Universidade Estadual de Campinas

Instituto de Química

Departamento de Química Orgânica



Dissertação de Mestrado

## "Versatilidade Enzimática:

## Triagem, Promiscuidade e Inibição de Enzimas"

Dissertação apresentada a Universidade Estadual de Campinas, como parte das exigências do programa de pós-graduação do Instituto de Química, para a obtenção do título de Mestre em Química na área de Química Orgânica.

Bruna Zucoloto da Costa Orientadora: Anita Jocelyne Marsaioli

CAMPINAS

18 de fevereiro de 2011

## FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE QUÍMICA DA UNICAMP

C823v	Costa, Bruna Zucoloto da. Versatilidade enzimática: triagem, promiscuidade e inibição de enzimas / Bruna Zucoloto da Costa Campinas, SP: [s.n], 2011.
	Orientadora: Profa. Dra. Anita Jocelyne Marsaioli.
	Mestrado - Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Química.
	<ol> <li>Triagem de alto desempenho. 2. Promiscuidade enzimática. 3. RMN. 4. Inibição de fosfatases.</li> <li>I. Marsaioli, Anita Jocelyne. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Química. III. Título.</li> </ol>

Título em inglês: Enzymatic versatility: screening, promiscuity and inhibition of enzymes

**Palavras-chaves em inglês:** High-throughput screening, Enzymatic promiscuity, NMR, Phosphatase inhibition

Área de concentração: Química Orgânica

Titulação: Mestre em Química na área de Química Orgânica

**Banca examinadora:** Profa. Dra. Anita Jocelyne Marsaioli (orientadora), Profa. Dra. Ana Paula Canedo Valente (IbqM-UFRJ), Prof. Dr. Paulo Mitsuo Imamura (IQ-UNICAMP)

Data de defesa: 18/02/2011

"Bom mesmo é ir a luta com determinação, abraçar a vida e viver com paixão, perder com classe e vencer com ousadia, porque o mundo pertence a quem se atreve, e a VIDA É MUITO, para ser insignificante!"

Charles Chaplin

Dedico este trabalho ao meu namorado Arnaldo e a minha mãe, sinônimos de amor e dedicação durante toda esta jornada! vii

### **AGRADECIMENTOS**

A Deus, pela vida;

A minha família, em especial a minha mãe, pelo apoio e orações, e a minha irmã Rubia, por mostrar que a vida não precisa ser complicada;

Ao meu namorado Arnaldo, meu melhor amigo e fiel companheiro;

A Profa Anita Jocelyne Marsaioli, pela orientação, amizade, e profissionalismo na realização deste trabalho;

Aos colaboradores deste trabalho, Profa Dra Laura Ottoboni e sua aluna Viviane D. Rodrigues, Profa Dra Carmen V. Ferreira e Dra Caroline C. S. Gonçalves.

Aos colegas de laboratório, Adriana, Carlinha, Carol, Célio, Dani, Diana, Felipe, Fran, Haleem, Lucas, Marcelo, Simone e Tiago, pelo auxílio e principalmente pela amizade e companhia;

Aos amigos que estão longe;

A Dona Maria, Fabi e Simone pelo auxílio concedido no dia-a-dia laboratorial;

Aos funcionários do Instituto de Química por toda a ajuda prestada, em especial aos colegas do laboratório de RMN e ao pessoal da secretaria de pós-graduação;

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológio (CNPq) pelo auxílio financeiro;

A Universidade Estadual de Campinas e ao Instituto de Química, pela oportunidade de realização deste trabalho e aos professores do Depto de Química Orgânica pelos conhecimentos transmitidos.

#### Muito Obrigada!

### Curriculum Vitae

### Bruna Zucoloto da Costa

#### Formação Acadêmica

2009 – 2011 Mestrado em Química. Universidade Estadual de Campinas, UNICAMP. Projeto: Versatilidade enzimática: triagem, promiscuidade e inibição de enzimas. Orientadora: Profa Dra Anita Jocelyne Marsaioli Bolsista do: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
2005 - 2008 Graduação em Química Bacharelado/Licenciatura/Tecnológica. Universidade Estadual de Londrina, UEL, Londrina, Brasil Projeto: Produção de Lipases e Lacases por *Botryosphaeria ribis* EC-01 e *Botryosphaeria rhodina* MAMB-05 sob Fermentação em Fase Sólida, em Tortas de Soja, Milho, Mamona e Azeitona.

Orientadora: Profa Dra Aneli de Melo Barbosa Bolsista do: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico.

### Produção Bibliográfica

### Artigos completos publicados em periódicos

Nogueira, G.C., **COSTA, Bruna Zucoloto da**, Crotti, A.E.M., Bragagnolo, N. *Synthesis of 7-Hydroperoxycholesterol and Its Separation, Identification, and Quantification in Cholesterol Heated Model Systems*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, v.58, p.10226 - 10230, 2010.

Messias, J.M., Costa, Bruna Zucoloto da, Lima, V.M.G., Dekker, R.F.H., Rezende, M.I., Krieger, N., Barbosa, A.M. *Screening Botryosphaeria species for lipases: Production of lipase by Botryosphaeria ribis EC-01 grown on soybean oil and other carbon sources*. Enzyme and Microbial Technology, v.45, p.426 - 431, 2009.

### Resumo de trabalhos científicos apresentados em congressos

GONÇALVES, C.C.S.; Costa, Bruna Zucoloto da, MARSAIOLI, A.J. *Monitoramento de Inibidores de Fosfatases com Sondas Fluorescentes*. Em: Cuarto Encuentro Regional de Biocatálisis y Biotransformaciones. Livro de Resumos. PAB-16.

MARSAIOLI, A.J., Costa, Bruna Zucoloto da, NMR Reveals Molecular Aspects of the Enzymatic Promiscuity. Em: World Wide Magnetic Resonance, Florence, Italy, 2010. Book of Abstracts, p. 214/P156.

**Costa, Bruna Zucoloto da**, MARSAIOLI, A.J. *A água explica promiscuidade enzimática e micelas por RMN*. Em: XI Jornada Brasileira de Ressonância Magnética, Curitiba, 2010. Livro de Resumos, p. 25/Tr12.

**Costa, Bruna Zucoloto da**, RODRIGUES, V.D., STOPPE, N.C., OTTOBONI, L., MARSAIOI, A.J. *Estudo do arsenal enzimático de bactérias isoladas de ambientes de mina de cobre*. Em: V Workshop de Biocatálise e Biotransformação, Maringá, 2010. Anais do V Workshop de Biocatálise e Biotransformação, T-32.

**Costa, Bruna Zucoloto da**, MARSAIOI, A.J. *Investigando a versatidade reacional das lipases*. Em: 33<sup>a</sup> Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, Águas de Lindóia, 2010. Anais da 33<sup>a</sup> Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, ORG-206/T1436-1.

NOGUEIRA, G.C., **Costa, Bruna Zucoloto da**, MARIUTTI, L.R.B., BRAGAGNOLO, N. *Synthesis and Identification of*  $7\alpha$ -hydroperoxycholesterol by 13C NMR and APCI-MS. Em: 3° Congresso BrMass, Campinas, 2009. Anais do 3° Congresso BrMass.

### **RESUMO**

## VERSATILIDADE ENZIMÁTICA: TRIAGEM, PROMISCUIDADE E INIBIÇÃO DE ENZIMAS

A versatilidade enzimática foi abordada nesta dissertação desde a triagem de microorganismos para a seleção de biocatalisadores adequados, e estudos de interações intermoleculares presentes em sistemas complexos de promiscuidade enzimática, até avaliação da inibição de enzimas relacionadas a ocorrência de diversas enfermidades. As triagens enzimáticas de micro-organismos isolados de água de drenagem de mina de prospecção de cobre permitiram a identificação de hidrolases e monoxigenases, sendo que as cepas de bactérias que apresentaram as melhores atividades oxidativas mostraram-se promissoras para oxidação de diversas classes de sulfetos, em ensaios de biocatálise convencional. A atuação promíscua de lipases foi avaliada frente a oxidação de cetonas cíclicas em meio orgânico, e as interações intermoleculares deste sistema foram estudadas por RMN, onde foi observado características de um sistema organizado em micelas reversas. A partir destas evidências, foi proposto que a condição necessária para a reação enzimática é o confinamento da enzima num ambiente aquoso restrito limitado por uma barreira molecular de ácido graxo. Finalmente a inibição da atividade enzimática de proteína tirosina fosfatases foi avaliada com implementação de uma metodologia fluorimétrica rápida e eficiente. Logo, este trabalho apresentou uma visão ampla no campo da enzimologia com o emprego de biocatalisadores, sejam eles enzimas isoladas ou células íntegras, em estudos relacionados a aspectos químicos, bioquímicos e terapêuticos das enzimas.

Palavras-chave: triagem de alto desempenho; promiscuidade enzimática; RMN; inibição de fosfatases.

### **ABSTRACT**

## ENZYMATIC VERSATILITY: SCREENING, PROMISCUITY AND INHIBITION OF ENZYMES

In this thesis the enzymatic versatility was evaluated in microorganisms selecting specific biocatalysts, in studies of intermolecular interactions of complex systems focusing enzyme promiscuity, and last in enzyme inhibition related to the occurrence of various diseases. The enzymatic screening of microorganisms isolated from copper mine water drainage led to the identification of hydrolases and monooxygenases, and bacterial strains with relevant oxidative activities were further investigated in larger scale oxidation of several sulfides. The promiscuous activity of lipases was evaluated in organic medium catalyzing the oxidation of cyclic ketones. The supramolecular interactions involved in these reactions were studied by NMR, revealing the presence of reverse micelles in a highly organized system. Therefore confinement of the enzyme in a restricted aqueous environment limited by a narrow molecular barrier of fatty acids in an organic medium is the necessary condition for this enzymatic reaction to occur. Finally, inhibition of enzymatic activity of protein tyrosine phosphatases was assessed with the implementation of a quick and efficient fluorimetric method. The data presented herewith provide a broad vision of enzyme application, as isolated enzymes or whole cells, in studies addressing chemical, biochemical and therapeutic issues.

Key-words: High-Throughput Screening; enzymatic promiscuity; NMR; phosphatase inhibition.

## <u>ÍNDICE</u>

LI	STA DE ABREVIATURAS xix
LI	STA DE TABELAS xxi
LI	STA DE FIGURASxxiii
LI	STA DE ESQUEMAS xxv
LI	STA DE ANEXOS xxvii
IN	TRODUÇÃO GERAL 1
OI	BJETIVOS
CA	APÍTULO I7
1.	Considerações Gerais9
2.	Resultados e Discussão15
3.	Conclusões Parciais e Perspectivas
CA	APÍTULO II
1.	Considerações Gerais
2.	Resultados e Discussão
3.	Conclusões Parciais e Perspectivas
CA	APÍTULO III63
1.	Considerações Gerais
2.	Resultados e Discussão
3.	Conclusões Parciais e Perspectivas
CC	ONSIDERAÇÕES FINAIS
PA	ARTE EXPERIMENTAL
A	NEXOS

## LISTA DE ABREVIATURAS

BSA	Albumina de Soro Bovino						
CAL-B	Lipase B de Candida Antarctica						
CCD	Cromatografia em Camada Delgada						
CG	Cromatografia Gasosa						
CG-DIC	Cromatografia Gasosa acoplada a Detector de Ionização de Chama						
CG-EM	Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massa						
E	Razão Enantiomérica						
ee	Excesso Enantiomérico						
EM	Espectrometria de Massa						
ESI-EM	Espectrometria de Massa por EletronSpray						
FID	Decaimento de indução livre						
HTS	Triagem de alto desempenho						
IC <sub>50</sub>	Concentração de inibidor que proporciona o decaimento de 50% da atividade enzimática						
k <sub>cat</sub>	Número de renovação enzimática						
$K_M$	Constante enzimática de Michaelis-Menten						
LMW-PTP	Proteína tirosina fosfatase de baixo peso molecular						
<i>m</i> -CPBA	Ácido <i>m</i> -cloroperbenzóico						
<i>p</i> -NPP	Fosfato de <i>p</i> -nitrofenila						
PP	Proteína Serina/Treonina fosfatases						
РТР	Proteína tirosina fosfatase						
RMN	Ressonância Magnética Nuclear						
SAXS	Espectrometria de espalhamento de Raio-X de baixo ângulo						
STD	Diferença de transferência de saturação						
$T_1$	Tempo de relaxação longitudinal						
$T_2$	Tempo de relaxação transversal						
UHP	Uréia-peróxido de hidrogênio						
V <sub>máx</sub>	Velocidade máxima enzimática						
3	Constante de especificidade enzimática						

## LISTA DE TABELAS

**Tabela 1.** Exemplos de enzimas relacionadas a diversas doenças e seus respectivos Tabela 2. Exemplos de produtos obtidos por processos industriais biocatalíticos......4 Tabela 3. Exemplos de micro-organismos utilizados na oxidação do fenilmetilsulfeto. Tabela 4. Conversões enzimáticas (%), determinadas por fluorimetria, das reações catalisadas pelas cepas de bactérias isoladas da amostra SO5 frente as sondas 1-9....16 Tabela 5. Conversões enzimáticas (%), determinadas por fluorimetria, das reações catalisadas pelas cepas de bactérias isoladas da amostra SO6 frente as sondas 1-9....16 Tabela 6. Conversões enzimáticas (%), determinadas por fluorimetria, das reações catalisadas pelas cepas de bactérias isoladas da amostra SO7 frente as sondas 1-9....17 Tabela 7. Conversões enzimáticas (%), determinadas por CG-EM, para as oxidações dos sulfetos 17-20, catalisadas pelas cepas pré-selecionadas nos ensaios de HTS, com Tabela 8. Conversões enzimáticas (%), determinadas por CG-EM, para as biorreações catalisadas pela cepa SO5-4 na presença dos substratos 17-20 e 28-32. . 24 **Tabela 9.** Exemplos de reações enzimáticas promovidas pela atuação promíscua de Tabela 10. Atividade enzimática das lipases comerciais determinada por titulação Tabela 11. Conversões enzimáticas (%), determinadas por CG-EM, das cetonas Tabela 12. Conversões enzimáticas (%), determinadas por CG-EM, para os ensaios de promiscuidade de lipases atuando em reações de oxidação de Baever-Villiger das **Tabela 13.** Variações dos tempos de relaxação  $T_1$  e  $T_2$  para o sistema reacional de oxidação da cetona cíclica 42 na ausência e presença da lipase de C. antarctica em 

<b>Tabela 14.</b> Variações dos tempos de relaxação $T_1$ e $T_2$ para o sistema reacional deoxidação da cetona cíclica 42 na ausência e presença da lipase de <i>C. cylindracea</i> emtolueno.60
<b>Tabela 15.</b> Variações dos tempos de relaxação $T_1$ e $T_2$ para o sistema reacional deoxidação da cetona cíclica 42 na ausência e presença da lipase de <i>C. cylindracea</i> embenzeno
<b>Tabela 16.</b> Conversão dos substratos <b>58</b> e <b>67</b> nos respectivos produtos de hidrólise,determinados por fluorescência e absorbância, em diversas concentrações de LMW-PTP
<b>Tabela 17.</b> Comparação das metodologias fluorimétrica e colorimétrica para adetecção da atividade de LMW-PTP
<b>Tabela 18.</b> Ensaios de competição entre os substratos 58 e 67 na presença da LMW-PTP.76
<b>Tabela 19.</b> Parâmetros utilizados para a realização dos experimentos de STD.         91
<b>Tabela 20.</b> Paramêtros utilizados para a realização dos experimentos de $T_1$ e $T_2$ 92
<b>Tabela 21.</b> Volumes das soluções 0,1 mol/L de Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> e KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> necessários para o preparo de soluções tampão Sφrensen em diversos pHs
<b>Tabela 22.</b> Volume da solução 0,05 mol/L de bórax necessário para o preparo desoluções tampão borato em diversos pHs.96
<b>Tabela 23.</b> Volumes das soluções 0,1 mol/L de ácido acético e acetato de sódionecessários para o preparo de soluções tampão acetato em diversos pHs

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Mercado Global Industrial de Enzimas (2008-2015)
<b>Figura 2.</b> Tipos de triagem utilizadas para selecionar enzimas em bibliotecas10
<b>Figura 3.</b> Cromatogramas de CG-EM: A) Controle dos substratos, e reações biocatalisadas pelas cepas B) SO5-4, C) SO5-9 e D) SO6-2, com 72 horas22
<b>Figura 4.</b> Cromatogramas de CG-EM das reações de oxidação dos sulfetos A) 17, B) <b>18</b> , C) <b>19</b> , D) <b>28</b> e E) <b>31</b> biocatalisadas pela cepa SO5-4 com 72 h
<b>Figura 5.</b> Cromatogramas de CG-DIC com coluna quiral das reações de oxidação dos sulfetos A) <b>17</b> e B) <b>28</b> biocatalisadas pela cepa SO5-4 com 120 h e 72 h, respectivamente.
Figura 6. Oito possíveis diastereoisômeros do sulfóxido 22
<b>Figura 7.</b> Cromatogramas de CG-DIC em coluna quiral de A) Padrão sintético do sulfóxido <b>22</b> , B) reação de oxidação do sulfeto <b>18</b> biocatalisada pela cepa SO5-4 com 48 h
Figura 8. Representação da cavidade oxianiônica das lipases
Figura 9. Representação esquemática do experimento de <i>STD</i> 41
Figura 10. Sequência de pulsos do experimento de <i>STD</i>
<b>Figura 11.</b> A relaxação leva a magnetização em <i>z</i> ao seu valor de equilíbrio e a magnetização em <i>x</i> , <i>y</i> a zero
<b>Figura 12.</b> Sequência de pulso do experimento de inversão-recuperação, utilizada para estimação do tempo de relaxação longitudinal, $T_1$
<b>Figura 13.</b> Sequência de pulso do experimento de CMPG, utilizada para estimação do tempo de relaxação transversal, <i>T</i> <sub>2</sub>
<b>Figura 14.</b> Teste com azul de metileno na presença de benzeno e $H_2O_2$ 30% e A) ácido octanóico, B) lipase de <i>C. cylindracea</i> , C) lipase de <i>C. cylindracea</i> e ácido octanóico.
Figura 15. Micela reversa de ácido octanóico formada em tolueno ou benzeno na presença de lipase

Figura 23. Curva de inibição da LMW-PTP na presença do inibidor Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>......77

Figura 24. Compostos avaliados nos ensaios de inibição da LMW-PTP......78

Figura 25. Curvas de inibição da LMW-PTP frente aos compostos A) 77 e B) 78...79

### LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 4. Reação de oxidação de Baeyer-Villiger mediada por perácidos orgânicos. 36 Esquema 5. Reação de oxidação Baeyer-Villiger catalisada por lipases através da Esquema 6. Mecanismo enzimático da peridrólise de ácidos carboxílicos catalisada Esquema 7. Substratos avaliados nos ensaios iniciais de promiscuidade enzimática de Esquema 8. Mecanismo da reação química de oxidação de Baeyer-Villiger na Esquema 9. Reação de oxidação de Baeyer-Villiger das cetonas cíclicas 42 e 55 em **Esquema 10.** Reações de fosforilação e desfosforilação de proteínas catalisadas por Esquema 12. Ensaio para determinação da atividade de fosfatases baseado em substratos fluorogênicos derivados de umbeliferona......67 **Esquema 13.** Rota sintética da sonda para detecção da atividade de proteína tirosina Esquema 14. Rota sintética da sonda para detecção da atividade de proteína serina-

Esquema 15. Abertura do anel lactônico do ânion umbeliferila (16) na presença	ı de
pH elevados.	71
-	
Esquema 16. Reação de hidrólise do <i>p</i> NPP na presença da PTP	74

### LISTA DE ANEXOS

Anexo 1. Espectro de massas obtido por EI (70 eV) do metilfenilsulfeto (28) 123
Anexo 2. Espectro de RMN de <sup>1</sup> H (499,88 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) do metilfenilsulfeto (28).123
Anexo 3. Espectro de RMN de <sup>13</sup> C (125,69 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) do metilfenilsulfeto (28)124
Anexo 4. Espectro de massas obtido por EI (70 eV) do etilfenilsulfeto (17)124
Anexo 5. Espectro de RMN de <sup>1</sup> H (499,88 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) do etilfenilsulfeto (17)125
<b>Anexo 6.</b> Espectro de RMN de ${}^{13}$ C (125,69 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) do etilfenilsulfeto (17)125
Anexo 7. Espectro de massas obtido por EI (70 eV) do metilfenilsulfóxido (33) 126
Anexo 8. Espectro de RMN de <sup>1</sup> H (499,88 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) do metilfenilsulfóxido (33).
Anexo 9. Espectro de RMN de <sup>13</sup> C (125,69 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) do metilfenilsulfóxido (33)
Anexo 10. Espectro de massas obtido por EI (70 eV) do etilfenilsulfóxido (21) 127
Anexo 11. Espectro de RMN de <sup>1</sup> H (499,88 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) do etilfenilsulfóxido (21).
Anexo 12. Espectro de RMN de <sup>13</sup> C (125,69 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) do etilfenilsulfóxido (21).
Anexo 13. Espectro de massas obtido por EI (70 eV) do 3-óxido de 2-metil-4-propil- 1,3-oxatiano (22)
<b>Anexo 14.</b> Espectro de RMN de <sup>1</sup> H (499,88 MHz, $CDCl_3$ ) do 3-óxido de 2-metil-4-propil-1,3-oxatiano ( <b>22</b> )
Anexo 15. Espectro de RMN de $^{13}$ C (125,69 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) do 3-óxido de 2-metil-4-propil-1,3-oxatiano (22)
Anexo 16. Espectro de massas obtido por EI (70 eV) do 2-(metilsulfinil)benzotiazol (23)
<b>Anexo 17.</b> Espectro de RMN de <sup>1</sup> H (499,88 MHz, $CDCl_3$ ) do 2-(metilsulfinil)benzotiazol ( <b>23</b> )

Anexo 18. Espectro de RMN de <sup>13</sup> C (125,69 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) do2- (metilsulfinil)benzotiazol (23)
<b>Anexo 19.</b> Espectro de massas obtido por EI (70 eV) da $\delta$ -decalactona ( <b>50</b> )
<b>Anexo 20.</b> Espectro de RMN de <sup>1</sup> H (499,88 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) da $\delta$ -decalactona ( <b>50</b> )132
<b>Anexo 21.</b> Espectro de RMN de <sup>13</sup> C (125,69 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) da $\delta$ -decalactona ( <b>50</b> )133
<b>Anexo 22.</b> Espectro de massas obtido por EI (70 eV) da δ-dodecalactona ( <b>56</b> ) 133
<b>Anexo 23.</b> Espectro de RMN de <sup>1</sup> H (499,88 MHz, $CDCl_3$ ) da $\delta$ -dodecalactona ( <b>56</b> ).
Anexo 24. Espectro de RMN de <sup>13</sup> C (125,69 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) da $\delta$ -dodecalactona (56).
Anexo 25. Espectro de massas obtido por EI (70 eV) da 7,8-epoxijasmona (54)135
Anexo 26. Espectro de RMN de <sup>1</sup> H (499,88 MHz, $CDCl_3$ ) da 7,8-epoxijasmona (54). 135
<b>Anexo 27.</b> Espectro de RMN de ${}^{13}$ C (125,69 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) da 7,8-epoxijasmona ( <b>54</b> ). 136
Anexo 28. Espectro de massas obtido por EI (70 eV) do 4-toluenossulfonato de 3- butenila (62)
Anexo 29. Espectro de RMN de <sup>1</sup> H (499,88 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) do 4-toluenossulfonato de 3-butenila (62)
<b>Anexo 30.</b> Espectro de RMN de ${}^{13}$ C (125,69 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) do 4-toluenossulfonato de 3-butenila ( <b>62</b> )
Anexo 31. Espectro de massas obtido por EI (70 eV) da <i>O</i> -(3-butenil)umbeliferona (63)
Anexo 32. Espectro de RMN de <sup>1</sup> H (499,88 MHz, $CDCl_3$ ) da $O$ -(3-butenil)umbeliferona (63)
Anexo 33. Espectro de RMN de ${}^{13}$ C (125,69 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) da $O$ -(3-butenil)umbeliferona (63)
Anexo 34. Espectro de massas obtido por EI (70 eV) da O-(3,4- diidroxibutil)umbeliferona (11)

<b>Anexo</b> diidroxi	<b>35.</b> butil)	Espectro umbelifero	de na ( <b>1</b>	RMN 1)	de	<sup>1</sup> H	(499,88	MHz,	CDCl <sub>3</sub> )	da 	<i>O</i> -(3,4- 140
<b>Anexo</b> diidroxi	<b>36.</b> butil)	Espectro umbelifero	de na ( <b>1</b>	RMN 1)	de	<sup>13</sup> C	(125,69	MHz,	CDCl <sub>3</sub> )	da	<i>O</i> -(3,4- 140
<b>Anexo</b> bis(dibe	<b>37.</b> nzil)f	Espectro osfonoxibu	de ıtil]u	RMN mbelife	de rona	<sup>1</sup> H ( <b>64</b> ).	(499,88	MHz,	CDCl <sub>3</sub> )	da	<i>O</i> -[3,4- 141
<b>Anexo</b> bis(dibe	<b>38.</b> nzil)fe	Espectro osfonoxibu	de ıtil]u	RMN mbelife	de rona	<sup>13</sup> C (64).	(125,69	MHz,	CDCl <sub>3</sub> )	da	<i>O</i> -[3,4- 141
<b>Anexo</b> difosfon	<b>39.</b> oxibu	Espectro itil)umbelif	de feron	RMN a ( <b>59</b> )	de	<sup>1</sup> H	(499,88	MHz,	CDCl <sub>3</sub> )	da	<i>O</i> -(3,4142
<b>Anexo</b> difosfon	<b>40.</b> oxibu	Espectro til)umbelif	de feron	RMN a ( <b>59</b> )	de	<sup>13</sup> C	(125,69	MHz,	CDCl <sub>3</sub> )	da	<i>O</i> -(3,4- 142
<b>Anexo</b> (dibenzi	<b>41.</b> 1)fosf	Espectro onoxiumbe	de elifer	RMN ona ( <b>60</b>	J de )	e <sup>1</sup> ]	H (499,	88 MF	Iz, CDC	Cl <sub>3</sub> )	da <i>O</i> - 143
<b>Anexo</b> (dibenzi	<b>42.</b> 1)fosf	Espectro onoxiumbe	de elifer	RMN ona ( <b>60</b>	de )	e <sup>13</sup>	C (125,	,69 MI	Hz, CDC	Cl <sub>3</sub> )	da <i>O</i> - 143
<b>Anexo</b> fosfonoz	<b>43.</b> xiumb	Espectro eliferona (	de 58)	RMN	J de	e <sup>1</sup> ]	H (499,	88 MF	Iz, CDC	Cl <sub>3</sub> )	da <i>O</i> - 144
<b>Anexo</b> fosfonoz	<b>44</b> . xiumb	Espectro eliferona (	de 58)	RMN	de	e <sup>13</sup>	C (125,	,69 MI	Iz, CDC	Cl <sub>3</sub> )	da <i>O</i> - 144

## INTRODUÇÃO GERAL

Enzimas são biopolímeros responsáveis pela catálise de reações químicas, podendo ser mais eficientes que muitos catalisadores sintéticos ou inorgânicos. Além de acelerarem a velocidade de reações, elas apresentam elevado grau de especificidade e atuam sob condições reacionais brandas.<sup>1</sup>

Estas macromoléculas são essenciais a uma grande parte dos processos biológicos, pois catalisando centenas de reações degradam nutrientes, conservam e transformam a energia química, e participam da construção de moléculas.<sup>1</sup> A deficiência ou total ausência de uma ou mais enzimas pode ser causa de muitas doenças, principalmente as de origem genética (Tabela 1). A superexpressão de uma determinada enzima também pode acarretar uma série de enfermidades, como é o caso de diversos tipos de cânceres. Assim, muitos fármacos atuam interagindo diretamente com as enzimas, inibindo ou ativando-as.<sup>2</sup>

Doença / Condição	Enzima Alvo	Inibidor / Fármaco		
Herpes	DNA polimerase viral	Aciclovir		
Inflamação, dor, febre	Ciclo-oxigenase	Aspirina		
Úlcera	H <sup>+</sup> , K <sup>+</sup> - ATPase	Omeprazol		
Transplante de órgão	Ciclofilina / Calcineurina	Ciclosporina		
Disfunção erétil	Fosfodiesterase	Viagra, Levitra		
AIDS	HIV protease	Amprenavir, Ritonavir, etc.		
Glaucoma	Anidrase carbônica	Acetazolamida		
Hipertensão	Angiotensina	Captopril		
Doença de Parkinson	Dopa descarboxilase	Cardidopa		

Tabela 1. Exemplos de enzimas relacionadas a diversas doenças e seus respectivos inibidores (fármacos)<sup>3</sup>

 <sup>&</sup>lt;sup>1</sup> Nelson, D.L.; Cox, M.M. Lehninger: Principles of Biochemistry, 5<sup>a</sup> ed. W.H. Freeman and Company, 2008.
 <sup>2</sup> Robertson, J.G.; *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **2007**, *17*, 674-679.
 <sup>3</sup> Navia, M.A.; Murcko, M.A. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **1992**, *2*, 202–210.

### INTRODUÇÃO

No entanto, a importância das enzimas vai além da bioquímica e da medicina, sendo empregadas em vários processos industriais. Estas macromoléculas são catalisadores notáveis, capazes de aceitar uma grande variedade de moléculas complexas como substratos, e catalisar reações quirais com requinte inigualável, apresentando elevada enantio e regiosseletividade. Portanto, os biocatalisadores podem ser utilizados em transformações simples e complexas, sem a necessidade de realizar as fastidiosas etapas de proteção e desproteção de moléculas, que são comumente necessárias em síntese orgânica enantio e regiosseletiva.<sup>4</sup> Além disso, a utilização de catalisadores biológicos está inserida no conceito de biotecnologia branca e química verde, sendo uma alternativa amigável as catálises convencionais, pois atuam em ambientes brandos e são biodegradáveis.<sup>5</sup>

Esses atributos têm resultado em milhares de aplicações, especialmente nas indústrias alimentícia e farmacêutica, onde a elevada estereosseletividade da reação é fundamental. Exemplos incluem a produção de xarope de milho rico em frutose, pela ação da xilose isomerase, que catalisa isomerização da *D*-glicose para *D*-frutose; e a preparação da penicilina semi-sintética catalisada pela penicilina amidase.<sup>4</sup>

Uma pesquisa realizada pela BCC Research revela que o mercado global industrial de enzimas foi estimado em US \$ 3,3 bilhões em 2010, sendo que o mesmo deve chegar a 4,4 bilhões dólares em 2015, uma taxa de crescimento anual de 6%. O mercado de enzimas técnicas foi avaliado em mais de US \$ 1 bilhão, sendo que as maiores vendas destas enzimas ocorreram no mercado de couro e bioetanol. O segmento de enzimas para a produção de alimentos e bebidas foi avaliado em US \$ 975 milhões, sendo os maiores investimentos realizados no setor de laticínios. <sup>6</sup> (Figura 1)

<sup>&</sup>lt;sup>4</sup> Schimid, A.*et al. Nature*, **2001**, *409*, 258-267.

<sup>&</sup>lt;sup>5</sup> Alcade, M. et.al, Trend in Biotechnol. **2006**, *24(6)*, 281-287.

<sup>&</sup>lt;sup>6</sup> Enzymes in Industrial Applications: Global Markets. <u>http://www.bccresearch.com/report/BIO030F.html</u>.



Figura 1. Mercado Global Industrial de Enzimas (2008-2015). Fonte: BCC Research.<sup>6</sup>

Entretanto a aplicação industrial da biocatálise é ainda limitada, devido a baixa disponibilidade de enzimas comerciais em grande quantidade, baixa estabilidade e atividade enzimática em solventes não aquosos, além das limitações no transporte de massa de sistemas de células íntegras.<sup>7</sup>

Para superar as dificuldades intrínsecas aos processos biocatalíticos, a seleção de enzimas adequadas é uma etapa determinante. Para isto, a triagem na natureza de micro-organismos ou outros seres vivos que apresentem a atividade enzimática requerida é ainda a alternativa mais viável.<sup>8</sup>

Neste enfoque, um processo biocatalítico pode ser realizado na presença de enzimas isoladas ou células íntegras. A vantagem da utilização de enzimas puras ou parcialmente purificadas está na sua elevada especificidade, maior produtividade e facilidade de isolamento dos produtos, embora o custo, disponibilidade e estabilidade das mesmas possam inviabilizar sua aplicação. No caso da utilização de células íntegras, o baixo custo e a regeneração autônoma de co-fatores são as principais vantagens, porém reações paralelas advindas do metabolismo celular, reversibilidade, e baixa tolerância a substratos e solventes orgânicos podem não favorecer a aplicabilidade deste processo.<sup>9</sup>

<sup>&</sup>lt;sup>7</sup> Oliveira, L.G.; Mantovani, S.M. *Quim. Nova*, **2009**, *32(3)*, 742-756. <sup>8</sup> Barreiro, E.J.; Bolzani, V.S. *Quim. Nova*, **2009**, *32(3)*, 679-688.

<sup>&</sup>lt;sup>9</sup> Bommarius, A.S.; Riebel, B.R. *Biocatalysis: Fundamentals and Applications*. Wiley-VCH, 2004.

А

Tabela 2 apresenta alguns exemplos de processos biocatalíticos aplicados por indústrias químicas.

Produto	Aplicação	Enzima	Micro-organismo	Empresa
Aspartame	Síntese de betalactamas	Termosilina	Bacillus thermoproteolyticus	DSM
(S)-fenilalanina	Síntese de betalactamas	Hidrolase	Bacillus lichiniformis	Coca-Cola
Diatizen	Hipertensão e angina	Redutase	Nocardia salmonicolor	Bristol-Myers Squibb
Agonista beta-3	Diabetes tipo II e hipertensão	Desidrogenase	Candida sorbophila	Merck
Rupinavir	Inibidor da protease do rinovírus	Lactato desidrogenase	Leuconostoc mesenteroides	Pfizer
6-hidróxinicotinato	Intermediário para inseticidas	Ácido nicotínico hidroxilase	Achnobacter xylosoxidans	Lonza AG
Terc-leucina	Intermediário de agentes anti-tumor	Leucina desidrogenase	Bacillus sphaericus	Degussa AG
BMS-180542	Anticolesterol	Álcool desidrogenase	Acinobacter calcoaceticus	Bristol-Myers Squibb
Enalapril	Anti- hipertensivo	Lactato desidrogenase	Sttaphylococcus epidermis	Ciba

**Tabela 2.** Exemplos de produtos obtidos por processos industriais biocatalíticos.<sup>10</sup>

Logo, os biocatalisadores tornaram-se alvos de intensa investigação nas mais diversas áreas científicas, sendo o estudo de suas propriedades e aplicações de extrema importância para o desenvolvimento de novas biotecnologias.

<sup>&</sup>lt;sup>10</sup> Bon, E.P.S.; Ferrara, M.A.; Corvo, M.L. *Enzimas em Biotecnologia: Produção, Aplicação e Mercado.* Editora Interciência, **2008.** 

### **OBJETIVOS**

Neste trabalho, foi proposto enfocar três diferentes aspectos enzimáticos: triagem, promiscuidade e inibição.

#### Capítulo I:

A triagem enzimática em busca de novos biocatalisadores é de extrema importância, pois estes encontram aplicações nos mais diversos processos industriais. Visto isto, o primeiro objetivo desta dissertação foi avaliar diversos micro-organismos isolados de mina de prospecção de cobre para a triagem de hidrolases e monoxigenases utilizando técnicas de triagem de alto desempenho, e sulfoxidases por biocatálise convencional.

#### Capítulo II:

A promiscuidade enzimática é o termo empregado para a ação enzimática em reações distintas das catalisadas *"in natura"*. Assim, O segundo objetivo desta dissertação foi avaliar ao nível molecular as reações de oxidação de Baeyer-Villiger de cetonas cílcicas, em solventes orgânicos, promovidas por lipases.

#### Capítulo III:

A inibição de proteína fosfatases está intimamente ligada ao tratamento de diversos tipos de doenças. Assim, estudar e validar uma metodologia para a detecção e inibição de proteína fosfatases utilizando sondas fluorescentes, mais sensíveis que as sondas colorimétricas padrões, é importante para a descoberta de novos fármacos e constitui o terceiro objetivo da dissertação.

# **CAPÍTULO I**

"Triagem Enzimática de Micro-organismos Isolados de Água de Drenagem de Mina de Prospecção de Cobre"
# 1. Considerações Gerais

A sociedade humana vem sendo continuamente confrontada pelo alerta da degradação ambiental e alteração climática, o que demanda novas posturas em relação aos dogmas tradicionais da economia de mercado. A preocupação com as questões ambientais, com a qualidade dos produtos e com o consumo de energia, vem incentivando vários setores industriais a buscar tecnologias mais limpas e eficientes. Neste contexto, a tecnologia enzimática surge como uma alternativa para a substituição gradual de processos químicos por processos biocatalisados.

O crescente interesse pela aplicação de processos biocatalíticos promove uma constante busca por novos biocatalisados. Atualmente, técnicas de engenharia genética estão sendo amplamente utilizadas nestas buscas. Entre elas, encontram-se as técnicas de metagenômica e evolução dirigida, que propiciam a obtenção de cepas microbianas transformadas que produzem enzimas capazes de catalisar reações com elevada razão enantiomérica (E).<sup>11</sup> Embora alguns biocatalisadores sejam até hoje extraídos de tecidos animais e vegetais, a grande maioria das enzimas é obtida a partir de micro-organismos. Assim, a triagem de cepas microbianas em amostras de solo, água, ar, madeira, frutos, e principalmente em amostras oriundas de ambientes extremos e restritos, é o procedimento mais utilizado, visto que, devido a elevada biodiversidade terrestre, novos biocatalisadores com funções singulares podem ser descobertos a cada nova coleta.

Para a realização de uma triagem eficiente é imprescindível a disponibilidade de ensaios enzimáticos, que são protocolos experimentais para a detecção de reações químicas catalisadas por enzimas. De maneira geral, estas triagens podem ser realizadas de três formas distintas, como apresentado na Figura 2.<sup>12</sup>

<sup>&</sup>lt;sup>11</sup> Otten, L.G.; Hollmann, F.; Arends, I.W.C.E. *Trends Biotechnol.*, **2009**, *28*, 46-54.

<sup>&</sup>lt;sup>12</sup> Marsaioli, A.J.; Porto, A.L.M. *Biocatálise e Biotransformação: Fundamentos e Aplicações.* Editora Schoba, **2010**.



**Figura 2.** Tipos de triagem utilizadas para selecionar enzimas em bibliotecas. Fonte: Adaptado de Marsaioli & Porto, 2010.<sup>12</sup>

A triagem com células em crescimento, utilizando métodos colorimétricos ou de seleção genética, somente revela a presença da atividade enzimática e é usada para a avaliação preliminar de grandes bibliotecas (10<sup>10</sup> indivíduos). Os testes em microplacas são realizados para bibliotecas com até 10<sup>5</sup> indivíduos, e comumente fornecem o parâmetro de conversão do substrato avaliado no produto de interesse. Finalmente, visando avaliar um ou vários substratos, assim como uma determinada reação de interesse, são realizados ensaios na escala de 1 a 10 mg de substrato, sendo o desenvolvimento da reação acompanhado por CG, HPLC, EM ou RMN.<sup>12</sup>

É essencial ressaltar que não existe um ensaio enzimático universal e que o desenvolvimento de estratégias eficientes para cada alvo é um grande desafio. Assim, a área de desenvolvimento de novos ensaios rápidos e convenientes para a detecção de atividades enzimáticas continua em expansão.<sup>13</sup>

<sup>&</sup>lt;sup>13</sup> Reymond, J.L. *Enzyme Assays: High-Throughput Screnning , Genetic Selection and Fingerprint.* Wiley-VCH, **2006**. 10

Os ensaios enzimáticos em microplacas são os mais utilizados, sendo realizados no formato de triagem de alto desempenho (HTS, do inglês High Throughput *Screnning*), constituindo uma ferramenta essencial para a prospecção de enzimas, pois possibilitam uma análise rápida e eficiente das reações químicas catalisadas pelas mesmas. Dentre as várias metodologias existentes, os ensaios envolvendo sondas cromogênicas e fluorogênicas, são os mais utilizados, e consistem no uso de substratos capazes de liberar um cromóforo ou fluoróforo, como consequência da reação enzimática, e que podem ser facilmente detectados por espectrofotometria UV-VIS.<sup>14</sup>

Ensaios que envolvem a utilização de sondas fluorogênicas são extremamente vantajosos quando comparados aos que utilizam sondas cromogênicas, pois permitem elevada sensibilidade e necessitam de pequena concentração de substrato no meio reacional.15

Um modelo de ensaio enzimático utilizando sondas fluorogênicas derivadas de umbeliferona foi proposto por Reymond e colaboradores<sup>16</sup> para enzimas isoladas, sendo adaptado em conjunto com o nosso grupo de pesquisa para células íntegras.<sup>17</sup> O ensaio consiste em uma sequência de reações, no qual, após a catálise enzimática, os substratos fluorogênicos 1-9 dão origem aos produtos 10-15, que pela ação de NaIO<sub>4</sub> e/ou BSA liberam o ânion umbeliferona, que é fluorescente e pode ser detectado a 460 nm (Esquema 1). No caso da ação das hidrolases sobre as sondas 1-5, os produtos obtidos são os dióis 10 ou 11 e no caso da atuação de monoxigenases sobre as sondas 6-9 os produtos obtidos são os compostos 12-15, ésteres ou lactonas das respectivas sondas.<sup>18</sup>

<sup>&</sup>lt;sup>14</sup> Janzen, W.P. *High-Throughput Screnning: Methods and Protocols.* v.190. Humana Press, 2002.
<sup>15</sup> Reymond, J.L. *Ann. N.Y. Acad. Soc.*, 2008, *1130*, 12-20.
<sup>16</sup> Klein, G.; Reymond, J.L. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 1998, *8*, 1113-1116.
<sup>17</sup> Bicalho, B. *et al. J. Braz. Chem. Soc.* 2004, *6*, 911-916.
<sup>18</sup> Wahler, D. Devrend, J.L. *Curr. Opin. Biotechnol.* 2001, *12*, 525, 544.

<sup>&</sup>lt;sup>18</sup> Wahler, D.; Reymond, J.L. *Curr. Opin. Biotechnol.* **2001**, *12*, 535-544.



Esquema 1. Modelo de ensaio enzimático utilizando sondas fluorogênicas derivadas de umbeliferona para a triagem de hidrolases e monoxigenases.

EPH = epóxido hidrolases, EST = esterases, BVMO = Baeyer-Villiger Monoxigenases, Cum = Cumarina, BSA = albumina de soro bovino.

Neste trabalho, micro-organismos heterotróficos, isolados de água de drenagem oriunda de mina de prospecção de cobre, foram triados para atividade de hidrolases e monoxigenases por técnica de HTS. Sulfoxidases (monoxigenases que catalisam a oxidação de sulfetos a sulfóxidos) foram melhor avaliadas por biocatálise convencional.

Os sulfóxidos foram escolhidos como principal alvo de estudo devido a sua ampla aplicabilidade em química e bioquímica. Eles ocorrem em diversos produtos naturais (precursores de sabores e aromas)<sup>19</sup>, compostos com atividade biológica (potenciais fármacos) e metabólitos<sup>20</sup>, além de serem amplamente utilizados em química orgânica sintética, como auxiliares quirais e materiais de partida assimétricos.<sup>21</sup>

A oxidação enzimática de sulfetos pode ser realizada por enzimas do tipo cicloexanona monoxigenase, cloroperoxidase, citocromo P-450, tolueno e naftaleno dioxigenase, entre outras.<sup>22</sup> Porém, a utilização destas enzimas isoladas em larga escala é ainda inviável devido aos seus altos custos, e a necessidade de adição de cofatores ou de um sistema de regeneração dos mesmos. No entanto, em um processo biocatalítico utilizando células íntegras estas condições adversas são superadas pelo baixo custo da reciclagem natural de co-fatores.

Micro-organismos isolados de ambiente de mina de cobre são descritos na literatura por catalisarem a oxidação de compostos de ferro e enxofre (principalmente inorgânico).<sup>23</sup> Esta característica é justificada pelo fato de que os dois principais tipos de minérios de cobre encontrados "in natura" são a calcopirita (CuFeS<sub>2</sub>) e a calcosita ( $Cu_2S$ ), ambos contendo enxofre.<sup>24</sup>

Diversos micro-organismos já foram relacionados a oxidação de sulfetos orgânicos, sendo que os resultados obtidos são interessantes e promissores, indicando

 <sup>&</sup>lt;sup>19</sup> Kusterer, J.; Keusgen, M. *J. Agric. Food Chem.*, **2010**, *58*, 1129-1137.
 <sup>20</sup> Bentley, R. *Chem. Soc. Rev.* **2005**, *34*, 609-624.

 <sup>&</sup>lt;sup>21</sup> Pellisier, H. *Tetrahedron*, **2006**, *62*, 5559-5601.
 <sup>22</sup> Holland, H.L. *Nat. Prod. Rep.*, **2001**, *18*, 171-181.
 <sup>23</sup> Tuttle, J.H.; Randles, C.I.; Dugan, P.R. *J. Bacteriol.*, **1968**, *95*, 1495-1503.
 <sup>24</sup> Moskalyk, R.R.; Alfantazi, A.M. *Min. Eng.*, **2003**, *16*, 893-919.

que processos biocatalíticos utilizando células íntegras podem ser convenientemente empregados para tal fim.<sup>25</sup> A Tabela 3 apresenta alguns exemplos de microorganismos empregados na oxidação do fenilmetilsulfeto.

Micro-organismo	Tempo (h)	Conversão (%)	ee	Configuração	Ref.
Rhodococcus sp. ECU0066	30	44,2	99	S	25(a)
Irpec lacteus CCB 196	96	91	26	S	25(b)
Pycnoporus sanguineus CCB 501	192	67	35	S	25(b)
Trametes rigida CCB 285	24	32	19	S	25(b)
Trametes versicolor CCB 202	192	87	31	S	25(b)
Trametes villosa CCB 291	192	90	16	S	25(b)
Trichaptum byssogenum CCB 203	96	67	21	S	25(b)
Pseudomonas frederiksbergensis DSM13022	18	87	91	S	25(c)
Aspergillus terreus CCT 3320	96	96	95	S	25(d)
Helminthosporium sp NRRL 4671	48	30	48	S	25(g)

Tabela 3. Exemplos de micro-organismos utilizados na oxidação do fenilmetilsulfeto.

<sup>&</sup>lt;sup>25</sup> (a) Li, A-T. *et al. Appl. Environ. Microbiol.* 2009, *75*, 551-556. (b).Ricci, L.C. *et al. Enz. Microbiol. Technol.*, 2005, *36*, 937-946. (c) Adam, W. *et al. Tetrahedron: Asymm.*, 2004, *15*, 983-985. (d) Porto, A.L.M. *et al. J. Mol. Catal. B: Enzym.*, 2002, *19*, 327-334. (e) Holland, H.L.; Andreana, P.R.; Brown, F.M. *Tetrahedron: Asymm.*, 1999, *10*, 2833-2843. (f) Chen, G. *et al. New. J. Chem.*, 1999, *23*, 827-832. (g) Holland, H.L.; Bornmann, N.J.; Lakshmaiah, G. *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, 1996, *1*, 97-102.

# 2. Resultados e Discussão

Os micro-organismos estudados neste trabalho foram isolados de três diferentes fontes de água de drenagem de mina de prospecção de cobre, pertencentes a empresa Vale, e localizadas na Província Mineral dos Carajás, no estado do Pará. Todo o procedimento de isolamento das cepas foi realizado pelo grupo de pesquisa da Profa Laura Ottoboni (CBMEG – UNICAMP). Das três diferentes fontes foram isoladas um total de 56 cepas de bactérias heterotróficas. Dentre estas, 18 são provenientes da amostra intitulada SO5, 23 da amostra SO6 e 15 da amostra SO7. A identificação mais detalhada das amostras é mantida sob sigilo pela empresa Vale, que financia parte deste trabalho.

Estas 56 cepas bacterianas foram triadas para atividade enzimática de epóxidohidrolases, esterases e monoxigenases utilizando diversas sondas fluorogênicas (Esquema 1) através de técnicas de triagem de alto desempenho (*HTS*). O procedimento utilizado foi detalhado no item 7 da Parte Experimental deste trabalho de dissertação.

Os resultados obtidos nas triagens enzimáticas estão listados nas Tabela 4-6. As reações foram consideradas positivas quando as porcentagens de conversão do substrato avaliado no produto de interesse foram superiores a 5% (valores apresentados em vermelho). Para a triagem de hidrolases foram considerados os ensaios com até 24 horas e para a triagem de monoxigenases com até 72 horas, visto que a expressão das últimas ocorre comumente mais tarde no ciclo celular.

Observou-se que as 56 cepas avaliadas apresentaram atividades distintas frente as diversas sondas fluorogênicas testadas, sendo que as cepas isoladas da fonte SO5 se destacaram quando comparadas as cepas isoladas das fontes SO6 e SO7, principalmente para a produção de enzimas oxidativas.

15

	P									
Conos	Sondas									
Cepas	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
SO5-1	2		1	29	4		7	5		
SO5-2	2			1	1	12		9		
SO5-3	2		45							
SO5-4	1					1	16	1		
SO5-5	1			2	1	7	14	2		
SO5-6	1		>99	21				1		
SO5-7			1	10	5	30		4		
SO5-8			63	1						
SO5-9	2					21	5	4		
SO5-10			1	17	1	29				
SO5-13	3		>99	11			3	4		
SO5-14			76	10			1			
SO5-16			64	3						
SO5-17			70	5						
SO5-18	2		90	8		1	3	8		
SO5-19			2	18						
SO5-20										
SO5-21			76	2						

**Tabela 4.** Conversões enzimáticas (%)<sup>a</sup>, determinadas por fluorimetria, das reações catalisadas pelas cepas de bactérias isoladas da amostra SO5 frente as sondas **1-9**.

<sup>a</sup>Parte Experimental – item 7: procedimento dos ensaios e cálculo da % de conversão.

Tabela 5.	Conversões	enzimáticas	$(\%)^{a}$ ,	determinadas	por	fluorimetria,	das	reações
catalisadas	pelas cepas	de bactérias	isolada	as da amostra	SO6	frente as sono	das 1	L <b>-9</b> .

Conos	Sondas									
Cepas	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
SO6-1				3	1					
SO6-2	1		3	56		1	29			
SO6-3			1	19						
SO6-4				15						
SO6-5			84	6						
SO6-6	1		33							
SO6-7	1		89	2		2	2	3		
SO6-8			69	3						
SO6-9			57							
SO6-10										
SO6-11				1						
SO6-12	1		14	>99		2	3	6		
SO6-13										
SO6-14			2	17				3		
SO6-15			88	18						
SO6-16			1	15						
SO6-17										
SO6-18	3	1	5	33		2	2	4		
SO6-19				9						
SO6-20	1		82	3						
SO6-21				1						
SO6-22			75	4						
SO6-23										

<sup>a</sup>Parte Experimental – item 7: procedimento dos ensaios e cálculo da % de conversão.

Canaa					Sondas				
Cepas	1	2	3	4	5	6	7	8	9
SO7-1			3	13	2				
SO7-2	2		2	27	11	1	2	7	
SO7-3		4	91	46					
SO7-4				1					
SO7-5									
SO7-6			25	12	1				
SO7-7	1		>99	4					
SO7-8			19	11	2				
SO7-9			1	13					
SO7-10			>99	3					
SO7-11			80						
SO7-12			10	11					
SO7-13				31					
SO7-14	1		21	11					
SO7-15			>99	4					

**Tabela 6.** Conversões enzimáticas  $(\%)^a$ , determinadas por fluorimetria, das reações catalisadas pelas cepas de bactérias isoladas da amostra SO7 frente as sondas **1-9**.

<sup>a</sup>Parte Experimental – item 7: procedimento dos ensaios e cálculo da % de conversão.

Os resultados apresentados nas Tabela 4-6 mostram que com 24 horas de ensaio nenhuma linhagem de micro-organismo foi capaz de hidrolisar as sondas 1 e 2, características para a triagem de epóxido-hidrolases. Somente foi observado atividade frente a estes substratos após 72 horas de reação (resultados não apresentados). Neste caso, 12 cepas catalisaram a hidrólise do epóxido terminal 1, e uma cepa do epóxido *cis*-dissubstituído 2, em porcentagens de conversão inferiores a 10%, o que torna a aplicação direta destes biocatalisadores pouco atrativa.

É notável que as enzimas hidrolíticas, em sua maioria, são expressas em grande quantidade nas etapas iniciais do ciclo celular, devido a sua participação intensa na metabolização de nutrientes. Assim, observou-se nos ensaios de *HTS* realizados com 24 horas que 75% das cepas avaliadas mostrou-se ativa frente as sondas **3** e **4**, específicas para a triagem de esterases que catalisam a hidrólise de ésteres de cadeia curta (acetatos e propionatos, respectivamente). Vale ressaltar que 27 cepas (9 de cada amostra analisada) promoveram a hidrólise do composto **3**, sendo que destas, 5 cepas apresentaram conversões maiores que 99%. Além disso, 27 cepas (8 da fonte SO5, 10 da SO6 e 9 da SO7) catalisaram a hidrólise da sonda **4**, sendo que a cepa SO6-12 apresentou conversão superior a 99%.

#### CAPÍTULO I: Resultados e Discussão

Os resultados obtidos para as sondas **3** e **4** ainda permitiram organizar os microorganismos avaliados em quatro grupos distintos. O primeiro grupo corresponde as 15 cepas que catalisaram seletivamente a hidrólise de ésteres de acetato, como SO7-7, 10 e 15. O segundo grupo é representado pelas 15 cepas que foram seletivas para a hidrólise de ésteres de propionato, como SO5-1 e SO6-2. O terceiro grupo é formado pelas 12 cepas que não discriminaram entre os dois substratos, como SO7-3 e 8, sendo que este comportamento pode ser explicado pela presença de esterases não seletivas, ou de dois tipos distintos destas enzimas. E o último grupo é constituído pelas 14 cepas que não apresentaram nenhuma atividade de esterase, como SO5-4, SO6-10 e SO7-5.

Somente duas linhagens (SO5-7 e SO7-2) foram capazes de hidrolisar o composto **5**, específico para a seleção de esterases que catalisam a hidrólise de ésteres de cadeia média, indicando que as linhagens de bactérias heterotróficas avaliadas possuem elevada seletividade por ésteres de cadeia curta.

Apenas 11 cepas, das 56 avaliadas, apresentaram atividade oxidativa frente as sondas fluorogênicas **6-9**. As linhagens SO5-2, 5, 7, 9 e 10 catalisaram a conversão da cetona **6** no seu respectivo éster **12**; as linhagens SO5-1, 4, 5 e SO6-2 oxidaram a cetona cíclica **7** em sua respectiva lactona **13**; e as linhagens SO5-2, 18, SO6-12 e SO7-2 catalisaram a oxidação da sonda **8** na lactona **14**. Nenhuma das cepas avaliadas oxidou a sonda **9**.

Apesar dos micro-organismos isolados de ambiente de mina de cobre serem descritos por catalisarem reações de oxidação, esta é uma característica principal dos organismos litotróficos, caracterizados por utilizarem compostos inorgânicos como fonte de energia. Os resultados obtidos nos ensaios enzimáticos de *HTS* mostraram que as bactérias heterotróficas isoladas desta fonte não apresentaram eficiência apreciável nas reações de oxidação avaliadas, porém merecem maior atenção em reações de oxidação de sulfetos orgânicos.

Com um total de aproximadamente 2000 experimentos, que somente foram possíveis de serem executados devido a utilização das técnicas de *HTS*, parte do arsenal enzimático presente nos micro-organismos avaliados foi efetivamente detectado. Atividades hidrolíticas foram encontradas em 75% das cepas, distribuídas igualmente entre todas as fontes, mas somente 20% das cepas avaliadas apresentaram atividades oxidativas, sendo que 73% destas foram isoladas da fonte SO5.

Portanto, a técnica de triagem de alto desempenho foi bastante útil para o estudo do potencial enzimático de micro-organismos oriundos de ambiente de mina de prospecção de cobre. Tais ambientes foram ainda pouco explorados microbiologicamente, e devido as condições restritas comumente presentes, como baixos pHs, elevada concentração de sais, baixa concentração de nutrientes, entre outras, a probabilidade de seleção de micro-organismos adequados para as condições requeridas em reações químicas é elevada.

Esta triagem rápida permitiu selecionar as cepas SO5-1, 2, 4, 5, 7, 9, 10 e SO6-2, que apresentaram as melhores atividades oxidativas, e que foram encaminhadas a testes de biocatálise convencional específicos, no formato de multibiorreação, visando determinar a aplicabilidade destes biocatalisadores na oxidação de várias classes de sulfetos.

Os substratos **17-20** (Esquema 2) foram utilizados para a triagem de sulfoxidases por técnica de multibiorreação. O substrato **18** foi utilizado em uma mistura 3:1 de seus isômeros *cis* e *trans*, respectivamente. Vale ressaltar que estes compostos foram selecionados de modo a permitir a avaliação das mais variadas classes de sulfetos, possibilitando um estudo dinâmico das reações de oxidação catalisadas pelos micro-organismos avaliados.



**Esquema 2.** Substratos utilizados para a triagem de sulfoxidases em ensaios de multibiorreação e os respectivos possíveis produtos de oxidação.

Os ensaios biocatalíticos foram realizados em tampão Sørensen pH 7,0, na presença de células íntegras em repouso e dos substratos a serem testados. As reações foram interrompidas após 72 e 120 horas, sendo extraídas com acetato de etila e analisadas por CG-EM. O procedimento detalhado está descrito no item 8 da Parte Experimental.

A Tabela 7 apresenta os valores de conversões enzimáticas para as multibiorreações catalisadas pelas 8 cepas pré-selecionadas.

**Tabela 7.** Conversões enzimáticas (%)<sup>a</sup>, determinadas por CG-EM, para as oxidações dos sulfetos **17-20**, catalisadas pelas cepas pré-selecionadas nos ensaios de *HTS*, com 72 h.

Cepas ——		Subst	ratos	
	17	18	19	20
SO5-1	3	-	-	-
SO5-2	-	-	-	-
SO5-4	18	11	5	-
SO5-5	7	-	-	-
SO5-7	11	-	-	-
SO5-9	25	11	10	-
SO5-10	4	-	-	-
SO6-2	10	11	6	-

<sup>a</sup>Cálculo das conversões reacionais descrito no item 8 da Parte Experimental.

Com exceção da cepa SO5-2, todas as outras sete bactérias avaliadas catalisaram a oxidação de pelo menos um dos substratos, sendo o sulfeto **17** preferencial em todos os casos. Nenhum micro-organismo foi capaz de oxidar o substrato **20**. O produto de oxidação de **19** foi identificado como sendo o sulfóxido **24**, visto que o enxofre externo ao anel benzotiazol é eletronicamente mais disponível que o interno. Todos os produtos reacionais foram confirmados por co-injeção em CG-EM com seus respectivos padrões sintéticos.

Vale destacar as cepas SO5-4, SO5-9 e SO6-2 que apresentaram as melhores conversões reacionais, além de oxidarem os substratos **17**, **18** e **19** aos seus respectivos sulfóxidos **21**, **22** e **24**. Os cromatogramas das reações biocatalisadas por estas cepas estão representados na Figura 3.



CAPÍTULO I: Resultados e Discussão

**Figura 3.** Cromatogramas de CG-EM: A) Controle dos substratos, e reações biocatalisadas pelas cepas B) SO5-4, C) SO5-9 e D) SO6-2, com 72 horas.

Condições de análise: 50-200 °C a 10 °C/min, 200-300 °C a 20 °C/min, onde permaneceu constante por 5 min. Mais detalhes no item 1.1 da Parte Experimental. 22

Os ensaios de biocatálise convencional no formato de multibiorreação permitiram avaliar as 8 cepas selecionadas no ensaios de *HTS* frente a diversos substratos. Os resultados comprovaram que bactérias isoladas de ambiente de mina de cobre também podem promover a oxidação de compostos orgânicos sulfurados, apesar de sua função natural residir na oxidação de minérios de ferro e enxofre presentes nestes ambientes restritos.

Visando avaliar a versatilidade destes micro-organismos e a enantiosseletividade destas reações, as cepas SO5-4 e SO5-9 foram re-avaliadas para oxidação de outros cinco diferentes sulfetos **28-32** (Esquema 3), além dos quatro (**17-20**) previamente testados, em reações biocatalíticas na presença de um único substrato. Neste caso, os ensaios foram realizados nas condições anteriormente descritas, porém sendo interrompidos após 12, 24, 48, 72 e 120 horas.



**Esquema 3.** Substratos utilizados para o estudo da versatilidade e enantiosseletividade das sulfoxidases produzidas pelas cepas SO5-4 e SO5-9 em ensaios de biorreação, e os respectivos possíveis produtos de oxidação.

Os ensaios realizados na presença da cepa SO5-9 não foram passíveis de análise, visto que os produtos de oxidação não foram extraídos com eficiência do meio reacional, utilizando somente agitação e centrifugação como meios físicos de extração. Possivelmente, os produtos não foram excretados para o meio, permanecendo no interior celular; ou ainda, ficaram agregados a exopolissacarídeos produzidos nestas condições. Ambas as situações poderiam ser superadas utilizando técnicas de ultrassom, que romperiam as membranas celulares e desagregariam o EPS. Porém, para manter a coerência das análises, esta técnica não foi utilizada.

Os resultados obtidos nos ensaios com a cepa SO5-4 mostraram que os rendimentos reacionais foram significantemente menores quando os substratos foram avaliados separadamente. (Tabela 8)

Substrata	Tempo de reação (h)							
Substrato	12	24	48	72	120			
17	0,4	0,3	1,0	1,0	2,8			
18	0,3	2,4	2,8	1,9	0,8			
19		0,2	0,2	0,8	0,8			
20								
28	2,5	2,0	2,0	2,0	1,9			
29								
30								
31		0,2	1,1	0,7	0,5			
32								

**Tabela 8.** Conversões enzimáticas (%), determinadas por CG-EM, para as biorreações catalisadas pela cepa SO5-4 na presença dos substratos **17-20** e **28-32**.

A Figura 4 apresenta os cromatogramas das reações biocatalisadas pela cepa SO5-4 que levaram a formação de produtos de oxidação. Observou-se que os sulfetos **17**, **18**, **19**, **28** e **31** foram oxidados aos seus respectivos sulfóxidos **21**, **22**, **24**, **33** e **36**.



Figura 4. Cromatogramas de CG-EM das reações de oxidação dos sulfetos A) 17, B) 18, C) 19, D) 28 e E) 31 biocatalisadas pela cepa SO5-4 com 72 h.

Condições de análise: 40-300 °C a 20 °C/min, onde permaneceu constante por 5 min. Mais detalhes no item 1.1 da Parte Experimental.

Dentre os substratos oxidados, dois (17 e 28) são amplamente utilizados para a triagem de sulfoxidases, visto a sua facilidade de oxidação química e biológica. Como pode ser observado na Figura 4 o composto 28 foi oxidado a sulfóxido e sulfona na proporção 1:1. Outra vantagem da utilização destas moléculas como padrão de triagem é a facilidade de análise cromatográfica e disponibilidade de dados na literatura para comparação.

Os substratos 18 e 31 são amplamente utilizados na indústria de aromas e fragrâncias, sendo aplicados na composição de odores frutados. A oxidação destes compostos leva a alteração da nota olfativa dos mesmos e o estudo de biotransformações utilizando estes substratos pode ser de grande valia para o desenvolvimento de novos produtos. O sulfóxido 22, oriundo da oxidação de 18, também possui aplicações no setor de aromas e fragrâncias, sendo que cada um dos seus diastereoisômeros possui diferentes notas olfativas.<sup>26</sup>

Não há nenhum relato na literatura sobre aplicação direta dos sulfóxidos 24 e 36, produtos de oxidação dos sulfetos 19 e 31, respectivamente. Porém, o anel benzotiazol e tiazol está presente em inúmeros compostos químicos de interesse comercial, como fármacos, pesticidas, corantes, entre outras, e seu produto de oxidação pode ser utilizado em uma destas vertentes.<sup>27</sup>

Os resultados obtidos mostraram que dos nove substratos avaliados, a cepa SO5-4 oxidou cinco deles, demonstrando a versatilidade deste biocatalisador, apesar das baixas conversões observadas.

No entanto, a química dos sulfóxidos apresenta inúmeras aplicações devido a geração de um centro quiral no átomo de enxofre concomitante a oxidação. Assim, reações de oxidação de sulfetos catalisadas por enzimas ou células íntegras são atrativas por proporcionarem, em muitos casos, a adição assimétrica de um átomo de oxigênio, devido ao ambiente quiral promovido pelo sítio ativo enzimático. Logo, as

 <sup>&</sup>lt;sup>26</sup> Bentley, R. *Chem. Rev.* **2006**, *106*, 4099-4112.
 <sup>27</sup> Bhoga, U. *Eur. J. Med. Chem.* **2007**, *42*, 1140-1150.

biorreações catalisadas pela cepa SO5-4 foram analisadas por cromatografia gasosa em coluna quiral acoplada a detector de ionização de chama (CG-DIC), para o estudo da enantiosseletividade destas reações.

As análises por CG-DIC das reações na presença do substrato **17** revelaram um aumento no excesso enantiomérico (*ee*) com o tempo de reação, sendo observado um *ee* de 51% com 120 h, indicando que a oxidação do sulfeto **17** é moderadamente enantiosseletiva. (Figura 5A)

As reações com o substrato **28** apresentaram *ee* discretos, sendo o maior deles (18%) obtido com 72 h. Como neste caso foi observada a presença de sulfona no meio reacional o excesso enantiomérico pode advir da oxidação seletiva do sulfeto ou ainda da oxidação seletiva do sulfóxido a sulfona, resultando no acúmulo de um dos enântiomeros. (Figura 5B)



**Figura 5.** Cromatogramas de CG-DIC com coluna quiral das reações de oxidação dos sulfetos A) **17** e B) **28** biocatalisadas pela cepa SO5-4 com 120 h e 72 h, respectivamente. Condições de análise: 50-100°C a 10°C/min, 100-180°C a 5°C/min, constante por 5 min. Mais detalhes no item 1.1 da Parte Experimental.

A interpretação dos resultados de CG-DIC com coluna quiral das reações realizadas com o substrato **18** não é trivial. Como o substrato utilizado consistia de

uma mistura dos isômeros *cis* e *trans*, os produtos de oxidação possuem três centros estereogênicos não definidos e consequentemente poderiam ser obtidos oito diastereoisômeros (Figura 6). A Figura 7A apresenta a análise por CG-DIC do padrão sintético do sulfóxido **22**, e é possível observar que a reação química é seletiva, ou seja, nem todos os isômeros do sulfeto são oxidados na mesma proporção. A análise da reação biocatalisada (Figura 7B) mostrou que os oito possíveis produtos de oxidação foram obtidos e que a seletividade foi semelhante a da reação química. Observou-se também um *ee* de 26% para o primeiro par de diastereoisômeros e de 20% para o terceiro par. Estudos posteriores deverão ser realizados para a identificação de cada diastereoisômero.



Figura 6. Oito possíveis diastereoisômeros do sulfóxido 22.



**Figura 7.** Cromatogramas de CG-DIC em coluna quiral de A) Padrão sintético do sulfóxido **22**, B) reação de oxidação do sulfeto **18** biocatalisada pela cepa SO5-4 com 48 h. Condições de análise: 50-100°C a 10°C/min, 100-180°C a 5°C/min, constante por 5 min. Mais detalhes no item 1.1 da Parte Experimental.

As análises por CG-DIC mostraram que as reações de oxidação dos substratos **19** e **31** não foram enantiosseletivas.

Apesar de os excessos enantioméricos, quando observados nas reações biocatalisadas pela cepa SO5-4, terem sido moderados ou baixos, os microorganismos avaliados mostraram-se efetivos na oxidação de sulfetos orgânicos e estudos posteriores de enantiosseletividade reacional podem proporcionar resultados promissores.

## 3. Conclusões Parciais e Perspectivas

A prospecção de novas fontes de enzimas, principalmente de ambientes extremos, como é o caso de minas de cobre, é de extrema relevância, pois pode levar ao isolamento de enzimas mais resistentes a grandes variações de temperatura e pH muitas vezes requeridas em reações químicas. Neste âmbito, esta pesquisa mostrou-se eficiente, pois hidrolases e monoxigenases foram identificadas por metodologia de triagem de alto desempenho utilizando sondas fluorescentes, e sulfoxidades por técnicas de biocatálise convencional. Vários substratos orgânicos sulfurados foram avaliados, e as enzimas produzidas por estes micro-organismos mostraram-se promissoras para oxidação de diversas classes de sulfetos. Estudos aprofundados deverão ser realizados para uma melhor avaliação da enantiosseletividade destas reações.

Trabalhos futuros poderão ser realizados com o intuito de aprimorar o conhecimento sobre o arsenal enzimático destes micro-organismos. Outras reações de oxidação, como reações de Baeyer-Villiger para a obtenção de ésteres e lactonas, e reações de hidrólise poderão ser avaliadas utilizando técnicas de biocatálise convencional.

Portanto, o estudo da biodiversidade, como a triagem de micro-organismos em amostras oriundas de fontes naturais, ainda é uma metodologia de grande valia para a seleção de biocatalisadores com propriedades desejadas.

# **CAPÍTULO II**

"Estudo da Promiscuidade Enzimática de

Lipases em Reações de Oxidação de Baeyer-Villiger em Meio Orgânico"

## 1. Considerações Gerais

A biocatálise tem se expandido rapidamente nas últimas décadas, principalmente com a descoberta e desenvolvimento de enzimas altamente estereosseletivas. Atualmente, a nova fronteira da biocatálise é o desenvolvimento de reações enzimáticas que apresentem ampla especificidade, ou seja, onde as enzimas utilizadas sejam capazes de atuar estereosseletivamente sobre diversos substratos.<sup>28</sup>

Esta versatilidade é um fenômeno conhecido como promiscuidade enzimática, indicando que uma mesma enzima pode atuar sobre diversas condições reacionais, em grupos funcionais e substratos distintos, e/ou em diferentes transformações químicas. Assim, a promiscuidade enzimática pode ser classificada em três grandes grupos:

- Promiscuidade enzimática de condição: apresentada por enzimas com atividade catalítica em condições reacionais diferentes das quais elas atuam naturalmente.

- Promiscuidade enzimática do substrato: apresentada por enzimas que possuem ampla especificidade de substratos.

- Promiscuidade enzimática catalítica: apresentada por enzimas capazes de catalisar transformações químicas distintas e com diferentes estados de transição. Pode ser acidental, ou seja, uma reação secundária realizada por uma enzima selvagem; ou induzida, onde uma ou várias mutações em uma enzima promovem o desenvolvimento de uma nova atuação catalítica.<sup>29</sup>

Embora muitas vezes subvalorizada, essa ausência ou baixa especificidade catalítica tem um papel primordial na evolução enzimática e ocasionalmente na biossíntese de metabólitos secundários.<sup>30</sup> Esta característica enzimática, inerente a uma grande variedade de enzimas, indica que a especificidade do sítio ativo não é tão

 <sup>&</sup>lt;sup>28</sup> Bornscheuer, U.T.; Kazlauskas, R.J. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2004**, *43*, 6032-6040.
 <sup>29</sup> Hult, K.; Berglund, P. *Trends Biotechnol.*, **2007**, *25*, 231-238.
 <sup>30</sup> Khersonsky, O. Roodveldt, C. Tawfik, D.S. *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **2006**, *10*, 498-508.

rígida, o que é normalmente associado a uma flexibilidade estrutural destas macromoléculas.

Para entender como uma atividade promíscua ocorre é preciso considerar o princípio básico da catálise enzimática: o aumento da velocidade de reação somente ocorre devido a uma estabilização preferencial do estado de transição quando comparado a reação não catalisada. É conhecido que as enzimas alcançam esta estabilização através da formação do complexo enzima-substrato. Neste complexo, o substrato é alocado no sítio ativo através de interações químicas e/ou eletrostáticas, de modo a fornecer aos grupos funcionais reativos um ambiente propício para que a reação ocorra. É um pressuposto da teoria enzimática que o sítio ativo de uma enzima é otimizado para um determinado substrato e mecanismo reacional, no entanto devido aos numerosos sítios de interação e grupos reativos presentes na maioria dos sítios ativos, a capacidade de uma enzima realizar a catálise de reações alternativas é completamente concebível.<sup>31</sup>

Assim, embora originalmente tenha sido suposto que a promiscuidade enzimática fosse um evento raro, muitos exemplos deste fenômeno foram relatados em estudos realizados nas últimas décadas. A constatação de que muitas enzimas possuem ampla especificidade promoveu grande parte do crescimento em biocatálise nos últimos anos, especialmente na área de síntese orgânica. A identificação de enzimas que apresentam alta estereosseletividade frente a uma ampla variedade de moléculas, permitiu o desenvolvimento rápido de novas aplicações para estes biocatalisadores, principalmente na síntese de compostos com atividade biológica.<sup>32</sup>

Atualmente, técnicas de mutagênese sítio-dirigida e de evolução dirigida tem sido amplamente utilizadas para o aumento da eficiência catalítica de atividades enzimáticas promíscuas, através da alteração seletiva de aminoácidos do sítio ativo da enzima, ampliando, assim, a aplicabilidade desta propriedade enzimática.<sup>33</sup>

 <sup>&</sup>lt;sup>31</sup> Babtie, A.; Tokuriki, N.; Hollfelder, F. *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **2010**, *14*, 200-207.
 <sup>32</sup> Khersonsky, O.; Tawfik, D.S. *Ann. Rev. Biochem.*, **2010**, *79*, 11.1-11.35.
 <sup>33</sup> Kazlauskas, R. J. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2005**, *9*, 195-201.

Explorar a versatilidade catalítica de uma enzima pode levar a obtenção de novos biocatalisadores eficientes e estáveis, com atividade sem precedentes para reações as quais não existe nenhuma alternativa biocatalítica aplicável. Logo, a promiscuidade enzimática se tornou uma ferramenta versátil nos estudos recentes de biocatálise, podendo ser aplicada nos mais diversos processos.

As lipases são as enzimas mais extensivamente descritas na literatura por apresentarem atuações promíscuas. Já é bem estabelecido que as lipases, quando em meio orgânico ou na presença de substratos específicos, podem catalisar diversas reações orgânicas.<sup>34</sup> (Tabela 9)

Reação	Lipase (fonte)	Substrato (s)	Solvente (s)	Ref.
Reação de Mannich	Várias	Acetona, anilina e <i>p</i> - nitrobenzaldeído	Acetona/água	34(a)
Oxidação de alcoóis arílicos	CAL-B	Alcoóis arílicos	Água-líquido iônico	34(b)
Reação de Adição C-S	CAL-B	Tióis e ésteres vinílicos	Éter di-isopropílico ou dimetilformamida	34(c)
Reação Aldólica assimétrica	Pâncreas suíno	Acetona e benzaldeídos substituídos	Acetona/água	34(d)
Reação de Morita- Baylis-Hillman	Várias	Cicloexanona e <i>p</i> - nitrobenzaldeído	Água	34(e)
Epoxidação de alcenos	CAL-B	3-careno	Diclorometano	34(f)
Reação de Michael	CAL-B Ser105Ala	Compostos 1,3- dicarbonílicos e carbonílicos α,.β-insaturados	Ausente	34(g)
Reação de Michael	CAL-B	Aminas secundárias e acrilonitrila	Tolueno	34(h)

**Tabela 9.** Exemplos de reações enzimáticas promovidas pela atuação promíscua de lipases.

<sup>&</sup>lt;sup>34</sup> (a) Li, K. *et al. Green Chem.*, **2009**, *11*, 777-779. (b) Sharma, U.K. *et al. Org. Lett.*, **2009**, *11*, 4846-4848 (c) Lou, F-W. *et al. Adv. Synth. Catal.*, **2008**, *350*, 1959-1962. (d) . Li, C. *et al. Green Chem.*, **2008**, *10*, 616-618. (e) Reetz, M.T.; Mondière, R.; Carballeira, J.D. *Tetrahedron Letters*, **2007**, *48*, 1679-1681. (f) Moreira, M.; Nascimento, M.G. *Catal. Commun.*, **2007**, *8*, 2043-2047. (g)Svedendahl, M.; Hult, K.; Berglund, P. J. Am. Chem. Soc., **2005**, *127*, 17988-17989. (h) Torre, O.; Afonso, I.; Gotor, V. *Chem. Commun.*, **2004**, 1724-1725.

### CAPÍTULO II: Considerações Gerais

Neste trabalho, foi considerada a atuação de lipases em reações de oxidação de Baeyer-Villiger. Esta reação consiste na clivagem oxidativa de uma ligação carbonocarbono, adjacente a um grupo carbonila, e a inserção de um átomo de oxigênio entre estes dois carbonos (Esquema 4).<sup>35</sup> Este tipo de reação é uma ferramenta importante na preparação de ésteres e lactonas, que são blocos construtores essenciais para a síntese de produtos naturais e outras moléculas de importância biológica.



Esquema 4. Reação de oxidação de Baever-Villiger mediada por perácidos orgânicos.

Quimicamente, a oxidação de Baeyer-Villiger é realizada utilizando perácidos orgânicos como reagentes doadores de oxigênio, sendo comumente utilizado o ácido meta-cloroperbenzóico (m-CPBA). Porém, este reagente é caro, sensível ao choque e potencialmente explosivo, o que limita as suas aplicações industriais.<sup>36</sup>

Processos biocatalíticos utilizando enzimas isoladas ou células íntegras são alternativas para este tipo de reação. Os biocatalisadores mais indicados para oxidações de Baeyer-Villiger são as monoxigenases.<sup>37</sup> No entanto, estas enzimas dependem de co-fatores, tornando o processo dispendioso. O uso de células íntegras supera esta desvantagem, porém a complexibilidade do processo pode aumentar devido a formação de subprodutos advindos do metabolismo celular.<sup>38</sup> Assim, uma terceira opção para esta reação é a geração in situ de perácidos através da peridrólise de ácidos carboxílicos ou ésteres mediada por lipases, na presença de  $H_2O_2$  (Esquema 5).

 <sup>&</sup>lt;sup>35</sup> Clayden, J. *et al. Organic Chemistry*, 8<sup>a</sup> ed. New York: Oxford, 2009.
 <sup>36</sup> ten Brink, G.J.; Arends, I.W.C.; Sheldon, R.A. *Chem. Rev.* **2004**, *104*, 4105-4123.
 <sup>37</sup> (a) Roberts, S.M.; Wan, P.W.H. *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, **1998**, *4*, 111-136. (b) Pazmiño, D.E.T.; Dudek, H.M.; Fraaije, M.W. Curr. Opin. Chem. Biol., **2010**, *14*, 138-144.

<sup>&</sup>lt;sup>38</sup> Faber, K. Biotransformations in Organic Chemistry, 4ª ed. New York: Springer, 2000.



**Esquema 5.** Reação de oxidação Baeyer-Villiger catalisada por lipases através da geração *in situ* de perácidos. Fonte: Adaptado de Rios, Salazar & Olivo, 2008.<sup>41d</sup>

O primeiro relato da aplicação de lipases na peridrólise de ácidos carboxílicos, na presença de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, foi publicado em 1990 por Björkling e colaboradores.<sup>39</sup> Neste trabalho, foi proposto pela primeira vez a elegante aplicação de perácidos gerados *in situ* na oxidação de alcenos a epóxidos. Mais tarde, em um segundo trabalho, os mesmos autores aperfeiçoaram as condições reacionais para a geração de perácidos, como também avaliaram a utilização dos mesmos em reações de oxidação de cetonas cíclicas e sulfetos.<sup>40</sup> A partir desta data, diversos trabalhos foram publicados relatando esta aplicação promíscua das lipases, principalmente relacionados a sua aplicação em reações de oxidação de Baeyer-Villiger.<sup>41</sup>

O mecanismo deste processo catalítico ainda não é completamente compreendido, porém a teoria mais aceita relata que a enzima somente participa da formação do perácido, e que a reação de oxidação ocorre fora do sítio ativo. Esta teoria é sustentada pelo fato de que a maioria das reações de oxidação mediadas por lipases não é enantiosseletiva.<sup>42</sup>

É conhecido, que a maioria das lipases possuem os aminoácidos serina, histidina, e aspartato no sítio ativo, a conhecida tríade catalítica das serina-hidrolases (Esquema 6). Os aminoácidos glutamina e treonina juntos formam a cavidade oxianiônica, que tem como funções polarizar a ligação dupla do grupamento carbonila do substrato,

<sup>&</sup>lt;sup>39</sup> Björkling, F.; Godtfredsen, S.E.; Kirk, O. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, **1990**, 1301-1303.

<sup>&</sup>lt;sup>40</sup> Björkling, F. *et al. Tetrahedron*, **1992**, *48*, 4587-4592.

<sup>&</sup>lt;sup>41</sup> (a) Lemoult, S.C.; Richardson, P.F.; Roberts, S.M. *J. Chem. Soc. Perkin Trans.*,**1995**, *1*, 89-91. (b) Pchelka, B. K.; Gelo-Pujic, M.; Guibé-Jampel E. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1*, **1998**, 2625-2627. (c) Rios, M.Y.; Salazar, E.; Olivo, H.F. *Green Chem.*, **2007**, *9*, 459-462. (d) Rios, M.Y.; Salazar, E.; Olivo, H.F. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2008**, *54*, 61-66. <sup>42</sup> Carlqvist, P. *et al. J.Mol. Model.*, **2003**, *9*, 164-171.

deixando o carbono carbonílico susceptível a um ataque nucleofílico, e estabilizar a carga negativa do oxigênio no estado de transição, através de ligações de hidrogênio. (Figura 8)



Figura 8. Representação da cavidade oxianiônica das lipases.

As reações promíscuas catalisadas por lipases são comumente realizadas em ambientes com baixas ou nenhuma concentração de água. Nestas condições, qualquer outro nucleófilo pode competir com a água, como  $H_2O_2$ , RNH<sub>2</sub>, ROH, etc. O Esquema 6 apresenta um possível mecanismo enzimático para estas reações.<sup>43</sup>

 <sup>&</sup>lt;sup>43</sup> Silverman, R.B. *The Organic Chemistry of Enzyme-Catalyzed Reactions.* Academic Press, **2000**.
 38



Esquema 6. Mecanismo enzimático da peridrólise de ácidos carboxílicos catalisada por lipases na presença de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

Além das vantagens inerentes a um processo biocatalítico, a utilização de peróxido de hidrogênio 30% (v/v) como agente oxidante é altamente atrativa, pois seu manuseio é fácil e seguro, apresentando um elevado teor de oxigênio ativo e um baixo custo, além de ser um reagente ambientalmente limpo, gerando somente água como co-produto reacional.

Assim, em contraste com as condições ácidas comumente utilizadas para a geração *"in situ"* de perácidos, a peridrólise de ácidos carboxílicos, na presença de peróxido de hidrogênio, catalisada por lipases pode ser realizada, em solventes orgânicos adequados, sob condições brandas. As condições empregadas e a segurança do processo (geração de concentrações catalíticas de perácido) tornam esta metodologia atrativa para reações de oxidação em escala industrial.

Para estudar a nível molecular a oxidação de cetonas cíclicas mediadas por lipases, na presença de peróxido de hidrogênio e ácido octanóico em solvente orgânico, foi selecionada a espectrometria de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de <sup>1</sup>H, a qual apresenta um arsenal de técnicas apropriadas para avaliar a dinâmica das interações de moléculas pequenas, na faixa de 1-1.000 u.m.a., e grandes, na faixa de 1.000 a 30.000 u.m.a.

Entre as técnicas de RMN de <sup>1</sup>H mais utilizadas para triar e caracterizar complexos supramoleculares podem-se citar: *rotational frame nuclear Overhauser effect spectroscopy (ROESY), diffusion-ordered spectroscopy (DOSY), saturation transfer difference (STD), nuclear Overhauser effect pumping (NOE-pumping), water ligant observed via gradient spectroscopy (WaterLOGSY)*, entre outras. Além das técnicas anteriores que são baseadas nas constantes de difusão, nOes e transferência de saturação, a alteração dos deslocamentos químicos e dos tempos de relaxação longitudinal (T<sub>1</sub>) e transversal (T<sub>2</sub>) das moléculas, quando livres ou complexadas, também fornecem informações importantes.<sup>44</sup>

<sup>&</sup>lt;sup>44</sup> Carlomagno, T. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **2005**, *34*, 245–66 40

Neste trabalho foram utilizados os experimentos de diferença de transferência de saturação (*STD*) e medidas dos tempos de relaxação longitudinal ( $T_1$ ) e transversal ( $T_2$ ).

O experimento de *STD* foi desenvolvido por Mayer & Meyer<sup>45</sup> em 1999, e é um método baseado na transferência de magnetização de hidrogênios da molécula receptora (baixa mobilidade molecular, difusão de spins e hidrogênios lábeis), para hidrogênios do ligante (alta mobilidade molecular).

Este experimento envolve a comparação de espectros de RMN de <sup>1</sup>H da molécula receptora e do ligante, em solução, medidas sobre irradiação em ressonância  $(I_{on})$  e fora da ressonância  $(I_{off})$ . Quando em ressonância, a magnetização dos hidrogênios do receptor é afetada via um trem de pulsos Gaussianos seletivo. O trem de pulsos de radiofreqüência (rf) é aplicado numa frequência onde ocorrem somente sinais do receptor e não dos ligantes. A saturação se propaga a partir dos hidrogênios saturados do receptor para outros hidrogênios do receptor *via* caminhos de relaxação cruzada intramolecular (<sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H); sendo que a saturação é então transferida para os ligantes complexados *via* relaxação cruzada intermolecular (<sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H) na interface receptor-ligante (Figura 9). Quando a irradiação ocorre fora da ressonância, uma irradiação com o mesmo *rf* e tempo de duração é utilizada, porém em uma frequência fora da ressonância do receptor e do ligante, assim nenhum sinal é perturbado.



Figura 9. Representação esquemática do experimento de STD.

<sup>&</sup>lt;sup>45</sup> Mayer, M.; Meyer, B. Angew. Chem. Int. Ed. Engl. **1999**, *38*, 1784-1788.

A diferença dos espectros,  $\Delta I$ , é gerada pela subtração dos espectros de RMN de <sup>1</sup>H em ressonância e fora da ressonância ( $\Delta I = I_{off} - I_{on}$ ). A magnetização do ligante que interage com a macromolécula é em parte saturada quando a irradiação ocorre em ressonância, resultando na redução da intensidade do sinal ( $I_{off} > I_{on}$ ). Logo, a diferença dos espectros fornece somente os sinais dos ligantes que foram saturados, e o resultado da diferença dos espectros pela irradiação fora de ressonância ( $\Delta I/I_{off}$ ) é a fração do efeito *STD* que é fornecida somente para os sinais dos hidrogênios dos ligantes que interagem com a macromolécula.

Na sequência de pulsos do experimento de *STD* (Figura 10) a saturação da molécula receptora é realizada através da aplicação de **n** repetições de um pulso seletivo (~ -0,5 ppm para proteínas) de 180° com formato Gaussiano. Este trem de pulsos tem, normalmente, uma duração total de 1 a 3 s. Após o pulso seletivo na macromolécula, um pulso duro de 90° ( $\varphi$ 1), que transfere a magnetização dos ligantes para o plano *x*,*y* é aplicado. Em seguida, utiliza-se um filtro  $T_{I\rho}$  ( $\varphi$ 2). Durante a aplicação deste filtro ocorre a transferência de magnetização do receptor para o ligante, e também a eliminação dos sinais residuais da macromolécula do espectro. Os pulsos posteriores ( $\varphi$ 3,  $\varphi$ 4,  $\varphi$ 5 e  $\varphi$ 6) compõem a sequência *WATERGATE*<sup>46</sup>, que tem como função eliminar o sinal residual da água (HDO). A saturação ocorre somente no sinal da água permanecendo inalterados os sinais dos compostos que interagem com a macromolécula.



Figura 10. Sequência de pulsos do experimento de STD.

 <sup>&</sup>lt;sup>46</sup> Piotto, M.; Saudek, V.; Sklenar, V. *J. Biomol. NMR*, **1992**, *2*, 661-665.
 42

O termo relaxação em RMN descreve o processo pelo qual, com o passar do tempo, a magnetização de uma amostra retorna a sua posição de equilíbrio, após uma perturbação no sistema. No equilíbrio a magnetização no plano x, y é nula e a magnetização no eixo z possui um valor proporcional ao número de spins, a constante giromagnética e ao campo magnético aplicado. (Figura 11)



**Figura 11.** A relaxação leva a magnetização em *z* ao seu valor de equilíbrio e a magnetização em *x*, *y* a zero.

O processo pelo qual a magnetização no eixo *z* retorna ao equilíbrio é chamado de relaxação longitudinal ou relaxação spin-rede, e o processo pelo qual a magnetização no plano *x*, *y* retorna ao equilíbrio é chamado de relaxação transversal ou relaxação spin-spin. Assim, o tempo de relaxação nada mais é que o tempo necessário para que este processo ocorra. O tempo de relaxação longitudinal é representado por  $T_1$ , e o tempo de relaxação transversal por  $T_2$ .<sup>47</sup>

É conhecido que macromoléculas relaxam mais rapidamente que moléculas pequenas.<sup>44</sup> Nesse contexto, quando ocorre a complexação entre um sistema macromolecular e um ligante, este adquire características semelhantes as do primeiro, sendo que uma delas é o tempo de relaxação. O monitoramento deste fenômeno

<sup>&</sup>lt;sup>47</sup> Keeler, J. Understanding NMR Spectroscopy. John Wiley & Sons, **2006**.
permite, então, avaliar a interação entre o ligante e a macromolécula. Duas formas de se avaliar essa interação é a utilização de medidas dos tempos de relaxação  $T_1$  e  $T_2$ .

Para as medidas de  $T_1$  é utilizada uma sequência de pulsos denominada inversão-recuperação. Nesta sequência a magnetização é invertida em *z* através da aplicação de um pulso de 180°; esta magnetização sofre relaxação durante o tempo  $\tau$ , e depois deste período, um pulso de 90° é aplicado e o *FID* é observado. Esta sequência é realizada diversas vezes variando-se os valores de  $\tau$  (Figura 12).<sup>48</sup> Assim, a intensidade dos picos em cada espectro obtido é proporcional ao valor da magnetização em *z* presente antes do pulso de 90° ser aplicado. A construção de um gráfico da intensidade ou integral dos picos versus o tempo  $\tau$ , permite a obtenção do tempo de relaxação longitudinal.



**Figura 12.** Sequência de pulso do experimento de inversão-recuperação, utilizada para estimação do tempo de relaxação longitudinal,  $T_1$ .

As medidas de  $T_2$  são comumente realizadas utilizando o experimento de CPMG (Carr-Purcell-Meiboom-Gill).<sup>49</sup> A sequência de pulsos básicas de CPMG é baseada na sequência de *spin-echo*, e consiste em um pulso de 90° que promove a geração da magnetização transversa, seguido de um bloco de *spin-echo*, que é repetido **n** vezes, e que determina o decaimento da magnetização no plano *x*,*y*. O experimento é repetido diversas vezes incrementando o número de blocos (Figura 13).

<sup>&</sup>lt;sup>48</sup> Berger, S.; Braun, S. 200 and More NMR Experiments. Ed. Wiley-VCH, 2004.

<sup>&</sup>lt;sup>49</sup> (a) Carr, H.Y.; Purcell, E.M. *Phys. Rev.* **1954**, *94*, 630-638. (b) Meiboom, S.; Gill, D. *Rev. Scient. Inst.*, **1958**, *29*, 688-691.

A construção de um gráfico da intensidade ou integral dos sinais versus o tempo (2 x  $\tau$  x n), permite a obtenção do tempo de relaxação transversal.



**Figura 13.** Sequência de pulso do experimento de CMPG, utilizada para estimação do tempo de relaxação transversal,  $T_2$ .

## 2. Resultados e Discussão

Nove lipases comerciais<sup>50</sup> não imobilizadas foram selecionadas para os ensaios de promiscuidade enzimática. Primeiramente, as atividades hidrolíticas destas enzimas foram confirmadas por titulação dos ácidos graxos liberados, utilizando como substrato óleo de oliva.<sup>51</sup> Este substrato foi escolhido devido a sua composição de triglicerídeos, que conta com mais de 80% de trioleína, um triglicerídeo de cadeia longa, recomendado para a determinação da atividade hidrolítica de lipases.

Tabela 10. Atividade enzimática das lipases comerciais determinada por titulação com óleo de oliva.

Lipase (fonte)	M.M. (g/mol)	Atividade comercial (U/mg) <sup>b</sup>	Atividade experimental (U/mg) <sup>g</sup>
Aspergillus	<sup>a</sup>	0,2 <sup>c</sup>	
Candida antarctica	a	1,5 <sup>d</sup>	1,2
Candida cylindracea	~ 67.000	4,0 <sup>d</sup>	2,4
Mucor miehei	<sup>a</sup>	1,2 <sup>d</sup>	1,7
Pseudomonas cepacia	<sup>a</sup>	46,2 <sup>d</sup>	4,7
Pseudomonas fluorescens	<sup>a</sup>	35,2 <sup>d</sup>	3,8
Rhizopus arrhizus	~ 43.000	10,5 <sup>e</sup>	
Rhizopus niveus	~ 83.000	$4,5^{\mathrm{f}}$	0,3
Pâncreas suíno	~ 50.000	30,1 <sup>f</sup>	0,5

<sup>a</sup> Massas moleculares não informadas. <sup>b</sup> Atividade relatada no Certificado de Análise referente a este lote de enzimas. Substratos: <sup>c</sup> Triacetina, <sup>d</sup> Trioleína, <sup>e</sup> Tributirina, <sup>f</sup> Óleo de oliva. <sup>g</sup> 1 U corresponde a quantidade de enzima que libera 1,0 µmol de ácido graxo por min.

As discrepâncias entre os valores obtidos e as atividades comerciais, se devem tanto a divergências de substratos, como no caso das lipases de Aspergillus e de R. arrhizus, onde os substratos padrões são a triacetina e a tributirina, respectivamente,

 <sup>&</sup>lt;sup>50</sup> Adquiridas de Sigma-Aldrich ®. Lipase Basic Kit. Cat.-No. 62327.
<sup>51</sup> Messias, J.M. *et al. Enz. Microb. Technol.*, **2009**, *45*, 426-431.

ambos triglicerídeos de cadeia pequena; como também a diferenças de metodologia, visto que neste experimento foi realizada uma titulação manual, utilizando fenolftaleína como indicador, e que as atuais técnicas de titulação enzimática envolvem tituladores automatizados.

Inicialmente, os ensaios de versatilidade enzimática foram realizados utilizando as lipases de *C. cylindracea*, *R. arrhizus*, *R. niveus* e de pâncreas suíno, devido a maior disponibilidade das mesmas para otimização da metodologia. Nestes ensaios foram avaliadas as cetonas cíclicas **39-43**, que após a reação poderiam levar aos produtos de oxidação **44-54** (Esquema 7).

A reação foi realizada na presença das cetonas avaliadas **39-43** (1,5  $\mu$ L de cada), ácido octanóico (100  $\mu$ L, 6,3 mmol), H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30% v/v (1 mL, 12,7 mmol) e das lipases (5 mg), em tolueno (10 mL). As reações foram mantidas sob agitação a 200 rpm e 40 °C. Alíquotas foram retiradas a cada 24 horas durante 3 dias; as mesmas foram lavadas com solução saturada de NaHCO<sub>3</sub>, para extração do ácido, e secas sobre MgSO<sub>4</sub> anidro, sendo posteriormente derivatizadas com diazometano e analisadas por GC-EM.



**Esquema 7.** Substratos avaliados nos ensaios iniciais de promiscuidade enzimática de lipases e os respectivos possíveis produtos de oxidação.

Os resultados apresentados na (Tabela 11) mostraram que somente as cetonas cíclicas **42** e **43** foram oxidadas em rendimentos apreciáveis. O substrato **43** foi oxidado por todas as lipases, já o substrato **42** somente não foi oxidado pela lipase de pâncreas suíno. Foi possível observar que as conversões aumentaram com o tempo reacional, atingindo valores maiores que 80%, com 72 horas de reação, para as reações na presença da lipase de *C. cylindracea*. As conversões reacionais foram superiores, em todos os casos, para o substrato **43**. A participação da enzima foi 48

comprovada pela ausência de produtos na reação controle (meio reacional na ausência da enzima).

Linases	Tempo de		ł	Substratos		
Lipuses	reação (h)	39	40	41	42	43
	24				9	11
C. cylindracea	48				53	66
	72	6		Substratos       40     41	82	83
R. arrhizus	24				4	6
	48				21	52
	72				24	67
	24				2	3
R. niveus	48				17	39
	72				20	62
	24					
Pâncreas suíno	48					15
	72					21

**Tabela 11.** Conversões enzimáticas (%), determinadas por CG-EM, das cetonas cíclicas **42-43** nos respectivos produtos de oxidação.

Condições de análise: 50-180 °C a 10 °C/min, 180-300 °C a 30 °C/min, constante por 5 min. Mais detalhes no item 1.1 da parte experimental.

O produto da oxidação da cetona cíclica **42** foi a lactona **50**, sendo observada a mesma regiosseletividade da reação química, onde o grupo que migra, geralmente, é o mais efetivo em estabilizar uma carga positiva, ou seja, o grupo mais substituído. Isto ocorre, porque o estado de transição envolve uma carga positiva na molécula, enquanto a porção carboxila sai na forma de um ânion. (Esquema 8).



**Esquema 8.** Mecanismo da reação química de oxidação de Baeyer-Villiger na presença de perácidos orgânicos.

A oxidação do substrato **39** somente foi visualizada com 72 horas de reação na presença da lipase de *C. cylindracea*. A conversão foi baixa (5,8 %) e o produto obtido, segundo a biblioteca de CG-EM, não foi nenhuma das respectivas lactonas **44** ou **45**, mas sim o epóxido **46**.

Como as condições de epoxidação de alcenos mediadas por lipases, são as mesmas que para a oxidação de Baeyer-Villiger de cetonas cíclicas, o produto de oxidação do substrato **43** foi o epóxido **54**. Quimicamente, a oxidação da ligação dupla da *cis*-jasmona é favorecida e a co-injeção do padrão sintético do respectivo epóxido por CG-EM confirmou o produto formado na reação biocatalisada.

O substrato 42 e a lipase de *C. cylindracea* foram escolhidos para os ensaios de seleção de solvente e agente oxidante. Os solventes avaliados foram tolueno, benzeno e acetonitrila, e os agentes oxidantes foram o  $H_2O_2$  30% v/v e uréia-peróxido de hidrogênio (UHP). Os resultados dos ensaios mostraram que a reação somente ocorre utilizando tolueno como solvente e  $H_2O_2$  30% v/v como agente oxidante. É relatado na literatura que reações de peridrólise catalisadas por lipases são mais efetivas em solventes não miscíveis com água<sup>40</sup>, o que justifica a ineficiência da acetonitrila. O agente oxidante UHP é geralmente utilizado para evitar a adição de água ao sistema reacional, que pode levar a hidrólise das lactonas formadas<sup>41(c)</sup>, porém seu caráter

oxidante é inferior ao do peróxido de hidrogênio livre, possivelmente justificando a ausência de produtos quando o mesmo foi utilizado.

Visando estudar melhor a promiscuidade enzimática das lipases, as nove lipase comerciais descritas na Tabela 10 foram avaliadas para reações de oxidação de Baeyer-Villiger frente aos substratos **42** e **55** (Esquema 9).



**Esquema 9.** Reação de oxidação de Baeyer-Villiger das cetonas cíclicas **42** e **55** em suas respectivas lactonas **50** e **56**, mediadas por lipase.

Estas duas cetonas cíclicas foram escolhidas, pois são amplamente empregadas na indústria de flavorizantes e fragrâncias, assim como suas respectivas lactonas.<sup>52</sup> Ambas as cetonas cíclicas possuem odor floral, levemente frutado e herbáceo, sendo principalmente usadas em composições de fragrâncias. As lactonas possuem odor frutado, levemente cremoso e amanteigado, sendo utilizadas tanto em perfumaria, como em flavorizantes. A lactona **50** possui típico odor de coco.<sup>53</sup>

As reações foram realizadas conforme descritas anteriormente, porém na presença de uma única cetona cíclica (10  $\mu$ L) como substrato. A Tabela 12 apresenta as conversões reacionais na presença de cada enzima.

<sup>&</sup>lt;sup>52</sup> Serra, S.; Fuganti, C.; Brenna, E. *Trends Biotechnol.*, **2005**, *23*, 193-198.

<sup>&</sup>lt;sup>53</sup> Bauer, K.; Garbe, D.; Surburg, H. *Common Fragrance and Flavour Materials.* Wiley-VCH, **2001**.

Lingses (fonte)	Substratos		
Lipases (ionic)	42	55	
Aspergillus	8	17	
Candida antarctica	52	>99	
Candida cylindracea	32	13	
Mucor miehei	19	2	
Pseudomonas cepacia	34	40	
Pseudomonas fluorescens	4	7	
Rhizopus arrhizus	14	21	
Rhizopus niveus	7	6	
Pâncreas suíno	4	25	

**Tabela 12.** Conversões enzimáticas (%), determinadas por CG-EM, para os ensaios de promiscuidade de lipases atuando em reações de oxidação de Baeyer-Villiger das cetonas cíclicas **42** e **55**, com 72 h.

Condições de análise: 40-200 °C a 10 °C/min, 200-300 °C a 30 °C/min, constante por 5 min. Mais detalhes no item 1.1 da parte experimental.

Os resultados obtidos mostraram que as lipases de diferentes fontes apresentaram atividade distintas frente as conversões das duas cetonas cíclicas avaliadas. Observouse que a lipase isolada de *Candida antarctica* forneceu as maiores conversões para a oxidação de ambas as cetonas. Vale também destacar a lipase *Pseudomonas cepacia* que catalisou as mesmas reações com conversões razoáveis; as lipases de *Candida cylindracea* e de *Mucor miehei* que promoveram a oxidação do substrato **42** em rendimentos apreciáveis; e as lipases de *Rhizopus niveus* e de pâncreas suíno que atuaram na oxidação do substrato **55**. A participação da enzima também foi comprovada pela ausência de produtos na reação controle (meio reacional na ausência da enzima).

Apesar de comprovada a participação da enzima a análise das alíquotas reacionais por cromatografia gasosa em coluna quiral (CG-DIC) mostrou que a reação não é enantiosseletiva. A ausência de participação da lipase na etapa de oxidação da cetona já é descrita na literatura, sendo está reação classificada como quimio-

enzimática, pois a lipase somente participa da peridrólise do ácido carboxílico, enquanto que a etapa de oxidação é espontânea e realizada pelo perácido livre. Eventuais resoluções enzimáticas das lactonas formadas podem ser observadas na presenca de atividade hidrolítica pós-oxidação.<sup>54</sup>

A oxidação da 2-pentilciclopentanona (42) pelas lipases de C. antarctica e C cylindracea em tolueno foi melhor investigada devido ao interesse comercial do produto de oxidação obtido (aroma de coco), e a quantidade expressiva de estudos na literatura sobre lipases oriundas de cepas de leveduras deste gênero, principalmente sobre a CAL-B (lipase B de C. antarctica), sendo que muitos relatam a atuação promíscua da mesma. A atuação da lipase de C cylindracea também foi avaliada utilizando benzeno como solvente orgânico, visto que este sistema foi ineficiente na oxidação do substrato de interesse.

Nesta etapa do trabalho, objetivou-se estudar as características do sistema reacional envolvido na atuação promíscua de lipases. Como a condição reacional envolve um sistema bifásico ( $H_2O_{2(aq)}$ /tolueno ou benzeno), a enzima pode atuar na interfase, entrando em contato com os reagentes na fase orgânica, uma característica intrínseca das lipases, que atuam originalmente em substratos lipofílicos. Porém, como este sistema envolve um ácido graxo, a enzima pode entrar em contato com os reagentes lipofílicos através da alocação da mesma no interior aquoso de micelas reversas de ácido octanóico em tolueno ou benzeno.

Para diferenciar as duas hipóteses, um teste simples com azul de metileno<sup>55</sup> (solúvel somente em água) acusa a presença de água na fase orgânica. Para a realização do teste, foi adicionado este corante a fase aquosa da reação e a mistura foi agitada. Após a separação das fases foi observado que a fração orgânica adquiriu coloração azul, indicando a transferência de pequenas gotas de água para a fase orgânica, dentro de micelas reversas. Tal fato somente foi observado na presença da

 <sup>&</sup>lt;sup>54</sup> Enzelberger, M.M. *et al. J. Biotechnol.*, **1997**, *56*, 129-133.
<sup>55</sup> Noritomi, H. *et al. Colloid. Polym. Sci.*, **2009**, *287*, 455-459.

#### CAPÍTULO II: Resultados e Discussão

enzima, ou seja, possivelmente houve indução da formação de micelas reversas de ácido octanóico quando a lipase estava presente no meio. Vale ressaltar que o teste realizado na presença da lipase de *C. cylindracea* em benzeno proporcionou uma intensa coloração azul na fase orgânica (Figura 14). O teste realizado com a mesma enzima em tolueno proporcionou uma coloração azul moderada na fase orgânica, enquanto que o teste realizado na presença da lipase de *C. antarctica* levou apenas a uma leve coloração azulada. Estas diferenças colorimétricas podem ser um indício do tamanho ou do número das micelas formadas.



**Figura 14.** Teste com azul de metileno na presença de benzeno e  $H_2O_2$  30% e A) ácido octanóico, B) lipase de *C. cylindracea*, C) lipase de *C. cylindracea* e ácido octanóico.

As micelas reversas são definidas pela IUPAC como agregados formados através da associação coloidal reversível de surfactantes em solventes apolares. Essa associação pode ser do tipo:

## $Monômero \rightleftharpoons Dímero \rightleftharpoons Trímero \rightleftharpoons \dots \rightleftharpoons n - mero$

e o fenômeno da concentração micelar crítica (ou um efeito análogo), consequentemente, não é observado. Em uma micela reversa os grupos polares dos surfactantes encontram-se voltados para o interior aquoso e os grupos lipofílicos prolongam-se no solvente apolar.<sup>56</sup>

As características principais de uma micela reversa são: a forma esférica é a mais comum; é formada em condições com concentrações <10% de surfactante, 0-10% de água e 80-90% de solvente orgânico apolar; geralmente são menores que as micelas; o número de agregação é menor que 50; possuem propriedades de soluções coloidais,

<sup>&</sup>lt;sup>56</sup> IUPAC Compendium of Chemical Terminology, **1997**, *66*, 1126.

como estabilidade termodinâmica, formação espontânea, diminuição da tensão superficial, entre outras.<sup>57</sup>

Entre as aplicações descritas na literatura para estas estruturas micelares encontram-se os sistemas de extração de poluentes<sup>58</sup>, liberação de fármacos<sup>59</sup>, reação para catálise enzimática<sup>60</sup>, separação e enovelamento de proteínas<sup>57</sup>, determinação estrutural de proteínas por RMN<sup>61</sup>, entre outras. É notável que as últimas três aplicações citadas envolvem a alocação de proteínas no interior de micelas reversas.

Assim, no caso do sistema avaliado as micelas reversas de ácido octanóico podem carregar em seu interior moléculas de água, enzima e  $H_2O_2$ , promovendo as condições necessárias para que a reação ocorra, e ainda simulando um ambiente nativo para a lipase, evitando qualquer possível desnaturação da mesma devido ao contato com o solvente orgânico. (Figura 15).<sup>62</sup>



Figura 15. Micela reversa de ácido octanóico formada em tolueno ou benzeno na presença de lipase.

<sup>&</sup>lt;sup>57</sup> Yang, L.; Xiaoyan, D.; Yan, S. Chin. J. Chem. Eng., 2008, 16, 949-955.

<sup>&</sup>lt;sup>58</sup> Ruiz, F-J.; Rubio, S.; Pérez-Bendito, D. *Anal. Chem.*, **2007**, *79*, 7473-7484.

<sup>&</sup>lt;sup>59</sup> Wang, T. et al. Eur. J. Pharm. Sci., **2010**, *39*, 373-379.

<sup>&</sup>lt;sup>60</sup> Ichinose, H. *et al. Langmuir*, **2004**, *20*, 5564-5568.

<sup>&</sup>lt;sup>61</sup> Valentine, K.G. et al. Structure, **2010**, *18*, 9-16.

<sup>62</sup> Horn, W.D.; Ogilvie, M.E.; Flynn, P.F. J. Am. Chem. Soc. 2009, 131, 8030-8039.

Assim, para avaliar este sistema supramolecular formado, técnicas específicas de RMN de <sup>1</sup>H, como diferença de transferência de saturação (*STD*) e medidas de tempo de relaxação longitudinal ( $T_1$ ) e transversal ( $T_2$ ) foram utilizadas para o estudo das interações intermoleculares presentes.

Os experimentos de RMN foram realizados simulando as condições reacionais na presença de solventes orgânicos deuterados, ou seja, continham  $H_2O_2$  30% v/v, ácido octanóico, cetona cíclica e lipase em tolueno ou benzeno deuterado (Figura 16). Experimentos também foram realizados na ausência da enzima, visando estudar a participação da mesma no sistema em estudo.

Os experimentos de RMN de <sup>1</sup>H-*STD* foram realizados saturando o sinal da enzima em –0,5 ppm e saturando o sinal da água, em 5,05 ppm, presente na fase orgânica. Os ensaios realizados através da saturação do sinal da água utilizaram as moléculas de água saturadas para relatar as interações intermoleculares presentes no sistema pela transferência de saturação para as espécies químicas específicas que participam da micela reversa.



**Figura 16.** Esquema da amostra para os experimentos de RMN simulando as condições reacionais. Todos os experimentos foram realizados tomando o cuidado para que a bobina do detector estivesse localizada na fase do solvente deuterado.

Uma possível confirmação da formação destas micelas reversas foi obtida nos experimentos realizados saturando o sinal da água. A transferência de saturação para os <sup>1</sup>H alfa carbonílicos do ácido octanóico indicaram ser esta a porção do ácido graxo mais próxima ao interior aquoso da micela reversa, o que é compatível com o tipo de agregação das mesmas. Este resultado foi observado para todos os sistemas estudados. (Espectros 1-3)

Os experimentos de *STD* irradiando no sinal da enzima (-0,5 ppm) não promoveram nenhuma transferência de saturação, possivelmente devido a baixa concentração das mesmas na fase orgânica.



**Figura 17.** Espectros de RMN de <sup>1</sup>H (499,89 MHz,  $C_7D_8$ / referência em 7,0 ppm) da A) 2pentileiclopentanona. B) do ácido octanóico. C) Espectro de *STD* controle (irradiando em 30 ppm). D) Espectro de *STD* (irradiando em 5,05 ppm), a 303 K, na presença da lipase de *C. cylindracea*.



**Figura 18.** Espectro de RMN de <sup>1</sup>H (499,89 MHz,  $C_7D_8$ / referência em 7,0 ppm) da A) 2pentilciclopentanona. B) do ácido octanóico. C) Espectro de *STD* controle (irradiando em 30 ppm). D) Espectro de *STD* (irradiando em 5,05 ppm), à 303 K, na presença da lipase de *C. antarctica*.



**Figura 19.** Espectros de RMN de <sup>1</sup>H (499,89 MHz,  $C_6D_6$ / referência em 7,16 ppm) da A) 2pentilciclopentanona. B) do ácido octanóico. C) Espectro de *STD* controle (irradiando em 30 ppm). D) Espectro de *STD* (irradiando em 5,05 ppm), a 303 K, na presença da lipase de *C. cylindracea*.

Os mesmos experimentos de *STD* foram realizados para o sistema na ausência da enzima e, neste caso, nenhum sinal foi observado, confirmando a ausência de micelas inversas, como já anteriormente visualizado no teste com azul de metileno.

Com o intuito de estudar as interações da enzima com o arranjo micelar proposto, experimentos para a determinação dos tempos de relaxação longitudinal  $(T_1)$  e transversal  $(T_2)$  foram realizados. As Tabela 13-15 apresentam os resultados obtidos.

**Tabela 13.** Variações dos tempos de relaxação  $T_1$  e  $T_2$  para o sistema reacional de oxidação da cetona cíclica **42** na ausência e presença da lipase de *C. antarctica* em tolueno.

Composto	Fnzima	Tempo de Relaxação			
Composto	Enzina	$T_{1}$ (s)	$\Delta T_{l} (\mathbf{s})^{\mathbf{a}}$	$T_2$ (s)	$\Delta T_2 (\mathbf{s})^{\mathbf{a}}$
Á sida astanóisa	Ausente	2,075	0,442	1,430	0.200
Actuo octanoico	Presente	1,633		1,140	0,290
2 mantilaialamantanana	Ausente	3,740	0,654	0,993	0.202
2-penthelelopentanona	Presente	3,086		0,790	0,205

 $^{a}\Delta T = T_{aus \hat{e}ncia} - T_{presença}$ 

**Tabela 14.** Variações dos tempos de relaxação  $T_1$  e  $T_2$  para o sistema reacional de oxidação da cetona cíclica **42** na ausência e presença da lipase de *C. cylindracea* em tolueno.

Composto	Enzimo	Tempo de Relaxação			
Composio	Liiziiia	$T_{I}(\mathbf{s})$	$\Delta T_{I}(\mathbf{s})^{\mathbf{a}}$	<i>T</i> <sub>2</sub> (s)	$\Delta T_2 (\mathbf{s})^{\mathbf{a}}$
Ácido octanóico	Ausente	1,764	0 197	0,950	0 172
Actuo octanoico	Presente	1,764 1,577 0,187	0,778	0,172	
2 poptiloiolopoptopopo	Ausente	3,055	0,065	1,636	0,008
2-penthereropentanona	Presente	2,990		1,628	

 $^{a}\Delta T = T_{aus \hat{e}ncia} - T_{presença}$ 

**Tabela 15.** Variações dos tempos de relaxação  $T_1$  e  $T_2$  para o sistema reacional de oxidação da cetona cíclica **42** na ausência e presença da lipase de *C. cylindracea* em benzeno.

Composto	Fnzima		Tempo de Relaxação			
Composto	Enzina	$T_{I}(\mathbf{s})$	$\Delta T_{I}(\mathbf{s})^{\mathbf{a}}$	$T_2$ (s)	$\Delta T_2 (\mathbf{s})^{\mathbf{a}}$	
Ácido octanóico	Ausente	1,548	0.205	1,007	0.202	
Acido octanoico	-0,205 Presente 1,753	-0,205	1,310	-0,303		
	Ausente	2,478	-0,843	1,145	-0,240	
2-pentilelelopentanona	Presente	3,321		1,385		

 $^{a}\Delta T = T_{aus \hat{e}ncia} - T_{presença}$ 

Analisando os dados apresentados nas Tabelas 13 e 14, observou-se um decréscimo nos valores de  $T_1$  e  $T_2$  para os sistemas envolvendo ambas as lipases em tolueno, quando comparados com os mesmos na ausência da enzima. Logo, é possível extrapolar que estas hidrolases estejam participando do arranjo micelar proposto.

A comparação dos dados das Tabelas 14 e 15, obtidos na presença da lipase de *C. cylindracea*, porém em solventes diferentes (tolueno e benzeno, respectivamente), mostram que para a reação em benzeno os valores de  $\Delta T$  foram negativos, indicando que os tempos de relaxação foram maiores na presença da enzima, ao contrário do que é observado para a reação em tolueno. Estes dados indicam que apesar dos tempos de relaxação serem mais longos, portanto com tempos de correlação menores, parece haver uma organização estrutural micelar na presença da lipase (evidenciado pelo experimento de *STD* e pela coloração da fase orgânica com azul de metileno), organização esta, distinta da observada em tolueno, e que resulta numa catálise ineficiente.

Outro fator relevante é a variação dos tempos de relaxação da 2pentilciclopentanona, indicando que, de alguma maneira, a mesma participe do sistema micelar formado. A localização mais provável desta molécula no arranjo é próxima a cauda apolar do ácido octanóico.

Já é relatado na literatura que proteínas podem ser estabilizadas através do confinamento das mesmas em micelas reversas. Esta estabilização ocorre devido ao elevado impedimento existente no interior micelar, o que simula as condições encontradas no ambiente celular, visto que, por exemplo, o citoplasma de uma célula de *E. coli* possui aproximadamente 300-400 mg de proteínas e ácidos nucléicos, quantidade muito superior as utilizadas no ensaios *in vitro*.<sup>62</sup>

#### 3. Conclusões Parciais e Perspectivas

Diversas lipases comerciais foram avaliadas quanto a sua versatilidade enzimática para atuação em reações de Baeyer-Villiger, e mostraram-se ativas frente a oxidação de cetonas cíclicas em meio orgânico, na presença de peróxido de hidrogênio e ácido octanóico.

A obtenção da  $\delta$ -decalactona e da  $\delta$ -dodecalactona, ambas utilizadas em composição de aromas e fragrâncias de interesse comercial, foi melhor avaliada, sendo que os resultados observados mostraram-se promissores para a aplicação desta metodologia em escala industrial.

Não foi observada enantiosseletividade nas reações, corroborando com a hipótese de que a lipase somente participe da etapa de peridrólise do ácido carboxílico. Porém, trabalhos futuros poderão ser realizados com o intuito de otimizar as condições reacionais para a observação de enantiosseletividade, como por exemplo, por indução da atividade hidrolítica pós-oxidação das lipases estudadas.

Pela primeira vez foi realizado o estudo das interações intermoleculares presentes em um sistema de promiscuidade enzimática de lipases atuando em reações de oxidação de Baeyer-Villiger. Foi proposto que este sistema reacional envolve a formação de micelas reversas de ácido octanóico em tolueno, que propiciam as condições necessárias para que a reação enzimática ocorra, sem a desnaturação da enzima pelo solvente orgânico e pelo peróxido de hidrogênio. Técnicas de RMN de <sup>1</sup>H, como *STD* e medidas de  $T_1$  e  $T_2$  foram utilizadas para a confirmação desta hipótese, sendo que experimentos adicionais, como difusão (*DOSY*), ainda serão realizados. Estudos com o intuito de caracterizar estas micelas, utilizando SAXS, também serão utilizados.

# **CAPÍTULO III**

"Desenvolvimento de uma Metodologia para a Detecção da Atividade e Inibição de Proteína Tirosina Fosfatases"

# 1. Considerações gerais

As fosfatases (E.C. 3.1.3) são enzimas que catalisam a hidrólise de substratos fosfomonoésteres, através da liberação do substrato com um grupamento hidroxila livre e um grupo fosfato inorgânico. As proteína fosfatases catalisam a hidrólise de grupos fosfato ligados a resíduos de aminoácidos em proteínas. De acordo com a sua função, estrutura, sequência, especificidade, ativadores e inibidores, elas podem ser classificadas em dois grupos: serina/treonina fosfatase (PP) e tirosina fosfatase (PTP). Estas enzimas catalisam, respectivamente, a hidrólise de grupos fosfato ligados a resíduos de serina/treonina e tirosina.<sup>63</sup>

As reações de fosforilação e desfosforilação de proteínas são empregadas por organismos para a regulação de diversos processos biológicos. Anormalidades na fosforilação/desfosforilação de proteínas podem levar a diversas enfermidades como câncer, diabetes e doenças auto-imunes.<sup>64</sup> A fosforilação de proteínas é governada pelas proteínas quinases e a desfosforilação pelas proteínas fosfatases (Esquema 10).



Esquema 10. Reações de fosforilação e desfosforilação de proteínas catalisadas por quinases e fosfatases.Fonte: Adaptado de Bialy & Waldmann, 2005.64

 <sup>&</sup>lt;sup>63</sup> Aoyama, H. *et.al, Quim. Nova*, **2003**, *26(6)*, 896-900.
<sup>64</sup> Bialy, L.; Waldmann, H. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2005**, *44*, 3814-3839.

As proteínas quinases são alvos terapêuticos extensivamente estudados, visto seu envolvimento na regulação de diversos processos biológicos.<sup>65</sup> Porém, são recentes os relatos na literatura sobre estudos de inibição de fosfatases.

O processo de identificação e otimização de novos fármacos é bastante complexo, englobando múltiplas etapas e várias áreas do conhecimento científico. A primeira etapa consiste na identificação do receptor macromolecular alvo responsável pelo desencadeamento do processo fisiológico de interesse, neste caso as PTPs, sendo o desenvolvimento de um método para a triagem de novos candidatos a drogas, o segundo passo neste processo.

Para a detecção da inibição de enzimas, as triagens de alto desempenho (HTS) em placas de 96 ou 384 poços, são extensivamente utilizadas e estão baseados no uso de sondas específicas que permitem o monitoramento de uma determinada atividade enzimática pela medida da diferença de um sinal na solução causada pela reação enzimática, como por exemplo: pH, turbidez, rotação específica, absorbância, fluorescência, potencial redox, entre outros.

A maioria das HTS utiliza substratos fluorogênicos ou cromogênicos, e consiste na liberação de um cromóforo ou fluoróforo como conseqüência da ação enzimática. Estes ensaios são de fácil execução, rápidos e sensíveis, o que permite a utilização de pequenas concentrações de enzima e substrato, aumento da velocidade de análise, além de possibilitar o acompanhamento da cinética da reação em tempo real.<sup>66</sup>

A umbeliferona (57), vista no Esquema 11, é um protótipo de fenóis fluorogênicos. Ésteres e éteres de umbeliferona não são fluorescentes, enquanto que a umbeliferona livre é fluorogênica devido ao ânion fenolato. Seu pKa é aproximadamente 7,0, sendo que qualquer reação que libere a umbeliferona em pH acima de 7,0 proporciona um grande incremento de fluorescência azul.<sup>67</sup>

<sup>65</sup> Krishnamurty, R.; Maly, J.D. ACS Chem. Biol., **2010**, *5*, 121-138.
<sup>66</sup> Goddard, J.P.; Reymond, J.L. Curr. Opin. Chem. Biol., **2004**, *15*, 314-322.
<sup>67</sup> Fink, D.W.; Koehler, W.R. Anal. Chem., **1970**, *42*, 990-993.



Esquema 11. Liberação do ânion umbeliferila em pH > 7,0.

Assim, foi proposto a utilização de derivados de umbeliferona (Esquema 12), como sondas para a determinação da atividade e inibição de proteína fosfatases. No caso da sonda para tirosina fosfatase  $(58)^{68}$ , a ação enzimática libera diretamente o ânion umbeliferila (16), que pode ser detectado a 460 nm em leitor de fluorescência, e no caso da sonda para serina/treonina fosfatases  $(59)^{69}$  a catálise enzimática gera o diol 11 que, então, por ação de NaIO<sub>4</sub> e BSA libera o ânion umbeliferila.



**Esquema 12.** Ensaio para determinação da atividade de fosfatases baseado em substratos fluorogênicos derivados de umbeliferona.

<sup>68</sup> Guilbault, G.G. et al. Anal. Lett. 1968, 1, 333-345.

<sup>&</sup>lt;sup>69</sup> Wahler, D. *et al.Chem. Eur. J.* **2002**, *8*, 3211-3228.

## 2. Resultados e Discussão

Inicialmente, as sondas **58** e **59** foram sintetizadas segundo metodologia descrita na literatura por Wahler e col.<sup>69</sup> (Esquema 13 e 14).



Esquema 13. Rota sintética da sonda para detecção da atividade de proteína tirosina fosfatases (58).



**Esquema 14.** Rota sintética da sonda para detecção da atividade de proteína serina-treonina fosfatases (59).

Os rendimentos globais das reações foram de 50% e 22% para a obtenção das sondas **58** e **59**, respectivamente, ambos razoáveis para sínteses que envolvem etapas de fosforilação. As estruturas dos compostos sintetizados foram confirmadas por CG-EM, RMN e/ou ESI-EM.

Após a síntese das sondas, as mesmas foram testadas para ensaios de determinação da atividade de proteínas fosfatases. Foram utilizadas as enzimas proteína tirosina fosfatase de baixo peso molecular (LMW-PTP, humana, recombinante)<sup>70</sup> e a proteína serina/treonina fosfatase calcineurina (PP2B, humana, recombinante, expressa em *E. coli*).<sup>71</sup> Os ensaios foram realizados utilizando diversas concentrações de enzima e substrato.

A sonda **58** mostrou-se ativa na determinação da atividade da LMW-PTP em tampão acetato 0,1 mol/L pH 5,0, utilizando 100  $\mu$ mol/L de substrato e aproximadamente 10 nmol/L de enzima (M.M. = 18.000 g/mol). Porém, como a umbeliferona não é fluorescente em pH ácido, a reação foi interrompida após 20 min pela adição de NaOH 0,1 mol/L, e a intensidade de fluorescência foi determinada a 460 nm.

No caso da sonda **59**, não foi observado hidrólise da mesma pela fosfatase PP2B em nenhuma das condições avaliadas. No entanto, a presença de atividade enzimática foi confirmada pelo método colorimétrico padrão utilizando verde de malaquita, e todos os ensaios testes foram realizados nas condições ótimas descritas pelo fabricante.<sup>72</sup> Assim, foi proposta a síntese de uma nova sonda (Figura 20) também derivada de umbeliferona, porém apresentando um único grupo fosfato primário em sua estrutura. A síntese e os testes para implementação desta metodologia estão sendo executados pela Dra Caroline C. S. Gonçalves, como uma parte de seu projeto de pósdoutoramento.



Figura 20. Sonda alternativa para a detecção da atividade de serina/treonina fosfatases.

<sup>&</sup>lt;sup>70</sup> Produzida e fornecida pelo grupo de pesquisa da Profa. Dra. Carmen Verissíma (IB-UNICAMP).

<sup>&</sup>lt;sup>71</sup> Adquirida da empresa Merck – Calbiochem®, Cat. No 539568.

<sup>&</sup>lt;sup>72</sup>Calcineurin Assay Kit, Colorimetric. Adquirido da empresa Merck – Calbiochem. Cat. No. 207005. User protocol 207005.

Assim, optou-se por seguir os estudos somente avaliando a inibição de proteína tirosina fosfatases, utilizando como sonda o composto **58**.

A primeira etapa no desenvolvimento de uma metodologia eficiente para a triagem de inibidores de enzimas é otimizar as condições reacionais para a determinação da referida atividade enzimática. Assim, para a otimização dos ensaios de atividade da LMW-PTP foram avaliadas diferentes concentrações de sonda e de enzima, assim como diferentes tempos reacionais. Para isto foi utilizado uma solução 2 mmol/L da sonda **58** em água destilada e uma solução de enzima diluída 1000 vezes em tampão acetato 0,1 mol/L pH 5,0. As reações foram incubadas a 37 °C em leitor de fluorescência, utilizando placas de 96 poços. As reações enzimáticas foram finalizadas através do aumento do pH do meio, possibilitando a leitura da fluorescência, uma vez que a umbeliferona (**16**) apenas fluoresce em pH acima de 7,0.

A concentração de substrato (**58**) foi avaliada na faixa de 25 a 500  $\mu$ mol/L, a concentração de enzima entre 1,5 a 15 nmol/L e o tempo reacional entre 1 a 30 min. As condições ótimas foram determinadas variando-se cada variável separadamente e, de acordo com os resultados obtidos, optou-se por utilizar uma concentração de 100  $\mu$ mol/L da sonda e 2,08 nmol/L de enzima. O tempo reacional ótimo para o ensaio foi de 10 min.

Inicialmente, as reações foram finalizadas pela adição de 100  $\mu$ L de uma solução aquosa de NaOH 1 mol/L, entretanto, constatou-se um decaimento considerável da fluorescência com o tempo (Figura 21), ou seja, o aumento brusco do pH do meio acarreta a abertura da porção lactônica da umbeliferona (**66**), justificando o decaimento nas medidas de fluorescência (Esquema 15).



**Figura 21.** Variação da intensidade de fluorescência do ânion umbeliferila com o tempo de incubação após adição de NaOH 1 mol/L ou tampão borato 0,1 mol/L pH 8,0.



Esquema 15. Abertura do anel lactônico do ânion umbeliferila (16) na presença de pH elevados.

Baseados nisto, os ensaios posteriores foram realizados adicionando-se tampão borato (0,1 mol/L) pH 8,0 para finalizar a reação, pois neste caso não foi observado decréscimo ou acréscimo na intensidade de fluorescência no intervalo de 20 min (Figura 21), indicando que a reação foi interrompida sem comprometimento dos resultados.

Os parâmetros cinéticos para a LMW-PTP na presença da sonda **58** como substrato também foram determinados. Inicialmente, foram obtidas as velocidades iniciais da reação enzimática nas concentrações de 25, 50, 75, 100, 150, 200, 250, 300, 400 e 500  $\mu$ mol/L de sonda, variando-se os tempos de 1 a 30 min e utilizando uma concentração de enzima de 2,08 nmol/L. As velocidades iniciais foram obtidas a

partir da construção de um gráfico da concentração de produto *versus* o tempo de reação, onde o valor da tangente da curva, que passa pela origem, constitui a velocidade inicial enzimática em uma determinada concentração de substrato.

A constante de Michaelis-Menten ( $K_M$ ) e a velocidade máxima ( $V_{máx}$ ) são parâmetros cinéticos enzimáticos obtidos a partir da equação de Michaelis-Menten (Equação 1).

$$V_0 = \frac{V_{max}[S]}{K_M + [S]}$$
 Equação 1

Uma metodologia gráfica prática e eficiente para a determinação destes parâmetros é a utilização da equação de duplo recíproco de Lineweaver-Burke. (Equação 2) e seu respectivo gráfico do inverso da velocidade inicial *versus* o inverso da concentração de substrato, onde o coeficiente angular da reta obtida corresponde ao valor de  $K_M/V_{máx}$  e o coeficiente linear corresponde ao valor de  $1/V_{máx}$ . (Figura 22)

$$\frac{1}{V_0} = \frac{K_M}{V_{máx}[S]} + \frac{1}{V_{máx}}$$
 Equação 2

Assim, foi observado um  $K_M$  de 1,98 mmol/L e uma  $V_{max}$  de 0,93 µmol/L.s.



**Figura 22.** Gráfico de duplo recíproco de Lineweaver-Burke para a obtenção das constantes cinéticas enzimáticas da LMW-PTP frente ao substrato **58**.

A constante de Michaelis-Menten,  $K_M$ , pode ser utilizada como indicativo da afinidade de uma enzima por um substrato específico, ou seja, quanto menor o valor de  $K_M$ , maior é a afinidade. Porém, esta constante é dependente do número e das velocidades das etapas individuais de uma reação enzimática. Assim, comumente são utilizados os parâmetros cinéticos  $k_{cat}$  e  $\varepsilon$  para comparar a eficiência catalítica de duas enzimas, ou a atuação de uma mesma enzima sobre substratos distintos.

O número de renovação  $(k_{cat})$  e a constante de especificidade  $(\varepsilon)$  estão relacionados aos valores de  $K_M$  e  $V_{máx}$  e são obtidos a partir das Equações 3 e 4, respectivamente.

$$k_{cat} = \frac{V_{max}}{[E]_T}$$
 Equação 3  $\varepsilon = \frac{k_{cat}}{K_M}$  Equação 4

Logo, no caso da atuação da LMW-PTP sobre a sonda **58** foi observado um número de renovação de 223,0 s<sup>-1</sup> e uma constante de especificidade de  $1,13 \times 10^6$  M<sup>-1</sup>.s<sup>-1</sup>.

O valor obtido de  $k_{cat}$  significa que 223 moléculas de substrato são convertidas em produto, por segundo, em uma única unidade enzimática, um valor expressivo para reações de hidrólise de grupos fosfatos, representando a elevada eficiência catalítica desta enzima frente a sonda **58**.

A constante de especificidade  $\varepsilon$  relaciona-se tanto a afinidade da ligação do substrato com a enzima, como com a capacidade catalítica da mesma. Esta constante apresenta um limite máximo teórico, denominado limite de difusão, que se encontra entre  $10^8 e 10^9 M^{-1}.s^{-1}$ . Isto ocorre, pois, considerando que cada colisão entre enzima e substrato resulte em uma catálise, a velocidade global da formação do produto será limitada pela velocidade de difusão da enzima em solução. Enzimas que apresentam valores de  $\varepsilon$  próximos ao limite de difusão são consideradas cataliticamente perfeitas.<sup>1</sup> Assim, considerando que a sonda avaliada não constitui o substrato natural da LMW-PTP, o valor de  $\varepsilon$  obtido representa uma elevada afinidade desta enzima pela sonda, assim como corrobora com o resultado obtido de  $k_{cat}$  referente a eficiência catalítica.

A validação desta metodologia fluorimétrica foi realizada por comparação com o método colorimétrico padrão baseado na hidrólise do fosfato *p*-nitrofenila (*pNPP*, **67**). A reação de hidrólise deste composto pela PTP libera o *p*-nitrofenol (**68**) conferindo coloração amarela a solução, que é acompanhada por leitura de absorbância a 405 nm. (Esquema 16)



Esquema 16. Reação de hidrólise do *p*NPP na presença da PTP.

A Tabela 16 apresenta os resultados de conversão dos substratos **58** e **67** nos respectivos produtos de hidrólise, expressos em porcentagem de fluorescência e absorbância, em diversas concentrações de enzima, para comparação do método fluorimétrico e colorimétrico. Equiparando-se as duas metodologias para dosagem da atividade fosfatásica, observou-se que a LMW-PTP apresenta maior afinidade pela sonda **58**, visto que até mesmo nas menores concentrações de enzima foram obtidas porcentagens de fluorescência significativas, ou seja, maiores que 10%.

**Tabela 16.** Conversão dos substratos **58** e **67** nos respectivos produtos de hidrólise, determinados por fluorescência e absorbância, em diversas concentrações de LMW-PTP.

Substrato	Metodologia <sup>c</sup>	Concentração de enzima (nM)				
Substituto	metouologiu	0,83	1,04 1	1,38	2,08	4,16
<b>58</b> <sup>a</sup>	Fluorescência	12,1	15,7	27,2	35,1	39,3
67 <sup>b</sup>	Absorbância	0,7	3,2	6,0	16,5	43,6

<sup>a</sup> Concentração de 100  $\mu$ M. <sup>b</sup> Concentração de 0,1 mM. <sup>c</sup> % de conversão= [(E-CN)/CP]\*100, onde E é a intensidade de fluorescência ou absorbância do ensaio, CN é a intensidade do controle negativo e CP é a intensidade do controle positivo. Maiores detalhes no Item 12 da Parte Experimental.

Observou-se que as metodologias apresentaram respostas semelhantes quando foi utilizado 1,04 nM de enzima para o ensaio fluorimétrico e 2,08 nM para o ensaio colorimétrico. A Tabela 17 apresenta alguns dados para a comparação das mesmas nesta condição. A sensibilidade do método fluorimétrico foi aproximadamente 50 vezes maior, visto que foi utilizada uma concentração de substrato 25 vezes menor e de enzima duas vezes menor. Assim, apesar de a metodologia fluorimétrica utilizar uma sonda de custo mais elevado, a maior sensibilidade da técnica permite a utilização de menores concentrações de enzima e substrato, tornando-a economicamente mais atrativa.

Variáveis	Substratos			
v al la vels	58	67		
[E] (nM)	1,04	2,08		
[S] (µM)	100	2500		
Tempo de incubação (min)	10	10		
Temperatura (°C)	37	37		
Leitura	Fluorescência (460 nm)	Absorbância (405 nm)		
Preço (US \$/g)	473	45		

**Tabela 17.** Comparação das metodologias fluorimétrica e colorimétrica para a detecção da atividade de LMW-PTP.

Visando avaliar comparativamente a afinidade da LMW-PTP frente a sonda **58**, foram realizados ensaios de competição entre os dois substratos. A Tabela 18 apresenta os resultados de conversão dos substratos avaliados determinados por fluorescência e absorbância para os ensaios realizados na presença de um único substrato ou na presença de ambos. A concentração utilizada foi de 100  $\mu$ M.

**Tabela 18.** Ensaios de competição entre os substratos **58** e **67** na presença da LMW-PTP.

Metodologia		Substratos <sup>b</sup>	
incloudingiu	58	67	58 + 67
Fluorescência <sup>a</sup>	42,8		44,0
Absorbância <sup>a</sup>		54,3	25,8

<sup>a</sup> % de conversão= [(E-CN)/CP]\*100, onde E é a intensidade de fluorescência ou absorbância do ensaio, CN é a intensidade do controle negativo e CP é a intensidade do controle positivo. Maiores detalhes no Item 12 da Parte Experimental. <sup>b</sup> Concentração de 100 μM

Foi observado que a conversão do substrato **58** foi pouco influenciada pela presença do *p*NPP (**67**) no meio, enquanto que o efeito contrário foi verificado para a conversão do *p*NPP (**67**) na presença de **58**, onde houve um decréscimo de 50%. Logo, estes resultados corroboram com uma maior afinidade da LMW-PTP pela sonda **58**.

Após a implementação da metodologia fluorimétrica para a determinação da atividade enzimática, a mesma foi avaliada para a triagem de inibidores da LMW-PTP. Os ensaios preliminares foram realizados utilizando o inibidor padrão  $Na_3VO_4$ . Os resultados obtidos foram promissores e este método mostrou-se eficiente para a detecção da inibição desta enzima, sendo possível a obtenção de uma curva característica de inibição (Figura 23) e do IC<sub>50</sub> deste inibidor, em um valor de 25  $\mu$ M.



Figura 23. Curva de inibição da LMW-PTP na presença do inibidor Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>.

Para avaliar a versatilidade deste método na triagem de inibidores de diversas estruturas químicas, uma série de compostos (alvos de pesquisa do nosso grupo, não diretamente relacionados a inibição de fosfatases), foram testados em ensaios de inibição preliminares (Figura 24)<sup>73</sup>. Dentre as substâncias avaliadas encontram-se homosserinas lactonas (**69-71**), piperidinas (**72-74**) e diversos componentes de fragrâncias (**75-88**), totalizando 20 compostos.

<sup>&</sup>lt;sup>73</sup> Os ensaios foram realizados na presença do surfactante Triton X-100, evitando a ocorrência de inibição promíscua.



Figura 24. Compostos avaliados nos ensaios de inibição da LMW-PTP.

Três componentes de fragrâncias (**77**, **78** e **82**) apresentaram inibição superior a 90% da atividade da LMW-PTP nos pré-testes, a uma concentração de 1,0 mM. Ensaios posteriores foram realizados variando-se a concentração dos dois primeiros compostos na reação enzimática na faixa de 0,0025 a 1,0 mM. Os gráficos da Figura 25 permitiram o cálculo do IC<sub>50</sub> para ambos os compostos, sendo observados os valores de 8,99  $\mu$ M para o composto **77** e 10,62  $\mu$ M para o composto **78**.



Figura 25. Curvas de inibição da LMW-PTP frente aos compostos A) 77 e B) 78.
Portanto, a metodologia fluorimétrica desenvolvida mostrou-se eficiente e versátil na detecção da inibição de LMW-PTPs, podendo ser utilizada para a triagem de diversas classes de compostos. A sensibilidade do método permite a utilização de pequenas quantidades de enzima, substrato e do candidato a inibidor, condições favoráveis para este tipo de seleção inicial.

Este trabalho faz parte do projeto temático intitulado "Biologia Química: Novos Alvos Moleculares Naturais e Sintéticos contra Câncer. Estudos Estruturais, Avaliação Biológica e Modos de Ação", financiado pela FAPESP, e coordenado pelos professores Dr. Ronaldo A. Pilli e Dr. Fernando A. S. Coelho.

Todos os experimentos foram realizados em conjunto com a pós-doutoranda Dr. Caroline C. S. Gonçalves e em colaboração com a Profa Dra Carmen V. Ferreira do Instituto de Biologia da UNICAMP.

# 3. Conclusões Parciais e Perspectivas

A modulação anômala das atividades enzimáticas podem originar diversas enfermidades, as quais podem ser controladas através do uso de fármacos que atuem inibindo ou ativando estas enzimas. Assim, neste trabalho foi desenvolvida uma metodologia para a detecção da atividade e inibição de fosfatases, que estão intimamente ligadas a ocorrência de diversas doenças.

Uma sonda fluorogênica, derivada de umbeliferona, para detecção de PTPs foi sintetizada, e a metodologia para a determinação da atividade de uma LMW-PTP frente a este substrato foi otimizada, desenvolvendo-se um método eficiente, rápido e sensível para a detecção da atividade desta enzima.

Diversos compostos, incluindo o inibidor padrão  $Na_3VO_4$ , foram avaliados frente a inibição desta LMW- PTP, observando que esta metodologia é versátil para o estudo de várias classes de substâncias.

Como perspectivas, moléculas sintetizadas por grupos de pesquisa em Síntese Orgânica do Instituto de Química, como candidatos específicos a inibidores de fosfatases, serão testadas para a inibição desta LMW-PTP. A metodologia para a detecção de outras PTPs (PTP1B, CD45 e Cdc25b) será avaliada utilizando a mesma sonda fluorogênica.

# **CONSIDERAÇÕES FINAIS**

Este trabalho de dissertação apresentou um estudo amplo sobre a versatilidade das enzimas, abordando aspectos específicos e relevantes da atuação destes biocatalisadores. Os principais tópicos apresentados foram a triagem enzimática de micro-organismos oriundos de ambientes restritos, o estudo da promiscuidade de lipases atuando em reações de oxidação de Baeyer-Villiger e a avaliação de inibidores de proteína tirosina fosfatases através da utilização de uma sonda fluorogênica derivada de umbeliferona.

Assim, foi possível avaliar aspectos químicos, bioquímicos e terapêuticos das enzimas e ao mesmo tempo aplicar pela primeira vez técnicas específicas de RMN de <sup>1</sup>H ao estudo de lipases atuando em reações de oxidação em meio orgânico, evidenciando a organização molecular do sistema bifásico água/tolueno, contendo lipase, ácido octanóico, cetona cíclica e peróxido de hidrogênio.

PARTE EXPERIMENTAL

# 1. Intrumentação

### 1.1. Métodos Cromatográficos

As análises cromatográficas em camada delgada (CCD) foram realizadas utilizando-se cromatofolhas de alumínio (folha padrão 20 x 20 cm), cobertas com sílica gel com indicador de fluorescência (Merck). A revelação dos compostos foi realizada por irradiação com lâmpada UV<sub>254nm</sub>, pulverização com solução reveladora de *p*-anisaldeído (*p*-anisaldeído, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, ácido acético e etanol na proporção de 1:2:1:100), ou pulverização com solução reveladora de ácido fosfomolíbdico (10% m/v de ácido fosfomolíbdico em etanol), ambas com posterior aquecimento a 300 °C com pistola aquecedora.

As purificações dos compostos sintetizados foram realizadas por cromatografia "flash" em coluna, sendo utilizada sílica gel 60  $\mu$ m (ACROS – 0,035-0,070 mm com poros de 6 nm) como fase estacionária e solventes destilados como eluentes. As frações coletadas foram comparadas por CCD e agrupadas por perfil de semelhança.

As cromatografias gasosas acopladas a espectrometria de massas (CG-EM) foram realizadas em cromatógrafo Agilent 7890 acoplado a detector seletivo de massas HP 5975C, operando por impacto de elétrons (EI) com energia de ionização de 70 eV, na faixa de m/z 50-700. Foi utilizada uma coluna capilar de sílica fundida HP 5-MS (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm) com 5% de fenil-metilsiloxano para a separação dos compostos analisados. As análises foram realizadas em fluxo constante de He (1 mL/min), com injetor a 200 °C e detector a 230 °C, e injeções em modo "split", utilizando 1,0 ou 2,0 µL da solução a ser analisada, dependendo da concentração da mesma. As condições de análise (rampas de aquecimento) variaram de acordo com cada experimento, sendo relatadas junto aos mesmos.

A discriminação dos enantiômeros foi realizada em cromatógrafo Agilent 6850, acoplado com detector de ionização de chama (CG-DIC), equipado com injetor automático e coluna capilar de sílica fundida Lipodex E, de fase quiral Octakis-(2,6di-O-pentil-3-O-butiril)- $\gamma$ -ciclodextrina (25 m x 0,25 mm x 0,25 µm). As análises foram realizadas em fluxo constante de H<sub>2</sub> de 1 mL/min, com injetor a 220 °C e detector a 240 °C, sendo as injeções feitas no modo "split", utilizando 1 µL da solução a ser analisada na concentração de 1 mg/mL. As condições de análise (rampas de aquecimento) variaram de acordo com cada experimento, sendo relatadas junto aos mesmos.

### 1.2. Métodos Espectrométricos de Massa por EletronSpray (ESI-EM)

Todos os experimentos foram realizados em espectrômetro de massa hídrido LTQ-Orbitrap (Thermo Fischer Scientific). Nitrogênio gasoso foi utilizado para nebulização, desolvatação e dissociação induzida por colisão. As amostras foram preparadas a uma concentração de 1,0 µg/mL em metanol: água (4:1), na presença de 0,1% de hidróxido de amônio para as análises no modo negativo ou 0,1% de ácido fórmico para as análises no modo positivo. As amostras foram submetidas a injeção direta, a pressão atmosférica e fluxo constante de 10 µL/min. As análises no modo negativo foram realizadas utilizando gás de arraste = 3, voltagem do spray = 4,0 kV, voltagem do capilar = 26 V, temperatura do capilar = 275 °C e *tube lens* = 150 V. As análises no modo positivo foram realizadas utilizando gás de arraste = 3, voltagem do spray = 4,0 kV, voltagem do capilar = -35 V, temperatura do capilar = 275 °C e *tube lens* = 170 V.

As varreduras de pseudo-íons moleculares (faixa de m/z 100-800) foram realizadas tanto no LTQ quanto no Orbitrap. Os dados foram adquiridos com uma resolução de 30.000 em m/z 400. O controle de ganho automático (AGC, do inglês *automatic gain control*) de população de íons alvo para os experimentos de varredura completa foi de 30.000 para o LTQ-EM e 300.000 para o Orbitrap-EM, e a população de íons alvo para o LTQ-EM. Os dados foram analisados utilizando o software Xcalibur 2.0.5 (Thermo Electron Corporation).

## 1.3. Métodos espectrométricos de Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

### 1.3.1. Condições Gerais

Todos os espectros de RMN foram obtidos em espectrômetro Varian Inova – 500 ( $B_0=11,7$  T), operando a 499,88 MHz para o <sup>1</sup>H e 125,69 MHz para o <sup>13</sup>C, ou em espectrômetro Bruker Avance III 400 ( $B_0=9,4$  T), operando a 400,13 MHz para o <sup>1</sup>H e 100,63 MHz para o <sup>13</sup>C.

As amostras foram analisadas em tubos de ressonância de 5 mm de diâmetro. O sinal de deutério do solvente foi utilizado como trava do campo e ajuste da homogeneidade do campo magnético.

Os deslocamentos químicos ( $\delta$ ) foram registrados em partes por milhão (ppm), tomando-se como padrão de referência interna tetrametilsilano (TMS, 0,0 ppm) ou o próprio solvente da solução.

Os espectros foram processados em estações de dados, utilizando o programa *VNMRJ*, para os experimentos realizados no espectrômetro Varian INOVA-500 e o programa *TopSpin 2.1*, para os experimentos realizados no espectrômetro Bruker Avance III 400.

1.3.2. Experimentos de RMN de <sup>1</sup>H e de <sup>13</sup>C

Os experimentos unidimensionais de RMN de <sup>1</sup>H e de <sup>13</sup>C foram realizados utilizando as condições típicas pré-definidas nos *softwares* dos equipamentos. Todos os experimentos de <sup>13</sup>C foram adquiridos utilizando uma sonda de 5 mm de detecção direta, e todos os experimentos uni e bidimensionais de <sup>1</sup>H foram adquiridos utilizando uma sonda de 5 mm de detecção indireta.

Espectros de RMN de <sup>13</sup>C de DEPT 135° e DEPT 90°, além de algumas técnicas de RMN em duas dimensões (COSY, HSQC e HMBC) foram utilizados, quando necessário, para elucidação estrutural de compostos sintetizados.

### 1.3.3. Experimentos de STD

Os experimentos de *STD* foram realizados em espectrômetro Varian Inova – 500 ( $B_0$ =11,7 T) operando a 499,88 MHz para o <sup>1</sup>H e equipado com sonda de 5 mm para detecção indireta (com gradiente de campo linear pulsado em z).

Inicialmente, o pulso de 90° foi calibrado através da realização de uma varredura de largura de pulsos. O segundo espectro obtido com ausência de sinais, resultado de um pulso de 360°, foi utilizado para a calibração, ou seja, a largura deste pulso, em  $\mu$ s, foi dividida por 4, resultando no valor da largura do pulso do 90°.

Previamente, também foram obtidos os valores de tempo de relaxação longitudinal ( $T_1$ ) para os sistemas estudados. Para isto, foi utilizada uma sequência de pulso conhecida como inversão-recuperação (descrita no item 1 do Capítulo II), a qual gerou uma lista de dez experimentos a serem realizados com os seguintes valores de tempo de espera entre os pulsos de 180° e 90° (d2): 0,0625; 0,125; 0,25; 0,50; 1,00; 2,00; 4,00; 8,00; 16,00 e 32,00 s. Os valores de  $T_1$ , obtidos a partir do processamento dos espectros, foram multiplicados por um fator de 3, para posterior utilização nos experimentos de *STD*, como garantia da relaxação completa de todos os spins da amostra.

O sinal da água foi saturado utilizando a sequência de pulsos "PRESAT" do pacote "WATER" da Varian, sendo que neste experimento a frequência do transmissor do equipamento foi ajustada para o valor da frequência dos hidrogênios da água, resultando na saturação seletiva dos mesmos.

Para realização dos experimentos de *STD*, os quais já resultam na diferença entre os experimentos em ressonância e fora de ressonância, foi executada uma irradiação seletiva utilizando trens de pulsos Gaussianos em -0,5 ppm (sinal da enzima) ou 5,05 ppm (sinal da água em tolueno ou benzeno) para aquisição em ressonância e em 30 ppm para a aquisição fora de ressonância. Para o cálculo dos incrementos de transferência de nOe relativos a cada sinal, foi também realizado um experimento

controle, irradiando-se somente na frequência fora da janela espectral (30 ppm), e com metade do número de repetições relativo ao experimento de STD.

Todos os experimentos foram realizados simulando as condições reacionais (item 8.4) na presença de solventes deuterados. Os parâmetros utilizados nestes experimentos estão listados na Tabela 19.

Parâmatros	Sistemas <sup>a</sup>				
i ai ameti os	1	2	3		
Tempo de relaxação (d1)	20 s	15 s	22 s		
Largura de pulso (pw=pw90)	9,0 µs	9,0 µs	9,5 µs		
Tempo de aquisição (at)	0,6 s	0,6 s	0,6 s		
Janela espectral (sw)	12.001,2 Hz	12.001,2 Hz	12.001,2 Hz		
nt (número de aquisições)	800	1024	700		
Tempo de mistura (mix)	40 ms	40 ms	40 ms		
Número de ciclos (n)	50	50	50		

Tabela 19. Parâmetros utilizados para a realização dos experimentos de STD.

<sup>a</sup> Sistema 1: lipase de *C. antarctica*, 2-pentilciclopentanona, tolueno. Sistema 2: lipase de *C. cylindracea*, 2-pentilciclopentanona, tolueno. Sistema 3: lipase de *C. cylindracea*, 2-pentilciclopentanona, benzeno.

## 1.3.4. Experimentos de $T_1$ e $T_2$

Os experimentos de  $T_1$  e  $T_2$  foram realizados em espectrômetro Bruker Avance III 400 (B<sub>0</sub>=9,4 T) operando a 400,13 MHz para o <sup>1</sup>H e equipado com sonda de 5 mm para detecção indireta.

Os experimentos de  $T_1$  foram realizados utilizando a sequência de pulsos de inversão-recuperação ([180° –  $\tau$  – 90°], descrita no item 1 do Capítulo II, e denominada "*t1ir*" no software *TopSpin* da Bruker). Esta metodologia consistiu na realização de 16 experimentos sequenciais com os seguintes valores de tempo de espera entre os pulsos de 180° e 90° (d2): 0,01; 0,10; 1,00; 2,00; 3,00; 4,00; 5,00; 6,00; 7,00; 8,00 s; 10,00; 12,00; 13,00; 14,00; 16,00 s e 20,00 s. Os valores de  $T_1$ foram obtidos a partir da construção de um gráfico da integral do sinal de interesse versus o tempo de espera d2, sendo que este gráfico se apresenta na forma de uma curva exponencial que segue a Equação 5.

$$I(t) = I(0) \cdot \left[ 1 - 2 \cdot A \cdot exp\left(\frac{-t}{T_1}\right) \right]$$
 Equação 5

Os experimentos de  $T_2$  foram realizados utilizando a sequência de pulsos CPMG (Carr-Purcell-Meiboom-Gill,  $[90^\circ_x - (\tau - 180^\circ_y - \tau)_n]$ , e consistiram na realização de 16 de experimentos em série, com um t de 1,0 ms e os seguintes valores de n: 1; 2; 20; 50; 100; 200; 300; 400; 500; 700; 1000; 1200; 1400; 1600; 1800; 2600. Os valores de  $T_2$  foram obtidos a partir da construção de um gráfico da integral do sinal de interesse versus o tempo d2, sendo que este gráfico se apresenta na forma de uma curva de decaimento exponencial que segue a Equação 6.

$$I(t) = I(0).exp\left(\frac{-t}{T_2}\right)$$
 Equação 6

Parâmetros	Experimento		
i urumetros	$T_{I}$	$T_2$	
Tempo de relaxação (d1)	20 s	15 s	
Largura de pulso (p1)	7,5 µs	7,5 µs	
Tempo de aquisição (AQ)	1,83 s	0,99 s	
Janela espectral (sw)	4480,29 Hz	8223,69 Hz	
Número de aquisições (ns)	8	8	
Frequência do transmissor (O1)	1402,44 Hz	2470,97 Hz	

**Tabela 20.** Paramêtros utilizados para a realização dos experimentos de  $T_1$  e  $T_2$ .

1.4. Métodos espectrofotométricos de fluorescência e absorbância

As medidas de fluorescência e absorbância dos ensaios de triagem de alto desempenho para a detecção da atividade e inibição de enzimas foram realizadas em 92 leitor de placas *FlashScan 530 Analitic Jena*. Para os ensaios fluorimétricos foi utilizada fonte de excitação em  $\lambda_{ex}$ = 390 nm e leitura de emissão em  $\lambda_{em}$ = 460 nm. Para os ensaios colorimétricos foi utilizado um comprimento de onda de 405 nm. Todos os ensaios foram realizados em placas de polipropileno de 96 poços, sendo as leituras obtidas em duplicata.

# 2. Reagentes e Solventes

Foram utilizados reagentes e solventes de grau P.A., sendo, sempre que necessário, tratados conforme procedimentos descritos na literatura.

As reações sensíveis a umidade foram realizadas em atmosfera inerte de argônio ou nitrogênio.

# 3. Procedimentos Gerais Adotados no Laboratório de Biocatálise

Todos os meios de cultura, soluções e materiais a serem utilizados em contato direto com os micro-organismos foram esterilizados a 121 °C, 1,5 Pa, por 15 minutos em autoclave.

Soluções de álcool 70% (v/v) e hipoclorito 1% (v/v) foram utilizadas para desinfetar bancadas de trabalho e fluxo laminar. A manipulação dos microorganismos foi sempre realizada em câmara de fluxo laminar.

Todos os materiais e meios que tiveram contato direto com os micro-organismos foram autoclavados antes de serem descartados.

# 4. Micro-organismos

Os micro-organismos avaliados nas reações de biocatálise foram isolados de três diferentes fontes de água de drenagem de mina de prospecção de cobre, localizada na Província Mineral dos Carajás no estado do Pará. O isolamento das cepas microbianas foi realizado pelo grupo de pesquisa da Profa Dra Laura Ottoboni (CBMEG-UNICAMP) e as amostras foram cedidas pela empresa Vale. As cepas de bactérias isoladas estão em processo de identificação.

# 5. Enzimas

# 5.1. Lipases

As lipases avaliadas nos ensaios de promiscuidade enzimática foram adquiridas da empresa Sigma-Aldrich® (Lipase Basic Kit. Cat.No. 62327), sendo provenientes das seguintes fontes:

- Aspergillus
- Candida Antarctica
- Candida cylindracea
- Mucor miehei
- Pseudomonas cepacia
- Pseudomanas fluorescens
- *Rhizopus niveus*
- Pâncreas Suíno

## 5.2. Fosfatases

Os ensaios de inibição de fosfatase foram realizados utilizando uma proteína tirosina fosfatase de baixo peso molecular (LMW-PTP, 18 kDa), recombinante,

humana (pâncreas), expressa em *E. coli*. Esta enzima foi produzida e cedida pelo grupo de pesquisa da Profa. Carmen V. Ferreira (IB – UNICAMP). Propriedades enzimáticas:

Concentração: 1,0 mg/mL pH ótimo: 5,0 (tampão acetato) Temperatura ótima: 37 °C Atividade (substrato *p*NPP): 25 U/mg *K<sub>M</sub>* (substrato *p*NPP): 0,16 mmol/L

# 6. Preparo de Soluções

6.1. Solução Tampão Sφrensen (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> – KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>)

Inicialmente foram preparadas soluções estoque 0,1 mol/L de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, dissolvendo-se 1,42 g deste sal em 100 mL de água destilada, e de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, dissolvendo-se 1,36 g deste sal em 100 mL de água destilada. As soluções tampões, nos pHs desejados, foram preparadas misturando-se as soluções previamente preparadas, em volumes aproximados, segundo a Tabela 21. Os valores de pH foram ajustados em pHmetro (pH 300 M *Analyser*).

рН	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (mL)	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (mL)	pН	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (mL)	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (mL)
5,3	2,5	97,5	6,8	50,0	50,0
5,6	5,0	95,0	7,0	60,0	40,0
5,9	10,0	90,0	7,2	70,0	30,0
6,2	20,0	80,0	7,3	80,0	20,0
6,5	30,0	70,0	7,7	90,0	10,0
6,6	40,0	60,0	8,0	95,0	5,0

**Tabela 21.** Volumes das soluções 0,1 mol/L de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> e KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> necessários para o preparo de soluções tampão S $\phi$ rensen em diversos pHs.

# 6.2. Solução Tampão Borato (Ácido Bórico-Bórax)

Inicialmente foram preparadas soluções estoque 0,2 mol/L de  $H_3BO_3$ , dissolvendo-se 1,24 g deste ácido em 100 mL de água destilada, e 0,05 mol/L de bórax (Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub>.10H<sub>2</sub>O), dissolvendo-se 1,91 g deste sal em 100 mL de água destilada. A solução tampão desejada foi preparada através da adição de volumes aproximados da solução de bórax, segundo a Tabela 22, a 25 mL da solução de  $H_3BO_3$ . A solução obtida foi então diluída para um volume de 100 mL. Os valores de pH foram ajustados em pHmetro (pH 300 M *Analyser*).

Tabela 22.	Volume da solução 0,05	mol/L de bé	órax necessário	para o preparo de
soluções tam	pão borato em diversos p	Hs.		
nH	Solução de Bór	ax	nH	Solução de Bórax
pm	(mL)		hu	(mL)

pН	solução de Borax (mL)	рН	solução de Borax (mL)
7,6	1,0	8,7	11,0
7,8	1,5	8,8	15,0
8,0	2,5	8,9	21,0
8,2	3,7	9,0	30,0
8,4	6,0	9,1	42,0
8,6	9,0	9,2	58,0

## 6.3. Solução Tampão Acetato

Inicialmente foram preparadas soluções estoque 0,1 mol/L de acetato de sódio (CH<sub>3</sub>COONa), dissolvendo-se 0,82 g deste sal em 100 mL de água destilada, e de ácido acético glacial (CH<sub>3</sub>COOH), diluindo-se 0,57 mL deste ácido em 100 mL de água destilada. A solução tampão no pH desejado foi preparada através da mistura, dos volumes aproximados, apresentados na Tabela 23, das soluções previamente preparadas.

рН	Ácido acético (mL)	Acetato de Sódio (mL)	pH	Ácido acético (mL)	Acetato de Sódio (mL)
3,60	92,5	7,5	4,80	40,0	60,0
3,80	88,0	12,0	5,00	29,5	70,5
4,00	82,0	18,0	5,20	21,0	79,0
4,20	73,5	26,5	5,40	14,5	85,5
4,40	63,0	37,0	5,60	9,5	90,5
4,60	51,0	49,0			

**Tabela 23.** Volumes das soluções 0,1 mol/L de ácido acético e acetato de sódio necessários para o preparo de soluções tampão acetato em diversos pHs.

## 6.4. Soluções das Sondas Fluorogênicas

Soluções estoques das sondas fluorogênicas **1-9** foram inicialmente preparadas a uma concentração de 20 mmol/L em acetonitrila. Posteriormente, as mesmas foram diluídas a uma concentração de 2,0 mmol/L em água:acetonitrila (1:1), constituindo a solução de trabalho. As soluções das sondas fluorogênicas **58** e **59** foram preparadas diretamente na concentração de trabalho de 2,0 mmol/L em água *milli-Q*.Todas as soluções foram estocadas sob refrigeração.

## 6.5. Solução de Periodato de Sódio (NaIO<sub>4</sub>)

A solução de NaIO<sub>4</sub> a uma concentração de 20 mmol/L foi preparada através da dissolução de 4,3 mg de NaIO<sub>4</sub> em 1,0 mL de água *milli-Q*. Esta solução foi sempre preparada momentos antes dos ensaios de *HTS* serem realizados.

## 6.6. Solução de Albumina de Soro Bovino (BSA)

A solução de BSA foi preparada dissolvendo-se 5,0 mg de BSA em 1,0 mL de tampão borato pH 7,4. A mistura obtida foi agitada suavemente, evitando a formação de espuma. Esta solução foi sempre preparada momentos antes da realização dos ensaios de *HTS*.

# 7. Ensaios de triagem de alto desempenho (HTS)

Os micro-organismos avaliados nos ensaios de *HTS* (item 4) foram cultivados em placas de Petri contendo meio LB sólido por 16 h. Os cultivos foram realizados pela doutoranda Viviane D. Rodrigues do grupo de pesquisa da Profa Dra Laura Ottoboni (CBMEG-UNICAMP).

Após o período de crescimento, as células foram transferidas para *Eppendorf* estéril, sendo pesadas e suspensas em tampão borato pH 7,4 20 mmol/L, e posteriormente diluídas para uma concentração final de 0,2 mg/mL.

As reações foram realizadas em placas de polipropileno de 96 poços, sendo os ensaios e controles realizados em duplicata, segundo o esquema abaixo:

### Ensaios (E):

10 µL de solução de sonda 2 mmol/L;

80 µL de solução de BSA 5,0 mg/mL;

10 µL de solução de NaIO<sub>4</sub> 20 mmol/L (triagem de hidrolases);

10 µL de tampão borato pH 7,4 20 mmol/L (triagem de monoxigenases);

100 µL de suspensão celular 0,2 mg/mL.

Controle positivo (CP):

10 µL de solução de produto a 2 mmol/L;

80 μL de solução de BSA 5,0 mg/mL;

10 µL de solução de NaIO<sub>4</sub> 20 mmol/L (triagem de hidrolases);

10 µL de tampão borato pH 7,4 20 mmol/L (triagem de monoxigenases);

100 µL de suspensão celular 0,2 mg/mL.

Controle negativo (CN):

10 µL de solução de sonda 2 mmol/L;

80 μL de solução de BSA 5,0 mg/mL;

10 µL de solução de NaIO<sub>4</sub> 20 mmol/L (triagem de hidrolases);

100 µL de tampão borato pH 7,4 20 mmol/L (triagem de hidrolases);

110µL de tampão borato pH 7,4 20 mmol/L (triagem de monoxigenases); Controle microbiano (*CM*):

10 μL de tampão borato pH 7,4 20 mmol/L (triagem de hidrolases);

20 µL de tampão borato pH 7,4 20 mmol/L (triagem de monoxigenases);

80 μL de solução de BSA 5,0 mg/mL;

10 µL de solução de NaIO<sub>4</sub> 20 mmol/L (triagem de hidrolases);

100 µL de suspensão celular 0,2 mg/mL.

Todos os resultados foram expressos em porcentagem de conversão da sonda no produto (% P), sendo considerado como 100% a reação na presença do produto de hidrólise ou oxidação (CP). As intensidades de fluorescência obtidas nos ensaios (E) foram diminuídas dos seus respectivos controles microbiano (CM) e negativo (CN), para os cálculos das conversões (Equação 7).

$$% P = \frac{(E - CM - CN)}{CP} \times 100$$
 Equação 7

# 8. Ensaios de biotransformação convencionais

Os micro-organismos avaliados (item 4) foram cultivados em meio LB líquido por 16 horas. Estes cultivos foram realizados pela doutoranda Viviane D. Rodrigues do grupo de pesquisa da Profa Dra Laura Ottoboni (CBMEG-UNICAMP).

Após o período de crescimento, as células foram separadas do meio líquido através de centrifugação a 5000 rpm, por 15 min, a temperatura ambiente.

Para a realização dos ensaios de biotransformação, aproximadamente 0,25 g de células (peso úmido) foi adicionado a 5,0 mL de tampão Sφrensen pH 7,0 em frascos

de Erlenmeyer de 25 mL. A esta suspensão foi adicionado 1,5  $\mu$ L de cada substrato para os ensaios em formato de multibiorreação, e 5  $\mu$ L ou 5 mg de substrato para os ensaios realizados na presença de um único composto. A solução resultante foi mantida sob agitação constante em incubadora orbital a 200 rpm e 37 °C, sendo monitoradas periodicamente. Os ensaios de multibiorreação foram interrompidos em 72 e 120 horas, e os ensaios com um único substrato foram interrompidos com 12, 24, 48, 72 e 120 horas.

As soluções reacionais foram extraídas com acetato de etila (2 x de 2,0 mL) por centrifugação das células, após saturação da fase aquosa com NaCl. A fase orgânica foi separada e seca sob MgSO<sub>4</sub> anidro. Os extratos orgânicos secos foram derivatizados com diazometano. As amostras derivatizadas foram acrescidas de benzofenona (padrão interno) e analisadas por CG-EM.

Para cada ensaio de biotransformção foram realizados dois controles: um contendo somente os substratos avaliados em tampão Sφrensen pH 7,0 (controle dos substratos), e outro contendo somente as células bacterianas em tampão Sφrensen pH 7,0 (controle microbiano).

As conversões enzimáticas (%) foram determinadas por CG-EM utilizando as áreas dos picos cromatográficos do padrão interno (benzofenona), do produto (cromatograma da reação) e do reagente (cromatograma do controle dos substratos), segundo a Equação 8.

% Conversão = 
$$\frac{A_P \cdot A_{PI-C}}{A_R \cdot A_{PI-R}}$$
 Equação 8

onde  $A_P$  é a área do pico cromatográfico do produto no cromatograma da reação,  $A_R$  é a área do pico cromatográfico do reagente no cromatograma de controle dos substratos,  $A_{PI-C}$  é a área do pico cromatográfico do padrão interno no cromatograma de controle dos substratos, e  $A_{PI-R}$  é a área do pico cromatográfico do padrão interno no cromatograma no cromatograma da reação.

# 9. Determinação da atividade enzimática de lipases por titulometria

Para a realização dos ensaios foi previamente preparada uma solução contendo 7,0% m/v de óleo de oliva e 4,5% m/v de Triton X-100 em tampão Sφrensen pH 8,0 0,05 mol/L. Esta mistura foi mantida sob agitação constante por 1 hora até a formação de uma emulsão estável.

A 5,0 mL desta emulsão foi adicionado 0,5 mL de uma solução de enzima em tampão S¢rensen pH 8,0 0,05 mol/L (Tabela 10). A mistura reacional foi mantida sob agitação por 30-60 min a 40 °C. Após este período, a mistura foi titulada com solução de NaOH 0,04 mol/L (previamente padronizada com solução padrão de biftalato de potássio 0,05 mol/L), utilizando fenolftaleína como indicador.

O branco da reação foi obtido simulando as condições acima, porém substituindo a solução enzimática por 0,5 mL de tampão S¢rensen pH 8,0 0,05 mol/L.

A atividade enzimática foi obtida utilizando a Equação 9, onde *V* é o volume gasto de NaOH para titular a reação enzimática,  $V_B$  é o volume gasto de NaOH para titular o branco da reação,  $MM_{NaOH}$  é a massa molar do NaOH, *m* é a massa de enzima utilizada e *t* é o tempo de reação.

$$A = \frac{\left[\frac{(V - V_B).MM_{NaOH}}{1000}\right]}{m.t} \qquad \text{Equação 9}$$

A atividade enzimática foi expressa em U/mg, onde uma unidade enzimática (U) é definida como a quantidade de enzima que promove a liberação de 1,0  $\mu$ mol de ácido graxo por min, em pH 8,0 e a 40 °C.

# 10. Ensaios de Promiscuidade Enzimática de Lipases

## **10.1.Ensaios Preliminares**

A uma solução das cetonas **39-43** (1,5  $\mu$ L de cada), ácido octanóico (100  $\mu$ L) e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30% (1 mL) em tolueno (10mL), foi adicionado 5 mg de uma das quatro lipases a serem avaliadas (*C. cylindracea, R. arrhizus, R. niveus* e pâncreas suíno). A reação foi mantida sob agitação a 200 rpm e 37 °C. Alíquotas foram retiradas a cada 24 horas durante 3 dias; as mesmas foram lavadas com solução saturada de NaHCO<sub>3</sub>, e secas sob MgSO<sub>4</sub>, sendo posteriormente derivatizadas com diazometano e analisadas por GC-EM.

## 10.2. Avaliação do Solvente

O procedimento do item 8.1 foi repetido avaliando-se os solventes tolueno, benzeno e acetonitrila, na presença da lipase de *C. cylindracea* e de uma única cetona cíclica como substrato (2-pentilciclopentanona, **42**, 5,0 μL).

## 10.3. Avaliação do Agente Oxidante

O procedimento 8.1 foi repetido avaliando-se os agentes oxidantes  $H_2O_2$  30% v/v (1,0 mL) e UHP (uréia-peróxido de hidrogênio, 50 mg), na presença da lipase de *C. cylindracea* e de uma única cetona cíclica como substrato (2-pentilciclopentanona, **42**, 5,0 µL).

## 10.4. Avaliação de Diferentes Substratos e Lipases

A uma solução de 2-pentilciclopentanona ou 2-heptilciclopentanona (10,0  $\mu$ L), ácido octanóico (100  $\mu$ L) e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30% (1 mL) em tolueno (10mL), foi adicionado 5 mg de lipase (nove lipases comerciais descritas no item 5.1). A reação foi mantida sob agitação a 200 rpm e 40 °C. Alíquotas foram retiradas a cada 24 horas durante 3 dias; as mesmas foram lavadas com solução saturada de NaHCO<sub>3</sub>, e secas sob MgSO<sub>4</sub>. A fase orgânica foi posteriormente derivatizada com diazometano, acrescida com benzofenona (padrão interno) e analisada por GC-EM.

## 11. Ensaio de Inibição de Fosfatases

### 11.1.Condições Gerais

Todos os ensaios foram realizados em placas de polipropileno de 96 poços e incubadas em leitor de placas *FlashScan 530 Analitic Jena*, com temperatura controlada a 37 °C.

As reações foram sempre realizadas em duplicatas e com seus respectivos controles: enzimático (reação na ausência da sonda), do substrato (reação na ausência da enzima), e do produto (reação substituindo a sonda pelo seu respectivo produto de hidrólise).

Todos os resultados foram expressos em porcentagem de formação do produto (% *P*), sendo considerado como 100% a reação na presença do produto de hidrólise (*CP*). As intensidades de fluorescência obtidas nos ensaios (*E*) foram diminuídas dos seus respectivos controles enzimático (*CE*) e do substrato (*CS*), para os cálculos das conversões (Equação 10).

$$\% P = \frac{(E - CE - CS)}{CP} \times 100$$
 Equação 10

#### 11.2. Otimização das Condições Reacionais

Os ensaios enzimáticos foram realizados utilizando solução estoque 2 mmol/L da sonda **58** (item 6.4), solução tampão acetato pH 5,0 0,1 mol/L (item 6.3), solução da enzima 55 nmol/L (1,0  $\mu$ L da solução estoque 1,0 mg/mL em 999  $\mu$ L de tampão acetato pH 5,0), e solução de NaOH 0,1 mol/L ou tampão borato pH 8,0 (item 6.2).

Os ensaios preliminares foram realizados utilizando 10  $\mu$ L da solução estoque de sonda, 10  $\mu$ L da solução de enzima e 80  $\mu$ L de solução tampão. Após um período de 10 min, a reação foi interrompida pela adição de 100  $\mu$ L da solução de NaOH 0,1 mol/L. Posteriormente, os ensaios passaram a ser interrompidos pela adição de 100  $\mu$ L de solução tampão borato pH 8,0.

Para a otimização das condições reacionais, foram avaliadas as concentrações de enzima e sonda, além do tempo reacional. As concentrações de enzima variaram de 1,5 a 15 nmol/L (5,0 a 50  $\mu$ L de solução de enzima). A concentração de sonda foi avaliada entre 25 e 500  $\mu$ mol/L (2,5 a 50  $\mu$ L de solução estoque de sonda). O tempo de reação foi avaliado na faixa de 1 a 30 min.

O volume final da reação foi sempre completado para 100  $\mu$ L com tampão acetato pH 5,0.

### 11.3. Determinação dos Parâmetros Cinéticos

Para a determinação das velocidades iniciais foram realizados experimentos nas concentrações de sonda de 25, 50, 75, 100, 150, 200, 250, 300, 400 e 500  $\mu$ M, variando-se os tempos de 1 a 30 min. A partir dos dados de intensidade de fluorescência obtidos, foram construídos gráficos da concentração de produto formado versus o tempo de incubação, cuja inclinação da reta fornece a velocidade inicial para cada concentração de substrato.

A partir destes dados foi plotado o gráfico de duplo recíproco de Lineweaver-Burke, segundo a Equação 2, de onde foram extraídos os valores de  $K_M$  e  $V_{máx}$ , possibilitando a determinação dos demais parâmetros ( $\varepsilon e k_{cat}$ ), segundo as Equações 3 e 4.

$$\frac{1}{V_0} = \frac{K_m}{V_{máx}[S]} + \frac{1}{V_{máx}} \quad \text{Equação 2}$$

104

$$k_{cat} = \frac{V_{máx}}{[E]_t}$$
 Equação 3  $\varepsilon = \frac{k_{cat}}{K_m}$  Equação 4

11.4. Validação da Metodologia

A metodologia fluorimétrica foi validada por comparação com o método colorimétrico baseado na hidrólise do fosfato de *p*-nitrofenila (*p*NPP).

O ensaio fluorimétrico foi realizado utilizando 10  $\mu$ L da solução estoque 2,0 mmol/L de sonda, 7,5  $\mu$ L da solução 55 nmol/L de enzima e 82,5  $\mu$ L de tampão acetato pH 5,0. Após 10 min, a reação foi interrompida pela adição de 100  $\mu$ L de tampão borato pH 8,0, sendo a leitura de fluorescência realizada segundo o item 1.4.

O ensaio colorimétrico foi realizado utilizando 5,0  $\mu$ L de uma solução 100 mmol/L de *p*NPP, 15,0  $\mu$ L da solução 55 nmol/L de enzima e 80  $\mu$ L de tampão acetato pH 5,0. Após 10 min, a reação foi interrompida pela adição de 100  $\mu$ L de solução 0,1 mol/L de NaOH, sendo a leitura de absorbância realizada segundo o item 1.4.

### 11.5.Ensaios de Inibição

Os ensaios preliminares de inibição foram realizados utilizando uma concentração de 1,0 mmol/L do candidato a inibidor na reação. Para isto, foram preparadas soluções estoque destes compostos a uma concentração de 20 mmol/L em acetonitrila ou dimetilsulfóxido, sendo adicionado 5,0 µL desta solução no meio reacional.

Para os candidatos a inibidores que apresentaram uma inibição superior a 80% nos testes preliminares, foram realizados ensaios variando-se a concentração dos mesmos no meio reacional. A faixa de concentração avaliada correspondeu a aproximadamente 10 vezes acima e abaixo do valor de  $K_m$  desta enzima frente a sonda **58**. Estes ensaios possibilitaram a obtenção do IC<sub>50</sub> para os candidatos a inibidor.

# 12. Procedimentos Sintéticos

12.1.Síntese de Aril Alquil Tioéteres

A um balão de 50 mL foi adicionado  $CH_2Cl_2$  (15 mL) e tiofenol (4,6 mmol, 0,5 g). A mistura reacional foi mantida sob agitação em banho de gelo por 5 minutos (0 °C). Após este tempo, foi adicionado  $K_2CO_3$  (13,7 mmol, 1,9 g), o haleto de alquila [13,7 mmol, (iodeto de metila, 0,83 mL) ou (iodeto de etila, 1,1 mL)] e trietilamina (13,7 mmol, 1,9 mL). A reação foi mantida sob agitação magnética por 4 horas. Ao final a solução reacional foi tratada com solução aquosa 2,0 mol/L de HCl (5 mL), água destilada (5 mL), solução aquosa saturada de Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (5 mL), solução aquosa saturada de NaCl (5 mL). A fase orgânica foi seca sob MgSO<sub>4</sub> e concentrada sob pressão reduzida. Não houve purificação.

12.1.1. Fenil-metil sulfeto (28)



**IE/EM** *m/z* (int. rel.): 124 (M<sup>+</sup>, 100), 109 (33), 91 (26), 78 (25), 65 (10).

**RMN de** <sup>1</sup>**H** (499,88 MHz, CDCl<sub>3</sub>,  $\delta_{\text{TMS}}$  0,0):  $\delta$  7,30-7,25 (4H, m, H-2 e H-3), 7,13 (1H, tt, *J* = 7,0; 2,0, H-4), 2,48 (3H, s, H-1').

**RMN de** <sup>13</sup>C (125,69 MHz, CDCl<sub>3</sub>,  $\delta_{TMS}$  0,0):  $\delta$  138,4 (C, C-1), 128,7 (CH, C-2), 126,6 (CH, C-3), 125,0 (CH, C-4), 15,8 (CH<sub>3</sub>, C-1').

12.1.2. Fenil-etil-sulfeto (17)



**IE/EM** *m/z* (int. rel.): 138 (M<sup>++</sup>, 100), 123 (59), 110 (52), 77 (10), 66 (13), 65 (12), 51 (8).

**RMN de <sup>1</sup>H** (499,88 MHz, CDCl<sub>3</sub>,  $\delta_{\text{TMS}}$  0,0):  $\delta$  7,33 (2H, dt, J = 8,0; 1,5, H-2), 7,28 (2H, tt, J = 8,0; 1,5 H-3), 7,17 (1H, tt, J = 8,0; 1,5, H-4), 2,94 (2H, q, J = 7,0, H-1'), 1,31 (3H, t, J = 7,0, H-2').

**RMN de** <sup>13</sup>C (125,69 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ<sub>TMS</sub> 0,0): δ 136,6 (C, C-1), 129,0 (CH, C-2), 128,8 (CH, C-3), 125,7 (CH, C-4), 27,6 (CH<sub>2</sub>, C-1'), 14,4 (CH<sub>3</sub>, C-2').

### 12.2.Síntese de Sulfóxidos Racêmicos

# 12.2.1. Metodologia I

A uma solução do respectivo sulfeto (5,0 mmol; 0,7 mL de **17**, 0,8 mL de **18** ou 0,6 mL de **28**) em metanol:água (1:1, 15 mL) sob banho de gelo (0 °C) e agitação magnética, foi adicionado NaIO<sub>4</sub> (5,0 mmol, 1,07 g). A reação foi mantida sob agitação e a temperatura ambiente por até 2 horas, sendo acompanhada por CCD (revelação com *p*-anisaldeído). Após este período, a mistura reacional foi filtrada e extraída com acetato de etila. As frações orgânicas foram combinadas, secas sob MgSO<sub>4</sub> anidro e concentradas sob pressão reduzida. Os produtos obtidos foram purificados por cromatografia "flash" em coluna de sílica gel, eluída com hexano:acetato de etila (8:2).

# 12.2.1.1. Fenilmetilsulfóxido (**33**)



**IE/EM** *m/z* (int. rel.): 140 (M<sup>+</sup>, 86), 125 (100), 124 (15), 97 (74), 94 (13), 78 (13), 77 (74), 51 (59), 50 (27), 65 (20), (12), 55 (36).

**RMN de** <sup>1</sup>**H** (499,88 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ<sub>TMS</sub> 0,0): δ 7,65 (1H, m, H-4), 7,53 (4H, m, H-3, H-2), 2,73 (3H, s, H-1').

**RMN de** <sup>13</sup>C (125,69 MHz, CDCl<sub>3</sub>,  $\delta_{TMS}$  0,0):  $\delta$  145,7 (C, C-1), 131,0 (CH, C-4), 129,3 (2CH, C-3), 123,5 (2CH, C-2), 44,0 (CH<sub>3</sub>, C-1').

12.2.1.2. Etilfenilsulfóxido (**21**)



**IE/EM** *m/z* (int. rel.): 154 (M<sup>+</sup>, 21), 126 (63), 125 (21), 97 (18), 78 (100), 77 (32), 51 (29), 50 (11).

**RMN de** <sup>1</sup>**H** (499,88 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 7,61 (1H, m, H-4), 7,51 (4H, m, H-3, H-2), 2,90 (1H, dq, *J* = 8,5; 7,5, H-1a'), 2,76 (1H, dq, *J* = 8,5; 7,5, H-1b') 1,20 (3H, t, *J* = 7,5, H-2').

**RMN de** <sup>13</sup>C (125,69 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 143,5 (C, C-1), 131,1 (CH, C-4), 129,3 (2CH, C-3), 124,4 (2CH, C-2), 50,5 (CH<sub>2</sub>, C-1'), 6,15 (CH<sub>3</sub>, C-2').

12.2.1.3. 3-óxido de 2-metil-4-propil-1,3-oxatiano (**22**)



**IE/EM** *m/z* (int. rel.): 176 (M<sup>+</sup>, ausente), 132 (61), 89 (56), 87 (11), 83 (41), 77 (23), 67 (10), 56 (10), 55 (100).

**RMN de** <sup>1</sup>**H** (499,88 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 4,07 (1H, q, H-4), 3,40 (2H, m, H-3), 2,53 (1H, m, H-1), 1,89 (1H, m, H-2<sub>eq</sub>), 1,64 (1H, m, H-2<sub>ax</sub>), 1,59 (2H, m, H-1'), 1,47 (3H, d, H-5), 1,33 (2H, m, H-2'), 0,90 (3H, t, H-3').

**RMN de** <sup>13</sup>C (125,69 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 93,6 (CH, C-4), 69,4 (CH<sub>2</sub>, C-3), 60,4 (CH, C-1), 32,2 (CH<sub>2</sub>, C-1'), 30,0 (CH<sub>2</sub>, C-2), 19,2 (CH<sub>2</sub>, C-2'), 16,8 (CH<sub>3</sub>, C-5), 14,2 (CH<sub>3</sub>, C-3').

### 12.2.2. Metodologia II

A uma solução de sulfeto (5,0 mmol, 0,91 g de **19**) em CHCl<sub>3</sub>, sob banho de gelo e agitação magnética, foi adicionado lentamente *m*-CPBA (7,5 mmol, 1,22 g). A reação foi mantida sob agitação e temperatura ambiente por até 24 horas, sendo acompanhada por CCD (revelação com luz  $UV_{254nm}$ ). Após este período, a mistura reacional foi lavada com solução aquosa saturada de NaHCO<sub>3</sub> e água destilada. A fase orgânica foi seca sob MgSO<sub>4</sub> e concentrada sob pressão reduzida. O produto obtido foi purificado por cromatografia "flash" em coluna de sílica gel, eluída com hexano:acetato de etila (1:1).

## 12.2.2.1. 2-(metilsulfinil)benzotiazol (23)



**IE/EM** *m/z* (int. rel.): 197 (M<sup>+</sup>, 45), 182 (84), 181 (41), 154 (64), 151 (100), 150 (65), 148 (38), 134 (49), 122 (21), 108 (39), 90 (42), 69 (36), 63 (47), 50 (14).

**RMN de** <sup>1</sup>**H** (499,88 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 8,07 (1H, dd, *J*= 8,5; 1,0, H-3), 8,01 (1H, dd, *J*= 8,0; 1,0, H-6), 7,57 (1H,ddd, *J*= 8,5; 7,0; 1,0, H-4), 7,50 (1H,ddd, *J*= 8,0; 7,0; 1,0, H-4), (3,09 (3H, s, H-1').

**RMN de** <sup>13</sup>C (125,69 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 178,6 (C, C-1), 154,0 (C, C-2), 136,2 (C, C-7), 127,2 (CH, C-4), 126,5 (CH, C-5), 124,2 (CH, C-6), 122,5 (CH, C-3), 43,4 (CH<sub>3</sub>, C-1').

# 12.3.Síntese de $\delta$ -lactonas

A uma solução resfriada (0 °C) de 2-pentilciclopentanona (**42**) ou 2heptilciclopentanona (**55**) (5,0 mmol; 0,87 mL de **42** ou 0,93 mL de **57**) em CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (25 mL), sob agitação magnética, foi adicionado NaHCO<sub>3</sub> (15,0 mmol, 1,26 g). Após 5 minutos foi adicionado ácido *meta*-cloroperbenzóico (10,0 mmol, 1,73 g). A reação foi acompanhada por CCD e revelada com *p*-anisaldeído. Após 12 horas, a mistura reacional foi sucessivamente lavada com soluções saturadas de NaHCO<sub>3</sub> (10 mL), Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (10 mL) e água destilada (10 mL). A fase orgânica foi seca sob MgSO<sub>4</sub> e concentrada sob pressão reduzida. Posterior purificação por cromatografia "flash" em coluna de sílica gel eluída com hexano:acetato de etila (gradiente, 8:2 a 1:1) forneceu os produtos **50** e **56** como líquidos oleosos ligeiramente amarelados.

12.3.1. δ- decalactona (**50**)



**IE/EM** *m/z* (int. rel.): 170 (M<sup>++</sup>, ausente), 114 (13), 99 (100), 71 (36), 70 (26), 56 (10), 55 (22),

**RMN de** <sup>1</sup>**H** (499,88 MHz, CDCl<sub>3</sub>,  $\delta_{\text{TMS}}$  0,0):  $\delta$  4,28 (1H, m, H-5), 2,58 (1H, m, H-2<sub>eq</sub>), 2,44 (1H, m, H-2<sub>ax</sub>), 1,91 (2H, m, H-3), 1,84 (1H, m, H-4<sub>eq</sub>), 1,70 (1H, m, H-6), 1,60-1,45 (3H, m, H-6', H-7', H-4<sub>ax</sub>), 1,44-1,35 (1H, m, H-7), 1,31 (4H, m, H-8, H-9), 0,89 (3H, t, *J*= 6,5, H-10).

**RMN de** <sup>13</sup>C (125,69 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ<sub>TMS</sub> 0,0): δ 172,0 (C, C-1), 80,6 (CH, C-5), 35,8 (CH<sub>2</sub>, C-6), 31,6 (CH<sub>2</sub>, C-8), 29,5 (CH<sub>2</sub>, C-2), 27,8 (CH<sub>2</sub>, C-4), 24,6 (CH<sub>2</sub>, C-7), 22,5 (CH<sub>2</sub>, C-9), 18,5 (CH<sub>2</sub>, C-3), 14,0 (CH<sub>3</sub>, C-10).

## 12.3.2. δ-dodecalactona (**56**)



**IE/EM** *m/z* (int. rel.): 198 (M<sup>+</sup>, ausente), 114 (12), 99 (100), 71 (45), 70 (25), 69 (15), 57 (10), 56 (12), 55 (36).

**RMN de** <sup>1</sup>**H** (499,88 MHz, CDCl<sub>3</sub>,  $\delta_{\text{TMS}}$  0,0):  $\delta$  4,25 (1H, m, H-5), 2,40 (2H, m, H-2), 2,00-1,75 (4H, m, H-3, H-4), 1,84 (1H, m, H-4<sub>eq</sub>), 1,53 (2H, m, H-6), 1,44-1,35 (1H, m, H-7), 1,31-1,25 (10H, m, H-7, H-8, H-9, H-10, H-11), 0,88 (3H, t, *J* = 6,5, H-12). **RMN de** <sup>13</sup>**C** (125,69 MHz, CDCl<sub>3</sub>,  $\delta_{\text{TMS}}$  0,0):  $\delta$  172,2 (C, C-1), 80,8 (CH, C-5), 36,0 (CH<sub>2</sub>, C-6), 31,9 (CH<sub>2</sub>, C-10), 29,7 (CH<sub>2</sub>, C-2), 29,5 (CH<sub>2</sub>, C-8), 29,3 (CH<sub>2</sub>, C-9), 28,0 (CH<sub>2</sub>, C-4), 25,1 (CH<sub>2</sub>, C-7), 22,8 (CH<sub>2</sub>, C-11), 18,7 (CH<sub>2</sub>, C-3) 14,2 (CH<sub>3</sub>, C-12).

12.4.Síntese da 7,8-epoxijasmona (54)



A uma solução resfriada (0 °C) de *m*-CPBA (6,1 mmol, 1,05 g) em diclorometano (20 mL) sob agitação magnética, foi adicionado lentamente uma solução de *cis*-jasmona (6,1 mmol, 1,0 mL) em diclorometano (5 mL). A mistura reacional foi mantida sob agitação e a temperatura ambiente por 12 h. Após este período, a mistura foi lavada com solução saturada de NaHCO<sub>3</sub> (2 x 5 mL) e água destilada (2 x 5 mL). A fase orgânica foi seca sob MgSO<sub>4</sub> e concentrada sob pressão reduzida. O produto obtido foi purificado por cromatografia "flash" em coluna de sílica gel, eluída com hexano:acetato de etila (7:3).

**IE/EM** *m/z* (int. rel.): 180 (M<sup>+</sup>, 50), 123 (68), 110 (100), 109 (50), 95 (28), 81 (29), 79 (78), 71 (42), 67 (36).

**RMN de** <sup>1</sup>**H** (499,88 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 3,05 (1H, m, H-7), 2,86 (1H, m, H-8), 2,54 (2H, m, H-5), 2,42 (2H, m, H-6), 2,37 (2H, m, H-4), 2,13 (3H, s, H-11), 1,63 (2H, m, H-9), 1,12 (3H, t, *J* = 7,5, H-10).

**RMN de** <sup>13</sup>C (125,69 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 209,5 (C, C-1), 173,2 (C, C-3), 137,6 (C, C-2), 58,9 (CH, C-8), 56,7 (CH, C-7), 34,3 (CH<sub>2</sub>, C-5), 31,9 (CH<sub>2</sub>, C-4), 23,4 (CH<sub>2</sub>, C-9), 21,9 (CH<sub>2</sub>, C-6), 18,2 (CH<sub>3</sub>, C-11), 11,3, (CH<sub>3</sub>, C-10).

## 12.5.O-(3,4-difosfonoxibutil)umbeliferona



## 12.5.1. Síntese do 4-toluenossulfonato de 3-butenila (**62**)

A uma solução de 3-buten-1-ol (1,0 mmol, 0,086 mL) em  $CH_2Cl_2$  anidro (13 mL) foram adicionados trietilamina recém-destilada (10,0 mmol, 1,39 mL), 4- (dimetilamino)piridina (DMAP, 0,1 mmol, 12 mg) e cloreto de tosila (1,1 mmol, 0,21g). A reação foi mantida a temperatura ambiente, sob agitação constante, durante 1 hora. Após este tempo a solução reacional foi lavada com solução aquosa de  $NH_4Cl$  10% m/v (24 mL, 3 vezes). A fase orgânica foi seca sob MgSO<sub>4</sub> anidro, filtrada e concentrada sob pressão reduzida. O produto foi purificado por cromatografia "flash" em coluna de sílica gel, eluida com hexano:AcOEt (7:3), sendo obtido um líquido oleoso incolor ligeiramente amarelado.

**IE/EM** *m*/*z* (int. rel.): 226 (M<sup>+</sup>, ausente), 155 (94), 91 (100), 65 (24), 54 (53). **RMN de** <sup>1</sup>**H** (499,88 MHz, CDCl<sub>3</sub>,  $\delta_{\text{TMS}}$  0,0):  $\delta$  7,79 (2H, dd, *J* = 8,5; 2,0, H-3 e H-5), 7,35 (2H, d, *J* = 8,5, H-2 e H-6), 5,72-5,63 (1H, m, H-3'), 5,10-5,05 (2H, m, H-4'), 4,07 (2H, t, *J* = 7,0, H-1'), 2,45 (3H, s, H-7), 2,40 (2H, dt, *J* = 7,0; 1,5, H-2'). **RMN de** <sup>13</sup>**C** (125,69 MHz, CDCl<sub>3</sub>,  $\delta_{\text{TMS}}$  0,0):  $\delta$  144,8 (C, C-1), 133,2 (C, C-4), 133,2 (C, C-4), 132,4 (CH, C-3'), 133,2 (2 CH, C-2 e C-6), 127,9 (2 CH, C-3 e C-5), 118,2 (CH<sub>2</sub>, C-4'), 69,4 (CH<sub>2</sub>, C-1'), 33,2 (CH<sub>2</sub>, C-2'),21,6 (CH<sub>3</sub>, C-7).

# 12.5.2. Síntese do O-(3-butenil)umbeliferona (63)



A uma solução do composto tosilado **62** (1,0 mmol, 0,226g) em acetona (10 mL) foram adicionados umbeliferona (1,2 mmol, 0,195g) e  $K_2CO_3$  (2,0 mmol, 0,277g). A reação permaneceu sob refluxo e agitação magnética por 18 horas. Após o resfriamento a solução foi filtrada e concentrada sob pressão reduzida. O produto obtido foi purificado por cromatografia "flash" em coluna de sílica gel, eluída com hexano:AcOEt (8:2), sendo obtido um composto sólido cristalino levemente amarelado.

**IE/EM** *m/z* (int. rel.): 216 (M<sup>+</sup>, 49), 188 (8), 162 (52), 134 (70), 105 (11), 89 (19), 77 (12), 63 (13), 55 (100), 51 (16).

**RMN de** <sup>1</sup>**H** (499,88 MHz, CDCl<sub>3</sub>,  $\delta_{\text{TMS}}$  0,0):  $\delta$  7,63 (1H, d, J = 9,5, H-4), 7,37 (1H, d, J = 8,5, H-5), 6,84 (1H, dd, J = 8,5; 2,5, H-6), 6,81 (1H, d, J = 2,5, H-8), 6,25 (1H, d, J = 9,5, H-3), 5,94-5,86 (1H, m, H-3'), 5,21-5,13 (2H, m, H-4'), 4,07 (2H, t, J = 7,0, H-1'), 2,58 (2H, qt, J = 7,0; 1,5, H-2').

**RMN de** <sup>13</sup>**C** (125,69 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ<sub>TMS</sub> 0,0): δ 162,1 (C, C-7), 161,2 (C, C-2), 155,9 (C, C-9), 143,4 (CH, C-4), 136,8 (CH, C-3'), 128,7 (CH, C-5), 117,5 (CH<sub>2</sub>, C-4'), 113,0 (CH, C-3), 112,9 (CH, C-6), 112,5 (C, C-10), 101,4 (CH, C-8), 67,8 (CH<sub>2</sub>, C-1'), 33,3 (CH<sub>2</sub>, C-2').
12.5.3. Síntese da O-(3,4-diidroxibutil)umbeliferona (11)



A uma solução do alceno **63** (1,0 mmol, 0,216g) em acetona:água (2,5:1, 8 mL) foi adicionado *N*-óxido de *N*-metilmorfolina (NMO, 1,2 mmol, 0,141g) e uma solução 0,2 mol/L de OsO<sub>4</sub> em *t*-butanol (100  $\mu$ L). A reação foi mantida sob agitação magnética por 18 horas a temperatura ambiente. Após este período, adicionou-se uma solução aquosa 10% m/v de Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (2,0 mL), sendo a agitação mantida por mais 30 minutos. Em seguida, foi adicionado uma solução aquosa saturada de NaCl (10 mL) e a fase orgânica foi extraída com acetato de etila (3x 10 mL). As fases orgânicas foram combinadas, secas sob MgSO<sub>4</sub> e concentradas sob pressão reduzida. O produto obtido foi purificado por cromatografia "flash" em coluna de sílica gel, eluída com CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:acetona (7:3), sendo obtido um composto sólido branco.

**IE/EM** *m/z* (int. rel.): 250 (M<sup>++</sup>, 10), 216 (17), 175 (11), 163 (15), 162 (100), 134 (82), 105 (11), 89 (11), 71 (10), 55 (30).

**RMN de** <sup>1</sup>**H** (499,88 MHz, CDCl<sub>3</sub>,  $\delta_{\text{TMS}}$  0,0):  $\delta$  7,87 (1H, d, J = 9,5, H-4), 7,52 (1H, d, J = 8,5, H-5), 6,93 (1H, dd, J = 8,5; 2,5, H-6), 6,90 (1H, d, J = 2,5, H-8), 6,23 (1H, d, J = 9,5, H-3), 4,57 (1H, s, OH), 4,26-4,18 (2H, m, H-1'), 3,88-3,83 (1H, m, H-3'), 3,56-3,49 (2H, m, H-4'), 2,05 (1H, m, H-2a'), 1,83 (1H, m, H-2b').

**RMN de** <sup>13</sup>C (125,69 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ<sub>TMS</sub> 0,0): δ 164,0 (C, C-7), 163,5 (C, C-2), 157,1 (C, C-9), 145,8 (CH, C-4), 130,4 (CH, C-5), 114,2 (C, C-3), 114,0 (C, C-10), 113,3 (CH, C-6), 102,3 (CH, C-8), 70,0 (CH, C-3'), 67,4 (CH<sub>2</sub>, C-4'), 66,6 (CH<sub>2</sub>, C-1'), 33,9 (CH<sub>2</sub>, C-2').

12.5.4. Síntese da O-[3,4-bis(dibenzil)fosfonoxibutil]umbeliferona (64)



A uma solução do diol **11**(1,0 mmol, 0,250g) e 1*H*-tetrazol (6,0 mmol, 0,504g) em  $CH_2Cl_2$  anidro (50 mL) foi adicionado *N*,*N*-diisopropilfosforamideto dibenzílico (2,0 mmol, 0,710 mL). Esta reação foi mantida sob agitação magnética por 2 horas. Após este período, a solução foi resfriada a -78 °C (banho de gelo seco com acetona), sendo então adicionado ácido meta-cloroperbenzóico (4,0 mmol, 0,690g). A reação foi mantida sob agitação a 0 °C por mais 45 minutos. Em seguida, a mesma foi tratada com solução aquosa 10% m/v de Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (10 mL), solução aquosa 5% m/v de NaHCO<sub>3</sub> (10 mL), solução aquosa saturada de NaCl (10 mL) e água. A fase orgânica foi seca sob MgSO<sub>4</sub> e concentrada sob pressão reduzida. O produto obtido foi purificado por cromatografia "flash" em coluna de sílica gel eluída com  $CH_2Cl_2$ :acetona (9:1).

**RMN de** <sup>1</sup>**H** (499,88 MHz, acetona-d<sub>6</sub>,  $\delta_{\text{TMS}}$  0,0):  $\delta$  7,87 (1H, d, J = 9,5, H-4), 7,53 (1H, d, J = 8,5, H-5), 7,41-7,30 (20H, m, H-Bn<sub>Ph</sub>), 6,93 (1H, dd, J = 8,5; 2,5, H-6), 6,90 (1H, d, J = 2,5, H-8), 6,23 (1H, d, J = 9,5, H-3), 5,11-4,99 (8H, m, H-Bn<sub>CH2</sub>, 4,90-4,87 (1H, m, H-4a'), 4,36-4,33 (1H, m, H-4b'), 4,25-4,19 (3H, m, H-3' e H-1'), 2,20-2,14 (2H, m, H-2').

**RMN de** <sup>13</sup>C (125,69 MHz, acetone-d<sub>6</sub>,  $\delta_{TMS}$  0,0):  $\delta$  162,7 (C, C-7), 160,9 (C, C-2), 156,8 (C, C-9), 144,5 (CH, C-4), 137,2 (4C, C-Bn), 130,1 (CH, C-5), 129,4-128,6 (20CH, C-Bn), 113,7 (C, C-3), 113,6 (C, C-10), 113,5 (CH, C-6), 102,1 (CH, C-8), 75,2 (CH, C-3'), 69,9 (CH<sub>2</sub>, C-Bn), 69,4 (CH<sub>2</sub>, C-4'), 65,0 (CH<sub>2</sub>, C-1'), 31,9 (CH<sub>2</sub>, C-2').

12.5.5. Síntese da *O*-(3,4-difosfonoxibutil)umbeliferona (59)



Uma solução do composto **64**(1,0 mmol, 0,778g) em metanol (100 mL) foi tratada com paládio em carvão ativo (0,1 mmol, 0,067g) a 25 °C, sob 1 atm de  $H_2$ , sendo a reação agitada por aproximadamente 1 hora. Após este período, a reação foi filtrada sob Celite e concentrada sob pressão reduzida.

**RMN de** <sup>1</sup>**H** (499,88 MHz, D<sub>2</sub>O,  $\delta_{D2O}$  4,67):  $\delta$  7,80 (1H, d, *J* = 9,5, H-4), 7,42 (1H, d, *J* = 8,5, H-5), 6,86 (1H, d, *J* = 8,5, H-6), 6,84 (1H, s, H-8), 6,16 (1H, d, *J* = 9,5, H-3), 4,45 (1H, H-4a'), 4,12 (1H, H-4b'), 3,92 (1H, H-3'), 3,51 (2H, H-1'), 2,03 (2H, H-2'). **RMN de** <sup>13</sup>**C** (125,69 MHz, D<sub>2</sub>O,  $\delta_{D2O}$  4,67):  $\delta$  164,9 (C, C-7), 161,8 (C, C-2), 155,0 (C, C-9), 146,1 (CH, C-4), 129,5 (CH, C-5), 113,5 (C, C-3), 113,0 (C, C-10), 111,5 (CH, C-6), 101,4 (CH, C-8), 64,8 (CH, C-3'), 62,5 (2CH<sub>2</sub>, C-4'e C-1'), 31,0 (CH<sub>2</sub>, C-2').

## 12.6.Síntese da O-fosfonoxiumbeliferona (58)

Neste caso, utilizou-se a mesma metodologia descrita nos itens 10.1.4 e 10.1.5 para obtenção do *O*-fosfonoumbeliferona, porém utilizando-se como reagente de partida a umbeliferona no lugar do diol **11**.



**RMN de** <sup>1</sup>**H** (499,88 MHz, acetona-d6,  $\delta_{\text{TMS}}$  0,0):  $\delta$  7,96 (1H, d, J = 9,5, H-4), 7,66 (1H, d, J = 8,5, H-5), 7,42-7,30 (10H, m, H-Bn<sub>Ph</sub>), 7,18 (1H, dd, J = 8,5; 2,5, H-6), 7,15 (1H, d, J = 2,5, H-8), 6,37 (1H, d, J = 9,5, H-3), 5,11-4,99 (4H, m, H-Bn<sub>CH2</sub>). **RMN de** <sup>13</sup>**C** (125,69 MHz, acetona-d6,  $\delta_{\text{TMS}}$  0,0):  $\delta$  159,6 (C, C-7), 155,2 (C, C-2), 153,3 (C, C-9), 143,4 (CH, C-4), 136,1 (2C, C-Bn<sub>1</sub>), 129,8 (CH, C-5), 129,0-128,0 (10CH, C-Bn), 116,8 (C, C-3), 116,5 (C, C-10), 115,7 (CH, C-6), 108,4 (CH, C-8), 70,2 (2CH<sub>2</sub>, C-Bn).



**RMN de** <sup>1</sup>**H** (499,88 MHz, D<sub>2</sub>O,  $\delta_{D2O}$  4,67):  $\delta$  7,79 (1H, d, *J* = 9,5, H-4), 7,43 (1H, d, *J* = 8,5, H-5), 7,04 (1H, dd, *J* = 8,5; 2,5, H-6), 6,99 (1H, d, *J* = 2,5, H-8), 6,24 (1H, d, *J* = 9,5, H-3).

**RMN de** <sup>13</sup>C (125,69 MHz, D<sub>2</sub>O, δ<sub>D2O</sub> 4,67): δ 160,3 (C, C-7), 159,5(C, C-2), 154,5 (C, C-9), 143,6 (CH, C-4), 128,7 (CH, C-5), 112,2 (C, C-3), 110,5 (C, C-10), 110,3 (CH, C-6), 101,2 (CH, C-8).

## ANEXOS



Anexo 1. Espectro de massas obtido por EI (70 eV) do metilfenilsulfeto (28).



Anexo 2. Espectro de RMN de <sup>1</sup>H (499,88 MHz, CDCl<sub>3</sub>) do metilfenilsulfeto (28).











Anexo 5. Espectro de RMN de <sup>1</sup>H (499,88 MHz, CDCl<sub>3</sub>) do etilfenilsulfeto (17).



Anexo 6. Espectro de RMN de <sup>13</sup>C (125,69 MHz, CDCl<sub>3</sub>) do etilfenilsulfeto (17)



Anexo 8. Espectro de RMN de <sup>1</sup>H (499,88 MHz, CDCl<sub>3</sub>) do metilfenilsulfóxido (33).





Anexo 10. Espectro de massas obtido por EI (70 eV) do etilfenilsulfóxido (21).



Anexo 11. Espectro de RMN de <sup>1</sup>H (499,88 MHz, CDCl<sub>3</sub>) do etilfenilsulfóxido (21).



Anexo 12. Espectro de RMN de <sup>13</sup>C (125,69 MHz, CDCl<sub>3</sub>) do etilfenilsulfóxido (21).



Anexo 13. Espectro de massas obtido por EI (70 eV) do 3-óxido de 2-metil-4-propil-1,3-oxatiano (22).



Anexo 14. Espectro de RMN de <sup>1</sup>H (499,88 MHz,  $CDCl_3$ ) do 3-óxido de 2-metil-4-propil-1,3-oxatiano (22).



**Anexo 15.** Espectro de RMN de  ${}^{13}$ C (125,69 MHz, CDCl<sub>3</sub>) do 3-óxido de 2-metil-4-propil-1,3-oxatiano (22).



Anexo 16. Espectro de massas obtido por EI (70 eV) do 2-(metilsulfinil)benzotiazol (23).



Anexo 17. Espectro de RMN de <sup>1</sup>H (499,88 MHz, CDCl<sub>3</sub>) do 2-(metilsulfinil)benzotiazol (23).



Anexo 18. Espectro de RMN de <sup>13</sup>C (125,69 MHz, CDCl<sub>3</sub>) do2-(metilsulfinil)benzotiazol (23).







**Anexo 20.** Espectro de RMN de <sup>1</sup>H (499,88 MHz, CDCl<sub>3</sub>) da  $\delta$ -decalactona (**50**).





Anexo 22. Espectro de massas obtido por EI (70 eV) da  $\delta$ -dodecalactona (56).



Anexo 23. Espectro de RMN de <sup>1</sup>H (499,88 MHz, CDCl<sub>3</sub>) da δ-dodecalactona (56).







Anexo 26. Espectro de RMN de  $^{1}$ H (499,88 MHz, CDCl<sub>3</sub>) da 7,8-epoxijasmona (54).



Anexo 27. Espectro de RMN de  $^{13}$ C (125,69 MHz, CDCl<sub>3</sub>) da 7,8-epoxijasmona (54).



**Anexo 28.** Espectro de massas obtido por EI (70 eV) do 4-toluenossulfonato de 3-butenila (**62**). 136



Anexo 29. Espectro de RMN de <sup>1</sup>H (499,88 MHz,  $CDCl_3$ ) do 4-toluenossulfonato de 3-butenila (62).



**Anexo 30.** Espectro de RMN de  ${}^{13}$ C (125,69 MHz, CDCl<sub>3</sub>) do 4-toluenossulfonato de 3-butenila (62).



Anexo 31. Espectro de massas obtido por EI (70 eV) da O-(3-butenil)umbeliferona (63).



Anexo 32. Espectro de RMN de <sup>1</sup>H (499,88 MHz, CDCl<sub>3</sub>) da *O*-(3-butenil)umbeliferona (63).



Anexo 33. Espectro de RMN de <sup>13</sup>C (125,69 MHz, CDCl<sub>3</sub>) da *O*-(3-butenil)umbeliferona (63).



Anexo 34. Espectro de massas obtido por EI (70 eV) da O-(3,4-diidroxibutil)umbeliferona (11).



Anexo 35. Espectro de RMN de <sup>1</sup>H (499,88 MHz,  $CD_3OD$ ) da *O*-(3,4-diidroxibutil)umbeliferona (11).



**Anexo 36.** Espectro de RMN de  ${}^{13}$ C (125,69 MHz, CD<sub>3</sub>OD) da *O*-(3,4-diidroxibutil)umbeliferona (11).



bis(dibenzil)fosfonoxibutil]umbeliferona (64).





**Anexo 39.** Espectro de RMN de <sup>1</sup>H (499,88 MHz,  $D_2O$ ) da *O*-(3,4-difosfonoxibutil)umbeliferona (59).



**Anexo 40.** Espectro de RMN de  ${}^{13}$ C (125,69 MHz, D<sub>2</sub>O) da *O*-(3,4-difosfonoxibutil)umbeliferona (59).



(dibenzil)fosfonoxiumbeliferona (60).



(dibenzil)fosfonoxiumbeliferona (60).



Anexo 43. Espectro de RMN de <sup>1</sup>H (499,88 MHz, D<sub>2</sub>O) da *O*-fosfonoxiumbeliferona (58).



Anexo 44. Espectro de RMN de <sup>13</sup>C (125,69 MHz, D<sub>2</sub>O) da *O*-fosfonoxiumbeliferona (58).