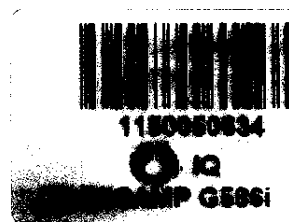


Universidade Estadual de Campinas  
Instituto de Química



**TESE DE DOUTORADO**

**“INTERMEDIÁRIOS SINTÉTICOS VERSÁTEIS,  
ENANTIOMERICAMENTE PUROS, OBTIDOS POR  
BIOCATÁLISE”**

Regina Aparecida Correia Gonçalves

Orientadora: Profa. Dra. Anita Jocelyne Marsaioli

Campinas – Fevereiro de 2002

*“Para achar água é preciso descer terra adentro,  
encharcar-se no lodo.  
Mas há os que preferem olhar os céus,  
e esperar pelas chuvas...”*

**Oduvaldo Vianna Filho, em Cúmplice da Paixão**

*Ao Ilimitado,*

*Deus*

*Aos meus pais,*

*Vaneide e Olympio*

*Aos meus irmãos, sobrinho e cunhado,*

*Luis, Dinho e Solange, Pedro Henrique e Arildo*

*Ao José Eduardo e a nossa querida Laura,*

*meus amores eternos.*

## AGRADECIMENTOS

À Prof. Dra. Anita J. Marsaioli, pela orientação, pela amizade, pelo amor à ciência, empolgação em cada resultado obtido, discussão e ensinamentos sobre a beleza da ciência, além de abrir todas as portas para que eu pudesse desenvolver minha pesquisa.

À Universidade Estadual de Maringá que permitiu a liberação para realização da pós-graduação.

Aos amigos do Departamento de Farmácia e Farmacologia, e em particular aos amigos Arildo, Isabel, Lucília e Regina.

Ao Dr. Gilson P. Manfio, Dra. Silvia Y. Eguchi, Edna H. Azumi e Ana Paula M. Zirbodi que proporcionaram o meu treinamento em algumas técnicas de microbiologia na Fundação Tropical “André Tosello”.

Aos Profs. Dr. Volker Bittrich e Dra. Maria do C. E. do Amaral (IB/UNICAMP) pela coleta das abelhas, seminários de grupo.

Aos Profs. Dr. Aderbal F. Magalhães, Dra. Eva G. Magalhães, Dr. Paulo M. Imamura, Sebastião F. Fonseca pelo convívio ao longo destes anos.

À CAPES que concedeu a bolsa durante o trabalho de pesquisa.

À FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo) pelos financiamentos concedidos à implantação do Projeto de Biocatálise.

À Universidade Estadual de Campinas e Instituto de Química, pela oportunidade e pelas facilidades encontradas no decorrer do meu trabalho.

À nossa técnica Dona Maria, pela competência, pela predisposição e pela amizade serena.

Aos meus amigos de grupo desta longa jornada: André, Beatriz, Bira, Clarinha, Cláudio, Denise, Domingos, Gelson, Laverde, Lídia, Luiz Antônio, Marisa, Marizinha, Paulo, Péricles, Renato, Ricardo, e Sérgio.

Aos funcionários do IQ pelos serviços prestados e em especial: Ao Iveraldo (Desenho), Bel, André (CPG), Paula, D. Iara e Samuel (xerox), Paula (RMN 80), Sônia & Sonia (RMN 300), Sônia (HPLC e pela sua amizade), Seu Fontana e Cláudio (Vidraria).

A todos os outros companheiros: Ana Lúcia, Carlos, Catarina, Celira, Gaspar, Inês, Ivânia, Juliana, Lurdinha, Marcelo, Marlon, Maria del Pilar, Miriam, Rosana, Valéria & Valéria.

Um agradecimento especial aos meus grandes amigos do doutorado: Ana, Flávio, Ana Flávia, Adauto, Samísia, Larissa e Denise.

Aos meus queridos tios e primos: Airton, Cida, Márcio e Guilherme, pelas presenças sempre constantes.

À Dona Célia, Sr. José, Márcia, Marcio, Luiz, Vera e Cida pela amizade e força durante todo o doutorado.

## RESUMO

### INTERMEDIÁRIOS SINTÉTICOS VERSÁTEIS, ENANTIOMERICAMENTE PUROS, OBTIDOS POR BIOCATÁLISE

Regina Aparecida Correia Gonçalves

Orientadora: Profa. Dra. Anita Jocelyne Marsaioli

O trabalho apresentado nesta tese refere-se à avaliação da atividade enzimática de microrganismos pertencentes a Coleção de Culturas Tropicais da Fundação Tropical “André Tosello” e de outros isolados de ambientes específicos, visando sua aplicação em transformações orgânicas preparativas.

O primeiro capítulo descreve o isolamento de microrganismos de ambientes específicos: solo e abelhas *Trigona* sp. Foram isoladas 35 bactérias do solo de cana-de-açúcar previamente tratado com cicloexanodiol e das abelhas *Trigona* sp, que coletavam resina floral de *Clusia*, material com atividade antibiótica conhecida, 17 fungos foram isolados.

Os procedimentos do plano de síntese dos 8 substratos e produtos racêmicos não comerciais foram elaborados e estão descritos no segundo capítulo. Os derivados da ciclobutanona foram utilizados para monitorar a atividade enzimática dos microrganismos isolados de ambientes específicos e da Coleção de Culturas Tropicais da Fundação Tropical “André Tosello”. As bactérias isoladas do solo apresentaram atividade de oxidoredutase, enquanto os fungos isolados de abelhas *Trigona* sp, biotransformaram os derivados da ciclobutanona em derivados do ciclobutanol e em derivados da  $\gamma$ -butirolactona. Uma atividade de Baeyer Villigerase significativa está presente nos microrganismos *Curvularia lunata* CCT 5629 e *Aspergillus niger* CCT 5559. Estes resultados estão descritos no capítulo 3.

O capítulo 4 descreve reações biocatalisadas que produzem compostos de interesse. Redução da 4-metil-heptano-3,4-diona com células íntegras da *Serratia*

*rubidaea* CCT 5732 e de *Aspergillus terreus* CCT 3320 conduz a síntese de intermediários chaves dos feromônios (+)-“Sitophilure” e (-)-“Stegobiol” via biorredução com alto enantio e diastereosseletividade. A *Serratia rubidaea* CCT 5732 foi eficiente na redução enantiosseletiva de  $\beta$ -cetoéster. O caminho estereoquímico da reação pode ser explicado através da atividade conjunta de duas enzimas, enolase e oxidoredutase, resultando numa resolução dinâmica parcial com racemização “*in situ*”.

Finalmente, a *Serratia rubidaea* foi suportada numa matriz inorgânica de Sílica-Titânia ( $\text{SiO}_2/\text{TiO}_2$ ) preparada pelo processo sol-gel, visando disponibilizar as células íntegras de *Serratia rubidaea* como um reagente químico com um tempo de prateleira de pelo menos alguns meses. Este objetivo foi alcançado e as células suportadas foram ativas por 2 meses com manutenção da enantio e diastereosseletividade.

## ABSTRACT

### ENANTIOMERICALLY PURE VERSATILE SYNTHETIC INTERMEDIATES VIA BIOCATALYSIS

Regina Aparecida Correia Gonçalves

Adviser: Profa. Dra. Anita Jocelyne Marsaioli

The work presented in this thesis refers to the evaluation of the enzymatic activity of microorganisms from the Culture Collection of the "Fundação Tropical André Tosello" and others isolated from specific environments, with a view to their application for preparative organic transformations.

The first chapter describes the isolation of microorganisms from two specific environments: soil and *Trigona* sp bees. Thus, 35 bacteria were isolated from sugarcane plantation soil previously treated with cyclohexanediol and from *Trigona* sp bees, collecting *Clusia* floral resin, material of known antibiotic activity, 17 fungi were isolated.

Proceeding according to plan the synthesis of 8 racemic noncommercial substrates and products were elaborated and are described in second chapter. The cyclobutanone derivatives were used to monitor the enzymatic activity of microorganisms isolated from specific environments and from the Culture Collection of the "Fundação Tropical André Tosello". The bacteria from the soil mainly depicted oxidoreductase activity while the *Trigona* sp bees fungi biotransformed cyclobutanone derivatives into cyclobutanol derivatives and into  $\gamma$ -butyrolactone derivatives. A significant B.Villigerase activity exists in microorganisms *Curvularia lunata* CCT 5623 and *Aspergillus niger* CCT 5559. These results are described in chapter 3.

Chapter 4 focus reactions producing compounds of interest. Therefore reduction of 4-methyl-heptane-3,4-dione with *Serratia rubidaea* CCT 5732 and

*Aspergillus terreus* CCT 3320 whole of cells led to the synthesis of (+)-Sitophilure and (-)-Stegobiol pheromones key intermediate via bioreduction in high enantio and diastereoselectivity. *Serratia rubidaea* CCT 5732 was also efficient in enantioselective  $\beta$ -ketoester reduction. The reaction stereochemical pathway could be explained by invoking the joint activity of two enzymes, enolase and oxidoreductase, resulting in a dynamic resolution with “*in situ*” racemization.

Finally *Serratia rubidaea* was supported onto an inorganic matrix of Silica-Titania ( $\text{SiO}_2/\text{TiO}_2$ ) prepared by sol-gel process viewing to transform the *Serratia rubidaea* whole cells into a chemical reagent with a shelf time of at least some months. This was indeed achieved and the supported cells were active for 2 months with no detectable deterioration of the enantio and diastereoselectivity.



## **CURRICULUM VITAE**

### **Formação Acadêmica**

- Bacharelado em Farmácia pela Universidade Estadual de Maringá – Maringá PR..
- Mestrado em Química Aplicada ao Meio Ambiente, área de concentração Química Orgânica pela Universidade Estadual de Maringá – Maringá, PR. Dissertação: “Síntese, Caracterização por RMN de  $^1\text{H}$  e de  $^{13}\text{C}$  e Ensaio Toxicológico do *cis* e *trans*-1(((Dimetilamino)-carbonil)oxi)-2-N,N-dimetilaminocicloexano”.

### **Formação profissional**

Professora Não Titular no Departamento de Farmácia e Farmacologia da Universidade Estadual de Maringá desde 11 de julho de 1990.

### **Trabalhos em Congressos Científicos**

Gonçalves, R. A. C.; Riatto, v. B.; Pilli, R. A.; Marsaioli, A. J., *Enantioselective and Diastereoselective Reduction of meso Diketone with Aspergillus Terreus*, **22<sup>nd</sup> IUPAC International Symposium on the Chemistry of Nature Products**, setembro de 2000, São Carlos – SP – Brasil.

Bicalho, B.; Gonçalves, R. A. C.; Zirbordi, A. P. M.; Manfio, G. P.; Marsaioli, A. J., *Bioactive Macrolactones Produced by Filamentous Fungi Isolated from bees (Trigona sp.)*, **22<sup>nd</sup> IUPAC International Symposium on the Chemistry of Nature Products**, setembro de 2000, São Carlos – SP – Brasil.

Gonçalves, R. A. C.; Gonçalves, J. E.; Gushikem, Y.; Marsaioli, A. J., *Immobilization of Bacteria Serratia rubidaea on Silica-Titania Mixed Oxide*, **22<sup>nd</sup> IUPAC International Symposium on the Chemistry of Nature Products**, setembro de 2000, São Carlos – SP – Brasil.

Gonçalves, R. A. C.; Marsaioli, A. J., *Enantioselective Reduction of  $\beta$ -Ketoesters with Serratia rubidaea*, **2<sup>nd</sup> IUPAC International Conference on Biodiversity**, julho de 1999, Belo Horizonte – MG – Brasil.

Gonçalves, R. A. C.; Cagnon, J. R.; Marsaioli, A. J., *Aplicação de Microorganismos na Lactonização de Ciclobutanonas*, **21<sup>a</sup> Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química**, maio de 1998, Poços de Caldas – MG.

Gonçalves, R. A. C.; Zibordi, A. P. M.; Bittrich, V.; Marsaioli, A. J., *Interação Mutualística entre Clusia (Plantas), Trigonas (Abelhas) e Microorganismos*, 21<sup>a</sup> **Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química**, maio de 1998, Poços de Caldas – MG.

Gonçalves, R. A. C.; Cagnon, J. R.; Manfio, G.; Marsaioli, A. J., *Isolamento de Microorganismos do Solo de Cana-de-Açúcar da Região de Campinas e Avaliação Preliminar do Potencial de Biotransformação*, 21<sup>a</sup> **Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química**, maio de 1998, Poços de Caldas – MG.

Marsaioli, A. J.; Porto, A. L. M.; Gonçalves, R. A. C.; Oliveira, C. M. A.; Manfio, G. P.; Bittrich, V., *The Ecosystem of Microorganisms, Bees and Clusia Floral Resin and Oils, from the Chemistry Point of View*, **IUPAC – International Conference on Biodiversity and Bioresources – Conservation and Utilization**, novembro de 1997, Phuket – Thailand.

#### **Palestra Ministrada**

*Biotransformação de Alguns Intermediários na Síntese de Produtos Farmacêuticos*, **X Jornada Farmacêutica, V Jornada Internacional de Umuarama**, maio de 2000, Umuarama – Pr – Brasil.

Ministrou a parte experimental e auxiliou na elaboração da apostila do curso “*Aplicações de Biocatálise na Produção de Compostos Homoquirais*”, **AUGM/IQ-UNICAMP/Fundação Tropical “André Tosello”** julho de 2000, Campinas – SP – Brasil.

#### **Artigo Publicado**

Marsaioli, A. J.; Porto, A. L. M.; Gonçalves, R. A. C.; Oliveira, C. M. A.; Manfio, G. P.; Bittrich, V., *The Ecosystem of Microorganisms, Bees and Clusia Floral Resin and Oils, from the Chemistry Point of View*, IUPAC.

#### **Patente**

Marsaioli, A. J.; Gonçalves, R. A. C.; Gonçalves, J. E.; Gushikem, Y., *Processo de Imobilização de Serratia rubidaea CCT 5732 em Óxido Misto de Sílica-Titânia*, relatório técnico protocolizado no INPI sob nº 100.200-7 (Patente requerida).

## *ÍNDICE*

|                                                                   | <b>pg.</b>    |
|-------------------------------------------------------------------|---------------|
| <b>LISTA DE ESQUEMAS</b>                                          | <b>xxiii</b>  |
| <b>LISTA DE FIGURAS</b>                                           | <b>xxvii</b>  |
| <b>LISTA DE TABELAS</b>                                           | <b>xxxI</b>   |
| <b>LISTA DE ABREVIATURAS</b>                                      | <b>xxxiii</b> |
| <b>LISTA DE ESPECTROS</b>                                         | <b>xxxv</b>   |
| <br>                                                              |               |
| <b>INTRODUÇÃO</b>                                                 | <b>01</b>     |
| <br>                                                              |               |
| <b>OBJETIVO</b>                                                   | <b>14</b>     |
| <br>                                                              |               |
| <b>Capítulo I – Isolamento de microrganismos</b>                  | <b>15</b>     |
| <b>I. Isolamento de microrganismos de ambientes específicos</b>   | <b>17</b>     |
| <b>I.1. Isolamento de bactérias do solo</b>                       | <b>18</b>     |
| <b>I.1.1. Considerações gerais</b>                                | <b>18</b>     |
| <b>I.1.2. Técnica de seleção de microrganismos por</b>            |               |
| <b>enriquecimento do solo.</b>                                    | <b>20</b>     |
| <b>I.1.2.1. Seleção dos meios de culturas para isolamento das</b> |               |
| <b>bactérias do solo de cana-de-açúcar.</b>                       | <b>20</b>     |
| <b>I.1.2.2. Contagem e identificação das colônias</b>             | <b>21</b>     |

|                                                                                                                                                                                         |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| I.1.2.3. Obtenção de culturas puras e isolamento por estria                                                                                                                             | 22 |
| I.1.2.4. Preservação das bactérias do solo                                                                                                                                              | 25 |
| I.2. Isolamento de fungos da abelha <i>Trigona</i> sp                                                                                                                                   | 25 |
| I.2.1. Ensaaios Biológicos                                                                                                                                                              | 29 |
| I.2.1.1. Ensaio bioautográfico com as resinas florais de<br><i>Clusia</i> e o ninho das abelhas <i>Trigona</i> sp                                                                       | 29 |
| I.2.1.2. Técnica de disco de difusão em ágar                                                                                                                                            | 30 |
| I.3. Conclusões                                                                                                                                                                         | 34 |
| <br>Capítulo II – Síntese dos Substratos e Padrões Racêmicos                                                                                                                            | 35 |
| II.1. Preparo dos substratos e padrões racêmicos                                                                                                                                        | 37 |
| II.1.1. Preparo do <i>cis</i> e <i>trans</i> cicloexanodiol ( <u>10</u> e <u>11</u> )                                                                                                   | 37 |
| II.1.2. Preparo dos $\beta$ -cetoésteres <u>13</u> e <u>15</u>                                                                                                                          | 38 |
| II.1.3. Preparo das ciclobutanonas pró-quirais <u>21</u> e <u>22</u>                                                                                                                    | 47 |
| <br>Capítulo III – Avaliação da Atividade Biocatalítica                                                                                                                                 | 51 |
| III. Monitoramento de linhagens isoladas de ambientes específicos<br>e de algumas linhagens puras e autenticadas obtidas a partir da<br>coleção de culturas da fundação “André Tosello” | 53 |
| III.1. Triagem de microrganismos para lactonização das<br>ciclobutanonas pró-quirais.                                                                                                   | 53 |

|                                                                                                                                        |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| III.2. Avaliação da atividade biocatalítica das bactérias isoladas do solo de cana-de-açúcar                                           | 54 |
| III.3. Avaliação de potencial biocatalítico de fungos isolados da abelha <i>Trigona</i> sp                                             | 56 |
| III.4. Avaliação do potencial enzimático de linhagens puras isoladas do Território Nacional                                            | 63 |
| III.5. Conclusão                                                                                                                       | 67 |
| IV – Reações Biocatalisadas                                                                                                            | 69 |
| IV. Reações Biocatalisadas Úteis para Produção de Blocos Quirais de Interesse Sintético                                                | 71 |
| IV.1. Biotransformações redutivas de compostos carbonílicos                                                                            | 71 |
| IV.2. Reduções biocatalíticas de dicetona                                                                                              | 74 |
| IV.2.1. Considerações gerais                                                                                                           | 74 |
| IV.2.2. Resultados e Discussões                                                                                                        | 76 |
| IV.2.3. Condições experimentais para selecionar células de <i>Serratia rubidaea</i> CCT 5732 na presença do álcool racêmico <u>29a</u> | 80 |
| IV.3. Redução microbial assimétrica de $\beta$ -cetoésteres                                                                            | 83 |
| IV.3.1. Considerações gerais                                                                                                           | 83 |
| IV.3.2. Resultados e discussão                                                                                                         | 84 |
| IV.4. Conclusão                                                                                                                        | 91 |

|                                                                                                                                                                  |            |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| <b>Capítulo V – Imobilização da <i>Serratia rubidaea</i> CCT 5732 no Óxido Misto SiO<sub>2</sub>/TiO<sub>2</sub></b>                                             | <b>93</b>  |
| <b>V. Imobilização da bactéria <i>Serratia rubidaea</i> CCT 5732</b>                                                                                             | <b>95</b>  |
| <b>V.1. Considerações gerais</b>                                                                                                                                 | <b>95</b>  |
| <b>V.2. Imobilização da bactéria <i>Serratia rubidaea</i> CCT 5732 no Óxido Binário Sílica –Titânia (SiO<sub>2</sub>/TiO<sub>2</sub>) e Reação Biocatalítica</b> | <b>99</b>  |
| <b>V.3. Características do material suporte</b>                                                                                                                  | <b>100</b> |
| <b>V.4. Conclusão</b>                                                                                                                                            | <b>110</b> |
| <b>CONCLUSÃO FINAL</b>                                                                                                                                           | <b>111</b> |
| <b>CONCLUSÃO FINAL</b>                                                                                                                                           | <b>113</b> |
| <b>VI – EXPERIMENTAL</b>                                                                                                                                         | <b>115</b> |
| <b>VI.1. INSTRUMENTAÇÃO E CONDIÇÕES</b>                                                                                                                          | <b>117</b> |
| <b>VI.2. PROCEDIMENTOS GERAIS ADOTADAS NO LABORATÓRIO DE BIOCATÁLISE</b>                                                                                         | <b>121</b> |
| <b>VI.3. ISOLAMENTO DE MICRORGANISMOS DE AMBIENTES ESPECÍFICOS</b>                                                                                               | <b>123</b> |
| <b>VI.4. ENSAIOS BIOLÓGICOS</b>                                                                                                                                  | <b>128</b> |
| <b>VI.5. EXPERIMENTAL REFERENTE À OBTENÇÃO DOS</b>                                                                                                               |            |

|                                                                                                                                                                                              |            |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| <b>COMPOSTOS SINTETIZADOS NESTE TRABALHO</b>                                                                                                                                                 | <b>130</b> |
| <b>VI.6. MONITORAMENTO DAS LINHAGENS ISOLADAS E<br/>DE LINHAGENS PURAS E AUTENTICADAS DO TERRITÓRIO<br/>NACIONAL</b>                                                                         | <b>161</b> |
| <b>VI.7. REAÇÕES BIOCATALISADAS ÚTEIS PARA PRODUÇÃO DE<br/>BLOCOS QUIRAIS DE INTERESSE SINTÉTICO</b>                                                                                         | <b>166</b> |
| <b>VI.8. IMOBILIZAÇÃO DA <i>Serratia rubidaea</i> CCT 5732 EM<br/>ÓXIDO MISTO SÍLICA-TITÂNIA (SiO<sub>2</sub>/TiO<sub>2</sub>)</b>                                                           | <b>169</b> |
| <b>VI.9. TENTATIVA DE IMOBILIZAÇÃO DOS FUNGOS<br/><i>Aspergillus terreus</i> CCT 3320 E <i>Rhizopus oryzae</i> CCT 4964 NA<br/>MATRIZ SÍLICA – TITÂNIA (SiO<sub>2</sub>/TiO<sub>2</sub>)</b> | <b>174</b> |
| <b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>                                                                                                                                                            | <b>177</b> |
| <b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>                                                                                                                                                            | <b>179</b> |
| <b>APÊNDICE</b>                                                                                                                                                                              | <b>189</b> |
| <b>ESPECTROS</b>                                                                                                                                                                             | <b>191</b> |

## LISTA DE ESQUEMAS

|                                                                                                                                                        | pg. |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| <b>Esquema 1:</b> Nicotinamida adenina dinucleotídeo (NADH) e Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH)                                       | 04  |
| <b>Esquema 2:</b> Biorredução de compostos carbonílicos e derivados.                                                                                   | 04  |
| <b>Esquema 3:</b> Reação de regeneração do cofator nas células.                                                                                        | 05  |
| <b>Esquema 4:</b> Reciclagem de NADPH nas reduções catalisadas por enzimas                                                                             | 06  |
| <b>Esquema 5:</b> Reações de oxidação enzimáticas.                                                                                                     | 08  |
| <b>Esquema 6:</b> Reações catalisadas por monoxigenases.                                                                                               | 09  |
| <b>Esquema 7:</b> Mecanismos proposto por Kelly [36a] para reações de BV biocatalisadas.                                                               | 12  |
| <b>Esquema 8:</b> Estado de Transição proposto por Kelly [36a] para o rearranjo de BV. Os orbitais antiligantes são mostrados como lóbulos sombreados. | 13  |
| <b>Esquema 9:</b> Caminho metabólico do cicloexanol e do <i>trans</i> -1,2-cicloexanodiol na <i>Acinetobacter</i>                                      | 19  |
| <b>Esquema 10:</b> Preparo do <i>cis</i> e <i>trans</i> ( <u>2</u> e <u>3</u> ) cicloexanodiol.                                                        | 37  |
| <b>Esquema 11:</b> Preparo dos $\beta$ -cetoésteres <u>13</u> e <u>15</u> e seus respectivos álcoois racêmicos.                                        | 39  |
| <b>Esquema 12:</b> Análise da configuração relativa para os álcoois                                                                                    |     |



|                                                                                                                                                                                                                |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| diastereoisoméricos <u>16a</u> e <u>16b</u> .                                                                                                                                                                  | 40 |
| <b>Esquema 13:</b> Modelo proposto para explicar os espectros de RMN de $^1\text{H}$ dos ésteres de <i>O</i> -metilmandélico.                                                                                  | 43 |
| <b>Esquema 14:</b> Derivação do álcool racêmico e diastereoisomérico (mistura <i>anti:syn</i> 2:1) <u>16</u> com o ( <i>S</i> )- <i>O</i> -metilmandélico.                                                     | 44 |
| <b>Esquema 15:</b> : Conformação mais estável dos derivados de ( <i>S</i> )- <i>O</i> -metilmandélico (mistura <i>anti</i> : <i>syn</i> 2:1) <u>16a</u> e <u>16b</u> proposta de acordo com a literatura [62]. | 45 |
| <b>Esquema 16:</b> Preparação das ciclobutanonas <u>21</u> e <u>22</u> e suas lactonas racêmicas correspondentes.                                                                                              | 47 |
| <b>Esquema 17:</b> Reação de Baeyer-Villiger.                                                                                                                                                                  | 48 |
| <b>Esquema 18:</b> Mecanismo proposto para oxidação de Baeyer-Villiger.                                                                                                                                        | 49 |
| <b>Esquema 19:</b> Reação de biocatálise da ciclobutanona <u>21</u> .                                                                                                                                          | 56 |
| <b>Esquema 20:</b> Biorredução da diona <u>27</u> .                                                                                                                                                            | 66 |
| <b>Esquema 21:</b> Redução estereosseletiva do grupo carbonila pela face <i>re</i> , definido pelo arranjo no sentido horário do oxigênio, grupos grande (G) e pequeno (p) (modelo da regra de Prelog).        | 71 |
| <b>Esquema 22:</b> Redução da cetona racêmica <u>28</u> .                                                                                                                                                      | 73 |
| <b>Esquema 23:</b> Biotransformação da dicetona <u>29</u> por células em repouso do <i>Aspergillus terreus</i> CCT 3320 e <i>Serratia rubidaea</i> CCT 5732.                                                   | 81 |
| <b>Esquema 24:</b> Redução microbiana do $\beta$ -cetoéster <u>15</u> .                                                                                                                                        | 86 |

**Esquema 25:** Redução microbiana do  $\beta$ -cetoéster 15 com células imobilizadas de *Serratia rubidaea* CCT 5732 na matriz sílica-titânio ( $\text{SiO}_2/\text{TiO}_2$ ).

**105**

## LISTA DE FIGURAS

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 | pg. |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| <b>Figura 1:</b> Abelha <i>Trigona</i> sp coletando resina floral de <i>Clusia</i> .                                                                                                                                                                                                                                            | 26  |
| <b>Figura 2:</b> (A) Asa da abelha <i>Trigona</i> sp com fungos; (B) Pata da abelha <i>Trigona</i> sp com fungos                                                                                                                                                                                                                | 27  |
| <b>Figura 3:</b> Ensaio bioautográfico do fungo RC 03: N-nistatina, 1- <i>C. spiritu - sanctensis</i> , 2- <i>C. weddelliana</i> , 3-ninho.                                                                                                                                                                                     | 30  |
| <b>Figura 4:</b> Teste de inibição de crescimento dos microrganismos de referência pelos fungos isolados da <i>Trigona</i> .                                                                                                                                                                                                    | 32  |
| <b>Figura 5:</b> Cromatograma obtido por CG/FID equipado com coluna capilar de sílica fundida com fase quiral heptakis-(2,6-metil-3-pentil)- $\beta$ -ciclodextrina do álcool racêmico e diastereoisomérico (mistura <i>syn:anti</i> 1:2) <u>16</u> .                                                                           | 42  |
| <b>Figura 6:</b> Espectro de RMN de $^1\text{H}$ (500 MHz) do: (A) álcool racêmico e diastereoisomérico (mistura <i>syn : anti</i> 1:2) <u>16</u> derivado com o ácido ( <i>S</i> )- <i>O</i> -metilmandélico; (B) álcool racêmico e diastereoisomérico <u>16</u> derivado com o ácido ( <i>R</i> )- <i>O</i> -acetilmandélico. | 46  |
| <b>Figura 7:</b> Cromatograma obtido por CG/FID equipado com coluna capilar de sílica fundida com fase quiral heptakis-(2,6-dimetil-3-pentil)- $\beta$ -ciclodextrina da reação da 3-fenilciclobutanona <u>21</u> com bactéria isolada do solo.                                                                                 | 55  |

**Figura 8A:** Cromatograma obtido por CG/FID equipado com coluna capilar de sílica fundida com fase estacionária quiral heptakis-(2,6-dimetil-3-pentil)- $\beta$ -ciclodextrina da: (a) ciclobutanona 21; (b) lactona 23. 58

**Figura 8B:** Cromatograma obtido por CG/FID equipado com coluna capilar de sílica fundida com fase estacionária quiral heptakis-(2,6-dimetil-3-pentil)- $\beta$ -ciclodextrina da: (c) ciclobutanona 22; (d) lactona 24. 59

**Figura 8C:** Cromatograma obtido por CG/FID equipado com coluna capilar de sílica fundida com fase estacionária quiral heptakis-(2,6-dimetil-3-pentil)- $\beta$ -ciclodextrina da: (a) bioxidação da ciclobutanona 22 com *C.lunata* ; (b) bioxidação da ciclobutanona 22 com *A. niger*. 62

**Figura 9:** *Sitophilus oryzae* (arroz) e *Sitophilus zeamais* (milho). 75

**Figura 10A:** Cromatograma obtido por CG/FID equipado com coluna capilar de sílica fundida com fase estacionária quiral heptakis-(2,6-dimetil-3-pentil)- $\beta$ -ciclodextrina da: (a) dicetona 29; (b) álcool racêmico 29a 78

**Figura 10B:** Cromatograma obtido por CG/FID equipado com coluna capilar de sílica fundida com fase estacionária quiral heptakis-(2,6-dimetil-3-pentil)- $\beta$ -ciclodextrina da: (a) álcool racêmico 29a; (b) redução da dicetona 29 com *Aspergillus terreus* CCT 3320. 82

**Figura 11:** Bactéria isolada do côco fruta, *Serratia rubidaea* CCT 5732. 85

**Figura 12:** Cromatograma obtido por CG/FID equipado com coluna

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |     |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| capilar de sílica fundida com fase quiral heptakis-(2,6-metil-3-pentil)- $\beta$ -ciclodextrina da redução enantioseletiva do $\beta$ -cetoéster <u>15</u> com <i>Serratia rubidaea</i> CCT 5732.                                                                                                         | 86  |
| <b>Figura 13:</b> Princípios da resolução cinética e dinâmica.                                                                                                                                                                                                                                            | 87  |
| <b>Figura 14:</b> Espectro de RMN de $^1\text{H}$ (500 MHz) do: (A) álcool racêmico e diastereoisomérico <u>16</u> derivado com o ácido <i>R-O</i> -acetilmandélico; (B) produto de biorredução derivado com o ácido <i>R-O</i> -acetilmandélico.                                                         | 90  |
| <b>Figura 15:</b> Microscopia eletrônica de varredura (tensão de aceleração 15 KeV). (A) Micrografia do $\text{SiO}_2/\text{TiO}_2$ ; (B) Micrografia da bactéria <i>Serratia rubidaea</i> imobilizada no $\text{SiO}_2/\text{TiO}_2$ com aumento de 2.000 x.                                             | 103 |
| <b>Figura 16:</b> Microscopia eletrônica de varredura (tensão de aceleração 15 KeV). (A) Micrografia da bactéria <i>Serratia rubidaea</i> CCT 5732 com aumento de 10.000 x; (B) Micrografia bactéria <i>Serratia rubidaea</i> CCT 5732 imobilizada no $\text{SiO}_2/\text{TiO}_2$ com aumento de 10.000 x | 104 |
| <b>Figura 17:</b> Cromatograma obtido por CG/FID equipado com coluna capilar de sílica fundida com fase estacionária quiral heptakis-(2,6-dimetil-3-pentil)- $\beta$ -ciclodextrina da redução enantiosseletiva do $\beta$ -cetoéster <u>15</u> com <i>Serratia rubidaea</i> .                            | 106 |
| <b>Figura 18:</b> Microscopia eletrônica de varredura (tensão de aceleração 15 KeV). (A) Micrografia do fungo CCT 3320 e partícula da $\text{SiO}_2/\text{TiO}_2$ ; (B) Micrografia do fungo CCT 4920 e partícula da $\text{SiO}_2/\text{TiO}_2$ .                                                        | 109 |

## LISTA DE TABELAS

|                                                                                                                                          | pg. |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| <b>Tabela 1:</b> Contagem total das colônias bacterianas isoladas do solo.                                                               | 22  |
| <b>Tabela 2:</b> Descrição da morfologia em meio sólido das colônias isoladas do solo de cana-de-açúcar.                                 | 24  |
| <b>Tabela 3:</b> Fungos isolados e classificados das abelhas <i>Trigona sp.</i>                                                          | 28  |
| <b>Tabela 4:</b> Microrganismos de referência utilizados no ensaio biológico.                                                            | 30  |
| <b>Tabela 5:</b> Resultados do ensaio biológico dos fungos isolados com os microrganismos de referência.                                 | 33  |
| <b>Tabela 6:</b> Oxidação da ciclobutanona <u>22</u> pró-quiral com células em repouso de fungos isolados da abelha <i>Trigona sp.</i>   | 61  |
| <b>Tabela 7:</b> Reações de biocatálise com ciclobutanonas pró-quirais.                                                                  | 64  |
| <b>Tabela 8:</b> Microrganismos selecionados para as reações de biocatálise da dicetona <u>29</u> .                                      | 72  |
| <b>Tabela 9:</b> Redução biocatalítica do composto <u>29</u> .                                                                           | 76  |
| <b>Tabela 10:</b> Microrganismos testados para redução microbiana dos $\beta$ -cetoésteres <u>13</u> e <u>15</u> .                       | 79  |
| <b>Tabela 11:</b> Análise química de titânio no óxido binário, área superficial específica, $S_{BET}$ , e volume médio de poros, $V_p$ . | 101 |
| <b>Tabela 12:</b> Células livres x células imobilizadas.                                                                                 | 107 |
| <b>Tabela 13:</b> Microrganismos selecionados para as reações de biocatálise                                                             |     |

da dicetona 29. 166

**Tabela 14:** Microrganismos testados para redução microbiana dos  $\beta$ -  
cetoésteres 13 e 15. 168

## LISTA DE ABREVIATURAS

|            |                                                        |
|------------|--------------------------------------------------------|
| $\delta$   | deslocamento químico                                   |
| Bn         | benzil                                                 |
| BV         | Baeyer-Villiger                                        |
| <i>ca.</i> | <i>circa</i> , em torno de                             |
| CCD        | cromatografia em camada delgada                        |
| CG         | cromatografia a gás                                    |
| CG/EM      | cromatografia a gás acoplada à espectrometria de massa |
| DCC        | N,N'-diciclohexilcarbodiimida                          |
| DEPT       | “distortionless enhancement by polarization transfer”  |
| DMAP       | 4-(dimetilamino)piridina                               |
| EDS        | microsonda com detector de energia dispersiva          |
| ee         | excesso enantiomérico                                  |
| EM         | espectrometria de massas                               |
| eV         | elétons-volt                                           |
| FID        | “flame ionization detector”                            |
| HSQC       | “heteronuclear single quantum correlation”             |
| Hz         | Hertz                                                  |
| IE         | impacto eletrônico                                     |
| IV         | infravermelho                                          |



|                  |                                                                  |
|------------------|------------------------------------------------------------------|
| $J$              | constante de acoplamento escalar                                 |
| $m/z$            | razão entre a massa do fragmento e sua respectiva carga elétrica |
| $M^+$            | íon molecular                                                    |
| $m$ -CPBA        | ácido <i>meta</i> -cloroperbenzóico                              |
| MA               | extrato de malte                                                 |
| Me               | grupo metil                                                      |
| MEV              | microscopia eletrônica de varredura                              |
| NA               | ágar nutriente                                                   |
| Ph               | grupo fenil                                                      |
| RMN              | ressonância magnética nuclear                                    |
| $S_{\text{BET}}$ | área superficial específica – método BET                         |
| ta.              | temperatura ambiente                                             |
| TEOS             | tetraetil-ortosilicato                                           |
| TBOT             | tetrabutóxido de titânio                                         |
| TMS              | tetrametilsilano                                                 |
| $V_p$            | volume médio dos poros                                           |

## LISTA DE ESPECTROS

|                                                                                                                                                                                                    | pg. |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| <b>E01</b> – Espectro na região do infravermelho (pastilha de KBr), do <i>cis</i> -cicloexano-1,2-diol ( <b>10</b> ).                                                                              | 191 |
| <b>E02</b> – Espectro de massas (IE, 70 eV), do <i>cis</i> -cicloexano-1,2-diol ( <b>10</b> ).                                                                                                     | 191 |
| <b>E03</b> – Espectro de RMN $^1\text{H}$ (500 MHz, $\text{D}_2\text{O}$ , referência interna de capilar de $\text{CCl}_4/\text{TMS}$ ), do <i>cis</i> -cicloexano-1,2-diol ( <b>10</b> ).         | 192 |
| <b>E04</b> – Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ (125,69 MHz, $\text{D}_2\text{O}$ , referência interna de capilar de $\text{CCl}_4/\text{TMS}$ ), do <i>cis</i> -cicloexano-1,2-diol ( <b>10</b> ).   | 192 |
| <b>E05</b> – Espectro de DEPT 90 e 135 (125,69 MHz, $\text{D}_2\text{O}$ , referência interna de capilar de $\text{CCl}_4/\text{TMS}$ ) do <i>cis</i> -cicloexano-1,2-diol ( <b>10</b> ).          | 193 |
| <b>E06</b> – Espectro na região do infravermelho (pastilha de KBr), do <i>trans</i> -cicloexano-1,2-diol ( <b>11</b> ).                                                                            | 193 |
| <b>E07</b> – Espectro de massas (IE, 70 eV), do <i>trans</i> -cicloexano-1,2-diol ( <b>11</b> ).                                                                                                   | 194 |
| <b>E08</b> – Espectro de RMN $^1\text{H}$ (500 MHz, $\text{D}_2\text{O}$ , referência interna de capilar de $\text{CCl}_4/\text{TMS}$ ), do <i>trans</i> -cicloexano-1,2-diol ( <b>11</b> ).       | 194 |
| <b>E09</b> – Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ (125,69 MHz, $\text{D}_2\text{O}$ , referência interna de capilar de $\text{CCl}_4/\text{TMS}$ ), do <i>trans</i> -cicloexano-1,2-diol ( <b>11</b> ). | 195 |
| <b>E10</b> – Espectro de DEPT 90 e 135 (125,69 MHz, $\text{D}_2\text{O}$ , referência interna                                                                                                      |     |

|                                                                                                                                     |     |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| de capilar de CCl <sub>4</sub> /TMS) do <i>trans</i> -cicloexano-1,2-diol ( <b>11</b> ).                                            | 195 |
| <b>E11</b> – Espectro na região do infravermelho (filme), do 2-alil-3-ona-butanoato de metila ( <b>15</b> ).                        | 196 |
| <b>E12</b> – Espectro de massas (IE, 70 eV), do 2-alil-3-ona-butanoato de metila ( <b>15</b> ).                                     | 196 |
| <b>E13</b> – Espectro de RMN <sup>1</sup> H (500 MHz, CDCl <sub>3</sub> ), do 2-alil-3-ona-butanoato de metila ( <b>15</b> ).       | 197 |
| <b>E14</b> – Espectro de RMN <sup>13</sup> C (125,69 MHz, CDCl <sub>3</sub> ), do 2-alil-3-ona-butanoato de metila ( <b>15</b> ).   | 197 |
| <b>E15</b> – Espectro de DEPT 90 e 135 (125,69 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) do 2-alil-3-ona-butanoato de metila ( <b>15</b> ).          | 198 |
| <b>E16</b> – Espectro na região do infravermelho (filme), do 2-benzil-3-ona-butanoato de metila ( <b>13</b> ).                      | 198 |
| <b>E17</b> – Espectro de massas (IE, 70 eV), do 2-benzil-3-ona-butanoato de metila ( <b>13</b> ).                                   | 199 |
| <b>E18</b> – Espectro de RMN <sup>1</sup> H (500 MHz, CDCl <sub>3</sub> ), do 2-benzil-3-ona-butanoato de metila ( <b>13</b> ).     | 199 |
| <b>E19</b> – Espectro de RMN <sup>13</sup> C (125,69 MHz, CDCl <sub>3</sub> ), do 2-benzil-3-ona-butanoato de metila ( <b>13</b> ). | 200 |
| <b>E20</b> – Espectro de DEPT 90 e 135 (125,69 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) do 2-benzil-3-                                              |     |

|                                                                                                                                               |     |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| ona-butanoato de metila ( <u>13</u> ).                                                                                                        | 200 |
| <b>E21</b> – Espectro na região do infravermelho (filme), de uma mistura 1:2 dos álcoois (+) <u>16a</u> e (+) <u>16b</u> .                    | 201 |
| <b>E22</b> – Espectro de massas (IE, 70 eV), de uma mistura 1:2 dos álcoois (+) <u>16a</u> e (+) <u>16b</u> .                                 | 201 |
| <b>E23</b> – Espectro de RMN $^1\text{H}$ (500 MHz, $\text{CDCl}_3$ ), de uma mistura 1:2 dos álcoois (+) <u>16a</u> e (+) <u>16b</u> .       | 202 |
| <b>E23a</b> – Expansão do espectro <b>E23</b> , na região entre $\delta$ 1,20 e 1,26.                                                         | 202 |
| <b>E24</b> – Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ (125,69 MHz, $\text{CDCl}_3$ ), de uma mistura 1:2 dos álcoois (+) <u>16a</u> e (+) <u>16b</u> . | 203 |
| <b>E25</b> – Espectro de DEPT 90 e 135 (125,69 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) de uma mistura 1:2 dos álcoois (+) <u>16a</u> e (+) <u>16b</u> .        | 203 |
| <b>E26</b> – Espectro na região do infravermelho (filme), de uma mistura 1:2 dos álcoois (+) <u>14a</u> e (+) <u>14b</u> .                    | 204 |
| <b>E27</b> – Espectro de massas (IE, 70 eV), do álcool (+) <u>14a</u> .                                                                       | 204 |
| <b>E28</b> – Espectro de massas (IE, 70 eV), do álcool (+) <u>14b</u> .                                                                       | 205 |
| <b>E29</b> – Espectro de RMN $^1\text{H}$ (300 MHz, $\text{CDCl}_3$ ), de uma mistura 1:2 dos álcoois (+) <u>14a</u> e (+) <u>14b</u> .       | 205 |
| <b>E29a</b> – Expansão do espectro <b>E29</b> , na região entre $\delta$ 1,22 e 1,28                                                          | 206 |

|                                                                                                                                              |            |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| <b>E30</b> – Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ (75,45 MHz, $\text{CDCl}_3$ ), de uma mistura 1:2 dos álcoois (+) <b>14a</b> e (+) <b>14b</b> . | <b>206</b> |
| <b>E31</b> – Espectro de DEPT 90 e 135 (75,45 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) de uma mistura 1:2 dos álcoois (+) <b>14a</b> e (+) <b>14b</b> .        | <b>207</b> |
| <b>E32</b> – Espectro na região do infravermelho (filme), do 2,2-dicloro-3-hexil-1-ciclobutanona ( <b>20</b> ).                              | <b>207</b> |
| <b>E33</b> – Espectro de massas (IE, 70 eV), do 2,2-dicloro-3-hexil-1-ciclobutanona ( <b>20</b> ).                                           | <b>208</b> |
| <b>E34</b> – Espectro de RMN $^1\text{H}$ (300 MHz, $\text{CDCl}_3$ ), do 2,2-dicloro-3-hexil-1-ciclobutanona ( <b>20</b> ).                 | <b>208</b> |
| <b>E35</b> – Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ (75,45 MHz, $\text{CDCl}_3$ ), do 2,2-dicloro-3-hexil-1-ciclobutanona ( <b>20</b> ).            | <b>209</b> |
| <b>E36</b> – Espectro de DEPT 90 e 135 (75,45 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) do 2,2-dicloro-3-hexil-1-ciclobutanona ( <b>20</b> ).                   | <b>209</b> |
| <b>E37</b> – Espectro na região do infravermelho (filme), da 3-hexil-1-ciclobutanona ( <b>22</b> ).                                          | <b>210</b> |
| <b>E38</b> – Espectro de massas (IE, 70 eV), da 3-hexil-1-ciclobutanona ( <b>22</b> ).                                                       | <b>210</b> |
| <b>E39</b> – Espectro de RMN $^1\text{H}$ (300 MHz, $\text{CDCl}_3$ ), da 3-hexil-1-ciclobutanona ( <b>22</b> ).                             | <b>211</b> |

|                                                                                                                                 |            |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| <b>E40</b> – Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ (75,45 MHz, $\text{CDCl}_3$ ), da 3-hexil-1-ciclobutanona ( <b>22</b> ).           | <b>211</b> |
| <b>E41</b> – Espectro de DEPT 90 e 135 (75,45 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) da 3-hexil-1-ciclobutanona ( <b>22</b> ).                  | <b>212</b> |
| <b>E42</b> – Espectro na região do infravermelho (filme), da 4-hexil-tetraidro-furanona ( <b>24</b> ).                          | <b>212</b> |
| <b>E43</b> – Espectro de massas (IE, 70 eV), da 4-hexil-tetraidro-furanona ( <b>24</b> ).                                       | <b>213</b> |
| <b>E44</b> – Espectro de RMN $^1\text{H}$ (500 MHz, $\text{CDCl}_3$ ), da 4-hexil-tetraidro-furanona ( <b>24</b> ).             | <b>213</b> |
| <b>E45</b> – Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ (125,69 MHz, $\text{CDCl}_3$ ), da 4-hexil-tetraidro-furanona ( <b>24</b> ).       | <b>214</b> |
| <b>E45a</b> – Espectro de HSQC $^1\text{H}$ , $^{13}\text{C}$ ( $\text{CDCl}_3$ ) da 4-hexil-tetraidro--furanona ( <b>24</b> ). | <b>214</b> |
| <b>E46</b> – Espectro de DEPT 90 e 135 (125,69 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) da 4-hexil-tetraidro-furanona ( <b>24</b> ).              | <b>215</b> |
| <b>E47</b> – Espectro na região do infravermelho (filme), do 3-hexil-1-ciclobutanol ( <b>25</b> ).                              | <b>215</b> |
| <b>E48</b> – Espectro de massas (IE, 70 eV), do 3-hexil-1-ciclobutanol ( <b>25</b> ).                                           | <b>216</b> |
| <b>E49</b> – Espectro de RMN $^1\text{H}$ (300 MHz, $\text{CDCl}_3$ ), do 3-hexil-1-ciclobutanol ( <b>25</b> ).                 | <b>216</b> |

|                                                                                                                                   |            |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| <b>E50</b> – Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ (75,45 MHz, $\text{CDCl}_3$ ), do 3-hexil-1-ciclobutanol ( <b>25</b> ).              | <b>217</b> |
| <b>E51</b> – Espectro de DEPT 90 e 135 (75,45 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) do 3-hexil-1-ciclobutanol ( <b>25</b> ).                     | <b>217</b> |
| <b>E52</b> – Espectro de RMN $^1\text{H}$ (300 MHz, $\text{CDCl}_3$ ), da 2,2-dicloro-3-fenil-1-ciclobutanona ( <b>19</b> ).      | <b>218</b> |
| <b>E53</b> – Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ (75,45 MHz, $\text{CDCl}_3$ ), da 2,2-dicloro-3-fenil-1-ciclobutanona ( <b>19</b> ). | <b>218</b> |
| <b>E54</b> – Espectro de DEPT 90 e 135 (75,45 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) da 2,2-dicloro-3-fenil-1-ciclobutanona ( <b>19</b> ).        | <b>219</b> |
| <b>E55</b> – Espectro na região do infravermelho (filme), do 3-fenil-1-ciclobutanona ( <b>21</b> ).                               | <b>219</b> |
| <b>E56</b> – Espectro de massas (IE, 70 eV), do 3-fenil-1-ciclobutanona ( <b>21</b> ).                                            | <b>220</b> |
| <b>E57</b> – Espectro de RMN $^1\text{H}$ (500 MHz, $\text{CDCl}_3$ ), do 3-fenil-1-ciclobutanona ( <b>21</b> ).                  | <b>220</b> |
| <b>E58</b> – Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ (125,69 MHz, $\text{CDCl}_3$ ), do 3-fenil-1-ciclobutanona ( <b>21</b> ).            | <b>221</b> |
| <b>E59</b> – Espectro de DEPT 90 e 135 (125,69 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) do 3-fenil-1-ciclobutanona ( <b>21</b> ).                   | <b>221</b> |
| <b>E60</b> – Espectro na região do infravermelho (filme), da 4-hexil-tetraidro-                                                   |            |

|                                                                                                                   |     |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| furanona ( <u>23</u> ).                                                                                           | 222 |
| E61 – Espectro de massas (IE, 70 eV), da 4-hexil-tetraidro-furanona ( <u>23</u> ).                                | 222 |
| E62 – Espectro de RMN $^1\text{H}$ (300 MHz, $\text{CDCl}_3$ ), da 4-hexil-tetraidro-furanona ( <u>23</u> ).      | 223 |
| E63 – Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ (75,45 MHz, $\text{CDCl}_3$ ), da 4-hexil-tetraidro-furanona ( <u>23</u> ). | 223 |
| E64 – Espectro de DEPT 90 e 135 (75,45 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) da 4-hexil-tetraidro-furanona ( <u>23</u> ).        | 224 |
| E65 – Espectro na região do infravermelho (filme), do 3-fenil-1-ciclobutanol ( <u>26</u> ).                       | 224 |
| E66 – Espectro de massas (IE, 70 eV), do 3-fenil-1-ciclobutanol ( <u>26</u> ).                                    | 225 |
| E67 – Espectro de RMN $^1\text{H}$ (500 MHz, $\text{CDCl}_3$ ), do 3-fenil-1-ciclobutanol ( <u>26</u> ).          | 225 |
| E68 – Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ (125,69 MHz, $\text{CDCl}_3$ ), do 3-fenil-1-ciclobutanol ( <u>26</u> ).    | 226 |
| E69 – Espectro de DEPT 90 e 135 (125,69 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) do 3-fenil-1-ciclobutanol ( <u>26</u> ).           | 226 |
| E70 – Espectro na região do infravermelho (filme), do ácido <i>R</i> -(-)-acetilmandélico.                        | 227 |
| E71 – Espectro de massas (IE, 70 eV), do ácido <i>R</i> -(-)-acetilmandélico.                                     | 227 |



|                                                                                                                                                                                                             |            |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| <b>E72</b> – Espectro de RMN $^1\text{H}$ (300 MHz, $\text{CDCl}_3$ ), do ácido <i>R</i> -(-)-acetilmandélico.                                                                                              | <b>228</b> |
| <b>E73</b> – Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ (75,45 MHz, $\text{CDCl}_3$ ), do ácido <i>R</i> -(-)-acetilmandélico.                                                                                         | <b>228</b> |
| <b>E74</b> – Espectro de DEPT 90 e 135 (75,45 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) do ácido <i>R</i> -(-)-acetilmandélico.                                                                                                | <b>229</b> |
| <b>E75</b> – Espectro na região do infravermelho (filme), de uma mistura 1:2 dos álcoois ( $\pm$ ) <b>16a</b> e ( $\pm$ ) <b>16b</b> derivado com o ácido <i>R</i> -(-)-acetilmandélico.                    | <b>229</b> |
| <b>E76</b> – Espectro de massas (IE, 70 eV), do álcool ( $\pm$ ) <b>16a</b> derivado com o ácido <i>R</i> -(-)-acetilmandélico.                                                                             | <b>230</b> |
| <b>E77</b> – Espectro de massas (IE, 70 eV), de uma mistura 1:2 do álcool ( $\pm$ ) <b>16b</b> derivado com o ácido <i>R</i> -(-)-acetilmandélico.                                                          | <b>230</b> |
| <b>E78</b> – Espectro de RMN $^1\text{H}$ (500 MHz, $\text{CDCl}_3$ ), de uma mistura 1:2 dos álcoois ( $\pm$ ) <b>16a</b> e ( $\pm$ ) <b>16b</b> derivado com o ácido <i>R</i> -(-)-acetilmandélico.       | <b>231</b> |
| <b>E78a</b> – Expansão do espectro <b>E78</b> , na região entre $\delta$ 1,08 e 1,32.                                                                                                                       | <b>231</b> |
| <b>E79</b> – Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ (125,69 MHz, $\text{CDCl}_3$ ), de uma mistura 1:2 dos álcoois ( $\pm$ ) <b>16a</b> e ( $\pm$ ) <b>16b</b> derivado com o ácido <i>R</i> -(-)-acetilmandélico. | <b>232</b> |
| <b>E80</b> – Espectro de DEPT 90 e 135 (125,69 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) de uma mistura 1:2 dos álcoois ( $\pm$ ) <b>16a</b> e ( $\pm$ ) <b>16b</b> derivado com o ácido <i>R</i> -(-)-acetilmandélico.        | <b>232</b> |

|                                                                                                                                                                                                                      |            |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| <b>E81</b> – Espectro na região do infravermelho (filme), de uma mistura 1:2 dos álcoois ( $\pm$ ) <b>16a</b> e ( $\pm$ ) <b>16b</b> derivado com o ácido <i>S</i> -(+)-metoxifenil acético.                         | <b>233</b> |
| <b>E82</b> – Espectro de massas (IE, 70 eV), do álcool ( $\pm$ ) <b>16a</b> derivado com o ácido <i>S</i> -(+)-metoxifenil acético.                                                                                  | <b>233</b> |
| <b>E83</b> – Espectro de massas (IE, 70 eV), de uma mistura 1:2 do álcool ( $\pm$ ) <b>16b</b> derivado com o ácido <i>S</i> -(+)-metoxifenil acético.                                                               | <b>234</b> |
| <b>E84</b> – Espectro de RMN $^1\text{H}$ (500 MHz, $\text{CDCl}_3$ ), de uma mistura 1:2 dos álcoois ( $\pm$ ) <b>16a</b> e ( $\pm$ ) <b>16b</b> derivado com o ácido <i>S</i> -(+)-metoxifenil acético.            | <b>234</b> |
| <b>E84a</b> – Expansão do espectro <b>E84</b> , na região entre $\delta$ 1,10 e 1,32.                                                                                                                                | <b>235</b> |
| <b>E85</b> – Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ (125,69 MHz, $\text{CDCl}_3$ ), de uma mistura 1:2 dos álcoois ( $\pm$ ) <b>16a</b> e ( $\pm$ ) <b>16b</b> derivado com o ácido <i>S</i> -(+)-metoxifenil acético.      | <b>235</b> |
| <b>E85a</b> – Espectro de HSQC $^1\text{H}$ , $^{13}\text{C}$ ( $\text{CDCl}_3$ ) de uma mistura 1:2 dos álcoois ( $\pm$ ) <b>16a</b> e ( $\pm$ ) <b>16b</b> derivado com o ácido <i>S</i> -(+)-metoxifenil acético. | <b>236</b> |
| <b>E86</b> – Espectro de DEPT 90 e 135 (125,69 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) de uma mistura 1:2 dos álcoois ( $\pm$ ) <b>16a</b> e ( $\pm$ ) <b>16b</b> derivado com o ácido <i>S</i> -(+)-metoxifenil acético.             | <b>236</b> |

## INTRODUÇÃO

A biocatálise transcende os tempos modernos e vai até povos primitivos onde os processos fermentativos eram utilizados para transformar uma matéria em outra. As transformações microbianas têm sido utilizadas pelos humanos desde os tempos antigos em panificação, laticínios e bebidas alcóolicas. Estas operações biotecnológicas utilizavam culturas mistas de microrganismos e foram primariamente direcionadas para áreas da agricultura e nutrição humana [1].

Uma das primeiras aplicações, cientificamente comprovada, utilizando uma cultura pura de microrganismo foi a oxidação do etanol para o ácido acético promovida pelo microrganismo *Bacterium xylinum* e atribuída a Pasteur em 1862 [2].

Atualmente as biotransformações são realizadas com culturas puras de microrganismos, células de plantas, enzimas puras ou parcialmente purificadas e representam um caminho para realizar modificações seletivas de compostos puros em produtos finais definidos [3].

A química orgânica moderna se apóia fundamentalmente sobre métodos sintéticos altamente seletivos, especialmente os enantiosseletivos. Na tentativa de melhorar o desempenho dos catalisadores, os químicos procuram imitar a natureza ou então tentam fazer com que a natureza “trabalhe” segundo projetos preestabelecidos. Neste sentido, as enzimas constituem biocatalisadores quimio, regio e estereosseletivos sobre os seus substratos naturais e também para os não

naturais. Estas propriedades foram os fatores determinantes para o desenvolvimento exponencial da utilização de biocatalisadores na síntese orgânica atual [4 – 8].

As enzimas que tradicionalmente eram utilizadas no processamento de alimentos, atualmente têm sido aplicadas na produção de fármacos quirais e de produtos agrícolas sob forma enantiomericamente puros [9 – 13]. Por exemplo, reações enzimáticas são correntemente empregadas na produção de *ca.* 1800 kilotoneladas por ano de intermediários para indústria farmacêutica [14 - 15].

Progressos biotecnológicos recentes concentram-se na otimização de microrganismos de interesse para obter linhagens com propriedades ótimas, inibição seletiva de uma das enzimas competitivas, desenvolvimento de novas técnicas de estabilização de enzimas através da variação dos parâmetros metabólicos pela imobilização, na biologia celular e molecular, originando novas ferramentas para manipulação de material genético para construção de genes que expressem as proteínas desejadas melhorando a seletividade das reações biocatalíticas, eliminando desta forma alguns problemas inerentes a biocatálise [16].

Dentro deste enfoque, nosso grupo implantou a pesquisa de biotransformações mediadas por enzimas de células microbianas íntegras. A biotransformação seria a etapa chave numa cascata reacional levando a produtos alvos enantiomericamente puros a partir de substratos racêmicos ou aquirais.

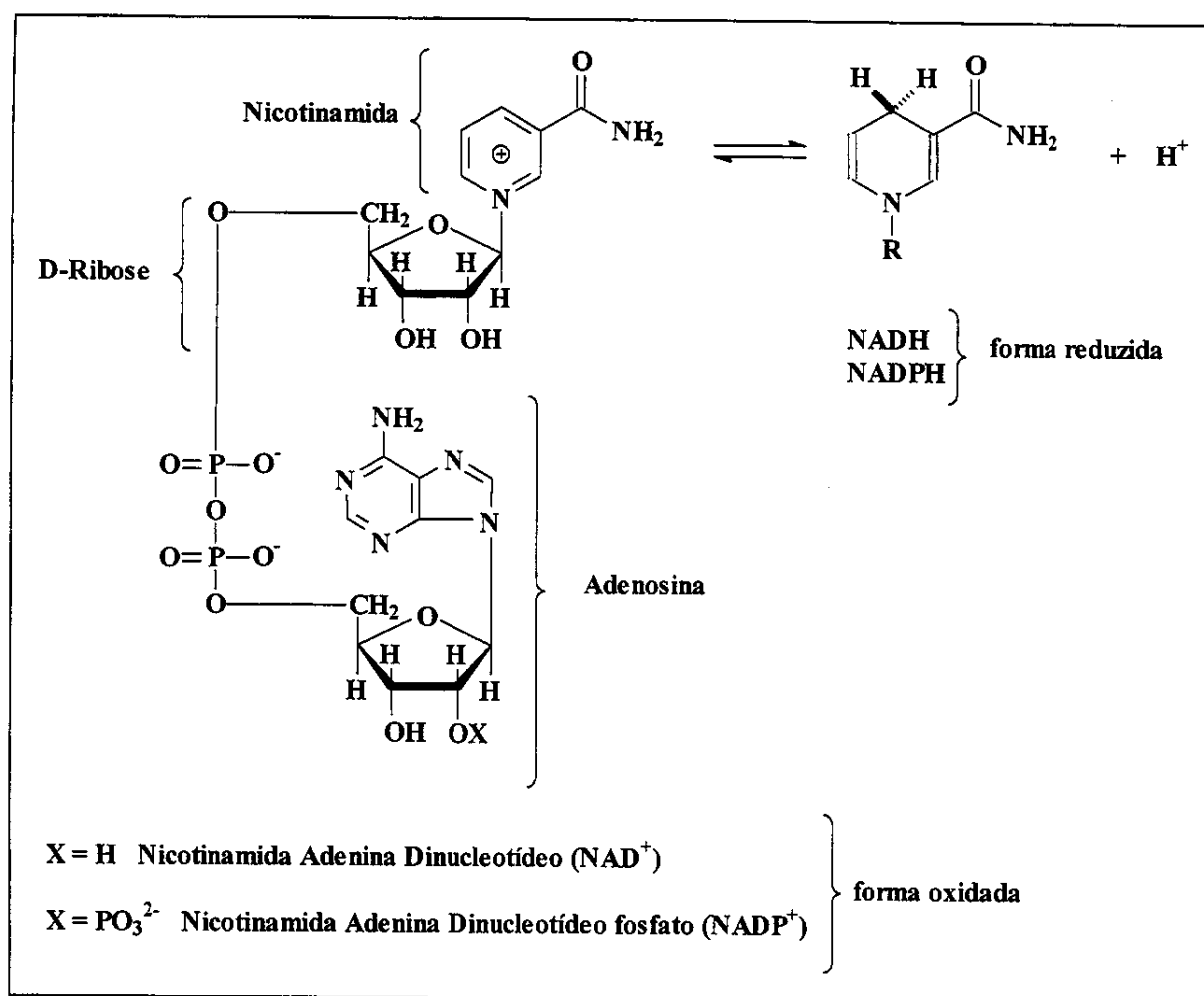
Há basicamente duas estratégias para realizar as biotransformações:

- utilizar enzimas puras ou parcialmente purificadas;

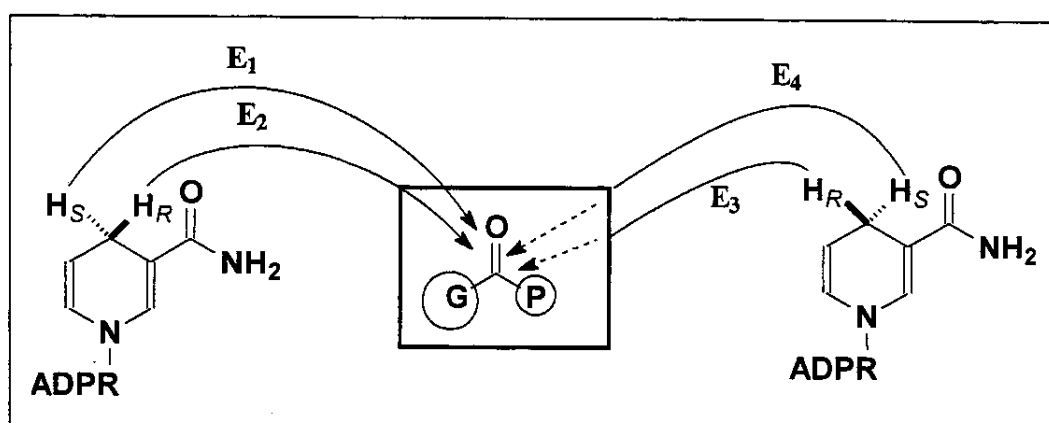
- células de organismos vivos, usualmente células de microrganismos (bactérias, leveduras e fungos filamentosos).

A utilização de enzimas isoladas pode apresentar problemas, especialmente enzimas intracelulares ou endoenzimas, que são aquelas que normalmente atuam dentro das células em que foram sintetizadas. Muitas enzimas intracelulares são relativamente instáveis fora do ambiente celular no qual normalmente operam. Consequentemente tais enzimas apresentam pouco valor como agentes para biocatálise quando extraídas da fonte celular [17].

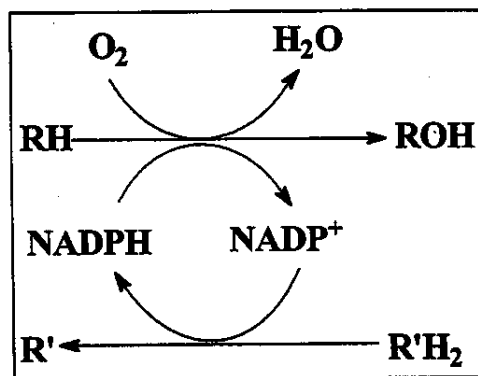
Algumas enzimas extracelulares ou exoenzimas, que atuam fora das células que lhe deram origem (por exemplo, hidrolases), não são dependentes de nenhum tipo de cofator para promoverem a atividade catalítica. No entanto as enzimas intracelulares, como por exemplo, as enzimas da classe oxidoreductase catalisam a transferência de um hidreto com alta estereosseletividade e são dependentes de cofatores. Os cofatores mais utilizados para estas reduções são o NADH ou NADPH (Esquema 1). Ambos possuem dois hidrogênios diastereotópicos que podem ser transferidos como hidreto para o substrato na forma oxidada (como aldeído, cetona, imina ou dupla ligação). Estes substratos podem conter duas faces diastereotópicas ou enantiotópicas (*re* ou *si*) no C-sp<sup>2</sup> a ser reduzido. Dependendo da redutase empregada, é possível controlar com alta especificidade o H a ser transferido, assim como a face do substrato a ser atacada (Esquema 2). Nos organismos vivos estes cofatores são reciclados por biotransformações complementares [17 – 18] (Esquema 3).



Esquema 1: Nicotinamida adenina dinucleotídeo (NADH) e Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH).



Esquema 2: Biorredução de compostos carbonílicos e derivados.



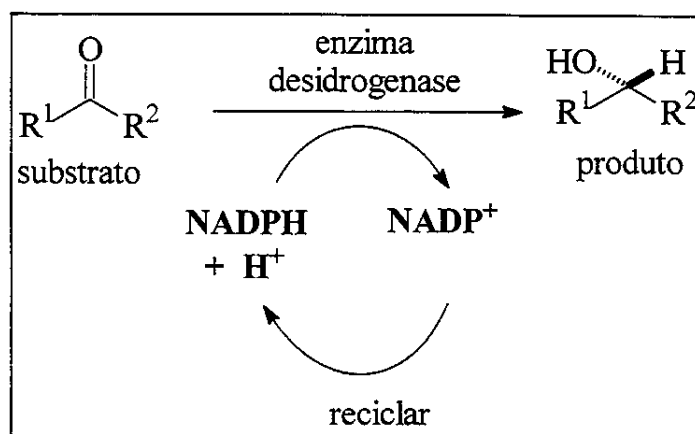
Esquema 3: Reação de regeneração do cofator nas células.

Entretanto, a utilização de enzimas isoladas dependentes de cofatores significa empregar cofatores extremamente caros [16] (NADH - US\$ 500 por mol e NADPH - US\$ 200000 por mol) como co-substratos em quantidades estequiométricas ou a necessidade de desenvolver um sistema compatível de reciclagem de cofator “*in vitro*” para viabilizar o seu uso em síntese. Entretanto, este processo também pode apresentar dificuldade de execução e ser dispendioso [19], justificando desta forma a utilização de células íntegras de microrganismos que já contêm um sistema multienzimático capaz de aceitar substratos não naturais, todos os cofatores necessários e os caminhos metabólicos para sua regeneração.

As oxidoreduases são classificadas em três categorias: desidrogenases, oxigenases e oxidases [20]. Dentre essas, as álcoois desidrogenases são as enzimas responsáveis pela catálise na redução estereosseletiva de compostos carbonílicos e derivados. Estas enzimas podem ser obtidas a partir de microrganismos ou fontes animais. Durante o processo de purificação, o cofator necessário, o nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH), é desligado da proteína. Para recuperar a

atividade catalítica enzimática, o cofator deve ser repostado. É impossível usar quantidade estequiométrica do cofator devido o alto custo do NADPH, sendo assim quantidades catalíticas são utilizadas e a reciclagem do cofator é empregada (Esquema 4).

Células microbianas íntegras são utilizadas em substituição as desidrogenases isoladas por possuírem desidrogenases múltiplas que são capazes de aceitarem substratos não naturais e a reciclagem de cofatores não é necessária, já que é realizada automaticamente pelas células microbianas. Como consequência, fontes de carbono baratas tais como sacarose ou glicose podem ser utilizadas como substratos auxiliares para as reações de reduções assimétricas. Desta forma, todas enzimas e co-fatores estão bem protegidos em seu ambiente celular natural.



**Esquema 4: Reciclagem de NADPH nas reduções catalisadas por enzimas.**

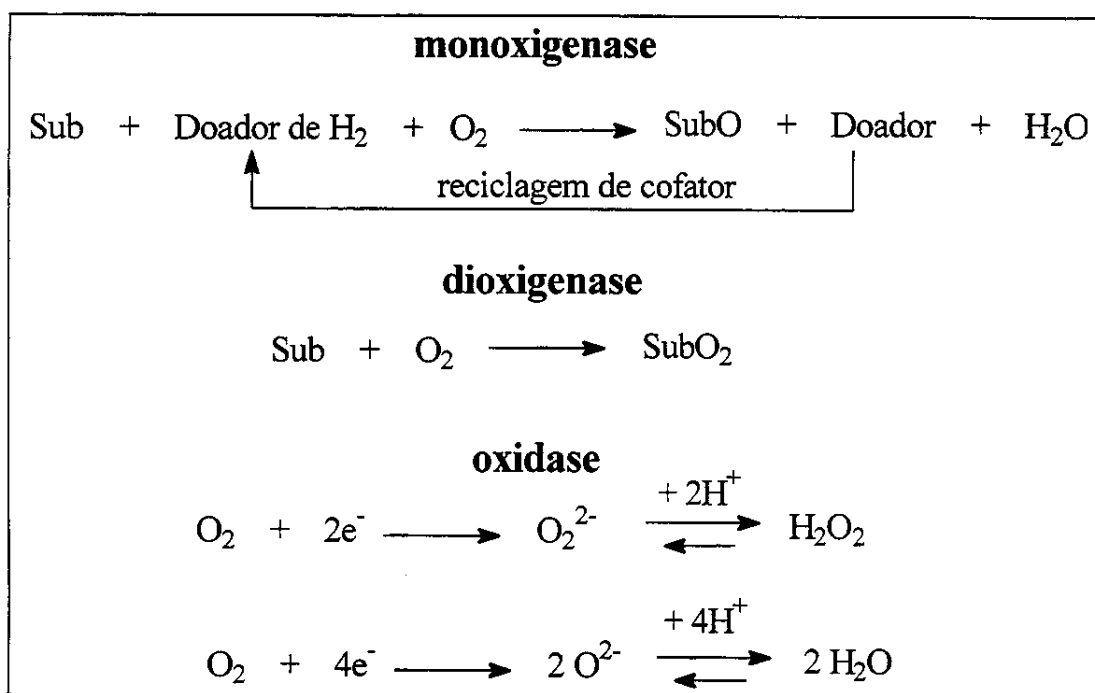
Enzimas que catalisam a incorporação direta de oxigênio molecular em moléculas orgânicas são chamadas de oxigenases [21]. As reações de oxidação



enzimáticas são particularmente interessantes, já que a oxifuncionalização de substratos orgânicos não ativados permanece um desafio na química orgânica sintética, principalmente com relação a regio e enantiosseletividade.

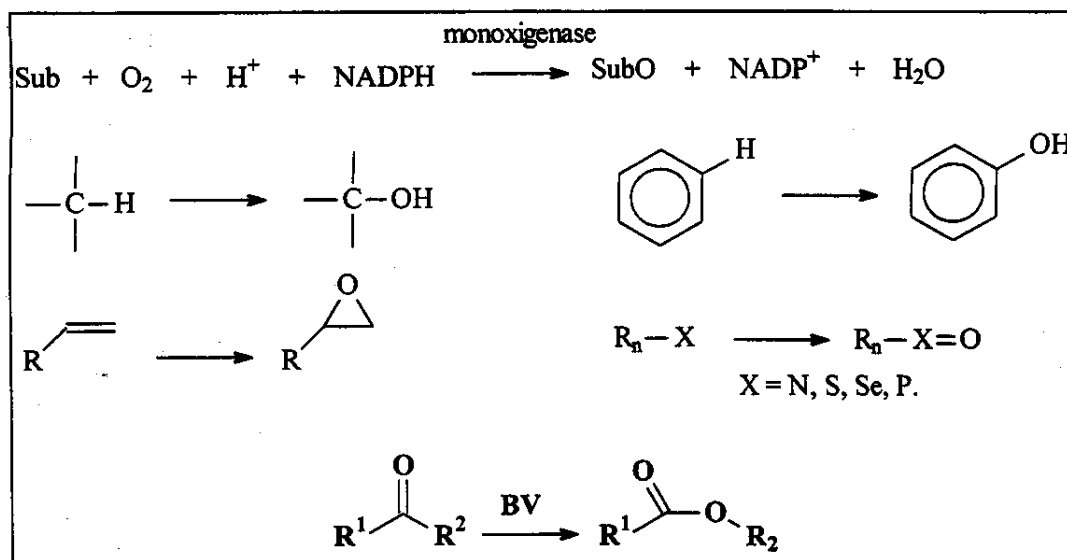
A transferência de oxigênio para moléculas orgânicas pode proceder-se através de três mecanismos distintos (Esquema 5):

- Monoxigenases incorporam um átomo de oxigênio a partir do oxigênio molecular no substrato, o outro é reduzido à custa de um doador (usualmente NADH ou NADPH) para formar água [22];
- Dioxigenases incorporam simultaneamente os dois átomos do oxigênio molecular no substrato, por isso são algumas vezes chamadas erroneamente de oxigênio transferases;
- Oxidases catalisam principalmente a transferência de elétrons para o oxigênio molecular, através da transferência de dois ou quatro elétrons, envolvendo peróxido de hidrogênio ou água como doador de oxigênio, respectivamente. Sob o ponto de vista sintético as oxidases não são utilizadas extensivamente.



Esquema 5: Reações de oxidação enzimáticas.

As reações de oxidação de interesse sintético catalisadas por monoxigenases são : hidroxilação, epoxidação, reações de Baeyer-Villiger, etc. (Esquema 6).



| Substrato   | Produto              | Tipo de Reação          | Tipo de cofator       |
|-------------|----------------------|-------------------------|-----------------------|
| Alcano      | Álcool               | hidroxilação            | dependente de metal   |
| aromático   | Fenol                | hidroxilação            | dependente de metal   |
| Alceno      | Epóxido              | epoxidação              | dependente de metal   |
| Heteroátomo | óxido do heteroátomo | oxidação de heteroátomo | dependente de flavina |
| Cetona      | Éster / lactona      | Baeyer - Villiger       | dependente de flavina |

Esquema 6: Reações catalisadas por monoxigenases.

As monoxigenases são comumente ligadas à membrana celular e portanto difíceis de serem isoladas. Este fato e a necessidade de reciclagem do NADPH faz com que a maioria das reações catalisadas por monoxigenases sejam realizadas por células microbianas íntegras.

Reações de oxidação de Baeyer-Villiger (BV) de cetonas lineares e cíclicas, que resultam na produção de ésteres ou lactonas, são reações de oxidação importantes na química orgânica. Aspectos estereoquímicos desta reação foram

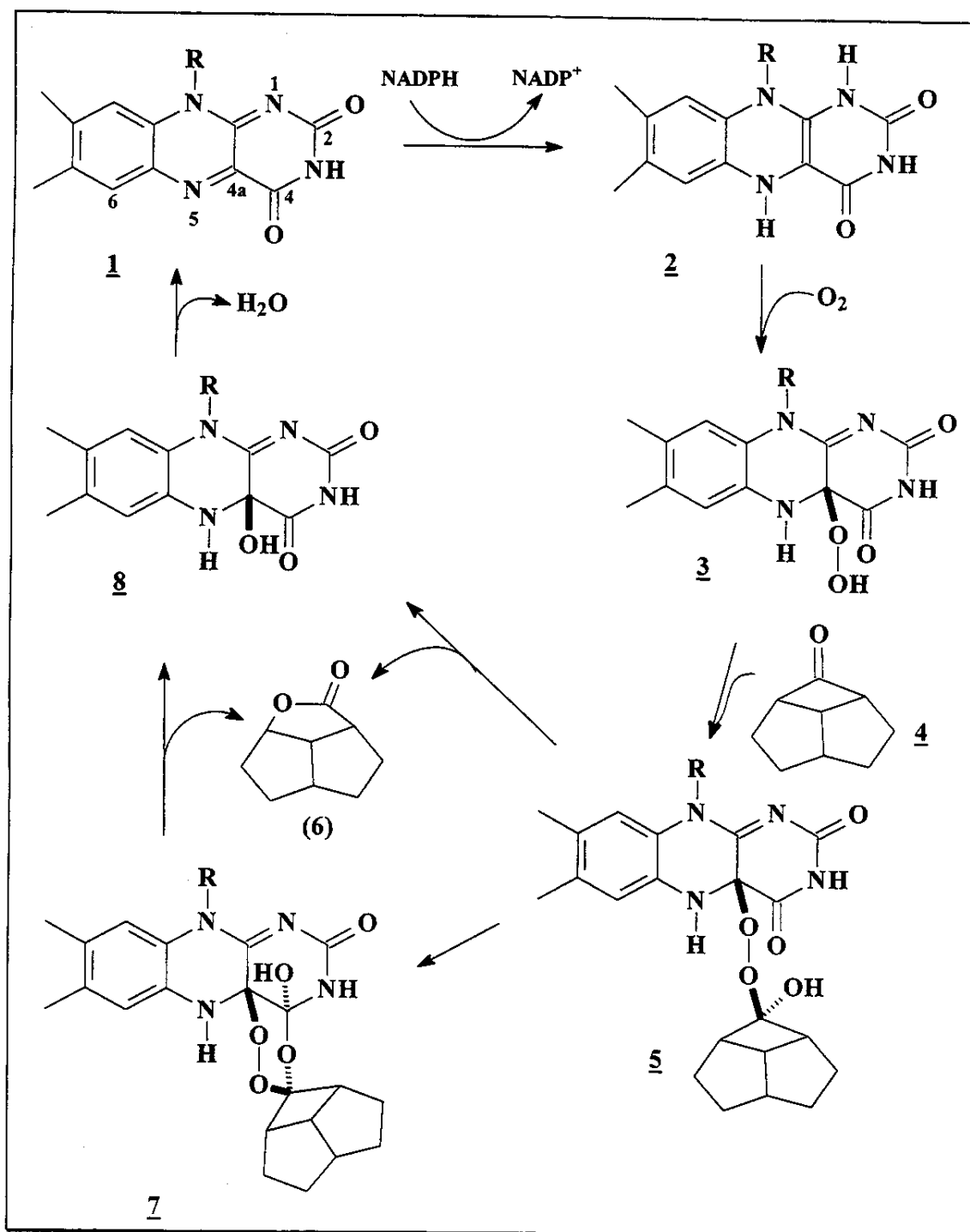
extensivamente estudados ao longo dos anos. Atualmente com a crescente demanda de moléculas quirais biologicamente ativas, é necessário ampliar os métodos disponíveis para oxidação de BV assimétrica, pois somente recentemente foi descrito BV assimétrica com algum sucesso [23].

Entretanto, estes procedimentos, que essencialmente implicam em reações catalisadas por metal, demonstram uma baixa versatilidade e frequentemente fornecem produtos com pureza enantiomérica moderada. Por outro lado, o envolvimento de uma etapa de oxidação de BV no caminho metabólico de muitos microrganismos, mediada pela enzima conhecida por Baeyer-Villigerase (BVase), permitiu realizar nos últimos 10 anos a oxidação de BV assimétrica de vários substratos utilizando biocatalisadores muito promissores. Esta metodologia demonstrou ser um caminho eficiente para produzir lactonas enantiopuras, a partir de cetonas cíclicas pró-quirais ou racêmicas [24 – 27].

Neste contexto, a bactéria *Acinetobacter calcoaceticus* NCIMB 9871 foi o primeiro e mais estudado microrganismo e apresentava uma cicloexanona monoxigenase (CHMO) que foi aplicada ao biciclo[3.2.0]hepta-2en-6-ona [28]. Esta reação atualmente é considerada um tipo de “reação protótipo” para oxidação de BV assimétrica enzimática bem como química [29].

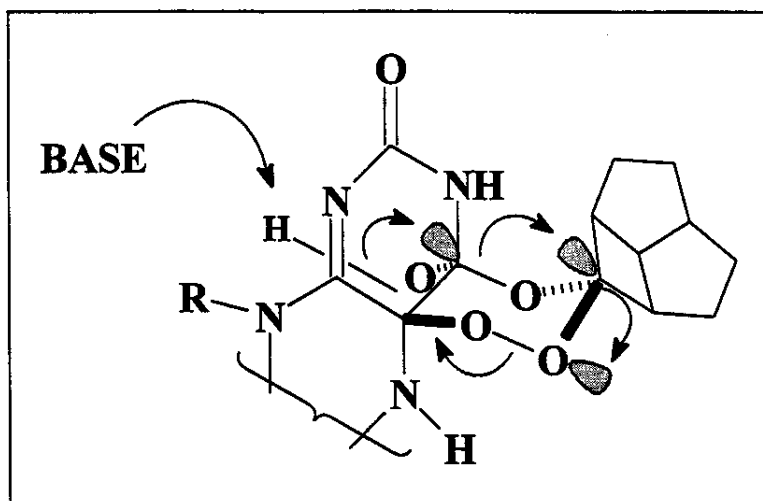
Nos últimos anos, esta reação biocatalisada foi introduzida em síntese orgânica; sua versatilidade e enantiosseletividade têm sido demonstrada através de uma série de estudos [30 - 36].

As Baeyer – Villigerases, enzimas que catalisam as reações de BV *in vivo*, são flavoproteínas que estão ligadas a coenzima denominada de flavina adenina dinucleotídeo (FAD) 1. O mecanismo de oxidação proposto por Kelly [36a] explica a origem da enantiosseletividade e envolve a flavina 2, na forma reduzida, a qual é oxidada por dioxigênio produzindo o hidroperóxido de flavina 3. A adição nucleofílica na cetona 4 fornece o intermediário hidroxiperóxido 5 o qual se rearranja para dar a lactona correspondente e a hidroxiflavina 8. A eliminação de água completa o ciclo (Esquema 7).



Esquema 7: Mecanismo proposto por Kelly [36a] para reações de BV biocatalisadas.

O alinhamento entre os orbitais ligantes e antiligantes favorece o rearranjo de BV sob um rigoroso controle estereoeletrônico fornecendo a lactona correspondente, regio e enantiosseletivamente (Esquema 8).



**Esquema 8:** Estado de transição proposto por Kelly [36a] para o rearranjo de BV. Os orbitais antiligantes são mostrados como lóbulos sombreados.

Surpreendentemente, somente alguns outros biocatalisadores foram descritos e estudados até o momento apesar das potencialidades promissoras de tais biooxidações, portanto é de alto interesse o desenvolvimento de pesquisa de novas BVases que podem eventualmente serem complementares com relação ao substrato e enantiosseletividade quando comparadas à bactéria *A. calcoaceticus* [26].

## **OBJETIVOS**

Neste contexto, o objetivo geral da nossa tese foi trabalhar com células íntegras de microrganismos visando oxidoredutases de ação diferenciada , para tanto iniciamos o trabalho selecionando linhagens de interesse.

Neste sentido, nossa estratégia de trabalho pode ser estabelecida nos seguintes objetivos específicos:

- Selecionar e isolar microrganismos de ambientes específicos com Baeyer-Villigerases e oxidoredutases;
- Sintetizar os substratos racêmicos, pró-quirais e os padrões racêmicos para monitoramento das reações biocatalisadas;
- Realizar a triagem dos microrganismos adequados para as reações, a partir do acesso a uma coleção particular construída através do isolamento de microrganismos de ambientes específicos ou uma coleção de culturas com linhagens puras isoladas do território Nacional pertencentes a Coleção de Culturas Tropicais da Fundação Tropical “André Tosello”;
- Executar as reações biocatalíticas com maior potencialidade para produzir blocos quirais de interesse sintético;
- Imobilizar os microrganismos para aumentar sua estabilidade, permitindo seu armazenamento sem alterar a sua atividade biocatalítica.



---

## *Capítulo I*

---

## **I. Isolamento de microrganismos de ambientes específicos**

O isolamento, purificação, identificação, seleção, caracterização, conservação e uso de microrganismos é prática imprescindível para o desenvolvimento de processos biocatalíticos e obtenção de produtos de interesse econômico, pois somente pouco mais de 2% do total do número estimado de espécies de microrganismos do mundo está sendo preservado em coleções de cultura [37].

Antes de iniciarmos o isolamento dos microrganismos foi realizado um treinamento na Fundação Tropical “André Tosello” sob supervisão dos microbiologistas Dra. Silvia Y. Eguchi e Dr. Gilson Manfio sobre os princípios básicos de funcionamento de um laboratório de microbiologia, incluindo segurança, principais equipamentos e técnicas básicas de cultivo de microrganismos. As condições ótimas de crescimento (temperatura, pressão de oxigênio e hidrogeniônica, nutrição, etc.) bem como os cuidados com assepsia são observações importantes para a obtenção e reprodutibilidade dos resultados nas reações de biocatálise.

Os microrganismos isolados pertencem a dois ambientes distintos:

- 1) bactérias de solo;
- 2) fungos associados a insetos (abelha *Trigona* sp.).

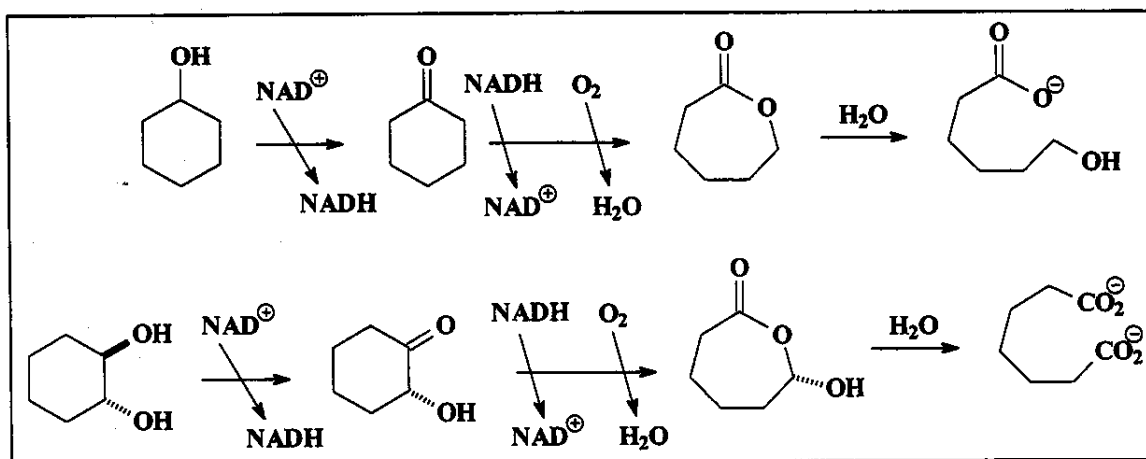
## **I.1. Isolamento de bactérias do solo**

### **I.1.1. Considerações gerais**

O solo é um dos ambientes naturais mais ricos em microrganismos e normalmente contém populações microbianas mistas superiores a  $10^8$  por grama, o que justifica a escolha do ambiente 1. Associada a diversidade dos microrganismos está a grande variedade das enzimas por eles produzidas. Durante o crescimento microbiano muitas enzimas são sintetizadas independentemente da composição do meio e são conhecidas como enzimas constitutivas. Por outro lado, as enzimas “induzidas” são formadas na presença de um agente indutor, que pode ser o próprio substrato ou um composto estruturalmente relacionado. As monoxigenases responsáveis pela biotransformação oxidativa, normalmente são consideradas enzimas adaptativas ou “induzidas”, as quais estão presentes em condições e períodos específicos do crescimento celular [38].

A cicloexanona monoxigenase tem sido detectada em bactérias de solo dos gêneros, *Nocardia*, *Pseudomonas*, *Acinetobacter* e apresentam a capacidade de crescerem na presença do cicloexanol ou cicloexanona como única fonte de carbono [30, 39 – 40]. Isto indica que o microrganismo oxida a cetona cíclica a lactona através da reação de Baeyer – Villiger catalisada pela enzima cicloexanona monoxigenase. A subsequente hidrólise enzimática da lactona de 7 membros, leva

à formação de hidroxi ácidos que podem ser metabolizados a C<sub>2</sub> e C<sub>4</sub> os quais são utilizados no metabolismo primário pelo microrganismo (Esquema 9).



**Esquema 9: Caminho metabólico do cicloexanol e do *trans*-1,2-cicloexanodiol na *Acinetobacteria*.**

De acordo com a literatura [30], as monoxigenases responsáveis pelas reações de Baeyer-Villiger são essenciais para os microrganismos capazes de crescerem em meios contendo cicloalcanonas (e cicloalcanóis  $\Rightarrow$  cicloalcanonas) como única fonte de carbono e energia. Estes microrganismos podem ser obtidos diretamente do meio ambiente através da técnica de seleção de microrganismos por enriquecimento [38]. Tais amostras após a coleta são inoculadas em um meio líquido contendo o cicloalcanol, como única fonte de energia. Os microrganismos capazes de metabolizarem o cicloalcanol proliferarão. Estas culturas isoladas podem ser avaliadas quanto ao potencial de biooxidação.

### **I.1.2. Técnica de seleção de microrganismos por enriquecimento do solo**

Amostras de solo foram coletadas nas proximidades de uma plantação de cana-de-açúcar sob supervisão do microbiologista Dr. Gilson Manfio. As amostras foram coletadas e levadas ao laboratório para submetê-las ao tratamento com o *cis* e *trans* cicloexanodiol sintetizados segundo o Esquema 10, pg 35 [38].

#### **I.1.2.1. Seleção dos meios de cultura para isolamento das bactérias do solo de cana-de-açúcar**

Uma linhagem microbiana em crescimento ativo em um meio de cultura constitui uma cultura. Nas reações de biocatálise todos os trabalhos são baseados em culturas puras, pois permitem estudos precisos baseados na fisiologia microbiana.

O crescimento de microrganismos em um meio de cultura está relacionado a fatores como a disponibilidade de nutrientes apropriados, necessidade ou não de oxigenação (aeração), necessidade de um certo grau de umidade, manutenção de pH apropriado, incubação a temperatura adequada [41 – 42].

Foram escolhidos três meios de cultura para serem utilizados no isolamento das bactérias, nestes meios adicionou-se o antifúngico cicloexamida (5 mL de solução antifúngica / 100 mL de meio de cultura).

NA (“Nutrient Agar”) é um meio de cultura utilizado de modo geral ao crescimento de bactérias menos exigentes quanto à composição nutricional;

BENNETT’S modificado é destinado ao desenvolvimento de bactérias mais exigentes, constituído de carboidratos e aminoácidos;

Amido e caseína, destinado ao desenvolvimento de bactérias de um modo geral e a identificação morfológica.

#### **I.1.2.2. Contagem e identificação das colônias**

O crescimento microbiano foi determinado pela observação no aumento do número de colônias.

As colônias bacterianas nas culturas em diluições  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$  e  $10^{-5}$ , conforme descrito detalhadamente na parte experimental, foram submetidas a contagem para se estimar o número de colônias. A contagem das colônias foi expressa em unidades formadoras de colônias (ufc) e é mostrado na Tabela 1.

Tabela 1: Contagem total das colônias bacterianas isoladas do solo.

| Meios de cultura            | Diluição $10^{-3}$ (24 h)<br>(ufc) | Diluição $10^{-4}$ (24 h)<br>(ufc) | Diluição $10^{-5}$ (24 h)<br>(ufc) |
|-----------------------------|------------------------------------|------------------------------------|------------------------------------|
| <b><i>Bennett's</i></b>     |                                    |                                    |                                    |
| <i>cis</i> cicloexanodiol   | Incontável                         | 387 + aglomerado                   | 48 + aglomerado                    |
| <i>trans</i> cicloexanodiol | 2688                               | 285                                | 32                                 |
| <b><i>NA</i></b>            |                                    |                                    |                                    |
| <i>cis</i> cicloexanodiol   | 2752                               | 313                                | 0                                  |
| <i>trans</i> cicloexanodiol | 3584                               | 353                                | 0                                  |
| <b><i>Amido/Caseína</i></b> |                                    |                                    |                                    |
| <i>cis</i> cicloexanodiol   | 3328                               | 319                                | 0                                  |
| <i>trans</i> cicloexanodiol | 2944                               | 340                                | 0                                  |

ufc – unidades formadoras de colônia; NA – ágar nutriente.

### I.1.2.3. Obtenção de culturas puras e isolamento por estria [43]

As colônias bacterianas nas placas com meio de cultura Bennett's com diluição  $10^{-5}$  foram observadas em lupa e marcadas para serem isoladas. Realizou-se

o mesmo procedimento com as placas com meios NA e Amido/Caseína com diluição  $10^{-4}$ .

A técnica de esgotamento em placa com meio sólido (NA) foi utilizado para obtenção de colônias isoladas. As placas semeadas na forma de estrias foram utilizadas para obtenção de culturas puras a partir das amostras que continham flora mista, condição fundamental para dar prosseguimento ao processo de identificação de microrganismos e avaliação da atividade biocatalítica.

Após um período de incubação de 24 horas, as colônias foram examinadas sob lupa para cada cultura semeada por estriamento nas placas e as principais observações macroscópicas com relação à morfologia das colônias bacterianas (cor, forma, superfície, brilho, borda, elevação, consistência, tamanho) são mostradas na Tabela 2.



## Capítulo I – Isolamento de microrganismos

**Tabela 2: Descrição da morfologia em meio sólido das colônias isoladas do solo de cana-de-açúcar.**

| Bactéria isolada | Cor da colônia | Forma     | Superfície  | Brilho   | Borda          | Elevação | Consistência | Tamanho (mm)       | Meio de Cultura |
|------------------|----------------|-----------|-------------|----------|----------------|----------|--------------|--------------------|-----------------|
| RG 01            | creme          | circular  | lisa        | presente | Perfeita       | Convexa  | Mucóide      | 3                  | Bennett's       |
| RG 02            | creme          | circular  | rugosa      | ausente  | Irregular      | Convexa  | Cremosa      | 1                  | Bennett's       |
| RG 03            | creme          | circular  | lisa        | presente | Perfeita       | Convexa  | mucóide      | 3                  | Bennett's       |
| RG 04            | creme          | circular  | lisa        | presente | Perfeita       | Convexa  | cremosa      | 3                  | Bennett's       |
| RG 05            | creme          | circular  | granulosa   | presente | irregular      | Convexa  | cremosa      | 1                  | Bennett's       |
| RG 06            | creme          | circular  | granulosa   | presente | irregular      | Convexa  | cremosa      | 1                  | Bennett's       |
| RG 07            | creme          | rizóide   | filamentosa | ausente  | filamentosa    | Plana    | seca         | bastante espalhada | Bennett's       |
| RG 08            | creme          | circular  | rugosa      | ausente  | ondulada       | Convexa  | cremosa      | 2                  | Bennett's       |
| RG 09            | creme          | irregular | lisa        | presente | ondulada       | convexa  | cremosa      | 1                  | Bennett's       |
| RG 10            | creme          | circular  | arenoso     | ausente  | perfeita       | convexa  | seca         | 2                  | Bennett's       |
| RG 11            | creme          | irregular | lisa        | presente | rizóide        | plana    | cremosa      | espalhada          | Bennett's       |
| RG 12            | creme          | circular  | rugosa      | ausente  | irregular      | lente    | butirosa     | 2                  | Amido / Caseína |
| RG 13            | creme          | circular  | rugosa      | presente | perfeita       | convexa  | mucóide      | 2                  | Amido / Caseína |
| RG 14            | creme          | circular  | rugosa      | presente | perfeita       | convexa  | mucóide      | 1                  | NA              |
| RG 15            | creme          | circular  | rugosa      | presente | irregular      | convexa  | mucóide      | 2                  | NA              |
| RG 16            | creme          | circular  | lisa        | presente | perfeita       | convexa  | cremosa      | 1                  | NA              |
| RG 17            | creme          | circular  | lisa        | presente | perfeita       | convexa  | mucóide      | 2                  | Amido / Caseína |
| RG 18            | creme          | circular  | rugosa      | ausente  | irregular      | lente    | butirosa     | 2                  | NA              |
| RG 19            | branca         | circular  | lisa        | presente | perfeita       | convexa  | mucóide      | 3                  | Bennett's       |
| RG 20            | creme          | circular  | lisa        | presente | perfeita       | convexa  | mucóide      | 3                  | Amido / Caseína |
| RG 21            | creme          | circular  | lisa        | presente | perfeita       | convexa  | mucóide      | 2                  | Amido / Caseína |
| RG 22            | creme          | circular  | rugosa      | presente | regular        | convexa  | cremosa      | 2                  | NA              |
| RG 23            | creme          | circular  | lisa        | presente | regular        | convexa  | cremosa      | 2                  | NA              |
| RG 24            | creme          | circular  | rugosa      | presente | irregular      | lente    | butirosa     | 3                  | NA              |
| RG 25            | creme          | circular  | rugosa      | ausente  | irregular      | lente    | butirosa     | 3                  | NA              |
| RG 26            | creme          | circular  | rugosa      | ausente  | irregular      | lente    | cremosa      | 1,5                | Amido / Caseína |
| RG 27            | creme          | circular  | lisa        | presente | quase perfeita | convexa  | mucóide      | 3                  | NA              |
| RG 28            | creme          | circular  | rugosa      | ausente  | quase perfeita | lente    | cremosa      | 2                  | Amido / Caseína |
| RG 29            | creme          | circular  | rugosa      | presente | irregular      | convexa  | mucóide      | 2                  | NA              |
| RG 30            | Branca         | circular  | arenosa     | ausente  | imperfeita     | lente    | ----         | 2                  | Bennett's       |
| RG 31            | Creme          | circular  | lisa        | presente | perfeita       | convexa  | cremosa      | 2                  | NA              |
| RG 32            | Creme          | circular  | lisa        | presente | perfeita       | convexa  | cremosa      | 2                  | NA              |
| RG 33            | Creme          | circular  | lisa        | presente | perfeita       | convexa  | cremosa      | 2                  | NA              |
| RG 34            | Creme          | circular  | rugosa      | ausente  | irregular      | lente    | seca         | 2                  | NA              |
| RG 35            | Creme          | circular  | arenosa     | presente | perfeita       | convexa  | cremosa      | 1                  | NA              |

#### I.1.2.4. Preservação das bactérias isoladas do solo

Após a purificação através do método de estrias, as bactérias de solo foram repicadas em duplicatas em tubos “slants” com meios de culturas Bennett’s e NA e incubadas por 24 horas para serem utilizadas na avaliação da atividade biocatalítica e preservadas em caldo nutriente, congeladas a baixa temperatura (- 20 °C) por tratar-se de um bom método de estocagem.

#### I.2. Isolamento de fungos de abelhas *Trigona* sp

O estudo de microrganismos de ambientes restritos é muito importante, pois as espécies adaptadas sofreram uma seleção natural e podem apresentar atividades enzimáticas interessantes. Os microrganismos de *Trigona* sp, ambiente 2, foram selecionados, pois estas abelhas coletam material (resinas florais de *Clusia*) com reconhecida atividade antibiótica e antifúngica [44 – 45].

A coleta das abelhas foi realizada pelo botânico Dr. Volker Bittrich – Instituto de Biologia/Unicamp que Coletou abelhas que estavam recolhendo resinas florais, garantindo desta forma que as mesmas participavam do sistema ecológico *Trigona-Clusia*-microrganismos. Pode-se observar na Figura 1 uma abelha *Trigona* sp coletando resina floral de *Clusia*.



Figura 1: Abelha *Trigona* sp coletando resina floral de *Clusia*.

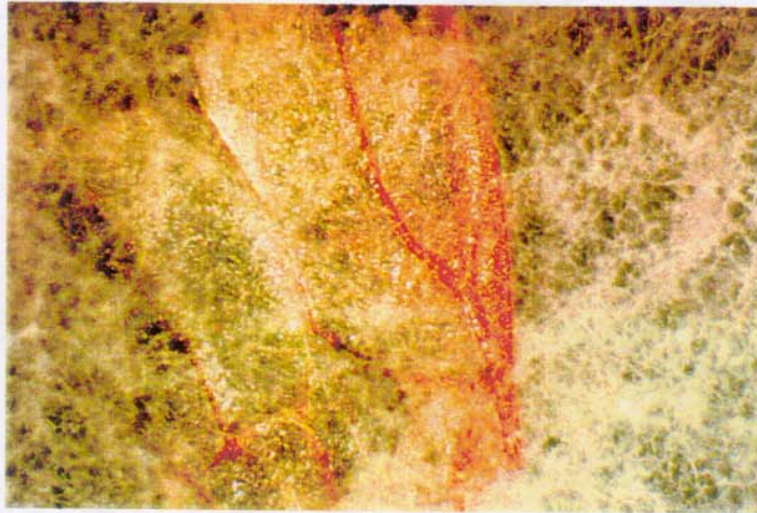
Em cada espécie microbiana existe determinado ótimo para todas as condições de cultura. A temperatura escolhida para o crescimento dos fungos foi de 28 °C, pois estaria próxima das condições do *habitat* natural das abelhas.

Os meios de cultura utilizados no isolamento foram específicos para fungos, “malt agar” (MA) e “corneal maize agar” (CMA).

As abelhas coletadas foram cortadas com auxílio de um bisturi e colocadas em placas com meios de cultura MA e CMA, agitadas para que as mesmas “carimbassem” todo o meio e incubadas a 28 °C para que houvesse o crescimento.

Após 48 horas de incubação observou-se o início do crescimento dos fungos, com 96 horas todas as placas apresentavam excelente crescimento (Figura 2).





(A)



(B)

**Figura 2: (A) Asa da abelha *Trigona* sp com fungos; (B) Pata da abelha *Trigona* sp com fungos**

Todas as placas contendo os diversos fungos foram observadas na lupa com acompanhamento de uma microbiologista para identificação preliminar dos diferentes tipos de fungos.

Os fungos isolados e classificados até o momento das abelhas *Trigona* sp estão apresentados na Tabela 3.

Tabela 3: Fungos isolados e classificados das abelhas *Trigona* sp.

| Códigos | Linhagens | Identificação                  |
|---------|-----------|--------------------------------|
| RC 01   | CCT 5551  | <i>Trichoderma</i> sp          |
| RC 02   | CCT 5552  | <i>Nodulisporium</i> sp        |
| RC 03   | CCT 5553  |                                |
| RC 04   | CCT 5628  | <i>Curvularia lunata</i>       |
| RC 05   | CCT 5559  | <i>Aspergillus niger</i>       |
| RC 06   | CCT 5629  |                                |
| RC 06A  | CCT 5654  | <i>Curvularia pallescens</i>   |
| RC 07   | CCT 5560  |                                |
| RC 08   | CCT 5630  |                                |
| RC 09   | CCT 5631  | <i>Dreschlera dematioidea</i>  |
| RC 10   | CCT 5635  |                                |
| RC 11   | CCT 5636  | <i>Dreschlera halodes</i>      |
| RC 12   | CCT 5632  |                                |
| RC 13   | CCT 5633  | <i>Penicillium pinophilum</i>  |
| RC 14   | CCT 5634  | <i>Curvularia eragrostides</i> |
| RC 15   |           |                                |
| RC 16   | CCT 5561  |                                |

### I.2.1. Ensaios Biológicos

#### I.2.1.1. Ensaio bioautográfico com as resinas florais de *Clusia* e o ninho das abelhas *Trigona* sp

Para realização do ensaio biológico preparou-se uma suspensão de esporos dos fungos isolados das abelhas ( $10^6 - 10^7$  esporos/mL).

Os testes foram realizados utilizando-se placas CCD (sílica gel 60 GF<sub>254</sub>, Merck), aplicou-se 10 µL de amostras nas placas a partir de uma solução de 10 mg/mL em acetato de etila no caso dos extratos das resinas florais de *Clusia weddelliana* masculina e *Clusia spiritu-sanctensis* masculina, 5 µL a partir de uma solução de 50 mg/mL do ninho em acetato de etila e 1 µL a partir de uma solução 10 mg/mL em metanol para o padrão fungicida (nistatina). As placas foram eluídas com hexano / AcOEt (85:15) e feitas em duplicatas, para que uma fosse utilizada no ensaio biológico e a outra como padrão de comparação mediante revelação com solução de anisaldeído.

Preparou-se o meio MA, transferiu-se 20 mL para as placas de Petri contendo a placa CCD e adicionou-se 100 µL da suspensão de esporos dos 17 fungos isolados de abelhas *Trigona* sp. Terminada a inoculação, as placas foram incubadas a 28 °C por um período de 48 horas.

Os resultados dos ensaios foram avaliados qualitativamente observando se na superfície do meio de cultura existia ou não halo de inibição de crescimento microbiano decorrido o prazo de incubação.

Verificou-se que não havia halo de inibição em nenhuma placa inoculada com os diferentes fungos isolados de abelha, conforme pode ser ilustrado na Figura 3, comprovando que os fungos isolados participavam do sistema associativo *Trigona* - *Clusia* - microrganismos.

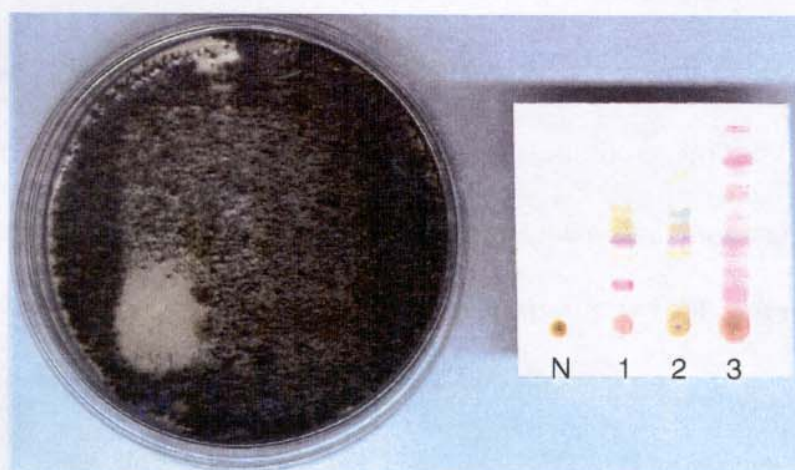


Figura 3: Ensaio bioautográfico do fungo RC 03: N-nistatina, 1-*C. spiritu - sanctensis*, 2-*C. weddelliana*, 3-ninho.

#### I.2.1.2. Técnica de disco de difusão em ágar

A técnica de disco de difusão em ágar é um método comumente utilizado em laboratórios de microbiologia para mensuração da sensibilidade das bactérias aos vários agentes antibióticos. Os discos de filtro de papel são impregnados com

antibióticos e colocados na superfície do ágar, previamente inoculado com o microrganismo a ser testado. O antibiótico do disco difunde-se no ágar, resultando em distintas zonas de inibição do crescimento em volta dos discos os quais a bactéria testada é sensível [46].

Esta metodologia foi adaptada para avaliação da atividade dos fungos isolados de abelha *Trigona* sp frente aos microrganismos de referência apresentados na Tabela 4.

Tabela 4: Microrganismos de referência utilizados nos ensaios biológicos.

| Microrganismo                         | Temp. ótima<br>(°C) | Tempo de<br>crescimento (h) | Meio de<br>cultura |
|---------------------------------------|---------------------|-----------------------------|--------------------|
| <i>Escherichia coli</i> CCT 5050      | 37                  | 24                          | MH                 |
| <i>Staphylococcus aureus</i> CCT 4295 | 37                  | 24                          | MH                 |
| <i>Bacillus subtilis</i> CCT 0089     | 30                  | 24                          | MH                 |
| <i>Rhodococcus equi</i> CCT 0541      | 37                  | 24                          | MH                 |
| <i>Candida albicans</i> CCT 0776      | 28                  | 48                          | YMA                |
| <i>Aspergillus niger</i> CCT 1435     | 28                  | 168                         | MA                 |

MH – “Mueller Hinton Medium” (Difco); YMA – “Yeast Malt Extract Agar” (Difco);

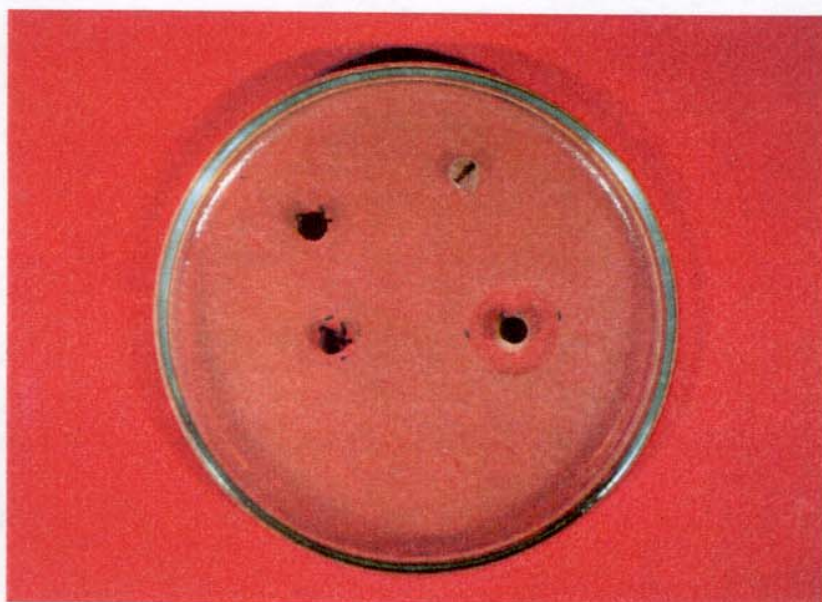
MA – “Malt Agar”(Difco)

Todos os fungos isolados das abelhas foram repicados em placas de Petri com meio de cultura MA em forma de estrias de forma que proporcionasse um crescimento homogêneo por toda a placa e foram incubadas por duas semanas a 28 °C.



Após o período de incubação as culturas dos fungos obtidas foram cortadas com um cortador manual em pequenos círculos de ágar ( $\varnothing$  5 mm). Estes pequenos círculos contendo os fungos foram colocados sobre as culturas dos microrganismos de referência, já previamente inoculados com concentrações conhecidas no caso das bactérias, levedura ( $6,0 \times 10^8$  células/mL) e do fungo ( $2,0 \times 10^6$  esporos/mL) (Tabela 4).

A leitura do ensaio biológico foi realizada após 18 horas de incubação e os resultados foram muito interessantes, observou-se que vários fungos inibiam o crescimento dos microrganismos de referência, o halo de inibição de crescimento foi medido em milímetros (mm) e os valores podem ser vistos na Tabela 5 e o ensaio biológico exemplificado na Figura 6.



**Figura 4:** Teste de inibição de crescimento dos microrganismos de referência pelos fungos isolados da *Trigona* sp.

**Tabela 5: Resultados do ensaio biológico dos fungos isolados com os microrganismos de referência.**

| Halos de inibição dos microrganismos de referência (Ø mm) |                  |                    |                |                |                    |                 |
|-----------------------------------------------------------|------------------|--------------------|----------------|----------------|--------------------|-----------------|
|                                                           | <i>S. aureus</i> | <i>B. subtilis</i> | <i>E. coli</i> | <i>R. equi</i> | <i>C. albicans</i> | <i>A. niger</i> |
| Fungos                                                    | CCT              | CCT                | CCT            | CCT            | CCT 0776           | CCT             |
| isolados                                                  | 4295             | 0089               | 5050           | 0541           |                    | 1435            |
| RC01                                                      | ----             | ----               | ----           | ----           | ----               | 19              |
| RC02                                                      | 7                | ----               | ----           | ----           | ----               | ----            |
| RC04                                                      | 12               | 13                 | ----           | 13             | ----               | 13              |
| RC05                                                      | ----             | ----               | ----           | ----           | ----               | 12              |
| RC06                                                      | 9                | 12                 | ----           | 14             | ----               | ----            |
| RC06A                                                     | 11               | 11                 | ----           | 20             | ----               | ----            |
| RC09                                                      | ----             | 8                  | ----           | ----           | ----               | 10              |
| RC11                                                      | ----             | ----               | ----           | ----           | ----               | 10              |
| RC13                                                      | ----             | 8                  | ----           | 8              | ----               | 10              |
| RC14                                                      | 14               | 13                 | ----           | 20             | ----               | 15              |

### **I.3. Conclusão**

O presente trabalho levou ao isolamento de trinta e cinco bactérias do solo de cana-de-açúcar utilizando a técnica de seleção de microrganismos por enriquecimento do solo e estas encontram-se preservadas na Fundação Tropical “André Tosello”;

A identificação preliminar dos microrganismos isolados do corpo das abelhas *Trigona* sp demonstrou o isolamento de dezessete fungos. Através da técnica de difusão em ágar observou-se que vários fungos apresentaram atividade bactericida e fungicida ;

As resinas florais não metiladas de *Clusia* e o extrato do ninho das abelhas polinizadoras não inibiram o crescimento de nenhum fungo isolado das abelhas, fato este que serviu de comprovação da participação dos mesmos no ambiente restrito escolhido resina floral de *Clusia- Trigona-* microrganismos;

Com a realização destes experimentos foi possível verificar a interação mutualística entre as resinas florais de *Clusia*, as abelhas polinizadoras e os seus fungos, constituindo um exemplo comprovado de um sistema ecológico envolvendo os três reinos naturais.

---

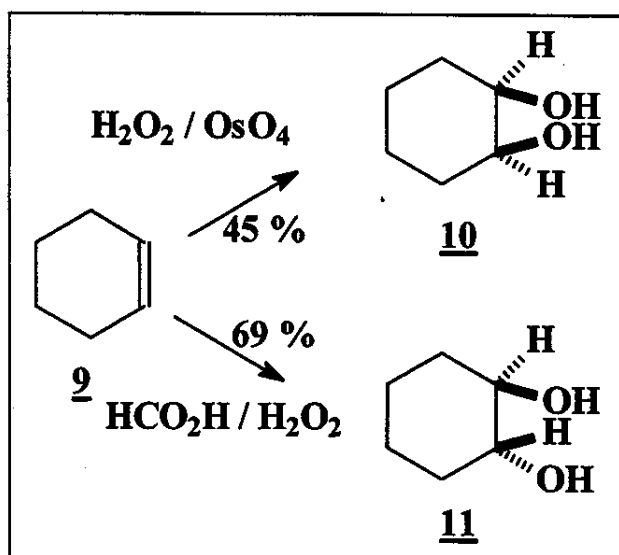
## *Capítulo II*

---

## II.1. Preparo dos substratos e padrões racêmicos

### II.1.1. Preparo do *cis* e *trans* cicloexanodiol (10 e 11)

Os *cis* e *trans* cicloexanodiol (10 e 11) utilizados como indutores de monoxigenase na técnica de seleção de microrganismos de solo, foram preparados por hidroxilação do cicloexeno comercial, usando-se água oxigenada / tetróxido de ósmio ou ácido fórmico / água oxigenada, com rendimento de 45 e 69 %, respectivamente (Esquema 10) [47].



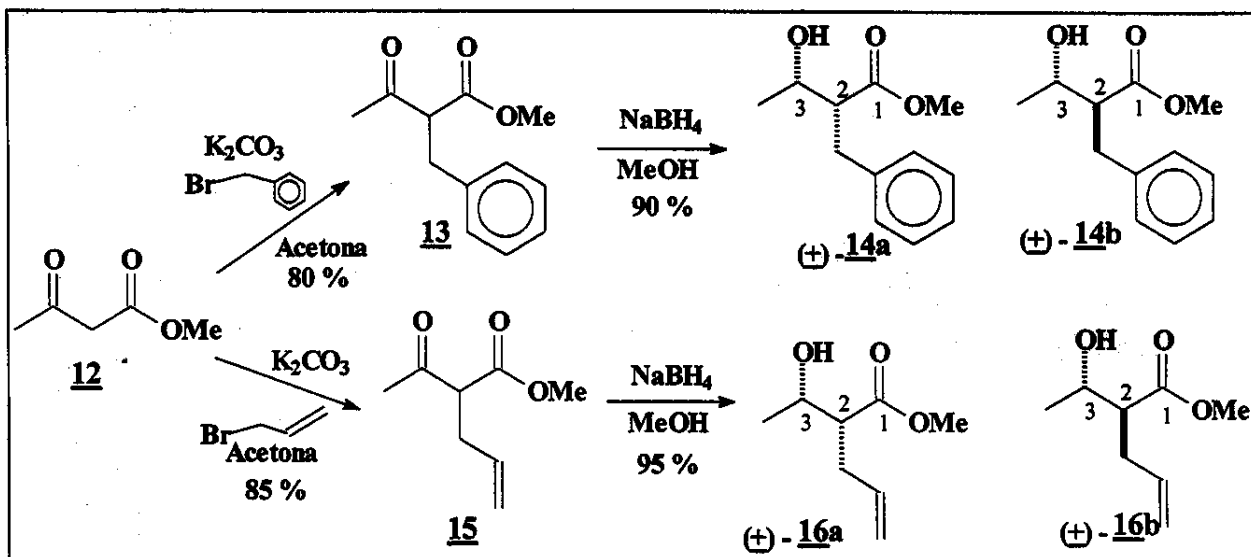
Esquema 10: Preparo do *cis* e *trans* (2 e 3) cicloexanodiol.

Os produtos obtidos foram caracterizados por RMN de  $^1\text{H}$  e de  $^{13}\text{C}$ . Nos espectros de RMN de  $^1\text{H}$ , dos diols *cis* (10) e do *trans* (11) observa-se um conjunto de 4 sinais, 3 multipletos mais protegidos ( $\delta$  0,90 a 2,00) correspondentes a 8

hidrogênios e multipletos ( $\delta$  3,61-3,66) e ( $\delta$  3,18-3,24 ) atribuídos aos hidrogênios carbinólicos *cis* e *trans* respectivamente segundo os dados da literatura [47a]. Os sinais de RMN de  $^{13}\text{C}$  demonstram que os carbonos do isômero *cis* **10** ressonam a frequências menores que os carbonos correspondentes ao isômero *trans* **11**. Este fato está de acordo com os dados da literatura [47b]. Portanto comprovou-se a síntese dos dois padrões desejados.

### **II.1.2. Preparo dos $\beta$ -cetoésteres **13** e **15****

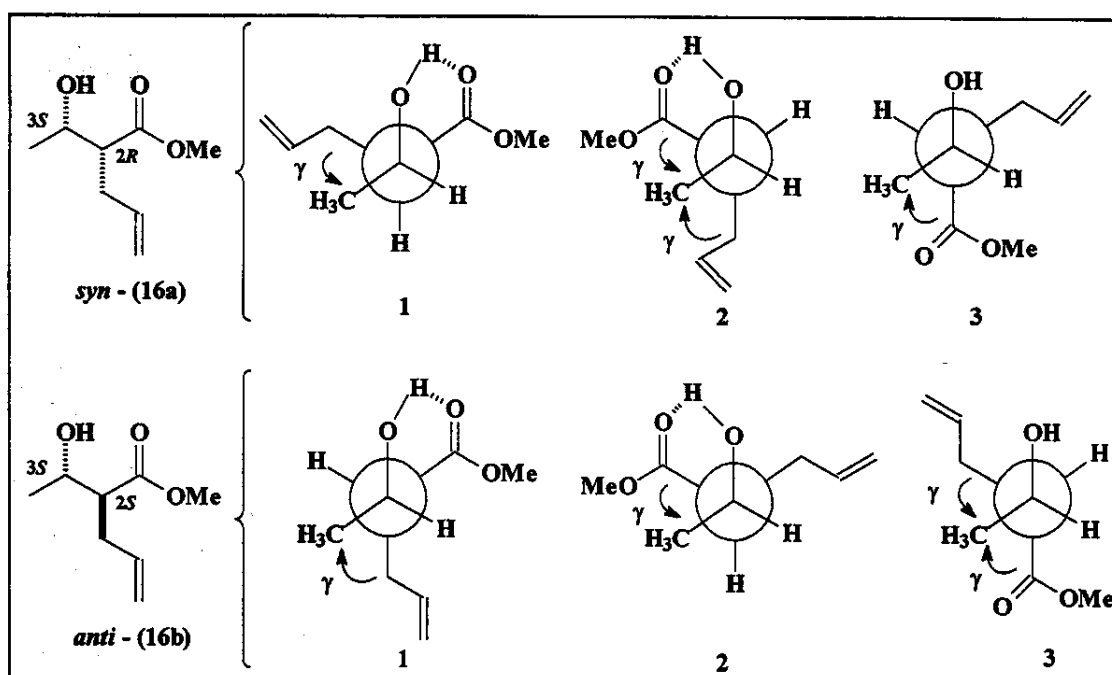
Os  $\beta$ -cetoésteres **13** e **15** utilizados nas biorreduções foram obtidos utilizando a metodologia de Bieber [48] através da alquilação do acetoacetato de metila **12** comercial, com brometo de benzila e alila com rendimento de 80 e 85 %, respectivamente (Esquema 11). As cetonas foram submetidas à redução com  $\text{NaBH}_4/\text{MeOH}$ , obtendo-se desta forma os padrões dos diastereoisômeros racêmicos **14a** e **14b** (90 % de rendimento) e **16a** e **16b** (95% de rendimento) necessários para o acompanhamento das reações biocatalisadas.



Esquema 11: Preparo dos β-cetoésteres **13** e **15** e seus respectivos álcoois racêmicos.

A configuração relativa dos diastereoisômeros **16a** e **16b** foi estabelecida primeiramente por RMN de <sup>13</sup>C. No espectro de RMN de <sup>13</sup>C observamos que as metilas correspondentes aos diastereoisômeros *syn* e *anti* eram distintas. A distinção entre os deslocamentos químicos pode ser racionalizada levando em consideração os diversos rotâmeros e suas estabilidades relativas (Esquema 12). Deve ser esclarecido que o sistema em estudo apresenta características de um sistema dinâmico rápido para a escala de tempo da RMN (sinais com largura de linha inferior a 1 Hz), portanto os deslocamentos químicos dos hidrogênios e carbono-13 são uma média ponderada dos deslocamentos químicos de cada confôrmero. Dentre as conformações possíveis para estes compostos é possível observar que os rotâmeros 1 e 2 dos diastereoisômeros *syn* e *anti* são estabilizadas por ligações de hidrogênio e deveriam ser as predominantes. Ao comparar as duas conformações preferenciais dos isômeros *syn* e *anti* nota-se que a conformação 2 do *syn* possui duas interações

do tipo  $\gamma$ -“gauches”, enquanto que no diastereoisômero *anti* ambas conformações possuem somente uma destas interações. Portanto, a partir do fato que interações deste tipo provocam um efeito de proteção em RMN de  $^{13}\text{C}$  [49], o sinal de metila que ressona a frequências menores foi atribuído ao *syn*-**16a** ( $\delta$  20,38) e o mais desprotegido ao *anti*-**16b** ( $\delta$  21,43).



Esquema 12: Análise da configuração relativa para os álcoois diastereoisoméricos **16a** e **16b**.

A análise do espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$ , levando em consideração o raciocínio acima, demonstra que a redução de cetona **15** com  $\text{NaBH}_4/\text{MeOH}$  produziu os álcoois **16b** e **16a** na proporção *anti:syn* 2 : 1.

A partir desta identificação espectral foi possível identificar os sinais de RMN de  $^{13}\text{C}$  do diastereoisômero *anti* e do *syn* e a proporção correta entre eles pôde



melhor ser avaliada através da integração dos sinais discriminados por cromatografia a gás.

Para considerarmos este um padrão sintético adequado numa avaliação enzimática (desidrogenases) foi necessário estabelecer ainda o método ideal para observar a enantiosseletividade da reação. A dificuldade de determinação da composição enantiomérica (excesso enantiomérico e.e.) é central para as pesquisas em biocatálise. E para tanto é necessário ter um método eficiente para discriminar os enantiômeros. Neste contexto a cromatografia a gás em fase quiral é um dos métodos mais eficientes no que se refere ao custo e ao benefício [50 – 51].

A análise por cromatografia a gás CG(FID) utilizando-se coluna capilar de sílica fundida com fase estacionária quiral heptakis-(2,6-metil-3-pentil)- $\beta$ -ciclodextrina forneceu um cromatograma onde pode ser observada a resolução dos quatro estereoisômeros na proporção 2:2:1:1 (mistura *anti* : *syn*). (Figura 5).

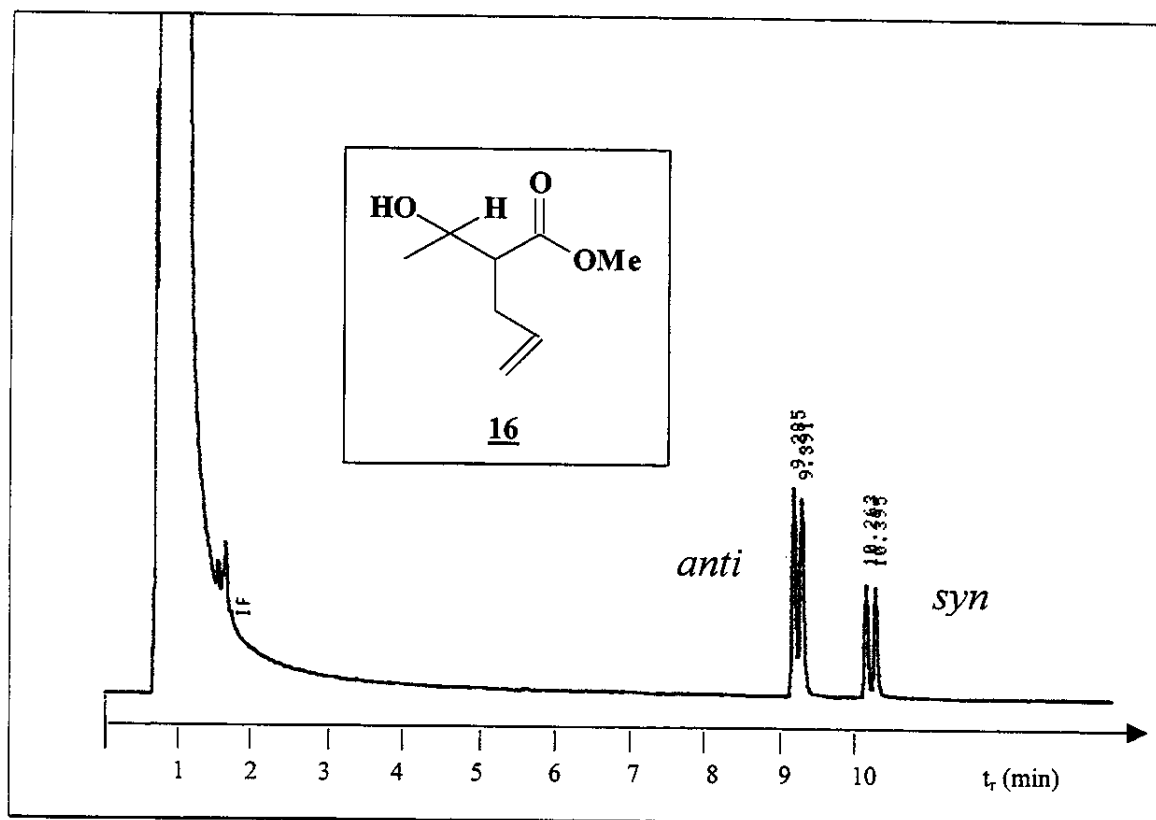
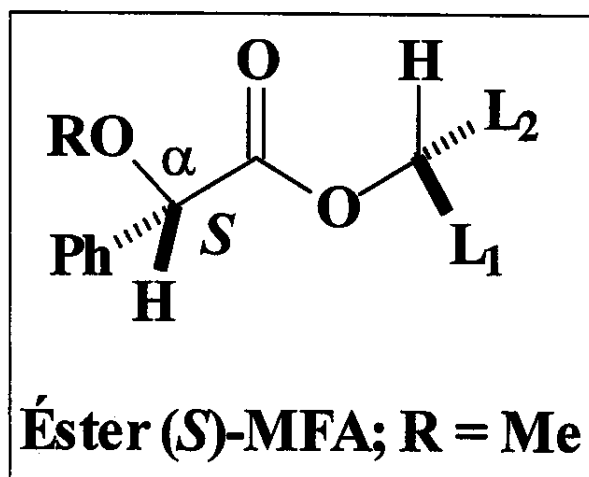


Figura 5: Cromatograma obtido por CG/FID equipado com coluna capilar de sílica fundida com fase quiral heptakis-(2,6-metil-3-pentil)- $\beta$ -ciclodextrina do álcool racêmico e diastereoisomérico (mistura *anti:syn* 2:1) **16**.

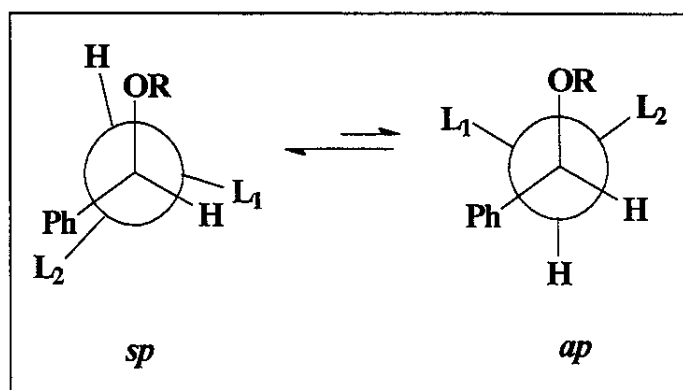
Para determinar a configuração absoluta de cada estereoisômero utilizou-se a RMN de  $^1\text{H}$  com derivados *O*-acetilmandélico e *O*-metilmandélico. A literatura recente demonstra o interesse crescente no desenvolvimento de reagentes quirais derivantes para determinação da configuração absoluta de compostos orgânicos por RMN de ( $^1\text{H}$ ,  $^{19}\text{F}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{31}\text{P}$ ,  $^{77}\text{Se}$ ) [52 - 59]. A diferenciação dos sinais de RMN dos diastereoisômeros [60] ou complexos diastereotópicos [61] obtidos pela reação do reagente derivante quiral (com configuração absoluta conhecida) com a molécula do substrato pode ser utilizada para determinar sua configuração absoluta.

O padrão químico racêmico e diastereoisomérico (mistura *anti* / *syn* 2:1) **16a** e **16b** foram submetidos ao ácido (*R*)-*O*-acetilmandélico e o ácido (*S*)-*O*-metilmandélico. A análise dos resultados obtidos da derivação com agentes quirais baseou-se na metodologia descrita por Corey *et al*, Trost *et al*, Smith and Konopelki, Lebreton *et al* [62] que propõe que no espectro de RMN de  $^1\text{H}$  dos derivados, a conformação mais estável para os ésteres é aquela onde o hidrogênio metínico do éster formado com o álcool secundário, a carbonila e o grupo metoxi ou acetila são todos *syn* e coplanares (Esquema 13).

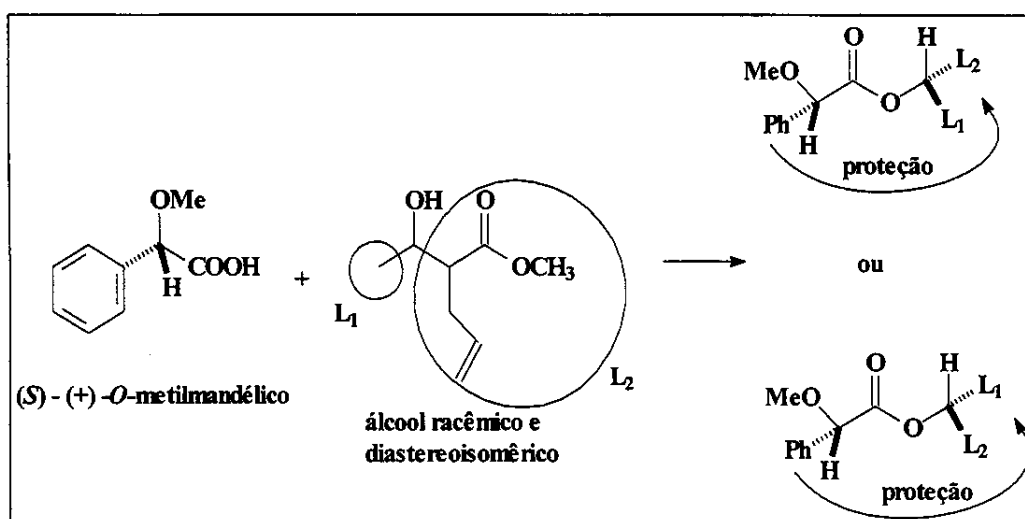


Esquema 13: Modelo proposto para explicar os espectros de RMN de  $^1\text{H}$  dos ésteres de *O*-metilmandélico.

Os ésteres (*S*) e (*R*) do *O*-metilmandélico de álcoois secundários existem em duas conformações predominantes a *syn*-periplanar (*sp*) e a *anti*-periplanar (*ap*).

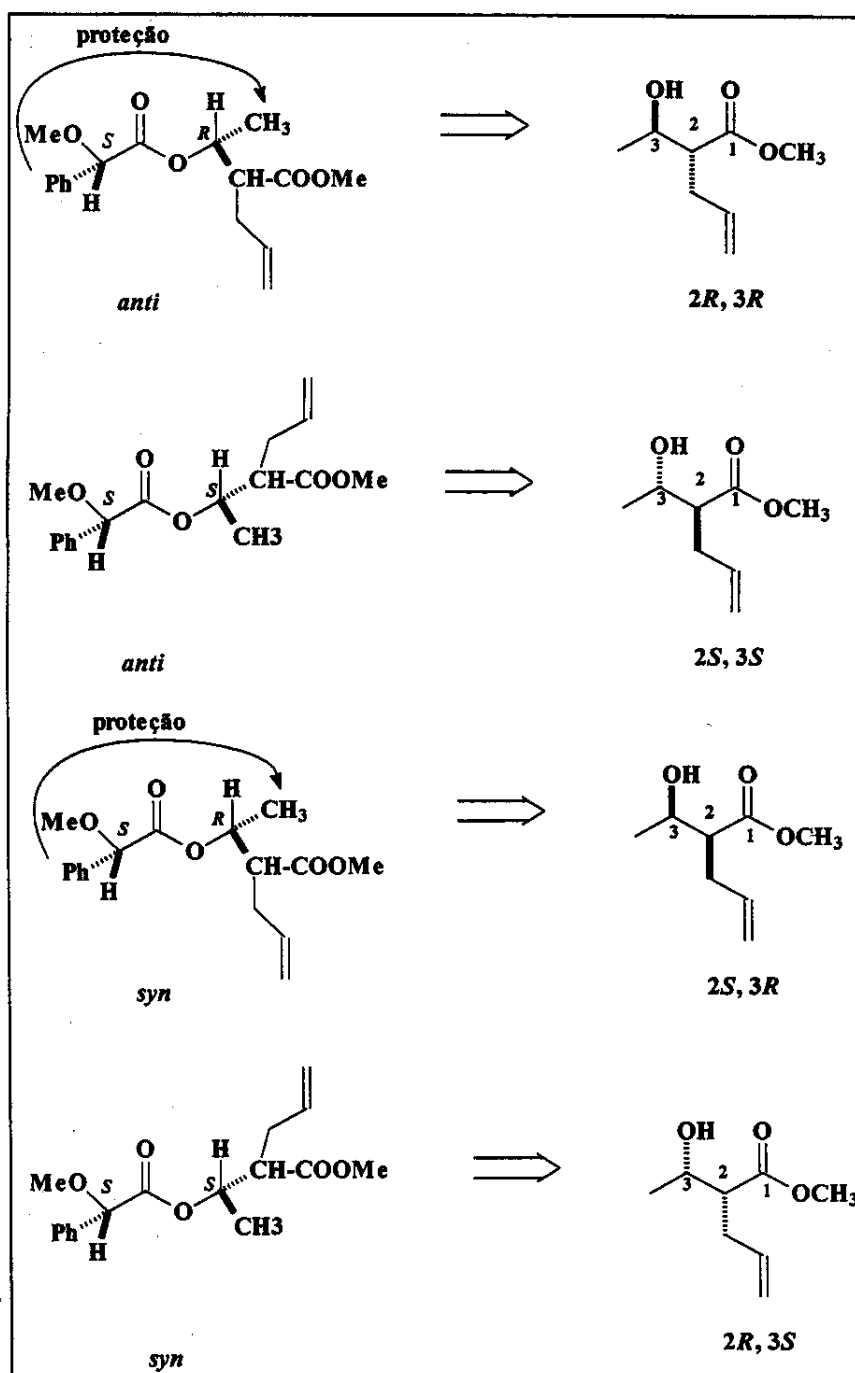


Os grupos (L<sub>1</sub> ou L<sub>2</sub>), substituintes do carbono carbinólico, serão protegidos ou desprotegidos de acordo com a posição relativa ao anel aromático (Esquema 14).



Esquema 14: Derivação do álcool racêmico e diastereoisomérico (mistura *anti:syn* 2:1) **16a** e **16b** com o (S)-(+)-O-metilmandélico.

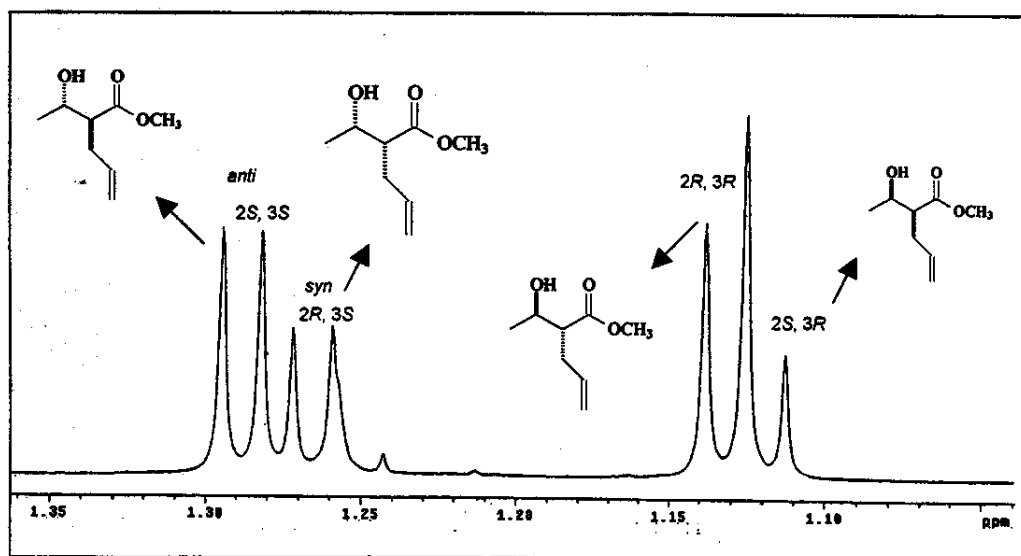
Dentre as várias conformações possíveis dos derivados de **16a** e **16b** com o (S)-O-metilmandélico as mais estáveis estão indicadas no Esquema 15, e se apoiaram em estudos anteriores realizados por Corey *et al.*, Smith and Konopelski, Trost *et al* e Lebreton [62].



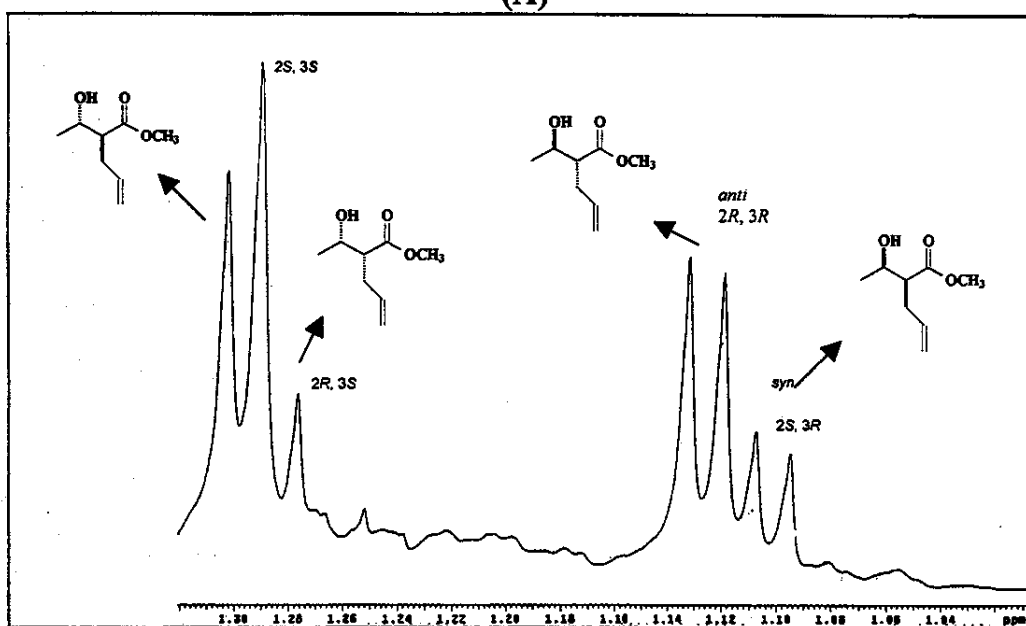
Esquema 15: Conformação mais estável dos derivados de (S)-O-metilmandílico (mistura *anti* : *syn* 2:1) **16a** e **16b** proposta de acordo com a literatura [62].

Analisando-se o espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (Figura 6) na região da metila ( $\delta$  1.2) para o padrão químico racêmico do álcool **16**, verificamos que os sinais

majoritários correspondem aos diastereoisômeros *anti* ( $2R, 3R$ ) e ( $2S, 3S$ ) e os minoritários aos diastereoisômeros *syn* ( $2S, 3R$ ) e ( $2R, 3S$ ).



(A)



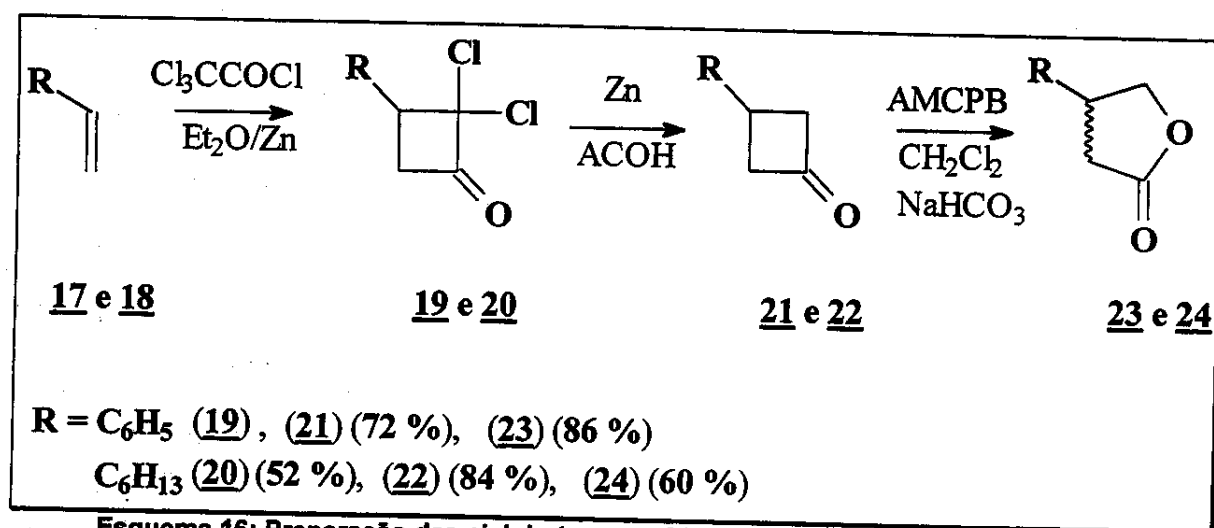
(B)

Figura 6: Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (500 MHz) do: (A) álcool racêmico e diastereoisomérico (mistura *syn* : *anti* 1:2) **16** derivado com o ácido (*S*)-*O*-metilmandélico; (B) álcool racêmico e diastereoisomérico **16** derivado com o ácido (*R*)-*O*-acetilmandélico.

Tendo otimizado os métodos cromatográficos para os possíveis produtos de redução do álcool 16 e caracterizado cada um dos estereoisômeros por RMN de  $^1\text{H}$ , considerou-se que os padrões estavam devidamente identificados para o acompanhamento das reações biocatalisadas e partiu-se para a preparação dos padrões das ciclobutanonas.

### II.1.3. Preparo das ciclobutanonas pró-quirais 21 e 22

As ciclobutanonas pró-quirais eram padrões essenciais para monitorar a atividade de monoxigenases e foram preparadas seguindo o procedimento descrito por Ghosez e colaboradores [63] envolvendo uma cicloadição intermolecular [2 + 2] do dicloroceteno para as olefinas reativas (Esquema 16).

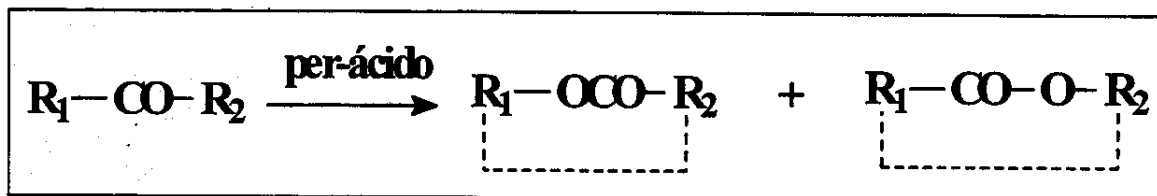


Esquema 16: Preparação das ciclobutanonas 21 e 22 e suas lactonas racêmicas

correspondentes.

O dicloroceteno é uma espécie lábil e reativa, é deve ser gerada *in situ* através de uma técnica eficiente e conveniente para o emprego na síntese. Os dois métodos mais comumente utilizados para a formação do dicloroceteno são a desalogenação do cloreto de tricloroacetila pelo zinco ativado e a desidrohalogenação do cloreto de dicloroacetila com trietilamina [64 - 65]. O método de desalogenação utilizando o zinco é o procedimento mais empregado e a realização da reação sob sonicação aumenta significativamente a eficiência e a velocidade da cicloadição olefina – dicloroceteno [66]. Os compostos 1-octeno **17** e estireno **18** reagiram sob sonicação com o dicloroceteno formando as diclorociclobutanonas que sofrem redução dos átomos de cloro na presença de zinco/AcOH. As ciclobutanonas foram submetidas a reação de oxidação de Baeyer-Villiger química utilizando o ácido *meta*-cloroperbenzóico (*m*-CPBA) obtendo-se desta forma os padrões racêmicos das lactonas **23** e **24** para o acompanhamento das reações biocatalisadas (Esquema 16).

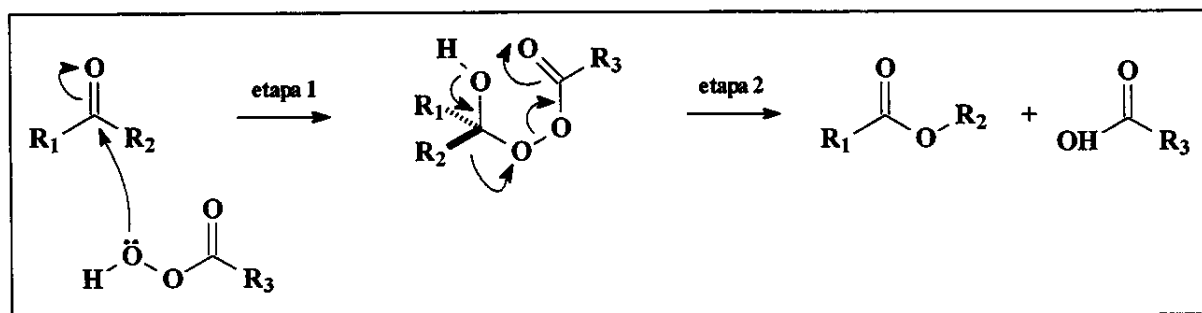
A conversão de cetonas acíclicas para ésteres ou de cetonas cíclicas para lactonas, conhecidas como reação de Baeyer-Villiger pode ser alcançada quimicamente utilizando um per-ácido (Esquema 17).



Esquema 17: Reação de Baeyer-Villiger.



A adição do per-ácido para o grupo carbonila da cetona (etapa 1) origina um intermediário tetraédrico “Criegee”. Subseqüentemente (etapa 2), este intermediário rearranja-se para formar o éster correspondente ou a lactona. Quando substituintes distintos estão ligados ao átomo de carbono carbonílico, aquele que melhor acomoda a carga positiva parcial migra para o novo átomo de oxigênio da molécula ( $R_2$  no Esquema 18) [67 – 68]. Conseqüentemente, a preferência de migração para grupos alquilas na oxidação de Baeyer-Villiger é terciário > secundário > primário > metila. Esta sequência tem sido atribuída ou a maior tendência de doar elétrons, ou a aceleração estérea de migração pelo grupo maior [69 – 71]. Fatores conformacionais, estéreos e eletrônicos podem alterar a preferência normal do grupo que migrará, embora a regioquímica da reação é usualmente previsível [68, 72 – 73]. Entretanto, os problemas surgem quando os dois grupos que irão migrar são similares e, portanto ambos regioisômeros possíveis do produto são frequentemente formados.



Esquema 18: Mecanismo proposto para oxidação de Baeyer-Villiger.

Desta forma, todos os substratos racêmicos, pró-quirais e os padrões racêmicos foram sintetizados para posterior avaliação da atividade enzimática dos microrganismos isolados de ambientes específicos e de linhagens puras e autenticadas do território Nacional obtidos a partir da Coleção de Culturas Tropicais da Fundação Tropical “André Tosello”.

---

## *Capítulo III*

---

### **III. Monitoramento de Linhagens Isoladas de Ambientes Específicos e de Algumas Linhagens Puras e Autenticadas Obtidas a Partir da Coleção de Culturas da Fundação Tropical “André Tosello”**

#### **III.1. Triagem de microrganismos para lactonização das ciclobutanonas pró-quirais.**

Dentro do objetivo de selecionar microrganismos com enzimas capazes de biooxidar compostos orgânicos, monitorou-se os microrganismos isolados de ambientes específicos e de linhagens puras (isoladas em território nacional) obtidas a partir da Coleção de Culturas Tropicais da Fundação Tropical “André Tosello”. Para tanto utilizou-se as ciclobutanonas pró-quirais preparadas segundo a sequência sintética descrita no Esquema 16, as quais seriam convertidas em  $\gamma$ -lactonas quirais.

As  $\gamma$ -lactonas quirais são intermediários versáteis na síntese de vários produtos naturais como alcalóides, feromônios e medicamentos contra leucemia [25, 76 – 80, 80a, 80b].

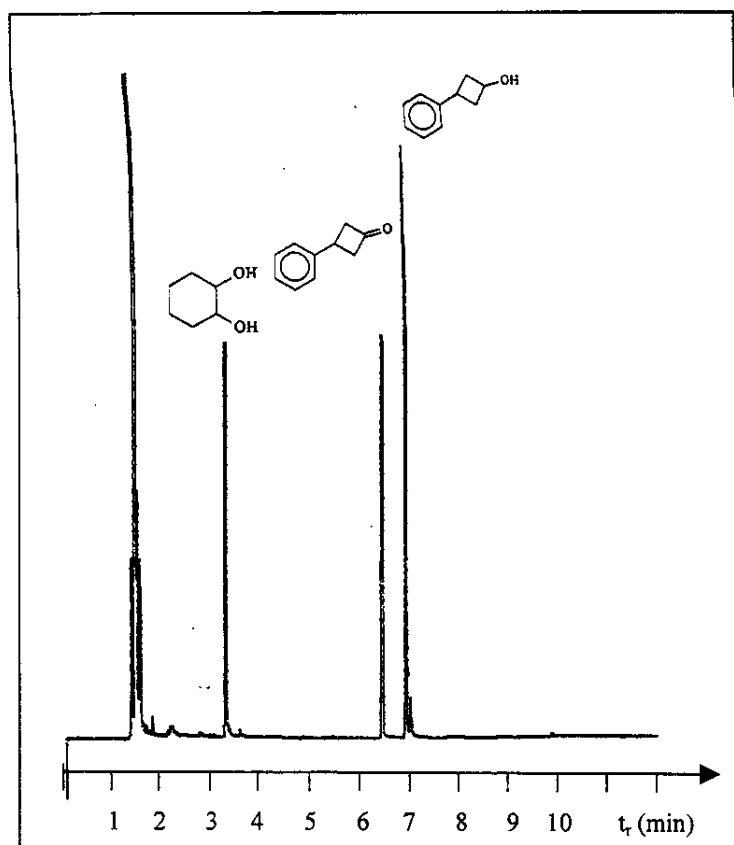
Estas são particularmente difíceis de serem preparadas via reação do tipo Baeyer-Villiger assimétrica, pois são poucos os métodos químicos disponíveis. Consequentemente os processos biocatalíticos representam atualmente alternativas eficientes para a transformação sítio, estereo e enantiosseletiva de ciclobutanonas através da ação enzimática com células íntegras [26, 66].

### **III.2. Avaliação da Atividade enzimática das Bactérias Isoladas do Solo de Cana-de-Açúcar**

Após o isolamento dos microrganismos e a síntese dos padrões, iniciou-se o monitoramento das enzimas de interesse nos microrganismos isolados. O monitoramento foi feito de forma separada e iniciou-se com as bactérias isoladas do solo. As 35 bactérias isoladas foram inoculadas em meio líquido constituído por sais minerais e o *cis* e *trans* cicloexanodiol, indutores de monoxigenases, como única fonte de carbono. As 20 culturas que apresentaram o melhor crescimento foram avaliadas quanto ao potencial de biocatálise na presença da 3-fenilciclobutanona **21** pró-quiral.

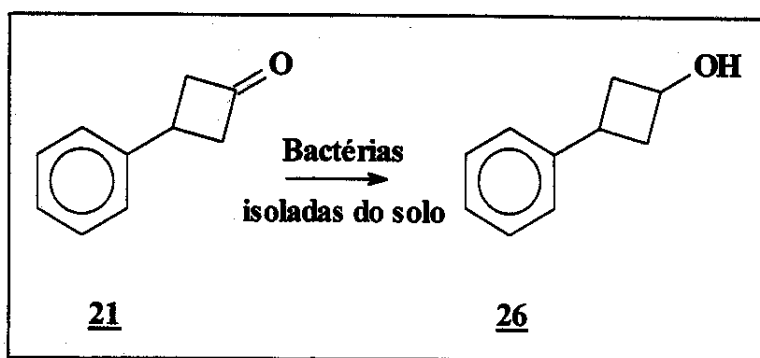
As biomassas centrifugadas foram transferidas para tubos de ensaio contendo 5 mL de solução tampão fosfato 0,1 M pH 7, 3 mg da ciclobutanona **21** e 1 mg de cicloexanodiol. Os tubos foram incubados em agitador rotatório (120 rpm) a 28 °C.

A reação foi monitorada a cada 12 h, retirando-se alíquotas (0,5 mL), extraindo o produto da reação com acetato de etila, secando sobre sulfato de sódio e analisando por cromatografia a gás CG(FID), utilizando-se coluna capilar de sílica fundida com fase estacionária quiral heptakis-(2,6-metil-3-pentil)- $\beta$ -ciclodextrina (Figura 7).



**Figura 7:** Cromatograma obtido por CG/FID equipado com coluna capilar de sílica fundida com fase quiral heptakis-(2,6-dimetil-3-pentil)- $\beta$ -ciclodextrina da reação da 3-fenilciclobutanona 21 com bactéria isolada do solo.

Os resultados obtidos na avaliação das 20 linhagens pré-selecionadas demonstraram que a formação do produto de redução da carbonila da ciclobutanona 21 ocorreu preferencialmente (Esquema 19). O ciclobutanol 26 resultante foi determinado por CG/EM ( $m/z = 148$ ).



Esquema 19: Reação de biocatálise da ciclobutanona **21**.

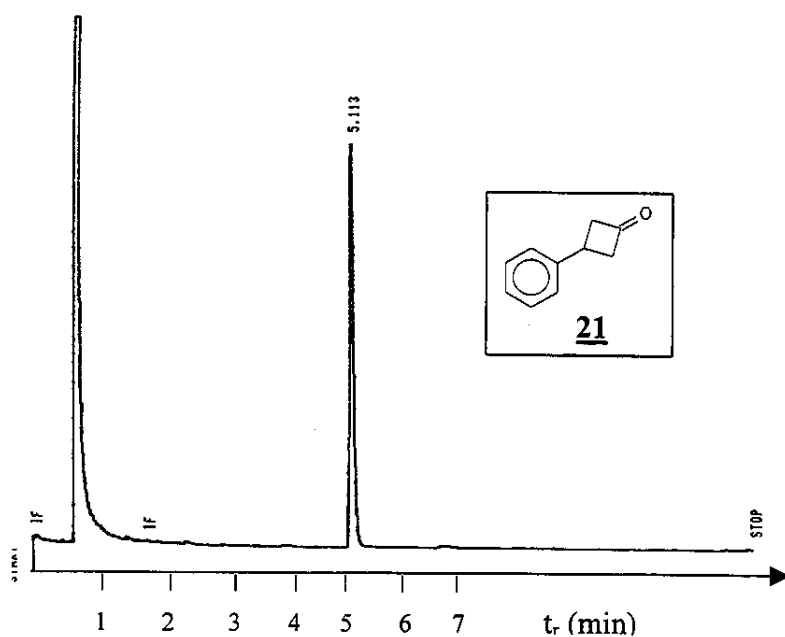
### III.3. Avaliação do potencial enzimático de fungos isolados de abelha *Trigona* sp

Selecionamos as oito linhagens de fungos (*Curvularia pallescens* CCT 5654, *Curvularia lunata* CCT 5629, *Dreschelera halodes* CCT 5636, *Dreschelera dematioidea* CCT 5631, *Curvularia lunata* CCT 5628, *Curvularia eragrostides* CCT 5634, *Aspergillus niger* CCT 5559 e *Trichoderma* sp CCT 5551) isolados da abelha e já identificados na Fundação Tropical de Pesquisa e Tecnologia “André Tosello” para avaliação de B.Villigerases. Os mesmos foram crescidos em meio nutriente líquido (ME) por 72 horas, a 28 °C em agitador rotatório. A biomassa foi filtrada e transferida para erlenmeyers contendo os substratos **21** e **22** (pg 45), em solução tampão fosfato 0,1 M pH 7.

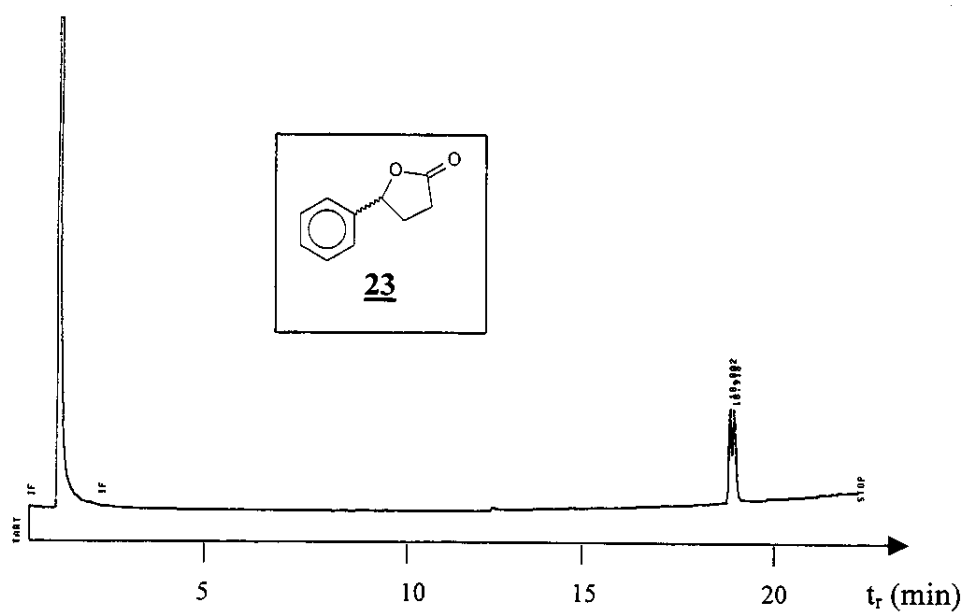
As reações biocatalisadas foram incubadas a 28 °C por 24 – 60 horas, sob agitação contínua. No decorrer deste período, alíquotas foram retiradas e os produtos extraídos da fase aquosa com acetato de etila.

As amostras foram analisadas por cromatografia gasosa (FID) empregando-se a coluna capilar de sílica fundida com a fase quiral heptakis-(2,6-dimetil-3-pentil)- $\beta$ -ciclodextrina. As condições iniciais de análise foram preestabelecidas pela injeção dos padrões sintéticos das lactonas racêmicas 23 e 24 e dos substratos 21 e 22 (Figuras 8A e 8B).



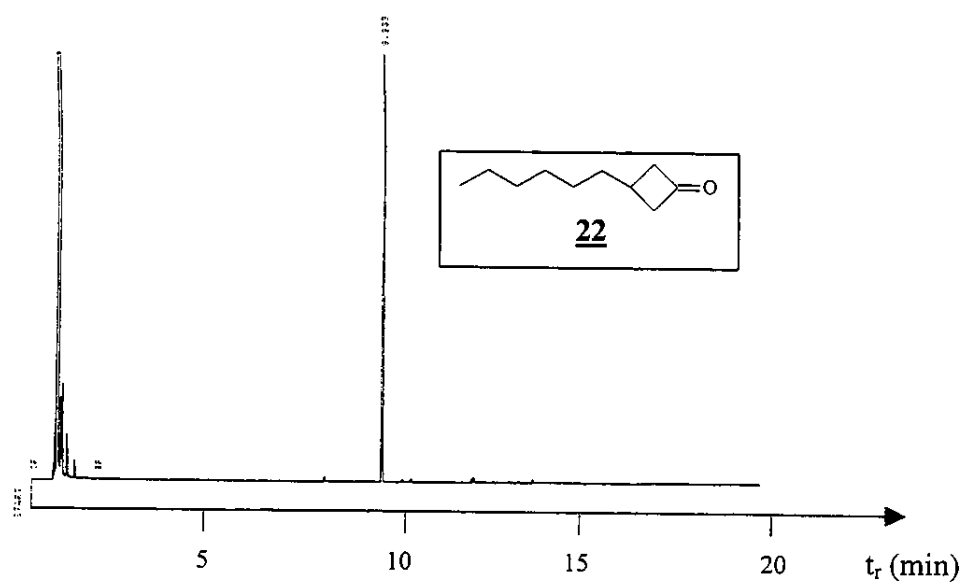


(a)

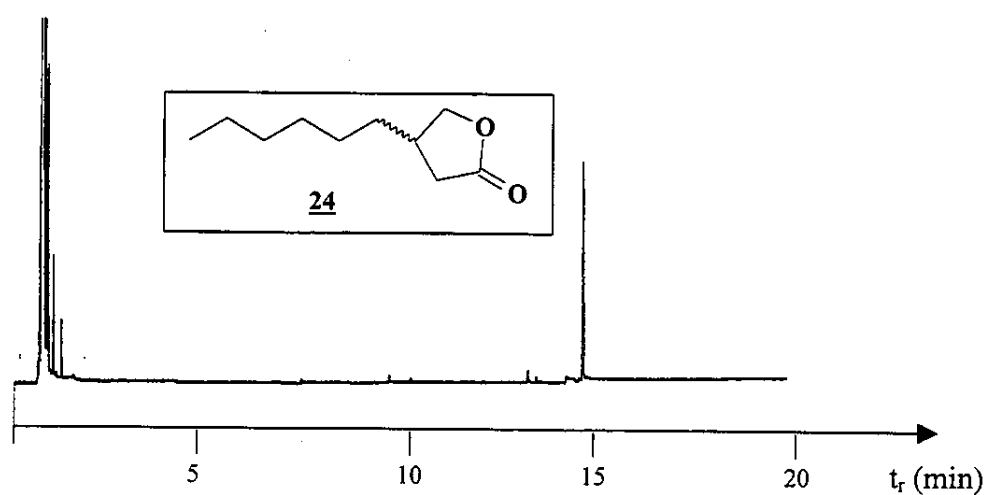


(b)

Figura 8A: Cromatograma obtido por CG/FID equipado com coluna capilar de sílica fundida com fase estacionária quiral heptakis-(2,6-dimetil-3-pentil)- $\beta$ -ciclodextrina da: (a) ciclobutanona **21**; (b) lactona **23**.



(c)



(d)

Figura 8B: Cromatograma obtido por CG/FID equipado com coluna capilar de sílica fundida com fase estacionária quiral heptakis-(2,6-dimetil-3-pentil)- $\beta$ -ciclodextrina da: (c) ciclobutanona 22; (d) lactona 24.

As linhagens *Curvularia pallescens* CCT 5654, *Curvularia lunata* CCT 5629, *Trichoderma sp* CCT 5551 e *Aspergillus niger* CCT 5559 apresentaram uma boa atividade de biooxidação do substrato 22, enquanto que as linhagens *Dreschelera halodes* CCT 5636, *Curvularia lunata* CCT 5628 e *Curvularia eragrostides* CCT 5634 apresentaram reações competitivas de redução e oxidação, estes resultados foram confirmados através de padrões das ciclobutanonas 21 e 22 reduzidos com NaBH<sub>4</sub>/MeOH. Com as demais linhagens testadas não se observou nem o produto de oxidação nem de redução.

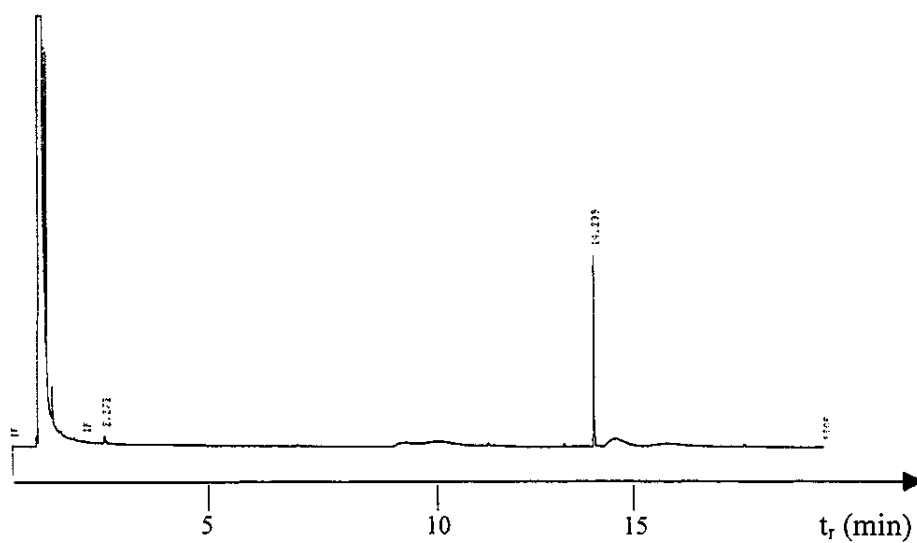
Os resultados preliminares obtidos com a reação de oxidação da ciclobutanona 22 pró-quiral na presença de células em repouso de fungos isolados da abelha *Trigona sp* estão resumidos na Tabela 6. Os melhores resultados foram obtidos com os fungos *C. lunata* CCT 5629, *A. niger* CCT 5559 e *Trichoderma sp* CCT 5551 e os cromatogramas obtidos com as oxidações biocatalisadas são mostrados na Figura 8C.

No caso da ciclobutanona 21 não foi observado a formação da lactona 24 com nenhum dos fungos testados e o produto de reação majoritário foi o proveniente da redução.

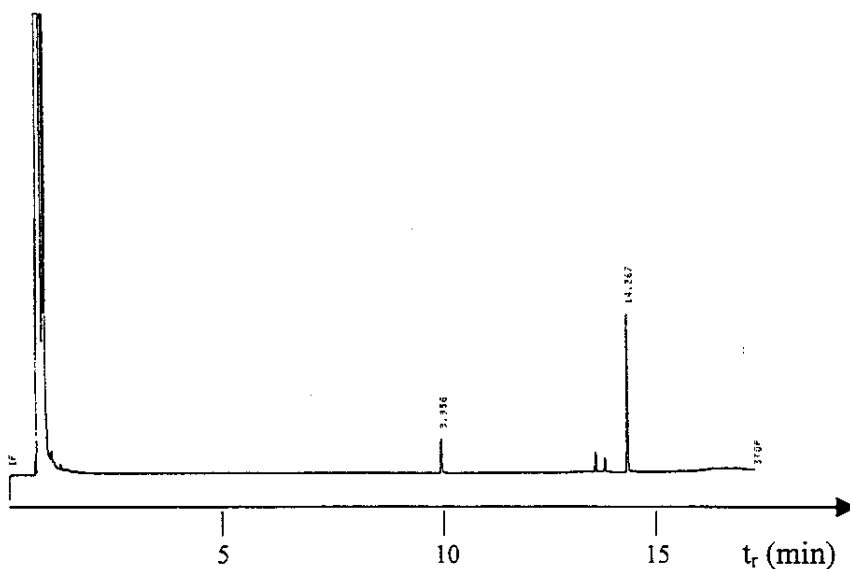
Tabela 6: Oxidação da ciclobutanona 22 pró-quiral com células em repouso de fungos isolados da abelha *Trigona* sp.

| Microrganismos         | Conversão (%)* | Produto de<br>redução (%) | Formação da lactona <u>24</u><br>(%) |
|------------------------|----------------|---------------------------|--------------------------------------|
| <i>C. pallescens</i>   |                |                           |                                      |
| CCT 5654               | 100            | ----                      | 54                                   |
| <i>D. holodes</i>      |                |                           |                                      |
| CCT 5636               | 80             | 44                        | 26                                   |
| <i>D. dematioidea</i>  |                |                           |                                      |
| CCT 5631               | 50             | ----                      | ----                                 |
| <i>C. lunata</i>       |                |                           |                                      |
| CCT 5629               | 100            | ----                      | 80                                   |
| <i>C. lunata</i>       |                |                           |                                      |
| CCT 5628               | 70             | 26                        | 44                                   |
| <i>Trichoderma</i> sp  |                |                           |                                      |
| CCT 5551               | 70             | ----                      | 70                                   |
| <i>C. eragrostides</i> |                |                           |                                      |
| CCT 5634               | 85             | 10                        | 20                                   |
| <i>A. niger</i>        |                |                           |                                      |
| CCT 5559               | 85             | ----                      | 80                                   |

\* calculado por cromatografia a gás.



(a)



(b)

Figura 8C: Cromatograma obtido por CG/FID equipado com coluna capilar de sílica fundida com fase estacionária quiral heptakis-(2,6-dimetil-3-pentil)- $\beta$ -ciclodextrina da: (a) biooxidação da ciclobutanona 22 com *C.lunata* ; (b) biooxidação da ciclobutanona 22 com *A. niger*.

#### III.4. Avaliação do potencial enzimático de linhagens puras isoladas do território nacional

Além dos microrganismos isolados de ambientes específicos considerou-se adequado testar a atividade enzimática de microrganismos com reconhecida atividade de monoxigenases[31, 74]. Foram selecionadas três linhagens do fungo *Cunninghamella echinulata* (CCT 4424, CCT 4259, CCT 3140). Os substratos, 3-hexil-ciclobutanona 22 e 3-fenil-ciclobutanona 21 foram adicionados a uma solução tampão fosfato 0,1 M pH 7 contendo células em repouso dos microrganismos citados anteriormente, mantendo-se a mistura sob agitação constante a 28 °C. Os produtos da reação foram extraídos com acetato de etila e analisados por cromatografia em fase gasosa (FID) empregando-se a coluna capilar de sílica fundida com a fase quiral heptakis-(2,6-dimetil-3-pentil)- $\beta$ -ciclodextrina.

A ciclobutanona 22 foi testada com o microrganismo *C. echinulata* CCT 4424 e CCT 4259 . Em ambos os casos, após 24 horas de reação, observamos a formação de lactona 24. A ciclobutanona 21 foi testada na presença da linhagem *C. echinulata* CCT 4259 e CCT 3140. Em ambos os casos detectamos a formação da lactona 23. Entretanto, o produto majoritário formado foi o ciclobutanol 26 resultante da redução da carbonila do composto 21.

Os microrganismos *Geotricum candidum* CCT 1205, *Aspergillus terreus* CCT 3320 e *Geotricum candidum* CCT 4964 foram selecionados e utilizados para as reações de biocatálise do substrato 21. No caso dos microrganismos *Geotricum*

*candidum* CCT 1205 e *Geotricum candidum* CCT 4964 o produto resultante da biocatálise foi o da redução (**26**), entretanto com o *Aspergillus terreus* CCT 3320 observamos também a formação da lactona **23**.

Enfim, os resultados preliminares obtidos com a reação de oxidação de ciclobutanonas pró-quirais podem ser resumidos na Tabela 7.

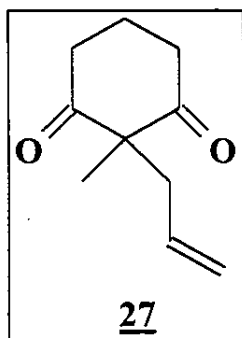
**Tabela 7: Reações de biocatálise com ciclobutanonas pró-quirais.**

| <b>Linhagens</b>           | <b>Substratos</b> | <b>Conversão (%)*</b> | <b>Produto de redução (%)</b> | <b>Formação da lactona (%)</b> |
|----------------------------|-------------------|-----------------------|-------------------------------|--------------------------------|
| <i>C. echinulata</i>       |                   |                       |                               |                                |
| CCT 4424                   | <b>22</b>         | 80                    | ---                           | 80                             |
| <i>C. echinulata</i>       |                   |                       |                               |                                |
| CCT 4259                   | <b>22</b>         | 80                    | ---                           | 80                             |
| <i>C. echinulata</i>       |                   |                       |                               |                                |
| CCT 3140                   | <b>21</b>         | 69                    | 61                            | 8                              |
| <i>C. echinulata</i>       |                   |                       |                               |                                |
| CCT 4259                   | <b>21</b>         | 67                    | 64                            | 3                              |
| <i>G. candidum</i>         |                   |                       |                               |                                |
| CCT 1205                   | <b>21</b>         | 100                   | 100                           | ---                            |
| <i>R. oryzae</i> CCT 4964  | <b>21</b>         | 100                   | 100                           | ---                            |
| <i>A. terreus</i> CCT 3320 | <b>21</b>         | 93                    | 44                            | 49                             |

\* calculado por cromatografia a gás.

A configuração absoluta e os excessos enantioméricos das lactonas deverão ser determinados numa próxima etapa.

Dando continuidade ao monitoramento de microrganismos com atividade de monoxigenases utilizou-se o substrato pró-quiral, cicloexano-1,3-diona 2,2-dissubstituída (27).



Para este estudo foi selecionado o fungo *Curvularia eragrostides* CCT 5634 isolado da abelha o qual havia revelado uma atividade modesta de B.Villigerase frente ao substrato 21. Com o intuito de avaliar se a atividade sofreria um incremento frente a cicloexanonas selecionou-se a diona 27. A reação biocatalítica foi realizada adicionando-se a diona 27 (20  $\mu$ L) a uma solução tampão fosfato 0,1 M pH 7 (25 mL), contendo células em repouso do fungo, previamente cultivado em caldo nutritivo de extrato de malte (ME).

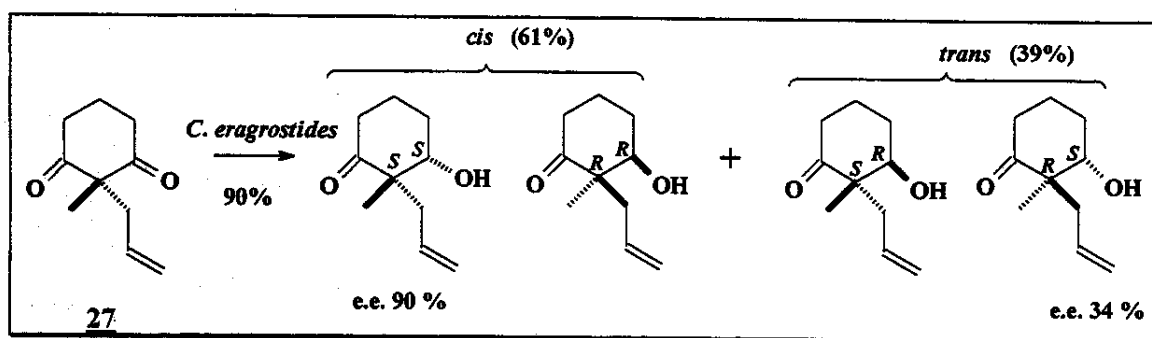
A suspensão do microrganismo contendo a diona foi incubada a 28 °C por 24 – 60 h, sob agitação contínua. No decorrer deste período, alíquotas foram retiradas e os produtos extraídos da fase aquosa com acetato de etila analisados por



cromatografia gasosa (FID) equipado com uma coluna capilar de sílica fundida com a fase quiral heptakis-(2,6-dimetil-3-pentil)- $\beta$ -ciclodextrina e cromatografia a gás acoplada a espectrometria de massas (CG/MS).

As análises demonstraram que não havia ocorrido a oxidação e sim a redução da diona. Estes resultados foram confirmados através das injeções dos padrões quirais do cetol alílico, sintetizados por Gelson J. A. da Conceição [75]. Através da comparação dos tempos de retenção com os compostos autênticos sintetizados e co-injeção, constatou-se a mono-redução assimétrica da diona 27 promovida pela *Curvularia eragrostides* CCT 5634 (Esquema 20).

A razão diastereoisomérica (rd) entre os produtos de biomonoredução *trans* e *cis* foi de 39:61, excesso enantiomérico (ee) (*trans*; *cis*) 34 % (*R*, *S*); 90 % (*S*, *S*) e conversão de 90 %.



Esquema 20: Biorredução da diona 27.

### **III.5. Conclusão**

Os resultados obtidos demonstram uma boa perspectiva quanto ao potencial biocatalítico dos microrganismos isolados de ambientes naturais específicos, exemplificada pela atividade redutora das 20 linhagens isoladas do solo de cana-de-açúcar em presença de um substrato não natural;

Os resultados preliminares da aplicação dos fungos isolados da abelha *Trigona* sp demonstram que eles apresentam potencial atividade de biooxidação da ciclobutanona 22, no entanto não foi possível determinar o excesso enantiomérico, pois não houve resolução dos enantiômeros da lactona 24 nas colunas quirais disponíveis em nosso laboratório (Figura 8b). Trabalhos futuros deverão completar este estudo.

---

## *Capítulo IV*

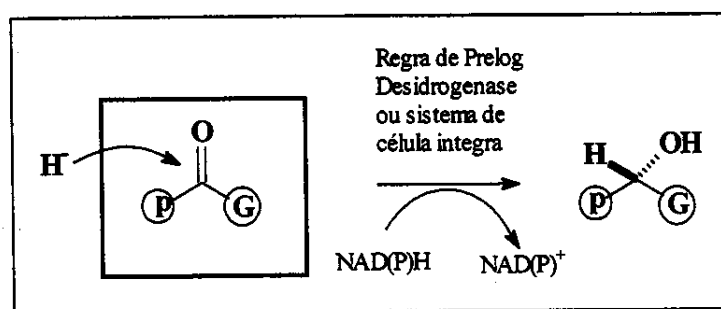
---

## IV. Reações Biocatalisadas Úteis para Produção de Blocos Quirais de Interesse Sintético

### IV.1. Biotransformações redutivas de compostos carbonílicos

A redução assimétrica de compostos carbonílicos por desidrogenases é um método bem estabelecido para preparação de álcoois enantiomericamente puros que são blocos de construção úteis para a síntese de produtos naturais, farmacêuticos e agroquímicos [81 – 83]. Estes biocatalisadores são utilizados nas reduções estereosseletivas sob condições reacionais suaves e seguras.

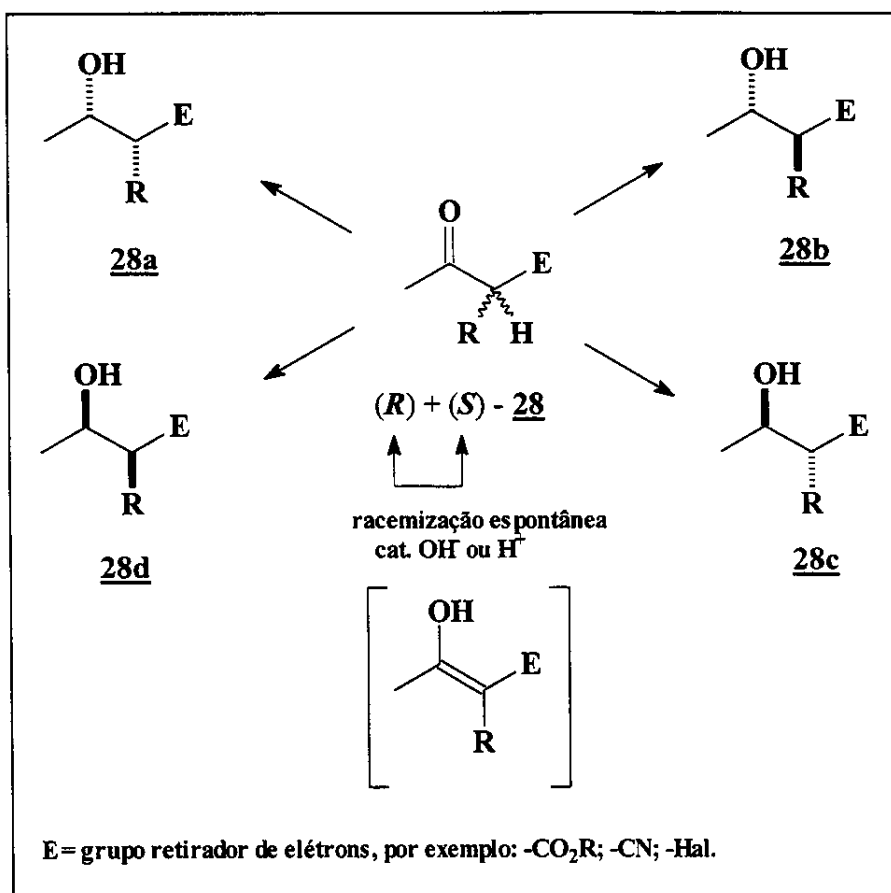
Durante o curso da reação, a enzima libera o hidreto preferencialmente na face *si* ou *re* da cetona para dar o álcool (*R*) ou (*S*) correspondente, respectivamente. Para muitos casos, o curso stereoquímico da reação, que depende principalmente da estrutura tridimensional do substrato, pode ser previsto baseado num modelo simples que geralmente é conhecido como regra de Prelog (Esquema 21) [84].



**Esquema 21:** Redução estereosseletiva do grupo carbonila pela face *re*, definido pelo arranjo no sentido horário do oxigênio, grupos grande (G) e pequeno (p) (modelo da regra de Prelog).

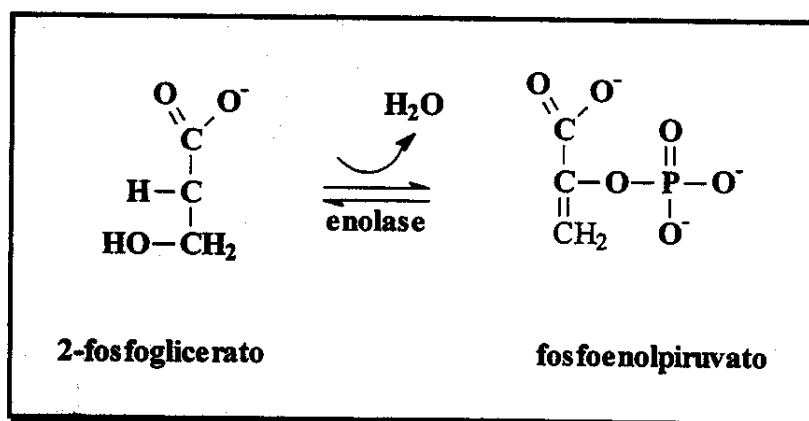
A grande versatilidade desta técnica é devido a disponibilidade de desidrogenases ou sistemas de células íntegras (vantajoso em relação as enzimas isoladas, já que a reciclagem externa de cofatores não é necessária) que apresentam especificidade Prelog ou anti-Prelog. A maioria das enzimas desidrogenases seguem a regra formulada por Prelog, enquanto as enzimas com atividades complementares são mais difíceis de serem obtidas [85]. Desta forma a estereoquímica resultante desta reação pode ser determinada pela escolha do sistema enzimático apropriado [86].

Os produtos da biorredução de cetonas racêmicas são diastereoisômeros (Esquema 22). O curso desta reação pode seguir dois caminhos diferentes: a) ambos os diastereoisômeros são produzidos (razões distintas ou iguais) com excessos enantioméricos variáveis; b) um único diastereoisômero é produzido com alto excesso enantiomérico.



Esquema 22: Redução da cetona racêmica **28**.

O primeiro tipo de reação constitui uma redução com resolução cinética. O segundo caso resulta de uma resolução dinâmica onde duas enzimas, enolase e oxidoreductase atuam em conjunto sobre a cetona racêmica de partida **28**. As enolases, um tipo de epimerase, são enzimas da via glicolítica, que promovem a remoção reversível de uma molécula de água do 2-fosfoglicerato para liberar fosfoenolpiruvato.



Por analogia, estas enzimas podem epimerizar centros estereogênicos contendo hidrogênios ácidos, passando pela forma enólica semelhante à reação usual. Como consequência, a redução biocatalítica assimétrica poderá levar a formação quantitativa de um único estereoisômero dentre os quatro compostos possíveis [86] (28 a-d, Esquema 22).

## IV.2. Reduções biocatalíticas de dicetona

### IV.2.1. Considerações gerais

As β-hidroxicetonas enantiomericamente puras são intermediários versáteis e particularmente úteis na síntese de produtos naturais, especialmente feromônios.

Em 1984, Schmuff *et al* [87] reportaram o isolamento e identificação química do feromônio de agregação do *Sitophilus oryzae* (arroz) e *Sitophilus zeamais* (milho) que são responsáveis por grandes perdas de grãos estocados. Estes insetos respondem mais efetivamente ao (4*S*, 5*R*)-5-hidroxi-4-metil-3-heptanona, conhecido

como “Sitophilure”, que é o maior componente do feromônio de agregação de ambas as espécies.

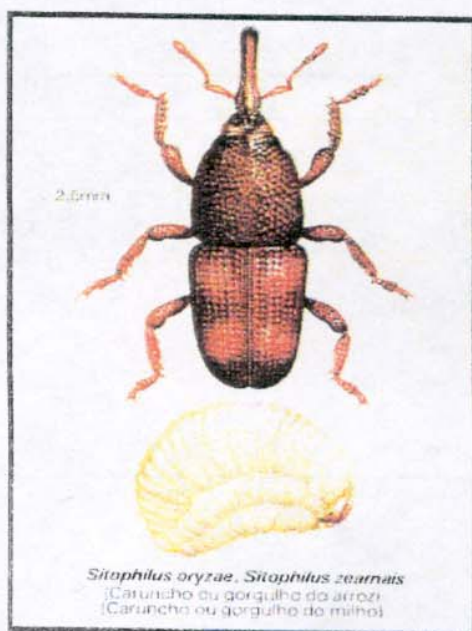
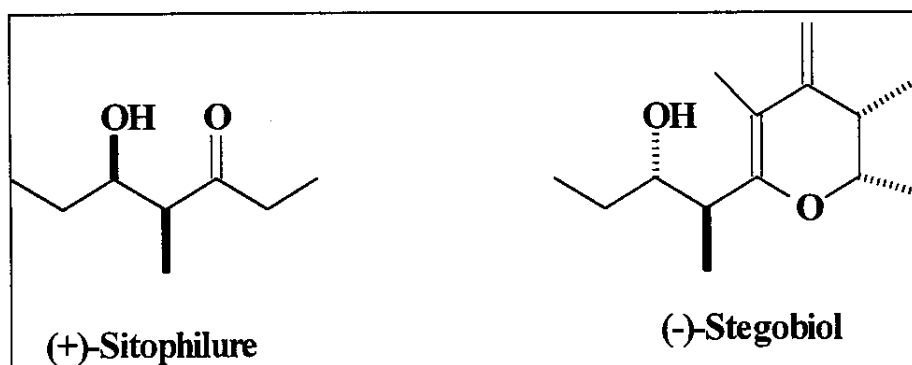
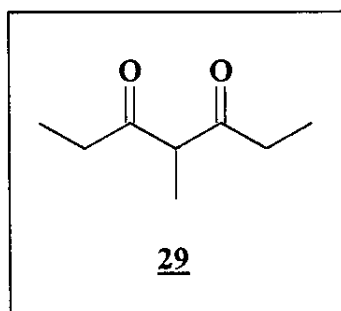


Figura 9: *Sitophilus oryzae* (arroz) e *Sitophilus zeamais* (milho).

O besouro *Stegobium paniceum* é uma peste devastadora que afeta alimentos armazenados e colheitas. O “stegobiol” representa um dos principais componentes do feromônio deste inseto e foi isolado por Kodama *et al* [88].

A segunda parte do trabalho teve como objetivo a biorredução enantiosseletiva e diastereosseletiva da dicetona **29** para obtenção de um intermediário quiral versátil para a síntese destes feromônios.





#### IV.2.2. Resultados e Discussões

Os microrganismos selecionados foram crescidos a 28 °C em meios apropriados conforme mostrado na Tabela 8:

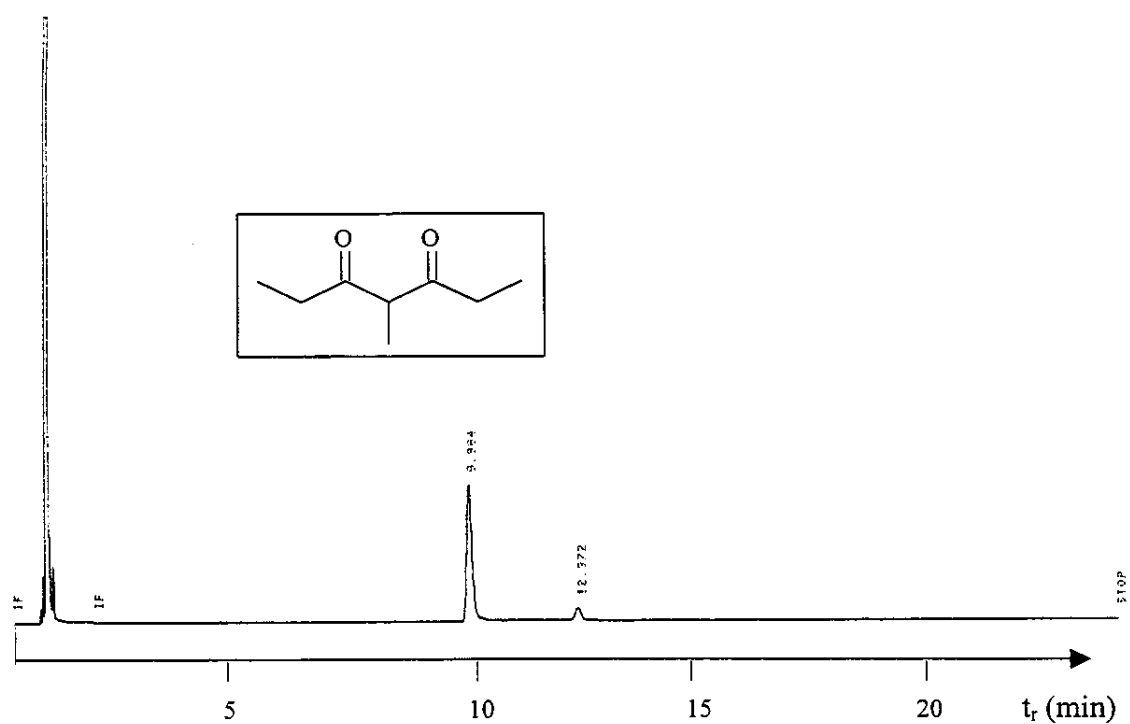
Tabela 8: Microrganismos selecionados para as reações de biocatálise da dicetona **29**.

| Microrganismos                            | Tempo de incubação (h) | meio de cultura |
|-------------------------------------------|------------------------|-----------------|
| <i>Rhodotorula glutinis</i> CCT 2182      | 48                     | YMA             |
| <i>Cunninghamella echinulata</i> CCT 4259 | 60                     | MA              |
| <i>Aspergillus terreus</i> CCT 3320       | 60                     | MA              |
| <i>Serratia rubidaea</i> CCT 5732         | 48                     | NA              |

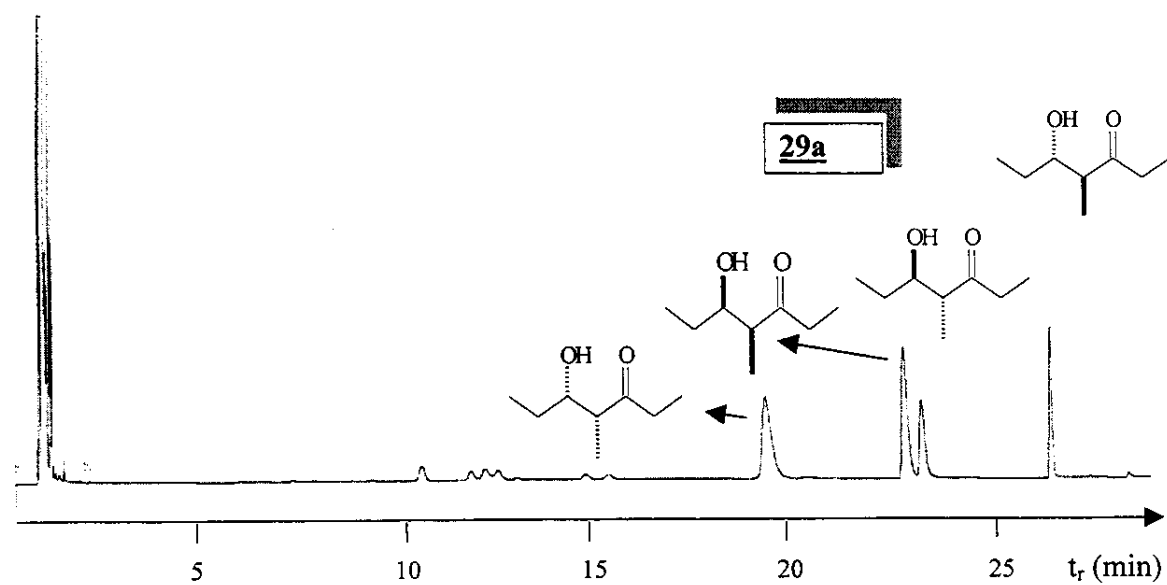
As células da levedura e da bactéria foram colhidas por centrifugação, as dos fungos por filtração e lavadas com solução tampão fosfato 0,1 M pH 7.

A biorredução de **29** foi realizada em erlenmeyer (125 mL) com solução tampão fosfato (20 mL), células lavadas com solução tampão fosfato 0,1 M pH 7 e 20 µL do composto **29**. A mistura foi agitada a 28 °C e a reação foi monitorada por CG/FID equipada com a coluna capilar de sílica fundida com a fase quiral heptakis-(2,6-dimetil-3-pentil)-β-ciclodextrina e as condições de resolução foram otimizadas com um padrão racêmico e diastereoisomérico numa proporção *syn:anti* 2:1.

Na Figura 10A apresentamos como exemplo, o perfil cromatográfico obtido com a injeção da dicetona **29**, bem como da injeção da mistura de álcoois *syn:anti* correspondentes, onde pode ser observada a resolução entre os quatros possíveis estereoisômeros.



(a)



(b)

Figura 10A: Cromatograma obtido por CG/FID equipado com coluna capilar de sílica fundida com fase estacionária quiral heptakis-(2,6-dimetil-3-pentil)- $\beta$ -ciclodextrina da: (a) dicetona **29**; (b) álcool racêmico **29a**.

Durante o acompanhamento das reações biocatalisadas observou-se que a bactéria *Serratia rubidaea* CCT 5732 reduzia enantiosseletivamente e diastereosseletivamente a dicetona 29, com baixa conversão. Entretanto a baixa conversão poderia ser o resultado de uma inativação enzimática pelo produto.

Este fato não é incomum e é importante estar alerta, pois muitos substratos ou seus produtos, compostos “xenobióticos”, podem ser tóxicos às células e uma das formas de contornar este problema seria a “adaptação” da cultura ao substrato ou ao produto.

A estratégia utilizada para evidenciar e para contornar este problema foi a utilização da *Serratia rubidaea* nas reações de biocatálise após o seu crescimento com quantidades crescentes do álcool racêmico 29a.

#### **IV.2.3. Condições experimentais para selecionar células de *Serratia rubidaea* CCT 5732 na presença do álcool racêmico 29a**

Foi retirada uma pequena porção da colônia bacteriana e transferida assepticamente com auxílio da alça de semeadura para erlenmeyer (250 mL) contendo meio nutriente líquido (100 mL), adicionou-se 1 µL do álcool racêmico e incubou-se a 28 °C por 24 horas, as células foram colhidas por centrifugação, lavadas com solução tampão fosfato 0,1 M pH 7. A biomassa resultante foi inoculada em um novo meio (100 mL) e 5 µL do álcool racêmico adicionado, a

suspensão foi então incubada a 28 °C por 24 horas, sob agitação contínua, centrifugada e as células lavadas com solução tampão fosfato.

Este procedimento foi repetido mais uma vez e a reação de biotransformação realizada com a biomassa resultante em uma solução tampão fosfato 0,1 M pH 7 (20 mL) e adicionou-se 20 µL da dicetona **29** e incubada a 28 °C por 72 horas, sob agitação contínua. No decorrer deste período, alíquotas da reação foram colhidas e o produto extraído da fase aquosa com acetato de etila e analisadas por CG/FID.

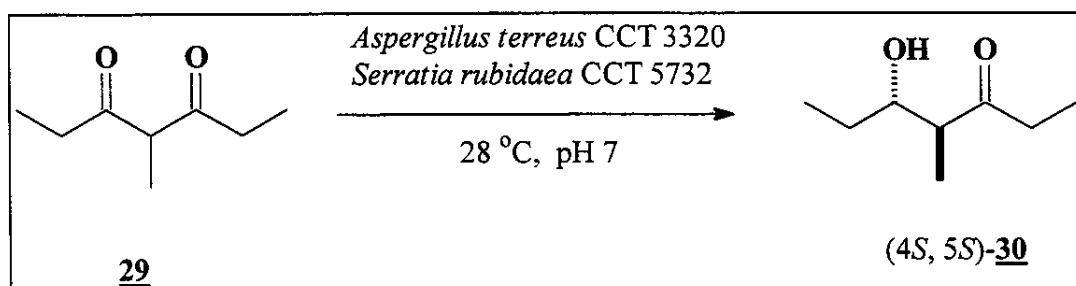
Após as injeções verificou-se que houve um aumento significativo na conversão do substrato, confirmando a hipótese formulada de que o produto seria tóxico para as bactérias. Este resultado também evidenciou que a seleção de células da *Serratia rubidaea* CCT 5732 resistentes ao álcool racêmico foi eficiente.

Os resultados obtidos com os microrganismos testados encontram-se sumarizados na Tabela 9 e os nossos melhores resultados foram obtidos com as células em repouso do *Aspergillus terreus* CCT 3320 e *Serratia rubidaea* CCT 5732 que converteram o composto **29** para o (4*S*, 5*S*)-5-hidroxi-4-metil-3-heptanona (**30**) com conversão de 90 % e 50 % respectivamente, excesso enantiomérico (ee %) > 98 e excesso diastereoisomérico (ed %) > 98, (Esquema 23).

Tabela 9: Redução biocatalítica do composto 29.

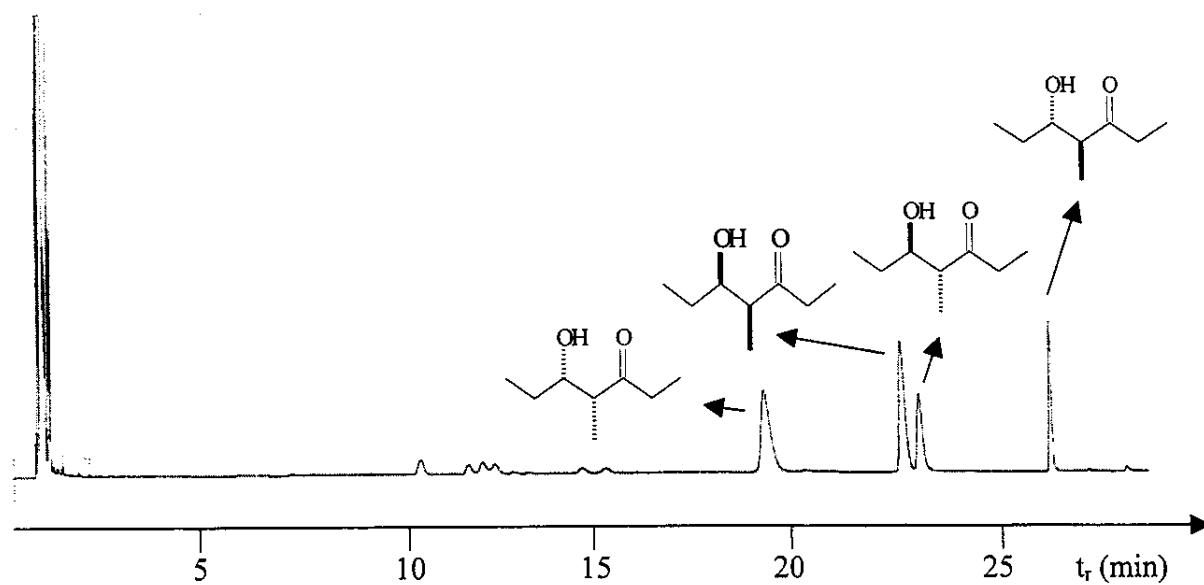
| Microrganismo        | Ee % ( <i>syn:anti</i> )                                     | Conversão (%)* |
|----------------------|--------------------------------------------------------------|----------------|
| <i>C. echinulata</i> | ----                                                         | ----           |
| <i>R. glutinis</i>   | 93 (4 <i>R</i> , 5 <i>S</i> ); 98 (4 <i>S</i> , 5 <i>S</i> ) | 90             |
| <i>S. rubidaea</i>   | > 98 % (4 <i>S</i> , 5 <i>S</i> )                            | 50             |
| <i>A. terreus</i>    | > 98 % (4 <i>S</i> , 5 <i>S</i> )                            | 90             |

\* calculado por cromatografia a gás.

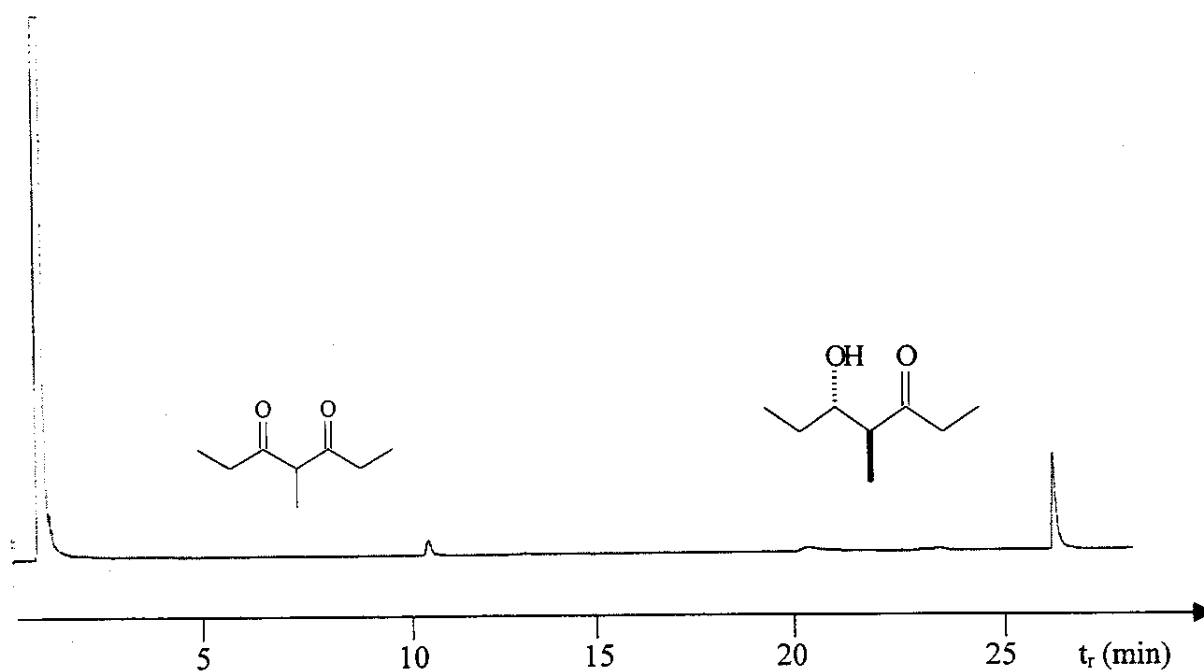


Esquema 23: Biotransformação da dicetona 28 por células em repouso do *Aspergillus terreus* CCT 3320 e *Serratia rubidaea* CCT 5732.

A Figura 10B ilustra o cromatograma obtido da monorredução assimétrica da dicetona 29 promovida pelo *Aspergillus terreus* CCT 3320.



(A)



(B)

Figura 10B: Cromatograma obtido por CG/FID equipado com coluna de sílica fundida com fase estacionária quiral hetakis-(2,6-dimetil-3-pentil)- $\beta$ -ciclodextrina da: (A) álcool racêmico 29a; (B) redução da dicetona 29 com *Aspergillus terreus* CCT 3320.

A dicetona **29** e os padrões racêmicos e diastereoisoméricos dos álcoois **29a** foram sintetizados e caracterizados por Valéria B. Riatto sob orientação do Prof. Dr. Ronaldo A. Pilli. A configuração absoluta do produto de biocatálise **30** foi estabelecida como (4*S*, 5*S*) através do isolamento do produto da biorredução e comparando sua atividade óptica com os dados da literatura {  $[\alpha]_D^{20} + 21,5^\circ$  (c 0,8, Et<sub>2</sub>O),  $[\alpha]_{DLit}^{20} + 24,2^\circ$  (c 0,8, Et<sub>2</sub>O) [76]} .

### IV.3. Redução microbiana assimétrica de β-cetoésteres

#### IV.3.1. Considerações gerais

As reduções estereosseletivas de β-cetoésteres têm sido estudada pelos químicos sintéticos para preparação de álcoois opticamente ativos, que são intermediários importantes para síntese de produtos naturais complexos [3, 89]. A redução de β-cetoésteres α-substituído gera simultaneamente dois centros estereogênicos.

Trabalhos da literatura demonstram que em geral as reduções catalisadas por *Saccharomyces cerevisiae* de ésteres 2-alkil-3-oxobutanoato são enantiosseletivas para fornecer os álcoois opticamente ativos, usualmente com configuração *S*. Para síntese de vários tipos de produtos naturais e compostos ativos fisiologicamente é



necessário encontrar microrganismos que possuam a habilidade de realizar reduções com resolução dinâmica [90-91].

#### IV.3.2. Resultados e discussão

Com a finalidade de obter a redução diastereo e enantiosseletiva dos  $\beta$ -cetoésteres **13** e **15** (Esquema 11, pg 37) vários microrganismos foram testados (Tabela 10).

**Tabela 10: Microrganismos testados para redução microbiana dos  $\beta$ -cetoésteres **13** e **15**.**

| Microrganismos                   | Linhagens                     |
|----------------------------------|-------------------------------|
| <i>Rhodotorula glutinis</i>      | CCT 2182                      |
| <i>Aspergillus niger</i>         | CCT 6252; CCT 5560 e CCT 5559 |
| <i>Cunninghamella echinulata</i> | CCT 4259                      |
| <i>Curvularia lunata</i>         | CCT 5634                      |
| <i>Serratia rubidaea</i>         | CCT 5732                      |

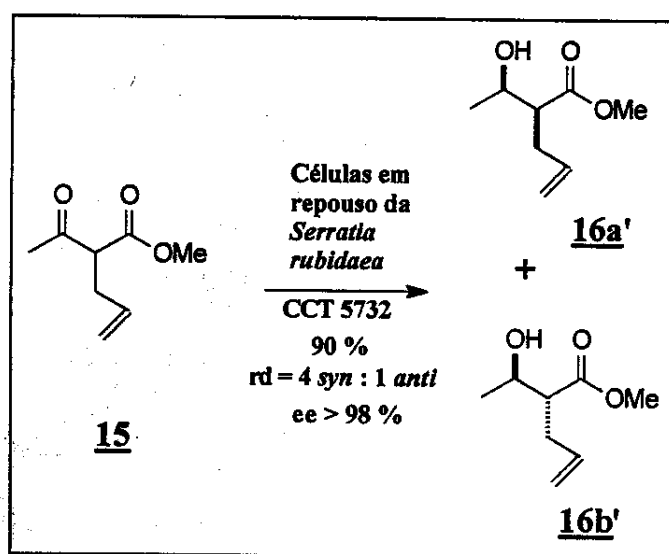
Os microrganismos listados na Tabela 10 foram cultivados nos meios nutritivos líquidos adequados e as reações de biocatálise promovidas adicionando-se os  $\beta$ -cetoésteres (20  $\mu$ L) a uma solução tampão fosfato 0,1 M pH 7, contendo células em repouso das linhagens em estudo e incubadas a 28 °C por 48-72 horas, sob agitação contínua.

As reações foram monitoradas a cada 12 horas retirando-se alíquotas, extraindo o produto da reação com acetato de etila e analisadas. As análises por cromatografia a gás (FID), para determinação do excesso enantiomérico dos produtos de biorredução foram realizadas empregando-se a coluna capilar de sílica fundida com a fase quiral heptakis-(2,6-dimetil-3-pentil)- $\beta$ -ciclodextrina e a condição de resolução foi otimizada pela injeção dos padrões racêmicos e diastereoisoméricos dos álcoois sintetizados conforme descrito no Esquema 11.

Nossos melhores resultados foram obtidos com *Serratia rubidaea* CCT 5732 (Figura 11), bactéria isolada do côco fruta, que converteu o composto **15** para os álcoois **16a'** e **16b'** com conversão de 90 % (Esquema 24), com uma diastereosseletividade 1(*anti*) : 4(*syn*). O excesso enantiomérico para ambos diastereoisômeros foi superior a 98 %, somente um enantiômero foi detectado.



Figura 11: Bactéria isolada do côco fruta, *Serratia rubidaea* CCT 5732.



Esquema 24: Redução microbiana do β-cetoéster 15.

A reação foi repetida várias vezes e interrompida a várias conversões e os resultados foram similares, com relação a proporção diastereoisomérica e somente um enantiômero foi detectado de cada par possível (Figura 12).

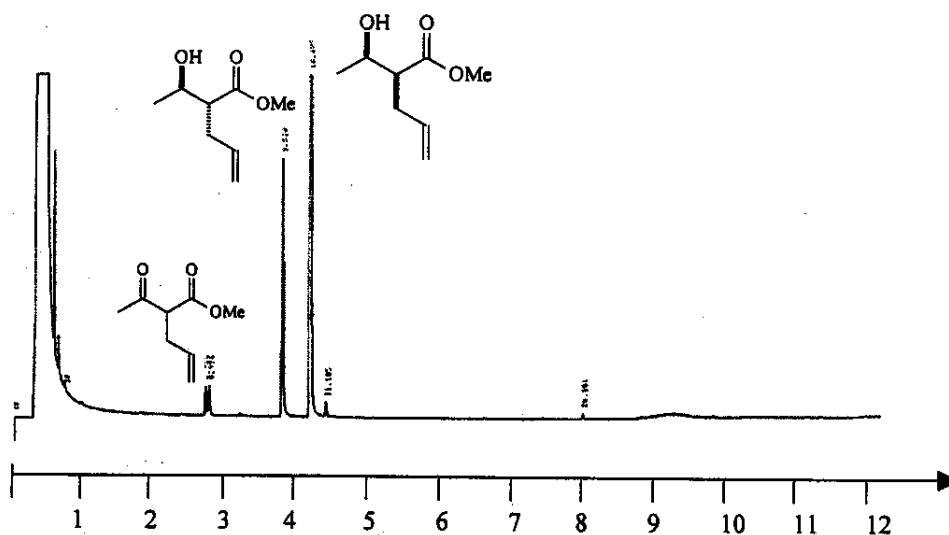


Figura 12: Cromatograma obtido por CG/FID equipado com coluna capilar de sílica fundida com fase quiral heptakis-(2,6-metil-3-pentil)-β-ciclodextrina da redução enantiosseletiva do β-cetoéster 15 com *Serratia rubidaea* CCT 5732.

Este resultado pode ser explicado como uma resolução cinética com racemização “*in situ*”, conhecida como resolução dinâmica [92]. Devido a quiralidade do sítio ativo da enzima, um enantiômero encaixa-se melhor no sítio ativo em relação ao outro e, portanto é convertido mais rapidamente, resultando na resolução cinética de um racemato.

Na resolução cinética de um racemato, cada um dos enantiômeros pode ser obtido no máximo com 50 % de rendimento. Para superar esta desvantagem, a resolução dinâmica com racemização “*in situ*” do material de partida, que usualmente é alcançada via química ou pela ação de enolases ou epimerases, tornam dinâmica a interconversão entre os enantiômeros R e S do substrato, podendo levar a formação de um único produto P com 100% de rendimento teórico, desde que a redução de um dos enantiômeros seja mais rápida do que a outra (Figura 13).

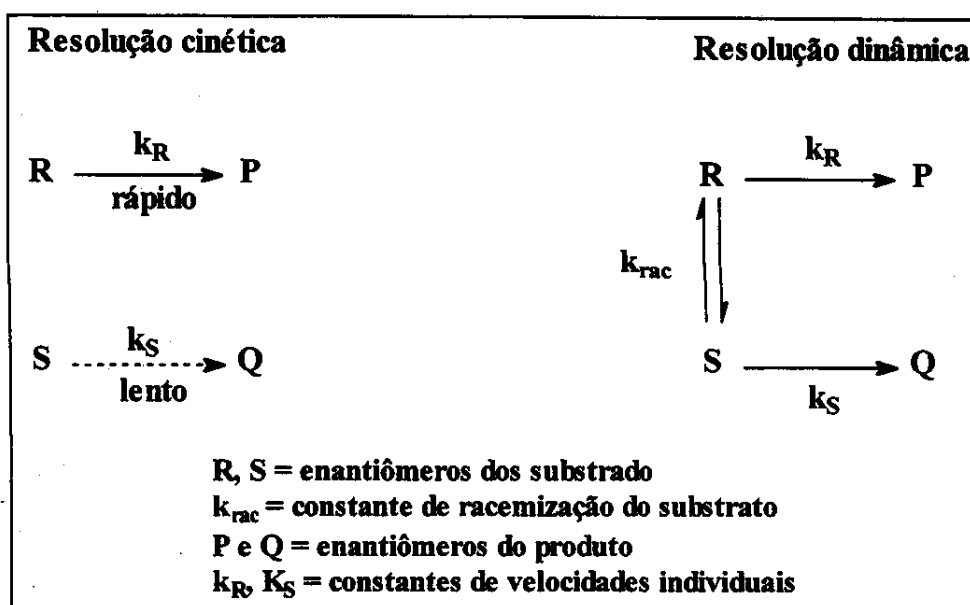


Figura 13: Princípios da resolução cinética e dinâmica.

Na resolução dinâmica os enantiômeros do substrato estão num rápido equilíbrio, mas os do produto não. Assim, quando o enantiômero do substrato que melhor se encaixa é convertido pela enzima, o equilíbrio é restaurado pela racemização do enantiômero que é pouco aceito pela enzima. Neste caso, várias reações ocorrem simultaneamente e as velocidades relativas determinam a estereoquímica resultante do processo completo (Figura 13). Para este processo ser eficiente as condições abaixo são exigidas:

A enzima deverá apresentar alta especificidade pelos substratos enantioméricos  $R/S$ ,  $k_R \gg k_S$  ou  $k_S \gg k_R$ ;

A racemização do substrato deverá ocorrer numa velocidade necessária para que ocorra interconversão do enantiômero “indesejado” para o enantiômero “desejado” ( $k_{rac}^{sub} \geq k_R$  ou  $k_S$ , respectivamente) ;

A racemização do produto ( $k_{rac}^{prod}$ ) deverá ser inexistente.

Para concluir sobre a resolução dinâmica deste processo foi imprescindível determinar a configuração absoluta do produto de biorredução do  $\beta$ -cetoéster **15**. Para tanto utilizou-se a RMN de  $^1H$  com derivados do ácido mandélico.

O padrão químico racêmico e diastereoisomérico (mistura *anti* / *syn* 2:1) **16** e o produto resultante da biocatálise do  $\beta$ -cetoéster **15** foram reagidos com o ácido (*R*)-*O*-acetilmandélico.

Analisando-se o espectro de RMN de  $^1H$  (Figura14-A) na região da metila para o padrão químico racêmico do álcool **16** (em torno de 1,12 ppm), verificamos que os sinais majoritários correspondem aos diastereoisômeros *anti* (2*R*, 3*R*) e (2*S*,

3*S*) e os minoritários aos diastereoisômeros *syn* (2*S*, 3*R*) e (2*R*, 3*S*). Comparando-se estes dados com o espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do produto de biorredução esterificado (Figura 14-B), constatamos que o sinal majoritário corresponde ao enantiômero *syn* (2*S*, 3*R*) e o minoritário ao *anti* (2*R*, 3*R*) (Figura 14).

Os resultados indicam claramente que a oxidoreductase é bastante estereosseletiva do ponto de vista facial, pois em ambos os produtos o NADH atacou pela face *si* da cetona **15** levando a formação de produtos 3*R* com alto ee. Entretanto não foi muito diastereosseletiva, pois produziu diastereoisômeros 2*S*:2*R* na proporção 4:1. Este fato pode ser explicado como uma epimerização ineficiente pela enolase ou pela baixa seletividade da oxidoreductase.

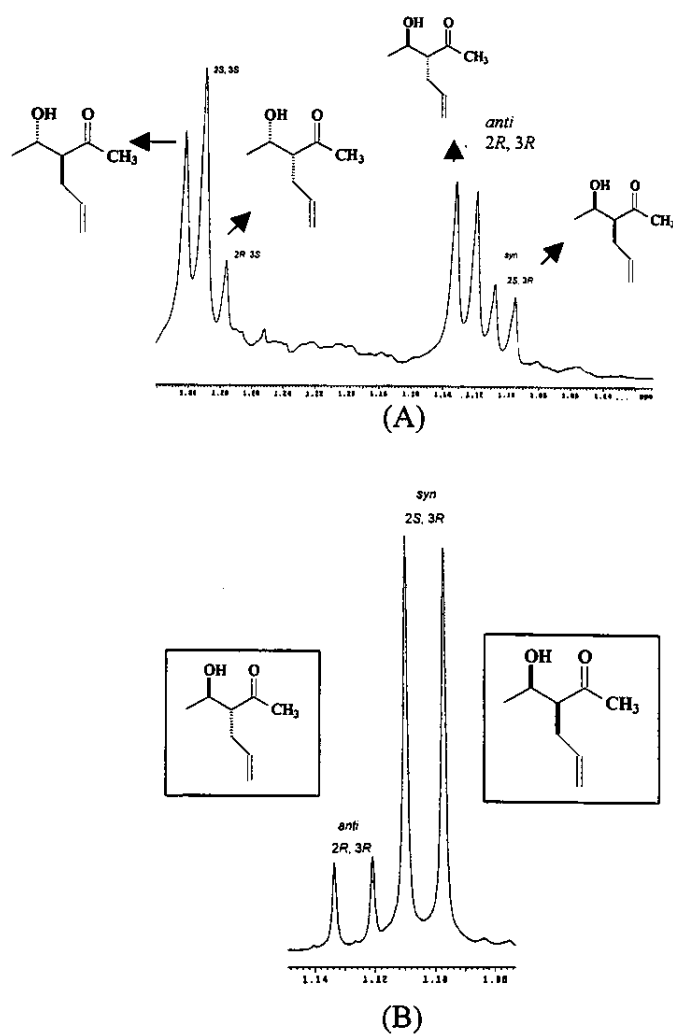


Figura 14: Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (500 MHz) do: (A) álcool racêmico e diastereoisomérico **16** derivado com o ácido *R*-O-acetilmandélico; (B) produto de biorredução derivado com o ácido *R*-O-acetilmandélico.

O  $\beta$ -cetoéster **13** não foi reduzido por nenhum microrganismo investigado.

#### IV.4. Conclusão

Os resultados reportados neste trabalho demonstram a versatilidade das células em repouso do *Aspergillus terreus* CCT 3320 e *Serratia rubidaea* CCT 5732 para promoverem a redução enantiosseletiva e diastereosseletiva da dicetona **29** e a hidroxi-cetona **30** quiral pode ser empregada como um intermediário versátil na síntese de feromônios de insetos, como (+)-sitophilure e (-)-stegobiol;

A redução enantiosseletiva de  $\beta$ -cetoésteres com *Serratia rubidaea* CCT 5732 se apresenta como uma metodologia muito promissora, devido a alta enantiosseletividade (ee > 98 %) deste sistema e ótima conversão, explicado como uma resolução dinâmica parcial com racemização “*in situ*”. Através desta metodologia pode-se obter o controle da estereoquímica absoluta na produção dos álcoois opticamente ativos **16a'** e **16b'** resultante da especificidade anti - Prelog das enzimas. A estereoquímica foi oposta a oriunda da redução dos  $\beta$ -cetoésteres por *Saccharomyces cerevisiae* [90].

A etapa seguinte deste trabalho foi a otimização das condições de reação biocatalítica com o objetivo de melhorar a estabilidade operacional do sistema biorredutor, facilitar o isolamento do produto e abrir perspectivas para reutilização do sistema biorredutor, uma vez que a *Serratia rubidaea* CCT 5732 se mostrou um sistema de biorredução eficiente.

Com este propósito, iniciou-se os estudos para imobilização da *Serratia rubidaea* CCT 5732.



---

## *Capítulo V*

---

## **V. Imobilização da Bactéria *Serratia rubidaea* CCT 5732.**

### **V.1. Considerações gerais**

A imobilização de enzimas e células microbianas é um setor da biocatálise com ampla aplicação industrial devido a maior facilidade de armazenamento e vida útil do biocatalisador. As reações realizadas com enzimas e microrganismos suportados apresentam vantagens sobre as condições tradicionais (não suportadas), pois são mais facilmente processadas, permitem processos contínuos e diminuem o número de operações unitárias necessárias nas indústrias [93 - 94]. Neste contexto é necessário haver uma compatibilidade entre o suporte e o biocatalisador de forma que o número de células viáveis por unidade de volume seja alta e que a atividade das enzimas de interesse continuem com igual eficiência do ponto de vista da biotransformação. Assim, a pesquisa e o desenvolvimento de novos suportes e de métodos para imobilização com a finalidade de melhorar o desempenho e a produtividade dos biocatalisadores para transformações específicas é uma área de grande interesse biotecnológico. As características essenciais são a área superficial, a estabilidade mecânica do suporte, além da viabilidade econômica [95 - 96].

Atualmente os métodos usuais de imobilização são baseados em quatro técnicas alternativas: encapsulamento em matriz polimérica, adsorção em superfície, ligação covalente em suportes sólidos insolúveis em água e ligação química cruzada com reagentes bifuncionais. Devido ao alto grau de variabilidade individual inerente

aos sistemas biológicos não existe um método genérico e ideal para todo o universo dos microrganismos e reações de interesse. [95].

A seleção do material suporte e do método de imobilização é feita ponderando as várias características e os aspectos práticos necessários para aplicação da enzima e ou célula microbiana versus as propriedades, limitações e características dos métodos de imobilização e do suporte [95].

Na imobilização por encapsulamento em matriz polimérica as moléculas das enzimas/células não estão livres em soluções, seu movimento é restrito pela estrutura cristalina do gel. Este método é limitado a enzimas isoladas previamente estabilizadas ou altamente estáveis e células microbianas que não estejam em crescimento.

Os métodos gerais de encapsulamento são:

- 1 – Gelificação ionotrópica de macromoléculas com cátions multivalentes (alginatos);
- 2 – Gelificação induzida por temperatura (agarose, gelatina);
- 3 – Polimerização orgânica por reações químicas e ou fotoquímicas (poliacrilamida);
- 4 – Precipitação a partir de solventes imiscíveis (poliestireno);

A ligação covalente em suportes sólidos insolúveis em água envolve a formação de uma ligação covalente entre a enzima e ou célula e o material suporte. A ligação é normalmente formada entre os grupos funcionais que fazem parte dos resíduos de aminoácidos na superfície da enzima, freqüentemente representados por

grupo amino (NH<sub>2</sub>) da lisina ou arginina, grupo carboxílico (CO<sub>2</sub>H) do ácido aspártico ou ácido glutâmico, o grupo hidroxila (OH) da serina ou treonina e o grupo sulfidril (SH) da cisteína.

Os materiais de suporte usualmente utilizados são: celulose, dextranas (Sephadex), amido, agarose (Sephacrose). Os polissacarídeos são suportes susceptíveis à degradação pelos microrganismos, e danos provocados pelos solventes orgânicos. Outros suportes utilizados para imobilização são sílica porosa e vidros porosos. A sílica porosa consiste de pequenas partículas esféricas fundidas que apresentam microcavidades, pequenos canais, alta resistência e durabilidade. O vidro de borossilicato sinterizado deve ser temperado para formar um sistema de canais uniformes, este suporte também é durável e resistente à degradação microbiológica ou danos provocados por solvente.

Ao escolher o método de imobilização através de ligação covalente deve se ter o cuidado na escolha dos grupos funcionais reativos do suporte para que os mesmos não inativem o processo enzimático ligando-se quimicamente aos amino-ácidos do sítio ativo.

A ligação cruzada é livre de suporte e envolve a ligação de células ou de enzimas entre si para formar uma estrutura complexa tridimensional grande, e pode ser obtida através de métodos químicos ou físicos. Os métodos químicos de ligação cruzada normalmente baseiam-se na formação de ligação covalente entre as células através de reagentes tais como glutaraldeído e diisocianato de tolueno. Entretanto, a

toxicidade de tais reagentes é um fator limitante a aplicação desta metodologia para células microbianas e muitas enzimas.

O método físico normalmente utilizado é a floculação, formando partículas com alta densidade celular. Os agentes floculantes, tais como poliaminas, polietilenoimina, poliestirenos sulfonados e vários fosfatos são extensivamente utilizados e bem caracterizados. A ligação cruzada é raramente usada como único meio de imobilização devido a ausência de propriedades mecânicas e baixa estabilidade que são limitações severas, ela é mais freqüentemente empregada para melhorar outros métodos de imobilização, normalmente por reduzir as perdas celulares que possam ocorrer em outros sistemas.

A imobilização por adsorção é o método mais simples e envolve interações de superfície reversíveis entre enzima/célula e o material suporte. As forças envolvidas são principalmente atrações eletrostáticas, tais como forças de van der Waals, interações iônicas, ligações de hidrogênio, embora ligações hidrofóbicas possam ser significantes. Estas forças são fracas, mas suficientemente importantes em número para fornecer uma ligação razoável. Nenhuma ativação ou modificação química é necessária durante o processo de adsorção, e normalmente nenhum dano é feito para as enzimas e ou células.

O presente trabalho tem como finalidade a imobilização da *Serratia rubidaea* CCT 5732 na superfície da matriz inorgânica de Sílica-Titânia ( $\text{SiO}_2/\text{TiO}_2$ ) preparada pelo processo sol-gel que permite obter materiais com alta homogeneidade, pureza, porosidade controlada, e partículas bem modeladas [97 -

98], para aumentar a vida útil do biocatalisador sem alterar a sua atividade biocatalítica.

## **V.2. Imobilização da Bactéria *Serratia rubidaea* CCT 5732 no Óxido Binário Sílica –Titânia ( $\text{SiO}_2/\text{TiO}_2$ ) e Reação Biocatalítica**

A *Serratia rubidaea* CCT 5732 foi inoculada em meio nutriente líquido apropriado (100 mL) em erlenmeyer (500 mL) e mantido em agitador rotatório(120 rpm), 28 °C por 72 h . Após este período de crescimento foi centrifugada e a biomassa resultante foi transferida para um erlenmeyer (250 mL) contendo água destilada estéril (50 mL) e o óxido binário  $\text{SiO}_2/\text{TiO}_2$  previamente esterilizado. O sistema foi agitado e após 12 h o sólido foi filtrado.

A imobilização da bactéria foi observada através de análises de microscopia eletrônica de varredura (MEV) [99].

Nenhuma técnica preserva a natureza *in vivo* do material estudado, mas deve-se procurar manter a sua estrutura. Para isso, na técnica de microscopia eletrônica de varredura, deve-se procurar: estabilidade mecânica, remoção ou imobilização da água e o direcionamento dos elétrons. Isso pode ser conseguido pela fixação do material por congelamento, seguida por fixação, desidratação e revestimento. Os procedimentos geralmente incluem: 1- a fixação em glutaraldeído; 2- desidratação

em etanol e/ou acetona; 3- emprego do ponto crítico; 4- revestimento com um filme de metal pesado, como ouro ou paládio [100 – 102].

A atividade biocatalítica foi avaliada através da reação de redução do  $\beta$ -cetoéster **15**.

A reação de biotransformação foi realizada em erlenmeyer (125 mL) contendo solução tampão fosfato pH 7 (NaHPO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O / KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,1 mol.L<sup>-1</sup>, 25 mL), substrato (20  $\mu$ L) e células imobilizadas, mantida num agitador rotatório a 28 °C e 120 rpm. A reação foi monitorada a cada 12 h retirando-se alíquotas, extraindo o produto da reação com acetato de etila, filtradas e analisadas por cromatografia em fase gasosa CG (FID) utilizando-se coluna capilar de sílica fundida com fase estacionária quiral heptakis-(2,6-metil-3-pentil)- $\beta$ -ciclodextrina e condição de resolução otimizada com um padrão racêmico *anti:syn* numa proporção 2:1.

Uma parte do material imobilizado foi estocado em recipientes estéreis sob refrigeração para testar sua estabilidade e verificar a manutenção da sua atividade biocatalítica após períodos de estocagem (1 semana, 1 mês e 2 meses).

### **V.3. Características do material suporte**

A Tabela 11 mostra o resultado da análise de titânio no óxido binário SiO<sub>2</sub>/TiO<sub>2</sub>, obtido por análise química, a medida de área superficial específica e o

volume médio de poros. Na tabela 11 observamos que o material apresenta uma alta área superficial específica e um elevado volume médio de poros.

**Tabela 11: Análise química de titânio no óxido binário, área superficial específica,  $S_{\text{BET}}$ , e volume médio de poros,  $V_p$ .**

| Matriz                      | Ti/ % em massa | $S_{\text{BET}}/ \text{m}^2.\text{g}^{-1}$ | $V_p/ \text{mL}.\text{g}^{-1}$ |
|-----------------------------|----------------|--------------------------------------------|--------------------------------|
| $\text{SiO}_2/\text{TiO}_2$ | 20,3           | 503                                        | 0,35                           |

Uma das maiores motivações para a utilização de suportes porosos, como é o caso do suporte em questão, é a obtenção de alta atividade catalítica por unidade de volume do catalisador através do uso de um material suporte com alta área superficial disponível por unidade de volume. Além disso, os substratos podem frequentemente se difundirem nos materiais porosos muito mais rapidamente que dentro de gels ou através de membranas de ultrafiltração, deste modo minimizando a limitação da difusão na velocidade de reação. As moléculas do substrato com tamanhos comparáveis aos da enzima não podem interagir com a enzima imobilizada pelo método de aprisionamento, enquanto tais substratos podem difundir-se, embora lentamente, dentro da estrutura porosa na qual as enzimas estão ligadas [103 - 104].

O resultado obtido de área superficial específica pelo método B.E.T. e o volume médio de poros pelo método de intrusão de mercúrio (Tabela 11) para o óxido binário  $\text{SiO}_2/\text{TiO}_2$  demonstrou um material microporoso com uma elevada



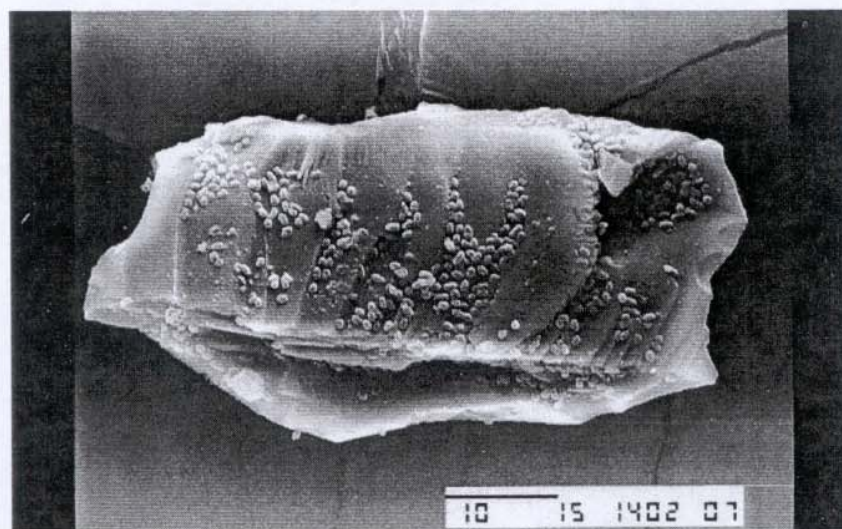
área superficial. O material submetido à microscopia eletrônica de varredura indicou que o titânio está distribuído uniformemente por todo o material. Esta matriz apresenta alta estabilidade térmica, alta resistência mecânica e é atóxica frente a materiais biológicos, desta forma tais propriedades fazem dela uma boa candidata para imobilização de células.

De acordo com a literatura [95], a imobilização metal-quelato é usualmente realizada em água e os microrganismos imobilizados são preferidos para conversões sequenciais, porque: 1) a célula microbiana contém todo o sistema multienzimático com as estruturas nativas para as bioconversões; 2) a imobilização de células previne a desativação de suas enzimas que pode ocorrer durante o isolamento das mesmas; 3) os produtos de reação são facilmente separados da biomassa; 4) as células continuamente regeneram os fatores endógenos necessários para os biocatalisadores por um longo tempo.

As imagens de microscopia eletrônica de varredura (Figura 15), mostram as micrografias da partícula SiO<sub>2</sub>/TiO<sub>2</sub> (Figura 15A) e da bactéria imobilizada (Figura 15B). Podemos observar que a bactéria está adsorvida por toda a matriz (Figura 15B), apresentando uma densidade média superficial de  $3,9 \times 10^{11}$  células de bactéria por metro quadrado. Sendo que o suporte apresenta uma área superficial de  $503 \text{ m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$  a quantidade de células bacterianas no suporte será de  $2 \times 10^{14}$  células por grama de matriz. Observou-se que a matriz Sílica-Titânia não apresenta nenhuma influência tóxica nas células da bactéria *Serratia rubidaea*, pois nenhuma alteração na morfologia celular foi verificada após a adsorção, Figura 16.

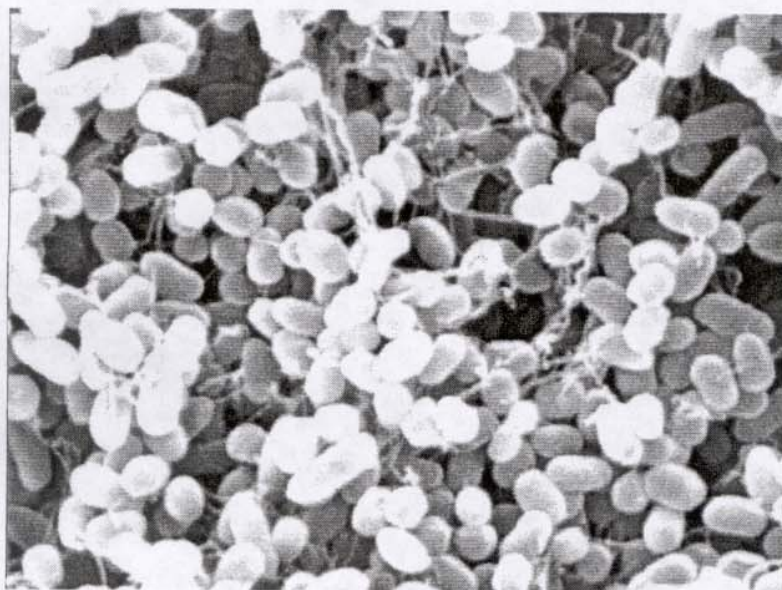


(A)

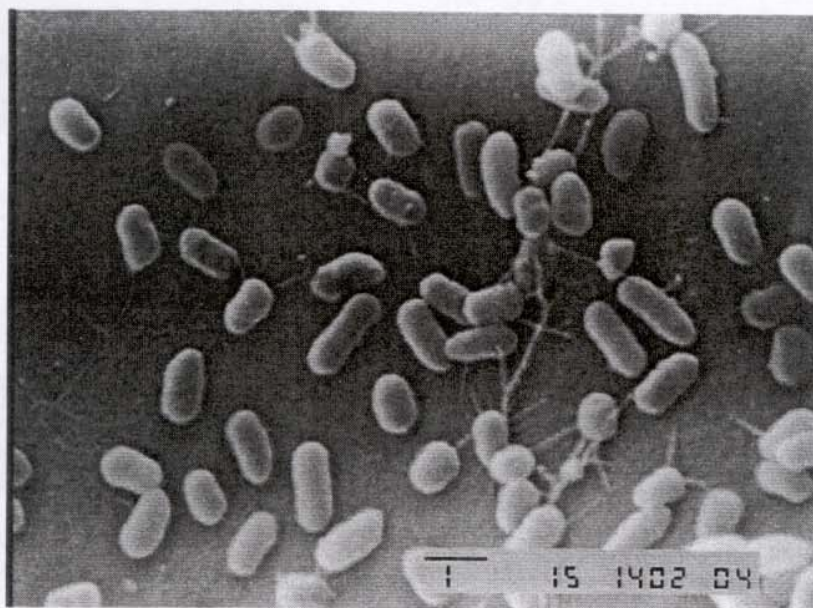


(B)

Figura 15: Microscopia eletrônica de varredura (tensão de aceleração 15 KeV). (A) Micrografia do  $\text{SiO}_2/\text{TiO}_2$ ; (B) Micrografia da bactéria *Serratia rubidaea* imobilizada no  $\text{SiO}_2/\text{TiO}_2$  com aumento de 2.000 x.



(A)

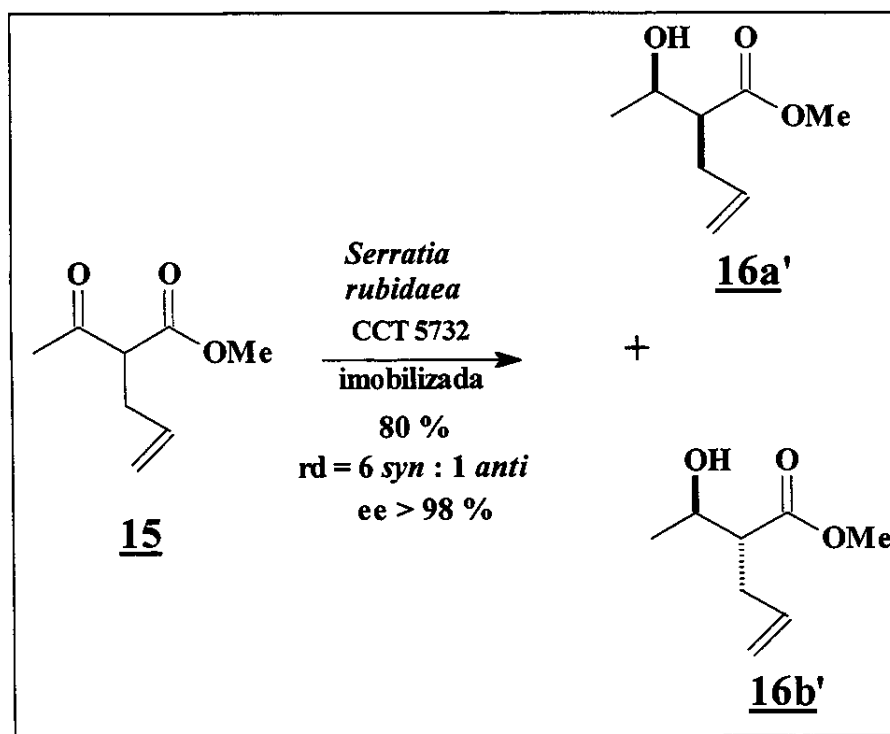


(B)

Figura 16: Microscopia eletrônica de varredura (tensão de aceleração 15 KeV). (A) Micrografia da bactéria *Serratia rubidaea* CCT 5732 com aumento de 10.000 x; (B) Micrografia da bactéria *Serratia rubidaea* CCT 5732 imobilizada no  $\text{SiO}_2/\text{TiO}_2$  com aumento de 10.000 x.

A imobilização da bactéria também foi testada em sílica gel, SiO<sub>2</sub>, (área superficial 500 m<sup>2</sup>.g<sup>-1</sup>) e óxido misto de Sílica-Zircônia (SiO<sub>2</sub> / ZrO<sub>2</sub>), no entanto as imobilizações não foram bem sucedidas apresentando nenhuma ou baixa adsorção, respectivamente. Sugerindo que a adsorção da bactéria no suporte do óxido misto de Sílica-Titânia pode estar associada à interação da bactéria com o metal de transição (Ti) do suporte.

A boa adsorção celular e a não toxicidade facilitou o desenvolvimento da atividade biocatalítica através da redução enantiosseletiva do β-cetoéster **15**, Esquema 25 (Figura 17).



Esquema 25: Redução microbiana do β-cetoéster **15** com células imobilizadas de *Serratia rubidaea* CCT 5732 na matriz inorgânica de sílica-titânia (SiO<sub>2</sub>/TiO<sub>2</sub>).

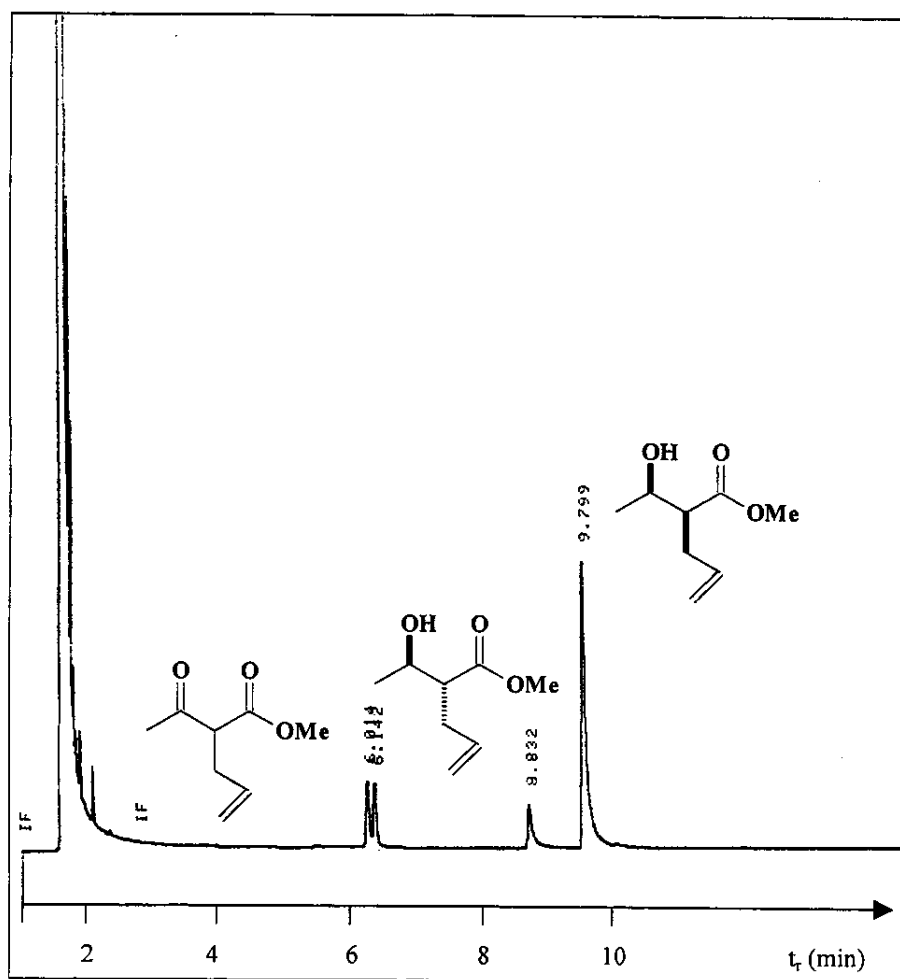


Figura 17: Cromatograma obtido por CG/FID equipado com coluna capilar de sílica fundida com fase estacionária quiral heptakis-(2,6-dimetil-3-pentil)- $\beta$ -ciclodextrina da redução enantiosseletiva do  $\beta$ -cetoéster 15 com *Serratia rubidaea*.

A Tabela 12 mostra a comparação dos resultados obtidos da reação biocatalisada com células livres em repouso *versus* células imobilizadas da *Serratia rubidaea*.



**Tabela 12: Células livres x células imobilizadas.**

|                                                         | <b>Excesso<br/>enantiomérico</b> | <b>Razão<br/>diastereoisomérica</b> | <b>Conversão<br/>(%)*</b> | <b>Tempo de<br/>reação</b> |
|---------------------------------------------------------|----------------------------------|-------------------------------------|---------------------------|----------------------------|
| Células livres                                          | >98%                             | 4 <i>syn</i> :1 <i>anti</i>         | 90                        | 72 horas                   |
| Células<br>imobilizadas                                 | >98%                             | 6 <i>syn</i> :1 <i>anti</i>         | 80                        | 96 horas                   |
| Células<br>imobilizadas<br>após 60 dias de<br>estocagem | >98%                             | 6 <i>syn</i> :1 <i>anti</i>         | 8                         | 100 horas                  |

\*calculada por cromatografia a gás.

A *Serratia rubidaea* CCT 5732 imobilizada no óxido binário SiO<sub>2</sub>/TiO<sub>2</sub> converteu o composto **15** para os álcoois **16a** e **16b** com conversão de 80 % (Esquema 25, pg 98), com uma diastereosseletividade *anti* : *syn* igual a 1: 6. O excesso enantiomérico para ambos diastereoisômeros foi superior a 98 % (somente um enantiômero foi detectado, Figura 17). Este resultado pode ser explicado como uma resolução dinâmica parcial com racemização “*in situ*”. O tempo maior de reação e a menor conversão podem ser otimizados por um aumento da quantidade de células suportadas.

As células imobilizadas através desta metodologia são estáveis a estocagem sob refrigeração (60 dias), comprovada através da manutenção da atividade biocatalítica após este período (Tabela 12).

Os resultados promissores com a imobilização da *Serratia rubidaea* levou-nos a testar outros microrganismos e os fungos *Aspergillus terreus* CCT 3320 e *Rhizopus oryzae* CCT 4964 foram selecionados.

Os fungos foram cultivados em meios de cultura adequados, filtrados e a biomassa agitada na presença da matriz suporte, de maneira similar ao protocolo da imobilização da bactéria, conforme descrito detalhadamente na parte experimental.

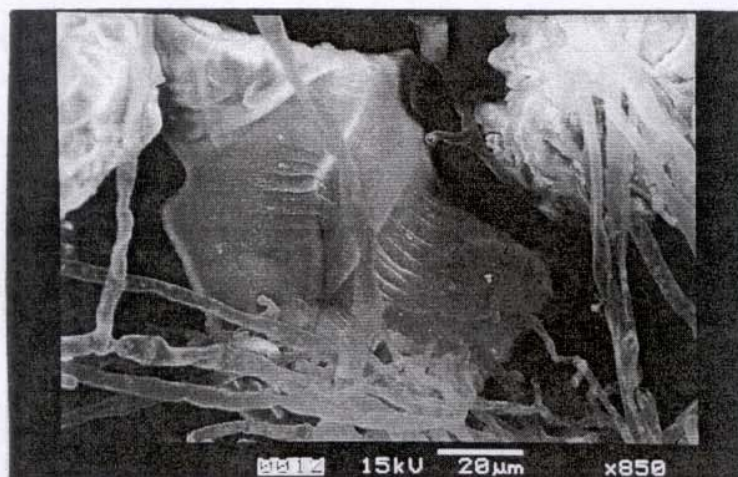
As análises de microscopia eletrônica de varredura (Figura 18) demonstraram que não havia ocorrido a adsorção dos fungos na matriz.

Estes resultados evidenciaram que as características das células microbianas representam parâmetros essenciais durante a seleção do material suporte para um processo de imobilização [95].

O processo de imobilização da célula bacteriana, *Serratia rubidaea* CCT 5732, na matriz inorgânica de sílica-titânia se mostrou adequada e de grande importância prática.



(a)



(b)

Figura 18: Microscopia eletrônica de varredura (tensão de aceleração 15 KeV). (A) Micrografia do fungo CCT 3320 e partícula da  $\text{SiO}_2/\text{TiO}_2$ ; (B) Micrografia do fungo CCT 4920 e partícula da  $\text{SiO}_2/\text{TiO}_2$ .



#### **V.4. Conclusão**

O processo de imobilização da *Serratia rubidaea* CCT 5732 foi apropriado para a biorredução efetiva de  $\beta$ -cetoéster **15**, sendo observado um incremento significativo da diastereosseletividade (razão diastereoisomérica *syn:anti* 6:1) em relação às células livres em repouso (razão diastereoisomérica *syn:anti*, 4:1), com manutenção da enantiosseletividade, >98%;

O método de imobilização utilizado não causou danos à célula microbiana, é simples, rápido e economicamente viável;

A bactéria imobilizada apresentou uma boa estabilidade após estocagem em refrigerador (4 °C) por um período de 60 dias;

O óxido binário sílica – titânia foi adequado para adsorção da bactéria *Serratia rubidaea*, mas não para os fungos *Aspergillus terreus* CCT 3320 e *Rhizopus oryzae* CCT 4964, demonstrando que as características das células microbianas são importantes para a seleção do material suporte;

Os resultados apresentados abrem novas perspectivas para a aplicação desta reação em processos contínuos utilizando células imobilizadas em colunas.

---

## ***Conclusão Final***

---

## CONCLUSÃO FINAL

O isolamento de microrganismos de ambientes específicos utilizando a técnica de seleção de microrganismos por enriquecimento do solo levou ao isolamento de 35 bactérias e das abelhas *Trigona* sp, 17 fungos foram isolados.

Através da técnica de difusão em ágar observou-se que vários fungos apresentaram atividade bactericida e fungicida.

As resinas florais não metiladas de *Clusia* e o extrato do ninho das abelhas polinizadoras não inibiram o crescimento de nenhum fungo isolado das abelhas, fato este que serviu de comprovação da participação dos mesmos no ambiente restrito escolhido resina floral de *Clusia- Trigona*- microrganismos.

As bactérias isoladas do solo apresentaram atividade de oxidoreductase, enquanto os fungos isolados de abelhas *Trigona* sp, biotransformaram os derivados da ciclobutanona em derivados do ciclobutanol e em derivados da  $\gamma$ -butirolactona. Uma atividade de Baeyer Villigerase significativa está presente nos microrganismos *Curvularia lunata* CCT 5629 e *Aspergillus niger* CCT 5559.

A redução da 4-metil-heptano-3,4-diona com células integras da *Serratia rubidaea* CCT 5732 e de *Aspergillus terreus* CCT 3320 conduz a síntese de intermediários chaves dos feromônios (+)-“Sitophilure” e (-)-“Stegobiol” via biorredução com alto enantio e diastereosseletividade. A *Serratia rubidaea* CCT 5732 foi eficiente na redução enantiosseletiva de  $\beta$ -cetoéster. O caminho estereoquímico da reação pode ser explicado através da atividade conjunta de duas

enzimas, enolase e oxidoredutase, resultando numa resolução dinâmica parcial com racemização “*in situ*”.

Finalmente, a *Serratia rubidaea* foi suportada numa matriz inorgânica de Sílica-Titânia ( $\text{SiO}_2/\text{TiO}_2$ ) preparada pelo processo sol-gel, visando disponibilizar as células íntegras de *Serratia rubidaea* como um reagente químico com um tempo de prateleira de pelo menos alguns meses. Este objetivo foi alcançado e as células suportadas foram ativas por 2 meses com manutenção da enantio e diastereosseletividade.

---

## ***Experimental***

---

## **VI.1. INSTRUMENTAÇÃO E CONDIÇÕES**

### **VI.1.1. Espectrometria na região do Infravermelho (IV)**

Os espectros de absorção na região do infravermelho foram obtidos como filmes sobre celas de KBr (substâncias líquidas) ou em pastilhas de KBr (sólidos), empregando-se um espectrofotômetro Perkin-Elmer 298 e 1660 FTIR.

### **VI.1.2. Cromatografia a Gás acoplada a Espectrometria de Massas (CG/EM)**

As análises por CG/EM foram realizadas empregando-se um cromatógrafo Hewlett Packard 5890B SERIES II, acoplado a um detector seletivo de massas HP 5970, operando com uma fonte de elétrons com energia de ionização de 70 eV. As colunas capilares de sílica fundida empregadas foram: J & W Scientific DB-5 (30 m x 0,25 mm x 0,25  $\mu$ m) ou HP-5 (30m x 0,25 mm x 0,25  $\mu$ m). O volume injetado das amostras, adequadamente diluídas, foi *ca.* 1  $\mu$ L e as condições utilizadas foram: 50-290  $^{\circ}$ C, 15  $^{\circ}$ C min $^{-1}$ . O gás de arraste foi o Hélio, sob fluxo de 1,16 mL min $^{-1}$  (modo "split"). As temperaturas do injetor e do detector foram 280 e 285  $^{\circ}$ C, respectivamente. O espectrômetro de massas operou com velocidade de 0,84 scans seg $^{-1}$ , na faixa de  $m/z$  40-550.

### **VI.1.3. Espectrometria de Ressonância Magnética Nuclear (RMN)**

Os espectros de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN de  $^1\text{H}$ ) foram obtidos em espectrômetros Gemini 300P – Varian Instruments (300,1 MHz),

Brucker AC (300,1 MHz) ou Inova 500 (499,99 MHz). Os deslocamentos químicos ( $\delta$ ) foram dados em ppm, tomando-se como padrões de referência interna o tetrametilsilano (TMS,  $\delta$  0,00) ou o  $\text{CDCl}_3$ , ( $\delta$  7,27). As constantes de acoplamento ( $J$ ) foram citadas em Hz.

Os espectros de RMN de  $^{13}\text{C}$  foram registrados em espectrômetros Gemini 300P – Varian Instruments (75,45 MHz), Brucker AC (75,50 MHz) ou Varian-Inova 500 (125,70 MHz). Os deslocamentos químicos ( $\delta$ ) foram dados em ppm, tomando-se como padrões de referência interna o tetrametilsilano (TMS,  $\delta$  0,00) ou o  $\text{CDCl}_3$ , ( $\delta$  77,00).

O número de hidrogênios ligados aos átomos de carbono foi determinado através dos espectros de RMN de  $^{13}\text{C}$ , com o auxílio das técnicas de RMN de  $^{13}\text{C}$ -DEPT (90 e 135, onde  $\text{CH}_3/\text{CH}$  = sinal positivo,  $\text{CH}_2$  = sinal negativo e  $\text{C}_{\text{quater}}$  = ausente).

#### VI.1.4. Cromatografia a Gás (CG)

As análises por CG foram realizadas em cromatógrafo Hewlett Packard – VCD 5890 A, com detector de ionização em chama (FID), equipado com uma coluna capilar de sílica fundida, com a fase quiral heptakis-(2,6-dimetil-3-pentil)- $\beta$ -ciclodextrina (25 m de comprimento x 0,25 mm de diâmetro interno x 0,25  $\mu\text{m}$  de espessura do filme), utilizando-se  $\text{H}_2$  como gás de arraste (*ca.*  $1\text{ mL min}^{-1}$ ). O volume injetado das amostras, adequadamente diluídas, foi *ca.* 1  $\mu\text{L}$  e as condições

empregadas encontram-se descritas no procedimento experimental dos compostos sintetizados. As temperaturas do injetor e detector foram 200 e 220 °C, respectivamente.

### VI.1.5. Rotação Óptica Específica

Os valores de rotação óptica foram determinados em um polarímetro modelo - Polamat A, equipado com lâmpada de mercúrio (precisão de 0,005 °), em temperatura ambiente. A rotação óptica específica, em função da raia D do sódio, foi obtida conforme as seguintes conversões recomendadas pelo fabricante, e expressas com  $[\alpha]_D$  (concentração ( $c$ ) da amostra em g/100 mL, solvente):

*-Conversão da rotação obtida com a lâmpada de mercúrio para a lâmpada de sódio a ta.:*

$$\alpha_{Na}^T = \alpha_{Hg} 1,17543^{-1}$$

*-Conversão da temperatura ambiente (T) para 20 °C:*

$$\alpha_{Na}^{20} = \alpha_{Na}^T / [1 + 0,000143(T - 20)], \text{ onde } \alpha_{Na}^T \text{ corresponde à rotação observada a ta..}$$

*-Rotação óptica específica:*

$$[\alpha]_D^{20} = \alpha_{Na}^{20} / l \times c, \text{ onde:}$$

$l$  = comprimento da cela (dm);

$c$  = concentração da amostra em g/100 mL.



#### VI.1.6. Cromatografia em Coluna (CC) e em Camada Delgada (CCD)

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

As CCD analíticas, para monitoramento das reações e acompanhamento da purificação dos produtos, foram realizadas empregando-se cromatofolhas de alumínio (5 x 2 cm), recobertas com sílica gel com indicador de fluorescência em UV<sub>254</sub> (Merck).

A revelação dos compostos em CCD foi realizada através da irradiação com lâmpada UV<sub>254</sub> e, ou pulverização com uma solução de *p*-anisaldeído [105] (preparada pela mistura de *p*-anisaldeído, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, HOAc e EtOH, na proporção de 1:2:1:100 em volumes, respectivamente) com subsequente aquecimento a 300 °C, com pistola aquecedora.

#### VI.1.7. Solventes e Reagentes

Todos os reagentes foram, em geral, utilizados como adquiridos e os solventes purificados conforme metodologias descritas na literatura [105].

## **VI.2. PROCEDIMENTOS GERAIS ADOTADAS NO LABORATÓRIO DE BIOCATÁLISE**

A vidraria é primeiramente lavada e seca, sendo então acondicionada com papel (Kraft, jornal, etc.) e esterilizada em autoclave a 121 °C por 30 minutos ou no forno de Pasteur a 170-180 °C por 2 horas. Todo material utilizado com microrganismos, portanto contaminado, deve ser depositado num frasco de descarte contendo uma solução de HClO 5% e posteriormente esterilizado em autoclave a 121 °C durante 40 minutos.

As soluções de álcool 70% e solução de hipoclorito de sódio 0,5%, 5 % e 10% foram utilizadas para desinfetar as bancadas de trabalho e câmara de fluxo laminar.

Praticamente todas as manipulações microbiológicas foram realizadas em câmaras de fluxo laminar (VECO), diminuindo a contaminação do material manipulado e apesar de trabalharmos apenas com linhagens de microrganismos não patogênicos este procedimento impede também a contaminação do meio externo.

### **VI.2.1. Meios de culturas sólidos destinados à manutenção e reativação das linhagens em estudo nesta tese**

**NA (ágar nutriente, g L<sup>-1</sup>)** - Destinado ao cultivo de bactérias

Extrato de carne.....3,0 g  
Peptona.....5,0 g  
Ágar.....20,0 g  
Água destilada.....1,0 L

**MA (Extrato de Malte, g L<sup>-1</sup>) - Elaborado ao cultivo de fungos**

Extrato de malte.....20 g  
Ágar.....20 g  
Água destilada.....1 L

**YMA (g L<sup>-1</sup>) - Utilizado para cultivo de leveduras**

Extrato de levedura.....3,0 g  
Extrato de malte.....3,0 g  
Peptona.....5,0 g  
Glicose.....10,0 g  
Ágar.....20,0 g  
Água destilada.....1 L

Os meios de culturas foram preparados em frascos com tampa ("Schott"), autoclavados a 121 °C por 15 minutos e estocados.

A preparação dos meios de cultura líquidos destinados ao crescimento das linhagens e às reações de biocatálise foram realizados em erlenmeyers de acordo com a formulação dos meios sólidos, excetuando a adição do ágar.

### **VI.3. ISOLAMENTO DE MICRORGANISMOS DE AMBIENTES ESPECÍFICOS**

#### **VI.3.1. Técnica de seleção de bactérias de solo**

Solos provenientes de uma plantação de cana-de-açúcar (Campinas-SP) foram coletados sob a supervisão do microbiologista Dr. Gilson Manfio. Partindo-se de 9 pontos, as amostras (ca. de 100 g) foram coletadas em sacos estéreis a duas profundidades diferentes 0-10 cm e 10-20 cm, utilizando instrumentos previamente esterilizados. Uma triagem foi realizada para eliminar pedregulhos e vegetais maiores, homogeneizando a amostra. A umidade do solo foi determinada tomando-se uma pequena alíquota (10 g) da amostra original, num recipiente, em seguida colocando-o numa estufa entre 105<sup>o</sup> e 110<sup>o</sup>C, até atingir a massa final, que foi constante. O teor de umidade do solo em questão foi de 19,7%. Transferiu-se a amostra (5,0 g) para "schotts" (100 mL) e adicionou-se o *cis* e *trans* cicloexanodiol (0,05 g) diluídos em água destilada esterilizada (1 mL), agitou-se vigorosamente para total homogeneização e incubou-se à 28 °C por 14 dias, para que houvesse proliferação de diversas populações microbianas.

#### **VI.3.1.1. Diluição em série decimal e Inoculação [107]**

Após o período de incubação procedeu-se a diluição que foi realizada com solução salina elaborada e esterilizada, utilizando a solução Ringer (g/L): 225 g de NaCl, 105 g de KCl, 120 g de  $\text{CaCl}_2$ , 50 g de  $\text{NaHCO}_3$ . A partir da solução Ringer preparada, retirou-se 1 mL e completou-se com água destilada (99 mL). Adicionou-se a solução salina (45 mL) aos frascos contendo as amostras de solo, agitou-se a suspensão vigorosamente por 30 min, em agitador mecânico, para dispersão dos microrganismos que haviam proliferado (solução  $10^{-1}$ ).

Desta solução pipetou-se 1 mL e transferiu-se para um tubo de ensaio com solução salina elaborada (9 mL) obtendo-se a primeira diluição ( $10^{-2}$ ), repetiu-se este procedimento até obter a diluição  $10^{-5}$ .

Preparadas a solução  $10^{-1}$  e as diluições ( $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$  e  $10^{-5}$ ) pipetou-se 100  $\mu\text{L}$  das diluições ( $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$  e  $10^{-5}$ ) para placas de Petri contendo os meios de culturas NA, BENNETT'S e Amido/Caseína. As placas, em duplicatas, foram inoculadas através do espalhamento da suspensão microbiana com uma alça de Drigalsky e incubadas em estufa B.O.D a 28 °C por 24 horas.

#### **VI.3.1.2. Seleção dos meios de cultura para isolamento das bactérias do solo de cana-de-açúcar**

Foram escolhidos três meios de cultura para serem utilizados no isolamento das bactérias, nestes meios adicionou-se o antifúngico cicloeximida (5 mL de solução antifúngica / 100 mL de meio de cultura).

**Solução antifúngica de cicloexamida:** 0,1 g de cicloexamida/100 mL de água destilada esterilizada, filtrada em membrana de 0,22  $\mu\text{m}$  (MILLIPORE), neste caso a filtração foi um método de esterilização.

**NA (“Nutrient Agar”)** - a composição está descrita no item V1.2.1.

**BENNETT’S modificado ( $\text{g L}^{-1}$ )** - Elaborado para cultivo de bactérias

|                                  |        |
|----------------------------------|--------|
| “Lab-Lemco”(UNIPATH Ltd.).....   | 0,80 g |
| Extrato de levedura (DIFCO)..... | 1,0 g  |
| “Bacto-Casitona” (DIFCO).....    | 2,0 g  |
| Glicose (Merck).....             | 10,0 g |
| Ágar (DIFCO).....                | 12,0 g |

**Amido/Caseína ( $\text{g L}^{-1}$ )**

|                                                 |         |
|-------------------------------------------------|---------|
| Amido solúvel.....                              | 5,0 g   |
| Caseína purificada.....                         | 0,15 g  |
| $\text{KNO}_3$ .....                            | 1,0 g   |
| $\text{NaCl}$ .....                             | 1,0 g   |
| $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ..... | 0,025 g |
| $\text{CaCO}_3$ .....                           | 0,01 g  |
| $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ..... | 0,005 g |
| Ágar.....                                       | 6,0 g   |

#### **VI.3.1.3. Contagem e identificação das Colônias**

Após o período de crescimento, as colônias bacterianas nas culturas nas diluições  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$  e  $10^{-5}$  foram submetidas a contagem para se estimar o número de colônias, através de um contador manual de colônias bacterianas BIOMATIC – Aparelhos Científicos Ltda – ART LAB.

#### **VI.3.1.4. Obtenção de cultura pura**

As colônias bacterianas nas placas com meio de cultura Bennett's ( $10^{-5}$ ), NA e Amido/Caseína ( $10^{-4}$ ) foram observadas com uma lupa (Stemi DRC – ZEISS 1,6 x) e marcadas para serem isoladas. Escolheu-se a colônia mais isolada e com a alça de platina tocou-se no centro da mesma e em seguida inoculou-se em placas com meio sólido para obtenção de culturas puras a partir das amostras que continham flora mista, utilizando a técnica de esgotamento [108]. Esta técnica consiste basicamente em espalhar um inóculo inicial de modo sucessivo para obter colônias isoladas e purificadas.

Após um período de incubação de 24 horas, as colônias foram examinadas com lupa para cada cultura semeada e as principais observações macroscópicas com relação à morfologia (cor, forma, superfície, brilho, borda, elevação, consistência, tamanho) das colônias bacterianas foram realizadas.

#### **VI.3.1.5. Preservação das bactérias isoladas do solo**

Após o isolamento das bactérias do solo, as mesmas foram repicadas em duplicatas em tubos “slants” com meios de culturas Bennett's e NA e incubadas por

24 horas para serem utilizadas na avaliação da atividade biocatalítica e preservadas em caldo nutriente + 10% de glicerol e congeladas a baixa temperatura (- 80 °C) .

### **VI.3.2. Isolamento de microrganismos de *Trigona* sp**

A coleta das abelhas em contato com resinas florais foi realizada pelo botânico Dr. Volker Bittrich – Instituto de Biologia/Unicamp.

A temperatura escolhida para o crescimento dos fungos foi de 28 °C, pois estaria próxima das condições do *habitat* natural das abelhas e os meios de cultura utilizados no isolamento foram específicos para fungos, MA e “corn maize agar” (CMA).

As abelhas coletadas em recipientes estéreis foram cortadas com auxílio de um bisturi esterilizado e colocadas nas placas com meios de cultura MA e CMA, agitadas para que as mesmas “carimbassem” todo o meio e incubadas à 28 °C para que houvesse o crescimento.

Após 96 horas de incubação, todas as placas contendo os diversos fungos foram observadas na lupa com acompanhamento de uma microbiologista para identificação preliminar dos diferentes tipos de fungos.

Realizou-se um repique dos vários fungos para “slants” com meio MA para verificar a pureza e iniciar o processo de classificação que foi realizado na Fundação Tropical “André Tosello”\*.

---

\* A classificação foi realizada pela técnica Ana Paula M. Zirbodi.



## VI.4. ENSAIOS BIOLÓGICOS

### VI.4.1. Ensaio bioautográfico com as resinas florais de *Clusia* e o ninho das abelhas *Trigona* sp

Para realização do ensaio biológico preparou-se uma suspensão de esporos dos fungos isolados das abelhas ( $10^6 - 10^7$  esporos/mL), calculado pelo método de contagem em câmara de Neubauer.

Os testes foram realizados utilizando-se placas CCD (sílica gel 60 GF<sub>254</sub>, Merck). Aplicou-se nas placas :

- a) 10 µL de solução de resina floral de cada espécie (*Clusia weddelliana* masculina e *Clusia spiritu-sanctensis* masculina) em acetato de etila (10,0 mg/mL);
- b) 5 µL de solução de ninho de Trigona (extrato do ninho em acetato de etila, 50,0 mg/mL);
- c) 1 µL para o padrão fungicida (nistatina 10,0 mg/mL em metanol).

As placas foram eluídas com hexano / AcOEt (85:15) e feitas em duplicatas, para que uma fosse utilizada no ensaio biológico e a outra como padrão de comparação mediante revelação com solução de anisaldeído.

Preparou-se o meio MA, transferiu-se 20 mL para as placas de Petri contendo a placa CCD, e adicionou-se 100 µL da suspensão de esporos dos 17 fungos isolados

das abelhas e semeou-se com a alça de Drigalsky. Terminada a inoculação, as placas foram incubadas a 28 °C por um período de 48 horas.

Os resultados dos ensaios foram avaliados qualitativamente após um período de incubação de 48 h, observando se na superfície do meio de cultura existia ou não halo de inibição de crescimento microbiano.

#### VI.4.2. Técnica de disco de difusão em ágar

Os fungos isolados das abelhas foram repicados em placas de Petri com meio de cultura MA em forma de estrias de forma que proporcionasse um crescimento homogêneo por toda a placa e incubadas por duas semanas a 28 °C.

**Tabela 4: Microrganismos de referência utilizados no ensaio biológico.**

| Microrganismo                         | Temp. ótima<br>(°C) | Tempo de<br>crescimento (h) | Meio de<br>cultura |
|---------------------------------------|---------------------|-----------------------------|--------------------|
| <i>Escherichia coli</i> CCT 5050      | 37                  | 24                          | MH                 |
| <i>Staphylococcus aureus</i> CCT 4295 | 37                  | 24                          | MH                 |
| <i>Bacillus subtilis</i> CCT 0089     | 30                  | 24                          | MH                 |
| <i>Rhodococcus equi</i> CCT 0541      | 37                  | 24                          | MH                 |
| <i>Candida albicans</i> CCT 0776      | 28                  | 48                          | YMA                |
| <i>Aspergillus niger</i> CCT 1435     | 28                  | 168                         | MA                 |

MH – “Mueller Hinton Medium” (Difco); YMA – “Yeast Malt Extract Agar” (Difco);

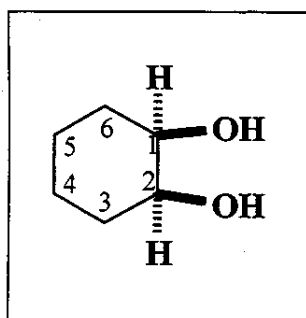
MA – “Malt Agar”(Difco)

Após o período de incubação as culturas dos fungos foram cortadas com um cortador manual em pequenos círculos de ágar ( $\varnothing$  5 mm). Estes pequenos círculos contendo os fungos foram colocados sobre as culturas dos microrganismos de referência já previamente inoculados com concentrações conhecidas no caso das bactérias, levedura ( $6,0 \times 10^8$  células/mL), utilizando a escala de McFarland's [109] que baseia-se na medida de turbidez comparativa de soluções padrões de sulfato de bário e ácido sulfúrico, com soluções bacterianas recém preparadas em soluções aquosas e a do fungo ( $2,0 \times 10^6$  esporos/mL)

A leitura do ensaio biológico foi realizada após 18 horas de incubação e o halo de inibição de crescimento dos microrganismos de referência foi medido em milímetros (mm).

## VI.5. EXPERIMENTAL REFERENTE À OBTENÇÃO DOS COMPOSTOS SINTETIZADOS NESTE TRABALHO

*cis* - cicloexano - 1,2 - diol ( 10 ) [47b]



Aspecto físico: sólido, levemente amarelado

$C_6H_{12}O_2$

116,16

Preparo do reagente: A uma mistura do álcool t-butílico (100 mL) e do peróxido de hidrogênio 30% (25 mL), adicionou-se em pequenas porções o  $\text{MgSO}_4$  anidro e duas fases se formaram. Removeu-se a fase alcoólica que contém a maioria do  $\text{H}_2\text{O}_2$ , secou-se sobre  $\text{MgSO}_4$  anidro e em seguida sobre  $\text{CaSO}_4$  anidro. O líquido resultante é uma solução estável de  $\text{H}_2\text{O}_2$  6,3 % em álcool t-butílico.

Em um balão de 250 mL contendo uma mistura do cicloexeno previamente destilado (8,2 g, 100 mmol) e  $\text{H}_2\text{O}_2$  6,3% (55 mL, 100 mmol), sob agitação magnética, adicionou-se cuidadosamente uma solução de  $\text{OsO}_4$  0,5% em álcool t-butílico anidro (3 mL) e resfriou-se a 0 °C. A mistura reacional permaneceu em repouso à ta. por 12 horas e a coloração alaranjada inicial desapareceu. Removeu-se o solvente e o cicloexeno que não reagiu por destilação sob pressão atmosférica. O resíduo resultante foi destilado sob vácuo ( $2 \cdot 10^{-1}$  Torr) utilizando um condensador a ar. Coletou-se a fração de p.e. 120-140 °C. Purificação do produto bruto por recristalização em AcOET, forneceu 5,0 g (45%) do diol **10**, p.f. 95 °C (p.f. 96 °C [37]).

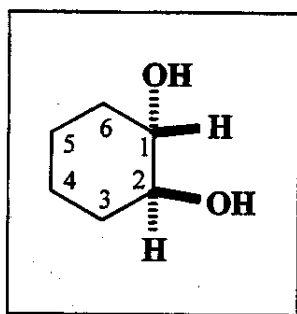
**EM**  $m/z$  (%): 116 ( $\text{M}^+$ , 8), 98 (28), 83 (31), 80 (8), 70 (100), 67 (5), 60 (4), 57 (74), 55 (25), 54 (10), 44 (43), 43 (39), 42 (40), 41 (47).

**IV** (Pastilha de KBr)  $\nu$  ( $\text{cm}^{-1}$ ): 3401, 3268, 2932, 2861, 1440, 1366, 1076 (intenso), 987, 714.

RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ , referência interna de capilar de  $\text{CCl}_4/\text{TMS}$ ):  $\delta_{\text{H}}$  (integração, multiplicidade,  $J$ , atribuição); 3,60 – 3,66 (2 H, m); 1,47 – 1,57 (2 H, m); 1,33 – 1,46 (4 H, m); 1,13 – 1,25 (2 H, m).

RMN  $^{13}\text{C}$  (125,69 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ , referência interna de um capilar  $\text{CCl}_4/\text{TMS}$ ):  $\delta_{\text{C}}$  (atribuição); 70,21 (C-1; C-2); 28,66 (C-3, C-6); 20,68 (C-4, C-5).

*trans* – cicloexano – 1,2 – diol (**11**) [47b]



Aspecto físico: sólido branco

$\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_2$

116,16

Em um balão de 3 saídas adaptado a um funil de adição, a um termômetro e contendo uma mistura de  $\text{HCO}_2\text{H}$  88-90% (75 mL, 1,5 mol) e  $\text{H}_2\text{O}_2$  30% (17,5 mL, 0,15 mol), adicionou-se lentamente cicloexeno previamente destilado (10,25 g, 0,125 mol), via funil de adição por um período de 20-30 minutos, mantendo-se a temperatura reacional entre 40-45  $^{\circ}\text{C}$  por resfriamento em banho de gelo. Manteve-se a mistura reacional com agitação e nesta temperatura por 1 hora adicional, após este período permaneceu em repouso a ta. por 12 horas. Removeu-se parte do ácido

fórmico e da água sob pressão reduzida e adicionou-se uma solução resfriada de NaOH 13 mol L<sup>-1</sup> (18 mL) em pequenas porções, mantendo a temperatura em torno de 45 °C. Extraíu-se com AcOEt (5 x 50 mL). Os extratos orgânicos foram reunidos, secos sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anidro e concentrados sob pressão reduzida. O volume residual foi resfriado a 0 °C e um sólido cristalizou-se. O produto bruto foi separado por filtração por sucção. Este procedimento foi repetido com a água mãe. O produto bruto reunido foi destilado sob vácuo (2.10<sup>-1</sup> Torr) utilizando um condensador a ar. Coletou-se a fração de p.e. 120-140 °C. Purificação do produto bruto por recristalização em AcOET, forneceu 5,0 g (69%) do diol 11, p.f. 101-103 °C (p.f. 102-103 °C [37]).

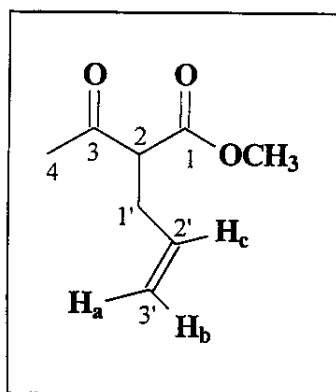
**EM** *m/z* (%): 116 (M<sup>+</sup>, 5), 98 (25), 83 (32), 80 (8), 70 (100), 57 (75), 55 (26), 54 (9), 44 (47), 43 (39), 42 (40), 41 (48).

**IV** (Pastilha de KBr)  $\nu$  (cm<sup>-1</sup>): 3386 (largo), 2934, 2859, 1630, 1445, 1353, 1067 (intenso), 929, 679.

**RMN** <sup>1</sup>H (500 MHz, D<sub>2</sub>O, referência interna de capilar de CCl<sub>4</sub>/TMS):  $\delta_H$  (integração, multiplicidade, *J*, atribuição); 3,18 – 3,25 (2 H, m, H<sub>1</sub> e H<sub>2</sub>); 1,70 – 1,90 (2 H, m); 1,43 – 1,54 (2 H, m); 1,00 – 1,20 (4 H, m).

RMN  $^{13}\text{C}$  (125,69 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ , referenciado com capilar de  $\text{CCl}_4/\text{TMS}$ ):  $\delta_{\text{C}}$  (atribuição); 74,53 (C-1, C-2); 32,24 (C-3, C-6); 23,47 (C-4, C-5).

**2-alil-3-ona-butanoato de metila (15)** [48a]



**Aspecto físico:** líquido incolor

$\text{C}_8\text{H}_{12}\text{O}_3$

156,18

Em um balão de 125 mL sob agitação magnética, contendo uma solução do acetoacetato de metila (12) (2 g, 17,2 mmol) em acetona bidestilada (20 mL), adicionou-se  $\text{K}_2\text{CO}_3$  (7 g, 51,6 mmol) previamente ativado em estufa a  $100^\circ\text{C}$  por 3 horas e agitou-se por 30 minutos à ta. Após este período o brometo de alila (1,4 mL, 17,2 mmol) foi lentamente adicionado e a mistura reacional foi agitada por 24 horas à ta.. Diluiu-se a mistura com adição de 20 mL de cicloexano e em seguida a suspensão foi filtrada sobre Celite<sup>®</sup>. O resíduo foi lavado com acetona e o filtrado resultante foi concentrado sob pressão reduzida. Purificação do produto bruto por cromatografia “flash”, em coluna de sílica gel (hexano – AcOEt 4:1), forneceu 2,3 g (85%) do  $\beta$ -cetoéster 15.

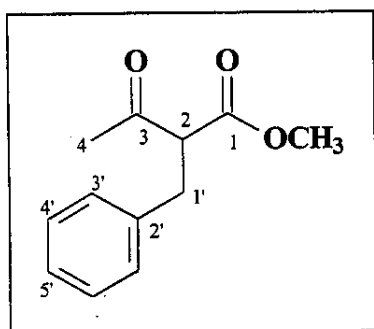
**EM  $m/z$  (%)**: 156 ( $M^+$ , 1), 138 (3), 124 (10), 114 (72), 113 (100), 97 (15), 81 (32), 55 (9), 43 (28)

**IV (Filme)  $\nu$  ( $\text{cm}^{-1}$ )**: 3082, 3005, 2956, 2846, 1746, 1716, 1644, 1437, 1361, 1234, 1198, 1152, 1059, 996, 922, 594.

**RMN  $^1\text{H}$**  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta_{\text{H}}$  (integração, multiplicidade,  $J$ , atribuição); 2,24 (3 H, s,  $\text{CH}_3$ -4); 2,60 (2 H, m, H-1'); 3,55 (1 H, t,  $J$  7,0 Hz, H-2); 3,74 (3 H, s,  $-\text{OCH}_3$ ); 5,05 (1 H, falso dq,  $J$  11,8 Hz, 1,5 Hz,  $\text{H}_b$ ); 5,10 (1 H, falso dq,  $J$  17,1 Hz, 1,5 Hz,  $\text{H}_a$ ); 5,75 (1 H, ddt,  $J$  6,8 Hz, 10,2 Hz e 17,1 Hz,  $\text{H}_c$ ).

**RMN  $^{13}\text{C}$**  (125,69 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta_{\text{C}}$  (atribuição); 29,19 (C-4); 32,22 (C-1'); 52,45 ( $-\text{OCH}_3$ ); 59,09 (C-2); 117,57 (C-3'); 134,15 (C-2'); 169,74 (C-1); 202,41 (C-3).

**2-benzil-3-ona-butanoato de metila (13) [48b]**



**Aspecto físico**: líquido incolor

$\text{C}_{12}\text{H}_{14}\text{O}_3$

206,24



A uma solução do acetoacetato de metila (**12**) (2 g, 17,2 mmol) em acetona bidestilada (20 mL), adicionou-se  $K_2CO_3$  (7 g, 51,6 mmol) previamente ativado em estufa a 100 °C por 3 horas e agitou-se por 30 minutos à ta. Após este período o brometo de benzila (2 mL, 17,2 mmol) foi lentamente adicionado e a mistura reacional foi agitada por 24 horas à ta.. Diluiu-se a mistura com adição de 20 mL de cicloexano e em seguida a suspensão foi filtrada sobre Celite®. O resíduo foi lavado com acetona e o filtrado resultante foi concentrado sob pressão reduzida. Purificação do produto bruto por cromatografia “flash”, em coluna de sílica gel (hexano – AcOEt 4:1), forneceu 2,83 g (80%) do  $\beta$  -cetoéster **13**.

**EM**  $m/z$  (%): 206 ( $M^+$ , 5), 188 (7), 175 (4), 163 (100), 147 (18), 131 (98), 121 (4), 104 (26), 103 (24), 91 (38), 78 (19), 77 (17), 65 (9), 59 (5), 55 (5), 51 (11), 43 (72)

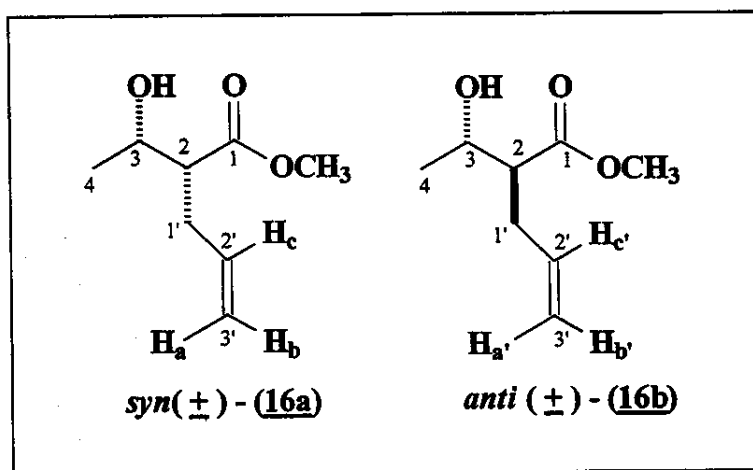
**IV** (Filme)  $\nu$  ( $cm^{-1}$ ): 3028, 2953, 1743 (intenso), 1717 (intenso), 1604, 1496, 1456, 1436, 1359, 1250, 1219, 1149, 1061, 1030, 751, 701, 511.

**RMN**  $^1H$  (500 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta_H$  (integração, multiplicidade,  $J$ , atribuição); 2,18 (3H, s,  $CH_3$ -4); 3,16 (2H, d,  $J$  7,5 Hz, H-1); 3,69 (3H, s,  $-OCH_3$ ); 3,80 (1H, t,  $J$  7,5 Hz, H-2); 7,15-7,30 (5H, m, arom.).

RMN  $^{13}\text{C}$  (125,69 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta_{\text{C}}$  (atribuição); 29,77 (C-4); 34,10 (C-1); 52,57 (-OCH<sub>3</sub>); 61,24 (C-2); 126,97 (C-5'); 128,86 (C-4' e C-6'); 128,98 (C-3' e C-7'); 138,33 (C-2'); 169,89 (C-1); 202,79 (C-3).

### Redução química do $\beta$ -cetoéster (15) utilizando-se $\text{NaBH}_4$

#### 2-alil-3-hidroxi-butanoato de metila



Aspecto físico: líquido

levemente amarelado

$\text{C}_8\text{H}_{14}\text{O}_3$

158,20

Em um balão de 50 mL contendo  $\beta$ -cetoéster (15) (0,110 g, 0,53 mmol), em metanol (10 mL), resfriada a  $0^\circ\text{C}$ , adicionou-se lentamente  $\text{NaBH}_4$  (0,005 g, 0,13 mmol). A reação foi agitada a temperatura ambiente durante 30 minutos e a seguir foi tratada com solução saturada de  $\text{NH}_4\text{Cl}$ . A fração orgânica foi extraída com  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , seca sobre  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anidro e concentrado à vacuo. Purificação do produto bruto por cromatografia “flash”, em coluna de sílica gel (hexano – AcOEt 4:1),

forneceu 0,098 g de uma mistura inseparável dos álcoois **16a** e **16b** em uma proporção de 1:2, respectivamente (90% rendimento global).

Dados para a mistura dos álcoois **16a** e **16b** :

**EM**  $m/z$  (%): 158 ( $M^+$ , ausente), 143 (8), 140 (7), 125 (30), 116 (32), 114 (100), 109 (17), 99 (13), 93 (3), 87 (15), 83 (60), 82 (76), 81 (85), 69 (20), 59 (43), 55 (88), 54 (35), 45 (45), 43 (49), 41 (23).

**IV** (Filme)  $\nu$  ( $\text{cm}^{-1}$ ): 3429 (largo), 3083, 2978, 2954, 2851, 1728 (intenso), 1643, 1440, 1379, 1269, 1233, 1198, 1173, 1117, 994, 919, 640.

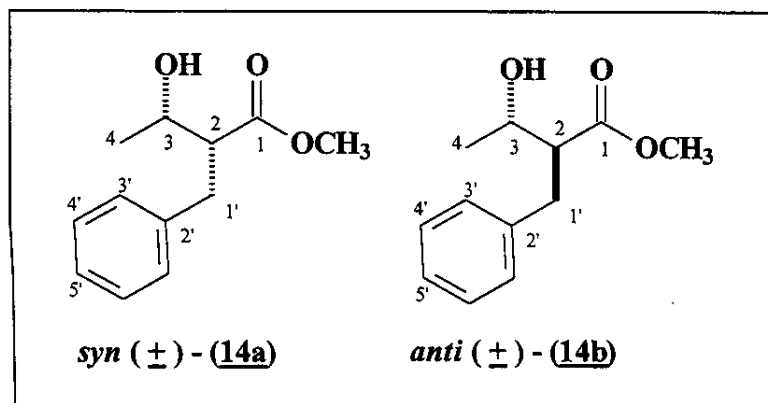
**RMN  $^1\text{H}$**  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta_{\text{H}}$  (integração, multiplicidade,  $J$ , atribuição); 1,21 (3 H, d,  $J$  6,4 Hz,  $\text{CH}_3$ -4 *syn*); 1,24 (3 H, d,  $J$  6,4 Hz,  $\text{CH}_3$ -4 *anti*); 2,40 (4H, m,  $\text{H}_{1'}$ , *syn e anti*); 2,49 (1H, dt,  $J$  9,0 Hz e 5,0 Hz, H-2, *anti*); 2,55 (1H, dt,  $J$  9,0 Hz e 5,0 Hz, H-2, *syn*); 2,59 (1H, sl, OH); 3,70 (3 H, s,  $-\text{OCH}_3$  *syn*); 3,71 (3 H, s,  $-\text{OCH}_3$  *anti*); 3,94 (1 H, dq,  $J$  6,0 Hz e 6,0 Hz, H-3 *syn*); 3,98 – 4,05 (1 H, m, H-3 *anti*); 5,01 – 5,06 (2 H, m,  $\text{H}_b$ -3' e  $\text{H}_b$ -3' *syn e anti*); 5,09 (1 H, falso dq,  $J$  17,0 Hz,  $J$  1,5 Hz  $\text{H}_a$ -3' *syn*); 5,10 (1 H, falso dq,  $J$  17,0 Hz, 1,5 Hz,  $\text{H}_a$ -3' *anti*); ; 5,75 (1 H, ddt,  $J$  17,0 Hz, 10,0 Hz e 7,0 Hz,  $\text{H}_c$ -2' *syn*); 5,79 (1 H, ddt,  $J$  17,0 Hz, 10,0 Hz e 7,0 Hz,  $\text{H}_c$ -2' *anti*).

**RMN  $^{13}\text{C}$**  (125,69 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta_{\text{C}}$  (atribuição); 20,38 (C-4 *syn*); 21,43 (C-4 *anti*); 31,87 (C-1' *syn*); 33,61 (C-1' *anti*); 51,63 ( $-\text{OCH}_3$  *anti*); 51,65 ( $-\text{OCH}_3$  *syn*); 51,99 (C-2 *syn*);

52,29 (C-2 *anti*); 67,89 (C-3 *anti*); 67,92 (C-3 *syn*); 116,83 (C-3' *syn*); 117,22 (C-3' *anti*); 134,74 (C-2' *anti*); 135,51 (C-2' *syn*); 174,88 (C-1 *syn*); 175,13 (C-1 *anti*).

### Redução química do $\beta$ -cetoéster **13** utilizando-se $\text{NaBH}_4$

#### 2-benzil-3-hidroxi-butanoato de metila



**Aspecto físico:** líquido,

levemente amarelado

$\text{C}_{12}\text{H}_{16}\text{O}_3$

208,26

Efetuuou-se o mesmo procedimento descrito para o  $\beta$ -cetoéster (**15**).

Quantidades:  $\beta$ -cetoéster (**13**) (0,108 g, 0,69 mmol),  $\text{NaBH}_4$  (0,006 g, 0,17 mmol). Purificação da mistura bruta por cromatografia “flash”, em coluna de sílica gel (hexano – AcOEt 4:1) forneceu 0,103 g de um mistura inseparável dos álcoois **14a** e **14b** em uma proporção de 2:1, respectivamente (95% de rendimento total).

Dados para a mistura dos álcoois **14a** e **14b**:

Diastereoisômero *syn*:

**EM** *m/z* (%): 208 ( $M^+$ , ausente), 190 (39), 175 (2), 158 (24), 147 (4), 131 (100), 121 (11), 117 (7), 105 (14), 104 (29), 103 (17), 92 (11), 91 (58), 78 (18), 77 (14), 65 (11), 55 (6), 51 (7), 45 (13), 43 (8).

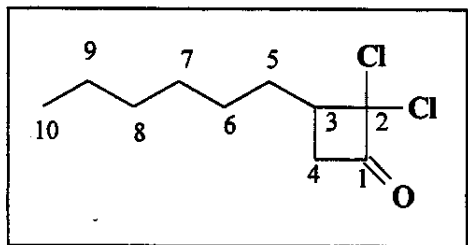
Diastereoisômero *anti*:

**EM** *m/z* (%): 208 ( $M^+$ , ausente), 190 (35), 175 (3), 158 (23), 147 (4), 131 (100), 121 (12), 117 (15), 105 (18), 104 (38), 103 (21), 92 (22), 91 (84), 78 (27), 77 (22), 65 (19), 55 (11), 51 (13), 45 (27), 43 (16).

**IV** (Filme)  $\nu$  ( $\text{cm}^{-1}$ ): 3448 (largo), 3022, 2978, 1737 (intenso), 1606, 1496, 1456, 1438, 1374, 1243, 1200, 1167, 1124, 1046, 938, 846, 749, 701.

**RMN  $^1\text{H}$**  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta_{\text{H}}$  (integração, multiplicidade, *J*, atribuição); 1,25 (3 H, d, *J* 6,2 Hz,  $\text{CH}_3$ -4 *anti*); 1,26 (3 H, d, *J* 6,2 Hz,  $\text{CH}_3$ -4 *syn*); 2,64 – 2,82 (2 H, m, H-2, *anti* e *syn*); 2,97 (4 H, dm, *J* 2,2 Hz, H-1' *anti* e *syn*); 3,57 (3 H, s,  $-\text{OCH}_3$  *syn*); 3,61 (3 H, s,  $-\text{OCH}_3$  *anti*); 3,85 – 4,08 (2 H, m, H-3 *syn* e *anti*); 7,14 – 7,34 (10 H, m, arom. *anti* e *syn*).

**RMN  $^{13}\text{C}$**  (75,45 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta_{\text{C}}$  (atribuição); 20,30 (C-4 *syn*); 21,65 (C-4 *anti*); 33,58 (C-1' *syn*); 35,31 (C-1' *anti*); 51,49 ( $-\text{OCH}_3$  *anti* e *syn*); 54,15 (C-2 *anti*); 54,36 (C-2 *syn*); 67,51 (C-3 *anti*); 67,98 (C-3 *syn*); 126,41 (C-5' *syn*); 126,53 (C-5' *anti*); 128,51 (C-3' e C-7' *anti* e *syn*); 128,94 (C-4' e C-6' *anti* e *syn*); 138,74 (C-2' *anti*); 139,23 (C-2' *syn*); 174,92 (C-1 *syn*); 175,31 (C-1 *anti*).

**2,2-dicloro-3-hexil-1-ciclobutanona (20) [63a]****Aspecto físico:** líquido levemente amarelado $C_{10}H_{16}Cl_2O$ 

223,14

Em um balão de 125 mL de 3 saídas acoplado a um funil de adição, sob atmosfera inerte (Ar) e agitação magnética, adicionou-se o 1-octeno (2,0 g, 17,8 mmol), zinco em pó, previamente ativado (2,9 g, 44,5 mmol) e Et<sub>2</sub>O seco (60 mL). O sistema foi transferido para um banho de ultra-som e uma solução etérea (20 mL) de cloreto de tricloroacetila (2,4 mL, 21,4 mmol) foi adicionada lentamente por *ca.* 50 min... Após duas horas complementares no banho de ultra-som, a mistura reacional foi filtrada sobre Celite® e extraiu-se com água (3 x 40 mL), solução de NaHCO<sub>3</sub> (3 x 40 mL) e secou-se sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anidro. Após concentração sob pressão reduzida, a purificação do produto bruto por cromatografia “flash”, em coluna de sílica gel (hexano – AcOEt 10:1), forneceu 2,1 g (52%) da diclorociclobutanona **20**.

Ativação do zinco: Lavou-se com HCl 2%, removeu-se o ácido por filtração a vácuo, lavou-se novamente com HCl 2%, água destilada, etanol 95 % e finalmente

com éter etílico. O material foi seco em estufa (120 °C). Pulverizou-se em gral. Armazenou-se em dessecador sob atmosfera de argônio.

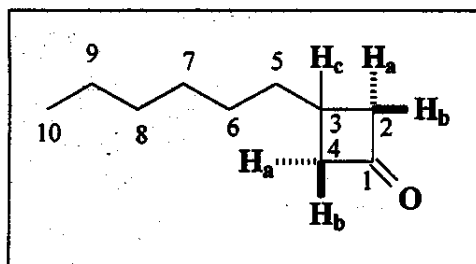
**EM  $m/z$  (%)**: 223 ( $M^+$ , ausente), 180 (9), 175 (3), 138 (8), 118 (9), 109 (36), 102 (27), 97 (7), 82 (17), 69 (29), 56 (52), 43 (100), 42 (40), 41 (62).

**IV (Filme)  $\nu$  ( $\text{cm}^{-1}$ )**: 2957, 2930, 2859, 1870, 1811, 1466, 1393, 1064, 987, 732, 568.

**RMN  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )**:  $\delta_{\text{H}}$  (integração, multiplicidade,  $J$ , atribuição); 0,90 (3 H, t,  $J$  6,9 Hz,  $\text{CH}_3$ -10); 1,21 – 1,50 (8 H, m, H-6, H-7, H-8 e H-9); 1,51 – 1,65 (1 H, m, H-5); 1,86 – 2,00 (1 H, m, H-5); 2,82 – 2,92 (1 H, m, H-3); 2,96 (1H, dd,  $J$  17,2 e 9,1 Hz, H-4); 3,36 (1 H, dd,  $J$  17,2 e 9,2 Hz, H-4).

**RMN  $^{13}\text{C}$  (75,45 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )**:  $\delta_{\text{C}}$  (atribuição); 13,99 (C-10); 22,51 (C-9); 27,36 (C-8); 29,01 (C-7); 31,36 (C-6); 31,57 (C-5); 45,98 (C-3); 47,76 (C-4); 88,88 (C-2); 193,02 (C-1).

### 3-hexil-1-ciclobutanona (**22**) [63a]



**Aspecto físico**: líquido incolor, aroma característico.

$\text{C}_{10}\text{H}_{18}\text{O}$

154,25

Em um balão de 2 saídas adaptado a um condensador de refluxo, sob agitação magnética, contendo uma mistura da diclorociclobutanona **20** (1,5 g, 6,7 mmol), ácido acético concentrado (10 mL), água (1 mL), adicionou-se zinco em pó, previamente ativado (2,6 g, 30,32 mmol) em pequenas porções. Após duas horas de agitação à ta., a solução foi aquecida à 50 °C por mais uma hora subsequente até o desaparecimento total do substrato. A mistura reacional foi filtrada sobre Celite®, diluído com água (100 mL) e extraiu-se com AcOEt (5 x 30 mL). A fase orgânica foi lavada com solução saturada de NaHCO<sub>3</sub> (3 x 40 mL), secou-se sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anidro e concentrou-se sob pressão reduzida, levando à obtenção de um líquido de cor alaranjada. Destilou-se sob vácuo (2.10<sup>-1</sup> Torr), em um sistema “Kugelrohr”, obtendo-se a ciclobutanona **22** (0,870 g, 84%).

**EM** *m/z* (%): 154 (M<sup>+</sup>, 1), 136 (3), 126 (6), 111 (7), 98 (100), 84 (37), 83 (27), 70 (39), 69 (35), 56 (49), 55 (67), 43 (66), 42 (45), 41 (77).

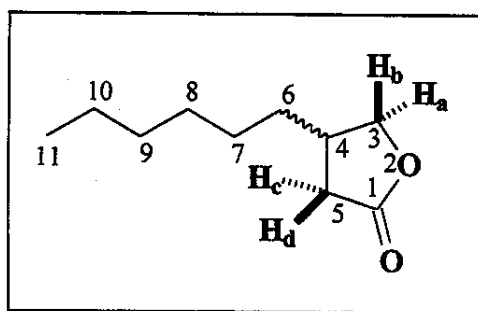
**IV** (Filme)  $\nu$  (cm<sup>-1</sup>): 2958, 2926, 2855, 1787 (intenso, C=O de ciclobutanonas), 1466, 1386, 1206, 1168, 1097, 724.

**RMN** <sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta_H$  (integração, multiplicidade, *J*, atribuição); 0,89 (3 H, t, *J* 6,9 Hz, CH<sub>3</sub>-10); 1,26 (8 H, m, H-6, H-7, H-8, H-9); 1,58 (2H, m, H-5) ; 2,35 (1 H, m, H-3); 2,66 (2H, m, H-2b e H-4b ou H-2a e H-4a); 3,07 – 3,19 (2 H, m, H-2a e H-4a ou H-2b e H-4b).



RMN  $^{13}\text{C}$  (75,45 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta_{\text{C}}$  (atribuição); 13,99 (C-10); 22,52 (C-9); 23,77 (C-3); 28,15; 29,03 31,72 (C-6,C-8,C-7), 36,29 (C-5); 52,44 (C-2 e C-4); 208,75 (C-1).

#### 4-hexil-tetraidro-furanona (24)



Aspecto físico: líquido incolor

$\text{C}_{10}\text{H}_{18}\text{O}_2$

170,25

Em um balão de 25 mL sob atmosfera inerte (Ar) e agitação magnética, foram adicionados a ciclobutanona 22 (0,200 g, 1,3 mmol) e o  $\text{NaHCO}_3$  (0,325 g, 3,9 mmol), em  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  seco (10 mL). A solução foi resfriada a  $0^\circ\text{C}$  e adicionou-se uma solução de *m*-CPBA 85% (0,290 g, 1,43 mmol), em  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (5 mL) *via* cânula. O banho de gelo foi retirado e a mistura reacional permaneceu agitando à ta. por 3 horas. A seguir lavou-se com solução de  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  10% para destruir o excesso de peróxido. A fase orgânica foi lavada com solução saturada de  $\text{NaHCO}_3$  e seca sobre  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anidro e concentrada sob pressão reduzida. Purificação do produto bruto por cromatografia “flash”, em coluna de sílica gel (hexano – AcOEt 10:1), forneceu 0,134 g (60%) da lactona 24.

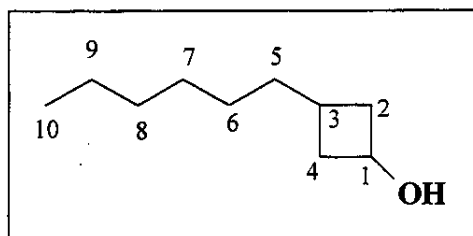
**EM**  $m/z$  (%): 170 ( $M^+$ , 2), 152 (2), 139 (4), 128 (6), 114 (18), 111 (24), 97 (12), 85 (26), 83 (46), 70 (43), 69 (49), 56 (98), 55 (64), 43 (82), 42 (44), 41 (100).

**IV** (Filme)  $\nu$  ( $\text{cm}^{-1}$ ): 295, 2927, 2857, 1779 (intenso, C=O de lactonas de 5 membros), 1467, 1420, 1379, 1171 (intenso), 1021, 837, 726, 686, 553.

**RMN  $^1\text{H}$**  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta_{\text{H}}$  (integração, multiplicidade,  $J$ , atribuição); 0,89 (3 H, t,  $J$  6,8 Hz,  $\text{CH}_3$ -11); 1,25 – 1,33 (8 H, m, H-7, H-8, H-9 e H-10); 1,45 – 1,49 (2 H, m, H-6); 2,15 – 2,22 (1 H, dd,  $J$  7,8 Hz e 1,2 Hz, H-5c ou H-5d); 2,50 – 2,59 (1 H, hepteto largo,  $J$  7,6 Hz, H-4); 2,60 – 2,66 (1 H, ddd,  $J$  16,8 Hz, 8,3 Hz e 1,2 Hz, H-5d ou H-5c); 3,93 (1 H, ddd,  $J$  8,8 Hz, 7,3 Hz e 1,2 Hz, H-3a ou H-3b); 4,42 (1 H, ddd,  $J$  8,8 Hz, 7,3 Hz e 1,2 Hz, H-3b ou H-3a).

**RMN  $^{13}\text{C}$**  (125,69 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta_{\text{C}}$  (atribuição); 14,04 (C-11); 22,56 (C-10); 27,36, 29,15, 31,64; 33,14 (C-9, C-6, C-7, C-8); 34,57 (C-5); 35,74 (C-4); 73,49 (C-3); 177,38 (C-1).

### 3-hexil-1-ciclobutanol (**25**)



**Aspecto físico:** líquido incolor

$\text{C}_{10}\text{H}_{20}\text{O}$

156,27

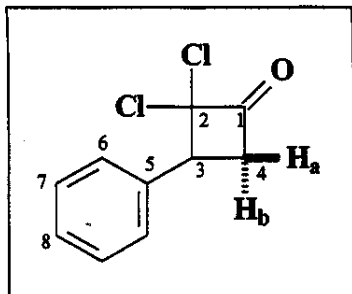
Em um balão de 25 mL contendo a 3-hexil-1-ciclobutanona (0,060g, 0,39 mmol), em metanol (5 mL), resfriada a 0°C, adicionou-se lentamente NaBH<sub>4</sub> (0,004 g, 0,09 mmol). A reação foi agitada à temperatura ambiente durante 30 minutos e a seguir foi tratada com solução saturada de NH<sub>4</sub>Cl. A fração orgânica foi extraída com CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, seca sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anidro e concentrada sob pressão reduzida. Purificação do produto bruto por cromatografia “flash”, em coluna de sílica gel (hexano – AcOEt 4:1), forneceu 0,052 g do 3-hexil-1-ciclobutanol (90% rendimento global).

**EM** *m/z* (%): 156 (M<sup>+</sup>, ausente), 138 (1), 128 (1), 112 (11), 96 (6), 83 (23), 71 (29), 70 (39), 69 (24), 57 (42), 56 (40), 55 (58), 45 (23), 44 (92), 43 (97), 41 (100).

**IV** (Filme)  $\nu$  (cm<sup>-1</sup>): 3345 (largo), 2960, 2853, 1460, 1336, 1235, 1146, 1058, 724.

**RMN** <sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta_H$  (integração, multiplicidade, *J*, atribuição); 0,88 (3 H, t, *J* 6,6 Hz, CH<sub>3</sub>-10); 1,24 – 1,51 (10 H, m, H-5, H-6, H-7, H-8 e H-9); 1,57 – 1,71 (1 H, m, H-3); 2,33 – 2,47 (4 H, m, H-2 e H-4); 4,02 – 4,12 (1 H, quinteto *J* 8,0 Hz, H-1).

**RMN** <sup>13</sup>C (75,45 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta_C$  (atribuição); 14,03 (C-10); 22,59 (C-9); 25,47 (C-3); 27,38 (C-8); 29,17 (C-7); 31,83 (C-6); 37,08 (C-5); 39,72 (C-2 e C-4); 63,80 (C-1).

**2,2-dicloro-3-fenil-1-ciclobutanona (19) [63b]**

**Aspecto físico:** cristais amarelados.

$C_{10}H_8Cl_2O$

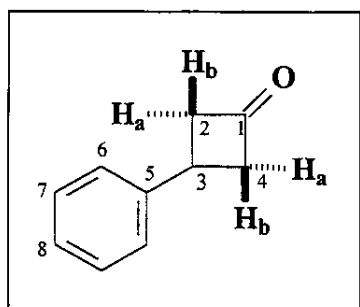
215,08

Em um balão de 125 mL acoplado a um funil de adição, sob atmosfera inerte (Ar) e agitação magnética, adicionou-se o estireno (3,3 mL, 20,8 mmol), zinco em pó, previamente ativado\* (2,7 g, 65,3 mmol) e Et<sub>2</sub>O seco (60 mL). Uma solução etérea (20 mL) de cloreto de tricloroacetila (2,8 mL, 30,0 mmol) e de POCl<sub>3</sub> foi adicionada lentamente por *ca.* 60 min. (via funil de adição). Após o término da adição, a solução ficou agitando por 24 horas. A mistura reacional foi filtrada sobre Celite® e lavada com hexano (100 mL). O solvente foi reduzido a 1/3 sob pressão reduzida (esta operação foi repetida por mais duas vezes). Adicionou-se AcOEt (100 mL) ao resíduo e lavou-se com solução de NaHCO<sub>3</sub> (3 x 40 mL), solução saturada de NaCl (1 x 50 mL) e secou-se sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anidro. Após concentração sob pressão reduzida, o produto bruto foi caracterizado por RMN de <sup>1</sup>H e de <sup>13</sup>C e utilizado para a próxima reação sem purificação adicional.

RMN  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta_{\text{H}}$  (integração, multiplicidade,  $J$ , atribuição); 3,55 (1 H, dd,  $J$  17,5 e 10,2 Hz, H-4a); 3,73 (1 H, dd,  $J$  17,5 e 10,2 Hz, H-4b); 4,25 (1 H, t,  $J$  10,2, H-3c); 7,28 – 7,48 (5 H, m, arom.).

RMN  $^{13}\text{C}$  (75,45 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta_{\text{C}}$  (atribuição); 45,64 (C-4); 50,44 (C-3); 89,60 (C-2); 128,27\* (C-6 e C-10); 128,56 (C-8); 128,87 (C-7 e C-9)\*; 134,69 (C-5); 192,44 (C-1). \* atribuição intercambiável

### 3-fenil-1-ciclobutanona (**21**) [63b]



Aspecto físico: líquido incolor

$\text{C}_{10}\text{H}_{10}\text{O}$

146,19

Em um balão de 2 saídas adaptado a um condensador de refluxo, sob agitação magnética, foram adicionados a diclorociclobutanona (**19**) (3,6 g, 16,7 mmol), ácido acético concentrado (15 mL) e água (1 mL). O zinco em pó, previamente ativado (6,6 g, 100 mmol) foi adicionado lentamente em pequenas porções à mistura reacional. Após quatro horas de agitação à ta., a solução foi aquecida à 50  $^{\circ}\text{C}$  por mais uma hora subsequente até o desaparecimento total do substrato. A mistura

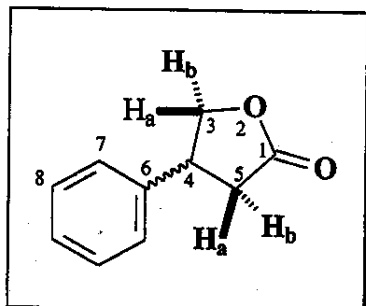
reacional foi filtrada sobre Celite®, diluído com água (150 mL) e extraiu-se com AcOEt (5 x 30 mL). A fase orgânica foi lavada com solução saturada de NaHCO<sub>3</sub> (3 x 40 mL), secou-se sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anidro e concentrou-se sob pressão reduzida. Purificação do produto bruto por cromatografia “flash”, em coluna de sílica gel, forneceu a ciclobutanona (**21**) (1,75 g, 72%).

EM *m/z* (%): 146 (M<sup>+</sup>, 1), 115 (4), 105 (9), 104 (100), 103 (19), 91 (3), 78 (22), 77 (11), 74 (2), 63 (4), 58 (2), 51 (10), 42 (3).

IV (Filme)  $\nu$  (cm<sup>-1</sup>): 3329, 2924, 1786 (intenso, C=O de ciclobutanonas), 1735, 1602, 1496, 1454, 1380, 1104, 759, 700.

RMN <sup>1</sup>H (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta_H$  (integração, multiplicidade, *J*, atribuição); 3,20 – 3,27 (2 H, m, H-2a.e 4-2a ou H-2b e H-4b); 3,44 – 3,52 (2 H, m, H-2a.e 4-2a ou H-2b e H-4b); 3,66 (1 H, qt, *J* 7,6 Hz, H-3); 7,22 – 7,38 (5 H, m, arom.).

RMN <sup>13</sup>C (125,69 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta_C$  (atribuição); 28,30 (C-3); 54,58 (C-2 e C-4); 126,40 (C-6 e C-10); 126,54 (C-8); 128,59 (C-7 e C-9); 143,46 (C-5); 206,84 (C-1).

**4-fenil-tetraidro-furanona (23)****Aspecto físico:** líquido incolor $C_{10}H_{10}O_2$ 

162,19

Em um balão de 25 mL sob atmosfera inerte (Ar) e agitação magnética, foram adicionados a ciclobutanona (21) (0.200g, 1,4 mmol) e de  $NaHCO_3$  (0,342 g, 4,0 mmol), em  $CH_2Cl_2$  seco (10 mL), sob atmosfera inerte (Ar) e resfriada a 0 °C, adicionou-se uma solução de m-CPBA 50-60% (0,472 g, 1,43 mmol), em  $CH_2Cl_2$  (5 mL) *via* cânula. O banho de gelo foi retirado e a mistura permaneceu agitando à ta. por 3 horas. A mistura reacional foi lavada com solução de  $Na_2S_2O_3$  10% para destruir o excesso de peróxido. Lavou-se a fase orgânica com solução saturada de  $NaHCO_3$ , secou-se sobre  $Na_2SO_4$  anidro e concentrou-se sob pressão reduzida. Purificação do produto bruto por cromatografia “flash”, em coluna de sílica gel (hexano – AcOEt 10:1), forneceu 0,195 g (86%) da lactona (23).

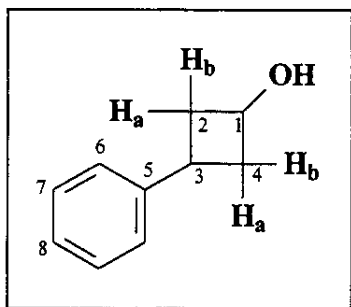
**EM  $m/z$  (%):** 162 ( $M^+$ , 14), 134 (2), 115 (2), 104 (100), 91 (7), 78 (18), 77 (13), 63 (6), 51 (23).

IV (Filme)  $\nu$  ( $\text{cm}^{-1}$ ): 3031, 2909, 1779 (intenso), 1604, 1496, 1456, 1421, 1352, 1222, 1170, 1020, 948, 853, 818, 761, 701, 642, 541.

RMN  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta_{\text{H}}$  (integração, multiplicidade,  $J$ , atribuição); 2,68 (1 H, dd,  $J$  17,5 e 9,1 Hz, H-5a); 2,95 (1 H, dd,  $J$  17,6 e 8,8 Hz, H-5b); 3,80 (1 H, qt,  $J$  8,4 Hz, H-4); 4,28 (1 H, dd,  $J$  9,1 e 8,0 Hz, H-3a); 4,68 (1 H, dd,  $J$  8,8 e 7,7 Hz, H-3b).

RMN  $^{13}\text{C}$  (75,45 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta_{\text{C}}$  (atribuição); 35,84 (C-5); 41,26 (C-4); 74,34 (C-3); 127,34 (C-7 e C-11); 128,22 (C-9); 129,66 (C-8 e C-10); 139,98 (C-6); 177,12 (C-1).

### 3-fenil-1-ciclobutanol (**26**)



Aspecto físico: líquido incolor

$\text{C}_{10}\text{H}_{12}\text{O}$

148,20

Efetuu-se o mesmo procedimento descrito para o 3-hexil-ciclobutanol (**25**)

Quantidades: 3-fenil-ciclobutanona (**23**) (0,070 g, 0,51 mmol),  $\text{NaBH}_4$  (0,005 g, 0,13 mmol). Purificação da mistura bruta por cromatografia “flash”, em coluna de



silica gel (hexano – AcOEt 4:1) forneceu 0,0717 g do 3-fenil-1-ciclobutanol (95% de rendimento total).

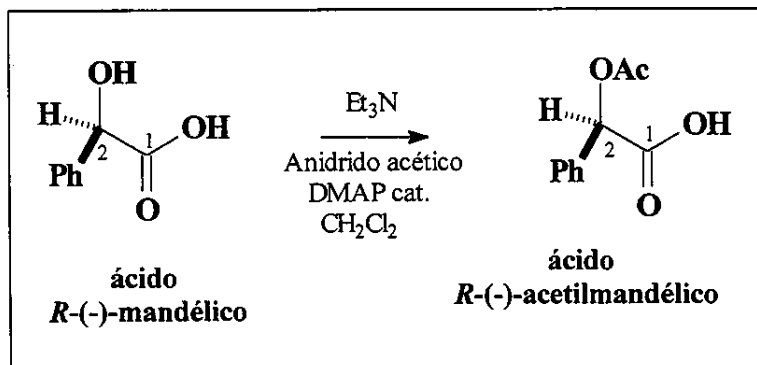
**EM**  $m/z$  (%): 148 ( $M^+$ , 1), 130 (5), 115 (3), 104 (100), 91 (4), 78 (21), 77 (11), 63 (4), 51 (10), 43 (4).

**IV** (Filme)  $\nu$  ( $\text{cm}^{-1}$ ): 3370, 3027, 2974, 2934, 1603, 1494, 1450, 1338, 1231, 1156, 1092, 960, 757, 699.

**RMN**  $^1\text{H}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta_{\text{H}}$  (integração, multiplicidade,  $J$ , atribuição); 1,97 – 2,04 (2 H, m, H-2a e H-4b); 2,40 (1 H, sl, OH); 2,71 – 2,77 (2 H, m, H-2b e H-4a); 2,93 (1 H, qt,  $J$  7,8 Hz, H-3); 4,24 (1 H, qt,  $J$  7,1 Hz, H-1); 7,16 – 7,31 (5 H, m, arom).

**RMN**  $^{13}\text{C}$  (125,69 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta_{\text{C}}$  (atribuição); 29,92 (C-3); 40,88 (c-2 e C-4); 63,52 (C-1); 125,97 (c-6 e C-10); 126,57 (C-8); 128,30 (C-7 e C-9); 144,57 (C-5).

## Reação de acetilação do Ácido Mandélico



Aspecto físico: líquido

viscoso, incolor

 $\text{C}_{10}\text{H}_{10}\text{O}_4$ 

194,19

A uma solução do ácido (*R*)-(-) mandélico (1,0 g, 6,6 mmol),  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (2 mL) e trietilamina (1,2 mL, 7,9 mmol), adicionou-se anidrido acético (72  $\mu\text{L}$ , 7,9 mmol) e DMAP (catalítico) e agitou-se a temperatura ambiente por 8 horas. Após acidificação do meio com HCl até pH 1, extraiu-se com éter dietílico, secou-se sobre  $\text{MgSO}_4$  anidro e concentrou-se sob pressão reduzida. Purificação do produto por cromatografia (“flash”) sobre sílica gel (AcOEt), forneceu 1,15 g (90%) do produto acetilado.

$[\alpha]_{\text{D}}^{20}$  - 150,0 ° (c 2,6,  $\text{CH}_3\text{COCH}_3$ );  $[\alpha]_{\text{Dlit}}^{20}$  - 152,4 ° (c 2,0,  $\text{CH}_3\text{COCH}_3$ ) [106].

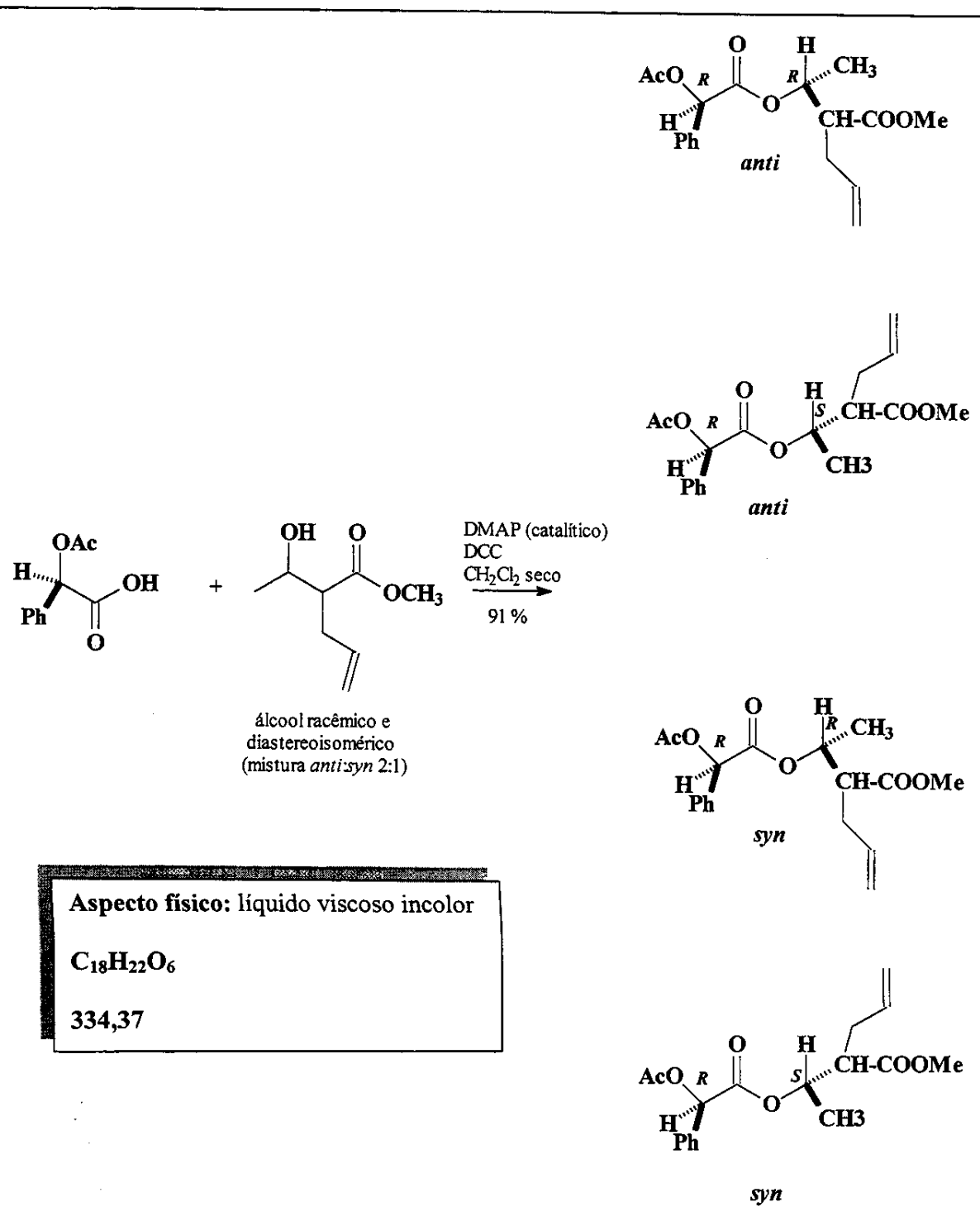
**EM**  $m/z$  (%): 194 ( $\text{M}^+$ , 1), 176 (14), 166 (3), 152 (11), 149 (12), 134 (28), 107 (53), 105 (37), 89 (6), 77 (37), 66 (19), 51 (17), 45 (35), 43 (100).

IV (Filme)  $\nu$  ( $\text{cm}^{-1}$ ): 3348, 2985, 2593, 1731, 1498, 1456, 1374, 1244, 1186, 1082, 957, 767, 720, 695, 648, 516.

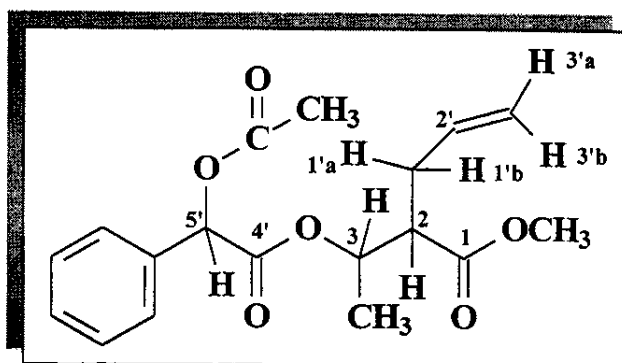
RMN  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta_{\text{H}}$  (integração, multiplicidade,  $J$ , atribuição); 2,15 (3 H, s, -  
 $\text{OCOCH}_3$ ); 5,92 (1 H, s, H-2); 7,34 – 7,50 (5 H, m, arom.); 8,01 (1 H, sl, OH).

RMN  $^{13}\text{C}$  (75,45 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta_{\text{C}}$  (atribuição); 20,34 (- $\text{OCOCH}_3$ ); 74,25 (C-2); 127,67 (2-  
CH-*orto*); 128,82 (2-CH-*meta*); 129,36 (CH-*para*); 133,51 (C-1); 170,81 (- $\text{OCOCH}_3$ );  
173,24 (C-1).

Reação de esterificação do álcool racêmico e diastereoisomérico (mistura *anti:syn* 2:1) (16) com o ácido (*R*)-(-)-acetilfenil acético



A uma mistura do álcool (**16**) (0,015 g, 0,095 mmol), do (*R*)-*O*-acetilmandélico (0,028 g, 0,142 mmol) e DMAP (catalítico), em CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> seco (5 mL), vigorosamente agitada sob atmosfera de argônio e resfriada a 0°C, adicionou-se o DCC (0,022 g, 0,104 mmol). Neste momento formou-se um precipitado branco e o banho de gelo foi retirado e a suspensão permaneceu agitando à ta. por 12 horas. Após este período, a mistura reacional foi filtrada sobre Celite®, lavou-se o resíduo várias vezes com CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> e o solvente foi concentrado sob vácuo. Purificação do produto bruto por cromatografia ("flash") sobre sílica gel (hexano -AcOEt 15%), forneceu 0,029 g (91%) do produto esterificado.



Diastereoisômero *anti*:

**EM** *m/z* (%): 334 ( $M^+$ , ausente); 176 (14); 150 (4); 149 (30); 118 (16); 108 (12); 107 (100); 90 (7); 81 (34); 79 (20); 71 (10); 59 (20); 55 (6); 43 (95).

Diastereoisômero *syn*:

**EM** *m/z* (%): 334 ( $M^+$ , ausente); 150 (35); 149 (3); 118 (3); 108 (100); 107 (39); 90 (10); 79 (17); 55 (21); 43 (54).

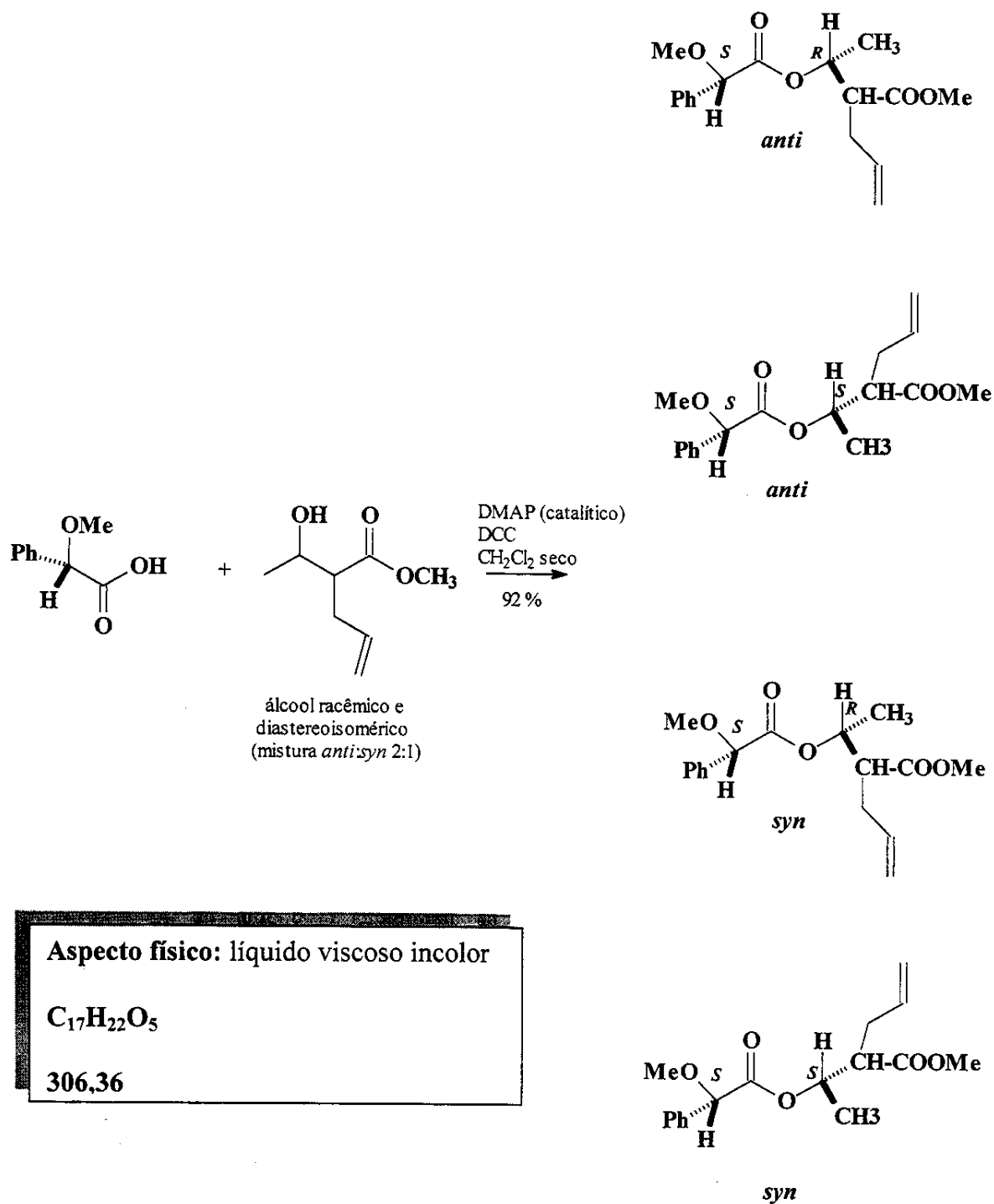
IV (Filme)  $\nu$  ( $\text{cm}^{-1}$ ): 3067, 2985, 2935, 2856, 1744 (intenso), 1672, 1519, 1455, 1374, 1233, 1178, 1053, 968, 924, 741, 697, 525.

RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta_{\text{H}}$  (integração, multiplicidade,  $J$ , atribuição parcial); 1,10 (3 H, d,  $J$  6,3 Hz,  $-\text{CH}_3$ , *syn*, 2*S*, 3*R*); 1,13 (3 H, d,  $J$  6,3 Hz,  $-\text{CH}_3$ , *anti*, 2*R*, 3*R*); 1,28 (3 H, d,  $J$  6,3 Hz,  $-\text{CH}_3$ , *syn*, 2*R*, 3*S*); 1,30 (3 H, d,  $J$  6,3 Hz,  $-\text{CH}_3$ , *anti*, 2*S*, 3*S*); 2,18 ,2,19 (12 H,  $\text{OCO}-\underline{\text{CH}_3}$ , *syn* 2*S*, 3*R*, *anti* 2*S*, 3*S*, *anti*, 2*R*, 3*R*, *syn* 2*R*, 3*S*); 2,27 – 2,33 (4 H, m, 1'a e 1'b *syn*); 2,33 – 2,41 (4 H, m, 1'a e 1'b *anti*); 2,54 – 2,64 (1 H, m, H-2); 2,66 – 2,76 (1 H, m, H-2); 3,35 (3 H, s,  $\text{COOCH}_3$  *anti* 2*S*, 3*S*); 3,51 (1 H, s,  $\text{COOCH}_3$  *anti* 2*R*, 3*R*); 3,63 (1 H, s,  $\text{COOCH}_3$  *anti* 2*R*, 3*R*); 3,65 (1 H, s,  $\text{COOCH}_3$  *syn* 2*R*, 3*S*); 4,80 – 5,05 (8 H, m, H-3'a e H-3'b *anti* e *syn*); 5,05 – 5,20 (4 H, m, H-3 *anti* e *syn*); 5,50 – 5,64\* (2 H, m, H-2' *anti* ou H-2' *syn*); 5,64 – 5,80\* (2 H, m, H-2' *syn* ou H-2' *anti*); 5,83\* (1 H, s, H-5' *anti* 2*R*, 3*R* ou *anti* 2*S*, 3*S*); 5,84\* (1 H, s, H-5' *anti* 2*R*, 3*R* ou *anti* 2*S*, 3*S*); 5,86\* (1 H, s, H-5' *syn* 2*R*, 3*S*); 5,87\* (1 H, s, H-5' *syn* 2*S*, 3*R*); 7,35 – 7,43 (10 H, m, arom. *anti*); 7,44 – 7,52 (10 H, m, arom. *syn*).

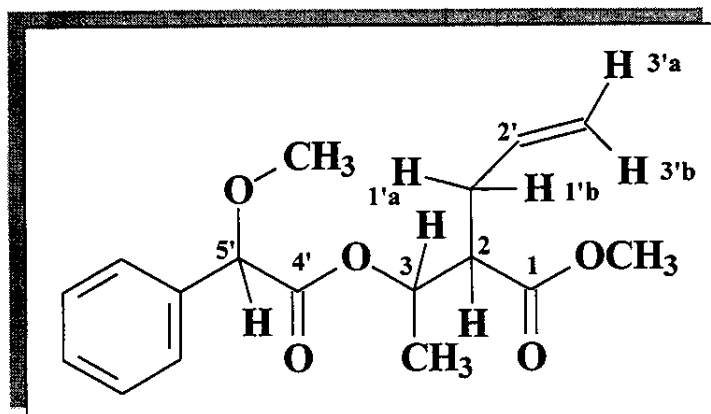
\* valores intercambiáveis.

RMN  $^{13}\text{C}$  (125,69 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta_{\text{C}}$  (Todos os sinais estão quadruplicados, foi selecionado o mais intenso para uma atribuição); 17,51 ( $\text{CH}_3$  sobre C-3); 20,66 ( $-\text{OCO}-\underline{\text{CH}_3}$ ); 37,27 (C-1'); 50,45 (C-2); 51,72 ( $-\text{OCH}_3$ ); 72,06 (C-3); 74,65 (C-5'); 117,45 (C-3'); 127,50 – 129,30 (arom.); 134,06 (C-2'); 168,01 ( $-\text{O}-\underline{\text{CO}}-\text{CH}_3$ ); 170,16 (C-4'); 172,16 (C-1).

Reação de esterificação do álcool racêmico e diastereoisomérico (mistura *anti:syn* 2:1) (**16**) com o ácido (*S*)- (+)-metoxifenil acético



À uma mistura do álcool (**16**) (0,047 g, 0,297 mmol), do ácido (*S*)- (+)-metoxilfenil acético (0,074g, 0,446 mmol) e DMAP (catalítico), em CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> seco ( 5 mL), vigorosamente agitada sob atmosfera de argônio e resfriada a 0°C, adicionou-se o DCC (0,074 g, 0,357 mmol). Neste momento formou-se um precipitado branco e o banho de gelo foi retirado e a suspensão permaneceu agitando à ta. por 12 horas. Após este período, a mistura reacional foi filtrada sobre Celite<sup>®</sup>, lavou-se o resíduo várias vezes com CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> e o solvente foi concentrado sob pressão reduzida. Purificação do produto bruto por cromatografia (“flash”) sobre sílica gel (hexano -AcOEt 15%), forneceu 0,084 g (92%) do produto esterificado.



Dados para o isômero *syn*:

**EM** *m/z* (%): 306 (M<sup>+</sup>, ausente), 148 (3), 121 (100), 105 (3), 91 (7), 77 (12), 41 (6).

Dados para o isômero *anti*:

**EM** *m/z* (%): 306 (M<sup>+</sup>, ausente), 148 (4), 121 (100), 105 (3), 91 (5), 77 (8), 41 (2).



IV (Filme)  $\nu$  ( $\text{cm}^{-1}$ ): 3080, 2986, 2951, 2829, 1743 (intenso), 1643, 1494, 1455, 1442, 1384, 1244, 1199, 1176, 1114, 1030, 996, 921, 850, 735, 699.

**RMN  $^1\text{H}$**  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta_{\text{H}}$  (integração, multiplicidade,  $J$ , atribuição parcial); 1,12 (3 H, d,  $J$  6,4 Hz,  $-\text{CH}_3$ , *syn* 2*S*, 3*R*); 1,13 (3 H, d,  $J$  6,4 Hz,  $-\text{CH}_3$ , *anti* 2*R*, 3*R*); 1,26 (3 H, d,  $J$  6,4 Hz,  $-\text{CH}_3$ , *syn* 2*R*, 3*S*); 1,29 (3 H, d,  $J$  6,3 Hz,  $-\text{CH}_3$ , *anti* 2*S*, 3*S*); 2,04 – 2,40 (8 H, m, H-1'a e H-1'); 2,50 – 2,80 (4 H, m, H-2); 3,34\* (3 H, s,  $-\text{OCH}_3$ , *anti* 2*R*, 3*R*); 3,38\* (3 H, s,  $-\text{OCH}_3$ , *anti* 2*R*, 3*S* ou 2*S*, 3*S*); 3,41\* (3 H, s,  $-\text{OCH}_3$ , *syn* 2*S*, 3*R* ou 2*R*, 3*S*); 3,42\* (3 H, s,  $-\text{OCH}_3$ , *syn* 2*S*, 3*R* ou 2*R*, 3*S*); 3,52\* (3 H, s,  $\text{COOCH}_3$  *syn* 2*S*, 3*R* ou 2*R*, 3*S*); 3,58\* (3 H, s,  $\text{COOCH}_3$  *anti* 2*R*, 3*R* ou 2*S*, 3*S*); 3,41\* (3 H, s,  $\text{COOCH}_3$  *anti* 2*R*, 3*R* ou 2*S*, 3*R*); 3,65\* (3 H, s,  $\text{COOCH}_3$  *syn* 2*S*, 3*R* ou 2*R*, 3*S*); 4,71\* (1 H, s, H-5' *anti* 2*R*, 3*R* ou 2*S*, 3*S*); 4,72\* (1 H, s, H-5' *anti* 2*R*, 3*R* ou 2*S*, 3*S*); 4,73\* (1 H, s, H-5' *syn* 2*S*, 3*R* ou 2*R*, 3*S*); 4,75\* (1 H, s, H-5' *syn* 2*S*, 3*R* ou 2*R*, 3*S*); 4,80 – 5,05 (8 H, m, H-3'a e H-3'b *anti* e *syn*); 5,07 – 5,20 (4 H, m, H-3 *anti* e *syn*); 5,48 – 5,61\* (2 H, m, H-2' *anti* ou H-2' *syn*); 5,64 – 5,74\* (2 H, m, H-2' *syn* ou H-2' *anti*); 7,30 – 7,46 (20 H, m, arom. *anti* e *syn*).

\* valores intercambiáveis.

**RMN  $^{13}\text{C}$**  (125,69 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta_{\text{C}}$  (Todos os sinais estão quadruplicados, foi selecionado o mais intenso para uma atribuição); 17,57 ( $\text{CH}_3$  sobre C-3); 32,25 (C-1'); 50,31 (C-2); 51,53 ( $-\text{COOCH}_3$ ); 57,27 ( $-\text{OCH}_3$ ); 71,30 (C-3); 82,51 (C-5'); 117,36 (C-3'); 126,94 – 128,73 (arom.); 134,20 (C-2'); 136,06 (C-6'); 169,65 (C-4'); 172,41 (C-1).

## VI.6. MONITORAMENTO DAS LINHAGENS ISOLADAS E DE LINHAGENS PURAS E AUTENTICADAS DO TERRITÓRIO NACIONAL

### VI.6.1. Avaliação da atividade biocatalítica das bactérias isoladas do solo de cana-de-açúcar

Através da técnica de enriquecimento do solo foram selecionadas 35 colônias, estas foram inoculadas assepticamente em tubos de ensaio estéreis (10 mL) contendo meio líquido (3 mL) constituído por sais minerais ( $\text{g L}^{-1}$ ):

|                                                 |       |
|-------------------------------------------------|-------|
| $\text{KH}_2\text{PO}_4$ .....                  | 2,0 g |
| $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ .....                 | 4,0 g |
| $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ .....              | 2,0 g |
| Extrato de levedura.....                        | 0,1 g |
| $\text{CaCl}_2$ .....                           | 0,1 g |
| $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ..... | 0,01g |

Preparou-se 2 soluções do *cis* e *trans* cicloexanodiol 1% e transferiu-se 0,3 mL destas soluções, previamente esterilizadas por filtração em membrana de 0,22  $\mu\text{m}$  (Millipore), para cada tubo de ensaio contendo o meio líquido e as bactérias inoculadas. Incubou-se à 28  $^{\circ}\text{C}$  em agitador rotatório (120 rpm) para promover o crescimento dos microrganismos com capacidade de metabolizar os cicloalcanóis como única fonte de carbono. As 20 culturas que apresentaram o melhor

crescimento foram avaliadas quanto ao potencial de biocatálise na presença de 3-fenil-1-ciclobutanona (**21**) pró-quiral, preparada segundo a sequência sintética descrita no Esquema 16.

Após o período de crescimento (48 h), as células bacterianas foram colhidas por centrifugação (4000 rpm) e lavadas com solução tampão ( $\text{NaHPO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$  /  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0,1 mol  $\text{L}^{-1}$  pH 7) e transferidas para tubos de ensaio contendo solução tampão ( $\text{NaHPO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$  /  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0,1 mol  $\text{L}^{-1}$  pH 7) (5 mL), ciclobutanona **21** (3 mg) e cicloexanodiol (1 mg). Incubou-se em agitador rotatório (120 rpm) a 28 °C. A reação foi monitorada a cada 6 h retirando-se alíquotas (0,5 mL), extraindo o produto da reação com AcOEt, secando sobre  $\text{NaSO}_4$  anidro e as amostras foram analisadas por CG/FID, empregando-se uma coluna capilar de sílica fundida, com a fase quiral heptakis-(2,6-dimetil-3-pentil)- $\beta$ -ciclodextrina [(25 m x 0,25 mm) x 0,25  $\mu\text{m}$ ]. As condições da análise foram: temperatura do injetor 200 °C e detector 220 °C, programação da temperatura: 100 °C – 5 min – 5 °C/min – 180 °C – 10 min e pressão na cabeça da coluna 0,6 bar.

#### VI.6.2. Avaliação do potencial biocatalítico de fungos isolados da abelha *Trigona* sp

Selecionamos as oito linhagens de fungos isoladas da abelha e já identificados na Fundação Tropical de Pesquisa e Tecnologia “André Tosello”, os microrganismos *Curvularia pallescens* CCT 5654, *Curvularia lunata* CCT 5629,

*Dreschlera halodes* CCT 5636, *Dreschlera dematioidea* CCT 5631, *Curvularia lunata* CCT 5628, *Curvularia eragrostides* CCT 5634, *Aspergillus niger* CCT 5559 e *Trichoderma sp* CCT 5551, foram crescidos em caldo nutriente (ME) por 72 horas, a 28 °C em agitador rotatório.

As reações biocatalisadas foram realizadas utilizando como substrato a 3-hexil-ciclobutanona 22 e a 3 fenil-ciclobutanona 21.

Dando continuidade ao monitoramento de microrganismos com atividade de monoxigenases utilizou-se o substrato pró-quiral, cicloexano-1,3,-diona 2,2-dissubstituída (27).

A reação biocatalítica foi realizada em erlenmeyer (125 mL) contendo solução tampão ( $\text{NaHPO}_4 \cdot 7 \text{ H}_2\text{O} / \text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0,1 mol L<sup>-1</sup> pH 7, 25 mL), células em repouso do fungo *Curvularia eragrostides* CCT 5634, previamente cultivado em caldo nutritivo de extrato de malte (ME) adicionando-se a diona 27 (20 µL).

A suspensão do microrganismo contendo a diona foi incubada a 28 °C por 24 – 60 h, sob agitação contínua. No decorrer deste período, alíquotas foram retiradas e os produtos extraídos da fase aquosa com AcOEt e analisados por CG (FID) equipado com uma coluna capilar de sílica fundida com a fase quiral heptakis-(2,6-dimetil-3-pentil)-β-ciclodextrina. As condições da análise foram: temperatura do injetor 200 °C e detector 220 °C, programação da temperatura: 80 °C – 5 min – 5 °C/min – 180 °C – 10 min e pressão na cabeça da coluna 0,6 bar.

### VI.6.3. Avaliação do potencial enzimático de linhagens puras isoladas do Território Nacional.

Todas as linhagens puras e autenticadas de microrganismos avaliados neste trabalho foram obtidos da Coleção de Culturas Tropicais (Fundação “André Tosello”). Foram selecionadas três linhagens do fungo *Cunninghamella echinulata* (CCT 4424, CCT 4259, CCT 3140) e dos fungos *Geotricum candidum* CCT 1205, *Aspergillus terreus* CCT 3320 e *Rhizopus oryzae* CCT 4964.

#### VI.6.3.1. Condições de crescimento para as culturas dos fungos

As linhagens dos fungos foram cultivados a 28 °C, em erlenmeyers (500 mL), agitados (120 rpm) em agitador rotatório em meio nutriente (100 mL) - Extrato de malte (8 g L<sup>-1</sup>) . Após 72 horas as células dos fungos filamentosos foram colhidas por filtração e lavadas duas vezes com 25 mL de solução tampão (NaHPO<sub>4</sub>.7 H<sub>2</sub>O / KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,1 mol L<sup>-1</sup> pH 7).

**VI.6.3.2. Procedimento geral para avaliação do potencial de biooxidação**

A reação enzimática da ciclobutanona 22 foi realizada em erlenmeyer (125 mL) contendo solução tampão ( $\text{NaHPO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$  /  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  pH 7, 25 mL) e células do fungo *C. echinulata* (CCT 4424, CCT 4259) (0,2 g, peso úmido) e adicionando-se uma alíquota da ciclobutanona 22 (20  $\mu\text{L}$ ). A suspensão resultante foi mantida num agitador rotatório (120 rpm) a  $28^\circ\text{C}$ . A reação foi monitorada tomando-se alíquotas (0,5 mL) em tempos periódicos, extraíndo-se com AcOET. Após secagem sobre  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anidro, as amostras foram analisadas por CG/FID, empregando-se uma coluna capilar de sílica fundida, com a fase quiral heptakis-(2,6-dimetil-3-pentil)- $\beta$ -ciclodextrina [(25 m x 0,25 mm) x 0,25  $\mu\text{m}$ ]. As condições da análise foram: temperatura do injetor  $200^\circ\text{C}$  e detector  $220^\circ\text{C}$ , programação da temperatura:  $80^\circ\text{C} - 5 \text{ min} - 5^\circ\text{C/min} - 180^\circ\text{C} - 10 \text{ min}$  e pressão na cabeça da coluna 0,6 bar.

O procedimento experimental anterior foi utilizado para avaliar as linhagens CCT 4259, CCT 3140 e os fungos *Geotricum candidum* CCT 1205, *Aspergillus terreus* CCT 3320 e *Rhizopus oryzae* CCT 4964 com a 3-fenil-ciclobutanona 21 como substrato.

## VI.7. REAÇÕES BIOCATALISADAS ÚTEIS PARA PRODUÇÃO DE BLOCOS QUIRAIS DE INTERESSE SINTÉTICO

### VI.7.1. Reduções Biocatalíticas da dicetona 29

Os microrganismos selecionados foram crescidos a 28 °C em meios apropriados conforme mostrado na Tabela 13:

Tabela 13: Microrganismos selecionados para as reações de biocatálise da dicetona 29\*.

| Microrganismos                            | tempo de incubação<br>(h) | meio de<br>cultura |
|-------------------------------------------|---------------------------|--------------------|
| <i>Rhodotorula glutinis</i> CCT 2182      | 48                        | YMA                |
| <i>Cunninghamella echinulata</i> CCT 4259 | 60                        | MA                 |
| <i>Aspergillus terreus</i> CCT 3320       | 60                        | MA                 |
| <i>Serratia rubidaea</i> CCT 5732         | 48                        | NA                 |

As células da levedura *R. glutinis* CCT 2182 e da bactéria *S. rubidaea* CCT 5732 foram colhidas por centrifugação e as dos fungos *C. echinulata* CCT 4259, *A. terreus* CCT 3320 por filtração e lavadas com solução tampão ( $\text{NaHPO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$  /  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0,1 mol L<sup>-1</sup> pH 7, 25 mL).

\* Compostos sintetizados e caracterizados por Valéria B. Riatto sob orientação do Prof. Dr Ronaldo A. Pilli.

A biorredução da dicetona **29** foi realizada em erlenmeyer (125 mL) com solução tampão ( $\text{NaHPO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$  /  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  pH 7, 25 mL), células íntegras dos microrganismos previamente lavadas (*ca.* 0,4-0,6 g, peso úmido) e 20  $\mu\text{L}$  do composto **29**. A suspensão resultante foi mantida em agitador rotatório à 28 °C e a reação foi monitorada por CG/FID equipada com a coluna capilar de sílica fundida com a fase quiral heptakis-(2,6-dimetil-3-pentil)- $\beta$ -ciclodextrina. As condições da análise foram: temperatura do injetor 200 °C e detector 220 °C, programação da temperatura: 70 °C – 20 min – 5 °C/min – 180 °C – 5 min e pressão na cabeça da coluna 0,6 bar.

#### VI.7.1.1. Condições experimentais para selecionar células de *Serratia rubidaea* CCT 5732 na presença do álcool racêmico \* **29a**

Foi retirado uma pequena porção da colônia bacteriana e transferida assepticamente com auxílio da alça de semeadura para erlenmeyer (250 mL) contendo caldo nutriente -NB (100 mL), adicionou-se 1  $\mu\text{L}$  do álcool racêmico **29a** e incubou-se à 28 °C em agitador rotatório (120 rpm) por 24 horas, as células foram colhidas por centrifugação, lavadas com solução tampão ( $\text{NaHPO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$  /  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  pH 7, 25 mL). A biomassa resultante foi inoculada em um novo meio (100 mL) e 5  $\mu\text{L}$  do álcool racêmico adicionado, a suspensão foi então incubada a



28 °C por 24 horas, sob agitação contínua, centrifugada e as células lavadas com solução tampão fosfato.

Este procedimento foi repetido mais uma vez e a reação de biotransformação realizada com a biomassa resultante (ca. 0,6 g, peso úmido), em uma solução tampão ( $\text{NaHPO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$  /  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0,1 mol L<sup>-1</sup> pH 7, 25 mL) e adicionou-se a dicetona **29** (20 µL) e incubou-se à 28 °C por 72 horas, sob agitação contínua (120rpm). No decorrer deste período, alíquotas da reação (0,5 mL) foram colhidas e o produto extraído da fase aquosa com AcOEt e analisadas por CG/FID com coluna quiral, utilizando-se a programação do item VI.7.

#### VI.7.2. Redução Microbial Assimétrica dos $\beta$ -cetoésteres **13** e **15**

Tabela 14: Microrganismos testados para redução microbiana dos  $\beta$ -cetoésteres **13** e **15**.

| Microrganismos                                | tempo de incubação (h) | meio de cultura |
|-----------------------------------------------|------------------------|-----------------|
| <i>Rhodotorula glutinis</i> CCT 2182          | 48                     | YMA             |
| <i>Cunninghamella echinulata</i> CCT 4259     | 60                     | ME              |
| <i>Aspergillus niger</i> CCT 6252; 5560; 5559 | 60                     | ME              |
| <i>Serratia rubidaea</i> CCT 5732             | 48                     | NB              |
| <i>Curvularia lunata</i> CCT 5634             | 72                     | ME              |

Os microrganismos listados na Tabela 14 foram cultivados nos meios de culturas e tempos adequados e as reações de biocatálise promovidas adicionando-se os  $\beta$ -cetoésteres **13** e **15** (20  $\mu$ L) à uma solução tampão ( $\text{NaHPO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$  /  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0,1 mol  $\text{L}^{-1}$  pH 7, 25 mL), contendo células em repouso das linhagens em estudo previamente lavadas. As suspensões resultantes foram incubadas à 28 °C por 48-72 horas, sob agitação contínua (120 rpm).

As reações foram monitoradas a cada 6 horas retirando-se alíquotas (0,5 mL), extraíndo os produtos da reações com AcOEt, analisadas por CG/FID com coluna quiral e as condições da análise foram: temperatura do injetor 200 °C e detector 220 °C, programação da temperatura: 80 °C – 5 min – 5 °C/min – 180 °C – 5 min e pressão na cabeça da coluna 0,6 bar.

## **VI.8. IMOBILIZAÇÃO DA *Serratia rubidaea* CCT 5732 EM ÓXIDO MISTO SÍLICA-TITÂNIA ( $\text{SiO}_2/\text{TiO}_2$ )**

### **VI.8.1. Síntese do Óxido binário Sílica – Titânia ( $\text{SiO}_2/\text{TiO}_2$ ) [98]**

O óxido binário  $\text{SiO}_2/\text{TiO}_2$  foi preparado adicionando-se uma solução de  $\text{HNO}_3$  (12,1 mL, 0,85 mol  $\text{L}^{-1}$ ) em uma solução de EtOH (123 mL) e de TEOS (123 mL). Deixou-se sob refluxo e agitação por 2,5 h a temperatura de 80 °C. Adicionou-se etanol (487 mL) e TBOT (34 mL). A mistura permaneceu agitando por 2 h

subsequentes a temperatura ambiente e uma solução de  $\text{HNO}_3$  (66,4, 0,6 mol  $\text{L}^{-1}$ ) foram adicionados lentamente. O produto foi deixado em repouso para gelificar. O gel formado foi quebrado e colocado em estufa a 110 °C por 24 h. A seguir, o produto foi triturado e peneirado em peneira de 250 – 75  $\mu\text{m}$ , permitindo que partículas com diâmetros entre 250 – 75  $\mu\text{m}$  fossem selecionadas.

O óxido binário de  $\text{SiO}_2/\text{TiO}_2$  foi lavado com solução aquosa de ácido nítrico (1 mol  $\text{L}^{-1}$ ), com água bidestilada e seco na estufa a 60 °C por 24 h. O excesso de água foi retirado na linha de vácuo ( $10^{-5}$  torr). Para eliminação da matéria orgânica, a matriz foi calcinada a 500 °C com fluxo de ar.

#### VI.8.2. Condições de crescimento para *Serratia rubidaea* CCT 5732

A linhagem do microrganismo avaliado foi obtido da Coleção de Culturas Tropicais (Fundação “André Tosello”). A inoculação foi realizada pela transferência do inóculo com alça de platina para o meio nutriente líquido adequado (100 mL) em erlenmeyer (500 mL) e mantido em agitador rotatório (120 rpm) à 28°C por 72 horas. As células bacterianas foram colhidas por centrifugação (4000 rpm) e lavadas duas vezes com 25 mL de solução tampão ( $\text{NaHPO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$  /  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0,1 mol  $\text{L}^{-1}$  pH 7) estéril.

### **VI.8.3. Protocolo para imobilização da *Serratia rubidaea* CCT 5732 na matriz sílica-titânia ( $\text{SiO}_2/\text{TiO}_2$ )**

A imobilização da bactéria foi realizada em enlenmeyer (250 mL) contendo água destilada estéril (50 mL), células íntegras do microrganismo previamente lavadas (ca. 1,2 g, peso úmido) e a matriz Sílica – Titânia (0,6g) esterilizada. A suspensão resultante foi agitada a 120 rpm, mantendo-se a temperatura em 28 °C. Após 12 horas o sólido foi filtrado.

Uma parte do material imobilizado foi estocado em recipientes estéreis sob refrigeração para testar sua estabilidade e verificar a manutenção da sua atividade biocatalítica após períodos de estocagem (1 semana, 1 mês e 2 meses).

### **VI.8.4. Preparo das amostras para microscopia eletrônica de varredura (MEV)**

Após a adsorção da bactéria no óxido binário, o material foi colocado em presença de uma solução tampão ( $\text{NaHPO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O} / \text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0,1 mol  $\text{L}^{-1}$  pH 7) contendo 2,5 % de glutaraldeído por 24 h. Após este período a solução sobrenadante foi descartada e o material foi lavado três vezes com soluções etanólicas de 30%, 50 %, 70 %, 90 % e 100% consecutivamente. O mesmo procedimento foi realizado com as células bacterianas não imobilizadas.

O material permaneceu em etanol absoluto e posteriormente foi realizado o ponto crítico, num equipamento Balzers CPD-030, utilizando CO<sub>2</sub> líquido à alta pressão.

#### **VI.8.5. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)**

As amostras para micrografia foram colocadas sobre a superfície de uma fita dupla face aderida aos portas amostras de alumínio. Em uma segunda etapa foi depositada sobre as amostras para análise de emissão de Raios – X via microsonda de EDS uma camada de substância condutora, para as micrografias da matriz foi depositada uma camada fina de carbono e para as micrografias das células bacteriana livres e imobilizadas depositou-se uma camada fina de ouro, através de um metalizador Balzer, modelo MED 020.

As micrografias foram realizadas em um microscópio “JEOL JSM T-300”, equipado de microsonda com detector de energia dispersiva (EDS) “TRACOR” da Northen. A tensão de aceleração utilizada para as amostras biológicas foi de 15 KeV e para a matriz inorgânica foi de 20 KeV.

#### **VI.8.6. Redução biocatalítica do $\beta$ - cetoéster 15 com células de *Serratia rubidaea* CCT 5732 imobilizada**

A redução enzimática do  $\beta$ - cetoéster 15 foi realizada em erlenmeyer (125 mL) contendo solução tampão ( $\text{NaHPO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$  /  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  pH 7, 25 mL) e células do microrganismo imobilizado (1,5 g, peso úmido) e adicionando-se uma alíquota do  $\beta$ -cetoéster (20  $\mu\text{L}$ ). A suspensão resultante foi mantida num agitador rotatório (120 rpm) a  $28^\circ\text{C}$ . A reação foi monitorada tomando-se alíquotas (0,5 mL) em tempos periódicos, extraindo-se com AcOET. Após secagem sobre  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anidro, as amostras foram analisadas por CG/FID, empregando-se uma coluna capilar de sílica fundida, com a fase quiral heptakis-(2,6-dimetil-3-pentil)- $\beta$ -ciclodextrina [(25 m x 0,25 mm) x 0,25  $\mu\text{m}$ ]. As condições da análise foram: temperatura do injetor e detector  $200^\circ\text{C}$ , programação da temperatura:  $80^\circ\text{C} - 5 \text{ min} - 5^\circ\text{C/min} - 180^\circ\text{C} - 10 \text{ min}$  e pressão na cabeça da coluna 0,6 bar.

#### **VI.8.7. Tentativa de imobilização da *Serratia rubidaea* em sílica gel ( $\text{SiO}_2$ ) e óxido misto de Sílica – Zircônia ( $\text{SiO}_2/\text{ZrO}_2$ )**

A tentativa de imobilização da bactéria nestes suportes foi realizada em erlenmeyers (250 mL) dispostos em agitador rotatório (120 rpm). Aos frascos

contendo água destilada estéril (50 mL) e células íntegras da bactéria previamente cultivadas (ca 1,2 g, peso úmido) conforme descrito no item VI.8.2., adicionou-se os suportes sílica gel ( $\text{SiO}_2$ ) e óxido misto de Sílica – Zircônia ( $\text{SiO}_2/\text{ZrO}_2$ ) (0,6 g para ambos). A suspensão foi agitada (120 rpm), mantendo-se a temperatura em 30 °C.

### **VI.9. TENTATIVA DE IMOBILIZAÇÃO DOS FUNGOS *Aspergillus terreus* CCT 3320 E *Rhizopus oryzae* CCT 4964 NA MATRIZ SÍLICA – TITÂNIA ( $\text{SiO}_2/\text{TiO}_2$ )**

#### **VI.9.1. Condições de crescimento para as culturas dos microrganismos**

Ambas as linhagens dos fungos avaliados foram cultivados a 28 °C, em erlenmeyers (500 mL), agitados (120 rpm) em agitador rotatório, em meio nutriente e tempos adequados:

*A. terreus* CCT e *R. oryzae* CCT (60 h) - Extrato de malte (8 g L<sup>-1</sup>). As células dos fungos filamentosos foram colhidas por filtração e lavadas duas vezes com 25 mL de solução tampão ( $\text{NaHPO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$  /  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0,1 mol L<sup>-1</sup> pH 7).

As células íntegras dos microrganismos previamente lavadas (ca. 1,2 g, peso úmido) foram agitadas na presença da matriz suporte de maneira similar ao protocolo de imobilização para *Serratia rubidaea* CCT 5732 . Posterior análise do

material obtido por microscopia eletrônica de varredura demonstrou a não imobilização das linhagens dos fungos em estudo.



---

## ***Referências Bibliográficas***

---

**REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

1. Teich, M; Needham, D. M., *A Documentary History of Biochemistry*, Leicester University Press, 1992.
2. Pasteur, L. C. R, *Hebd. Seances Acad. Sci*, **1862**, 55, 28.
3. Csuk, R.; Glänzer, B. I., *Chem. Rev.*, **1991**, 91, 49.
4. McCoy, M., *Chem. Eng. News*, 4, **1999**, 10.
5. Feng, J. M.; Lin, C. H.; Bradshaw, C. W.; Wong, C. H., *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, **1995**, 967.
6. Mori, K., *Synlett*, **1995**, 1097.
7. Roberts, S. M., *J. Chem. Soc. Perkin Trans 1*, **1998**, 157.
8. Johnson, C. R., *Acc. Chem. Res.*, **1998**, 31, 333.
9. Stinson, S. C., *Chem. Eng. News*, **1992**, 28, 46.
10. Sheldon, R. A., *Chirechnology*, Marcel Dekler, New York, **1993**.
11. Collins, A. N.; Sheldrake, G. N.; Crosby, J. C. (Eds.), *Chirality in Industry*, Wiley, Chichester, vol. I **1992** e vol. II **1997**.
12. Stinson, S. C., *Chem. Eng. News*, **1998**, 21, 83.
13. Patel, R. N., *Advances in Applied Microbiology*, v. 43, Academic Press, Inc. **1997**.
14. Roberts, S. M., *J. Chem.Soc., Perkin Trans.1*, **1999**, 1.
15. Enzymes Business, Michael Barber and Associates, March, **1998**.

16. Wong, C. H.; Whitesides, G. M., "Enzymes in Synthetic Organic Chemistry", Tetrahedron Organic Chemistry Series, v. 12 Pergamon, Elsevier Science, New York, 1994.
17. Lehninger, A. L.; Nelson, D. L.; Cox, M. M., *Princípios de Bioquímica*, 2<sup>o</sup> ed., Sarvier, São Paulo, 1995.
18. Voet, D.; Voet, J. G., *Biochemistry*, John Wiley & Sons, New York, 1995.
19. Ward, O. P.; Young, C. S., *Enzyme Microb. Technol.*, 1990, 12, 482.
20. Hummel, W.; Kula, M. R., *Eur. J. Biochem.*, 1989, 184, 1.
21. Holland, H. L., *Organic Synthesis with Oxidative Enzymes*, Uerlag Chemie, Weinheim, 1992.
22. Dawson, J. H., *Sciense*, 1988, 240, 433.
23. Strukul, G., *Angew. Chem. Int. Ed.*, 1998, 37, 1199.
24. Alphand, V.; Furstoss, R.; Pedragosa-Moreau, S.; Roberts, S. M.; Willetts, A. J., *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, 1996, 1867.
25. Gagnon, R.; Grogan, G.; Groussain, E.; Pedrgosa-Moreau, S.; Richardson, P. F.; Roberts, S. M.; Willetts, A. J.; Alphand, V.; Lebreton, J.; Furstoss, R., *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, 1995, 2527.
26. Alphand, V.; Furstoss, R., *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 2000, 9, 209.
27. Stewart, J. D., *Current Organic Chemistry*, 1998, 2, 195.
28. Alphand, V.; Furstoss, R., *J. Org. Chem.*, 1998, 57, 1306.
29. Schilingloff, C. B., *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, 1995, 1247.

30. Walsh, C. T.; Chen, Y-C. J., *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1988**, 27, 333.
31. Glagnon, R.; Grogan, G.; Levitt, M. S.; Roberts, I. M.; Wan, P. W. H.; Willetts, A. J., *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I*, **1994**, 2537.
32. Petit, F.; Furstoss, R., *Tetrahedron: Asymmetry*, **1993**, 4, 1341.
33. Taschner, M. J.; Black, D. J.; Chen, Q-Z., *Tetrahedron: Asymmetry*, **1993**, 4, 1387.
34. Adam, W.; Groer, P.; Saha-Möller, C. R., *Tetrahedron: Asymmetry*, **2000**, 11, 2239.
35. Alphand, V.; Mazzini, C.; Lebreton, J.; Furstoss, R., *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, **1998**, 5, 219.
36. Mazzini, C.; Lebreton, J.; Furstoss, R., *Heterocycles*, **1997**, 45, 1161.
- 36a. Kelly, D. R., *Tetrahedron: Asymmetry*, **1996**, 7, 1149.
37. Canhos, V. P., *Views of Developing Country in: The Biodiversity of Microorganisms and the Role of Microbial Resource Centers*, Eds. B. Kirsop & D. L. Hawksworth, Wod Federation of Culture Collections, **1994**.
38. Roberts, S. M.; Turner, J. N.; Willetts, A. J.; Tuner, M. K., *Introduction to Biocatalysis*, Cambridge University Press, London, **1995**.
39. Roberts, S. M.; Wan, P. W. H., *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, **1998**, 4, 111.
40. Trudgill, P. W.; Gibson, T. (Ed), *Microbial Degradation of Organic Compounds*, Marcel Dekker, New York, **1984**.

41. Brock, T. D.; Madigan, M. T., *Biology of Microorganisms*, Sixth edition, Prentice Hall, New Jersey, **1991**.
42. Pelczar, Jr.; Chan, E. C. S.; Reid, R., *Microbiology*, fifth edition, MacGraw-Hill Book Company, **1986**.
43. Bailey, W. R. & Scott, E. G., *Diagnostic Microbiology*, The CV Mosby Company, ST Louis, **1962**.
44. Oliveira, C. M. A.; Porto, A. L. M.; Marsaioli, A. J., *Tetrahedron Lett.*, **1996**, 37, 6424.
45. André L. M. Porto; Anita J. Marsaioli, *Dissertação de Mestrado*, IQ/UNICAMP, **1997**.
46. Allen, K.; Sammers, D. Jr, *Diagnóstico microbiológico*, Texto e Atlas Colorido, 2º ed., Editora Medica Panamericana, São Paulo, **1993**.
47. Vogel, *Textbook of Pratical Organic Chemistry*, 5<sup>th</sup> ed., Harlow, Edingburg gate, London, **1996**.
- 47a. Sadtler Research Laboratories Inc., *Sadtler NMR Espectros*, 6085 e 6423.
- 47b. Perlin, A. S.; Koch, H. J., *Canadian Journal of Chemistry*, **1970**, 48, 2639.
48. Araújo, A. C. V.; Almeida, F. V.; Bieber, L. W., *Química Nova*, **1996**, 19, 79.
- 48a. Coletivo de autores; *Organicum*, Fund. Caloustre Gulbenkian, Lisboa, **1975**, 621.
- 48b. Leuchs, H.; Heller, A.; Hoffmann, A.; *Ber. dtsh. Chem. Ges.*, **1929**, 62, 871.

50. Allenmark, S. G., *Chromatographic Enantioseparations Methods and Applications*, 2<sup>a</sup> ed., Prentice Hall, New Jersey, **1991**.
51. Eliel, E. L., *Stereochemistry of Organic Compounds*, John Wiley, New York, **1994**.
52. Latypov, S. K.; Galiullina, N. F.; Aganov, A. V.; Kataev, V. E.; Riguera, R., *Tetrahedron*, **2001**, 57, 2231.
53. Barrelle, M.; Hamman, S., *J. Chem. Res. (M)*, **1995**, 1933.
54. Heumann, A.; Ortiz, A., *Tetrahedron: Asymmetry*, **1995**, 6, 1073.
55. Alexakis, A.; Frutos, J. C.; Mutti, S.; Mangeny, P., *J. Org. Chem.*, **1994**, 59, 3326.
56. Bredikhin, A. A.; Strunskaya, E. I.; Azancheev, N. M.; Bredikhin, Z.A., *Russ. Chem. Bull.*, **1998**, 47, 174.
57. Bredikhin, A. A.; Bredikhin, Z.A.; Nigmatzyanov, F. F., *Russ. Chem. Bull.*, **1998**, 47, 411.
58. Peng, J.; Odom, J. D.; Dunlap, R. B.; Silks, L. A., *Tetrahedron: Asymmetry*, **1994**, 5, 1627.
59. Peng, J.; Barr, M. E.; Asbburn, D. A.; Lebioda, L.; Garber, A. R.; Martinez, R. A.; Odom, J. D.; Dunlap, R. B.; Silks, L. A., *J. Org. Chem.*, **1995**, 60, 5540.
60. Parker, D., *Chem. Rev.*, **1991**, 91, 1441.
61. Omefanczuk, J.; Mikolajczk, N., *Tetrahedron: Asymmetry*, **1996**, 7, 2687.

62. (A) Chataigner, I.; Lebreton, J.; Duvand, D.; Guingant, A.; Villieras, J., *Tetrahedron Lett.*, **1998**, 39, 1759. (B) Corey, E. J.; Hopkins, P. B.; Yoo, S. K. S.; Nambiar, K. P.; Falck, J. R., *Journal of the American Chemical Society*, **1979**, 101, 7131. (C) Trost, B. M.; Belletirre, J. L.; Godleski, S.; McDougal, P. G.; Balkovec, J. M., *J. Org. Chem.*, **1986**, 51, 2370. (D) Smith, A. B.; Konopelski, J. P., *J. Org. Chem.*, **1984**, 49, 4094.
63. Chen, L. Y.; Ghosez, L., *Tetrahedron Asymmetry*, **1991**, 2, 1181.
- 63a. Greene, A. E.; Lansard, J. P.; Luche, J. L.; Petrier, C., *J. Org. Chem.*, **1983**, 48, 4763.
- 63b. Hassner, A.; Dillon, J. L., *J. Org. Chem.*, **1983**, 48, 3382.
64. Brady, W. T., *Tetrahedron*, **1981**, 37, 2949.
65. Brady, W. T., *Synthesis*, **1971**, 8, 415.
66. Mehta, G.; Rao, H. S. P., *Synthetic Communications*, **1985**, 15, 991.
67. Krow, G. R., *Tetrahedron*, **1981**, 37, 2697.
68. Krow, G. R., *Org. React.*, **1993**, 43, 251.
69. Hawthorne, M. F.; Emmons, W. D.; McCallum, K. S., *J. Am. Chem. Soc.*, **1958**, 80, 6393.
70. Plesnicar, B., *Oxidation in Organic Chemistry*, Academic Press, New York, **1978**.
71. Waring, A. J., *Comprehensive Organic Chemistry*, Pergamon Press, Oxford, **1979**.
72. Sauers, R. R.; Ahearn, G. P., *J. Am. Chem. Soc.*, **1961**, 83, 2759.

73. Chandrasekhar, S.; Roy, C. D., *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2*, **1994**, 2141.
74. Furstoss, R.; Lebreton, J.; Alphand, V.; Mazzini, *J. Org. Chem.*, **1997**, 62, 5215.
75. Gelson J. A. Conceição; Anita J. Marsaioli, *Tese de Doutorado*, IQ/UNICAMP, **2000**.
76. Chamberlin, A. R.; Koch, S. S. C., *J. Org. Chem.*, **1993**, 58, 2725.
77. de Jong, J. C.; van Bolhuis, F.; Feringa, B. L., *Tetrahedron: Asymmetry*, **1991**, 2, 1247.
78. Petter, A.; Ward, S. R.; Jones, M. D.; Maddicks, P., *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, **1993**, 2621.
79. Alphand, V.; Mazzini, C.; Lebreton, J.; Furstoss, R., *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, **1999**, 5, 219.
80. Mazzini, C.; Lebreton, J.; Alphand, V.; Furstoss, R., *J. Org. Chem.*, **1997**, 62, 3382.
- 80a. Honda, T.; Kimura, N.; Sato, S.; Kato, D.; Tominaga, H., *J. Chem. Soc., Perkin Trans.*, **1994**, 1, 1043.
- 80b. Fronza, G.; Fuganti, C.; Mendoza, M.; Rigoni, R.; Servi, S.; Zucchi, G., *Pure & Appl. Chem.*, **1996**, 68, 2065.
81. Nakamura, K.; Matsuda, T., *J. Org. Chem.*, **1998**, 63, 8957.
82. Matsuda, T.; Harada, T.; Nakajima, N.; Nakamura, K., *Tetrahedron Letters*, **2000**, 41, 4135.



83. Chartrain, M.; Greasham, R.; Moore, J.; Reider, P.; Robinson, D.; Buckland, B., *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, **2001**, 11, 503.
84. Prelog, V., *Pure Appl. Chem.*, **1964**, 9, 119.
85. Faber, K., *Pure Appl. Chem.*, **1997**, 69, 1613.
86. Stecher, H.; Faber, K., *Synthesis*, **1997**, 1.
87. Schmuff, N. R.; Phillips, J. R.; Burkholder, W. E.; Fales, H
88. Kodama, H.; Ono, M.; Kohno, M; Ohnishi, A., *J. Chem. Ecol.*, **1987**, 13, 1871.
89. Servi, S., *Synthesis*, **1990**, 1.
90. Jian-Xin, G.; Zu-Yi, L.; Guo-Qiang, L., *Tetrahedron*, **1993**, 49, 5805.
91. Molinari, F.; Gandolfi, R.; Villa, R.; Occhiato, E. G., *Tetrahedron: Asymmetry*, **1999**, 10, 3515.
92. Strauss, U. T.; Felfer, U.; Faber, K., *Tetrahedron Asymmetry*, **1999**, 10, 107.
93. Quintana, M. G.; Dalton, H., *Enzyme and Microbial Technology*, **1999**, 24, 232.
94. Salter, G. J.; Kell, D. B., *Current Opinion in Biotechnology*, **1991**, 2, 385.
95. Bieckerstaff, G. F., *Immobilization of Enzymes and Cells*, Humana Press, Totowa, New Jersey, **1997**.
96. Andreeva, L. S.; Zakanin, A. I.; Barannik, G. B.; Simakov, A. V.; Kirchanov, A. A., *React. Kinet. Catal. Lett.*, **1997**, 60, 373.
97. Gonçalves, J. E.; Gushikem, Y.; Castro, S. C., *J. Non-Crystall. Solids*, **1999**, 260, 125.

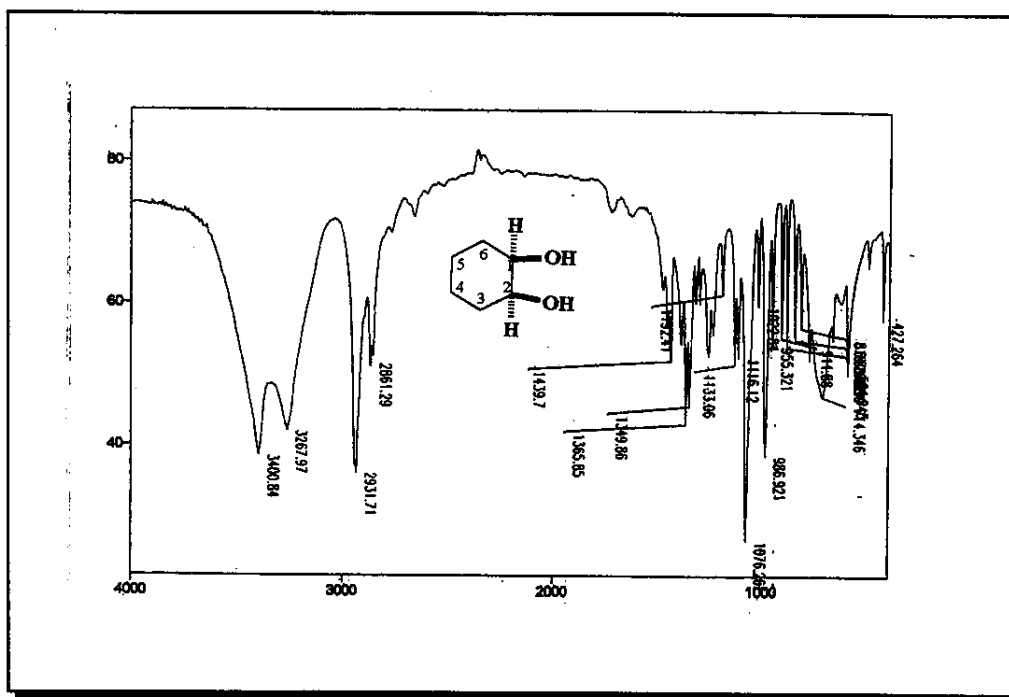
98. Gonçalves, J. E.; Gushikem, Y., *Tese de Doutorado*, IQ/UNICAMP, 2000.
99. Toldra, F.; Lequerica, J. L., *Scanning electron microscopy*, 1991, 35, 739.
100. Collins, C. H.; Lyne, P. M.; Grange, J. M., *Collins and Lyne's Microbiological Methods*, 6<sup>th</sup> ed., Butterworth, Heinemann, 1989.
101. Gerhardt, P.; Murray, R. G. E.; Costilow, R. N.; Nester, E. W.; Wood, W. A.; Krieg, N. R.; Phillips, G. B., *Manual of Methods for General Bacteriology*, 3<sup>rd</sup> ed., American Society for Microbiology, 1984.
102. Ribeiro, M. C.; Soares, M. M. S. R., *Microbiologia Prática: Roteiro e Manual, Bactérias e Fungos*, Atheneu, São Paulo, 1993.
103. Borchert, A.; Buchholz, K., *Biotechnol. Bioeng.*, 1984, 26, 727.
104. Dennis, K. E.; Clark, D. S.; Bailey, J. E.; Cho, Y. K.; Park, Y. H., *Biotechnol. Bioeng.*, 1984, 26, 892.
105. Perrin, D. D.; Armarego, W. L., *Purification of Laboratory Chemicals*, 3 ed, Pergamon, New York, 1988.
106. *J. Chem. Soc., Perkin Trans*, (1983), 2, 83.
107. Koch, A. L., *Manual of Methods for General Bacteriology*, American Society for Microbiology, Washington DC, 1981.
108. Hungria, M.; Araujo, R., *Manual de Métodos Empregados em Estudos de Microbiologia Agrícola*, EMBRAPA, Brasília, 1995.
109. Macfaddin, J. F., *Biochemical Tests for Identification of Medical Bacteria*, Second edition, Willians & Wilkins, London, 1980.

110. Longobardo, L.; Mobbili, G.; Tagliavini, E.; Trombini, C.; Ronchi, V. A., *Tetrahedron*, **1992**, 48, 1299.
111. Burghardet, H; Schimz, K.L.; Muller, M.; *Febs Lett.*, **1998**, 425, 40.
112. Ager, D. J.; Prakash, I.; Schaad, D. R.; *Aldrichimica Acta*, **1997**, 30, 3.
113. Faber, K., *Biotransformation in Organic Chemistry*, Springer-Verlag, Berlin, **1995**.
114. Kitamura, M.; Tokunaga, M.; Noyori, R., *Tetrahedron*, **1993**, 49, 1853.

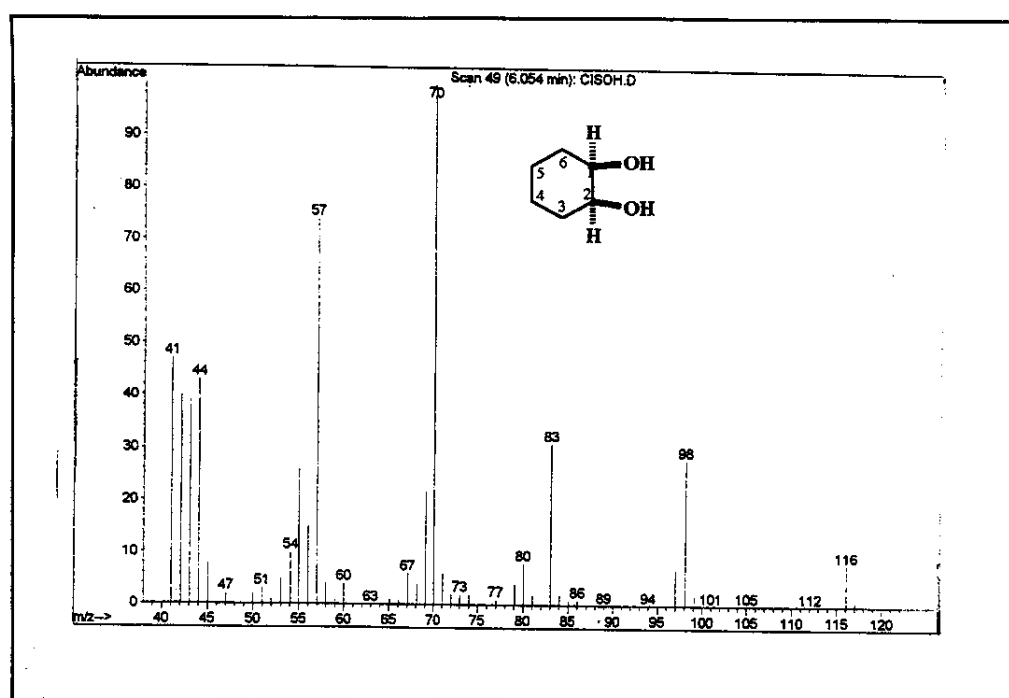
---

## ***Apêndice - Espectros***

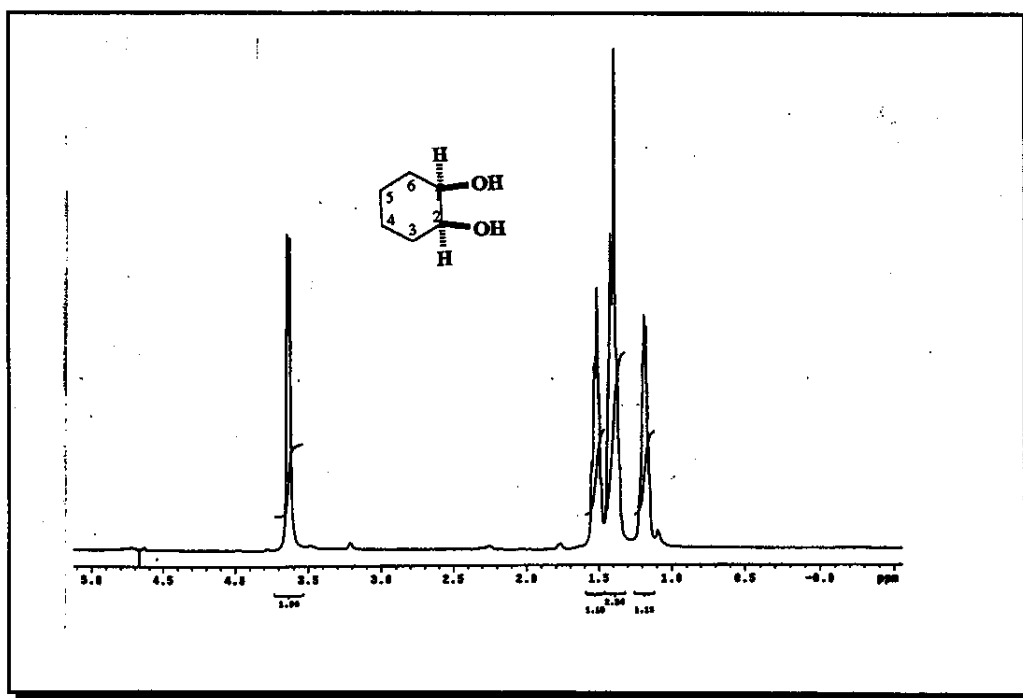
---



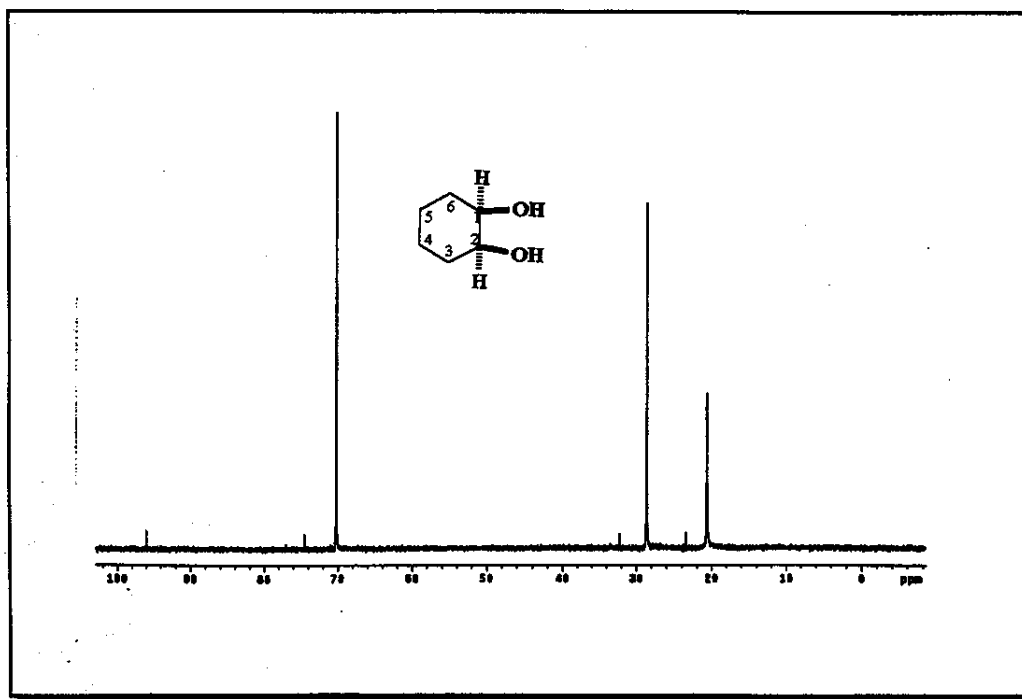
E01 – Espectro na região do infravermelho (pastilha de KBr), do *cis*-cicloexano-1,2-diol (**10**).



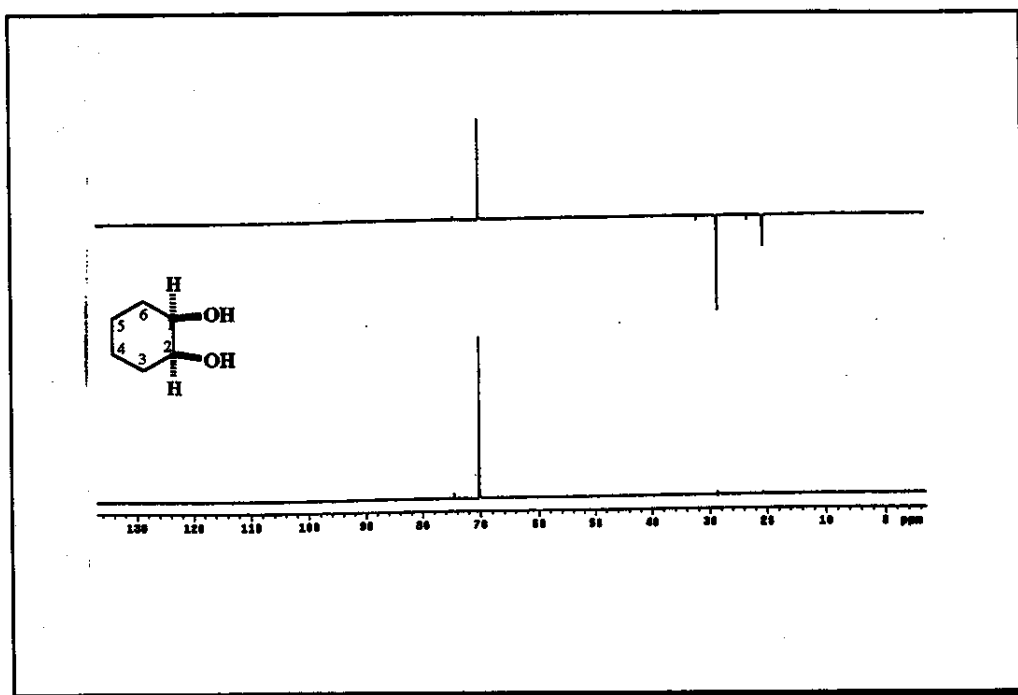
E02 – Espectro de massas (IE, 70 eV), do *cis*-cicloexano-1,2-diol (**10**).



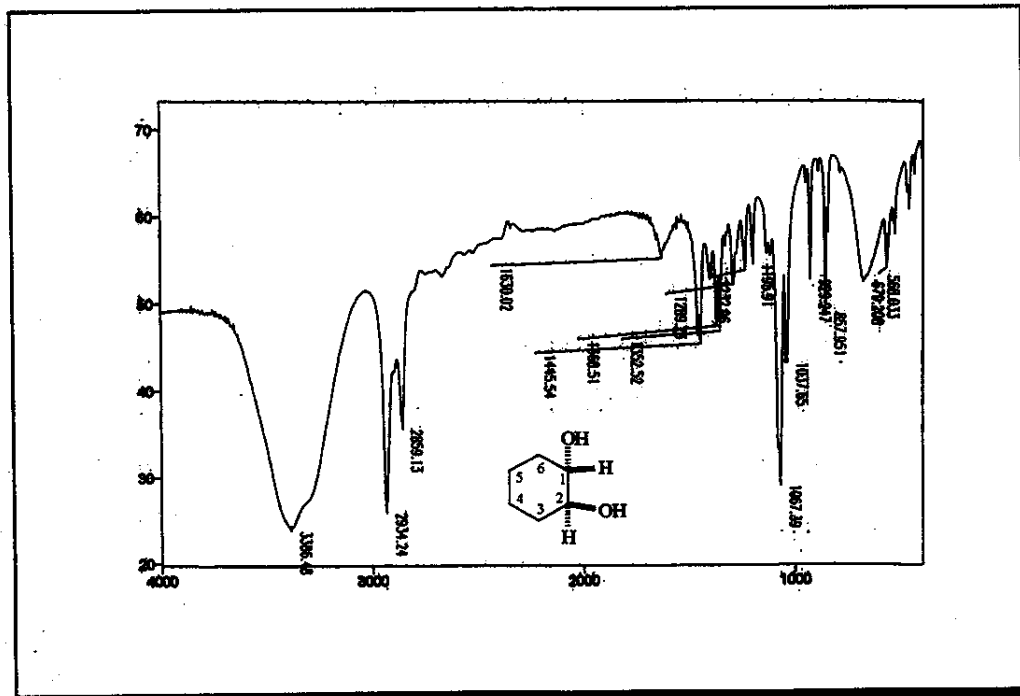
**E03** – Espectro de RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ , referência interna de capilar de  $\text{CCl}_4/\text{TMS}$ ), do *cis*-cicloexano-1,2-diol (**10**).



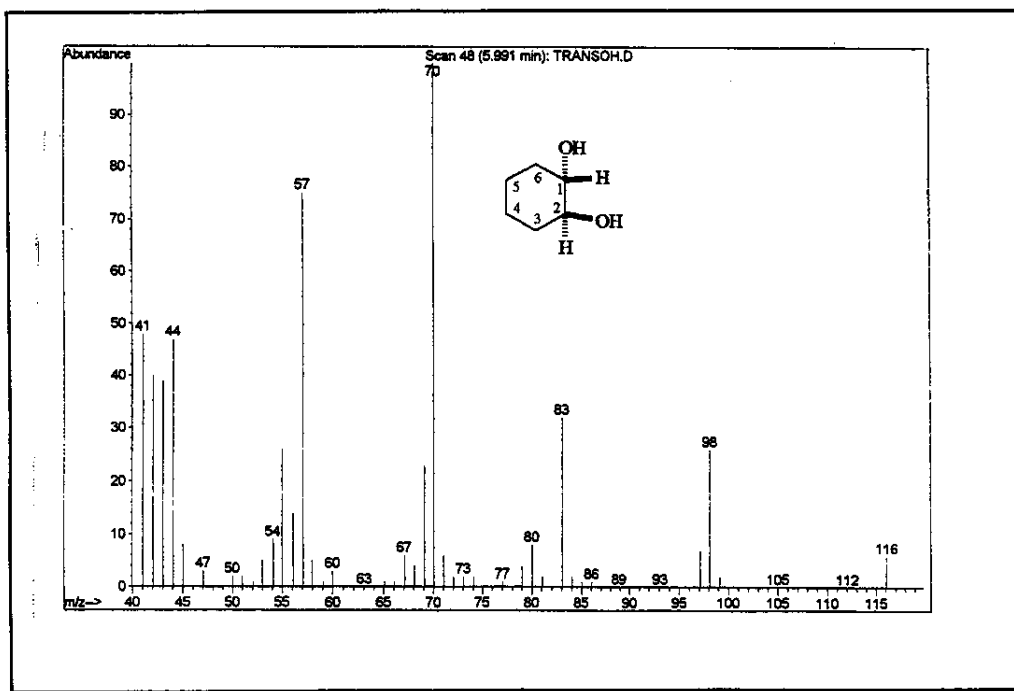
**E04** – Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (125,69 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ , referência interna de capilar de  $\text{CCl}_4/\text{TMS}$ ), do *cis*-cicloexano-1,2-diol (**10**).



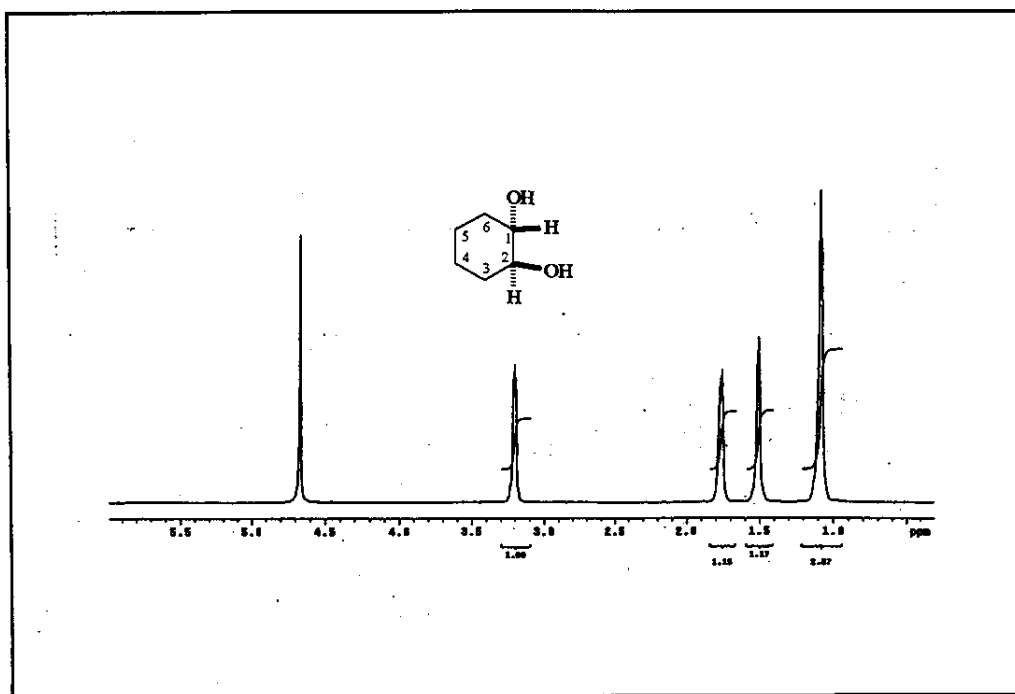
**E05** – Espectro de DEPT 90 e 135 (125,69 MHz, D<sub>2</sub>O, referência interna de capilar de CCl<sub>4</sub>/TMS) do *cis*-cicloexano-1,2-diol (**10**).



**E06** – Espectro na região do infravermelho (pastilha de KBr), do *trans*-cicloexano-1,2-diol (**11**).

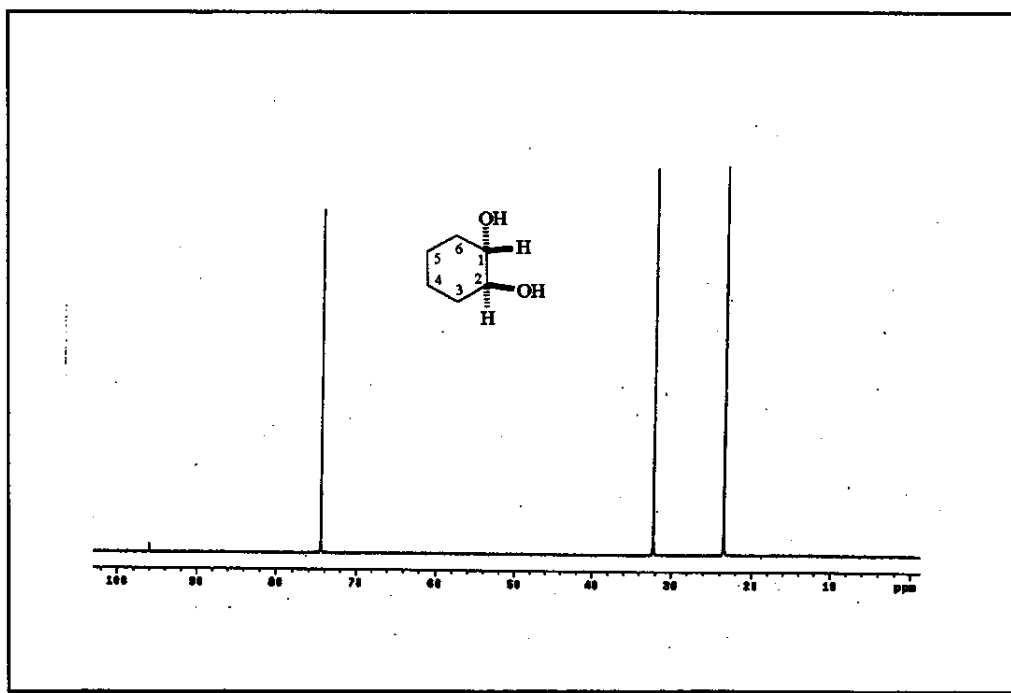


E07 – Espectro de massas (IE, 70 eV), do *trans*-cicloexano-1,2-diol (**11**).

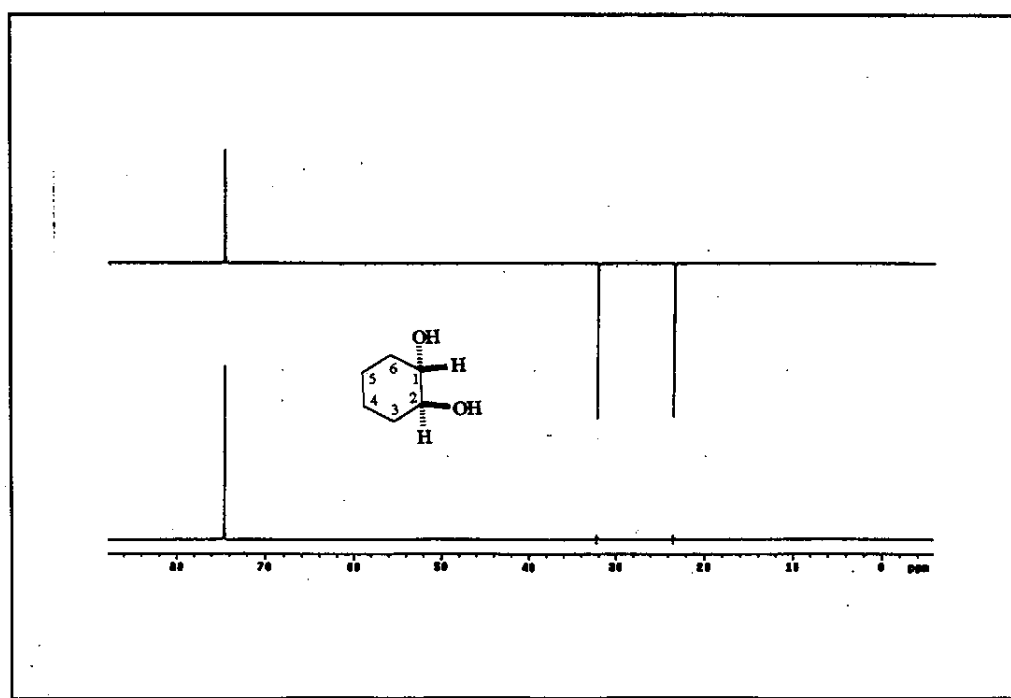


E08 – Espectro de RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ , referência interna de capilar de  $\text{CCl}_4/\text{TMS}$ ), do *trans*-cicloexano-1,2-diol (**11**).

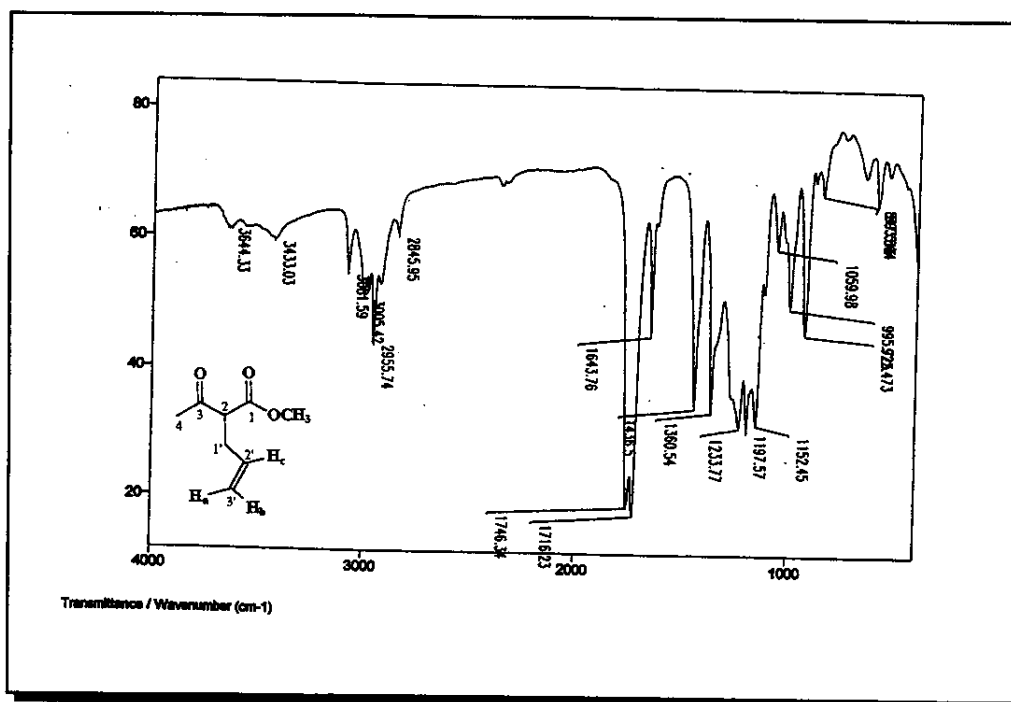




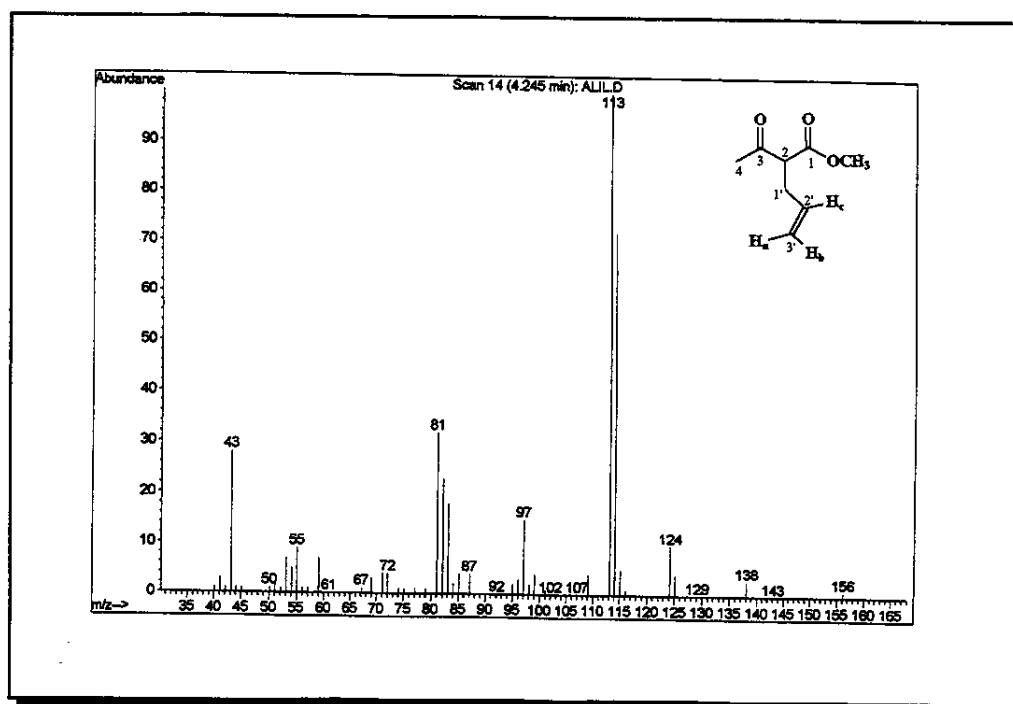
**E09** – Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (125,69 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ , referência interna de capilar de  $\text{CCl}_4/\text{TMS}$ ), do *trans*-cicloexano-1,2-diol (**11**).



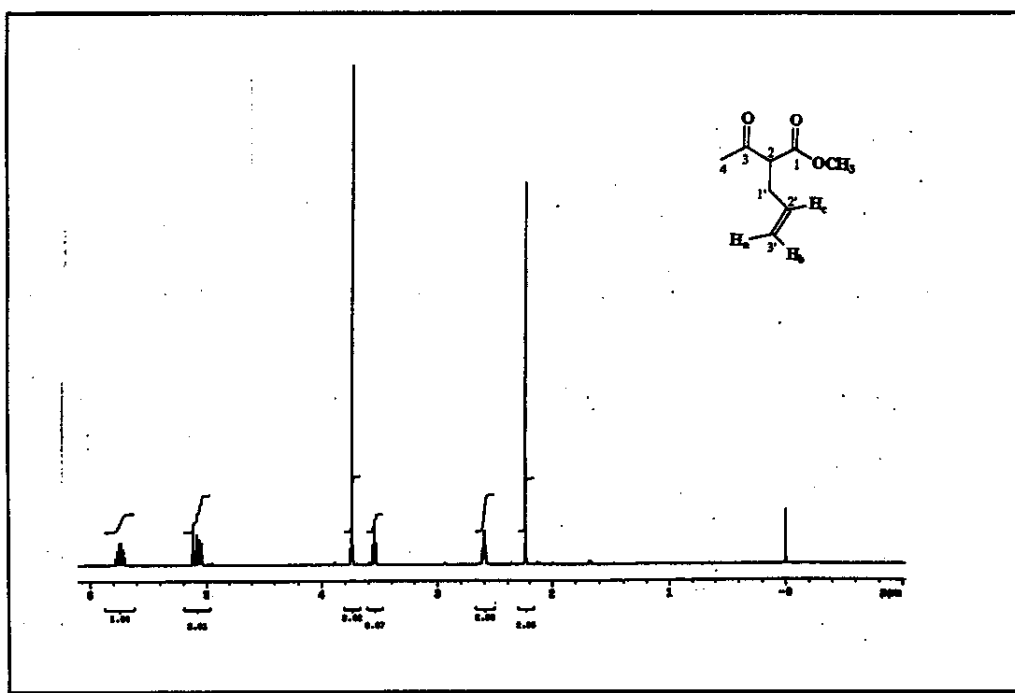
**E10** – Espectro de DEPT 90 e 135 (125,69 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ , referência interna de capilar de  $\text{CCl}_4/\text{TMS}$ ) do *trans*-cicloexano-1,2-diol (**11**).



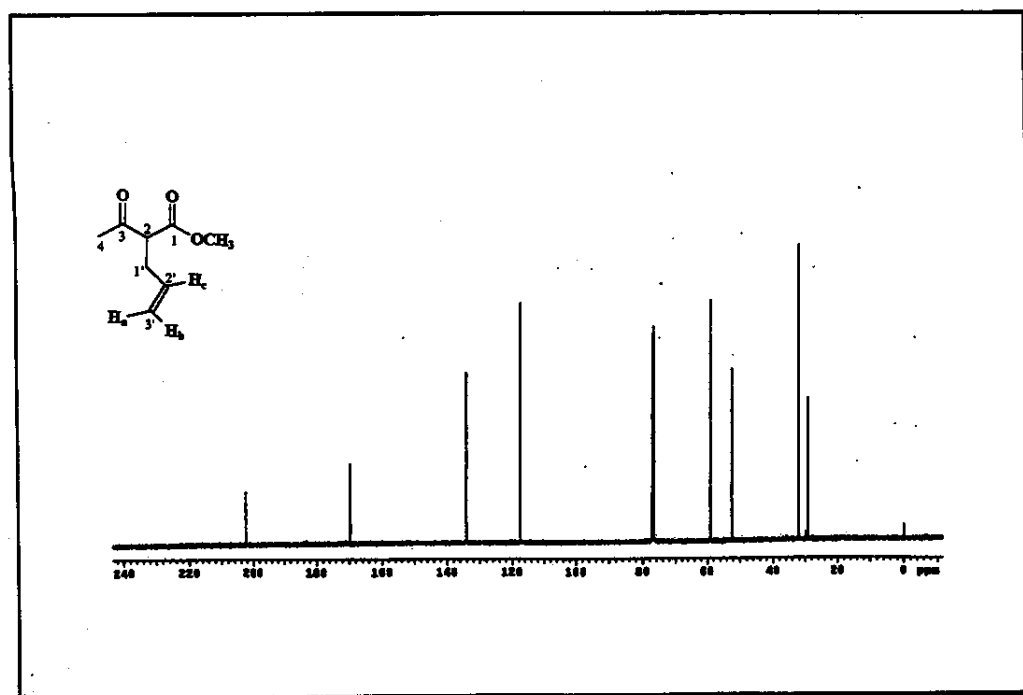
E11 – Espectro na região do infravermelho (filme), do 2-aliil-3-ona-butanoato de metila (**15**).



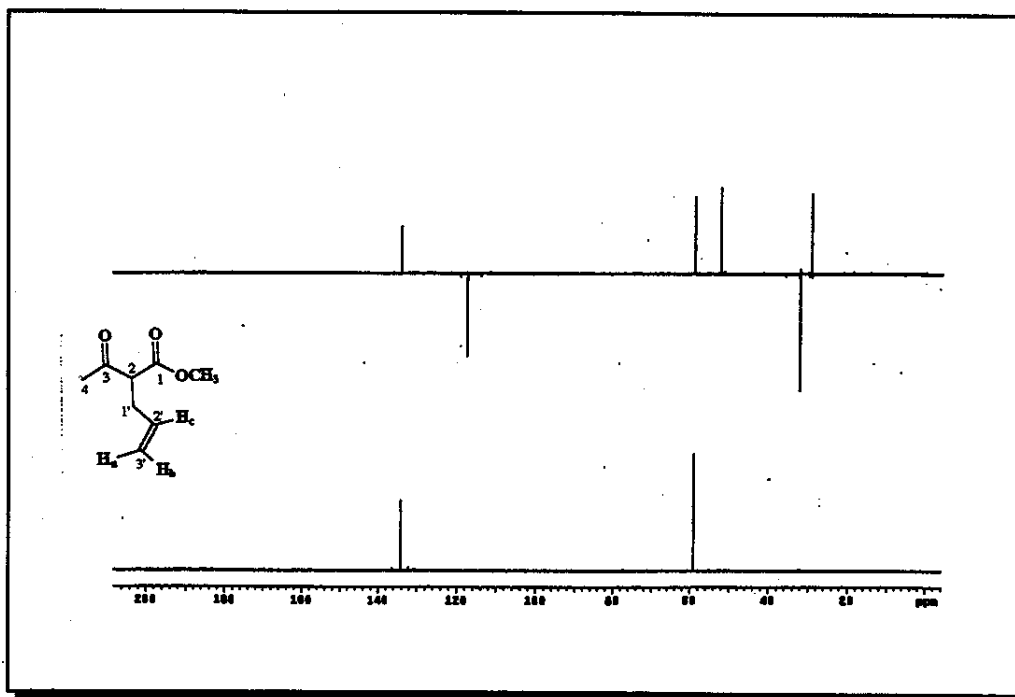
E12 – Espectro de massas (IE, 70 eV), do 2-aliil-3-ona-butanoato de metila (**15**).



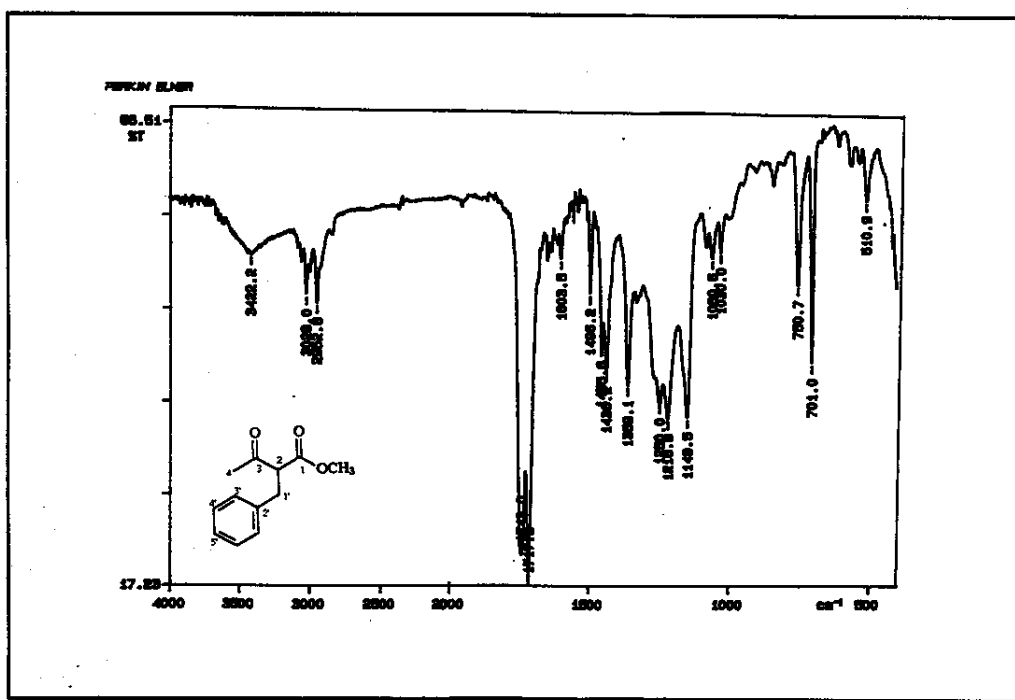
**E13** – Espectro de RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ), do 2-alil-3-ona-butanoato de metila (**15**).



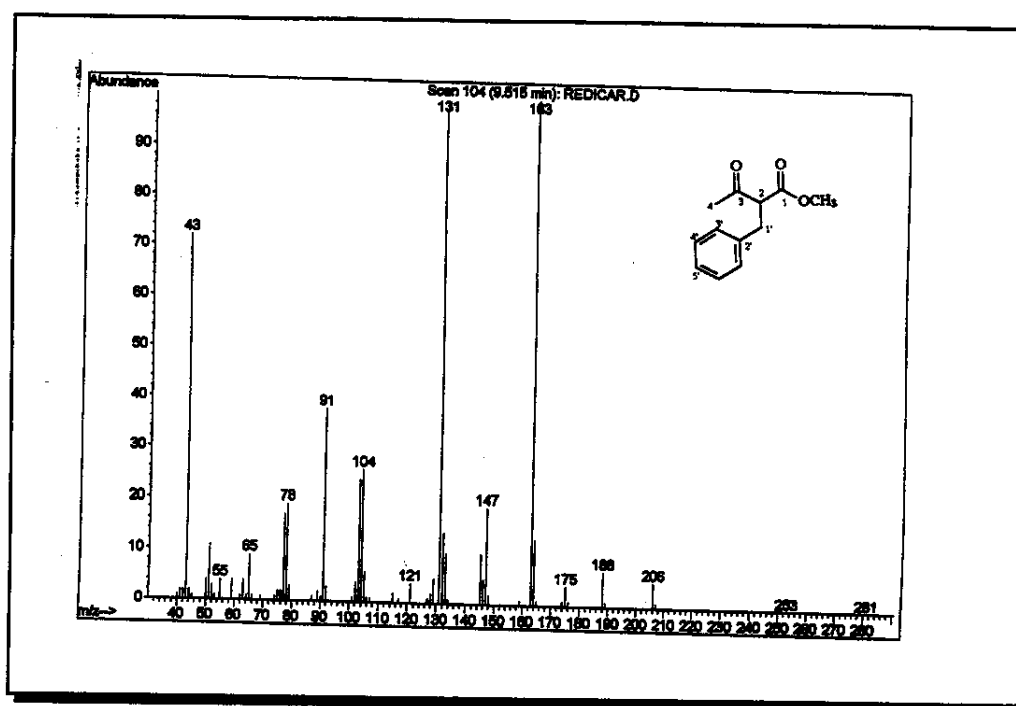
**E14** – Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (125,69 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ), do 2-alil-3-ona-butanoato de metila (**15**).



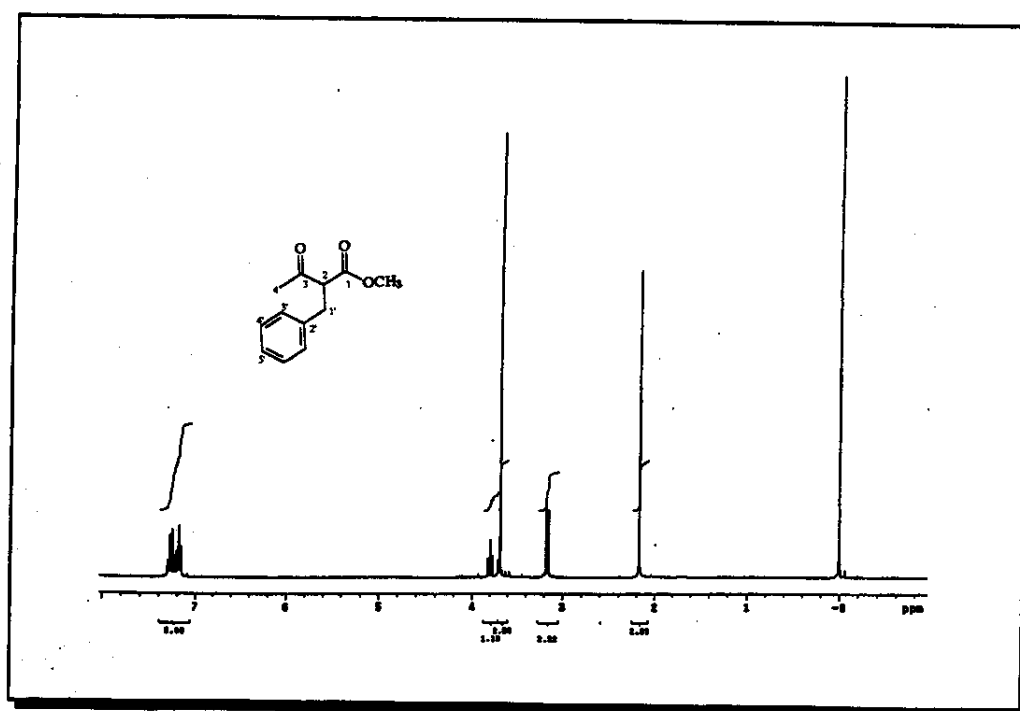
E15 – Espectro de DEPT 90 e 135 (125,69 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) do 2-alil-3-ona-butanoato de metila (**15**).



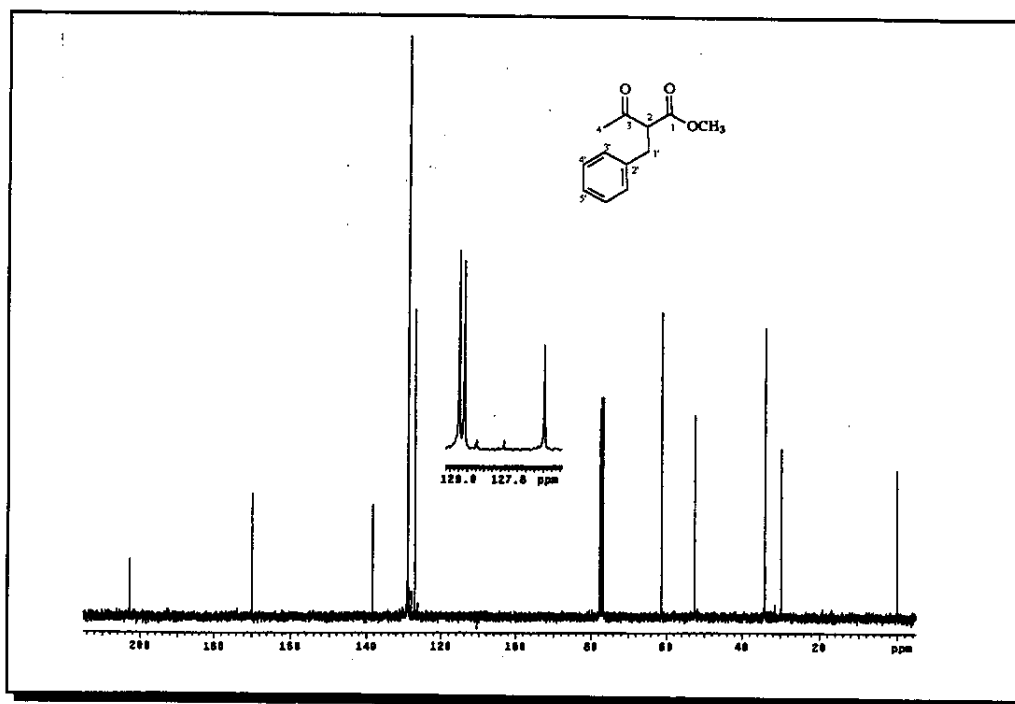
E16 – Espectro na região do infravermelho (filme), do 2-benzil-3-ona-butanoato de metila (**13**).



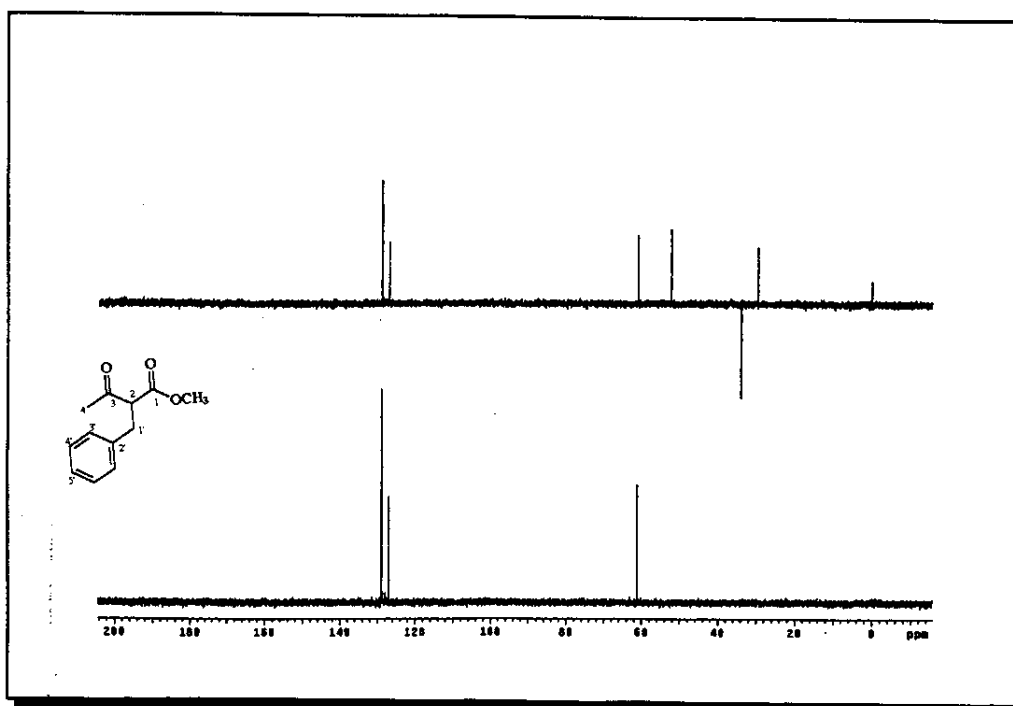
E17 – Espectro de massas (IE, 70 eV), do 2-benzil-3-ona-butanoato de metila (13).



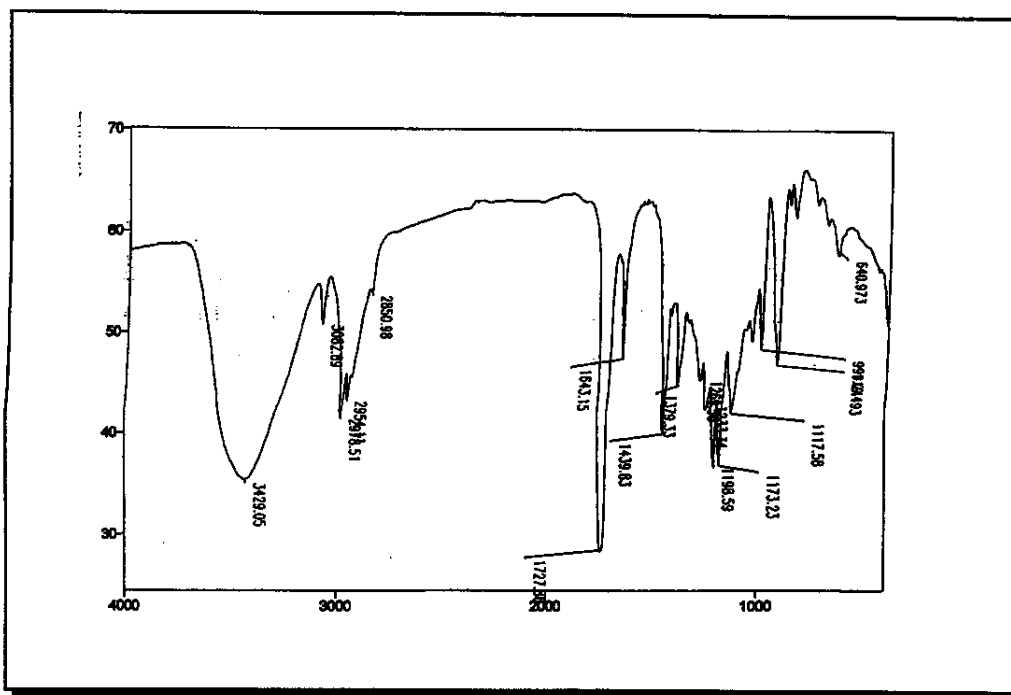
E18 – Espectro de RMN <sup>1</sup>H (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>), do 2-benzil-3-ona-butanoato de metila (13).



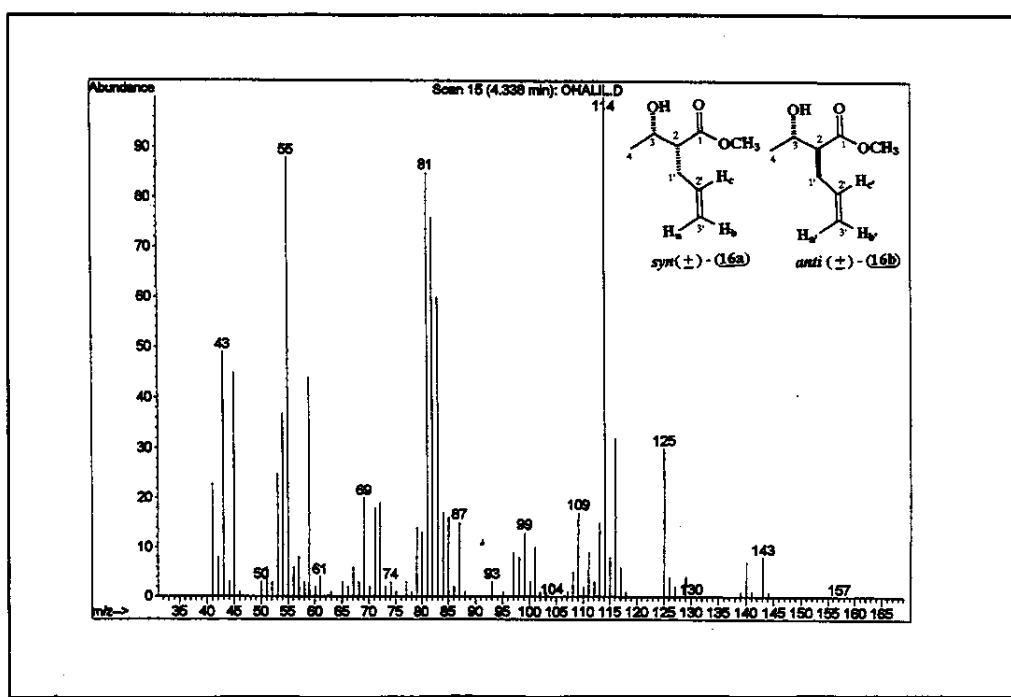
**E19** – Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (125,69 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ), do 2-benzil-3-ona-butanoato de metila (**13**).



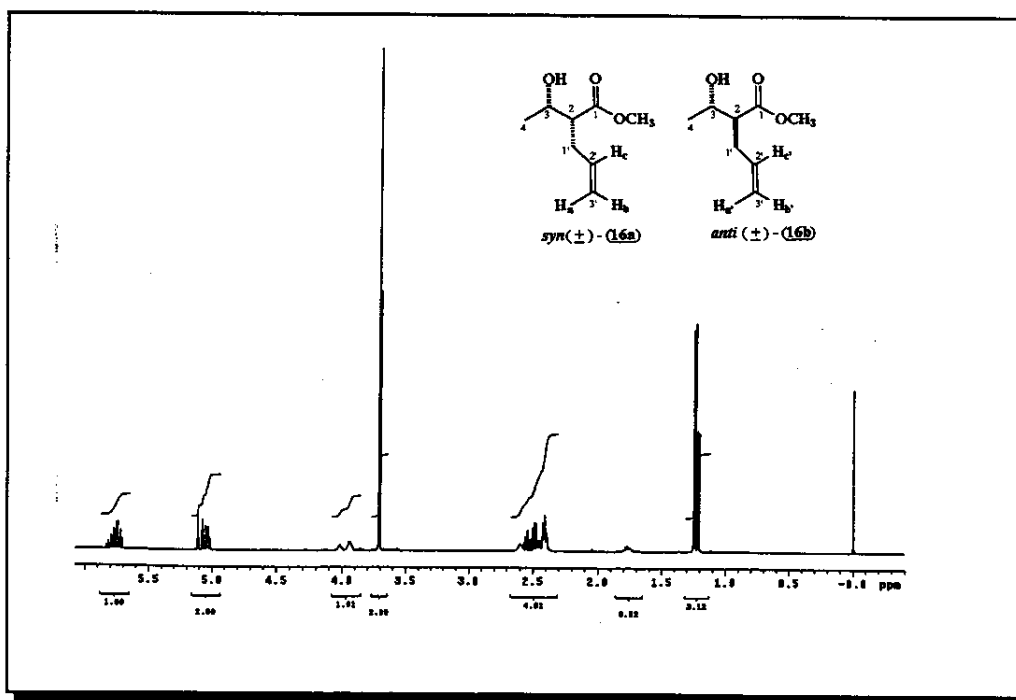
**E20** – Espectro de DEPT 90 e 135 (125,69 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) do 2-benzil-3-ona-butanoato de metila (**13**).



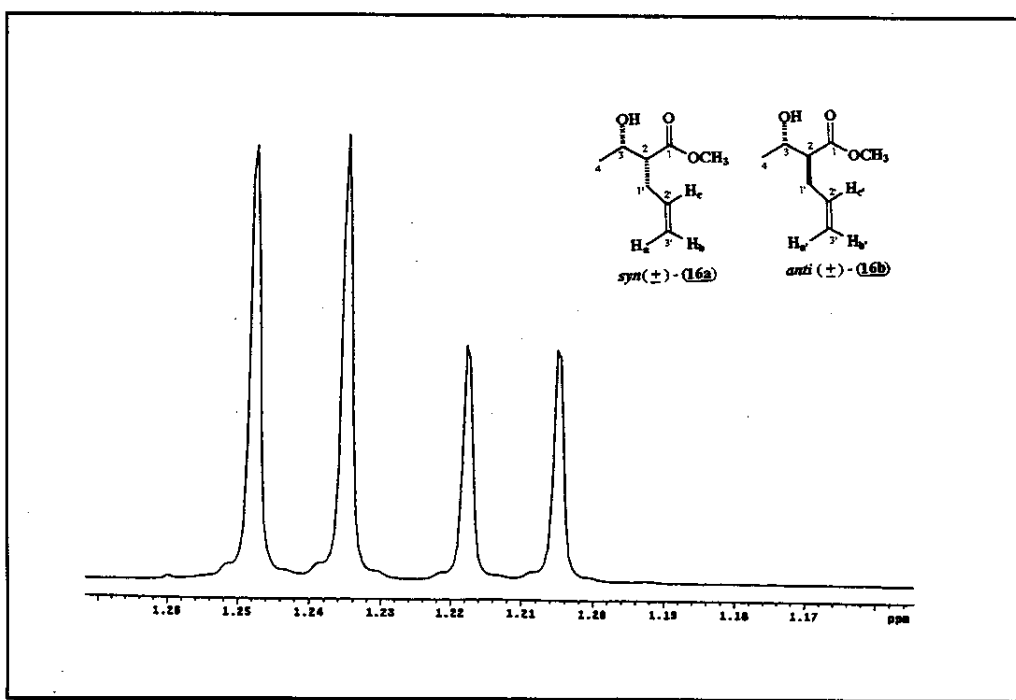
E21 – Espectro na região do infravermelho (filme), de uma mistura 1:2 dos álcoois (+) **16a** e (+) **16b**.



E22 – Espectro de massas (IE, 70 eV), de uma mistura 1:2 dos álcoois (+) **16a** e (+) **16b**.

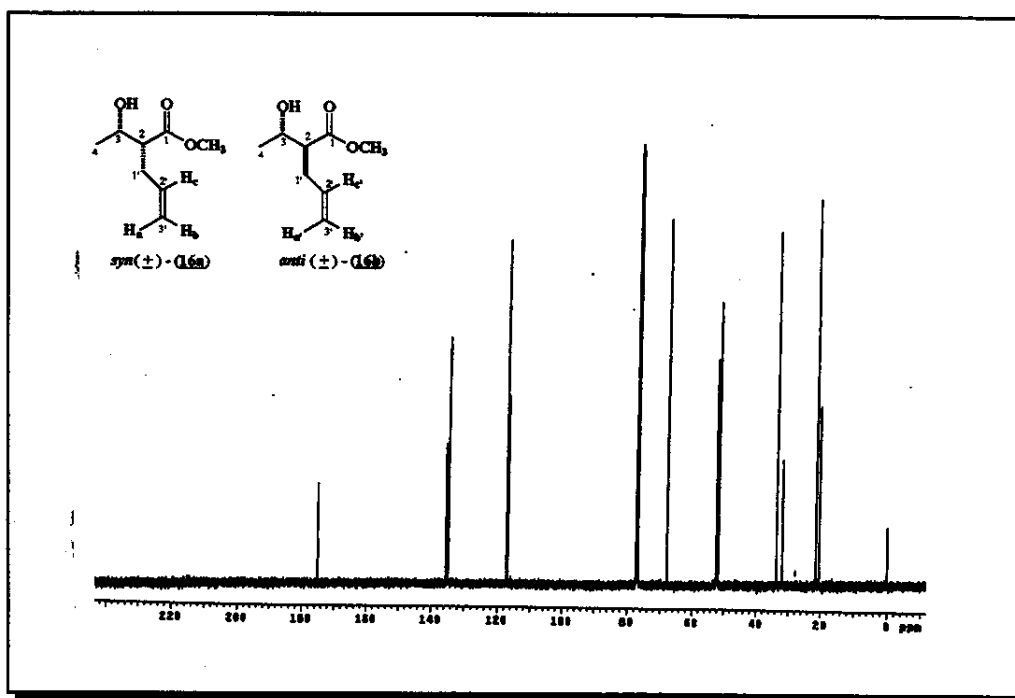


**E23** – Espectro de RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ), de uma mistura 1:2 dos álcoois ( $\pm$ ) **16a** e ( $\pm$ ) **16b**.

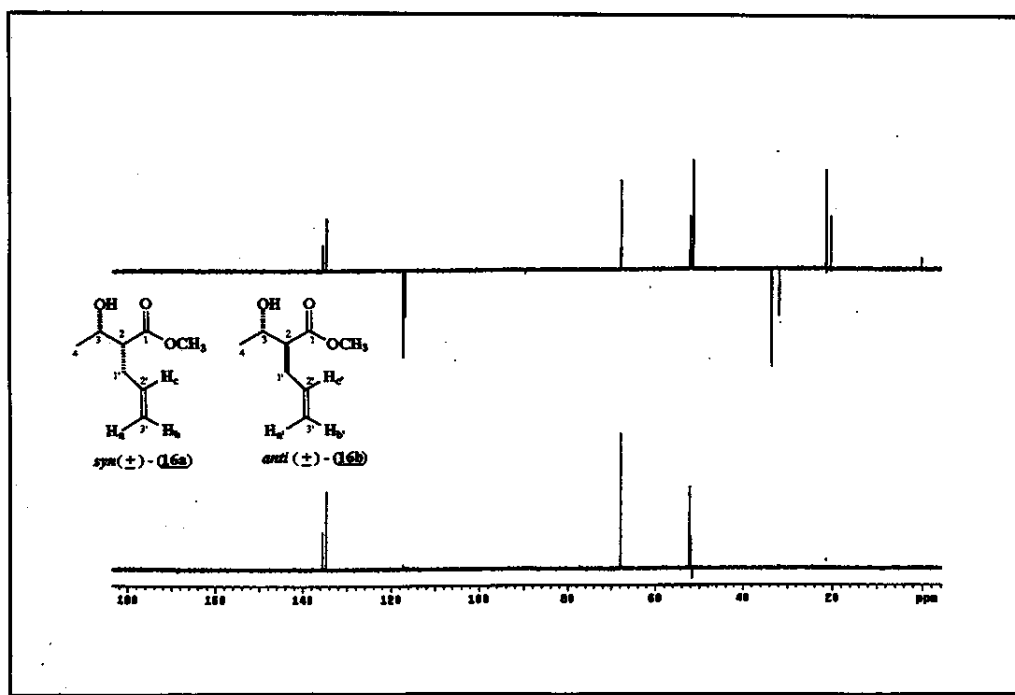


**E23a** – Expansão do espectro **E23**, na região entre  $\delta$  1,20 e 1,26.

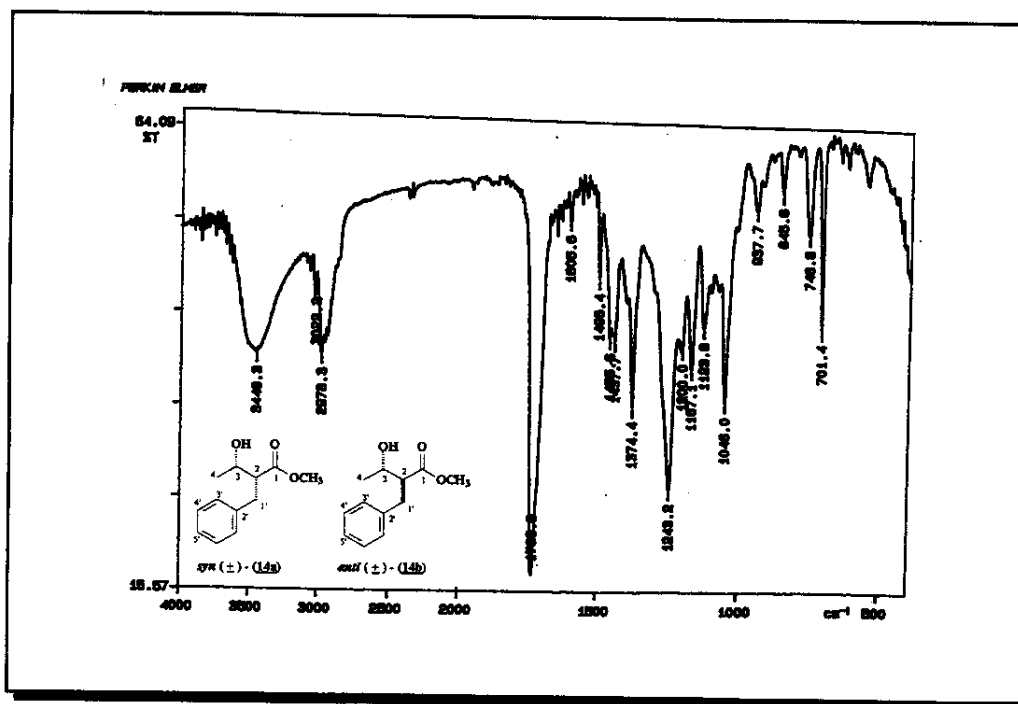




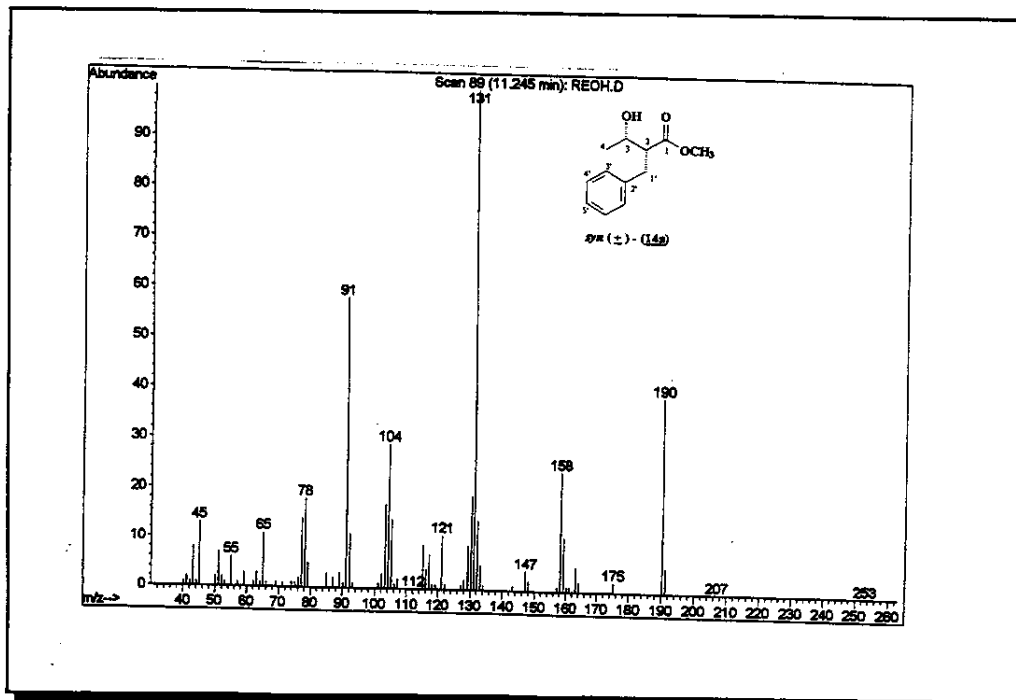
**E24** – Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (125,69 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ), de uma mistura 1:2 dos álcoois **(+)-16a** e **(+)-16b**.



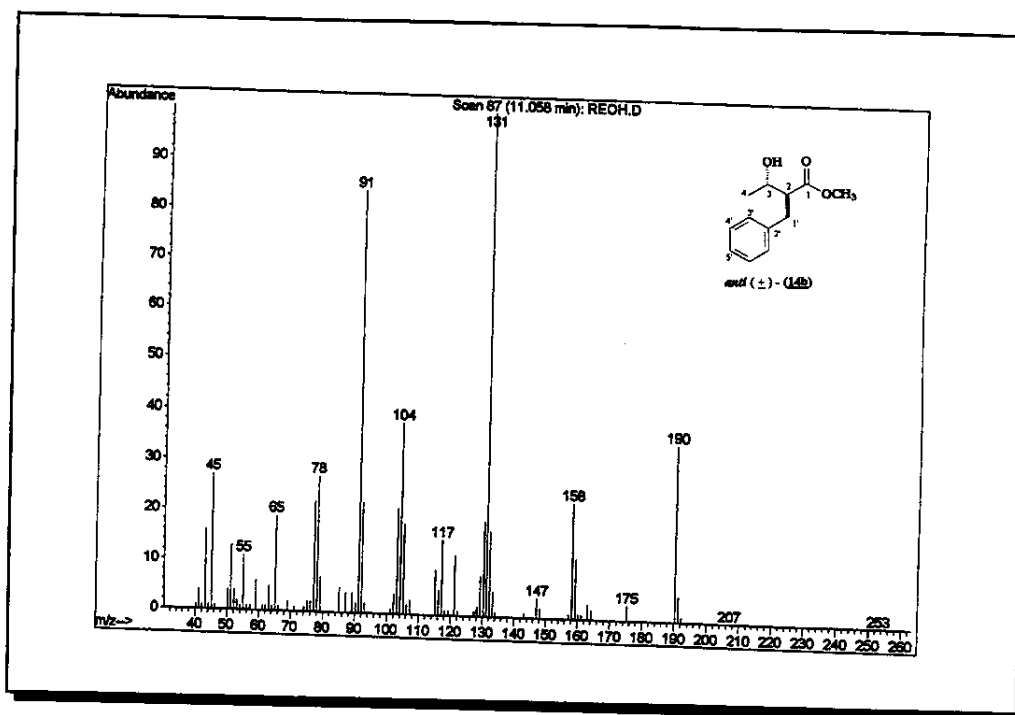
**E25** – Espectro de DEPT 90 e 135 (125,69 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de uma mistura 1:2 dos álcoois **(+)-16a** e **(+)-16b**.



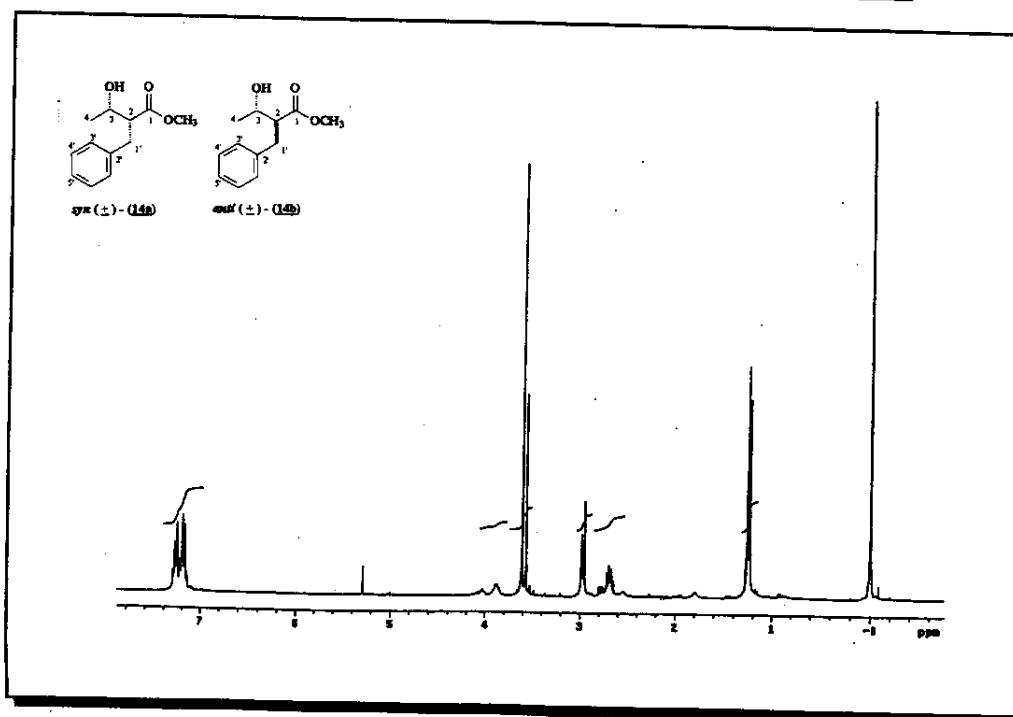
E26 – Espectro na região do infravermelho (filme), de uma mistura 1:2 dos álcoois (+) **14a** e (+) **14b**.



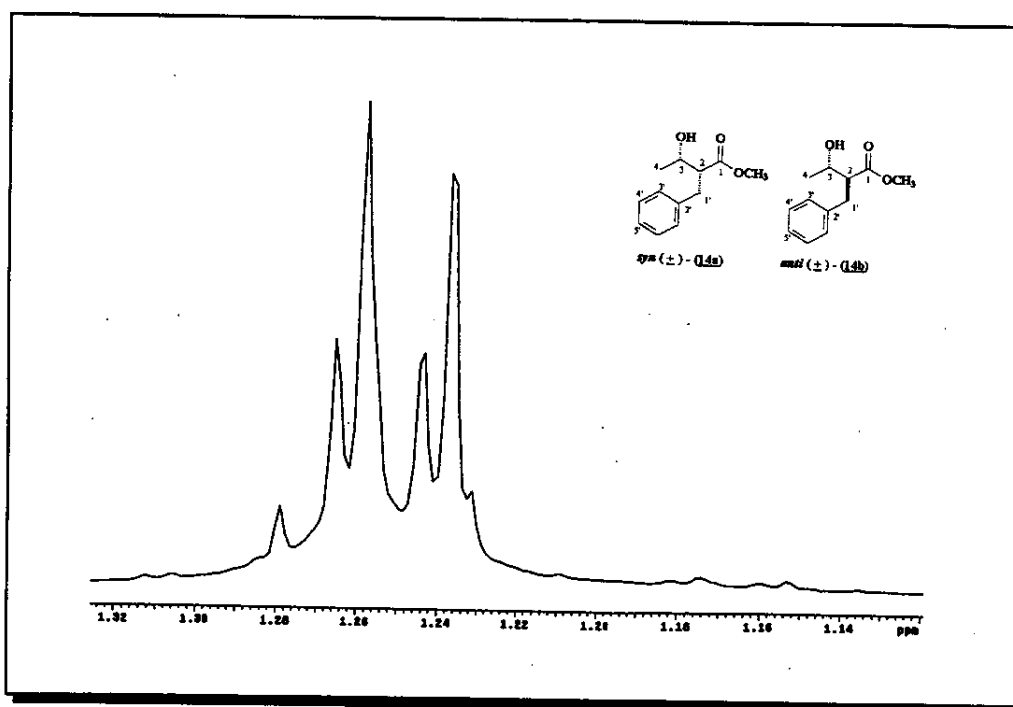
E27 – Espectro de massas (IE, 70 eV), do álcool (+) **14a**.



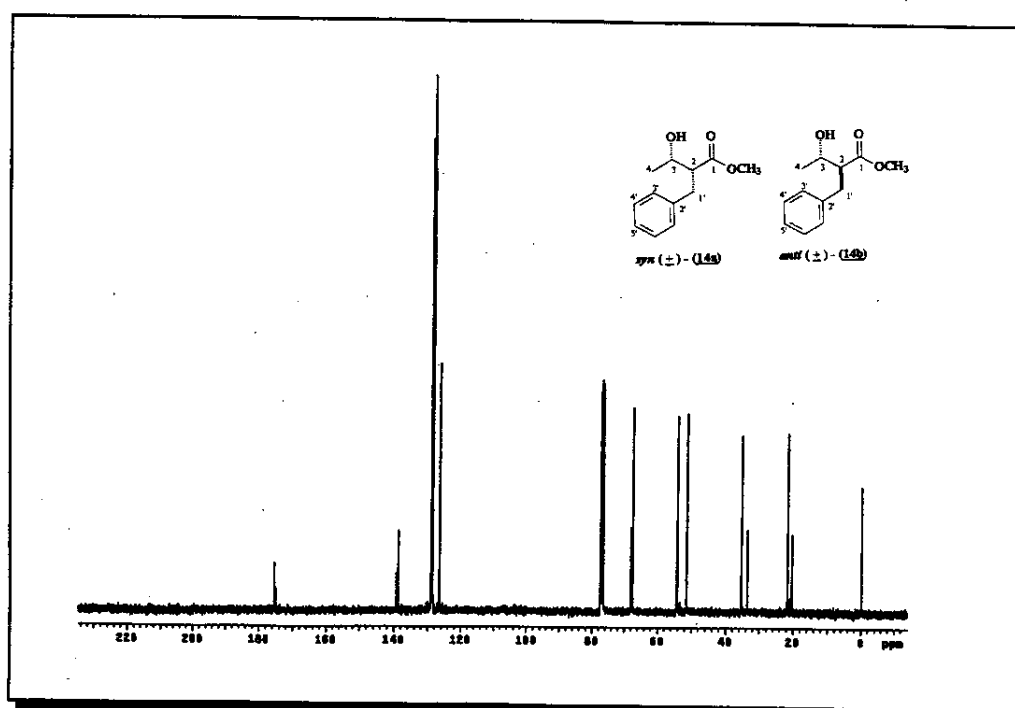
**E28** – Espectro de massas (IE, 70 eV), do álcool (±) **14b**.



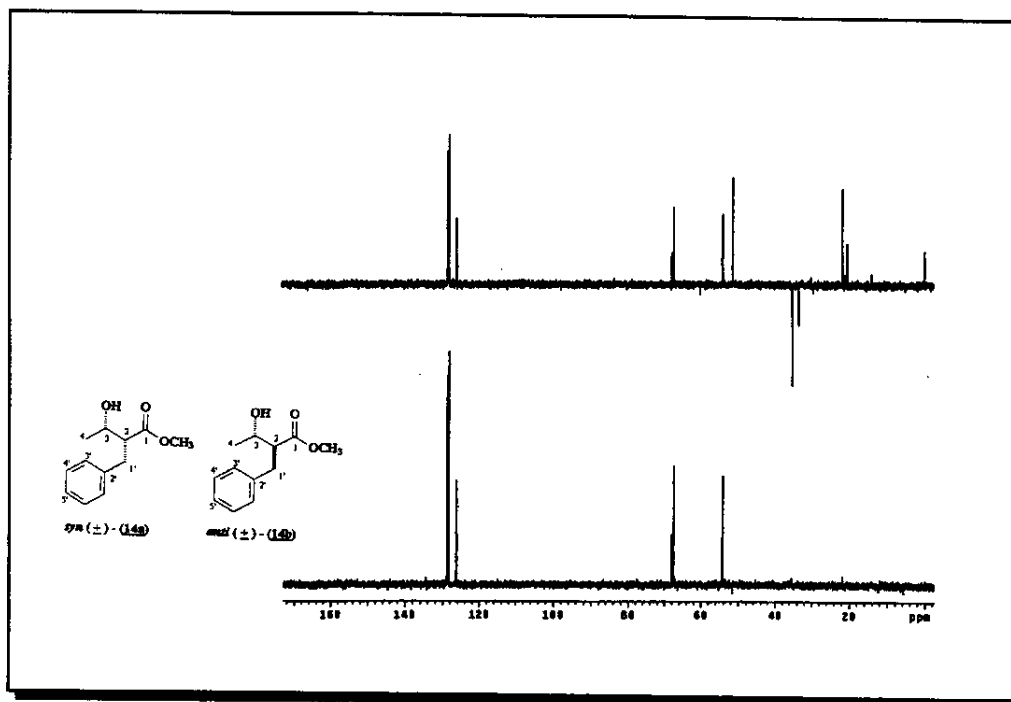
**E29** – Espectro de RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>), de uma mistura 1:2 dos álcoois (±) **14a** e (±) **14b**.



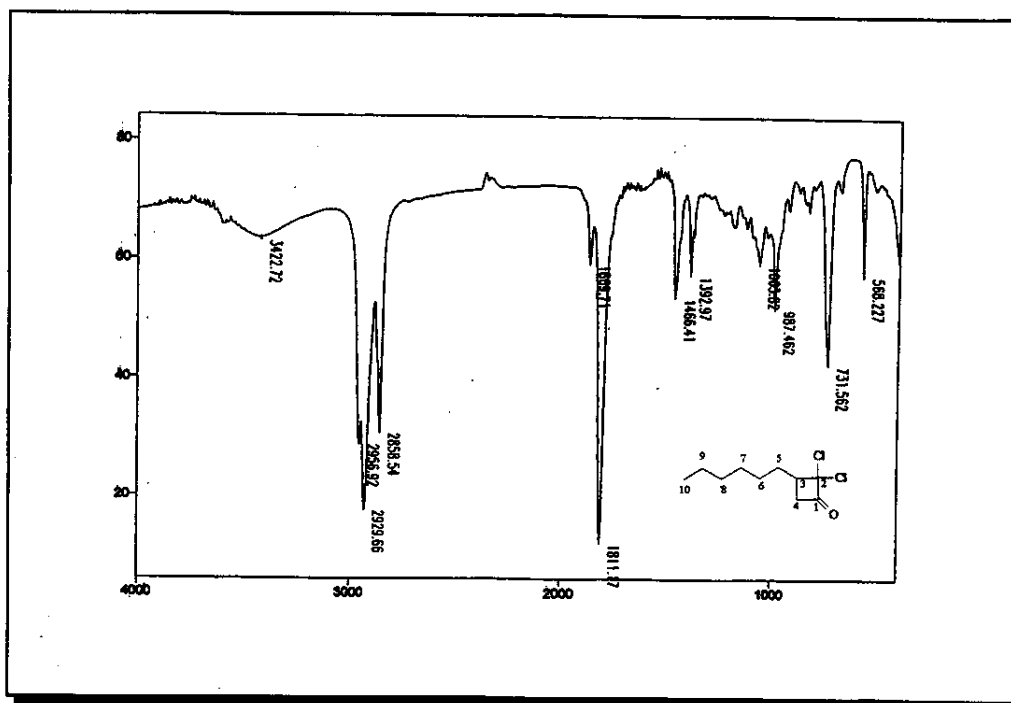
**E29a** – Expansão do espectro **E29**, na região entre  $\delta$  1,22 e 1,28.



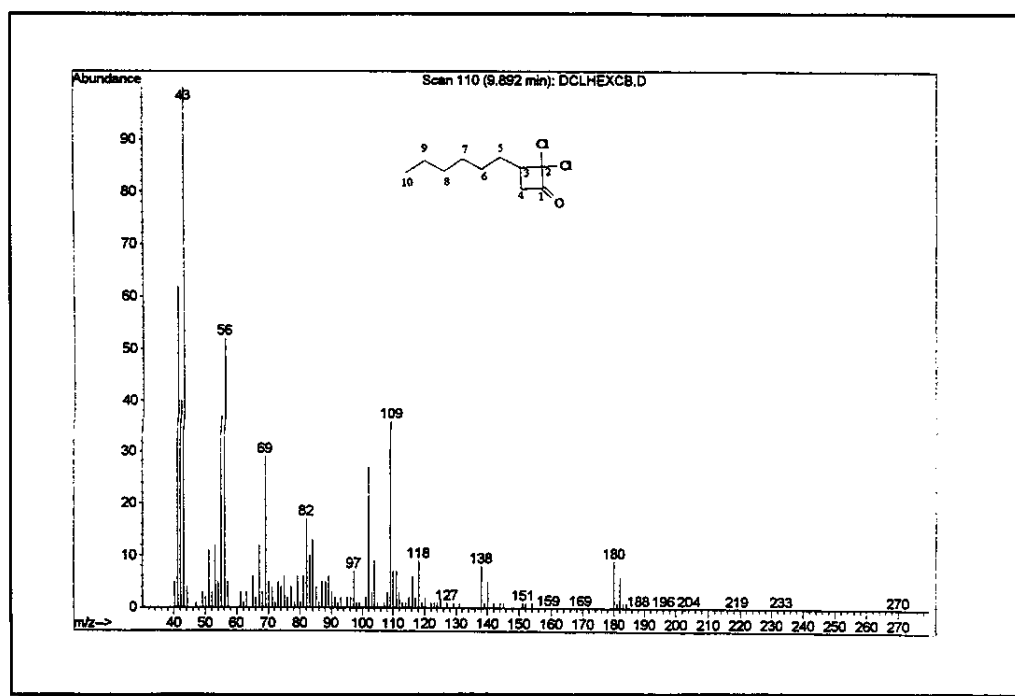
**E30** – Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (75,45 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ), de uma mistura 1:2 dos álcoois (±) **14a** e (±) **14b**.



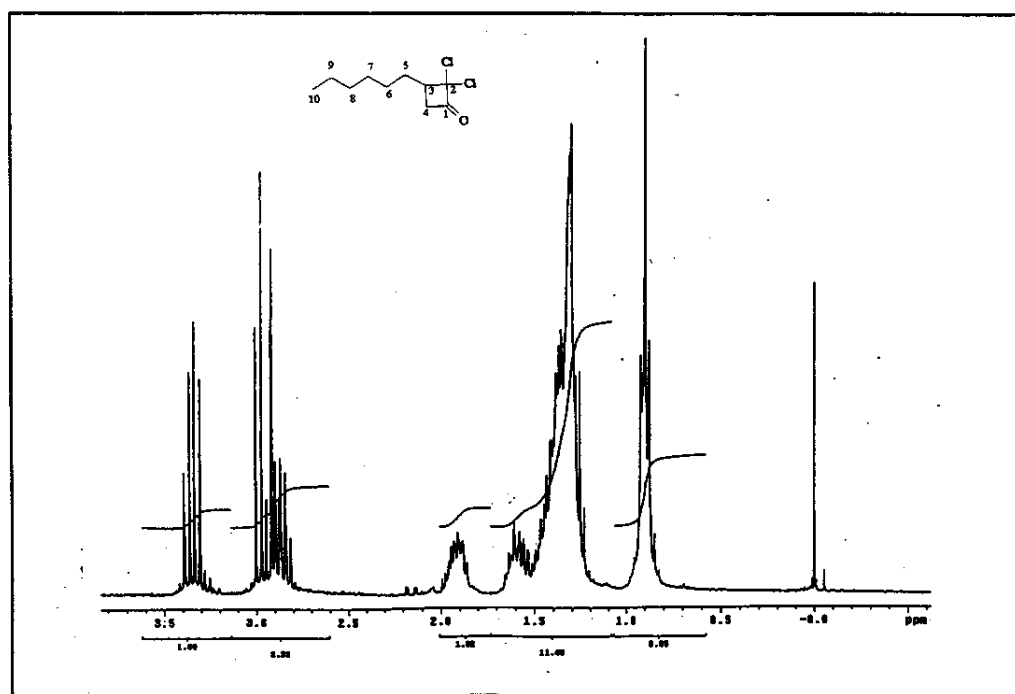
E31 – Espectro de DEPT 90 e 135 (75,45 MHz, CDCl<sub>3</sub>) de uma mistura 1:2 dos álcoois (+) **14a** e (+) **14b**.



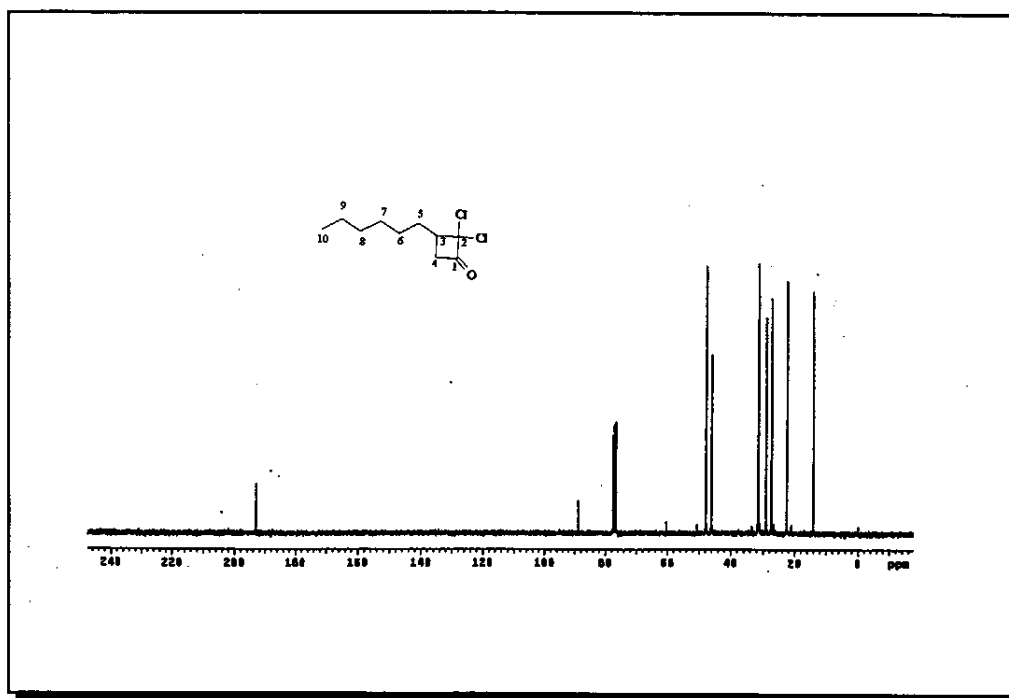
E32 – Espectro na região do infravermelho (filme), do 2,2-dicloro-3-hexil-1-ciclobutanona (**20**).



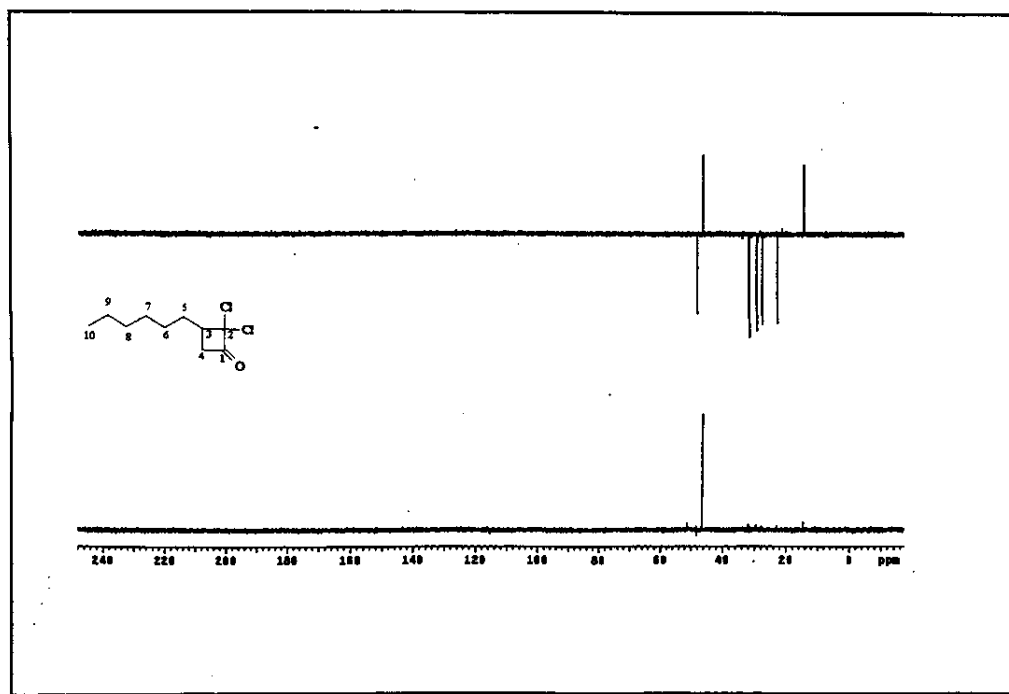
E33 – Espectro de massas (IE, 70 eV), do 2,2-dicloro-3-hexil-1-ciclobutanona (**20**).



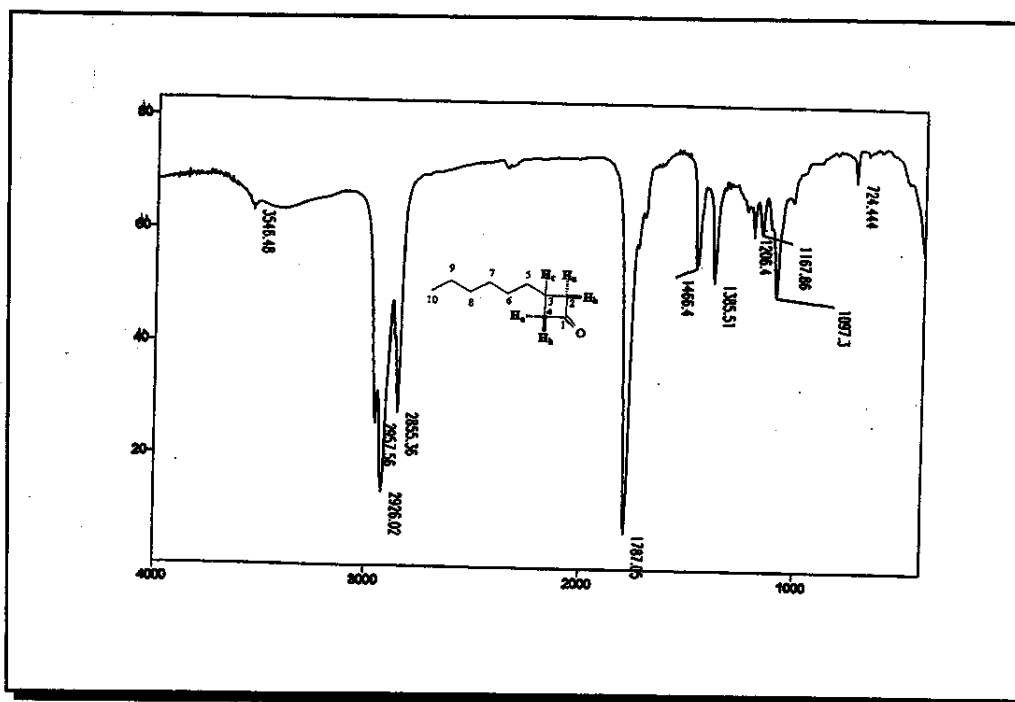
E34 – Espectro de RMN  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ), do 2,2-dicloro-3-hexil-1-ciclobutanona (**20**).



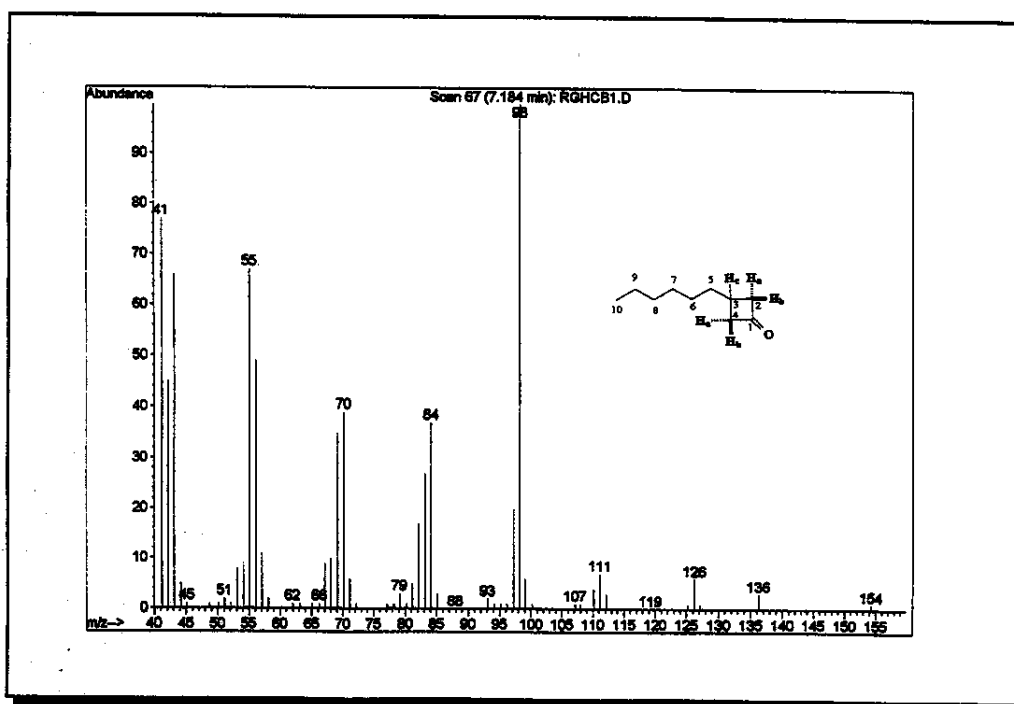
**E35** – Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (75,45 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ), do 2,2-dicloro-3-hexil-1-ciclobutanona (**20**).



**E36** – Espectro de DEPT 90 e 135 (75,45 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) do 2,2-dicloro-3-hexil-1-ciclobutanona (**20**).

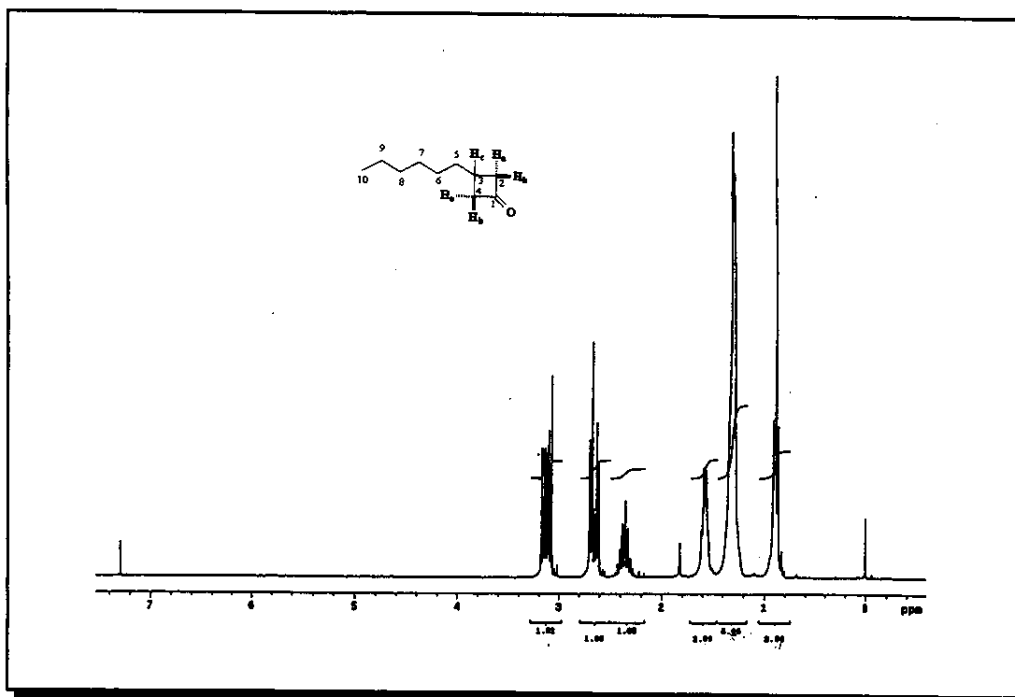


E37 – Espectro na região do infravermelho (filme), da 3-hexil-1-ciclobutanona (22).

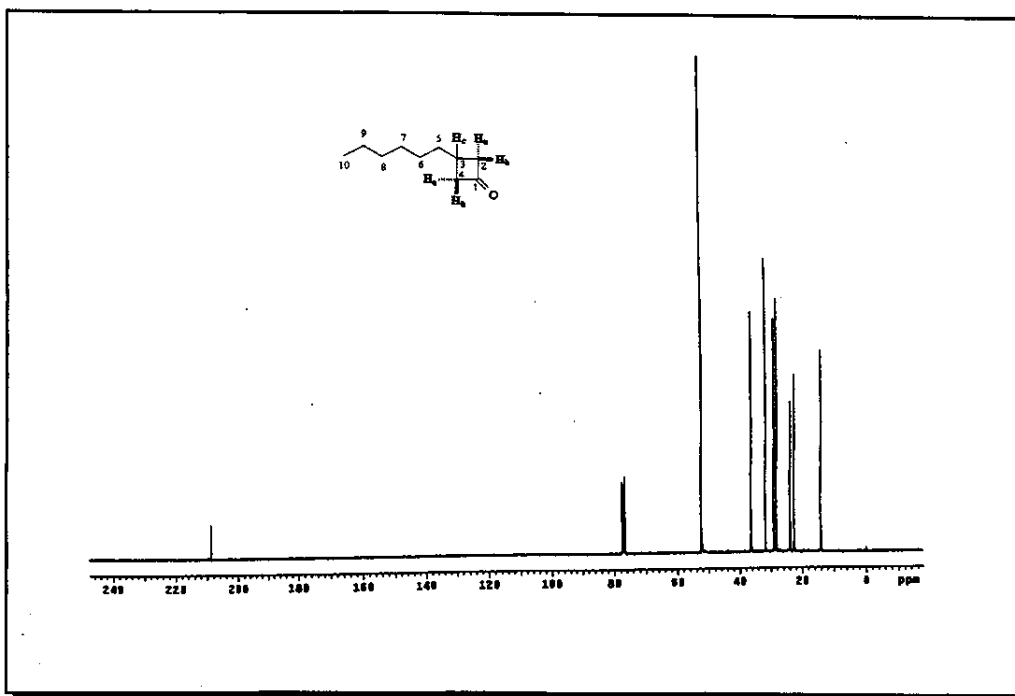


E38 – Espectro de massas (IE, 70 eV), da 3-hexil-1-ciclobutanona (22).

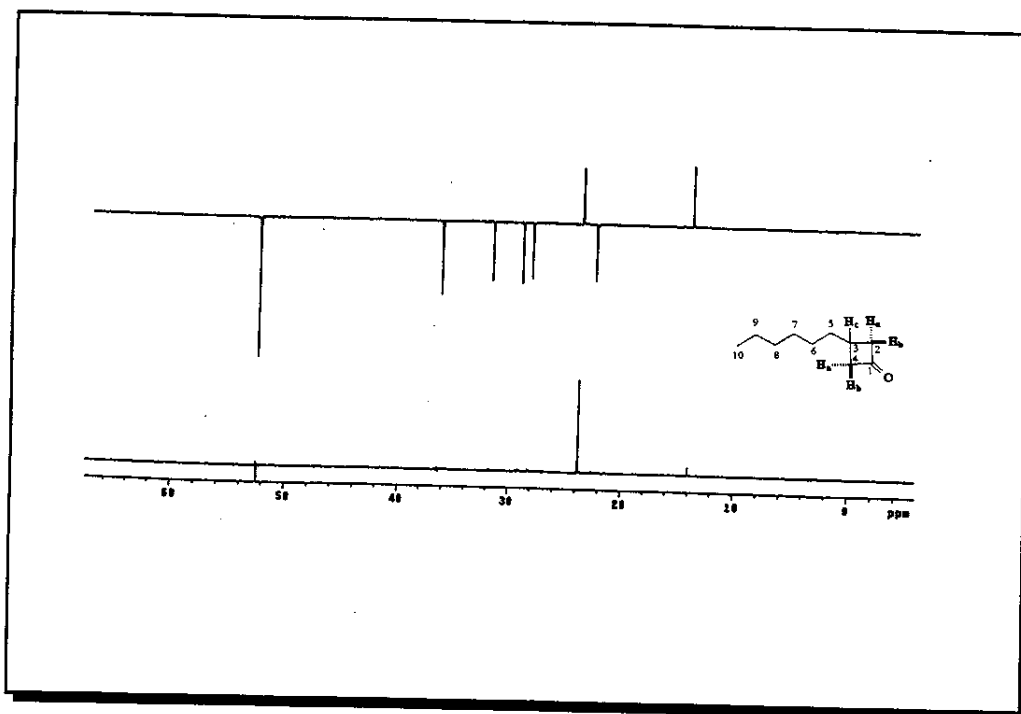




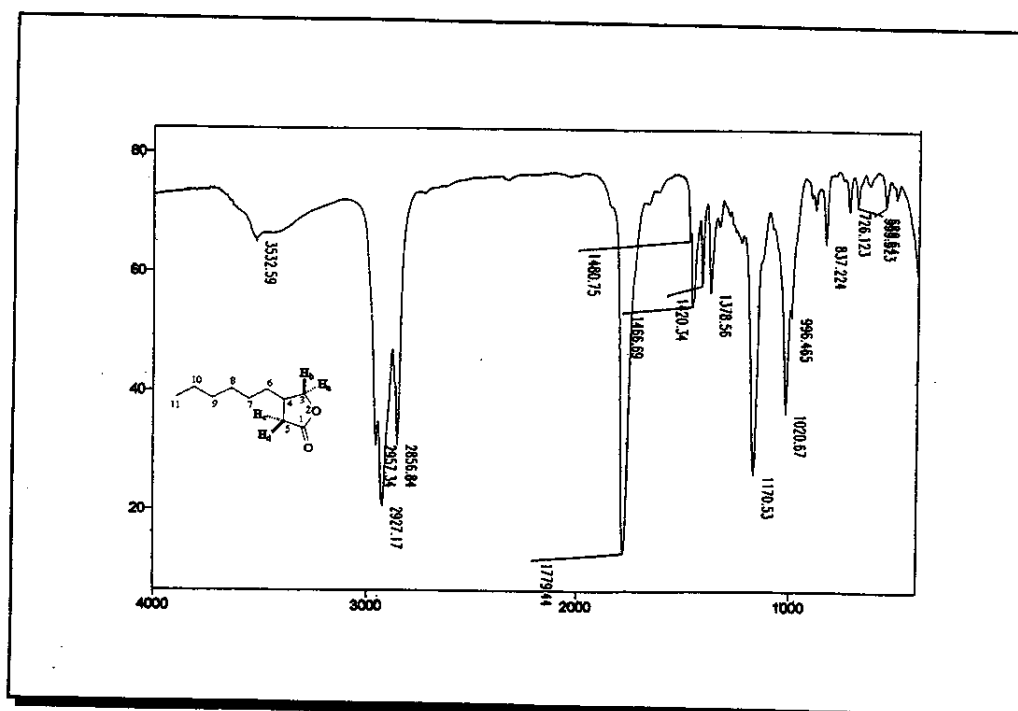
E39 – Espectro de RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>), da 3-hexil-1-ciclobutanona (22).



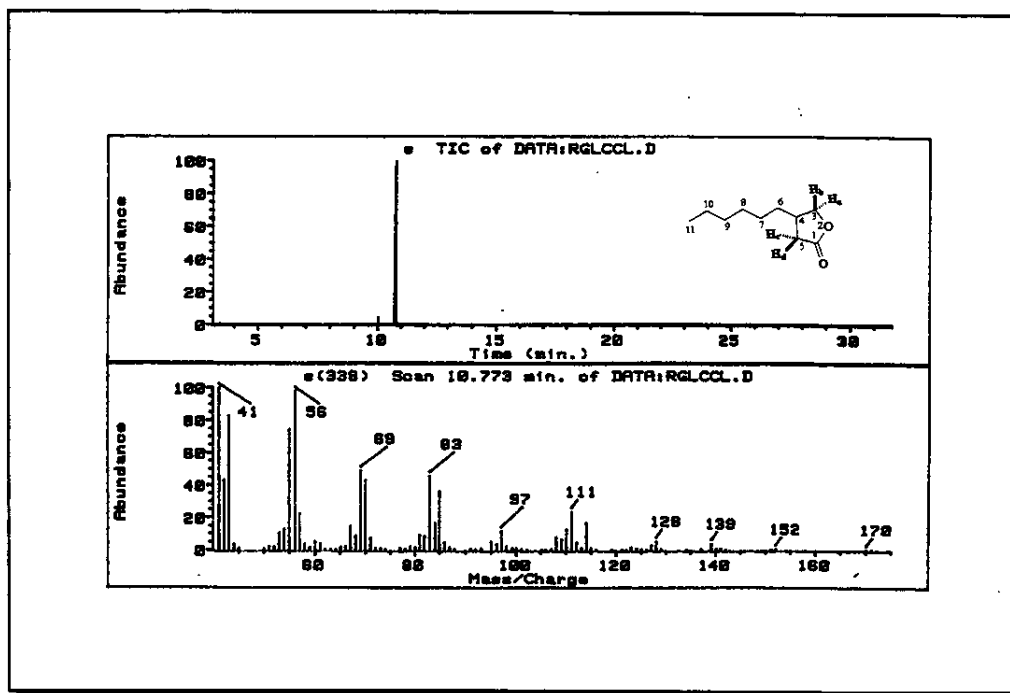
E40 – Espectro de RMN <sup>13</sup>C (75,45 MHz, CDCl<sub>3</sub>), da 3-hexil-1-ciclobutanona (22).



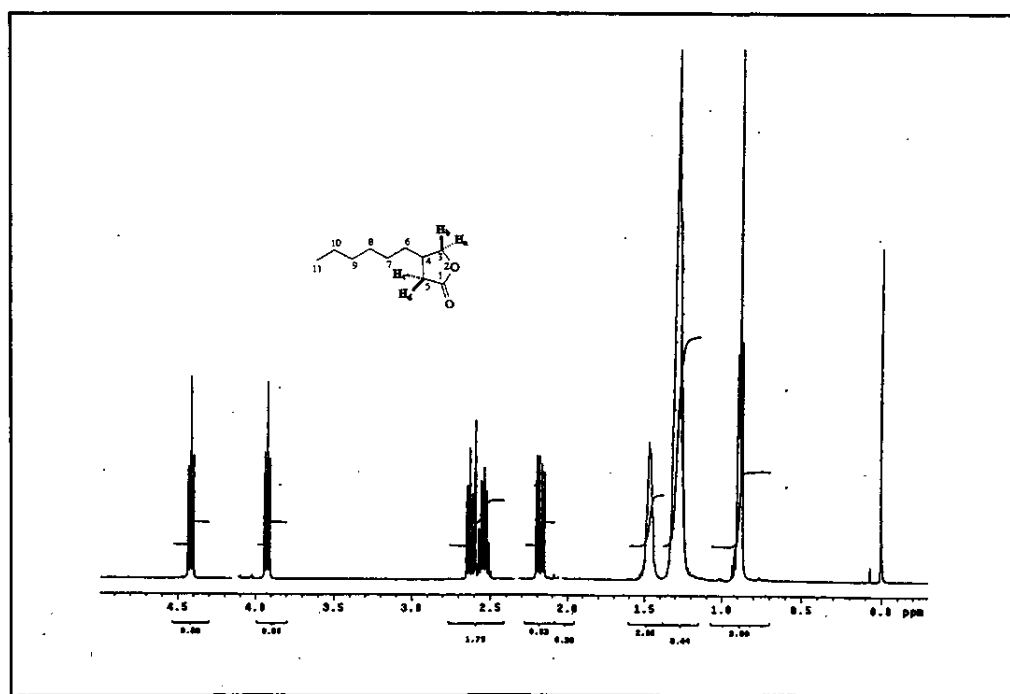
E41 – Espectro de DEPT 90 e 135 (75,45 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) da 3-hexil-1-ciclobutanona (22).



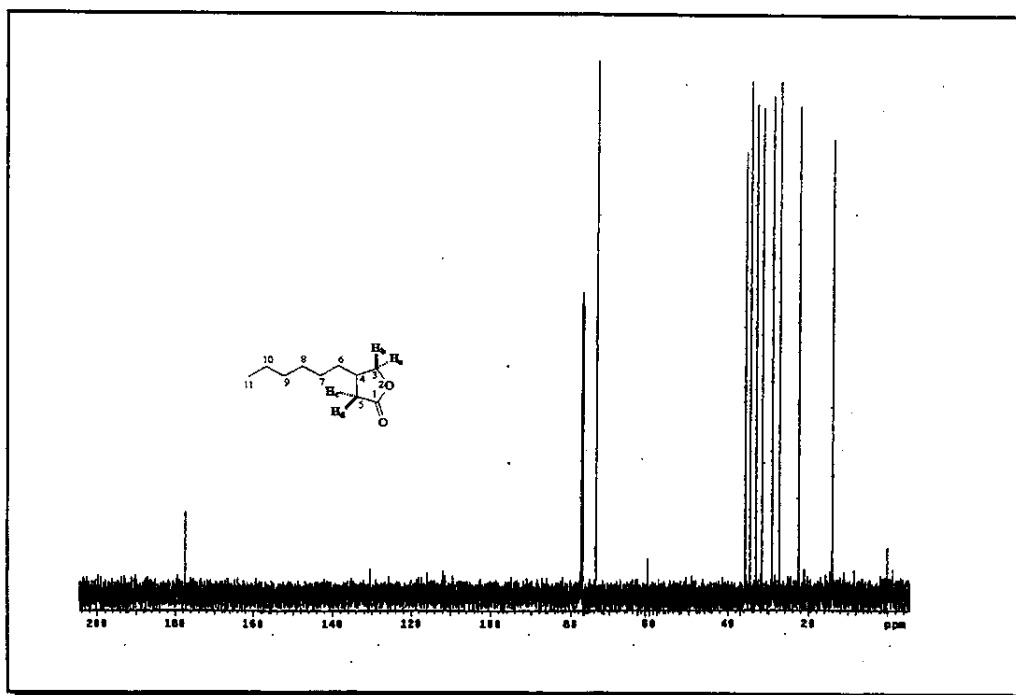
E42 – Espectro na região do infravermelho (filme), da 4-hexil-tetraidro-furanona (24).



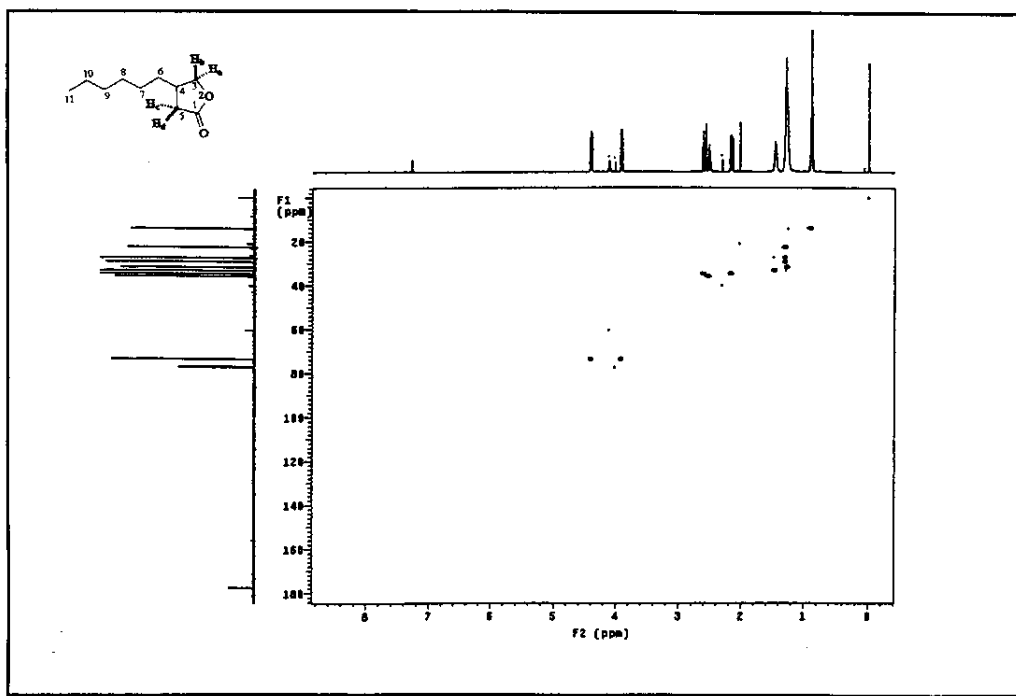
E43 – Espectro de massas (IE, 70 eV), da 4-hexil-tetraidro-furanona (**24**).



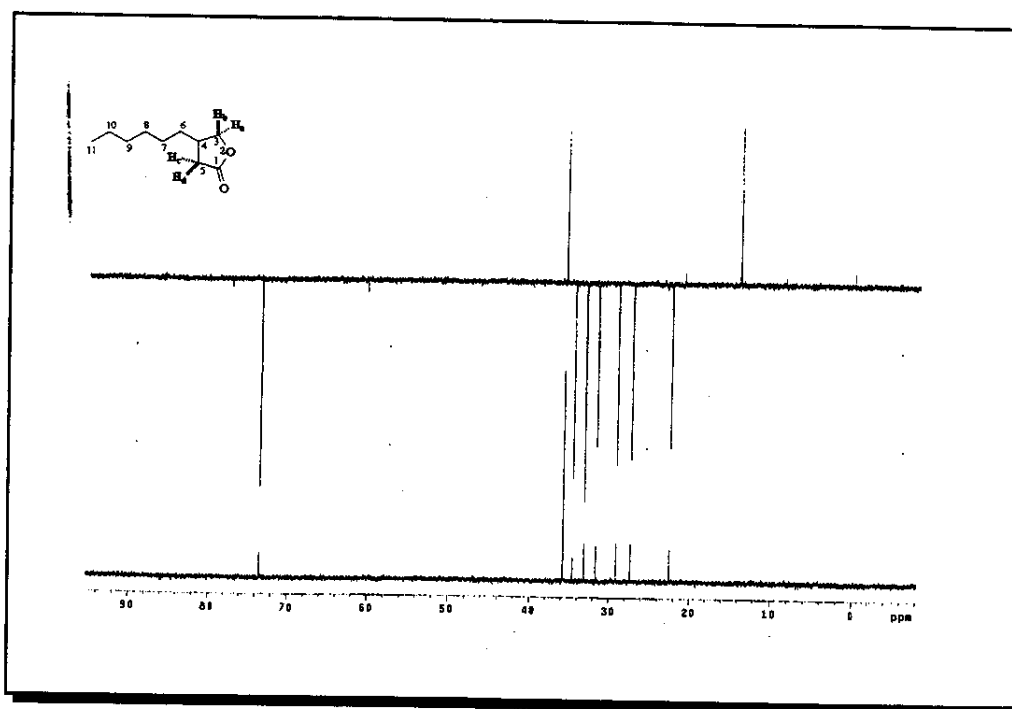
E44 – Espectro de RMN <sup>1</sup>H (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>), da 4-hexil-tetraidro-furanona (**24**).



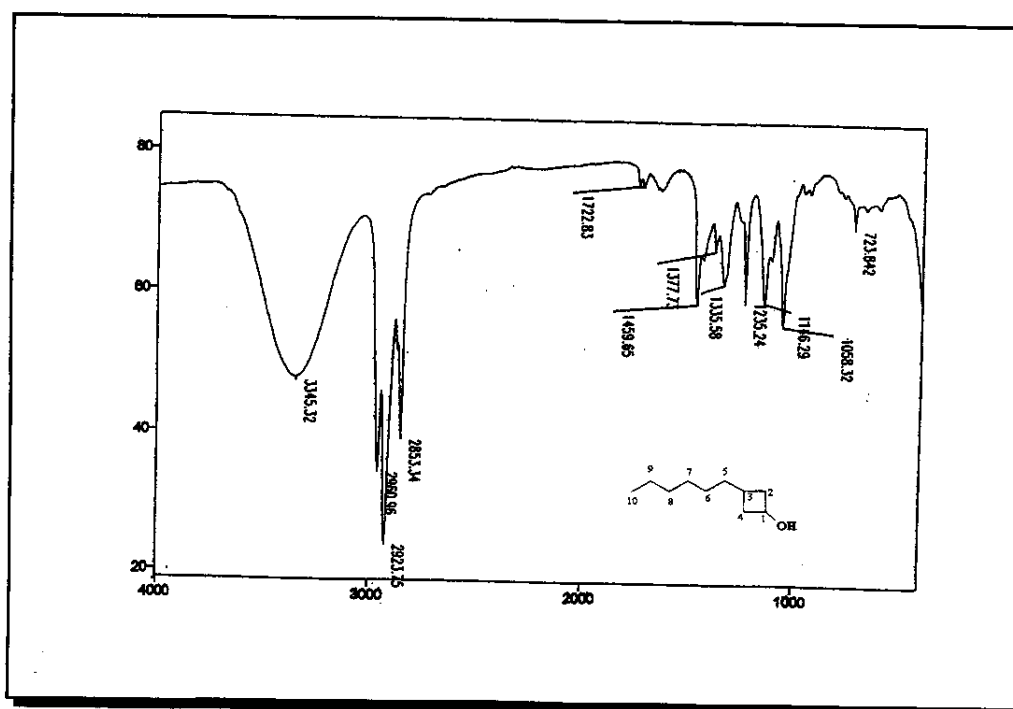
**E45** – Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (125,69 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ), da 4-hexil-tetraidro-furanona (**24**).



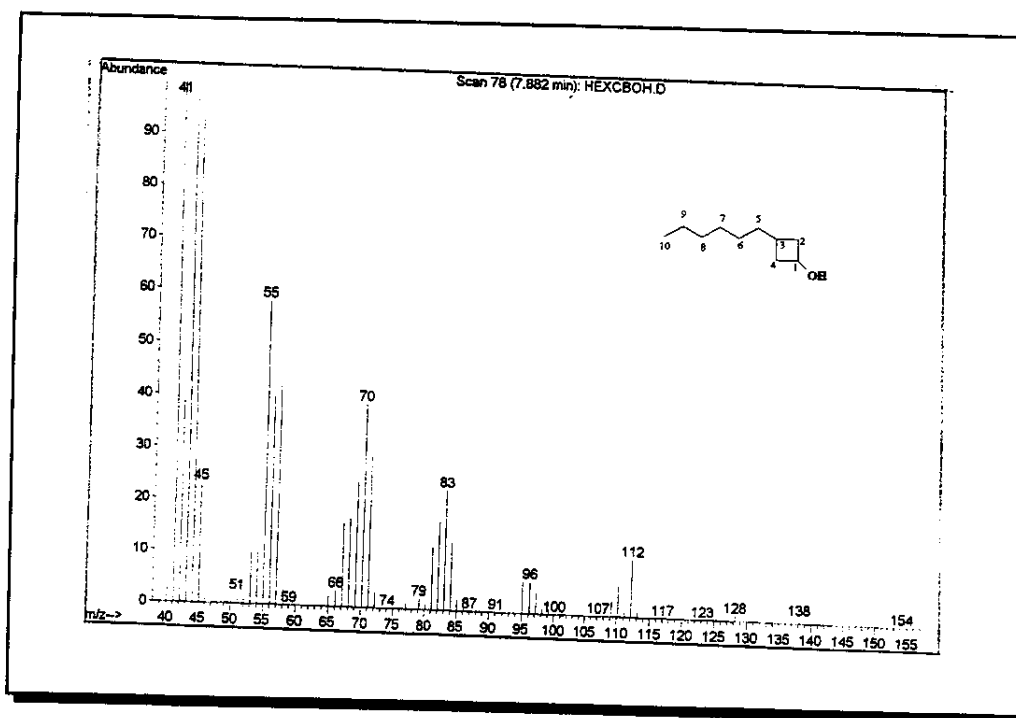
**E45a** – Espectro de HSQC  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) da 4-hexil-tetraidro--furanona (**24**).



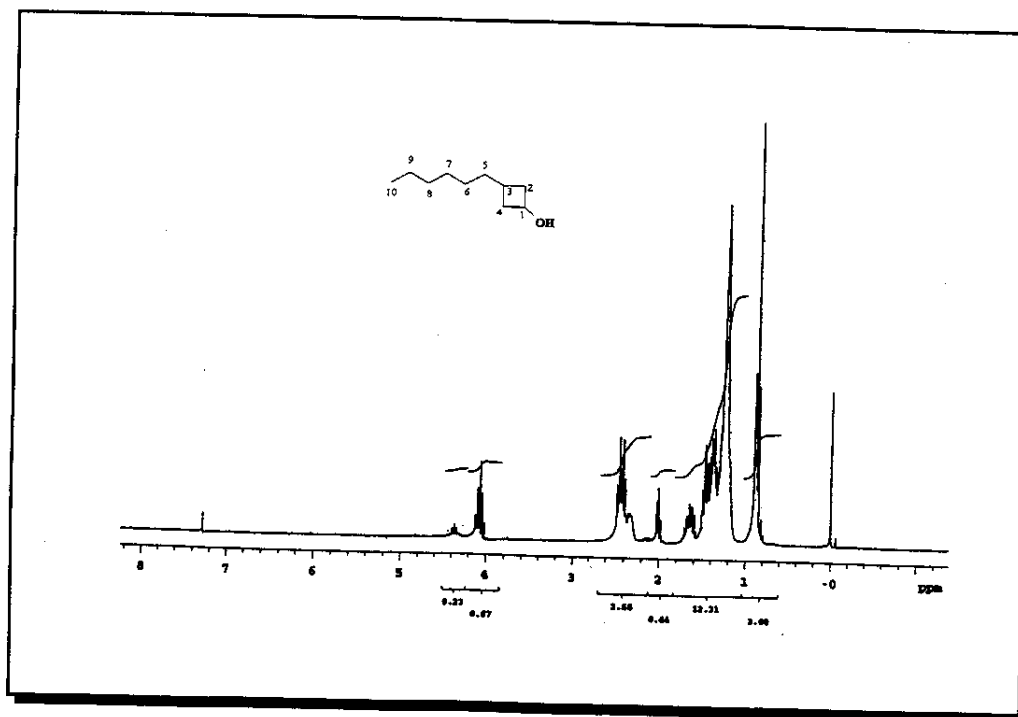
E46 – Espectro de DEPT 90 e 135 (125,69 MHz, CDCl<sub>3</sub>) da 4-hexil-tetrahydrofuranona (**24**).



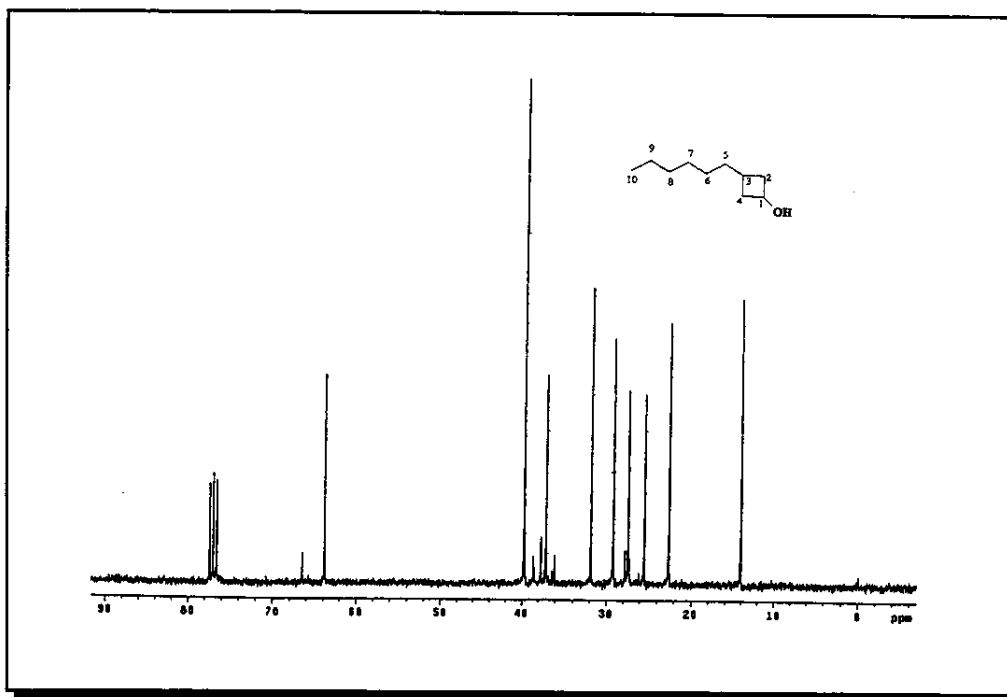
E47 – Espectro na região do infravermelho (filme), do 3-hexil-1-ciclobutanol (**25**).



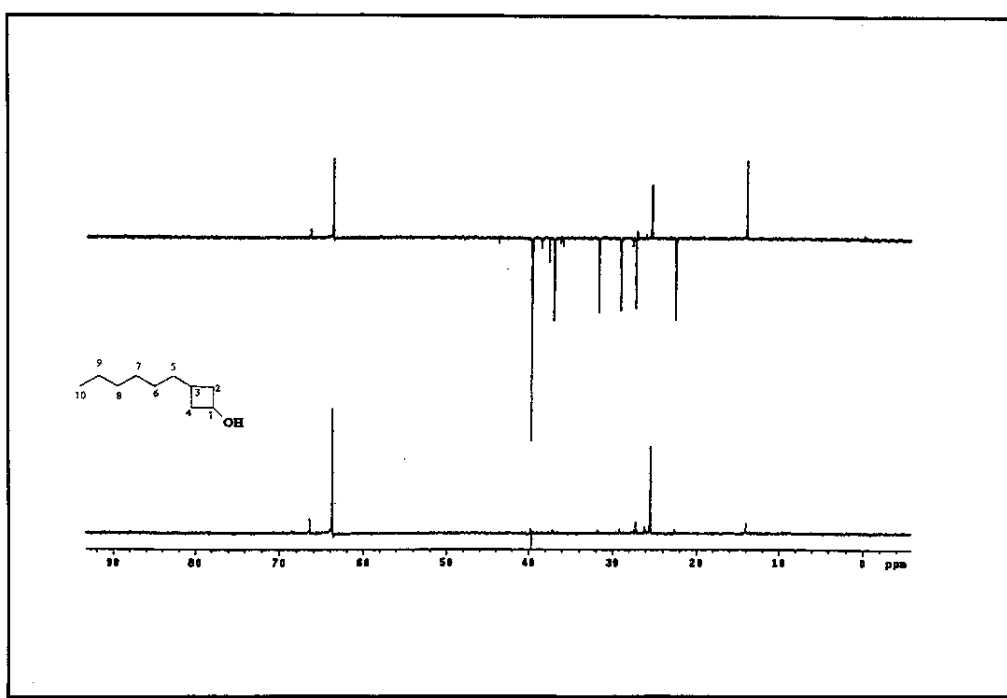
E48 – Espectro de massas (IE, 70 eV), do 3-hexil-1-ciclobutanol (**25**).



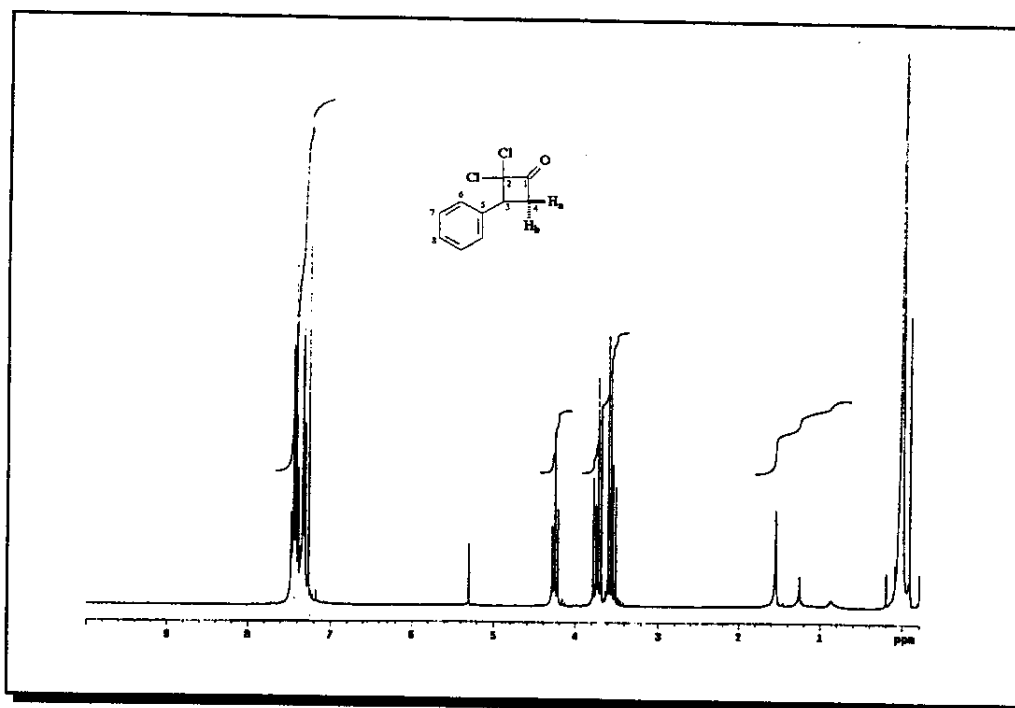
E49 – Espectro de RMN  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ), do 3-hexil-1-ciclobutanol (**25**).



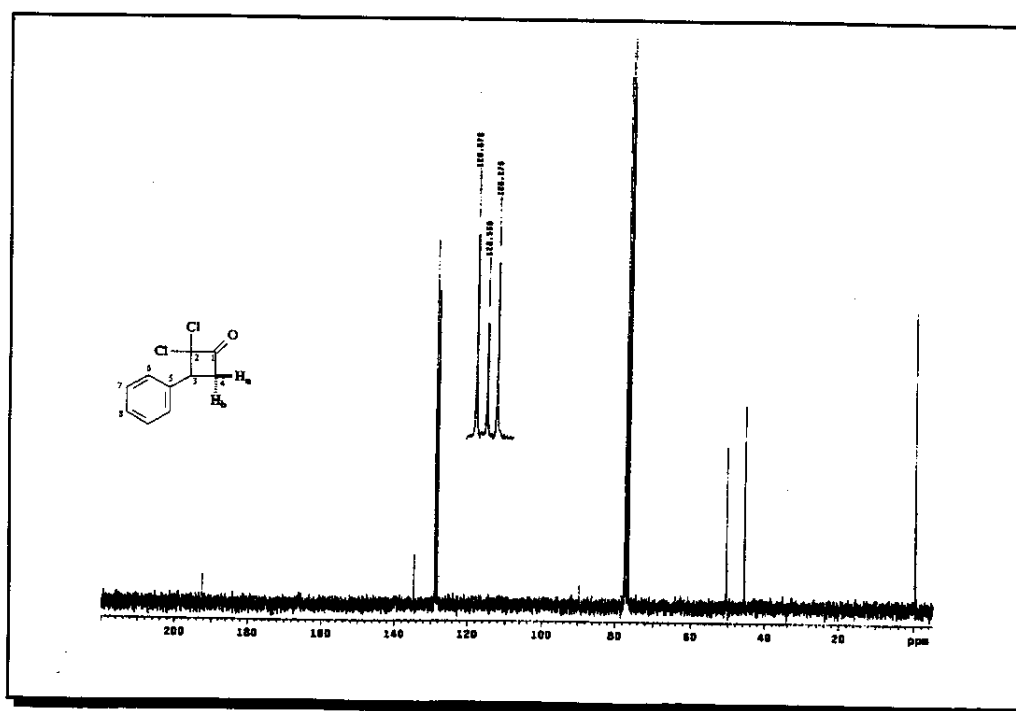
**E50** – Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (75,45 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ), do 3-hexil-1-ciclobutanol (**25**).



**E51** – Espectro de DEPT 90 e 135 (75,45 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) do 3-hexil-1-ciclobutanol (**25**).

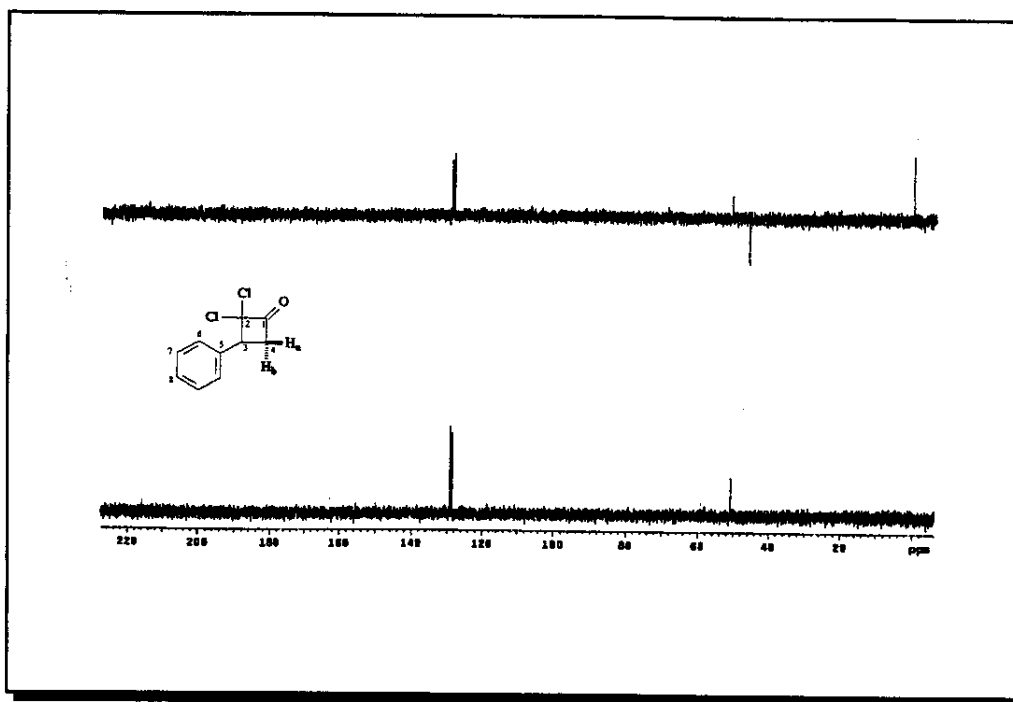


**E52** – Espectro de RMN  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ), da 2,2-dicloro-3-fenil-1-ciclobutanona (**19**).

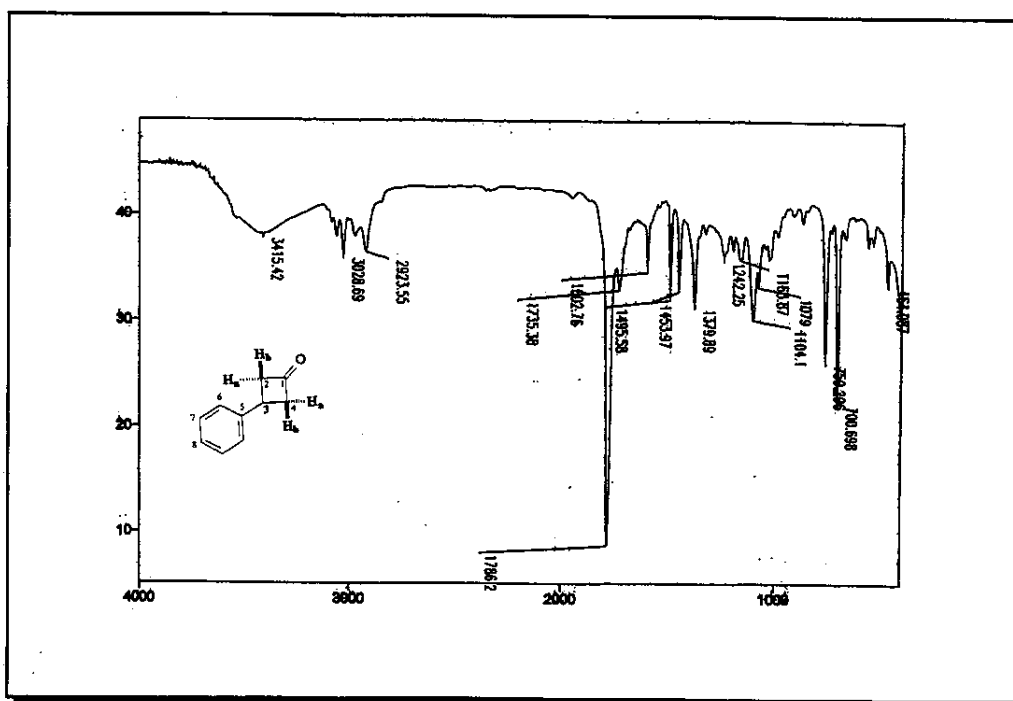


**E53** – Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (75,45 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ), da 2,2-dicloro-3-fenil-1-ciclobutanona (**19**).

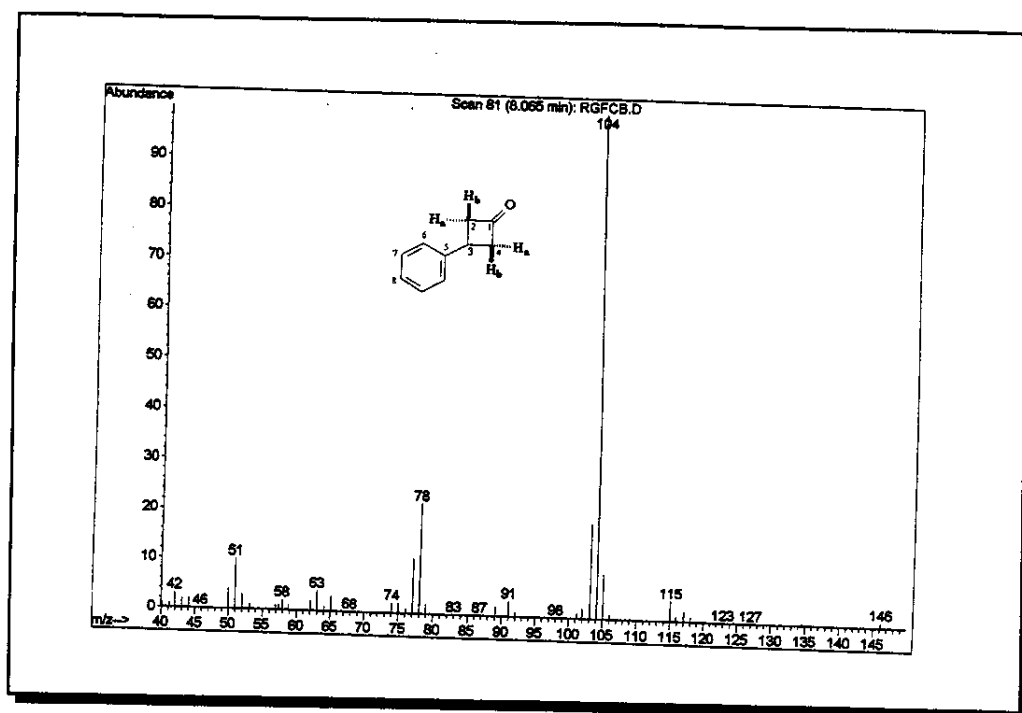




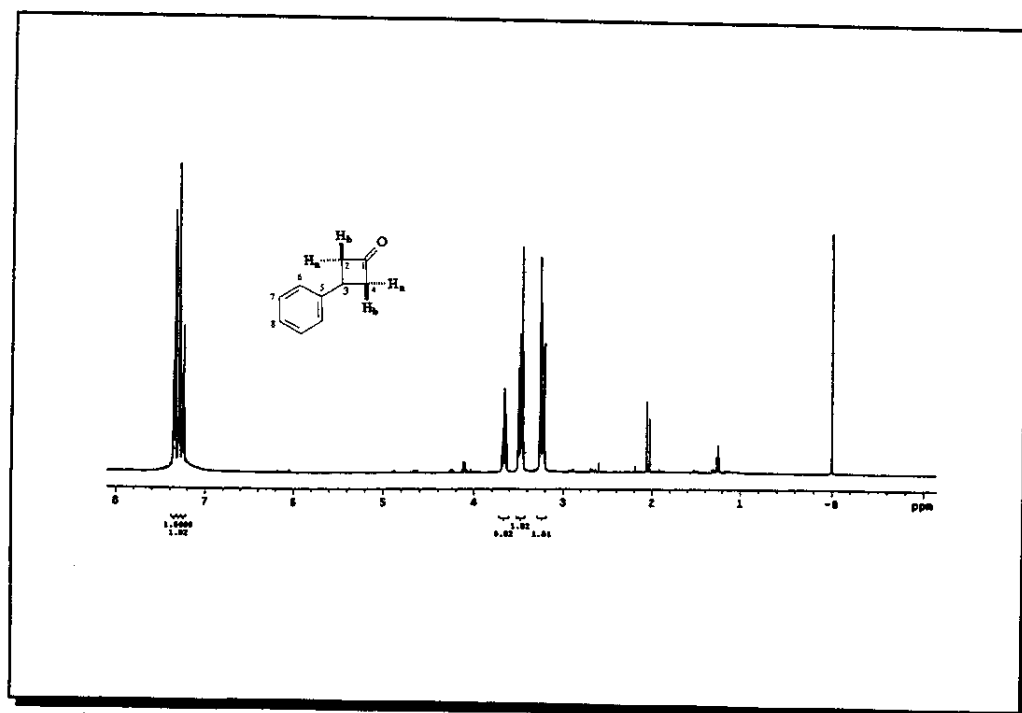
E54 – Espectro de DEPT 90 e 135 (75,45 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) da 2,2-dicloro-3-fenil-1-ciclobutanona (**19**).



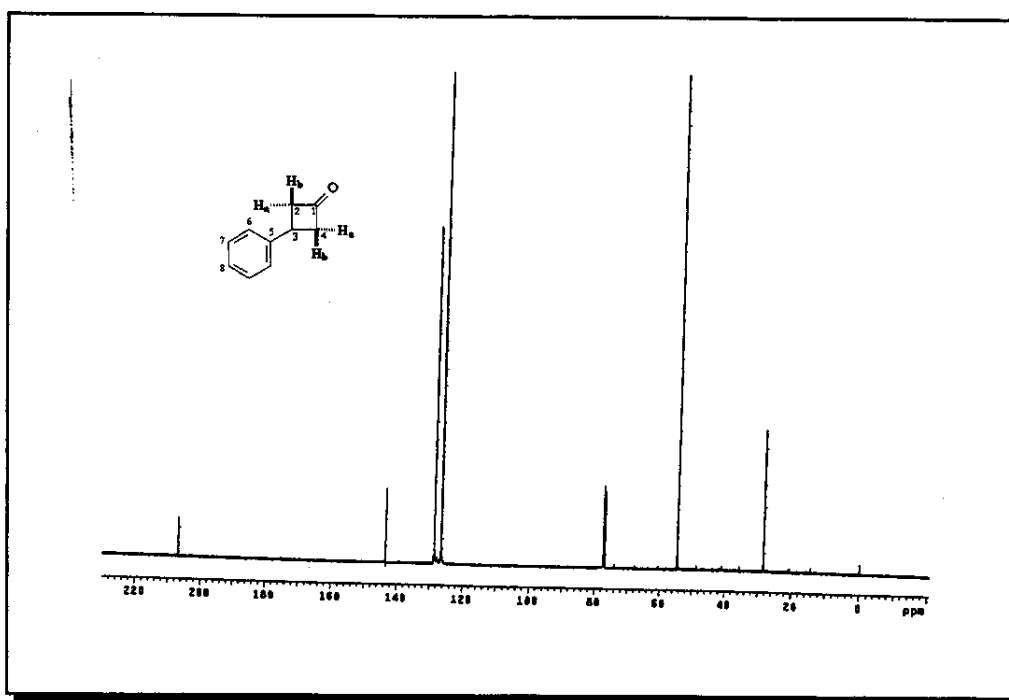
E55 – Espectro na região do infravermelho (filme), do 3-fenil-1-ciclobutanona (**21**).



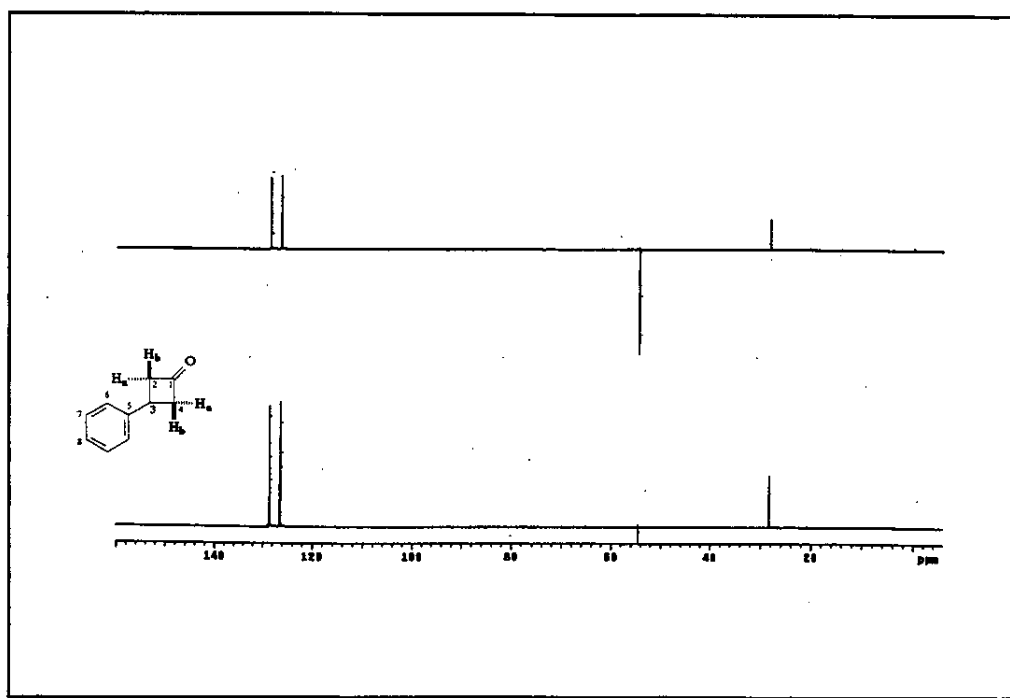
E56 – Espectro de massas (IE, 70 eV), do 3-fenil-1-ciclobutanona (**21**).



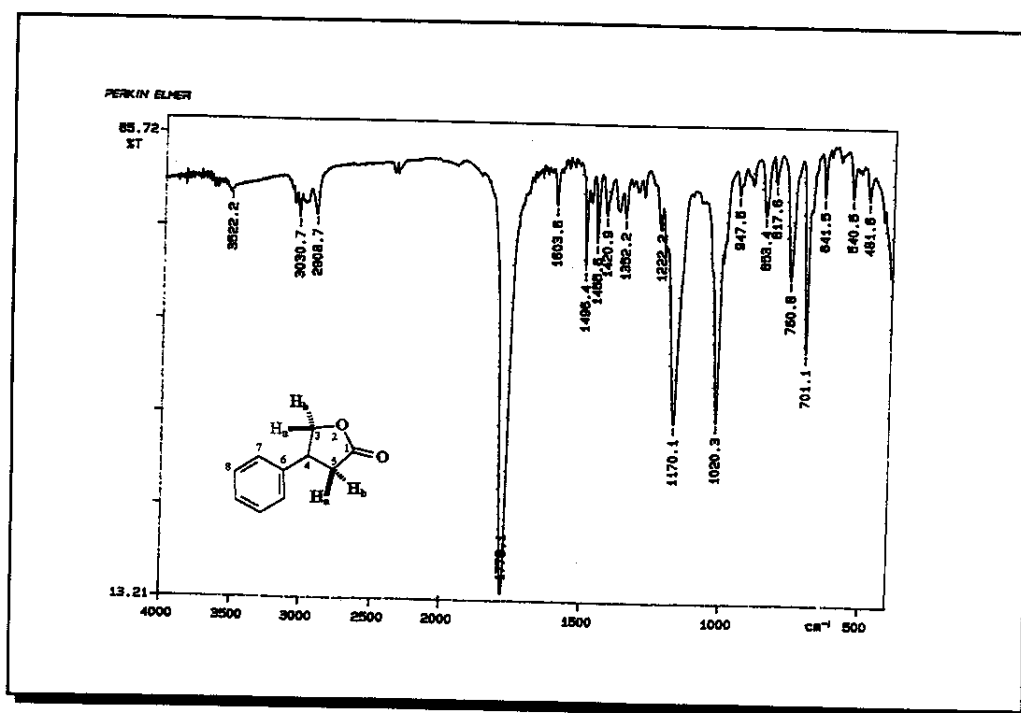
E57 – Espectro de RMN <sup>1</sup>H (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>), do 3-fenil-1-ciclobutanona (**21**).



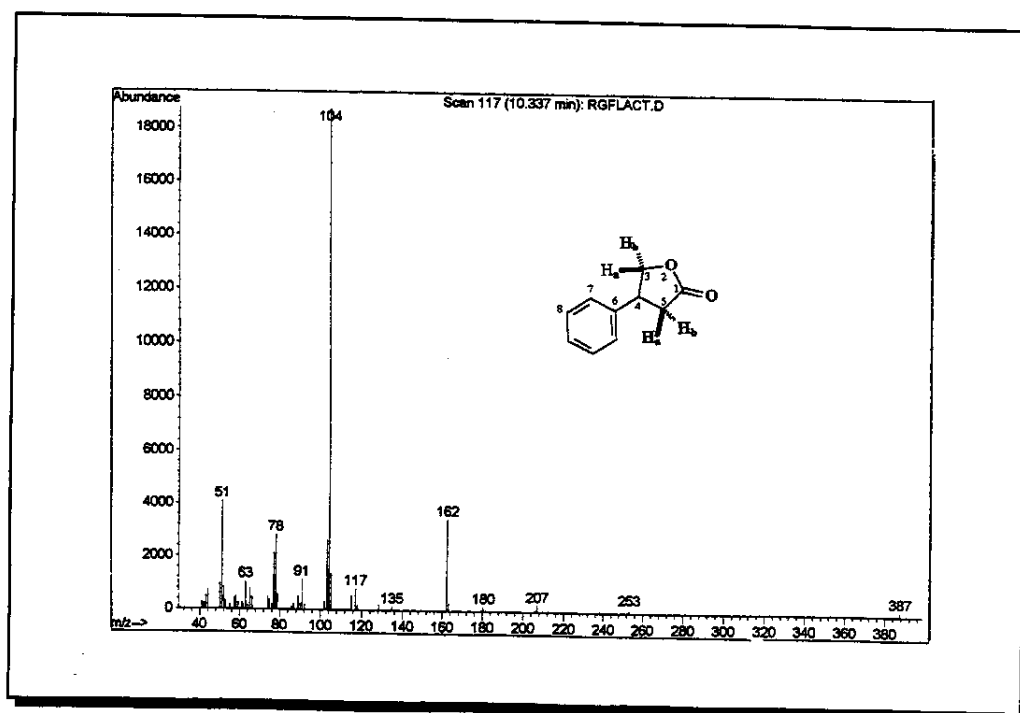
**E58** – Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (125,69 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ), do 3-fenil-1-ciclobutanona (**21**).



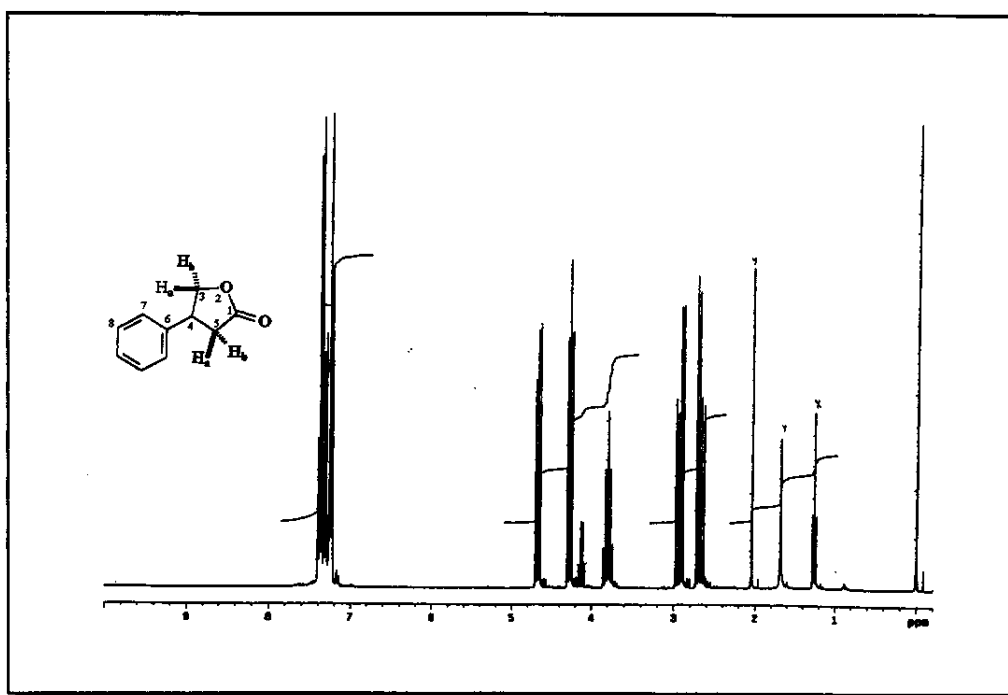
**E59** – Espectro de DEPT 90 e 135 (125,69 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) do 3-fenil-1-ciclobutanona (**21**).



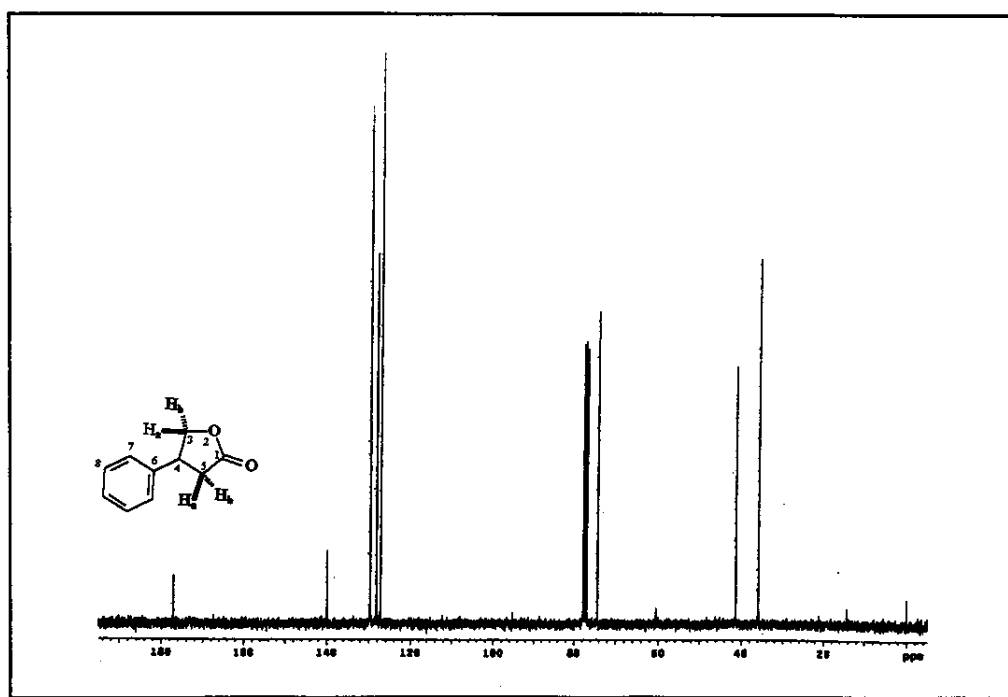
E60 – Espectro na região do infravermelho (filme), da 4-hexil-tetraidro-furanona (23).



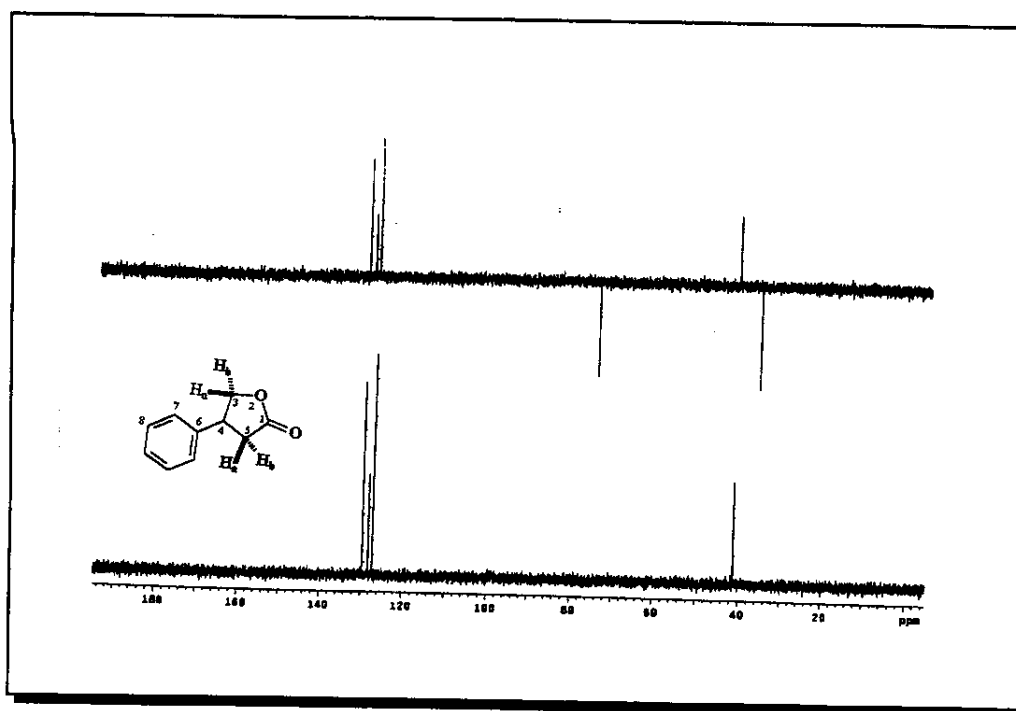
E61 – Espectro de massas (IE, 70 eV), da 4-hexil-tetraidro-furanona (23).



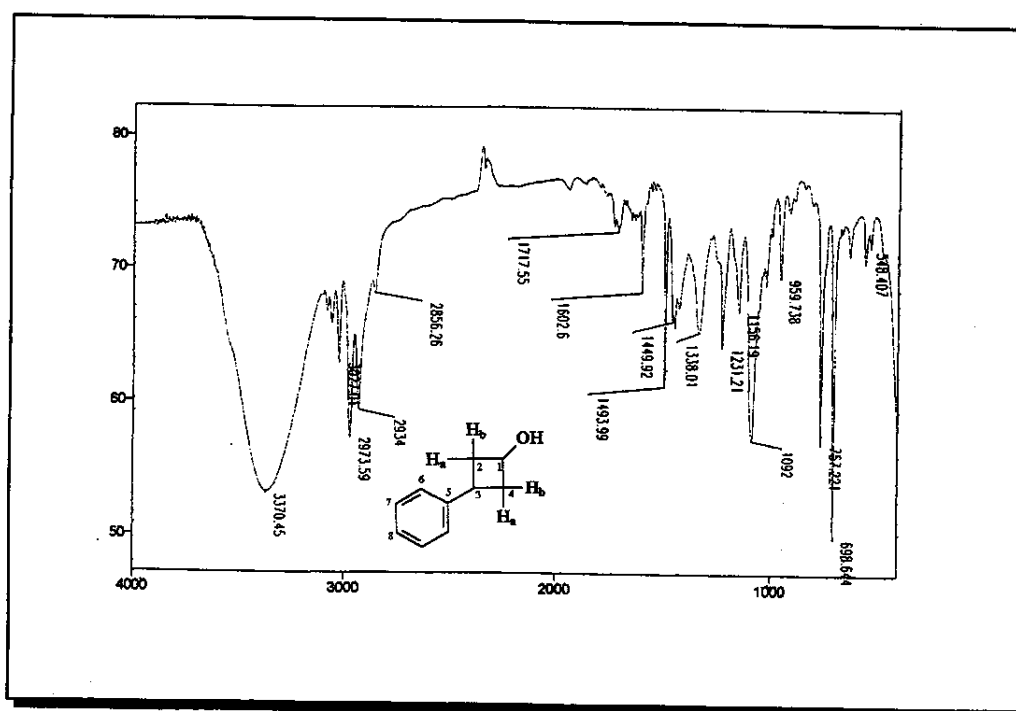
**E62** – Espectro de RMN  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ), da 4-hexil-tetraidro-furanona (**23**).



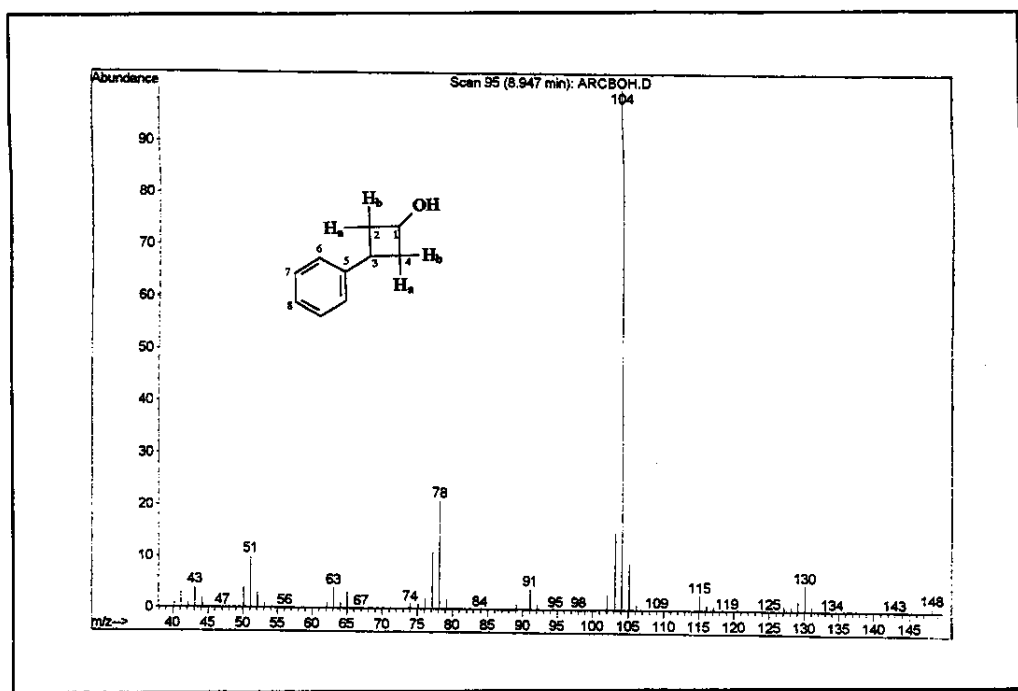
**E63** – Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (75,45 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ), da 4-hexil-tetraidro-furanona (**23**).



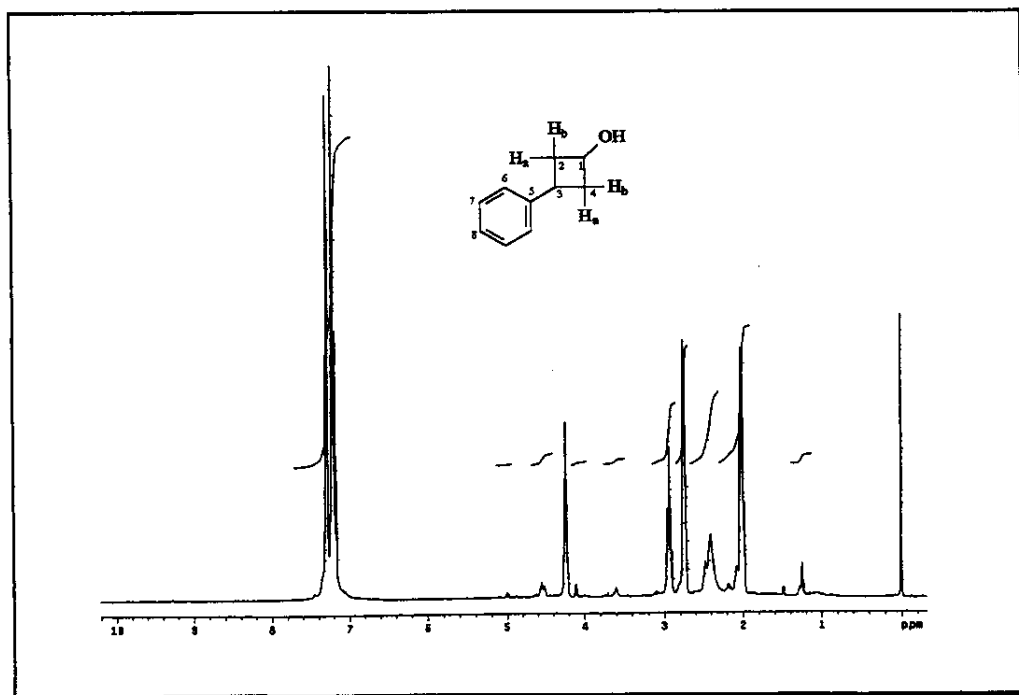
E64 – Espectro de DEPT 90 e 135 (75,45 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) da 4-hexil-tetraidro-furanona (**23**).



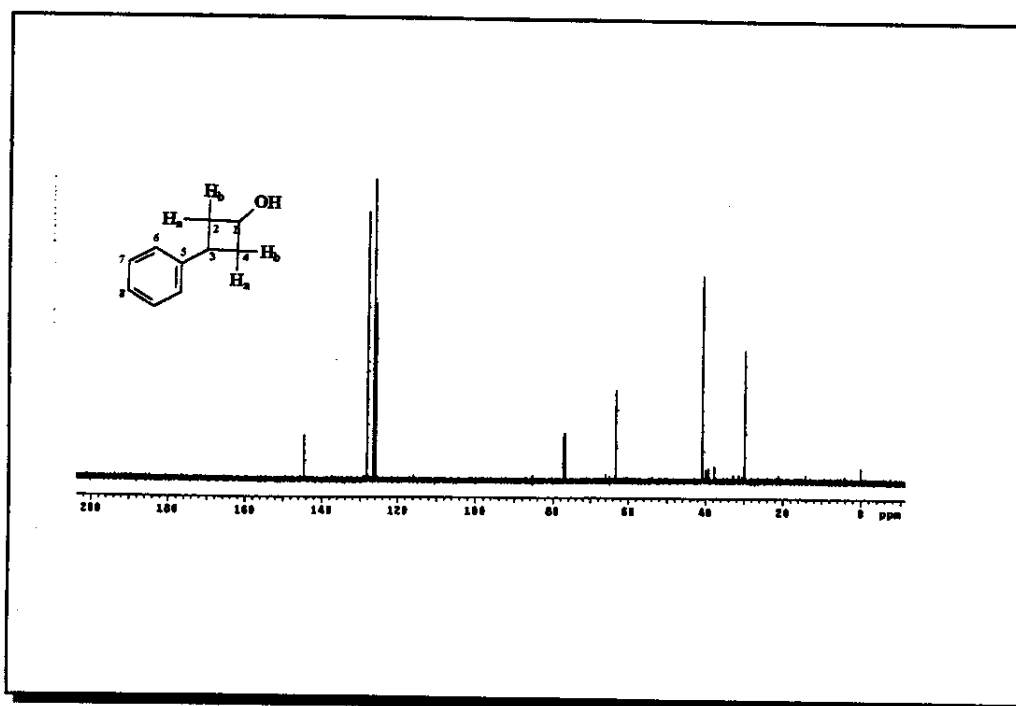
E65 – Espectro na região do infravermelho (filme), do 3-fenil-1-ciclobutanol (**26**).



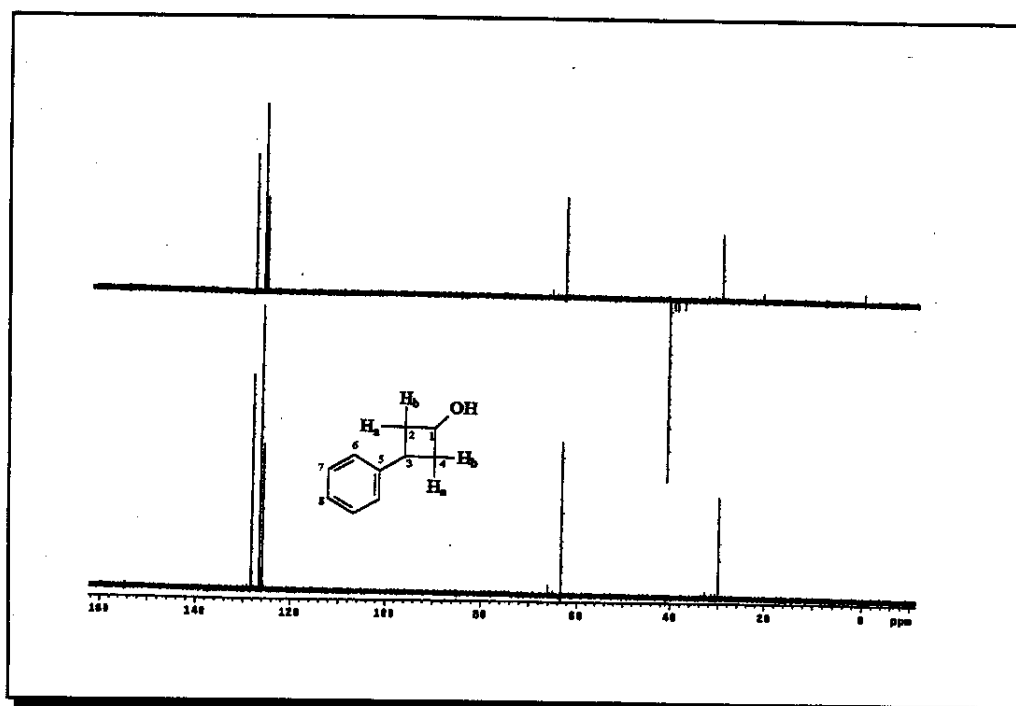
E66 – Espectro de massas (IE, 70 eV), do 3-fenil-1-ciclobutanol (**26**).



E67 – Espectro de RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ), do 3-fenil-1-ciclobutanol (**26**).

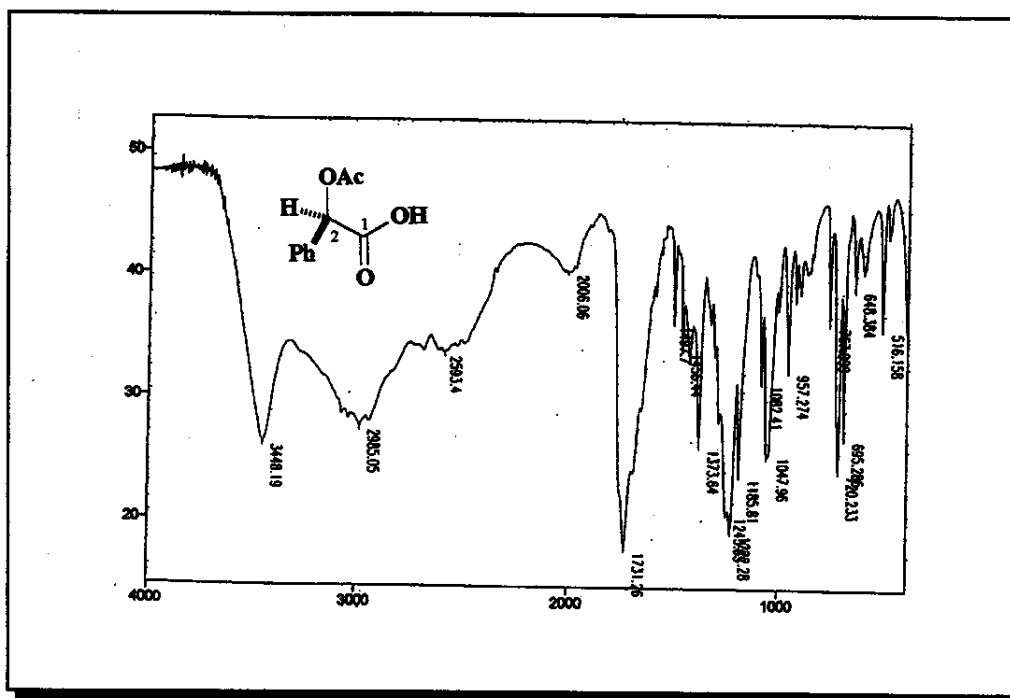


**E68** – Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (125,69 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ), do 3-fenil-1-ciclobutanol (**26**).

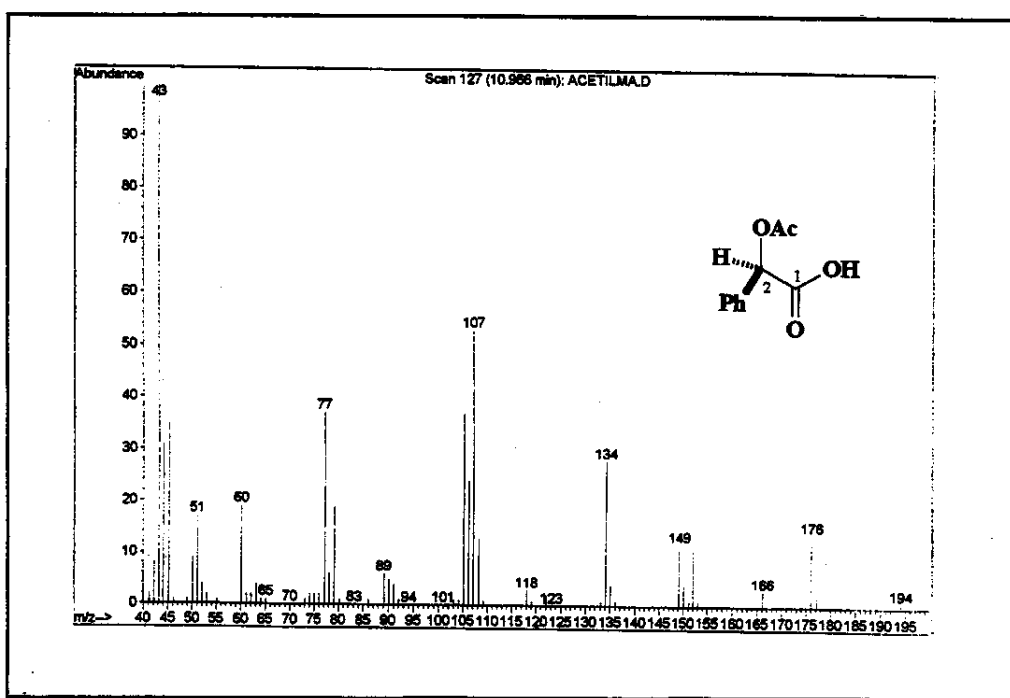


**E69** – Espectro de DEPT 90 e 135 (125,69 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) do 3-fenil-1-ciclobutanol (**26**).

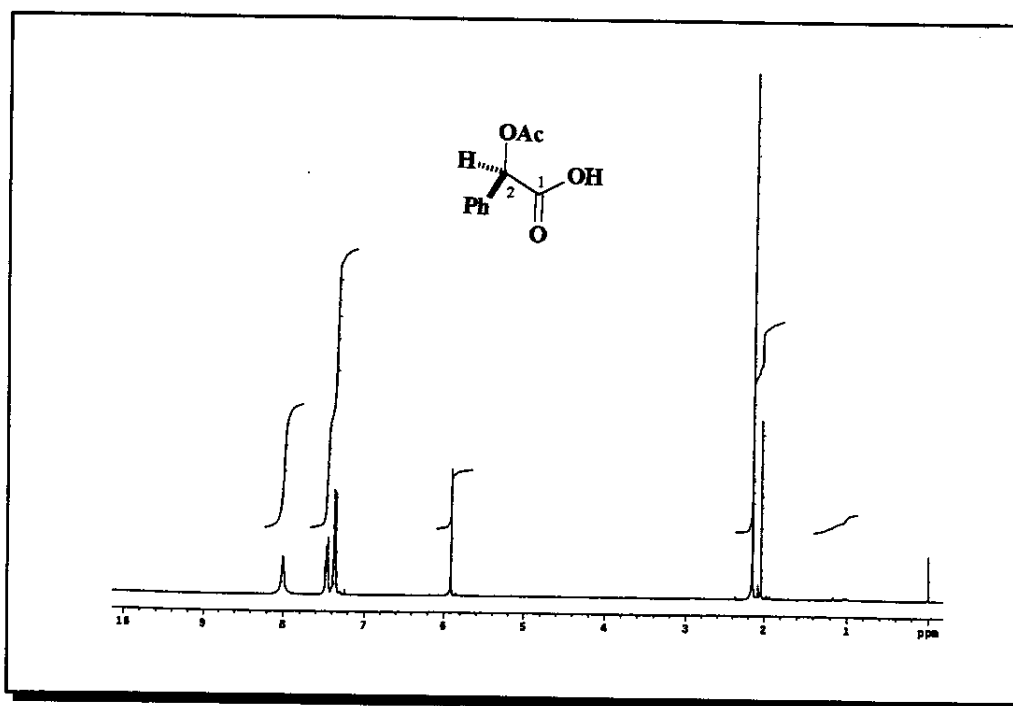




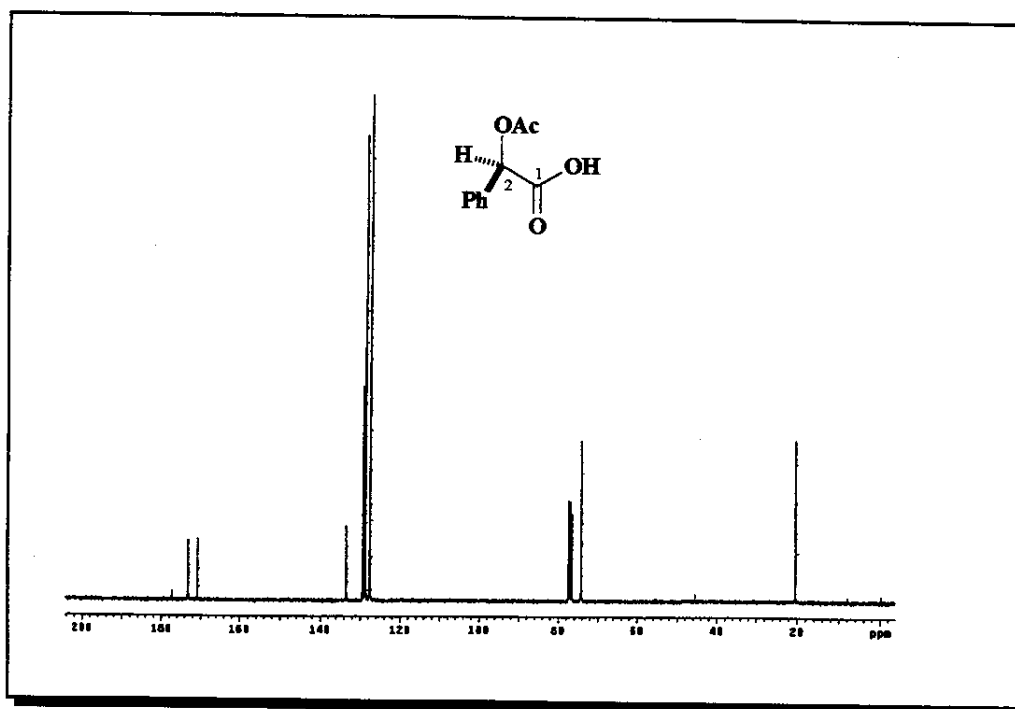
E70 – Espectro na região do infravermelho (filme), do ácido *R*-(-)-acetilmandélico.



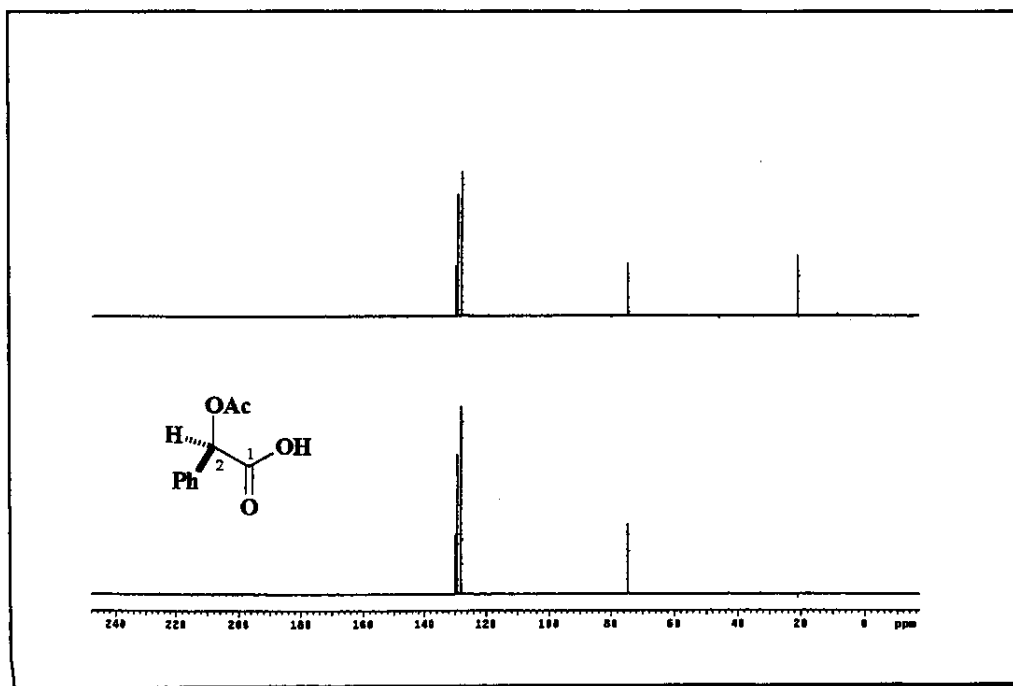
E71 – Espectro de massas (IE, 70 eV), do ácido *R*-(-)-acetilmandélico.



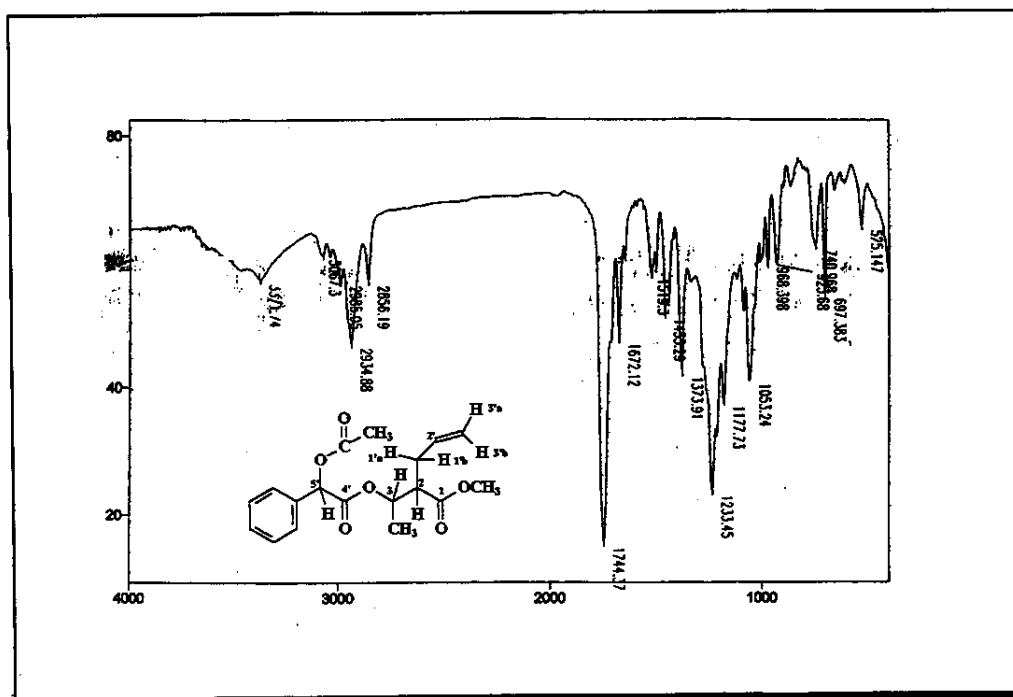
E72 – Espectro de RMN  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ), do ácido *R*-(-)-acetilmandélico.



E73 – Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (75,45 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ), do ácido *R*-(-)-acetilmandélico.

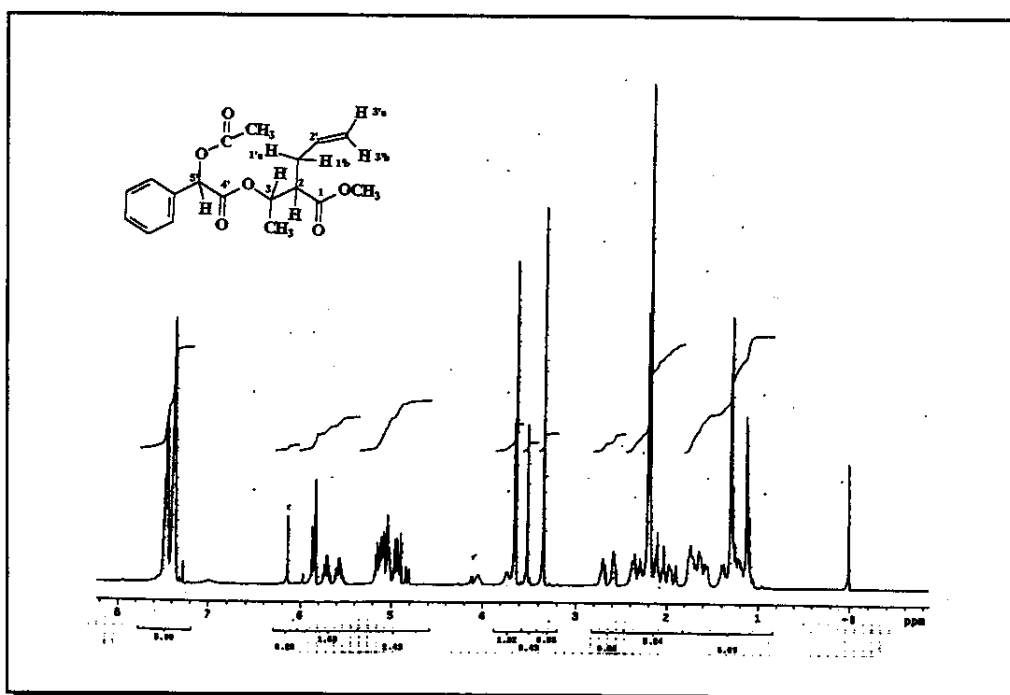


**E74** – Espectro de DEPT 90 e 135 (75,45 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) do ácido *R*-(-)-acetilmandélico.

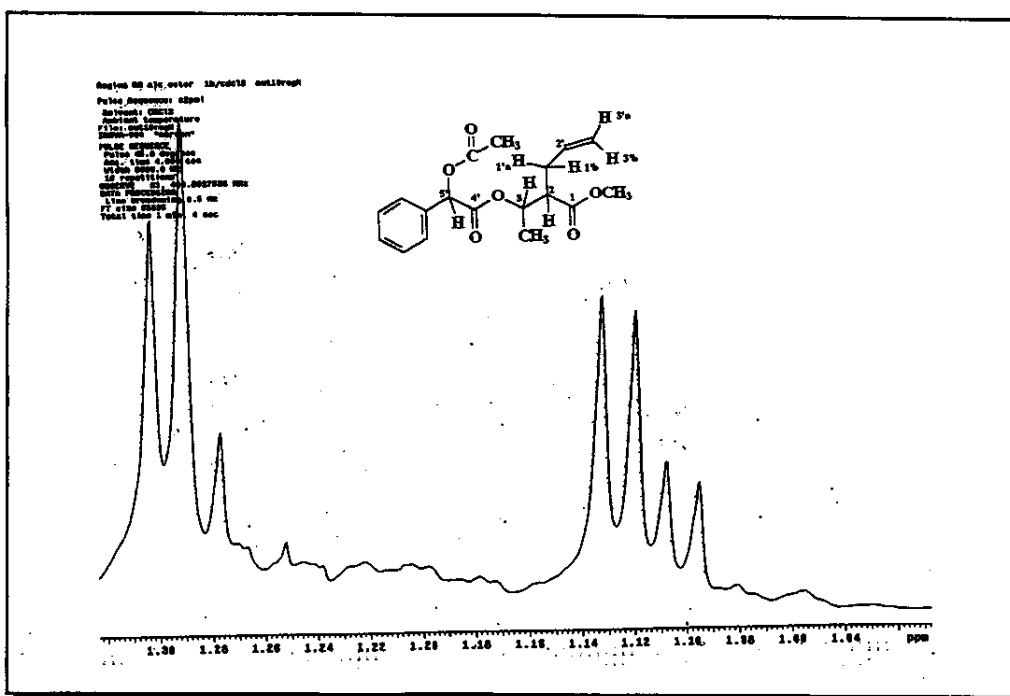


**E75** – Espectro na região do infravermelho (filme), de uma mistura 1:2 dos álcoois (+) **16a** e (+) **16b** derivado com o ácido *R*-(-)-acetilmandélico.

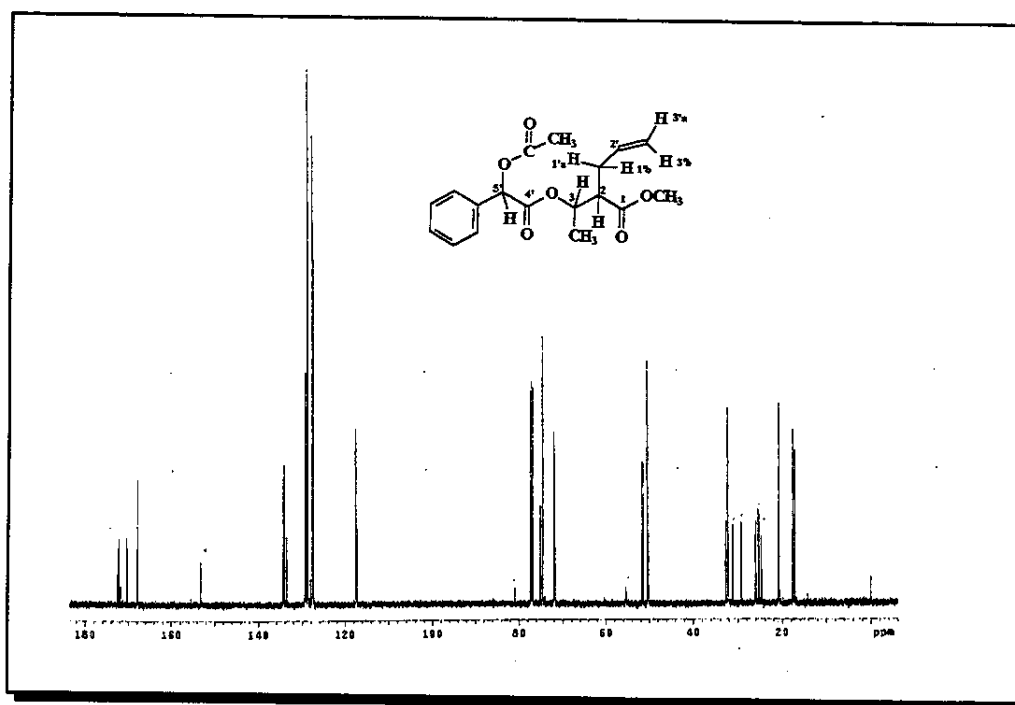




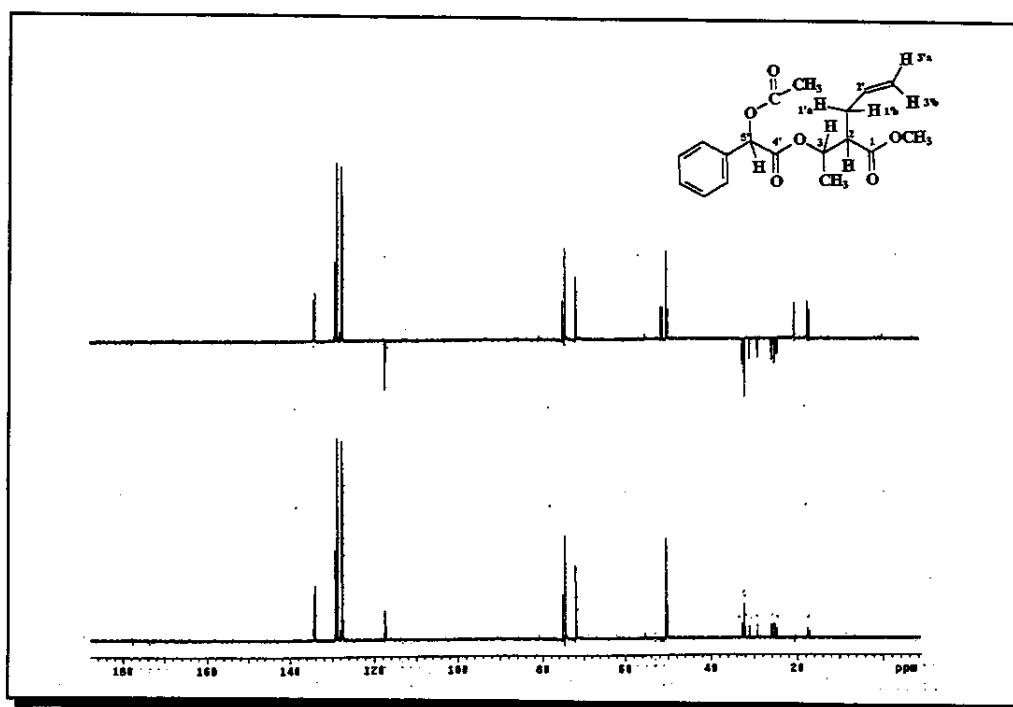
E78 – Espectro de RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ), de uma mistura 1:2 dos álcoois ( $\pm$ ) **16a** e ( $\pm$ ) **16b** derivado com o ácido *R*-(-)-acetilmandélico.



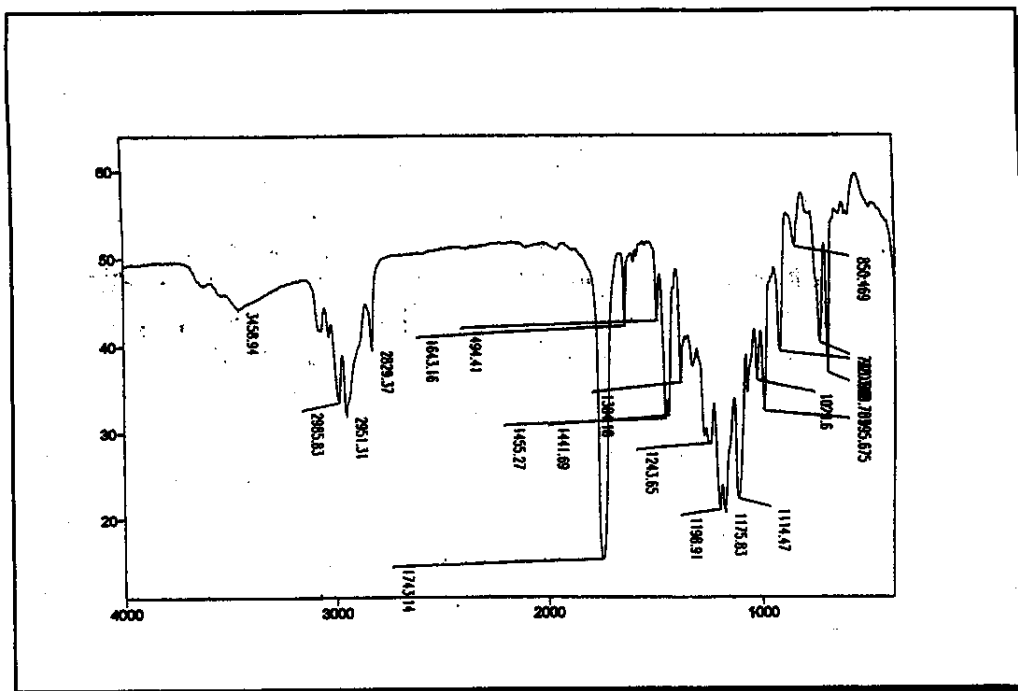
E78a – Expansão do espectro E78, na região entre  $\delta$  1,08 e 1,32.



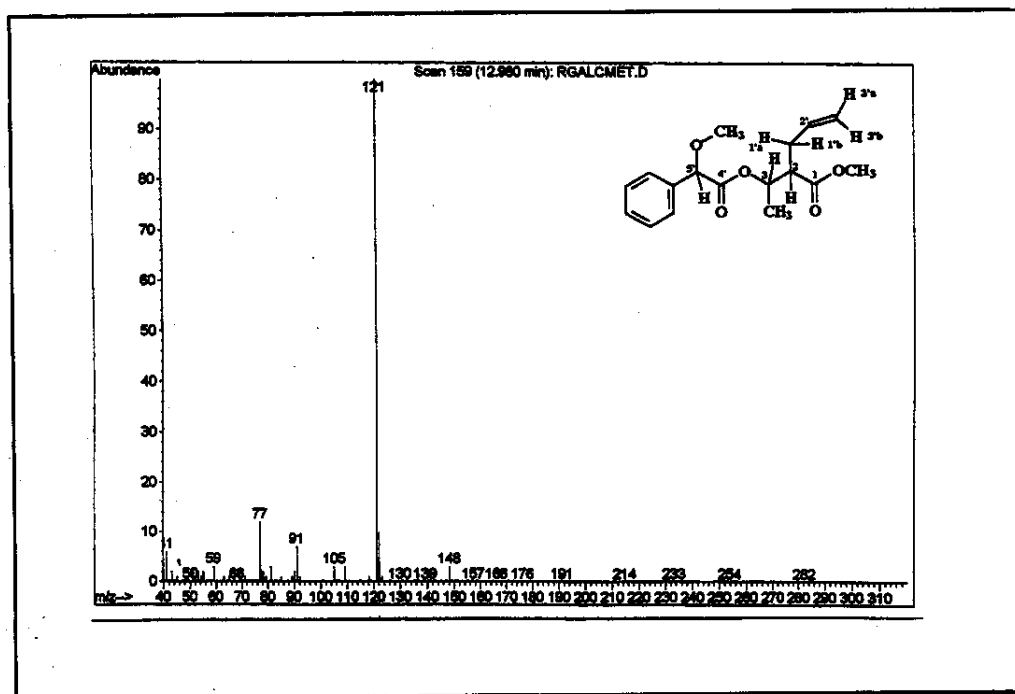
**E79** – Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (125,69 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ), de uma mistura 1:2 dos álcoois (+) **16a** e (+) **16b** derivado com o ácido *R*-(-)-acetilmandélico.



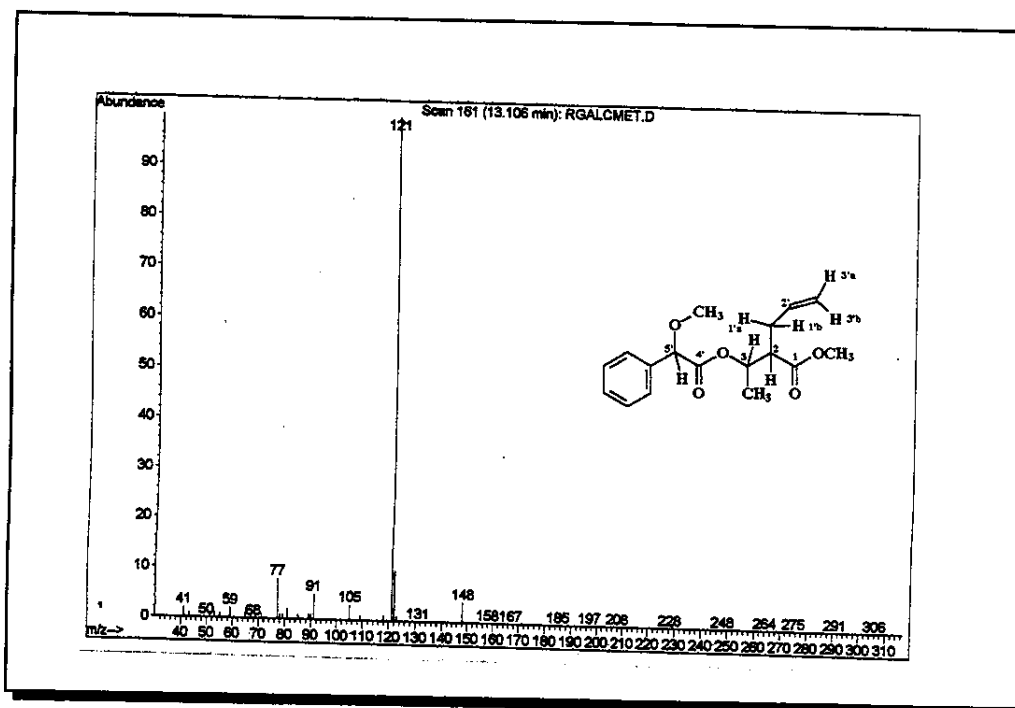
**E80** – Espectro de DEPT 90 e 135 (125,69 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de uma mistura 1:2 dos álcoois (+) **16a** e (+) **16b** derivado com o ácido *R*-(-)-acetilmandélico.



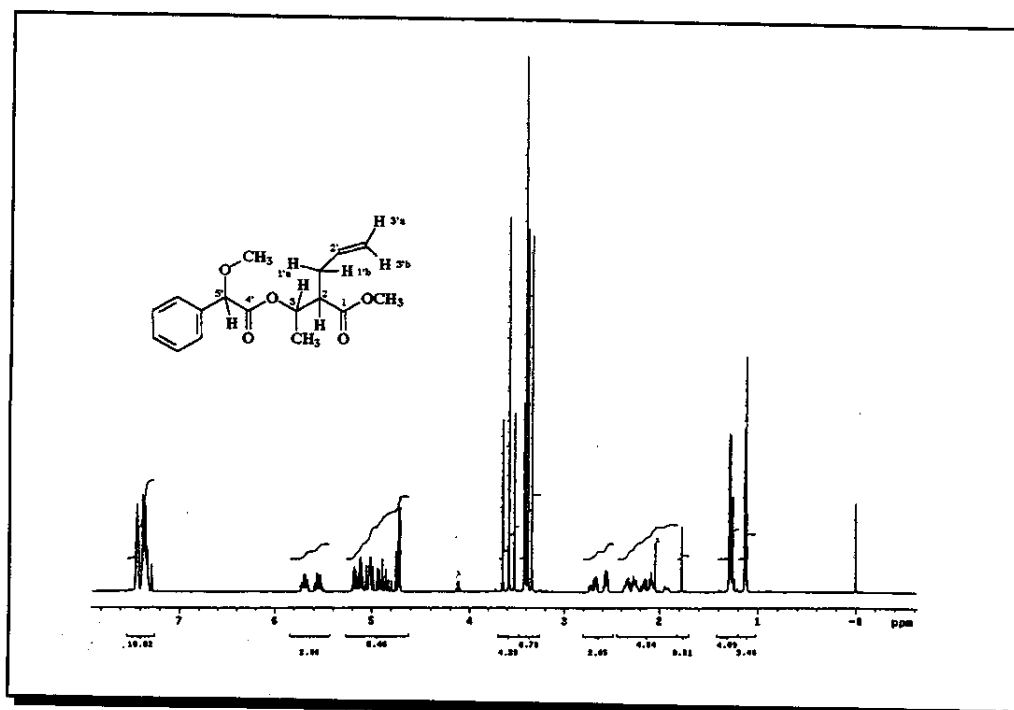
**E81** – Espectro na região do infravermelho (filme), de uma mistura 1:2 dos álcoois (+) **16a** e (+) **16b** derivado com o ácido S-(+)-metoxifenil acético.



**E82** – Espectro de massas (IE, 70 eV), do álcool (+) **16a** derivado com o ácido S-(+)-metoxifenil acético.

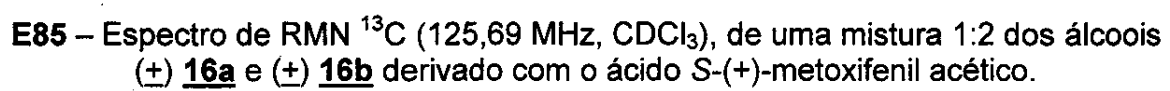


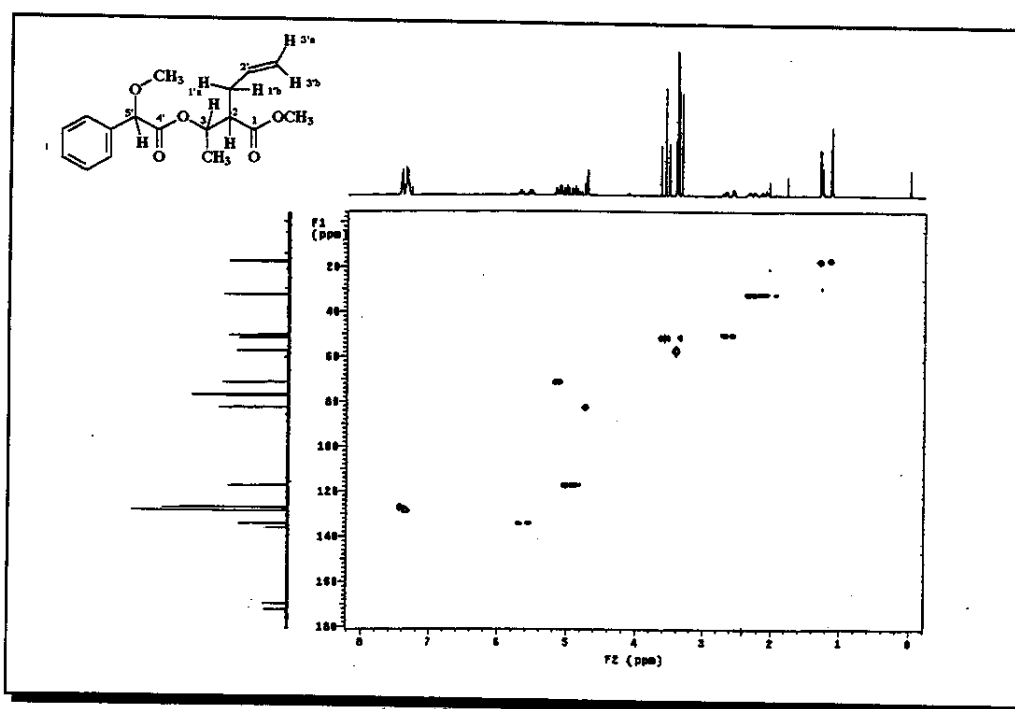
**E83** – Espectro de massas (IE, 70 eV), de uma mistura 1:2 do álcool (+) **16b** derivado com o ácido S-(+)-metoxifenil acético.



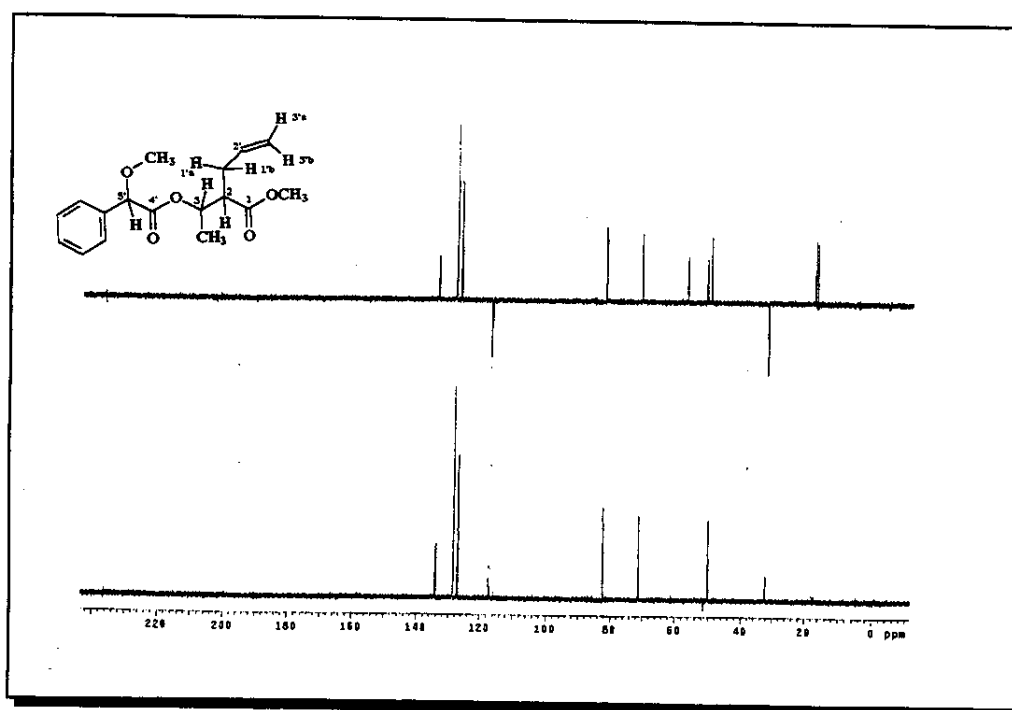
**E84** – Espectro de RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ), de uma mistura 1:2 dos álcoois (+) **16a** e (+) **16b** derivado com o ácido S-(+)-metoxifenil acético.







**E85a** – Espectro de HSQC  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) de uma mistura 1:2 dos álcoois (+) **16a** e (+) **16b** derivado com o ácido S-(+)-metoxifenil acético.



**E86** – Espectro de DEPT 90 e 135 (125,69 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de uma mistura 1:2 dos álcoois (+) **16a** e (+) **16b** derivado com o ácido S-(+)-metoxifenil acético.