UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE QUÍMICA

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ORGÂNICA

Triagem, aplicação e engenharia de biocatalisadores para transformações enantio e regiosseletivas

TESE DE DOUTORADO

Aluna: Simone Moraes Mantovani

Orientadora: Profa. Dra. Anita Jocelyne Marsaioli

Campinas/2011

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE QUÍMICA DA UNICAMP

M319t

Mantovani, Simone Moraes.
Triagem, aplicação e engenharia de biocatalisadores para transformações enantio e regiosseletivas / Simone Moraes Mantovani. -- Campinas, SP: [s.n], 2011.

Orientador: Profa. Dra. Anita Jocelyne Marsaioli.

Doutorado - Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Química.

1. Biocatálise. 2. Metagenômica. 3. Desracemização. 4. Evolução dirigida. I. Marsaioli, Anita Jocelyne. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Química. III. Título.

Título em inglês: Screening, applying and engineering biocatalysts for enantio and regioselective transformations

Palavras-chaves em inglês: Biocatalysis, Metagenomic, Deracemization, Direct evolution

Área de concentração: Química Orgânica

Titulação: Doutor em Ciências

Banca examinadora: Profa. Dra. Anita Jocelyne Marsaioli (orientadora), Profa. Dra. Nadia Krieger (DQ-UFPR), Profa. Dra. Maria da Graça Nascimento (DQ-UFSC), Prof. Dr. Carlos Henrique Inácio Ramos (IQ-UNICAMP), Profa. Dra. Ljubica Tasic (IQ-UNICAMP)

Data de defesa: 03/06/2011

“I could be bounded in a nutshell,
and count myself a king of infinite space,
were it not that I have bad dreams.”
W. Shakespeare, Hamlet, ato 2, cena 2

AGRADECIMENTOS

Ao CNPq pela bolsa concedida.

À CAPES pela bolsa PDEE.

Ao Instituto de química pela excelente infra-estrutura.

À Profa. Anita Marsaioli pela orientação durante todos esses anos.

À Profa. Frances H. Arnold pela incomparável oportunidade de trabalhar em seu grupo.

Um agradecimento especial ao Prof. Jared C. Lewis pela excelente co-orientação.

Aos colegas de grupo e colaboradores pela agradável convivência e valiosas discussões.

Aos funcionários do IQ-Unicamp.

Á família pelo incentivo e apoio incondicional.

Muito Obrigada!

Curriculum Vitae

Simone Moraes Mantovani

1- Formação Acadêmica/Titulação

2009-2010 Doutorado Sanduíche
California Institute of Technology, Pasadena, CA, USA
Título: Engineering cytochrome $P450_{BM3}$ for regioselective demethylation of large substrates.
Orientador: Frances H. Arnold
Bolsista do(a): CAPES-PDEE

2007- 2011 Doutorado em Química.
Universidade Estadual de Campinas, UNICAMP, Campinas, Brasil
Título: Triagem, aplicação e engenharia de biocatalisadores em síntese de compostos quirais
Orientador: Anita Jocelyne Marsaioli
Bolsista do(a): Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

2005 - 2007 Mestrado em Química.
Universidade Estadual de Campinas, UNICAMP, Campinas, Brasil
Título: Aplicação de triagem de alto desempenho na investigação da atividades enzimáticas e enantiosseletividade de microrganismos brasileiros
Orientador: Anita Jocelyne Marsaioli

2001 - 2004 Graduação em Bacharelado Em Química.
Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, Sao Paulo, Brasil
Título: Estudo Fitoquímico de Frutos de Cryptocaria moschata
Orientador: Alberto José Cavalheiro

2- Produção bibliográfica

Artigos completos publicados em periódicos

1. Lewis, J. C., MANTOVANI, Simone Moraes, Fu, Y., Snow, C. D., Komor, R. S., Wong, C., Arnold, F. H. Combinatorial Alanine Substitution Enables Rapid Optimization of Cytochrome P450BM3 for Selective Hydroxylation of Large Substrates. ChemBioChem, v.11, p.2502 - 2505, 2010.

2. MANTOVANI, Simone Moraes, de Oliveira, L. G., Marsaioli, A. J.
Esterase screening using whole cells of Brazilian soil microorganisms. Journal of the Brazilian Chemical Society (Impresso). , v.21, p.1484 - 1489, 2010.

3. MANTOVANI, Simone Moraes, ANGOLINI, C. F. F., Marsaioli, A. J.
Mechanistic investigation of the Candida albicans CCT 0776 stereoinversion system and application to obtain enantiopure secondary alcohols. Tetrahedron. Asymmetry. , p.2635 - 2638, 2009.

4. Oliveira, Luciana Gonzaga de, MANTOVANI, Simone Moraes
Transformações biológicas: contribuições e perspectivas. Química Nova, v.32, p.742 - 756, 2009.

5. MANTOVANI, Simone Moraes, de Oliveira, L. G., Marsaioli, A. J.
Whole cell quick E for epoxide hydrolase screening using fluorescent probes. Journal of Molecular Catalysis. B, Enzymatic, v.52-53, p.173 - 177, 2008.

6. CHEN, L. S., MANTOVANI, Simone Moraes, de Oliveira, L. G., DUARTE, M. C. T., Marsaioli, A. J.
1,2-Octanediol deracemization by stereoinversion using whole cells. Journal of Molecular Catalysis. B, Enzymatic, v.54, p.50 - 54, 2008.

Capítulos de livros publicados

1. Marsaioli, A. J., Cintia D. F. Milagre, MANTOVANI, Simone Moraes
Técnicas para selecionar enzimas perfeitas In: Biocatálise e Biotransformações Fundamentos e aplicações.1 ed.Salto : Schoba, 2010, v.1, p. 22-50.

Trabalhos publicados em anais de eventos à partir de 2007 (resumos)

1. MANTOVANI, Simone Moraes, Roseto, C., SIMOES, T. H. N., Marsaioli, A. J.
Esterases de biblioteca metagenômica In: IV workshop de biocatálise e biotransformação, 2008, São Carlos -SP.
IV WkBiocatBiotrans. , 2008.

2. MANTOVANI, Simone Moraes, SIMOES, T. H. N., Roseto, C., Santos, E., Oliveira, V. M., Marsaioli, A. J.
Triagem de alto desempenho para detecção de hidrolases em biblioteca metagenômica de sedimento contaminado por petróleo In: 31a Reunião anual da Sociedade Brasileira de Química, Águas de Lindóia-SP.
31a SBQ - Livro de Resumos. , 2008.

3. MANTOVANI, Simone Moraes, de Oliveira, L. G., Marsaioli, A. J.
Detecção e aplicação de esterases e lipases em microrganismos isolados da biodiversidade brasileira In: 30a Reunião anual da Sociedade Brasileira de Química, Águas de Lindóia.
30a SBQ - Livro de Resumos. , 2007.

4. MANTOVANI, Simone Moraes, SIMOES, T. H. N., Santos, E., Oliveira, V. M., Dimitrov, M. R., Marsaioli, A. J.
High Throughput screening for detection of hydrolitic enzymes in metagenomic library In: 12th Brazilian Meeting on Organic Synthesis, 2007, Itapema-SC.
12th BMOS- Abstract Book. , 2007.

5. ANGOLINI, C. F. F., MANTOVANI, Simone Moraes, de Oliveira, L. G., Marsaioli, A. J.
Síntese e desracemização do 1,2,4-butanotriol por biocatálise In: 30a Reunião anual da Sociedade Brasileira de Química, Águas de Lindóia.
30a SBQ - Livro de Resumos. , 2007.

6. MANTOVANI, Simone Moraes, de Oliveira, L. G., Marsaioli, A. J.
Whole cell epoxide hydrolase In: 8th International Symposium on Biocatalysis and Biotransformation, 2007, Oviedo.
8th Biontrans 2007 Symposium. , 2007. p.P268 -

7. MANTOVANI, Simone Moraes, de Oliveira, L. G., ANGOLINI, C. F. F., Marsaioli, A. J.
1,2,4-butanetriol deracemization using whole cells of Candida albicans CCT 0776 In: 12th Brazilian Meeting on Organic Synthesis, 2007, Itapema-SC.
12th BMOS- Abstract Book. , 2007. p.PS09 -

Resumo

A utilização de biocatalisadores em processos industriais permite a obtenção de produtos de alto valor agregado em sintonia com as demandas de caráter tecnológico e de preservação ambiental. De maneira geral, o desenvolvimento de um biocatalisador envolve inicialmente a triagem da atividade de interesse, seguida da análise das propriedades como seletividade (regio e estereosseletividade) ou estabilidade, que podem ser posteriormente otimizadas por evolução dirigida ou desenho racional até a obtenção de um biocatalisador ótimo. Dessa maneira, os objetivos desse trabalho de tese foram aplicar diferentes metodologias para obtenção de biocatalisadores eficientes, que serão descritos em três capítulos. No capítulo I foi descrita a exploração de novos biocatalisadores por triagem da atividade enzimática em formato miniaturizado de biblioteca metagenômica composta por 864 clones utilizando sondas fluorogênicas, e que levou à detecção de quatro clones ativos para a hidrólise de ésteres. Posteriormente esses clones foram avaliados frente a substratos não modificados permitindo identificar um clone expressando uma enzima de alta quimio e enantiosseletividade para resolução cinética de éster propiônico (E > 100).. No capítulo II foi descrito o mecanismo da desracemização de álcoois secundários por células íntegras de *Candida albicans* CCT 0776 que consiste em um processo cíclico de oxidação e redução. A primeira etapa é catalisada por uma enzima altamente (*S*)-seletiva dependente de $NADP^+$ e O_2, seguida de redução pouco seletiva dependente de NADH. Esse sistema foi aplicado para diferentes álcoois e dióis, e possibilitou a detecção dos enantiômeros *anti*-Prelog com conversões de moderadas a altas (60 a 99 %) e altos excessos enantioméricos (80 a 90%) entre períodos de 20 a 120 h. Por fim, no Capítulo III foi descrito o trabalho de engenharia do citocromo $P450_{Bm3}$ por exploração combinatória de alanina e posterior evolução dirigida para desmetilação regiosseletiva de substratos volumosos. Essa etapa foi desenvolvida durante o estágio de doutorando em Catech (EUA) sob a supervisão da Profa. Frances Arnold e permitiu a obtenção de variantes capazes de catalisar *N*-desmetilação de alcalóides e hidroxilação de esteróides com rendimentos moderados (20-80%). Todos esses resultados mostram a variedade de técnicas que podem ser empregadas para o desenvolvimento e aplicações de biocatalisadores visando transformações regio e estereosseletivas eficientes.

Abstract

Biocatalysts have been widely applied in recent decades for industrial processes yielding high value products under environmentally friendly reaction conditions. The development of biocatalysts often begins with screening to identify enzymes with suitable activities followed by characterization of the enzymes chemo-, regio- and stereoselectivity or stability. However, identification of new biocatalysts does not always yield enzymes suitable for a given synthetic problem. To overcome this limitation, biocatalysts can be optimized by protein engineering using rational design or directed evolution. In this context, this thesis describes different methodologies that can be explored to obtain efficient biocatalysts for selective transformations. In Chapter I, functional screening of an 864 member metagenomic library derived from soil using a miniaturized assay based on fluorogenic substrates is described. These assays identified four clones capable of ester hydrolysis. Upon further evaluation using high value substrates, one clone, B6, was shown to display high chemo- and enantioselectivity (*E*>100) for propionic ester hydrolysis. Chapter II describes the study and application of secondary alcohols deracemization using *Candida albicans* CCT 0776 whole cells. Monitoring the reaction using phenylethanol as a substrate revealed this system furnishes the (*R*)-enantiomer in high yield and enantiomeric excess mediated by a cyclic process of oxidation and reduction. In summary the first step is catalyzed by a high *S*- selective enzyme dependent on $NADP^+$ and O_2 followed by a non-selective reduction catalyzed by an NADH-dependent enzyme. This whole cell biocatalyst was applied to different *sec*-alcohols and diols allowing the detection of the *anti*-Prelog products in moderate to high conversions (60 and 99%) and high enantiomeric excess (80 and 90%) within 20 to 120 hour incubation times. Finally, in Charpter III the engineering of cytochrome $P450_{Bm3}$ by alanine combinatorial scanning mutagenesis followed by directed evolution was used to identify enzymes with regioselective demethylation of bulky substrates. These libraries furnished variants capable of catalyzing regioselective *N*-demethylation of alkaloids and diastereoselective hydroxylation of steroids in moderate yields. Taken together these studies show the variety of techniques that can be applied for development and application of biocatalysts enabling selective and efficient transformations.

Índice

Lista de Figuras.....xix

Lista de Esquemas.....xxiii

Lista de Tabelas.....xv

Lista de Espectros.....xxvii

1 Introdução Geral 3

1.1 Ensaios de triagem da atividade enzimática 6

1.1.1 Triagem com células em crescimento 7

1.1.2 Triagem em microplacas 8

1.1.3 Triagem convencional por instrumentação analítica.....13

2 Prospecção de novos biocatalisadores de biblioteca metagenômica 17

2.1 Considerações Gerais 17

2.2 Hipótese 21

2.3 Objetivos.....22

2.4 Resultados e discussão 23

2.4.1 Construção da biblioteca metagenômica 23

2.4.2 Otimização e triagem da atividade enzimática 23

2.4.3 Reações com substratos não-modificados.....25

2.4.4 Subclonagem.....28

2.4.5 Triagem da atividade enzimática dos microrganismos isolados 29

2.5 Conclusões Parciais 31

2.6 Procedimentos Experimentais 33

2.6.1 Reagentes 33

2.6.2 Equipamentos 33

2.6.3 Ensaio enzimático com sondas fluorogênicas 33

2.6.4 Ensaios enzimáticos com substratos não fluorogênicos 34

2.6.5 Construção as bibliotecas shotgun 34

2.6.6 Triagem da atividade enzimática das bibliotecas shotgun 35

2.6.7 Substratos 35

3 Investigação mecanística e aplicação da desracemização biocatalisada de álcoois secundários 41

3.1 Considerações gerais 41

3.1.1 Mecanismos propostos 43

3.2 Hipótese 49

3.3 Objetivos 50

3.4 Resultados e discussões 51

3.4.1 Implicações mecanísticas da estereoinversão de álcoois secundários catalisadas por células de *C. albicans* CCT0776 51

3.4.2 Aplicação do sistema de *C. albicans* CCT 0776 para obtenção de álcoois enantiomericamente puros partindo de misturas racêmicas 57

3.5 Conclusões parciais 68

3.6 Procedimentos Experimentais 69

3.6.1 Reagentes 69
3.6.2 Equipamentos 69
3.6.3 Procedimento geral para reações de desracemização 69
3.6.4 Procedimento geral para reações de desracemização em escala média 70
3.6.5 Ensaio espectrofotométrico para determinação da dependência de cofator[65] 70
3.6.6 Substratos 71
4 Engenharia de Citocromo P450Bm3 para desmetilação regiosseletiva de substratos volumosos 81
4.1 Engenharia de proteínas 81
4.1.1 Desenho racional 81
4.1.2 Evolução dirigida 82
4.1.3 Citocromo P450 89
4.2 Hipótese 97
4.3 Objetivos específicos 98
4.4 Resultados e discussões 99
4.4.1 Seleção da variante pai 99
4.4.2 Seleção dos resíduos de aminoácidos candidatos à mutagênese 99
4.4.3 Substituição combinatória de alanina 100
4.4.4 Biblioteca 1 - substituição dos resíduos do sítio-ativo 101
4.4.5 Biblioteca 2- Substituição dos resíduos do canal de acesso 108
4.4.6 Biblioteca 3 - Evolução dirigida para oxidação de esteróides 110

4.5 Conclusões parciais 115

4.6 Procedimentos experimentais 116

4.6.1 Reagentes 116

4.6.2 Equipamentos 116

4.6.3 Construção das bibliotecas combinatórias de alanina 116

4.6.4 Construção da biblioteca de *error-prone* PCR 120

4.6.5 Condições de cultivo das bibliotecas 121

4.6.6 Ensaio enzimático colorimétrico (Purpald) 121

4.6.7 Ensaio de ligação de CO 122

4.6.8 Expressão e purificação das variantes de $P450_{Bm3}$ 122

4.6.9 Procedimento típico para bioconversões em media escala 123

4.6.10 Procedimento típico para bioconversões em escala preparativa 123

4.6.11 Caracterização dos produtos 124

5 Conclusões Gerais 127

Anexos 124

Lista de Figuras

Figura 1: Estratégia para desenvolvimento de processos biocatalíticos 4

Figura 3: Espectro UV/vis de NADPH e $NADP^+$ com os cromóforos representados no gráfico. 11

Figura 4: Representação esquemática da medida da velocidade de reação enzimática de cada um dos enantiômeros por uma enzima de enantiosseletiva (A) e de uma pouco seletiva (B)....13

Figura 5: Cromatogramas em CG-DIC das reações do clone B4 com substrato (±)-16 no tempo 0 min (A), 20 h (B), e coinjeção de (±)-19 e (*R*)-19 (C). E cromatogramas das reações do clone B6 com substrato (±)-17 no tempo 0 min (D), 20 h (E), e coinjeção das alíquotas analisadas em D e E (F). Condições de análise: 40-180 °C a 15 ° / min, 180 °C por 5 min, $T_{injetor}$= 200 °C, $T_{detector}$= 240 °C, $P_{constante}$= 10 psi. Coluna: Chrompack CD-Chirasil (25 m x 0,25 mm x - 0,25 μm). 27

Figura 6: Processos de desracemização. a- Enantioconvergência onde duas enzimas com seletividade oposta fornecem o mesmo produto. b- Resolução cinética dinâmica que combina uma etapa estereosseletiva com a racemização dos estereoisômeros não reativo. c- Estereoinversão de somente um dos enantiômeros.....42

Figura 7: As etapas reacionais levam à racemização do substrato pseudo-racêmico uma vez que as reações são reversíveis.....43

Figura 8: Cromatograma CG- DIC da reação de *C. albicans* CCT 0776 com (±)-19 a 0 h (A), 2,5 h (B) e 4,5 h (C) e 16 (D). Condições de análise: 40-180 ° C a 15 °/ min, 180 °C por 5 min, $T_{injetor}$= 200 °C, $T_{detector}$= 240 °C, $P_{constante}$= 10 psi. Coluna: Chrompack CD-Chirasil (25 m x 0,25 mm x 0,25 μm).....52

Figura 9: Cromatograma CG- DIC da reação de *C. albicans* CCT 0776 com (*R*)-19 à 0 h (A), 2,5 h (B) e 4,5 h (C) e com (*S*)-19 à 0 h (D), 2,5 h (E) e 4,5 h (F). Condições de análise: 40-180 ° C a 15 °/ min, 180 °C por 5 min, $T_{injetor}$= 200 °C, $T_{detector}$= 240 °C, $P_{constante}$= 10 psi. Coluna: Chrompack CD-Chirasil (25 m x 0,25 mm x 0,25 μm). 54

Figura 10: Racionalização com relação ao tamanho dos substituintes a fim de obter ambos os enantiômeros de 23. O composto 21 consiste no 23 substituído por benzila na posição 4, assim (*S*)-21 seria resultaria no *(S)*-23 após desproteção. Já o composto 22 consiste no 23 substituído na posição 1 o que levaria na obtenção do (*S*)-22 e conseqüentemente (*R*)-23. 58

Figura 11: Determinação do excesso enantiomérico por RMN de ^{1}H do produto da reação entre o substrato (±)-21 e *C. albicans* seguido de derivatização com (S)-MPA ($CDCl_3$, 499,9 MHz, TMS). Expansão da região dos prótons metilênicos e metínicos de (a) (±)-21 derivatizado com (S)-MPA, (b) (*S*)-21 derivatizado com (S)-MPA; (c) produto da reação de biotransformação após 24 h derivatizado com (S)-MPA. 59

Figura 12: Cromatogramas CG-DIC do monitoramento das reações de (±)-24 frente à *C. albicans* a 0 min (A), 120 h (B). Condições de análise: 40 °C por 5 min, 40-130 a 5 °C min^{-1}, 130-150 °C a 2 °C min^{-1}, 150-180 a 5 °C min^{-1}, e 180 °C por 3 min, $T_{injetor}$= 180 °C, $T_{detector}$= 220 °C, Fluxo= 0,8 mL min^{-1}, e coluna: Chrompack CD-Chirasil (25 m x 0,25 mm x 0,25 μm). 61

Figura 13: Cromatogramas CG-DIC do monitoramento das reações de (±)-25 frente à *C. albicans* à 0 min (C), 48 h (D). Condições de análise: 60-155 °C a 5 °C min^{-1}, 155-180 °C a 10 °C min^{-1} e 180 °C por 2 min, $T_{injetor}$= 180 °C, $T_{detector}$= 220 °C, Fluxo= 0,8 mL min^{-1}, e coluna: Chrompack CD-Chirasil (25 m x 0,25 mm x 0,25 μm). 62

Figura 15: Cromatogramas CG-DIC de (±)-26 (A), e coinjeção de (±)-26 com (*S*)-26 (comercial) (B). Condições de análise: 50-85 °C a 0,6 °C min^{-1}, 85-180 °C a 15 °C min^{-1}, $T_{injetor}$= 180 °C, $T_{detector}$= 220 °C, Fluxo= 0,8 mL min^{-1}, e coluna: Chrompack CD-Chirasil (25 m x 0,25 mm x 0,25 μm). 63

Figura 14: Cromatogramas CG-DIC das reações de desracemização de (±)-26 por *C. albicans* a 0 min (A), 15 min (B), 30 min (C) e coinjeção de (±)-26 com (*S*)-26 (comercial) (D). Condições de análise: 50-85 °C a 0,6 °C min^{-1}, 85-180 °C a 15 °C min^{-1}, $T_{injetor}$= 180 °C, $T_{detector}$= 220 °C, Fluxo= 0,8 mL min^{-1}, e coluna: Chrompack CD-Chirasil (25 m x 0,25 mm x 0,25 μm). 64

Figura 16: Cromatogramas CG- DIC das reações de da desracemização de (±)-27 a 0 min (A), 30 min (B) e 1,0 h (C). Condições de análise: 70-108 °C a 0,6 °C min^{-1}, 108-180 °C a 10 °C min^{-1}, $T_{injetor}$= 180 °C, $T_{detector}$= 220 °C, Fluxo= 0,8 mL min^{-1}, e coluna: Chrompack CD-Chirasil (25 m x 0,25 mm x -0,25 μm). 65

Figura 18: A- Esquema geral de representação de SOE-PCR onde os *primers* C e D carregam a mutação de interesse. B- SOE-PCR para construção de múltiplas mutações. Adaptado de Adair e Wallace.[93] 83

Figura 19: Esquema geral de evolução dirigida de biocatalisadores. 84

Figura 20: Recombinação entre duas β-lactamases TEM-1 e PSE-4. A- mapeamento dos módulos recombinados na estrutura da lactamase TEM-1. B- Perfil de ruptura para recombinação de lactamases usando as coordenadas estruturais de TEM-1. 86

Figura 21: Perfil da especificidade do substrato e dos intermediários da evolução de uma P450 propano monoxigenase ($P450_{PMO}$) a partir de uma hidroxilase de ácidos graxos de cadeia longa $P450_{Bm3}$.....87

Figura 23: Propriedades espectrais de citocromo $P450_{Bm3}$. A linha sólida representa a forma oxidada e a linha pontilhada a forma reduzida quando ligada ao CO. 92

Figura 24: A) Representação do domínio heme do tipo selvagem do citocromo $P450_{Bm3}$ com os resíduos K69, L75, M177, L181, T260, I263, T268 e L437 do sítio ativo destacados em vermelho. B) Posições relativas dos resíduos selecionados para mutagênese em relação ao sítio ativo do tipo selvagem da citocromo $P450_{Bm3}$. C) Representação do domínio heme do tipo selvagem do citocromo $P450_{Bm3}$ com os resíduos L17, L20, V26, R47, Y51, L75, V87, M177, L188 do canal de entrada destacados em vermelho. D) Posições relativas dos resíduos selecionados para mutagênese em relação ao canal de entrada do tipo selvagem da citocromo $P450_{Bm3}$.....100

Figura 25. SOE PCR para construção da biblioteca 1. Primeiramente foram sintetizados cinco fragmentos contendo uma mistura de todas as possíveis substituições de alanina e posteriormente reunidos em duas etapas distintas de PCR. 102
Figura 26: A)- Média de substituições de alanina por resíduo. B)- Perfil de ligação de CO da biblioteca do sítio ativo. 103
Figura 27: Substratos usados para triagem de atividade enzimática. 105
Figura 28: Análise cromatográfica das reações catalisadas pelas melhores variantes detectadas na triagem por Purpald. A análise comparativa da porcentagem de cada um dos produtos formados para cada variante permitiu selecionar as variantes mais regiosseletivas. Os tioglicosídeos 35 a 38 foram analisados por CG-DIC enquanto os alcalóides 39 e 40 foram analisados por LC-MS. 107
Figura 29: A) Média de substituições de alanina por resíduo. B)- Perfil de ligação de CO da biblioteca do sítio ativo. 109
Figura 30. Perfil do ensaio de ligação de CO para as bibliotecas mutantes de $P450_{Bm3}$ preparadas por epPCR com 100 μM, 150 μM, 200 μM e 250 μM de $MnCl_2$. 111
Figura 31: Representação da estrutura terciária do domínio heme de citocromo $P450_{Bm3}$ selvagem com os resíduos R47H, N95Y, G315C, K465R destacados em roxo, e o resíduo 437 substituído na biblioteca 1. 112

Lista de Esquemas

Esquema 1: Sistemas de triagem chave para se encontrar enzimas ativas em bibliotecas..... 7

Esquema 2: Esquema geral de triagem de atividade enzimática com células em crescimento. . 8

Esquema 3: Ensaio de triagem de atividade enzimática utilizando substratos fluorogênico para detecção de epóxido hidrolases, esterases, lipases, álcool desidrogenases e monoxigenases. 10

Esquema 4: Triagem de reações enzimáticas por quantificação dos produtos das reações no ponto final pelo teste de adrenalina.....12

Esquema 5: Ilustração dos passos básicos da técnica de clonagem comumente usado em biologia molecular utilizando um vetor plasmídeo contendo gene resistente a antibióticos para seleção dos microrganismos recombinados.....18

Esquema 6: Substratos fluorogênicos para detecção de atividade epóxido-hidrolase (1 e 2), esterases e lipases (3, 4 e 5). 24

Esquema 7: Resolução cinética dos substratos 16, 17 e 18.....25

Esquema 8: Esquema geral da metodologia utilizada para isolar e identificar os genes de esterases/lipases contidos nos fosmídeo selecionados. 29

Esquema 9: Mecanismo de desracemização por estereoinversão em que um enantiômero é seletivamente oxidado ao intermediário pró-quiral e posteriormente reduzido em direção ao enantiômero oposto. 43

Esquema 10: Estereoinversão de (±)-1-*d*-feniletanol com *Geotrichium candidum*.....46

Esquema 11: Desracemização de álcoois secundários via oxidação-redução simultâneos com a oxidação mediada por células de *Alcaligenes* sp. e a redução em solução.....48

Esquema 12: Oxidação e redução orquestrada para desracemização de álcoois secundários.48

Esquema 13: Mecanismo cíclico de desracemização de (±)-19 por células de *C. albicans* CCT 0776.....57

Esquema 14: Para o álcool 18 k1>>k-1, k2>>k-2 e k1>>k2. Para o álcool 26 na presença de glicose k1>>k-1, k2>>k-2 e k2>k1.....67
Esquema 15: Procedimento para síntese do diol 21 71
Esquema 16: Procedimento para síntese do diol 22. 73
Esquema 17: Ciclo catalitico de citocromo P450. 91
Esquema 18: Mecanismo para reações de *N*- desalquilação mediada por citocromo P450. 94
Esquema 19: Mecanismo para reações de *O*- desalquilação mediada por citocromo P450.....95
Esquema 20: Mecanismo catalítico da porção redutase da $P450_{Bm3}$.....96
Esquema 21. Ensaio colorimétrico de Purpald em que a hidroxilação do substrato produz o éter dimetílico que se decompõe em álcool e formaldeído. O reagente Purpald reage então com o formaldeído para formar o composto roxo.....104

Lista de Tabelas

Tabela 1:Classe de enzimas e suas aplicações em processos. 5

Tabela 2: Tamanho médio de bibliotecas de insertos clonados em diferentes vetores. 18

Tabela 3: Exemplos recentes de triagem baseada na atividade de bibliotecas metagenômicas para detecção de esterases e lipases. 20

Tabela 4: Otimização da concentração de células + sobrenadante nos ensaios miniaturizados frente à sonda 1 24

Tabela 5: Triagem enzimática para hidrolases da biblioteca metagenômica utilizando as sondas fluorogênicas descritas no Esquema 5.....25

Tabela 6: Reação de hidrólise dos substratos 16, 17 e 18 26

Tabela 7: Perfil das atividades enzimáticas dos microrganismos isolados da amostra de sedimento 30

Tabela 8: Exemplos de aplicação de estereoinversão biocatalisada de álcoois secundários. ...44

Tabela 9. Estereoinversão de (±)-feniletanol por *C. albicans* CCT0776 52

Tabela 10: Redução de acetofenona por *C. albicans* CCT0776.....53

Tabela 11: Redução de acetofenona por células de *C. albicans* CCT 0776 55

Tabela 12: Absorbância observada para a oxidação de feniletanol.....56

Tabela 13: Reação de esteroinversão de 4-benzilóxi-1,2-butanodiol por células de *C. albicans* 60

Tabela 14: Estereoinversão de 1,2-dióis catalisados por *C. albicans* CCT 0776 61

Tabela 15: Resolução cinética de 2-nonanol e 2-undecanol 63

Tabela 16: Estudo da aceleração da etapa de redução com adição de glicose e $NaBH_4$ na reação de biotransformação de (±)-2-nonanol 67

Tabela 17: Resumo das etapas de evolução dirigida e substituições de amino ácidos em variantes de $P450_{Bm3}$ para oxidação de alcanos menores. 87

Tabela 18: Reações comumente catalisadas por citocromo P450. 93
Tabela 19: Mutagênese combinatória de alanina 101
Tabela 20: Frequência de substituição de alanina nas variantes positivas detectadas por ensaio colorimétrico 106
Tabela 21:Frequência de substituição de alanina nas variantes positivas detectadas por ensaio colorimétrico 110
Tabela 22: Sequenciamento das variantes positivas frente ao substrato 41 111
Tabela 23: Desmetilação regiosseletiva e hidroxilação de produtos naturais volumosos por variantes de $P450_{Bm3}$ geradas por desenho reacional e posterior evolução dirigida.....114
Tabela 24: Condições da reação de PCR para construção dos fragmentos A a E 117
Tabela 25: Condições da reação de PCR para montagem dos fragmentos A a E.....117
Tabela 26: Sequência dos *primers* utilizados para criação das bibliotecas 119
Tabela 27: Condições da reação de error-prone PCR.....120
Tabela 28: Identificação dos compostos caracterizados 131

Lista de Espectros

E 1: Espectro de massas (IE, 70 e V) de(±)-16. 132

E 2: Espectro de RMN de ^{1}H (300,07 MHz, $CDCl_3$) de (±)-16.....132

E 3: Espectro de RMN de ^{13}C (75,45 MHz, $CDCl_3$) de (±)-16. 133

E 4: Espectro de RMN de 13C, DEPT 90 e 135 º (75,45 MHz, $CDCl_3$) de (±)-16. 133

E 5: Espectro de massas (IE, 70 e V) (±)-17. 134

E 6: Espectro de RMN de ^{1}H (300,07 MHz, $CDCl_3$) de (±)-17.....134

E 7: Espectro de RMN de ^{13}C (75,45 MHz, $CDCl_3$) (±)-17. 135

E 8: Espectro de RMN de ^{13}C, DEPT 90 e 135 º (75,45 MHz, $CDCl_3$) (±)-17. 135

E 9: Espectro de massas (IE, 70 e V) de (±)-18. 136

E 10: Espectro de RMN de ^{1}H (300,07 MHz, $CDCl_3$) (±)-18. 136

E 11: Espectro de RMN de ^{13}C (75,45 MHz, $CDCl_3$) de (±)-18. 137

E 12: Espectro de RMN de ^{1}H (300,07 MHz, $CDCl_3$) 31. 137

E 13: Espectro de RMN de ^{13}C (75,45 MHz, $CDCl_3$) de 31.....138

E 14: Espectro de RMN de ^{13}C, DEPT 90 e 135 º (75,45 MHz, $CDCl_3$) 31. 138

E 15: Espectro de massas (IE, 70 e V) de (±)-21. 139

E 16: Espectro de RMN de ^{1}H (499,88 MHz, $CDCl_3$) (±)-21. 139

E 17: Espectro de RMN de ^{13}C (125,69 MHz, $CDCl_3$) (±)-21. 140

E 18: Espectro de RMN de ^{13}C, DEPT 90 e 135 º (125,69 MHz, $CDCl_3$) (±)-21. 140

E 19: Espectro de RMN de ^{1}H (499,88 MHz, $CDCl_3$) do (±)-21'. 141

E 20: Espectro de RMN de ^{13}C (125,69 MHz, $CDCl_3$) do (±)-21'.....141

E 21: Espectro de RMN de ^{13}C DEPT 90 e 135 º (125,69 MHz, $CDCl_3$) do (±)-21'. 142

E 22: Espectro de RMN de 2D (^{1}H e ^{13}C HSQC, $CDCl_3$) do (±)-21'. 142

E 23: Espectro de RMN 2D de^{1}H e ^{1}H (gCOSY, 499,88 MHz, $CDCl_3$) do (±)-21'.....143

E 24: Espectro de RMN de ^{1}H (499,88 MHz, $CDCl_3$) do (*S*)-21'. 143

E 25: Espectro de RMN de ^{13}C (125,69 MHz, $CDCl_3$) do (*S*)-21'. 144

E 26: Espectro de RMN de ^{13}C, DEPT 90 e 135 º (125,69 MHz, $CDCl_3$) do (*S*)-21'.....144

E 27: Espectro de RMN de 2D de ^{1}H e ^{13}C (HSQC, $CDCl_3$) do (*S*)-21'.....145

E 28: Espectro de RMN de ^{1}H (300,06 MHz, $CDCl_3$) de 33. 145

E 29: Espectro de RMN de ^{13}C (75,55 MHz, $CDCl_3$) de 33. 146

E 30: Espectro de RMN de ^{13}C DEPT 90 e 135 º (75,55MHz, $CDCl_3$) de 33. 146

E 31: Espectro de RMN de ^{1}H (300,06 MHz, $CDCl_3$) de (±)34. 147

E 32: Espectro de RMN de ^{13}C (75,55 MHz, $CDCl_3$) de (±)-34. 147

E 33: Espectro de RMN de ^{13}C, DEPT 90 e 135 º (125,69 MHz, $CDCl_3$) do (±)-34. 148

E 34: Espectro de RMN de ^{1}H (300,06 MHz, $CDCl_3$) de (±)-22.....148

E 35: Espectro de RMN de ^{13}C (75,55 MHz, $CDCl_3$) de (±)-22. 149

E 36: Espectro de RMN de ^{13}C, DEPT 90 e 135 º (125,69 MHz, $CDCl_3$) de (±)-22. 149

E 37: Espectro de RMN de ^{1}H (300,06 MHz, $CDCl_3$) de (±)-24.....150

E 38: Espectro de RMN de ^{13}C (75,55 MHz, $CDCl_3$) de (±)-24. 150

E 39: Espectro de RMN de ^{1}H (300,06 MHz, $CDCl_3$) de (±)-25.....151

E 40: Espectro de RMN de ^{13}C (75,55 MHz, $CDCl_3$) de (±)-25. 151

E 41: Espectro de RMN de ^{1}H (300,06 MHz, $CDCl_3$) de (*S*)-25. 152

E 42: Espectro de RMN de ^{13}C (75,55 MHz, $CDCl_3$) de (*S*)-25. 152

E 43: Espectro de RMN de ^{1}H (600,06 MHz, $(CD_3)_2SO_2$) de 51.....153

E 44: Espectro de RMN de ^{13}C (150 MHz, $(CD_3)_2SO_2$) de 51. 153

E 45: Espectro de RMN de ^{1}H (300,06 MHz, $CDCl_3$) de 52. 154

E 46: Espectro de RMN de ^{13}C (62 MHz, $CDCl_3$) de 52.....154

E 47: Espectro de RMN de ^{1}H (600,06 MHz, $(CD_3)_2SO_2$ de 53. 155

E 48: Espectro de RMN de ^{13}C (125,69 MHz, $(CD_3)_2SO_2$) de 53. 155

E 49: Espectro de RMN 2D de ^{1}H e ^{1}H (gCOSY, 600,06 MHz, $CDCl_3$) de 53. 156

E 50: Espectro de RMN 2D de ^{1}H e ^{13}C (HSQC, $CDCl_3$) de 53. 156

E 51: Espectro de RMN 2D de ^{1}H e ^{13}C (HMBC, $CDCl_3$) do 53. 157

E 52: Espectro de RMN 2D de ^{1}H (NOESY, $CDCl_3$) do 53 157

Introdução geral

1 Introdução Geral

A utilização de sistemas biológicos como catalisadores em processos industriais tem sido amplamente explorada nas últimas décadas, pois permite a obtenção de produtos de alto valor agregado em sintonia com as demandas de caráter tecnológico e de preservação ambiental.[1] Isso se deve fundamentalmente aos altos níveis de quimio, regio e estereosseletividade característico aos sistemas biológicos, com relação às rotas químicas convencionais, além das condições reacionais brandas, como pH e temperatura.[2]

Processos biocatalisados têm sido aplicados em diversos setores industriais como alimentos, bebidas, diagnósticos, plásticos, detergentes, cosméticos, combustíveis, e com um destaque principal nas indústrias farmacêuticas em que a estereosseletividade das reações é de grande importância. [1,3]

De maneira geral, o desenvolvimento de um biocatalisador inicia-se primeiramente com a seleção ou triagem da atividade de interesse, seja de bibliotecas de enzimas isoladas ou células íntegras, utilizando técnicas de análise rápida em formato de alto desempenho (HTS). Posteriormente, esses biocatalisadores são avaliados mais criteriosamente quanto à disponibilidade, seletividade e estabilidade no processo de interesse. Os biocatalisadores que não apresentam essa propriedade adequada podem ser posteriormente otimizados através de modificações físico-químicas do sistema como solvente, imobilização do biocatalisador, ou ainda, pela utilização de técnicas de biologia molecular como evolução dirigida ou desenho racional até a obtenção de um biocatalisador ótimo (**Figura 1**).[4, 5,6]

No Brasil, o setor biotecnológico tem um papel especial devido à grande biodiversidade natural, e por isso, o incentivo político para a produção e utilização de

---

[1] Bon, E P.S.; *et. al.* Em: *Enzimas em biotecnologia produção, aplicações e Mercado.* Bon, E P.S.; Ferrara, M. A.; Corvo, M. L.; eds. Interciência: Rio de Janeiro, 2008, cap. 20.
[2] Krieger, N.; Steiner, W.; Mitchell, D. *Food Technol. Biotechnol.* **2004,** *42,* 219–221.
[3] Lorenz, P.; Eck, J. *Nature*, **2005,** *3,* 510-516.
[4] Turner, N. *Nat. Chem. Biol.* **2009**, *5*, 567-573.
[5] Bonascheuer, U. T.; Bessler, C.; Srinivas, R.; Krisna, S. H. *Trends Biotechnol.* **2002**, *20:433*
[6] Coward-Kelly, G.; Chen, R. R. *Biotechnol. Progr.* **2007,** *23,* 52-54.

tecnologia enzimática para fins industriais, tem encorajado as pesquisas científicas principalmente na área de biocombustíveis.[7,8]

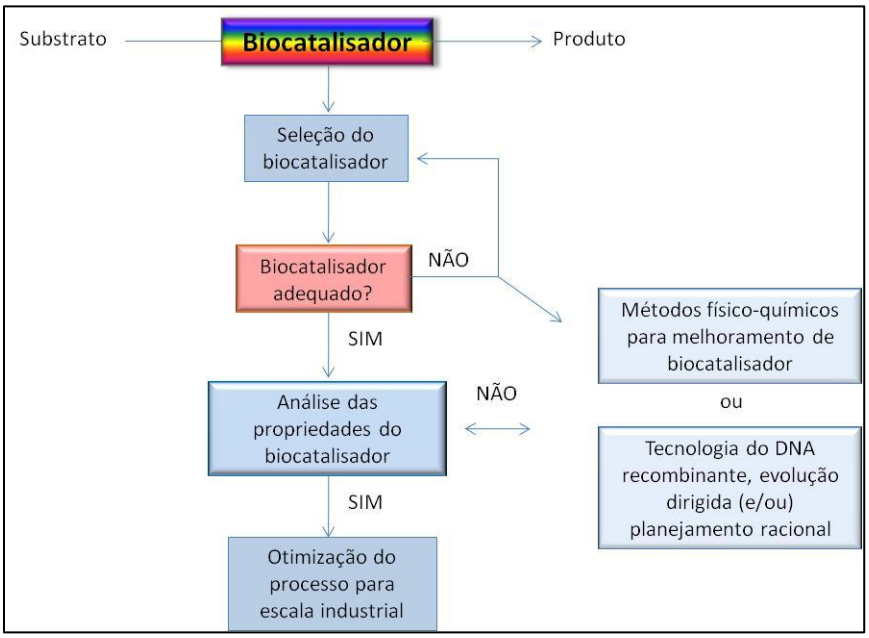


Figura 1: Estratégia para desenvolvimento de processos biocatalíticos. Adaptado de Bonascheuer *et. al.*[5]

Dentre as várias classes de enzimas aplicadas industrialmente, as hidrolases tem um papel de destaque englobando 60% dos processos, seguidas dos biocatalisadores redox com 25% (**Tabela 1**).[9]

As hidrolases (EC 3) são uma classe de enzimas que catalisam a clivagem de ligações pela reação com água. A função natural dessa enzimas é digestiva, ou seja, para clivar nutrientes em unidades menores, e por isso estão presentes na maioria dos organismos. Além disso, essas enzimas são independentes de cofatores e são geralmente capazes de aceitar uma grande variedade de substratos, por isso são comumente aplicadas para obtenção de blocos de construção quirais a partir de misturas racêmicas via resolução cinética, compostos pró-quirais e misturas diastereoisoméricas.

---

[7] Fonte: Ministerio do Desenvolvimento, Indústria e Comércio Exterior do Brasil
[8]Fundação Biominas, *Life Science industry in Brazil,* , http://win.biominas.org.br/biominas2008/File/LIFE%20SCIENCE%20INDUSTRY%20IN%20BRAZIL.pdf

Tabela 1: Classificação de enzimas [9]

Classe de enzimas (Número EC)	Subclasses mais utilizadas	Reações mais comuns	Aplicação
Oxidorredutases (EC1)	desidrogenases, mono e dioxigenases, peroxidases	Oxidação e redução de álcoois, epoxidação, hidroxilação de alcenos e alcanos	25%
Transferases (EC2)	quinases	Fosforilação (dependente de ATP)	5%
Hidrolases (EC3)	esterases, lipases, amidases (proteases e acilases), fosfatases e epóxido hidrolases	Hidrólise e formação de ésteres, amidas, fosfato e hidrólise de epóxidos	60%
Liases (EC4)	carboxiliases, amônia-liases, hidroliases	Adição e eliminação em ligações como C=C, C=O, C=N	5%
Isomerases (EC5)	racemases, epimerases	Isomerizações como racemização, epimerização, rearranjos	1%
Ligases (EC6)	aldolases, transaldolases, glicosidases, transaminases	Reação aldólica, formação de ligação glicosídica, formação de ésteres sulfato e ligação C-N	1%

A versatilidade das enzimas hidrolíticas permite ainda a catálise enantiocomplementar por meio das reações reversas (esterificação, transesterificação, aminólise ou amidação) permitindo o acesso a ambos os enantiômeros de um par de racemato.

O segundo grupo de enzimas mais utilizado pelas industrias compreende as oxidorredutases (EC 1). Esse grupo de enzimas são de grande importância pois catalisam reações de oxidação com alta seletividade, reações essas que são ainda um desafio na química orgânica clássica Este grupo de enzimas é cofator dependente e

[9] Adaptado de Koeller, K. M.; Wong, C.-H.; *Nature* **2001**, *409*, 232; Faber, K.; *Biotransformations in Organic Chemistry*, 3rd ed., Springer: Berlin, 1997; Roberts, S. M.; *Biocatalysis for Fine Chemicals Synthesis*, Wiley: Weinheim, 1999.

neste caso a utilização de células íntegras ou de alternativas que permitam a regeneração destes cofatores.

Dentre as oxidorredutases, têm-se as desidrogenases (EC 1.1.1.X) que catalisam a oxidação reversível de álcoois secundários aos correspondentes aldeídos ou cetonas, pela transferência de hidreto (H^-) à partir de NAD(P)H.

Já as oxidases (EC 1.1.3.X) se diferem das desidrogenases pela forma como a coenzima é reciclada no ciclo catalítico, pois as essas enzimas utilizam oxigênio molecular para oxidar a coenzima com formação concomitante de peróxido de hidrogênio.

Por outro lado, as oxigenases (EC 1.13 ou EC 1.14) promovem a transferência de um (monoxigenases) ou dois átomos oxigênio (dioxigenases) para substratos orgânicos a partir do oxigênio molecular. Estas enzimas geralmente catalisam a inserção de oxigênio em átomos de carbono pouco ativados como alcanos, compostos aromáticos, olefinas, e são dependes de íons metálicos (Fe^{2+} ou Cu^+) e NAD(P)H.

Algumas monoxigenases promovem oxidações assimétricas do tipo Baeyer-Villiger de cetonas e aldeídos (EC 1.14.13), podendo ser aplicadas na síntese enantiosseletiva de lactonas, importantes blocos de construção quirais. Essas enzimas são dependentes de flavina e oxigênio molecular.

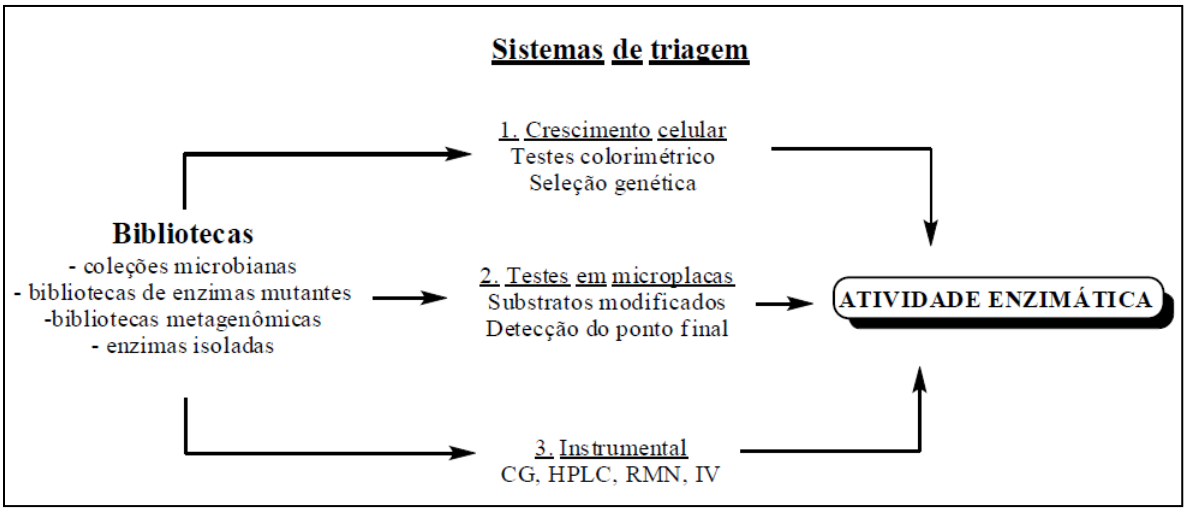
Nesse sentido a biocatálise faz uso da capacidade das enzimas, seja na forma purificada ou em células íntegras, em atuar em substratos não-naturais e com aplicação de valor industrial.

1.1 Ensaios de triagem da atividade enzimática

Assim, a aplicação de metodologias de triagem rápida para avaliação de diversos organismos individualmente é uma das etapas chaves do processo de descobrimento de novos biocatalisadores. Para tanto, ensaios enzimáticos em diferentes formatos podem ser empregados.

Reymond e Babiak classificaram os sistemas de triagem enzimática em três diferentes classes, onde a primeira classe avalia a atividade enzimática diretamente nas células em crescimento por testes colorimétrico ou técnicas de seleção (item

2.1.3.1). A segunda classe utiliza substratos cromogênicos ou fluorogênicos em formato de microplacas ou micro-arranjos (item 2.1.3.2); e a terceira classe é composta por ensaios que fazem uso de instrumentação analítica mais sofisticada como CG, CLAE, EM, ou RMN adaptadas para formato alto desempenho (high-throughput) (item 2.1.3.3) (**Esquema 1**).[10]



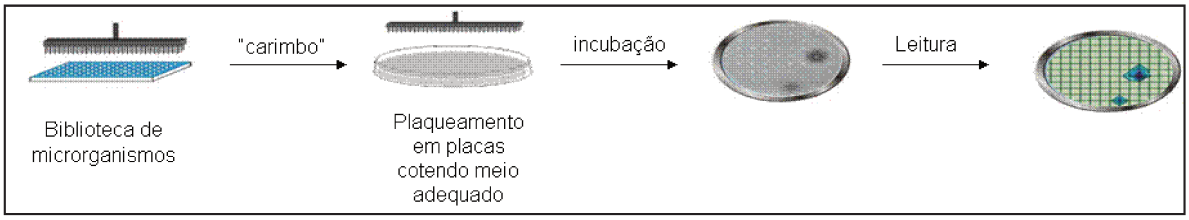
Esquema 1: Sistemas de triagem funcional de bibliotecas de enzimas ou microrganismos. Adaptado de Reymond e Babialk.[10]

1.1.1 Triagem com células em crescimento

As técnicas de triagem enzimática com células em crescimento podem ser por seleção, que empregam condições que favoreçam exclusivamente a sobrevivência dos microrganismos com a atividade de interesse; assim são vantajosas, pois envolvem a conexão direta do gene codificante da enzima alvo e atividade enzimática de interesse permitindo uma avaliação rápida limitada pelo tempo de crescimento do organismo analisado. Exemplos desse tipo de metodologia envolvem a detecção de nitrilases pelo cultivo de microrganismos em meio mínimo e um ciano derivado (ex adiponitrila), como única fonte de nitrogênio, assim somente os microrganismos capazes de hidrolisar o grupo nitrila seriam capazes de crescer.[11]

[10] Reymond, J. L.; Babiak, P. *Adv. Biochem. Engin. Biotechnol.* **2007**, *105*, 31-58.
[11] DeSantis, G. *et. al. J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 9024-9025.

Os métodos colorimétricos de triagem em placas de Petri são bastante disseminados e podem ser aplicados para detecção de atividades de lipase,[12] esterase,[13] protease,[14] etc. Esses ensaios baseiam-se na mudança de cor ou formação de halo que permitam analisar várias classes de enzimas de maneira rápida (**Esquema 3**), porém são ensaios semi-quatitativos e não muito sensíveis a pequenas alterações na atividade enzimática, além de muitas vezes serem limitados pela baixa a diversidade de substratos.



Esquema 2: Esquema geral de triagem de atividade enzimática com células em crescimento.

1.1.2 Triagem em microplacas

Ensaios em microplacas são geralmente analisados por leitores de UV/VIS ou fluorescência, e em geral são baseados em sistemas químicos que induzem uma modificação nas propriedades espectroscópicas na solução reacional após a transformação enzimática. Vários exemplos de ensaios acoplados a enzimas ou ensaios com substratos marcados e sistemas de detecção do ponto final são relatados na literatura e têm a vantagem de permitir a quantificação da reação enzimática.

1.1.2.1 Substratos modificados

Os métodos mais simples para obter um sinal UV/VIS ou fluorescência a partir de transformações enzimáticas utilizam substratos marcados sinteticamente, a fim de que após a ação enzimática um produto cromogênico ou fluorogênico possa ser detectado. Os principais grupos utilizados como marcador de substratos são o ânion nitrofenolato (cor amarela) e os ânions de umbeliferona, resofurina e a fluoresceína

---

[12] Bornscheuer, U. T.; Altenbuchner, J.; Meyer, H. H.; *Biotechnol. Bioeng.* **1999**, *64*, 678-684.
[13] Chu, X.; He, H.; Guo, C.; Sun, B. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2008**, *80*,615–625.
[14] Salleh, A. B.; Rahman, R. N. Z. R. A.; Basri, M. Em *New lipases and Proteases;* Salleh, A. B. et al. Ed.; Nova Science Publishers, Inc. 2006, cap. 6.

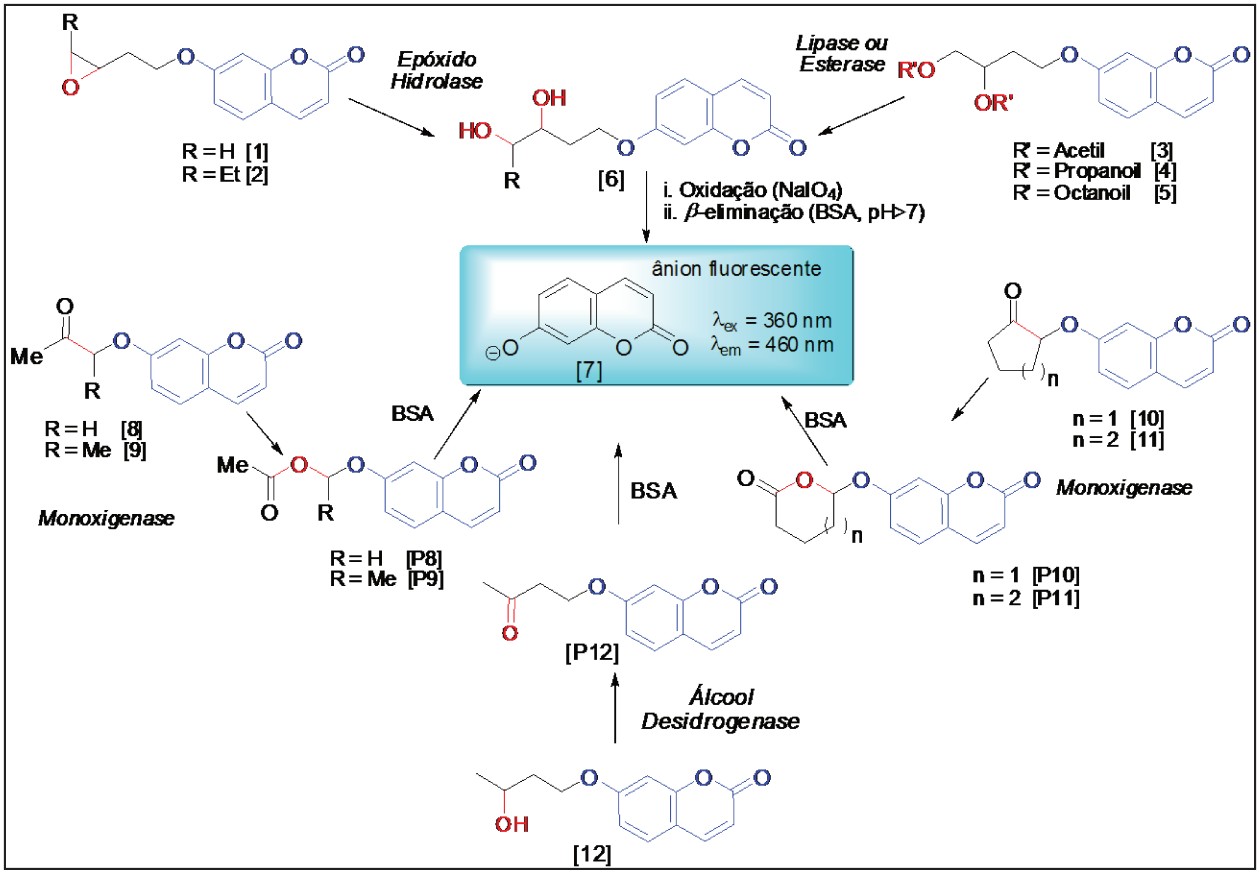
(fluorescentes). Muitos desses substratos são comercialmente disponíveis e amplamente utilizados para detecção de enzimas hidrolíticas.[15]

Muitos ensaios aplicados a enzimas hidrolíticas utilizam os grupos aromáticos ligados diretamente ao grupo funcional reativo, o que pode interferir no reconhecimento do substrato pela enzima e dificulta modificações estruturais do substrato. Além disso, esse tipo de substrato pode ser problemático devido à alta reatividade e suscetibilidade a fatores não enzimáticos, como calor e pH ligeiramente básico, que podem dificultar a diferenciação entre as reações catalisadas pela enzima alvo e a hidrólise espontânea.[10,16]

Um modelo de ensaio enzimático fluorogênico de detecção indireta de hidrolases consiste numa sequência de reações, onde os substratos fluorogênicos **1-5**, derivados da 7-hidroxicoumarina, liberam o diol **6** pela ação enzimática, o qual sofre clivagem oxidativa por $NaIO_4$ e posterior β-eliminação na presença de albumina de soro bovino (BSA). Essa última etapa leva à liberação do ânion umbeliferila **7,** fluorescente, que pode ser detectado à 465nm.[17] Principio semelhante pode ser aplicado para a detecção de monoxigenases[18] (**8-11**) e álcool desidrogenases[19] (**12**) que após a oxidação enzimática das sondas geram os produtos de oxidação (**P8-P11)** que na presença de BSA sofrem facilmente *β*-eliminação. Essa técnica de triagem enzimática tem sido aplicada há algum tempo por nosso grupo de pesquisa na triagem de microrganismos isolados e será apresentada no capítulo para avaliação do perfil enzimático de biblioteca metagenômica (**Esquema 4)**.

---

[15] Sicard, R.; Reymond, J. L. Em: *Enzyme assays: High-Throughput Screening, genetic selection and fingerprint*; Reymond, J. L., eds.; Wiley-VCH Verlag: Weinheim, 2006, cap. 1.
[16] Reymond, J. L. Em *Modern Biocatalysis: Stereoselective and Environmentally Friendly Reactions,* Fessner W. D.; Anthonsen, T.; eds. Wiley-VCH Verlag: Weinheim, 2009, cap. 1.
[17] Bicalho, B.; Chen, L. S.; Grognux, J.; Reymond, J. L.; Marsaioli, A. J.; *J. Braz. Chem. Soc.* **2004***, 6*, 911-916.
[18] Sicard, R.; Chen, L. S.; Marsaioli, A. J.; Reymond, J.-L. *Adv. Synth. Catal*. **2005**, *347*, 1041–1050.
[19] Klein, G.; Reymond J. L. *Bioorg. Medic. Chem.Letters*, **1998,** *8*,1113-1116.



Esquema 3: Ensaio de triagem de atividade enzimática utilizando substratos fluorogênico para detecção de epóxido hidrolases, esterases, lipases, álcool desidrogenases e monoxigenases.

1.1.2.2 Substratos não modificados

Os métodos discutidos anteriormente são ferramentas eficientes na detecção do perfil enzimático de coleções e bibliotecas de microrganismos. Entretanto, em muitos casos para estudo de propriedades de biocatalisadores, a utilização de metodologias que permitam a avaliação da atividade enzimática frente aos substratos de interesse real é de fundamental importância, pois a utilização de substratos modificados não é apropriada.

Um exemplo desses métodos são os ensaios enzimáticos acoplados à NADPH. Enzimas oxidorredutases são geralmente dependentes de NAD(P)H, que pode ser seletivamente detectado por absorbância a 340 nm, onde o cofator na sua forma oxidada $NAD(P)^+$ não absorve (**Figura 3**). [20] Assim esse tipo de detecção pode ser feito

para o monitoramento do ensaio direto de reações de óxido-redução, bem como para detecção do produto de uma determinada reação que reage sequencialmente com uma enzima dependente de NAD(P).[10] Um exemplo de aplicação dessa metodologia será mostrada no Capítulo II.

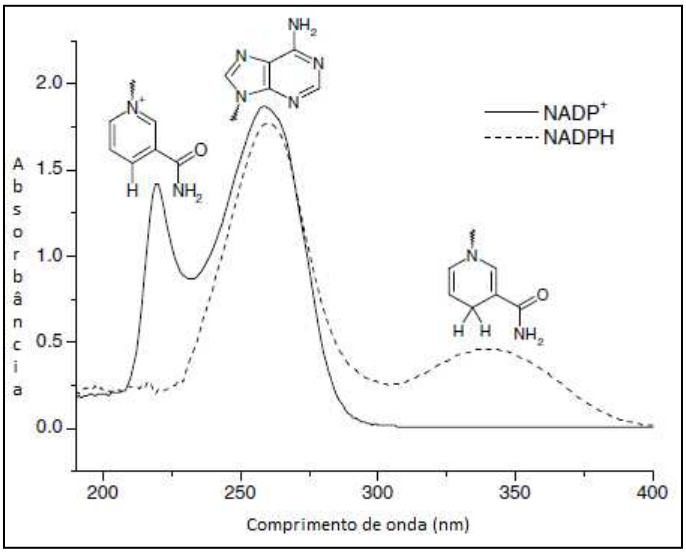
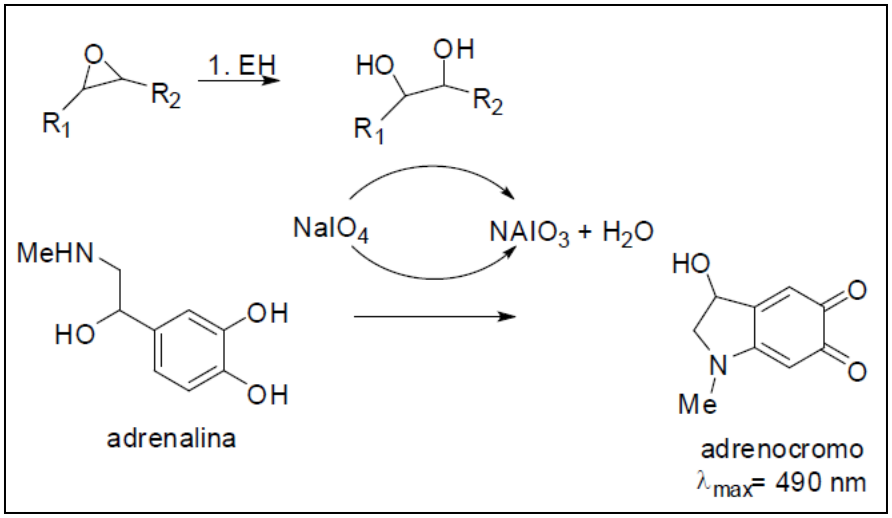


Figura 2: Espectro UV/vis de NADPH e $NADP^+$ com os cromóforos representados no gráfico. Adaptado de De Ruyck e*t. al.*[20]

Outro tipo de ensaio que também permite a avaliação da atividade frente a substratos não-modificados são os ensaios de detecção do ponto final da reação, que consistem na reação do produto da reação enzimática, ou de subprodutos, com um sensor que gere cor ou fluorescência. Um exemplo dessa metodologia envolve a detecção de atividade epóxido hidrolase pela titulação reversa de adrenalina com o diol formado na reação enzimática na presença de periodato (**Esquema 5**). [10] Outro será descrito no Capítulo III para detecção de reações de *O*- e *N*-desmetilação promovida por monoxigenases do tipo citocromo P450.

[20] De Ruyck, J.; Famere, M.; Wouters, J.; Perpete, E. A.; Preat, J.; Jacquemin, D. *Chem. Phys. Lett.* **2007**, *450,* 119–122.



Esquema 4: Teste com adrenalina para detecção de atividade epóxido-hidrolase pela titulação do produto formado no ponto final da reação. Adaptado de Reymond e Babiak.[10]

1.1.2.3 Estimando a seletividade por ensaios rápidos

Os métodos em microplacas podem também ser aplicados para estimar a estereosseletividade das reações enzimáticas pela medida das velocidades iniciais dos estereoisômeros avaliados separadamente.[21] Essas metodologias são conhecidas como *Quick E,* onde *E* é o parâmetro de seletividade da reação enzimática. A utilização de compostos de referência aquiral junto aos substratos monitorados na forma diastereo ou enantiomericamente pura permite simular a competição entre os isômeros e fornece uma medida mais confiável da estereosseletividade.[22]

$$E = \frac{(k_{cat}/K_M)_{enanti\ ômero\ rápido}}{(k_{cat}/K_M)_{enanti\ ômero\ lento}} \qquad Quick\ E = \frac{(V_0)_{enanti\ ômero\ rápido}}{(V_0)_{enanti\ ômero\ lento}}$$

[21] Janes, L. E.; Kazlauskas, R. J. *Chem. Eur. J.* **1998**, *4*, 2324-2331.
[22] Mantovani, S. M.; de Oliveira, L. G.; Marsaioli, A. J. *J. Mol. Cat. B, Enzym.* **2008,** *52-53*, 173-177.

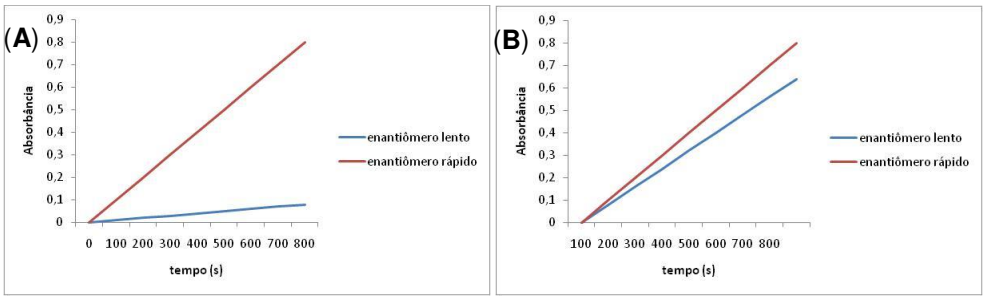


Figura 3: Representação esquemática da medida da velocidade inicial da reação dos enantiômeros separados catalisadas por enzima enantiosseletiva (**A**) e por enzima pouco seletiva (**B**).

1.1.3 Triagem convencional por instrumentação analítica

Uma análise mais refinada da regio e/ou estereosseletividade pode ser feita utilizando instrumentação analítica mais sofisticada como espectrometria de massas (EM), ressonância magnética nuclear (RMN), infravermelho (IV). Reetz e colaboradores relataram diversas metodologias de análise rápida de enantiosseletividade pelo monitoramento da reação com substratos isotopicamente marcados,[23] porém essas metodologias envolvem instrumentação analítica adequada para formato de alto desempenho o que tem um custo bastante elevado.

Alternativamente, pode-se utilizar triagem por multibiorreação com um biocatalisador e vários substratos simultaneamente, e monitoramento por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM), que e reduz o tempo de análise em **n** vezes, onde **n** é o número de substratos adicionados.[24]

Diante da importância dos processos biocatalisados em conjunto com o grande número de técnicas disponíveis para o desenvolvimento de biocatalisadores visando aplicações industriais, os objetivos desse trabalho foram explorar diferentes estratégias e metodologias, desde o descobrimento de novos biocatalisadores e aplicação em substratos de interesse sintético, até o melhoramento de proteínas, que futuramente possam ser empregadas para o desenvolvimento de outros biocatalisadores.

---

[23] Reetz, M. T. Em: *Enzyme assays: High-Throughput Screening, genetic selection and fingerprint*; Reymond, J. L., eds.; Wiley-VCH Verlag: Weinheim, 2006, cap. 2.
[24] Gonçalves, R. A. C.; Porto, A. L. M.; Pinheiro, L.; Cagnon, J. R.; Manfion, G. P.; Marsaioli, A. J.; *Food Technol. Biotechnol.* **2004**, *42*, 355-361. Pinheiro, L.; Marsaioli, A. J.; *J. Mol. Catal.B: Enzym.* **2007,** *44*, 78-86.

Capítulo I

Prospecção de novos biocatalisadores de biblioteca metagenômica

2 Prospecção de novos biocatalisadores de biblioteca metagenômica

2.1 Considerações Gerais

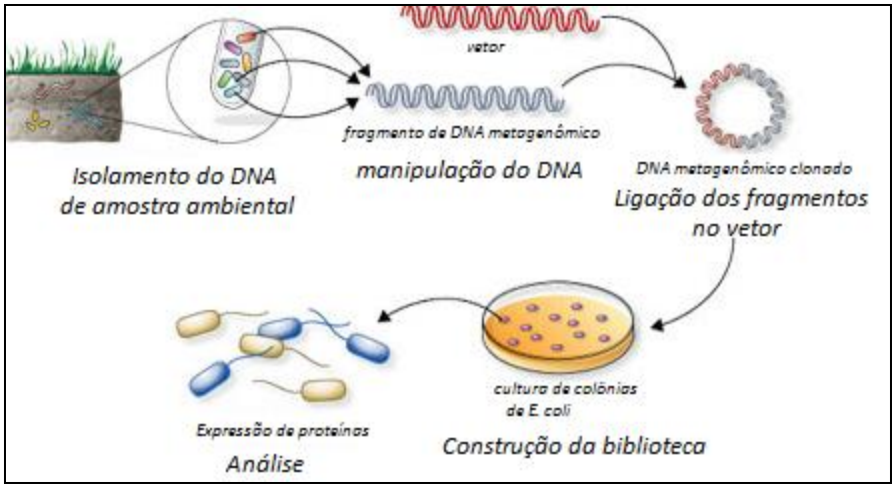
O número total de procariotos na Terra é estimado em 4 a 6 x 10^{30}, sendo que essa diversidade representa uma enorme ferramenta biológica podendo levar ao descobrimento de novos genes, ciclos metabólicos e seus produtos[25]. Entretanto, as técnicas convencionais de cultivo permitem acessar somente cerca de 1 % da diversidade microbiana total estimada, o que exclui uma grande fração da população microbiana.[26,27,28]

Para superar as limitações associadas às técnicas de cultivo, utilizam-se métodos que empregam a extração do DNA total ou "metagenoma" de uma determinada amostra sem cultivar os organismos presentes. Esse DNA metagenômico é então digerido e clonado em vetor apropriado, que posteriormente é transformado em bactérias de fácil cultivo, como *Escherichia coli,* gerando bibliotecas de clones contendo o DNA da amostra ambiental de partida (**Esquema 5**).[29,30]

Para construção dessas bibliotecas pode-se utilizar vetores do tipo BACs, fosmídeos e cosmídeos que permitem clonar grandes fragmentos de DNA, e a escolha do vetor apropriado depende do tamanho médio dos insertos de interesse e do número de cópias (**Tabela 2**). Os BACs (*bacterial artificial chromosome*) comportam um tamanho médio de insertos de 27 a 80 kb, enquanto os cosmídeos e fosmídeos comportam entre 20 – 40 kb, porém os fosmídeos são vetores de maior número de cópias e são mais indicados para detecção baseada na atividade de genes que não são facilmente expressos em *E. coli* [31].

---

[25] Cowan, D.; Meyer, Q.; Stafford, W.; Muyanga, S.; Cameron, R.; Wittwer, P. *Trends in Biotech.* **2005**, *23*, 321-329.
[26] Handelsman, J. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **2004**, *68*, 669-685.
[27] Surge então o termo não-cultiváveis, que na verdade é impróprio pois na realidade são microrganismos que não tiveram suas condições ideais de cultivo otimizadas.
[28] Jiang, C.; Wu, B. *Biochem. Biophys. Res. Commun*. **2007**, *357*, 421-426.
[29] De Oliveira, V. M.; Manfio, G. P.; Em: *Enzyme assays: High-Throughput Screening, genetic selection and fingerprint*; Reymond, J. L., eds.; Wiley-VCH Verlag: Weinheim, 2006, cap. 8.
[30] Park, H. J.; Jeon, J. H.; Kang, S. G.; Lee, J. H.; Lee, S. A.; Kim, H. K. *Protein Expression Purif.* **2007**, *52*, 340-347.
[31] Witternauer, L. A., Shirai, K. ; Jackson, R. L.; Johnson, J. D.; *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1984**, *118*, 894-901.



Esquema 5: Ilustração dos passos básicos para construção de biblioteca metagenômica.

Tabela 2: Tamanho médio de bibliotecas de insertos clonados em diferentes vetores. Adaptado de Daniel R. [32]

Fonte de DNA	Vetor de clonagem	Tamanho médio do inserto da biblioteca (kb)
Solo	Plasmídeo (pBluescript SK^+)	6 a 8
Sedimento de rio	Plasmídeo (pBluescript SK^+)	6 a 8
Cultura enriquecida	Cosmídeo (pWE15)	30 a 40
Picoplâncton	Fosmídeo (pFOS1)	40
Picoplâncton	BAC (pIndigoBAC536)	80
Solo	BAC (pBeloBAC11)	27 a 45

Os estudos metagenômicos se dividem em três principais categorias com relação ao ambiente. O primeiro grupo seleciona ambientes naturalmente enriquecidos para o biocatalisador alvo, como a triagem para celulases em rúmem bovino.[33] O segundo grupo seleciona ambiente genomicamente diversificado, como solo. Nesse caso o DNA ambiental pode ser diretamente extraído e clonado, ou submete-se a comunidade primeiramente a um enriquecimento e então segue-se com a extração e

[32] Daniel, R. In *Direct Molecular Evolution of proteins: or How to improve Enzymes for Biocatalysis;* Brakmann, S.; Johnsson, K.; Wiley-VCH Verlag: Weinheim, 2002, p. 63-78.
[33] Hess,M. e*t. al. Science*, **2011**, *331,* 463-467.

clonagem. Já o terceiro grupo estuda ambientes extremos, como altas temperaturas, pH, concentração salina, e busca por biocatalisadores que sejam estáveis nessas condições.[34]

Com relação às técnicas de análise, essas bibliotecas metagenômicas podem ser estudadas com base na atividade (estudo funcional), ou na similaridade das sequências, sendo que ambas as técnicas envolvem, a princípio, clonagem do DNA ambiental e contrução de bibliotecas.[35]

As metodologias de análise de bibliotecas metagenômicas baseadas na sequência de DNA empregam geralmente *primers* e sondas derivadas de regiões conservadas de genes conhecidos, o que limita a detecção somente de genes com alta homologia[36,37,38 ,39].

Alternativamente, as estratégias baseadas na atividade enzimática são mais rápidas, baratas e podem revelar novas enzimas para síntese de compostos bioativos. Essas estratégias envolvem a utilização de substratos marcados como sondas que permitem detectar um fenótipo específico de cepas recombinantes de *E. coli* em grandes bibliotecas.**[40]** Diversas enzimas têm sido identificadas por triagem baseada na atividade enzimática de bibliotecas metagenômicas, como proteases, celulases, e vários exemplos de esterases, lipases (**Tabela 2**).[41,42]

---

[34] Steele, H. L.; Jaeger, K. E.; Daniel, R.; Streit, W. R. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* **2009**,*16*, 25–37.
[35] Simon, C. Daniel, R. *Appl. Environ. Microbiol.* **2011**, *77*, 1153–1161.
[36] Scheimesser, C.; Steele, H.; Streit, W. R. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2007**, *75*, 955-962.
[37] Robertson, D. E. *et. al. Appl. Environ. Microb.* **2004**, *70*, 2429-2436.
[38]Gillespie, D. E.; Brady, S. F.; Bettermann, A. D.; Cianciotto, N. P.; Liles, M. R.; Rondon, M. R.; Clardy, J.; Goodman, R. M.; Handelsman, J. *Appl. Environ. Microb*, **2002**, *68*, 4901-4306.
[39] Handelsman, J. *Nat. Biotecnol.* **2005,** *23*, 38-39
[40] Daniel, R. *Curr. Opin. Biotechnol.* **2004**, *15*, 199-204.
[41] Lorenz, P.; Liebeton, K.; Niehaus, F.; Eck, J. *Curr. Opin. Biotechnol.* **2002**, *13*, 572-577. Simon, C. Daniel, R. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2009**, *85*,265–276
[42] Simon, C. Daniel, R. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2009**, *85*,265–276.

Tabela 3: Exemplos recentes de triagem baseada na atividade de bibliotecas metagenômicas para detecção de esterases e lipases. Adaptada de Steele *et. al*.[34]

Fonte de DNA	Vetor	Número de clones analisados	Tamanho médio do inserto (kb)	Tamanho Total (Mb)	Número de clones positivos
Solo	plasmídeo	73.000	6,5	474,5	1
	plasmídeo	180.000	6,5	1,170	1
	plasmídeo	98.000	6,5	637	2
Solo	BAC	3.648	27	100	2
Solo	cosmídeo	1.532	32,5	49,8	1
Lago	fagomídeo	60.000	6	360	2
	fagomídeo	100.000	6	600	1
Solo	fosmídeo	33.700	35	1.179	8
hot spring	fosmídeo	2.000	20	40	4
hot spring	fosmídeo	10.214	40	409	10
Rumen bovino	fagomídeo	14.000	5,5	77	11
Àgua	cosmídeo	1.600	35	56	6
Solo	cosmídeo	2.500	35	87,5	2
Solo	plasmídeo	32.000	3-8	26	14

2.2 Hipótese

Diante do potencial das bibliotecas metagenômicas para acessar novos biocatalisadores, a divisão de recursos microbinanos do CPQBA-Unicamp têm construído bibliotecas de diversas fontes ambientais, dentre elas amostras de solo que são ambientes ricos em diversidade microbiana.

Adicionalmente, o nosso grupo de pesquisa vem empregando há algum tempo ensaios miniaturizados com sondas fluorogênicas para triagem de novos biocatalisadores em coleções de microrganismos isolados de amostras de solo,[43] amostras de petróleo,[44] microbiota de pele humana.[45]

Assim, considerando a alta biodiversidade do território brasileiro, foi sugerido nesse capítulo a prospecção de novos biocatalisadores pela análise funcional por sondas fluorogênicas de biblioteca metagenômica de solo.

[43] Mantovani, S. M.; de Oliveira, L. G.; Marsaioli, A. J. *J. Braz. Chem. Soc*. **2010**, *21*,1484-1489.
[44] da Cruz, G. F. *et. al. Appl. Microbiol. Biotechnol*. **2010**, *87*, 319–329.
[45] Porto, C.; Marsaioli, A. J. Dados ainda não publicados

2.3 Objetivos

1- Triagem enzimática de biblioteca metagenômica baseada em sondas fluorogênicas;

2- Estudos dos clones positivos frente a substratos não-fluorogênicos;

3- Seqüenciamento do gene codificante das melhores enzimas.

2.4 Resultados e discussão

2.4.1 Construção da biblioteca metagenômica

A biblioteca metagenômica foi construída pelo Dr. Tiago H. N. Simões sob orientação compartilhada dos Profs Gilson Manfio e Valeria Maia de Oliveira (CPQBA-UNICAMP), através da extração do DNA metagenômico de uma amostra de sedimento impactado com petróleo. A amostra foi previamente enriquecida na presença de óleo diesel, e o DNA extraído foi então digerido a fragmentos de alto peso molecular (30 a 35 kb), os quais foram então clonados em fosmídeo e transformados em células de *E. coli*. O perfil enzimático da biblioteca composta por 864 clones foi então avaliado por sondas fluorogênicas.[46]

2.4.2 Otimização e triagem da atividade enzimática

A fim de garantir que os ensaios de triagem enzimática seriam capazes de detectar enzimas expressas intra e extracelulares, os ensaios foram otimizados utilizando a mistura de células + sobrenadantes. A avaliação dos ensaios utilizando diferentes concentrações da mistura célula+sobrenadantes frente ao substrato fluorogênico **1** (**Esquema 6**) mostrou que a condição 2 (30 μL de célula + sobrenadante, **Tabela 4**) seria a mais apropriada, pois essa condição permitia a aplicação de maior quantidade de biocatalisador sem comprometer a intensidade de fluorescência observada para o controle positivo da reação, uma vez que grandes concentrações do meio de cultivo reduzem bastante a intensidade de fluorescência máxima observada.

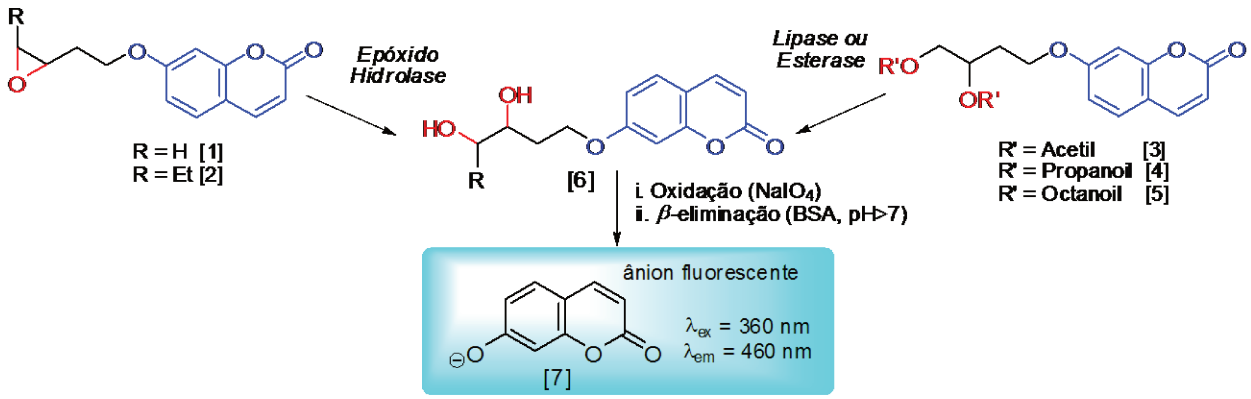
[46] Simões, T. H. N. *Triagem de Enzimas Associadas à Biotransformação de Hidrocarbonetos a Partir de Metagenoma de Sedimentos Contaminados Com Petróleo e Metais Pesados.*Teses ICB-USP:São Paulo, 2009.

Tabela 4: Otimização da concentração de células + sobrenadante nos ensaios miniaturizados frente à sonda 1

Volume Célula+Sobrenadante (μL)	IF[a] (Sonda 1)	IF[b] (Diol 6)
10	120 ± 9	1300 ± 70
30	100 ± 3	1200 ± 28
50	50 ± 3	640 ± 17
70	35 ±3	400 ±11
100	28 ± 1	325 ± 7

[a] Intensidade de fluorescência observada para os ensaios contendo a mistura de células e sobrenadante como biocatalisador. [b] Intensidade de fluorescência observada para o controle positivo contendo a mistura de células e sobrenadante como biocatalisador. Sonda e controle positivo estão descritos no **Esquema 4**.

A avaliação da biblioteca frente às sondas fluorogênicas **1**, **2**, **3**, **4** e **5** (**Esquema 6**) resultou num total de 4500 experimentos e permitiu detectar três clones positivos para a hidrólise de acetatos (**3**) e um clone para a hidrólise de propionatos (**4**) como mostrado na **Tabela 5**. Esses resultados revelam a freqüência de um clone positivo para atividade esterases/lipases em cada 216 clones testados, ou 1 clone a cada 7,5 kb de DNA analisados, que é um número apreciável em comparação a outros estudos onde a frequência de enzimas lipolíticas ativas é bem inferior, na ordem de 1 clone positivo a cada 40 Mb (**Tabela 3**).[34]



Esquema 6: Substratos fluorogênicos para detecção de atividade epóxido-hidrolase (**1** e **2**), esterases e lipases (**3, 4** e **5**).

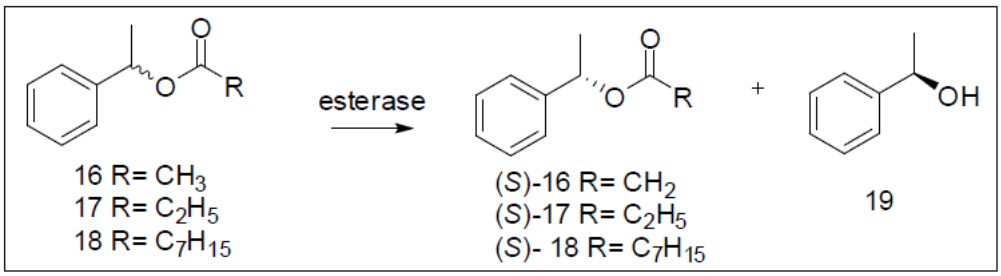
Tabela 5: Triagem enzimática da biblioteca metagenômica para hidrolases utilizando as sondas fluorogênicas descritas no **Esquema 6**

Clone positivo (Placa)	% de conversão[a]	Substrato fluorogênico
B4 (Metagenoma SE 05/12/06)	40	3
F4 (Metagenoma SE 05/12/06)	30	3
B6 (Met. Sed. 1)	16	4
H5 (Biblioteca sedimento aeróbio 27/12/06)	62	3

[a] Porcentagem de conversão foi calculada considerando-se as intensidades de fluorescência dos ensaios com as sondas (IF_{ensaio}) com relação à intensidade de fluorescência do controle positivo (IF_{cp}) $\% c = \frac{IF_{ensaio} \cdot 100}{IF_{cp}}$. [b]

2.4.3 Reações com substratos não-modificados

Para confirmação dos resultados observados na triagem e para análise de estereosseletividade das enzimas identificadas, os clones positivos foram avaliados para resolução cinética de hidrólise dos ésteres frente aos derivados de feniletanol **16, 17** e **18** (**Esquema 6**).



Esquema 7: Resolução cinética dos substratos **16, 17** e **18**.

As reações foram feitas tanto com as células repouso, ou seja, as células foram ressuspensas em solução tampão, como também com o sobrenadante e observou-se que somente as reações em que foram utilizadas as células como biocatalisador mostraram atividade hidrolítica do substrato ao álcool correspondente.

Além disso, a análise por cromatografia gasosa utilizando coluna de fase quiral revelou que o clone **B4** apresentou-se bastante enantiosseletivo na hidrólise do éster **16** (E > 100) ao álcool **(*R*)-19** com conversão moderada e o que clone **B6** mostrou alta razão enantiomérica para a resolução cinética do éster propiônico **17** com alta taxa de conversão. Assim, esse clone **B6** foi também avaliado frente a outros ésteres com diferentes tamanhos de cadeia **16** e **18**, onde se observou baixa atividade para o éster **16** e nenhuma atividade para o éster **18** mostrando que essa enzima é também quimiosseletiva com relação ao tamanho da cadeia lateral do éster (**Tabela 6**). Esses dados concordam com os resultados observados para as sondas fluorogênicas.

Tabela 6: Parâmetros das reação de hidrólise dos substratos **16, 17** e **18** catalisadas pelos clones positivos

Clone (Placa)	Substrato	Conversão %[a]	% *ee*[b]	Razão enantiomérica *(E)*[c]	Configuração absoluta[d]
F4 (Metagenoma SE 05/12/06)	16	36	18	1,6	*R*
H5 (Biblioteca sedimento aeróbio 27/12/06)	16	35	16	1,5	*R*
B4 (Metagenoma SE 05/12/06)	16	20	>99	>100	*R*
B6 (Met. Sed. 1)	17	42	97	>100	*R*
B6 (Met. Sed. 1)	16	12	83	12	*R*
B6 (Met. Sed. 1)	18	-	-	-	-

[a] Valores de conversão cromatográfica foram calculados pela razão entre as áreas dos picos referentes ao substrato em relação às áreas dos picos referentes ao padrão interno benzofenona (0,05 mg mL^{-1}) ($C_{substrato} = (A_{substrato}.C_{PI}/A_{PI})\,FR$ após 20 h de reação. [b] Discriminação enantiomérica foi feita por CG de fase quiral usando uma coluna capilar Chirasil-β-ciclodextrina (25 m x 0,25 mm x 0,25 μm), e o excesso enantiomérico do produto calculado por *ee* = [(A-B)/(A+B)] 100 onde A e B são as áreas correspondentes a cada enantiômero após 20 h de reação. [c] Razão enantiomérica calculada usando a $E = \frac{\ln\left[1 - c \quad \left(1 + ee_{produto}\right)\right]}{\ln\left[1 - c \quad \left(1 - ee_{produto}\right)\right]}$, onde c corresponde aos valores de conversão e *ee* aos valores de excesso enantiomérico após 20 h de reação. [d] A configuração absoluta foi determinada pela coinjeção do racemato com a padrão de (*R*)-feniletanol.

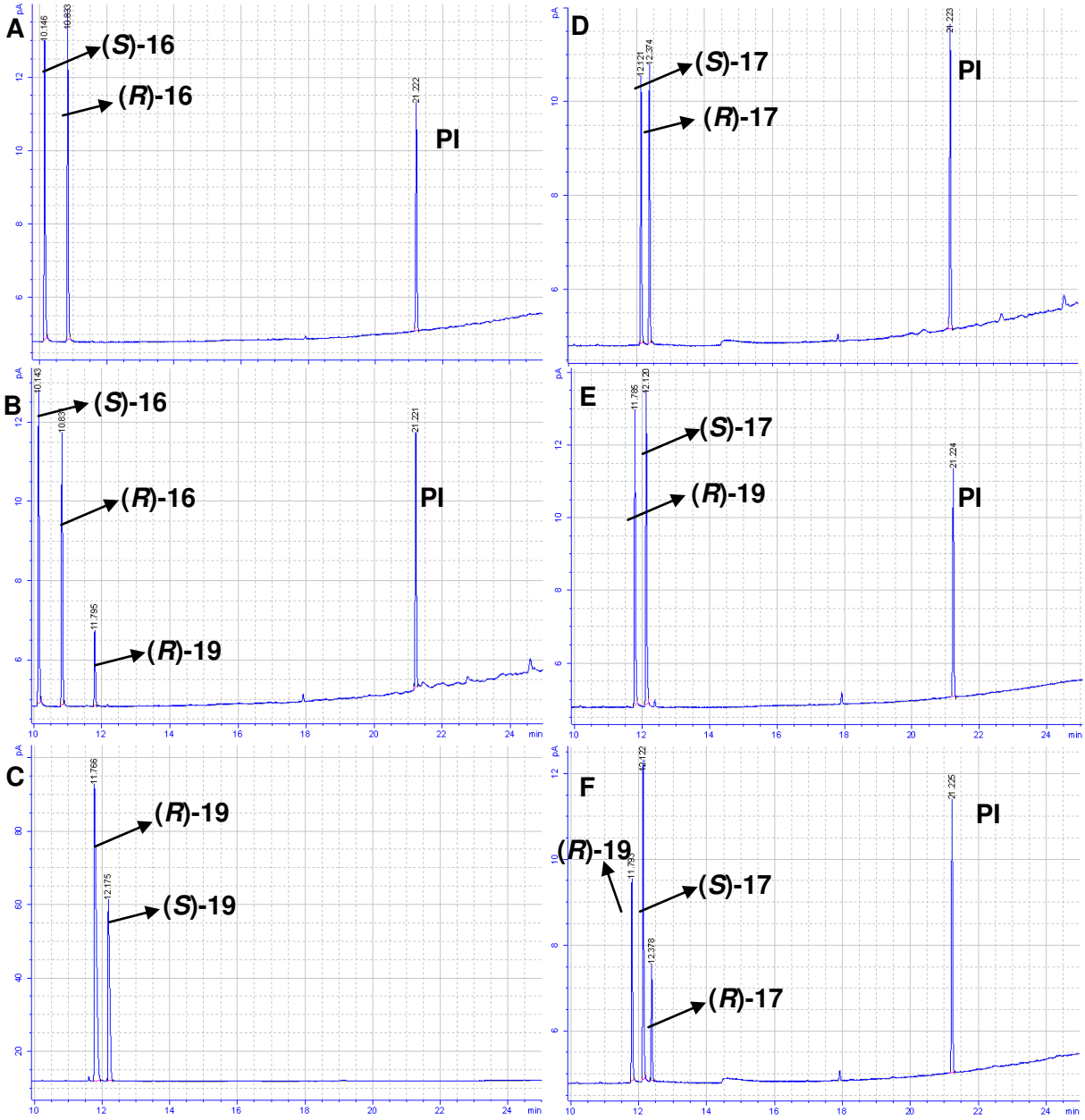


Figura 4: Cromatogramas em CG-DIC das reações do clone B4 com substrato (±)-**16** no tempo 0 min (**A**), 20 h (**B**), e coinjeção de (±)-**19** e (*R*)-**19** (**C**). E cromatogramas das reações do clone B6 com substrato (±)-**17** no tempo 0 min (**D**), 20 h (**E**), e coinjeção das alíquotas analisadas em **D** e **E** (**F**). Condições de análise: 40-180 °C a 15 ° / min, 180 °C por 5 min, $T_{injetor}$= 200 °C, $T_{detector}$= 240 °C, $P_{constante}$= 10 psi. Coluna: Chrompack CD-Chirasil (25 m x 0,25 mm x - 0,25 μm).

A confirmação da configuração absoluta do produto da hidrólise foi feita a partir da coinjeção do álcool racêmico **(±)-19** com o padrão enantiomericamente enriquecido **(*R*)-19,** revelando a hidrólise preferencial dos ésteres de configuração *R,* em concordância com a extensão da 'Regra de Prelog', que prediz a configuração do enantiômero mais reativo com base no tamanho dos grupos substituintes ligados ao estereocentro.[47]

2.4.4 Subclonagem

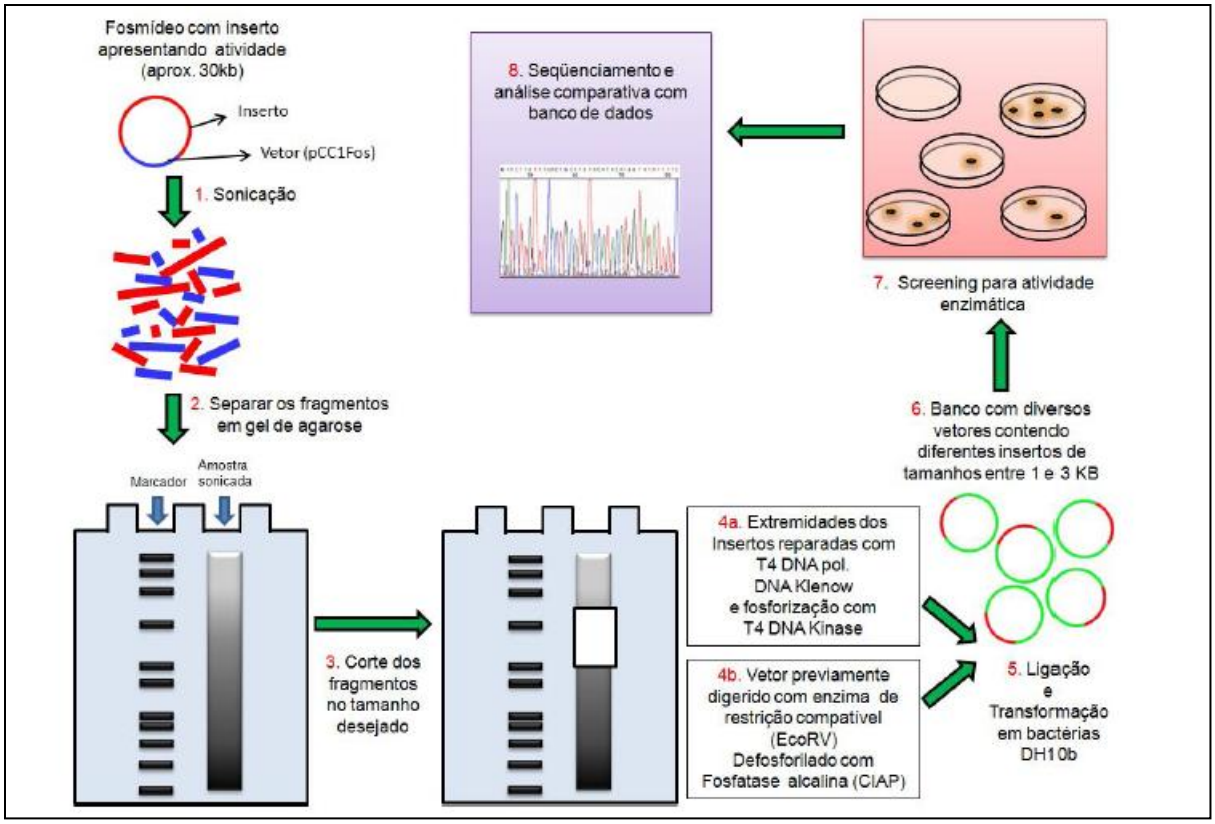
Diante desses resultados, o próximo passo do trabalho foi identificar os genes responsáveis pela atividade hidrolítica observada. A primeira estratégia aplicada para a identificação dos genes foi a digestão dos fragmentos de ~ 35 kb em fragmentos de 2-5 kb seguida da subclonagem em vetor pBluescript (PBS) e transformação em *E. coli*. Para cada um dos clones (B6, B4, F4 e H5) foram coletadas aproximadamente 1000 subclones (10 placas de 96 poços para cada fosmídeo) que foram posteriormente submetidas a outro ciclo de triagem por sondas fluorogênicas. Essa etapa do trabalho foi feita em colaboração com a Prof. Anete Pereira com a ajuda das alunas Eliane Bogo e Lilian Beloti (IB-Unicamp) (**Esquema 8**).

A triagem das bibliotecas de fragmentos menores revelou alguns clones positivos que foram sequenciados, porém esses insertos foram homólogos à seqüência de proteínas de *E. coli*. Considerando que pudéssemos ter tido contaminação durante a a construção da biblioteca de subclonagem nós enviamos o fosmídeo contendo o fragmento do clone B6 para sequenciamento.

A análise do fragmento de DNA de 33.739 pb permitiu prever 25 genes sendo que todos apresentaram homologia de 100 % com genes de *E. coli.* Além disso, nenhum desses genes apresentou homologia para sequências de esterase ou lipase, o que não nos permitiu concluir essa etapa do trabalho. [48]

---

[47] Kazlauskas, R. J.; Weissfloch, A. N. E.; Rappaport, A. T.; Ciccia, L. A. *J. Org. Chem.* **1991**, *56,* 2656-2665.
[48] O DNA foi analisado no pelo programa *Prodigal gene prediction server analysis* e os genes preditos foram identificados pelo banco de dados NCBI.



Esquema 8: Esquema geral da metodologia utilizada para isolar e identificar os genes de esterases/lipases contidos nos fosmídeo selecionados da biblioteca metagenômica.

2.4.5 Triagem da atividade enzimática dos microrganismos isolados

Adicionalmente, foram avaliadas as atividades enzimáticas de 34 microrganismos, os quais foram isolados da mesma amostra de sedimento utilizada para a construção da biblioteca (**Tabela 7**). Os resultados revelaram não somente a presença de atividade lipolítica (substratos 1, 2 e 3) como também para hidrólise de epóxidos (substratos 4 e 5) o que mostra o grande potencial enzimático da amostra de sedimento inicial. A identificação por rDNA 16S[46] revelou que esses microrganismos pertencem principalmente aos gêneros *Rhizobium, Pseudaminebacteria, Novosphingobium, Thalassospira, Pseudomonas, Rhodococus, Mycobacterium*.[46]

Tabela 7: Perfil das atividades enzimáticas dos microrganismos isolados da amostra de sedimento

Microrganismos	% de conversão[a]				
	1	**2**	**3**	**4**	**5**
22B	-	11	9	18	-
6	-	9	8	-	-
20A	-	-	13	10	-
11	-	9	11	-	-
22J	-	-	13	10	-
10	-	-	11	-	-
21F	12	-	-	-	-
12	-	-	10	-	-
22C	12	-	-	-	-
21C	-	-	10	-	-
4	-	-	20	-	-
5	-	-	24	-	-
7	-	-	24	-	-
20B	-	7	-	7	-
22H	-	7	-	7	-
16B	-	-	-	-	28
27B	-	30	15	-	-

[a] Porcentagem de conversão foi calculada considerando-se as intensidades de fluorescência dos ensaios com as sondas (IF_{ensaio}) com relação à intensidade de fluorescência do controle positivo (IF_{cp}) % $c = \frac{IF_{ensaio} \cdot 100}{IF_{cp}}$. [b]As sondas estão descritas no **Esquema 4.**

2.5 Conclusões Parciais

Nesse trabalho foi empregada triagem baseada na detecção da atividade enzimática de uma biblioteca metagenômica de 864 clones construída a partir de amostra de sedimento impactado de petróleo a fim de acessar novos biocatalisadores funcionais por sondas fluorogênicas. Foram detectados quatro clones ativos para hidrólise de ésteres e a análise desses clones para resolução cinética de ésteres não modificados revelou que essas enzimas são quimio e enantiosseletivas.Paralelamente a mesma metodologia foi empregada para avaliação da atividade enzimática de 34 microrganismos isolados da mesma amostra ambiental revelando uma variedade de atividades.

Assim, o estudo funcionalmente dirigido de bibliotecas metagenômicas e coleções de microrganismos foi eficiente para buscar biocatalisadores capazes de atuar seletivamente em substratos com potencial para aplicações industrais.

Infelizmente, a identificação do gene responsavél pela excelente atividade hidrolítica na biblioteca metagenômica revelou ser de *E. coli,* que se trata de um organismo facilmente cultivavél. Esse fato pode estar relacionada com a limitação da expressão funcional de genes ambientais em hospedeiros heterólogos, ou seja, genes provindos de organismos raros, ou não-cultiváveis não são expressos adequadamente no sistema heterólogo e por isso não são identificados através de triagem funcional, enquanto genes de *E. coli* são facilmente expressos. Essa limitação tem sido relatada como a principal desvantagem da triagem baseada na atividade enzimática.[49]

Contudo, apesar das limitações observadas na triagem funcional, consistente com a literatura, a metagenômica é uma ferramenta importante e indispensável para a análise da diversidade genética e potencial metabólico de comunidades microbianas. Atualmente, o desenvolvimento de novas tecnologias de sequenciamento tem ampliado as análises de sequências metagenômicas, permitindo inclusive análises independentes de clonagem a custos baixos. Também, o rápido desenvolvimento de

[49] Troeschel, S. C.; Drepper, T.; Leggewie, C.; Streit, W. R.; Jaeger, K. E. *Methods Mol. Biol*. **2010**;*668*,117-39.

técnicas de sequenciamento de alto desempenho de DNA e das ferramentas de bioinformática deve contribuir não somente para estudos ecológicos, como também para futuras aplicações industriais.

2.6 Procedimentos Experimentais

2.6.1 Reagentes

Os reagentes utilizados nesse trabalho foram obtidos das Sigma-Aldrich e usados sem purificação. O solvente utilizado na extração foi obtido da Synth e posteriormente bidestilado. Os meios de cultivo foram obtidos da Oxoid ou Synth.

2.6.2 Equipamentos

As medidas de fluorescência dos ensaios enzimáticos realizados em microplacas de polipropileno de 96 poços foram feitas em espectrofotômetro (*Flashscan 530 Analitic Jena*) utilizando filtro de excitação (λ_{ex}) a 365 nm e leitura de emissão (λ_{ex}) a 460 nm.

As análises de cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas foram realizadas em cromatógrafo Agilent 6890 acoplado a um detector de massas HP 5973 operando por impacto eletrônico com energia de ionização de 70 eV na faixa de *m/z* 45-500. Para discriminação enantiomérica das reações de biotransformação foi utilizado cromatógrafo Agilent 6850 com detector de ionização de chamas (DIC) equipado com injetor automático.

2.6.3 Ensaio enzimático com sondas fluorogênicas

A biblioteca estudada foi estocada no laboratório a -20°C em microplacas de 96 poços em 150 µL de meio Luria-Bertani contendo cloranfenicol (12,5 $\mu g\ mL^{-1}$) (LB_{clor}) e glicerol (20% v/v). Para realização dos ensaios a biblioteca foi inoculada em placas de 96 poços (deep well) em meio LB_{clor} (1,0 mL) por 16 h a 37 °C e 225 rpm, e posteriormente transferidas para as microplacas de 96 poços com capacidade de 200 µL.

Para triagem de hidrolases foram adicionados sonda ou controle positivo (10 µL, 2,0 mM); tampão borato pH 8,0 (70 µL, 20 mM); suspensão celular (30 µL de meio de

cultivo+célula), BSA (80 μL, 5,0 mg mL^{-1}) e mantidas a 25 º C por 24 h e 225 rpm. Em seguida foram adicionados $NaIO_4$ (10 μL, 20mM) e analisadas em espectrofotômetro.

Para análise das atividades enzimáticas dos microrganismos isolados nas condições convencionais (temperatura 25 º C e meio NB com ágar 1%) utilizou-se sonda (10 μL, 2mM), $NaIO_4$ (10 μL, 20 mM) e as células (20 μL, 0,05 mg mL^{-1} massa úmida) suspensas em tampão borato pH 8,0 (20 mM), BSA (160 μL, 2,5 mg mL^{-1}) e mantidas a 25 º C por 24 h e 225 rpm. Em seguida as microplacas foram analisadas por espectrofotômetro.[17]

2.6.4 Ensaios enzimáticos com substratos não fluorogênicos

Os clones positivos foram cultivados em tubo de 50 mL contendo meio LB_{clor} (10 mL) e arabinose (0,02 % m/m) por 16 h a 37 °C e 225 rpm. Para realização das reações de biotransformação as células foram separadas por centrifugação (5000 rpm e 18 º C por 10 min). Em seguida o sobrenadante (1,0 mL) e massa celular úmida ressuspensa em tampão fosfato pH 7,0 (1,0 mL) foram armazenados separadamente. Posteriormente os biocatalisadores foram transferidos para placas de 24 poços e 2,0 μL dos substratos em questão foram adicionados. As reações foram mantidas por 16 h a 28 °C e 225 rpm em seguida extraídas com de solução de benzofenona em acetato de etila (1,0 mL, 0,05 mg mL^{-1}) e analisadas por CG-EM e CG-DIC equipado com coluna de fase quiral.

2.6.5 Construção as bibliotecas shotgun[50]

Os clones foram cultivados meio LB_{clor} (2,0 L) com arabinose (0,02 % m/m), mantido a 37 ºC por 16 h e então separadas do sobrenadante por centrifugadas (10 min a 6000 g) e armazenadas à -20 ºC. A extração do fosmídeo foi feita utilizando o kit para *max prep* da Invitek®. Os fosmídeos foram então digeridos em ultrassom e aplicados em gel de agarose, de onde foram recortadas as bandas correspondentes a fragmentos de 2-5 kb. Os fragmentos obtidos do gel de agarose foram então

[50] Essa etapa do trabalho foi executada no CBMEG-Unicamp em conjunto com a Dra. Eliane Bogo.

submetidos às reações de reparo das extremidades utilizando T4 polimerase e Klenow (Invitrogen).

O DNA obtido foi então ligado ao vetor pBlueScript previamente digerido com EcoRV, defosforilado e o produto da reação de ligação foi posteriormente transformado em *E. coli* DH5α. As células transformadas foram primeiramente cultivadas em Luria-Bertani contendo ampicilina 100 µg mL^{-1} (LB_{amp}), ágar 2%, IPTG e X-gal. Foram então coletadas 960 colônias incolores que foram transferidas para microplacas de 96 poços em 150 µL de meio LB_{amp} com posterior adição de glicerol 20% v/v e armazenamento à -20°C.

2.6.6 Triagem da atividade enzimática das bibliotecas shotgun

Os ensaios para as bibliotecas de subclonagem foram semelhantes ao descrito no item 2.5.4 com exceção das condições de cultivo que primeiramente iniciaram-se com LB_{amp} (200 μL) em placas de 96 poços (deep well) por 16 h a 37 °C e 225 rpm, e posteriormente adição de mais 800 mL de LB_{amp} por aproximadamente por 4,0 h a 37 °C e 225 rpm. Em seguida foi adicionado IPTG (0,1 mM) e mantidas por 24 h a 25 °C e 225 rpm. As placas foram então centrifugadas (3,000xg, 15 min, 4 °C), e as célula foram ressuspensa em tampão borato pH 8,0 (50 μL, 20 mM) e transferidos para as microplacas de 96 poços com capacidade de 200 μL onde foram feitos os ensaios.

2.6.7 Substratos

As sondas fluorogênicas utilizadas na triagem enzimática foram sintetizadas no grupo de pesquisa segundo o procedimento descrito por Badalassi e colaboradores[51] e os ésteres **16, 17** e **18** como a seguir.

[51] Badalassi, F.; Wahler, D.; Klein, G.; Crotti, P.; Reymond, J.-L.; *Angew. Chem., Int. Ed.* **2001***, 23*, 4457-4460.

2.6.7.1 Síntese do acetato de feniletila 16

A uma solução do álcool (1,617 g; 13,2 mmol) em 25 mL de diclorometano sob agitação a 0 ºC, foram adicionados 1,58 g (16,8 mmol) de cloreto de acetila e 2,58 g (21,2 mmol) de DMAP e mantidas sob agitação à temperatura ambiente por 10 h. A solução reacional foi extraída com solução saturada de $NaHCO_3$. A fase orgânica foi seca com Na_2SO_4 (anidro) e purificada em coluna cromatográfica de sílica gel com eluição em Hex : AcOEt (9:1). O produto foi obtido com rendimento de 85%. MM: 164 g mol^{-1} ($C_{10}H_{12}O_2$). IE/EM *m/z* (int. rel.): 164 ($\dot{M}^+$, 22), 122 (100), 107 (37), 105 (74), 104 (90), 77 (34), 43 (42). RMN de ^1H (300,0616 MHz, $CDCl_3$): δ 1,55 (*d*, 3H, *J* = 6,6 Hz); 2,10 (*s*, 3H); 5,93 (*q*, 1H, *J* = 6,6 Hz); 7,40 (*m*, 5H). RMN de ^{13}C (75,4505 MHz, $CDCl_3$): δ 21,3 (CH_3); 22,2 (CH_3); 72,3 (CH); 126,0 (2 CH); 127,8 (CH); 128,5 (2 CH); 141,67 (C_0); 170,3 (C_0).

2.6.7.2 Síntese do propionato de feniletila 17

A uma solução do álcool (1,792 g; 14,6 mmol) em 25 mL de diclorometano sob agitação à 0 º C, foram adicionados 1,80 mL (18 mmol) de cloreto de propionila e 2,58 g (21,1 mmol) de DMAP e mantidas sob agitação à temperatura ambiente por 10 h. A solução reacional foi extraída com solução saturada de $NaHCO_3$. A fase orgânica foi seca com Na_2SO_4 (anidro) e purificada em coluna cromatográfica de sílica gel com eluição em Hex : AcOEt (5:1). O produto foi obtido com rendimento de 80%. MM: 178 g mol^{-1} ($C_{11}H_{14}O_2$). IE/EM *m/z* (int. rel.): 178 ($\dot{M}^+$, 25), 122 (95), 105 (100), 104 (78), 77 (26), 57 (31). RMN de ^1H (300,0616 MHz, $CDCl_3$): δ 1,17 (*t*, *J* = 7,7 Hz, 3H); 1,50 (*d*, *J* = 6,7 Hz, 3H); 2,35 (*q*, *J* = 7,7 Hz, 2H); 5,90 (*q, J* = 6,7 Hz, 1H); 7,40 (*m*, 5H). RMN de ^{13}C (75,4505 MHz, $CDCl_3$, δ_{CDCl3} 77,0) δ: 9,1 (CH_3); 22,2 (CH_3); 27,8 (CH_2); 72,0 (CH); 126,0 (2 CH); 127,7 (CH); 128,4 (2 CH); 141,8 (C_0); 173,6 (C_0).

2.6.7.3 Síntese do octanoato de feniletila 18

A uma solução do álcool (1,861 g; 15,25 mmol) em 25 mL de diclorometano sob agitação a 0 º C, foram adicionados 3,42 mL (22 mmol) de cloreto de octanoíla e 2,68 g

(22 mmol) de DMAP e mantidas sob agitação à temperatura ambiente por 10 h. A solução reacional foi extraída com solução saturada de $NaHCO_3$. A fase orgânica foi seca com Na_2SO_4 (anidro) e purificada em coluna cromatográfica de sílica gel com eluição em Hex : AcOEt (95:5). O produto foi obtido com rendimento de 79%. MM: 248 g mol^{-1} ($C_{16}H_{24}O_2$). IE/EM *m/z* (int. rel.): 248 ($\dot{M}^+$, 2), 143 (5), 122 (100), 105 (87), 57 (11). RMN de ^1H: (300,0616 MHz, $CDCl_3$): δ 0,86 (*t*, *J* = 6,0 Hz, 3H); 1,20-1,35 (*m*, 8H), 1,52 (*d*, *J* = 6,0 Hz, 5H); 1,62 (*t*, *J* = 6,0 Hz, 2H); 2,32 (*t*, *J*= 6,0 Hz, 2H); 5,90 (*q*, *J* = 6,0 Hz, 1H); 7,22-7,40 (*m*, 5H). RMN de ^{13}C (75,4505 MHz, $CDCl_3$): δ 13,9 (CH_3), 22,2 (CH_3); 22,5 (CH_2), 24,9 (CH_2), 28,8 (CH_2); 28,9 (CH_2); 31,6 (CH_2); 35,5 (CH_2); 71,9 (CH); 125,9 (2 CH); 127,7 (CH); 128,4 (2 CH); 141,8 (C_0); 173,0 (C_0).

Capítulo II

Investigação mecanística e aplicação da desracemização biocatalisada de álcoois secundários

O material desse capítulo foi publicado em MANTOVANI, S. M., ANGOLINI, C. F. F., Marsaioli, A. J. “Mechanistic investigation of the Candida albicans CCT 0776 stereoinversion system and application to obtain enantiopure secondary alcohols.” Tetrahedron. Asymmetry., p.2635 - 2638, 2009.

3 Investigação mecanística e aplicação da desracemização biocatalisada de álcoois secundários

3.1 Considerações gerais

Álcoois secundários quirais são extensivamente aplicados em indústrias farmacêuticas, alimentícias e de fragrâncias.[52] Esses compostos enantiomericamente puros são geralmente obtidos a partir da resolução cinética de misturas racêmicas de álcoois via acilação ou oxidação seletivas, que fornecem um rendimento máximo de 50 %[53], ou através de métodos químicos ou biocatalíticos de redução assimétrica de cetonas pró-quirais[54]. Alternativamente, a desracemização de álcoois racêmicos é atraente considerando a alta disponibilidade de álcoois racêmicos e a possibilidade de se obter somente um dos enantiômeros em alto excesso enantiomérico (*ee*) e rendimento.[55]

Desracemização são processos nos quais um racemato (A + B) é convertido em um produto não racêmico (P ou Q) com 100 % de rendimento teórico sem a separação intermediária dos materiais.[56] Esses processos podem ser de enantioconvergência, de resolução cinética dinâmica onde o enantiômero menos reativo é racemizado *in situ*, e estereoinversão, onde somente um dos enantiômeros do substrato é transformado, nesse caso o processo é mais econômico, pois exige a metade dos biocatalisadores necessários em relação aos processos enantioconvergentes (**Figura 5**)[57].

Nos processos de desracemização, o principal desafio é encontrar condições em que dois ou mais catalisadores, enzimas, ou ainda uma enzima e um catalisador metálico, sejam capazes de operar efetivamente em uma etapa e em um frasco

---

[52] Utsukira, T.; Misumi, º; Nakajima , K.; Koshimura, M.; Kuniyoshi, M.; Kuroiwa, T.; Horiuchi, C. A. *J. Mol. Cat. B, Enzym*. **2008,** *51*, 19-23.
[53] Mandal, S. K.; Sigman, M. S. *J. Org. Chem.* **2003**, *68*, 7535-7537. Faller, J. W.; Lavoie, A. R. *Org. Lett.* **2001**, *3*, 3703-3706.
[54] Gladiali, S.; Alberico, E.; *Chem. Soc. Rev.* **2006**, *35*, 226-236. Samec, J. S. M.; Backvall, J. E.; Andersson, P. G.; Brandt, P. G.; *Chem. Soc. Rev.* **2006**, *35*, 237-248.
[55] Vaijayanthi, T.; Cadha, A. *Tetrahedron Asymmetr.* **2007**, *18*, 1077-1084.
[56] Faber, K. *Chem. Eur. J.***2001,** *7*, 5004-5010.
[57] Strauss, U. T.; Felfer, U.; Faber, K. *Tetrahedron Asymmetr.* **1999**, *10*, 107-117.

reacional (*one-pot*).[58] Assim, os sistemas que empregam células íntegras de um microrganismos como biocatalisador são bastante atraentes.

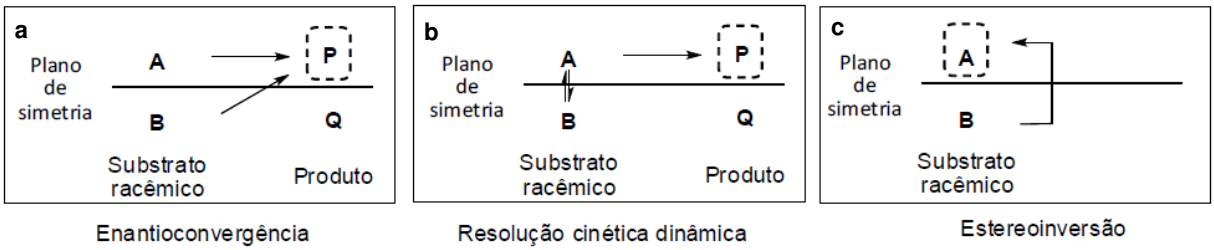
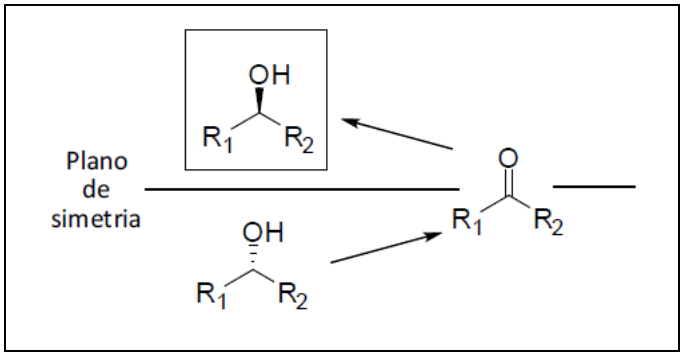


Figura 5: Processos de desracemização. **a**- Enantioconvergência onde duas enzimas com seletividade oposta fornecem o mesmo produto. **b**- Resolução cinética dinâmica que combina uma etapa estereosseletiva com a racemização dos estereoisômeros não reativo. **c**- Estereoinversão de somente um dos enantiômeros.

Diversas aplicações da estereoinversão de álcoois secundários vêm sendo descritas utilizando células microbianas de bactérias, leveduras e fungos ou até mesmo células de plantas, para biotransformação de diferentes tipos de substrato como os exemplificados na **Tabela 8**.[59]

Apesar do grande número de aplicações da estereoinversão biocatalítica de álcoois secundários, essa habilidade microbiana de interconverter um enantiômero na sua imagem especular partindo de um racemato não é uma transformação comum de ser observada na natureza, e as enzimas e etapas metabólicas envolvidas nesse processo ainda são desconhecidos.[60] De maneira geral, o que se conhece é que esse sistema ocorre via uma sequência de oxidação e redução envolvendo o intermediário aquiral correspondente, porém pouco tem se especulado sobre a força motriz desse mecanismo bem como das enzimas envolvidas (**Esquema 9**).[61]

[58] Turner, N. J.; *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2010**, *14*,115–121.
[59] Matsuda, T.; Yamanaka, R.; Nakamura, K.; *Tetrahedron Asymmetr.* **2009**, *20,* 513–557.
[60] Voss, C. V.; Gruber, C. C.; Kroutil, W. *Synlett*, **2010**, *7*, 991-998.
[61] Gruber, C. C.; Lavandera, L. Faber, K.; Kroutil, W. *Adv. Synth. Catal.* **2006**, *348*, 1789-1805.



Esquema 9: Mecanismo de desracemização por estereoinversão em que um enantiômero é seletivamente oxidado ao intermediário pró-quiral e posteriormente reduzido em direção ao enantiômero de configuração oposta.

3.1.1 Mecanismos propostos

Os primeiros estudos envolvendo desracemização por estereoinversão com a formação do intermediário proquiral sugeriam a participação de duas álcool desidrogenases (ADH) com estereopreferência oposta, e que idealmente o hidreto retirado na etapa oxidativa retornaria na etapa redutiva por uma reciclagem interna de cofatores.[57,62] Entretanto, uma vez que as reações catalisadas por ADH são reversíveis, a aplicação conjunta de duas ADHs de estereosseletividade oposta podem levar à racemização do substrato (**Figura 6)**.[60,62]

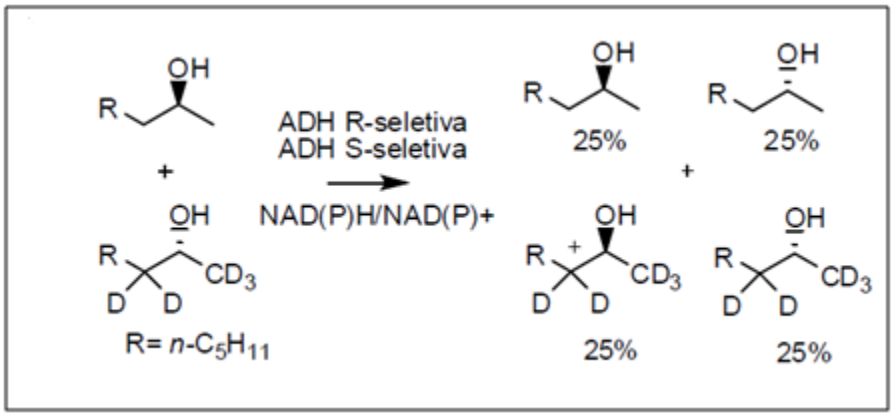
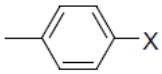
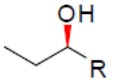
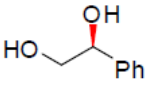
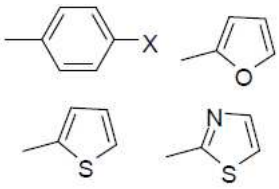
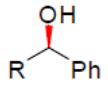
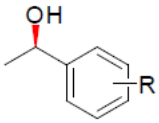
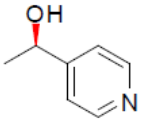
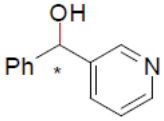
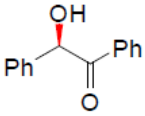
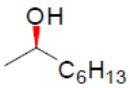
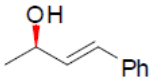
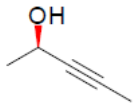
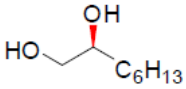
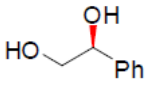
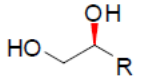
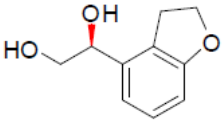
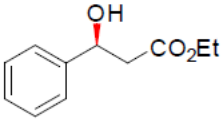
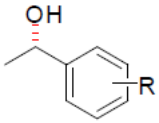
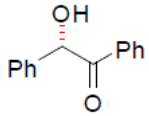
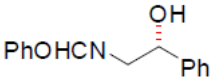
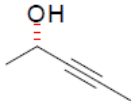
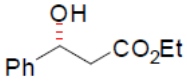
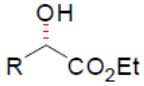
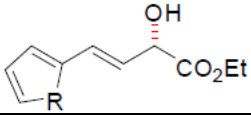


Figura 6: A combinação de duas ADHs com estereosseletividade opostas levam à racemização do substrato pseudo-racêmico uma vez catalisam as reações reversivelmente. Adaptado de Voss *et. al.*[60]

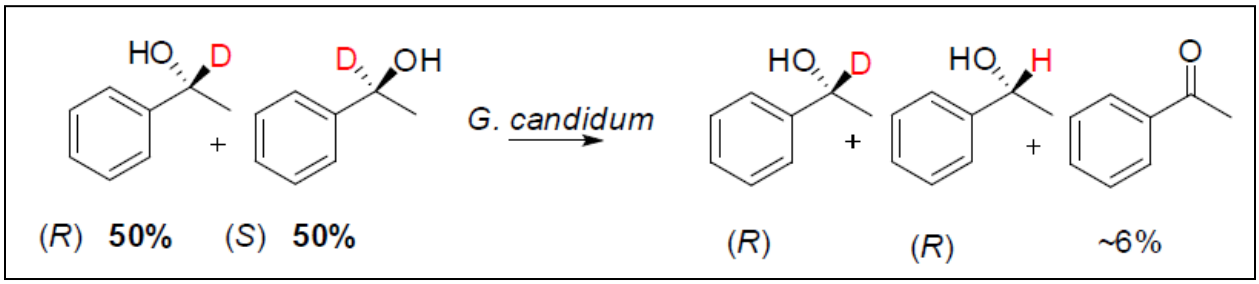
[62] Stecher, H.; faber, K. *Synthesis*, **1997**, 1-16.

Tabela 8: Exemplos de aplicação de estereoinversão biocatalisada de álcoois secundários. Adaptado de Gruber *et. al.* [59]

Álcool	R	% rendimento	% *ee* (configuração)	Organismo
	 -CH_2Ph -$(CH_2)_2Ph$ -CH_2OPh -CH_2COPh	>95	95–100 (*R*)	*Geotrichum candidum*
	-Ph -$CH_2CO_2CH_3$		(*R*)	
			(*S*)	
		79–100	>89 (*R*)	*Sphingomonas paucimobilis*
	-CH_3 -CH_2CH_3 -CH_2CH_2Cl			
	*m*-F *p*-Br *p*-NO_2 *p*-OCH_3	88–100	99 (*R*)	*Aspergillus terreus* CCT3320
		92-99	>99 (*R*)	*Cataranthus roseus*
		93%	100% (-)	*Catharanthus roseus*
		73–76	95–97 (*R*)	*Rhizopus oryzae* ATCC 9363
		92%	97(*R*)	*Candida rugosa*
		68–79	76–99 (*R*)	*Candida parappsilosis* ATCC7330

		83 70	100-98 (*R*)	*Nocardia fusca* AKU2131 *com substrato a 2%(v/v), NADPH e glicose
		65.5	>99 (*S*)	*Candida albicans* CCT 0776
		92	98 (*S*)	*Candida parapsilosis* CCTCC M203011
	-Ph -$(CH_2)_2$Ph	93–100	97–100 (*S*)	*Candida parapsilosis* NBRC 0708
		67	100 (*S*)	*Pichia methanolica*
	p-NO_2 p-CH_3	68 75	99 (*S*) 99 (*S*)	*Candida parapsilosis* ATCC7330
		96	98 (*S*)	*Aspergillus terreus* URM 4602
	*m*-NO_2 *p*-Cl *p*-OCH_3 H	95 97–>99 100	91(*S*) 84–99 (*S*) 98 (*S*)	*Cyanidioschyzon* *Aspergillus terreus* CCT 4083, *Aspergillus orizae* CCT 4964
		85	71 (*S*)	*Rhizopus oryzae* ATCC 9363
		92	98 (*R*)	*Cunninghamella echinulata*
		70	98 (*S*)	*Nocardia psudosporangifera* AKU NOC 060
		57	>99 (*S*)	*Candida parapsilosis* ATCC 7330
	-Ph -CH_2CH_2Ph -CH=CHPh	95 66–70 55–85	99 (*S*) 91–95 (*S*) 50–99 (*S*)	*Candida parapsilosis* ATCC 7330
	S, O, NH	52–79	90–>99 (*S*)	*Candida parapsilosis* ATCC 7330

Adicionalmente, Nakamura e colaboradores[63] provaram que a desracemização do álcool isotopicamente marcado (±)-1-*d*-feniletanol por células de *Geotrichium candidum* envolve a participação de ao menos duas enzimas e coenzimas diferentes no processo. O átomo de deutério no centro quiral do pseudo-enantiômero *D*-(*S*) foi convertido no enantiômero (*R*) não deuterado, enquanto o pseudo-enantiômero *D*-(*R*) manteve-se inalterado (**Esquema 10**).



Esquema 10: Estereoinversão de (±)-1-*d*-feniletanol com *Geotrichium candidum.*Adaptado de Nakamura e*t. al.*[63]

Entretanto a eliminação de competição entre as etapas de oxidação e redução não é suficiente para conferir irreversibilidade ao sistema. Uma vez que o valor de ΔH para a interconversão de enantiômeros é igual a zero, a desracemização por estereoinersão é puramente dependente de entropia (ΔS).[61] Porém, a desracemização leva à diminuição da entropia do sistema fazendo com que o processo seja termodinamicamente desfavorecido. [64] Dessa maneira é preciso considerar a ação de uma força motriz na conversão do racemato a um dos enantiômeros.[65]

Por isso, alguns autores sugerem além da participação de duas enzimas com dependência e reciclagem de cofatores distintos, também o envolvimento de uma enzima capaz de catalisar reações de transferência de hidreto irreversivelmente. Nesse contexto sugere-se a participação de álcool-oxidases ao invés de uma ADH na etapa de oxidação, que são enzimas dependentes de oxigênio molecular.[61, 66]

---

[63] Nakamura, K.; Fujii, M.; Ida, Y. *Tetrahedron Asymmetr.* **2001**, *12*, 3147-3153.
[64] Steinreiber,J.; Faber, K.; Griengl, H. *Chem. Eur. J.* **2008**, *14*, 8060 – 8072.
[65] Gruber, C. C.; *et. al. Chem. Eur. J.* **2007**, *13*, 8271 – 8276. De acordo com Eliel a racemização é um processo termodinamicamente favorecido pela entropia do sistema: $\Delta S = R \ln 2 = 1.38$ calmol^{-1} K^{-1}. Eliel, E.; Wilen, S. H.; Doyle, M. P. in *Basic Organic Stereochemistry*, Wiley, New York, 2001, pp. 102 –105.
[66] Azerad, R.; Buisson, D. *Curr. Opin. Biotechol.* **2000**, *11*, 565-571.

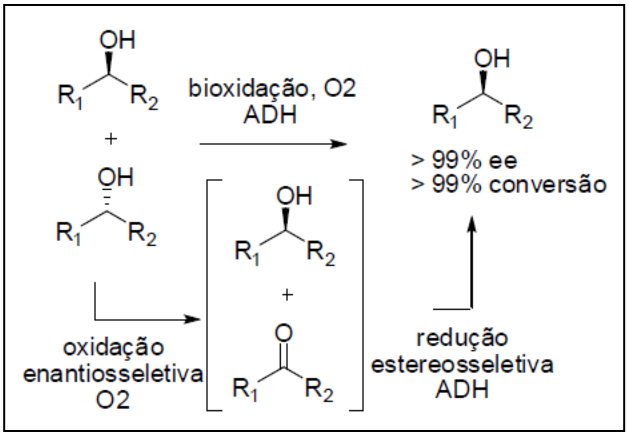
Como durante a dissertação de mestrado foi identificada a capacidade de esteroinversão do 1,2-octanodiol por células íntegras de *Candida albicans* CCT0776,[67] nesse trabalho foi proposto estudar a dependência de cofator das enzimas envolvidas nesse sistema de estereoinversão, uma vez que nós fomos os primeiros a relatar sua aplicação, e também expandir possibilidades para otimização desse processo frente a outros substratos.

Durante esse mesmo período Voss e colaboradores relataram exemplos da combinação de diferentes enzimas a fim de reproduzir artificialmente o metabolismo mediado por células íntegras.

No primeiro exemplo foram empregadas células de *Alcaligenes faecalis*, que é proposto conter ao menos duas enzimas distintas, uma ADH *R*-estereosseletiva dependente de NADH e por uma álcool oxidase, que é responsável por regenerar NAD^+ na presença de oxigênio. O emprego dessas células em conjunto com uma ADH S-seletiva e também dependente de NADH mostrou-se eficiente para desracemização de diversos álcoois racêmicos. Entretanto, a combinação de extrato celular (livre de células) de *A. faecalis* na presença de uma ADH com a mesma preferência de cofator (dependente de NADH) não foi eficiente na desracemização.

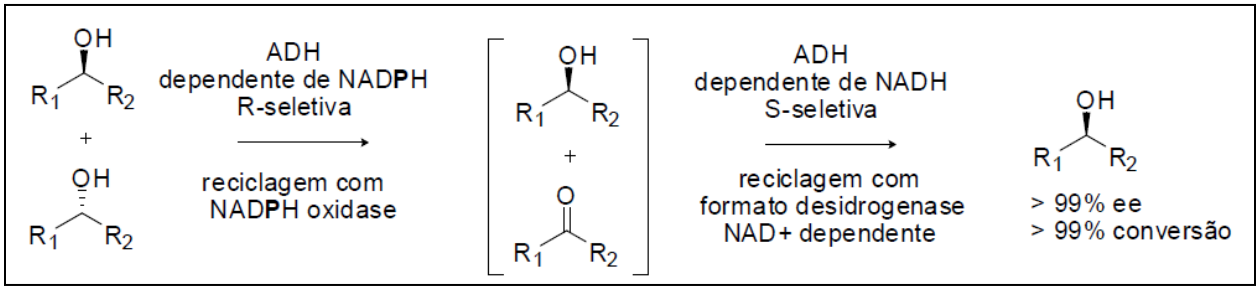
Esses resultados evidenciam que sistemas de células íntegras podem levar á desracemização com enzimas dependentes de mesmo cofator na presença de compartimentalização celular das etapas de oxidação e redução (**Esquema 11**).[68]

[67] Chen, L. S.; Mantovani, S. M.; de Oliveira, L. G.; Duarte, M. C. T.; Marsaioli, A. J. *J. Mol. Cat. B, Enzym*. **2008**, *54*, 50-54
[68] Voss, C. V.; Gruber, C. C.; Kroutil, W. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 741.



Esquema 11: Desracemização de álcoois secundários via oxidação-redução simultâneos com a oxidação mediada por células de *Alcaligenes* sp. e a redução em solução.adaptado de Voss *et. al.*[68]

Adicionalmente, o mesmo grupo propôs a utilização conjunta de quatro enzimas, sendo duas ADHs com estereosseletividades complementares, preferência de cofator e sistemas de reciclagem independentes, sendo que a reciclagem de cofator da etapa oxidativa foi mediada por uma oxidase dependente de oxigênio. Esse sistema em que as etapas de oxidação e redução são independentes mostrou-se eficiente para vários substratos e que a combinação de ADHs com oxidase viabiliza o sistema (**Esquema 12**).[69]



Esquema 12: Oxidação e redução orquestrada para desracemização de álcoois secundários. Adpatado de Voss *et. al.* [69]

[69] Voss, C. V.; Gruber, C. C.; Faber, K.; Knaus, T.; Macheroux, P.; Kroutil, W.; *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 13969.

3.2 Hipótese

Apesar do grande número de aplicações relatadas para a desracemização de álcoois secundário, pouco se conhece a respeito das enzimas envolvidas no processo multienzimático. De maneira geral é sugerido o envolvimento de enzimas dependentes de cofatores distintos, sendo que uma das etapas é também dependente de oxigênio molecular.

Uma vez que fomos os primeiros a relatar a poderosa habilidade de desracemização por células de *Candida albicans* CCT 0776 e que esse sistema algumas vezes não atua de maneira muito eficiente em certos substratos. Foi proposto que o estudo dos parâmetros cinéticos e dos cofatores envolvidos nesse processo poderiam não somente esclarecer o processo de estereoinversão, como também servir de inspiração para modificações físico-químicas do sistema para aqueles substratos cujo processo é pouco eficiente.

3.3 Objetivos

1- Avaliação do mecanismo de estereoinversão mediada por células de *C. albicans* frente ao substrato modelo feniletanol:

   a. Avaliar as conversões e excessos enantioméricos com relação ao tempo;

   b. Avaliar a dependência de O_2 na etapa de oxidação;

   c. Determinar a dependência de cofator das enzimas envolvidas em cada uma das etapas da estereoinversão;

2- Aplicar o sistema de *C. albicans* CCT 0776 para obtenção de álcoois enantiomericamente puros partindo de misturas racêmicas de:

   a. Derivados do 1,2,4-butanotriol;

   b. 1,2-dióis;

   c. Álcoois secundários lineares.

3.4 Resultados e discussões

3.4.1 Implicações mecanísticas da estereoinversão de álcoois secundários catalisadas por células de *C. albicans* CCT0776

3.4.1.1 Avaliação do tempo de oxido-redução do feniletanol (19)

O substrato (±)-**19** foi selecionado como substrato modelo para o estudo do sistema enzimático da levedura *C. albicans* CCT 0776 envolvidas na estereoinversão, devido à alta velocidade de reação e pelo fato das condições de análise por cromatografia de fase quiral já terem sido previamente otimizadas.

Os ensaios de biotransformação utilizando 50 mg mL^{-1} de massa úmida de células e 0,5 mg mL^{-1} de substrato em tampão fosfato pH 7,0 permitiram avaliar as etapas de oxidação e redução com relação ao tempo. Os resultados observados são coerentes com o mecanismo proposto para a os sistemas de estereoinversão, em que o álcool (*S*)-**19** foi completamente oxidado à acetofenona (**20**) após 2,5 h e fornecendo o (*R*)-**19** com alto *ee* (98%) e conversão de 48 % por um processo resolução cinética. Em seguida, o intermediário **20** é reduzido seletivamente em direção ao enantiômero (*R*)-**19** que foi obtido em alto rendimento cromatográfico (90 %), mais lentamente (20 h) (**Tabela 9 e Figura 7**).

Adicionalmente, monitorou-se a redução da cetona **20** por células de *C. albicans*, e surpreendentemente observou-se que inicialmente a cetona é reduzida preferencialmente em direção ao enantiômero *S*, porém com baixa estereosseletividade, mas após algum tempo o enantiômero (*R*)-**19** se acumula preferencialmente (**Tabela 10**).

Esse comportamento sugere que a desracemização de álcoois secundários mediados por *C. albicans* estaria passando por um sistema cíclico. Assim, a ocorrência sequencial da oxidação *S*-específica seguida da redução da cetona intermediária por uma enzima de baixa estereosseletividade levaria ao acúmulo do enantiômero *R,* após várias etapas de oxidação e redução.

Tabela 9. Estereoinversão de (±)-feniletanol por *C. albicans* CCT0776

Tempo (h)	% 19[a]	%20	% *ee*[b]	Configuração[c]
0,67	70	30	66	*R*
1,33	58	45	89	*R*
2,5	48	50	99	*R*
4,5	60	40	99	*R*
16,0	70	30	99	*R*
24,0	96	-	99	*R*

[a] Valores de conversão cromatográfica foram calculados pela razão entre as áreas dos picos referentes ao substrato em relação as áreas dos picos referentes ao padrão interno benzofenona (0,01 mg mL^{-1}) ($C_{substrato} = (A_{substrato}.C_{PI}/A_{PI})\,FR.$ [b] o excesso enantiomérico calculado por *ee* = [(A-B)/(A+B)] 100 onde A e B são as áreas correspondentes a cada enantiômero. [c] Configuração absoluta determinada por coinjeção com padrão enantiopuro.

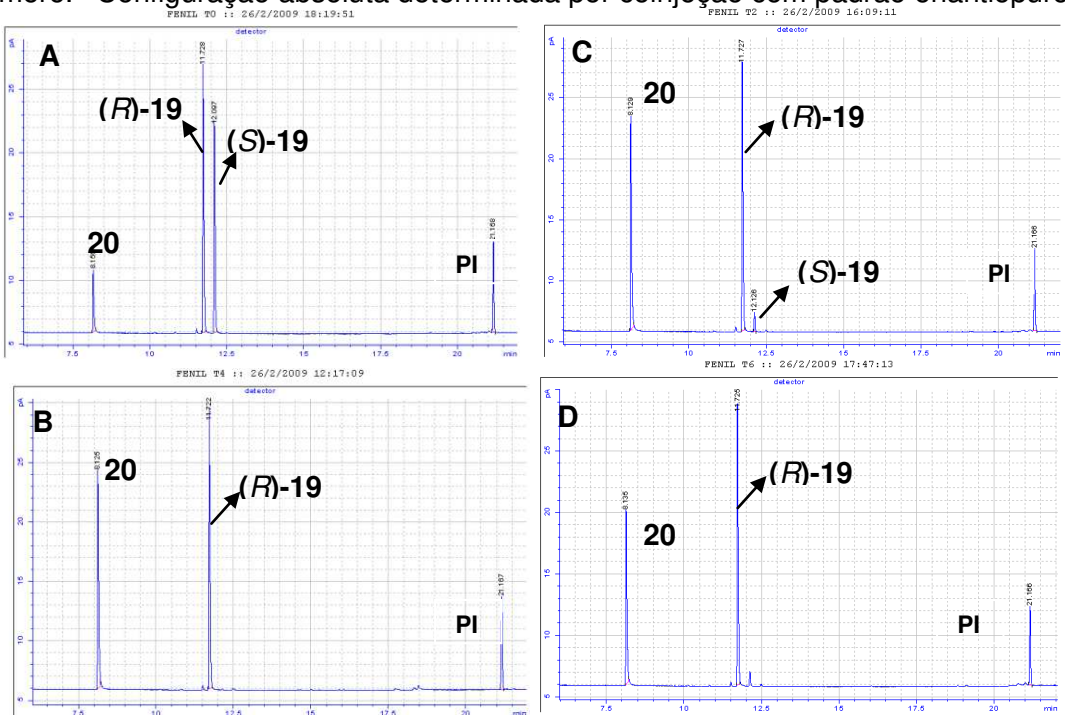


Figura 7: Cromatograma CG- DIC da reação de *C. albicans* CCT 0776 com (±)-**19** a 0 h (**A**), 2,5 h (**B**) e 4,5 h (**C**) e 16 (**D**). Condições de análise: 40-180 ° C a 15 °/min, 180 °C por 5 min, $T_{injetor}$= 200 °C, $T_{detector}$= 240 °C, $P_{constante}$= 10 psi. Coluna: Chrompack CD-Chirasil (25 m x 0,25 mm x 0,25 μm).

Posteriormente, avaliou-se também o comportamento da levedura frente aos enantiômeros puros avaliados separadamente, concordou com o mecanismo proposto uma vez que o enatiômero (*S*)-**19** foi oxidado à cetona enquanto o enantiômero (*R*)-**19** manteve-se completamente inalterado durante o monitoramento (**Figura 8**).

Tabela 10: Redução de acetofenona por *C. albicans* CCT0776

Tempo (h)	% 19[a]	% *ee*[b]	Configuração[c]
2,5	7,5	26	*S*
4,5	7,0	18	*R*
16	12	73	*R*
24	20	95	*R*

[a] Valores de conversão cromatográfica foram calculados pela razão entre as áreas dos picos referentes ao substrato em relação às áreas dos picos referentes ao padrão interno benzofenona (0,01 mg mL^{-1}) ($C_{substrato} = (A_{substrato}.C_{PI}/A_{PI})\ FR.$ [b] o excesso enantiomérico calculado por *ee* = [(A-B)/(A+B)] 100 onde A e B são as áreas correspondentes a cada enantiômero. [c] Configuração absoluta determinada por coinjeção com padrão enantiopuro.

Assim, esse sistema que combina uma enzima seletiva e outra não seletiva satisfaz os parâmetro termodinâmicos do processo de desracemização e nenhuma das reações precisa ser irreversível. Do ponto de vista cinético, esse caso é bastante sofisticado sendo que os parâmetros cruciais para a viabilidade desse processo são a seletividade da etapa oxidativa, a qual é determinante do excesso enantiomérico obtido no equilíbrio, e as velocidades de reação direta e reversa que determinam o rendimento.[70]

Além disso, esse exemplo mostra a aplicabilidade de enzimas de baixa estereosseletividade para obtenção de compostos enantiopuros. Esse tipo de sistema já havia sido proposto anteriormente para a desracemização de amino álcoois por *Cunninghamella echinulata.*[71]

[70] Kroutil, W.; Faber, K. *Tretrahedron Asymmetr.* **1998**, *9,* 2901–2913.
[71] Cardus, G. J.; Carnell, A. J.; Trauthwein, H.; Riermeir, T. *Tretrahedron Asymmetr.* **2004**, *15*, 239-243.

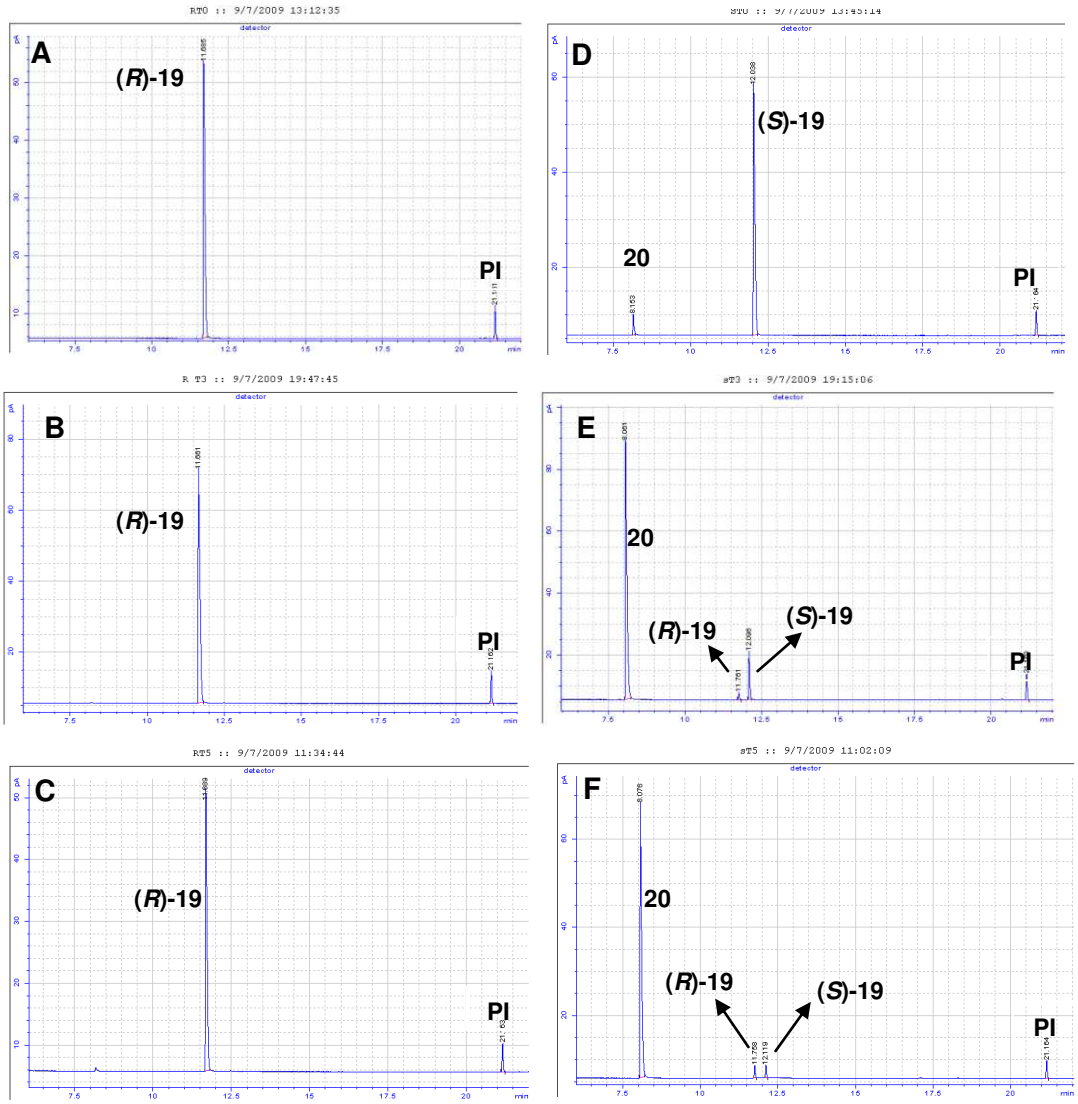


Figura 8: Cromatograma CG- DIC da reação de *C. albicans* CCT 0776 com (*R*)-**19** à 0 h (**A**), 2,5 h (**B**) e 4,5 h (**C**) e com (*S*)-**19** à 0 h (**D**), 2,5 h (**E**) e 4,5 h (**F**). Condições de análise: 40-180 ° C a 15 °/ min, 180 °C por 5 min, $T_{injetor}$= 200 °C, $T_{detector}$= 240 °C, $P_{constante}$= 10 psi. Coluna: Chrompack CD-Chirasil (25 m x 0,25 mm x 0,25 μm).

3.4.1.2 Estudo da dependência de O_2 na etapa oxidativa

Alguns autores sugerem a participação de álcool oxidases, que são enzimas dependentes de oxigênio molecular, na etapa oxidativa da desracemização e que conferem irreversibilidade ao sistema. Portanto, esta dependência foi também avaliada nas reações catalisadas por *C. albicans* através do monitoramento da estereoinversão de (±)-**19** sob atmosfera inerte, e como esperado, não foi observado biotransformação

do álcool, indicando que a etapa de oxidação deve envolver uma enzima dependente de O_2.

Para confirmar essa evidência, foi investigada também a redução de **20** em condições anaeróbias e observou-se a formação preferencial do enantiômero (*S*)-**19** com o decorrer da reação enquanto que sob condições aeróbicas houve o acúmulo do enantiômero *R* (**Tabela 11**). Esses resultados estão de acordo com a proposta anterior onde a redução em direção do enantiômero *S* é preferencial, e com a inibição da etapa de oxidação não observa-se o acúmulo do enantiômero *R*. Assim, pode-se sugerir que há participação de uma enzima dependente de oxigênio na etapa de oxidação estereosseletiva, seja diretamente na etapa de oxidação, ou na reciclagem de cofator como proposto por Voss e colaboradores.[69]

Tabela 11: Redução de acetofenona por células de *C. albicans* CCT 0776

Tempo (h)	% *ee*[a]	% 19[b]	Configuração[c]
Condições aeróbicas			
2,5	26	7,5	*S*
4,5	18	7,0	*R*
16	73	12	*R*
24	95	20	*R*
Condições anaeróbicas			
2,5	92	6,7	*S*
4,5	93	9,6	*S*
16	91	15	*S*
24	92	23	*S*

[a] Excesso enantiomérico calculado por *ee* = [(A-B)/(A+B)] 100 onde A e B são as áreas correspondentes a cada enantiômero. [b] Valores de conversão cromatográfica foram calculados pela razão entre as áreas dos picos referentes ao substrato em relação às áreas dos picos referentes ao padrão interno benzofenona (0,01 mg mL^{-1}) ($C_{substrato} = (A_{substrato} . C_{PI}/A_{PI})\, FR$. [c] Configuração absoluta determinada por coinjeção com padrão enantiopuro.

3.4.1.3 Estudo da dependência de cofator nas etapas envolvidas

A preferência distinta dos cofatores de cada uma das etapas envolvidas nos sistemas de desracemização biocatalítica é enfatizado por outros autores,[60] e por isso foi também proposto nesse trabalho identificar os cofatores envolvidos nas desracemização mediada por *C. albicans* CCT 0776. Para isso avaliou-se o comportamento do extrato celular (*free-cell*) de *C. albicans* na presença dos substratos **19** e **20** e dos cofatores NAD(P)$^+$ ou NAD(P)H através de ensaios espectrofotométricos baseados no consumo e formação de NADPH e NADH pelo monitoramento da absorbância à 340 nm.[72]

O monitoramento da redução de **20** revelou um lento consumo de NADH, com relação ao controle, enquanto o NADPH permaneceu praticamente constante, indicando a preferência por NADH na etapa redutiva. Por outro lado, durante a avaliação da oxidação de **19** observou-se um aumento significativo da formação de NADPH com relação ao controle cerca de 2,5h de reação, enquanto a formação de NADH foi insignificante (**Tabela 12**).

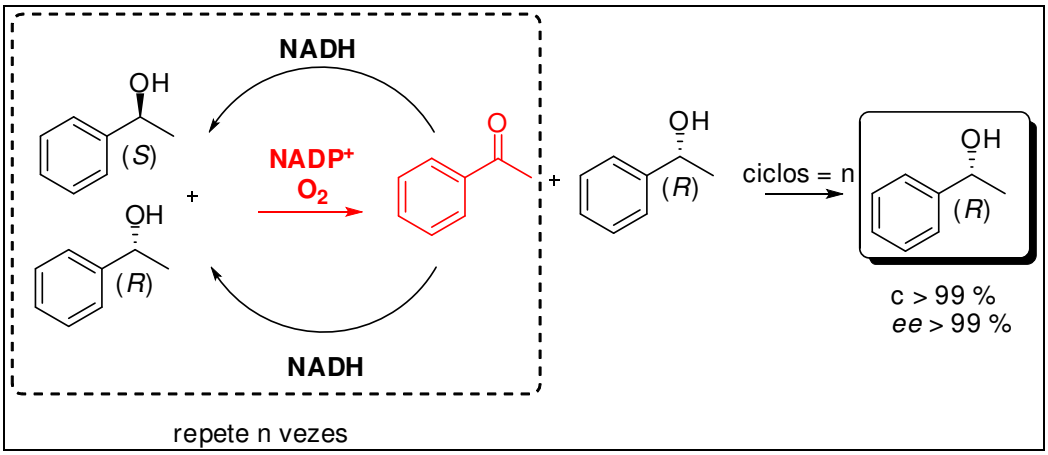
Tabela 12: Consumo de cofator nas reações catalisadas pelo extrato celular de *C. albicans* CCT 0776

Substrato	**Absorbância a 340 nm**			
	NAD$^+$	**NADP$^+$**	**NADH**	**NADPH**
(±)-**18**	0,1±0,02	1,1±0,04	-	-
(*R*)-**18**	0,1±0,02	0,9±0,08	-	-
(*S*)-**18**	0,1±0,02	0,9±0,02	-	-
19	-	-	0,1±0,01	0,8±0,01

Baseado nesses resultados pode-se resumir que, no processo de estereoinversão de (±)-**19** mediado por *C. albicans* CCT 0776, o enantiômero (*S*)-**19** é oxidado ao intermediário **20** por uma enzima que dependente de NADP$^+$ e direto ou indiretamente por oxigênio, formando o intermediário **20,** que é posteriormente reduzido

[72] Nie, Y.; Xu, Y.; Mu, Q. *Org. Process Res. Dev.* **2004,** *8*, 246-251.

por uma enzima pouco seletiva dependente de NADH, gerando ao final de vários ciclos de oxidação e redução o (*R*)-**19** com rendimento cromatográfico quantitativo e excesso enantiomérico (*ee*) maiores que 98% (**Esquema 13**).



Esquema 13: Mecanismo cíclico de desracemização de (±)-**19** por células de *C. albicans* CCT 0776.

3.4.2 Aplicação do sistema de *C. albicans* CCT 0776 para obtenção de álcoois enantiomericamente puros partindo de misturas racêmicas

Diante dessa poderosa ferramenta biocatalítica para obtenção de álcoois secundários enantiomericamente enriquecidos, avaliou-se também o potencial de desracemização de células de *C. albicans* CCT 0776 frente a outros substratos, que podem ser usados como intermediários quirais para síntese de compostos bioativos como os dióis 4-benzilóxi-1,2-butanodiol (**21**) e 4- benzilóxi -1,3-butanodiol (**22**) que são derivados do 1,2,4-butanotriol (**23**), 3-fenóxi-1,2-propanodiol (**24**) e 1,2-feniletanodiol (**25**) e os álcoois lineares 2-nonanol (**26**) e 2-undecanol (**27**).

3.4.2.1 Estereoinversão de derivado do 1,2,4-butanotriol

O interesse nos derivados do 1,2,4-butanotriol (**23**), deve-se ao fato desse composto ser um importante bloco construtor na síntese de vários produtos naturais biologicamente ativos como Rasfonina[73] e (-)-Calisatina A[74], porém a síntese enantiosseletiva de **23** requer várias etapas ou então a utilização de várias enzimas no

[73] Akiyama, K.; Yamamoto, S.; Fujimoto, S.; Ishibashi, M. *Tetrahedron.* **2005**, *61,* 1827-1833.
[74] Dias, L. C.; Meira, P. R. R. *J. Org. Lett.* **2003**, *21*, 3839-3842.

processo[75]. Nesse trabalho foram avaliados os derivados **21** e **22** que contém o substituinte benzila nas posições 1 e 4 do triol **23**, a fim de explorar a flexibilidade desse sistema enzimático em aceitar substratos do tipo 1,2 e 1,3-dióis. Assim, considerando que o sistema enzimático em questão favorece a formação do isômero *anti*-Prelog, poderíamos obter **23** em ambas as formas enantiomericamente enriquecidas (**Figura 9**).

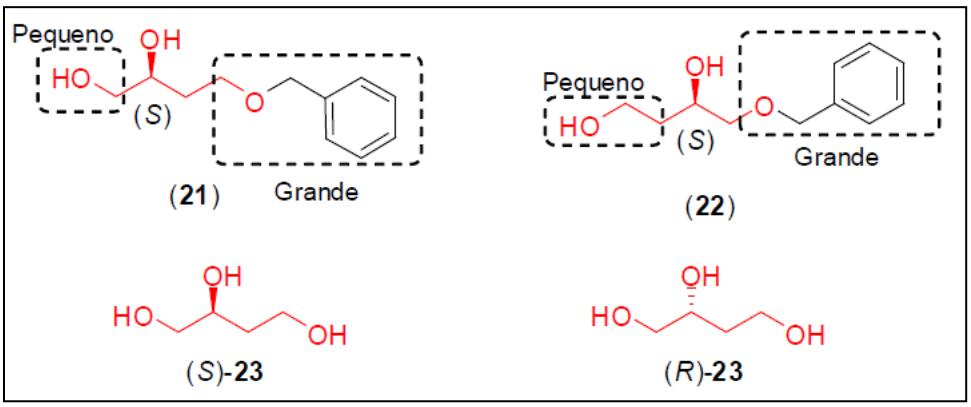


Figura 9: Racionalização com relação ao tamanho dos substituintes a fim de obter ambos os enantiômeros de **23**. O composto **21** consiste no **23** substituído por benzila na posição 4, assim (*S*)-**21** seria resultaria no *(S)*-**23** após desproteção. Já o composto **22** consiste no **23** substituído na posição 1 o que levaria na obtenção do (*S*)-**22** e conseqüentemente (*R*)-**23**.

Os estudos com o diol-1,2 **21** foram iniciados durante a dissertação de mestrado onde otimizou-se a determinação do excesso enantiomérico e configuração absoluta por RMN de ^{1}H através da metodologia de Trost[76] através da derivatização com ácido metoxifenilacético (MPA) (**Figura 10**).[77]

Assim a análise dos derivados da reação de biotransformação de **(±)-**21 pela levedura *C. albicans* revelou a formação de (*S*)-**21** com 81% de rendimento 98 % de excesso enantiomérico após 120 h de reação (**Tabela 13**).

---

[75] Yamada-Onodera, K.; Norimoto, A.; Kawada, N.; Furuya, R.; yamamoto, H.; Tani, Y. *J. Biosc. Bioeng.* **2007**, *103*, 494-496.
[76] Trost, B. M.; Belletire, J. L; Godlesk, S., McDougal, P. G.; Balkovec, J. M. *J Org. Chem.,* **1986**, *51*, 2370-2374.
[77] Mantovani, S. M. *Aplicação de Triagem de Alto desempenho na Investigação das Atividades Enzimáticas e Enantiosseletividades de Microrganismos Brasileiros.*Teses IQ-Unicamp:Campinas, 2007.

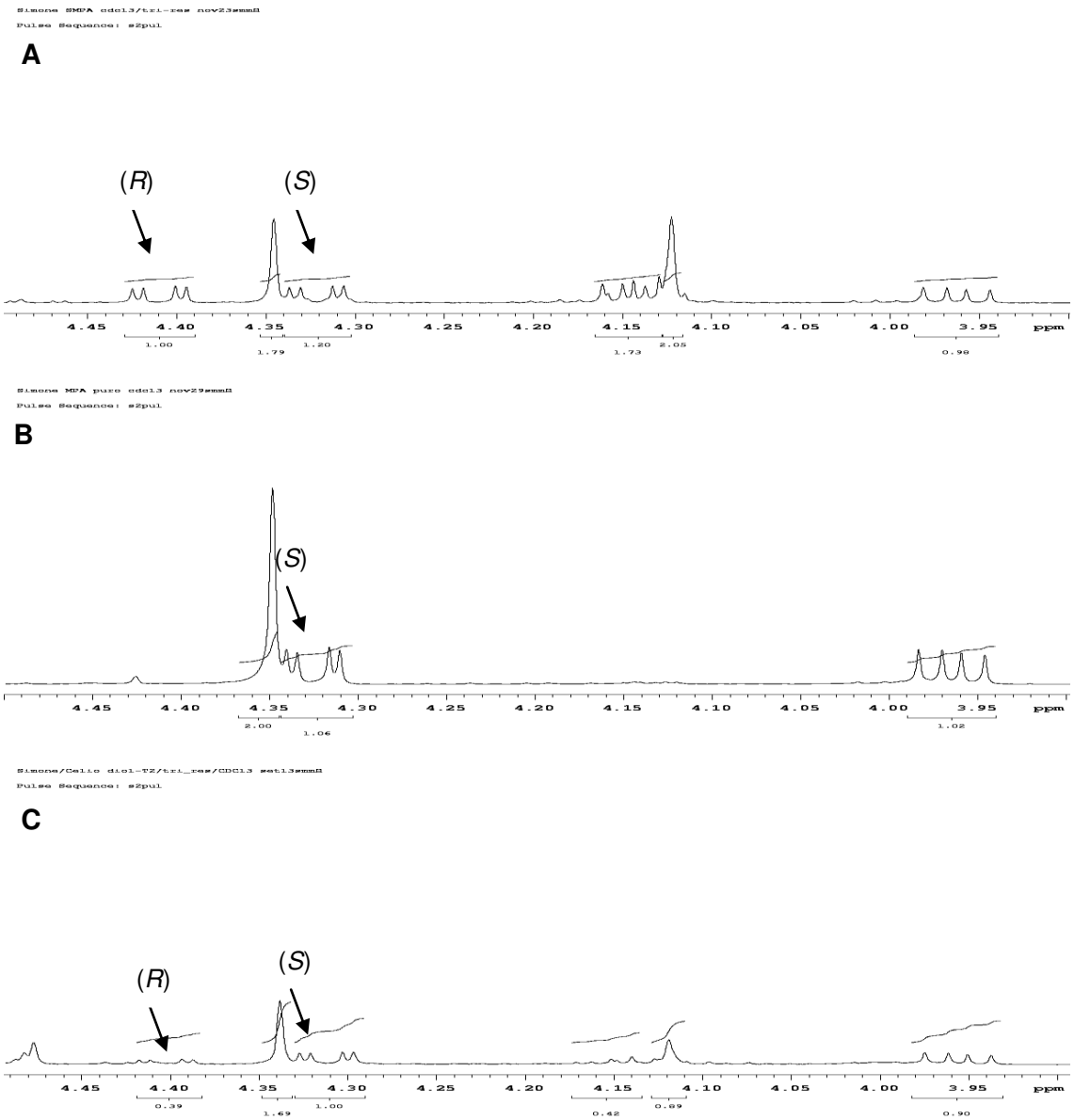


Figura 10: Determinação do excesso enantiomérico por RMN de ^{1}H do produto da reação entre o substrato (±)-**21** e *C. albicans* seguido de derivatização com (S)-MPA ($CDCl_3$, 499,9 MHz, TMS). Expansão da região dos prótons metilênicos e metínicos de **(a)** (±)-**21** derivatizado com (S)-MPA, **(b)** (*S*)-**21** derivatizado com (S)-MPA; **(c)** produto da reação de biotransformação após 24 h derivatizado com (S)-MPA.

A reação de biotransformação com diol-1,3 (±)-**22** não foi observada durante o período de 120 h. Nesse mesmo período Yama-Onodera e colaboradores publicaram a produção de (S)-**23** diretamente utilizando células de *Sterigmatomyces elviae* com 60 % de rendimento e excesso enantiomérico de 99,9 % com apenas 82 h de reação.[75]

Tabela 13: Reação de esteroinversão de 4-benzilóxi-1,2-butanodiol por células de *C. albicans*

Tempo (h)	% 21[a]	% *ee*[b]	Configuração[c]
24	50	40	S
48	70	74	*S*
96	74	78	*S*
120	81	98	*S*

[a] Valores de conversão cromatográfica foram determinados por CG-EM e calculados pela razão entre as áreas dos picos referentes ao substrato em relação às áreas dos picos referentes ao padrão interno benzofenona (0,05 mg mL^{-1}) ($C_{substrato} = (A_{substrato}.C_{PI}/A_{PI})\,FR.$ [b] Porcentagem do excesso enantiomérico calculado pela integração dos prótons metínicos por RMN de ^1H do diol **21** derivatizados com (*S*)-MPA.[c] Configuração absoluta do produto foi obtida pela derivatização do produto biotransformado com éster (*S*)-MPA aplicando o modelo sugerido por Trost[76] que foi confirmado pela derivatização do padrão (*S)*-**21**.

3.4.2.2 Estereoinversão de dióis-1,2

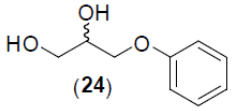
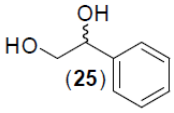
Ainda buscando a desracemização de blocos de construção versáteis, avaliou-se a reação do 3-fenóxi-1,2-propanodiol (**24**), que é um importante intermediário na síntese de β-bloqueadores normalmente utilizados no tratamento de hipertensão,[78] porém observou-se que o sistema enzimático não foi eficiente, uma vez que o intermediário aquiral não foi identificado e os excessos enantioméricos foram praticamente inexistentes (**Tabela 14 e Figura 11**).

Adicionalmente, testou-se também o substrato 1,2-feniletanodiol (**25**) que é um bloco de construção versátil na síntese de fármacos,[79] e nesse caso a desracemização procedeu de maneira eficiente fornecendo um dos enantiômeros com alto excesso enantiomérico após 48 h de reação (**Tabela 14 e Figura 12**). É interessante notar também quase não se observou a formação do intermediário aquiral durante o monitoramento do curso da reação, indicando que para esse substrato a etapa

[78] Wang, L.-W. *Directed Evolution of the Aspergillus niger Epoxide Hydrolase*. 2006. Cap. 1.
[79] Nie, Y.; Xu, Y.; Yang, M.; Mu, X. –Q. *Lett. Appl. Microbiol*. **2007,** *44*, 555-562.

oxidativa seria a limitante da velocidade da reação, e não a redutiva como se observou para o álcool **19**.

Tabela 14: Estereoinversão de 1,2-dióis catalisados por *C. albicans* CCT 0776

Substrato	Tempo (h)	% álcool	% *ee*[b]	Configuração[c]
 (**24**)	120	97	10	-
 (**25**)	48	97	~80	*S*

[a] Valores de conversão cromatográfica foram determinados por CG-EM e calculados pela razão entre as áreas dos picos referentes ao substrato em relação às áreas dos picos referentes ao padrão interno benzofenona (0,05 mg mL^{-1}) ($C_{substrato} = (A_{substrato}.C_{PI}/A_{PI})\,FR$.[b] Como a separação dos picos correspondentes a cada enantômero não foi bem resolvida os valores de excess enantiomérico foram calculado por *ee* = [(A-B)/(A+B)]*100, pela coinjeção da alíquota com a mistura racêmica previamente analisada, onde A e B são as áreas correspondentes a cada enantiômero substraído da área do composto racêmico. [c] Configuração absoluta determinada por coinjeção com padrão enantiopuro.

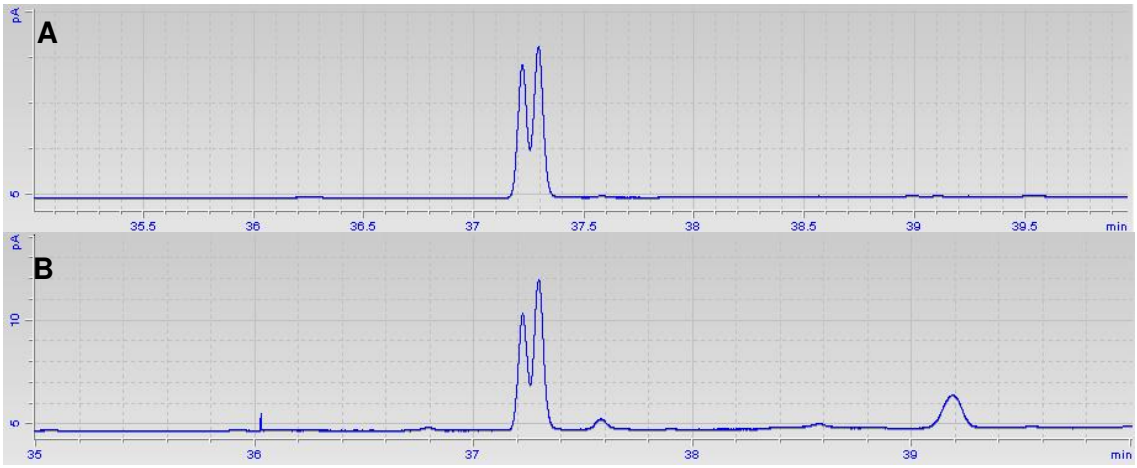


Figura 11: Cromatogramas CG-DIC do monitoramento das reações de (±)-24 frente à *C. albicans* a 0 min (A), 120 h (B). Condições de análise: 40 °C por 5 min, 40-130 a 5 °C min^{-1}, 130-150 °C a 2 °C min^{-1}, 150-180 a 5 °C min^{-1}, e 180 °C por 3 min, $T_{injetor}$= 180 °C, $T_{detector}$= 220 °C, Fluxo= 0,8 mL min^{-1}, e coluna: Chrompack CD-Chirasil (25 m x 0,25 mm x 0,25 μm).

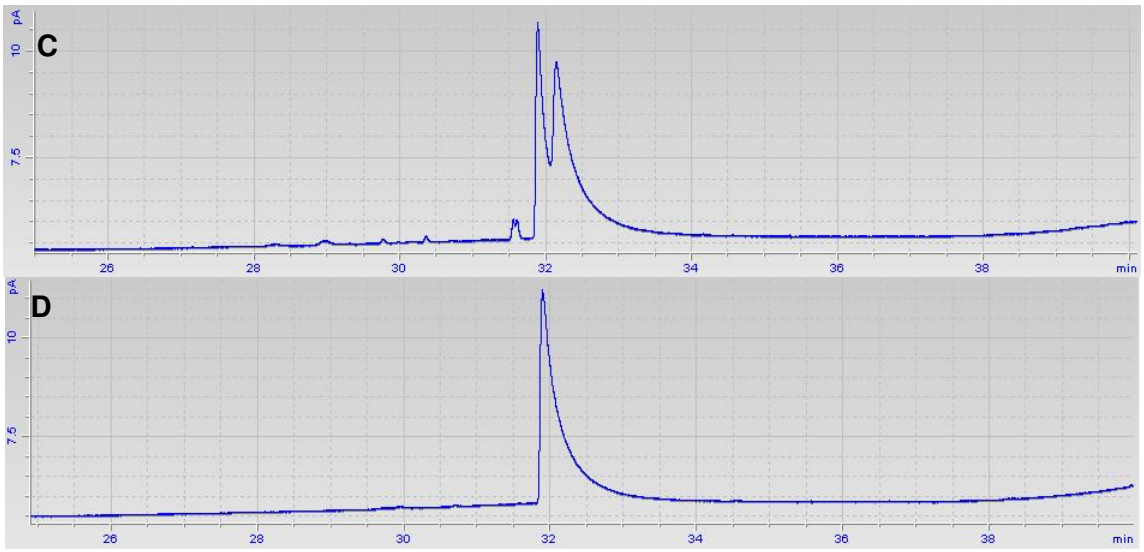


Figura 12: Cromatogramas CG-DIC do monitoramento das reações de (±)-**25** frente à *C. albicans* à 0 min (**C**), 48 h (**D**). Condições de análise: 60-155 °C a 5 °C min^{-1}, 155-180 °C a 10 °C min^{-1} e 180 °C por 2 min, $T_{injetor}$= 180 °C, $T_{detector}$= 220 °C, Fluxo= 0,8 mL min^{-1}, e coluna: Chrompack CD-Chirasil (25 m x 0,25 mm x 0,25 μm).

3.4.2.3 Estereoinversão de álcoois secundários lineares 2-nonanol e 2-undecanol

A fim de estender a aplicação de desracemização biocatalítica de álcoois secundários foram também testados os álcoois lineares 2-nonanol (**26**) e 2-undecanol (**27**), cuja forma enantiomericamente pura está envolvida na comunicação química de espécies de abelhas sem ferrão.[80]

O monitoramento da reação de estereoinversão em escala de 20 mg do substrato **26** por CG-EM e CG-DIC de fase quiral revelou que o isômero (*S*)-**26** é rapidamente oxidado à correspondente cetona 2-nonanona (**28**), fornecendo o (*R*)-**26** com alto excesso enantiomérico e conversão moderada, porém a posterior etapa de redução procede muito lentamente e dificulta a obtenção do (*R*)-**26** em maior rendimento(**Tabela 15 e Figura 13**). Fenômeno semelhante foi observado para o álcool **27** onde o enantiômero (*R*)-**27** foi obtido após 1,0 h de reação com *ee* 99 % e 62% de conversão (**Tabela 15** e **Figura 15**).

[80] Pianaro, A.; Menezes, C.; Kerr, W. E.; Singer, R. B.; Lotufo, E. F.; Patricio, R. A.; Marsaioli, A. J. *J. Chem. Ecol.* **2009**, *35*, 1117-1128.

Tabela 15: Resolução cinética de 2-nonanol e 2-undecanol

Tempo (min)	% *ee*[a]	% álcool[b]	Configuração[c]
	(±)-26		
15	82	65	*R*
30	91	62	*R*
	(±)-27		
15	60	52	*R*
30	86	60	*R*
60	95	62	*R*

[a] Como a separação dos picos correspondentes a cada enantômero não foi bem resolvida os valores de excesso enantiomérico foram calculado por *ee* = [(A-B)/(A+B)]*100, pela coinjeção da alíquota com a mistura racêmica previamente analisada, onde A e B são as áreas correspondentes a cada enantiômero substraído da área do composto racêmico. [b] Valores de conversão cromatográfica foram calculados pela razão entre as áreas dos picos referentes ao substrato em relação às áreas dos picos referentes ao padrão interno benzofenona (0,05 mg mL^{-1})($C_{substrato} = (A_{substrato}.C_{PI}/A_{PI})\,FR.$ [c] Configuração absoluta determinada por coinjeção com padrão enantiopuro.

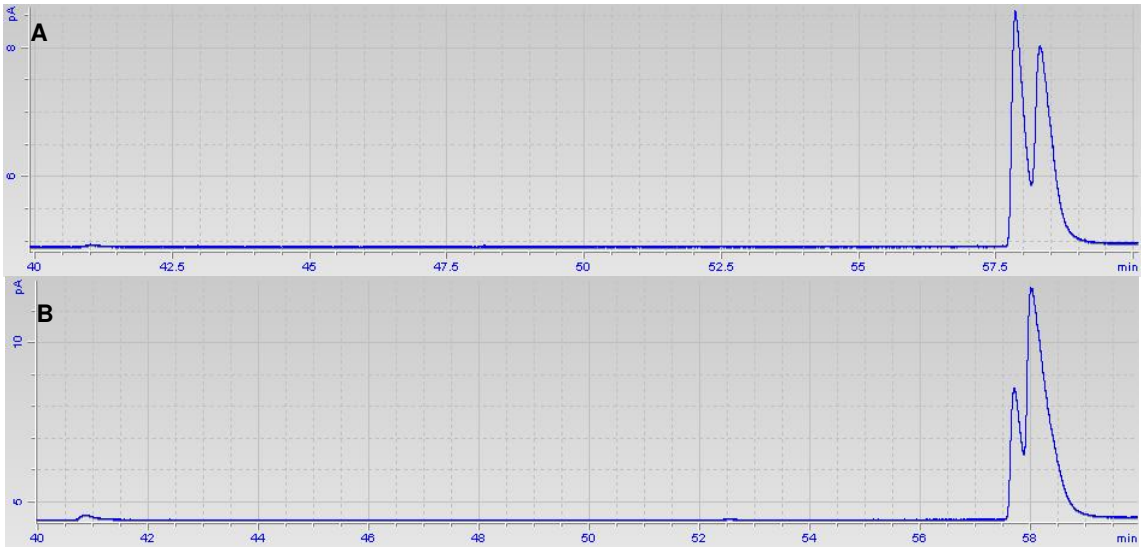


Figura 13: Cromatogramas CG-DIC de (±)-**26** (**A**), e coinjeção de (±)-**26** com (*S*)-**26** (comercial) (**B**). Condições de análise: 50-85 °C a 0,6 °C min^{-1}, 85-180 °C a 15 °C min^{-1}, $T_{injetor}$= 180 °C, $T_{detector}$= 220 °C, Fluxo= 0,8 mL min^{-1}, e coluna: Chrompack CD-Chirasil (25 m x 0,25 mm x 0,25 μm).

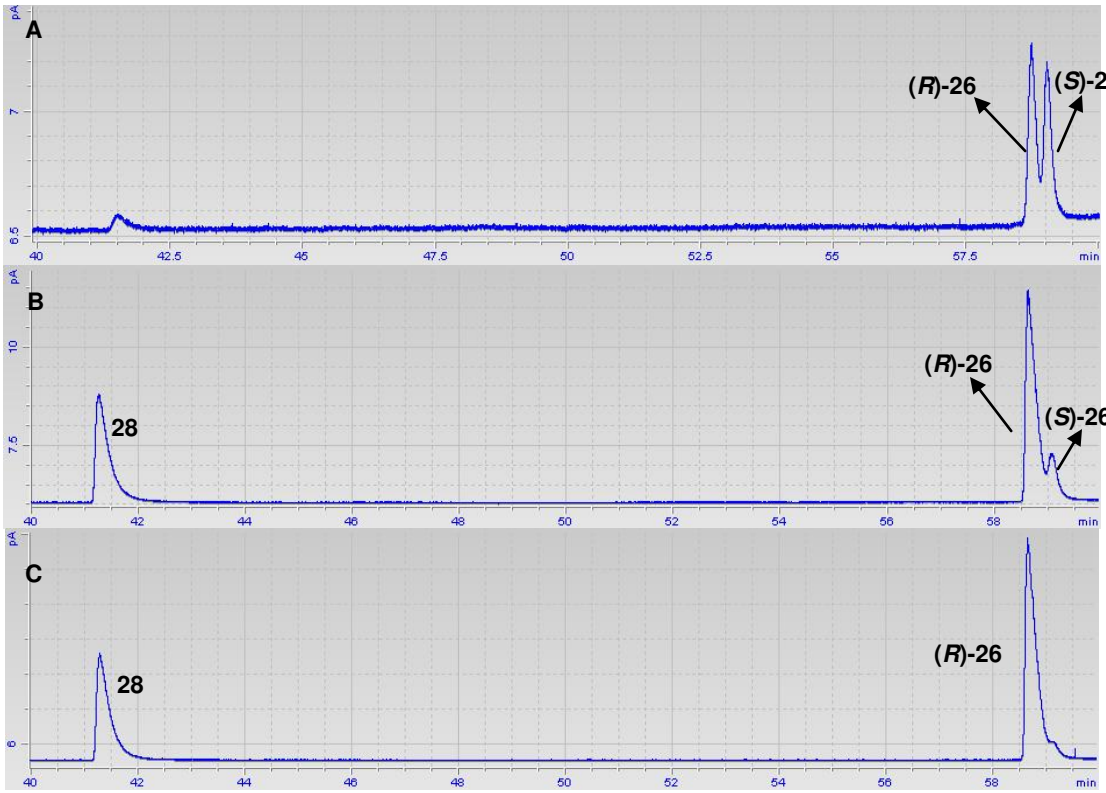


Figura 14: Cromatogramas CG-DIC das reações de desracemização de (±)-**26** por *C. albicans* a 0 min (**A**), 15 min (**B**), 30 min (**C**) e coinjeção de (±)-**26** com (*S*)-**26** (comercial) (**D**). Condições de análise: 50-85 °C a 0,6 °C min^{-1}, 85-180 °C a 15 °C min^{-1}, $T_{injetor}$= 180 °C, $T_{detector}$= 220 °C, Fluxo= 0,8 mL min^{-1}, e coluna: Chrompack CD-Chirasil (25 m x 0,25 mm x 0,25 μm).

Assim, uma vez que a etapa oxidativa parece ser eficiente e que a etapa de redução estaria limitando o rendimento final do álcool, foram propostas metodologias alternativas para acelerar essa segunda etapa, e assim aumentar a eficiência da reação.

A primeira metodologia para aumentar a ação da enzima redutora foi incrementar o meio reacional com glicose,[71] pois é conhecido que a glicose pode atuar como doador de elétrons à forma oxidada NAD^+ e assim aumentaria a capacidade de regeneração do cofator redutor NADH pela via glicolítica.[81] Dessa maneira, as células de *C. albicans* CCT 0776 ressuspensas em tampão fosfato pH 7,0 (1,0 mL) foram

[81] Milagre, C. D. F. *Estudos visando a síntese enantio e diastereosseletiva de um análogo do resíduo N-terminal de nikkomicinas B.*Teses IQ-Unicamp:Campinas, 2007.Chin-Joe, I.; Straathof, A.; J. J.; Pronk, J. T.; Heijnen, J. J. *Biotechnol. Bioeng.* **2001**, 75, 29-38.

incubadas com glicose (5,0 mg mL^{-1}, 2,0 equivalentes) durante 2,0 h sob agitação, seguida da adição do substrato **26** (2,0 mg mL^{-1}) .

Paralelamente, foi sugerido também o acoplamento de uma etapa de redução química, não seletiva, a fim de mimetizar o sistema de desracemização descrito para o álcool **19**. Para tanto foi sugerido acoplar redução química à etapa de oxidação mediada por células de *C. albicans*, similar ao proposto para desracemização de amino ácidos utilizando agentes redutores como $NaBH_4$[82,83] em conjunto com enzimas isoladas. Assim adicionou-se $NaBH_4$ (2,0 equivalente) à reação, e os resultados estão descritos na **Tabela 16**.

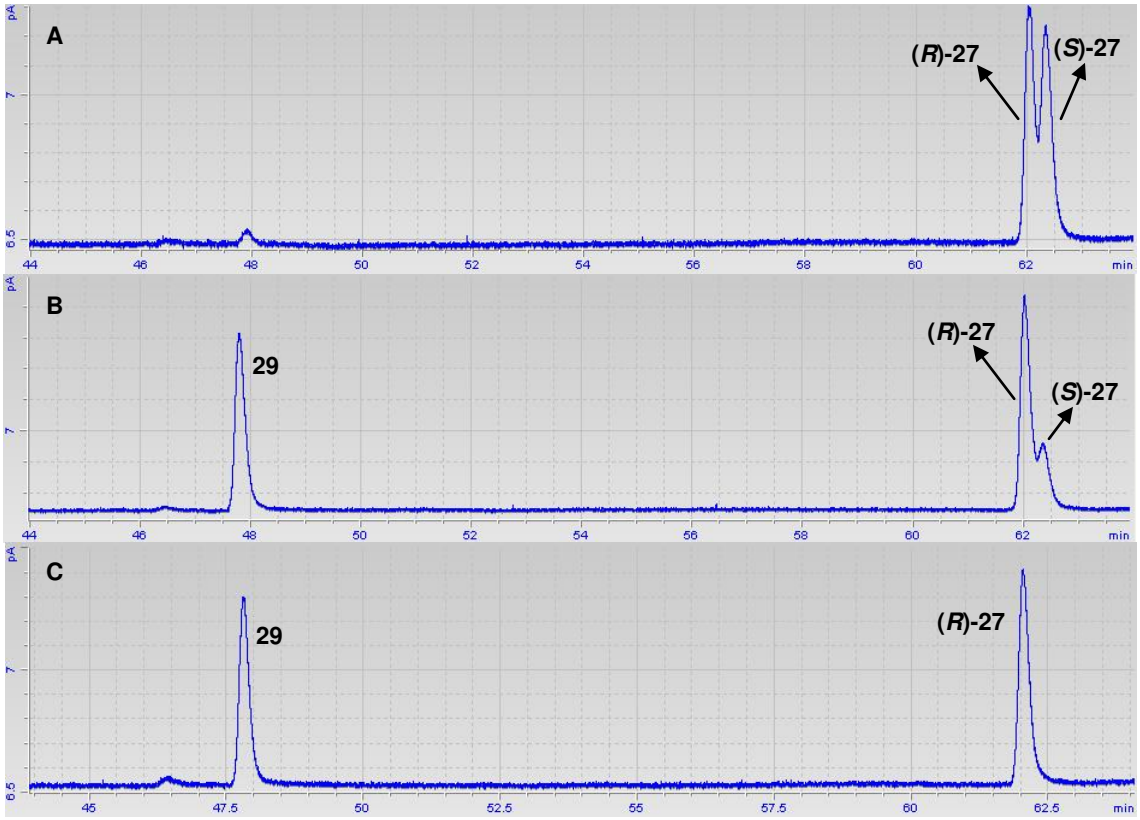


Figura 15: Cromatogramas CG- DIC das reações de da desracemização de (±)-**27** a 0 min (**A**), 30 min (**B**) e 1,0 h (**C**). Condições de análise: 70-108 °C a 0,6 °C min^{-1}, 108-180 °C a 10 °C min^{-1}, $T_{injetor}$= 180 °C, $T_{detector}$= 220 °C, Fluxo= 0,8 mL min^{-1}, e coluna: Chrompack CD-Chirasil (25 m x 0,25 mm x -0,25 μm).

[82] Soda, K.; Oikawa, T.; Yokoigawa, K. *J. Mol. Cat. B, Enzym.* **2001**, *11,* 149–153.
[83] Beard, T. M.; Turner, N. J. *Chem. Commun.* **2002**, 246–247.

A análise da **Tabela 16** mostra que de maneira geral a adição de glicose não teve muito impacto na formação do produto ao final de 20h, enquanto que a adição do redutor químico $NaBH_4$ teve um impacto negativo em comparação com a reação sem aditivo.

O monitoramento do curso da reação na presença de glicose revela um pequeno aumento na quantidade do álcool presente na amostra, que pode ser atribuído ao favorecimento da etapa de redução, porém nota-se também que os valores de excessos enantioméricos foram menores. Isso pode ser explicado considerando que a glicose favorece a formação de NADH, cofator da etapa de redução, mas também do NADPH, que é produto da etapa oxidativa. Assim, pode-se sugerir que a etapa de redução estaria sobrepondo a etapa de oxidação, que por sua vez favorece o enantiômero *S* e leva a excessos mais baixos (**Esquema 14**).

Já a redução química por $NaBH_4$ levou ao consumo do intermediário aquiral indicando que o redutor atuou eficientemente, porém os valores de *ee* foram muito baixos, o que pode ser atribuído à toxicidade do redutor para as células que se decompõem. Assim, como o processo é cíclico, mesmo que o $NaBH_4$ tenha sido eficiente para reduzir o intermediário aquiral, as reações de oxidação posteriores não estariam ocorrendo.

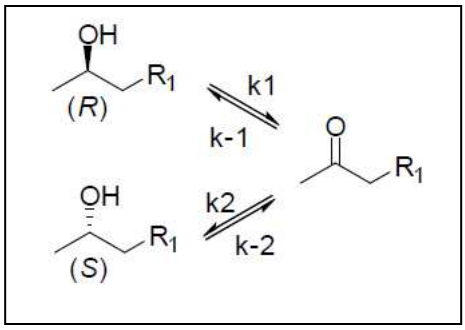
Tanaka e colaboradores relataram recentemente a desracemização quimioenzimática de diversos álcoois utilizando células imobilizadas de *G. candidum* e $NaBH_4$ (9 equivalentes) em sistema bifásico de solução tampão e líquido iônico, que deve proteger as células da degradação.[84]

[84] Tanaka, T.; Iwai, N.; Matsuda, T.; Kitazume, T. *J. Mol. Cat. B, Enzym.* **2009,** *57,* 317–320.

Tabela 16: Estudo da aceleração da etapa de redução com adição de glicose e $NaBH_4$ na reação de biotransformação de (±)-2-nonanol

Tempo (h)[a]	% ee[b]	% 26[c]	Configuração[d]
Desracemização de (±)-**26**			
1,0	43	69	*R*
4,0	67	56	*R*
20	95	77	*R*
Desracemização de (±)-**26** com suplementação de glicose			
1,0	17	87	*R*
4,0	32	72	*R*
20	93	76	*R*
Desracemização de (±)-**26** na presença de $NaBH_4$			
1,0	8	99	*R*
4,0	15	99	*R*
20	16	80	*R*

[a] Essas reações foram repetidas em escala de 2 mg de substrato como descrito na parte experimental e são mais lentas que os resultados mostrados na Tabela 14. [b] Excesso enantiomérico calculado por *ee* = [(A-B)/(A+B)] 100 onde A e B são as áreas correspondentes a cada enantiômero. [c] Valores de conversão cromatográfica foram calculados pela razão entre as áreas dos picos referentes ao substrato em relação às áreas dos picos referentes ao padrão interno benzofenona (0,05 mg mL^{-1}) ($C_{substrato} = (A_{substrato} . C_{PI}/A_{PI})\, FR$. [d] Configuração absoluta determinada por coinjeção com padrão enantiopuro.



Esquema 14: Para o álcool **18** k1>>k-1, k2>>k-2 e k1>>k2. Para o álcool **26** na presença de glicose k1>>k-1, k2>>k-2 e k2>k1.

3.5 Conclusões parciais

Os estudos mecanísticos da desracemização de álcoois por células de *C. albicans* CCT 0776 utilizando o substrato modelo **19** revelaram a maneira elegante como a natureza combina uma enzima de alta especificidade dependente de O_2 molecular e $NADP^+$, junto a uma redutase pouco seletiva dependente de NADH, e leva à formação de somente um dos enantiômeros com alto excesso enantiomérico e conversão após vários ciclos de oxidação e redução.

A aplicação desse sistema para diferentes substratos levou à desracemização de álcoois secundários aromáticos (**19**) e alifáticos (**26** e **27**), e vários 1,2-dióis com cadeia lateral alifática (1,2-epoxioctano) ou aromática (**21** e **25**) em altos excessos enantioméricos e rendimento cromatográfico de moderado a alto para o enantiômero *anti*-Prelog. Já os substratos como o diol-1,3 (**22**), e o diol-1,2 (**24**) praticamente não foram transformados.

Todos esses dados conjuntamente revelam o conceito geral envolvido na desracemização mediado por células íntegras de *C. albicans* CCT 0776 e podem servir de modelo para racionalização de outros sistemas, bem como de inspiração para a combinação de diferentes enzimas ou enzima e reagentes químicos visando à obtenção de compostos opticamente puros cujo sistema célula íntegra não têm boa aceitação.

3.6 Procedimentos Experimentais

3.6.1 Reagentes

Os reagentes utilizados nesse trabalho foram obtidos da Sigma-Aldrich e usados sem purificação. O solvente utilizado na extração foi obtido da Synth e posteriormente bidestilado. Os solventes deuterados utilizados para análise por RMN foram da obtidos da Cambridge Isotope Laboratories. Os meios de cultivo foram obtidos da Oxoid ou Synth.

3.6.2 Equipamentos

As medidas de absorbância dos ensaios enzimáticos realizados em microplacas de polipropileno de 96 poços foram feitas em espectrofotômetro *Flashscan 530 Analitic Jena* a 340 nm.

As análises de cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas foram realizadas em cromatógrafo Agilent 6890 acoplado a um detector de massas HP 5973 operando por impacto eletrônico com energia de ionização de 70 eV na faixa de *m/z* 45-500. As discriminações enantioméricas dos produtos das reações de biotransformação foram realizadas em cromatógrafo Agilent 6850 e detector de ionização de chamas (DIC) equipado com injetor automático e colunas de fase quiral.

Os espectros de RMN foram obtidos em espectrômetro Bruker 250 (250,1315 MHz para ^{1}H e 62,8952 para ^{13}C), Gemini 300P-Varian (300,0616 MHz para ^{1}H e 75,4505 para ^{13}C), Varian Inova-500 (499,8851 MHz para ^{1}H e 125,6951 para ^{13}C) ou Bruker Advance III-400 (400,1300 para ^{1}H e 100, 6128 MHz para ^{13}C) com os deslocamentos químicos registrados em ppm tomando-se como padrão de referência clorofórmio ($CDCl_3$ δ_H 7,27 e δ_c 77,0) ou tetrametilsilano (TMS δ_H 0,00).

3.6.3 Procedimento geral para reações de desracemização

Para realização das reações de biotransformação células da levedura *Candida albicans* CCT 0776 foram cultivadas em Erlenmeyer de 500 mL em extrato de levedura (YE, 250 ml) a 30 ºC, 255 rpm por 48 h. Em seguida as células foram separadas por centrifugação (5000 rpm e 18 º C por 10 min), ressuspensas (2,0 g de massa celular

úmida) em tampão fosfato pH 7,0 (20 mL) onde adicionou-se 20 mg do substrato. A suspensão resultante foi mantida em shaker orbital a 28 ºC e monitoradas por CG-EM ou CG-DIC após extração de alíquotas de 1,0 mL com solução de benzofenona em acetato de etila (0,5 mL, 0,05 mg mL^{-1}). Os substratos sólidos foram primeiramente solubilizados em acetona (5 % v/v).

As reações em atmosfera inerte foram feitas em balões de fundo redondo de 100 mL contendo as células (2,0 g de peso úmido) em tampão fosfato pH 7,0 (20 mL) vedados com septo de borracha e submetidos à atmosfera saturada de N_2 por 10 min. Em seguida 20 μL do substrato foi adicionado e o balão foi em atmosfera de N_2 a 29 ºC e 255 rpm durante todo o período de monitoramento (24h).

3.6.4 Procedimento geral para reações de desracemização em escala média

As reações foram recentemente adaptadas para uma escala menor a fim de reduzir a quantidade de célula e substrato. Assim as células de *Candida albicans* CCT 0776 foram cultivadas em tubo falcon de 50 mL em extrato de levedura (YE, 10 ml) a 30 ºC, 255 rpm por 48 h. Em seguida as células foram separadas por centrifugação (5000 rpm e 18 ºC por 10 min), e a massa celular úmida foi ressuspensa em tampão fosfato pH 7,0 (1,0 mL) e transferidas para placas de 24 poços. Posteriormente foram adicionados 2,0 mg de substrato e as placas foram mantidas em shaker orbital a 28 ºC. As reações foram monitoradas por CG-EM ou CG-DIC após extração das alíquotas com solução de benzofenona em acetato de etila (0,5 mL, 0,05 mg mL^{-1}). Os substratos sólidos foram primeiramente solubilizados em acetona (5 % v/v) à concentração final de 2,0 mg mL^{-1}.

3.6.5 Ensaio espectrofotométrico para determinação da dependência de cofator[72]

Os extratos celulares foram preparados a partir de células cultivadas em meio YE (250 mL) a 29 ºC e 255 rpm por 48 h. Após o período de crescimento as células foram centrifugadas (5000 rpm por 15 min) e ressuspensas em tampão fosfato pH 7,0 contendo DTT (1mM) e EDTA (1mM) e lisadas por maceração em nitrogênio líquido. A

mistura resultante foi novamente centrifugada (30 min a 5000 rpm e 4 ºC) e o sobrenadante resultante foi utilizado como extrato livre de células.

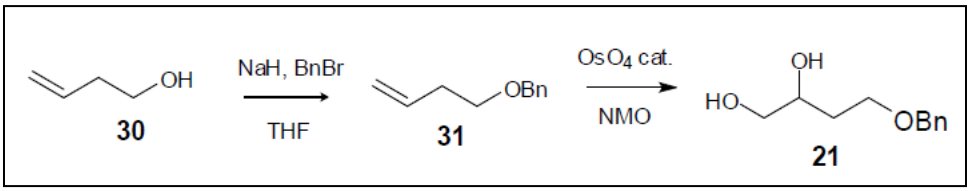
As reações de oxidorredução foram investigadas em formato miniaturizado usando microplacas de 96 poços. Os ensaios para monitoramento da oxidação do feniletanol foram realizados adicionando-se substrato (±)-**19** (10 μL, 2,0 mM), NAD^+ ou $NADP^+$ (80 μL, 7,5 mM) e após 2 min de incubação a 25 ºC adicionou-se 10 μL do extrato celular. Nos ensaios para redução de **20** utilizou-se substrato (10 μL, 2,0 mM), NADH ou NADPH (80 μL, 7,5 mM) e após 2 min de incubação a 25 ºC adicionou-se 10 μL do extrato celular. As reações foram monitoradas a 340 nm por 10 h.

3.6.6 Substratos

Os substratos (±)-**19**, (*R*)-**19**, (*S*)-**19**, **20,** (±)-**26**, (*S*)-**26**, (±)-**27** foram adquiridos da Sigma-Aldrich. Os demais foram sintetizados como se segue:

3.6.6.1 Síntese do 4-fenilmetoxi-1,2-butanodiol (21)

O diol **21** foi sintetizado a partir da proteção do álcool **30** com brometo de benzila seguido da diidroxilação da dupla com tetróxido de ósmio segundo o **Esquema 15**.



Esquema 15: Procedimento para síntese do diol **21**

3.6.6.1.1 Síntese de 31[85]

O álcool **30** (1 g, 13,87 mmol) foi lentamente adicionado a uma suspensão de NaI (555 mg, 13,87 mmol) em THF seco (12 mL) a 0 ºC e mantida sob agitação por 15 min à temperatura ambiente. Em seguida, brometo de benzila (2,37 g, 13,87 mmol) foi adicionado à reação que foi mantida sob agitação à temperatura ambiente por 48 h. A suspensão resultante foi então diluída em éter etílico, lavada com solução saturada de

[85] Wahler, D.; Badalassi, F.; Crotti, P.; Reymond, J.L. *J. Eur. Chem.* **2002**, *14*,3211-3278.

NaCl, a fase aquosa extraída com éter etílico: acetato de etila (1:1), e a fase orgânica combinada foi então seca com $MgSO_4$ e o solvente evaporado. O produto foi purificado em coluna de sílica gel utilizando hexano/EtOAc (7:3) e forneceu 2.1 g de **31** (12.9 mmol, 93,4%) como um óleo incolor. MM: 162,2 g mol^{-1} ($C_{11}H_{14}O$). RMN de ^1H (300,0631 MHz, $CDCl_3$): δ 2,39 (q, 2H), 3,45 (t, 2H), 4,50 (s, 2H), 5,10 (t, 2H), 5,80 (m, 1H),7,30 (m, 5H). RMN de ^{13}C (75,4505 MHz, $CDCl_3$): δ 34,2 (CH_2), 69,5 (CH_2), 72,8 (CH_2), 116,2 (CH_2), 127,4 (CH), 127,5 (CH), 128,2 (2CH), 135,1 (2CH), 138,43(C).

3.6.6.1.2 Síntese de 21[86]

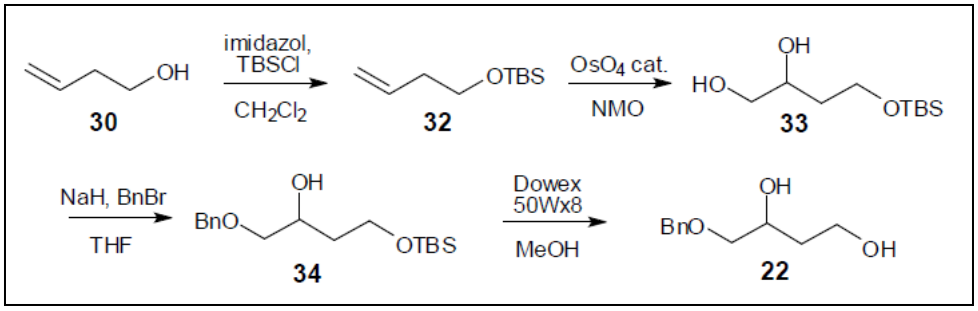
A uma solução do alceno **31** (1.3 g, 8.02 mmol) em acetona/água (50 ml, 2,5:1) sob agitação adicionou-se *N*-oxido de 4-Metilmorfolina (1.13 g, 9.62 mmol) e uma solução de tetróxido de ósmio (0,4 mL) em tert-butanol (2,5%). A mistura reacional foi mantida sob agitação por 24 h e a reação terminada pela adição de solução aquosa de Na_2SO_3 10% (4 mL). Em seguida, a mistura foi extraída com AcOEt, as fases orgânicas combinadas foram secas com $MgSO_4$ e o solvente evaporado. O produto foi purificado em coluna de sílica gel utilizando hexano/EtOAc (2:8) e forneceu 1.25 g de **21** (6.41 mmol, 80%) como um sólido branco. MM: 196,1 g mol^{-1} ($C_{11}H_{16}O_3$). IE/EM *m/z* (int. rel.): 196 ($\dot{M}^+$, 1), 107 (45), 91 (100), 79 (10). RMN de ^1H (300,0616 MHz, $CDCl_3$): δ 1,70-1,90 (m, 2H), 2,83 (sl, 1H), 3,25 (sl, 1H), 3,50 (m, 1H), 3,60-3,70 (m, 3H), 3,90 (m, 1H), 4,55 (s, 2H), 7,30 (m, 5H); RMN de ^{13}C (75,4505 MHz, $CDCl_3$): δ 32,7 (CH_2), 66,5 (CH_2), 68,1 (CH_2), 73,2 (CH_2), 71,1 (CH), 127,5 (CH), 127,7 (2CH), 128,3 (2CH), 137,6 (C).

3.6.6.2 Síntese do 4-fenilmetoxi-1,3-butanodiol (22)

O diol **22** foi sintetizado a partir da proteção do álcool **30** com TBS, seguido da diidroxilação da dupla com tetróxido de ósmio, posterior proteção da hidroxila terminal com benzila e desproteção do TBS **Esquema 16**.

---

[86] De Oliveira, L. G. *Sintese Total das (+)-Crocacinas C e D. Síntese dos Fragmentos 6,6-Espirocetal das Espirofunginas A e B.*Teses IQ-Unicamp:Campinas, 2004.



Esquema 16: Procedimento para síntese do diol **22.**

3.6.6.2.1 Síntese de 32[86]

A uma solução do álcool **30** (1.84 g, 8.4 mmol) em CH_2Cl_2 (50 ml) foi adicionado imidazol (572 mg, 8.4 mmol) e cloreto de tert-butildimetilsilila (1.26 g, 8.4 mmol) e a suspensão resultante foi mantida sob agitação por 12 h. Após lavagem com solução saturada de NaCl e solução de $NaHCO_3$, a fase orgânica combinada foi então seca com $MgSO_4$ e o solvente evaporado. O produto foi purificado em coluna de sílica gel utilizando hexano/EtOAc (2:8) e forneceu 2,4 g de **32** (12,87 mmol, 93%) como um óleo incolor. Esse composto foi usado diretamente como reagente para a síntese de **33**.

3.6.6.2.2 Síntese de 33[85]

A uma solução do alceno **32** (1,2 g, 6,44 mmol) em acetona/água (50 ml, 2,5:1) sob agitação adicionou-se *N*-oxido de 4-Metilmorfolina (1.13 g, 9.62 mmol) e uma solução de tetróxido de ósmio (0,4 mL) em tert-butanol (2,5%). A mistura reacional foi mantida sob agitação por 24 h e a reação foi interrompida pela adição de solução aquosa de Na_2SO_3 10% (4 mL). Em seguida, a mistura foi extraída com AcOEt, as fases orgânicas combinadas foram secas com $MgSO_4$ e o solvente evaporado. O produto foi purificado em coluna de sílica gel utilizando hexano/EtOAc (8:2) e forneceu 1,07 g de **33** (4,9 mmol, 76%) como um óleo incolor. MM: 220,1 g mol^{-1} ($C_{10}H_{24}O_3Si$). IE/EM *m/z* (int. rel.): 220 ($\dot{M}^+$, ausente), 189 (10), 145 (65), 115 (15), 89 (13), 75 (100). RMN de ^1H (300,0616 MHz, $CDCl_3$): δ -0,05 (s, 3H) 0,08 (s, 3H), 0,90 (s, 9H), 1,60-1,70 (m, 2H), 3,50 (dd, *J* = 4,7 e 10 Hz, 1H), 3,62 (dd, *J* = 3,6 e 11 Hz, 1H), 3,80-3,88 (m, 2H), 3,90-3,98 (m, 1H). RMN de ^{13}C (75,4505 MHz, $CDCl_3$): δ -5,6 (CH_3), -5,5 (CH_3), 18,0 (C_0), 25,8 ($3CH_3$), 34,8 (CH_2), 61,7 (CH_2), 66,6 (CH_2), 71,8 (CH).

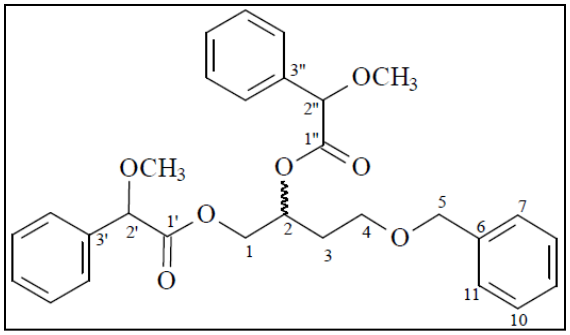
3.6.6.2.3 Síntese de 34[86]

A proteção do diol **33** (361,6 mg, 1,64 mmol) com benzila foi feita seguindo o procedimento descrito no item 3.5.6.1.1. O produto foi purificado em coluna de sílica gel utilizando hexano/EtOAc (6:4) e forneceu 406,3 mg de **34** (1,31 mmol, 80%) como um sólido branco. MM: 310,2 g mol^{-1} ($C_{17}H_{30}O_3Si$). IE/EM *m/z* (int. rel.): 310 ($\dot{M}^+$, 1), 203 (1), 161 (3), 91 (100). RMN de ^1H (250,1315 MHz, $CDCl_3$): δ 0,09 (s, 6H), 0,90 (s, 9H), 1,23 (sl, 1H), 1,70 (q, 2H), 3,50 (m, 2H), 3,81 (m, 2H), 4,05 (m, 1H), 4,50 (s, 2H), 7,30 (m, 5H). RMN de ^{13}C (62,9015 MHz, $CDCl_3$): δ -5,5 (CH_3), -5,5 (CH_3), 18,1 (C_0), 25,8 (3 CH_3), 35,4 (CH_2), 61,3 (CH_2), 69,6 (CH), 73,3 (CH_2), 74,3 (CH_2), 127,6 (CH), 127,7 (CH), 128,4 (CH), 128,7 (CH), 129,0 (CH), 138,1 (C_0).

3.6.6.2.4 Síntese de 22[86]

O diol **34 (**128 mg, 0,41 mmol) foi quantitativamente desprotegido resina ácida (Dowex 50Wx8, cat.) na presença de metanol. Após filtração e evaporação do solvente obteve-se **22** como um sólido branco. MM: 196,1 g mol^{-1} ($C_{11}H_{16}O_3$). IE/EM *m/z* (int. rel.): 196 ($\dot{M}^+$, 1), 151 (1), 121 (3), 107 (20), 91 (100), 75 (15). RMN de ^1H (250,1315 MHz, $CDCl_3$): δ 1,71 (m, 2H), 3,41 (dd, *J* = 9,4 e 7,4 Hz, 1H), 3,51 (dd, *J* = 9,4 e 3,6 Hz, 1H), 3,84 (t, *J* = 5,5 Hz, 2H), 4,09 (m, 1H), 4,55 (s, 2H), 7,35 (m, 5H). RMN de ^{13}C (62,9015 MHz, $CDCl_3$): δ 34,7(CH_2), 61,0 (CH_2), 70,3 (CH), 73,4 (CH_2), 74,3 (CH_2), 127,7 (2CH), 127,8 (CH), 128,4 (2CH), 137,7 (C_0);

3.6.6.3 Preparação do bis-éster (S)-MPA das alíquotas da reação entre (±)-4-fenilmetoxi-1,2-butanodiol [87]

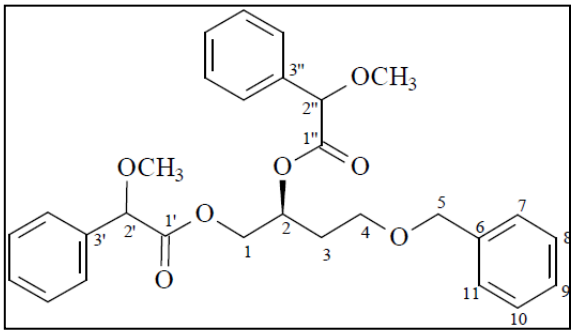


O ácido (*S*)- MPA (30,31 mg; 0,128 mmol) foi adicionado a uma solução do diol **21** (10 mg; 0,05 mmol) em 0,5 mL de diclorometano seco sob agitação e atmosfera de argônio. Em seguida, adicionou-se 22,15 mg (0,107 mmol) de diciclocarbodiimida (DCC), e DMAP em quantidade catalítica. Observou-se a formação de um precipitado branco, caracterizando a formação do complexo DCC-uréia. Após 20 h de reação o produto foi filtrado em celite e o solvente evaporado sob pressão reduzida. A purificação do produto foi feita por cromatografia em coluna de sílica gel com eluição em Hex/AcOEt (6:4). MM: 460 g mol^{-1} ($C_{58}H_{64}O_{14}$). RMN de ^{1}H (499,8851 MHz, $CDCl_3$): δ 1,58-1,64 (*m*, 2H, H-3); 1,74-1,80 (*m*, 2H, H-3); 3,29- 3,43 (*m*, 4H, H-4), 3,31 (*s*, 3H, OCH_3), 3,35 (*s*, 3H, OCH_3), 3,38 (*s*, 3H, OCH_3), 3,40 (*s*, 3H, OCH_3); 3,95 (*dd*, *J*= 3,5Hz e *J*= 12Hz, 1H, H-1a), 4,11 (*s*, 2H, H-5), 4,13 (*dd*, *J*= 3,5Hz e *J*= 12Hz, 1H, H-1a'); 4,31 (*dd*, *J*= 6,5Hz e *J*= 12 Hz, 1H, H-1b), 4,33 (*s*, 2H, H-5), 4,39 (*dd*, *J*= 6,5Hz e *J*= 12 Hz, 1H, H-1b'); 4,51 (*s*, 1H, H-2'), 4,59 (*s*, 1H, H-2'); 4,70 (*s*, 1H, H-2''); 4,73 (*s*, 1H, H-2''); 5,19-5,24 (*m*, 1H, H-2); 5,28-5 (*m*, 1H, H-2), 34 7,16- 7,48 (*m*, 30H, H aromáticos). RMN de ^{13}C (125,6951 MHz, $CDCl_3$) δ: 30,5 (CH_2, C-3), 30,6 (CH_2, C-3); 56,8 (CH_3, OCH_3), 57,2 (CH_3, OCH_3), 57,2 (CH_3, OCH_3), 57,3 (CH_3, OCH_3); 65,1 ($2CH_2$, C-4 e C-1), 65,2 ($2CH_2$, C-4 e C-1), 65,3 ($2CH_2$, C-4 e C-1), 65,5 ($2CH_2$, C-4 e C-1); 69,6 (CH, C-2), 70,0 (CH, C-2); 72,8 (CH_2, C-5), 73,0 (CH_2, C-5); 81,9 (CH, C-2'), 82,0 (CH, C-2'), 82,1 (CH, C-2''), 82,4 (CH, C-2''); 126,9 (CH, C aromáticos), 127,1 (CH, C aromáticos), 127,1 (CH, C aromáticos), 127,1 (CH, C aromáticos), 127,2 (CH, C aromáticos), 127,5 (CH, C aromáticos), 127,5 (CH, C aromáticos), 127,6 (CH, C aromáticos), 128,0 (CH, C aromáticos), 128,2 (CH, C aromáticos), 128,3 (CH, C

[87] Trost, B. M.; Belletiere, J. L.; Golesk, S.; McDougal, P. G.; Balkovec, J. M. *J. Org. Chem.* **1986**, *51*, 2370-2374.

aromáticos), 128,5 (CH, C aromáticos), 128,5 (CH, C aromáticos), 128,5 (CH, C aromáticos), 128,6 (CH, C aromáticos), 128,6 (CH, C aromáticos), 128,6 (CH, C aromáticos), 128,7 (CH, C aromáticos); 135,9 ($2C_0$, C-3' ou C-3''), 136,0 ($2C_0$, C-3' ou C-3''), 136,1 ($2C_0$, C-3' ou C-3''), 136,3 ($2C_0$, C-3' ou C-3''); 137,9 (C_0, C-6), 139,7 (C_0, C-6); 169,8 ($2C_0$, H-1' ou H-1''), 170,1 ($2C_0$, H-1' ou H-1''), 170,15 ($2C_0$, H-1' ou H-1''), 170,2 ($2C_0$, H-1' ou H-1'').

3.6.6.4 Preparação do bis-éster (S)-MPA das alíquotas da reação entre (*S*)-4-fenilmetoxi-1,2-butanodiol



O (*S*)-4-fenilmetoxi-1,2-butanodiol foi cedido pela Dra. Luciana G. de Oliveira e esterificado segundo o procedimento descrito no item anterior. MM: 460 g mol^{-1} ($C_{29}H_{32}O_7$). RMN de ^1H (499,8851, $CDCl_3$) δ: 1,72-1,80 (*m*, 2H, H-3); 3,30 (*s*, 3H, OCH_3); 3,35 (*s*, 3H, OCH_3); 3,30-3,40 (*m*, 2H, H-4); 3,95 (*dd*, 1H, *J*= 3,5 e 12Hz, H-1a); 4,20 (1H, *dd*, *J*= 6,5 e 12 Hz, H-1b); 4,34 (*s*, 2H, H-5); 4,52 (*s*, 1H, H-2'); 4,70 (*s*, 1H, H-2''); 5,29-5,34 (*m*, 1H, H-2); 7,20- 7,50 (*m*, 15H, H aromáticos). RMN de ^{13}C (125,6951 MHz, $CDCl_3$,) δ: 30,1 (CH_2, C-3); 57,2 (CH_3, OCH_3), 57,4 (CH_3, OCH_3); 65,3 (CH_2, C-1); 65,5 (CH_2, C-4); 70,1 (CH, C-2); 73,0 (CH_2, C-5); 82,0 (CH, C-2'), 82,4 (CH, C-2''); 127,0 (CH, C aromáticos), 127,1 (CH, C aromáticos), 127,6 (CH, C aromáticos), 127,7 (CH, C aromáticos), 128,3 (CH, C aromáticos), 128,5 (CH, C aromáticos), 128,6 (CH, C aromáticos), 128,7 (CH, C aromáticos); 136,0 (C_0, C-4'), 136,2 (C_0, C-4''); 137,9 (C_0, C-6); 170,2 (2 C_0, C-1').

3.6.6.5 Procedimento para derivatização com ácido S-MPA

Para determinação da pureza enantiomérica do diol **21** foram extraídas alíquotas de 2,0 ml das reações conforme descrito item 3.5.3 com acetato de etila e concentradas sob atmosfera de N_2. As frações foram então ressuspensas em CH_2Cl_2 e adicionou-se quantidades catalíticas de DMAP, DCC e ácido (*S*)-MPA e após 16 h de

reação, as frações foram filtradas em celite, o solvente era evaporado, e ressuspensas em $CDCl_3$ para análise por RMN de ^1H.

3.6.6.6 Procedimento geral para síntese de fenoxi-1,2-propanodiol (24) e Síntese do 1,2-feniletanodiol (25)

Os dióis **24** e **25** foram obtidos a partir da hidrólise dos respectivos epóxidos seguindo o procedimento geral de adição de 5-10 gotas de H_2SO_4 fumegante (pH 2,0) a uma solução do epóxido correspondente (400 mg) em solução de THF/água (5:1), e mantido sob agitação à temperatura ambiente por 16 h.[88]

3.6.6.6.1 Síntese do fenoxi-1,2-propanodiol (24)

O produto foi purificado em coluna de sílica gel utilizando hexano/EtOAc (8:2) e forneceu 250 mg de **24** (1,70 mmol, 50%) como um sólido branco. MM: 168,1 g mol^{-1} ($C_9H_{12}O_3$). IE/EM *m/z* (int. rel.): 168 ($\dot{M}^+$, 40), 119 (15), 94 (100), 77 (27). RMN de ^1H (400,1300 MHz, $CDCl_3$): δ 2,35 (sl, 1H), 2,75 (sl, 1H), 3,74 (dd, 1H, *J* = 5,4, 11,3 Hz), 3,83 (dd, 1H, *J* = 3,5 e 11,3 Hz), 4,02 (m, 2H), 4,09 (m, 1H), 6,91 (d, 2H, *J* = 8,6 Hz), 6,98 (t, 1H, *J* = 7,3 Hz), 7,28 (m, 2H). RMN de ^{13}C (100, 6128 MHz, $CDCl_3$): δ 63,8, 69,3, 70,6, 114,7, 121,5 (2C), 129, 7(2C), 158,6.

3.6.6.6.2 Síntese do 1,2-feniletanodiol (25)

O produto foi purificado em coluna de sílica gel utilizando hexano/EtOAc (8:2) e forneceu 250 mg de **25** (1,70 mmol, 50%) como um sólido branco. MM: 138,1 g mol^{-1} ($C_8H_{10}O_2$). IE/EM *m/z* (int. rel.): 138 ($\dot{M}^+$, 1), 120 (22), 105 (50), 91 (100), 77 (50). RMN de ^1H (400,1300 MHz, $CDCl_3$): δ 2,55 (sl, 1H), 3,10 (sl, 1H), 3,64 (dd, *J* = 2,6 e 11,1 Hz, 1H), 3,72 (dd, *J* = 8,3 e 11,1 Hz, 1H), 4,78 (dd, *J* = 2,6 e 8,1 Hz, 1H), 7,25 (m, 5H). RMN de ^{13}C (100, 6128 MHz, $CDCl_3$): δ 68,2, 74,9, 126,2 (2C), 128,0, 128,1, 128,7 (2C).

---

[88] Chen, L. S. Triagem de Alto Desempenho na Detecção de Atividade de Epóxido-Hidrolases e Monooxigenases Utilizando Células Íntegras. Teses IQ-Unicamp:Campinas, 2006.

3.6.6.7 Síntese do (*S*)-1,2-feniletanodiol (*S*)-25

O diol enantioméricamente enriquecido (*S*)-**25 foi** obtido a partir da diidroxilação assimétrica de Sharpless[89] do alceno. O alceno estireno (50 mg, 0,48 mmol) foi adicionado a uma mistura de "AD-mix-α" (0,62 mg) em tert-BuOH/água (1:1) a 0 °C e mantido sob agitação a 0 °C por 24 h. Após esse período adicionou-se Na_2SO_3 (0,75 mg) à mistura reacional sob agitação e temperatura ambiente, seguido da extração com AcOEt, e as fases orgânicas combinadas foram secas com $MgSO_4$ e o solvente evaporado. O produto foi purificado em coluna de sílica gel utilizando hexano/EtOAc (4:6) e forneceu 11,2 mg de **33** (0,08 mmol, 17%) como um sólido branco. MM: 138,1 g mol^{-1} ($C_8H_{10}O_2$). $[\alpha]^{25}_D$ = +43,0 (*c* 1,0 $CHCl_3$) IE/EM *m/z* (int. rel.): 138 ($\dot{M}^+$, 1), 120 (22), 105 (50), 91 (100), 77 (50). RMN de ^1H (400,1300 MHz, $CDCl_3$): δ 2,55 (sl, 1H), 3,10 (sl, 1H), 3,64 (dd, *J* = 2,6 e 11,1 Hz, 1H), 3,72 (dd, *J* = 8,3 e 11,1 Hz, 1H), 4,78 (dd, *J* = 2,6 e 8,1 Hz, 1H), 7,25 (m, 5H). RMN de ^{13}C (100, 6128 MHz, $CDCl_3$): δ 68,2, 74,9, 126,2 (2C), 128,0, 128,1, 128,7 (2C).

[89] Shapless, K. B.; Amber, W.; Beller, M.; Chen, H.; Hartung, J.; Kanawanami, Y.; Lubben, D.; Manoury, E.; Ogino, Y.; Shibata, T.; Ukita, T. *J. Org. Chem.* **1991**, *56*, 4585-4588. Kolb, H. C.; VanNieuwenhze, M. S.; Sharpless, K. B. *Chem. Rev.* **1994,** *94*, 2483-2547.

Capítulo III

Engenharia de Citocromo $P450_{Bm3}$ para desmetilação regiosseletiva de substratos volumosos

O material desse capítulo está em: Lewis, J. C., MANTOVANI, Simone Moraes, Fu, Y., Snow, C. D., Komor, R. S., Wong, C., Arnold, F. H. “Combinatorial Alanine Substitution Enables Rapid Optimization of Cytochrome P450BM3 for Selective Hydroxylation of Large Substrates.” ChemBioChem, v.11, p.2502 - 2505, 2010.

4 Engenharia de Citocromo P450Bm3 para desmetilação regiosseletiva de substratos volumosos

4.1 Engenharia de proteínas

Até o presente momento foram expostas estratégias de descobrimento e aplicação de novos biocatalisadores em transformações de substratos orgânicos. Apesar das inúmeras vantagens, nem todas as enzimas encontradas na natureza são apropriadas para resolver problemas sintéticos específicos e nem sempre apresentam propriedades de interesse.

Até o início da década de 90, essas limitações eram superadas ou por triagem de biocatalisadores alternativos por modificações do sistema reacional.[90] Porém, com o avanço das técnicas de clonagem, expressão e caracterização de enzimas, surgiram estratégias complementares como mutagênese sítio-dirigida, para enzimas cujo gene codificante e a estrutura tridimensional são conhecidas, ou evolução dirigida.

4.1.1 Desenho racional

O desenho racional de enzimas é baseado no conhecimento da estrutura e mecanismo reacional da enzima de interesse combinado a métodos teóricos de físico-química com bioinformática, a fim de predizer os efeitos de certas mutações em uma dada enzima. Em seguida, aplicam-se ferramentas de mutagênese sítio-dirigida, que consistem na habilidade de criar essas mutações pré-definidas no DNA. As técnicas envolvidas nesse processo vêm sendo muito utilizadas desde o prêmio Nobel de química em 1993, concedido a Michael Smith pelo seu desenvolvimento, [91] para aumento de termoestabilidade, criação de novas funções catalíticas e aumento de estereosseletividade.[92]

O método básico para mutagênese sítio-dirigida envolve uma reação de PCR em que um dos *primers* (oligonucleotídeos) empregados no processo de amplificação do DNA de interesse contenha a mutação. Assim, a extensão da cadeia de

---

[90] Bornscheuer, U. T.; Pohl, M. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2001**, *5,* 137-143.
[91] Smith, M. *J. Biol. Chem.* **2006**, *181*, e31-e33.
[92] Brustad, E. M.;Arnold, F. H. *Curr. Opin.Chem.Biol*. **2010**, *15*, 1–10.

oligonucleotídeos nas duas direções leva à síntese do DNA contendo a mutação desejada no produto.[93]

Um método geral utilizado para diversas aplicações como mutações pontuais, remoção de sequências, construção de domínios e fusão de genes é a mutagênese por *Overlap Extension PCR* (SOE-PCR). Esse método consiste primeiramente na síntese de fragmentos (**Reação 1, Figura 16-A**) utilizando dois *primers* complementares para cada mutação (*primers* **C** e **D Figura 16-A**) e dois *primers* que se anelem às sequências flanqueadoras do DNA molde e fora dos pontos de mutação (*primers* **A** e **B Figura 16-A**). Em seguida esses fragmentos, que apresentam sobreposição parcial da sequência de oligonucleotídeos, são reunidos em uma segunda reação de PCR para a construção do gene ou domínio completo (**Reação 2, Figura 16-A**).[93]

Em seguida, para eliminar o DNA molde, ou seja, o DNA que não contenha a mutação, é importante purificar o produto de PCR a fim de certificar que todo o DNA obtido seja produto da amplificação. Nesse caso, pode ser feito o tratamento com a enzima de restrição Dpn1 capaz de clivar sítios de DNA metilado, ou seja, DNA originado da replicação celular. A purificação também pode ser feita por gel de agarose, pois o DNA molde tem peso molecular muito superior ao segmento amplificado.

4.1.2 Evolução dirigida

Em contraste ao desenho racional, as estratégias de evolução dirigida não requerem necessariamente o conhecimento prévio da estrutura e mecanismo da enzima de interesse. A evolução dirigida de proteínas foi realizada primeiramente por Eigen e Gardiner em 1984,[94] e baseia-se na mutagênese randômica para gerar uma biblioteca de enzimas mutantes a partir de gene pai (*parent*) e subsequente identificação das variantes com o fenótipo desejado, que pode então ser utilizado como pai para outros ciclos de mutagênese e triagem (**Figura 17**).

---

[93] Adair, J. R.; Wallace, T. P. *Molecular Biomethods Handbook.* Rapley, R.; Walker, J. M.; eds. Humana Press: New Jersey, 1998, cap 28.
[94] Eigen, M.; Gardiner, W. *Pure Appl. Chem.*,**1984**, *56*, 967-978.

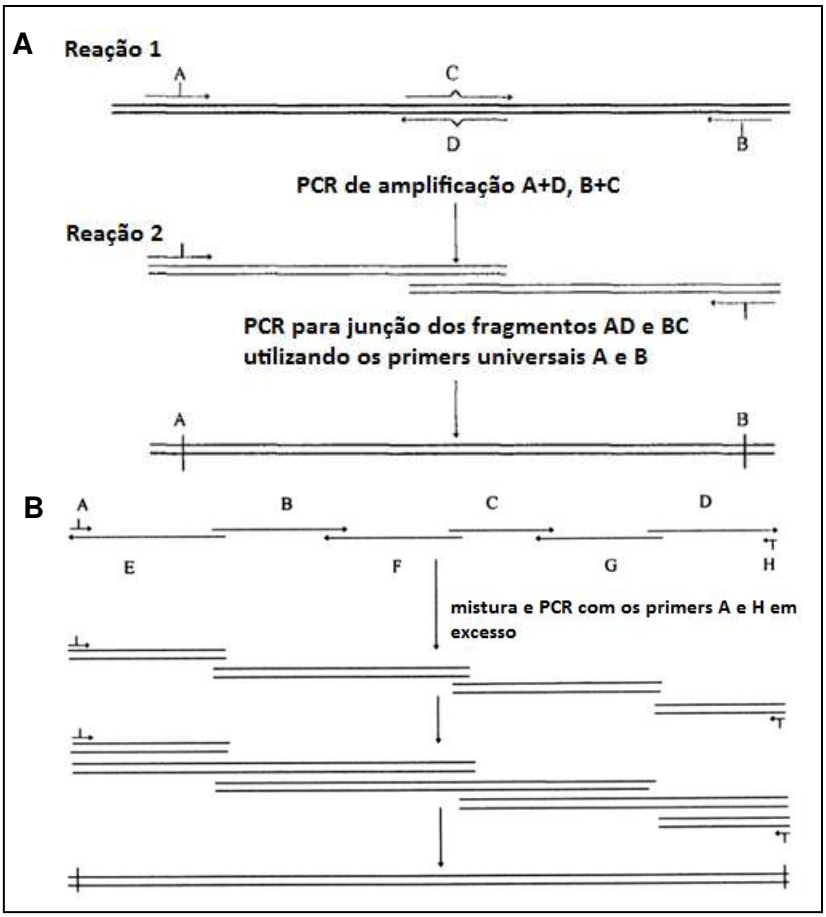


Figura 16: A- Esquema geral de representação de SOE-PCR onde os *primers* C e D carregam a mutação de interesse. **B**- SOE-PCR para construção de múltiplas mutações. Adaptado de Adair e Wallace.[93]

Em geral, as estratégias de evolução dirigida utilizam o fato de que as enzimas possuem atividade promíscua que podem ser melhoradas com algumas mutações. Inúmeros exemplos bem sucedidos mostram que as proteínas podem adaptar-se a novas funções ou ambientes como termoestabilidade, escopo de substratos, enantiosseletividade ou resistência a solventes através de poucas mutações introduzidas por basicamente três estratégias: mutagênese randômica do gene completo, recombinação e mutagênese de saturação.[95]

[95] Reetz, M. T. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 2–39.

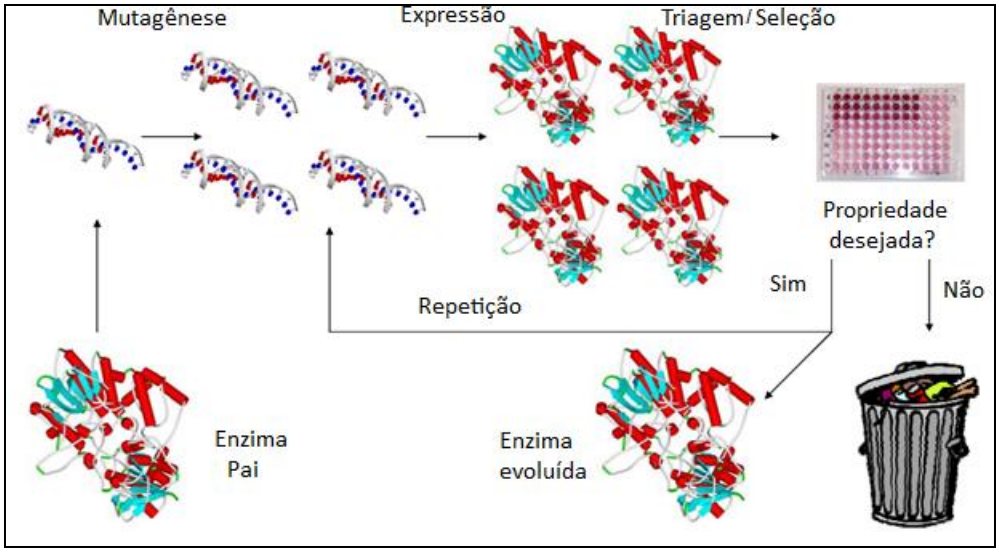


Figura 17: Esquema geral de evolução dirigida de biocatalisadores. Adaptado de Reetz.[95]

4.1.2.1 Mutagênese randômica

A mutagênese randômica do gene completo consiste na substituição de amino ácidos ao longo do gene codificante de uma enzima que apresente ao menos uma atividade residual no processo de interesse. A técnica mais comumente empregada para essa finalidade é conhecida como *error-prone* PCR que consiste em reações de PCR com altas concentrações Mg^{2+} ou Mn^{2+} a fim de estabilizar pares de bases não complementares do DNA e estimular erros na ação da *Taq* polimerase, geralmente de baixa fidelidade, gerando então DNA contendo mutações aleatórias. Esse tipo de metodologia é bastante aplicado e tem uma vantagem em relação ao desenho racional, pois muitas vezes revela incremento na atividade de interesse por mutações em regiões distantes do sítio-ativo. [96]

4.1.2.2 Mutagênese de saturação

O sucesso das técnicas de evolução dirigida por mutagênese randômica baseia-se na alta diversidade gerada. Entretanto, como o sucesso dessa técnica depende de

[96] Cirino, P. C.; Mayer, K. M.; Umeno, D.*Directed Evolution Library Creation: Methods and Protocols.*Arnold, F. H. A.; Georgiou, G.; eds. Humana Press: New Jersey, 2003, cap 1.

posterior triagem, a criação de bibliotecas de maior qualidade e menor número de variantes é bastante interessante.

Uma alternativa sofisticada é a criação de bibliotecas focadas, ou seja, os sítios a serem randomizados são previamente selecionados com base na estrutura ou sequência, resultando em bibliotecas menores de alta qualidade.[97] A metodologia conhecida como mutagênese de saturação consiste na randomização de uma ou mais posições simultaneamente por todos os outros 20 aminoácidos canônicos, permitindo assim, a identificação de interações cooperativas, enquanto os efeitos antagônicos são eliminados durante o processo de triagem. Adicionalmente, as melhores variantes escolhidas dessas bibliotecas podem ser posteriormente recombinadas, a fim de ampliar o efeito sinergístico de mutações benéficas.[98]

4.1.2.3 Recombinação

As técnicas citadas anteriormente baseiam-se no acúmulo de mutações pontuais, entretanto, uma vez que a maioria das mutações é deletéria, a probabilidade de uma variante reter seu enovelamento e função decresce exponencialmente com o número de substituições randômicas. [99]

Assim, múltiplas mutações de uma só vez são de grande importância para o melhoramento das propriedades das enzimas, e uma alternativa utilizada pela natureza para criar mutações múltiplas é a recombinação, de proteínas homólogas de ocorrência natural, a fim de criar diversidade genética dentro de sequências de algumas proteínas. Geralmente, as mutações adquiridas por recombinação geram um maior número de proteínas funcionais que as mutações randômicas, sendo que, proteínas quiméricas podem diferir em centenas de mutações da proteína pai e ainda permanecer funcional.

Exemplos de técnicas de recombinação são o embaralhamento de genes ou *DNA shuffling*[100]*,* cuja recombinação dependente de homologia entre as proteínas pais, e o SCHEMA, criado por Arnold e colaboradores, que se baseia na recombinação de

---

[97] Reetz, M. T.; Kahakeaw, D.; Lohmer, R. *ChemBioChem.* **2008**, *9*, 1797–1804.
[98] Chica, R. A.; Doucet, N.; Pelletier, J. N. *Curr. Opin. Biotech.* **2005**, *16*, 378–384.
[99]. 30–50% das mutações pontuais são bastante deletérias, 50–70% são neutras ou pouco prejudiciais, e somente 0,01–1% são benéficas.Romero, P. A;. Arnold, F. H. *Nat. Rev. Mol. Cell Bio.* **2009,** *10*, 866-876.
[100] Stemmer, W. P. C. *Nature,* **1994***, 370*, 389 – 391.

enzimas de baixo grau de homologia, porém conserva alguns elementos dos genes pais a fim de gerar alto grau de recombinação garantindo sequências funcionais.[101,]

O SCHEMA é uma metodologia computacional que permite a identificação de blocos de sequências cujas perturbações estruturais sejam minimizadas quando recombinadas em proteínas quiméricas (**Figura 18**). Para isso, são utilizadas informações estruturais para identificar a interação entre pares de resíduos de amino ácidos que possam ser interrompidas com baixo custo energético, definido como *E*. Vários estudos têm mostrado que bibliotecas de quimeras criadas com valores de E baixos são mais suscetíveis a manter o enovelamento e função.[102]

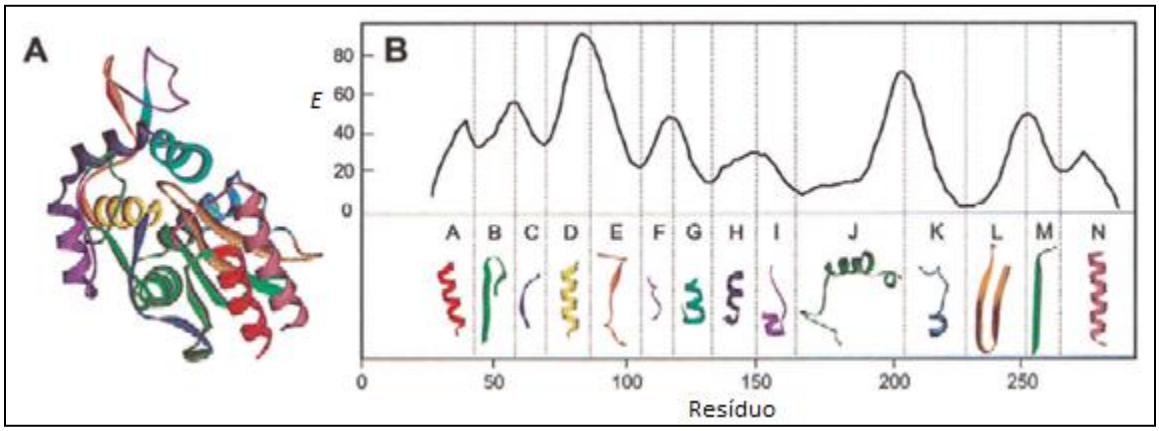


Figura 18: Recombinação entre duas β-lactamases TEM-1 e PSE-4. **A**- mapeamento dos módulos recombinados na estrutura da lactamase TEM-1. **B**- Perfil de ruptura para recombinação de lactamases usando as coordenadas estruturais de TEM-1.[103]

Enfim, desde a década de 90, várias metodologias têm sido desenvolvidas para ampliar e facilitar o melhoramento de propriedades que limitem o emprego de biocatalisadores para fins industriais. Um exemplo bem sucedido da aplicação conjunta de diferentes técnicas e de vários ciclos de mutagênese é a especialização da atividade de citocromo $P450_{Bm3}$, que catalisa a hidroxilação de alcanos de cadeia longa (C12 a C 20), para oxidação de propano (**Tabela 17** e **Figura 19**).[104]

---

[101] Otey, C. R.; Landwehr, M.; Endelman, J. B.; Hiraga, K.; Bloom, J. D.; Arnold, F. H. *PLoS Biol.* **2006**, *4*, 789-798.
[102] Li, Y.; Drummond, D. A.; Sawayama, A. M.; Snow, C. D.; Bloom, J. D.; Arnold, F. H. *Nat. Biotechnol.* **2007**, *25,* 1051-1056.
[103] Hiraga, K.; Arnold, F. H. *J. Mol. Biol.* **2003**, *330*, 287–296.
[104] Fasan, R.; Meharenna, Y. T.;Snow, C. D.; Poulos, T. L.; Arnold, F. H. *J. Mol. Biol.* **2008,** 28, 1069-1080.

Tabela 17: Resumo das etapas de evolução dirigida e substituições de amino ácidos em variantes de $P450_{Bm3}$ para oxidação de alcanos menores. Adaptado de Fasan *et. al.* [104]

Variante	Substrato alvo	Método de mutagênese	Substituições no domínio heme
139-3	Octano	epPCR / recombinação	V78A, H138Y, T175I, V178I, A184V, H236Q, E252G, R255S, A290V, A295T, L353V
J	Propano	*DNA shuffling*	Y138H, I178V, F205C, S226R, T295A
35E11	Propano	Saturação / Recombinação	R47C, A78F, A82S, K94I, P142S, A328F
ETS8	Estabilidade - Propano	Sítio dirigida	L52I, I366V
19A12	Propano	Randômica /	L188P
11-3	Propano	Saturação	A74S
1-3	Propano	Recombinação	V184A
$P450_{PMO}$	Propano	Saturação / recombinação / Sítio dirigida	A74E, S82G, A184V, G443A

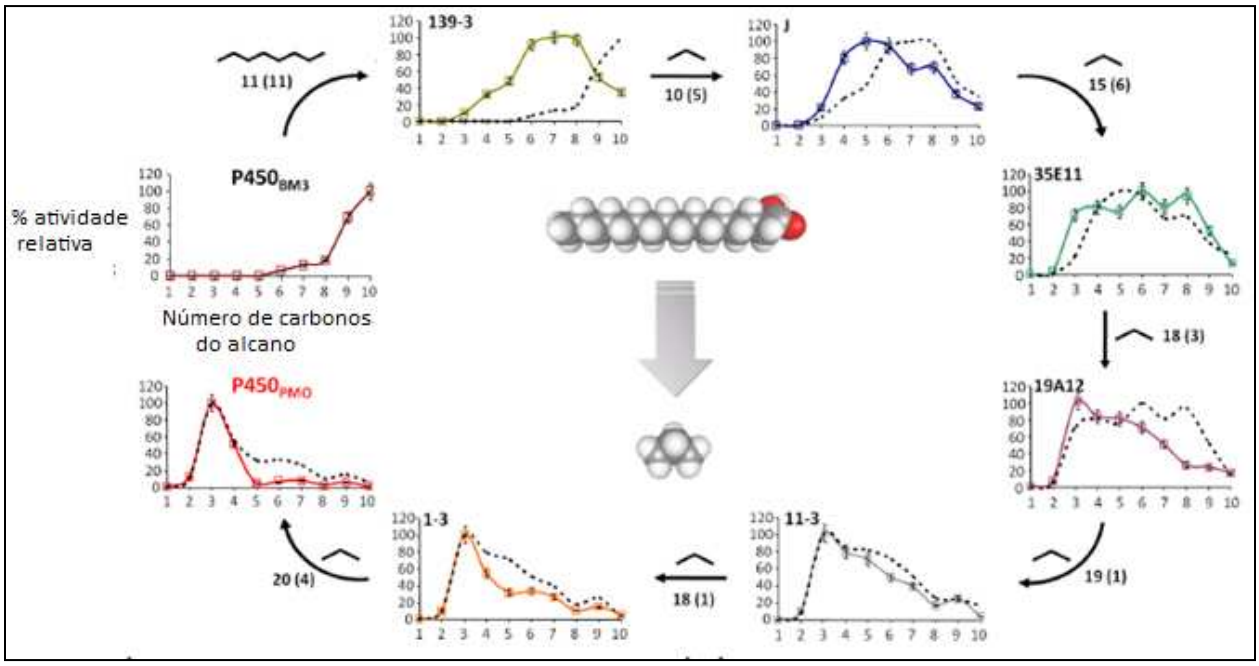


Figura 19: Perfil da especificidade do substrato e dos intermediários da evolução de uma P450 propano monoxigenase ($P450_{PMO}$) a partir de uma hidroxilase de ácidos graxos de cadeia longa $P450_{Bm3}$.[104]

Esses estudos de evolução dirigida permitem também caracterizar os intermediários evolutivos dessas novas propriedade o que tem não somente ampliado a compreensão da relação entre sequência e função, como têm mostrado que mutações neutras podem definir a etapa para futuras mutações. Mutações pontuais podem incrementar as propriedades funcionais de interesse ou através de mutações benéficas sequenciais ou por mutações neutras. Essas mutações neutras, apesar de não influenciarem na função, podem ter efeito na estabilidade da proteína e assim aumentar sua tolerância para futuras mutações benéficas.[105] Elas podem também gerar variantes funcionalmente promiscuas que não estão necessariamente sob pressão de seleção, mas que podem tornar-se variantes de partida para evolução adaptativa de novas funções.[106]

Além disso, deve-se considerar também que algumas proteínas são mais facilmente adaptáveis à novas funções que outras, são chamadas proteínas mais "evoluíveis" (*evolvable*). Um indício dessa "evolutividade" é a diversidade funcional natural de algumas superfamílias, pois indica que essas proteínas tem uma maior plasticidade estrutural para suportar modificações na sequência e gerar variantes com novas propriedades. Entretanto, a base estrutural e mecanismos associados à facilidade de adaptação de certas enzimas são apenas especulativos.[107] Dentre as famílias de proteínas que se destacam por essa propriedade estão as imunoglobinas, HIV proteases, chaperonas, fosfatases alcalina, glutationa transfrases e citocromos P450.[108,109]

---

[105] O efeito de uma mutação depende a estabilidade da proteína. Proteínas que apresentam estruturas estavéis podem enovelar e serem funcionais após uma mutação, porém proteínas pouco estáveis podem falhar no enovelamento e por isso serem não-funcionais. Mutações funcionalmente benéficas mas desestabilizantes são toleradas somente por uma proteína que acumulou previamente uma ou mais substituições estabilizantes. Bloom, J. D.; Arnold, F. H. *Proc. Nat. Acad. Soc.* **2009**, *106*, 9995-10000.

[106] F.H. Arnold. Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology, Volume LXXIV. 2009 Cold Spring Harbor Laboratory Press 978-087969870-6.

[107] Jung, S. T.; Laucli, R.; Arnold, F. H. *Curr. Opn. Biotech.* **2011**, *22*, 1-9.

[108] Dougherty, M. J.; Arnold, F. H. *Curr. Opin. Biotech.* **2009**, *20*, 486–491.

[109] Nobeli, I.; Favia, A. D.; Thornton, J. M. *Nat. Biotechnol.* **2009**, *27*, 157-167.

4.1.3 Citocromo P450

Citocromo P450 (EC 1.14.14.1) é uma superfamilia de enzimas pertencentes a classe das monoxigenases que catalisam a clivagem redutiva de oxigênio molecular (O_2) gerando como produto um composto orgânico oxigenado e uma molécula de água. Essas enzimas são biossinteticamente essenciais para sintese de esteróides, eicosanoides e prostaglandinas, além de apresentarem um importante papel na defesa de organismos contra xenobióticos, uma vez que a oxigenação (hidroxilação ou epoxidação) gera compostos mais polares e que são mais facilmente eliminados do organismo.[110]

Atualmente são conhecidas mais de 1000 sequências das enzimas pertencentes a superfamília P450, sendo que a maioria apresenta peso molecular entre 40-60 kDa com alta similaridade na topologia a na orientação da estrutura secundária. As P450s cujas sequências de aminoácidos são semelhantes geralmente apresentam alta similaridade na seletividade do substrato, porém a maioria das enzimas pertencentes a essa superfamilia tem identidade inferior a 15%, o que revela que a natureza tem mantido o enovelamento geral e o sítio ativo heme enquanto modificava o restante da sequência para obter diversidade para diferentes substratos e parceiros redox.[107]

4.1.3.1 Ciclo catalítico

Na ausência do substrato, o ferro heme (Fe^{3+}) permanece em uma configuração eletrônica de *spin* baixo em que o ferro está hexacoordenado aos quatro atomos de nitrogênio do grupo pirrol nas posições equatoriais, e a um átomo de enxofre, pertencente ao resíduo de cisteína, e um ligante, como água, em axial (**Esquema 17-1**).

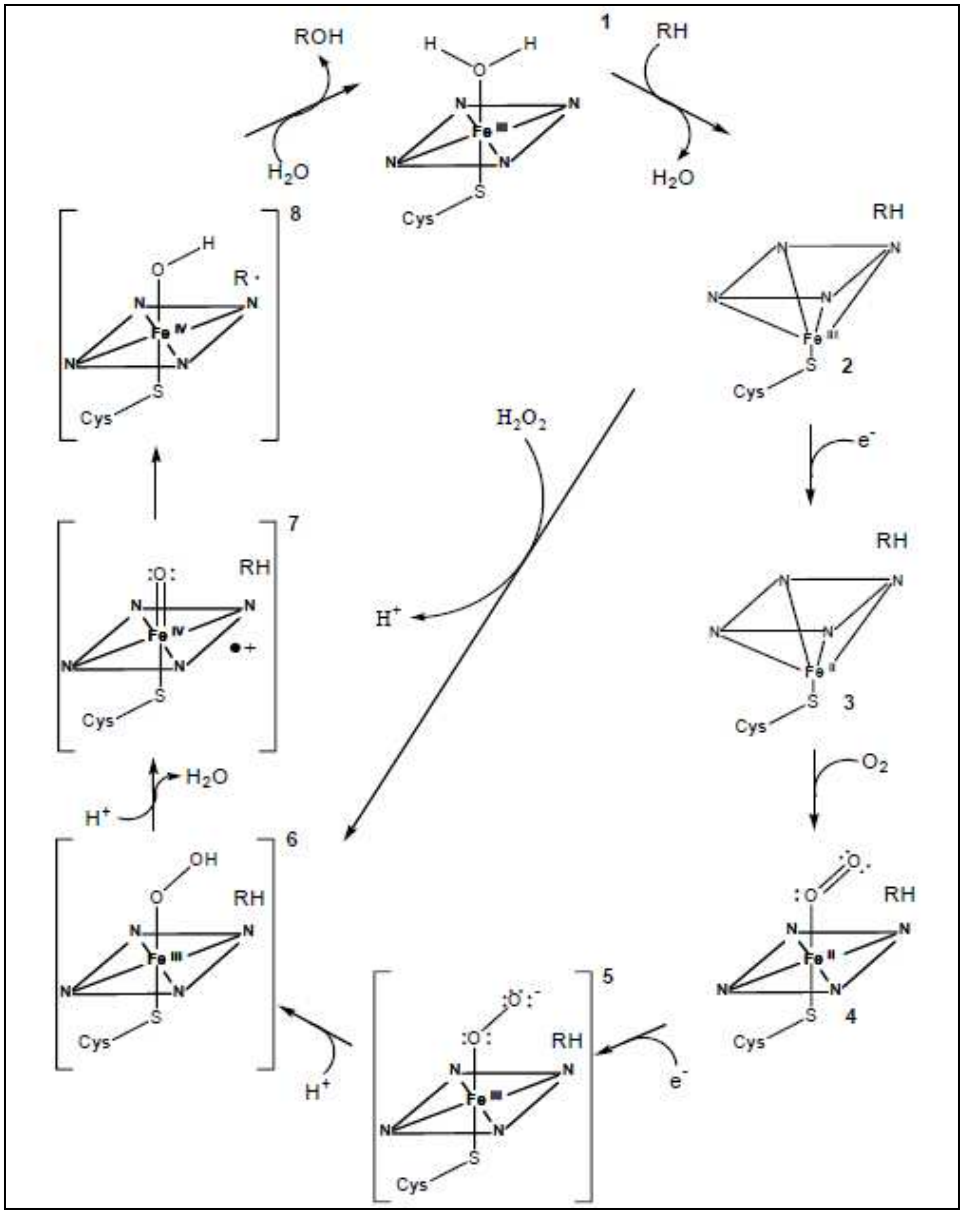
O ciclo catalítico das P450s inicia-se com a ligação do substrato, que induz a saída da molécula de água fracamente ligada ao Fe^{3+} e leva à mudança no estado de spin do metal de *spin baixo* para *spin* alto, em que o Fe^{3+} está pentacoordenado e fora do plano do anel profirinico (**Esquema 17-2**). Essa mudança no estado de spin também

[110] Munro, A. W.; Leys, D. G.; McLean, K. J.; Marshall, K. R.; Ost, T. W. B.; Daff, S.; Miles, C. S.; Chapman, S. K.; Lysek, D. A.; Moser, C. C.; Page, C. C.; Duttons, P. L. *Trends Biochem. Sci.,* **2002**, *27*, 250-257.

eleva o potencial de redução do Fe^{3+} em aproximadamente 150 mV, o que ativa a transferência de um elétron derivado da oxidação de NAD(P)H pela redutase associada para formação do complexo ferroso (**3**). [111]

Em seguida, oxigênio molecular se liga ao Fe^{2+} gerando a espécie oxi-P450 (**4**) que é capaz de aceitar um segundo elétron para gerar o ânion peróxido férrico (**5**). Essa transferência seguida da rápida protonação de **5**, gera o complexo hidroperóxido férrico (**6**) que sofre clivagem heterolitica da ligação O-O e leva à formação de uma molecula de água e do cátion radical altamente reativo [Fe(V)=O] (**7**), também conhecida como Composto I. Dados cristalográficos sugerem a posterior formação de um intermediário eletrofílico oxiferril (**7**), que ataca então o substrato gerando o produto hidroxilado e a enzima no seu estado original. [112] Em algumas P450s, a reação com peróxido de hidrogênio pode ser observada, onde o Fe^{3+} pode ser diretamente hidroxilado (**Esquema 17**).

[111] Montellano, P. R. O. *Cytochrome P450: strucuture, mechanims and biochemistry*, **2005**, Spring: New York.
[112] Groves, J. T. *Proc. Nat. Acad. Soc.* **2003**, *100*, 3569-3574.



Esquema 17: Ciclo catalitico de citocromo P450. [113]

O nome citocromo P450 deve-se à forte banda de absorção em 450 nm que é decorrente da diferença de absorção entre a forma reduzida livre e a forma reduzida ligada ao monóxido de carbono (CO) (**Figura 20**). Adicionalmente, a ligação com CO na presença de P450 biologicamente inativa, gera um espectro a 420 nm, que é uma

[113] Meinhold, P. *Engineering Cytochrome P450 Bm-3 for Selective Hydroxilation of Alkanes.* Teses-Caltech: Pasadena (EUA) 2005. Ener. M. E.; Lee, E. T.; Winkler, J. R.; Gray, H. B.; Cheruzel, L. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2010,***19*, 1-4.

propriedade bastante eficiente para detectar a proporção de variantes de citocromo P450 apropriadamente enoveladas.[114]

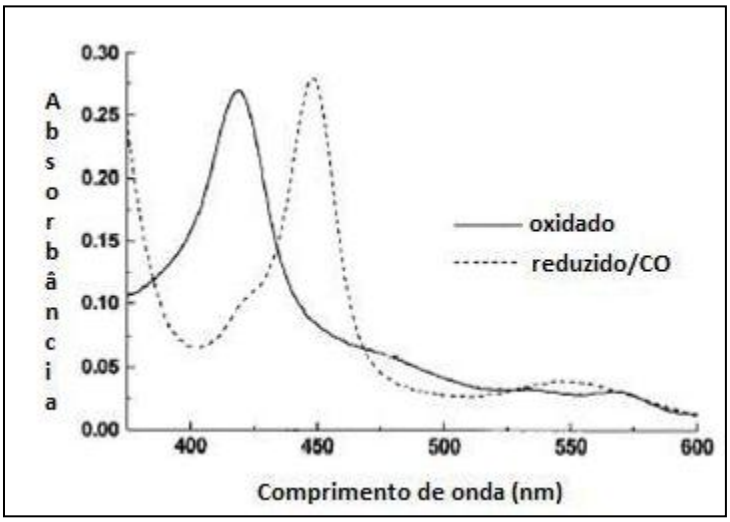


Figura 20: Propriedades espectrais de citocromo $P450_{Bm3}$. A linha sólida representa a forma oxidada e a linha pontilhada a forma reduzida quando ligada ao CO. Adaptado de Munro *et. al.*[110]

4.1.3.2 Oxidação do substrato

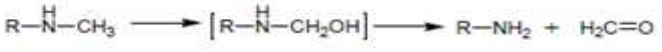
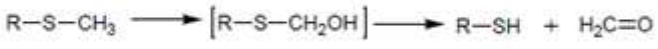
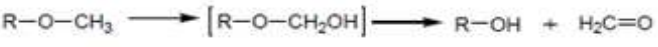
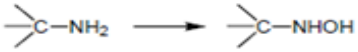
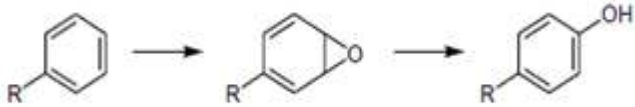
As monoxigenases do tipo citocromo P450 são capazes de catalisar uma grande variedade de reações como hidroxilação de alcanos, epoxidação de alcenos, hidroxilação e epoxidação de arenos, *N-, O- e S-* desalquilação, oxigenação de aminas e sulfetos, e até desalogenação (**Tabela 18**).

Entre todas as variedades de reações que podem ser catalisadas por citocromo P450, a capacidade de catalisar centros carbônicos não ativados é bastante atraente devido ao grande desafio químico em realizar hidroxilação seletiva de hidrocarbonetos.[115] Além disso, as reações de *N-, O-* desalquilação são bastante interessantes, pois permitem a desproteção quimio e regiosseletiva de derivados produtos naturais como alcalóides e esteróides de relevância tecnológica.

---

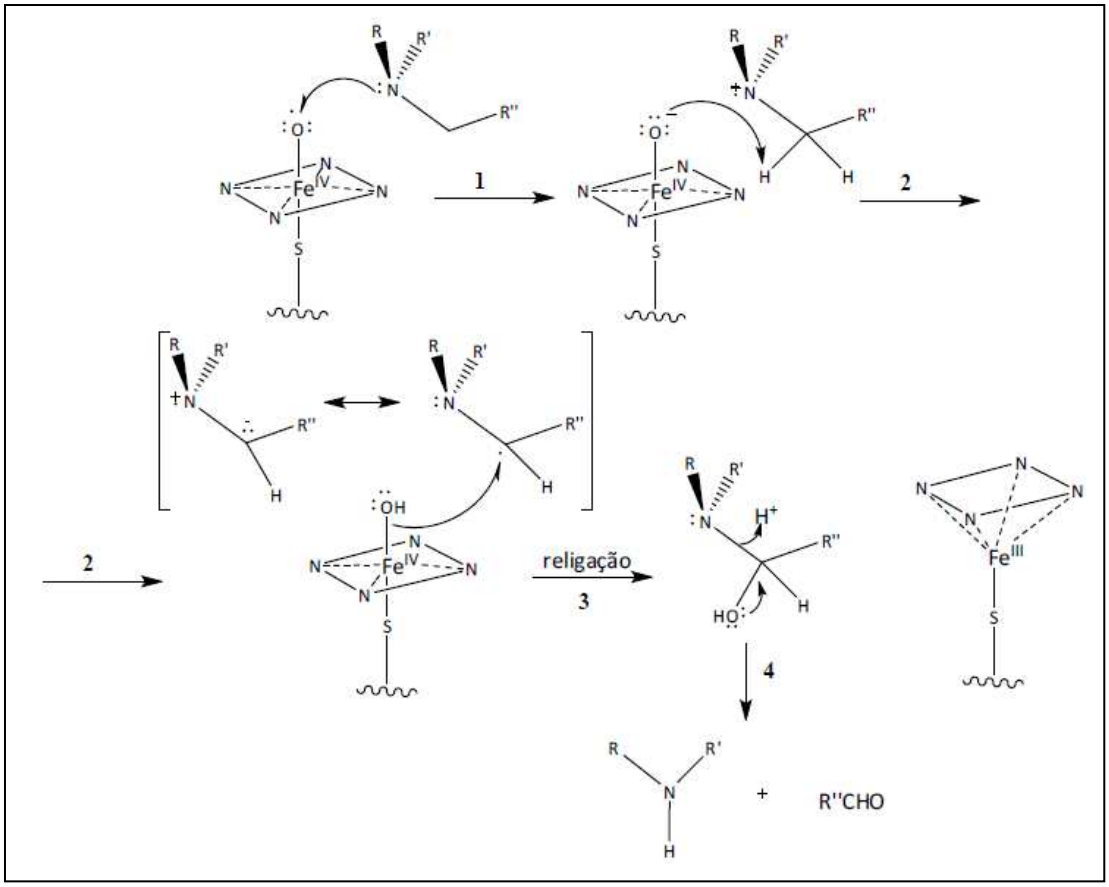
[114] Guengerich, F. P.; Martin, M. V.; Sohl, C. D.; Cheng, Q. *Nature Protoc.***2009**, ***4***, 1245-1251.
[115] Reagentes como permanganato e cromatos podem realizar esse tipo de transformação porém devem ser usados em condições drástica e não atuam seletivamente.

Tabela 18: Reações comumente catalisadas por citocromo P450. Adaptado de Silverman[116]

Hidroxilação de ligação C-H	
N-desalquilação	
S-desalquilação	
O-desalquilação	
N-hidroxilação	
N-oxidação	
S-oxidação	
Epoxidação de alcenos	
Epoxidação de arenos	
Desidrogenação	

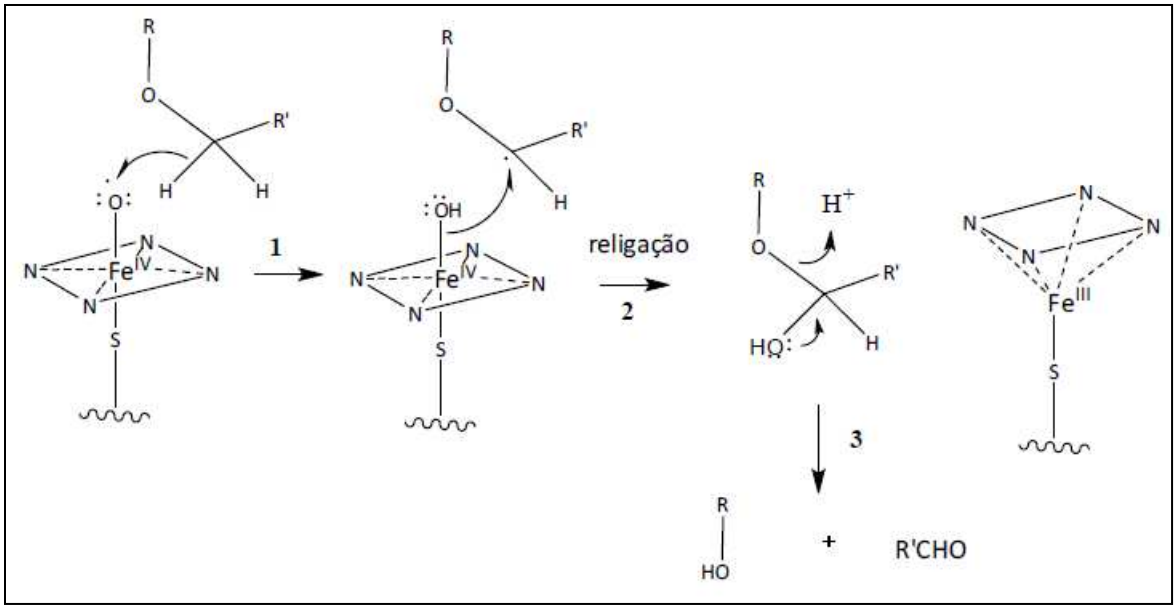
Vários mecanismos diferentes são considerados para transferência de oxigênio ao substrato. Para a desalquilação de aminas contendo hidrogênio α por exemplo, o mecanismo proposto sugere primeiramente a oxidação do heteroátomo pela perda de um único elétron gerando um cátion radical ($^{+\cdot}NR_2$) (**1**), cuja abstração do próton α é favorecida com relação à oxigenação do nitrogênio levando assim à formação de um α-radical (**2**). Nesse estágio a re-ligação do oxigênio resulta no aminoálcool (**3**) que se decompõe facilmente em uma amina e aldeído (**4**) (**Esquema 18**).[116]

[116] Silverman, R. B. The Organic Chemistry of Enzyme-Catalyzed Reaction. 2002, Elsevier: Orlando; cap. 4.



Esquema 18: Mecanismo para reações de *N*- desalquilação mediada por citocromo P450. Adaptado de Silverman.[116]

No caso da desalquilação de éteres, evidências para a oxidação de um elétron do heteroátomo não são observada, devido à alta eletronegatividade do oxigênio, e para isso dois tipos de mecanismo são propostos envolvendo a abstração de hidrogênio e religação de oxigênio, ou um mecanismo concertado. Assim, após a formação do hemiacetal (**2**) que, como os amino álcoois caracterizam-se por serem espécies pouco estáveis, levam à formação de álcool e aldeído (**3**) (**Esquema 19**).



Esquema 19: Mecanismo para reações de *O*- desalquilação mediada por citocromo P450. Adaptado de Silverman.[116]

4.1.3.3 Citocromo P450$_{Bm3}$

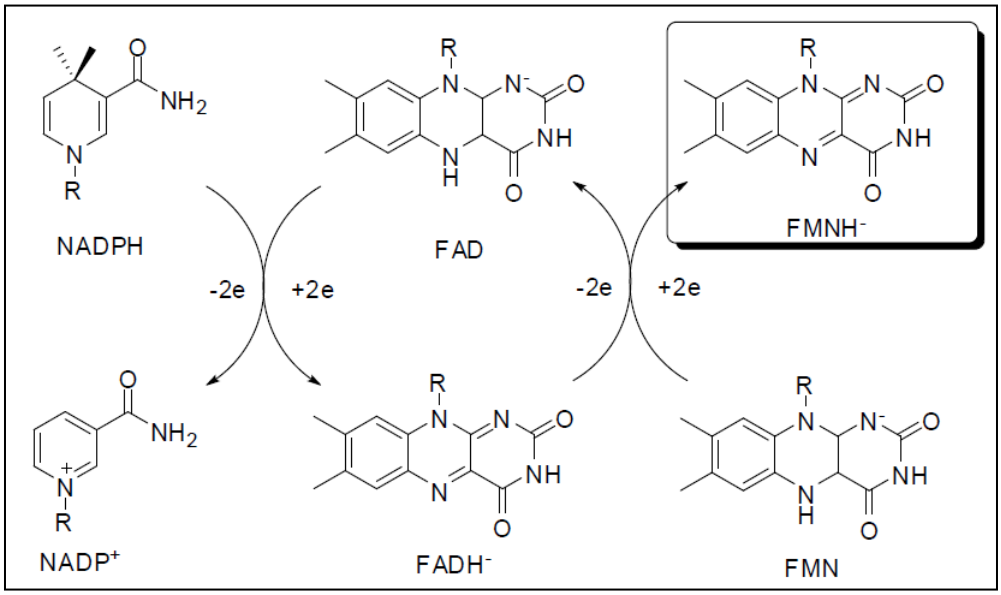
Apesar do mecanismo básico de transferência sucessiva de dois elétrons ao substrato ser comum a todas as enzimas citocromo P450, observa-se diferentes caminhos para a redução do sítio-ativo. Inicialmente, essas enzimas eram caracterizadas em duas classes distintas com relação ao parceiro redox, as P450s de procariotos (classe I) que recebem elétrons de uma ferrodoxina-redutase dependente de NAD(P)H (uma proteina ferro-enxofre), enquanto as P450s de eucariotos (classe II) são proteínas de membrana e recebem elétrons diretamente de uma redutase dependente de FAD e FMN geralmente conhecidas como NAD(P)H-citocromo P450 redutase. Entretanto, nas últimas décadas uma grande diversidade de parceiros redox foram identificados e que não se enquadram nas classes I e II.[117]

Um exemplo é a citocromo P450$_{Bm3}$ isolada de *Bacillus megaterium* que é uma enzima solúvel, facilmente expressa em *E. coli*, e adicionalmente apresenta o dominio NAD(P)H-redutase fusionado no C-terminal do domínio heme formando um único

[117] McLean, K.J.; Sabri, M.; Marshall, K.R.; Lawson, R.J.; Lewis, D.G.; Clift, D.; Balding, P.R.; Dunford, A.J.; Warman, A.J.; McVey, J.P.; Quinn, A.M.; Sutcliffe, M. J.; Scrutton, N. S.; Munro A.W. *Biochem. Soc. Trans.* **2005**, *33*, 796-801.

polipeptideo de 119 kDa, com o dominio heme encontra-se no N-terminal da enzima com cerca de 54 kDa e o dominio redutase no C-terminal com 64 kDa.[118]

O mecanismo catalítico do domínio redutase consiste na transferência de hidreto do NADPH ao FAD, gerando a forma hidroquinona reduzida por dois elétrons $FADH^-$. Em seguida, dois elétrons do $FADH^-$ são então transferidos ao FMN para formar a semiquinona cataliticamente ativa $FMNH^-$, que na etapa final transfere elétrons ao domínio heme, e sob condições aeróbicas atinge o estado de redução de quatro elétrons (**Esquema 20**).



Esquema 20: Mecanismo catalítico da porção redutase da $P450_{Bm3}$.[113]

[118] Narhi, L. O.; Fulco, A. *J. Biolog. Chem.* **1986,** *16*, 7160-7169.

4.2 Hipótese

Diante das propriedades interessantes da $P450_{Bm3}$, vários estudos aplicando técnicas de desenho racional e evolução dirigida tem permitido expandir o escopo de atividade dessa enzima criando catalisadores eficientes para diversas transformações oxidativas.

Recentemente o grupo da Profa. Arnold reportou o desenvolvimento de variantes dessa enzima capazes de catalisar a desmetilação e desmetoxidesmetilação regiosseletiva de monossacarideos.[119] Nesse estudo observou-se uma limitação da atividade enzimática frente a substratos volumosos, como por exemplo o grupo MOM em hexoses. Essa mesma limitação foi observada para outros substratos como alcalóides e esteróides sendo racionalizado que provavelmente a forma e o tamanho desses substratos excediam a a capacidade do sítio-ativo da enzima.

Uma vez que mutações dentro do sitio ativo da $P450_{Bm3}$ são raramente encontradas por mutagênese randômica do gene completo, e que para gerar um grande número de substituições é necessário avaliar um grande número de variantes com baixa atividade. A aplicação de estratégia semi-racional baseada na estrutura da enzima poderia permitir a superação dessa limitação.

[119]Lewis, J. C.; Bastian, S.; Bennett, S. C.; Fu, Y.; Mitsuda, Y.; Chen, M. M.; Greenberg, W. A.; Wong, C. H.; Arnold, F. H. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2009**, *106*, 16550–16555.

4.3 Objetivos específicos

Os objetivos dessa etapa do trabalho foram criar variantes de citocromo $P450_{Bm3}$ para desmetilação regiosseletiva de substratos volumosos:

1- Construção e análise da biblioteca 1 pela substituição combinatória dos resíduos volumosos do sítio ativo da variante termoestavél 9-10A F87V TS por alanina para desmetilação seletiva de substratos volumosos.

2- Construção e análise da biblioteca 2 pela substituição combinatória dos resíduos do canal de entrada da variante 5F9 L181A L437A por alanina para desmetilação seletiva de substratos volumosos.

3- Melhoramento da atividade oxidativa da variante 8F11 L437A frente à esteróides por epPCR.

4.4 Resultados e discussões

4.4.1 Seleção da variante pai

A triagem das variantes de $P450_{Bm3}$ pertencentes ao laboratório da Profa. Arnold permitiu identificar a variante 9-10A com atividade frente ao substrato α–1,2,3,4-tetrametoximetilxilose (**35**). Essa variante, cujo tempo de meia vida a 50 °C é de 3 ± min, foi então otimizada por evolução dirigida para a formação da variante termoestável 9-10A F87V TS (tempo de meia vida a 50 °C de 136 ± 7 min) após seis mutações na sequência.[120]

4.4.2 Seleção dos resíduos de aminoácidos candidatos à mutagênese

Primeiramente, foram calculadas as estruturas dos confômeros mais estáveis dos substratos de interesse utilizando-se o programa Omega.[121] Esses confôrmeros foram então colocados no sítio ativo do modelo da 9-10A F87V TS de maneira que, os grupos metoxila estivessem orientados com a geometria do estado de transição proposto para reações catalisadas por P450.[122] Essa etapa do trabalho foi executada pelo Dr. Cristopher D. Snow.

A inspeção do conjunto das possíveis conformações do estado de transição, de onde foram eliminadas as possíveis conformações do substrato que se chocavam com o esqueleto da enzima, permitiu identificar oito resíduos do sítio ativo (K69, L75, M177, L181, T260, I263, T268 e L437) e nove resíduos do canal de entrada (L17, L20, V26, R47, Y51, L75, V87, M177, L188) da citocromo $P450_{Bm3}$ 9-10A F87V TS (**Figura 21**).

[120] Trabalho de doutorado de Russel Komor.
[121] Bostrom, J. Greenwood, J. R.; Gottfries, J.; *J. Mol. Graphics Modell.* **2003**, *21*, 449-462.
[122] Ryderberg, P.; Olsen, L.; Norrby, P. O.; Ryde, U. *J. Chem. Theory Compt.* **2007**, *3*, 1765-1773.

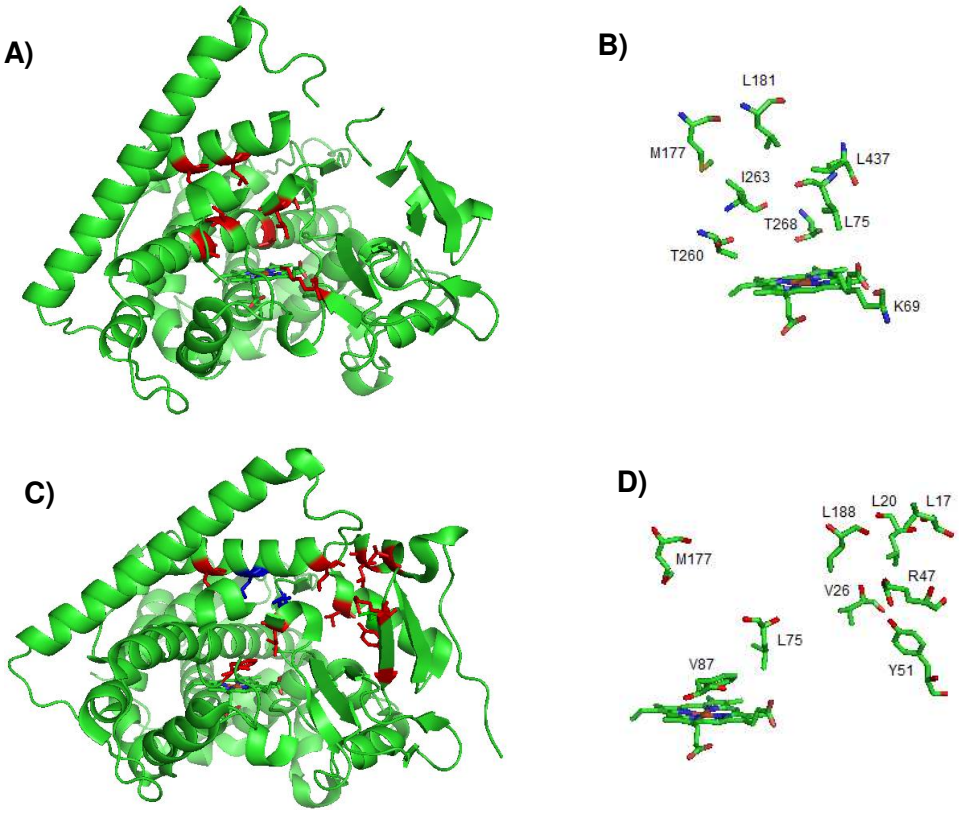


Figura 21: A) Representação do domínio heme do tipo selvagem do citocromo $P450_{Bm3}$ com os resíduos K69, L75, M177, L181, T260, I263, T268 e L437 do sítio ativo destacados em vermelho**. B)** Posições relativas dos resíduos selecionados para mutagênese em relação ao sítio ativo do tipo selvagem da citocromo $P450_{Bm3}$. **C)** Representação do domínio heme do tipo selvagem do citocromo $P450_{Bm3}$ com os resíduos L17, L20, V26, R47, Y51, L75, V87, M177, L188 do canal de entrada destacados em vermelho. **D)** Posições relativas dos resíduos selecionados para mutagênese em relação ao canal de entrada do tipo selvagem da citocromo $P450_{Bm3}$

4.4.3 Substituição combinatória de alanina

A estratégia de substituição dos amino ácidos volumosos por alanina foi proposta para aumentar o volume da cavidade do sítio ativo e do canal de entrada, uma vez que a alanina possui somente uma metila na cadeia lateral ao carbono α, mas ainda conserva os ângulos diedricos do esqueleto da proteína, o que não poderia ser conseguido com glicina, por exemplo, que introduz uma grande flexibilidade ao esqueleto protéico. Além disso, a mutagênese combinatória não somente permitiria avaliar os efeitos das mutações individuais, como também permitiria identificar a

importância da combinação de resíduos relevantes à atividade entre todas as permutações de alanina dos resíduos escolhidos.[123,124]

Para a substituição combinatória de alanina foram utilizados oligonucleotídeos degenerados para aqueles resíduos de aminoácidos cujo códon pode ser substituídos por alanina alterando somente um nucleotídeo (**Tabela 19**). Para os demais aminoácidos foram utilizados mistura de *primers*, também na razão 1:1, para que todos os resíduos selecionados pudessem ser substituídos.

Tabela 19: Mutagênese combinatória de alanina[124]

Amino ácido	Substituição	Códon
Arg	Ala/Arg/Gly/Pro	(G/C)(G/C)T
Cys	Ala/Cys/Gly/Ser	(G/T)(G/C)T
Gly*	Ala/Gly	G(G/C)T
Leu	Ala/Leu/Pro/Val	(G/C)(C/T)T
Ile	Ala/Ile/Thr/Val	(A/G)(C/T)T
Phe	Ala/Phe/Ser/Val	(G/T)(C/T)T
Thr*	Ala/Thr	(A/G)CT
Val*	Ala/Val	G(C/T)T
Asn	Ala/Asn/Asp/Thr	(A/G)(A/C)C
Glu*	Ala/Glu	G(A/C)A
His	Ala/His/Asp/Pro	(G/C)(A/C)T
Lys	Ala/Lys/Glu/Thr	(A/G)(A/C)A
Pro*	Ala/Pro	(G/C)CA
Trp	Ala/Trp/Gly/Ser	(G/T)(G/C)G
Asp*	Ala/Asp	G(A/C)T
Gln	Ala/Gln/Glu/Pro	(G/C)(A/C)T
Tyr	Ala/Tyr/Asp/Ser	(G/T)(A/C)T
Met	Ala/Met/Thr/Val	(A/G)(C/T)G
Ser*	Ala/Ser	(G/T)CC

*Os aminoácidos marcados são aqueles que podem ser substituídos por primer degenerados.

4.4.4 Biblioteca 1 - substituição dos resíduos do sítio-ativo

A biblioteca combinatória de alanina dos resíduos do sítio ativo K69, L75, M177, L181, T260, I263, T268 e L437 foi construída por *site directed overlap extension* (SOE).

[123] Weiss, G. A.; Watanabe, C. K.; Zhong, A.; Goddard, A.; Sidhu, S. S. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2000**, *97*, 168950–168954.
[124] Morrison, K. L.; Weiss, G. A. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2001**, *5*, 302–307.

Primeiramente, foram construídos cinco fragmentos de A a E, sendo que para cada ponto de mutação foram feitas duas reações de PCR usando primers flanqueadores nas posições 5' and 3' perfeitamente complementares. Os fragmentos A a E resultantes foram então reunidos em outras duas reações de PCR distintas, gerando no PCR final o fragmento resultante do gene completo (**Figura 22**).

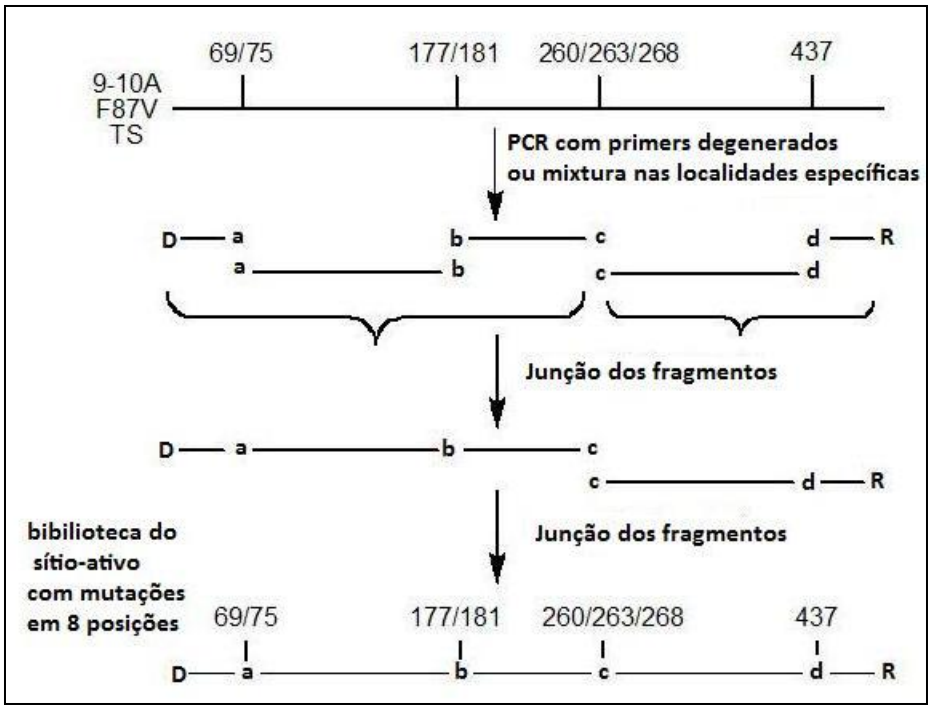


Figura 22. SOE PCR para construção da biblioteca 1. Primeiramente foram sintetizados cinco fragmentos contendo uma mistura de todas as possíveis substituições de alanina e posteriormente reunidos em duas etapas distintas de PCR.

A biblioteca de DNA com amino ácidos selecionados substituidos por alanina foi transformada em *E. coli* DH5α gerando uma biblioteca composta por um total de 767 colônias, que corresponde a uma amostragem de três vezes o tamanho teórico da biblioteca (3×2^8).

A qualidade da biblioteca foi avaliada através do sequenciamento de 1 % das variantes, que revelou incorporação de alanina em todos os sítios selecionados com uma média de 3,9 substituições por sequência, confirmando que a reação de PCR foi eficiente e levou à substituição de todos os resíduos selecionados. Adicionalmente, a

análise por ensaio de ligação de CO[125] indicou que 65% das $P450_{Bm3}$ variantes estavam apropriadamente enoveladas, sugerindo uma biblioteca de boa qualidade (**Figura 23**).

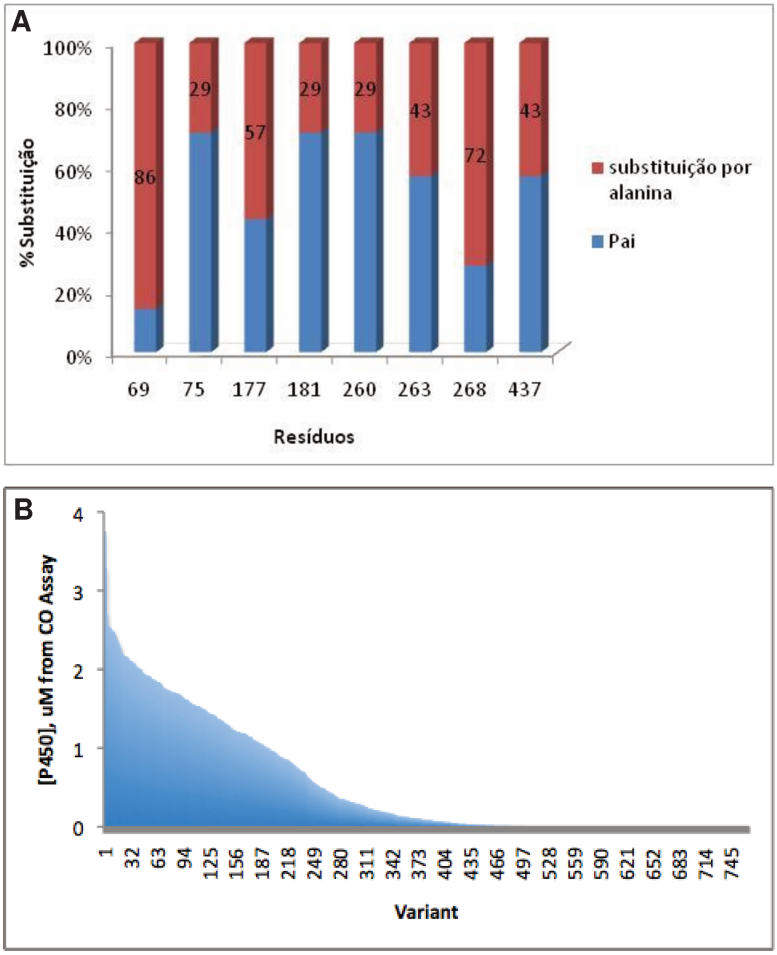


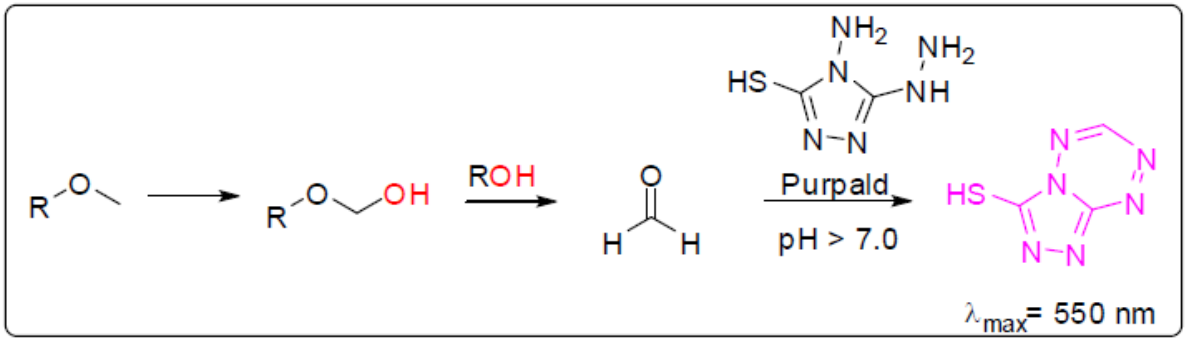
Figura 23: A)- Média de substituições de alanina por resíduo. **B)**- Perfil de ligação de CO da biblioteca do sítio ativo.

É importante enfatizar que a média de mutações observadas (3,9 / sequência) é consideravelmente alta para manter 65 % das variantes apropriadamente enoveladas. Esses dados condizem com a afirmação de que a maioria das mutações são desestabiblizantes da estrutura, e mutações que incrementam função mas não estão

[125] O grupo Heme é capaz de ligar-se a monóxido de carbono favorecendo a mudança conformacional no sítio-ativo levando a uma alta absorção a 450 nm quando comparada à espécie inativa, que absorve a 420 nm quando ligada à CO. Esse ensaio é uma maneira eficiente de detectar a proporção de variantes de citocromo P450 apropriadamente enoveladas.

relacionadas com a estabilidade são também desestabilizantes. [107] Assim, a utilização de uma variante pai termoestável permite que uma enzima aceite uma grande faixa de mutações enquanto ainda mantém a conformação propriamente enovelada.

A atividade funcional da biblioteca foi então analisada com substratos selecionados utilizando um ensaio colorimétrico que detecta a liberação de formaldeído, subproduto da oxidação dos grupos *O*-Me, *N*-Me e MOM.[126] Esse ensaio pode ser aplicado no formato de alto desempenho em microplacas de 96 poços utilizando as células lisadas e o reagente Purpald que permite detectar a 550 nm a presença de formaldeído em concentrações de 10 µM (**Esquema 21**).[127]



Esquema 21. Ensaio colorimétrico de Purpald em que a hidroxilação do substrato produz o éter dimetílico que se decompõe em álcool e formaldeído. O reagente Purpald reage então com o formaldeído para formar o composto roxo.

Foram selecionados substratos volumosos possuindo vários hetereoátomos metilados e pertencentes a diferentes classes de compostos para avaliar a reatividade dessa biblioteca (**Figura 24)**.

Os ensaios colorimétricos para detecção de atividade revelaram que a enzima pai, 9-10A F87V TS, apresenta uma atividade de 20 % em relação ao controle negativo para os substratos **35-38**, 30% frente ao alcalóide **39**, e nenhuma atividade para os demais substratos. Porém, inúmeras variantes apresentaram atividade 4 a 8 vezes superior a variante pai frente aos tioglicosídeos **35-38** e 2 a 4 vezes maior para os alcalóides **39** e **40**, revelando que o aumento da cavidade do sítio ativo por substituições de alanina aumentou a atividade oxidativa de substratos volumosos. Para

[126] Lewis, J. C.; Arnold, F. H. *Chimia* **2009**, *63*, 309-312.
[127] Hopps, H. B. *Aldrichimica Acta* **2000**,.*33*, 28-30.

o esteróide **41,** cuja proteína pai não apresentou atividade, foi identificada uma variante ativa (**Tabela 20**).

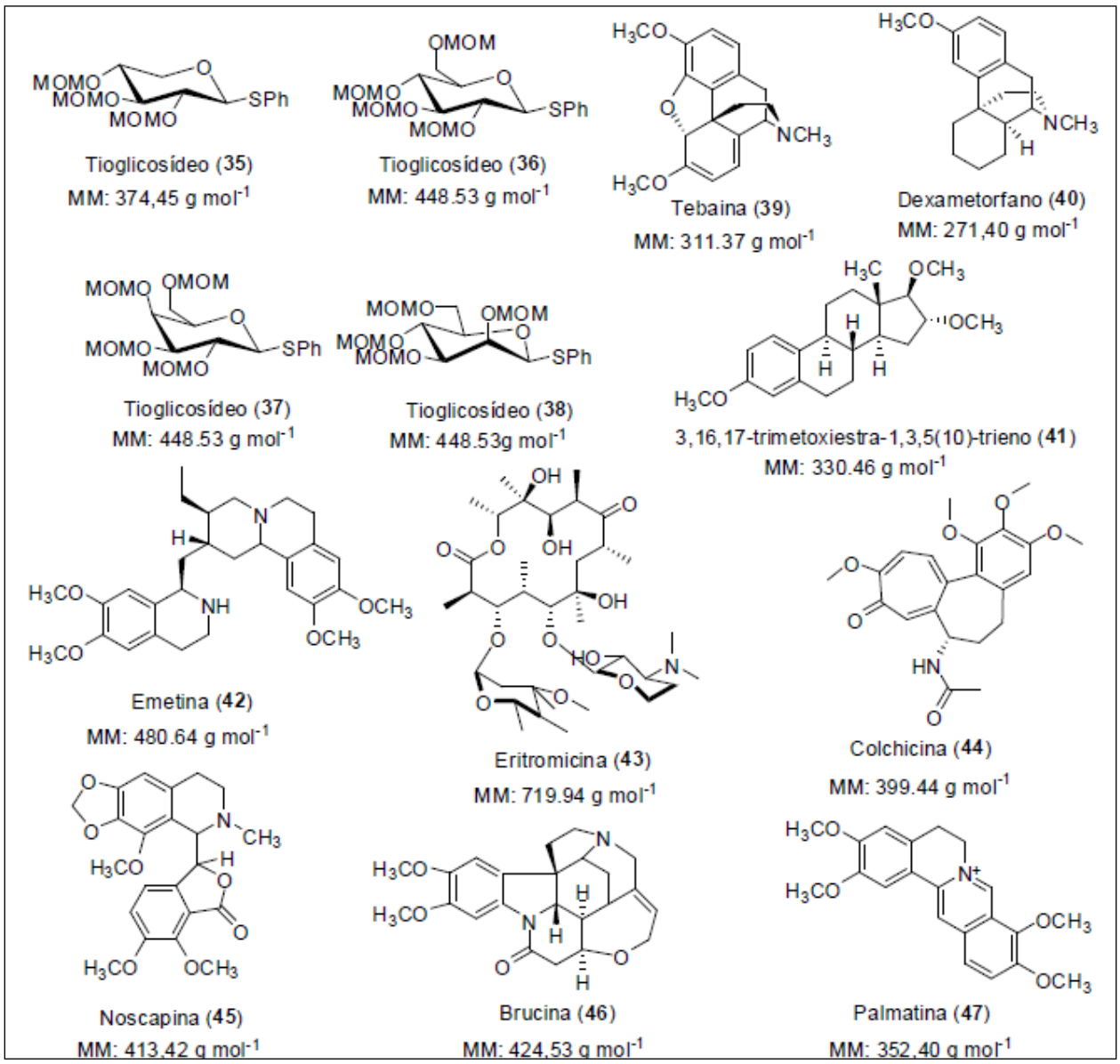


Figura 24: Substratos usados para triagem de atividade enzimática.

O sequenciamento das variantes mais ativas detectadas por ensaio colorimétrico revelou que as substituições que mais contribuiram para o aumento da atividade enzimática foram os resíduos 75, 177, 181, 260 e 437, enquanto os resíduos 69, 263 e 268 foram irrelevantes (**Tabela 20**).

Tabela 20: Substituição de alanina e atividade relativa das variantes positivas detectadas por ensaio colorimétrico

Substratos	Variantes	Resíduos								Atividade relativa[a]
		K69	L75	M177	L181	T260	I263	T268	L437	
Tioglicosídeos (35-38)	8C7	-	+	-	+	-	-	-	-	4,4
	2A1	-	+	-	+	-	-	-	+	4,1
	4H9	-	-	-	+	+	-	-	+	7,9
	4H5	-	+	+	+	-	-	-	-	2,7
Alcalóides (39 e 40)	8F11	-	-	-	-	-	-	-	+	2,6
	4H9	-	-	-	+	+	-	-	+	3,9
	7A1	-	+	+	+	+	-	-	-	2,7
	4H5	-	+	+	+	-	-	-	-	2,2
	8C7	-	+	-	+	-	-	-	-	2,7
Esteróide (41)	8F11	-	-	-	-	-	-	-	+	[b]
% de alanina[c]		0	67	33	83	33	0	0	50	

[a] Atividade relativa medida através do ensaio colorimétrico de Purpald em comparação à proteína pai. [b] Detecção visual.[c] Porcentagem de substituição de cada um dos resíduos do sítio ativo por alanina nas variantes mais ativas.

Dentre os resíduos observados para o aumento da atividade, com excessão ao resíduo T260A, todas as substituições caracterizam-se por serem tipicamente de aminoácidos apolares. Isso indica que as substituições por alanina aumentaram o volume da cavidade do sítio ativo para acomodar esses novos substratos, enquanto causaram pouca perturbação conformacionais da enzima (**Tabela 20**).

Os resíduos L75 e L181 já foram relatados por outros autores como relevantes para alteração do escopo do substrato e seletividade. Porém, a substituição L437A, que foi determinante para a atividade oxidativa de esteróides não foi relatada anteriormente.

Além disso, as variantes ativas frente aos diferentes substratos testados apresentaram em média uma a três substituições por alanina, que enfatiza aplicabilidade da estratégia de substituição combinatória. Além disso, a substituição de poucos resíduos no sítio ativo da $P450_{Bm3}$ foram responsáveis pelo aumento significativo da atividade frente a vários substratos de estruturas distintas.

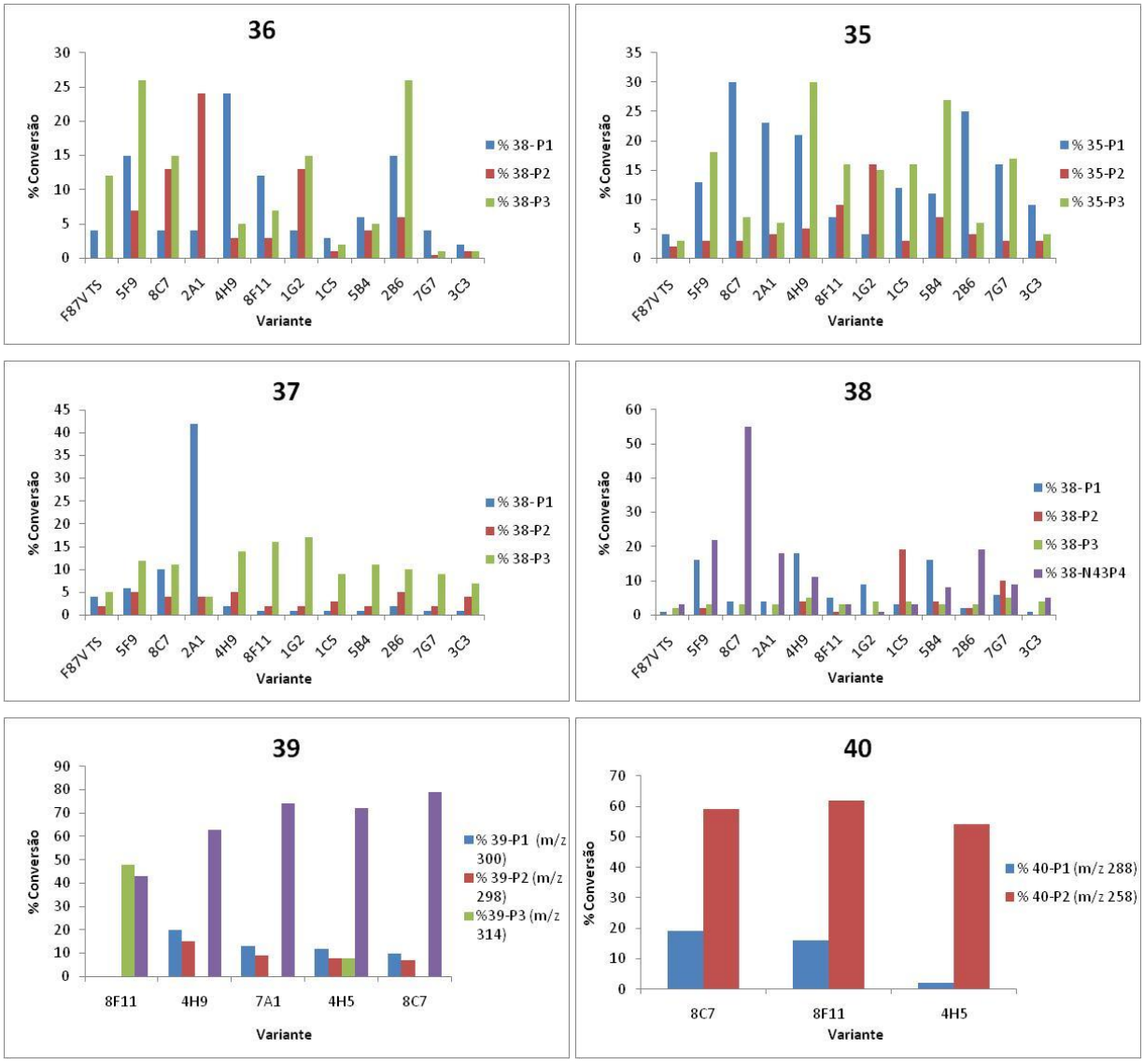


Figura 25: Análise cromatográfica das reações catalisadas pelas melhores variantes detectadas na triagem por Purpald. A análise comparativa da porcentagem de cada um dos produtos formados para cada variante permitiu selecionar as variantes mais regiosseletivas. Os tioglicosídeos **35** a **38** foram analisados por CG-DIC enquanto os alcalóides **39** e **40** foram analisados por LC-MS.

Adicionalmente, foram analisadas por cromatografia os produtos das reações usando 0,5 mg de substrato e 2,0 nmol de enzimas purificadas das variantes detectadas na triagem inicial, e observou-se que de maneira geral as conversões foram moderadas a altas com alta regiosseletividade (**Figura 25**). Assim, foram selecionadas duas variantes 2A1 e 8C7 com regiosseletividades superiores a 80 % para desproteção dos substratos **36** e **38**, respectivamente, e duas variantes com alta regiosseletividade 8C7 e 4H5 para os alcalóides **39** e **40,** respectivamente.

4.4.5 Biblioteca 2- Substituição dos resíduos do canal de acesso

Visando expandir a gama de aplicação da enzima para *N*- e *O*-desmetilação de substratos mais volumosos, criou-se uma segunda biblioteca substituindo resíduos do canal de acesso L17, L20, V26, R47, Y51, L75, V87, M177, L188 por alanina. O mesmo procedimento da biblioteca anterior foi aplicado utilizando como proteína pai a variante 5F9, que contém alanina nas posições 181 e 437 que foram bastante relevantes para o incremento para atividade na biblioteca 1.

Essa segunda biblioteca foi composta por 1638 colônias e novamente, a qualidade da biblioteca foi avaliada pelo sequenciamento de 1% das variantes, que confirmou a incorporação de alanina em todos os sítios selecionados. A análise por ligação de CO revelou que cerca de 70% das enzimas estavam apropriadamente enoveladas (**Figura 26**).

A biblioteca foi novamente testada frente aos substratos listados na **Figura 24.** A enzima pai (5F9) apresentou uma atividade média de 70 % com relação ao controle negativo para o tioglicosídeo **37** e o alcalóide **39**. Mas mesmo diante da alta atividade da enzima pai, dezessete variantes foram 1,5 vezes mais ativas ao alcalóide **39,** enquanto 9 mostraram aumento de atividade 1,3 vezes maior em relação ao pai para o tioglicosídeo **38**. Entretanto, nenhuma das variantes testadas apresentou atividade frente aos substratos **42** a **47** (**Tabela 21**).

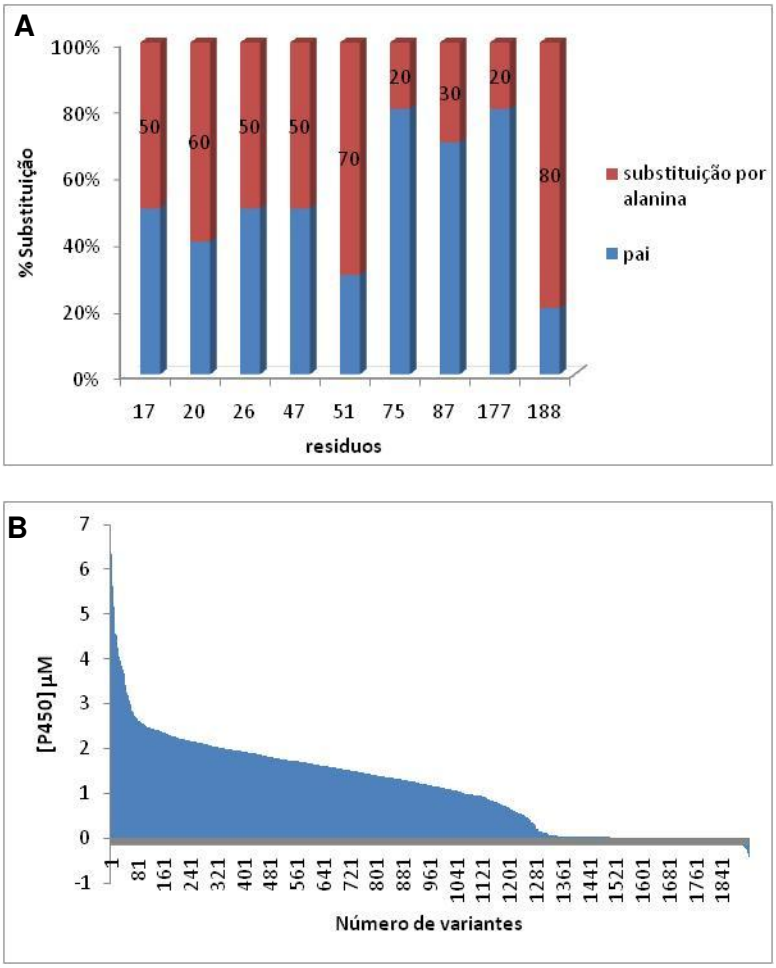


Figura 26: A) Média de substituições de alanina por resíduo. **B)**- Perfil de ligação de CO da biblioteca do sítio ativo.

Esses resultados sugerem que a substituição dos resíduos do canal de entrada acarretam no aumento da atividade enzimática frente a substratos volumosos, porém as substituições nos resíduos do sítio ativo foram mais significativas para atividade. Contudo, a ausência de variantes ativas para os demais substratos é uma limitação da estratégia adotada, pois substratos com pesos moleculares maiores que 400 Da e com estruturas rígidas não foram transformados. Possivelmente essa limitação deve ser resultado da utilização do substrato **35** como modelo para seleção dos resíduos substituídos.

O sequenciamento das variantes mais ativas selecionadas no ensaio colorimétrico revelou que a posição 47 estava sempre presente, enquanto as outras

posições não revelaram nenhuma importância significativa para atividade nos substratos **38** e **39**. Esses dados concordam com a relevância do resíduo 47 para o reconhecimento do substrato natural da enzima selvagem e também para atividade oxidativa em outros substratos.[128]

Tabela 21: Substituição de alanina e atividade relativa das variantes positivas detectadas por ensaio colorimétrico

Substratos	Variantes	Resíduos									Atividade
		17	**20**	**26**	**47**	**51**	**75**	**87**	**177**	**188**	**relativa [a]**
Tioglicosídeo	11F3 (F5)	-	+	-	+	-	-	-	-	-	1,5
(38)	2E6 (F8)	+	-	-	+	-	-	-	-	-	1,9
Alcalóide (39)	8H9(D4)	-	-	-	+	-	-	-	-	-	6,0
	18F11 (A7)	-	+	-	+	-	-	-	-	-	1,6
	15F11 (D6)	+	-	-	+	-	-	-	-	+	1,6
	4C11 (H1)	-	-	+	+	-	-	-	-	-	1,5
% de alanina[c]		33	33	17	100	0	0	0	0	17	

[a] Medida de atividade relativa por ensaio colorimétrico em comparação a proteína pai.

4.4.6 Biblioteca 3 - Evolução dirigida para oxidação de esteróides

A hidroxilação seletiva de esteróides é um tipo de reação particularmente interessante devido à importância biológica desses compostos e do desafio sintético para preparação desses compostos, que geralmente envolve células íntegras ou sistemas multienzimáticos.[129]

Como até o momento somente uma única variante, 8F11, transformou o esteróide **41**, foi proposta a criação de uma terceira biblioteca, por *ep*PCR, para otimizar esta atividade. Primeiramente foram feitas quatro reações de PCR com diferentes concentrações de $MnCl_2$, 100 μM, 150 μM, 200 μM e 250 μM e a qualidade das bibliotecas foram avaliadas através de ensaio de ligação de CO de 96 variantes de

[128] Cowart, L. A.; Falk, J. R.; Capdevila, J. H. *Arch. Biochem. Biophys.* **2001***, 387*, 117-124.

[129] Zehentgruber, D.; Hannemann, F.; Bleif, S.; Bernhardt, R.; Lutz, S. *ChemBioChem*. **2010**, *11*, 713–721.

cada uma das dessas quatro condições (**Figura 27**). Esses ensaios revelaram que as variantes resultantes da reação de PCR com 100 μM $MnCl_2$ mostraram a maior proporção de enzimas apropriadamente enoveladas, aproximadamente 60 %, com relação as outras concentrações. O sequenciamento de algumas variantes revelou uma média de mutação de três bases por sequência.

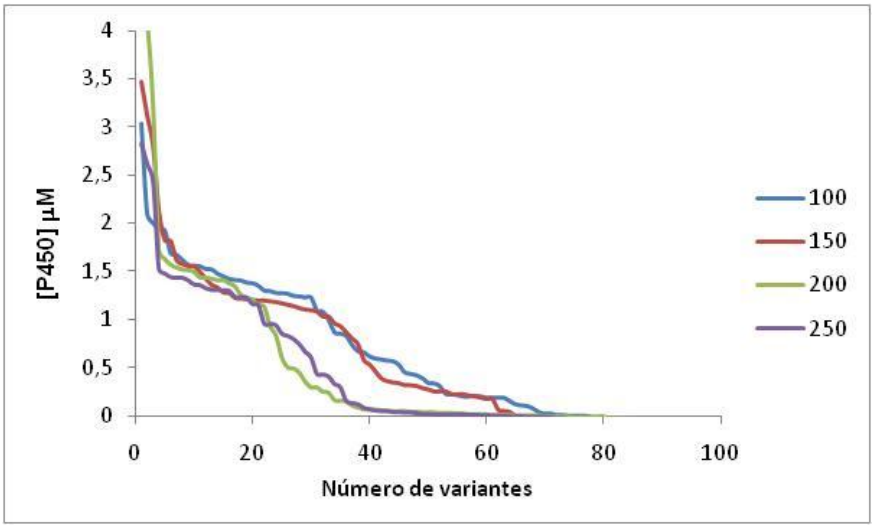


Figura 27. Perfil do ensaio de ligação de CO para as bibliotecas mutantes de $P450_{Bm3}$ preparadas por epPCR com 100 μM, 150 μM, 200 μM e 250 μM de $MnCl_2$.

Dessa maneira, foram coletadas 1700 colônias produzidas da biblioteca preparada com 100 μM de $MnCl_2$ e a análise por ensaio colorimétrico utilizando o esteróide **41** como substrato revelou três variantes com atividade superior à atividade da proteína pai (**Tabela 22**).

Tabela 22: Mutação das variantes positivas frente ao substrato **41**

Variantes	**Mutações**	**Atividade relativa[a]**
8F11 (pai)	**T437A**	1
F1	**T437A,** R47H, N95Y, G315C, K465R	1,6
A2	**T437A,** A78V, T91A	1,5
H5	**T437A,** E337D, H408R, A448T	1,2

[a] Atividade relativa à proteína pai medida através do ensaio colorimétrico de Purpald.

Enquanto a atividade de hidroxilação de esteróides *O*-metilados é fácil de ser detectada no formato miniaturizado de alto desempenho, essas novas variantes também poderiam apresentar atividade frente a substratos de maior valor agregado como derivados de testosterona e progesterona. Assim, foram analisadas por CLAE-EM reações usando 2 nmol da variante F1 e 0,5 mg dos substrato 11-α-hidroxiprogesterona (**48**) e acetil-testosterona (**49**) (*m/z* 331 $[M+H]^+$) que sugeriram a conversão em derivados hidroxilados (*m/z* 347 $[M+H]^+$) com 58% e 25%, respectivamente. A variante pai 8F11 não apresentou atividade frente a esses substratos.

Uma vez que a enzima F1 mostrou uma atividade interessante e que as mutações observadas são distantes do sítio ativo (**Figura 28**), construíram-se quatro variantes contendo cada uma das mutações pontuais, a fim de avaliar o impacto de cada uma das substuições no aumento da atividade oxidativa. A avaliação dos mutantes pontuais frente ao substrato **48** mostrou nenhuma atividade enzimática indicando que as mutações em F1 devem atuar em sinergia para a hidroxilação de esteróides. Esses resultados enfatizam a importância das técnicas de evolução dirigida em que o aumento da atividade enzimática não está relacionado diretamente com mutações no sítio ativo, mas também mutações estabilizantes da estrutura protéica.

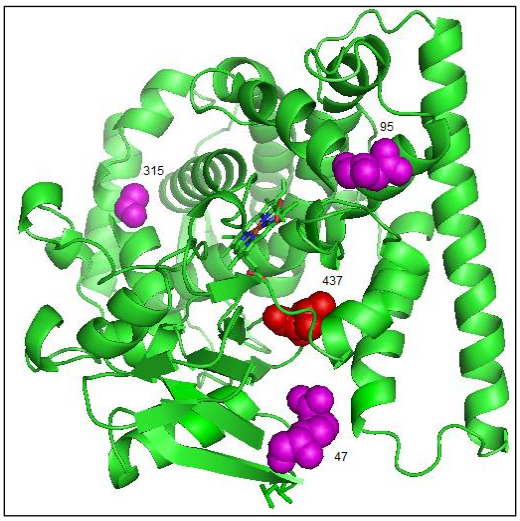


Figura 28: Representação da estrutura terciária do domínio heme de citocromo $P450_{Bm3}$ selvagem com os resíduos R47H, N95Y, G315C, K465R destacados em roxo, e o resíduo 437 substituído na biblioteca 1.

A fim de investigar a utilidade sintética das enzimas obtidas das três bibliotecas construídas, foram conduzidas bioconversões em escala preparativa a fim de caracterizar os produtos majoritários das variantes selecionadas. Essas reações forneceram produtos regiosseletivamente desprotegidos com rendimentos de moderado a altos que estão listados na **Tabela 23**.

A análise dos espectros de RMN de ^{1}H dos produtos majoritários das reações de desmetilação dos alcalóides **39** e **40** revelou a perda do sinal da metila em 2,50 ppm atribuída à metila ligada ao nitrogênio indicando que a *N*-desmetilação é preferencial levando á formação de *N*-nortebaína (**51**) e *N*-nordexametorfano (**52**).

A aplicação de $P450_{Bm3}$ para *N*-desmetilação de alcalóides derivados de **39** é de grande importancia uma vez que os processos industrais empregam primeiramente a preparação do intermediário carbamato e posterior hidrólise sob altas temperaturas.[130]

Adicionalmente, a análise dos espectros de RMN de ^{1}H e ^{13}C 1D e 2D (gCOSY, HSQC, HMBC) do produto de oxidação do esteróide **48** permitiu identificar que a hidroxilação ocorreu na posição 2.[131] Novamente, a aplicação de variantes de $P450_{Bm3}$ para hidroxilação seletiva de esteróides é uma alternativa mais interessante aos sistemas multienzimáticos geralmente aplicados[132,129], além de ser uma enzimas facilmente engenheirada podendo ser otimizada para diversos substratos.

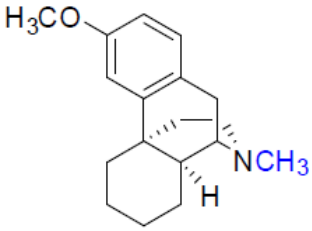
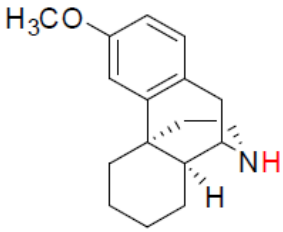
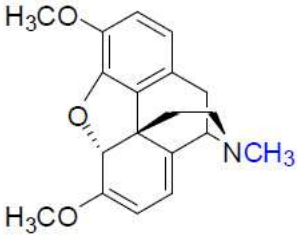
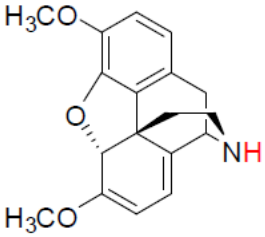
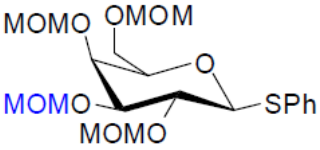
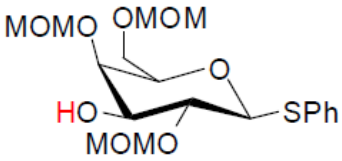
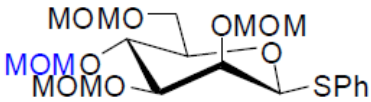
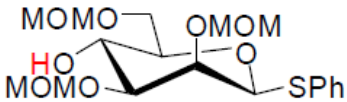
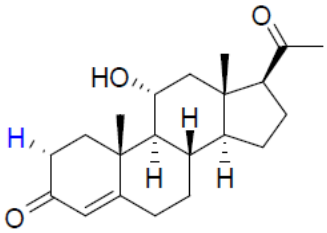
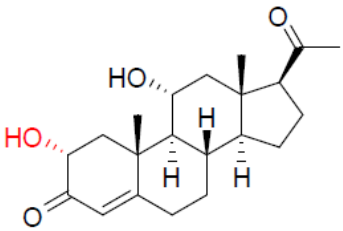
---

[130] Patel, N. S.; Kilaru, S.; Thennati, R.; *US pat.* 0,122,436 **2009**.

[131] A mobilidade conformacional do anel A de esteróides 2-hidróxi-3-oxo-4-eno altera as relações entre o H-1 e H-1 com o plano de insaturação assim como altera os ângulos diédricos, conseqüentemente os deslocamentos químicos e os acoplamentos vicinais não são evidências confiáveis para a conformação e configuração relativa dos substituintes nas posições 1 e 2. Para maiores detalhes consultar Jacobsen, N. E.; Kover, K. E.; Marataliev, M. B.; Feyereisen, R.; Walker, F. A. *Magn. Reson. Chem.* **2006**, *44*, 467-474.

[132] Furuya, T.; Shibata, D.; Kino, K. *Steroids* **2009**, *74*, 906-912.

Tabela 23: Desmetilação regiosseletiva e hidroxilação de produtos naturais volumosos por variantes de $P450_{Bm3}$ geradas por desenho reacional e posterior evolução dirigida

Substrato	Enzima (mutação)	Produto	Conv. (%)[a]	Reg. (%)	Rend. (%)[e]
	4H5 (75A, 181A, 177A)		54[a]	98[c]	50
	8C7 (75A, 181A)		88[a]	72[c]	60
	2A1 (75A, 181A, 437A)		80[b]	90[d]	75
	8C7 (75A, 181A)		93[b]	80[d]	70
	F1 (T437A, R46H, N94Y, K477R, G350C)		28[a]	82[c]	20

[a] Conversão do substrato determinado por LC. [b] Conversão do substrato determinado por CG-DIC. [c]Porcentagem do produto de interesse relativo aos demais produtos observados pela análise por CLAE do extrato bruto. [d] Porcentagem do produto de interesse relativo aos demais produtos observados pela análise por CG do extrato bruto. [e] Rendimento do produto puro isolado.

4.5 Conclusões parciais

Os resultados obtidos pela estratégia combinatória de substituição de resíduos do sítio ativo por alanina levou à obtenção de variantes ativas frente a diversos substratos volumosos, comprovando-se uma maneira eficiente e versátil para engenharia de enzimas cujo tamanho do substrato é limitante da atividade enzimática.

Foi demonstrado também que variantes obtidas dessa estratégia podem ser futuramente otimizadas por evolução dirigida para melhoramento da atividade, o que mais uma vez enfatiza a importância dessas técnicas, considerando que as quatro mutações observadas na variante F1 foram mutações distantes do sítio ativo.

Os substratos tioglicosídeos, alcalóides e esteróides avaliados nesse capítulo pertencem à classes de compostos de grande importância como precursores de produtos comercializados por indústrias farmacêuticas,[133] e a possibilidade de obtenção dos derivados em uma única etapa e uma única enzima são mais atrativas que as rotas químicas convencionais que em geral empregam procedimentos de várias etapas ou sistemas multienzimáticos.

[133] McGrath,N.; Brichacek, M.; Plichta, A.; Mack, D. J.; Njardarson, J. T. *Top 200 Pharmaceutical Products by Worldwide Sales in 2008*. Produzido pelo Grupo de pesquisa Njardarson, Cornell University, EUA.

4.6 Procedimentos experimentais

4.6.1 Reagentes

Todos os reagentes e padrões utilizados foram obtidos da Sigma, Aldrich ou Fluka, as enzimas utilizadas da criação das bibliotecas foram obtidas da Biolabs ou Roche. Os oligonulceotídeos foram obtidos da Integrated DNA Technologies (IDT, San Diego-CA). Os kits de purificação de DNA foram obtidos da Qiagen ou Zymo Research. O sequenciamento das variantes foi feito pela empresa Laragen (Pasadena-CA).

4.6.2 Equipamentos

As medidas de absorbância dos ensaios enzimáticos realizados em microplacas de polipropileno de 96 poços foram feitas em espectrofotômetro *Infinite 200 Tecan.*As análises de CG-EM foram realizadas em cromatógrafo Shimadzu GC-17 com coluna HP5 (30m x 0,32 mm x 0,1 μm). As análises de cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (LC-MS) foram feita em equipamento Agilent 1100 equipado com uma coluna kromasil C18 (5 μm x 50 mm x 4,6 mm) usando gradiente de eluição com acido acético 0,1% e acetonitrila. Os espectros de massas de alta resolução foram obtidos com espectrômetro JEOL JMS-600H em Caltech.

Os espectros de RMN de ^{1}H e de ^{13}C foram obtidos em espectrômetro Varian Mercury (300,00 MHz e 75,00 MHz respectivamente) ou Varian Inova 600 spectrometer (600 MHz e 150 MHz respectivamente) com os deslocamentos químicos registrados em ppm tomando-se como padrão de referência clorofórmio ($CDCl_3$ δ_H 7,24 e δ_c 77,0), DMSO ($(CD_3)_2SO$, δ_H 5,24 e δ_c 40,4) ou tetrametilsilano (TMS δ_H 0,00).

4.6.3 Construção das bibliotecas combinatórias de alanina

Para construção dos fragmentos A a E foram utilizados o DNA da variante pai como molde (50 ng), solução tampão Phusion HF (1x, Biolabs), mistura dos desoxirribonucleotídeos trifosfato (dNTP, 0,2 mM, Roche), primers direto e reverso (0,5 μM cada) e polimerase PhusionHF (0,02 U/μl, Biolabs). As condições da reação de PCR estão descritas na Tabela abaixo.

Tabela 24: Condições da reação de PCR para construção dos fragmentos A a E

Etapa	Temperatura (°C)	Tempo (s)	Numero de ciclos
Desnaturação inicial	98	30	1
Desnaturação	98	10	
Extensão	72	10	30
Extensão final	72	10 (min)	
Finalização	4	-	1

Os fragmentos A a E resultantes foram então reunidos em outras duas reações de PCR utilizando cada fragmento (50 ng), Phusion HF (1x, Biolabs), dNTPs (0,2 mM, Roche), primers direto e reverso (0,5 µM cada) e polimerase PhusionHF (0,02 U/µl, Biolabs).

Tabela 25: Condições da reação de PCR para montagem dos fragmentos A a E

Etapa	Temperatura (°C)	Tempo (s)	Numero de ciclos
Desnaturação inicial	98	30	1
Desnaturação	98	10	
Anelamento	55	10	
Extensão	72	55	25
Extensão final	72	10 (min)	
Finalização	4	-	1

Em seguida, o fragmento final (2 µg), bem como o vetor pCWori[Bm3] (2 µg) do vetor foram digeridos com *Sac I* (Biolabs, 200 U/mL) e *Bam HI* (Biolabs, 200 U/mL), em tampão NEB I (Biolabs, 1x) e BSA (Aldrich, 1x) por 1,5 h a 37 °C. Em seguida o vetor foi defosforilado com fosfatase alcalina (Roche, 0,02U/µL) e mantidas por 30 min a 37 °C. Para ligação foram utilizados 100 ng de vetor para 2000 ng de inserto (inserto/vetor = 20), T4 DNA ligase (Roche, 0,07 U/µL), e tampão T4 DNA ligase (Roche, 1x) a 16 °C overnight. O produto da reação de ligação foi posteriomente transformado por

eletroporação em células competentes de *E. Coli* DH5α, mantidas a 37 °C por 45 min em meio SOC, incubadas em placas de LB_{amp} sólido a 37 °C overnight. Essas colônias foram transferidas para as placas *deep well* de 96 poços utilizando robô Qpix (Genetix, Beaverton, OR).

Tabela 26: Sequência dos *primers* utilizados para criação das bibliotecas

Biblioteca	Primer	**Sequência (5'-3')**
1	K69L75F	CTTTGAT**AAA**AACTTAAGTCAAGCG**CTT**AAATTTG
	K69L75R	CAAATTT**AAG**CGCTTGACTTAAGTT**TTT**ATCAAAG
	A69L75F	CTTTGAT**GCA**AACTTAAGTCAAGCG**CTT**AAATTTG
	A69L75R	CAAATTT**AAG**CGCTTGACTTAAGTT**TGC**ATCAAAG
	K69A75F	CTTTGAT**AAA**AACTTAAGTCAAGCG**GCT**AAATTTG
	K69A75R	CAAATTT**AGC**CGCTTGACTTAAGTT**TTT**ATCAAAG
	A69A75F	CTTTGAT**GCA**AACTTAAGTCAAGCG**GCT**AAATTTG
	A69A75R	CAAATTT**AGC**CGCTTGACTTAAGTT**TGC**ATCAAAG
	M177L181F	TATTATAAGT**ATG**GTCCGTGCA**CTG**GATGAAGTAA
	M177L181R	TTACTTCATC**CAG**TGCACGGAC**CAT**ACTTATAATA
	A177L181F	TATTATAAGT**GCG**GTCCGTGCA**CTG**GATGAAGTAA
	A177L181R	TTACTTCATC**CAG**TGCACGGAC**CGC**ACTTATAATA
	M177A181F	TATTATAAGT**ATG**GTCCGTGCA**GCG**GATGAAGTAA
	M177A181R	TTACTTCATC**CGC**TGCACGGAC**CAT**ACTTATAATA
	A177A181F	TATTATAAGT**GCG**GTCCGTGCA**GCG**GATGAAGTAA
	A177A181R	TTACTTCATC**CGC**TGCACGGAC**CGC**ACTTATAATA
	TA260I263TA268F	AATTATT**RCA**TTCTTA**ATT**GCGGGACACGAA**RCA**ACAAGT
	TA260I263TA268R	ACTTGT**TGY**TTCGTGTCCCGC**AAT**TAAGAA**TGY**AATAATT
	TA260A263TA268F	AATTATT**RCA**TTCTTA**GCT**GCGGGACACGAA**RCA**ACAAGT
	TA260A263TA268R	ACTTGT**TGY**TTCGTGTCCCGC**AGC**TAAGAA**TGY**AATAATT
	L437F	GATATTAAAGAAACT**TTA**ACGTTAAAACCTAAA
	L437R	TTTAGGTTTTAACGT**TAA**AGTTTCTTTAATATC
	A437F	GATATTAAAGAAACT**GCA**ACGTTAAAACCTAAA
	A437R	TTTAGGTTTTAACGT**TGC**AGTTTCTTTAATATC
2	L17L20V26F	CTTAAAAAT**TTG**CCGTTA**TTG**AACACAGATAAACCG**GYT**CAAGCTTTG
	L17L20V26R	CAAAGCTTG**ARC**CGGTTTATCTGTGTT**CAA**TAACGG**CAA**ATTTTTAAG
	A17L20AV26F	CTTAAAAAT**GCA**CCGTTA**TTA**AACACAGATAAACCG**GYT**CAAGCTTTG
	A17L20AV26R	CAAAGCTTG**ARC**CGGTTTATCTGTGTT**TAA**TAACGG**TGC**ATTTTTAAG
	L17A20AV26F	CTTAAAAAT**TTA**CCGTTA**GCA**AACACAGATAAACCG**GYT**CAAGCTTTG
	L17A20AV26R	CAAAGCTTG**ARC**CGGTTTATCTGTGTT**TGC**TAACGG**TAA**ATTTTTAAG
	A17A20AV26F	CTTAAAAAT**GCA**CCGTTA**GCA**AACACAGATAAACCG**GYT**CAAGCTTTG
	A17A20AV26R	CAAAGCTTG**ARC**CGGTTTATCTGTGTT**TGC**TAACGG**TGC**ATTTTTAAG
	R47Y51F	GCCTGGT**CGC**GTAACGCGC**TAC**TTATCAAG
	R47Y51R	CTTGATAA**GTA**GCGCGTTAC**GCG**ACCAGGC
	A47Y51F	GCCTGGT**GCC**GTAACGCGC**TAC**TTATCAAG
	A47Y51R	CTTGATAA**GTA**GCGCGTTAC**GGC**ACCAGGC
	R47A51F	GCCTGGT**CGT**GTAACGCGC**GCA**TTATCAAG
	R47A51R	CTTGATAA**TGC**GCGCGTTAC**ACG**ACCAGGC
	A47A51F	GCCTGGT**GCT**GTAACGCGC**GCA**TTATCAAG
	A47A51R	CTTGATAA**TGC**GCGCGTTAC**AGC**ACCAGGC
	L75AV87F	AAGCG**CTG**AAATTTGCACGTGATTTTGCAGGAGACGGGTTA**GYA**ACAAG
	L75AV87R	CTTGT**TRC**TAACCCGTCTCCTGCAAAATCACGTGCAAATTT**CAG**CGCTT
	A75AV87F	AAGCG**GCT**AAATTTGCACGTGATTTTGCAGGAGACGGGTTA**GYA**ACAAG
	A75AV87R	CTTGT**TRC**TAACCCGTCTCCTGCAAAATCACGTGCAAATTT**AGC**CGCTT

	M177L188F	TAAGT**ATG**GTCCGTGCAGCGGATGAAGTAATGAACAAG**CTG**CAGCG
	M177L188R	CGCTG**CAG**CTTGTTCATTACTTCATCCGCTGCACGGAC**CAT**ACTTA
	A177L188F	TAAGT**GCG**GTCCGTGCAGCGGATGAAGTAATGAACAAG**CTG**CAGCG
	A177L188R	CGCTG**CAG**CTTGTTCATTACTTCATCCGCTGCACGGAC**CGC**ACTTA
	M177A188F	TAAGT**ATG**GTCCGTGCAGCGGATGAAGTAATGAACAAG**GCG**CAGCG
	M177A188R	CGCTG**CGC**CTTGTTCATTACTTCATCCGCTGCACGGAC**CAT**ACTTA
	A177A188F	TAAGT**GCG**GTCCGTGCAGCGGATGAAGTAATGAACAAG**GCG**CAGCG
	A177A188R	CGCTG**CGC**CTTGTTCATTACTTCATCCGCTGCACGGAC**CGC**ACTTA
Mutantes pontuais	R47HF	GAGGCGCCTGGT**CAT**GTAACGCGCTAC
	R47HR	GTAGCGCGTTAC**ATG**ACCAGGCGCCTC
	N95YF	GACGCATGAAAAA**TAT**TGGAAAAAAGCGC
	N95YR	GCGCTTTTTTCCAATATTTTTCATGCGTC
	G315CF	CAGCTTAAATATGTC**TGC**ATGGTCTTAAACGAAGC
	G315CR	GCTTCGTTTAAGACCATGCAGACATATTTAAGCTG
	K465RF	CTGAACAGTCTGCTAAA**AGA**GTACGCAAAAAGGCAG
	K465RR	CTGCCTTTTTGCGTACTCTTTTAGCAGACTGTTCAG

4.6.4 Construção da biblioteca de *error-prone* PCR

O DNA circular da variante 8F11 foi utilizado como molde (50 ng), junto as dNTPs (Roche, 0,2 mM), primers direto e reverso (0,5 µM cada), tampão Taq (Roche, 1x), Taq polimerase (Roche, 0,02 U/µl,) e $MnCl_2$ variando de 100-300 µM.

Tabela 27: Condições da reação de error-prone PCR

Etapa	Temperatura (°C)	Tempo	Número de ciclos
Desnaturaço inicial	95	2 min	1
Desnaturação	95	30 s	
Anelamento	55	30 s	25
Extensão	72	2 min	
Extensão final	72	30 s	
Finalização	10	-	1

Em seguida o DNA foi tratado com Dpn1 (0,2 U/µL, Roche) por 1h a 37 °C, e digerido (2 µg), bem como o vetor (2 µg) com Kpn I (Biolabs, 200 U/mL) e Bam HI (Biolabs, 200 U/mL), na presença de tampão NEBI (Biolabs, 1x) e BSA (Aldrich, 1x) por

1,5 h a 37 °C. Posteriormente o vetor foi tratado com fosfatase alcalina (Roche, 0,02U/μL) e tampão fosfatase (Roche, 1x) por 30 min a 37 °C.

4.6.5 Condições de cultivo das bibliotecas

As bibliotecas foram estocadas no laboratorio em glicerol a -78 °C em 150 µL de meio Luria-Bertani com ampicillina (0,1 mg/mL, LB_{amp}) e 20% v/v LB/glicerol em microplacas de 96 poços. Esses estoques foram usados para inocular as culturas em placas de 96 poços medios com 300 µL de meio LB_{amp} usando o pipetador automático de 96 pinos Multimek (Beckman Coulter, Fullerton, CA). As bibliotecas foram incubadas a 37 °C, 225 rpm, e após 16 h, aliquotas de 50 μL foram transferidas para as placas deep-well preenchidas com meio Terrific Broth (800 µL, TB_{amp}: 0.1 mg/mL ampicillin and 1 µL/mL mistura metal traço). Em seguida as culturas foram incubadas por 4 h a 37 °C225 rpm, então adicionava-se 50 µL de β-D-1-tiogalactopiranosideo de isopropila (IPTG, 0,25 mM) e as culturas foram mantidas por mais 24 h a 25 °C e 225 rpm. Em seguida placas as células foram centrifugadas (3,000xg, 15 min, 4 °C) e estocadas a -20 °C por pelo menos 2 h antes de serem lisadas.

Para a lise das células, as placas foram descongeladas por 30 min à temperatura ambiente e então adicionados solução lisozima (0.75 mg/mL), DNase I (40 U/mL) e $MgCl_2$ (10 mM) em tampão fosfato (300 µL, 0.1 M, pH 8.0). As células foram homogeinizadas e incubadas 37 °C por 1 h, e novamente centrifugadas (5,000xg, 4 °C por 15 min). Os sobrenadante foram utilizados como biocatalisadores para os ensaios de CO e Purpald.

4.6.6 Ensaio enzimático colorimétrico (Purpald)[134]

O sobrenadantes das variantes (40 μL) foram transferidos para microplacas contendo tampão fosfato (200 µL, 0,1 M, pH 8,0) utilizando pipetador automático de 96 pinos Multimek (Beckman Coulter, Fullerton, CA). Em seguida foram adicionadas quantidades apropriadas do substrato de interesse (1 mM) diluido em DMSO

[134] Peters, M. W.; Meinhold, P.; Glieder, A.; Arnold F. H. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *44,* 13442-13450.

(concentração final inferior a 2,5% v/v) e as reações foram iniciadas pela adição de solução de NADPH em tampão fosfato (0,5 mM). Após 2 h as reações foram finalizadas pela adição de 50 µL de Purpald (0.16 M em 2M NaOH) e analisadas em leitor de microplacas à 550 nm.

4.6.7 Ensaio de ligação de CO[135]

O sobrenadante das variantes (40 µL) foram diluidos em 60 µL de tampão fosfato (0,1 M, pH 8,0) e $Na_2S_2O_4$ (0,3 M in phosphate buffer, 1 M, pH 8,0) e analisados em leitor de microplacas à 450 and 490 nm. Em seguida as placas foram transferidas para uma câmara de vacuo vedada, a qual era evacuada ate aproximadamente -15 mm de Hg e em seguida purgada com gás CO e mantidas por 20 min. As placas foram então removidas e novamente analisadas à 450 and 490 nm. A diferenca entre os espectros antes de depois da incubação era utilizada para determinar a concentração de P450 no lisado utilizando a seguinte equação:

$$\frac{(A_{450} - A_{490})}{0.091} = \text{nmol de proteína por mL}$$

4.6.8 Expressão e purificação das variantes de $P450_{Bm3}$

As variants foram pré-inoculadas em 250 mL de meio LB_{amp} e mantidas overnight a 37 °C e 250 rpm, transferidas para frascos contendo meio TB_{amp} (2,0 L) e incubadas a 37 °C, 250 rpm até uma OD_{600} de 1,8 (ca. 3-4 h). Em seguida as culturas foram induzidas pela adição de IPTG (0,1 mM) a 25°C por mais 24h. Em seguida as células foram centrifugadas a 4 °C por 15 min e 3000xg, e os pellets foram armazenados por ao menos 2h a -20 ° C. Os pellets foram ressuspensos em tampão A (Tris-HCl, 25 mM, pH 8.0) e as células foram lisadas por sonicação (4x1min, 50% duty cycle, 0.5s on-0.5s off). Os restos celulares foram decantados por centrifugação (20 min at 4 °C and 20000xg) e o sobrenadante resultante foi aplicado em coluna de resina de troca iônica (Super Q 650-M) a qual foi lavada com cerca de três volumes mortos de tampão B (Tris-HCl, 25 mM, pH 8.0, 150 mM NaCl). Em seguida a proteína foi eluida com tampão

[135] Otey, C. R. *Directed Enzyme Evolution: Screening and Selection Methods,* Arnold, F. H.; Georgiou, G.; eds. Humana Press : Totowa, 2003, cap. 13.

C (Tris-HCl, 25 Mm, pH 8.0, 340 mM NaCl) e posteriormente concentrada usando tubos Millipore Centricon. Após concentrar a proteina em tampão fosfato (100 mM, pH 8.0), as amostras foram armazenadas a -20 °C. As concentrações das proteinas antes dos ensaios foram determinadas por ensaio de CO.[136]

4.6.9 Procedimento típico para bioconversões em media escala

As reações em média escala foram feitas em placas de 24 poços com adição de tampão fosfato 100 mM, pH 8,0 para um volume final de 0,5-1,0 mL, solução do substrato de interesse em DMSO (1 equiv, 1 mM), e solução de $NADP^+$ (0,25 equiv, 0,25 mM), glicose-6-fosfato (10 equiv, 10 mM) e glicose-6-fosfato desidrogenase (2 U/mL). Por último foram adicionadas a enzima (0,002 equiv, 2 μM) e mantida sob agitacao a 350 rpm. Aliquotas foram extraidas com $CHCl_3$ e analisadas por LC-MS.

4.6.10 Procedimento típico para bioconversões em escala preparativa

Em frascos de cristalização de 100 x 50 mm (ChemGlass #CG-8276-100) foram adicionados tampão fosfato (100 mM, pH 8,0) e solução do substrato de interesse em DMSO (1 equiv, 2 mM). Em seguida adicionou-se uma solução de $NADP^+$ (0,25 equiv, 0,5 mM), glicose-6-fosfato (10 equiv, 20 mM), e glicose-6-fosfato desidrogenase (2 U/mL) para reciclagem do cofator. Por último foi adicionado o volume apropriado de enzima (0,002 equiv, 4 μM) e mantido sob agitação branda utilizando barra magnetica para aeração da mistura reacional e evitar a formacao de espuma. O progresso da reação foi avaliado pela análise de aliquotas de 0,2 mL da mistura reacional como descrito no item anterior.

Após o tempo reacional ótimo a mistura reacional foi saturada com NaCl, seguido da adição de HCl 2N até ~ pH 4 a fim de levar a precipitação das proteinas em solução e aumentar a eficiência da extração. Após cerca de 30 min de agitação em condições ácidas a mistura foi filtrada em celite e areia, lavada com CH_2Cl_2 (3x20 mL) e teve o pH novamente reajustado > 10. A mistura bifásica resultante foi transferida para um funil de separação e extraída com CH_2Cl_2 (4 x 75 mL), os extratos orgânicos

[136] Schwaneberg, U.; Sprauer, A.; Schmidt-Dannert, C.; Schmid, R.D. *J. Chromatogr. A.*, **1999**, *848*, 149-159.

combinados foram secos com Na_2SO_4, filtrado e concentrado. O resíduo resultante foi purificado por coluna de sílica gel.

4.6.11 Caracterização dos produtos

4.6.11.1 *N*-nortebaína

Adicionou-se 50,1 mg de tebaína (0,16 mmol, 1 equiv) em 2,4 mL de DMSO (3% v/v) à 73,5 mL de tampão fosfato, seguido de 30,6 mg $NADP^+$ (0,04 mmol, 0,25 equiv), 488.2 mg glicose-6-fosfato (1,6 mmol, 10 equiv) e 960 µL glicose-6-fosfato desidrogenase (2,0 U mL^{-1}) e por fim 4,0 mL da variante 8C7 (2,0 µM, 0,002 equiv). Após 4,0 h a reação foi extraída como descrito no procedimento geral e purificada em coluna de sílica gel com $MeOH/CH_2Cl_2$ 1:9 rendendo 26,0 mg de N-nortebaína (60%) como um sólido amarelado. MM: 297,35 g mol^{-1} ($C_{18}H_{19}NO_3$). HRMS-FAB^+ *m/z* observado 298,1410, calculado para $[M + H]^+$ 298,1443, erro -3,3 ppm. RMN de ^1H (300,00 MHz, $CDCl_3$): δ 1,83 (d, *J* = 12,4 Hz, 1H), 2,18 (t, *J* = 12,4 Hz, 1H), 2,25 (sl, 1H), 3, 05 – 3,25 (m, 4H), 3,55 (s, 3H), 3,70 (s, 3H), 4,05 (d, *J* = 6,0 Hz, 1H,), 5,03 (d, *J* = 6,0 Hz, 1H), 5,29 (s, 1H), 5,60 (d, *J* = 6,0 Hz, 1H,), 6,16 (d, *J* = 8,0 Hz, 1H), 6,28 (d, *J* = 8,0 Hz, 1H).[137] RMN de ^1H (599.67MHz, $(CD_3)_2SO$): δ 1,65 (dd, *J* = 12,3 e 2,4Hz, 1H), 2,02-2,05 (m, 1H), 2,80 (dd, *J* = 13,6 e 4,2Hz, 1H), 2,90-3,05 (m, 3H), 3,55 (s, 3H), 3,75 (s, 3H), 3,83 (d, J= 6,0 Hz, 1H), 5,09 (d, *J* = 6,0 Hz, 1H), 5,26 (s, 1H), 5,57 (d, *J* = 6,0 Hz, 1H), 6,58 (d, *J* = 6,0 Hz, 1H), 6,73 (d, *J* = 6,0 Hz, 1H), RMN de ^{13}C (150.8 MHz, $(CD_3)_2SO$): δ 152,0, 144,3, 142,1, 133,2, 127,7, 119,1, 113,0, 99,7, 96,9, 96,0, 88,1, 64,8, 55,9, 54,7, 52,7, 46,0, 37,6, 36,6.

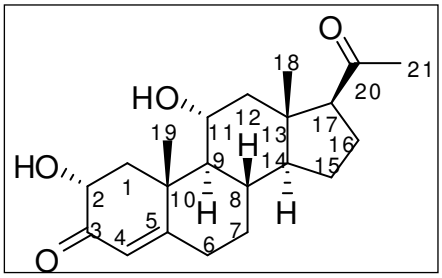
4.6.11.2 *N*-nordexametorfano

Adicionou-se 50,0 mg de Dexametorfano (0,13 mmol, 1 equiv) em 1,95 mL de DMSO 3% v/v (0,16 mmol, 1 equiv) à 60 mL de tampão fosfato, seguido de 24,87 mg NADP+ (0,04 mmol, 0,25 equiv), 396,6 mg de glicose-6-fosfato (1,6 mmol, 10 equiv) e 390 µL glicose-6-fosfato desidrogenase (2,0 U mL^{-1}) e por fim 3,63 mL da variante 4H5

[137] Dong, Z.; Scammells, P. J. *J. Org. Chem.* **2007**, *72*, 9881-9885.

(72 µM, 0,001 equiv). Após 16 h a reação foi extraída como descrito no procedimento geral e purificada em coluna de sílica gel com $CHCl_3$/MeOH/NH_4OH (90:10:0.5) rendendo 21,0 mg of N-nordexametorfano (50%) como um sólido amarelado. MM: 257,18 g mol^{-1} ($C_{17}H_{23}NO$). HRMS-FAB$^+$ *m*/*z* observado 258,1858, calculado para [M + H]$^+$ 258,1858, erro 0,0 ppm. RMN de ^{1}H (300,00 MHz, $CDCl_3$): δ 1,07 (m, 1H), 1,25–1,45 (m, 5H), 1,47–1,57 (m, 1H), 1,58–1,72 (m, 2H), 1,82 (d, *J* = 13 Hz, 1H), 2,32 (d, *J* = 12,6 Hz, 1H), 2,71-2,78 (m, 1H), 2,81 (d, *J* = 18,0 Hz, 2H), 3,10 (m, 1H), 3,30 (sl, 1H), 3,80 (s, 3H), 6,72 (dd, *J* = 8,4 e 2,4 Hz, 1H), 6.80 (d, *J* = 2,4 Hz, 1H), 7,04 (d, *J* = 8,4 Hz, 1H). RMN de ^{13}C (150.8 MHz, $CDCl_3$): δ 158,4, 141,4, 128,8, 128,6, 111,2, 111,0, 55,2, 51,0, 44,2, 42,2, 38,5, 37,7, 36,5, 31,5, 26,9, 26,3, 21,9.[137]

4.6.11.3 2,11-α-diidróxiprogesterona



Adicionou-se 101,0 mg de α-11-hidroxiprogesterona (0,306 mmol, 1 equiv) em 4,53 mL de DMSO 3% v/v (0,16 mmol, 1 equiv) à 135 mL de tampão fosfato, seguido de 46,2 mg NADP$^+$ (0,06 mmol, 0,2 equiv), 921,4 mg de glicose-6-fosfato (3,01 mmol, 10 equiv) e 906 µL glicose-6-fosfato desidrogenase (2,0 U mL^{-1}) e por fim 18,0 mL da variante F1 (33 µM, 0,002 equiv). Após 16 h a reação foi extraída como descrito no procedimento geral e purificada em coluna de sílica gel com Hex/AcOEt 3:7 rendendo 21,0 mg de a-2,11-hidróxiprogesterona (20%) como um sólido branco. MM: 346,2145 g mol^{-1} ($C_{21}H_{30}O_4$). HRMS-EI$^+$ *m*/*z* observado 346,2145 (15 % int. relat.), 302,1857 (100 % int. relat.), calculado para (M$^+$) 346,2144, erro 0,3 ppm. RMN de ^{1}H (599.67 MHz, $CDCl_3$): δ 0,67 (s, 3H, H-18), 1,07 (m, 1H, H-7), 1,23-1,26 (m, 2H, H14 e H 16), 1,27 (s, 3H, H-19), 1,50-1,54 (m, 3H, H_{eq}-1, H-9, H_{ax}-12), 1,69-1,73 (m, 3H, H-16', H-15, H-8), 1,99 (m, 1H, H-7'), 2,12 (s, 3H, H-21), 2,17 (m, 1H, H-15'), 2,27 (m, 1H, H-6), 2,37 (dd, *J* = 11,8 e 5,3 Hz, 1H, H_{eq}-12), 2,54 (m, 2H, H-6' e H 17), 3,38 (dd, *J* = 13,0 e 5,0 Hz, 1H, H_{ax}-1), 4,04 (m, 1H, H-11), 4,35 (dd, *J* = 13,0 e 5,0 Hz, 1H, H-2), 5,84 (s, 1H, H-4). RMN de ^{13}C (150,8 MHz, $CDCl_3$): δ 14,6 (CH_3-18); 23,1 (CH_3-19); 23,2 (CH_2-15); 24,5 (CH_2-16);

32,0 (CH_3-21); 33,3 (CH_2-6); 34,7 (CH-8); 34,8 (CH_2-7); 41,8 (CH_2-1), 42,4 (C-10); 44,0 (C-13); 50,0 (CH_2-12); 55,0 (CH-14); 56,2 (CH-9); 62,9 (CH-17); 68,1 (CH-11), 69,5 (CH-2), 120,0 (CH-4); 175,0 (C-5); 201,0 (C-3); 210,0 (C-20).

5 Conclusões Gerais

Assim, no Capítulo I a aplicação de triagem funcional em formato miniaturizado de biblioteca metagenômica solo permitiu selecionar quatro clones positivos para hidrólise de ésteres de cadeia curta, como acetato e propionato. Esses clones foram também ativos frente a substratos não fuorogênicos, sendo que dois deles mostraram valores de razão enantiomérica superiores a 100 (E > 100*)*, o que indica um grande potencial dessas enzimas para resolução cinética de ésteres.

Adicionalmente, no Capítulo II foi descrito a elucidação do estudo do mecanismos multienzimático mediado por células de *C. albicans* CCT 0776 para desracemização do substrato modelo feniletanol. Assim foi possível atribuir que a interconversão do enantiômeros ocorre por um processo cíclico mediado por uma enzima altamente seletiva em conjunto a outra pouco seletiva o que satisfaz os parâmetros termodinâmicos do processo. Pudemos também identificar os cofatores envolvidos em cada uma das etapas, além de confirmar a inibição da etapa oxidativa na ausência de oxigênio.

Ainda no Capítulo II mostrou-se a aplicação da desracemização de diversos 1,2-dióis e álcoois secundários que forneceu os enantiômeros anti-Prelog em altos excessos enantioméricos e rendimento cromatográfico de moderado a alto.

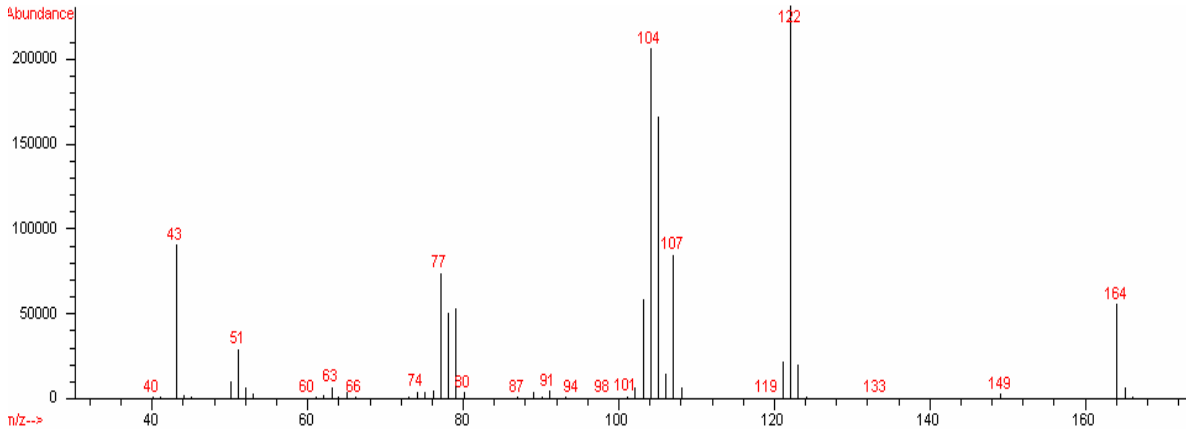
No Capítulo III foram exploradas ferramentas de biologia molecular visando o melhoramento de biocatalisadores por evolução dirigida e desenho racional que permitiu obter biocatalisadores mais versáteis para as transformações oxidativas de substratos volumosos.

Assim, é importante enfatizar que a biocatálise é uma área multidisciplinar que envolve a síntese química, bioquímica, microbiologia, química teórica e biologia molecular, e que merece estímulo e integração no âmbito nacional a fim de manter o Brasil em lugar de destaque no setor biotecnológico mundial.

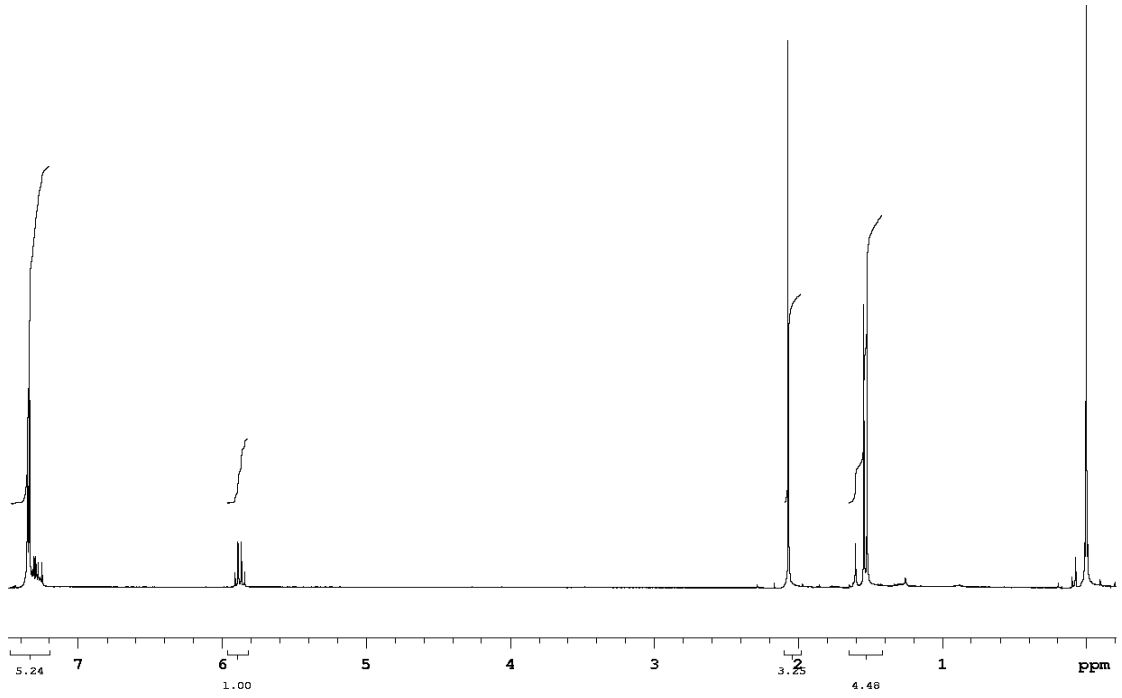
Anexo

Tabela 28: Identificação dos compostos caracterizados

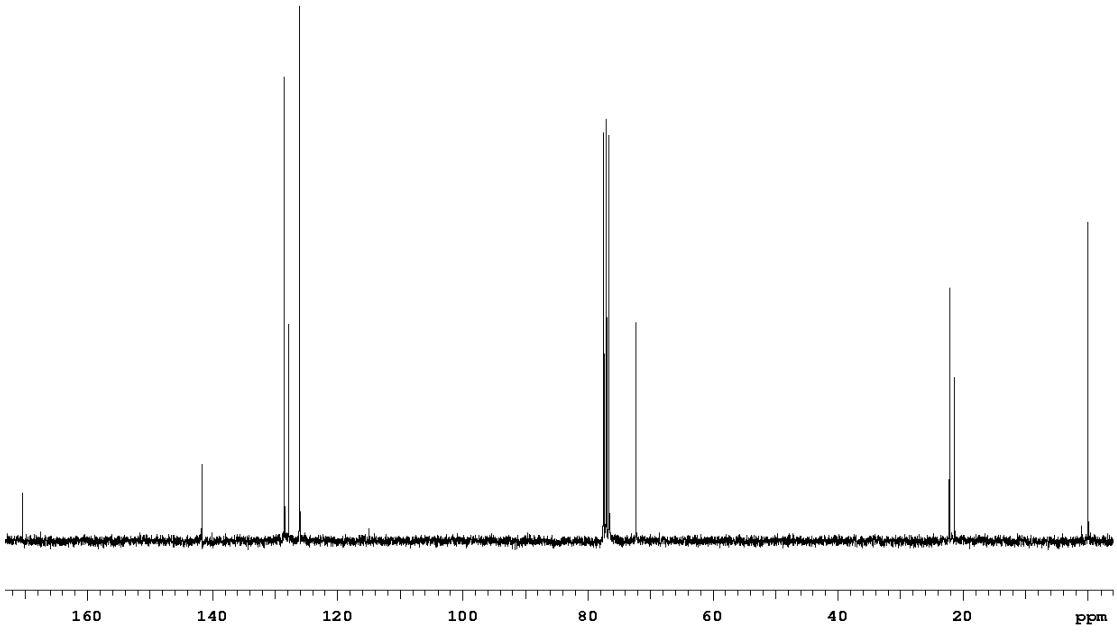
Número do composto	Nome
16	Acetato de feniletila
17	Propionato de feniletila
18	Octanoato de feniletila
31	4-benziloxi-1,2-buteno
21	4-benziloxi-1,2-butanodiol
21'	4-(benziloxi)butanodiol-1,2- bis(2-fenilpropanoato)
(*S*)-21'	2-(*S*)-4-(benziloxi)butanodiol-1,2- bis(2-fenilpropanoato)
33	4-(tert-butildimetilsililoxi)-1,2-butanodiol
34	1-benziloxi-4-(tert-butildimetilsililoxi)butane-2-ol
22	4-benziloxi-1,3-butanodiol
24	3-fenoxi-1,2-propanodiol
25	1,2-feniletanodiol
(*S*)-25	(*S*)-1,2-feniletanodiol
51	*N*-nortebaína
52	*N*-nordexametorfano
53	2,11-α-diidroxiprogesterona



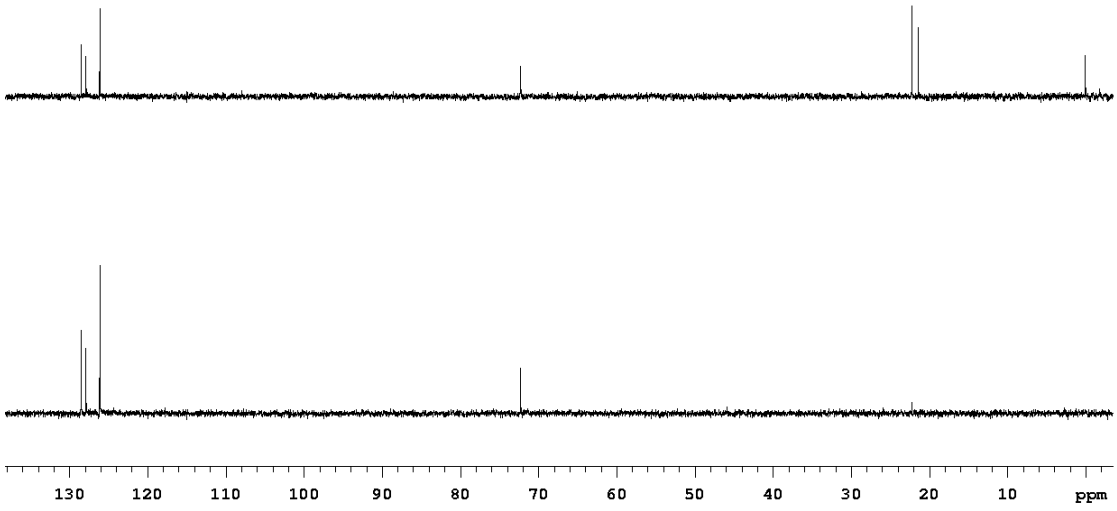
E 1: Espectro de massas (IE, 70 e V) de(±)-**16**.



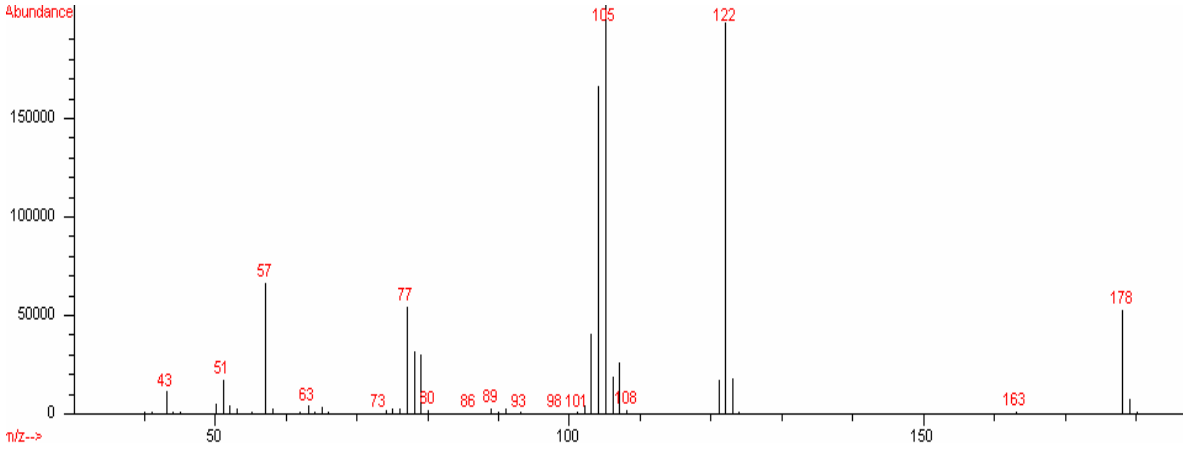
E 2: Espectro de RMN de ^{1}H (300,07 MHz, $CDCl_3$) de (±)-**16.**



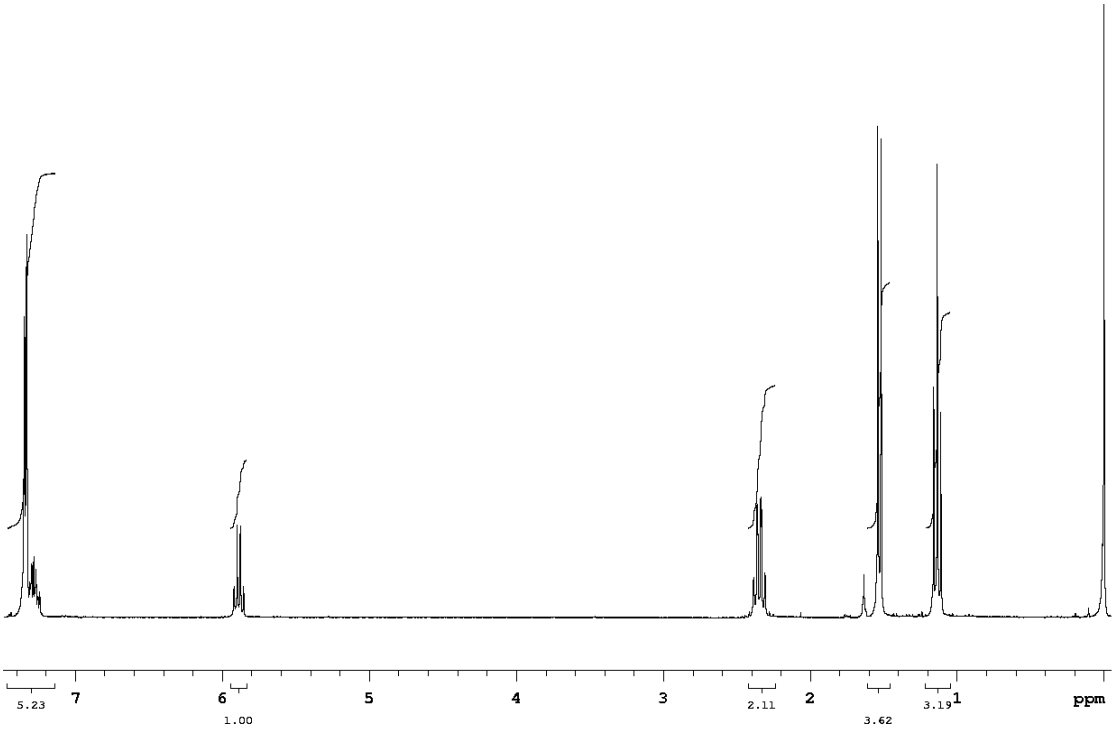
E 3: Espectro de RMN de ^{13}C (75,45 MHz, $CDCl_3$) de (±)-**16.**



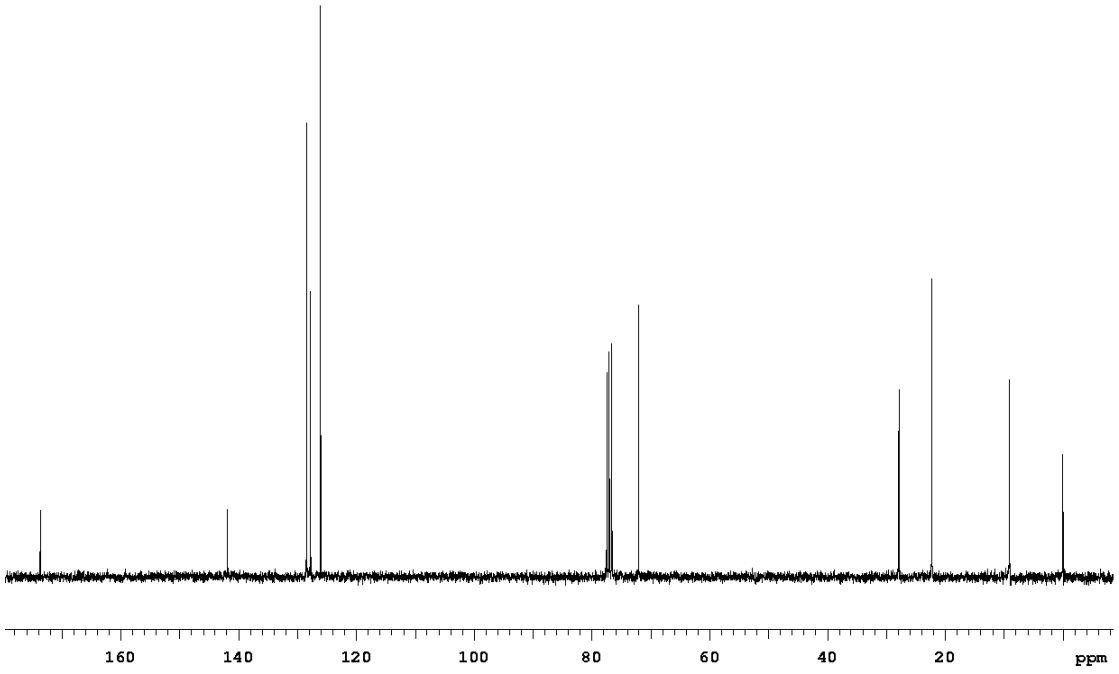
E 4: Espectro de RMN de 13C, DEPT 90 e 135 º (75,45 MHz, $CDCl_3$) de (±)-**16**.



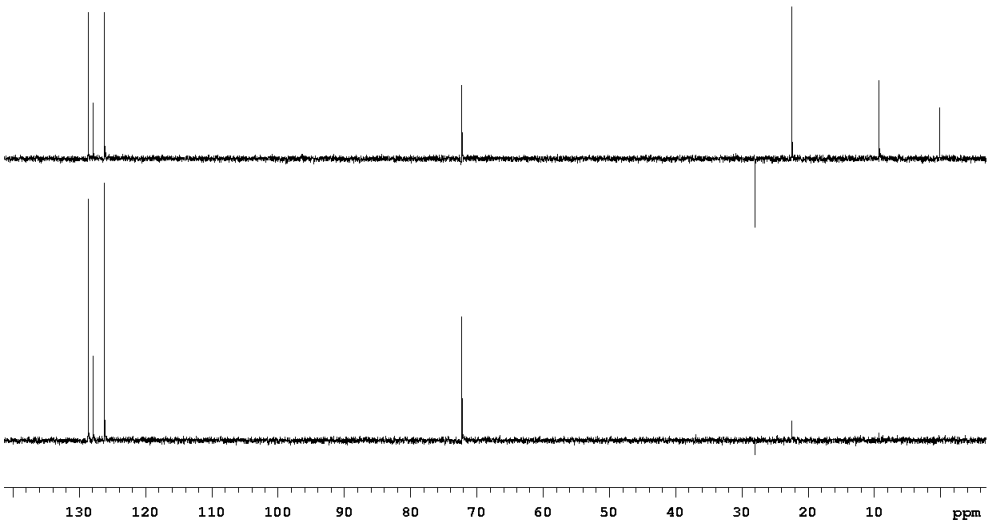
E 5: Espectro de massas (IE, 70 e V) (±)-**17**.



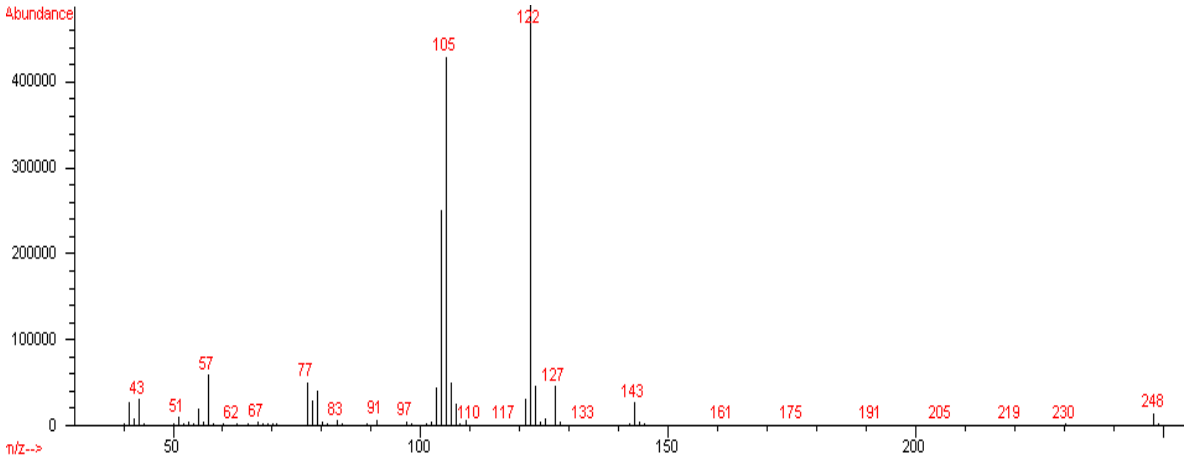
E 6: Espectro de RMN de ^{1}H (300,07 MHz, $CDCl_3$) de (±)-**17.**



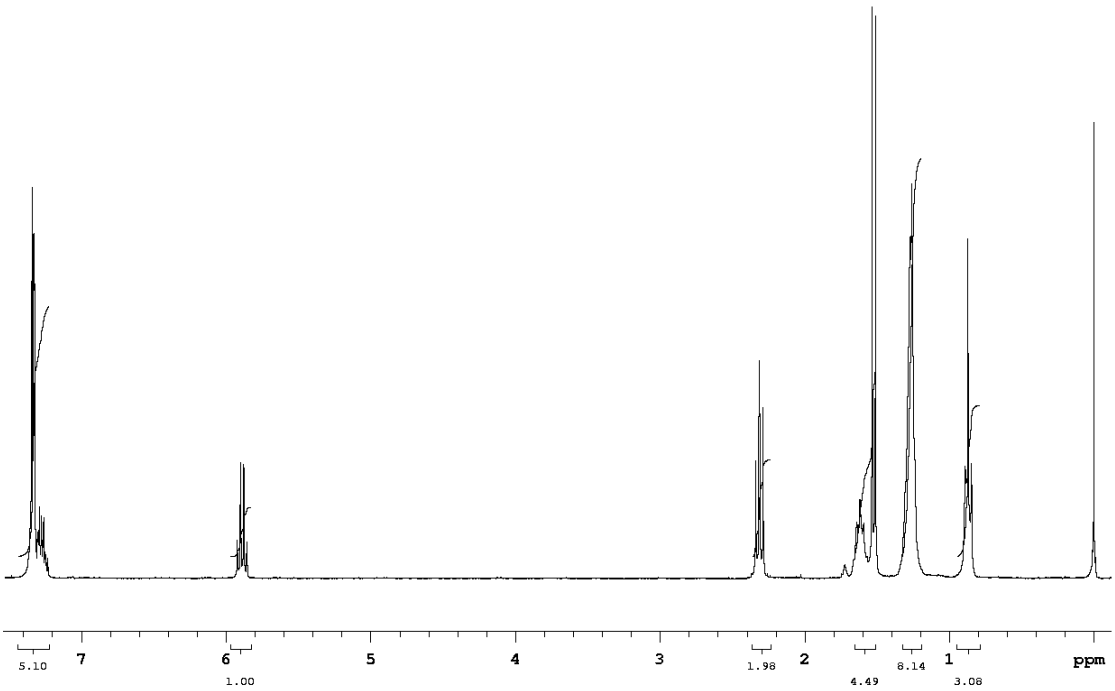
E 7: Espectro de RMN de ^{13}C (75,45 MHz, $CDCl_3$) (±)-**17.**



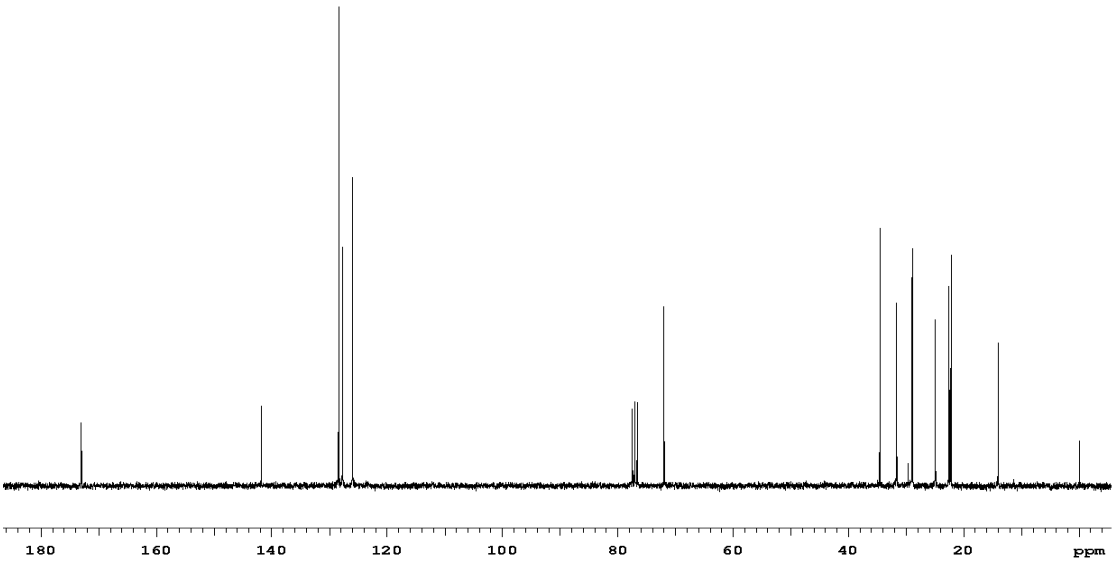
E 8: Espectro de RMN de ^{13}C, DEPT 90 e 135 º (75,45 MHz, $CDCl_3$) (±)-**17.**



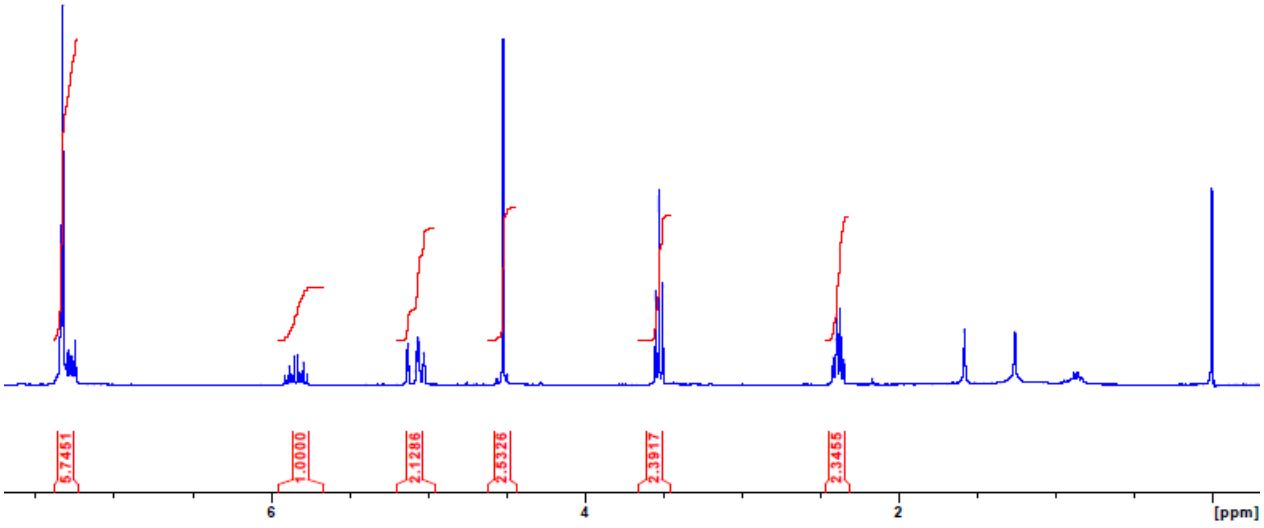
E 9: Espectro de massas (IE, 70 e V) de (±)-**18**.



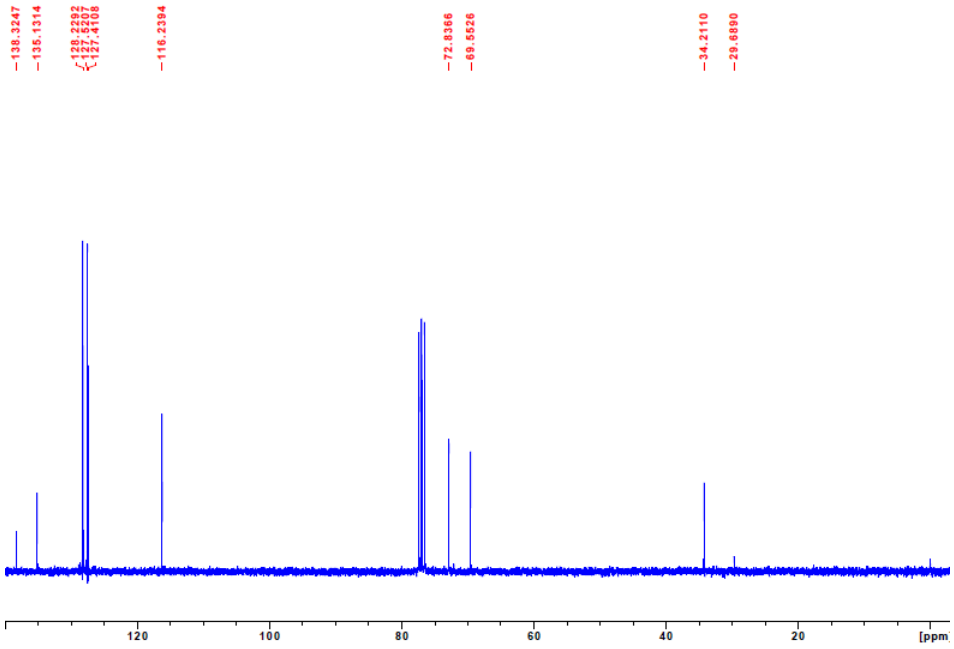
E 10: Espectro de RMN de ^{1}H (300,07 MHz, $CDCl_3$) (±)-**18.**



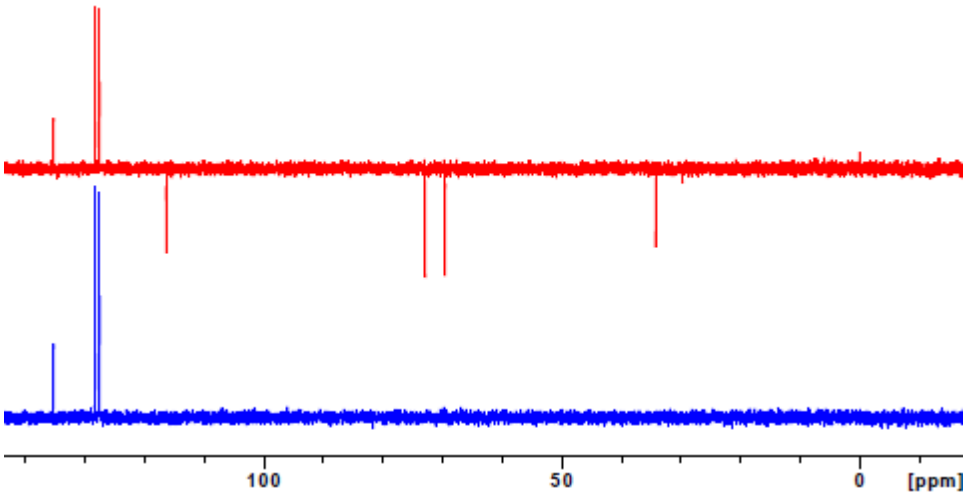
E 11: Espectro de RMN de ^{13}C (75,45 MHz, $CDCl_3$) de (±)-**18**.



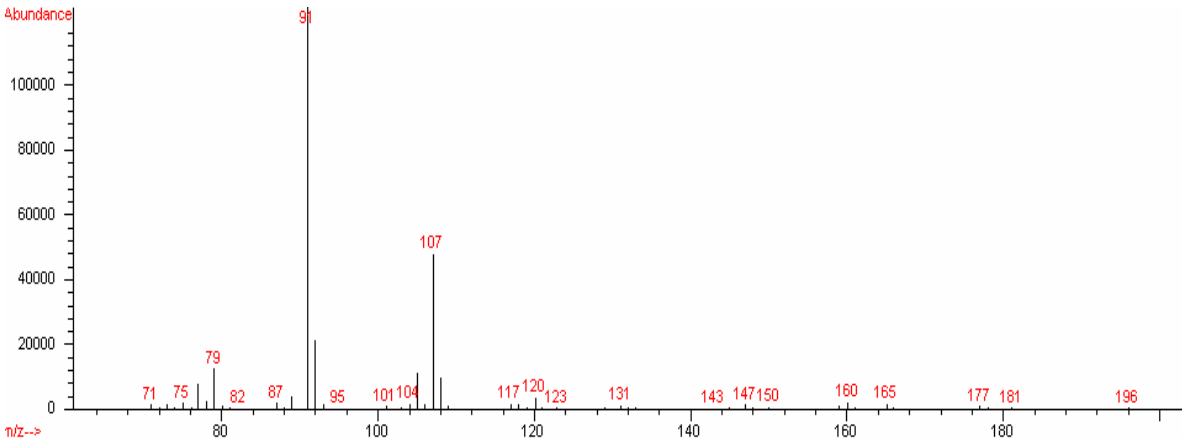
E 12: Espectro de RMN de ^{1}H (300,07 MHz, $CDCl_3$) **31**.



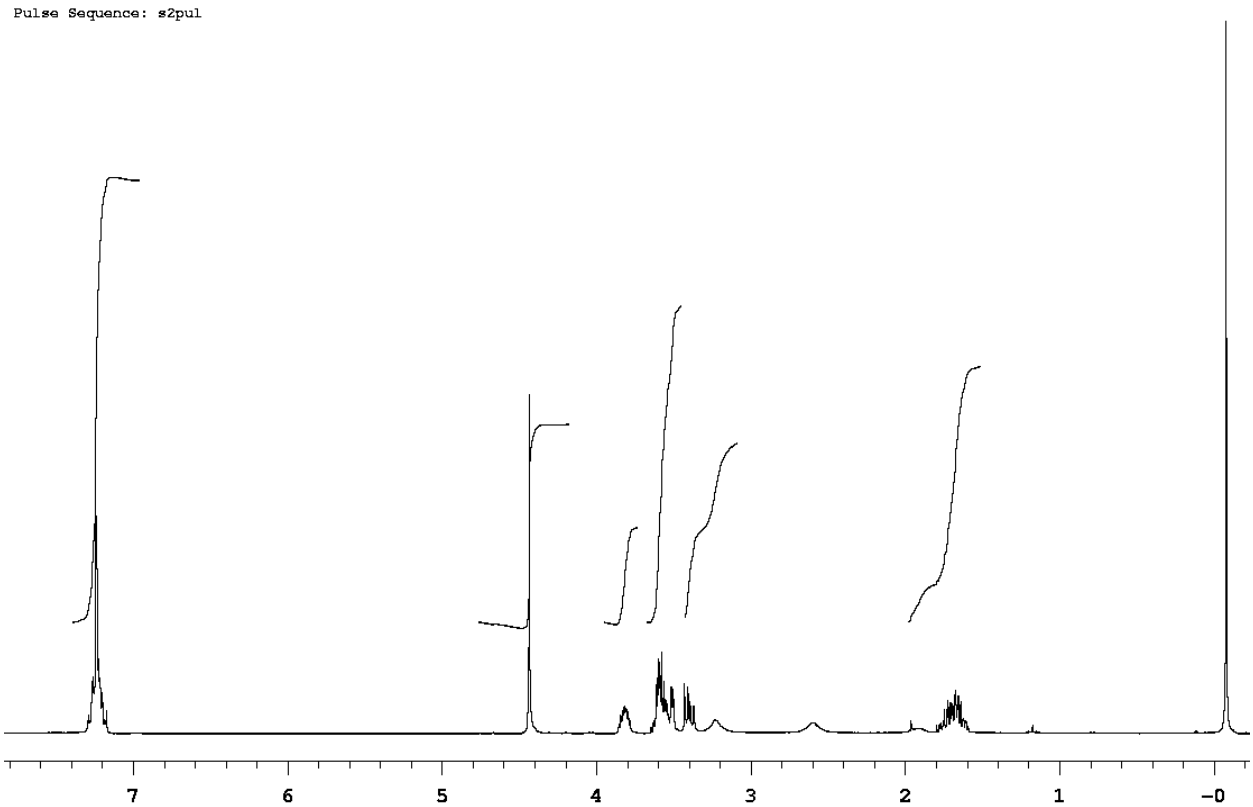
E 13: Espectro de RMN de ^{13}C (75,45 MHz, $CDCl_3$) de **31**.



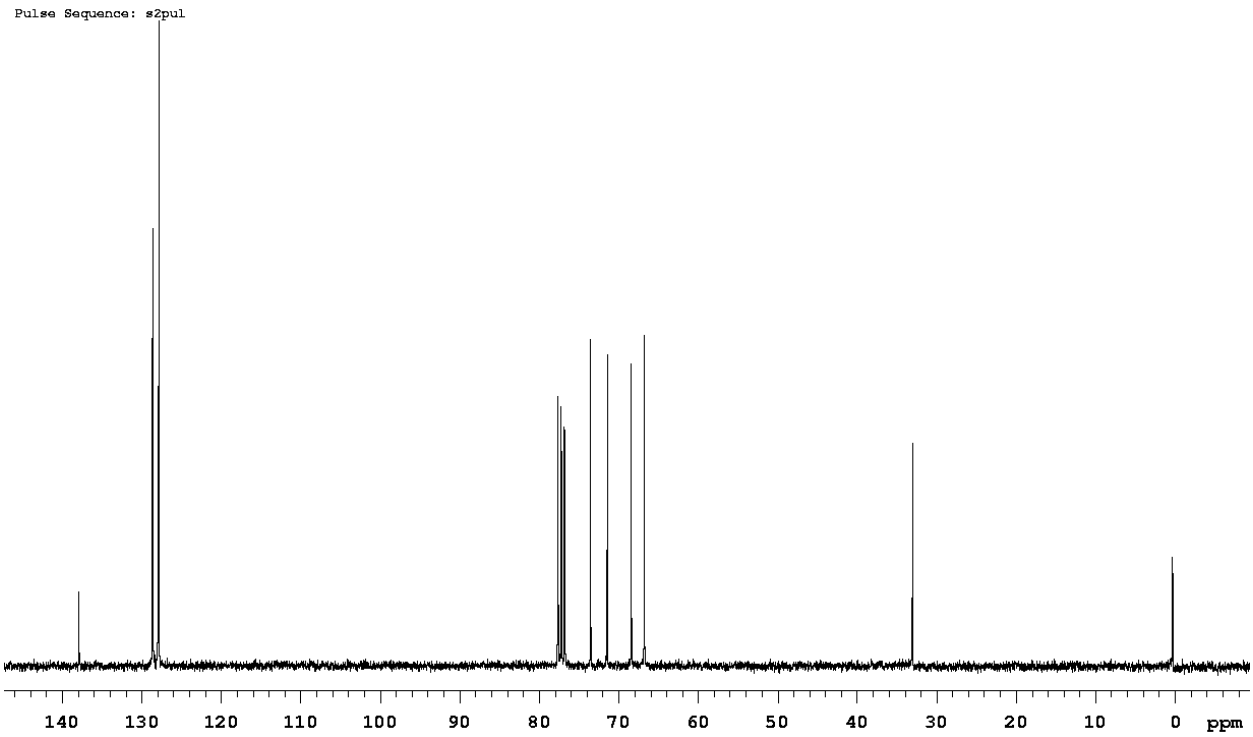
E 14: Espectro de RMN de ^{13}C, DEPT 90 e 135 º (75,45 MHz, $CDCl_3$) 31.



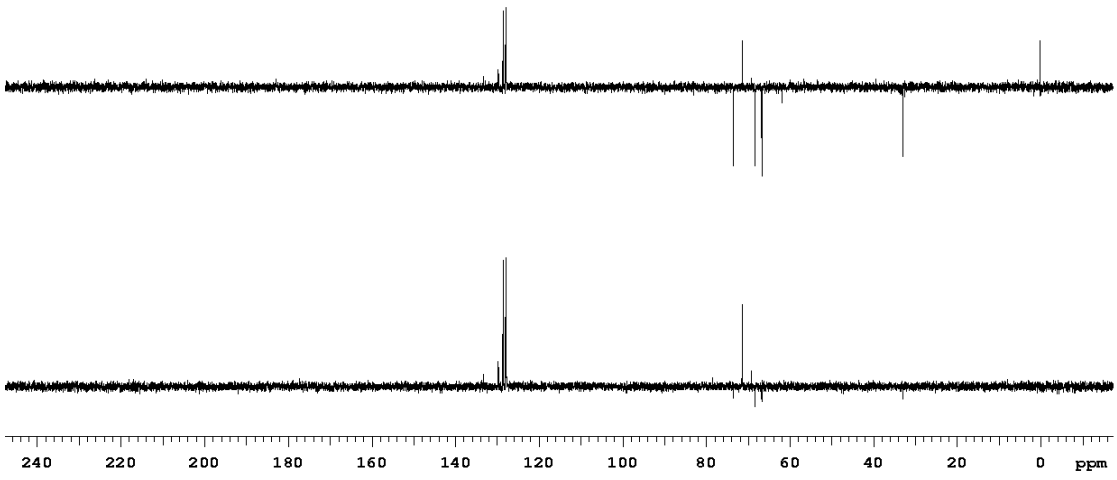
E 15: Espectro de massas (IE, 70 e V) de (±)-**21**.



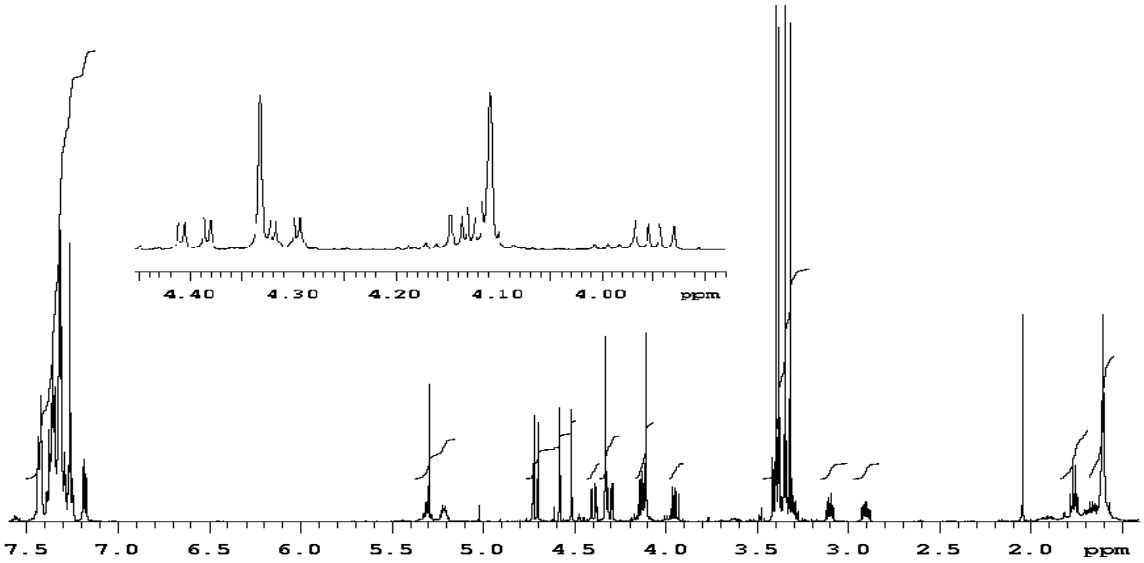
E 16: Espectro de RMN de ^{1}H (499,88 MHz, $CDCl_3$) (±)-**21.**



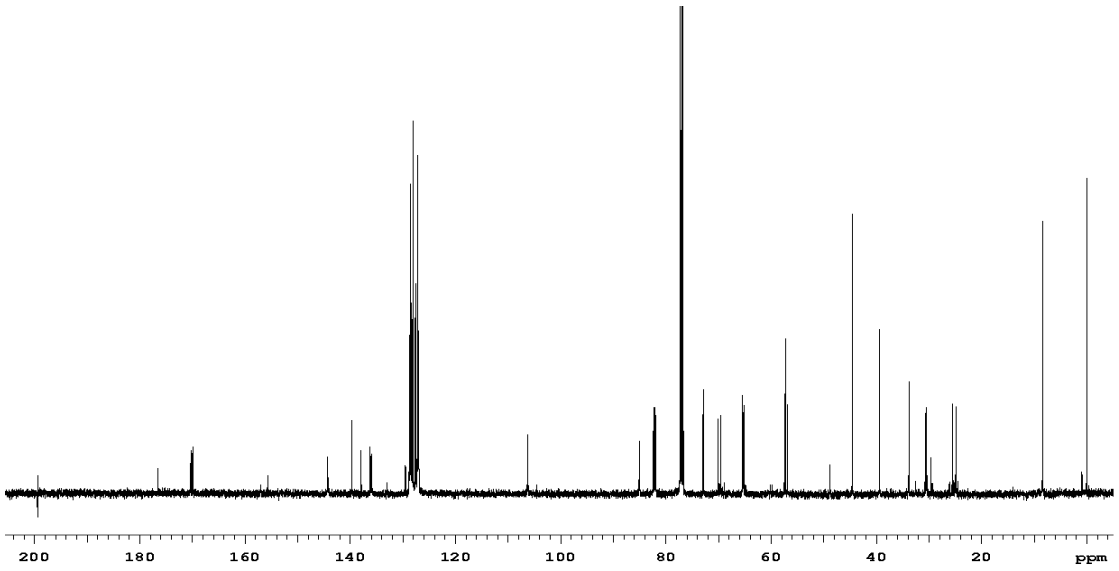
E 17: Espectro de RMN de ^{13}C (125,69 MHz, $CDCl_3$) (±)-**21**.



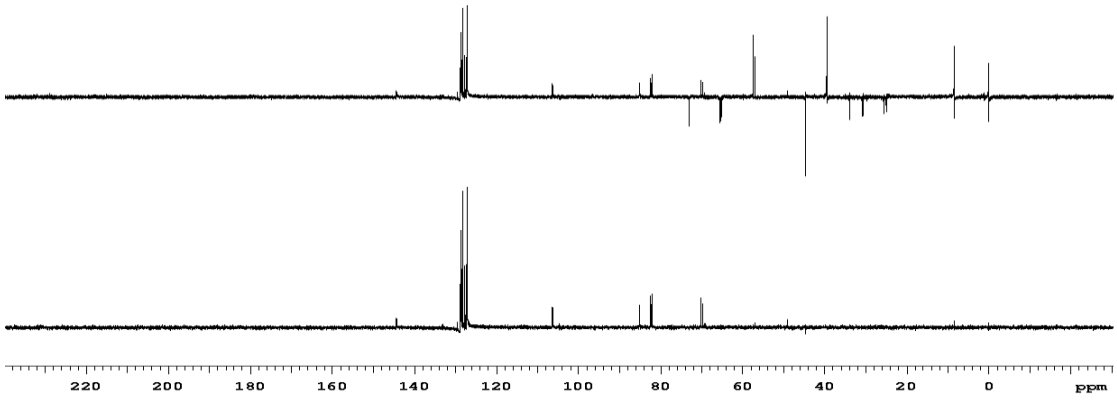
E 18: Espectro de RMN de ^{13}C, DEPT 90 e 135 º (125,69 MHz, $CDCl_3$) (±)-**21**.



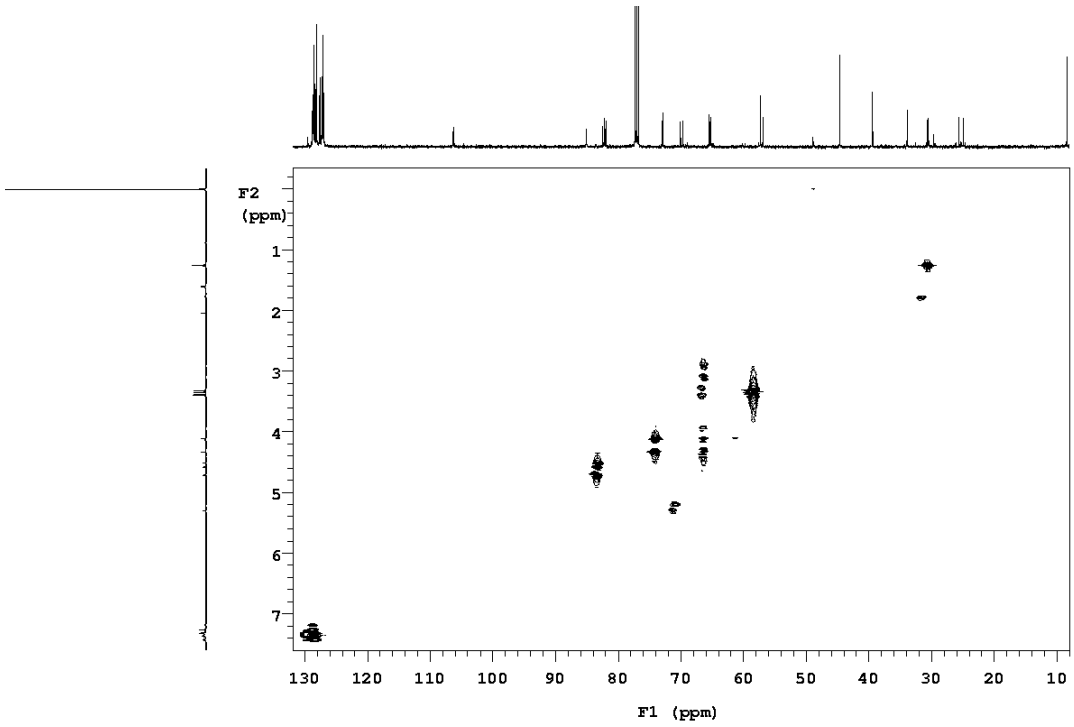
E 19: Espectro de RMN de ^{1}H (499,88 MHz, $CDCl_3$) do (±)-**21'.**



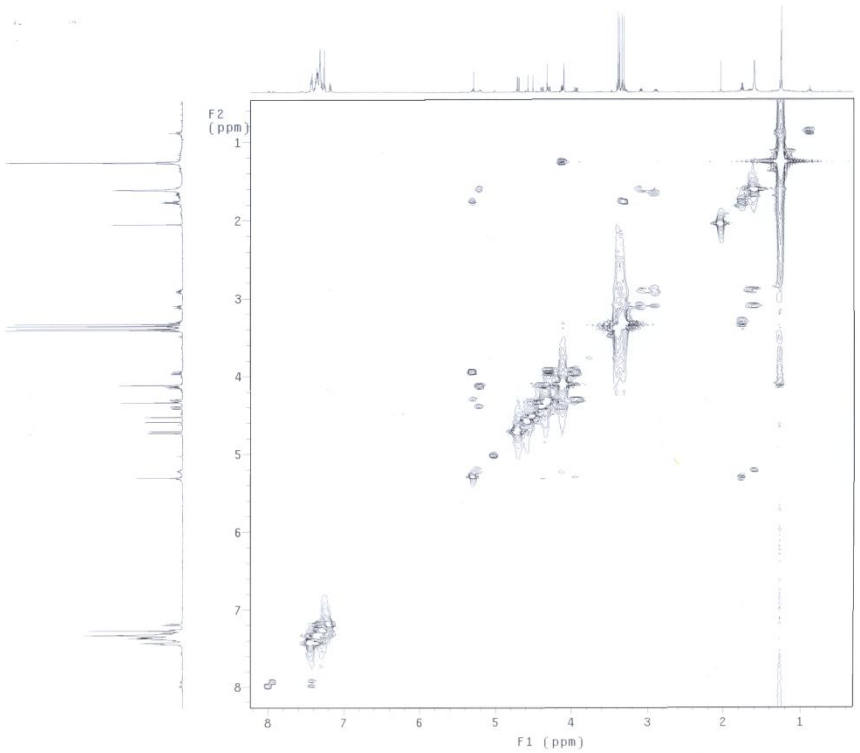
E 20: Espectro de RMN de ^{13}C (125,69 MHz, $CDCl_3$) do (±)-**21'.**



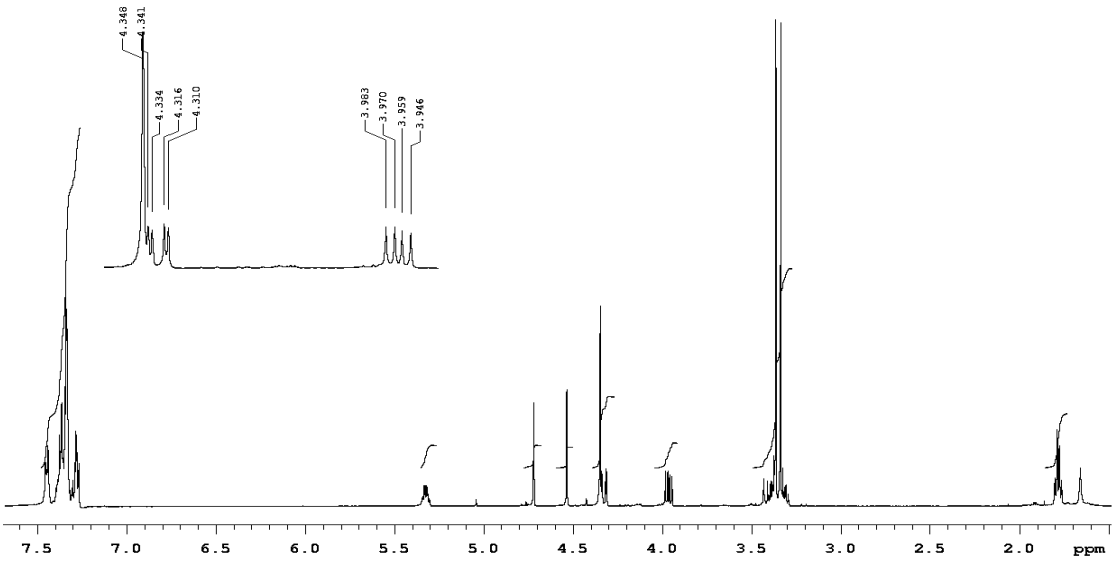
E 21: Espectro de RMN de ^{13}C DEPT 90 e 135 º (125,69 MHz, $CDCl_3$) do (±)-**21'**.



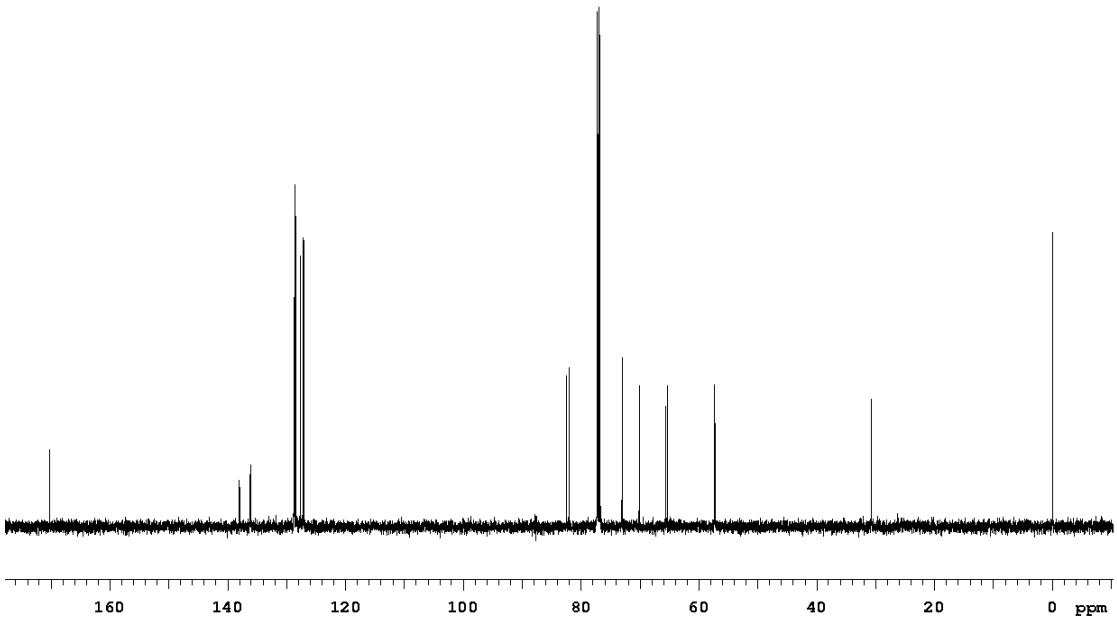
E 22: Espectro de RMN de 2D (^1H e ^{13}C HSQC, $CDCl_3$) do (±)-**21**'.



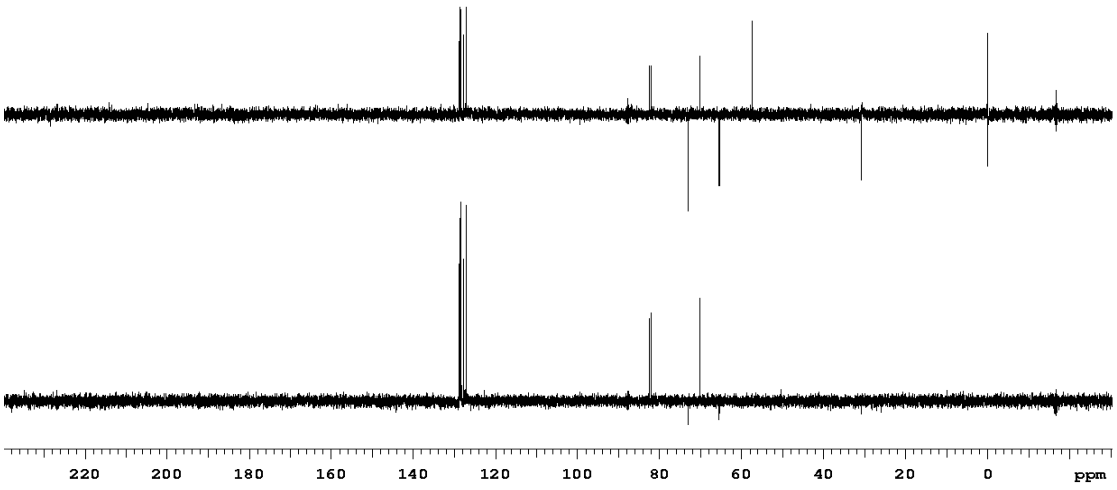
E 23: Espectro de RMN 2D de ^{1}H e ^{1}H (gCOSY, 499,88 MHz, $CDCl_3$) do (±)-**21'**.



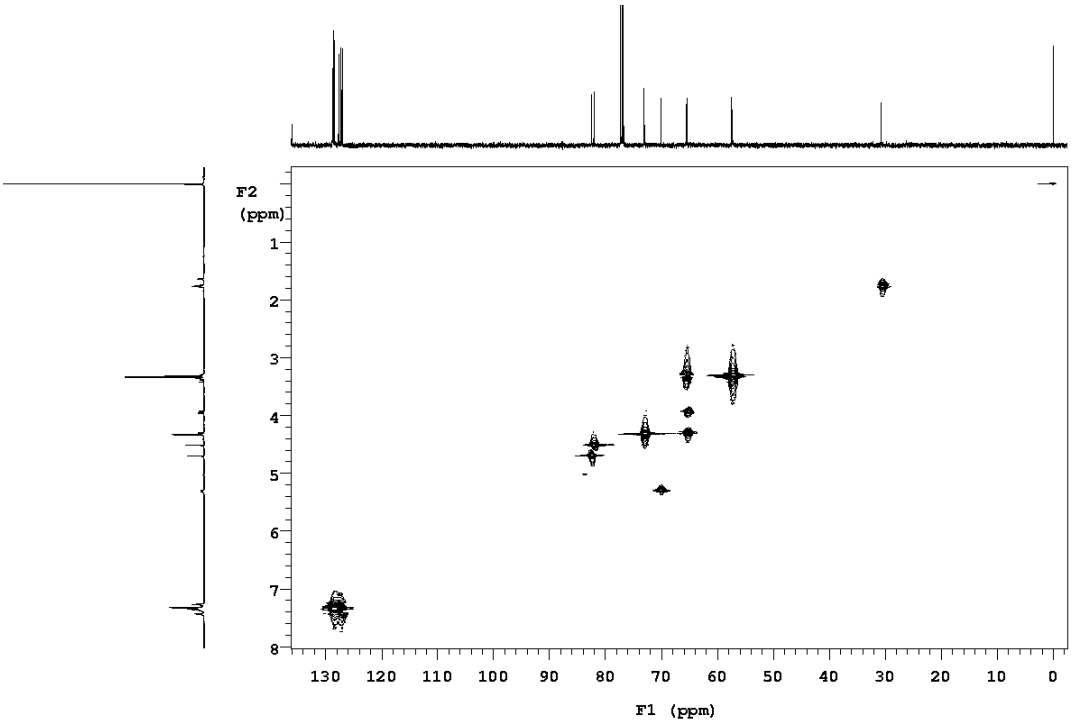
E 24: Espectro de RMN de ^{1}H (499,88 MHz, $CDCl_3$) do (*S*)-**21'.**



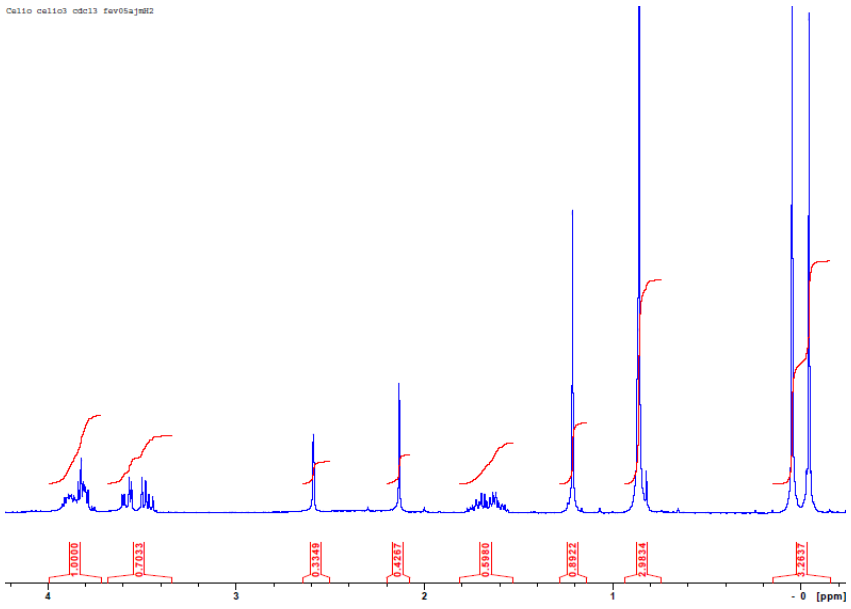
E 25: Espectro de RMN de ^{13}C (125,69 MHz, $CDCl_3$) do (*S*)-**21'.**



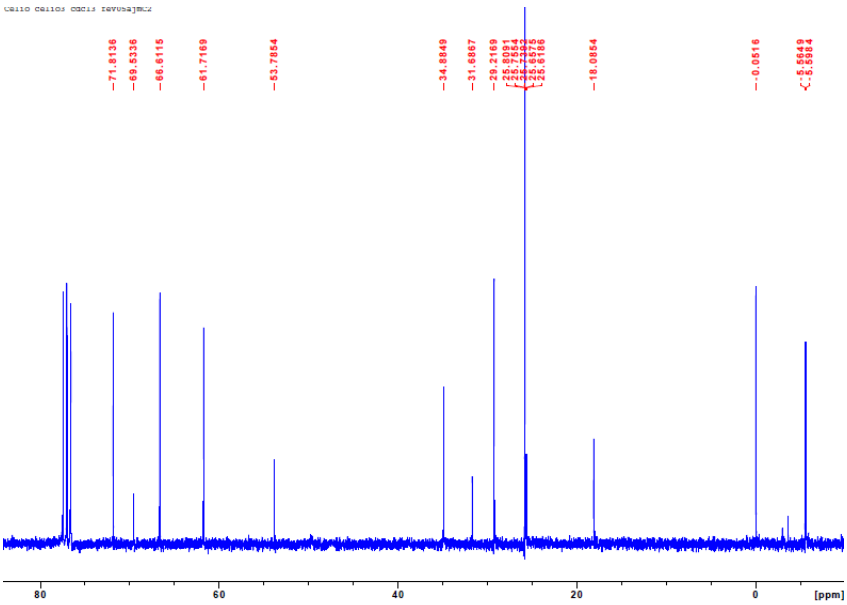
E 26: Espectro de RMN de ^{13}C, DEPT 90 e 135 º (125,69 MHz, $CDCl_3$) do (*S*)-**21**'.



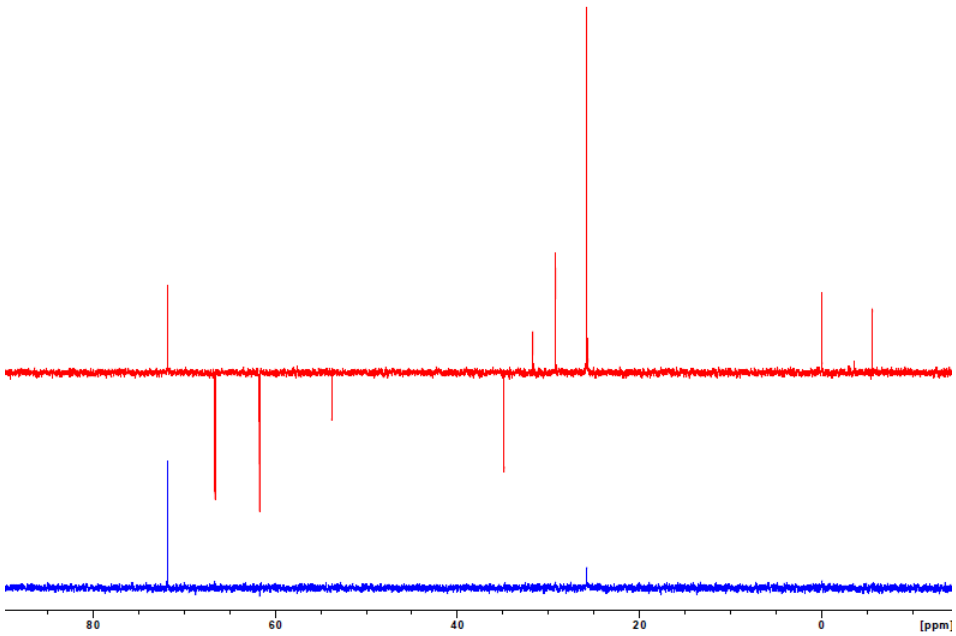
E 27: Espectro de RMN de 2D de ^{1}H e ^{13}C (HSQC, $CDCl_3$) do (*S*)-**21'.**



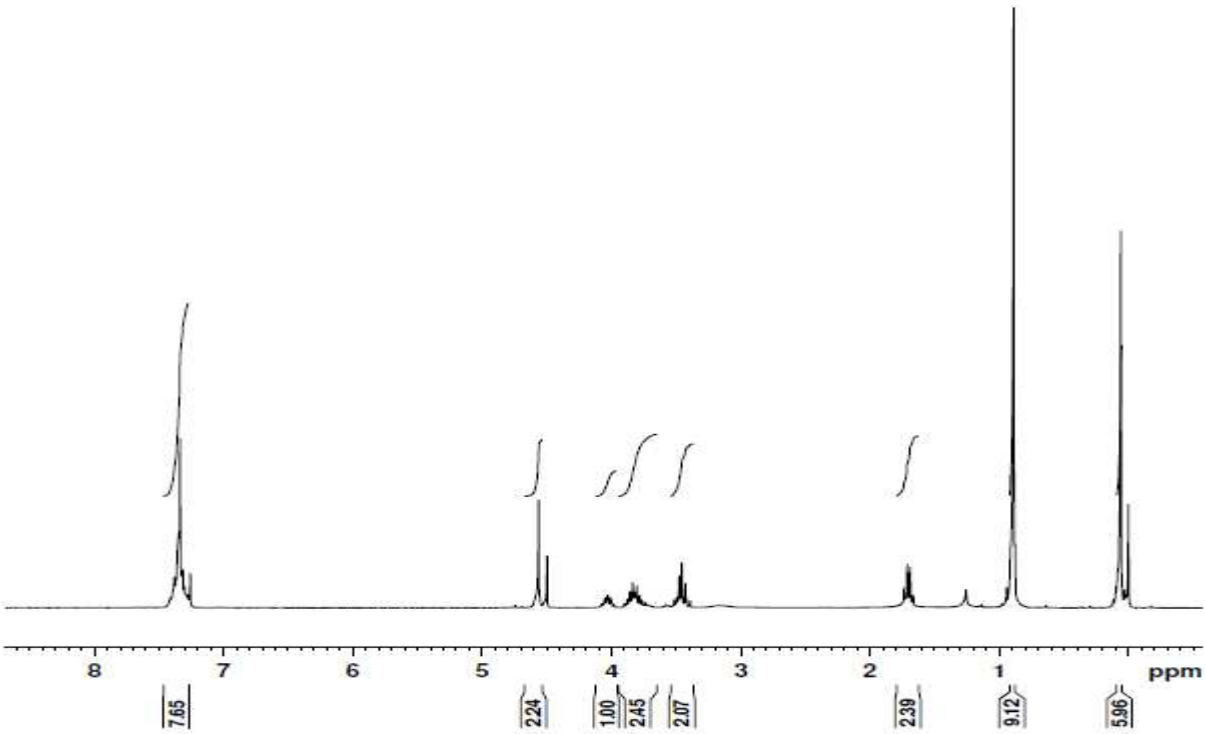
E 28: Espectro de RMN de ^{1}H (300,06 MHz, $CDCl_3$) de **33.**



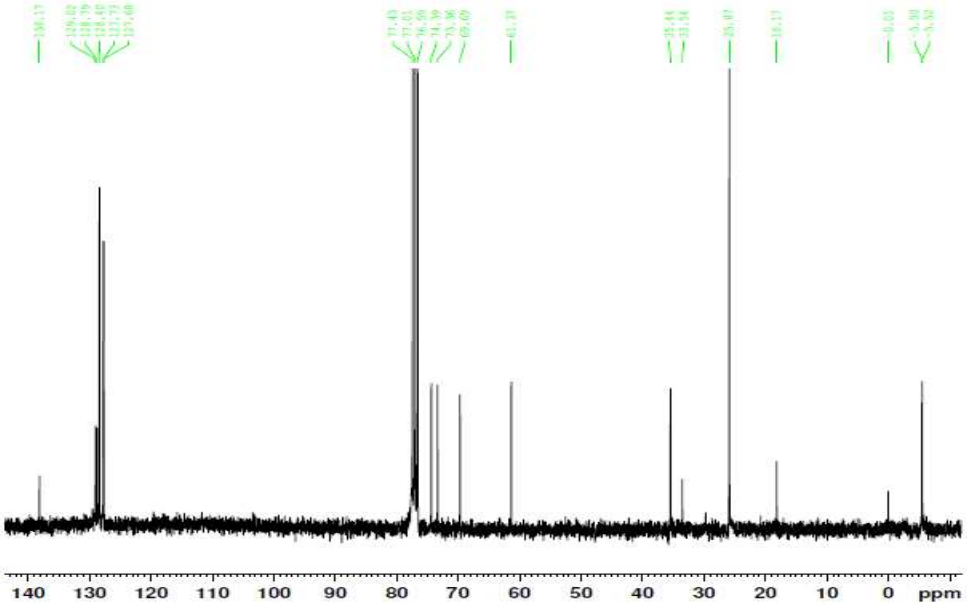
E 29: Espectro de RMN de ^{13}C (75,55 MHz, $CDCl_3$) de **33.**



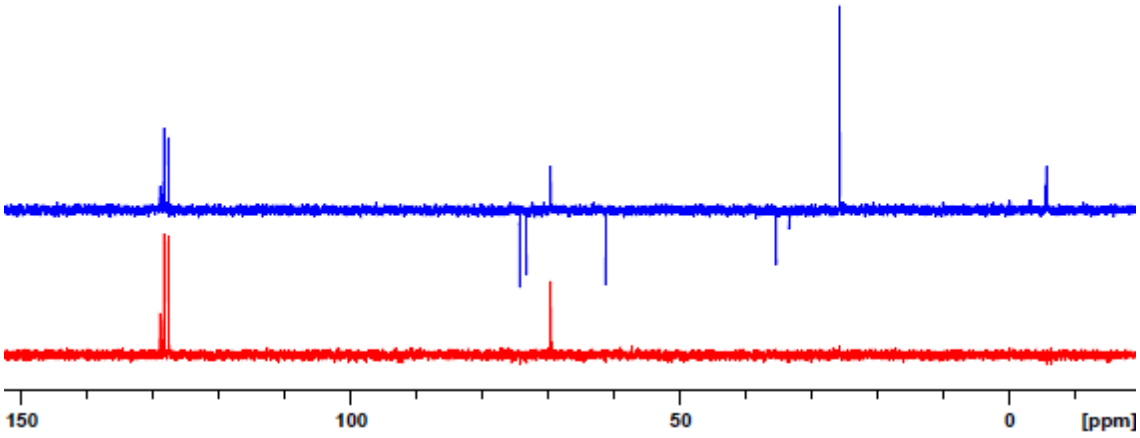
E 30: Espectro de RMN de ^{13}C DEPT 90 e 135 º (75,55MHz, $CDCl_3$) de **33**.



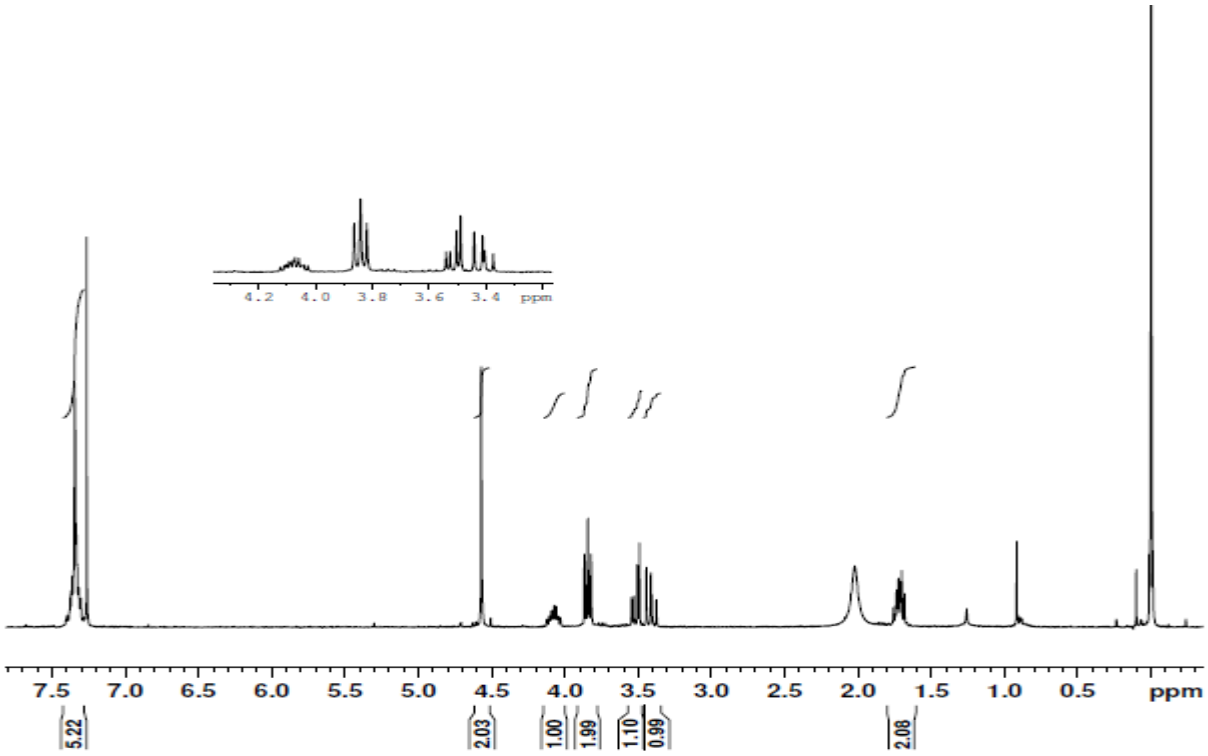
E 31: Espectro de RMN de ^{1}H (300,06 MHz, $CDCl_3$) de (±)**34.**



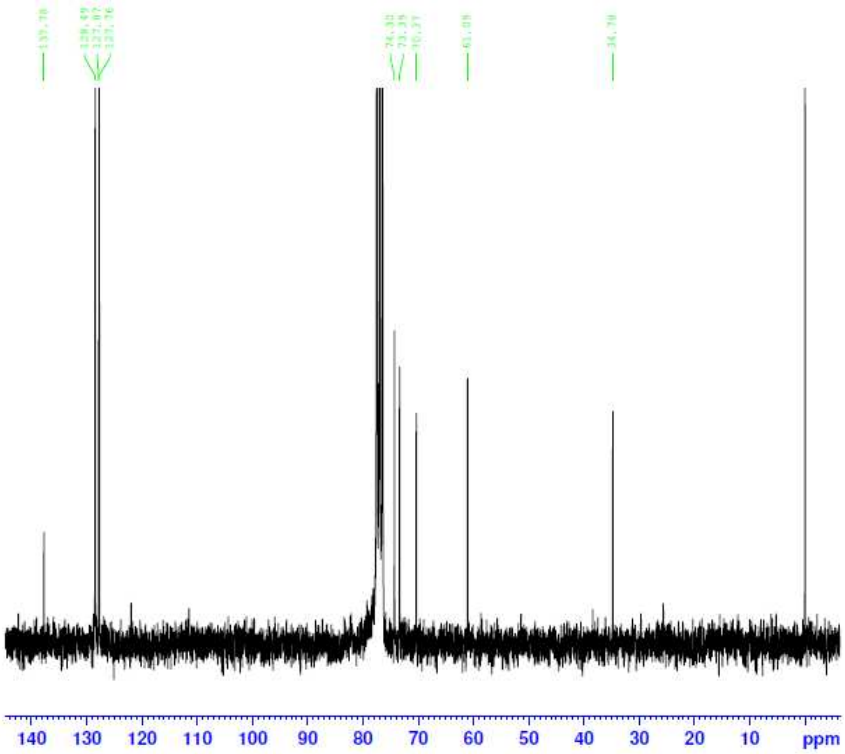
E 32: Espectro de RMN de ^{13}C (75,55 MHz, $CDCl_3$) de (±)-**34**.



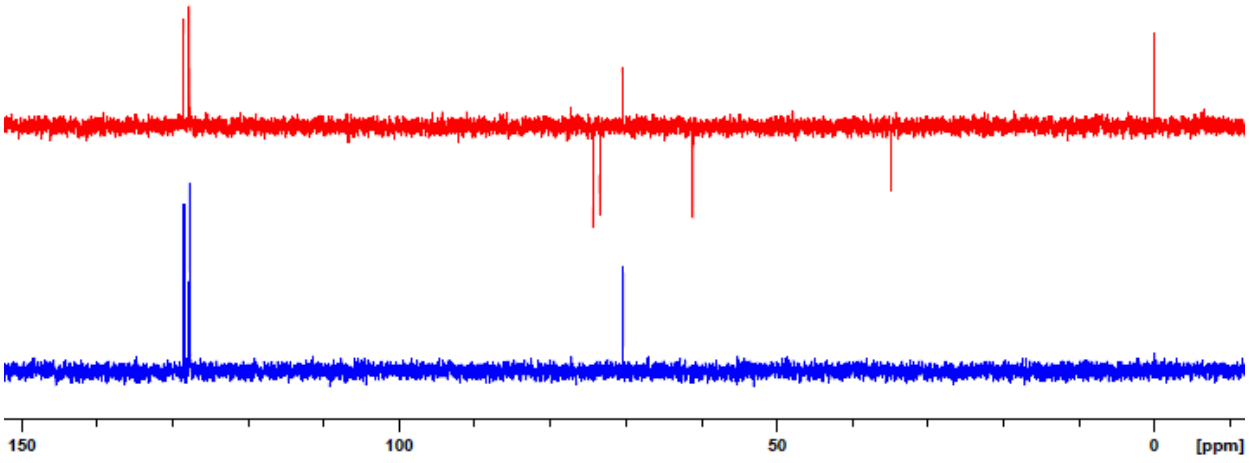
E 33: Espectro de RMN de ^{13}C, DEPT 90 e 135 º (125,69 MHz, $CDCl_3$) do (±)-**34**.



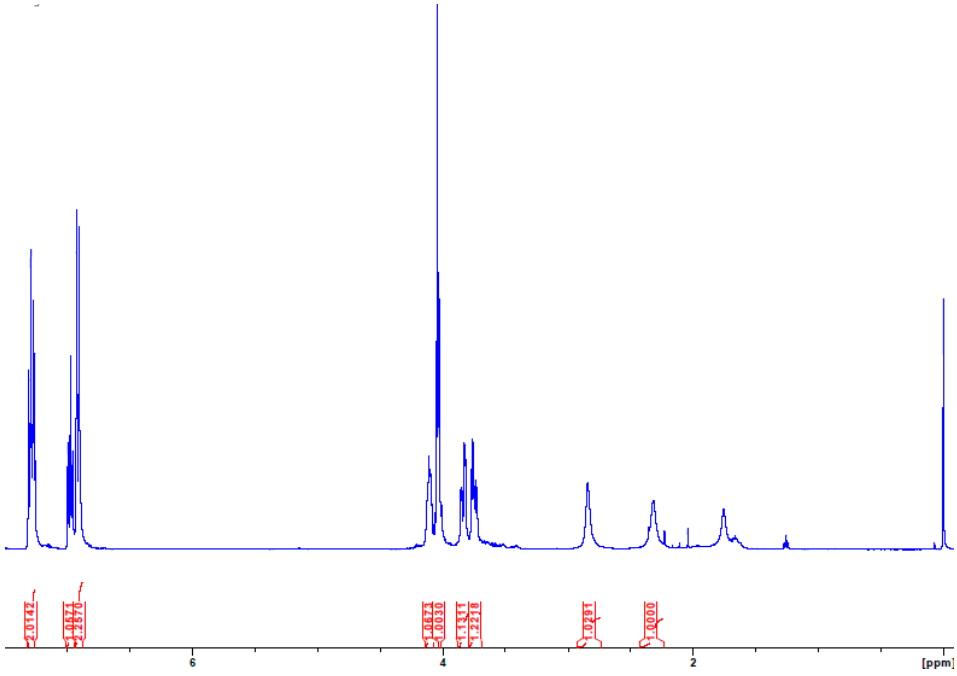
E 34: Espectro de RMN de ^{1}H (300,06 MHz, $CDCl_3$) de (±)-**22.**



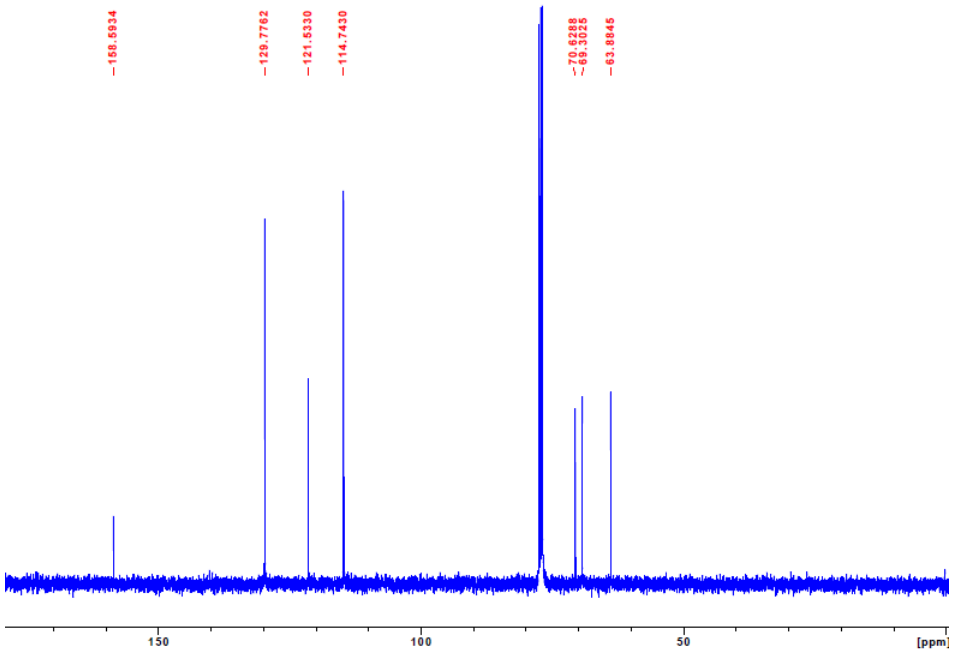
E 35: Espectro de RMN de ^{13}C (75,55 MHz, $CDCl_3$) de (±)-**22**.



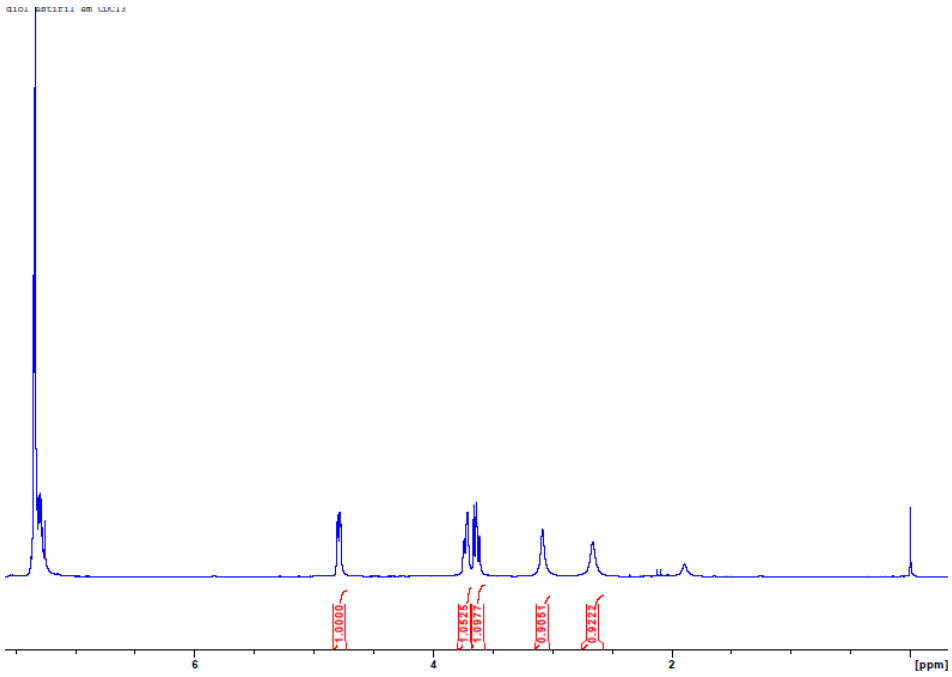
E 36: Espectro de RMN de ^{13}C, DEPT 90 e 135 º (125,69 MHz, $CDCl_3$) de (±)-**22**.



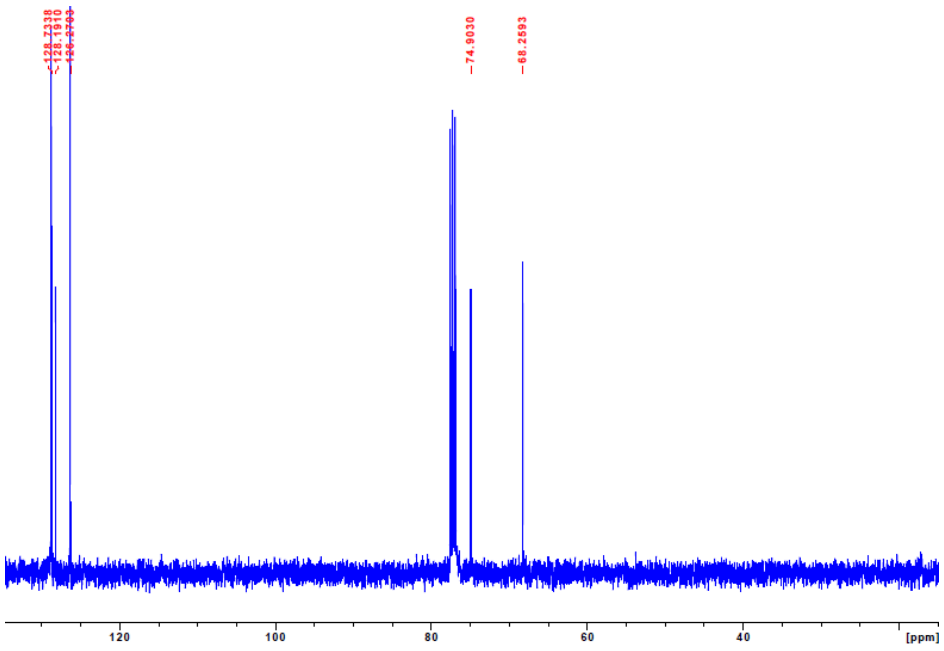
E 37: Espectro de RMN de ^{1}H (300,06 MHz, $CDCl_3$) de (±)-**24.**



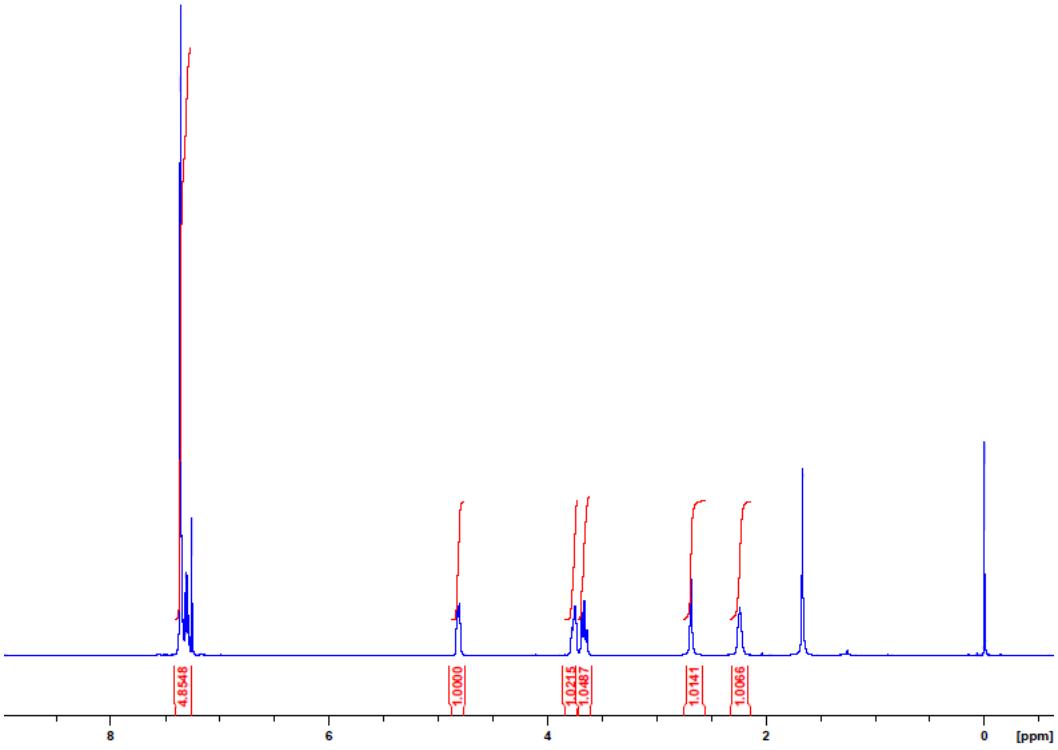
E 38: Espectro de RMN de ^{13}C (75,55 MHz, $CDCl_3$) de (±)-**24**.



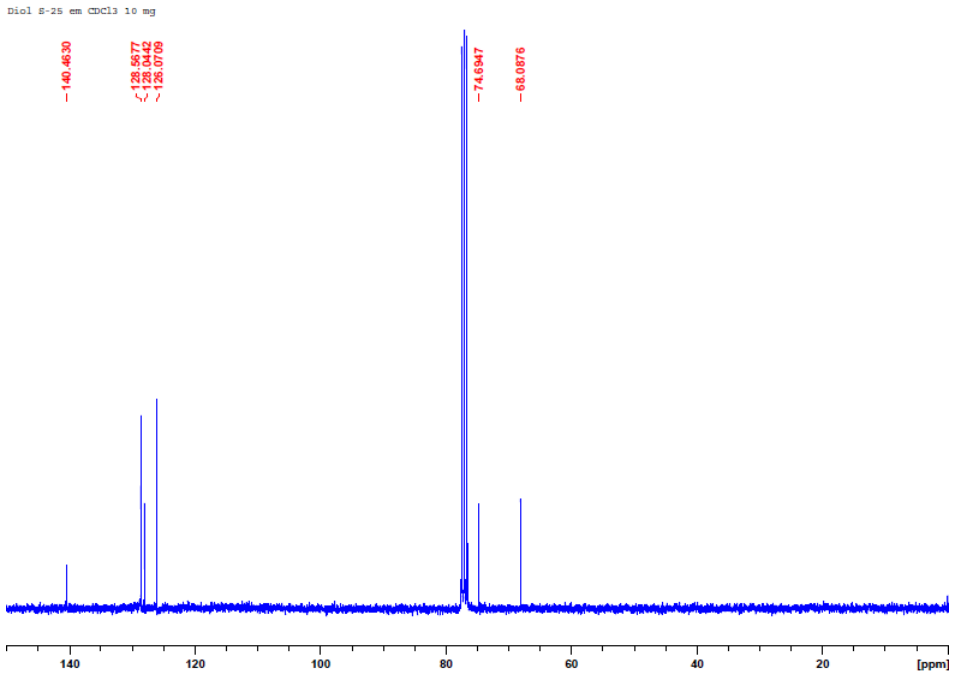
E 39: Espectro de RMN de ^{1}H (300,06 MHz, $CDCl_3$) de (±)-**25.**



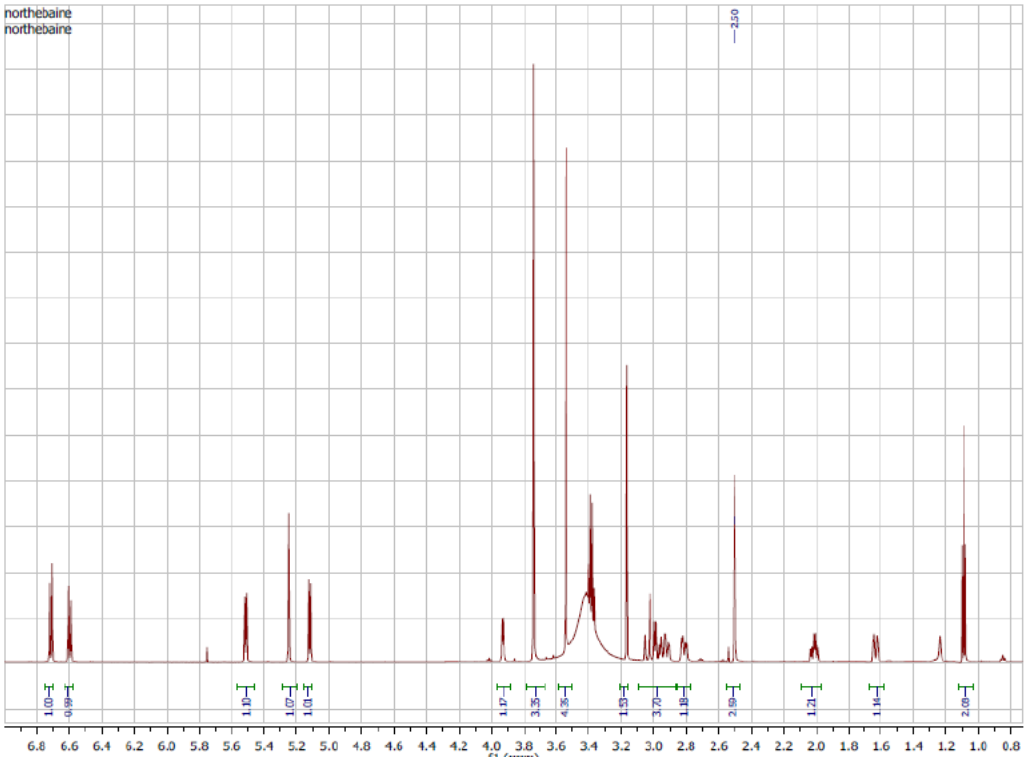
E 40: Espectro de RMN de ^{13}C (75,55 MHz, $CDCl_3$) de (±)-**25**.



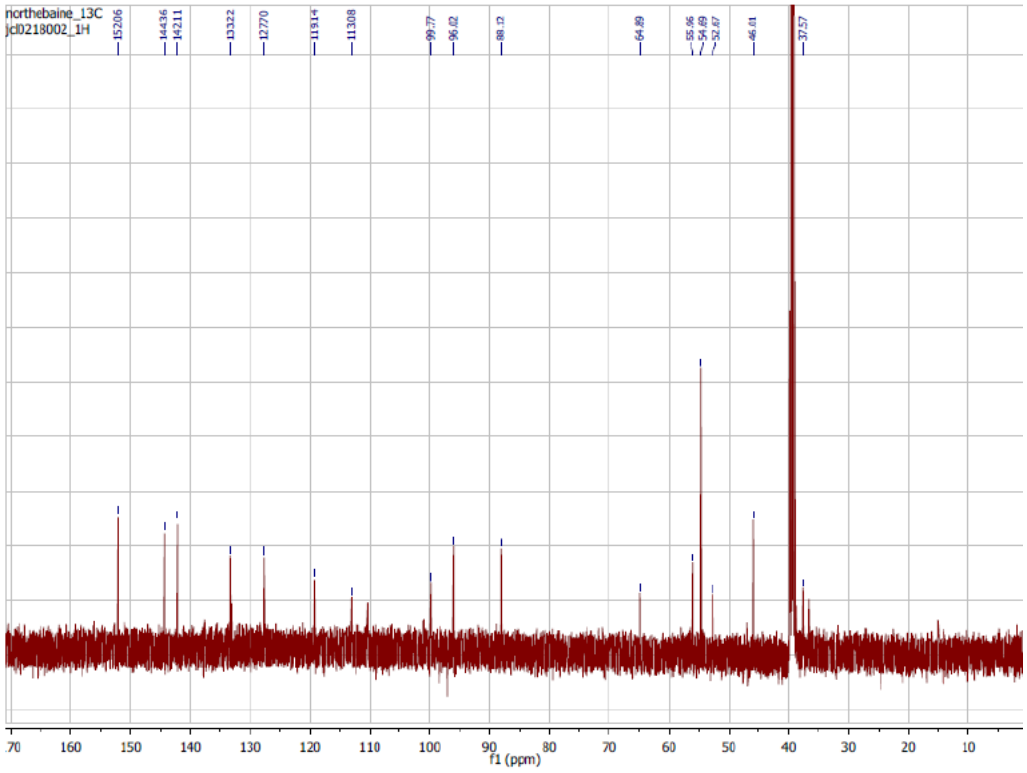
E 41: Espectro de RMN de ^{1}H (300,06 MHz, $CDCl_3$) de (*S*)-**25.**



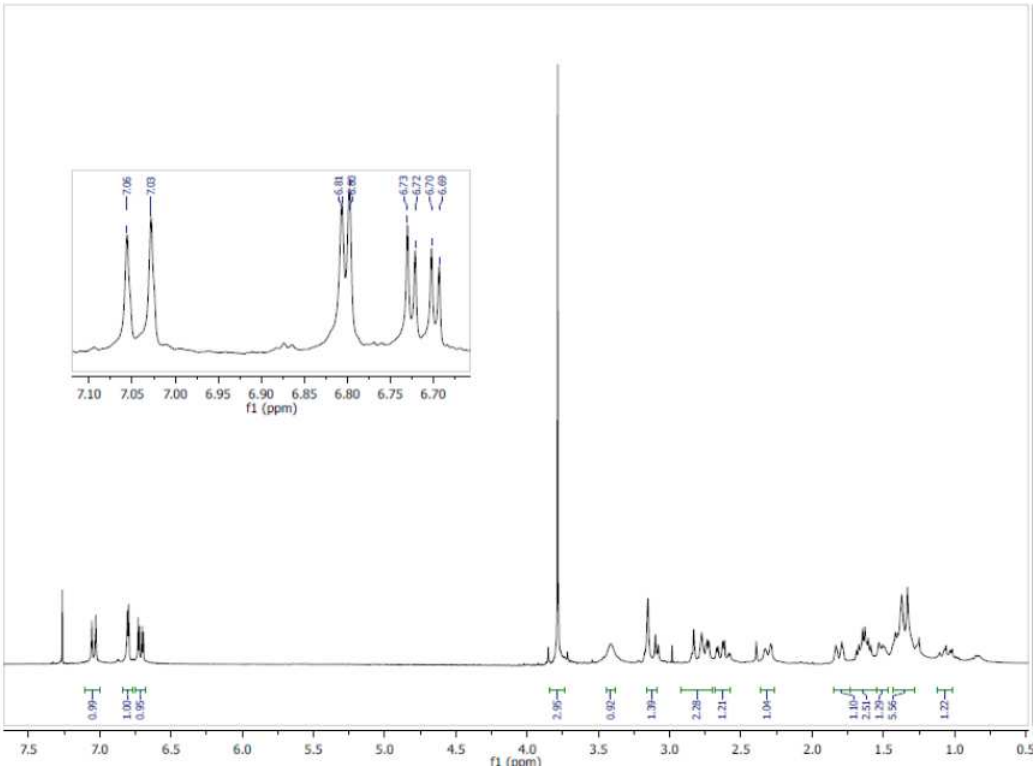
E 42: Espectro de RMN de ^{13}C (75,55 MHz, $CDCl_3$) de (*S*)-**25**.



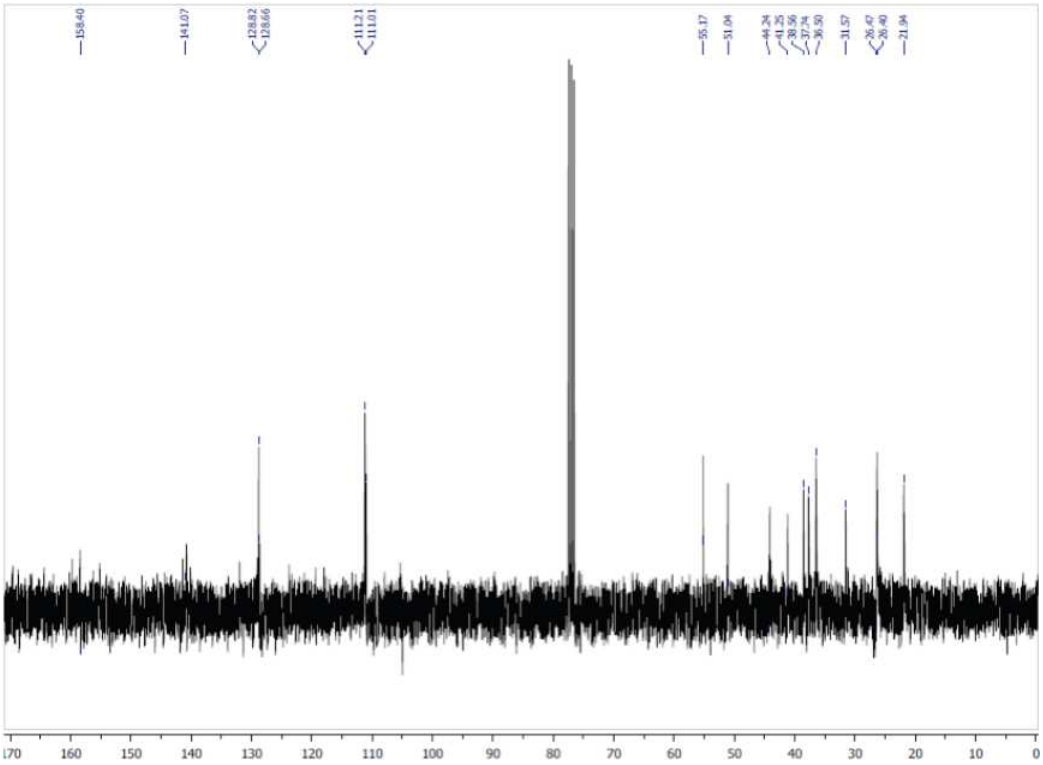
E 43: Espectro de RMN de ^{1}H (600,06 MHz, $(CD_3)_2SO_2$) de **51.**



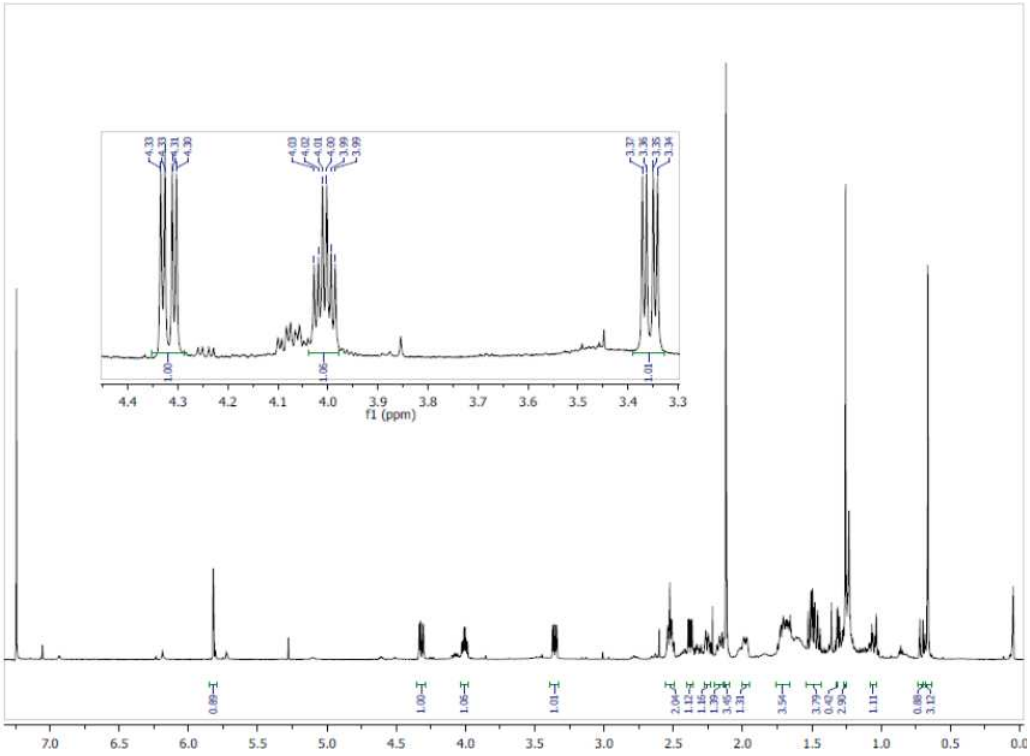
E 44: Espectro de RMN de ^{13}C (150 MHz, $(CD_3)_2SO_2$) de **51**.



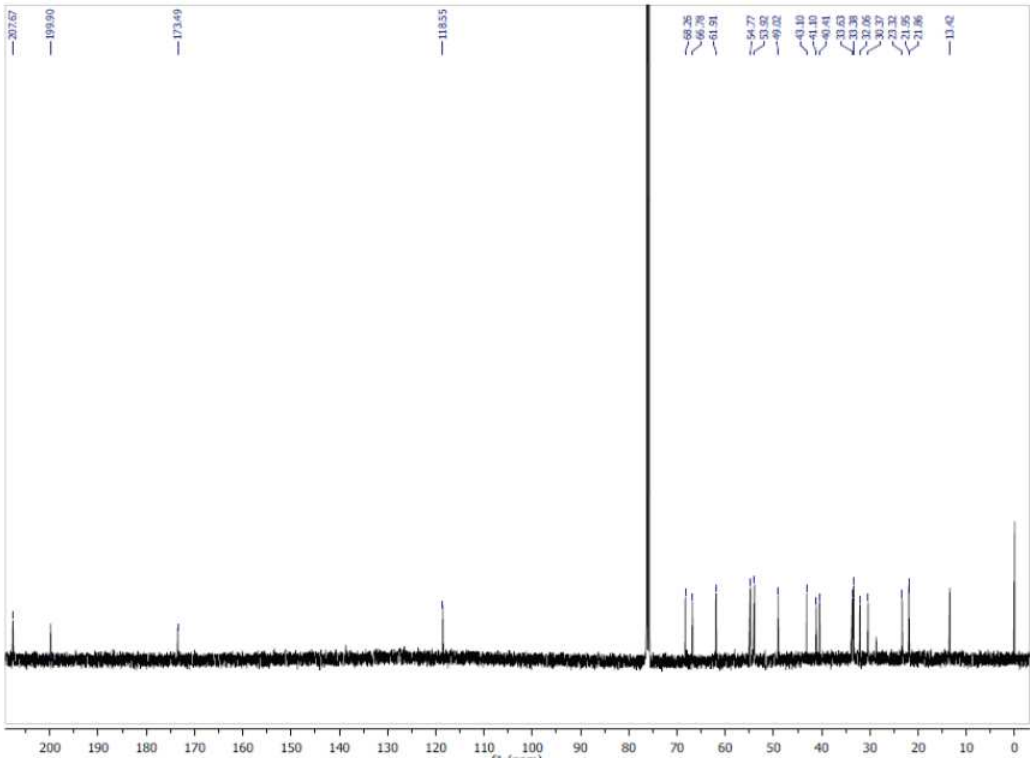
E 45: Espectro de RMN de ^{1}H (300,06 MHz, $CDCl_3$) de **52.**



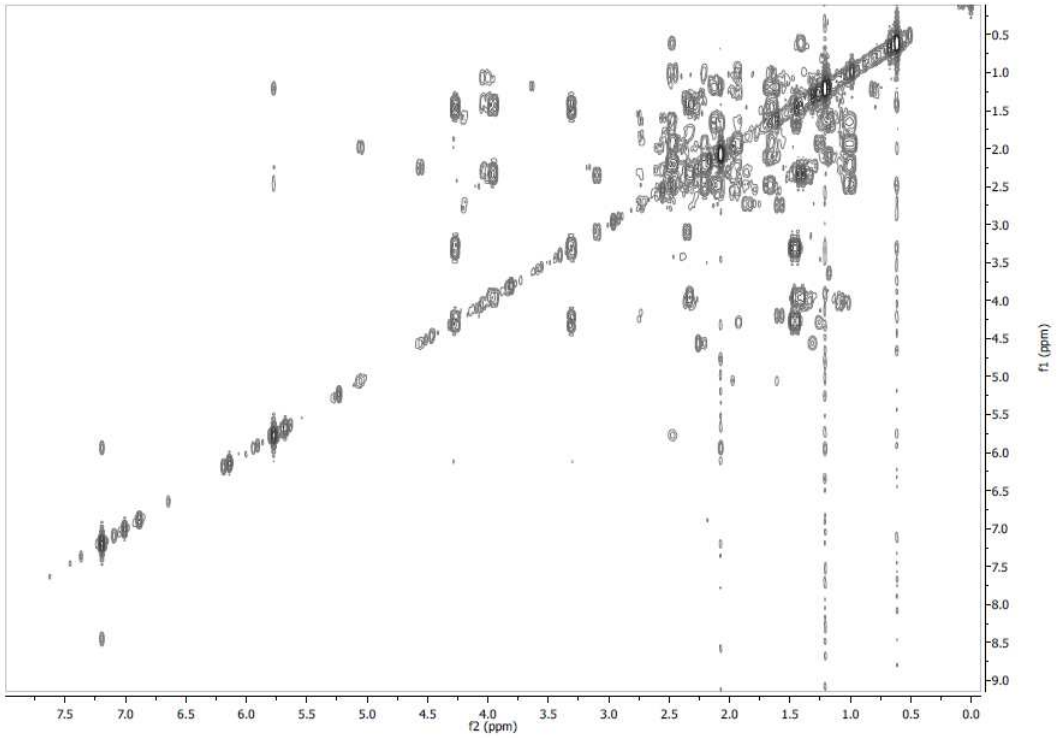
E 46: Espectro de RMN de ^{13}C (62 MHz, $CDCl_3$) de **52**.



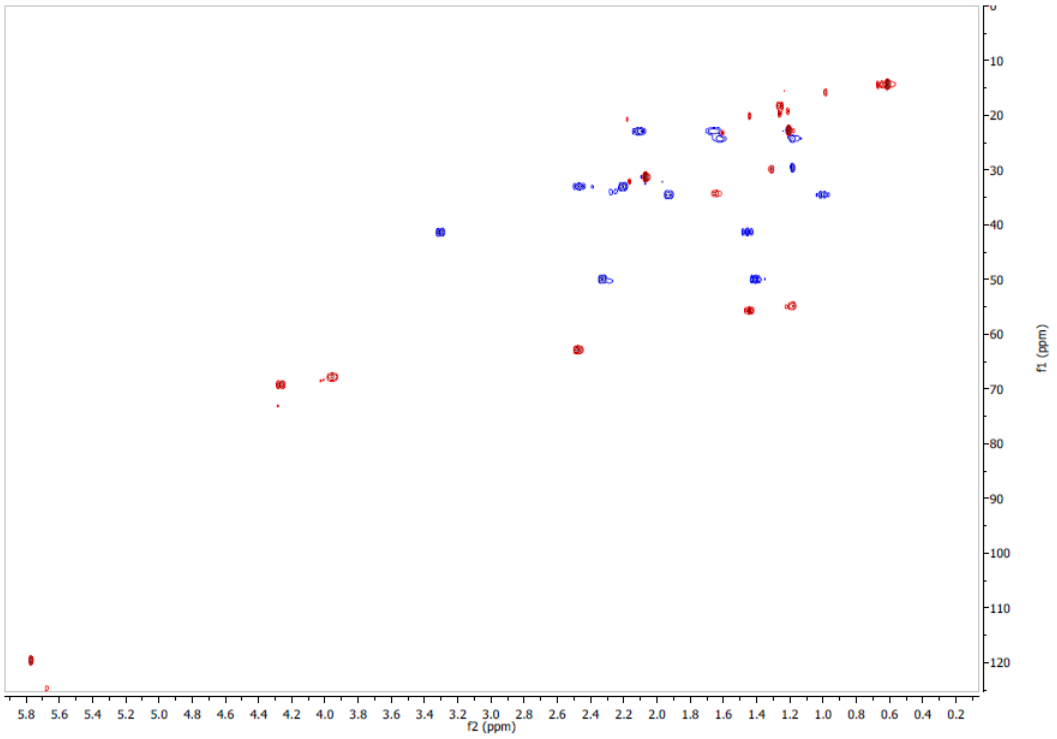
E 47: Espectro de RMN de ^{1}H (600,06 MHz, $(CD_3)_2SO_2$ de **53.**



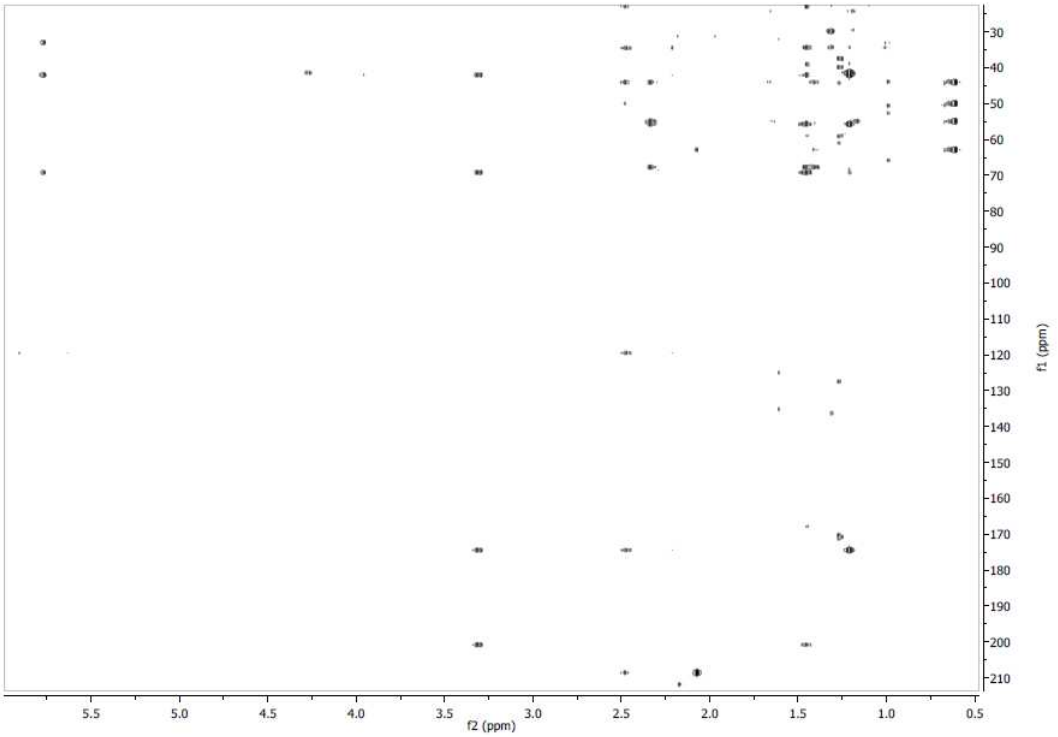
E 48: Espectro de RMN de ^{13}C (125,69 MHz, $(CD_3)_2SO_2$) de **53**.



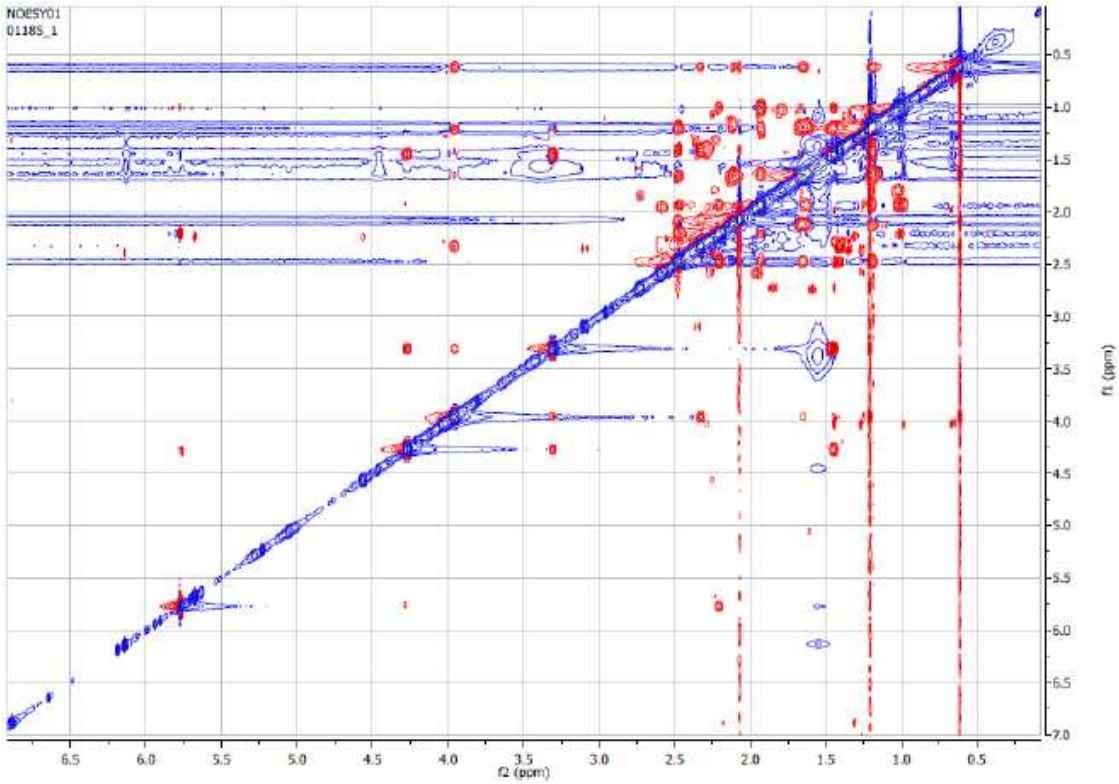
E 49: Espectro de RMN 2D de ^{1}H e ^{1}H (gCOSY, 600,06 MHz, $CDCl_3$) de **53.**



E 50: Espectro de RMN 2D de ^{1}H e ^{13}C (HSQC, $CDCl_3$) de **53.**



E 51: Espectro de RMN 2D de ^{1}H e ^{13}C (HMBC, $CDCl_3$) do **53**.



E 52: Espectro de RMN 2D de ^{1}H (NOESY, $CDCl_3$) do **53**