

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE QUÍMICA

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ORGÂNICA



“Aplicação de Triagem de Alto Desempenho na Investigação das Atividades Enzimáticas e Enantiosseletividades de Microrganismo Brasileiros”

Dissertação apresentada à Universidade Estadual de Campinas, como parte das exigências do curso de pós-graduação do Instituto de Química, para obtenção do título de Mestre em Química Orgânica

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Aluna: Simone Moraes Mantovani

Orientadora: Profa. Dra. Anita J. Marsaioli

Fevereiro/2007

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

M319a	Mantovani, Simone Moraes. Aplicação de triagem de alto desempenho na investigação das atividades enzimáticas e enantiosseletividades de microorganismos brasileiros. -- Campinas, SP: [s.n], 2007. Orientadora: Anita Jocelyne Marsaioli. Mestrado- Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Química. 1. Enantiosseletividade. 2. Estereoinversão. 3. Epóxido-hidrolases. 4. Esterases I. Marsaioli, Anita Jocelyne. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Química. III. Título.
-------	--

Título em inglês: Enzymatic activity and Quick E in hydrolases screening applying fluorescent probes.

Palavras-chaves em inglês: High-throughput screening, enantioselectivity, stereoinversion, epoxide hydrolase, esterases.

Área de concentração: Química Orgânica.

Titulação: Mestre em Química Orgânica

Banca examinadora: Profa. Anita Jocelyne Marsaioli (orientadora), Prof. Dr. Leandro Helgueira Andrade (USP-SP), Prof. Dr. Paulo José Samenho Moran (IQ-Unicamp), Suplentes: Prof. Dr. Antonio Cláudio Herrera Braga (IQ-Unicamp), Prof. Dr. Paulo Mitsuo Imamura (IQ-Unicamp), Prof. Dr. Denis Pires de Lima (UFMS)

Data de defesa: 27/02/2007

AGRADECIMENTOS

À Profa. Anita J. Marsaioli pela orientação, e especialmente pelo seu profissionalismo, incentivo, conduta, e entusiasmo durante esses dois anos.

À Dra. Luciana G. de Oliveira pela valiosa colaboração, paciência e amizade.

Aos Prof. do IQ, em especial ao Prof. Cláudio H. Braga e ao Prof. Roberto Hittner pelo aprendizado nas disciplinas de Orgânica Avançada e Métodos Físicos em química Orgânica, respectivamente. À Profa. Ljubica Tasic pela valiosa coordenação no programa estágio docente e mais uma vez à Profa. Anita pelo aprendizado durante a disciplina de Introdução à RMN de carbono-13.

Aos amigos e colegas do grupo: Adriana, Armando, Cabeça, Carlinha, Diego, Eduardo, Ísis, Georgiana, Letícia, Lu Chen, Luciana, Lucimar, Marcela, Sergio e Susan pela amizade e agradável convivência.

Aos colegas de outros grupos: Adriano, Alessandra, Cíntia e Humberto, Duda, Márcio, Socorro.

À D. Maria pelos valiosos serviços prestados e pelo carinho e alegria com que sempre nos tratou.

À todos os funcionários do IQ-UNICAMP pelos serviços prestados, em especial ao pessoal da sala de ressonância.

Aos meus queridos pais Eneas e Rita e meus irmãos Sabrina e Samuel pelo apoio e carinho durante toda a vida.

Aos amigos de Araraquarenses Lili, Mari, Fer e Dieguinho, e às grandes amigas riopardenses, pelos felizes momentos juntos.

Ao meu Amor, pelo carinho, amizade, incentivo e compreensão nos momentos estressantes, e pela paciência, não muito grande, mas valiosa. Além, é claro, das ótimas cachaçadas.

E a todos que contribuíram de alguma forma para a realização desse trabalho.

Obrigada!

Curriculum Vitae

SIMONE MORAES MANTOVANI

1. Formação Acadêmica

- 2005-2007 Instituto de Química- UNICAMP
Mestrado em Química Orgânica
Projeto: Aplicação de triagem de Alto desempenho na avaliação das atividades enzimáticas e enantiosseletividades de microrganismos brasileiros.
Orientador: Profa. Dra. Anita Jocelyne Marsaioli
- 2001-2004 Instituto de Química- UNESP
Bacharelado em Química

2. Resumo do trabalho científico apresentado em congresso

1. MANTOVANI, S. M.; Vasconcelos, S. P.; Oliveira, L. G.; Cruz, G. F.; Marsaioli, A. J. "High throughput screening for detection of hydrolytic enzymes in Brazilian microorganisms". *16th International Conference on Organic Synthesis*, **2006**, Yucatán - México. Abstract book.
2. Cruz, G. F.; Vasconcelos, S. P.; Oliveira, L. G.; MANTOVANI, S. M.; Marsaioli, A. J. " Fluorescence-based assays for detect Baeyer-Villiger monooxygenases in Brazilian microorganisms". *16th International Conference on Organic Synthesis*, **2006**, Yucatán - México. Abstract book.
3. Marsaioli, A. J.; MANTOVANI, S. M.; Chen, L. S.; Oliveira, L. G.; Vasconcelos, S. P.; Cruz, G. F. "Utilização de triagem de Alto Desempenho para detecção de epóxido hidrolases em microrganismo brasileiros". *29ª Reunião Anual da SBQ*, **2006**, Águas de Lindóia - SP. Livro de resumos.
4. Vasconcelos, S. P.; Chen, L. S.; MANTOVANI, S. M.; Cruz, G. F.; Oliveira, V. M.; Santos neto, E. V.; Marsaioli, A. J. "Avaliação da atividade de epóxido hidrolases de microrganismos do petróleo da Bacia de Campos, RJ". *III Workshop de Biocatálise e II Encuentro Regional de Biocatálisis y Biotransformaciones*, **2006**, São Paulo - SP. Livro de resumos.
5. Vasconcelos, S. P.; MANTOVANI, S. M.; Cruz, G. F.; Oliveira, L. G.; Chen, L. S.; Oliveira, V. M.; Santos neto, E. V.; Marsaioli, A. J. "Ensaio de Triagem de Alto Desempenho para a detecção de esterases e lipases em

bactérias do petróleo da Bacia Campos, RJ". *III Workshop de Biocatálise e II Encuentro Regional de Biocatálisis y Biotransformaciones*, **2006**, São Paulo - SP. Apresentação Oral e pôster.

6. Vasconcelos, S. P.; MANTOVANI, S. M.; Cruz, G. F.; Reymond, J. L.; Sicard, R.; Oliveira, V. M.; Santos neto, E. V.; Marsaioli, A. J "Detecção de Baeyer-Villiger monooxigenases em microrganismos de petróleo da Bacia de Campos, RJ". *III Workshop de Biocatálise e II Encuentro Regional de Biocatálisis y Biotransformaciones*, **2006**, São Paulo - SP. Livro de resumos.
7. MANTOVANI, S. M.; Mattoso, E.; Figueira, G. M.; Magalhães, P. M.; Pereira, B.; da Silva, D.; Marsaioli, A. J. "Avaliação química de espécies do gênero *Mentha* da coleção de plantas medicinais e aromáticas do CPQBA-UNICAMP". *III Simpósio Brasileiro de Óleos Essenciais*, **2005**, Campinas - SP. Livro de resumos.

3. Estágios

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

Local: Instituto de Química - UNICAMP

Orientador: Ljubica Tasic

Disciplina: QO 422

Período: 08-12 2005

RESUMO

Nas últimas décadas as reações utilizando biocatalisadores tem sido amplamente aplicadas na síntese orgânica, como componentes chave de muitos processos químicos industriais, levando ao aumento na demanda por novas enzimas. A maneira mais rápida e simples de detectar enzimas é através de metodologias de triagem de alto desempenho (HTS) que permitam identificação rápida da atividade enzimática, como por exemplo, os ensaios utilizando compostos fluorogênicos e cromogênicos. Nesse trabalho nós aplicamos HTS baseado em substratos fluorogênicos para detecção de epóxido-hidrolases e esterases em microrganismos brasileiros. Inicialmente foram selecionados cinco microrganismos com alta atividade epóxido-hidrolase, e 18 pela presença de esterases. Inspirados nesse princípio nós adaptamos a metodologia conhecida como "Quick E" para a avaliação rápida das enantiosseletividades de epóxido-hidrolases em células íntegras através de medidas das velocidades iniciais de substratos fluorogênicos quirais avaliados separadamente com adição de um competidor. Os ensaios de enantiosseletividade mostraram que os experimentos com competidor apresentaram valores de enantiosseletividade muito próximos dos valores de *E* determinados via biocatálise convencional. Além disso, alguns microrganismos selecionados por HTS foram testados para reações de biotransformação frente a substratos de interesse sintético, o que permitiu, além da confirmação das atividades enzimáticas e seletividades observadas, detectar a capacidade do microrganismo *C. albicans* CCT 0776 de desracemizar álcoois secundários por estereoinversão, fornecendo o (S)-1,2-octanodiol com 100 % de rendimento teórico e ee > 99 %, e o (S)-4-fenilmetoxi-1,2-butanodiol com ee 45 %.

ABSTRACT

Since the past decades the biocatalysts have been applied in organic chemistry, as key components of many industrial chemical processes, thus increasing the demand for novel enzymes. High-Throughput Screening (HTS), using fluorogenic probes are among the best assays to discovery new enzymes, easily adapted to whole cells format. In this work, have been applied fluorogenic probes to screen epoxide hydrolases and esterases in Brazilian Collection Cultures of microorganisms, which allowed to detect epoxide hydrolases in five microorganisms, and esterases in 18 microorganisms. Additionally, were used chiral probes to implement a Quick *E* assay, for a fast valuation of epoxide hydrolases enantioselectivity by measuring initial rates of pure enantiomers. Optimization of the methodology revealed that almost true *E* were obtained by competitive experiments of each enantiomer and a substrate of similar reactivity. The quick *E* assay was validated by determining conversion and ee using GC/MS and NMR (using mandelic acid derivatives) and is now a new method to determine the enantiomeric ratio for epoxide hidrolases. Finally, the outstanding HTS results were better investigated by conventional catalysis detecting a stereoinversion process performed by *C. albicans* CCT 0776, which furnished (*S*)-1,2-octanodiol in 100 % theoretical yield and ee of 100%, and (*S*)-4-fenilmetoxi-1,2-butanodiol in ee of 45%.

ÍNDICE

LISTA DE TABELAS	XVII
LISTA DE FIGURAS	XIX
LISTA DE ESQUEMAS	XXIII
LISTA DE ESPECTROS	XXV
1.0. INTRODUÇÃO	1
1.1. HIDROLASES.....	4
1.1.1 <i>Epóxido-hidrolases</i>	4
1.1.2 <i>Esterases e lipases</i>	8
1.2. TRIAGEM DE ALTO DESEMPENHO	11
2.0. OBJETIVOS.....	13
3.0.TRIAGEM DE ALTO DESEMPENHO (HTS)	15
3.1. CONSIDERAÇÕES GERAIS	15
3.2. RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	22
3.2.1 <i>Epóxido-hidrolases</i>	22
3.2.2 <i>Esterases e lipases</i>	23
4. TESTE EM FORMATO HTS PARA MEDIDA DE ENANTIOSSELETIVIDADE DE EPÓXIDO-HIDROLASES "QUICK E"	29
4.1. CONSIDERAÇÕES GERAIS	29
4.2. ADAPTAÇÃO DO “QUICK E” COM CÉLULAS ÍNTEGRAS PARA DETECÇÃO DE EPÓXIDO- HIDROLASES ENANTIOSSELETIVAS	33
4.2.1 <i>Concentração de substrato fluorogênico e competidor</i>	33
4.2.1 <i>Otimização do competidor</i>	33
4.2.1 <i>Otimização do pH</i>	35
4.3. RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	36
5. REAÇÕES DE BIOTRANSFORMAÇÃO UTILIZANDO SUBSTRATOS NÃO FLUOROGÊNICOS.....	41

5.1 EPÓXIDO-HIDROLASES	41
5.2 ESTEREOINVERSÃO.....	47
5.2.1 <i>Considerações gerais</i>	47
5.2.2 <i>Resultados e discussões</i>	50
5.3. ESTERASES E LIPASES.....	59
6.0. CONCLUSÕES	67
7.0 PARTE EXPERIMENTAL	69
7.1. INSTRUMENTAÇÃO.....	69
7.1.1. <i>Métodos cromatográficos</i>	69
7.1.2. <i>Métodos espectrométricos de ressonância magnética nuclear (RMN)..</i>	70
7.1.3. <i>Métodos espectrofotométricos de fluorescência</i>	70
7.2. CÁLCULOS	71
7.3. REAGENTES E SOLVENTES	71
7.4. PROCEDIMENTOS GERAIS ADOTADOS NO LABORATÓRIO DE BIOCATÁLISE	71
7.5. MICRORGANISMOS UTILIZADOS NAS REAÇÕES DE BIOCATÁLISE	72
7.6. ENSAIOS DE TRIAGEM DE ALTO DESEMPENHO (HTS).....	72
7.7. TESTE EM FORMATO HTS PARA MEDIDA DE ENANTIOSELETIVIDADE	73
7.8. ENSAIOS DE BIOTRANSFORMAÇÃO CONVENCIONAIS	74
7.9. PREPARAÇÃO DE SOLUÇÕES TAMPÃO	74
7.9.1. <i>Solução tampão Sørensen (Na_2HPO_4 - KH_2PO_4)</i>	74
7.9.2. <i>Solução tampão borato</i>	75
7.10. PREPARAÇÃO DE SOLUÇÕES	75
7.10.1. <i>Solução das sondas fluorogênicas</i>	75
7.10.2. <i>Solução de periodato de sódio</i>	76
7.10.3. <i>Solução de BSA</i>	76
7.11. SÍNTESE DOS COMPOSTOS.....	76
7.11.1. <i>Síntese do ($\pm$)-4-fenilmetoxi-1,2-butanodiol (32)</i>	76
7.11.2. <i>Preparação do (S)-4-fenilmetoxi-1,2-butanodiol ((S)-32)</i>	78
7.11.4. <i>Preparação do feniletanol (48)</i>	82
7.11.5. <i>Preparação do acetato de feniletila (53)</i>	83

7.11.6. <i>Preparação do propionato de feniletila (54)</i>	83
7.11.7. <i>Preparação do octanoato de feniletila (55)</i>	84
8.0 ESPECTROS	85

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Biotransformações desenvolvidas por indústrias farmacêuticas	3
Tabela 2: Microrganismos investigados nas de triagens de alto desempenho	19
Tabela 3: Microrganismos isolados do solo de várzea de Silves (AM) ^a utilizados na avaliação das atividades enzimáticas por HTS	20
Tabela 4: Resumo dos ensaio enzimático para detecção de epóxido-hidrolases utilizando as sonda 20 e 21	22
Tabela 5: Ensaio enzimático para detecção de esterases e lipases	24
Tabela 6: Enantiosseletividades estimadas de algumas epóxido-hidrolases frente à sonda fluorogênicas quirais	367
Tabela 7: Reação de hidrólise do ($\pm$)-1,2-epoxioctano com <i>C. albicans</i> em tampão fosfato pH 7,0	42
Tabela 8: Valores de δ_H dos espectros de RMN 1H do 4-fenilmetoxi-1,2-butanodiol derivatizado com (S)-MPA resultantes da reação com o microrganismo <i>C.</i> <i>albicans</i> CCT 0776	52
Tabela 9: Acompanhamento da reação de estereoinversão do ($\pm$)-4-fenilmetoxi- 1,2-butanodiol pelo microrganismos <i>C. albicans</i> CCT 0776 por RMN 1H	54
Tabela 10: Valores de $\Delta\delta$ entre os substituintes majoritário e minoritário dos ésteres (S)-MPA	56
Tabela 11: Comparação da seletividade do substrato observada nos experimentos de HTS com os experimentos realizados por metodologias convencionais	61
Tabela 12: Reações de hidrólise do substrato acetilado 53, pelos microrganismos selecionados previamente nos ensaios de HTS	62
Tabela 13: Reações de hidrólise do substrato propionilado 54, pelos microrganismos selecionados previamente nos ensaios de HTS	63
Tabela 14: Solução Tampão Sørensen	75
Tabela 15: Solução Tampão ácido bórico- bórax	75

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Tipos de enzimas utilizadas em processos industriais.	2
Figura 2: Exemplos do uso de resoluções catalisadas por EH como processos chave na obtenção de compostos biologicamente ativos ¹⁶	8
Figura 3: Fenóis conjugados utilizados em substratos cromogênicos e fluorogênicos que na forma neutra são pouco coloridos e não-fluorescentes ²⁸	15
Figura 4: Substratos fluorogênicos e controles positivos para triagem de epóxido-hidrolases, esterases e lipases.	18
Figura 5: Curvas representativas de acompanhamento da cinética das reações nos ensaios de HTS baseados em fluorescência, onde CP é a curva representativa do controle positivo, E representa o ensaio enzimático, e CN representa a curva do controle negativo.	21
Figura 6: Acompanhamento da cinética de reação frente aos substratos EP1 e EP2 para a detecção de epóxido-hidrolases.	23
Figura 7: Acompanhamento da cinética de reação frente à sonda 22 para a detecção de hidrolases de acetatos (esterases).	25
Figura 8: Acompanhamento da cinética de reação frente à sonda 23 para a detecção de hidrolases de propionatos (esterases).	25
Figura 9: Variação da atividade enzimática com a variação do comprimento da cadeia acil.	26
Figura 10: Variação da atividade enzimática com a variação do comprimento da cadeia acil.	27
Figura 11: ^a Em um experimento real onde os enantiômeros são avaliados na mistura racêmica há competição entre eles pelo sítio ativo da enzima. ^b A análise dos enantiômeros separadamente ignora o efeito de competição entre eles. ^c A utilização de um competidor frente a cada um dos enantiômeros simula a competição entre eles levando a uma situação mais próxima do real.	31
Figura 12: Curva de calibração de umbeliferona em pH 7,2.	32

Figura 13: Sondas fluorogênicas quirais utilizadas nos testes de enantiosseletividade de epóxido-hidrolases.	32
Figura 14: Comparação entre o controle positivo 26 da sonda dissubstituída (21) com e sem a presença de competidor.	33
Figura 15: Sondas fluorogênicas quirais e competidores não-fluorogênicos utilizadas nos testes de enantiosseletividade de epóxido-hidrolases.	34
Figura 16: Cinética de reação dos microrganismos Ama 32 utilizando as sondas de epóxido-hidrolases 1,2-dissubstituída 21-(R,R) e 21-(S,S) com um competidor semelhante 28 e com competidor diferente 27.	35
Figura 17: Ensaio utilizando sonda fluorescente quiral frente ao microrganismo <i>E. nidulans</i> e ao 1,2-epóxi octano na forma racêmica e na forma enantiomericamente pura como competidor.	35
Figura 18: Cinética da hidrólise espontânea das sondas 20 e 21 com a variação do pH, e variação da intensidade de fluorescência do ânion umbeliferona em diferentes valores de pH.	36
Figura 19: Cinética de reação do microrganismos <i>A. niger</i> CCT 1435 utilizando sondas para detecção de epóxido-hidrolases enantiosseletiva utilizando o par de sondas 21-(R,R) e 21-(S,S) e na presença de competidor na razão 10:1 entre sonda e competidor.	37
Figura 20: Cinética de reação do microrganismos <i>C. albicans</i> CCT 0776 utilizando sondas para detecção de epóxido-hidrolases enantiosseletiva utilizando o par de sondas 20-(R) e 20-(S) e na presença de competidor na razão 10:1 entre sonda e competidor.	38
Figura 21: Expansão do espectro de RMN ¹ H (499,883 MHz, CDCl ₃) do produto da reação entre (±)-20 e <i>C. albicans</i> derivatizado com (S)-MPA.	39
Figura 22: Cromatograma (CG-FID) de uma amostra de (±)-1,2-epoxioctano fortalecido com o padrão comercial de (R)-1,2-epoxioctano (a) e (±)-1,2-octanodiol com co-injeção do (S)-1,2-octanodiol (b). Condições de análise: 40 ° C/ 15 min, rampa de 1 ° C/min até 55 ° C e 15 ° C/min até 180 ° C onde permaneceu constante por 5 min, T _{injetor} = 220 ° C, T _{detector} = 240 ° C e pressão	

constante de 10 psi. Coluna: Chrompack CD-Chirasil (25 m x 0,25 mm x 0,25 μ m).	41
Figura 23: a- Cromatograma de íons (CG-EM) da reação de <i>C. albicans</i> com ($\pm$)-1,2-epoxioctano após 4,0 h. b- Cromatograma de íons (CG-EM) da reação de <i>C. albicans</i> com ($\pm$)-1,2-epoxioctano após 4,0 h fortalecido com 1-hidroxi-2-octanona.....	43
Figura 24: Análise da reação de estereoinversão do ($\pm$)-1,2-octanodiol com <i>C. albicans</i> . a- alíquota no início da reação. b- alíquota após 15 h de reação. Condições de análise: 40 ° C/ 15 min, rampa de 10 ° C/min até 180 ° C onde permaneceu constante por 5 min, $T_{injetor}$ = 220 ° C, $T_{detector}$ = 240 ° C e pressão constante de 10 psi. Coluna: Chrompack CD-Chirasil (25 m x 0,25 mm x 0,25 μ m).	44
Figura 25: Num processo de estereoinversão o microrganismos é capaz de oxidar seletivamente o (<i>R</i>)-diol e posteriormente reduzir o intermediário aquiral fornecendo 100% do (<i>S</i>)-diol, em uma resolução cinética só é possível obter 50% do (<i>S</i>)- diol e 50% do produto da oxidação seletiva do (<i>R</i>)-diol.	44
Figura 26: Análise da reação de redução da 1-hidróxi-2-octanona com <i>C. albicans</i> . a- alíquota no início da reação. b- alíquota após 6 h de reação.c-alíquota após 18h de reação. Condições de análise: 40 ° C/ 15 min, rampa de 1 ° C/min até 55 ° C e 15 ° C/min até 180 ° C onde permaneceu constante por 5 min, $T_{injetor}$ = 220 ° C, $T_{detector}$ = 240 ° C e pressão constante de 10 psi. Coluna: Chrompack CD-Chirasil (25 m x 0,25 mm x 0,25 μ m).	45
Figura 27: Compostos com comprovada atividade biológica sintetizados à partir do 33 nas formas enantioméricamente puras (<i>R</i>) ou (<i>S</i>)......	50
Figura 28: Expansão do espectro de RMN ¹ H (499,883 MHz, CDCl ₃) a- ($\pm$)-4-fenilmetoxi-1,2-butanodiol derivatizado com (<i>S</i>)-MPA; b- alíquota após 24 h; c- alíquota após 48 h; d- alíquota após 72 h; X- pico de impureza do espectro .	53
Figura 29: Conformações predominates para ésteres (<i>S</i>)-MPA dos dois enantiômeros avaliados separadamente.....	55
Figura 30: Modelos conformacionais para ésteres (<i>S</i>)-MPA do composto 4-fenilmetoxi-1,2-butanodiol.	56

Figura 31: Espectros de RMN de ^1H (499,883 MHz, CDCl_3) a- do produto da reação do ($\pm$)-4-fenilmetoxi-1,2-butanodiol e <i>C. albicans</i> derivatizado com (S)-MPA, e b- (S)- 4-fenilmetoxi-1,2-butanodiol derivatizado com (S)-MPA.....	58
Figura 32: a – Cromatogramas (CG- FID) de a- 53, b- resolução cinética de 53 por Ame 8. Condições de análise: 40-180 ° C a 15 ° C / min, onde permaneceu constante por 5 min, $T_{\text{injetor}} = 220$ ° C, $T_{\text{detector}} = 240$ ° C, pressão constante de 10 psi. Coluna: Chrompack CD-Chirasil (25 m x 0,25 mm x 0,25 μm).	60
Figura 33: a – Cromatogramas (CG-FID) de a- 54, b- resolução cinética de 54 por Ame 8. Condições de análise: 40-180 ° C a 15 ° C / min, onde permaneceu constante por 5 min, $T_{\text{injetor}} = 220$ ° C, $T_{\text{detector}} = 240$ ° C, pressão constante de 10 psi. Coluna: Chrompack CD-Chirasil (25 m x 0,25 mm x 0,25 μm).	60
Figura 34: a – Cromatogramas (CG-FID) de a- 54, b- resolução cinética de 55 por Ame 8. Condições de análise: 40-180 ° C a 15 ° C / min, onde permaneceu constante por 5 min, $T_{\text{injetor}} = 220$ ° C, $T_{\text{detector}} = 240$ ° C, pressão constante de 10 psi. Coluna: Chrompack CD-Chirasil (25 m x 0,25 mm x 0,25 μm).	60
Figura 35: : a- resolução entre uma amostra de ($\pm$)-feniletano, b - e com co-injeção do padrão comercial de (R)-feniletano I. Condições de análise: 40-180 ° C a 15 ° C / min, onde permaneceu constante por 5 min, $T_{\text{injetor}} = 220$ ° C, $T_{\text{detector}} = 240$ ° C, pressão constante de 10 psi. Coluna: Chrompack CD-Chirasil (25 m x 0,25 mm x 0,25 μm).	64
Figura 36: Extensão da 'Regra de Prelog' indicando a hidrólise preferencial do éster com configuração-(R).	65

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1: Síntese do taxol (1) utilizando duas etapas enzimática. Na primeira etapa ocorre a acilação seletiva da hidroxila secundária de 1a na presença de termosilina bacteriológica produzindo 1b, que posteriormente sofre a hidrólise do éster vinílico terminal catalisado por lipase de <i>Candida antarctica</i>	2
Esquema 2: Representação esquemática do mecanismo de atuação da EH de <i>Agrobacterium radiobacter</i> ¹⁶	5
Esquema 3: Possibilidades estereoquímicas de EH. Se o ataque nucleofílico ocorrer na posição menos impedida (k_1) a configuração absoluta do diol formado será mantida, caso contrário (k_2) o diol formado terá configuração oposta.	6
Esquema 4: Se os dois enantiômeros do substrato sofrem hidrólise por duas enzimas com regiosseletividades diferentes ($k_2 \gg k_1$ e $k_4 \gg k_3$) um único enantiômero será formado.	6
Esquema 5: mecanismo de hidrolise catalisada por lipases e esterases.....	10
Esquema 6: Etapa retrossintética do precursor do hidrocloreto de (-)-Paroxetina.	10
Esquema 7: Preparação quimioenzimática do (S)-(+)-Zopiclone.	11
Esquema 8: Representação esquemática do ensaio fluorogênico para detecção de enzimas hidrolíticas.	16
Esquema 9: Ensaio baseado na leitura de fluorescência para avaliação da razão enantiomérica de epóxido-hidrolases.....	30
Esquema 10: Hidrólise de ($\pm$)-1,2-epoxioctano e posterior estereoinversão do (R)-1,2-octanodiol.....	43
Esquema 11: Desracemização. a- Por enantioconvergencia onde duas enzimas com seletividade oposta fornecem o mesmo produto. b- Por resolução cinética dinâmica onde uma racemase equilibra os enantiômeros do substrato. c- Por estereoinversão de somente um dos enantiômeros.....	48
Esquema 12: Reciclagem interna de cofatores na deracemização de álcoois secundários.	48

Esquema 13: Rota sintética para obtenção do (±)-4-fenilmetoxi-1,2-butanodiol. ..	50
Esquema 14: Rota sintética utilizada para obtenção do (S)-4-fenilmetoxi-1,2-butanodiol.....	57
Esquema 15: Rotas sintéticas para obtenção dos derivados esterificados do álcool metilbenzílico.....	59
Esquema 16: Hidrólise dos ésteres 53, 54 e 55 e posterior oxidação do álcool 48 formado preferencialmente.....	63

LISTA DE ESPECTROS

E 1: Espectro de massas (IE, 70 e V) da 1-hidróxi-2-octanona.....	85
E2: Espectro de RMN ^1H (499,88 MHz, CDCl_3) do 7-(3,4-di-hidróxi-butóxi)-2H-1-benzopiran-2-ona (CP1) derivatizado com (S)-MPA.....	85
E 3: Espectro de RMN de ^1H (499,88 Mz, CDCl_3) do ($\pm$)-4-fenilmetoxi-1,2-butanodiol.....	86
E 4: Espectro de RMN de ^{13}C (125,69 MHz, CDCl_3) do ($\pm$)-4-fenilmetoxi-1,2-butanodiol.....	87
E 5: Espectro de DEPT 90 e 135 ° (125,69 MHz, CDCl_3) do ($\pm$)-4-fenilmetoxi-1,2-butanodiol derivatizado com (S)-MPA.	87
E 6: Espectro de RMN de ^1H (499,88 Mz, CDCl_3) do (S)-4-fenilmetoxi-1,2-butanodiol.....	88
E 7 : Espectro de RMN de ^{13}C (125,69 MHz, CDCl_3) do (S)-4-fenilmetoxi-1,2-butanodiol.....	88
E 8: Espectro de DEPT 90 e 135 ° (125,69 MHz, CDCl_3) do ($\pm$)-4-fenilmetoxi-1,2-butanodiol.....	89
E 9: Espectro de RMN de ^1H (499,88 Mz, CDCl_3) do ($\pm$)-4-fenilmetoxi-1,2-butanodiol derivatizado com (S)-MPA.	89
E 10: Espectro de RMN de ^{13}C (125,69 MHz, CDCl_3) do ($\pm$)-4-fenilmetoxi-1,2-butanodiol derivatizado com (S)-MPA.	90
E 11: Espectro de DEPT 90 e 135 ° (125,69 MHz, CDCl_3) do ($\pm$)-4-fenilmetoxi-1,2-butanodiol derivatizado com (S)-MPA.	90
E 12: Espectro de RMN 2D (^1H e ^{13}C HSQC, 499,88 MHz, CDCl_3) do ($\pm$)-4-fenilmetoxi-1,2-butanodiol derivatizado com (S)-MPA.....	91
E 13: Espectro de RMN 2D (^1H e ^1H gCOSY, 499,88 MHz, CDCl_3) do ($\pm$)-4-fenilmetoxi-1,2-butanodiol derivatizado com (S)-MPA.....	91
E 14: Espectro de RMN de ^1H (499,88 MHz, CDCl_3) do (S)-4-fenilmetoxi-1,2-butanodiol derivatizado com (S)-MPA.	92
E 15: Espectro de RMN de ^{13}C (125,69 MHz, CDCl_3) do (S)-4-fenilmetoxi-1,2-butanodiol derivatizado com (S)-MPA.	92

E 16: Espectro DEPT 90 e 135 ° (125,69 MHz, CDCl ₃) do (S)-4-fenilmetoxi-1,2-butanodiol derivatizado com (S)-MPA.	93
E 17: Espectro de RMN 2D (¹ H e ¹³ C HSQC, CDCl ₃) do (S)-4-fenilmetoxi-1,2-butanodiol derivatizado com (S)-MPA.	93
E 18: Espectro de massas (IE, 70 e V) do feniletanol.	94
E 19: Espectro de RMN de ¹ H (300,07 MHz, CDCl ₃) do feniletanol.	94
E 20: Espectro DEPT 90 e 135 ° (75,45 MHz, CDCl ₃) do feniletanol.	95
E 21: Espectro de massas (IE, 70 e V) do acetato de feniletila.....	95
E 22: Espectro de RMN de ¹ H (300,07 MHz, CDCl ₃) do acetato de feniletila.....	96
E 23: Espectro de RMN de ¹³ C (75,45 MHz, CDCl ₃) do acetato de feniletila.	96
E 24: Espectro DEPT 90 e 135 ° (75,45 MHz, CDCl ₃) do acetato de feniletila.....	97
E 25: Espectro de massas (IE, 70 e V) do propionato de feniletila.....	97
E 26: Espectro de RMN de ¹ H (300,07 MHz, CDCl ₃) do propionato de feniletila. .	98
E 27: Espectro de RMN de ¹³ C (75,45 MHz, CDCl ₃) do propionato de feniletila. ..	98
E 28: Espectro DEPT 90 e 135 ° (75,45 MHz, CDCl ₃) do propionato de feniletila.	99
E 29: Espectro de massas (IE, 70 e V) do octanoato de feniletila.....	99
E 30: Espectro de RMN de ¹ H (300,07 MHz, CDCl ₃) do octanoato de feniletila..	100
E 31: Espectro de RMN de ¹³ C (75,45 MHz, CDCl ₃) do octanoato de feniletila. .	100
E 32: Espectro DEPT 90 e 135 ° (75,45 MHz, CDCl ₃) do octanoato de feniletila.	101
E 33: Espectro de RMN de ¹ H (499,88 Mz, CDCl ₃) do (±)-4-fenilmetoxi-1,2-butanodiol na presença de (Eu (hfc) ₃) na razão de diol: Eu III (0,5:1).	101
E 34: Espectro de RMN de ¹ H (499,88 Mz, CDCl ₃) do (±)-4-fenilmetoxi-1,2-butanodiol na presença de (Eu (hfc) ₃) na razão de diol: Eu III (1:1).	102

LISTA DE ABREVIATURAS

<i>c</i>	conversão
Ama	microrganismos isolados de água de várzea de Silves (AM)
Ame	microrganismos isolados do solo de Ilhéus
CCD	cromatografia líquida de camada delgada
CCT	coleção de culturas tropicais
CDCl ₃	clorofórmio deuterado
CG-EM	cromatografia a gás acoplada à espectrometria de massas
DEPT	“Distortionless Enhancement by Polarization Transfer”
DCC	diciclocarbodiimida
<i>E</i>	razão enantiomérica
<i>ee</i>	excesso enantiomérico
eV	elétrons-volt
FID	“flame ionozation detector”
Hz	Hertz
HTS	“High Troughput Screening”
IE	impacto eletrônico
<i>m/z</i>	razão entre a massa do fragmento e sua respectiva carga
RMN ¹ H	ressonância magnética nuclear de hidrogênio
RMN ¹³ C	ressonância magnética nuclear de hidrogênio
δ	deslocamento químico em partes por milhão

1.0. INTRODUÇÃO

Biocatalisadores são agentes biológicos (enzimas ou microrganismos) que aceleram a velocidade de reações químicas. Nas últimas décadas eles têm sido considerados por químicos e microbiologistas como uma ferramenta muito promissora para a síntese assimétrica¹, na obtenção de medicamentos, agroquímicos, detergentes, intermediários químicos e biomateriais².

O grande interesse na utilização industrial desses biocatalisadores é devido à sua capacidade de transformar uma variedade de substratos com alta especificidade, resultando em compostos com grande pureza enantiomérica^{3,4}. Afinal, desde a catástrofe da Talidomida, mais e mais compostos na forma enantiomericamente pura tem sido aplicados industrialmente, sendo previsto para 2009 um investimento de até \$15 bilhões no mercado global de intermediários quirais⁵.

Além disso, a utilização de biocatalisadores em transformações químicas está inserida no conceito de “química verde”, o que os tornam uma alternativa ambientalmente amigável às catálises químicas convencionais, pois agem sob condições brandas de reação, requerendo assim pouca energia e minimizando os problemas de isomerizações e rearranjo dos compostos. Ao mesmo tempo, eles são biodegradáveis e na maioria das vezes quimio-, regio- e estereosseletivos resultando na diminuição de sub-produtos e evitando etapas químicas de ativação, proteção e desproteção⁶.

As aplicações industriais em grande escala envolvendo biocatalisadores incluem, a síntese do Taxol (**1**) (**Esquema 1**)², do aspartame catalisada por Termosilina, a da acrilamida e nicotinamida, sendo que, essas últimas utilizam nitrilases⁶. Outros exemplos aplicados nas indústrias farmacêuticas estão listados na **Tabela 1**.

¹ Bessler, M. K.; Jaeger, K. E. *Trends in Biothechnol.* **2006**, 6, 248-250.

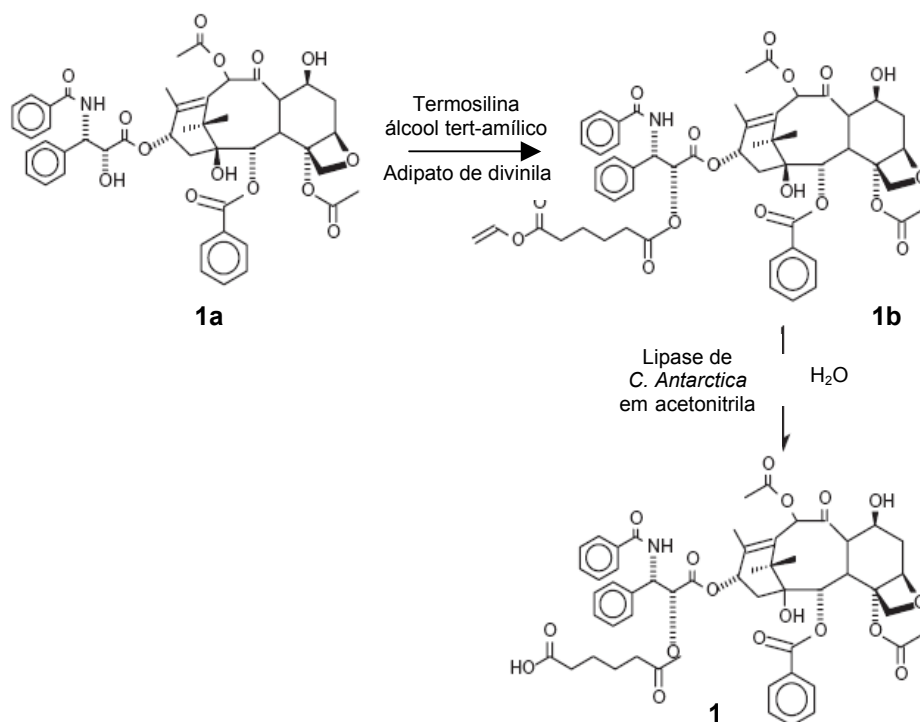
² Dordick, J. S.; Freeman, A. *Curr. Opinion in Biotechnol* **2006**, 17, 559-561.

³ Schimdt, A.; Dordick, J. S.; Hauer, B.; Kiener, A.; Wubbolts, M. ; Witholt, B. *Nature*, **2001**, 409, 258-268.

⁴ Bommarus, A. S.; Pollizi, K. M. *Chem. Eng. Sci.* **2006**, 61,-1004-1016.

⁵ Buchholz, S. *Biotechnol. J.*, **2006**, 1, 485-486.

⁶ Alcalde, M.; Ferrer, M.; Plou, F. J.; Ballesteros, A. *Trends in Biothechnol.* **2006**, 24, 281-287.



Esquema 1: Síntese do taxol (**1**) utilizando duas etapas enzimática. Na primeira etapa ocorre a acilação seletiva da hidroxila secundária de **1a** na presença de termosilina bacteriológica produzindo **1b**, que posteriormente sofre a hidrólise do éster vinílico terminal catalisado por lípase de *Candida antarctica*.

Dentre as várias classes de enzimas aplicadas industrialmente, as hidrolases tem um papel de destaque englobando 44% dos processos, seguidas dos biocatalisadores redox com 30% (**Figura 1**)⁷.

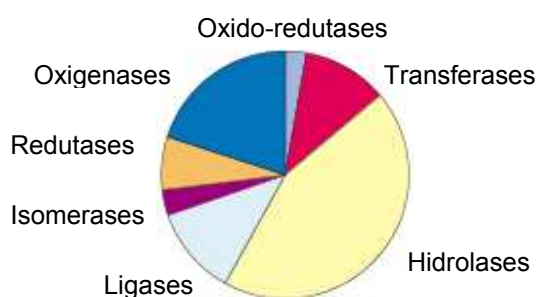


Figura 1: Tipos de enzimas utilizadas em processos industriais.

Tabela 1: Biotransformações desenvolvidas por indústrias farmacêuticas⁷

Produto	Companhia^a	reação	Biocatalisador^b
SCH56592	Schering P	Acilação	CALB
β -Lactamas	Glaxo	Acilação	CALB
Lotrafiban	Glaxo	Hidrólise	CALB
Paclitaxel	BMS	Hidrólise	lipase PS-30 de <i>Pseudomonas</i>
HMG-CoA inibidor	BMS	Acilação	lipase PS-30 <i>Pseudomonas cepacia</i>
SCH66336	Schering P	Acilação	lipase de <i>Pseudomonas</i>
Xemiofiban	Monsanto	Hidrólise	<i>aeruginosa</i> Acilase de <i>Escherichia coli</i>
Renina inibidor	Hoffman La Roche	Hidrólise	Subtilisina de <i>B.</i> <i>licheniformis</i>
Lamivudina	Glaxo	Hidrólise	Desaminase de <i>Escherichia coli</i>
AG7088	Pfizer	Redução	D-LDH de <i>Leuconostoc</i>
ACE inibidor	Ciba-Geigy	Redução	<i>mesenteroides</i> D-LDH <i>Staphylococcus</i>
LY300164	Eli Lilly	Redução	<i>epidermis</i> Desidrogenase <i>Zygasaccharomyces</i>
Omapatrilat	BMS	Aminação redutiva	<i>rouxii</i> PDH <i>Thermoactinomyces</i>
DNJ N-butila	Pharmacia	Oxidação	<i>intermedius</i> SDH <i>Gluconobacter</i>
Ácido 2- quinonalino- carboxílico	Pfizer	Oxidação	<i>oxydans</i> MO <i>Absidia repens</i>
HMG-CoA inibidor	MSD	Oxidação	MO <i>Nocardia autotropica</i>
Pró-droga Lobucavir	BMS	Acilação	Subtilisina <i>Candida cylindracea</i>

^a BMS - Bristol-Myers Squibb; Glaxo - Glaxo Wellcome/ Glaxo Smith Kline; MSD - Merck Sharp & Dohme; Schering P - Schering Plough. ^b CALB - lipase de *C. antarctica* B; FDH – formato desidrogenase; D-LDH – D-lactato desidrogenase; MO-monoxigenase; PDH – fenilalanina desidrogenase; SDH – sorbitol desidrogenase.

⁷ Straathof, A. J. J.; Panke, S.; Schmid, A. *Curr. Opin. in Biotechnol.* **2002**, 13, 548-556.

1.1. Hidrolases

As hidrolases são enzimas capazes de hidrolisar ou formar ésteres, amidas, lactonas, lactamas, epóxidos, nitrilas, anidridos, glicosídeos e organolídeos⁸. As reações catalisadas por essa classe de enzimas são as melhores rotas utilizadas na resolução de racematos, pois são mais seletivas e baratas que os métodos químicos convencionais⁹. Além disso, são bastante atrativas pelo fato de serem independentes de co-fatores e reagirem com uma grande variedade de substratos.

As lipases e esterases são as mais amplamente utilizadas em resoluções e dessimetrizações de álcoois primários, ácidos carboxílicos, e substratos complexos contendo um ou mais centros estereogênicos. Já as epóxido-hidrolases são particularmente interessantes, pois catalisam a resolução de epóxidos racêmicos a seus respectivos dióis vicinais⁸.

1.1.1 Epóxido-hidrolases

Epóxido-hidrolases (EH) são enzimas que catalisam a hidrólise de epóxidos resultando em seus respectivos dióis vicinais. Elas são encontradas em vários tipos de organismos vivos, incluindo mamíferos, insetos, plantas e microrganismos¹⁰.

Essas enzimas estão envolvidas no metabolismo de uma variedade de epóxidos, muitos dos quais são mutagênicos e/ou carcinogênicos. Os epóxidos são geralmente formados pela oxidação de compostos olefínicos ou aromáticos, catalisada por Citocromo P-450¹¹. Sua toxicidade está relacionada com a alta reatividade do anel oxirano, que devido ao seu caráter eletrofílico, pode reagir com uma variedade de nucleófilos biológicos. Dessa maneira a sua degradação a dióis, os quais são mais solúveis em água e podem ser facilmente eliminados, é de vital importância para a regulação celular¹².

Desde a última década, as EH microbianas capazes de hidrolisar enantiosseletivamente epóxidos racêmicos, emergiram como uma alternativa

⁸ Kazlauskas, R. J. *Tetrahedron: Asymmetry* **2004**, 15, 2727-2728.

⁹ Faber, K. *Biotransformation in Organic Chemistry*, 2nd ed.; Springer: Berlin, **1995**.

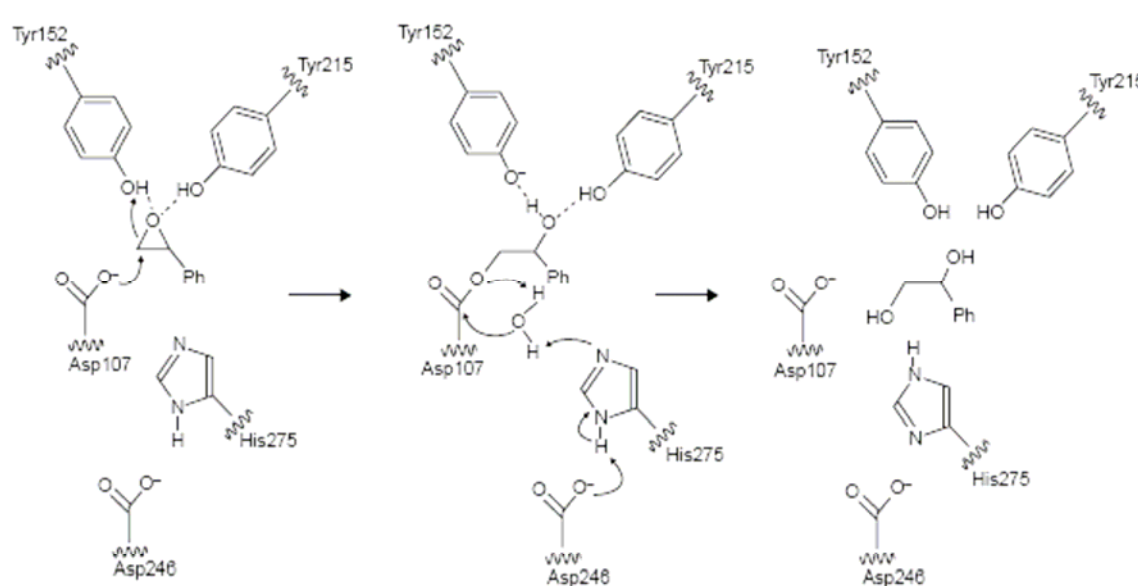
¹⁰ Weijers, C. A. G. M.; Bont, J. A. M. *J. Mol. Catal. Enz. B* **1999**, 6, 199-214.

¹¹ Chiappe, C.; Cordoni, A.; Lo Moro, G.; Palese, C. D. *Tetrahedron: Asymmetry* **1998**, 9, 341-350.

¹² Archelas, A.; Furtoss, R. *Tibtech* **1998**, 16, 108-116.

promissora na obtenção de epóxidos e dióis vicinais enantiomericamente puros, afinal esses compostos são blocos construtores importantes na síntese de numerosas moléculas bioativas^{13, 14}.

O mecanismo de atuação das EH microbianas baseado na EH de *Agrobacterium radiobacter*¹⁵ é composto por duas etapas de clivagem hidrolítica. Primeiramente, ocorre o ataque nucleofílico de um resíduo de aspartato (Asp-107) à um dos carbonos do anel oxirano, resultando no intermediário “glicol-monoéster”. Esse processo é facilitado pela atuação de dois resíduos de tirosina (Tyr-152 e Tyr-215), que estabilizam o estado de transição através da doação de hidrogênio ao átomo de oxigênio do oxirano. A segunda etapa consiste na hidrólise da ligação carboxílica do intermediário por uma molécula de água ativada pelo par His-275 e Asp-246, fornecendo assim o diol vicinal como produto^{16, 9} (**Esquema 2**).



Esquema 2: Representação esquemática do mecanismo de atuação da EH de *Agrobacterium radiobacter*¹⁶.

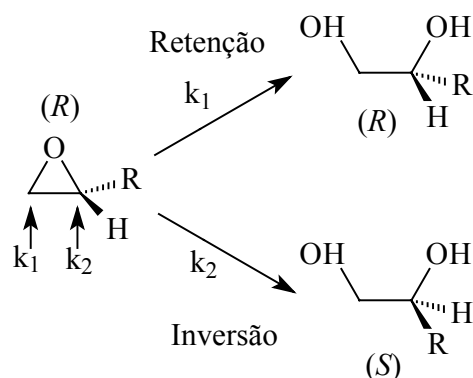
Esse mecanismo traz consequências importantes para estereoquímica das reação catalisadas por EH, pois o ataque nucleofílico da hidroxila pode ocorrer em

¹³ Simeó, Y.; Faber, K. *Tetrahedron: Asymmetry* **2006**, 17, 40-409.

¹⁴ Kotik, M.; Brichac, J.; Kyslík, P. *J. Biotechnol.* **2005**, 120, 364-375.

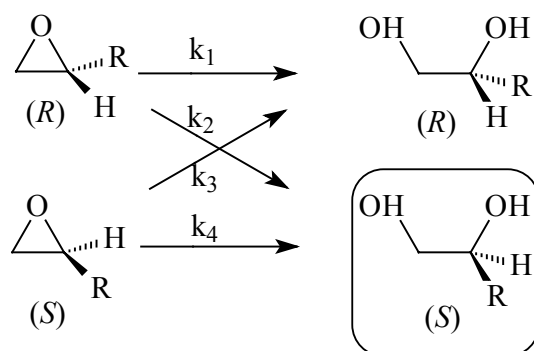
¹⁵ Archelas, A.; Furtoss, R. *Curr. Opinion in Biotechnol* **2001**, 5, 112-119.

qualquer um dos dois átomos de carbono do anel oxirano, fazendo com que a configuração absoluta do diol seja mantida, ou invertida. Dessa maneira, essas enzimas oferecem um mecanismo enzimático mais complicado que outras hidrolases, como por exemplo, esterases e lipases, devido às possíveis combinações de enantiosseletividade e regioseletividade¹⁶ (**Esquema 3**).



Esquema 3: Possibilidades estereoquímicas de EH. Se o ataque nucleofílico ocorrer na posição menos impedida (k_1) a configuração absoluta do diol formado será mantida, caso contrário (k_2) o diol formado terá configuração oposta.

Assim como os outros tipos de hidrolases, as EH são capazes de resolver epóxidos fornecendo epóxido e diol enantiomericamente puros com 50% de rendimento. Entretanto, devido à complexidade do seu mecanismo de atuação, em alguns casos é possível obter o diol com 100% de rendimento teórico e 100% de pureza enantiomérica na presença de duas EH enantiosseletivas com regioseletividades diferentes¹⁷ (**Esquema 4**).



Esquema 4: Se os dois enantiômeros do substrato sofrem hidrólise por duas enzimas com regioseletividades diferentes ($k_2 \gg k_1$ e $k_4 \gg k_3$) um único enantiômero será formado.

¹⁷ Orru, R. V. A.; Mayer, S. F.; Kroutil, W.; Faber, K. *Tetrahedron* **1998**, 54, 859-874.

Esse processo é uma técnica de desracemização conhecida como enantioconvergência. O mecanismo pode ser explicado pelo fato que ambos os enantiômeros do epóxido são atacados por enzimas com regiosseletividades opostas. Esse fenômeno é facilitado por efeitos estéricos semelhantes de ambos os átomos de carbono adjacentes, dessa maneira é aplicado preferencialmente a epóxidos 1,2-dissubstituídos¹⁸.

Alguns exemplos de reações em grande escala utilizando EH estão descritos na **Figura 2**. Por exemplo, o 4-desoxi-D-futose-6-fosfato (**2**) foi preparado à partir do (S)-2-hidroxi-4-oxobutil-1-fosfato, o qual foi obtido por resolução cinética utilizando *Aspergillus niger* (**Figura 2a**). O (S)-Ibuprofeno (**3**), que é um poderoso antiinflamatório, pôde ser obtido pelo intermediário gerado da resolução do α -metil-isobutilestireno utilizando a mesma enzima (**Figura 2b**).

Já a síntese do (R)-mevalonolactona (**4**) foi atingida em uma única etapa, utilizando uma estratégia quimioenzimática enantioconvergente (**Figura 2c**). Na **Figura 2d**, tem-se outro exemplo de processo enantioconvergente pelo uso de duas enzimas complementares na síntese do (R)-*para*-cloroestireno, que serve como bloco construtor para a síntese do Eliprodil (**5**), o qual é um poderoso agente neuroprotetor.

¹⁸ Steinreiber, A.; Mayer, S. F.; Saf, R.; Faber, K. *Tetrahedron: Asymmetry* **2001**, 12, 1519-1528.

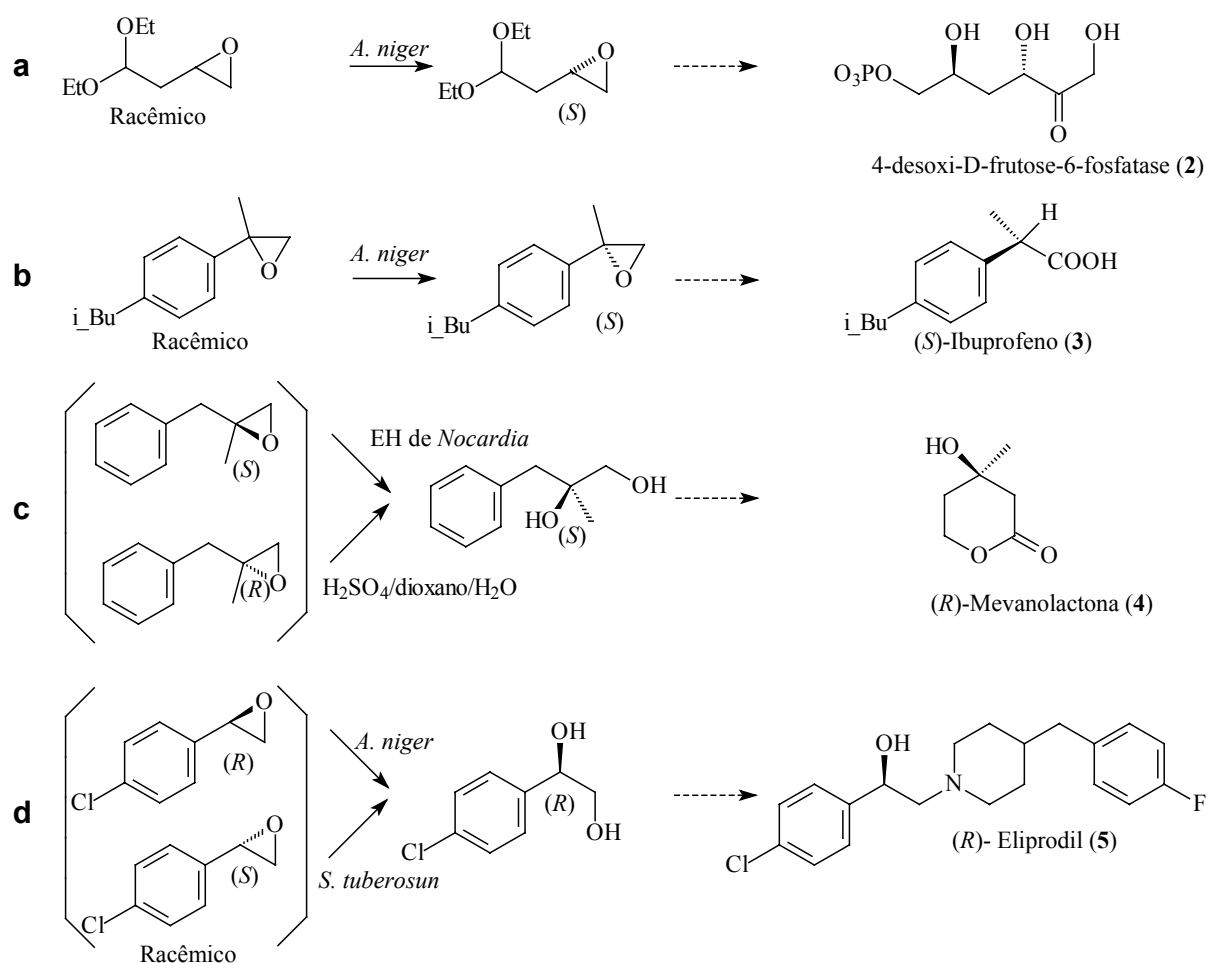


Figura 2: Exemplos do uso de resoluções catalisadas por EH como processos chave na obtenção de compostos biologicamente ativos¹⁶.

1.1.2. Esterases e lipases

Esterases representam um grupo diversificado de hidrolases que catalisam a clivagem e a formação de ligações éster. Elas estão amplamente distribuídas em animais, plantas e microrganismos¹⁹.

Essas enzimas apresentam tolerância a uma grande variedade de substratos, além de mostrarem alta regio- e estereoespecificidade, o que faz desses biocatalisadores uma ferramenta atrativa para produção de compostos em indústrias de química fina. O interesse nas esterases reside também no fato de

¹⁹ Bornscheuer, U. T. *FEMS Microbiology Reviews* **2002**, 26, 73-81.

serem independentes de co-fatores, e geralmente muito estáveis e ativas em solvente orgânico²⁰.

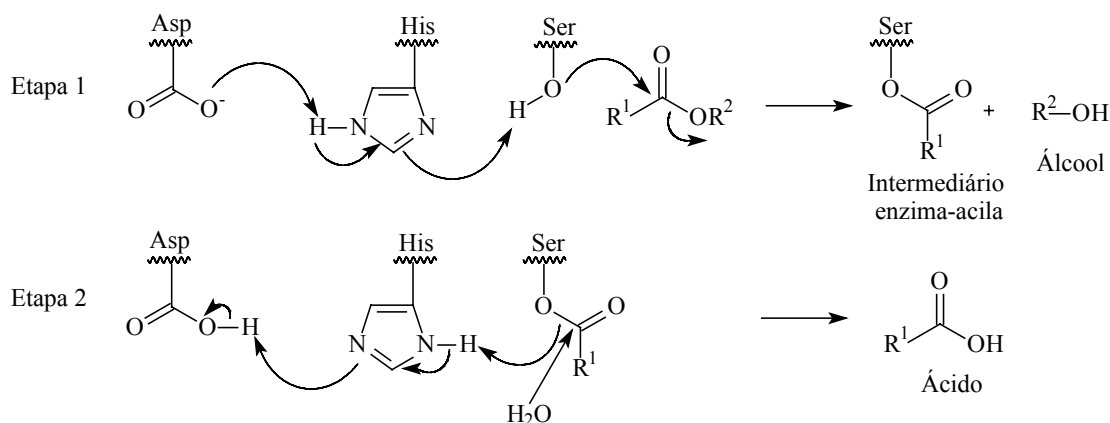
As esterases, junto das lipases, representam o grupo mais importante de biocatalisadores para aplicações biotecnológicas¹⁹. As lipases caracterizam-se por catalisar reações de hidrólise, esterificação e transesterificação de triglicerídeos compostos principalmente por ácidos graxos de cadeia longa (C₈), enquanto as “verdadeiras” esterases hidrolisam preferencialmente ésteres de cadeia curta, como acetatos e propionatos, e triglicerídeos com ésteres de ácido graxo de cadeia menor que C₆¹⁹.

A maior diferença entre lipases e esterases surge das interações físico-químicas com seus substratos. Enquanto as esterases obedecem à cinética clássica de Michaelis-Menten, ou seja, sua atividade é dependente da concentração do substrato, as lipases necessitam de uma concentração mínima de substrato antes de serem ativadas, esse fenômeno é chamado de ativação interfacial, e é observado somente para lipases⁹.

O mecanismo de hidrólise de ésteres é essencialmente o mesmo para lipases e esterases, e é composto por duas etapas, sendo que grupos aspartato (Asp), histidina (His) e serina (Ser) compõem a chamada ‘tríade catalítica’.

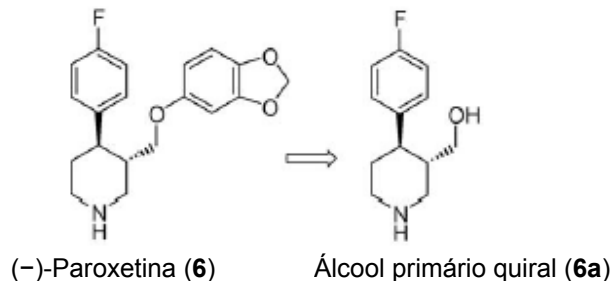
Primeiramente, o substrato sofre um ataque nucleofílico de uma Ser ativada por resíduos de His e Asp, passando por um intermediário tetraédrico, e liberando o álcool como grupo abandonador. Em seguida, ocorre o ataque nucleofílico de uma molécula de água, (ou outro álcool no caso de uma transesterificação), formando novamente um intermediário tetraédrico, que posteriormente regenera a enzima e fornece o ácido carboxílico (ou um éster)^{9, 19} (**Esquema 5**).

²⁰ Hutchins, L. M.; Hunter, L.; Ehya, N.; Gibbs, M. D.; Bergquist, P. L.; Hutton, C. A *Tetrahedron :Asymmetry* **2004**, *15*, 2975-2980.



Esquema 5: mecanismo de hidrólise catalisada por lipases e esterases.

Dentre a várias aplicações dessas enzimas, podemos citar, por exemplo, a síntese quimioenzimática do hidrocloreto de (-)-Paroxetina (**6**), que é utilizado como antidepressivo. A preparação do intermediário quiral foi feita pela acilação seletiva catalisada por lipase de *Candida antarctica* (CAL-A) do álcool primário (**6a**) fornecendo-o na forma enantiomericamente pura com alto rendimento ($E > 100$)²¹.



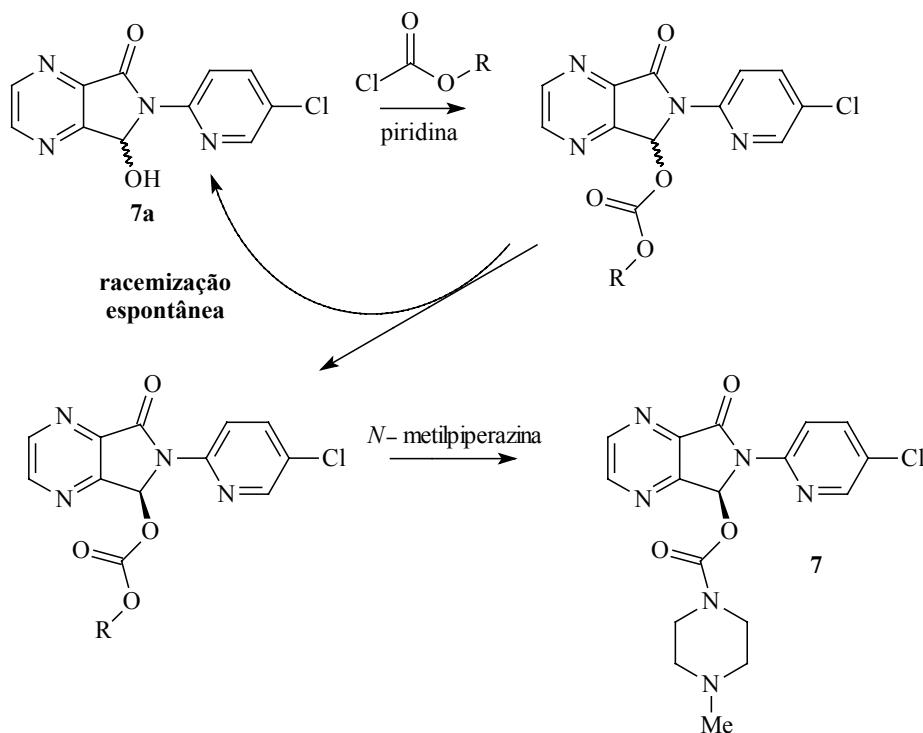
Esquema 6: Etapa retrossintética do precursor do hidrocloreto de (-)-Paroxetina.

Outro exemplo é a síntese do (S)-(+)-Zopiclone (**7**), o qual possui várias propriedades farmacêuticas. Esse medicamento foi primeiramente comercializado na forma racêmica, porém o (*R*)-enantiômero mostrou-se tóxico.

Dessa maneira a alternativa encontrada para a síntese desse composto na forma quiral foi a preparação quimioenzimática na presença de lipase de *C. antarctica* B (CAL-B) por resolução cinética dinâmica. Pois a hidrólise seletiva catalisada pela enzima CAL-B gera o álcool *R* (**7a**) que sofre racemização

²¹ Fernadéz, V. G.; Brieva, R.; Gotor, V. J. *Mol. Catal. Enz. B* **2006**, 40, 111-120.

espontânea no meio reacional²¹ (**Esquema 7**). Esse processo é bastante vantajoso, pois por envolver um mecanismo de resolução cinética dinâmica fornece rendimentos maiores que 50% (90%).



Esquema 7: Preparação quimioenzimática do (S)-(+)-Zopiclone (7).

1.2. Triagem de Alto Desempenho

Diante dessa gama de aplicações, os biocatalisadores surgem como componentes chave de muitos processos químicos industriais, tornando-se necessário a busca por novas enzimas para fins específicos¹.

A busca por novas enzimas inicia-se pela triagem enzimática da biodiversidade natural seguido pelo isolamento da enzima de interesse, que pode ser expressa em vetores (bactérias e leveduras) e vir a ser comercializada. Outra linha de pesquisa parte da alteração das propriedades de enzimas comercialmente disponíveis através de modificações estruturais, técnica essa conhecida como mutagênese, que envolve a triagem de milhares de mutantes²².

Finalmente uma versão mais atual de triagem enzimática envolve a extração do DNA (metagenoma) de uma amostra ambiental onde estão inseridos milhares de microrganismos. Este DNA é clivado em grandes fragmentos e

inserido em vetores produzindo bibliotecas artificiais com milhares de quimeras com grandes modificações e que precisam ser avaliados quanto ao novo potencial enzimático. As vantagens destes microrganismos é que podem produzir enzimas de outros microrganismos que normalmente não poderiam ser cultivados em laboratório.

Entretanto, todas essas possibilidades necessitam de metodologias que permitam a identificação rápida das atividades e enantiosseletividades enzimáticas²². Dessa maneira a utilização de Triagem de Alto Desempenho (High-Throughput Screening - HTS) tem ganhado destaque, pois possibilita a triagem de milhares de enzimas simultaneamente.

Nesse contexto, é importante ressaltar que o Brasil apresenta uma das maiores biodiversidades do planeta, com milhares de microrganismos de grande aplicação sintética, tornando-se necessário uma avaliação sistemática do material que dispomos²³.

Dentre os vários métodos que permitem o monitoramento da atividade enzimática no formato HTS, os ensaios envolvendo substratos fluorogênicos ou cromogênicos são os mais utilizados¹. As vantagens desses métodos rápidos em relação aos métodos convencionais são a alta sensibilidade que permite a utilização de pequenas concentrações de substrato e de biocatalisadores, o aumento na velocidade de análise, além da possibilidade do acompanhamento da cinética reacional em tempo real²⁴.

²² Lagarde, D.; Nguyen, H. K.; Ravot, G.; Wahler, D.; Reymond, J. R.; Hills, G. Veit, T.; Lefevre, F. *Org. Process Research & development* **2002**, 6, 441-445.

²³ Chen, L. S. "Triagem de alto desempenho na detecção de atividade de epóxido-hidrolases e monooxigenases utilizando células íntegras", Tese de Doutorado, Instituto de Química, Unicamp; **2006**.

²⁴ Schimdt, M.; Bornscheuer, U. T. *Biom. Eng.* **2005**, 22, 51-56.

2.0. OBJETIVOS

Cientes da grande biodiversidade brasileira de microrganismos e diante da possibilidade de utilização dos ensaios de Triagem de Alto Desempenho baseados em substratos fluorogênicos como ferramenta para detecção de atividade enzimáticas, os objetivos desse trabalho foram:

1. Utilizar triagem de alto desempenho HTS para detecção de esterases, lipases e epóxido-hidrolases em microrganismos brasileiros.
2. Implantar teste rápido que permita a determinação da enantiosseletividade de epóxido-hidrolases em formato HTS (Quick *E*) utilizando células íntegras e sondas fluorogênicas enantiomericamente enriquecidas.
3. Aplicar os resultados obtidos na triagem de alto desempenho para obtenção de compostos enantiomericamente puros de interesse sintético.

3.0. TRIAGEM DE ALTO DESEMPENHO (HTS)

3.1. Considerações gerais

Ensaio enzimáticos são protocolos experimentais que tornam visíveis as reações químicas catalisadas por enzimas²⁵. No formato de triagem de alto desempenho, esses ensaios, são ferramentas essenciais para a exploração da biodiversidade na busca de novas enzimas²⁶.

Os ensaios no formato HTS baseados em substratos fluorogênicos e cromogênico, que são os mais utilizados, consistem na utilização de um substrato capaz de liberar um cromóforo ou fluoróforo como consequência da ação enzimática^{27, 24}.

Dentre esses substratos, tem-se os derivados do tão conhecido ânion nitrofenolato (8), que apresenta cor amarela, e os ânions fluorescentes umbeliferona (9), resofurina (10) e a fluoresceína (11) que fluorescem no azul, vermelho e verde respectivamente (**Figura 3**). Muitos desses substratos são comercialmente disponíveis e amplamente utilizados para detecção de enzimas hidrolíticas²⁸.

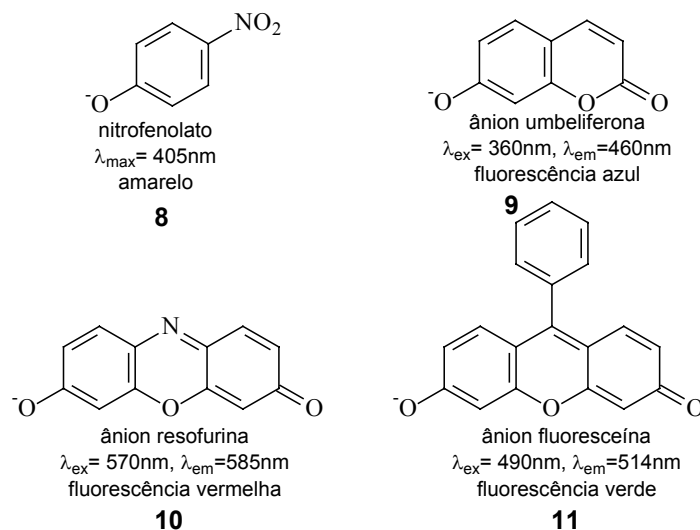


Figura 3: Fenóis conjugados utilizados em substratos cromogênicos e fluorogênicos que na forma neutra são pouco coloridos e não-fluorescentes²⁸, comprimento de onda de máxima absorção ($\lambda_{\text{máx}}$), comprimento de onda de excitação λ_{ex} , comprimento de onda de emissão λ_{em} .

²⁵ Goddard, J. P.; Reymond, J. L. *Trends in Biotechnol.* **2004**, 22, 363-370.

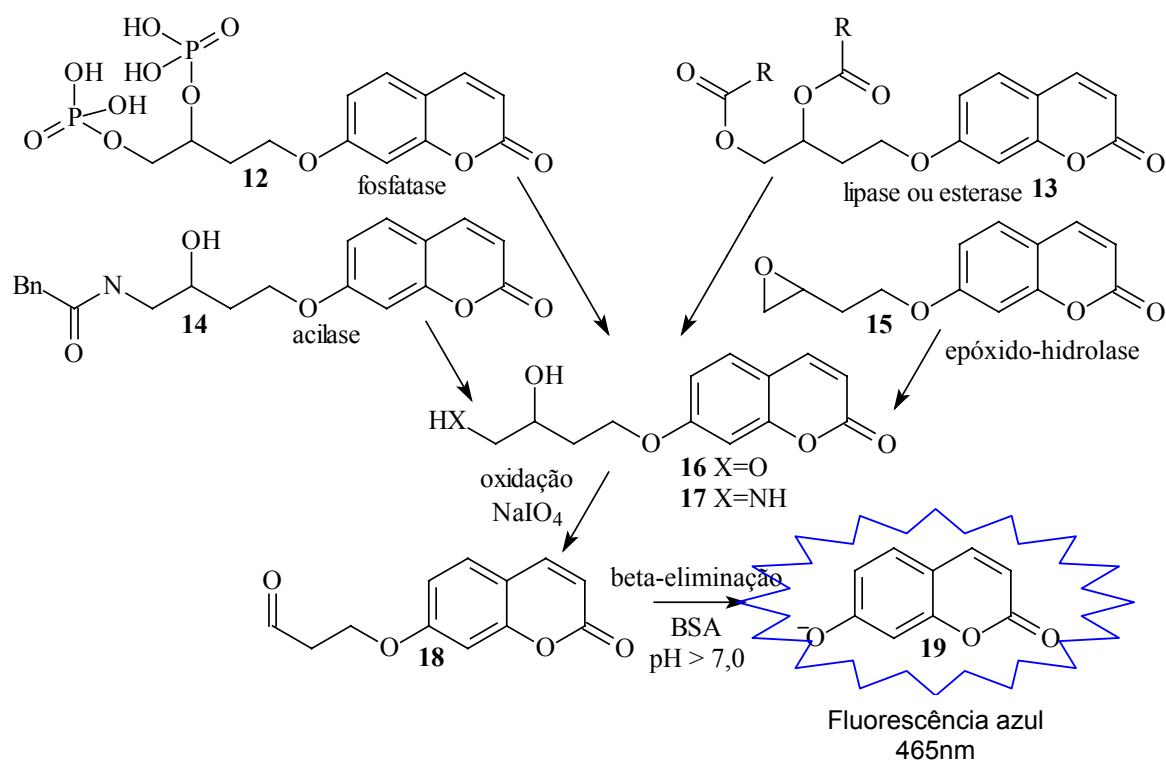
²⁶ Wahler, D.; Boujard, O.; Lefreuve, F.; Reymond, J. L. *Tetrahedron* **2004**, 60, 703-710.

²⁷ Goddard, J. P.; Reymond, J. L. *Trends in Biotechnol.* **2004**, 7, 363-370.

²⁸ Reymond, J. L. *Enzyme Assays*, **2004**, 22, 51-56.

Um modelo de ensaio enzimático utilizando substratos fluorogênicos foi desenvolvido por Reymond e colaboradores²⁹ para detecção de hidrolases com enzimas isoladas, e adaptado por nosso grupo de pesquisa para células íntegras³⁰.

O ensaio consiste numa sequência de reações, onde após a ação enzimática, a sonda, que é um substrato fluorogênico, se transforma num composto fluorescente. Os substratos fluorogênicos **12-15** dão origem aos produtos **16** ou **17** pela reação com o biocatalisador. A subsequente oxidação por NaIO₄ leva ao composto carbonílico **18**, o qual por sua vez, sofre uma reação de β-eliminação por albumina de soro bovino (BSA) dando origem ao ânion da umbeliferona **19** que é fluorescente (**Esquema 8**).



Esquema 8: Representação esquemática do ensaio fluorogênico para detecção de enzimas hidrolíticas³¹.

²⁹ Klein, G.; Reymond, J. L. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1998**, *8*, 1113-1116.

³⁰ Bicalho, B.; Chen, L. S.; Grognum, J.; Reymond, J. L.; Marsaioli, A. J. *J. Braz. Chem. Soc.* **2004**, *6*, 911-916.

³¹ Wahler, D.; Reymond, J. L. *Curr. Opin. Biotechnol.* **2001**, *12*, 535-544.

Nesse trabalho foram avaliados 103 microrganismos para a detecção de epóxido-hidrolases, esterases e lipases, sendo 59 microrganismos pertencentes à Coleção de Culturas Tropicais (CCT) e Coleção de Culturas do laboratório de biocatálise e síntese orgânica (CBS-Unicamp) (**Tabela 2**), e ainda outros 44 microrganismos que foram isolados de água de várzea de Silves (AM), mas que ainda não foram identificados (**Tabela 3**).

Os ensaios foram realizados utilizando cinco sondas fluorogênicas, as quais foram sintetizadas pela Dra. Luciana de Oliveira e pela Dra. Lu Shi Chen. Para detecção de epóxido-hidrolase foram utilizadas duas sondas, a 7-(1,2-epóxi-butóxi)-2*H*-1-benzopiran-2-ona (**20**) e 7-(3,4-epóxi-hexilóxi)-2*H*-1-benzopiran-2-ona (**21**). Para a detecção de esterases também foram utilizadas duas sondas, sendo 7-(1,2-di-acetato-butóxi)-2*H*-1-benzopiran-2-ona (**22**) para detecção de hidrólise acetatos, e 7-(1,2-di-propionato-butóxi)-2*H*-1-benzopiran-2-ona (**23**) para detecção de hidrólise de propionatos. A sonda 7-(1,2-di-octanoato-butóxi)-2*H*-1-benzopiran-2-ona (**24**), que contém ésteres de ácido de cadeia longa (C₈) foi utilizada para detecção de lipases, e além disso, foram sintetizados os controles positivos 7-(1,2-di-hidróxi-butóxi)-2*H*-1-benzopiran-2-ona (**25**) e 7-(3,4-di-hidróxi-hexilóxi)-2*H*-1-benzopiran-2-ona (**26**) (**Figura 4**).

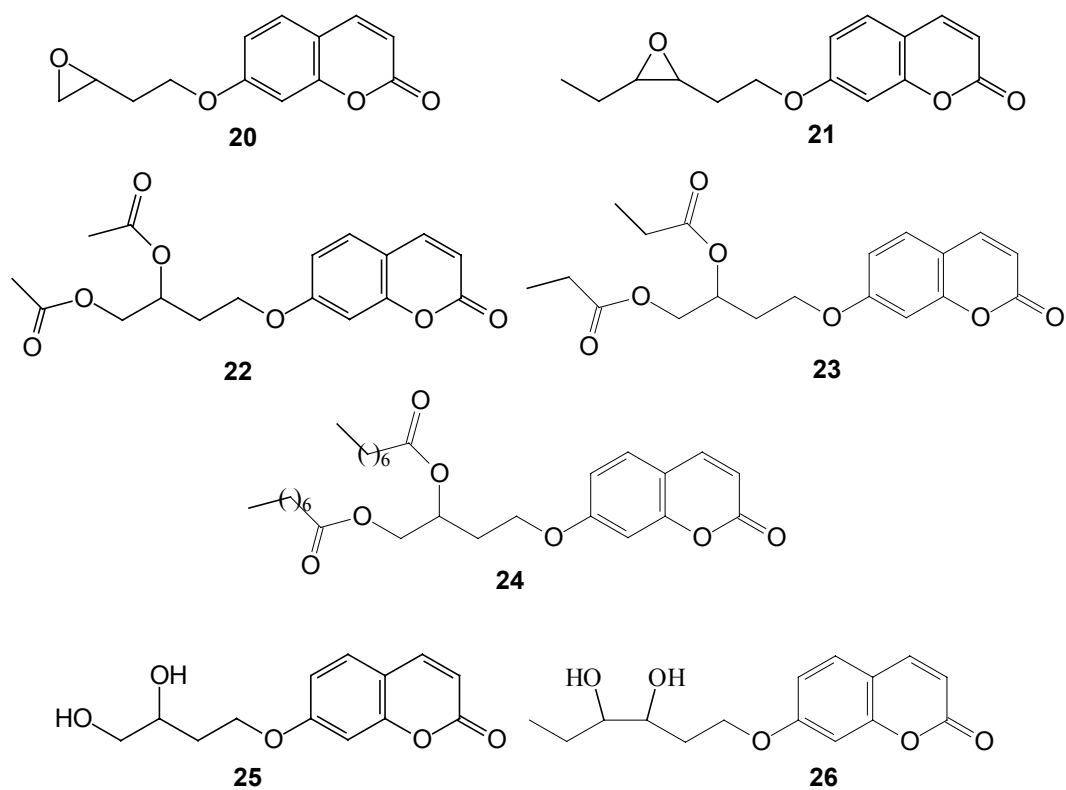


Figura 4: Substratos fluorogênicos e controles positivos para triagem de epóxido-hidrolases, esterases e lipases.

Tabela 2: Microrganismos investigados nas de triagens de alto desempenho

Microorganismo	Coleção Nº	Microorganismo	Código
Bactérias			
		<i>Escherichia coli</i>	CCT 5050
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	CCT 6515		
<i>Antrobacter oxydans</i>	CCT 3027	<i>Micrococcus luteus</i>	CCT 2720
<i>Antrobacter sp.</i>	CCT 1875	<i>Pseudomonas oleovorans</i>	CCT 1969
<i>Arquea</i>	CBS 2005	<i>Pseudomonas putida</i>	CCT 2357
<i>Arquea</i>	CBS 2004	<i>Salmonella thyphimurium</i>	CCT 0528
<i>Arquea</i>	CBS 2006	<i>Serratia liquefaciens</i>	CCT 7262
<i>Bacillus cereus</i>	CCT 4060	<i>Serratia marcescens</i>	CCT 2573
<i>Bacillus subtilis</i>	CCT 0089	<i>Serratia plymuthica</i>	CCT 4371
<i>Citrobacter amalonaticus</i>	CCT 4059	<i>Serratia rubidae</i>	CCT 5732
Fungos filamentosos			
<i>Alternaria alternata</i>	CCT 1250	<i>Curvularia pallescens</i>	CCT 5654
<i>Aspergillus fumigatus</i>	CCT 1277	<i>Emericella nidulans</i>	CCT 3119
<i>Aspergillus niger</i>	CCT 1435	Fungo (não identificado)	CCT 5553
<i>Aspergillus niger</i>	CBS 1004	Fungo (não identificado)	CCT 5632
<i>Aspergillus niger</i>	CCT 4648	Fungo (não identificado)	CCT 5560
<i>Aspergillus ochraceus</i>	CBS 1005	Fungo (não identificado)	CCT 5661
<i>Aspergillus oryzae</i>	CCT 0975	<i>Geotrichum candidum</i>	CCT 1205
<i>Aspergillus terreus</i>	CCT 1212	<i>Mortierella Isabelina</i>	CCT 3498
<i>Aspergillus terreus</i>	CCT 3320	<i>Nodulisporium sp.</i>	CBS 1020
<i>Cunninghamella echinulata</i>	CCT 4259	<i>Rhizopus oryzae</i>	CCT 1022
<i>Curvularia eragrostides</i>	CCT 5634	<i>Rhizopus oryzae</i>	CCT 4964
<i>Curvularia lunata</i>	CCT 5628	<i>Trametes versicolor</i>	CCT 4521
Leveduras			
<i>Candida albicans</i>	CCT 0776	<i>Sacharomyces boulardii</i>	CBS 3007
<i>Candida utilis</i>	CCT 3469	<i>Sacharomyces cerevisiae</i>	CCT 0771
<i>Kluyveromyces marxianus</i>	CCT 4086	<i>Sacharomyces cerevisiae</i>	CCT 0195
<i>Kluyveromyces matianus</i>	CCT 2393	<i>Sacharomyces cerevisiae</i>	CCT 0949
<i>Pachysolen tannophilus</i>	CCT 1891	<i>Sacharomyces cerevisiae</i>	CCT 0194
<i>Pichia canadensis</i>	CCT 2636	<i>Sacharomyces cerevisiae</i>	CCT 3174
<i>Pichia kluyveri</i>	CCT 3365	<i>Sacharomyces sp.</i>	CBS 3008
<i>Pichia stipitis</i>	CCT 2617	<i>Trichosporon cutaneum</i>	CCT 1903
<i>Rhodotorula glutinis</i>	CCT 2182		

Tabela 3: Microrganismos isolados do solo de várzea de Silves (AM)^a utilizados na avaliação das atividades enzimáticas por HTS

Microrganismos de água de várzea de Silves				
Ama 1	Ama 10	Ama 19	Ama 28	SA 1
Ama 2	Ama 11	Ama 20	Ama 29	SA 2
Ama 3	Ama 12	Ama 21	Ama 31	SA 3
Ama 4	Ama 13	Ama 22	Ama 32	SA 4
Ama 5	Ama 14	Ama 23	Ama 33	SA 7
Ama 6	Ama 15	Ama 24	Ama 34	SA 8
Ama 7	Ama 16	Ama 25	Ama 35	SA 9
Ama 8	Ama 17	Ama 26	Ama 36	SA 10
Ama 9	Ama 18	Ama 27		

^a Os microrganismos não foram ainda identificados. A sigla “Ama” foi utilizada para designar as bactérias e leveduras e a sigla “SA” para designar os fungos.

Para realização dos ensaios, os microrganismos foram cultivados em tubo inclinado contendo meio ágar adequado (Fungo EM, levedura YE e bactérias NA)³², e encubados por 96 h (fungos) e 48 h (leveduras e bactérias). A massa úmida das colônias desenvolvidas foram removidas, transferidas para frascos *Eppendorf* estéreis, e ressuspensas em solução tampão borato pH 8,8 a 20 mM.

Todos os experimentos foram realizados em microplaca de polipropileno com 96 cavidades e monitoradas por leitor de fluorescência (*Flashscan 530 Analytic Jena*) durante 10 h, utilizando filtros com comprimento de onda de excitação de 365 nm e as leituras feitas à 460 nm.

Os ensaios foram montados utilizando concentrações microbianas de 0,1 mg/mL para leveduras e bactérias e 0,5 mg/mL para fungos filamentosos, na presença de BSA a 2,0 mg/mL em solução tampão, solução aquosa de periodato de sódio a 1,0 mM e sondas a 100 µM. Todos os ensaios foram realizados em duplicata.

Adicionalmente foram realizados controles negativos (substrato + BSA + NaIO₄ em solução tampão sem a presença de microrganismo) para controle da intensidade de fluorescência liberada pela hidrólise não enzimática dos substratos, controles positivos (controles positivos + BSA + NaIO₄ + suspensão celular em solução tampão) para avaliar uma possível interferência na fluorescência do produto resultante da reação de biotransformação, além do controle microbiano

³² EM- extrato de malte; YE- extrato de levedura, NA- nutriente-ágar.

(BSA + NaIO₄ + suspensão celular em solução tampão) para monitorar a possível autofluorescência dos microrganismos (**Figura 5**).

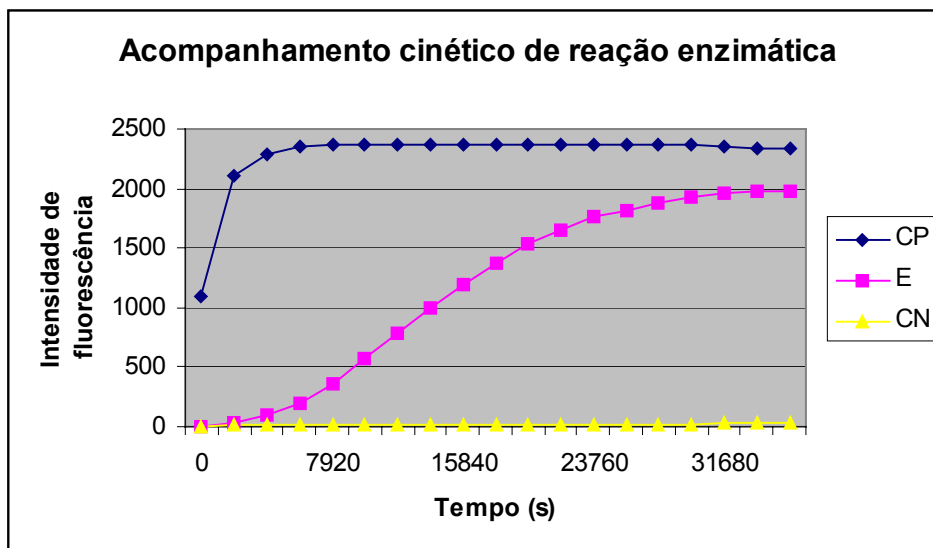


Figura 5: Curvas representativas de acompanhamento da cinética das reações nos ensaios de HTS baseados em fluorescência, onde CP é a curva representativa do controle positivo, E representa o ensaio enzimático, e CN representa a curva do controle negativo.

O tratamento dos dados foi feito pela diferença entre a média dos valores de intensidade de fluorescência dos ensaios com microrganismos (E) e média dos valores de intensidade de fluorescência emitidos pelo controle negativo (CN) (**Equação 1**).

$$R = E - CN \quad (1)$$

Com base no valor máximo de emissão de fluorescência do ânion umbeliferona em pH 8,8 de 2500 unidades de fluorescência, somente os ensaios que resultaram em valores de intensidade de fluorescência superiores a 100 unidades, ou seja, acima de 5 % de conversão, foram considerados positivos.

3.2. Resultados e discussões

3.2.1. Epóxido-hidrolases

Dentre os microrganismos avaliados para atividade epóxido-hidrolase, cinco foram considerados ativos, pois apresentaram valores de intensidade de fluorescência superior a 100 unidades (5 % de conversão) para as sondas **20** e **21** (Tabela 4).

Tabela 4: Resumo dos ensaio enzimático para detecção de epóxido-hidrolases utilizando as sonda **20** e **21**

Microrganismos ^a	Coleção/Código	Fluorescência ^b	
		20	21
<i>Candida albicans</i> ^c	CCT 0776	1919	-
<i>Pichia stipitis</i> ^c	CCT 2617	394	-
<i>Rhizopus oryzae</i> ^d	CCT 4964	154	189
<i>Aspergillus niger</i> ^d	CCT 1435	-	236
Ama 32 ^e	-	-	168

^a Concentração das suspensões microbianas utilizadas nos testes foram de 0,1mg/mL. ^b Intensidade de fluorescência = (média de duplicata das amostras) - (média das duplicatas do controle negativo) medida após 10 h de reação. ^c Leveduras. ^d Fungos. ^e Microrganismos do solo da Amazônia não identificados.

A cinética de reação para esses microrganismos pode ser observada na **Figura 6** através do aumento da intensidade de fluorescência, referente ao aumento na concentração de umbeliferona, associada ao tempo de reação.

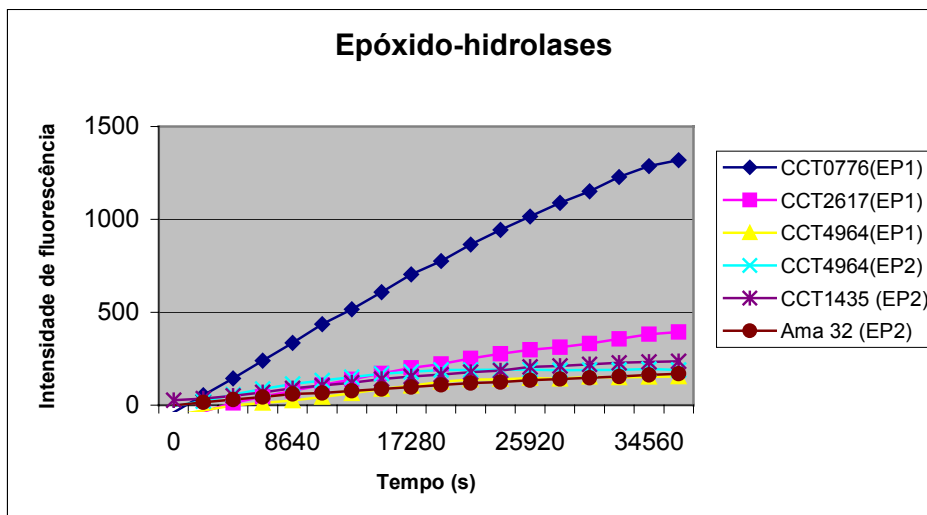


Figura 6: Acompanhamento da cinética de reação frente aos substratos **20** e **21** para a detecção de epóxido-hidrolases.

Os resultados obtidos para as sondas **20** e **21** permitiram organizar os microrganismos em três grupos distintos. O primeiro grupo é formado pelos microrganismos que apresentaram a capacidade de hidrolisar seletivamente epóxidos terminais (**20**) como *C. albicans* CCT 0776 e *P. stipitis* CCT 2617. O segundo grupo é representado pelos microrganismos que foram seletivos para a hidrólise de epóxido cis-dissubstituído (**21**) como *A. niger* CCT 1435 e Ama 32. Já o terceiro grupo é formado pelos microrganismos que não discriminam entre os dois substratos, como *R. oryzae* CCT 4964. Esse comportamento pode ser explicado pela presença de uma epóxido-hidrolase não seletiva, ou pela presença de dois tipos de epóxido-hidrolases.

3.2.2. Esterases e lipases

Nos ensaios realizados para detecção de lipases (**24**) e esterases (**22** e **23**) 18 microrganismos mostraram-se enzimaticamente ativos com valores de intensidade de fluorescência superior a 100 unidades (5 % de conversão) (**Tabela 5**).

Tabela 5: Ensaio enzimático para detecção de esterases e lipases

Microrganismos ^a	Coleção/Código	Fluorescência ^b		
		22	23	24
<i>Alternaria alternata</i> ^c	CCT 1250	665	-	-
<i>Aspergillus terreus</i> ^c	CCT 1212	-	140	-
<i>Cunninghamella ecchinulata</i> ^c	CCT 4259	108	1601	-
Fungo (não identificado) ^c	CCT 5553	202	126	-
Fungo (não identificado) ^c	CCT 5661	147	244	-
<i>Trametes versicolor</i> ^c	CCT 4521	150	-	-
<i>Rhodotarula glutinis</i> ^d	CCT 2182	-	231	-
<i>Trichosporon cutaneum</i> ^d	CCT 1903	139	354	-
Ama 18 ^e	-	146	-	-
Ama 19 ^e	-	1923	-	-
Ama 21 ^e	-	114	104	-
Ama 23 ^e	-	135	149	-
Ama 27 ^e	-	1618	-	-
Ama 28 ^e	-	318	-	-
Ama 31 ^e	-	216	1421	-
Ama 32 ^e	-	530	1957	-
Ama 33 ^e	-	-	117	-
Ama 34 ^e	-	318	107	-

^aConcentração das suspensões microbianas utilizadas nos testes foram de 0,1 mg/mL. ^bIntensidade de fluorescência = (média de duplicata das amostras) - (média das duplicatas do controle negativo) medida após 10 h de reação. ^cFungos. ^dLeveduras. ^eMicrorganismos do solo da Amazônia não identificados.

A cinética da reação enzimática desses microrganismos para as sondas **22** e **23** podem ser visualizadas nas **Figuras 7** e **8** respectivamente.

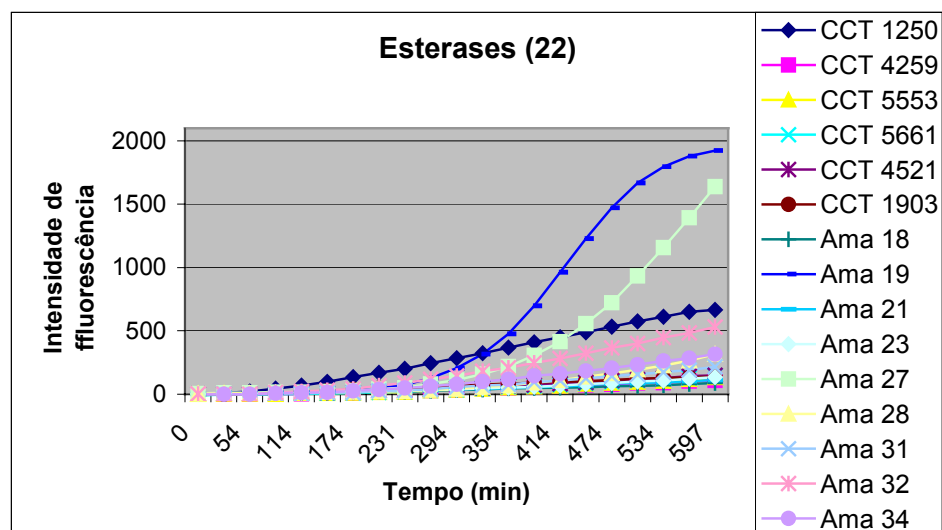


Figura 7: Acompanhamento da cinética de reação frente à sonda **22** para a detecção de hidrolases de acetatos (esterases).

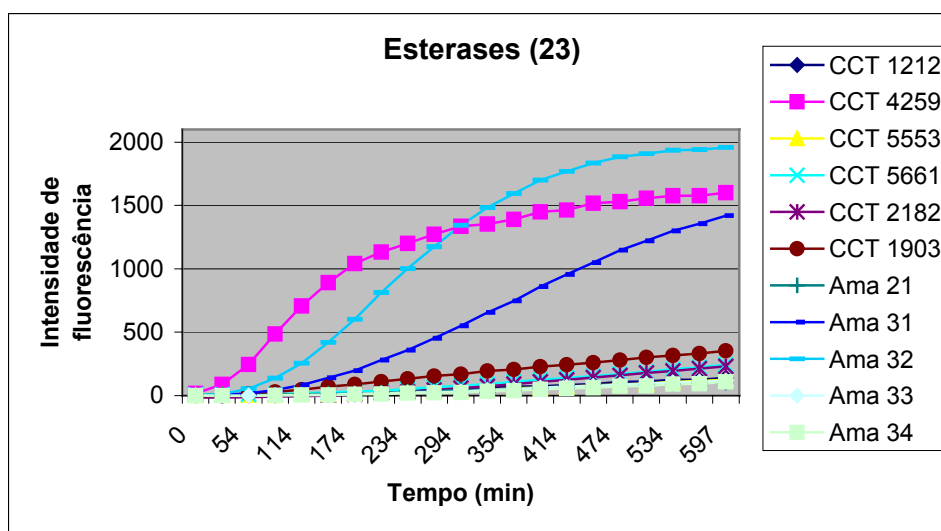


Figura 8: Acompanhamento da cinética de reação frente à sonda **23** para a detecção de hidrolases de propionatos (esterases).

Os resultados obtidos indicam a presença de esterases nos microrganismos avaliados pela triagem de esterases e lipases, pois em geral os microrganismos avaliados hidrolisaram preferencialmente ésteres de cadeia mais curta como acetatos (**22**) e propionatos (**23**), enquanto que para ésteres de cadeia longa (**24**), como oleatos, não foram encontrados resultados significativos.

Esses resultados são bastante interessantes, pois em geral o que se observa é a hidrólise preferencial de ésteres de ácidos graxos de cadeia longa, inclusive na presença de esterases comerciais³³.

Os microrganismos *A. alternata* CCT 1250, *T. versicolor* CCT 4521, Ama 19, Ama 27 e Ama 28 destacaram-se pela hidrólise seletiva de acetato (**22**), uma vez que apresentaram valores inferiores a 100 unidades de fluorescência para as demais sondas (**23** e **24**). Esses microrganismos apresentaram uma diminuição gradativa das atividades enzimática com o aumento do tamanho da cadeia acil dos substratos **22**, **23** e **24** (Tabela 5 e Figura 9)

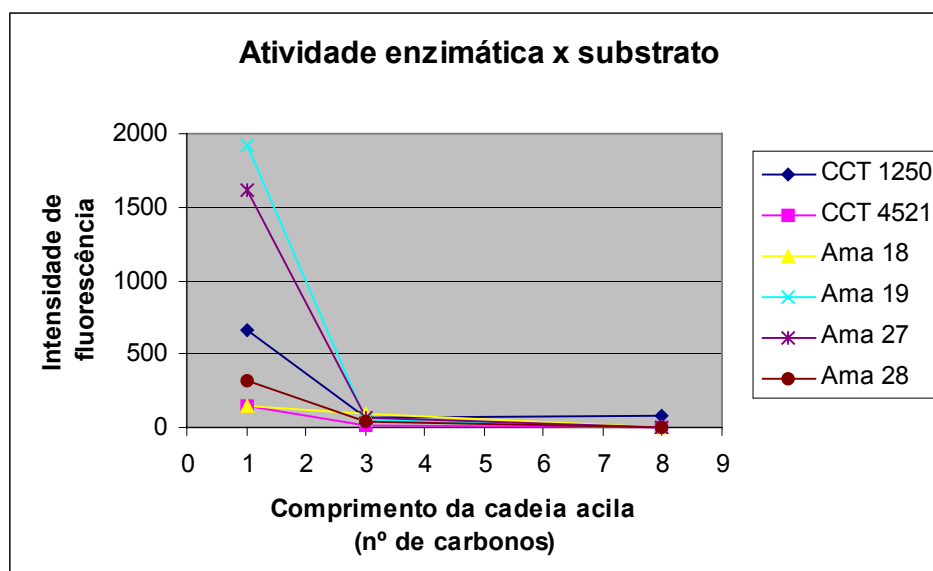


Figura 9: Variação da atividade enzimática com a variação do comprimento da cadeia acila dos substratos **22**, **23** e **24**.

Com relação à hidrólise de propionatos (**23**), os microrganismos que mais se destacaram foram *C. echinulata* CCT 4259, AMA 31 e AMA 32, porém não foram seletivos, pois hidrolisaram também acetatos (**22**), mas com atividade moderada (inferior a 1000 unidades de fluorescência) (Tabela 5 e Figura 10).

³³ Nyfeler, E.; grognux, J.; Wahler, D.; Reymond, J. L. *Helvetica Chimica Acta* **2003**, 86, 2919-2927.

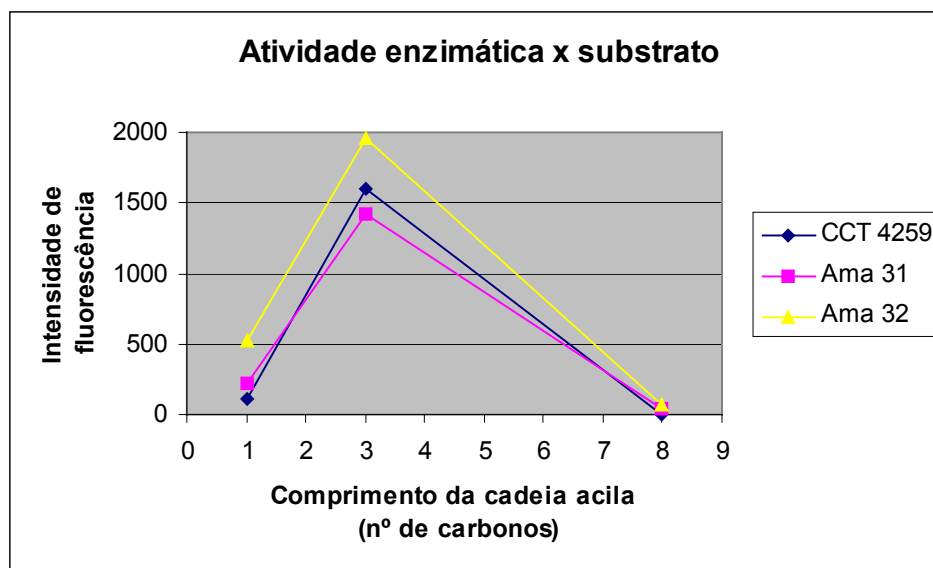
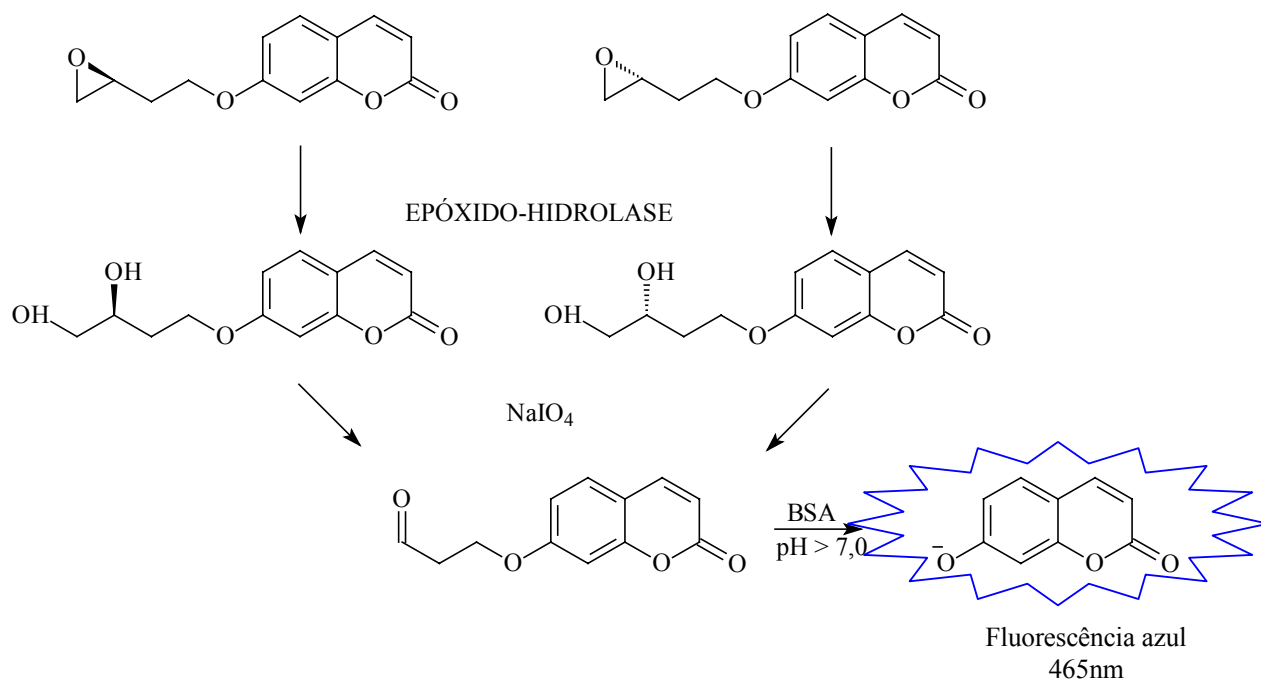


Figura 10: Variação da atividade enzimática com a variação do comprimento da cadeia acila dos substratos **22**, **23** e **24**.

Já os microrganismos *T. cutaneum* CCT 1903, Ama 21, Ama 23 e os Fungos não identificados CCT 5553 e CCT 5661 que apresentaram moderada atividade para esterases, mostraram-se pouco seletivos na hidrólise de ésteres de cadeia curta, pois apresentaram valores de intensidade de fluorescência muito semelhantes para as sondas **22** e **23** (**Tabela 5**).

Assim a técnica de triagem de alto desempenho foi bastante útil para seleção dos microrganismos com maior potencial hidrolítico para epóxido-hidrolases e esterases, resultando num total de 1030 experimentos (microrganismos x substratos em duplicatas), sendo que tal quantidade só foi realizada pela possibilidade da utilização de triagem rápida. Entretanto essa técnica não elimina a necessidade da determinação da enantiosseletividade dessas enzimas, afinal essa é a propriedade mais importante em termos de aplicação sintética.

Inspirados nesse princípio Reymond e colaboradores³⁹ propuseram uma metodologia que permite estimar qualitativamente a enantiosseletividade (E^*) de epóxido-hidrolases por experimentos de HTS utilizando sondas fluorogênicas enantiomericamente enriquecidas (**Esquema 9**).



Esquema 9: Ensaio baseado na leitura de fluorescência para avaliação da razão enantiomérica de epóxido-hidrolases.

O método consiste na determinação da enantiosseletividade pela avaliação das intensidades de fluorescência produzidas pela umbeliferona provenientes da biotransformação dos enantiômeros do substrato analisados separadamente.

Porém, a grande desvantagem desse modelo é que a avaliação dos enantiômeros separadamente pode levar a desvios de até 70%, acima ou abaixo do valor real (E_{real}), pois ignora o efeito de competição dos enantiômeros pelo sítio ativo da enzima³⁸.

Uma forma mais exata de obter o valor de E próximo ao valor real consiste na introdução de um substrato similar de modo a simular a competição entre os enantiômeros (Quick E) (**Figura 11**). Essa metodologia foi originalmente estabelecida por Kazlauskas e colaboradores^{38,40} para a detecção de esterases

³⁹ Badalassi, F.; Wahler, D.; Klein, G.; Crotti, P.; Reymond, J. L. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, 39, 4067-4070.

⁴⁰ Somers, N. A.; Kazlauskas, R. J. *Tetrahedron: Asymmetry* **2004**, 15, 2991-3004.

em enzimas isoladas pela utilização de substratos cromogênicos, e proposta neste trabalho para a avaliação de epóxido-hidrolases utilizando células íntegras e substratos fluorogênicos.

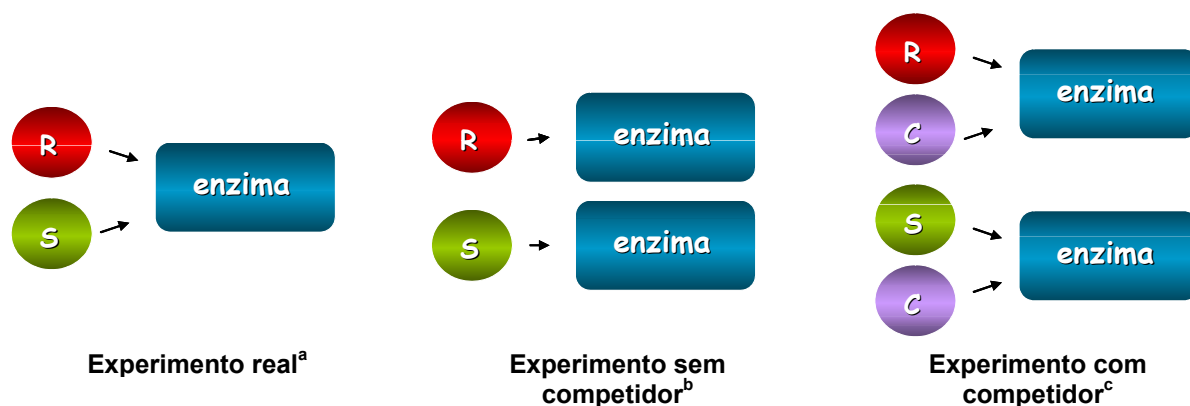


Figura 11: ^a Em um experimento real onde os enantiômeros são avaliados na mistura racêmica há competição entre eles pelo sítio ativo da enzima. ^b A análise dos enantiômeros separadamente ignora o efeito de competição entre eles. ^c A utilização de um competidor frente a cada um dos enantiômeros simula a competição entre eles levando a uma situação mais próxima do real.

Dessa forma, os ensaios foram implantados utilizando as sondas fluorogênicas quirais cedidas pelo Prof. Reymond, nas condições experimentais descritas anteriormente na **sessão 3** em microplacas, porém com cada enantiômero analisado separadamente.

As velocidades iniciais de cada enantiômero foram obtidas utilizando os valores iniciais de leituras intensidade de fluorescência, que foram convertidas em valores de concentração de umbeliferona (pmol/s) utilizando uma curva de calibração. A razão enantiomérica foi calculada comparando as velocidades iniciais de acordo com a **Equação 5**.

A curva de calibração foi preparada à partir de diluições de uma solução estoque de umbeliferona a 20 mM em CH₃CN:H₂O (1:1, v/v), na presença de BSA (2,0 mg/mL) em 20 mM de tampão borato (pH 7,2) e solução aquosa de NaIO₄ (1,0 mM) (**Figura 12**).

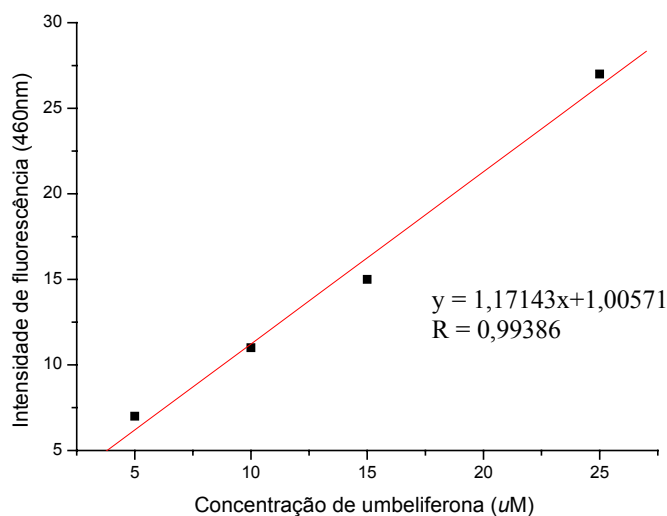


Figura 12: Curva de calibração de umbeliferona em pH 7,2.

É importante ressaltar que os valores de velocidade inicial dos ensaios foram determinados pela subtração do valor da velocidade inicial do controle negativo (V_{controle}) ao valor da velocidade inicial de cada ensaio catalisado pela enzima (V_{ensaio}) (**Equação 6**).

$$V_{\text{inicial}} = V_{\text{ensaio}} - V_{\text{controle}} \quad (6)$$

As sondas utilizadas foram **20-(R)** e **20-(S)**, que são epóxidos terminais e **21-(R,R)** e **21-(S,S)** que correspondem a epóxidos-1,2-dissubstituídos (**Figura 13**).

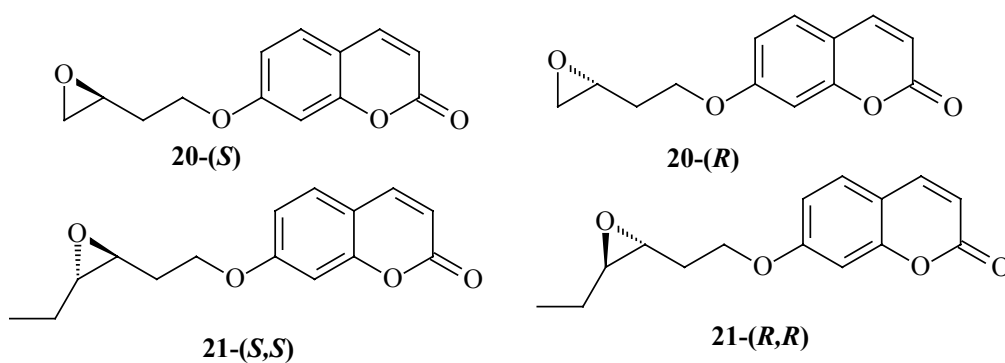


Figura 13: Sondas fluorogênicas quirais utilizadas nos testes de enantiosseletividade de epóxido-hidrolases.

4.2. Adaptação do “Quick E” com células íntegras para detecção de epóxido-hidrolases enantiosseletivas

4.2.1. Concentração de substrato fluorogênico e competidor

A concentração final de 100 μM das sondas foi mantida em relação aos experimentos de triagem de atividade enzimática, entretanto nos experimento com competição, foi adicionado o competidor à concentração final de 10 μM em cada poço. A razão 10:1 entre substrato e competidor foi utilizada com base no trabalho de Kazlauskas e colaboradores⁴⁰, e os resultados obtidos com os controles positivos mostraram que não há diferenças significativas na emissão de fluorescência da sonda na presença de competidor.

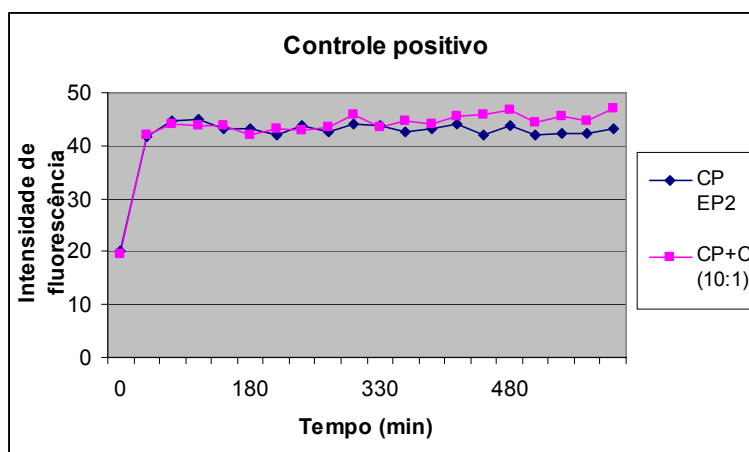


Figura 14: Comparação entre o controle positivo **26** da sonda dissubstituída (**21**) com e sem a presença de competidor.

4.2.1. Otimização do competidor

Nos experimentos com introdução de competição adicionou-se 1,2-epoxioctano (**27**) para atuar como competidor frente às sondas **20-(R)** e **20-(S)**, e o ($\pm$)-cis-oxiranoetanol-3-etil-4-metilbenzenossulfonato (**28**) no caso das sondas **21-(R,R)** e **21-(S,S)** (Figura 15).

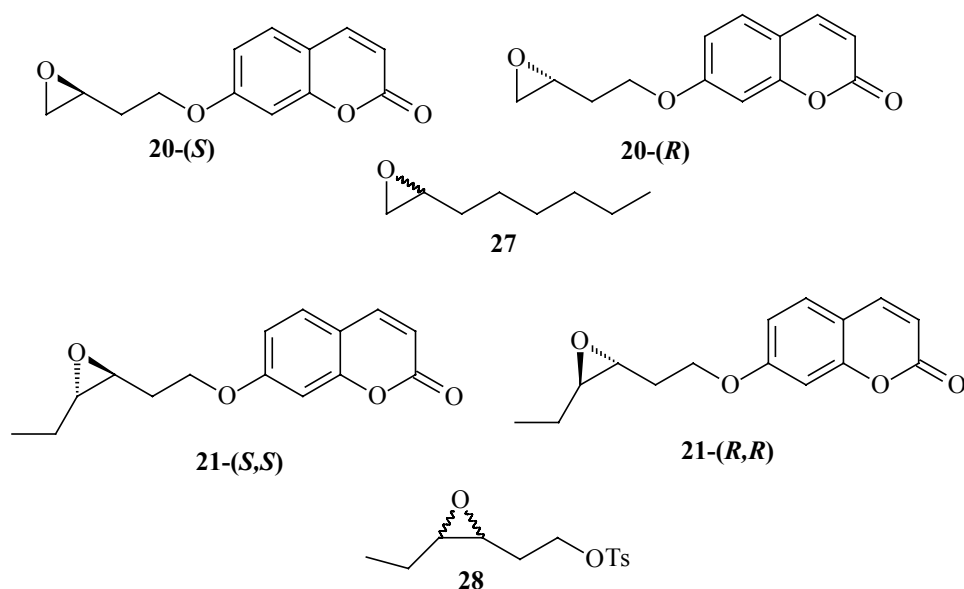


Figura 15: Sondas fluorogênicas quirais e competidores não-fluorogênicos utilizadas nos testes de enantiosseletividade de epóxido-hidrolases.

A necessidade de utilizar competidores com estruturas semelhantes às sondas surgiu da comparação dos valores de E entre experimentos utilizando as sondas dissustituídas **21-(R,R)** e **21-(S,S)** com os competidores **27** e **28**.

O teste mostrou que o microrganismo Ama 32 frente às sondas *cis*-dissustituídas e o competidor **28**, que também é um epóxido dissustituído, apresentou diferença significativa entre a hidrólise de cada enantiômero. Entretanto, na presença do competidor **27**, um epóxido terminal, não apresentou fluorescência significativa. Isso provavelmente ocorreu porque a enzima hidrolisou somente o competidor, o qual é mais reativo, e assim tivemos a falsa idéia de que a enzima não foi capaz de hidrolisar seletivamente esse tipo de sonda (**Figura 16**).

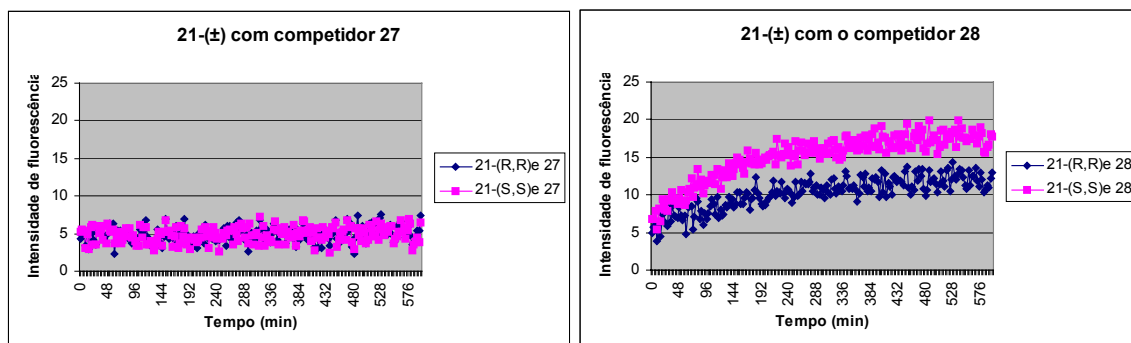


Figura 16: Cinética de reação dos microrganismos Ama 32 utilizando as sondas de epóxido-hidrolases 1,2-dissubstituída 21-(R,R) e 21-(S,S) com um competidor semelhante 28 e com competidor diferente 27.

Além disso, nós comparamos a utilização de um competidor racêmico ($\pm$)-**27** e o competidor quiral **27-(R)** frente à sonda de configuração oposta **20-(S)**, para verificar se haveria diferenças em relação ao tipo de competidor. Os resultados comprovaram que não houve variações nas velocidades iniciais entre os dois experimentos. (**Figura 17**).

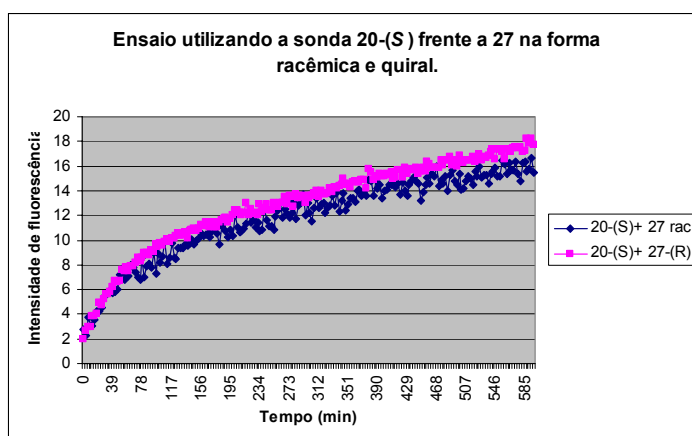


Figura 17: Ensaio utilizando sonda fluorescente quiral 20-(S) frente ao microrganismo *E. nidulans* e ao 1,2-epoxioctano na forma racêmica e na forma enantiomericamente pura como competidor.

Isso indica que não haveria necessidade de utilizarmos como competidor um composto quiral de configuração oposta à sonda, e sim um competidor racêmico com estrutura semelhante à sonda envolvida.

4.2.1. Otimização do pH

Com relação ao pH, solução tampão pH 7,2 (20 mM) mostrou-se a condição mais apropriada para realização dos ensaios de enantiosseletividade, pois nessa

condição a hidrólise espontânea das sondas no início do experimento foi mínima, mas a fluorescência do ânion umbeliferona foi ainda expressiva³⁹ (**Figura 18**).

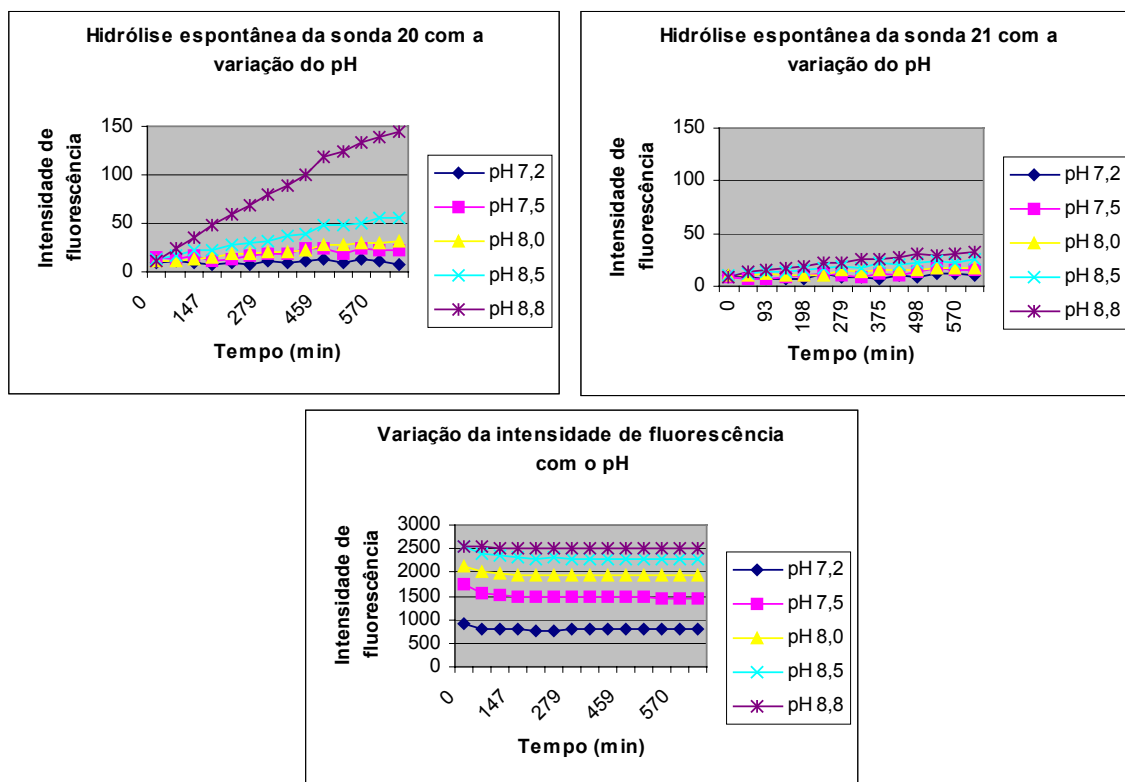


Figura 18: Cinética da hidrólise espontânea das sondas **20** e **21** com a variação do pH, e variação da intensidade de fluorescência do ânion umbeliferona em diferentes valores de pH.

4.3. Resultados e discussões

Com as condições dos ensaios estabelecidas, foram escolhidos alguns dos microrganismos cujas atividades epóxido-hidrolase haviam sido detectadas nos experimentos de HTS, para a realização dos ensaios. Os resultados estão apresentados na **Tabela 6**.

Tabela 6: Enantiosseletividades estimadas de algumas epóxido-hidrolases frente à sonda fluorogênicas quirais

Microrganismos	Preferência enantiomérica	E^* ^a	Quick E^b	% erro
<i>Aspergillus niger</i> CCT 1435	21-(S,S)	2,7	1,8	33,3
<i>Rhizopus oryzae</i> CCT 4964	21-(S,S)	1,3	1,1	15,4
Ama 31	21-(S,S)	1,4	1,1	21,4
Ama 32	21-(S,S)	2,4	1,4	41,6
<i>Candida albicans</i> CCT 0776	20-(S)	4,5	1,5	66,6

^a E^* indica a enantiosseletividade estimada pela comparação das velocidades iniciais de hidrólise medidas com 30 min do início da leitura dos enantiômeros analisados separadamente. ^b Quick E representa os valores medidos com adição de competidor na razão 10:1 de sonda e competidor, respectivamente.

Os resultados da **Tabela 6** revelaram que os experimentos com introdução de competição (Quick E) forneceram valores de razão enantiomérica significativamente distintos dos valores obtidos para os experimento sem competidor (E^*) (**Tabela 6** e **Figura 20**).

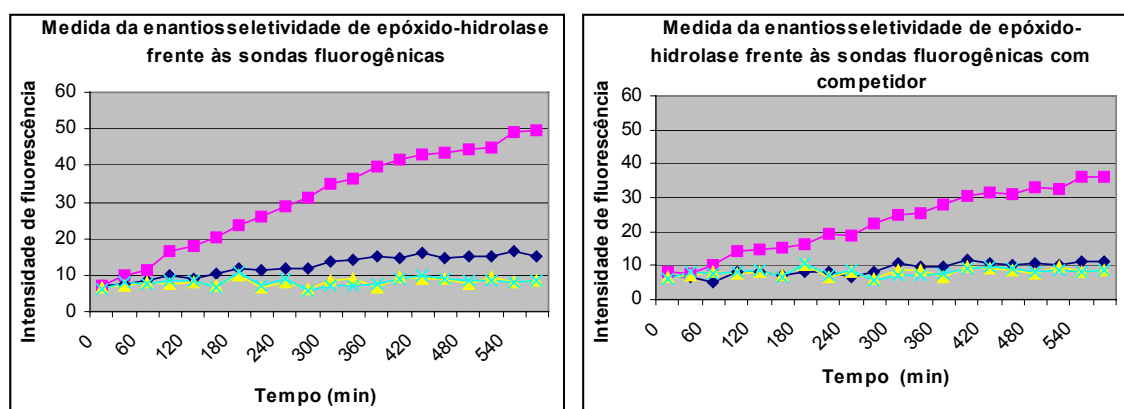


Figura 19: Cinética de reação do microrganismo *A. niger* CCT 1435 utilizando sondas para detecção de epóxido-hidrolases enantiosseletiva utilizando o par de sondas 21-(R,R) e 21-(S,S) e na presença de competidor na razão 10:1 entre sonda e competidor.

Dentre os microrganismos avaliados *C. albicans* CCT 0776, foi o que apresentou diferenças mais significativas entre os dois experimentos, chegando a 66%. Esse comportamento pode ser explicado, pois a disputa entre o competidor

e o enantiômero mais reativo, pelo mesmo sítio ativo da enzima, faz com que a razão entre as velocidades dos dois enantiômeros seja menor (**Figura 201**).

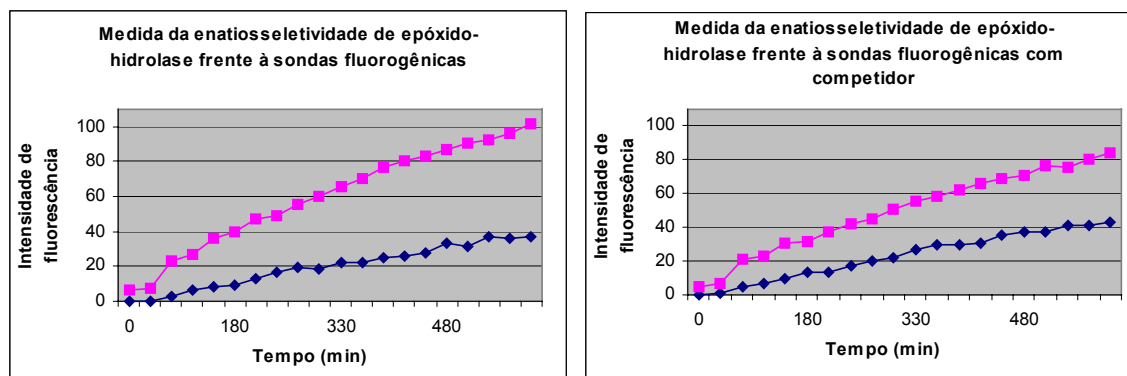


Figura 20: Cinética de reação do microrganismos *C. albicans* CCT 0776 utilizando sondas para detecção de epóxido-hidrolases enantiosseletiva utilizando o par de sondas 20-(R) e 20-(S) e na presença de competidor na razão 10:1 entre sonda e competidor.

Contudo, a fim de verificar a confiabilidade desses resultados, foi feita a reação da *C. albicans* CCT 0776 com a sonda ($\pm$)-**20** para determinação do valor de *E* por metodologias convencionais.

A reação foi monitorada por CG-EM até 42,5% de conversão, entretanto a determinação da pureza enantiomérica desse substrato não pôde ser determinada através de metodologias diretas, pois as condições de análise em cromatografia a gás (CG)⁴¹, ou cromatografia líquida (CLAE)⁴² de fase quiral não foram capazes de resolver os enantiômeros.

Dessa maneira, a alternativa encontrada para determinação do valor de *ee* foi por RMN de ¹H através da derivatização do diol obtido à cerca de 40 % de conversão com o auxiliar quiral ácido (S)-metóxfenilacético ((S)-MPA). Essa metodologia é geralmente aplicada à determinação de configuração absoluta, entretanto nesse caso foi bastante útil para determinação do *ee*, pois permitiu visualizar claramente os sinais referentes a cada um dos enantiômeros derivatizados. Os valores de *ee* foram calculados através da integração dos sinais referentes aos prótons metilênicos de cada um dos isômeros formados (δ_H 4,34 e 4,48), e o cálculo (**Equação 6**) revelou um valor de *ee* 3,6 % (**Figura 21**).

⁴¹ Foram testadas duas colunas de CG de fase quiral: (a) Chrompack, com fase chirasil- β -ciclodextrina (25 m x 0,25 mm x 0,25 μ m) e (b) Heptakis (2,6-di-O-metil-o-pentil-3)- β -ciclodextrina (25 m x 0,25 mm x 0,25 μ m).

⁴² Coluna de CLAE de fase quiral: Chirasel OJ-H com fase quiral celulose (150 cm x 4,6 mm x 0,4 μ m).

$$\% ee = \frac{(1-0,93)}{(1+0,93)} 100 = 3,6 \quad (6)$$

O valor de enantiosseletividade foi calculado utilizando a **Equação 3**, e forneceu um valor de $E = 1,1$, o qual está muito próximo do valor (20 %) obtido pelos experimentos com adição de competidor $E = 1,5$ (Quick E), enquanto que o experimento sem competidor apresentou um valor de $E = 4,5$ muito distinto, com uma porcentagem de erro de 75 %, em relação ao experimento real.

$$E = \frac{\ln[1-0,42 \quad (1+0,036)]}{\ln[1-0,42 \quad (1-0,036)]}$$

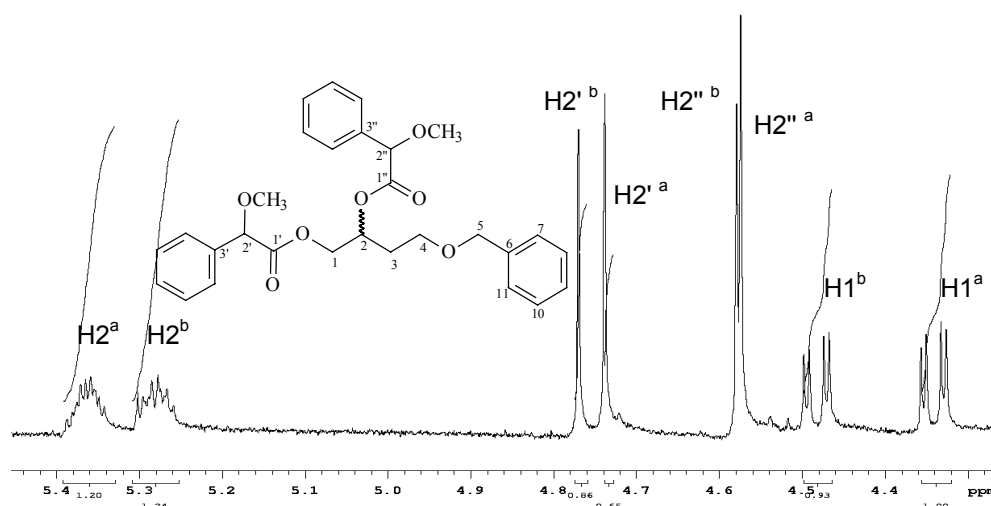


Figura 21: Expansão do espectro de RMN¹H (499,883 MHz, CDCl₃) do produto da reação entre (±)-20 e *C. albicans* derivatizado com (S)-MPA.

Todos os microrganismos testados apresentaram baixos valores de E ($E < 2$), porém, como essa técnica mostrou-se bastante rápida e confiável na determinação da razão enantiomérica de epóxido-hidrolases em células íntegras, poderá ser aplicada à outros microrganismos da nossa coleção, na busca de enzimas com alta enantiosseletividade.

Com relação à seletividade do substrato, observou-se que os epóxidos dissustituídos (**21**) foram mais susceptíveis à abertura enantiosseletiva que os epóxidos terminais, afinal somente *C. albicans* CCT 0776 foi capaz de hidrolisar **20** enantiosseletivamente (**Tabela 6**). Além disso, todos os microrganismos avaliados hidrolisaram preferencialmente os epóxidos com configuração (S).

Dessa maneira, a adaptação dos ensaios para determinação de enantiosseletividade de epóxido-hidrolases em células íntegras, utilizando sondas fluorogênicas quirais na presença de competidor, foi bastante satisfatória, afinal o valor de E concordou com a enantiosseletividade determinada por metodologia convencional.

Além disso, a metodologia para determinação rápida da enantiosseletividade, na presença de células íntegras e competidor, é inédita na literatura, pois a principal aplicação desses ensaios estava limitada à determinação em enzimas ou extratos enzimáticos.

Adicionalmente, esses ensaios são mais rápidos que os métodos convencionais, pois elimina a necessidade de medidas de ee, além de requerer pequenas quantidades de enzima e substrato, e possibilitar o monitoramento de várias reações simultaneamente, viabilizando a triagem de bibliotecas e coleções de microrganismos.

5. REAÇÕES DE BIOTRANSFORMAÇÃO UTILIZANDO SUBSTRATOS NÃO FLUOROGÊNICOS

5.1 Epóxido-hidrolases

Dentre os microrganismos testados para atividade epóxido-hidrolase *C.albicans* CCT 0776 foi o que mais se destacou nos testes de triagem enzimática de alto desempenho, assim para verificar a atividade observada, escolhemos o ($\pm$)-1,2-epoxioctano (**29**) como substrato para realização de reações de biotransformação a fim de determinar os valores de conversão e excesso enantiomérico (ee) frente a um substrato de interesse sintético.

A reação de biotransformação foi monitorada por CG-FID, e a identificação dos enantiômeros foi realizada por co-injeção com padrão (*R*)-(+)-1,2-epoxioctano e com (*S*)-(-)-1,2-octanodiol.

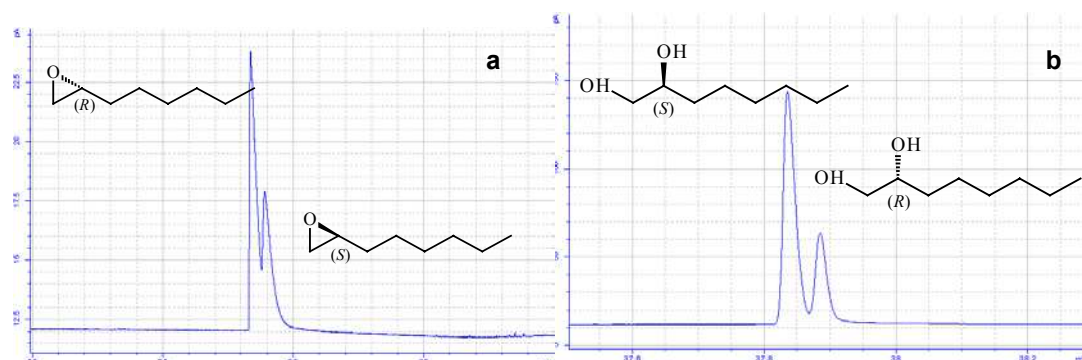


Figura 22: Cromatograma (CG-FID) de uma amostra de ($\pm$)-1,2-epoxioctano fortalecido com o padrão comercial de (*R*)-1,2-epoxioctano (**a**) e ($\pm$)-1,2-octanodiol com co-injeção do (*S*)-1,2-octanodiol (**b**). Condições de análise: 40 ° C/ 15 min, rampa de 1 ° C/min até 55 ° C e 15 ° C/min até 180 ° C onde permaneceu constante por 5 min, $T_{\text{injetor}} = 220$ ° C, $T_{\text{detector}} = 240$ ° C e pressão constante de 10 psi. Coluna: Chrompack CD-Chirasil (25 m x 0,25 mm x 0,25 μ m).

Os resultados resumidos na **Tabela 7** permitiram confirmar a atividade epóxido-hidrolase do microrganismo *C. albicans* CCT 0776, a qual havia sido previamente observada nos experimentos de HTS, e ainda verificar enantiosseletividade baixa pela formação do diol com configuração (*R*).

Porém, além da atividade epóxido-hidrolase, observou-se também um fato curioso, pois após 9 horas de reação, quando a conversão do ($\pm$)-1,2-epoxioctano foi de 100%, notou-se a formação do (*S*)-1,2-octanodiol, com ee maior que 99%

(**Tabela 7**). Esses resultados sugerem que esse microrganismo possui um outro sistema enzimático capaz de desracemizar o ($\pm$)-1,2-octanodiol (**30**) ao final da reação, pois num processo de resolução cinética, após a conversão total do epóxido, o esperado seria a mistura racêmica do diol (**Esquema 10**).

Tabela 7: Reação de hidrólise do **29** com *C. albicans* em tampão fosfato pH 7,0

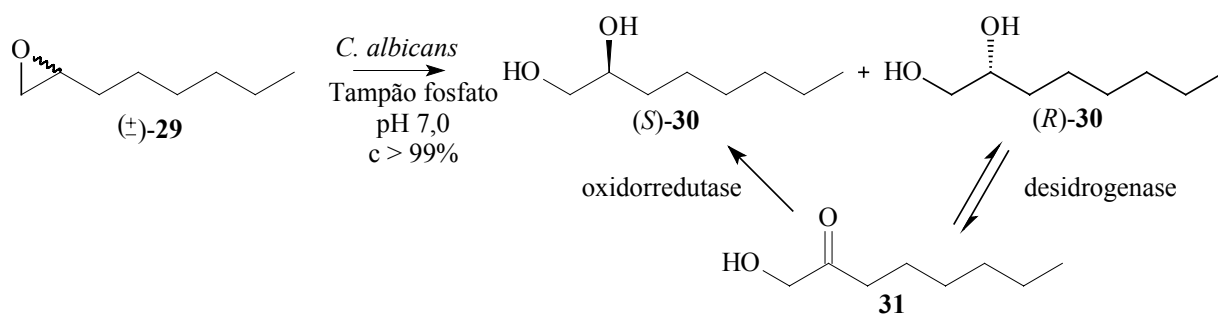
Tempo (h)	% conversão ^a	29		30	
		% ee ^b	configuração absoluta	% ee ^b	configuração absoluta
0,3	16	33,0	(S)	39,0	(R)
1,0	44	34,0	(S)	36,0	(R)
2,0	95	37,0	(S)	21,0	(R)
4,0	>99	-	-	0	-
9,0	>99	-	-	>99,0	(S)

^ac=(A+B)/(A₀+B₀), onde A₀ e B₀ são as áreas de cada enantiômero do substrato no início da reação, e A e B as áreas medidas no decorrer da reação. ^b ee=[(A-B)/(A+B)]100.

Dentre as várias técnicas de desracemização, a estereoinversão de álcoois secundários tem sido amplamente divulgada nos últimos anos⁴³. Esse mecanismo pode ser explicado por uma sequência de reações de oxido-redução, onde num primeiro momento tem-se a oxidação seletiva do álcool secundário com configuração (*R*) à cetona pró-quiral 1-hidróxi-2-octanona (**31**) correspondente, enquanto o outro enantiômero (*S*) permanece intacto. Em seguida a cetona é reduzida por outro sistema enzimático com estereoquímica oposta⁴⁴ (**Esquema 10**).

⁴³ Gruber, C. C.; Lavandera, I.; Faber, K.; Kroutil, W. *Adv. Synth. Catal.*, **2006**, 348, 1789-1805

⁴⁴ Stecher, H.; Faber, K. *Synthesis* **1997**, 1-16.



Esquema 10: Hidrólise de (±)-1,2-epoxioctano e posterior estereoinversão do (R)-1,2-octanodiol.

Esse mecanismo foi proposto para explicar a reação em questão, pelo fato do intermediário aquiral **31** ter sido identificado em pequena quantidade por CG-EM (m/z 144) e fortalecimento com padrão (**Figura 21**).

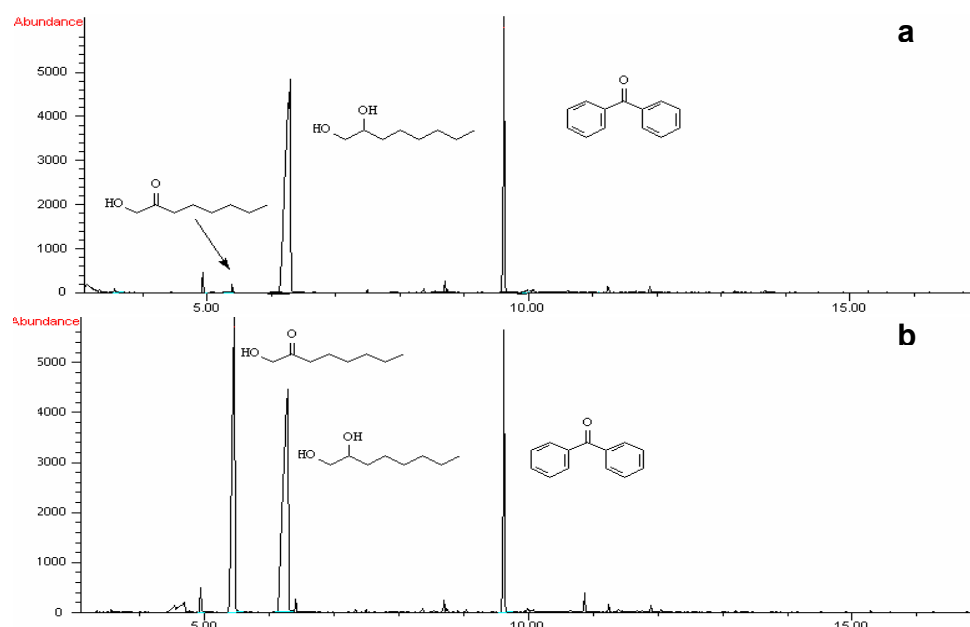


Figura 23: **a-** Cromatograma de íons (CG-EM) da reação de *C. albicans* com (±)-1,2-epoxioctano após 4,0 h. **b-** Cromatograma de íons (CG-EM) da reação de *C. albicans* com (±)-1,2-epoxioctano após 4,0 h fortalecido com 1-hidroxi-2-octanona.

Entretanto, com o intuito de confirmar a ocorrência de estereoinversão, realizou-se a reação desse mesmo microrganismo com o (±)-1,2-octanodiol, e os resultados mostraram que com 15 horas de reação somente o (S)-1,2-octanodiol foi observado com valores de ee maiores que 99%.

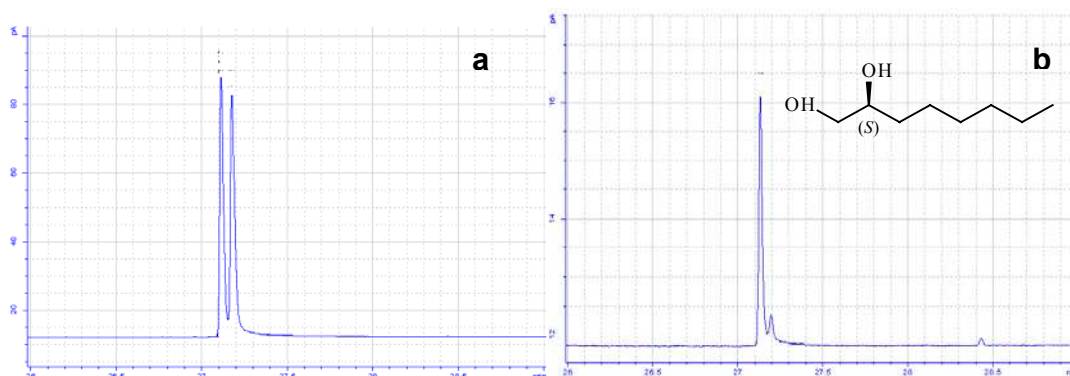


Figura 24: Análise da reação de estereoinversão do (±)-1,2-octanodiol com *C. albicans*. **a-** alíquota no início da reação. **b-** alíquota após 15 h de reação. Condições de análise: 40 ° C/ 15 min, rampa de 10 ° C/min até 180 ° C onde permaneceu constante por 5 min, $T_{\text{injetor}} = 220\text{ ° C}$, $T_{\text{detector}} = 240\text{ ° C}$ e pressão constante de 10 psi. Coluna: Chrompack CD-Chirasil (25 m x 0,25 mm x 0,25 μm).

Por fim, realizou-se também a reação da *C. albicans* com a cetona **31**, para verificar se a desracemização do diol **30** estaria ocorrendo realmente por estereoinversão, onde seria possível obter 100% do (S)-**30**, ou se esse microrganismo estaria fazendo somente a resolução cinética do diol racêmico, onde seria observada a formação de 50% do (S)-**30** e 50% da cetona **31**, sem a posterior redução seletiva da cetona.

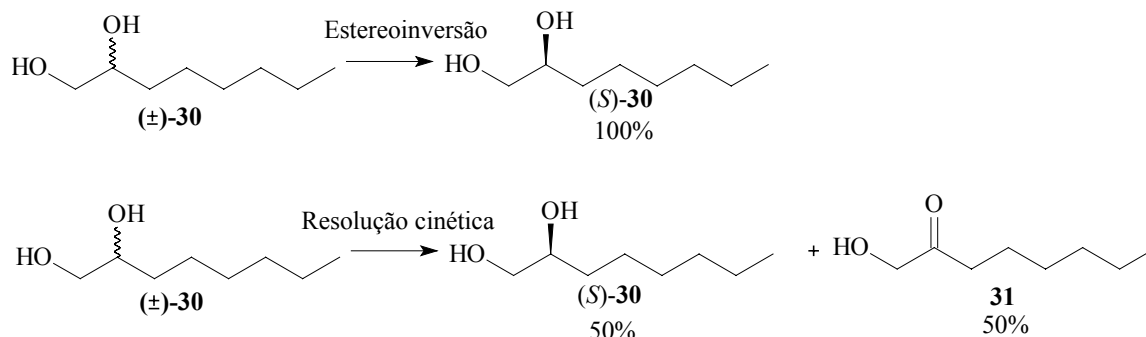


Figura 25: Num processo de estereoinversão o microrganismos é capaz de oxidar seletivamente o (R)-diol e posteriormente reduzir o intermediário aquiral fornecendo 100% do (S)-diol, em uma resolução cinética só é possível obter 50% do (S)- diol e 50% do produto da oxidação seletiva do (R)-diol.

Como esperado, após 18 h de reação, toda a cetona **31** foi convertida em **30**, com pureza enantiomérica maior que 99%, confirmando assim o mecanismo de estereoinversão do (R)-1,2-octanodiol.

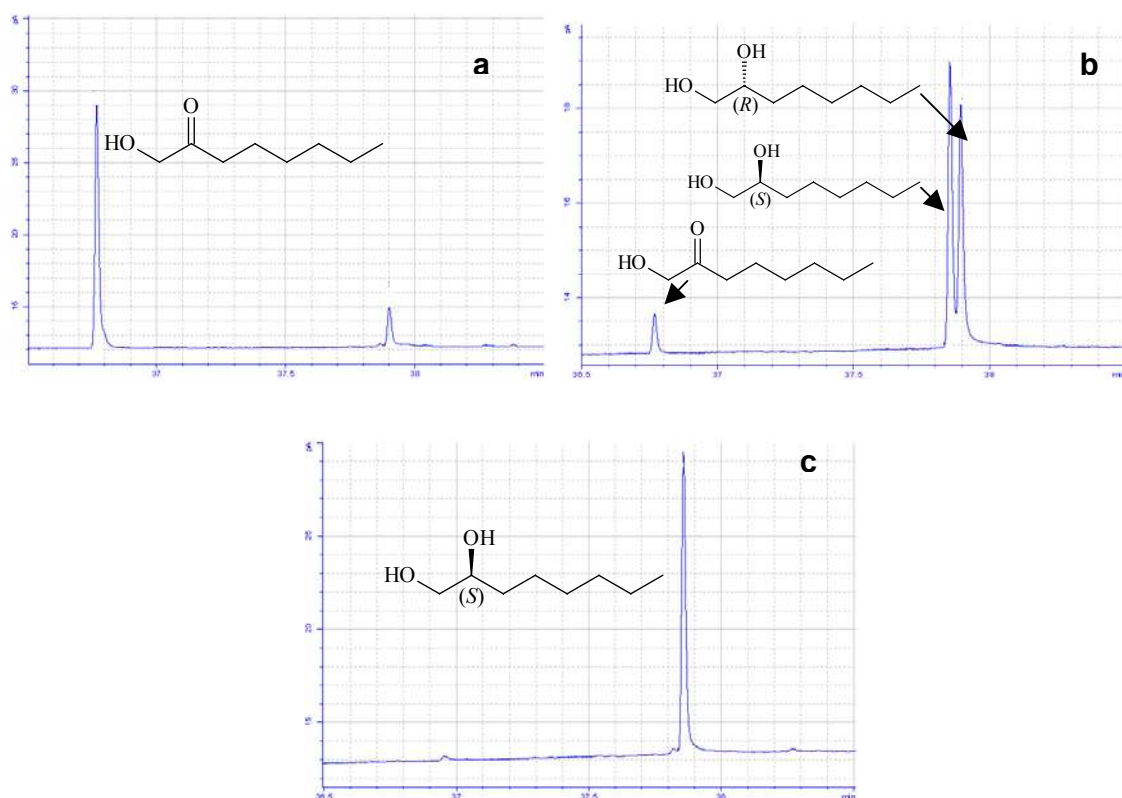


Figura 26: Análise da reação de redução da 1-hidróxi-2-octanona com *C. albicans*. **a-** alíquota no início da reação. **b-** alíquota após 6 h de reação. **c-** alíquota após 18h de reação. Condições de análise: 40 ° C/ 15 min, rampa de 1 ° C/min até 55 ° C e 15 ° C/min até 180 ° C onde permaneceu constante por 5 min, $T_{\text{injetor}} = 220^{\circ} \text{C}$, $T_{\text{detector}} = 240^{\circ} \text{C}$ e pressão constante de 10 psi. Coluna: Chrompack CD-Chirasil (25 m x 0,25 mm x 0,25 μm).

É importante ressaltar que o cromatograma **b** revela a presença dos dois enantiômeros do diol **30**, enquanto no cromatograma **c** somente (S)-enantiômero foi detectado. Essa observação concorda com o mecanismo proposto^{44,43}, em que a etapa de oxidação do (R)-enantiômero é reversível, sendo possível obter o (S)-diol e o (R)-diol à partir da cetona pró-quiral, porém a redução em direção ao (S)-diol é irreversível, favorecendo assim a sua formação em relação ao (R)-diol no final da reação (**Esquema 10**).

Dessa maneira, podemos concluir que o microrganismo *C. albicans* CCT 0776 é capaz de realizar estereoinversão do ($\pm$)-1,2-octanodiol fornecendo o (S)-1,2-octanodiol com 100% de rendimento teórico e alta pureza enantiomérica (>99%). Esse mesmo comportamento já havia sido descrito anteriormente para

outras espécies do gênero *Candida*^{45,46} e também observado anteriormente no grupo de pesquisa da Profa. Anita J. Marsaioli²³ com o microrganismo *A. niger* CCT 1435.

⁴⁵ Mu, X. Q.; Xu, Y.; Nie, Y.; Ouyang, J.; Sun, Z. H. *Process Biochem.* **2005**, *40*, 2345-2350.

⁴⁶ Nie, Y.; Xu, Y.; Mu, X. Q.; Tang, Y.; Jiang, J.; Sun, Z. H. *Biothecnol. Lett.* **2005**, *27*, 23-26.

5.2 Estereoinversão

5.2.1 Considerações gerais

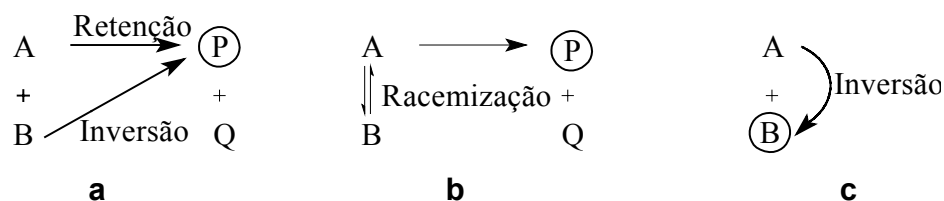
Diante dos resultados obtidos com o microrganismo *C. albicans* CCT 0776, decidiu-se investigar melhor esse mecanismo de estereoinversão visando à obtenção de álcoois secundários com aplicação industrial na forma enantiomericamente pura.

Álcoois secundários quirais são intermediários sintéticos amplamente empregados em setores industriais, como indústrias farmacêuticas, agroquímicas, aromas e fragrâncias ⁴⁷.

Os métodos mais empregados na obtenção de álcoois enantiomericamente puros partem da redução assimétrica das cetonas correspondentes, por reagentes químicos ou biocatalíticos⁴⁷, ou aplicam técnicas de desracemização, que fornecem um único enantiômero a partir de misturas racêmicas. Essas últimas são mais vantajosas em relação às resoluções enzimáticas, pois fornecem um único estereoisômero do produto com rendimento teórico de 100%⁴⁴.

As técnicas de desracemização englobam processos que consistem na transformação de ambos os enantiômeros do substrato (A e B) em um único enantiômero do produto (P ou Q). Esses processos podem ser a enantioconvergência que consiste na retenção e inversão de configuração (**Esquema 11a**), a resolução cinética dinâmica onde o enantiômero não reativo é racemizado (**Esquema 11b**), e a estereoinversão, onde somente um dos enantiômeros do substrato é transformado (**Esquema 11c**), nesse caso o processo é mais econômico, pois exige a metade dos biocatalisadores necessários em relação aos processos enantioconvergentes⁴⁷.

⁴⁷ Gruber, C. C.; Lavandera, I; Faber, K.; Kroutil, W. *Adv. Synth. Catal.*, **2006**, 348, 1789-1805.

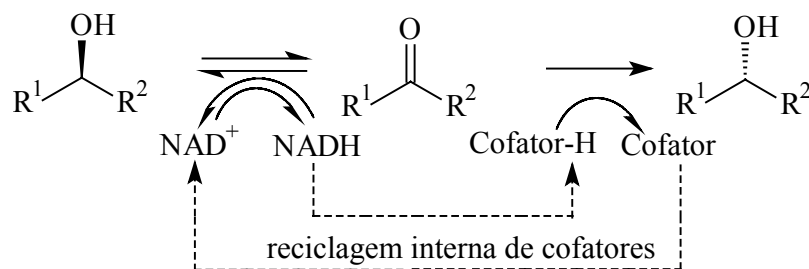


Esquema 11: Desracemização. **a-** Por enantioconvergência onde duas enzimas com seletividade oposta fornecem o mesmo produto. **b-** Por resolução cinética dinâmica onde a racemização equilibra os enantiômeros do substrato. **c-** Por estereoinversão de somente um dos enantiômeros.

Nos últimos anos foram relatados muitos exemplos de estereoinversão de álcoois secundários empregando células microbianas e células de plantas, porém pouco é conhecido sobre o mecanismo e as enzimas envolvidas⁴⁷. O que se conhece é que esse sistema ocorre via uma sequência de oxidação e redução envolvendo o correspondente intermediário aquiral, o qual é frequentemente detectado em pequenas quantidades, como foi exemplificado na sessão 5.1.

Nakamura e col.⁴⁸ sujeitaram o 1-*d*-feniletanol à estereoinversão microbiana e mostraram que o deutério do enantiômero reativo é trocado por hidrogênio enquanto o enantiômero remanescente permanece deuterado, assim foi concluído que duas enzimas devem estar envolvidas. Dessa maneira a explicação mais óbvia para esse mecanismo é o envolvimento de duas desidrogenases NAD-dependente com estereopreferência oposta⁴⁷.

O envolvimento de reações de oxidação-redução consecutivas faz com que o balanço redox desse processo seja zero e que nenhuma reciclagem externa de cofatores seja necessária^{44,47} (**Esquema 12**).



Esquema 12: Reciclagem interna de cofatores na deracemização de álcoois secundários.

⁴⁸ Nakamura, K.; Fujii, M.; Ida, Y. *Tetrahedron: Asymmetry* **2001**, 12, 3147-3153.

Dessa maneira, o ($\pm$)-4-fenilmetoxi-1,2-butanodiol (**32**) foi escolhido como substrato de interesse por ser um diol vicinal terminal, assemelhando-se assim ao 1,2-octanodiol que já havia sido estudado, e principalmente, por ser derivado do 1,2,4-butanotriol (**33**), o qual apresenta uma gama de aplicações na forma enantioméricamente pura, como bloco construtor para diversas sínteses.

A **Figura 27** ilustra alguns exemplos de moléculas biologicamente ativas que foram sintetizadas à partir do triol **33** enantiomericamente puro. Por exemplo, a Rasfonina (**34**), que é um produto natural com atividade indutora de apoptose celular, foi sintetizada à partir do (*S*)-**33**⁴⁹. Outros produtos naturais que foram sintetizados partindo do (*S*)-**33** como única fonte de quiralidade são a (+)-Azimina (**35**) e (+)-Carpaína (**36**) que apresentam comprovada atividade antitumoral⁵⁰.

Já o produto natural (-)-Calistatina A (**37**) que também apresenta potente atividade antitumoral foi sintetizado à partir do (*R*)-**33**⁵¹, assim como o ácido lisofosfatídico (**38**), que é um fosfolípídeo de ocorrência natural que exibe diversas atividades biológicas para uma variedade de tipos celulares⁵².

⁴⁹ Akiyama, K.; Yamamoto, S.; Fujimoto, H.; Ishibashi, M. *Tetrahedron*, **2005**, 61, 1827-1833.

⁵⁰ Sato, T; Aoyagi, S.; Kibayashi, C. *Org. Letters*, **2003**, 21, 3839-3842.

⁵¹ Dias, L. C.; Meira, P. R. R. *J. Org. Chem.*, **2005**, 70, 4762-4769.

⁵² Xu, Y; Qian, L; Pontsler, A. V.; McIntyre, T. M.; Prestwich, G. *Tetrahedron*, **2004**, 60, 40-49.

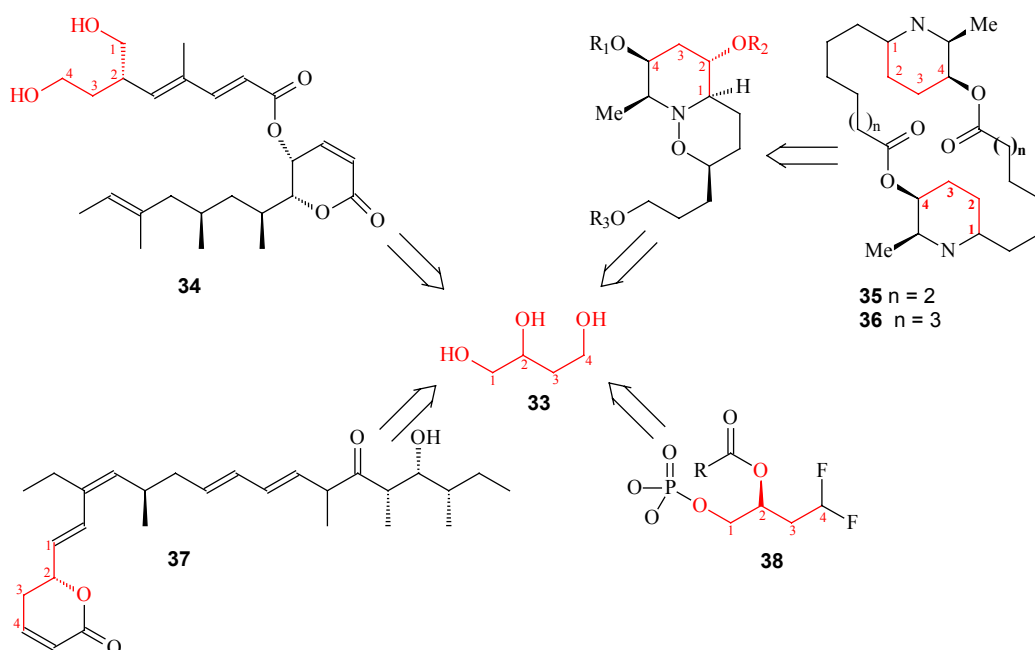
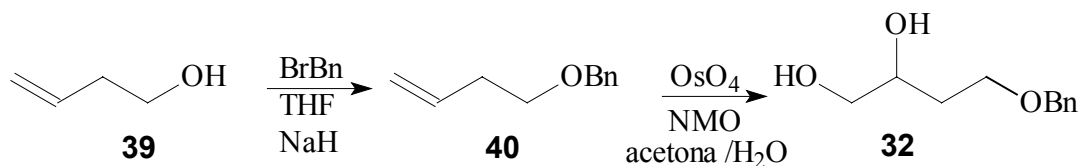


Figura 27: Compostos com comprovada atividade biológica sintetizados à partir do **33** nas formas enantiomericamente puras (R) ou (S).

5.2.2 Resultados e discussões

5.2.2.1 Síntese do substrato

O substrato de interesse **32** foi sintetizado à partir do but-3-en-1-ol (**39**). O álcool primário **39** foi primeiramente protegido por com benzila na presença de BrBn e NaH fornecendo o alceno benzilado (**40**), que posteriormente foi diidroxilado na presença de OsO₄ fornecendo o diol vicinal **32** (Esquema 13)²³.



Esquema 13: Rota sintética para obtenção do (±)-4-fenilmetoxi-1,2-butanodiol.

5.2.2.2 Reação de biotransformação

A reação com o microrganismo foi monitorada por CG-EM, porém a determinação a pureza enantiomérica desse substrato não pôde ser realizada por metodologias diretas, pois as condições de análise em cromatografia a gás (CG)⁴¹,

ou cromatografia líquida (CLAE)⁴² de fase quiral não foram capazes de resolver os enantiômeros.

Além disso, foi testado também a utilização do reagente de deslocamento quiral, tris-[heptafluoropropilhidroximetileno)-(+)-canforato de Eu III (Eu(hfc)₃), no qual, o Eu III poderia se comportar como um ácido de Lewis, e complexar-se à hidroxila do álcool. Esse efeito proporcionaria a variação no deslocamento químico dos dois enantiômeros e permitiria a determinação do ee através da integração dos sinais referentes a cada um deles, entretanto para o substrato em questão não foi possível observar essa variação, mas somente o alargamento dos sinais referentes ao diol.

Dessa maneira a alternativa encontrada foi a determinação dos ee por RMN de ¹H através da derivatização do diol resultante da reação com o microrganismo com um agente de derivatização quiral, como o ácido (S)-metoxifenilacético ((S)-MPA).

Num primeiro momento derivatizou-se o (±)-4-fenilmetoxi-1,2-butanodiol na forma racêmica com o (S)-MPA e verificou-se na região δ_H 3,9 a 4,8 a presença de sinais duplicados na razão 1:1 referentes a cada um dos enantiômeros derivatizados (**Tabela 8** e **Figura 28**). As atribuições completas dos sinais foram feitas com auxílio de RMN de ¹³C, ¹H e ¹H gCOSY, ¹H e ¹³C HSQC.

O mesmo procedimento foi aplicado às alíquotas resultantes da reação do substrato com o microrganismo *C. albicans* CCT 0776, e os valores de ee foram calculados através da integração dos sinais referentes aos prótons metínicos de cada um dos enantiômeros (δ_H 4,52 e 4,58) (**Tabela 9**). A comparação entre os sinais dos espectros das alíquotas no início e após 72 h está apresentada na (**Figura 28**).

Tabela 8: Valores de δ_H dos espectros de RMN 1H do 4-fenilmetoxi-1,2-butanodiol derivatizado com (S)-MPA resultantes da reação com o microrganismo *C. albicans* CCT 0776

Composto	Razão entre os diastereisômeros ^b	Valores de δ_H		
		Benzílico	Metilênicos	Metínicos do (S)-MPA
Racêmico	1:1	4,10; 4,35	3,95 e 4,30; 4,13 e 4,40	4,52 e 4,58; 4,70 e 4,30
Alíquota 48 h	1:0,44	4,10; 4,35^a	3,95 e 4,30^a ; 4,13 e 4,40	4,52 e 4,70^a , 4,58 e 4,30

^a os valores em negrito indicam os sinais que apresentam maior intensidade. ^b Razão entre os sinais referentes aos prótons metilênicos de cada enantiômero.

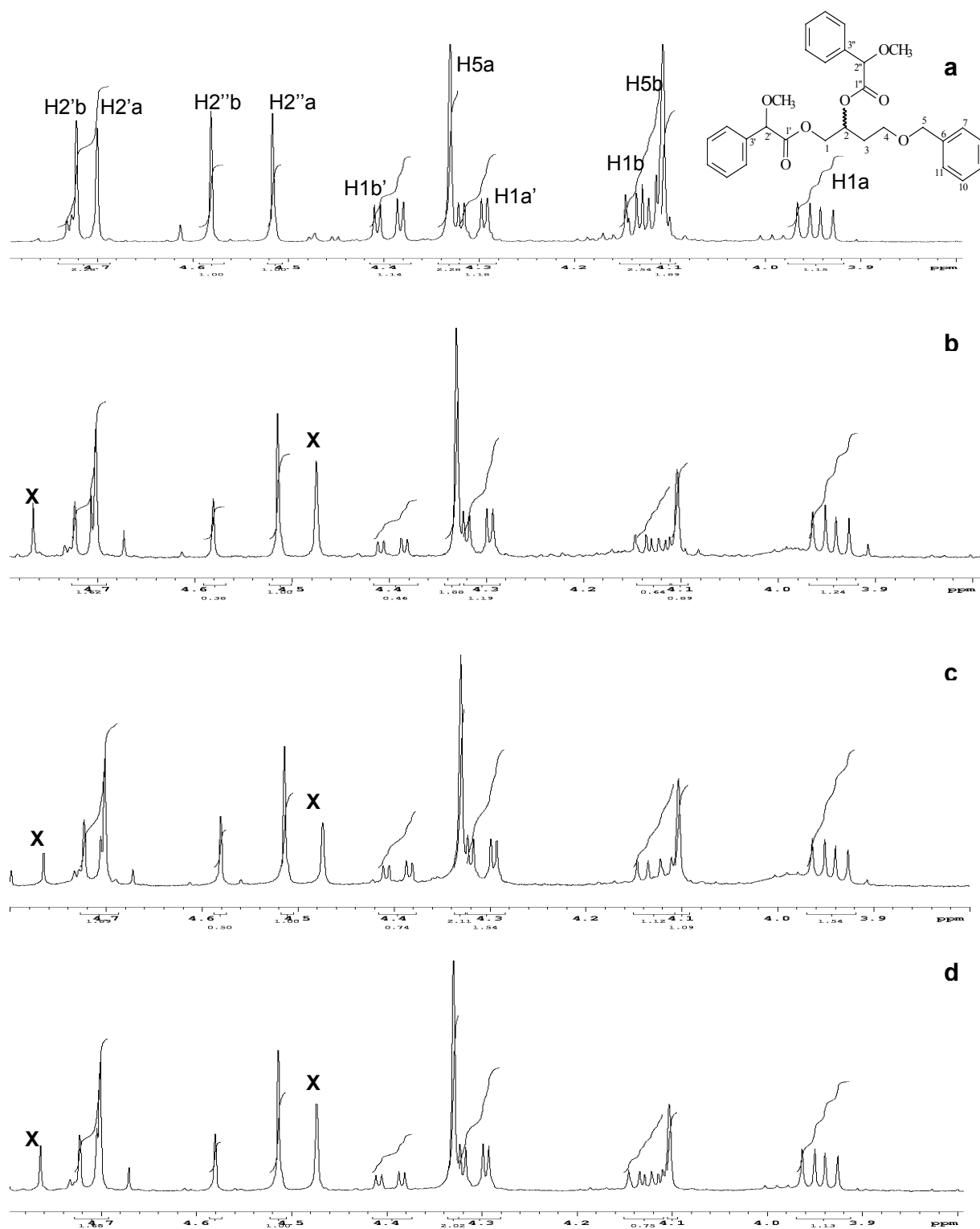


Figura 28: Expansão do espectro de RMN¹H (499,883 MHz, CDCl₃) **a-** (±)-4-fenilmetoxi-1,2-butanodiol derivatizado com (S)-MPA; **b-** alíquota após 24 h; **c-** alíquota após 48 h; **d-** alíquota após 72 h; **X-** pico de impureza do espectro .

Tabela 9: Acompanhamento da reação de estereoinversão do (±)-4-fenilmetoxi-1,2-butanodiol pelo microrganismos *C. albicans* CCT 0776 por RMN¹H

Tempo (h)	% ee ^a	Configuração absoluta ^b
0	0	S
24	33	S
48	45	S
72	34	S

^a ee=[(A-B)/(A+B)]100. ^b configuração absoluta determinada pela comparação com os valores de δ_H do padrão sintético (S)-4-fenilmetoxi-1,2-butanodiol derivatizado com o (S)-MPA.

Os resultados obtidos mostraram que após 24 h de reação foi observado um ee de 33%, chegando a 45 % em 48h e caindo novamente a 34 % após 72 h de reação. Acima desse período o microrganismo começa a degradar o diol a outro produto ainda não identificado. Esses resultados indicam que esse microrganismo é capaz de transformar seletivamente um dos enantiômeros do (±)-**32** com ee de 45%.

Essa metodologia de derivatização com o reagente de derivatização quiral (S)-MPA mostrou-se duplamente útil, pois permitiu a determinação dos valores de ee, e a determinação da configuração absoluta do diol remanescente pelos efeitos de proteção e desproteção do grupo fenila do reagente derivatizante MPA como será explicado a seguir.

5.2.2.3 Determinação da configuração absoluta

A determinação da configuração de compostos quirais por RMN ¹H tem sido amplamente aplicada como ferramenta de rotina. A principal metodologia utilizada para essa finalidade são os métodos originalmente propostos por Mosher e Trost⁵³, que são baseados na derivatização de álcoois secundários com os reagentes MTPA (ácido metóxitrifluorometilfenilacético) ou o MPA (ácido metóxifenilacético).

Em geral essa técnica envolve a derivatização do substrato com os dois enantiômeros do auxiliar quiral, ou do substrato racêmico com um dos

⁵³ Trost, B. M.; Belletire, J. L.; Godlesk, S.; McDougal, P. G.; Balkovec, J. M. *J Org. Chem.*, **1986**, 51, 2370-2374.

enantiômeros do auxiliar, seguido da comparação dos deslocamentos químicos dos hidrogênios vizinhos aos centros assimétricos dos ésteres formados. Kakisawa e colaboradores⁵⁴ ampliaram consideravelmente essa metodologia para aplicação dos deslocamentos de hidrogênios mais distantes do centro assimétrico.

O uso da RMN ^1H baseia-se no efeito anisotrópico que o grupo fenila do auxiliar quiral (MPA ou MTPA) exerce nos substituintes (L_1 e L_2) do substrato. Trost e colaboradores⁵³ estabeleceram que a conformação mais estável no caso do auxiliar MPA, é aquela onde o substituinte de menor prioridade (H^1) está no mesmo plano que a carbonila e a metoxila do MPA (**Figura 29**).

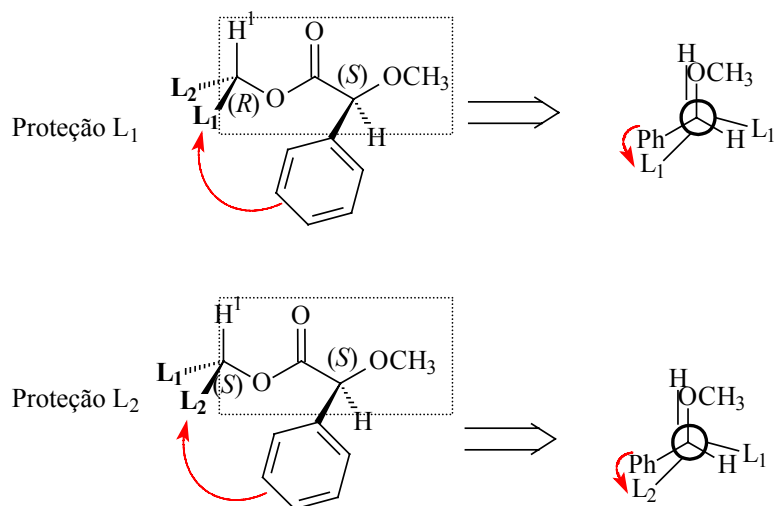


Figura 29: Conformações predominantes para ésteres (S)-MPA dos dois enantiômeros avaliados separadamente.

A análise do espectro de RMN de ^1H do produto da reação revelou que os duplos dubletos atribuídos aos prótons $\text{H}1$ e $\text{H}1'$ (δ_{H} 3,95 e 4,30) do isômero mais abundante, encontravam-se mais protegidos em relação aos sinais correspondentes do isômero minoritário (δ_{H} 4,13 e 4,40). Por outro lado, os hidrogênios benzílicos (δ_{H} 4,10 e 4,35) sofriam efeito oposto, ou seja, no isômero majoritário encontravam-se mais desprotegidos em relação ao minoritário.

⁵⁴ Ohtani, I.; Kusumi, T.; Kashman, Y.; kakisawa, H. *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, 113, 4092-4096

Tabela 10: Valores de $\Delta\delta$ entre os substituintes majoritário e minoritário dos ésteres (S)-MPA.

Próton	$\Delta\delta^{\text{Mm*}}$
H1	-0,18
H1'	-0,10
H5	0,24

* Os valores de $\Delta\delta$ foram calculados pela diferença entre o isômero majoritário (M) e o minoritário (m). Os valores de $\Delta\delta < 0$ indicam que o grupo sofreu proteção do (S)-MPA, os sinais $\Delta\delta > 0$ indicam desproteção.

Conclui-se então que no caso do enantiômero (S), os hidrogênios metilênicos sofrem o efeito anisotrópico de proteção do grupo fenila do auxiliar quiral (S)-MPA, enquanto que no caso do enantiômero (R) são os hidrogênios benzílicos que sofrem esse efeito (**Figura 20**).

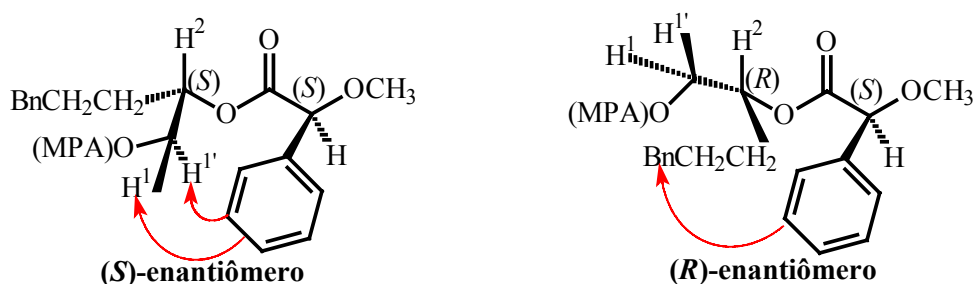
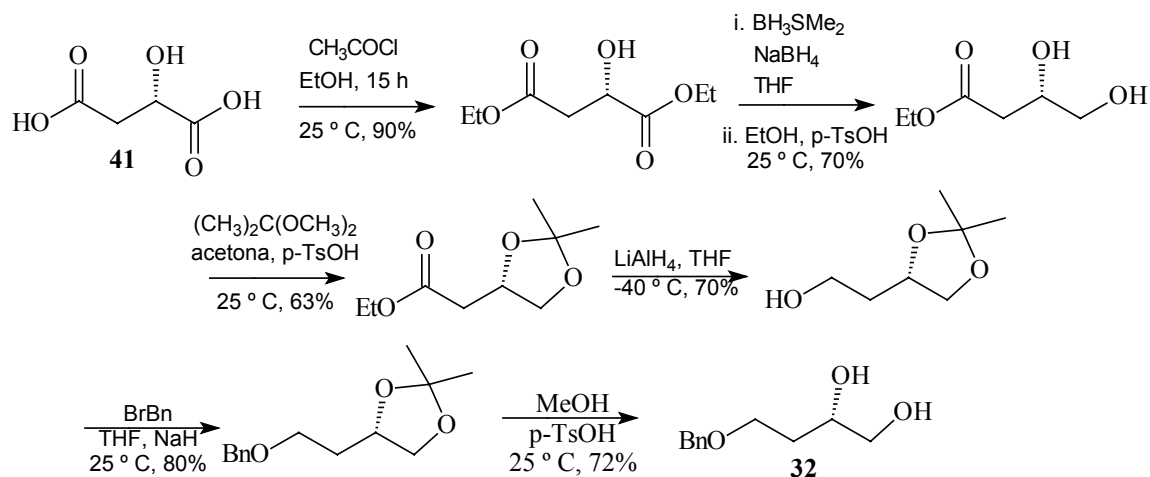


Figura 30: Modelos conformacionais para ésteres (S)-MPA do composto 4-fenilmetoxi-1,2-butanodiol.

Dessa maneira foi possível atribuir que o microrganismo *C. albicans* CCT 0776, fornece preferencialmente o enantiômero (S) (**Tabela 9**). Entretanto essa metodologia pode ser problemática na determinação da configuração absoluta de dióis, pois os efeitos de deslocamento produzidos pelo anel aromático do agente auxiliar em cada uma das hidroxilas do diol, afetam não somente os substituintes do carbono assimétrico, mas também os substituintes do segundo átomo de carbono, assim os deslocamentos químicos observados resultam na ação de ambos os efeitos de proteção e desproteção.

A fim de confirmar a configuração absoluta atribuída com base na metodologia acima descrita, utilizou-se o diol enantiomericamente puro (S)-4-

fenilmetoxi-1,2-butanodiol ((S)-**32**), derivatizado com o (S)-MPA para comparação entre os espectros de RMN de ^1H . A síntese foi realizada pela Dra. Luciana G. de Oliveira à partir do ácido L-málico (**41**), e após 6 etapas forneceu o (S)-**32** com rendimento de 16 % (**Esquema 14**).



Esquema 14: Rota sintética utilizada para obtenção do (S)-4-fenilmetoxi-1,2-butanodiol.

A comparação entre os espectros do produto da reação e do diol enantiomericamente puro derivatizados confirmaram a configuração absoluta do diol presente em maior proporção, mostrando a preferência enantiomérica pela formação do (S)-4-fenilmetoxi-1,2-butanodiol pelo microrganismo *C. albicans* CCT 0776 (**Figura 31**).

Foi necessária a realização de todos esses experimentos para determinação de configuração absoluta do produto da reação biocatalítica, devido ao baixo valor de rotação óptica relatado na literatura $[\alpha]^{25}_{\text{D}} + 4,3^\circ$ (c 2,50, CHCl_3)⁵⁵ para o composto (S)-**32**, o que dificultou a comparação com a rotação óptica do produto obtido da reação de biotransformação.

⁵⁵ Beuerle, T.; Engelhard, S.; Bicchi, C.; Schwab, W. *J. Nat. Prod.*, **1999**, 62, 35-40.

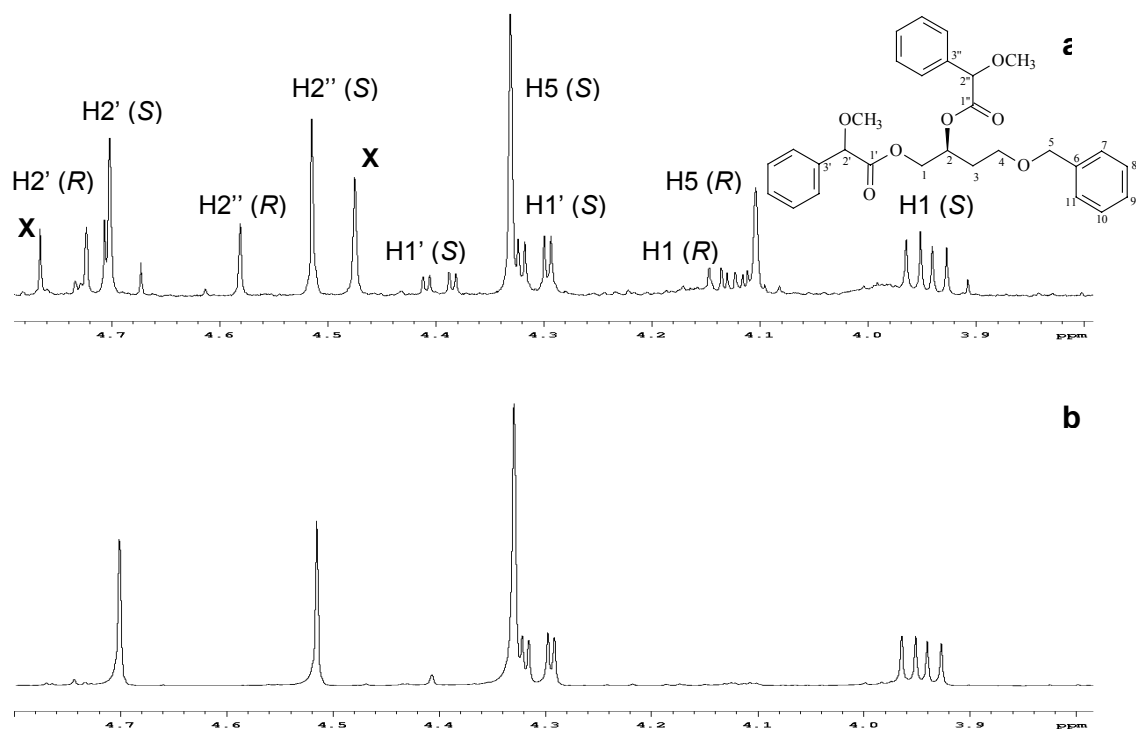


Figura 31: Espectros de RMN de ^1H (499,883 MHz, CDCl_3) **a-** do produto da reação do ($\pm$)-4-fenilmetoxi-1,2-butanodiol e *C. albicans* derivatizado com (S)-MPA, e **b-** (S)- 4-fenilmetoxi-1,2-butanodiol derivatizado com (S)-MPA..

Assim podemos concluir que o microrganismo *C. albicans* é capaz de fornecer o (S)-4-fenilmetoxi-1,2-butanodiol, com pureza enantiomérica de 45%. O mecanismo de estereoinversão desse substrato será melhor investigado visando a obtenção desse produto com maior pureza enantiomérica através de variações nas condições reacionais, e também pela utilização de outros microrganismos pertencentes à nossa coleção, que apresentaram a capacidade de realizar estereoinversão de álcoois secundário.

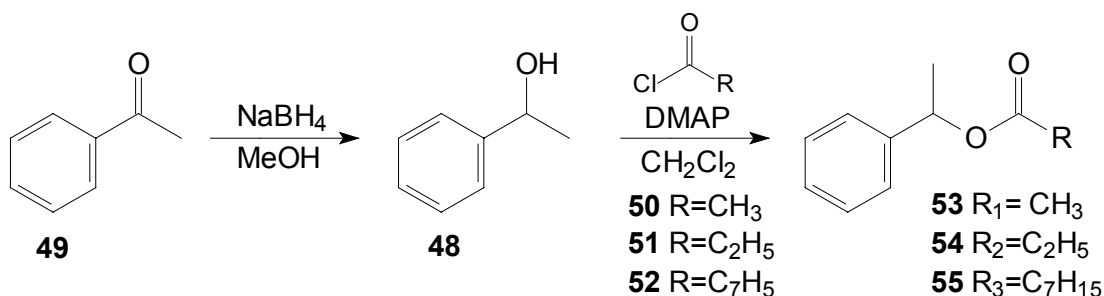
5.3. Esterases e lipases

A triagem enzimática de esterases e lipases permitiu selecionar alguns microrganismos com alta atividade enzimática, e alta seletividade referente ao tamanho da cadeia alifática dos ésteres testados.

Dessa maneira alguns desses microrganismos foram selecionados para reações de biotransformação por metodologias convencionais a fim de verificar os resultados previamente observados por HTS, e ainda determinar a enantiosseletividade desses microrganismos frente à substratos não-fluorogênicos.

Para a realização das reações de biotransformação selecionamos os microrganismo Ama 19, Ama 32, *C. echinulata* CCT 4259, que se destacaram nos ensaios de triagem de alto desempenho realizados neste trabalho, e também os microrganismos Ame 8, Ame 17 e Ame 23, os quais foram triados pela Dra. Luciana de Oliveira.

Os substratos propostos para esses ensaios foram os derivados esterificados do álcool α -metilbenzílico (**48**). A síntese desses substratos foi realizada através da redução da acetofenona (**49**) na presença de NaBH_4 fornecendo o álcool **48** com rendimento de 90%, que posteriormente foi esterificado com os respectivos cloretos de ácidos (**50**), (**51**) e (**52**) na presença de DMAP. Os ésteres (**53**), (**54**) e (**55**) foram obtidos com rendimentos de 75-85% (**Esquema 15**).



Esquema 15: Rotas sintéticas para obtenção dos derivados esterificados do álcool metilbenzílico.

O acompanhamento das reações de biotransformação foi realizado por CG-FID de fase quiral, e a razão enantiomérica (*E*) foi obtida aplicando as equações de Sih³⁷ e colaboradores, porém os valores de conversão empregados foram

calculados à partir da formação do produto, e não em relação ao desaparecimento do substrato como foi proposto por Sih e colaboradores³⁷, já que o substrato apresentou variações relacionadas à sua solubilidade no meio reacional.

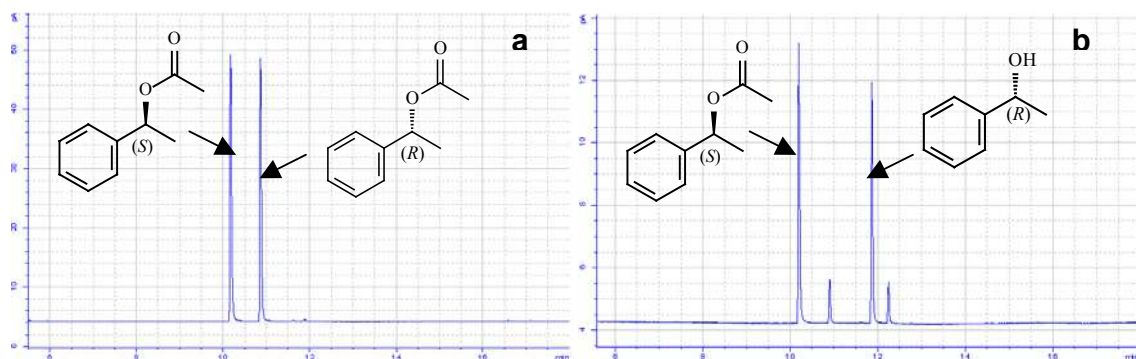


Figura 32: a – Cromatogramas (CG- FID) de a- **53**, b- resolução cinética de **53** por Ame 8. Condições de análise: 40-180 ° C a 15 ° C / min, onde permaneceu constante por 5 min, $T_{\text{injetor}} = 220$ ° C, $T_{\text{detector}} = 240$ ° C, pressão constante de 10 psi. Coluna: Chrompack CD-Chirasil (25 m x 0,25 mm x 0,25 μm).

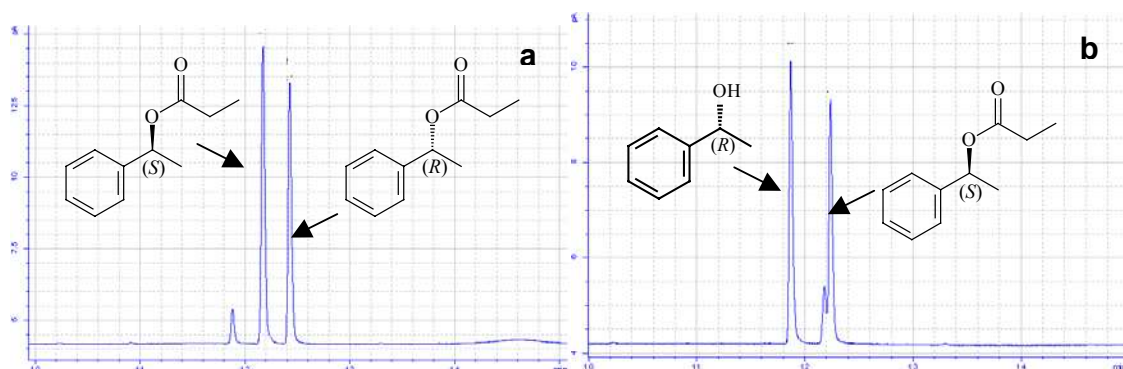


Figura 33: a – Cromatogramas (CG-FID) de a- **54**, b- resolução cinética de **54** por Ame 8. Condições de análise: 40-180 ° C a 15 ° C / min, onde permaneceu constante por 5 min, $T_{\text{injetor}} = 220$ ° C, $T_{\text{detector}} = 240$ ° C, pressão constante de 10 psi. Coluna: Chrompack CD-Chirasil (25 m x 0,25 mm x 0,25 μm).

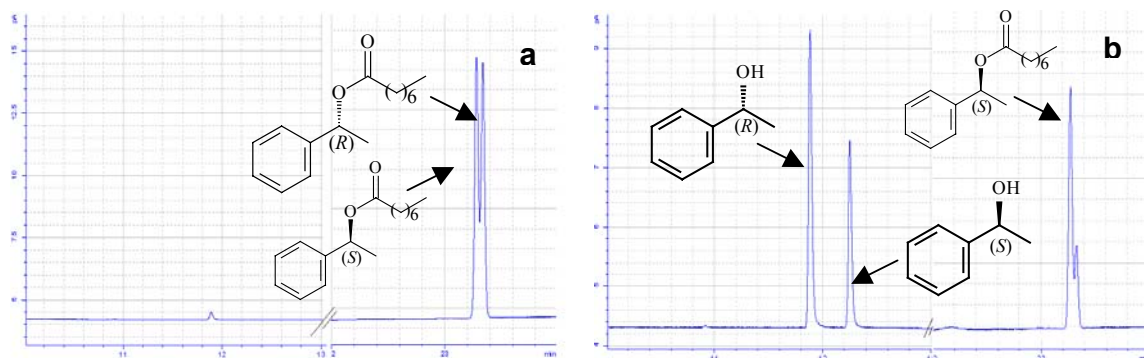


Figura 34: a – Cromatogramas (CG-FID) de a- **55**, b- resolução cinética de **55** por Ame 8. Condições de análise: 40-180 ° C a 15 ° C / min, onde permaneceu constante por 5 min, $T_{\text{injetor}} = 220$ ° C, $T_{\text{detector}} = 240$ ° C, pressão constante de 10 psi. Coluna: Chrompack CD-Chirasil (25 m x 0,25 mm x 0,25 μm).

Os resultados obtidos (**Tabela 11**) permitiram confirmar a atividade enzimática observada por HTS, pois todos os microrganismos testados foram capazes de formar o álcool **48**, que é o produto da hidrólise dos ésteres **53**, **54** e **55**.

Observou-se também que os microrganismos selecionados hidrolisaram também oleatos (**55**), porém com velocidades muito baixas, concordando com os experimentos de triagem de alto desempenho, onde observou-se valores de intensidade de fluorescência muito baixo para a sonda **24**, que é composta por oleatos (**Tabela 11**).

Além disso, esses experimentos permitiram confirmar a seletividade do substrato observada por HTS, através das diferenças significativas da velocidade de hidrólise relacionadas à variação do tamanho da cadeia alifática dos ésteres testados.

Tabela 11: Comparação da seletividade do substrato observada nos experimentos de HTS com os experimentos realizados por metodologias convencionais

Microrganismos	Intensidade de fluorescência (HTS) ^a			$\Delta t_{c=50\%}$ (h) ^b		
	22	23	24	53	54	55
CCT 4259	108	1601	2	2,0	1,5	10
Ama 19	1923	56	2	4,0	14	>24
Ama 32	530	1957	-	2,0	1,5	>24
Ame 8 ^c	111	1331	2	2,0	0,75	>10

^a medidas de intensidade de fluorescência obtidas nos experimentos de HTS. ^b Intervalo de tempo para conversão de 50 % dos substratos não fluorogênicos utilizando-se 2,0 g de células em 50 mL de solução tampão fosfato pH 7,0 e 20 mg de substrato. ^c Ame sigla referente aos microrganismos isolados do solo de Ilhéus, que foram triados pela Dra. Luciana G. de Oliveira.

Um exemplo é o microrganismo Ama 19, que apresentou uma diminuição da atividade hidrolítica com o aumento da cadeia alifática presente nos substratos (acetila > propanoíla > octanoíla) nos experimentos de HTS, e manteve a mesma prioridade frente aos substratos não-fluorogênicos. Isso pode ser visualizado pelo fato de ter sido capaz de converter 50% do substrato acetilado **53** ao respectivo álcool com cerca de 4,0 h de reação, enquanto a hidrólise dos outros ésteres (propionatos **54** e oleatos **55**) ocorreu mais lentamente (**Tabela 11**).

Um comportamento semelhante foi observado para os microrganismos *C. echinulata* CCT 4259, Ama 32 e Ame 8, que hidrolisaram preferencialmente propionatos nos experimentos de HTS, mas apresentaram valores significativos na hidrólise de acetatos, afinal eles foram capazes de hidrolisar 50% do éster propionilado (**54**) e do éster acetilado (**53**) com velocidades semelhantes, porém hidrolisaram preferencialmente os propionatos (**Tabela 11**).

As reações de biotransformação forneceram também dados a respeito da enantiosseletividade (*E*) desses microrganismos frente aos ésteres testados, esses resultados estão resumidos nas **Tabela 12** e **Tabela 13**.

Dentre os microrganismos avaliados pela hidrólise de acetatos, Ame 8, Ame 17 e Ame 23 foram os que mais se destacaram pelos excelentes valores de *E* (*E* > 30) em relação ao substrato **53** (**Tabela 12**).

Tabela 12: Reações de hidrólise do substrato acetilado **53**, pelos microrganismos selecionados previamente nos ensaios de HTS

Microrganismos	%conversão ^a	% ee _s ^b	% ee _p ^b	<i>E</i> _{substrato} ^c	<i>E</i> _{produto} ^d
CCT 4259	56	69	61	7	9
Ama 19	50	36	26	6	3
Ama 32	30	15	9	2	1
Ame 8	54	99	53	60	8
Ame 17	32	43	90	34	29
Ame 23	55	99	58	49	8

^a determinada pela razão entre a área do produto formado e a área do padrão interno (ver sessão 7.2). ^b excesso enantiomérico $ee = ((A-B)/(A+B))100$. ^c razão enantiomérica do substrato $E = \ln[(1-c)(1-ee)]/\ln[(1-c)(1+ee)]$. ^d razão enantiomérica do produto $E = \ln[1-c(1+ee)]/\ln[1-c(1-ee)]$.

Em relação à hidrólise de propionatos **54**, os maiores valores de enantiosseletividade em relação ao substrato foram encontrados novamente com o microrganismo Ame 8 (*E*=51) e com o microrganismo Ama 19, o qual apresentou *E*=96 que é bastante significativo (**Tabela 13**). Por outro lado, os microrganismos Ama 32 e *C. echinulata* CCT 4259 apresentaram baixa enantiosseletividade (*E*<10) em relação aos três substratos testados. No caso do substrato **55**, os valores de enantiosseletividade não foram calculados devido à sua baixa velocidade de hidrólise.

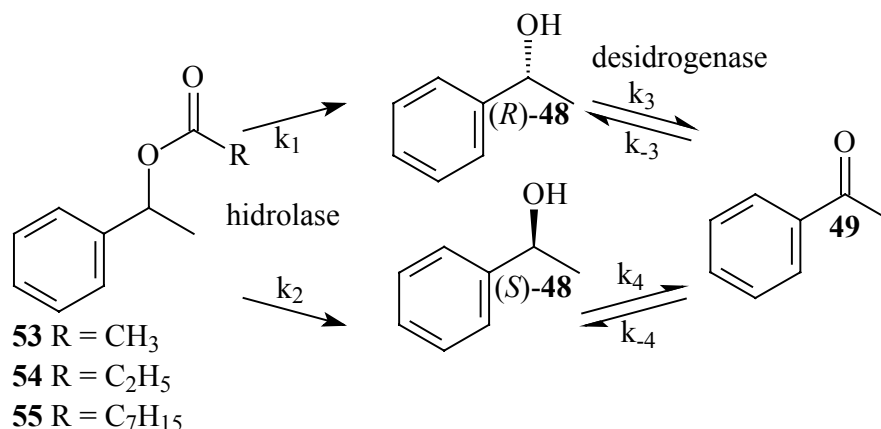
Tabela 13: Reações de hidrólise do substrato propionilado **54**, pelos microrganismos selecionados previamente nos ensaios de HTS

Microrganismos	%conversão ^a	% ee _s ^b	% ee _p ^b	E _{substrato} ^c	E _{produto} ^d
CCT 4259	52	0,5	0,5	4	5
Ama 19	48	87	38	96	3
Ama 32	48	10	0	2	1
Ame 8	50	89	46	51	4

^aDeterminada pela razão entre a área do produto formado e a área do padrão interno. ^b excesso enantiomérico $ee = ((A-B)/(A+B))100$. ^cRazão enantiomérica do substrato $E = \ln[(1-c)(1-ee)]/\ln[(1-c)(1+ee)]$. ^d Razão enantiomérica do produto $E = \ln[1-c(1+ee)]/\ln[1-c(1-ee)]$.

É importante ressaltar que com exceção do microrganismo Ame 17, os valores de *E* em relação ao produto formado foram muito baixos para todos os microrganismos testados, inclusive aqueles que apresentaram elevada enantiosseletividade em relação ao substrato (**Tabela 12** e **Tabela 13**).

Esse comportamento pode ser explicado pela presença de outras enzimas que atuam sobre o álcool formado (**Esquema 16**) , afinal em alguns casos foi possível observar a acetofenona **49**, que é produto da oxidação do **48**.



Esquema 16: Resolução dos ésteres **53**, **54** e **55** e posterior oxidação do álcool **48** formado preferencialmente.

Num primeiro momento, se considerarmos $k_1 \gg k_2$, temos a formação preferencial do (*R*)-**48** com alto valor de ee. Porém, se num segundo momento houver a atuação de outras enzimas capazes de realizar estereoinversão do (*R*)-**48**^{56,57} ($k_3 \gg k_{-3}$, $k_4 \gg k_{-4}$ e $k_{-4} \gg k_{-3}$), ou simplesmente a oxidação preferencial de

⁵⁶ Comasseto, J. V.; Andrade, L. H.; Omori, A. T.; Assis, L. F.; Porto, A. L. M. *J. Mol. Catal. Enz. B* **2004**, *29*, 55-61.

⁵⁷ Andrade, L. H.; Keppler, A. F.; Schoenlein-Crusius, I. H.; Porto, A. L. M.; Comasseto, J. V. *J. Mol. Catal. Enz. B* **2004**, *31*, 129-135.

(*R*)-**48** ($k_3 \gg k_{-3}$, $k_4 \gg k_{-4}$ e $k_3 \gg k_4$), o valor *ee* do álcool seria baixo, justificando assim o baixo valor de enantiosseletividade observado em relação ao produto (**Esquema 16**).

Entretanto, para determinação exata desse mecanismo teríamos que acompanhar por mais tempo a reação, o que não foi foco dessa parte do trabalho. Esse fato poderia ser contornado se ao invés das células íntegras, fossem utilizados os extratos enzimáticos, onde teríamos a atuação somente de hidrolases, enquanto as oxidoreduktases estariam inativas.

A configuração absoluta desses compostos foi determinada por fortificação do ($\pm$)-**48**, que é o produto de hidrólise dos ésteres testados, com o (*R*)-**48** (**Figura 35**). Dessa maneira, observou-se que todos os microrganismos estudados hidrolisaram preferencialmente o enantiômero (*R*), levando à formação do álcool com mesma configuração.

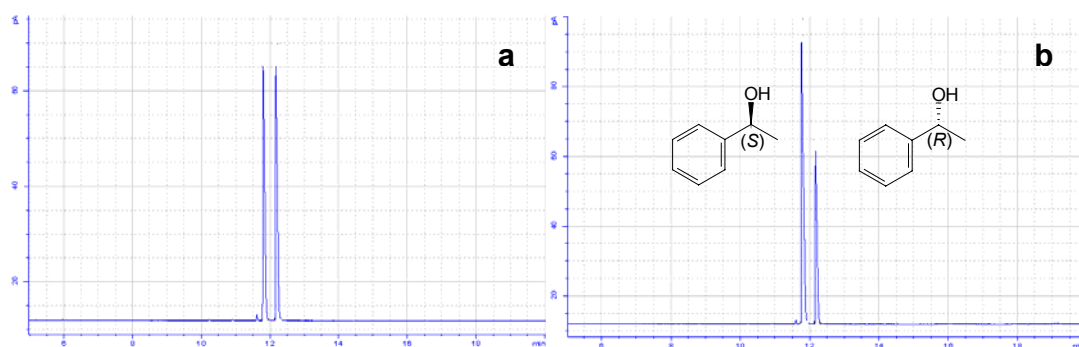


Figura 35: a- resolução entre uma amostra de ($\pm$)-feniletanol, b - e com fortificação com padrão comercial de (*R*)-feniletanol. Condições de análise: 40-180 ° C a 15 ° C / min, onde permaneceu constante por 5 min, $T_{\text{injetor}} = 220$ ° C, $T_{\text{detector}} = 240$ ° C, pressão constante de 10 psi. Coluna: Chrompack CD-Chirasil (25 m x 0,25 mm x 0,25 μ m).

Essa preferência enantiomérica concorda com a ‘Regra de Prelog’ que é baseada no tamanho dos grupos substituintes ligados ao estereocentro³⁶. Essa regra que foi primeiramente descrita para reações de redução enzimática, e pode ser estendida para hidrólise enzimática de ésteres de álcoois secundários⁵⁸, predizendo a maior aceitação da enzima pelo enantiômero que possui a forma indicada na **Figura 26**, assumindo que a ordem dos substituintes seja $R^2 > R^1$.

⁵⁸ Kazlauskas, R. J.; Weissfloch, A. N. E.; Rappaport, A. T.; Ciccio, L. A. *J. Org. Chem.* **1991**, 56, 2656-2665.

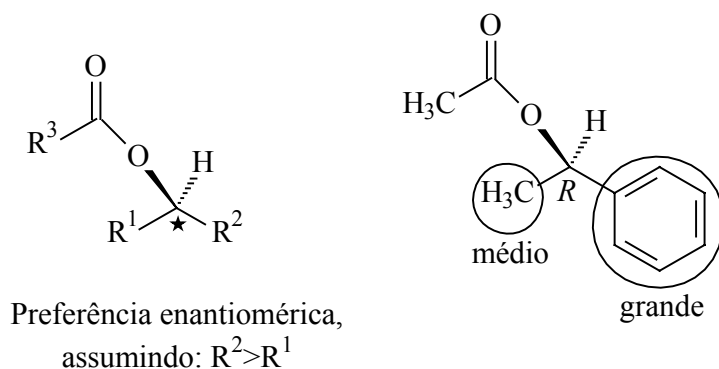


Figura 36: Extensão da 'Regra de Prelog' indicando a hidrólise preferencial do éster com configuração-(*R*).

Dessa forma, os resultados obtidos pelas reações de biotransformação utilizando ésteres não-fluorogênicos permitiram confirmar a atividade enzimática, pois os microrganismos que apresentaram altos valores de intensidade de fluorescência nos ensaios de HTS, promoveram a hidrólise do substrato não-fluorogênico, do mesmo modo, nos casos onde a intensidade de fluorescência foi baixa, a hidrólise do substrato ocorreu com velocidades muito pequenas.

Além disso, foi possível verificar também a seletividade do substrato observada nos ensaios de HTS e ainda selecionar alguns microrganismos, que apresentaram altos valores de *E*, para estudos que possibilitem a obtenção de compostos enantiomericamente puros com maior valor sintético.

6.0. Conclusões

A utilização de triagem de alto desempenho baseados em substratos fluorogênicos para monitoramento de atividades enzimáticas em células íntegras permitiu a avaliação de 103 microrganismos de forma simples e rápida, sendo que cinco microrganismos destacaram-se pela presença de epóxido-hidrolases e *C. albicans* CCT 0776 foi o que mostrou melhor desempenho. Em relação às esterases, 18 microrganismos se destacaram para a hidrólise de ésteres de cadeia curta enquanto para ésteres de cadeia longa os resultados foram pouco significativos.

A implementação do teste em formato HTS para medida de enantiosseletividade de epóxido-hidrolases utilizando células íntegras na presença de competidor, que é inédito na literatura, foi realizada com sucesso, pois os resultados concordaram com o valor da enantiosseletividade obtido por metodologias convencionais, e, além disso, permitiu determinar a razão enantiomérica para os microrganismos testados, de maneira rápida e confiável, podendo ainda ser ampliados para caracterização enzimática de coleções de microrganismos.

Os ensaios de biotransformação realizados por metodologias convencionais foram de grande importância, pois possibilitaram a confirmação das atividades hidrolíticas e ainda a seletividade do substrato observadas nos experimentos de triagem enzimática.

Além disso, esses experimentos permitiram selecionar alguns microrganismos com alta enantiosseletividade na resolução cinética de ésteres acetilados e propionilados, como Ama 19, Ame 8, Ame 17 e Ame 23.

Por meio das reações de biotransformação utilizando como substrato o ($\pm$)-1,2-epoxioctano, foi possível, além de confirmar a atividade epóxido-hidrolase da *C. albicans* CCT 0776, detectar a sua capacidade de desracemização por estereoinversão de dióis vicinais.

Os ensaios de desracemização por estereoinversão utilizando dióis vicinais permitiram obter, no caso do ($\pm$)-1,2-octanodiol, o enantiômero de configuração (S)

com pureza enantiomérica > 99 %, enquanto que no caso do ($\pm$)-4-fenilmetoxi-1,2-butanodiol, o diol de mesma configuração absoluta foi obtido com pureza enantiomérica de 45 %.

Dessa maneira, poderão ser conduzidos futuramente estudos visando à obtenção desse produto com maior pureza enantiomérica, e ainda outros compostos como α e β -hidróxiésteres e lactonas de interesse sintético através de variações nas condições reacionais, e também pela utilização de outros microrganismos pertencentes à nossa coleção, que apresentaram a capacidade de realizar estereoinversão de álcoois secundários.

7.0 PARTE EXPERIMENTAL

7.1. Instrumentação

7.1.1. Métodos cromatográficos

As análises cromatográficas em camada delgada (CCD), para monitoramento das reações e acompanhamento da purificação dos produtos, foram realizadas empregando-se cromatofolhas de alumínio (folha padrão 20 x 20 cm), recobertas com sílica gel com indicador de fluorescência em UV_{254nm} (Merck).

A revelação dos compostos em cromatofolhas foi feita por irradiação com lâmpada UV_{254/365} e/ou pulverização com solução de KMnO₄ ou *p*-anisaldeído (*p*-anisaldeído, H₂SO₄, AcOH e EtOH na razão 1:2:1:100), e subsequente, aquecimento a 300 ° C com pistola aquecedora.

Nas purificações de compostos por cromatografia “flash” em coluna, foram utilizados sílica gel 60 µm (ACROS - 0,035-0,070 mm com poros de 6nm) e solventes destilados para eluição.

As análises por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM) foram realizadas em cromatógrafo Agilent 6890 acoplado um detector seletivo de massas HP 5973 operando por impacto eletrônico, com energia de ionização de 70 eV, na faixa de *m/z* 45-500. A coluna utilizada foi uma coluna capilar de sílica fundida HP-5 MS (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm) com 5% de fenil-metilsiloxano. As condições de análise foram com fluxo constante de He de 1 mL/min, com injetor a 220 ° C e detector a 280 ° C, e as injeções feitas no modo “splitless”, com injeção de cerca de 1 µL na concentração de 1 mg / mL. A programação utilizada foi 50 – 290 ° C com rampa de aquecimento à 15 ° C / min, e mantidas a 290 ° C por 10 min.

A discriminação dos enantiômeros foi feita em cromatógrafo Agilent 6850 e detector de ionização de chama (FID), equipado com injetor automático e coluna capilar de sílica fundida Chrompack®, de fase quiral Chirasil-β-ciclodextrina (25 m x 0,25 mm x 0,25 µm). As condições de análise foram com fluxo constante de H₂ de 1 mL/min, com injetor a 220 ° C e detector a 240 ° C, e as injeções feitas no modo “split”, com injeção de cerca de 1 µL na concentração de 1 mg/mL. As

rampas de aquecimento variaram, e por isso foram relatadas junto aos respectivos experimentos.

7.1.2. Métodos espectrométricos de ressonância magnética nuclear (RMN)

Os espectros de RMN de ^1H foram obtidos em espectrômetros Gemini 300P – Varian Instruments (300,07 MHz) ou Inova 500 (499,88 MHz). Os deslocamentos químicos (δ) foram registrados em ppm, tomando-se como padrões de referência interna tetrametilsilano 0,03% (TMS δ_{H} 0,00) ou clorofórmio (CDCl_3 δ_{H} 7,27).

Os espectros de RMN de ^{13}C foram adquiridos em espectrômetros Gemini 300P – Varian Instruments (75,45 MHz) ou Inova 500 (125,69 MHz). Os deslocamentos químicos (δ) foram registrados em ppm, tomando-se como padrões de referência interna tetrametilsilano 0,03% (TMS δ_{H} 0,00) ou clorofórmio (CDCl_3 δ_{H} 77,0).

Os espectros de RMN ^{13}C DEPT 135 ° e DEPT 90 ° foram utilizados para determinar o tipo de carbono pela comparação com o espectro de RMN de ^{13}C desacoplado, onde carbonos metílicos (CH_3) e metínicos (CH) dão sinais positivos, metilênicos (CH_2) negativos e carbonos quaternários (C_0) são ausentes.

Foram utilizadas em alguns casos técnicas de RMN 2D como $^1\text{H}, ^1\text{H}$ COSY e $^1\text{H}, ^{13}\text{C}$ HSQC.

7.1.3. Métodos espectrofotométricos de fluorescência

As medidas de fluorescência das reações de triagem de alto desempenho para detecção das atividades enzimáticas e enantiosseletividades foram realizadas em leitor de fluorescência *Flashscan 530 Analytic Jena* utilizando filtro de excitação com $\lambda_{\text{ex}} = 365$ nm e leitura de emissão de fluorescência feita à $\lambda_{\text{em}} = 460$ nm. As leituras foram feitas em microplacas de polipropileno de 96 cavidades, à temperatura ambiente (~ 22 ° C) durante 10 h com intervalos de leitura e agitação de 3,0 min.

7.2. Cálculos

Os excessos enantioméricos foram calculados com base nas áreas de cada enantiômero segundo a equação:

$$ee = \frac{A-B}{A+B} \times 100$$

onde A e B corresponde à área de cada um dos enantiômeros.

Os valores de conversão foram calculados pelo método do fator de resposta (FR). As extrações das alíquotas retiradas das reações de biotransformação foram realizadas com acetato de etila bidestilado contendo benzofenona 0,05 mg / mL , a qual foi usada como padrão interno (PI). O fator de resposta foi calculado com base nas áreas do PI e do substrato no tempo inicial do experimento (0% de conversão) e aplicado no acompanhamento da reação.

$$\frac{A_{substrato}}{C_{substrato}} = FR \frac{A_{PI}}{C_{PI}}$$

7.3. Reagentes e solventes

Foram utilizados reagentes e solventes grau P.A., mas sempre que necessário, foram tratados conforme procedimentos descritos na literatura⁵⁹.

As reações sensíveis à umidade foram realizadas em atmosfera inerte de Ar ou N₂, e as vidrarias previamente aquecidas a altas temperaturas.

7.4. Procedimentos gerais adotados no laboratório de biocatálise

A vidraria foi lavada, seca e acondicionada com papel para esterilização em autoclave a 121° C, 1,5 Pa por 20 min, e posterior secagem em estufa 45 ° C. Todo o material utilizado em contato direto com os microrganismos foram autoclavados à 121° C por 40 min antes de serem descartados ou reaproveitados.

Soluções de álcool 70% (v/v) e solução de HClO 5% (v/v) foram utilizadas para desinfetar as bancadas de trabalho e câmara de fluxo laminar, diminuindo a contaminação do material manipulado e do meio externo.

⁵⁹ Paquette, L. A. Encyclopedia dos reagents for organic synthesis. West Sussex: John Wiley & Sons, LTDA, 1995.

7.5. Microrganismos utilizados nas reações de biocatálise

Os microrganismos testados são provenientes da Coleção de Culturas Tropicais (CCT, <http://www.cct.org.br/>), da Fundação André Tosello, Campinas – SP, e ainda os microrganismos isolados do solo de várzea de Silves – AM ainda não identificados.

7.6. Ensaios de triagem de alto desempenho (HTS)

Os microrganismos utilizados nos ensaios de HTS foram cultivados em “slant” contendo o meio de cultivo específico por 24 h no caso de bactérias e leveduras e 72 h no caso de fungos filamentosos.

Após esse tempo, as células foram transferidas para *Eppendorf* estéril, onde foram pesadas e suspensas em tampão borato pH 8,8 a 20 mM, e posteriormente diluídas a fim de obter suspensões celulares de 1 mg/mL para fungos filamentosos, e 0,2 mg/mL para bactérias e leveduras.

Os ensaios, e controles foram realizados em duplicatas e montados da seguinte maneira:

- **Ensaios:** 10 μ L das sondas 2 mM; 80 μ L de BSA 5,0 mg/mL, 100 μ L de suspensão celular 0,2 mg/mL (leveduras e bactérias) ou 1,0 mg/mL (fungos), e 10 μ L de NaIO₄ 20 mM por poço.
- **Controle positivo:** 10 μ L do produto a 2 mM; 80 μ L de BSA 5,0 mg/mL, 100 μ L de suspensão celular 0,2 mg/mL (leveduras e bactérias) ou 1,0 mg/mL (fungos), e 10 μ L de NaIO₄ 20 mM por poço.
- **Controle negativo:** 10 μ L das sondas a 2 mM; 80 μ L de BSA 5,0 mg/mL, 100 μ L de solução tampão borato pH 8,8 e 10 μ L de NaIO₄ 20 mM por poço.
- **Controle microbiano:** 10 μ L solução tampão borato pH 8,8; 80 μ L de BSA 5,0 mg/mL, 100 μ L de suspensão 0,2 mg/mL (leveduras e bactérias) ou 1,0 mg/mL (fungos), e 10 μ L de NaIO₄ 20 mM por poço.

7.7. Teste em formato HTS para medida de enantiosseletividade

Os microrganismos foram cultivados da mesma maneira descrita no ítem 7.5., porém as suspensões celulares foram preparadas em tampão fosfato pH 7,2. Os ensaios e controles nos experimentos sem competidor foram realizados em duplicata para cada enantiômero e montados da seguinte maneira:

- **Ensaios:** 20 μ L das sondas a 1 mM; 70 μ L de BSA 5,7 mg/mL, 100 μ L de suspensão celular 0,2 mg/mL (leveduras e bactérias) ou 1,0 mg/mL (fungos), e 10 μ L de NaIO₄ 20 mM por poço.
- **Controle positivo:** 20 μ L das sondas a 1 mM; 70 μ L de BSA 5,7 mg/mL, 100 μ L de suspensão celular 0,2 mg/mL (leveduras e bactérias) ou 1,0 mg/mL (fungos), e 10 μ L de NaIO₄ 20 mM por poço.
- **Controle negativo:** 20 μ L das sondas a 1 mM; 70 μ L de BSA 5,7 mg/mL, 100 μ L de solução tampão borato pH 8,8 e 10 μ L de NaIO₄ 20 mM por poço.

Os experimentos com competidor também foram realizados em duplicata para cada enantiômero e montados da seguinte maneira:

- **Ensaios:** 10 μ L das sondas a 2 mM, 10 μ L do competidor 0,2 mM, 70 μ L de BSA 5,7 mg/mL, 100 μ L de suspensão celular 0,2 mg/mL (leveduras e bactérias) ou 1,0 mg/mL (fungos), e 10 μ L de NaIO₄ 20 mM por poço.
- **Controle positivo:** 10 μ L das sondas a 2 mM, 10 μ L do competidor 0,2 mM, 70 μ L de BSA 5,7 mg/mL, 100 μ L de suspensão celular 0,2 mg/mL (leveduras e bactérias) ou 1,0 mg/mL (fungos), e 10 μ L de NaIO₄ 20 mM por poço.
- **Controle negativo:** 10 μ L das sondas a 2 mM, 10 μ L do competidor 0,2 mM, 70 μ L de BSA 5,7 mg/mL, 100 μ L de solução tampão borato pH 8,8 e 10 μ L de NaIO₄ 20 mM por poço.

7.8. Ensaios de biotransformação convencionais

Os microrganismos foram primeiramente cultivados em “slant” contendo o meio de cultivo adequado, e posteriormente transferidos para Erlenmeyer de 500 mL contendo 250 mL de meio de cultivo líquido, e incubados de 3-4 dias a 29 ° C sob agitação (150 rpm). Após esse período de crescimento, as células, no caso de fungos foram filtradas sob vácuo em peneiras de 200 mesh, e no caso de bactérias e leveduras foram centrifugadas a 5000 rpm por 15 min, e posteriormente ressuspensas em tampão fosfato ($\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$, 0,1 M, pH 7,0).

Foram adicionadas 2,0 g de célula (peso úmido) a cada 40 mL de tampão fosfato pH 7,0 em erlenmeyers de 125 mL, e 20 μL de substrato. A suspensão resultante foi agitada em “shaker” à temperatura de 29 ° C, e monitoradas periodicamente (a cada 20 min) tomando-se alíquotas de 1,0 mL.

As alíquotas foram extraídas com 2,0 mL de acetato de etila (2x 1,0 mL), por centrifugação das células, após saturação da fase aquosa com NaCl. A fase orgânica superior foi retirada e seca com Na_2SO_4 anidro para remoção de traços de água e subsequente análise por CG/FID. O solvente utilizado na extração continha benzofenona 0,05 mg/mL como padrão interno.

7.9. Preparação de soluções tampão

7.9.1. Solução tampão Sørensen ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 - \text{KH}_2\text{PO}_4$)⁶⁰

Inicialmente preparou-se solução estoque de Na_2HPO_4 dissolvendo-se 11,876 g do sal em 1,0 L de água destilada, e solução estoque de KH_2PO_4 dissolvendo-se 9,078 g em 1,0 L de água destilada. Em seguida a solução tampão com o pH desejado foi preparada segundo a **Tabela 14**.

⁶⁰ Assunção, R. M. V.; Morita, T. *Manual de Soluções, Reagentes e solventes: Padronização, Preparação e Purificação*. São Paulo: Edgardlucher LTDA, **1968**, p. 276.

Tabela 14: Solução Tampão Sørensen

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

7.9.2. Solução tampão borato⁶¹

Inicialmente preparou-se solução estoque de H₃BO₃ 0,2 M dissolvendo-se 12,4 g ácido em 1,0 L e água destilada, e solução estoque de bórax 0,05 M dissolvendo-se 19,05 g em 1,0 L e água destilada. Em seguida a solução tampão com o pH desejado foi preparada adicionando-se 50 mL da solução de H₃BO₃ a um volume da solução de bórax, segundo a **Tabela 15** e diluindo para um volume total de 200 mL.

Tabela 15: Solução Tampão ácido bórico- bórax

Solução bórax 0,05 M (mL)	pH	Solução bórax 0,05 M (mL)	pH
2,0	7,6	22,5	8,7
3,1	7,8	30,0	8,8
4,9	8,0	42,5	8,9
7,3	8,2	59,0	9,0
11,5	8,4	83,0	9,1
17,5	8,6	115,0	9,2

Todas as soluções tampão preparadas tiveram seus valores de pH comprovados e ajustados em pHmetro (pH 300 M *analyser*).

7.10. Preparação de soluções**7.10.1. Solução das sondas fluorogênicas**

As sondas foram inicialmente solubilizadas em H₂O : ACN (1:1) numa concentração de 20 mM, e posteriormente diluídas para uma concentração de 2

⁶¹ Holmes, *Anat. Rec.* **1943**, 86, 163.

mM. Nos experimentos de triagem da atividade enzimática a solução trabalho foi de 2 mM, enquanto que nos experimentos de triagem da enantiosseletividade as sondas foram posteriormente diluídas para 1 mM. Essas soluções foram sempre conservadas em geladeira.

7.10.2. Solução de periodato de sódio

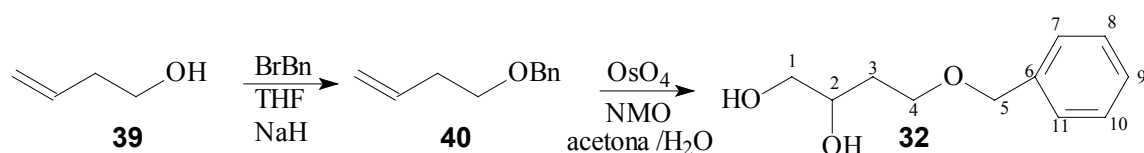
As soluções de periodato foram sempre preparadas momentos antes do experimento. Foram dissolvidos 4,3mg de NaIO₄ em 1 mL de água *milli-Q* resultando em uma concentração de 20 mM.

7.10.3. Solução de BSA

A solução de BSA à 2 mg/mL utilizada nos experimentos de triagem da atividade enzimática foram preparadas através da diluição de 5 mg de BSA em 1 ml da solução tampão, seguida de suave agitação para evitar a formação de espuma. No caso dos experimentos de triagem da enantiosseletividade a solução de BSA a 5,7 mg/mL foi preparada.

7.11. Síntese dos compostos

7.11.1. Síntese do (±)-4-fenilmetoxi-1,2-butanodiol (**32**)



À uma suspensão de 0,55 g (13,87 mmol) de NaH em THF seco, a 0 ° C, foram adicionados 1,0 g (13,87 mmol) do álcool **32** em 12 mL de THF. O banho foi removido, e a suspensão resultante foi agitada por 30 min à temperatura ambiente. Após esse tempo, foram adicionados 1,2 mL de brometo de benzila (13,87 mmol) , permanecendo sob agitação por 48 h à 25 ° C, e posteriormente diluída com éter e transferida para um funil de extração contendo contendo água e AcOEt. As fases foram separadas e a fase aquosa foi extraída com éter etílico: AcOEt (1:1). A fase orgânica combinada foi seca com MgSO₄, filtrada e

concentrado à pressão reduzida. O alceno protegido (**40**) foi obtido com 95% de rendimento **MM**:238 g / mol ($C_{14}H_{22}O_3$); *Rf* 0,23 (20% AcOEt/hexano)⁶².

Posteriormente, num balão de fundo redondo foram adicionados 45 ml (1,00 g; 6,2 mmol) de solução do alceno (**40**) em acetona : água (2,5:1), seguido da adição de *N*-óxido de *N*-metilmorfolina (0,87 g; 7,4 mmol) e 0,12 mL de solução de OsO_4 0,2 M em *t*-butanol. A reação foi mantida sob agitação por 12h e posteriormente foi lavada com solução saturada de NaCl (2 x 20 mL) e AcOEt, o extrato orgânico combinado foi seco com Na_2SO_4 (anidro), filtrado e concentrado sob pressão reduzida. Após purificação em coluna cromatográfica de sílica gel com eluição em AcOEt : MeOH (9:1) forneceu o produto como um óleo incolor com rendimento de 80 %.

MM:196 g / mol ($C_{11}H_{16}O_3$)

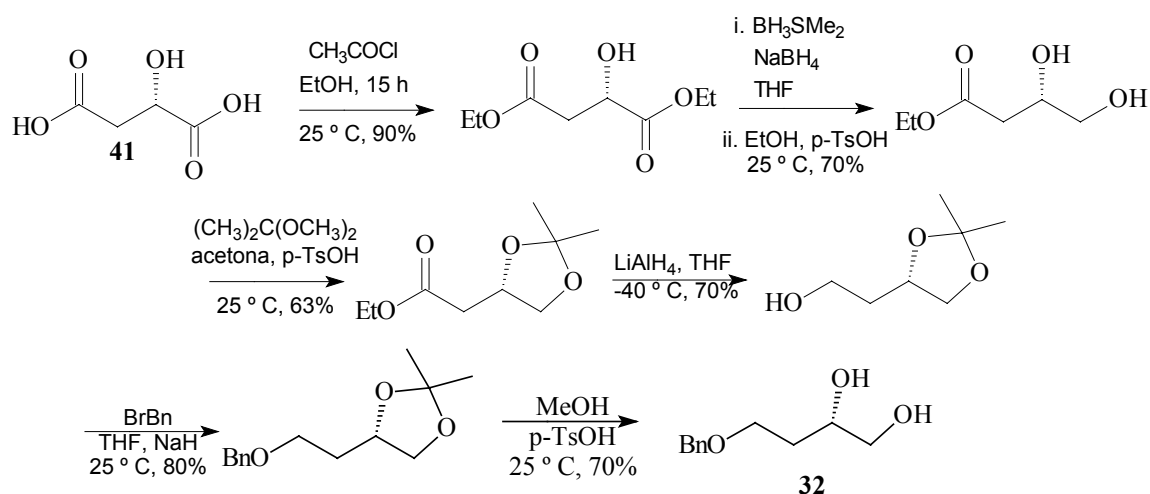
IE/EM *m/z* (int. rel.): 196 (M^+ , 0,2), 160 (2), 120 (3), 107 (38), 91 (100), 79 (10)

RMN de 1H (300,01 Mz, $CDCl_3$, δ_{TMS} 0,00) δ : 1,70-2,00 (2H, *m*, H-3), 3,50 (1H, *m*, H-1a); 3,60-3,70 (3H, *m*, H-4 e H-1b); 3,87-3,97 (1H, *m*, H-2); 4,55 (2H, *s*, H-5); 4,25-7,40 (5H, *m*, H-6, H-7, H-8, H-9 e H-10).

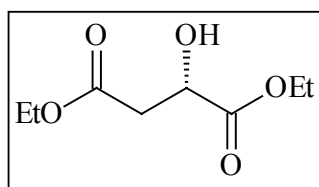
RMN de ^{13}C (75,5 MHz, $CDCl_3$, δ_{CDCl_3} 77,0) δ : 32,7 (CH_2 , C-3); 66,5 (CH_2 , C-4); 68,2 (CH_2 , C-1); 71,3 (CH, C-2); 73,3 (CH_2 , C-5); 127,8 (2 CH, C-7 e C-11); 128 (2 CH, C-8 e C-10); 129 (C_0 , C-6).

⁶² Essa etapa foi realizada pelo aluno de iniciação científica Célio F. F. Angolini.

7.11.2. Preparação do (S)-4-fenilmetoxi-1,2-butanodiol ((S)-32)⁶³



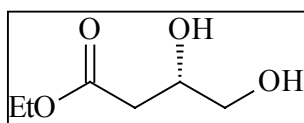
7.11.2.1. Síntese do dietil (2S)-2-hidroxibutanodioato



Ácido *L*-málico (2,080 g 15,5 mmol) (**41**) foi dissolvido em uma solução de HCl/EtOH 3% , a qual foi preparada adicionando-se 0,7 mL (9,84 mmol) de cloreto de acetila a 14 mL (0,23 mmol) de etanol. A solução foi agitada durante a noite à temperatura ambiente e então o solvente foi removido à pressão reduzida. O óleo obtido foi purificado em coluna cromatográfica de sílica gel com eluição em Hex:AcOEt (6:4) com rendimento de 90% (2,65 g).

MM:190,25 g / mol (C₈H₁₄O₅), R_f 0,36 (40% AcOEt/hexano).

7.11.2.2. Síntese do etil (2S)-3,4-diidroxiutananoato



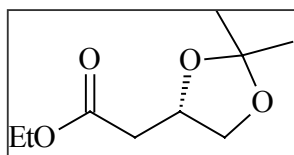
A um balão de duas bocas equipado com um condensador de refluxo foi adicionada uma solução de 1,50 g (7,84 mmol) do dietil éster em 17 mL de THF. A esta solução foram adicionados 0,80 mL (8,33 mmol) de BH₃.DMS gota a gota, à temperatura ambiente e sob agitação até que cessasse a evolução de H₂ (~ 40 min). O frasco foi então resfriado a 10 ° C e adicionou-se 15 mg (0,39 mmol) de NaBH₄ de uma só vez (exotérmico), sob agitação vigorosa. Quando a reação exotérmica cessou, o banho de gelo foi removido, e a reação mantida á temperatura ambiente. Ao

⁶³ O substrato (S)-4-fenilmetoxi-1,2-butanodiol foi sintetizado e cedido pela Dra. Luciana G. de Oliveira, dessa maneira só foi possível caracterizar o produto final.

bruto reacional foram adicionados 6 mL de etanol, 74,3 mg (0,39 mmol) de *p*-TsOH e a solução levemente turva foi agitada por 30 min à temperatura ambiente, sendo posteriormente concentrada à pressão reduzida. O óleo obtido foi dissolvido várias vezes em benzeno/etanol (1:1) e concentrado para eliminar etanol e B(OEt)₃ até o óleo ficar incolor. O produto obtido foi purificado em coluna cromatográfica de sílica gel com eluição em Hex:AcOEt (6:4) com rendimento de 70% (0,75 g).

MM:148,13 g / mol (C₆H₁₂O₄), Rf 0,30 (50% AcOEt/hexano)

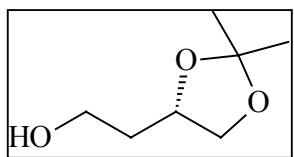
7.11.2.3. Síntese do etil 2-[(4S)-2,2-dimetil-1,3-dioxolan-4-il]acetato



Uma solução de 0,75 g (5,08mmol) do diol em 2,69 mL de acetona, 0,705 mL (5,69 mmol) de 2,2-dimetoxipropano e 50 mg (0,26 mmol) de *p*-TsOH foi mantida sob agitação durante a noite à temperatura ambiente. Após esse período a solução foi neutralizada com algumas gotas de Et₃N, diluída em éter etílico e filtrada em sílica gel. A solução final foi concentrada à pressão reduzida e purificada por cromatografia em coluna de sílica gel com eluição em Hex:AcOEt (7:3).

MM:188 g / mol (C₉H₁₆O₄); Rf 0,40 (30% AcOEt/hexano).

7.11.3.4. Síntese do etil 2-[(4S)-2,2-dimetil-1,3-dioxolan-4-il]-1-etanol



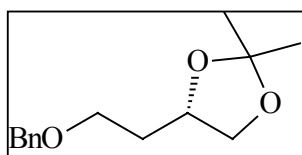
A uma solução de 393 mg (10,33 mmol) de LiAlH₄ em 46 mL de THF, foi adicionada uma solução de 1,22 g do éster (6,49 mmol) em 12 mL de THF gota a gota sob agitação a -40 ° C (banho de etilenoglicol e gelo seco). Após 2 h o banho foi removido e a reação permaneceu à temperatura ambiente sob agitação por 24 h. Dilui-se a mistura reacional em 100 mL de éter etílico e 20 mL de água, 20 mL de NaOH 16% e mais 20 mL de água em intervalos de 2 h em banho de gelo. Após adição do último volume de água a solução foi mantida sob agitação até clarear. A

Fez-se a extração com éter etílico e solução saturada de NaCl, a fase orgânica foi seca com Na₂SO₄ (anidro), filtrada e o solvente concentrado à

pressão reduzida. O produto foi purificado por cromatografia em coluna de sílica gel com eluição em Hex:AcOEt (1:1).

MM:146 g / mol ($C_7H_{16}O_3$); *Rf* 0,37 (50 % AcOEt/hexano)

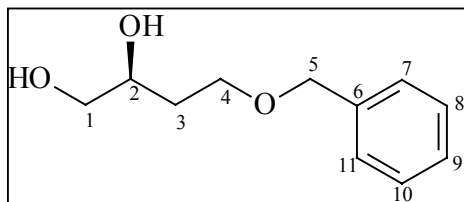
7.11.2.5. Síntese do etil 2-[(4*S*)-2,2-dimetil-1,3-dioxolan-4-il]-1-fenilmetoxi



A uma suspensão de 85 mg (2,11 mmol) de NaH em THF seco, a 0 ° C, foram adicionados 258 mg (1,77 mmol) do álcool em THF. O banho foi removido, e a suspensão resultante foi agitada por 30 min à temperatura ambiente. Após esse tempo, foram adicionados 0,23 mL de brometo de benzila, permanecendo sob agitação por 48 h à 25 ° C, e posteriormente diluída com éter e transferida para um funil de extração contendo água e AcOEt. As fases foram separadas e a fase aquosa foi extraída com éter : AcOEt (1:1). A fase orgânica combinada foi seca com $MgSO_4$, filtrada e concentrado à pressão reduzida. A purificação foi feita por cromatografia em coluna de sílica gel com eluição em Hex:AcOEt (7:3).

MM:238 g / mol ($C_{14}H_{22}O_3$); *Rf* 0,39 (30% AcOEt/hexano)

7.11.2.6. Síntese do (S)-4-fenilmetoxi-1,2-butanodiol



Em uma balão de fundo redondo foram adicionados o acetone e MeOH. A esta solução adicionou-se quantidade catalítica de *p*-TsOH permanecendo sob agitação por 6h. Após esse tempo a solução foi tratada com solução saturada de $NaHCO_3$, filtrada e seca com $MgSO_4$. O produto foi purificado por cromatografia em coluna de sílica gel com eluição em AcOEt : MeOH (9:1).

MM:196 g / mol ($C_{11}H_{16}O_3$); *Rf* 0,15 (50% AcOEt/hexano)

IE/EM *m/z* (int. rel.): 196 (M^+ , 0,2), 160 (2), 120 (3), 107 (38), 91 (100), 79 (10)

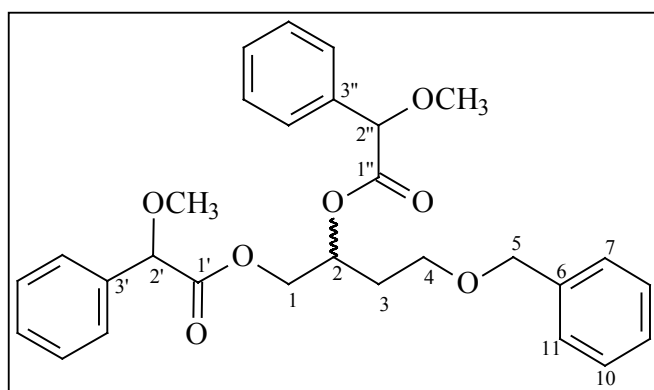
RMN de 1H (300,01 Mz, $CDCl_3$, δ_{TMS} 0,00) δ : 1,70-1,90 (2H, *m*, H-3), 3,50 (2H, *m*, H-1); 3,60-3,70 (2H, *m*, H-4); 3,82-3,92 (1H, *m*, H-2); 4,55 (2H, *s*, H-5); 4,25-7,40 (5H, *m*, H-6, H-7, H-8, H-9 e H-10).

RMN de ^{13}C (75,5 MHz, CDCl_3 , δ_{CDCl_3} 77,0) δ : 32,7 (CH_2 , C-3); 66,5 (CH_2 , C-4); 68,0 (CH_2 , C-1); 71,1 (CH , C-2); 73,2 (CH_2 , C-5); 127,7 (2 CH , C-7 e C-11); 128,4 (2 CH , C-8 e C-10); 129 (C_0 , C-6).

7.11.3. Procedimento geral para preparação do *bis*-éster (S)- MPA do 4-fenilmetoxi-1,2-butanodiol

O ácido (S)- MPA (30,31 mg; 0,128 mmol) foi adicionado a uma solução do diol (10 mg; 0,05 mmol) em 0,5 mL de diclorometano seco sob agitação e atmosfera de argônio. Em seguida, adicionou-se 22,15 mg (0,107 mmol) de diciclocarbodiimida (DCC), e DMAP em quantidade catalítica. Observou-se a formação de um precipitado branco, caracterizando a formação do complexo DCC-uréia. Após 20 h de reação o produto foi filtrado em celite e o solvente evaporado sob pressão reduzida. A purificação do produto foi feita por cromatografia em coluna de sílica gel com eluição em Hex : AcOEt (6:4).

7.11.4.1. Preparação do *bis*-éster (S)- MPA das alíquotas da reação entre ($\pm$)-4-fenilmetoxi-1,2-butanodiol e o microrganismo *C. albicans* CCT 0776



MM: 460 g / mol ($\text{C}_{29}\text{H}_{32}\text{O}_5$)

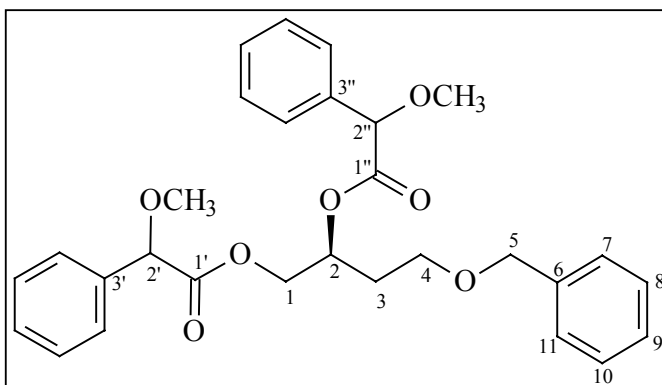
RMN de ^1H (499,88 Mz, CDCl_3 , δ_{TMS} 0,00) δ : 1,58-1,64 e 1,74-1,80 (*m*, 2H, H-3); 3,31, 3,35, 3,38 e 3,40 (*s*, 3H, OCH_3); 3,29-3,43 (*m*, 4H, H-4); 3,95 e 4,13 (*dd*, 1H, $J = 3,5\text{Hz}$ e $J = 12\text{Hz}$, H-1a); 4,31 e 4,39 (1H, *dd*, $J = 6,5\text{Hz}$

e $J = 12\text{Hz}$, H-1b); 4,11 e 4,33 (*s*, 2H, H-5);); 4,51, 4,59 4,70 e 4,73 (*s*, 1H, H-2' ou H-2''); 5,19-5,24 e 5,28-5,34 (*m*, 1H, H-2); 7,16- 7,48 (*m*, 15H, H aromáticos).

RMN de ^{13}C (125,69 MHz, CDCl_3 , δ_{CDCl_3} 77,0) δ : 30,5 e 30,6 (CH_2 , C-3); 56,8, 57,2, 57,2 e 57,3 (CH_3 , OCH_3); 65,1, 65,2 65,3 e 65,5 (CH_2 , C-4 e C-1); 69,6 e 70,0 (CH , C-2); 72,8 e 73,0 (CH_2 , C-5); 81,9, 82,0, 82,1 e 82,4 (CH , C-2' e C-2''); 126,9, 127,10, 127,13, 127,16, 127,2, 127,54, 127,57, 127,6, 128,0, 128,2, 128,3,

128,5, 128,53, 128,58, 128,61, 128,66, 128,69, 128,73 (18 CH, C aromáticos); 135,9, 136,0, 136,1, 136,3 (C₀, H-3' e H-3''); 137,9 e 139,7 (C₀, H-6); 169,8, 170,1, 170,15 e 170,2 (C₀, H-1' e H-1'').

7.11.4.2. Preparação do *bis*-éster (S)- MPA do (S)-4-fenilmetoxi-1,2-butanodiol



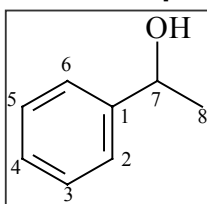
MM: 460 g / mol (C₂₉H₃₂O₅)

RMN de ¹H (499,88 Mz, CDCl₃, δ_{TMS} 0,00) δ: 1,72-1,80 (*m*, 2H, H-3); 3,30 (*s*, 3H, OCH₃); 3,35 (*s*, 3H, OCH₃); 3,30-3,40 (*m*, 2H, H-4); 3,95 (*dd*, 1H, *J* = 3,5Hz e *J* = 12Hz, H-1a); 4,20 (1H, *dd*, *J* = 6,5

Hz e *J* = 12 Hz, H-1b); 4,34 (*s*, 2H, H-5); 4,52 (*s*, 1H, H-2' ou H-2''); 4,70 (*s*, 1H, H-2' ou H-2''); 5,29-5,34 (*m*, 1H, H-2); 7,20- 7,50 (*m*, 15H, H aromáticos).

RMN de ¹³C (125,69 MHz, CDCl₃, δ_{CDCl₃} 77,0) δ: 30,1 (CH₂, C-3); 57,2 e 57,4 (CH₃, OCH₃); 65,3 (CH₂, C-1); 65,5 (CH₂, C-4); 70,1 (CH, C-2); 73,0 (CH₂, C-5); 82,0 e 82,4 (CH, C-2' e C-2''); 127,0, 127,1, 127,6, 127,7, 128,3, 128,5, 128,6 128,7 (8CH, C aromáticos); 136,0 e 136,2 (C₀, H-4' e H-4''); 137,9 (C₀, H-6); 170,2 (2 C₀, H-1' e H-1'').

7.11.4. Preparação do feniletanol (48)



Em um balão de fundo redondo contendo uma solução de acetofenona 1,063 g (8,71 mmol) em 3 mL de MeOH foram adicionados 335 mg de NaBH₄ sob agitação. Após 20 min a reação foi tratada com solução saturada de NaCl e extraída com AcOEt (2 x 15 mL). A fase orgânica foi seca com Na₂SO₄ (anidro), filtrada e o solvente evaporado sob pressão reduzida. O produto foi obtido com 87% de rendimento.

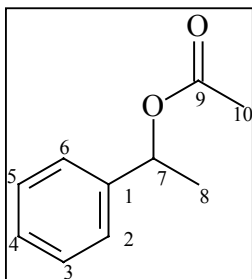
MM: 122 g / mol (C₈H₁₀O).

IE/EM *m/z* (int. rel.): 122 (M⁺, 34), 107 (100), 79 (90), 77 (51), 51 (14), 43 (18).

RMN de ¹H (300,01 Mz, CDCl₃, δ_{TMS} 0,00) δ: 1,45 (*d*, 3H, *J* = 6,6 Hz, H-8); 2,1 (*sl*, 1H, OH); 4,9 (*q*, 1H, *J* = 6,6 Hz, H-7); 7,4 (*m*, 5H, H-2, H-3, H-4, H-5, H-6).

RMN de ^{13}C (75,5 MHz, CDCl_3 , δ_{CDCl_3} 77,0) δ : 25,0 (CH_3 , C-8); 69,8 (CH , C-7); 125,3 (2 CH , C-3 e C-5); 127,0 (CH , C-4); 128,0 (2 CH , C-2 e C-6).

7.11.5. Preparação do acetato de feniletila (53)



A uma solução do álcool (1,617 g; 13,2 mmol) em 25 mL de diclorometano sob agitação à 0 ° C, foram adicionados 1,58 g (16,8 mmol) de cloreto de acetila e 2,58 g (21,2 mmol) de DMAP e mantidas sob agitação à temperatura ambiente por 10 h. A solução reacional foi extraída com solução saturada de NaHCO_3 . A fase orgânica foi seca com Na_2SO_4 (anidro) e

purificada em coluna cromatográfica de sílica gel com eluição em Hex : AcOEt (9:1). O produto foi obtido com rendimento de 85%.

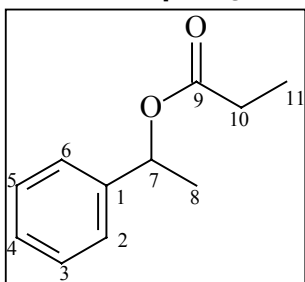
MM: 164 g / mol ($\text{C}_{10}\text{H}_{12}\text{O}_2$)

IE/EM m/z (int. rel.): 164 (M^+ , 22), 122 (100), 107 (37), 105 (74), 104 (90), 77 (34), 43 (42).

RMN de ^1H (300,01 Mz, CDCl_3 , δ_{TMS} 0,00) δ : 1,55 (d, 3H, J = 6,6 Hz, H-8); 2,10 (s, 3H, H-10); 5,9 (q, 1H, J = 6,6 Hz, H-7); 7,4 (m, 5H, H-2, H-3, H-4, H-5, H-6).

RMN de ^{13}C (75,5 MHz, CDCl_3 , δ_{CDCl_3} 77,0) δ : 21,3 (CH_3 , C-10); 22,2 (CH_3 , C-8); 72,3 (CH , C-7); 126 (2 CH , C-3 e C-5); 127,8 (CH , C-4); 128,5 (2 CH , C-2 e C-6); 141,67 (C_0 , C-1); 170,3 (C_0 , C-9).

7.11.6. Preparação do propionato de feniletila (54)



A uma solução do álcool (1,792 g; 14,6 mmol) em 25 mL de diclorometano sob agitação à 0 ° C, foram adicionados 1,80 mL (18 mmol) de cloreto de propionila e 2,58 g (21,1 mmol) de DMAP e mantidas sob agitação à temperatura ambiente por 10 h. A solução reacional foi extraída com solução saturada de NaHCO_3 . A fase orgânica foi seca

com Na_2SO_4 (anidro) e purificada em coluna cromatográfica de sílica gel com eluição em Hex : AcOEt (5:1). O produto foi obtido com rendimento de 80%.

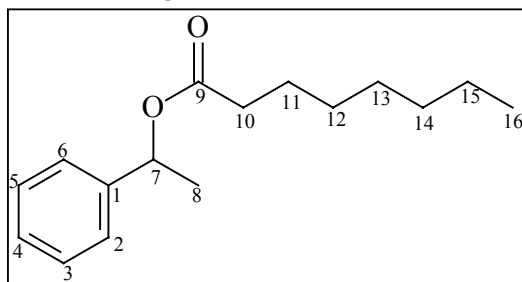
MM: 178 g / mol ($\text{C}_{11}\text{H}_{14}\text{O}_2$).

IE/EM m/z (int. rel.): 178 (M^+ , 25), 122 (95), 105 (100), 104 (78), 77 (26), 57 (31).

RMN de ^1H (300,01 Mz, CDCl_3 , δ_{TMS} 0,00) δ : 1,17 (*t*, 3H, $J = 7,7$ Hz, H-11); 1,5 (*d*, 3H, $J = 6,7$ Hz, H-8); 2,35 (*q*, 2H, $J = 7,7$ Hz, H-10); 5,9 (*q*, 1H, $J = 6,7$ Hz, H-7); 7,4 (*m*, 5H, H-2, H-3, H-4, H-5, H-6).

RMN de ^{13}C (75,5 MHz, CDCl_3 , δ_{CDCl_3} 77,0) δ : 9,06 (CH_3 , C-11); 22,2 (CH_3 , C-8); 27,8 (CH_2 , C-10); 72,0 (CH , C-7); 126,0 (2 CH , C-3 e C-5); 127,7 (CH , C-4); 128,4 (2 CH , C-2 e C-6); 141,8 (C_0 , C-1); 173,6 (C_0 , C-9).

7.11.7. Preparação do octanoato de feniletila (55)



A uma solução do álcool (1,861 g; 15,25 mmol) em 25 mL de diclorometano sob agitação à 0 ° C, foram adicionados 3,42 mL (22 mmol) de cloreto de octanoíla e 2,68 g (22 mmol) de DMAP e mantidas sob agitação à temperatura ambiente por 10 h.

A solução reacional foi extraída com solução saturada de NaHCO_3 . A fase orgânica foi seca com Na_2SO_4 (anidro) e purificada em coluna cromatográfica de sílica gel com eluição em Hex : AcOEt (95:5). O produto foi obtido com rendimento de 79%.

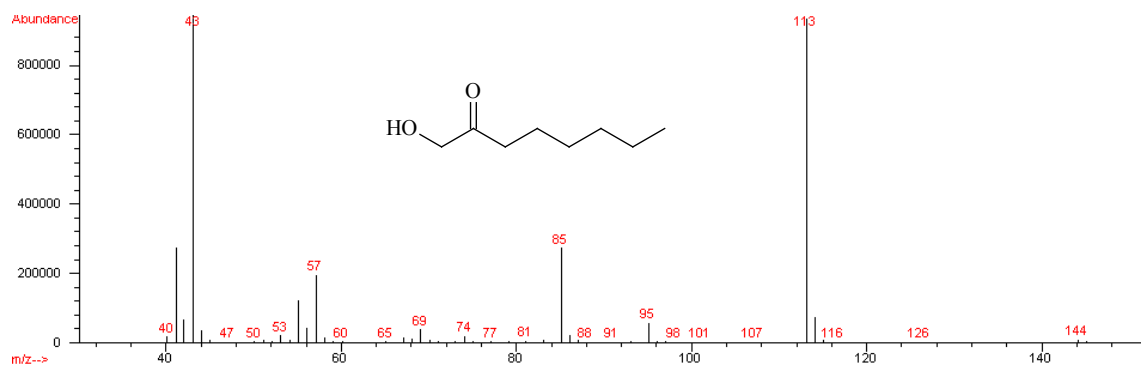
MM: 248 g / mol ($\text{C}_{16}\text{H}_{24}\text{O}_2$)

IE/EM m/z (int. rel.): 248 (M^+ , 2), 143 (5), 122 (100), 105 (87), 57 (11)

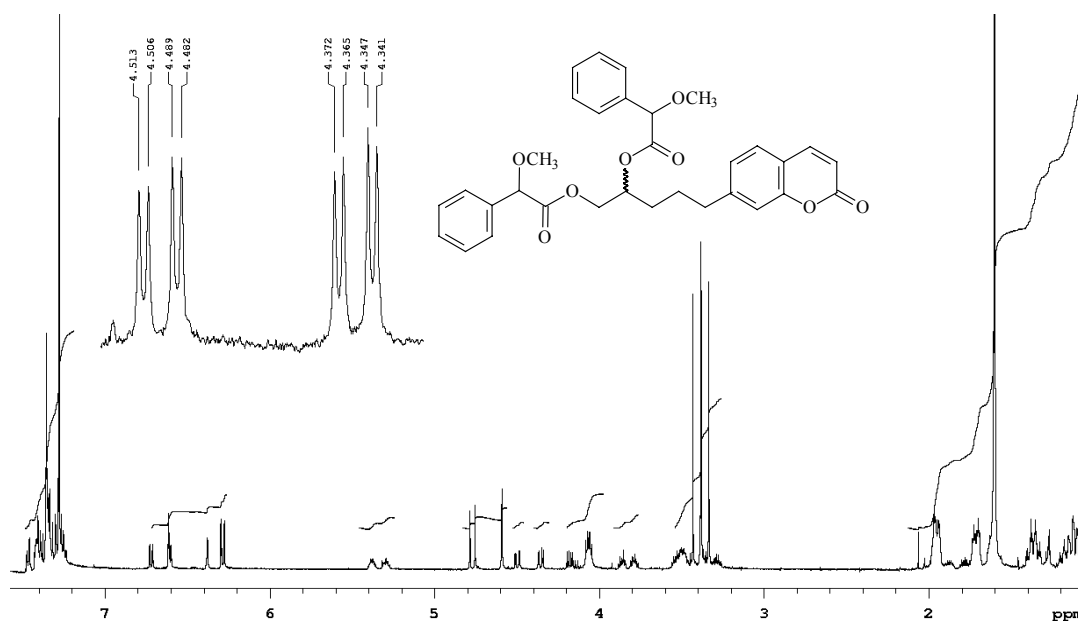
RMN de ^1H : (300,01 Mz, CDCl_3 , δ_{TMS} 0,00) δ : 0,86 (*t*, 3H, $J = 6,0$ Hz, H-16); 1,20-1,35 (*m*, 8H, H-12, H-13, H-14 e H-15), 1,52 (*d*, $J = 6,0$ Hz, 3H, H-8); 1,62 (*t*, 2H, $J = 6,0$ Hz, H-11); 2,32 (*t*, 2H, $J = 6,0$ Hz, H-10); 5,90 (*q*, 1H, $J = 6,0$ Hz, H-7); 7,22-7,40 (*m*, 5H, H-2, H-3, H-4, H-5, H-6).

RMN de ^{13}C (75,5 MHz, CDCl_3 , δ_{CDCl_3} 77,0) δ : 13,9 (CH_3 , C-16), 22,2 (CH_3 , C-8); 22,5 (CH_2 , C-15), 24,9 (CH_2 , C-14), 28,8 (CH_2 , C-13); 28,9 (CH_2 , C-12); 31,6 (CH_2 , C-11); 35,5 (CH_2 , C-10); 71,9 (CH , C-7); 125,9 (2 CH , C-3 e C-5); 127,7 (CH , C-4); 128,4 (2 CH , C-2 e C-6); 141,8 (C_0 , C-1); 173,0 (C_0 , C-9).

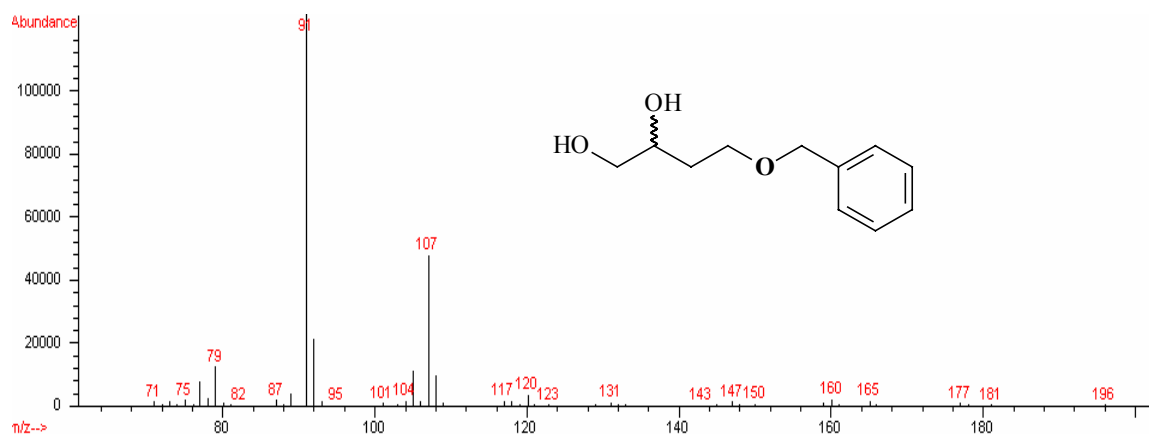
8.0. ESPECTROS



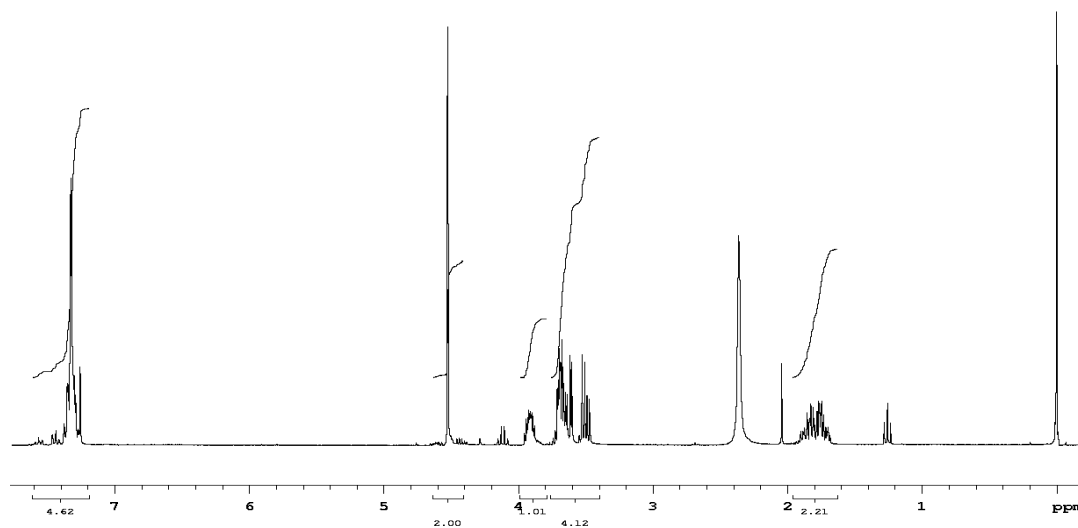
E 1: Espectro de massas (IE, 70 e V) da 1-hidróxi-2-octanona.



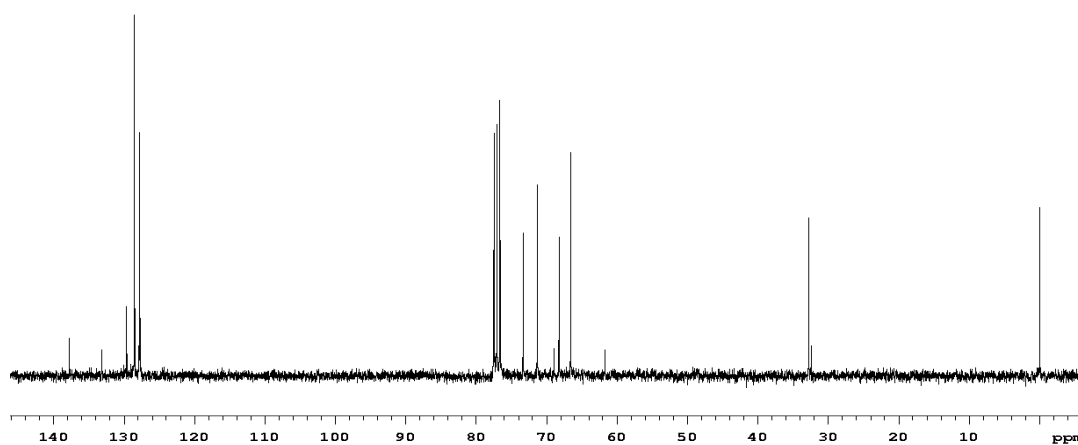
E 2: Espectro de RMN de ¹H (499,88 Mz, CDCl₃) do 7-(3,4-di-hidróxi-butóxi)-2H-1-benzopiran-2-ona (CP1) derivatizado com (S)-MPA.



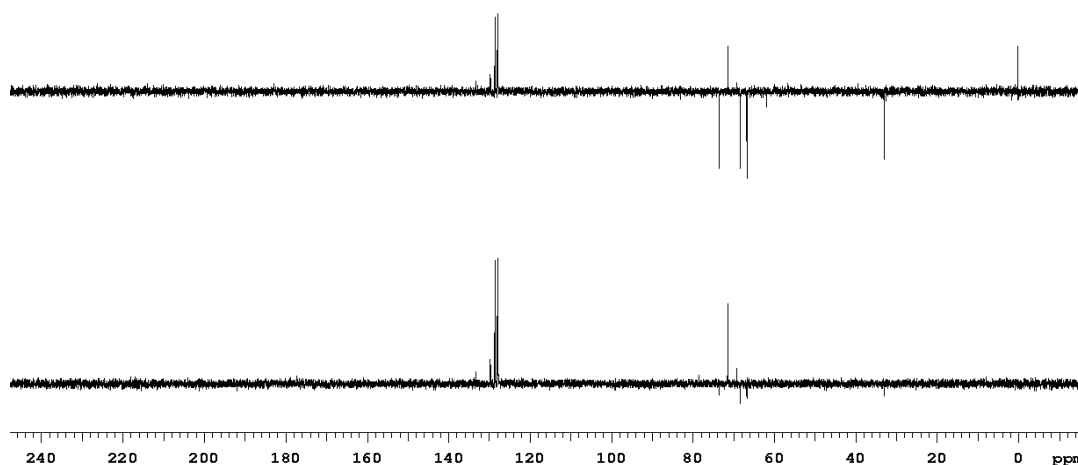
E 3: Espectro de massas (IE, 70 e V) do (±)-4-fenilmetoxi-1,2-butanodiol.



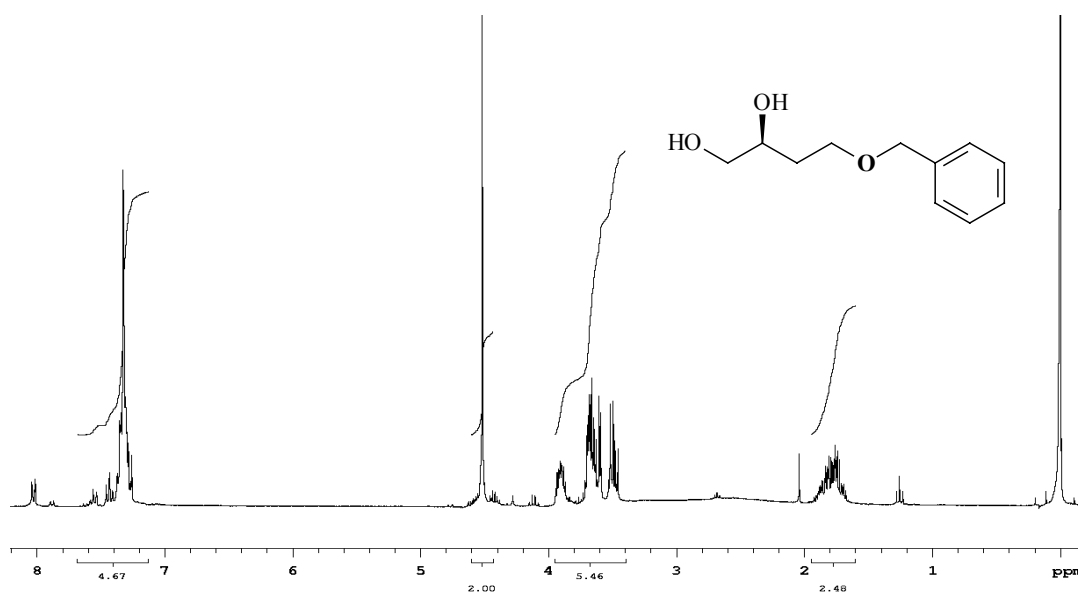
E 3: Espectro de RMN de ^1H (499,88 Mz, CDCl_3) do (±)-4-fenilmetoxi-1,2-butanodiol



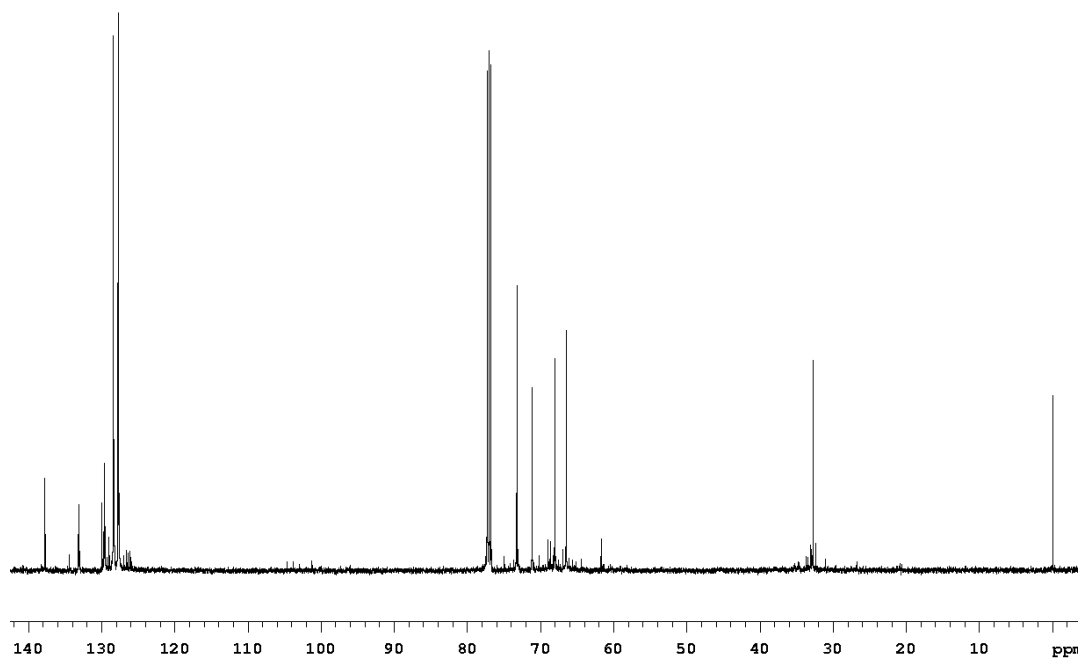
E 4: Espectro de RMN de ¹³C (125,69 MHz, CDCl₃) do (±)-4-fenilmetoxi-1,2-butanodiol.



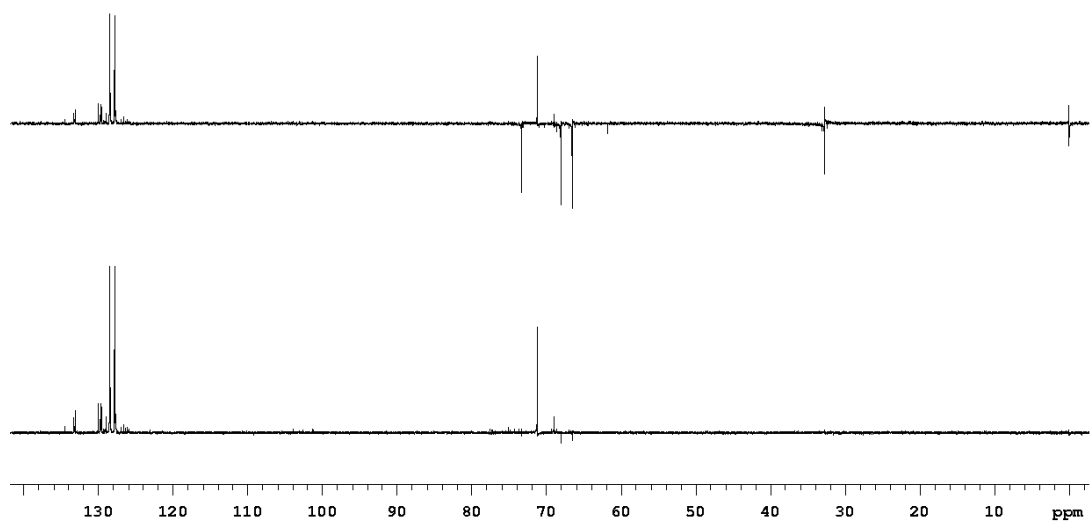
E 5: Espectro de DEPT 90 e 135 ° (125,69 MHz, CDCl₃) do (±)-4-fenilmetoxi-1,2-butanodiol derivatizado com (S)-MPA.



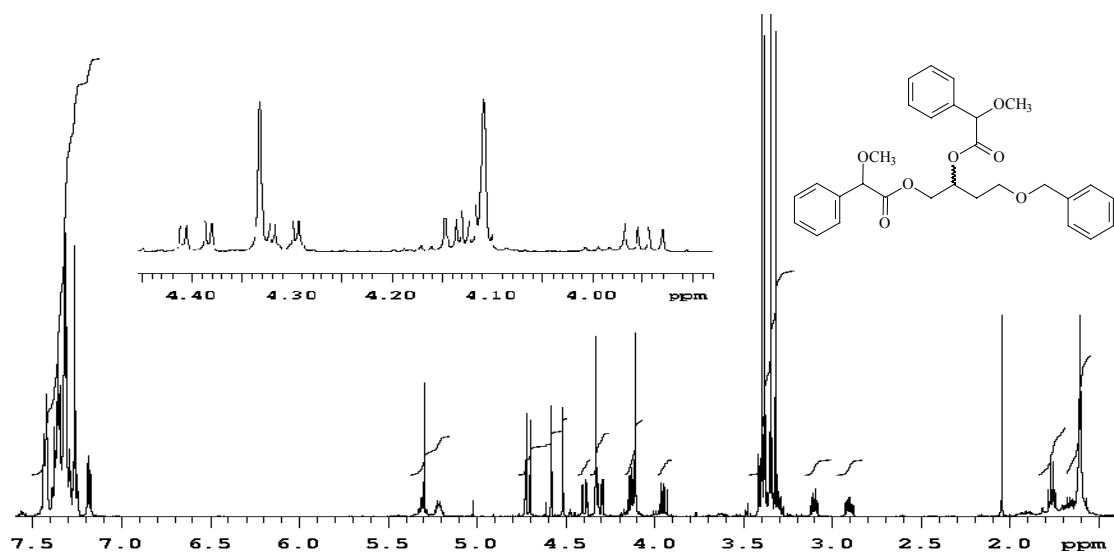
E 6: Espectro de RMN de ¹H (499,88 Mz, CDCl₃) do (S)-4-fenilmetoxi-1,2-butanodiol.



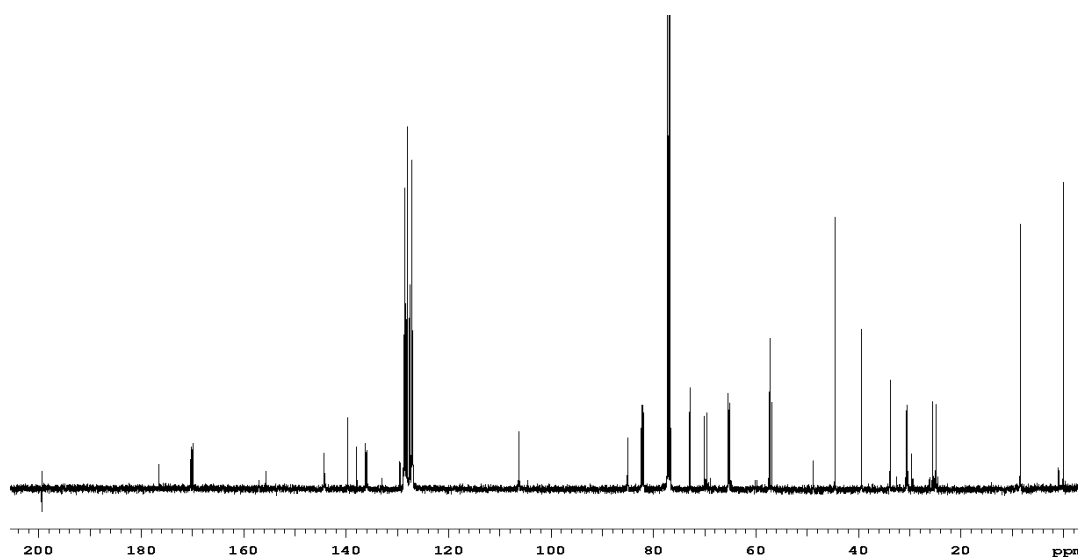
E 7 : Espectro de RMN de ¹³C (125,69 MHz, CDCl₃) do (S)-4-fenilmetoxi-1,2-butanodiol.



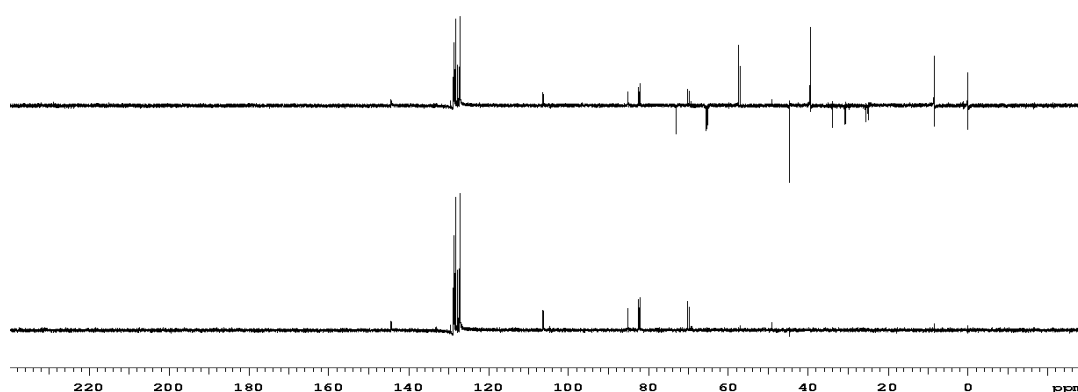
E 8: Espectro de DEPT 90 e 135 ° (125,69 MHz, CDCl_3) do ($\pm$)-4-fenilmetoxi-1,2-butanodiol.



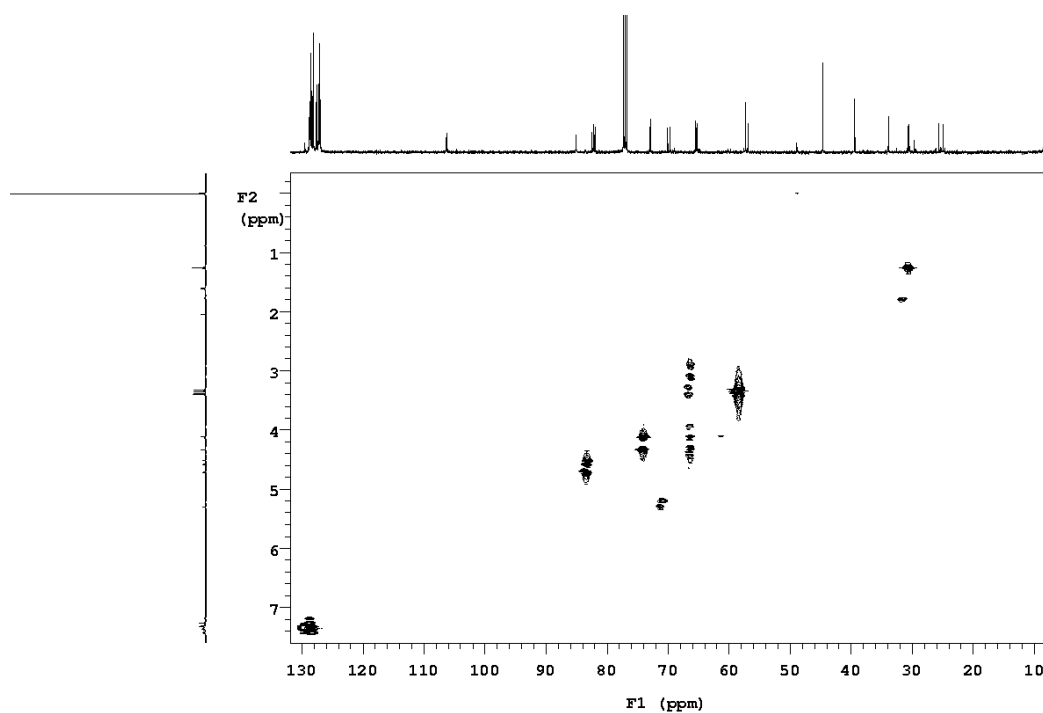
E 9: Espectro de RMN de ^1H (499,88 Mz, CDCl_3) do ($\pm$)-4-fenilmetoxi-1,2-butanodiol derivatizado com (S)-MPA.



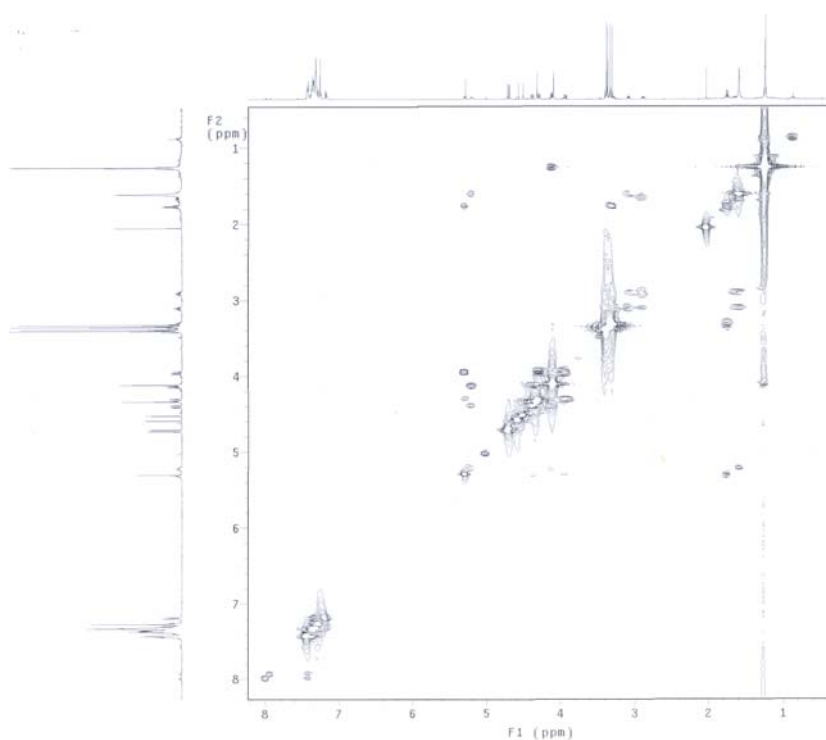
E 10: Espectro de RMN de ^{13}C (125,69 MHz, CDCl_3) do ($\pm$)-4-fenilmetoxi-1,2-butanodiol derivatizado com (S)-MPA.



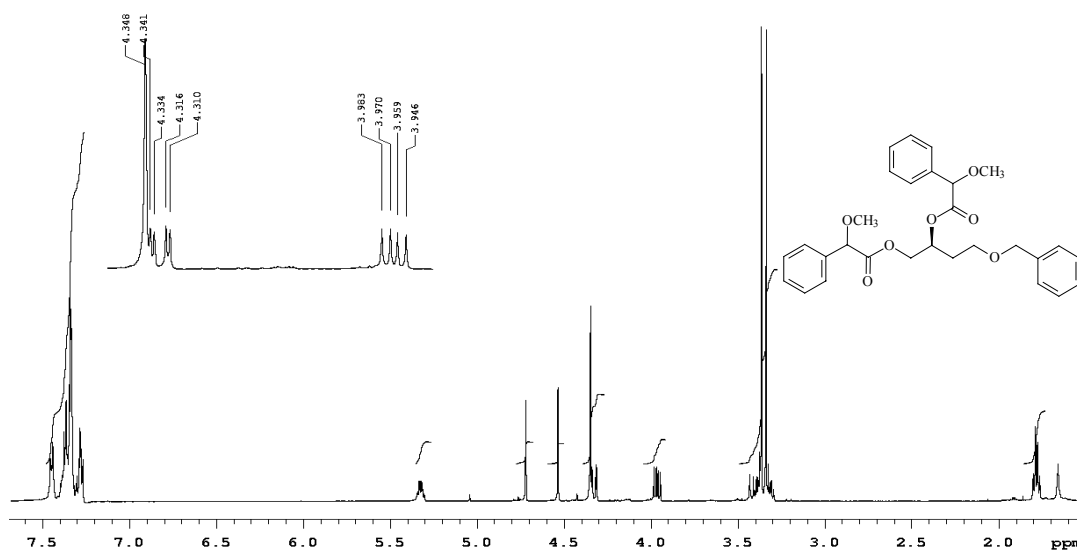
E 11: Espectro de DEPT 90 e 135 ° (125,69 MHz, CDCl_3) do ($\pm$)-4-fenilmetoxi-1,2-butanodiol derivatizado com (S)-MPA.



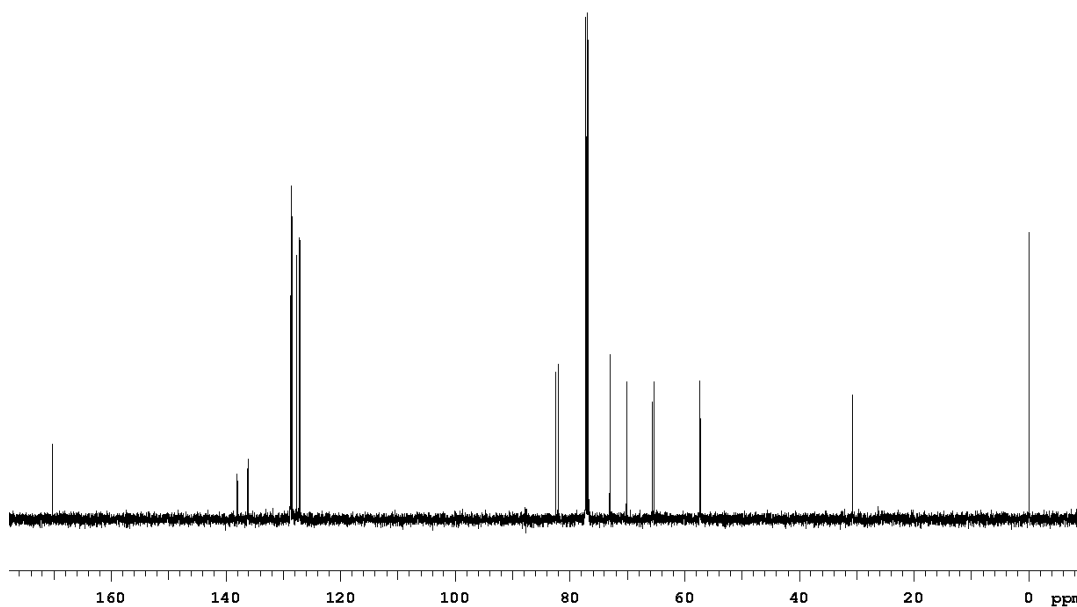
E 12: Espectro de RMN 2D (^1H e ^{13}C HSQC, CDCl_3) do ($\pm$)-4-fenilmetoxi-1,2-butanodiol derivatizado com (S)-MPA.



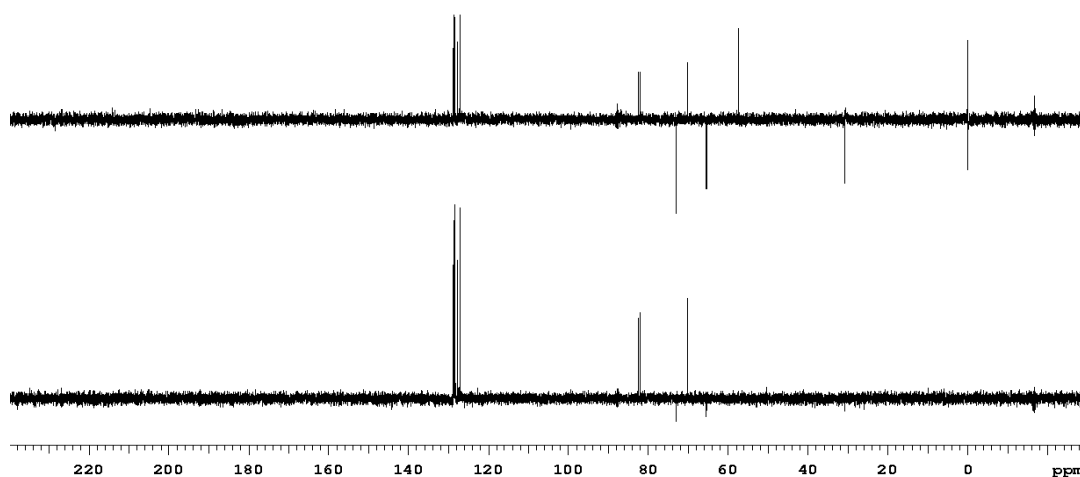
E 13: Espectro de RMN 2D (^1H e ^1H gCOSY, 499,88 MHz, CDCl_3) do ($\pm$)-4-fenilmetoxi-1,2-butanodiol derivatizado com (S)-MPA.



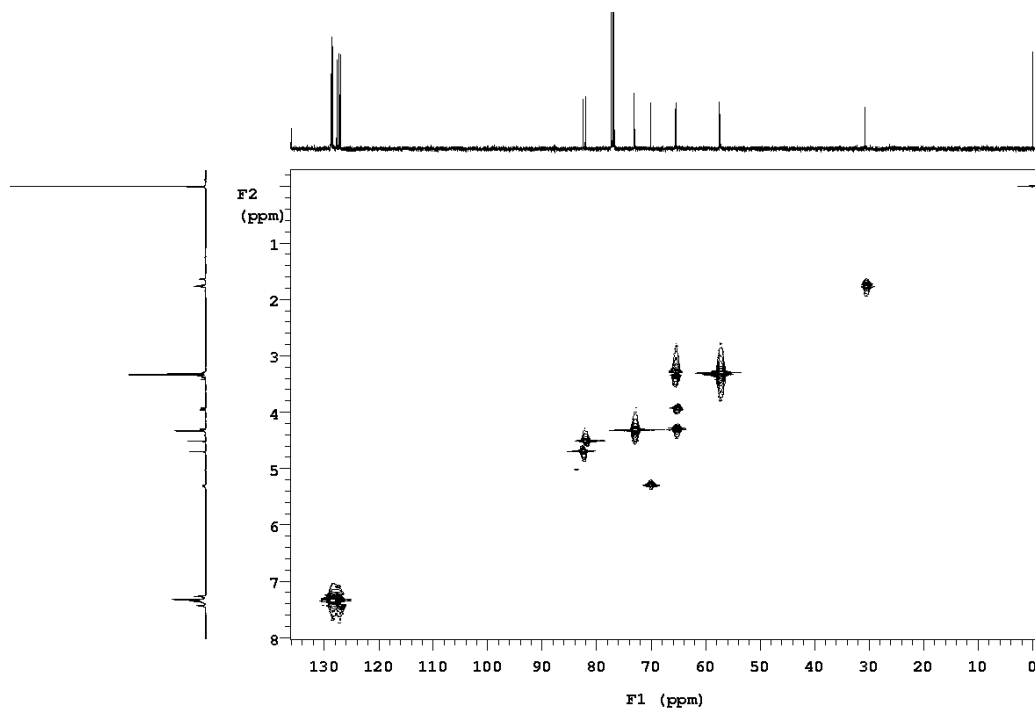
E 14: Espectro de RMN de ^1H (499,88 MHz, CDCl_3) do (S)-4-fenilmetoxi-1,2-butanodiol derivatizado com (S)-MPA.



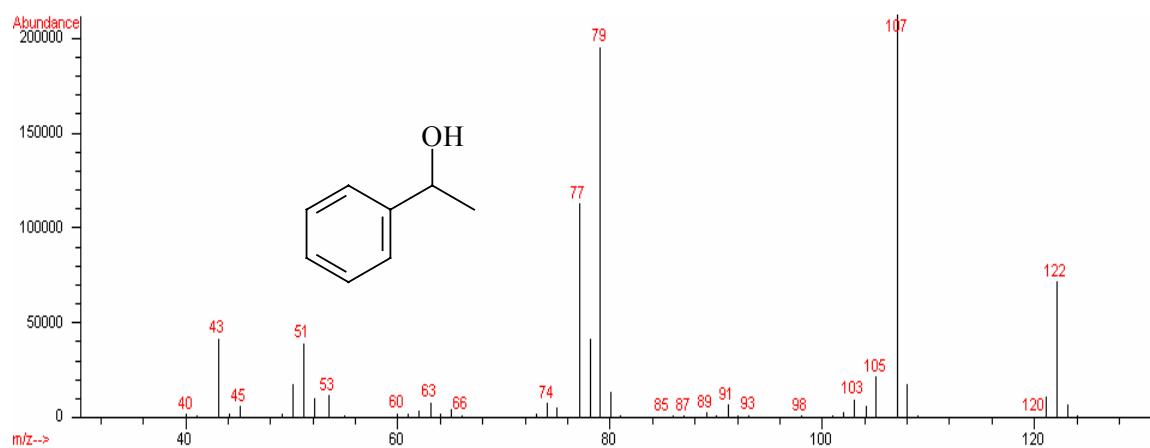
E 15: Espectro de RMN de ^{13}C (125,69 MHz, CDCl_3) do (S)-4-fenilmetoxi-1,2-butanodiol derivatizado com (S)-MPA.



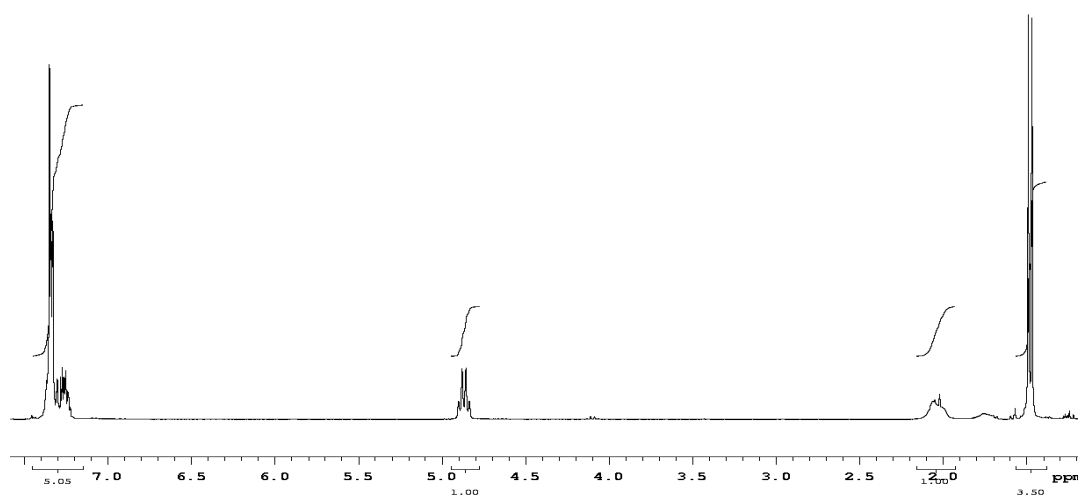
E 16: Espectro DEPT 90 e 135 ° (125,69 MHz, CDCl₃) do (S)-4-fenilmetoxi-1,2-butanodiol derivatizado com (S)-MPA.



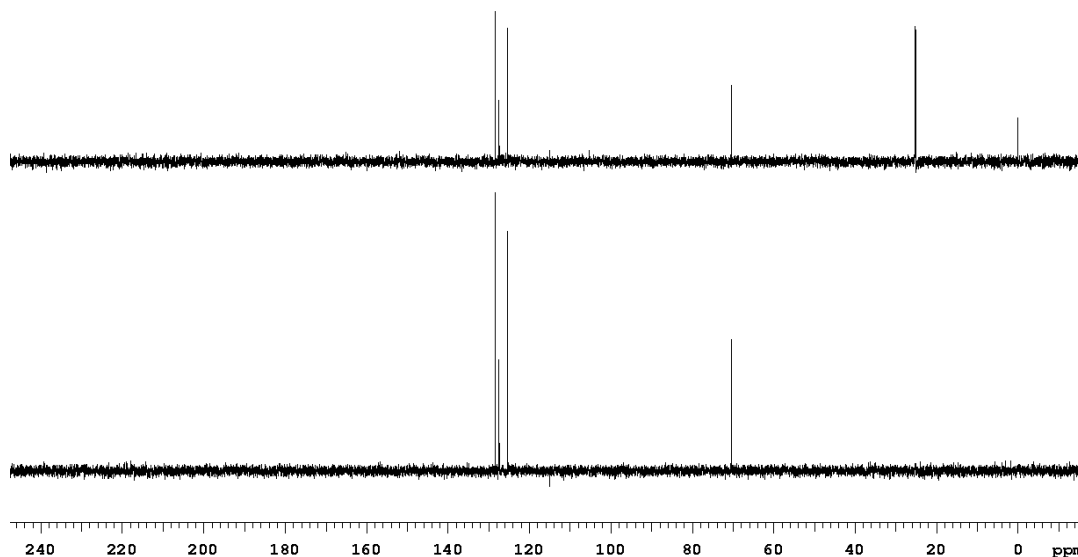
E 17: Espectro de RMN 2D (¹H e ¹³C HSQC, CDCl₃) do (S)-4-fenilmetoxi-1,2-butanodiol derivatizado com (S)-MPA.



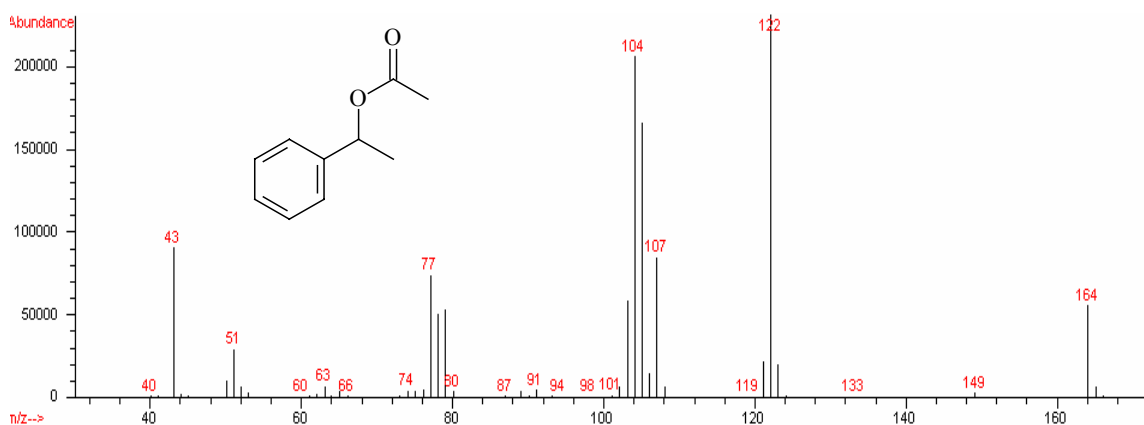
E 18: Espectro de massas (IE, 70 e V) do feniletanol.



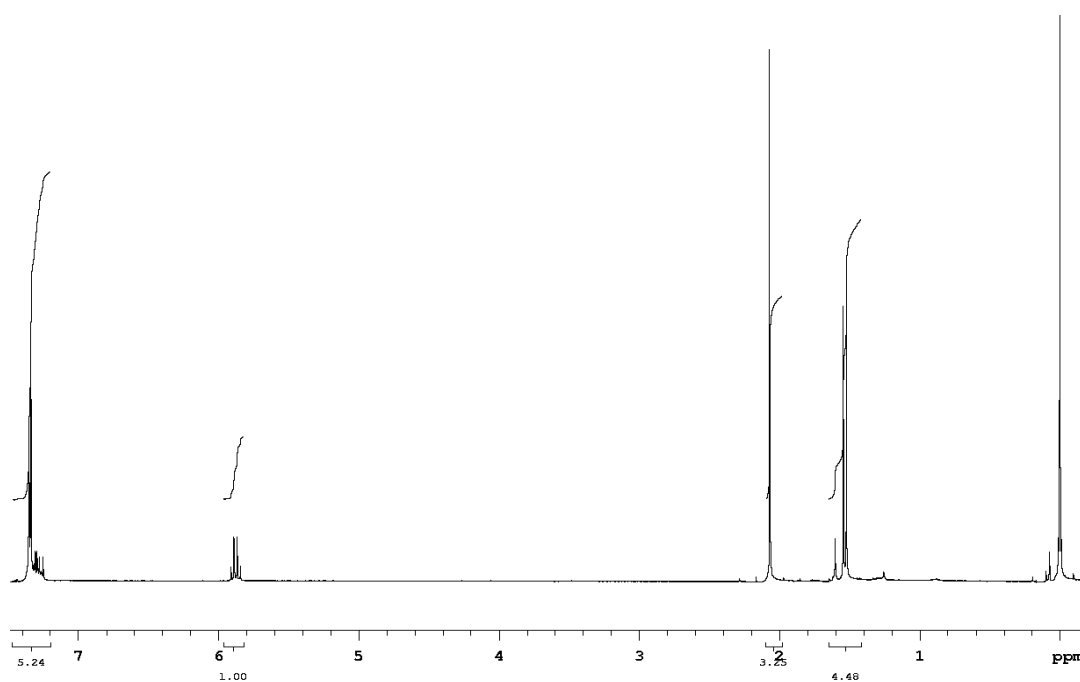
E 19: Espectro de RMN de ¹H (300,07 MHz, CDCl₃) do feniletanol.



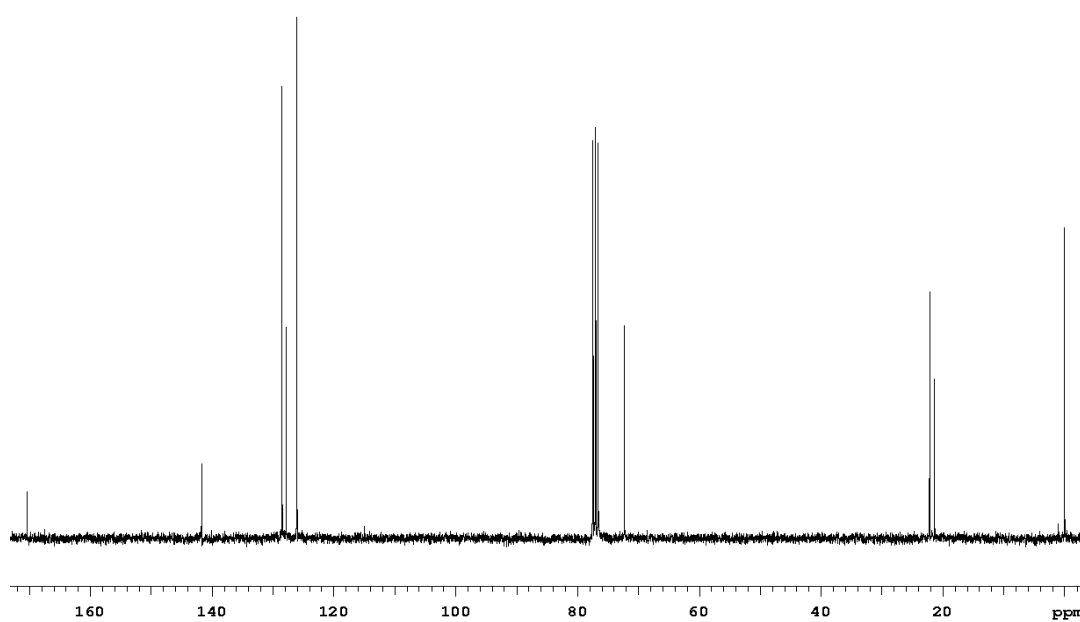
E 20: Espectro DEPT 90 e 135 ° (75,45 MHz, CDCl_3) do feniletanol.



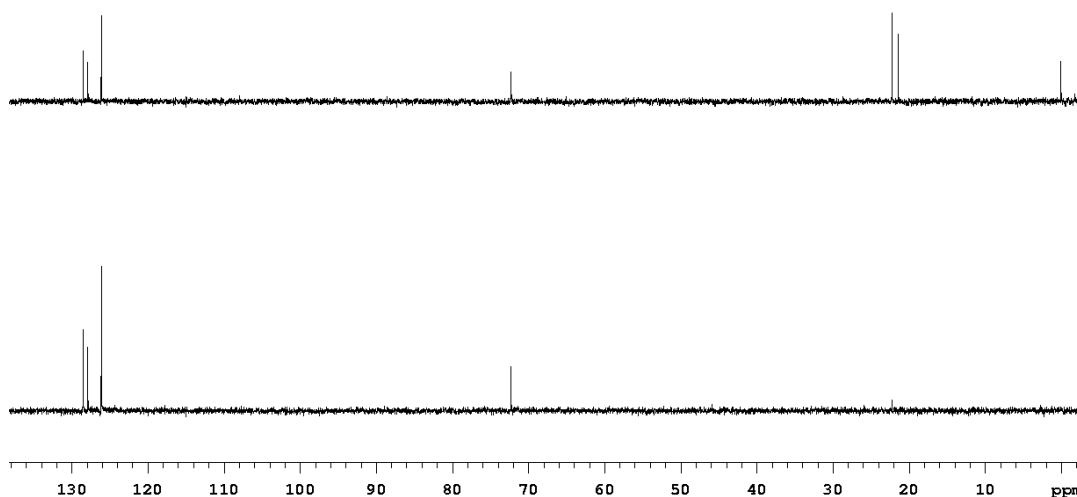
E 21: Espectro de massas (IE, 70 e V) do acetato de feniletila.



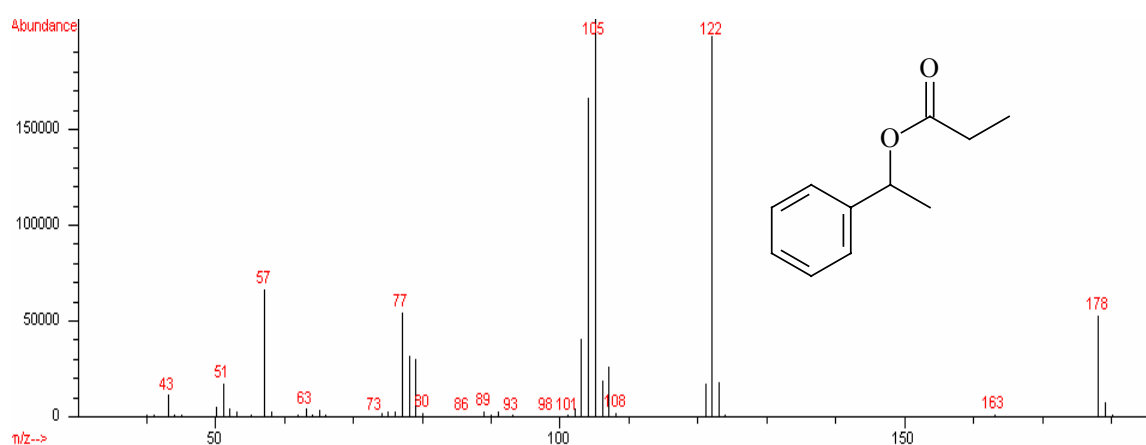
E 22: Espectro de RMN de ^1H (300,07 MHz, CDCl_3) do acetato de feniletila.



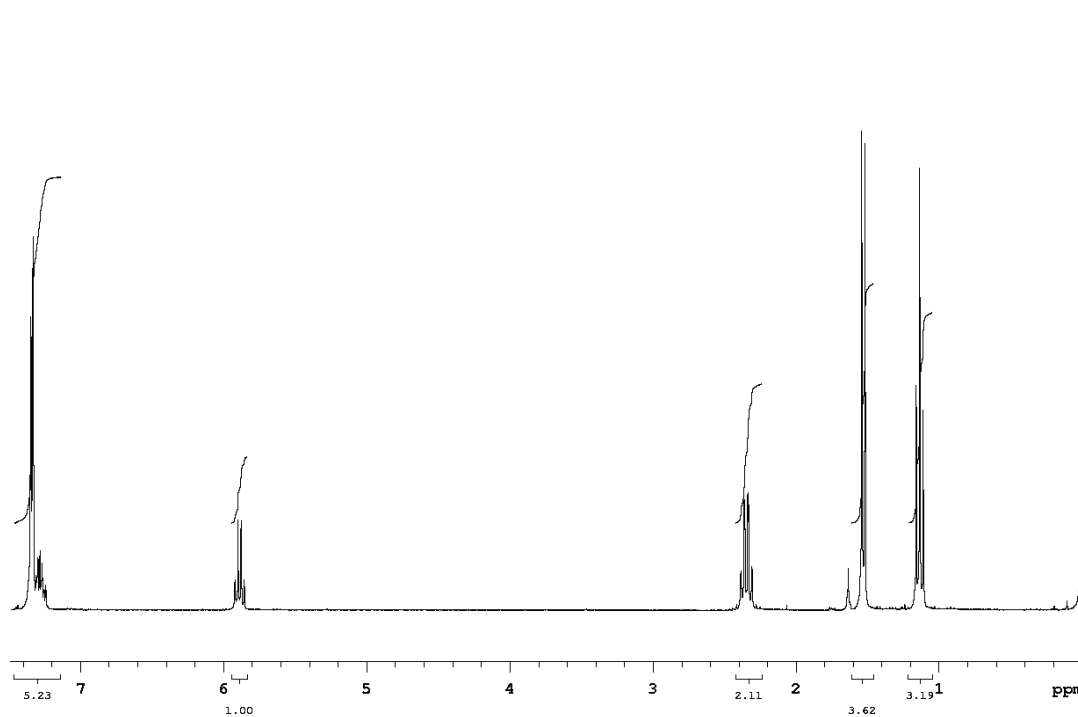
E 23: Espectro de RMN de ^{13}C (75,45 MHz, CDCl_3) do acetato de feniletila.



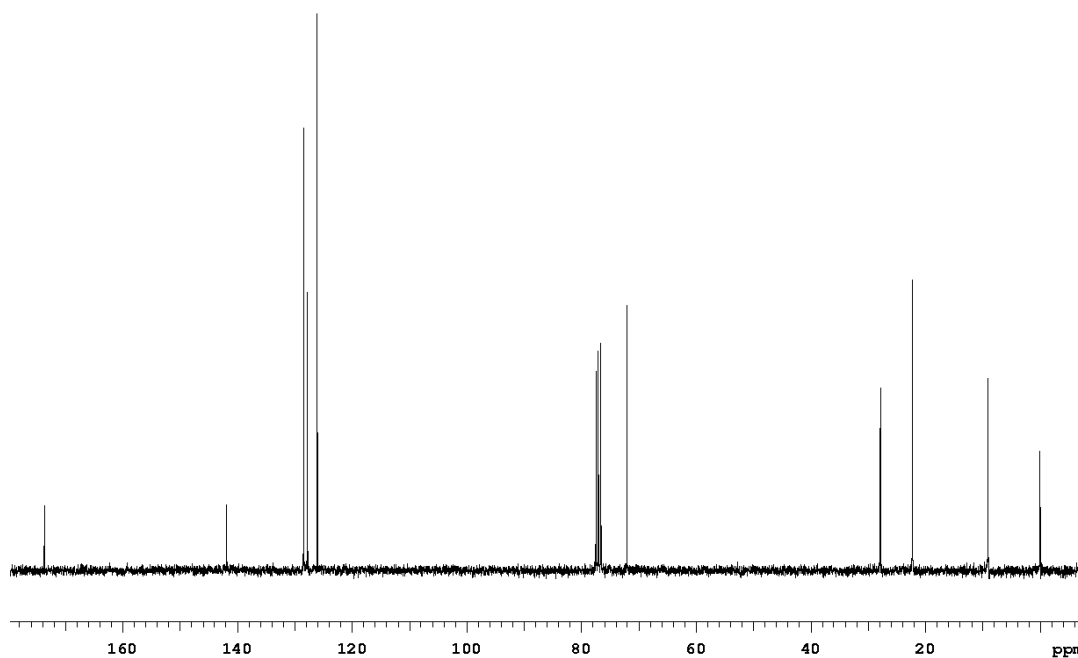
E 24: Espectro DEPT 90 e 135 ° (75,45 MHz, CDCl_3) do acetato de feniletila.



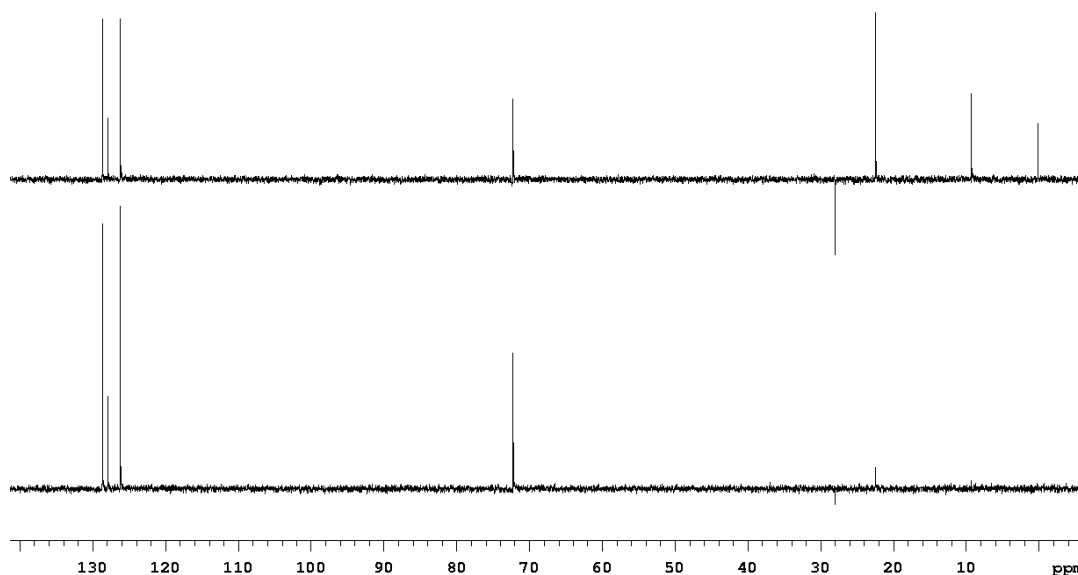
E 25: Espectro de massas (IE, 70 e V) do propionato de feniletila.



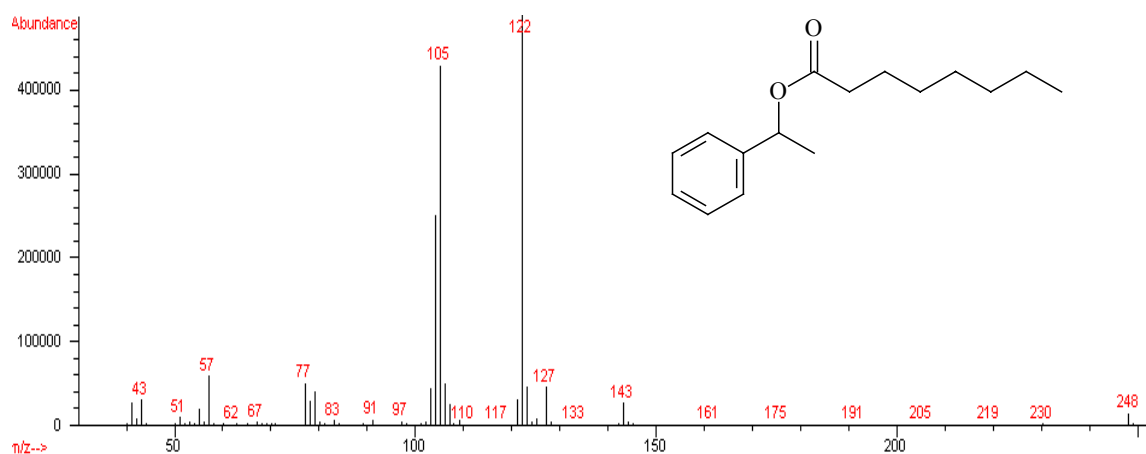
E 26: Espectro de RMN de ¹H (300,07 MHz, CDCl₃) do propionato de feniletila.



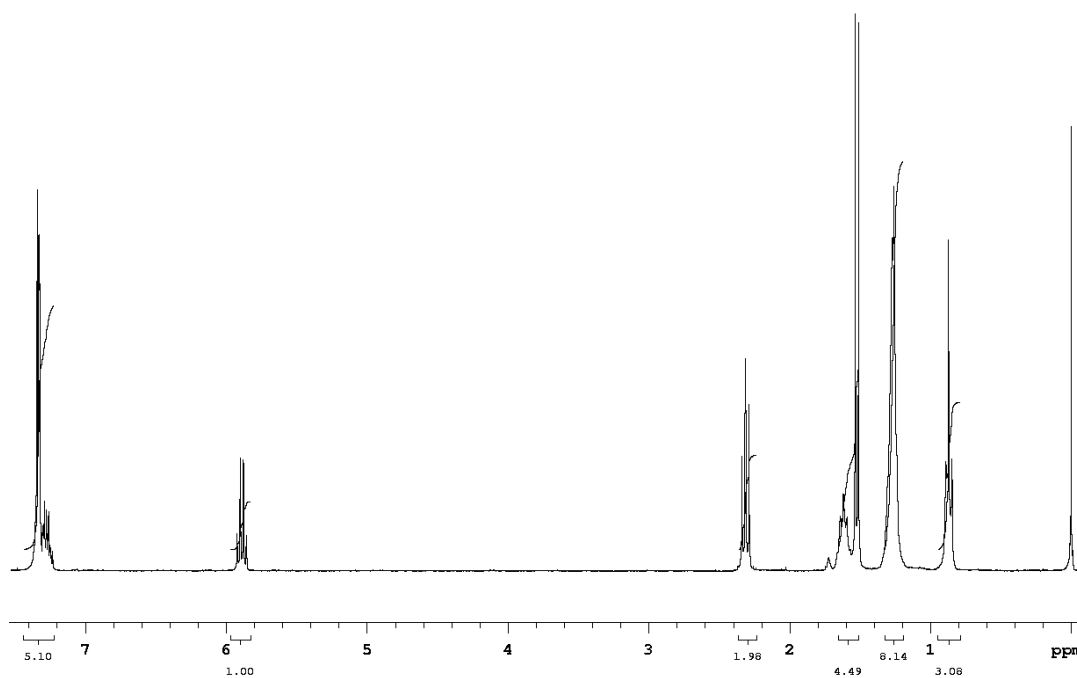
E 27: Espectro de RMN de ¹³C (75,45 MHz, CDCl₃) do propionato de feniletila.



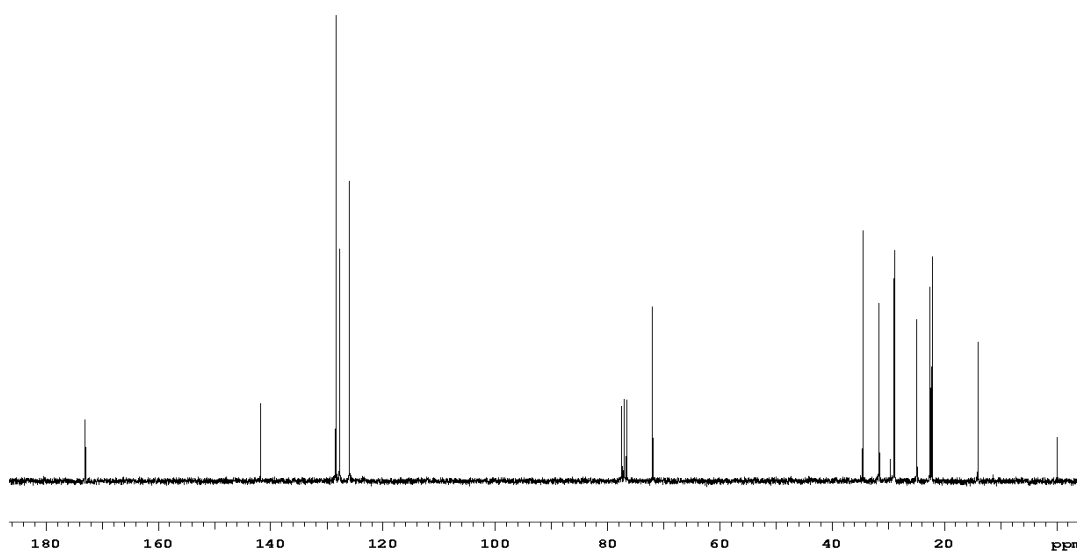
E 28: Espectro DEPT 90 e 135 ° (75,45 MHz, CDCl_3) do propionato de feniletila.



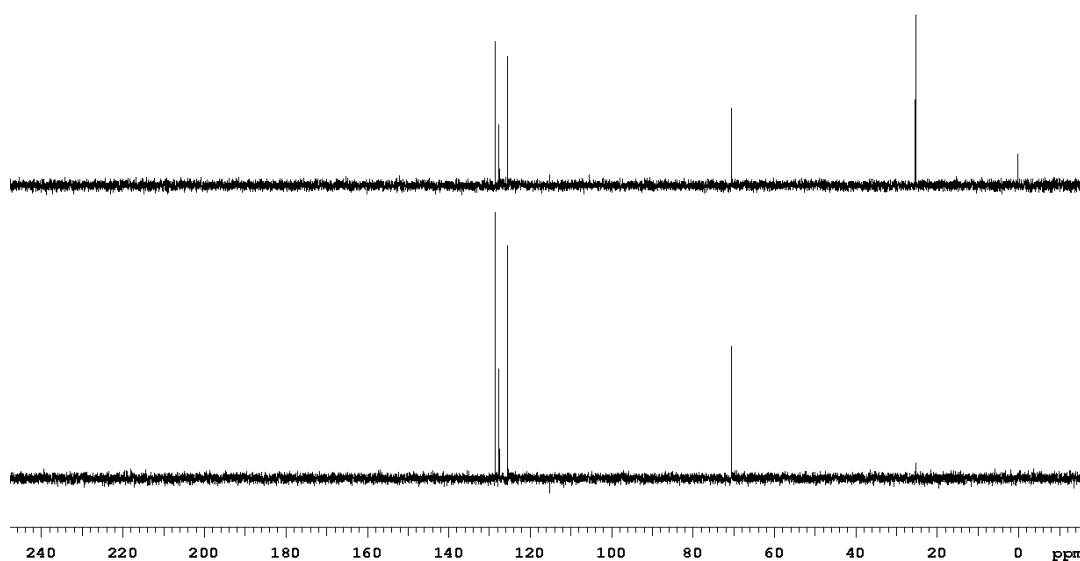
E 29: Espectro de massas (IE, 70 e V) do octanoato de feniletila.



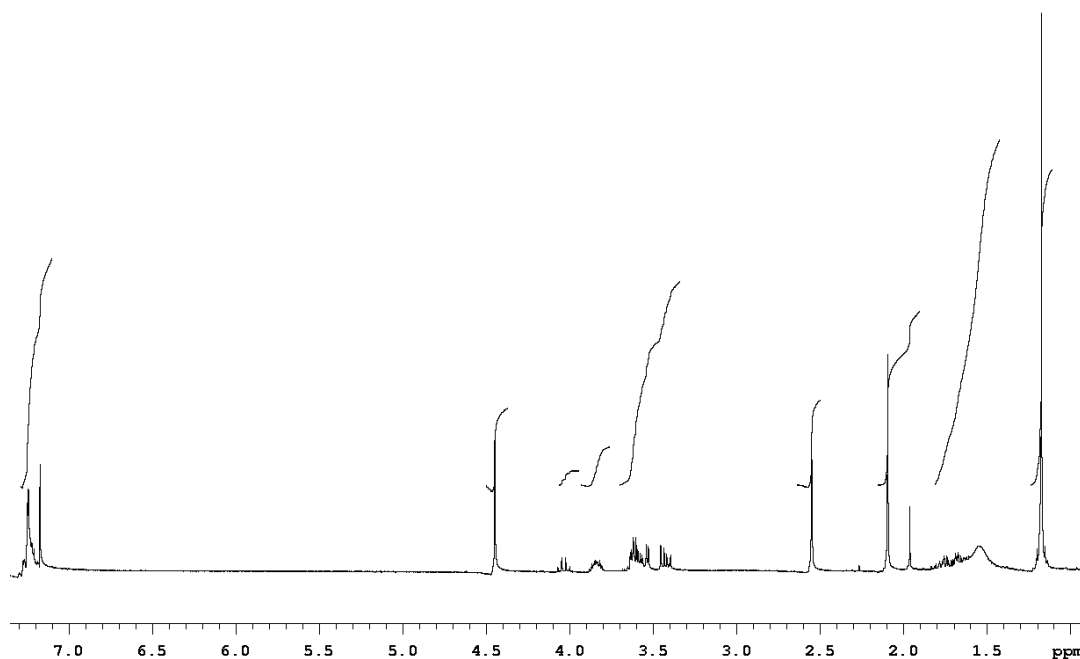
E 30: Espectro de RMN de ^1H (300,07 MHz, CDCl_3) do octanoato de feniletila.



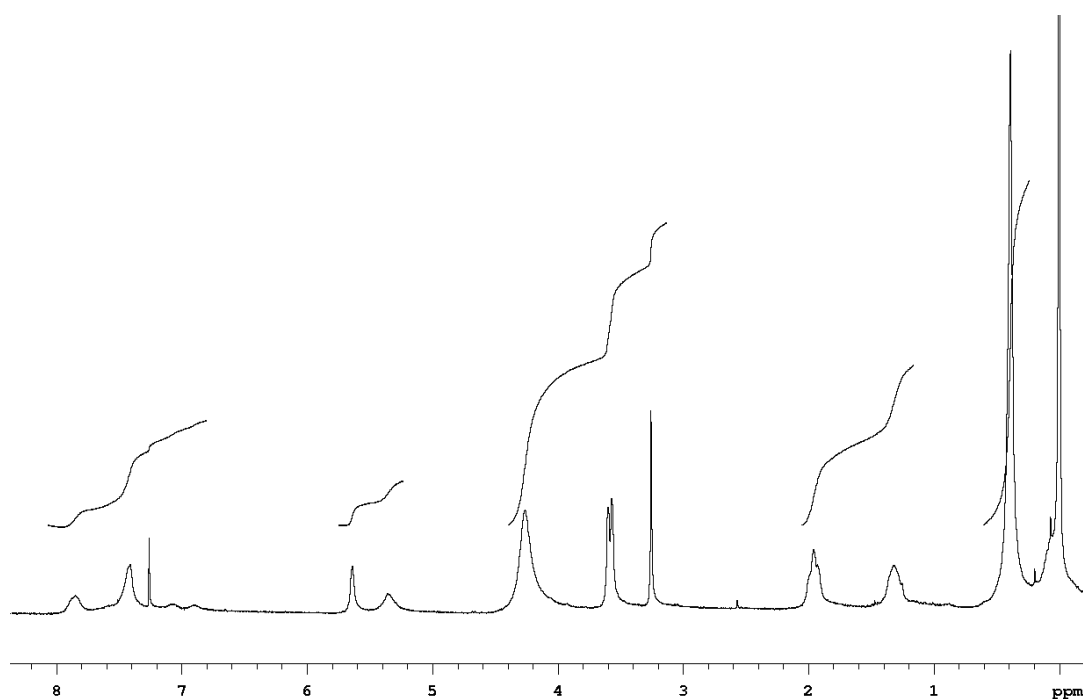
E 31: Espectro de RMN de ^{13}C (75,45 MHz, CDCl_3) do octanoato de feniletila.



E 32: Espectro DEPT 90 e 135 ° (75,45 MHz, CDCl_3) do octanoato de feniletila.



E 33: Espectro de RMN de ^1H (499,88 Mz, CDCl_3) do (±)-4-fenilmetoxi-1,2-butanodiol na presença de $(\text{Eu}(\text{hfc})_3)$ na razão de diol: Eu III (0,5:1).



E 34: Espectro de RMN de ^1H (499,88 Mz, CDCl_3) do ($\pm$)-4-fenilmetoxi-1,2-butanodiol na presença de $(\text{Eu}(\text{hfc})_3)$ na razão de diol: Eu III (1:1).