

Universidade Estadual de Campinas

UNICAMP

Instituto de Química



“Triagem de alto desempenho na detecção de atividade de epóxido-hidrolases e monooxigenases utilizando células íntegras”

Tese apresentada à Universidade Estadual de Campinas, como parte das exigências do curso de pós-graduação do Instituto de Química, para obtenção do título de Doutor em Ciências.

**Tese de Doutorado**

Lu Shi Chen

Orientadora: Profa. Dra. Anita Jocelyne Marsaioli

30 de Maio de 2006

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

C42t	<p>Chen, Lu Shi. Triagem de alto desempenho na detecção de atividade de epóxido-hidrolases e monooxigenases utilizando células íntegras / Lu Shi Chen. -- Campinas, SP: [s.n], 2006.</p> <p style="text-align: center;">Orientadora: Anita Jocelyne Marsaioli.</p> <p style="text-align: center;">Tese – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Química.</p> <p style="text-align: center;">1. Triagem de alto desempenho. 2. Epóxido-hidrolases. 3. Monooxigenases. 4. Biodiversidade. I. Marsaioli, Anita Jocelyne. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Química. III. Título.</p>
------	--

**Título em inglês:** High-Throughput screening in enzyme assays for epoxide hydrolases and monooxygenases activity detection using whole cell

**Palavras-chaves em inglês:** High-throughput screening, Epoxide hydrolases, Monooxygenases, Biodiversity

**Área de concentração:** Química Orgânica

**Titulação:** Doutor em Ciências

**Banca examinadora:** Anita Jocelyne Marsaioli (orientadora), Gabriela Macedo, Nadia Krieger, Raquel Marques Braga, Ljubica Tasic

**Data de defesa:** 30/05/2006

Dedico este trabalho aos  
meus pais e aos meus irmãos  
pelo constante apoio e incentivo  
e, sobretudo, pelo imenso amor  
que sempre uniu a nossa família.

## AGRADECIMENTOS

Expresso meus sinceros agradecimentos a todos meus amigos que, sem importar a distância em que se encontram, contribuíram de uma ou outra forma para o desenvolvimento deste trabalho.

À Profa. Dra. Anita Jocelyne Marsaioli, pela orientação científica necessária para a execução deste projeto, mas, especialmente, pela amizade, confiança e apoio incondicional com que me recebeu durante estes anos.

Ao Instituto de Química da Universidade Estadual de Campinas e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq – pelo fornecimento de uma excelente infraestrutura e bolsa de estudo para execução do trabalho.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) por financiar e conceder auxílios para a compra do leitor de fluorescência FLASHScan 530 (Analytikjena) e ao Fundo de Apoio Ao Ensino, à Pesquisa e à Extensão (FAEPEX) pelo auxílio financeiro concedido.

À Faculdade de Ciências Químicas da Universidade Nacional de Asunción e ao Prof. Dr. André Amarilla pelo apoio recebido. Também, aos professores Esteban Ferro, Daniel, Dionisio, Nelson, Mirtha e Monica pelo incentivo constante e inestimável amizade.

Ao Prof. Dr. Jean-Louis Reymond pela valiosa colaboração, discussões e confiança depositada, sem o qual este trabalho não seria possível; à sua colaboradora Dra. Tami Darbre e, a todos seus alunos: Cathy, Elena, Emma, Jacob, Kong, Peter, Petko, Renaud, Sasha, Estelle, Syed, Ronan, Ruud e Tobia, pelo tempo memorável e pratos de comidas compartilhados. Agradeço especialmente aos Drs. Jean-Philippe Goddart e Johann Grognum pelo tempo e paciência. Minha imensa gratidão pela recepção na Universidade de Berna, Suíça.

Aos professores do IQ-UNICAMP que, direta ou indiretamente, contribuíram ao meu aprendizado, especialmente ao professor Ronaldo Pilli pelas horas dedicadas nas aulas de síntese orgânica e pela atenção incondicional que ele sempre ofereceu aos alunos, ao professor Luis Carlos pela paixão contagiante com que ele desenvolveu as aulas de TOM (Teoria de orbital molecular) e à professora Anita que com suas sabedorias explica com simplicidade os difíceis movimentos dos spins e seqüências de pulsos no estudo de RMN.

Aos professores Aderbal, Eva, Paulo Imamura e Sebastião, pelos conselhos e convivência durante estes anos, e, sobretudo, pela amizade.

Meu agradecimento especial à Dona. Maria, pela ajuda, paciência e pelo delicioso café que prepara todas as manhas.

Aos amigos e colegas do grupo, Adriana Flach, Adriana Pianaro, Armando, Beatriz, Carla, Diego, Eduardo, Fernando Macedo, Fernando Cabeça, Georgiana, Isis, Julia, Letícia, Luciana, Lucimar, Luis Antonio, Marcela, Mariza, Milena, Mirele, Samísia, Sergio, Suzan e Simone, pela amizade, paciência, e momentos inesquecíveis de convivência dentro e fora do laboratório. Gostaria de agradecer principalmente à Beatriz por empreender comigo no começo desta aventura de triagem, à Luciana pelo apoio e dicas nas reações de síntese, e à Isis e, mais uma vez, à Luciana por me ajudarem na correção deste trabalho.

Aos amigos e colegas de outros grupos de pesquisa: Alex, André, Ângelo, Araceli, Betinho, Cíntia, Gabriela, Glicelda, Giovanni, Gustavo, Humberto, Joselito, Kezia, Laverde, Leila, Liliane, Mária del Pilar, Marinaldo, Mary Ângela, Regina e Socorro entre outros pela disponibilidade e ajuda prestada.

À minha grande amiga e colega de república Luciana Coelho com quem compartilhei incontáveis “aventuras domésticas” ao longo de três anos de convivência. Aos meus grandes amigos Hugo e Gianluigi, que, mesmo distantes, me apoiaram em momentos difíceis.

A todos os funcionários do Instituto de Química que, de alguma forma, contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho, especialmente a Paula, Sônia e Sônia, pela presteza com que sempre me socorreram na sala de ressonância e aos funcionários da CPG André, Bel e Rodrigo pela disposição e paciência com que sempre me trataram. Também não poderia deixar de mencionar o Toninho da biblioteca do Instituto, obrigada pela ajuda.

Agradeço eternamente aos meus pais e aos meus irmãos, Alex, Fernando, José, Dani e Oscar por cada momento desta vida!! Eu adoro vocês!! E à minhas cunhadas Alejandra, Tatiana, Elvia e Claudia pela amizade e convivência e por meus adoráveis sobrinos!!!

Finalmente, a você, meu querido Jon “Huaitã”, pelas inumeráveis diferenças que superamos juntos e por aquelas ainda a serem superadas, por compartilhar comigo seus sonhos e suas criações e, especialmente, pelo imenso carinho, paciência, compreensão e estímulo que foram e continuam sendo fundamentais para mim.

## CURRICULUM VITAE

### Informações pessoais

---

Nome: Lu Shi Chen  
Filiação: Lin Yuan Chen e Chin Fong Lin  
Lugar de Nascimento: Taipei-Taiwan  
Nacionalidade: Paraguaia naturalizada  
e-mail: [lushichen@gmail.com](mailto:lushichen@gmail.com)

### Formação acadêmica

---

- **Doutorado em Química Orgânica**  
Universidade Estadual de Campinas, São Paulo, Brasil.  
Instituto de Química.  
**Área de concentração:** Implementação de testes rápidos baseados em fluorescência para detecção de potencial catalítico dos microrganismos. Implementação de ensaio enzimático utilizando substratos não modificados. Estudo de biotransformação de xenobióticos.  
**Orientador:** Profa. Dra. Anita Jocelyne Marsaioli.  
**Tese:** “*Triagem de alto desempenho na detecção de atividade de epóxido-hidrolases e monooxigenases utilizando células íntegras*”  
**Financiamento:** Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico –CNPq.  
Março de 2002 a Maio de 2006.
- **Mestrado em Microbiologia**  
Universidade Estadual de Londrina, Paraná, Brasil.  
Centro de Ciências Biológicas.  
Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa – Soja).  
**Área de concentração:** Isolamento e purificação de rizóbios nativos. Determinação da resistência intrínseca dos mesmos aos antibióticos. Extração de proteína, lipopolissacarídeos (LPS) e DNA bacteriana. Determinação dos perfis protéicos e LPS. Fingerprinting genômico utilizando ERIC e REP-PCR. Análise da sequência de 16S rRNA e análise filogenética. Experimento em campo de potencial simbiótica dos rizóbios isolados. Análise de componente principal.  
**Orientador:** Dra. Mariangela Hungria.  
**Tese:** “*Diversidade dos rizóbios isolados de nódulos de soja coletados no solo de Paraguai*”  
**Financiamento:** Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)  
Fevereiro de 1998 a Março de 2000.
- Universidade Nacional de Asunción, Assunção, Paraguai.  
Faculdade de Ciências Químicas  
**Grau acadêmico:** Química Analítica.  
Março de 1990 a Dezembro de 1992

## *Cursos de Especialização*

---

- Curso de Pós-graduação em “Didática Universitária” (380hs) Organizado pelo Departamento de Apoio Pedagógico do Reitorado da Universidade Nacional de Assunção. 1995-1996.
- Curso de Pós-graduação em “Especialização em Fixação de Nitrogênio na Agricultura”. Organizado pela Escola de Pós-graduação Acadêmica da Universidade Nacional de Assunção. 1995.
- Curso de Pós-graduação em “Atualização em Cromatografia Líquida” Organizado pela Escola de Pós-graduação Acadêmica da Universidade Nacional de Assunção. 1993.

## *Publicações*

---

- R. Sicard, **L. S. Chen**, A. J. Marsaioli and J.-L. Reymond. (2005) A fluorescence-based assay for Baeyer-Villiger monooxygenases, hydroxylases and lactonases. *Advanced Synthesis & Catalysis*. 347(7+8), 1041-1050
- B. Bicalho, **L. S. Chen**, J. Grognum, J.-L. Reymond and A. J. Marsaioli. (2004) Studies on Whole Cell Fluorescence-Based Screening for Epoxide Hydrolases and Baeyer-Villiger Monooxygenases. *J. Braz. Chem. Soc.* 15, 911-916.
- **Lu Shi Chen**, Antonio Figueredo, Hugo Villani, Javier Michajluk and Mariangela Hungria (2002) Diversity and symbiotic effectiveness of rhizobia isolated from field-grown soybean nodules in Paraguay. *Biol. Fertil. Soils*, 35, 448-457.
- **Chen, L.S.**; Figueredo, A.; Pedrosa, F.O. and Hungria, M. (2000) Genetic Characterization of soybean rhizobia in Paraguay. *Applied and Environmental Microbiology*, 66, 5099-5103.
- Antonio Figueredo, Hugo Villani, Javier Michajluk, **Lu Shi Chen**, Ladislao Nagy (2000) Screening de rizobios nativos en suelos paraguayos. *Revista de Ciencias y Tecnología*, Dirección de Investigación, National University of Asunción. 1, 87-92.
- Nagy, Ladislao; Figueredo, A.; Michajluk, B.J.; Villani, H.R.; **Chen, L.S.** Effect of titanium ascorbate on nitrogen fixation in *Glycine max*. In: Proc. 8. International Trace Element Symposium, Budapest, September 1998 (Ed.: I. Pais)
- Villani, H., A. Figueredo, **L. S. Chen**, J. Michajluk and L. Nagy (1999) Evaluation of Nitrogen Fixing Efficiency of Indigenous Rhizobia Isolated from Paraguayan Soils. *An. Academia Brasileira de Ciências*, 71, 561-565.

## RESUMO

### **Triagem de alto desempenho na detecção de atividade de epóxido-hidrolases e monooxigenases utilizando células íntegras**

Palavras-chave: Triagem de alto desempenho, ensaios enzimáticos, epóxido-hidrolases, monooxigenases.

A biocatálise é uma área multidisciplinar de pesquisa, na qual as novas tecnologias têm sido desenvolvidas rapidamente a fim de oferecer opções e soluções únicas aos diversos desafios encontrados em síntese orgânica, atuando em complemento com a química sintética tradicional. Frente à necessidade de acompanhar o progresso desta área, este trabalho visa à implementação de metodologias de triagens de alto desempenho (HTS) que permitam a detecção do potencial enzimático microbiano de uma forma simples e rápida. Este trabalho está dividido em dois tópicos principais: epóxido-hidrolases (EH) e monooxigenases (MO). Cada um dos tópicos relatará a síntese das sondas fluorogênicas que foram utilizadas nos testes de HTS e, em seguida, encontrar-se-á os resultados de avaliações preliminares destas sondas com diferentes concentrações celulares e de reagentes. As melhores condições para os testes com células microbianas foram encontradas e empregadas para avaliar diferentes microrganismos provenientes do bioma brasileiro ou de coleções de cultura brasileiras. Os resultados obtidos com as sondas fluorogênicas foram comparados com os relatados na literatura ou os obtidos no nosso laboratório. No tópico de EH, foram empregadas, ainda, sondas quirais que permitiram a determinação de velocidades iniciais e excessos enantioméricos das reações. Foi realizada a adaptação do teste de adrenalina para detecção de EH nos microrganismos utilizando 23 substratos comerciais, associando o potencial dos ensaios de HTS com substratos de interesse. Por último, foram realizadas reações de biotransformações via biocatálise convencional de microrganismos que apresentaram resultados mais interessantes nos ensaios de fluorescência. Por meio destas biotransformações, foi possível detectar processo de estereoinversão do 1,2-octanodiol catalisado por *A. niger* CCT 1435 com >80% de rendimento e 90% *ee* e processos de resolução cinética catalisados por *B. pumilus* CBMAI 0008, CBC 008 e CBC 009 e *A. niger* CCT 4846. A diferenciação do tipo de MO (Baeyer-Villiger monooxigenase e hidroxilase) detectadas em *T. cutaneum* CCT 1903, *R. oryzae* CCT 4964, AMA 7 e o fungo CCT 5632 foi também obtida por biocatálise convencional.

## ABSTRACT

### **High-Throughput screening in enzyme assays for epoxide hydrolases and monooxygenases activity detection using whole cell**

Key words: High-throughput screening, epoxide hydrolase, monooxygenase, enzyme assays

Biocatalysis is a multidisciplinary area, where new technologies are developing rapidly in order to offer unique options and solutions to different organic chemistry problems, complementing the classical synthetic chemistry. Facing the need imposed by progress in this area, this project aims at the implementation of high-throughput screening (HTS) methodologies allowing an easy and direct method to detect enzymatic activity using whole cells. This thesis is divided in two main topics: epoxide hydrolases (EH) and monooxygenases (MO). Each topic will report the synthesis of the fluorogenic probes used in the HTS assays and their application in preliminary evaluations with different cellular concentrations and reagents. The best experimental conditions with microbial cells were found and employed to evaluate microorganisms from Brazilian culture collections or isolated from national biomes. The fluorogenic assay results were compared with those in the literature or those obtained in our laboratory. In the EH topic, chiral probes were used, which allowed the initial velocity measurements and enantiomeric excess calculations. Additionally, the adrenaline test was applied to the epoxide hydrolases detection in microorganisms using 23 commercial substrates. This methodology associates the potential of the HTS assays with substrates of interest. Finally, the HTS outstanding results were better investigated by conventional catalysis. Therefore, using this approach we were able to provide evidences of the stereoinversion process of 1,2-octanediol catalyzed by *A. niger* CCT 1435 (yield > 80% with 90% *ee*), and the kinetic resolution of 1,2-octanediol by *B. pumilus* CBMAI 0008, CBC 008, CBC 009 and *A. niger* CCT 4846. The differentiation between the monooxygenases (Baeyer-Villiger monooxygenase and hydroxylase) detected in *T. cutaneum* CCT 1903, *R. oryzae* CCT 4964, AMA 7 and the fungus CCT 5632 was also provided by conventional biocatalysis.

## Abreviaturas, Siglas e Símbolos.

HTS	“High-Throughput Screening” ou Triagem de alto desempenho
EH	epóxido-hidrolase
MO	monooxigenase
BV	Baeyer-Villiger
BVMO	Baeyer-Villiger monooxigenase
CCT	Coleção de Culturas Tropicais
CBMAI	Coleção Brasileira de Microrganismos do Ambiente e da Indústria
CBC	Coleção do Laboratório de biocatálise
CLAE	cromatografia líquida de alta eficiência
CCD	cromatografia em camada delgada
CG	cromatografia gasosa
EM	espectrometria de massas
CG-EM	cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas
CG-FID	cromatografia gasosa acoplada ao detector de ionização de chama
eV	elétrons-volt
IE	impacto eletrônico
$m/z$	razão entre a massa e sua respectiva carga elétrica
$M^{\bullet+}$	íon molecular
RMN	ressonância magnética nuclear
RMN de $^1\text{H}$	ressonância magnética nuclear de hidrogênio
RMN de $^{13}\text{C}$	ressonância magnética nuclear de carbono treze
DEPT	"Distortionless Enhancement by Polarization Transfer"
Hz	hertz
MHz	megahertz
$J$	constante de acoplamento
$\delta$	deslocamento químico em partes por milhão
TMS	tetrametilsilano
$\text{CDCl}_3$	clorofórmio deuterado
$\text{CDOD}_3$	metanol deuterado
ELISA	“Enzyme-linked immunosorbent assay”
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
FRET	transferência de energia de ressonância de fluorescência
BODIPY	“Boron dipyrromethene difluoride”

PLA <sub>2</sub>	fosfolipase A <sub>2</sub>
k <sub>cat</sub>	Constante de velocidade catalítica
K <sub>M</sub>	Constante de Michaelis
<i>ee</i>	excesso enantiomérico
<i>E</i>	razão enantiomérica
DNA	ácido desoxirribonucléico
Asp	ácido aspártico
His	histidina
Glu	ácido glutâmico
Tyr	tirosina
ATP	adenosina trifosfato
NADH	forma reduzida do dinucleotídeo de nicotinamida e adenina
NADPH	forma reduzida do dinucleotídeo de nicotinamida e adenina fosfatada
FMN	mononucleotídeo de flavina
FAD	dinucleotídeo de flavina e adenina
HLADH	álcool desidrogenase de fígado de cavalo
BSA	albumina de soro bovino
TEMPO	<i>N</i> -oxil-2,2,6,6-tetrametilpiperidina
NMO	<i>N</i> -óxido de <i>N</i> -metilmorfolina
MCPBA	ácido <i>m</i> -cloroperbenzóico
DMF	<i>N,N</i> -dimetilformamida
TBSCl	cloreto de <i>t</i> -butil dimetilsilano
PCC	cloro cromato de piridínio
PBS	tampão fosfato salino
u.f.r.	unidade relativa de fluorescência
UV/VIS	ultravioleta/visível
IV	infravermelho
DO	densidade óptica

## INDICE GERAL

1 INTRODUÇÃO .....	3
1.1 CONSIDERAÇÕES GERAIS .....	3
1.2 ENSAIOS ENZIMÁTICOS .....	5
1.3 TRIAGEM DE ALTO DESEMPENHO APLICADA AOS ENSAIOS ENZIMÁTICOS .....	9
1.3.1 Ensaio com substratos marcados .....	11
1.3.1.1 Substratos fluorogênicos e cromogênicos associados a $\beta$ -eliminação .....	11
1.3.1.2 Substratos fluorogênicos associados à Transferência de Energia de Ressonância de Fluorescência .....	15
1.3.1.3 Substratos com marcação isotópica .....	16
1.3.1.4 Outros substratos marcados .....	21
1.3.2 Ensaio com substratos não modificados .....	22
1.3.2.1 Ensaio fundamentado na detecção do ponto final da reação (Endpoint assays) .....	23
1.3.2.2 Ensaio com detecção em tempo real .....	27
2. OBJETIVOS .....	33
3. TRIAGEM DE EPÓXIDO-HIDROLASES .....	37
3.1. CONSIDERAÇÕES GERAIS .....	37
3.1.1 Ocorrências e tipos de epóxido-hidrolases .....	38
3.1.2 Estrutura e mecanismo de reação de epóxido-hidrolases .....	41
3.2 TRIAGEM ENZIMÁTICA DE ALTO DESEMPENHO COM SONDAS FLUOROGÊNICAS PARA DETECÇÃO DE EPÓXIDO-HIDROLASES .....	43
3.3 RESULTADOS E DISCUSSÕES .....	46
3.3.1 Preparação das sondas fluorogênicas <b>3.5</b> e <b>3.6</b> .....	46
3.3.2 Sondas fluorogênicas enantiomericamente enriquecidas para detecção de epóxido-hidrolases .....	49
3.3.2.1 Consideração geral .....	49
3.3.2.2 Sondas para detecção de EH enantiomericamente enriquecidas .....	50
3.3.3 Adaptação de HTS com células íntegras na detecção de epóxido-hidrolases .....	52
3.3.3.1 Efeito das concentrações microbinas na oxidação do diol .....	52
3.3.3.2 Efeito das concentrações microbianas na biotransformação das sondas .....	55
3.3.3.3 Efeito da concentração de periodato na oxidação do diol .....	56
3.3.4 Ensaio de HTS para detecção de EH por meio das sondas fluorogênicas <b>3.5</b> e <b>3.6</b> .....	57
3.3.4.1 Microrganismos .....	57

3.3.4.2 Resultados e discussões.....	60
3.3.4.3 Conclusão parcial.....	65
3.3.5 Ensaio de HTS para detecção de epóxido-hidrolases utilizando sondas enantiomericamente enriquecidas.....	66
3.3.5.1 Resultados e discussões.....	66
3.3.5.2 Conclusão parcial.....	72
3.4 HTS UTILIZANDO SUBSTRATOS NÃO MODIFICADOS PARA DETECÇÃO DE EPÓXIDO-HIDROLASES.....	73
3.4.1 Considerações gerais.....	73
3.4.2 Resultados e discussões.....	76
3.4.3 Conclusão parcial.....	79
3.5 VALIDAÇÃO DOS ENSAIOS DE HTS PARA EPÓXIDO-HIDROLASES VIA BIOCATALÍSE CONVENCIONAL.....	80
3.5.1 Resultados e discussões.....	80
3.5.1.1 Reações biocatalíticas com <i>Bacillus pumilus</i> CBMAI 0008 e <i>Aspergillus niger</i> CCT 1435.....	80
3.5.1.2 Reações biocatalíticas com (±)-1,2-epoxioctano.....	85
3.5.1.3 Reações biocatalíticas com (±)-1,2-octanodiol.....	91
3.5.1.4 Reações biocatalíticas com 1-hidróxi-2-octanona.....	95
3.5.2 Conclusão parcial.....	98
4. TRIAGEM DE MONOOXIGENASES (MO).....	101
4.1. CONSIDERAÇÃO GERAL.....	101
4.1.1 Baeyer-Villiger monooxigenases.....	102
4.1.1.1 Ocorrências e tipos Baeyer-Villiger monooxigenases.....	104
4.1.1.2 Estrutura e mecanismo de reação Baeyer-Villiger monooxigenases.....	106
4.2 TRIAGEM ENZIMÁTICA DE ALTO DESEMPENHO PARA DETECÇÃO DE MONOOXIGENASES (MO).....	109
4.3 RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	112
4.3.1 Preparação da sonda fluorogênica <b>4.4</b> para detecção de monooxigenases.....	112
4.3.2 Sondas fluorogênicas <b>4.15 – 4.18</b> para detecção de monooxigenases ..	114
4.3.3 Adaptação de HTS com células íntegras para detecção de monooxigenases.....	116
4.3.4 Ensaio de HTS para detecção de monooxigenases por meio das sondas fluorogênicas <b>4.15 – 4.18</b> .....	119
4.3.5 Conclusão parcial.....	123
4.4 VALIDAÇÃO DOS ENSAIOS DE HTS PARA MONOOXIGENASES VIA BIOCATALÍSE CONVENCIONAL.....	125
4.4.1 Resultados e discussões.....	125

4.4.1.1	Reações biocatalíticas com <i>Trichosporon cutaneum</i> CCT 1903 ....	125
4.4.1.2	Reações biocatalíticas com <i>Rhizopus oryzae</i> CCT 4964, AMA 7 e o fungo CCT 5632.....	129
4.4.1.3	Conclusão parcial.....	130
5	CONCLUSÃO GERAL .....	133
6	PARTE EXPERIMENTAL.....	137
6.1	REAGENTES E SOLVENTES .....	137
6.2	MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS.....	137
6.3	MÉTODO ESPECTROMÉTRICO DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR.....	139
6.4	MÉTODOS ESPECTROFOTOMÉTRICOS UV/VIS E DE FLUORESCÊNCIA.....	140
6.5	OUTRAS MEDIÇÕES .....	141
6.6	MICROORGANISMOS.....	141
6.6.1	Manutenção e reativação das linhagens em estudo.....	142
6.6.1.1	Para ensaios de triagem de alto desempenho.....	142
6.6.1.2	Para ensaios biocatalíticos convencionais .....	143
6.6.1.3	Meios de cultivo destinados à manutenção e reativação das linhagens em estudo .....	143
6.6.1.3.1	Meio NB.....	143
6.6.1.3.2	Meio YM .....	144
6.6.1.3.3	Meio ME.....	144
6.6.1.3.4	Meio hipertônico .....	144
6.6.1.3.5	Meio de Xilana de bétula.....	144
6.6.1.4	Preparação de Solução Tampão de Sørensen ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 - \text{KH}_2\text{PO}_4$ ) .....	145
6.6.2	Procedimentos gerais adotados no laboratório de biocatálise .....	146
6.7	TRIAGEM DE EPOXIDO-HIDROLASES.....	146
6.7.1	Preparação de sondas fluorogênicas para detecção de EH.....	146
6.7.1.1	Procedimento geral para as reações de tosilacção .....	146
6.7.1.1.1	4-toluenossulfonato de 3-butenila (3.1) .....	147
6.7.1.1.2	4-toluenossulfonato de 3-hexenila (3.2) .....	147
6.7.1.2	Procedimento geral para as reações de alquilação.....	148
6.7.1.2.1	7-(3-butenoxi)-2H-1-benzopiran-2-ona (3.3) .....	149
6.7.1.2.2	7-(3-hexeniloxi)-2H-1-benzopiran-2-ona (3.4).....	150
6.7.1.3	Procedimento geral para as reações de epoxidação .....	151
6.7.1.3.1	7-(3,4-epóxi-butóxi)-2H-1-benzopiran-2-ona (3.5) .....	151
6.7.1.3.2	7-(3,4-epóxi-hexilóxi)-2H-1-benzopiran-2-ona (3.6) .....	152
6.7.1.4	Procedimento geral para as reações de di-hidroxilação.....	153
6.7.1.4.1	7-(3,4-di-hidróxi-butóxi)-2H-1-benzopiran-2-ona (3.7) .....	153

6.7.1.4.2	7-(3,4-di-hidróxi-hexilóxi)-2H-1-benzopiran-2-ona (3.8) .....	154
6.7.2	Adaptação de HTS com células íntegras para detecção de EH .....	155
6.7.2.1	Influência da concentração celular na oxidação do diol .....	155
6.7.2.2	Influência da concentração celular na catálise das sondas.....	156
6.7.2.3	Influência da concentração de NaIO <sub>4</sub> no sistema do ensaio .....	156
6.7.3	HTS para detecção de EH com as sondas fluorogênicas .....	156
6.7.3.1	Microrganismos.....	156
6.7.3.2	Preparação de soluções.....	157
6.7.3.2.1	Soluções estoque das sondas fluorogênicas .....	157
6.7.3.2.2	Solução tampão borato 20 mM pH 8,8 .....	157
6.7.3.2.3	Solução de periodato de sódio .....	157
6.7.3.2.4	Solução de BSA.....	157
6.7.3.3	Experimento de calibração de curva padrão de umbeliferona .....	158
6.7.3.4	Montagem das reações de HTS para EH com sondas fluorogênicas .....	158
6.7.4	HTS para detecção de EH com substratos não modificados (Teste de adrenalina).....	159
6.7.4.1	Microrganismos.....	159
6.7.4.2	Preparação geral das soluções .....	159
6.7.4.2.1	Soluções estoque dos substratos .....	159
6.7.4.2.2	Solução de periodato de sódio .....	160
6.7.4.2.3	Soluções tampão.....	160
6.7.4.2.4	Preparação de solução de cloreto de adrenalina.....	160
6.7.4.3	Montagem do teste de adrenalina .....	161
6.7.5	Validação dos ensaios de HTS para detecção de EH via biocatálise convencional.....	161
6.7.5.1	Microrganismos.....	161
6.7.5.2	Substratos .....	162
6.7.5.2.1	Síntese de ( $\pm$ )-1,2-octanodiol (3.24) .....	162
6.7.5.2.2	Síntese de ( $\pm$ )-4-hexil-2,2-dimetil-[1,3]dioxolano 3.25 (técnica I).....	163
6.7.5.2.3	Síntese de ( $\pm$ )-4-hexil-2,2-dimetil-[1,3]dioxolano 3.25 (técnica II).....	164
6.7.5.2.4	Síntese de 1-hidróxi-2-octanona (3.28) .....	165
6.7.5.3	Montagem das reações biocatalíticas para epóxido-hidrolases.....	167
6.7.5.3.1	( $\pm$ )-1,2-epoxioctano (3.23) como substrato.....	167
6.7.5.3.2	( $\pm$ )-1,2 octanodiol (3.24) como substrato .....	169
6.7.5.3.3	1-hidróxi-2-octanona (3.28) como substrato.....	169
6.8	TRIAGEM DE MONOOXIGENASES .....	170

6.8.1 Preparação das sondas fluorogênicas para detecção de monooxigenases .....	170
6.8.1.1 Preparação da substância padrão 4.14 .....	170
6.8.1.1.1 3-hidróxi-propil-p-toluenossulfonil éter (4.12).....	170
6.8.1.1.2 3-acetóxi-propil-p-toluenossulfonil éter (4.13).....	171
6.8.1.1.3 3-acetóxi-propil-7-umbeliferil éter (4.14).....	172
6.8.2 Adaptação de HTS com células íntegras para detecção de monooxigenases .....	173
6.8.2.1 Estabilidade das sondas em diferentes soluções tampão .....	173
6.8.2.2. Emissão de fluorescência dos produtos em diferentes soluções tampão.....	174
6.8.3 Triagem de alto desempenho com sondas fluorogênicas para detecção de monooxigenases .....	174
6.8.3.1 Microrganismos.....	174
6.8.3.2 Preparação de soluções.....	174
6.8.3.2.1 Solução de BSA.....	175
6.8.3.3 Montagem das reações de HTS para monooxigenases com sondas fluorogênicas.....	175
6.8.4 Validação dos ensaios de HTS para detecção de monooxigenases via biocatálise convencional.....	176
6.8.4.1 Microrganismos.....	176
6.8.4.2 Substratos utilizados.....	176
6.8.4.3 Montagem das reações biocatalíticas para monooxigenases .....	177
6.8.4.3.1 Trichosporon cutaneum CCT 1903.....	177
6.8.4.3.1.1 Caracterização de 6-endo-hidroxicanfora.....	178
6.8.4.3.2 Ensaios de multi-biorreação com Rhizopus oryzae CCT 4964, AMA 7 e o fungo CCT 5632 .....	179
7 ANEXO.....	183

## INDICE DE ESQUEMAS

<b>Esquema 1</b> – Diferentes formas de detecção ou de monitoramento da conversão de um substrato num produto. <sup>7</sup> .....	5
<b>Esquema 2</b> – Determinação estrutural e análise funcional de enzima. <sup>7</sup> .....	6
<b>Esquema 3</b> - Seleção de enzimas e microrganismos naturais ou melhorados a partir da biodiversidade e bibliotecas genômicas. <sup>7</sup> .....	8
<b>Esquema 4</b> – Ésteres e amidas de nitrofenil e umbeliferil utilizados na detecção de atividade enzimática hidrolíticas. ....	12

<b>Esquema 5</b> - Ensaio para detecção de álcool desidrogenase (ADH) acoplado à reação de β-eliminação mediada por albumina de soro bovino (BSA). <sup>19</sup> .....	13
<b>Esquema 6</b> - Representação esquemática do ensaio fluorogênico acoplado com periodato de sódio e BSA para detecção de enzimas hidrolíticas. As ligações de cor vermelha são as que sofrem a ruptura enzimática ou química. <sup>21</sup> .....	14
<b>Esquema 7</b> - Sonda desenhada para detecção de atividade de fosfolipase A <sub>2</sub> (PLA <sub>2</sub> ). A ligação vermelha mostra a ligação a ser clivada pela enzima.....	16
<b>Esquema 8</b> – Substratos pseudo-enantiômeros marcados com <sup>13</sup> C no grupo acetila para determinação de <i>ee</i> nas reações de hidrólise, por meio de <b>(a)</b> RMN de <sup>1</sup> H <sup>41</sup> ou <b>(b)</b> espectroscopia no IV. <sup>42</sup> .....	19
<b>Esquema 9</b> – Triagem de alto desempenho de nitrilases enantiosseletivas pela utilização de uma sonda <b>1.22</b> marcada com <sup>15</sup> N que permite a formação de mono-ácido <b>1.23</b> e detecção por espectrometria de massas. <sup>43</sup> .....	21
<b>Esquema 10</b> – Ensaio fluorogênico para detecção de álcool desidrogenases. <sup>47</sup> .....	22
<b>Esquema 11</b> – Ensaio fluorogênico para detecção de formação de ligação C-C. <sup>50</sup> .....	22
<b>Esquema 12</b> - Detecção da atividade de amidases com 7-cloro-4-nitrobenzofurazana <b>1.30</b> como revelador fluorogênico do produto enzimático. <sup>57</sup> .....	24
<b>Esquema 13</b> – Esquema de um ensaio enzimático baseado na utilização de vesículas contendo poros multifuncionais sintéticos. A biotransformação do substrato a produto é monitorada pela quantidade de carboxifluoresceína que atravessa os poros. <sup>58</sup> .....	25
<b>Esquema 14</b> - <b>(a)</b> Princípio da detecção por retro-titulação de periodato no teste de adrenalina; <b>(b)</b> Visualização dos resultados pela intensidade da cor. Quanto menos intensa a coloração, maior será o consumo de periodato pelo produto da reação enzimática. <sup>61</sup> .....	27
<b>Esquema 15</b> – Detecção de lipases e esterases. Utilização de um éster vinílico qualquer e a 7-hidrazino-4-nitrobenzofurazana permite o monitoramento da reação catalisada por hidrolases pela fluorescência. <sup>63</sup> .....	28
<b>Esquema 16</b> - Princípio de HTS para ensaios enzimáticos. O sinal produzido pela amostra-teste deve ser comparado ao controle branco (somente reagentes e soluções) e a uma enzima ativa como controle positivo. A confirmação final deve ser realizada por outros meios para o propósito desejado. ....	30
<b>Esquema 17</b> - Reação de abertura do epóxido em meio ácido aquoso. ....	37
<b>Esquema 18</b> - Mecanismo de hidrólise do óxido de 4-nitroestireno pela EH de <i>Aspergillus niger</i> . Os resíduos estão desenhados de maneira que sejam o mais semelhante possível a suas posições e orientações reais. O primeiro passo catalítico é o determinante da velocidade da reação. <sup>82</sup> .....	43
<b>Esquema 19</b> - Rota sintética para a obtenção das duas sondas <b>3.5</b> e <b>3.6</b> para HTS de epóxido hidrolases. ....	47

<b>Esquema 20</b> - Sínteses de dióis <b>3.7</b> e <b>3.8</b> a partir dos compostos <b>3.3</b> e <b>3.4</b> .....	49
<b>Esquema 21</b> – Ensaio baseado na leitura de fluorescência para avaliar da enantiosseletividade de lipase/esterase. <sup>88</sup> .....	49
<b>Esquema 22</b> - Princípio de detecção de EH proposto por Furstoss e colaboradores. <sup>49</sup> .....	74
<b>Esquema 23</b> – Princípio de detecção de EH proposto por Schmid, <sup>100</sup> baseado na retro-titulação de periodato de sódio por carboxifluoresceína. ....	75
<b>Esquema 24</b> – Preparação de ( $\pm$ )-1,2-octanodiol <b>3.24</b> . ....	81
<b>Esquema 25</b> - Derivatização do diol <b>3.24</b> .....	83
<b>Esquema 26</b> – Dependência da configuração absoluta do diol na regiosseletividade da biocatálise. <sup>91</sup> .....	89
<b>Esquema 27</b> - Se os dois enantiômeros sofrerem hidrólise com regiosseletividades diferentes ( $k_2 > k_1$ e $k_4 > k_3$ ) formarão um mesmo diol. <sup>91</sup> .....	90
<b>Esquema 28</b> - Processo global de estereoinversão enantioespecífica de um álcool secundário. ....	91
<b>Esquema 29</b> – Rota sintética para a obtenção de 1-hidróxi-2-octanona. ....	95
<b>Esquema 30</b> – Ação seqüencial de epóxido-hidrolase e oxidorredutases na biotransformação de ( $\pm$ )-1,2-epoxioctano e ( $\pm$ )-1,2-octanediol respectivamente, resultando a resolução total do diol em <i>A. niger</i> CCT 1435 e uma resolução cinética em <i>B. pumilus</i> CBMAI 0008. A sugestão para as constantes cinéticas é $k_1 > k_2$ ; $k_3 \gg k_4$ ; $k_4 \gg k_3$ para <i>A. niger</i> ; e $k_1 > k_2$ ; $k_3 > k_4$ para <i>B. pumilus</i> (os valores de $k_3$ e $k_4$ devem ser extremamente pequenos ou não ocorrerem). <sup>97</sup>	97
<b>Esquema 31</b> - Reações de oxidação catalisadas por monooxigenases. <sup>113</sup> .....	102
<b>Esquema 32</b> - Oxidação de Baeyer-Villiger .....	103
<b>Esquema 33</b> - Representação esquemática das mudanças conformacionais que ocorrem nas etapas catalíticas das reações de Baeyer-Villiger monooxigenases. O NADP <sup>+</sup> permanece ligado à enzima conforme sugerido pela análise cinética da cicloexanona monooxigenases. <sup>135</sup> .....	108
<b>Esquema 34</b> - Representação esquemática da reação de oxidação catalisada por Baeyer-Villiger monooxigenases com referência a fenilacetona monooxigenase. <sup>136</sup> .....	109
<b>Esquema 35</b> - Princípio de detecção de Baeyer-Villiger monooxigenases. (a) Enzima (com adição de cofator NADPH) ou células íntegras; (b) esterase... ..	110
<b>Esquema 36</b> - Princípio do ensaio fluorogênico para Baeyer-Villiger monooxigenases. <sup>28</sup> .....	111
<b>Esquema 37</b> - Representação esquemática da síntese de sonda <b>4.4</b> . <sup>142</sup> .....	112
<b>Esquema 38</b> - Rota sintética para a obtenção do padrão controle positivo <b>4.14</b> . ..	113
<b>Esquema 39</b> - Comparação dos ensaios fluorogênicos empregando a sonda <b>4.4</b> (em preto) e a nova sonda <b>4.15</b> (em azul). (a) BVMO; (b) hidrólise espontânea ou	

enzimática; (c) oxidação enzimática (HLADH-NAD <sup>+</sup> ) ou química (TEMPO-NaOCl); (d) β-eliminação.....	116
<b>Esquema 40</b> – Produto de oxidação de cânfora por <i>T. cutaneum</i> CCT 1903.....	128
<b>Esquema 41</b> – Esquema representativo da detecção de hidroxilases com as sondas 4.15- 4.18.....	129

## INDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.-</b> Região expandida de espectro de RMN de <sup>1</sup> H <b>(a)</b> uma mistura “racêmica” de ( <i>S</i> )- <sup>13</sup> C- <b>1.16</b> / <i>(R)</i> - <b>1.16</b> , caracterizando o dubleto da metila marcada com <sup>13</sup> C e o singleto da metila não marcada; e <b>(b)</b> O espectro mostra o singleto da metila não marcada de ( <i>R</i> )- <b>1.16</b> acompanhado dos satélites devido à presença natural de <sup>13</sup> C na amostra. <sup>41</sup> A razão exata dos dois pseudo-enantiômeros é obtida pela integração dos respectivos picos assim como o valor de <i>ee</i> . .....	19
<b>Figura 2</b> – Parte do espectro de IV-TF de uma mistura (1:1) de ( <i>S</i> )- <sup>13</sup> C- <b>1.19</b> e ( <i>R</i> )- <b>1.19</b> , ilustrando o deslocamento de 40-50 cm <sup>-1</sup> da máxima absorção de estiramento vibracional da carbonila marcada com <sup>13</sup> C, evitando assim a sobreposição das duas bandas de carbonila. <sup>42</sup> .....	20
<b>Figura 3</b> – Impressão digital (“fingerprint”) da atividade enzimática. Cada cor indica uma atividade enzimática determinada cuja intensidade e cor está relacionada à atividade enzimática. <sup>35</sup> .....	29
<b>Figura 4</b> - Diferentes tipos de EH de mamíferos com seus substratos. <sup>75</sup> .....	39
<b>Figura 5</b> - Tríade catalítica de epóxido-hidrolases de <i>Aspergillus niger</i> (Asp-192, His-374 e Asp-348) e as interações de ligações de hidrogênio mais importantes com os outros aminoácidos e moléculas de água. <sup>82</sup> .....	41
<b>Figura 6-</b> Reações específicas entre as sondas fluorogênicas catalisadas pela enzima correspondente e os respectivos controles positivos (aminoálcool e diol) Condições: 100 mg/mL de enzima, 100 μM de substrato, 1 mM de NaIO <sub>4</sub> , 2 mg/mL de BSA, 20 mM de tampão borato (pH 8,8), 30 min. <sup>10</sup> .....	44
<b>Figura 7</b> – Um exemplo gráfico de uma reação enzimática positiva e o respectivo controle branco. ....	45
<b>Figura 8</b> – Outros substratos utilizados nesta parte do trabalho na determinação de seletividade de epóxido-hidrolases. ....	51
<b>Figura 9</b> – Sondas fluorogênicas empregadas neste trabalho em triagens de alto desempenho para detecção de epóxido-hidrolases.....	52
<b>Figura 10</b> – Influência da concentração celular na oxidação de <b>3.8</b> por periodato Condições do ensaio: 100 μM de <b>3.8</b> , 1 mM de NaIO <sub>4</sub> , 2 mg/mL de BSA e diferentes suspensões celulares de <i>Aspergillus niger</i> CCT 1435 em 20 mM de tampão borato (pH 8,8).....	54

<b>Figura 11</b> - Ensaios realizados com a sonda <b>3.6</b> . na presença de células de <i>A. niger</i> CCT 1435. Condições do ensaio: 100 µM de <b>3.6</b> , 1 mM de NaIO <sub>4</sub> , 2 mg/mL de BSA e diferentes suspensões celulares de <i>Aspergillus niger</i> CCT 1435 em 20 mM de tampão borato (pH 8,8). .....	55
<b>Figura 12</b> – Ensaios de oxidação do diol <b>3.8</b> . na presença de diferentes concentrações de NaIO <sub>4</sub> . Condições do ensaio: 100 µM de <b>3.8</b> , 1 a 2 mM de NaIO <sub>4</sub> , 2 mg/mL de BSA, 0,5 mg/mL de <i>Aspergillus niger</i> em 20 mM de tampão borato (pH 8,8) e diferentes concentrações de NaIO <sub>4</sub> .....	56
<b>Figura 13</b> - Detecção de EHs em <i>Candida albicans</i> CCT 0776 e <i>Rhodococcus equi</i> CCT 0541 utilizando a sonda <b>3.5</b> . Condições: 100 µM de <b>3.5</b> , 0,1 ou 0,5 mg/mL de suspensões celulares, 2 mg/mL de BSA, 1 mM de NaIO <sub>4</sub> , 20 mM de tampão borato (pH 8,8), λ <sub>ex</sub> = 365 nm, λ <sub>em</sub> = 460 nm.....	63
<b>Figura 14</b> – Estrutura da toxina produzida por <i>Alternaria alternata</i> f sp. <i>lycopersici</i> .....	64
<b>Figura 15</b> - Detecção de EH em <i>A. alternata</i> CCT 1250 contra a sonda <b>3.5</b> . Condições: 100 µM de <b>3.5</b> , 0,1 ou 0,5 mg/mL de suspensões celulares, 2 mg/mL de BSA, 1 mM de NaIO <sub>4</sub> , 20 mM de tampão borato (pH 8,8), λ <sub>ex</sub> = 365 nm, λ <sub>em</sub> = 460 nm. ....	65
<b>Figura 16</b> – Curva de calibração de umbeliferona na presença de 2 mg/mL de BSA em 20 mM de tampão borato e solução aquosa de 1 mM de NaIO <sub>4</sub> . ....	67
<b>Figura 17</b> – Detecção de EH enantiosseletiva de <i>B. subtilis</i> utilizando o par de sondas ( <i>S</i> )- <b>3.15</b> e ( <i>R</i> )- <b>3.15</b> . ....	71
<b>Figura 18</b> - Detecção de EH enantiosseletiva de <i>B. pumilus</i> utilizando o par de sondas ( <i>S,S</i> )- <b>3.16</b> e ( <i>R,R</i> )- <b>3.16</b> . ....	71
<b>Figura 19</b> - Epóxidos ( <b>1 – 23</b> ) utilizados no teste de adrenalina para detecção de epóxido-hidrolases.....	76
<b>Figura 20</b> - Perfis hidrolíticos dos 9 microrganismos frente a 23 epóxidos comerciais. Os microrganismos estão ordenados pelo decréscimo na atividade catalítica total. Condições: 1) 1 mM de epóxido, 0,1 mg/mL de suspensão microbiana e 1 mM de NaIO <sub>4</sub> , 10 horas a 28°C; 2) solução 1,5 mM de adrenalina. ....	78
<b>Figura 21</b> - Representação da estrutura terciária do monômero da fenilacetona monooxigenase. O domínio de ligação ao FAD (resíduos 10-158 e 390-542) é representado em verde, o domínio de ligação ao NADP (resíduos 159-389) representado em azul e a seqüência FXGXXXHXXXW (167-177) em vermelho. O cofator FAD é mostrado em amarelo. <sup>133</sup> .....	107
<b>Figura 22</b> - Sondas fluorogênicas <b>4.15 – 4.18</b> e os correspondentes ésteres e lactonas <b>4.19 – 4.22</b> utilizados para a detecção de monooxigenases. ....	115

<b>Figura 23</b> - Influência das soluções tampão na estabilidade da sonda <b>4.15</b> . Condições: 100 $\mu$ M da sonda <b>4.15</b> e solução 2 mg/mL de BSA.....	117
<b>Figura 24</b> - Influência das soluções tampão na emissão de fluorescência de <b>4.19</b> Condições: 100 $\mu$ M do éster <b>4.19</b> e solução 2 mg/mL de BSA. ....	118
<b>Figura 25</b> - Triagem de atividade de monooxigenases em <i>Cunninghamella echinulata</i> CCT 4259, <i>Curvularia lunata</i> CCT 5629 e CCT 5628, <i>Aspergillus niger</i> 4846 e <i>Geotrichum candidum</i> CCT 1205 frente a sonda <b>4.17</b> . Condições: 100 $\mu$ M de substrato, 0,5 mg/mL de suspensão celular, 2 mg/mL de BSA em 20 mM de tampão borato (pH 8,8), $\lambda_{\text{ex}} = 365$ nm, $\lambda_{\text{em}} = 460$ nm. ....	121
<b>Figura 26</b> – Reações representativas da triagem de atividade de monooxigenases frente às 4 sondas <b>4.15</b> – <b>4.18</b> . Condições: 100 $\mu$ M de substrato, 0,5 mg/mL de suspensão celular de <i>T. cutaneum</i> CCT 1903, 2 mg/mL de BSA, 20 mM de tampão borato (pH 8,8). $\lambda_{\text{ex}} = 365$ nm, $\lambda_{\text{em}} = 460$ nm.....	123

## INDICE DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> - Exemplos selecionados de aplicação industrial utilizando biocatalisadores (enzimas/células).....	4
<b>Tabela 2</b> – Epóxidos quirais utilizados na detecção da enantiosseletividade de epóxido-hidrolases em microrganismos. ....	51
<b>Tabela 3</b> - Condições ótimas para detecção de epóxido-hidrolases usando células íntegras em triagens com sondas fluorescentes.....	57
<b>Tabela 4</b> - Microrganismos investigados nas de triagens de alto desempenho. ....	58
<b>Tabela 5</b> – Linhagens isoladas de água de formação de petróleo <sup>a</sup> e testadas com a sonda <b>3.5</b> para epóxido-hidrolases.....	59
<b>Tabela 6</b> - Microrganismos isolados do solo de várzea de Silves (AM) <sup>a</sup> utilizando na avaliação de epóxido-hidrolases frente as sondas <b>3.5</b> e <b>3.6</b> .....	59
<b>Tabela 7</b> - Resumo dos testes positivos com as sondas <b>3.5</b> e <b>3.6</b> para detecção de epóxido-hidrolases. <sup>a,b</sup> .....	61
<b>Tabela 8</b> – Resumo dos resultados obtidos com as sondas fluorogênicas <b>3.13-3.19</b> e <b>3.6</b> .....	70
<b>Tabela 9</b> - Reações de hidrólise do ( $\pm$ )-1,2-epoxioctano catalisada por <i>A. niger</i> CCT 1435 e <i>B. pumilus</i> CBMAI 0008 em tampão fosfato (pH 7,0). ....	86
<b>Tabela 10</b> – Reações de desracemização de ( $\pm$ )-1,2-octanodiol .....	92
<b>Tabela 11</b> - Biocatálise de ( $\pm$ )-1,2-octanodiol com <i>B. pumilus</i> CBC 008 e 009 e <i>A. niger</i> CCT 4846. <sup>a</sup> .....	94
<b>Tabela 12</b> – Biotransformação de 1-hidróxi-2-octanona <b>3.28</b> por <i>A. niger</i> CCT 1435 e <i>B. pumilus</i> CBMAI 0008 <sup>a</sup> em solução tampão fosfato (pH 7,0). ....	96

<b>Tabela 13</b> – Intensidade de fluorescência observada nos testes de 26 microrganismos com as sondas <b>4.15 – 4.18</b> para detecção de monooxigenases <sup>a</sup> .....	120
<b>Tabela 14</b> - Reações biocatalíticas realizadas com <i>Trichosporon cutaneum</i> CCT 1903 com cetonas estruturalmente diferentes .....	126

## INDICE DE FLUXOGRAMAS

<b>Fluxograma 1</b> - Ensaio enzimáticos freqüentemente utilizados nas triagens de alto desempenho. ....	10
<b>Fluxograma 2</b> - Procedimento geral dos experimentos de triagem de alto desempenho. ....	46

## INDICE DE CROMATOGRAMAS

<b>Cromatograma 1</b> – Cromatograma (CG-FID) da resolução de <b>(a)</b> uma amostra racêmica de 1,2-epoxioctano; <b>(b)</b> co-injeção de ( <i>R</i> )-1,2-epoxioctano (Aldrich) + amostra racêmica. As condições de análises: 40 °C/15 min, rampa de 1 °C/min até 55 °C, depois 25 °C/min até 180 °C, T <sub>inj</sub> = 220 °C, T <sub>det</sub> = 240 °C, pressão constante de 10 psi. Coluna: Chrompak, CD-Chirasil (25 m x 0,25 mm x 0,25 µm). ....	82
<b>Cromatograma 2</b> – Cromatograma (CG-FID) da resolução dos enantiômeros de (±)-4-hexil-2,2-dimetil-[1,3]dioxolano ( <b>3.25</b> ). As condições de análises foram: 100 °C/10 min, rampa de 30 °C/min até 180 °C, T <sub>inj</sub> = 220 °C, T <sub>det</sub> = 240 °C, pressão constante de 10 psi. Coluna: Chrompak, CD-Chirasil (25 m x 0,25 mm x 0,25 µm). ....	83
<b>Cromatograma 3</b> - Cromatograma de íon totais (CG-EM) da reação de derivatização de 1,2-octanodiol na presença de 1,2-epóxiocetano. As condições de análises foram: 70 °C/2 min, rampa de 10 °C/min até 180 °C, depois, rampa de 20 °C/min até 290 °C, T <sub>inj</sub> = 220 °C. Coluna capilar de sílica fundida HP-5 MS (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm). ....	85
<b>Cromatograma 4</b> - Cromatogramas (CG-FID) obtidos para reação enzimática de 1,2-epoxioctano com células em repouso de <b>(a)</b> <i>A. niger</i> CCT 1435 com 2, 7, 24 hs, e <b>(b)</b> <i>B. pumilus</i> CBMAI 0008 com 2, 7, 24 hs. <b>(c)</b> Cromatogramas (GC-FID) obtidos para reação enzimática com o liofilizado do sobrenadante de <i>B. pumilus</i> CBMAI 0008 com 2, 24, 48 hs. Condições de análise (ver <b>Cromatograma 2</b> ). ....	88
<b>Cromatograma 5</b> - Cromatogramas (CG-FID) obtidos para reação enzimática de 1,2-octanodiol com células em repouso de <b>(a)</b> <i>B. pumilus</i> CBMAI 0008 com 0,	

24, 48 hs, e (b) <i>A. niger</i> CCT 1435 com 0, 24, 48 h. As condições de análises foram: 100 °C/10 min, rampa de 30 °C/min até 180 °C, $T_{inj} = 220$ °C, $T_{det} = 240$ °C, pressão constante de 10 psi. Coluna: Chrompak, CD-Chirasil (25 m x 0,25 mm x 0,25 $\mu$ m). .....	93
<b>Cromatograma 6</b> - Cromatogramas (CG-FID) obtidos para reação enzimática de 1-hidróxi-2-octanona com células em repouso de <i>A. niger</i> CCT 1435 com 8, 21, 30 hs. As condições de análises foram: 100 °C/10 min, rampa de 30 °C/min até 180 °C, $T_{inj} = 220$ °C, $T_{det} = 240$ °C, pressão constante de 10 psi. Coluna: Chrompak, CD-Chirasil (25 m x 0,25 mm x 0,25 $\mu$ m). .....	96
<b>Cromatograma 7</b> - Cromatograma de íon totais (CG-EM) da reação de hidroxilação da cânfora com células em repouso de <i>T. cutaneum</i> CCT 1903. Condições de análise: $T_{inicial} = 60$ °C, rampa de 20 °C/min até 290 °C. $T_{inj} = 240$ °C. Coluna capilar de sílica fundida HP-5 MS (30 m x 0,25 mm x 0,25 $\mu$ m). .....	128
<b>Cromatograma 8</b> - Cromatograma representativo de íon totais (CG-EM) da reação de oxilação da <i>cis</i> -jasmona. Condições de análise: $T_{inicial} = 60$ °C, rampa de 20 °C/min até 290 °C. $T_{inj} = 220$ °C. Coluna capilar de sílica fundida HP-5 MS (30 m x 0,25 mm x 0,25 $\mu$ m). .....	130

## INDICE DE ESPECTROS

<b>E 1</b> – Espectro de RMN de $^1\text{H}$ (300,07 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) de 4-toluenossulfonato de 3-butenila <b>3.1</b> . .....	183
<b>E 2</b> – Espectro de massas (IE, 70 eV) de 4-toluenossulfonato de 3-butenila <b>3.1</b> . .....	183
<b>E 3</b> – Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ (75,45 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) de 4-toluenossulfonato de 3-butenila <b>3.1</b> . .....	184
<b>E 4</b> – Espectro DEPT 90 e 135° (75,45 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) de 4-toluenossulfonato de 3-butenila <b>3.1</b> . .....	184
<b>E 5</b> – Espectro de RMN de $^1\text{H}$ (300,07 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) de 4-toluenossulfonato de 3-hexenila <b>3.2</b> . .....	185
<b>E 6</b> – Espectro de massas (IE, 70 eV) de 4-toluenossulfonato de 3-hexenila <b>3.2</b> . .....	185
<b>E 7</b> – Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ (75,45 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) de 4-toluenossulfonato de 3-hexenila <b>3.2</b> . .....	186
<b>E 8</b> – Espectro DEPT 90 e 135° (75,45 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) de 4-toluenossulfonato de 3-hexenila <b>3.2</b> . .....	186
<b>E 9</b> – Espectro de RMN de $^1\text{H}$ (300,07 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) de 7-(3-butenóxi)-2 <i>H</i> -1-benzopiran-2-ona <b>3.3</b> . .....	187
<b>E 10</b> – Espectro de massas (IE, 70 eV) de 7-(3-butenóxi)-2 <i>H</i> -1-benzopiran-2-ona <b>3.3</b> . .....	187

E 11 – Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ (75,45 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) de 7-(3-butenóxi)-2 <i>H</i> -1-benzopiran-2-ona 3.3.....	188
E 12 – Espectro DEPT 90 e $135^\circ$ (75,45 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) de 7-(3-butenóxi)-2 <i>H</i> -1-benzopiran-2-ona 3.3.....	188
E 13 – Espectro de RMN de $^1\text{H}$ (300,07 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) de 7-(3-hexenilóxi)-2 <i>H</i> -1-benzopiran-2-ona 3.4.....	189
E 14 – Espectro de massas (IE, 70 eV) de 7-(3-hexenilóxi)-2 <i>H</i> -1-benzopiran-2-ona 3.4.....	189
E 15 – Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ (75,45 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) de 7-(3-hexenilóxi)-2 <i>H</i> -1-benzopiran-2-ona 3.4.....	190
E 16 – Espectro DEPT 90 e $135^\circ$ (75,45 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) do 7-(3-hexenilóxi)-2 <i>H</i> -1-benzopiran-2-ona 3.4.....	190
E 17 – Espectro de RMN de $^1\text{H}$ (300,07 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) de 7-(3,4-epóxi-butóxi)-2 <i>H</i> -1-benzopiran-2-ona 3.5.....	191
E 18 – Espectro de massas (IE, 70 eV) de 7-(3,4-epóxi-butóxi)-2 <i>H</i> -1-benzopiran-2-ona 3.5.....	191
E 19 – Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ (75,45 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) de 7-(3,4-epóxi-butóxi)-2 <i>H</i> -1-benzopiran-2-ona 3.5.....	192
E 20 – Espectro DEPT 90 e $135^\circ$ (75,45 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) de 7-(3,4-epóxi-butóxi)-2 <i>H</i> -1-benzopiran-2-ona 3.5.....	192
E 21 – Espectro de RMN de $^1\text{H}$ (300,07 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) de 7-(3,4-epóxi-hexilóxi)-2 <i>H</i> -1-benzopiran-2-ona 3.6.....	193
E 22 – Espectro de massas (IE, 70 eV) de 7-(3,4-epóxi-hexilóxi)-2 <i>H</i> -1-benzopiran-2-ona 3.6.....	193
E 23 – Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ (75,45 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) de 7-(3,4-epóxi-hexilóxi)-2 <i>H</i> -1-benzopiran-2-ona 3.6.....	194
E 24 – Espectro DEPT 90 e $135^\circ$ (75,45 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) de 7-(3,4-epóxi-hexilóxi)-2 <i>H</i> -1-benzopiran-2-ona 3.6.....	194
E 25 – Espectro de RMN de $^1\text{H}$ (300,07 MHz, $\text{CD}_3\text{OD}$ ) do 7-(3,4-di-hidróxi-butóxi)-2 <i>H</i> -1-benzopiran-2-ona 3.7.....	195
E 26 – Espectro de massas (IE, 70 eV) de 7-(3,4-di-hidróxi-butóxi)-2 <i>H</i> -1-benzopiran-2-ona 3.7.....	195
E 27 – Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ (75,45 MHz, $\text{CD}_3\text{OD}$ ) de 7-(3,4-di-hidróxi-butóxi)-2 <i>H</i> -1-benzopiran-2-ona 3.7.....	196
E 28 – Espectro DEPT 90 e $135^\circ$ (75,45 MHz, $\text{CD}_3\text{OD}$ ) do 7-(3,4-di-hidróxi-butóxi)-2 <i>H</i> -1-benzopiran-2-ona 3.7.....	196
E 29 – Espectro de RMN de $^1\text{H}$ (300,07 MHz, $\text{CD}_3\text{OD}$ ) de 7-(3,4-di-hidróxi-hexilóxi)-2 <i>H</i> -1-benzopiran-2-ona 3.8.....	197
E 30 – Espectro de massas (IE, 70 eV) de 7-(3,4-di-hidróxi-hexilóxi)-2 <i>H</i> -1-benzopiran-2-ona 3.8.....	197

E 31 – Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ (75,45 MHz, $\text{CD}_3\text{OD}$ ) de 7-(3,4-di-hidróxi-hexilóxi)-2 <i>H</i> -1-benzopiran-2-ona <b>3.8</b> .....	198
E 32 – Espectro DEPT 90 e $135^\circ$ (75,45 MHz, $\text{CD}_3\text{OD}$ ) de 7-(3,4-di-hidróxi-hexilóxi)-2 <i>H</i> -1-benzopiran-2-ona <b>3.8</b> .....	198
E 33 – Espectro de RMN de $^1\text{H}$ (300,07 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) do 1,2-octanodiol <b>3.24</b> ...	199
E 34 – Espectro de massas (IE, 70 eV) do 1,2-octanodiol <b>3.24</b> .....	199
E 35 – Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ (75,45 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) do 1,2-octanodiol <b>3.24</b> ....	200
E 36 – Espectro DEPT 90 e $135^\circ$ (75,45 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) do 1,2-octanodiol <b>3.24</b> ...	200
E 37 – Espectro de RMN de $^1\text{H}$ (300,07 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) do 4-hexil-2,2-dimetil-[1,3]dioxolano <b>3.25</b> .....	201
E 38 – Espectro de massas (IE, 70 eV) do 4-hexil-2,2-dimetil-[1,3]dioxolano <b>3.25</b> .....	201
E 39 – Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ (75,45 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) do 4-hexil-2,2-dimetil-[1,3]dioxolano <b>3.25</b> .....	202
E 40 – Espectro DEPT 90 e $135^\circ$ (75,45 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) do 4-hexil-2,2-dimetil-[1,3]dioxolano <b>3.25</b> .....	202
E 41 – Espectro de RMN de $^1\text{H}$ (300,07 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) de 1-hidróxi-2-octanona <b>3.28</b> .....	203
E 42 – Espectro de massas (IE, 70 eV) de 1-hidróxi-2-octanona <b>3.28</b> .....	203
E 43 – Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ (75,45 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) de 1-hidróxi-2-octanona <b>3.28</b> .....	204
E 44 – Espectro DEPT 90 e $135^\circ$ (75,45 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) de 1-hidróxi-2-octanona <b>3.28</b> .....	204
E 45 – Espectro de RMN de $^1\text{H}$ (300,07 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) de 3-hidróxi-propil- <i>p</i> -toluenossulfonil éter <b>4.12</b> .....	205
E 46 – Espectro de massas (IE, 70 eV) de 3-hidróxi-propil- <i>p</i> -toluenossulfonil éter <b>4.12</b> .....	205
E 47 – Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ (75,45 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) de 3-hidróxi-propil- <i>p</i> -toluenossulfonil éter <b>4.12</b> .....	206
E 48 – Espectro DEPT 90 e $135^\circ$ (75,45 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) de 3-hidróxi-propil- <i>p</i> -toluenossulfonil éter <b>4.12</b> .....	206
E 49 – Espectro de RMN de $^1\text{H}$ (300,07 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) de 3-acetóxi-propil- <i>p</i> -toluenossulfonil éter <b>4.13</b> .....	207
E 50 – Espectro de massas (IE, 70 eV) de 3-acetóxi-propil- <i>p</i> -toluenossulfonil éter <b>4.13</b> .....	207
E 51 – Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ (75,45 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) do -acetóxi-propil- <i>p</i> -toluenossulfonil éter <b>4.13</b> .....	208
E 52 – Espectro DEPT 90 e $135^\circ$ (75,45 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) do -acetóxi-propil- <i>p</i> -toluenossulfonil éter <b>4.13</b> .....	208

E 53 – Espectro de RMN de $^1\text{H}$ (499,89 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) do 3-acetóxi-propil-7-umbeliferil éter 4.14. ....	209
E 54 – Espectro de massas (IE, 70 eV) do 3-acetóxi-propil-7-umbeliferil éter 4.14. ....	209
E 55 – Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ (125,70 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) do 3-acetóxi-propil-7-umbeliferil éter 4.14. ....	210
E 56 – Espectro DEPT 90 e $135^\circ$ (125,70 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) do 3-acetóxi-propil-7-umbeliferil éter 4.14. ....	210
E 57 – Espectro de massas (IE, 70 eV) de epóxido de <i>cis</i> -jasmona. ....	211
E 58 – Espectro de massas (IE, 70 eV) de 4-hidróxi- <i>cis</i> -jasmona. ....	211
E 59 – Espectro de RMN de $^1\text{H}$ (300,07 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) de 6- <i>endo</i> -hidroxicanfôra 4.24. ....	212
E 60 – Espectro de massas (IE, 70 eV) de 6- <i>endo</i> -hidroxicanfôra 4.24. ....	212
E 61 – Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ (75,45 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) de 6- <i>endo</i> -hidroxicanfôra 4.24. ....	213
E 62 – Espectro DEPT 90 e $135^\circ$ (75,45 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) de 6- <i>endo</i> -hidroxicanfôra 4.24. ....	213

---

# *Introdução*

---

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 CONSIDERAÇÕES GERAIS

As enzimas são biocatalisadores versáteis que, em condições brandas de temperatura e pressão, possibilitam a transformação de espécies químicas. Além dessa vantagem, muitas vezes elas promovem reações assimétricas gerando produtos finais com maior valor agregado.<sup>1</sup> Conseqüentemente, a transformação química, por meio de enzima ou microrganismo, é uma alternativa altamente viável em síntese orgânica. Os microrganismos utilizados em biotransformação, podem ser do tipo selvagem (wild-type), recombinante, e/ou geneticamente modificados para incrementar a produção de enzimas específicas (tolerando solventes orgânicos, ou valores extremos de pH e temperatura). As enzimas podem provir de células íntegras em crescimento, em repouso ou imobilizadas. Outras alternativas são as enzimas isoladas, as quais podem ser utilizadas em solução, em suspensão, ou ainda imobilizadas.<sup>2</sup>

O mercado de enzimas e o número de processos competitivos baseados em enzimas/microrganismos estão crescendo rapidamente nas indústrias (**Tabela 1**), devido aos métodos mais econômicos de produção, aos novos campos de aplicação e às novas enzimas.<sup>3</sup>

---

<sup>1</sup> a) Johnson, C.R. *Accounts Chem. Res.* **1998**, *31*, 333-341. b) Nandi, R.; Sengupta, S. *Crit. Rev. Microbiol.* **1998**, *24*, 61-84. c) Hardman, D.J. *Crit. Rev. Biotechnol.* **1991**, *11*, 1-40. d) Azerad, R. *B. Soc. Chim. Fr.* **1995**, *132*, 17-51. e) Brevet, J.L.; Mori, K. *Synthesis-Stuttgart* **1992**, *10*, 1007-1012. f) Mori, K.; Takeuchi, T. *Tetrahedron* **1988**, *44*, 333-342. g) Kitayama, T. *Tetrahedron* **1996**, *52*, 6139-6148

<sup>2</sup> Shaw, N.M.; Robins, K.T.; Kiener, A. *Adv. Synth. Catal.* **2003**, *345*, 425-435.

<sup>3</sup> van Beilen, J.B.; Li, Z. *Curr. Opin. Biotech.* **2002**, *13*, 338-344.

**Tabela 1** - Exemplos selecionados de aplicação industrial utilizando biocatalisadores (enzimas/células)<sup>4</sup>

Produto <sup>a</sup>	Enzima	Enz. livre ou imobilizada	Empresa
<b>&gt; 10.000.000 ton/a</b> Dextrinas Glucoses Melado de milho com alta concentração de frutose (HFCS)	amilase glucoamilase glucose isomerase	livre livre imobilizada	Vários
<b>&gt;10.000 t/a</b> $\alpha$ -D-glucosil-1,6- $\beta$ -D-frutoside	sacarose mutase	células imobilizadas	Südzucker, Cerestar
Acrilamida	nitrila hidratase	células imobilizadas	Nitto
Ác. 6-aminopenicilânico <sup>b</sup>	penicilina amidase	imobilizada	Vários
Manteiga de cacau	lipase	imobilizada	Fuji Oil, Unilever
Lactose, leite ou soro de leite	$\beta$ -galactosidase	livre ou imobilizada	Vários
<b>&gt; 1.000 t/a</b> Ác. 7-aminocefalosporânico	(R)-amino oxidase	imobilizada	Vários
Ác. 7-aminodesacetoxi- cefalosporânico	glutaril amidase glutaril amidase (modificado)	imobilizada imobilizada imobilizada	DSM
(S)- ácido aspártico	aspartase	imobilizada	Tanabe
Aspartame <sup>c</sup>	termolisina	imobilizada	Tosoh, DSM
(S)-metoxiisopropil amina	lipase	imobilizada	BASF
(S)- ácido pantotênico	aldolactonase		Fuji Chem. Ind.
(R)-fenilglicina	hidantoinase, carbamoilase	imobilizada	Vários
(S)-aminoácidos	aminoacilase	livre	Degussa, Tanabe
<b>~ 1.000 t/a</b> Amoxicilina	penicilina amidase	imobilizada	DSM
Cefalexina	penicilina amidase	imobilizada	DSM
(S)-DOPA	$\beta$ -tirocinase	imobilizada	Ajinomoto
Insulina humana	carboxipeptidase A	livre	Aventis
Álcoois e aminas quirais	lisil endopeptidase	livre	Vários
(R)- ácido mandélico	tripsina	livre	BASF
	lipase	imobilizada	BASF
	nitrilase	imobilizada	BASF

<sup>a</sup> Escala de produção de vários milhões a centenas de toneladas por ano

<sup>b</sup> Principalmente para penicilinas semi-sintéticas e antibióticos cefalosporínicos (ampicilina, amoxicilina) com venda superior a  $3 \cdot 10^9$  US\$/ano

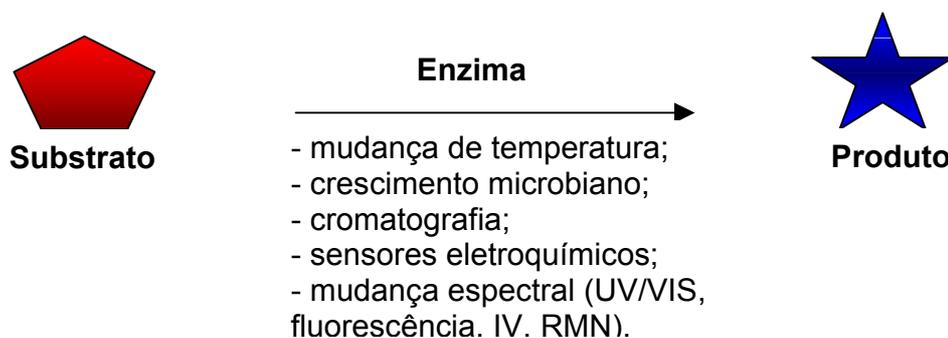
<sup>c</sup> Venda de cerca de  $850 \cdot 10^6$  US\$/ano

<sup>4</sup> Bornscheuer, U.T.; Buchholz, K. *Eng. Life. Sci.* **2005**, *5*, 309-323.

Em todas estas aplicações há uma forte demanda por novas enzimas ou aprimoramento das enzimas existentes, sendo que para garimpar novas enzimas é importante varrer a biosfera e, em particular, os microrganismos, que são fontes acessíveis de enzimas. Sendo assim, ensaios enzimáticos para triagem intensiva da biodiversidade são de grande importância.<sup>5,6</sup>

## 1.2 ENSAIOS ENZIMÁTICOS

Os ensaios enzimáticos são protocolos experimentais que possibilitam “visualizar” uma transformação química catalisada por enzima, através de um sinal de luz, mudança na cor da amostra, crescimento microbiano diferenciado devido à seleção biológica, produção de calor ou precipitação do produto de biotransformação entre outros. Alternativamente, é possível monitorar o progresso de uma reação utilizando métodos analíticos como cromatografia, espectrometria de massas (EM) e ressonância magnética nuclear (RMN).<sup>7</sup> Conforme ilustrada no **Esquema 1**, a transformação do substrato num produto qualquer pode ser revelada por diferentes métodos de detecção.



**Esquema 1** – Diferentes formas de detecção ou de monitoramento da conversão de um substrato num produto.<sup>7</sup>

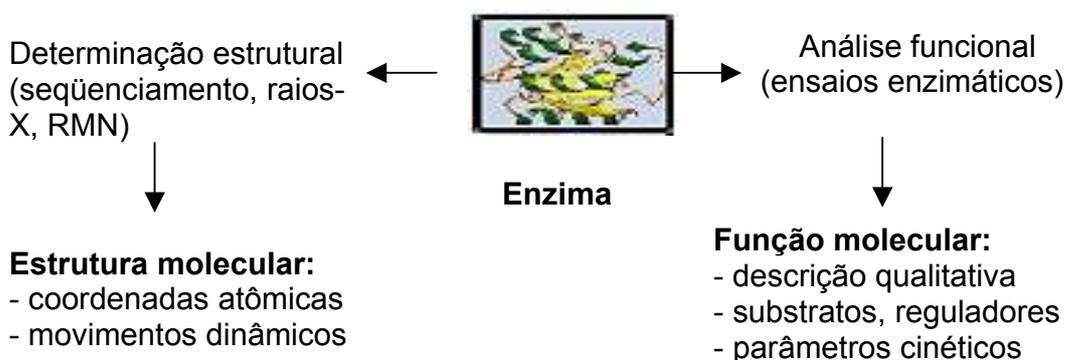
<sup>5</sup> Fenniri, H. *Chemtech* **1996**, *11*, 15-25.

<sup>6</sup> Demirjian, D.C.; Shah, A.; Moris-Varas, F. *Top. Curr. Chem.* **1999**, *200*, 1-29.

<sup>7</sup> Sicard, R.; Reymond, J.-L. In: *Enzyme Assays. High-throughput screening. Genetic selection and fingerprinting*. Reymond, J.L. (ed), Wiley-VCH, Weinheim, **2006**, p 1-14.

Na era pós-genômica, o interesse nas proteínas evoluiu, passando da identificação estrutural para a análise funcional das proteínas,<sup>8</sup> e a função destas enzimas foi rapidamente determinada utilizando-se ensaios enzimáticos.<sup>9,10</sup> Assim, os ensaios enzimáticos permitem visualizar a função da enzima sem o prévio conhecimento de sua estrutura, evidenciando de maneira prática a relação entre o biocatalisador (proteína) e a atividade enzimática. Neste caso, a descrição da função molecular torna-se independente da estrutura (**Esquema 2**), onde alterações estruturais insignificantes na proteína podem produzir mudanças drásticas na função, ou seja, na atividade catalítica.

Para o melhoramento genético de uma enzima, a informação funcional obtida através de ensaios enzimáticos de milhares de mutantes é freqüentemente mais útil do que a informação estrutural detalhada de uma única enzima.<sup>11</sup>



**Esquema 2** – Determinação estrutural e análise funcional de enzima.<sup>7</sup>

Na prática, os ensaios enzimáticos são aplicados em muitas áreas de pesquisas, como por exemplo, nos testes clínicos para diagnosticar a presença de patógenos. Estes ensaios são também componentes-chave de sistemas bio-

<sup>8</sup> Steinmetz, L.M.; Davis, R.W. *Nat. Rev. Genet.* **2004**, 5, 190-201.

<sup>9</sup> Reetz, M. T. *Angew. Chem. Int. Edit.* **2001**, 40, 284-310.

<sup>10</sup> Wahler, D.; Reymond, J.-L. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2001**, 5, 152-158.

<sup>11</sup> Brakmann, S. *ChemBioChem* **2001**, 2, 865-871.

analíticos, incluindo amplificação de sinal nos testes de ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay), análise genética empregando PCR (Reação de Polimerase em Cadeia) e seqüenciamento de genes utilizando DNA polimerase. Além disso, os ensaios enzimáticos desempenham papel crítico na seleção de substâncias que atuam como inibidores enzimáticos, assim como na elucidação das funções e mecanismos de ação por meio de interpretações bioquímicas. Mais importante ainda, os ensaios enzimáticos são ferramentas indispensáveis para descobrir novas enzimas e/ou selecionar enzimas mais eficientes em grandes coleções, como as coleções de microrganismos da biosfera<sup>12</sup> ou coleções de mutantes gerados pelos métodos de recombinação genética (gene shuffling e error –prone PCR).<sup>13,14,15</sup> Em ambos os casos, a construção de banco de dados do potencial enzimático destas coleções permite identificar os alvos desejados (**Esquema 3**). Esta abordagem tem sido muito utilizada para descobrir biotocalisadores eficientes contribuindo para uma aceitação cada vez maior da utilização de enzimas na produção em larga escala de produtos químicos.<sup>16</sup>

---

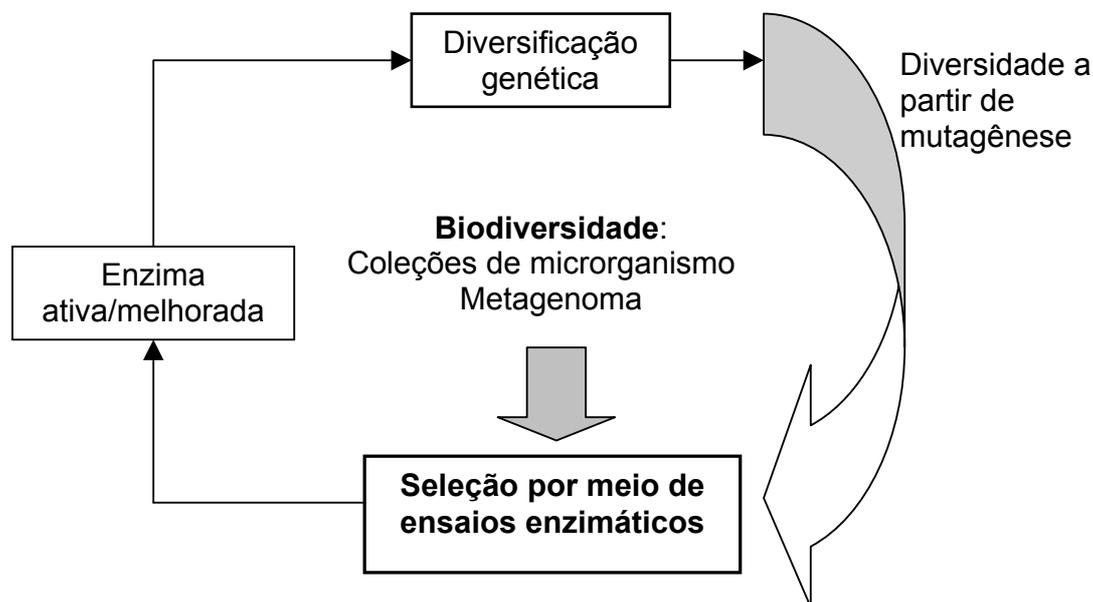
<sup>12</sup> Beisson, F.; Tiss, A.; Rivière, C.; Verger, R. *Eur. J. Lipid. Sci. Tech.* **2000**, *102*, 133-153.

<sup>13</sup> Marrs, B.; Delagrave, S.; Murphy, D. *Curr. Opin. Microbiol.* **1999**, *2*, 241-245.

<sup>14</sup> Stemmer, W.P.C. *Nature* **1994**, *370*, 389-391.

<sup>15</sup> Taylor, S.V.; Kast, P.; Hilvert, D. *Angew. Chem. Int. Edit.* **2001**, *40*, 3310-3335.

<sup>16</sup> Schmid, A.; Dordick, J.S.; Hauer, B.; Kiener, A.; Wubbolts, M.; Witholt, B. *Nature* **2001**, *409*, 258-268.



**Esquema 3** - Seleção de enzimas e microrganismos naturais ou melhorados a partir da biodiversidade e bibliotecas genômicas.<sup>7</sup>

Para projetar um ensaio enzimático funcional é necessário combinar o conhecimento químico do teste com as informações que se deseja obter. Idealmente, o ensaio deve ser simples e livre de erros – isto é, sem falsos positivos ou falsos negativos. O sucesso dos ensaios repousa na natureza das reações monitoradas, sendo umas algumas mais difíceis que outras, e na simplicidade da execução, na qual os custos operacionais envolvidos devem ser minuciosamente avaliados.

Como mencionado acima, existem muitos métodos analíticos para a detecção de biocatalisadores voltados a uma aplicação específica. A análise instrumental clássica fornece muitas ferramentas para a quantificação e identificação de compostos, inclusive em misturas complexas. Técnicas como cromatografia gasosa (CG), espectrometria de massas (EM), cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e eletroforese capilar são apropriadas para o monitoramento das biotransformações. Entretanto, tais técnicas, sem auxílio de robotização (ou

automação), tornam-se dispendiosas e lentas para triagens de grande porte, as quais avaliam centenas ou milhares de amostras diárias e requerem sistemas rápidos e econômicos.

### 1.3 TRIAGEM DE ALTO DESEMPENHO APLICADA AOS ENSAIOS ENZIMÁTICOS

Nos últimos anos surgiu o interesse no desenvolvimento de ensaios enzimáticos baseados no conceito de triagem de alto desempenho para utilização em biocatálise.

Segundo duas definições de Triagem de Alto Desempenho (High throughput Screening, HTS) encontradas no internet: “High-throughput screening é um método científico especialmente relevante na área de biologia e química. Por meio da combinação de sistemas robotizados permite conduzir centenas de experimentos de uma só vez”<sup>\*</sup> Outra definição: “Uma técnica para ensaios biológicos que permite analisar uma grande quantidade de compostos em paralelo e identificar moléculas com efeitos biológicos específicos monitorando grandes bibliotecas de compostos”.<sup>\*\*</sup>

Rigorosamente falando, uma metodologia é considerada de alto desempenho quando permite avaliar de 1000 a 8000 amostras por dia. Para avaliações entre 300 – 700 amostras por dia, a metodologia é considerada de desempenho médio.<sup>17</sup> De forma geral, uma metodologia é considerada de alto desempenho quando aplica o princípio de análise em paralelo, que permite uma grande redução no tempo de análise em relação aos ensaios convencionais.

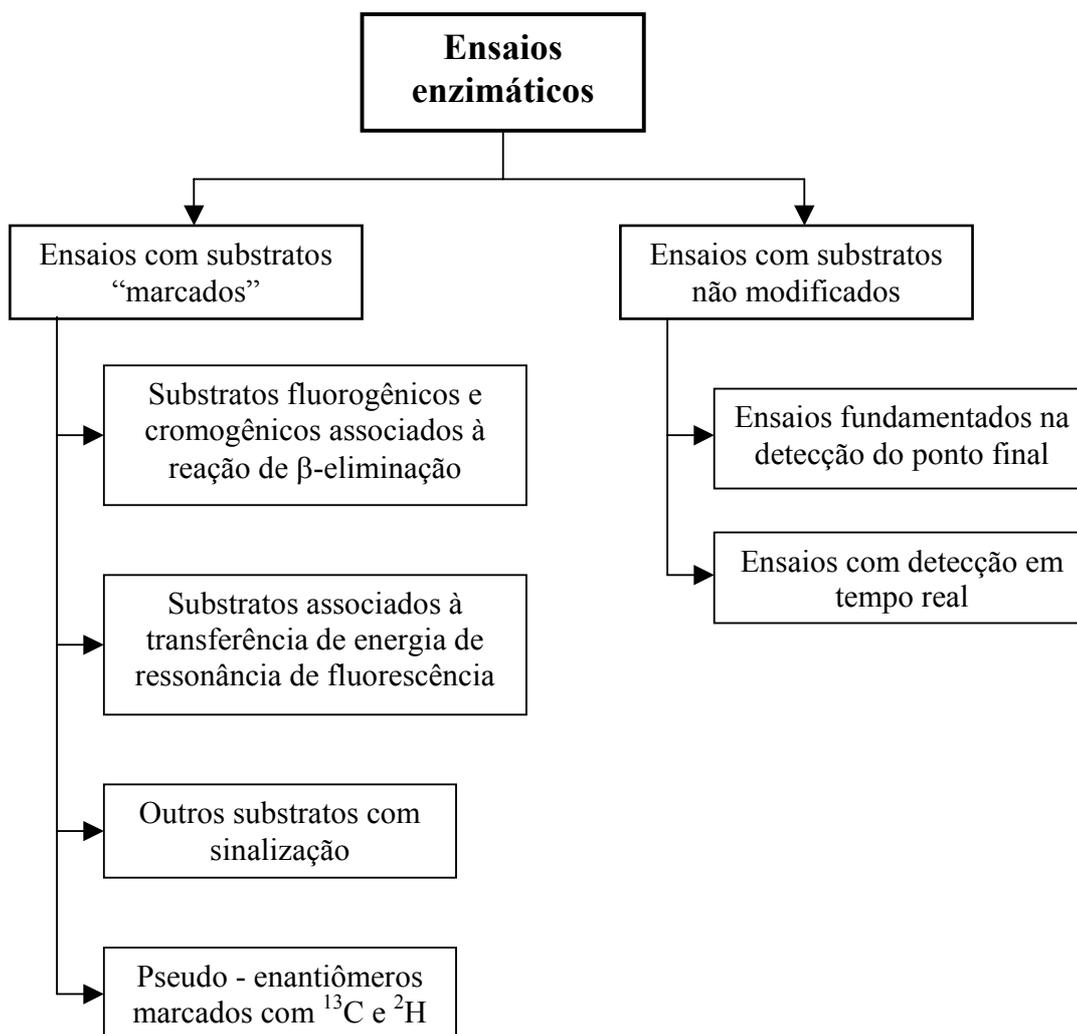
---

<sup>17</sup> Reetz, M. T. *Angew. Chem. Int. Edit.* **2002**, *41*, 1335-1338.

\* [http://en.wikipedia.org/wiki/High\\_throughput\\_screening](http://en.wikipedia.org/wiki/High_throughput_screening)

\*\* [http://www.lionbioscience.com/press/glossary/index\\_eng.html](http://www.lionbioscience.com/press/glossary/index_eng.html)

A maioria dos ensaios enzimáticos de alto desempenho utiliza substratos fluorogênicos e cromogênicos, ou sensores capazes de revelar uma atividade catalítica determinada. Assim, é possível classificar estes ensaios em dois grandes grupos<sup>18</sup>: ensaios com substratos marcados e ensaios com substratos não modificados, conforme ilustrado no **Fluxograma 1**. Cada tipo de ensaio será abordado sucintamente, a seguir.



**Fluxograma 1** - Ensaio enzimático frequentemente utilizados nas triagens de alto desempenho.

<sup>18</sup> Goddard, J.-P.; Reymond, J.-L. *Trends Biotechnol.* **2004**, *22*, 363-370.

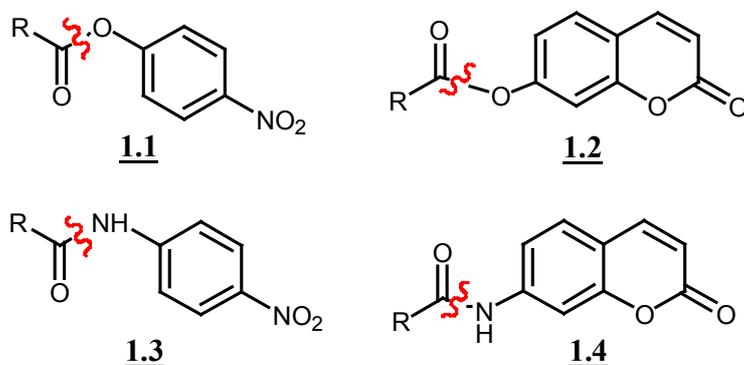
### 1.3.1 Ensaaios com substratos marcados

Os ensaios de execução mais simples são os que partem de substratos cromogênicos ou fluorogênicos e fornecem produtos com propriedades espectrais distintas dos substratos. Nesta classificação encontram-se substratos fluorogênicos e cromogênicos associados à reação de  $\beta$ -eliminação, substratos associados à transferência de energia de ressonância de fluorescência, substratos com marcação isotópica e outros substratos com marcação fluorescente para detecção indireta. Estes ensaios são vantajosos no sentido de oferecerem uma conexão direta entre a atividade enzimática e o sinal observado. Entretanto, a principal desvantagem destes métodos está justamente na introdução do cromóforo ou fluoróforo, pois as enzimas selecionadas reagem com o substrato modificado e, portanto, selecionam enzimas apropriadas para estes substratos que podem não ser adequadas aos substratos de interesses os quais não estão modificados.<sup>18</sup>

#### 1.3.1.1 Substratos fluorogênicos e cromogênicos associados a $\beta$ -eliminação

A umbeliferona é um protótipo de fenóis fluorogênicos. Ésteres e éteres de umbeliferona não são fluorescentes, enquanto que a umbeliferona livre é fortemente fluorogênica devido ao ânion fenolato. Seu pKa é relativamente baixo (pKa  $\sim$  7) e qualquer reação que libere a umbeliferona acima de pH 6,5 proporciona um grande incremento de fluorescência azul. De maneira análoga, a liberação de nitrofenolato amarelo a partir de ésteres e éteres incolores constitui uma reação de fácil detecção em pH acima de 6,5. Assim, ésteres e éteres de nitrofenol (**1.1**) e umbeliferona (**1.2**), amidas de nitroanilina (**1.2**) e aminocumarina (**1.4**) são conhecidos como substratos cromogênicos ou fluorogênicos para enzimas hidrolíticas (**Esquema 4**).<sup>10,12</sup> No entanto, o uso destes substratos era restrito devido à reatividade e

suscetibilidade destes por agentes não catalíticos, como calor e pH ligeiramente básico, dificultando, assim, a diferenciação entre as reações catalisadas pela enzima alvo e as hidrólises espontâneas (não específicas).

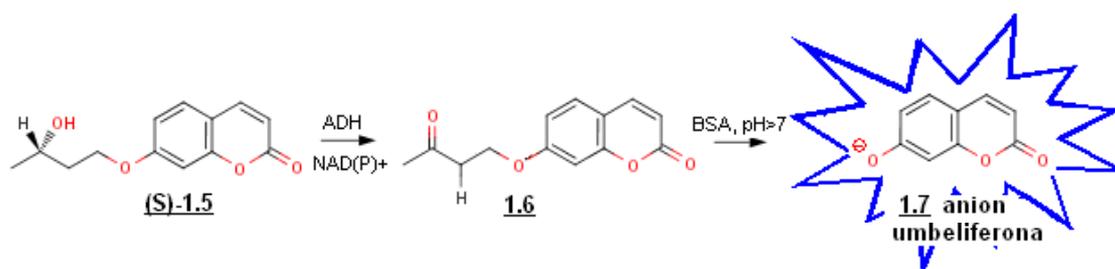


**Esquema 4** – Ésteres e amidas de nitrofenil e umbeliferil utilizados na detecção de atividade enzimática hidrolíticas.

Uma solução para estas limitações foi desenvolvida por Reymond e colaboradores.<sup>19</sup> Eles propuseram uma seqüência de reações que, ligando a reação enzimática principal, objeto do ensaio, a uma reação secundária, permite a conversão do produto primário (resultado da catálise enzimática) em um produto fluorescente. Este novo tipo de substrato fluorogênico utiliza também a liberação de fenolato como sinal; entretanto a emissão de fluorescência está associada a uma reação de  $\beta$ -eliminação do produto enzimático e não diretamente à catálise enzimática. Devido a suas reatividades, a umbeliferona e o nitrofenol atuam como grupos de saída numa reação de  $\beta$ -eliminação.<sup>20</sup> Conforme ilustrado no **Esquema 5**, o álcool secundário quiral (*S*)-**1.5** foi utilizado como substrato fluorogênico para a enzima álcool desidrogenase, formando a cetona **1.6** como produto primário da reação enzimática. Subseqüentemente, a cetona **1.6** sofre uma reação de  $\beta$ -eliminação, liberando a molécula repórter fluorescente **1.7**.

<sup>19</sup> Klein, G.; Reymond, J.-L. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1998**, 8, 1113-1116.

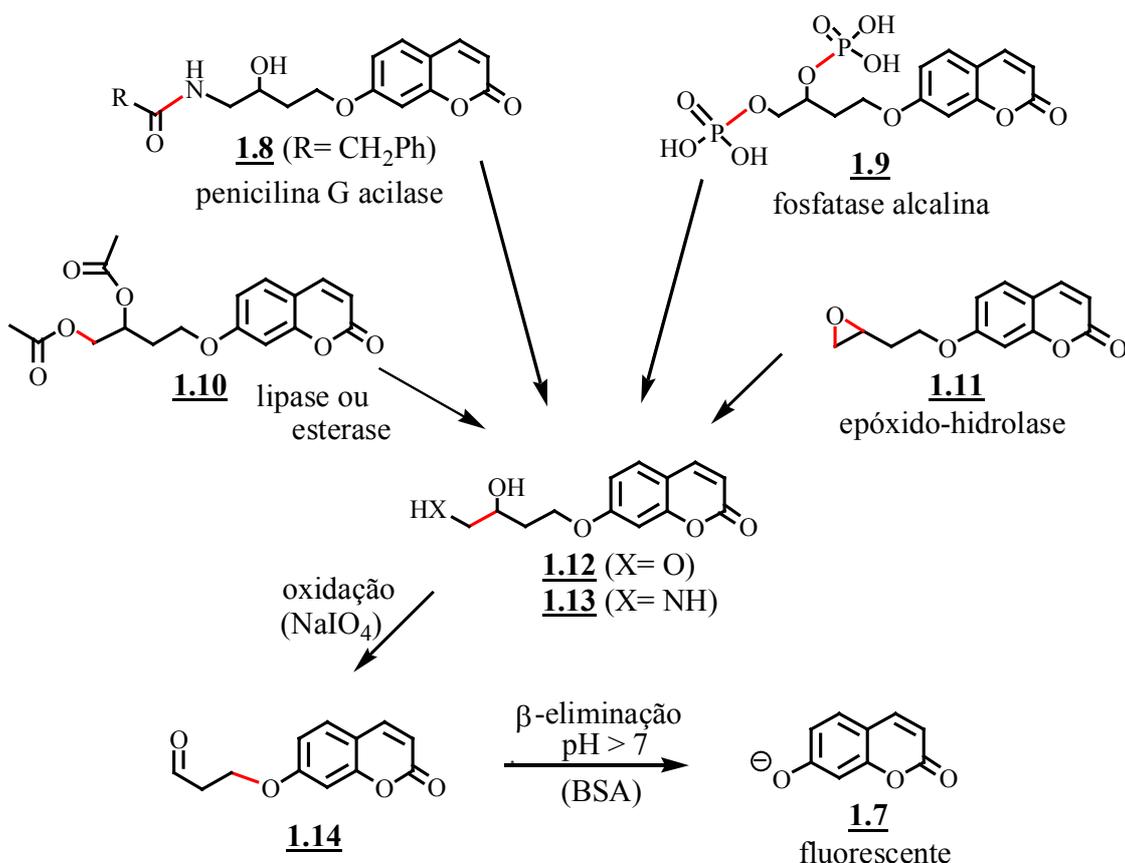
<sup>20</sup> Fedor, L.R.; Glave, W.R. *J. Am. Chem. Soc.* **1971**, 93, 985-989.



**Esquema 5** - Ensaio para detecção de álcool desidrogenase (ADH) acoplado à reação de β-eliminação mediada por albumina de soro bovino (BSA).<sup>19</sup>

Este protocolo versátil foi aplicado inicialmente a várias enzimas hidrolíticas (**Esquema 6**), incluindo lipases, esterases, fosfatases, acilases e epóxido-hidrolases.<sup>21</sup> O produto primário da reação enzimática utilizando as sondas fluorogênicas **1.8** – **1.11** é um diol ou aminoálcool **1.12** – **1.13**, o qual na presença de periodato de sódio (NaIO<sub>4</sub>) sofre imediatamente uma reação de clivagem oxidativa, resultando na formação do aldeído **1.14**. A decomposição do aldeído por meio de uma reação de β-eliminação catalisada por BSA promove a liberação do sinal fluorescente **1.7** (**Esquema 6**).

<sup>21</sup> Badalassi, F.; Wahler, D.; Klein, G.; Crotti, P.; Reymond, J.-L. *Angew. Chem. Int. Edit.* **2000**, *39*, 4067-4070



**Esquema 6** - Representação esquemática do ensaio fluorogênico acoplado com periodato de sódio e BSA para detecção de enzimas hidrolíticas. As ligações de cor vermelha são as que sofrem a ruptura enzimática ou química.<sup>21</sup>

A introdução da estratégia de  $\beta$ -eliminação na seqüência de reações separa eficientemente a transformação enzimática da liberação do grupo fenolato e facilita a diversificação estrutural e funcional dos substratos. O mesmo princípio foi aplicado aos ensaios enzimáticos para detectar outras classes de enzimas, como transaldolases<sup>22</sup> e transcetolases<sup>23</sup>. O sucesso desta estratégia foi incorporada em

<sup>22</sup> González-García, E.; Helaine, V.; Klein, G.; Schuermann, M.; Sprenger, G.A.; Fessner, W.-D.; Reymond, J.-L. *Chem.-Eur. J.* **2003**, *9*, 893-899.

<sup>23</sup> Sevestre, A.; Hélaïne, V.; Guyot, G.; Martin C.; Hecquet, L. *Tetrahedron lett.* **2003**, *44*, 827-830.

detecção enzimática para lipases e esterases,<sup>24,25</sup> fosfatases,<sup>26</sup> HIV proteases,<sup>27</sup> Baeyer-Villiger monoxigenases,<sup>28,29</sup> e  $\beta$ -lactamase.<sup>30</sup>

### 1.3.1.2 Substratos fluorogênicos associados à Transferência de Energia de Ressonância de Fluorescência

O fenômeno de Transferência de Energia de Ressonância de Fluorescência (FRET) ocorre quando dois fluoróforos (ou cromóforos) interagem um com o outro resultando na modificação da emissão de fluorescência. Esta interação pode ocorrer a uma distância relativamente longa (a várias ligações); e os dois fluoróforos podem estar ligados por uma cadeia covalente ou dentro de um complexo não covalente. Quando a ligação que une o par de fluoróforo-fluoróforo ou fluoróforo-supressor é clivada por ação enzimática, ocorre um incremento na emissão de fluorescência ou um deslocamento no comprimento de onda (mudança espectral). Este princípio foi primeiramente utilizado na detecção de atividade de HIV-proteases<sup>31</sup> e é um dos métodos mais eficientes para detecção de reações de clivagem.<sup>32</sup>

Os substratos associados ao fenômeno de FRET não estão limitados apenas à clivagem proteolítica e foram recentemente aplicados à triagem de fosfolipases por

---

<sup>24</sup> Leroy, E.; Bensele, N.; Reymond, J.-L. *Adv. Synth. Catal.* **2003**, *345*, 859-865.

<sup>25</sup> Nyfeler, E.; Grognum, J.; Wahler, D.; Reymond, J.-L. *Helv. Chim. Acta* **2003**, *86*, 2919-2927.

<sup>26</sup> González-García, E. M.; Grognum, J.; Wahler, D.; Reymond, J.-L. *Helv. Chim. Acta* **2003**, *86*, 2458-2470.

<sup>27</sup> Badalassi, F.; Nguyen, H.K.; Crotti, P.; Reymond, J.-L. *Helv. Chim. Acta* **2002**, *85*, 3090-3098.

<sup>28</sup> Gutiérrez, M. C.; Slegers, A.; Simpson, H. D.; Alphan, V.; Furstoss, R. *Org. Biomol. Chem.* **2003**, *1*, 3500-3506.

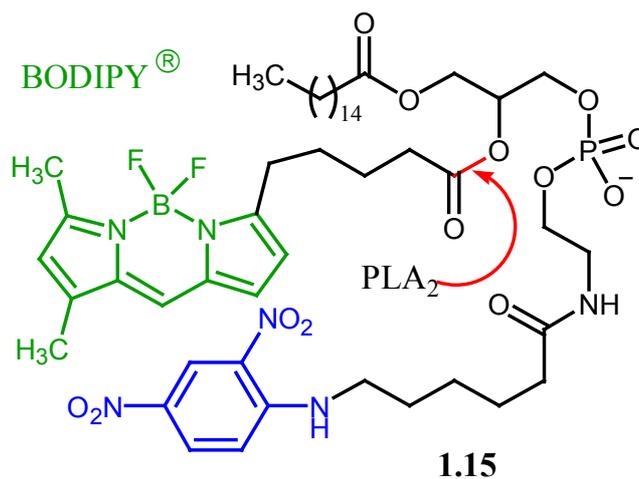
<sup>29</sup> Sicard, R.; Chen, L.S.; Marsaioli, A.J.; Reymond, J.-L. *Adv. Synth. Catal.* **2005**, *347*, 1041-1050

<sup>30</sup> Gao, W.; Xing, B.; Tsien, R.Y.; Rao, J. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 11168-11169.

<sup>31</sup> Matayoshi, E.D.; Wang, G.T.; Krafft, G.A.; Erickson, J. *Science* **1990**, *247*, 954-958.

<sup>32</sup> Kohl, T.; Heinze, K.G.; Kuhlemann, R.; Koltermann, R. *P. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2002**, *99*, 12161-12166.

meio de uma visualização *in vivo* de dois fosfolipídeos marcados (**Esquema 7**).<sup>33</sup> Esta sonda **1.15** para detecção de fosfolipases contém uma molécula supressora, a dinitroanilina, que interage com o fluoróforo BODIPY<sup>®</sup> (Boron DiPyrromethene difluoride), impedindo a emissão de fluorescência. Após a clivagem catalisada por fosfolipase A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>), o BODIPY<sup>®</sup> fica livre, emitindo fluorescência verde.



**Esquema 7** - Sonda desenhada para detecção de atividade de fosfolipase A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>). A ligação vermelha mostra a ligação a ser clivada pela enzima.

### 1.3.1.3 Substratos com marcação isotópica

Muitos dos ensaios supracitados podem operar com substratos quirais e, conseqüentemente, realizar análise de enantiosseletividade utilizando enantiômeros puros.<sup>34,35</sup> Nesse caso, as leituras de fluorescência dos enantiômeros (*R*) e (*S*) são feitas em experimentos separados.

<sup>33</sup> Farber, S.A.; Pack, M.; Ho, S.Y.; Johnson, I.D.; Wagner, D.S.; Dosch, R.; Mullins, M.C.; Hendrickson, H.S.; Hendrickson, E.K.; Halpern, M.E. *Science* **2001**, *292*, 1385-1388.

<sup>34</sup> Reetz, M.T.; Jaeger, K.-E. *Chem.-Eur. J.* **2000**, *6*, 407-412.

<sup>35</sup> Wahler, D.; Badalassi, F.; Crotti, P.; Reymond, J.-L. *Chem.-Eur. J.* **2002**, *8*, 3211-3228.

Numericamente, a enantiosseletividade ou a razão enantiomérica ( $E$ ) de uma reação enzimática pode ser calculada utilizando a seguinte fórmula, aplicando os valores de  $k_{\text{cat}}$  e  $K_M$  de cada enantiômero.<sup>36</sup>

$$\text{Razão enantiomérica} = E = \frac{(k_{\text{cat}}/K_M) \text{ enantiômero rápido}}{(k_{\text{cat}}/K_M) \text{ enantiômero lento}}$$

As constantes  $k_{\text{cat}}$  (constante da velocidade catalítica) e  $K_M$  (constante de Michaelis) são parâmetros que caracterizam a seletividade de uma enzima por um substrato determinado. A razão enantiomérica  $E$  pode ser também calculada por meio de experimentos competitivos, nos quais os dois enantiômeros competem pelo sítio ativo da enzima. A quantidade de cada produto formado revela a seletividade da enzima. Um método de determinação de razão enantiomérica baseada neste conceito foi desenvolvido por Sih,<sup>37</sup> no qual a medida de conversão ( $c$ ) e excesso enantiomérico do substrato restante ( $ee(S)$ ) ou excesso enantiomérico do produto formado ( $ee(P)$ ) num experimento permite o cálculo do valor de  $E$ .

$$\frac{\ln [(1-c)(1-ee(S))]}{\ln [(1-c)(1+ee(S))]} = \frac{V_{\text{max. (A)}}/K_{M(A)}}{V_{\text{max. (B)}}/K_{M(B)}} = E$$

Nos experimentos de HTS utilizando enantiômeros puros, os enantiômeros são avaliados separadamente, desta maneira, o efeito da competição entre eles pelo sítio ativo da enzima é ignorado, tornando inadequada a utilização de quaisquer das equações apresentadas. Usualmente, nestes tipos de ensaios, calcula-se a razão enantiomérica aparente ( $E$ -aparente) a partir das velocidades das reações dos enantiômeros isolados:

<sup>36</sup> Kazlauskas R.J. In: *Enzyme Assays. High-throughput screening. Genetic selection and fingerprinting*. Reymond, J.L. (ed), Wiley-VCH, Weinheim, 2006, p 17-39.

<sup>37</sup> Chen, C.-S.; Fujimoto, Y.; Girdaukas, G.; Sih, C. J. *J. Am. Chem. Soc.* **1982**, *104*, 7294-7299.

$$E\text{-aparente} = \frac{\text{Velocidade do enantiômero rápido}}{\text{Velocidade do enantiômero lento}}$$

Assim, o valor de *E*-aparente é obtido a partir da comparação da velocidade inicial das reações dos dois enantiômeros obtidas separadamente.<sup>38,39</sup> A facilidade de obtenção do *E*-aparente é uma vantagem; entretanto, a distorção do valor obtido torna o método pouco confiável na determinação do *E*.

Uma forma mais exata de obtê-lo consiste na introdução de um substrato similar de modo a simular a competição.<sup>39</sup> Outra solução pode ser alcançada com os substratos isotopicamente marcados.

Reetz e colaboradores<sup>40,41,42</sup> propuseram várias soluções baseadas na marcação isotópica para detectar diretamente a enantiosseletividade em ensaios de triagem de alto desempenho. A marcação isotópica de um dos enantiômeros de um éster ou amida acetilado (**Esquema 8**) permite investigar a resolução cinética enzimática destes substratos por meio de hidrólise enantiosseletiva. A marcação com <sup>13</sup>C ou <sup>2</sup>H do grupo acetila não produz mudanças na reatividade química entre os enantiômeros, mas facilita o rastreamento seletivo de cada substrato ou enantiômero, por EM,<sup>40</sup> RMN de <sup>1</sup>H,<sup>41</sup> (**Esquema 8a e Figura 1**) ou por meio de espectroscopia no Infravermelho - Transformada de Fourier (IV-TF) (**Esquema 8b e Figura 2**).<sup>42</sup>

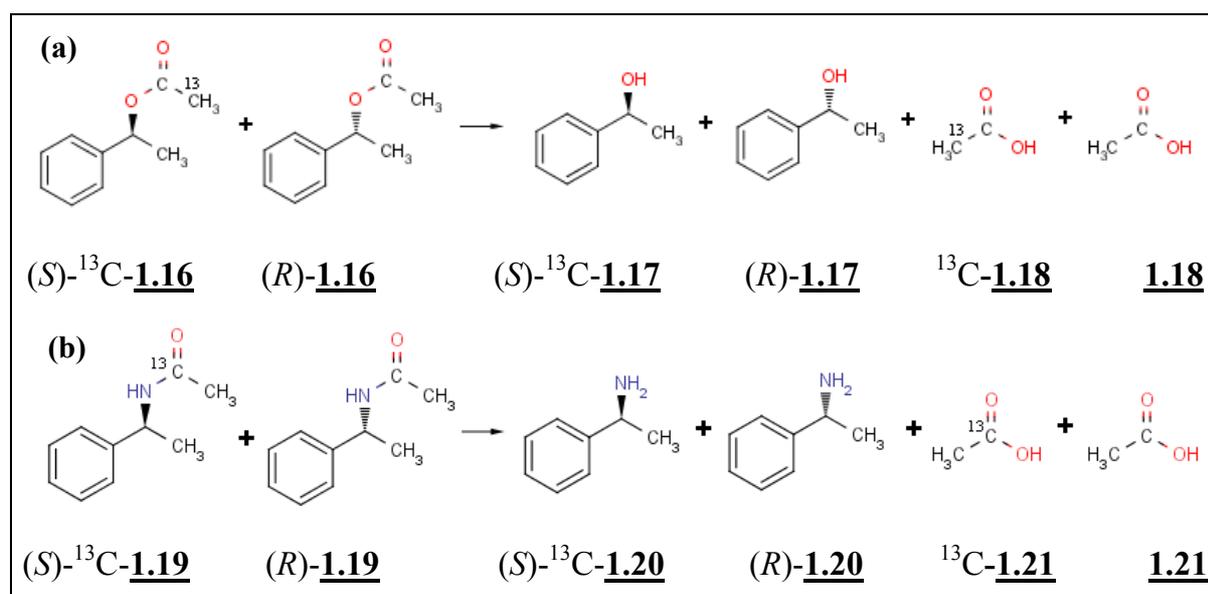
<sup>38</sup> (a) Zandonella, G.; Haalck, L.; Spencer, F.; Faber, K.; Paltauf, F.; Hermetter, A. *Chirality* **1996**, *8*, 481-489. (b) Reetz, M.T.; Zonta, A.; Schimossek, K.; Liebeton, K.; Jaeger, K.-E. *Angew. Chem. Int. Edit.* **1997**, *36*, 2830-2832.

<sup>39</sup> Janes, L.E.; Kazlauskas, R.J. *J. Org. Chem.* **1997**, *62*, 4560-4561

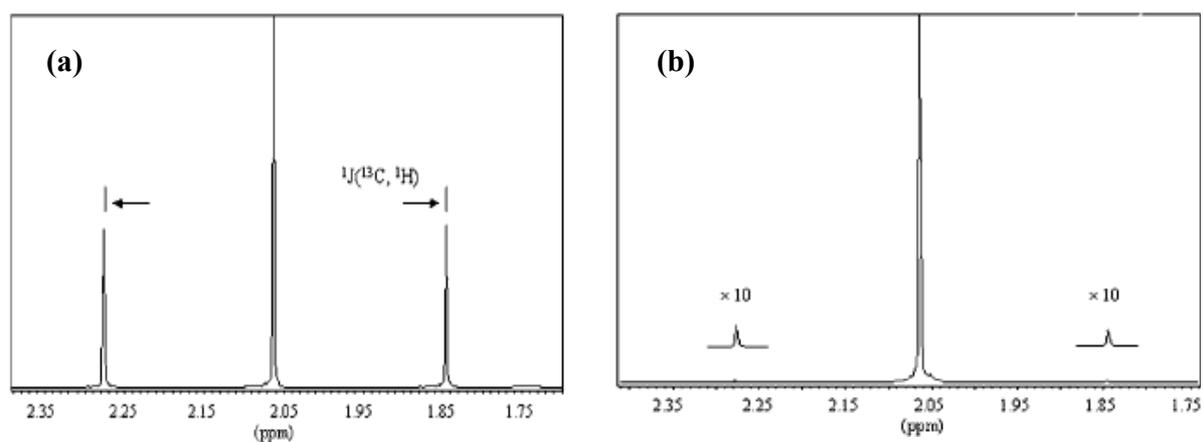
<sup>40</sup> Reetz, M.T.; Becker, M.H.; Klein, H.W.; Stockigt, D. *Angew. Chem. Int. Edit.* **1999**, *12*, 1758-1761.

<sup>41</sup> Reetz, M.T.; Eipper, A.; Tielmann, P.; Mynott, R. *Adv. Synth. Catal.* **2002**, *344*, 1008-1016.

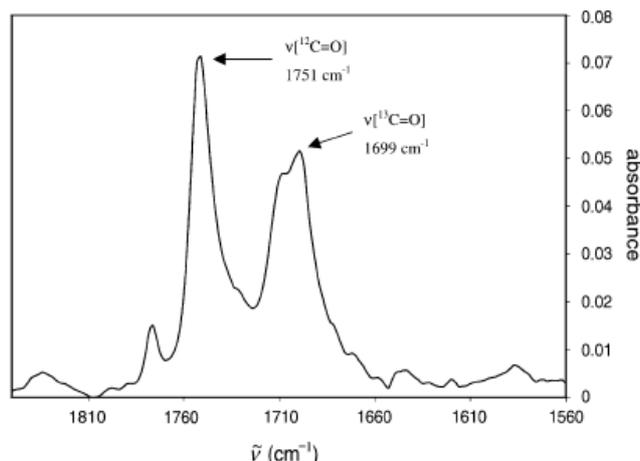
<sup>42</sup> Tielmann, P.; Boese, M.; Luft, M.; Reetz, M.T. *Chem.-Eur. J.* **2003**, *9*, 3882-3887.



**Esquema 8** – Substratos pseudo-enantiômeros marcados com <sup>13</sup>C no grupo acetila para determinação de *ee* nas reações de hidrólise, por meio de (a) RMN de <sup>1</sup>H<sup>41</sup> ou (b) espectroscopia no IV.<sup>42</sup>



**Figura 1.-** Região expandida de espectro de RMN de <sup>1</sup>H (a) uma mistura “racêmica” de (S)-<sup>13</sup>C-1.16/(R)-1.16, caracterizando o dubleto da metila marcada com <sup>13</sup>C e o singlete da metila não marcada; e (b) O espectro mostra o singlete da metila não marcada de (R)-1.16 acompanhado dos satélites devido à presença natural de <sup>13</sup>C na amostra.<sup>41</sup> A razão exata dos dois pseudo-enantiômeros é obtida pela integração dos respectivos picos assim como o valor de *ee*.

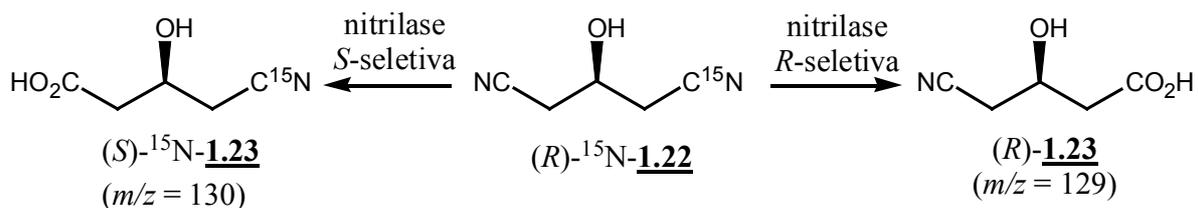


**Figura 2** – Parte do espectro de IV-TF de uma mistura (1:1) de (*S*)-<sup>13</sup>C-**1.19** e (*R*)-**1.19**, ilustrando o deslocamento de 40-50 cm<sup>-1</sup> da máxima absorção de estiramento vibracional da carbonila marcada com <sup>13</sup>C, evitando assim a sobreposição das duas bandas de carbonila.<sup>42</sup>

Estes métodos podem ser implementados em formato de HTS pela utilização de instrumentos robotizados apropriados que permitem a análise de amostras em microplacas de 96 ou 384 poços, alcançando teoricamente um número de 1400 amostras/dia por RMN e até 9000 amostras/dia por espectroscopia no infravermelho. Ainda, esta última metodologia permite medir valores de excesso enantiomérico diretamente do sobrenadante da cultura, a qual não é possível nos casos de ensaios com RMN e EM. Vale lembrar que, embora versáteis, estas metodologias não são universais para serem aplicadas em todos tipos de substratos e a escolha da melhor posição para as marcações isotópicas, que permitem a diferenciação dos dois pseudo-enantiômeros, é de importância capital.

Outra aplicação interessante da marcação isotópica foi empregada para rastrear nitrilases enantiosseletivas utilizando 3-hidróxi-pentanodinitrila **1.22** como substrato pseudo-proquiral marcado com <sup>15</sup>N (**Esquema 9**).<sup>43</sup>

<sup>43</sup> DeSantis, G.; Wong, K.; Farwell, B.; Chatman, K.; Zhu, Z.; Tomlinson, G.; Huang, H.; Tan, X.; Bibbs, L.; Chen, P.; Kretz, K.; Burk, M.J. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 11476-11477.



**Esquema 9** – Triagem de alto desempenho de nitrilases enantiosseletivas pela utilização de uma sonda **1.22** marcada com <sup>15</sup>N que permite a formação de mono-ácido **1.23** e detecção por espectrometria de massas.<sup>43</sup>

#### 1.3.1.4 Outros substratos marcados

Há ainda outros substratos fluorogênicos ou cromogênicos que não estão dentro das três categorias anteriores e que são particularmente interessantes pelas suas aplicações. Por exemplo, isotiocianato de fluoresceína é utilizado para marcar proteínas e anticorpos; assim, a caseína marcada com este fluoróforo é um substrato fluorogênico para proteases. Outras aplicações recentes da fluoresceína<sup>44</sup> (ou análogos, como a rodamina<sup>45</sup>) são para a triagem de cinases e fosfatases. O interesse nas cinases e fosfatases está ligado principalmente à triagem de inibidores destas enzimas, que representam até 5% do genoma humano.<sup>46</sup>

A emissão de fluorescência azul pela oxidação de (6-metóxi-2-naftalenil)-metanol **1.24** (não fluorescente) em aldeído correspondente **1.25**, foi empregada no desenvolvimento de um ensaio fluorogênico para detecção de álcool desidrogenases (ADH, **Esquema 10**).<sup>47</sup> Este ensaio foi subsequentemente adaptado para testar retroaldolases<sup>48</sup> e juntamente com a oxidação secundária por meio de periodato de sódio, para triagem de lipases e epóxido-hidrolases.<sup>35</sup> De maneira análoga, é

<sup>44</sup> Simeonov, A. *Anal. Biochem.* **2002**, *304*, 193-199.

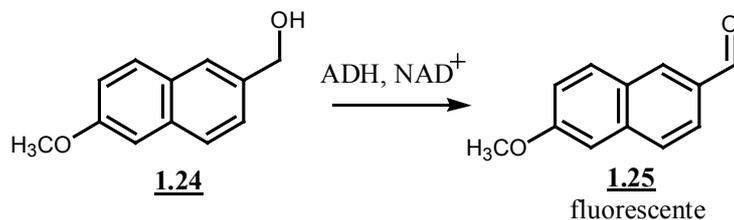
<sup>45</sup> Kupcho, K.; Somberg, R.; Bulleit, B.; Goueli, S.A. *Anal. Biochem.* **2003**, *317*, 210-217.

<sup>46</sup> Cohen, P. *Eur. J. Biochem.* **2001**, *268*, 5001-5010.

<sup>47</sup> Vallee, B.L. **1992**, US Patent, 5,162,203.

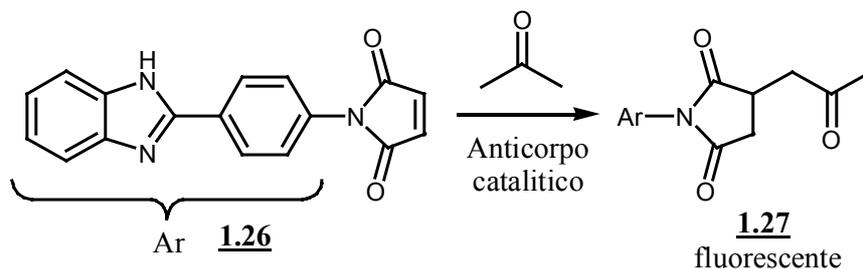
<sup>48</sup> List, B.; Barbas III, C.F.; Lerner, R.A. *P. Natl. Acad. Sci. USA* **1998**, *95*, 15351-15355.

possível utilizar diretamente os óxidos de estireno como substratos cromogênicos para detecção de epóxido-hidrolases.<sup>49</sup>



**Esquema 10** – Ensaio fluorogênico para detecção de álcool desidrogenases.<sup>47</sup>

Para monitorar reações de formação de ligação C-C, como adição de Michael e reação de Diels-Alder, foi proposta a utilização de *N*-aril maleimida **1.26** (não fluorescente) como substrato. Após a reação catalítica, os adutos de maleimida correspondentes, por exemplo **1.27**, podem ser detectados pela emissão de fluorescência (**Esquema 11**).<sup>50</sup>



**Esquema 11** – Ensaio fluorogênico para detecção de formação de ligação C-C.<sup>50</sup>

### 1.3.2 Ensaios com substratos não modificados

O uso de sondas cromogênicas ou fluorogênicas tem o inconveniente de realizar os ensaios com substratos modificados, sendo assim, preferível a aplicação direta dos substratos alvos. Estes ensaios baseiam-se na utilização de quimiossensores que respondem à formação do produto tornando desnecessária a marcação do substrato.

<sup>49</sup> Mateo, C.; Archelas, A.; Furstoss, R. *Anal. Biochem.* **2003**, *314*, 135-141.

<sup>50</sup> Tanaka, F.; Thayumanavan, R.; Barbas, C. F., III. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 8523-8528.

Esta idéia foi aplicada para monitorar a hidrólise de éster catalisada por lipases estereosseletivas com um indicador cromogênico de pH.<sup>39,51</sup> Outros ensaios indiretos utilizam sensores capazes de detectar o progresso da reação, tais como medição de mudança de temperatura por termografia infravermelho<sup>52</sup> ou medição de íons metálicos livres,<sup>53</sup> e também sensores fluorescentes que respondam a um reconhecimento seletivo do produto.<sup>54</sup>

### 1.3.2.1 Ensaios fundamentados na detecção do ponto final da reação (Endpoint assays)

Estes ensaios monitoram o consumo de substrato ou formação do produto após um intervalo de tempo e são suficientes para revelar atividades enzimáticas. A tática mais empregada é a utilização de um reagente que revela especificamente o grupo funcional formado na reação.

Tradicionalmente, as atividades das cinases foram analisadas pela incubação de proteínas ou peptídeos imobilizados e tratados com ATP marcada com radioisótopos, usualmente com fósforo gama 32 ou 33, ou pela coloração do produto com anticorpo específico para fosfoproteína. Um aperfeiçoamento recente foi realizado por meio da molécula fluorescente e seletiva de fosfoproteína chamada “Pro-Q Diamond”.<sup>55</sup> Este revelador é utilizado especialmente em micro-arranjos de proteínas que, após a sua fosforilação com ATP por meio de cinase, permite uma identificação rápida dos produtos.<sup>55</sup> Outra estratégia similar utiliza o

---

<sup>51</sup> Janes, L.E.; Lowendahl, A.C.; Kazlauskas, R.J. *Chem.-Eur. J.* **1998**, *11*, 2324-2331.

<sup>52</sup> (a) Taylor, S.J.; Morken, J.P. *Science* **1998**, *280*, 267-270. (b) Reetz, M.T.; Becker, M.H.; Liebl, M.; Fürstner, A. *Angew. Chem. Int. Edit.* **2000**, *39*, 1236-1239.

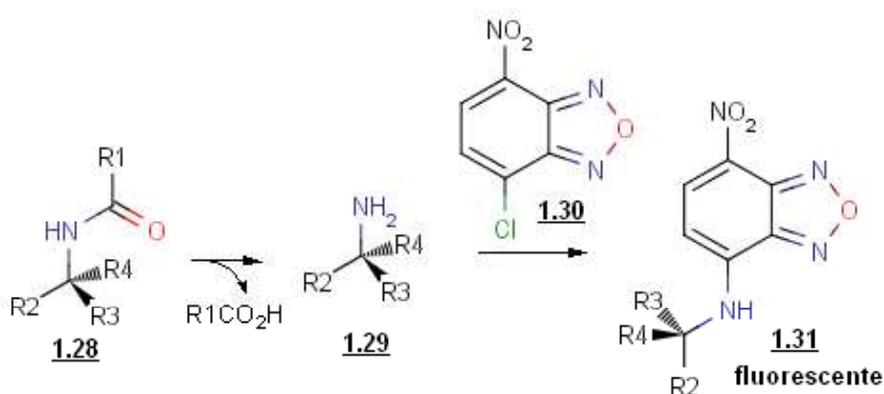
<sup>53</sup> Klein, G.; Reymond, J.-L. *Angew. Chem.* **2001**, *113*, 1821-1823.

<sup>54</sup> Geymayer, P.; Bahr, N.; Reymond, J.-L. *Chem.-Eur. J.* **1999**, *5*, 1006-1012.

<sup>55</sup> Martins, K.; Steinberg, T.H.; Cooley, L.A.; Gee, K.R.; Beechem, J.M.; Patton, W.F. *Proteomics* **2003**, *3*, 1244-1255.

complexo de zinco-fluoresceína, que se liga às proteínas fosforiladas.<sup>56</sup> Todos estes ensaios requerem um substrato imobilizado, usualmente a proteína, para permitir que ATP e a cinase sejam lavadas antes da aplicação final do fluoróforo, revelador do grupo fosfato.

Outro exemplo constitui a reação entre a amina **1.29** (produto de hidrólise de amida) e a 7-cloro-4-nitrobenzofurazana **1.30** para revelar a atividade de amidases, utilizando a amida **1.28** “não modificada” (Esquema 12).<sup>57</sup> Assim, a atividade da amidase está diretamente relacionada à intensidade de fluorescência emitida pelo produto da reação **1.31** entre a amina formada e a 7-cloro-4-nitrobenzofurazana. Este método foi aplicado na triagem enantiosseletiva de diferentes hidrolases.



**Esquema 12** - Detecção da atividade de amidases com 7-cloro-4-nitrobenzofurazana **1.30** como revelador fluorogênico do produto enzimático.<sup>57</sup>

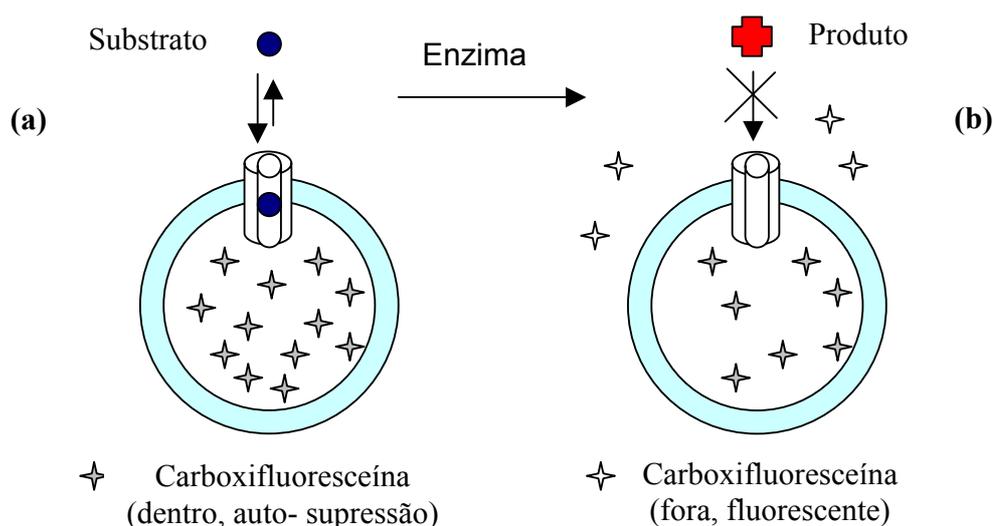
Matiles e colaboradores<sup>58</sup> relataram um ensaio interessante baseado na utilização de vesículas contendo uma solução concentrada e autosupressora de carboxifluoresceína. (Esquema 13). Nas membranas das vesículas foram incorporados poros sintéticos denominados Poros Multifuncionais Sintéticos (SMPs), que funcionam como canais para a saída do fluoróforo. Neste caso, os

<sup>56</sup> Ojida, A.; Mito-oka, Y.; Inoue, M.; Hamachi, I. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 6256-6258.

<sup>57</sup> Henke, E.; Bornscheuer, U.T. *Anal. Chem.* **2003**, *75*, 255-260.

<sup>58</sup> Das, G.; Talukdar, P.; Matile, S. *Science* **2002**, *298*, 1600-1602.

poros estão obstruídos pelo substrato da enzima devido à maior afinidade entre estes (**Esquema 13a**) do que entre o produto e os poros (**Esquema 13b**). A biotransformação do substrato para o produto pela enzima altera sua afinidade pelo poro permitindo a difusão do fluoróforo para fora das vesículas provocando um incremento na fluorescência. Esta metodologia foi aplicada a vários tipos de enzimas, incluindo DNA nucleases, DNA polimerase, apirase, heparinase, hialuronidase, papaina, elastase e pronase.<sup>59</sup> As limitações desta metodologia estão na síntese relativamente complexa dos poros sintéticos e na possibilidade de um bloqueio não seletivo de poros por contaminantes, tais como a própria enzima ou cofatores presentes na reação.



**Esquema 13** – Esquema de um ensaio enzimático baseado na utilização de vesículas contendo poros multifuncionais sintéticos. A biotransformação do substrato a produto é monitorada pela quantidade de carboxifluoresceína que atravessa os poros.<sup>58</sup>

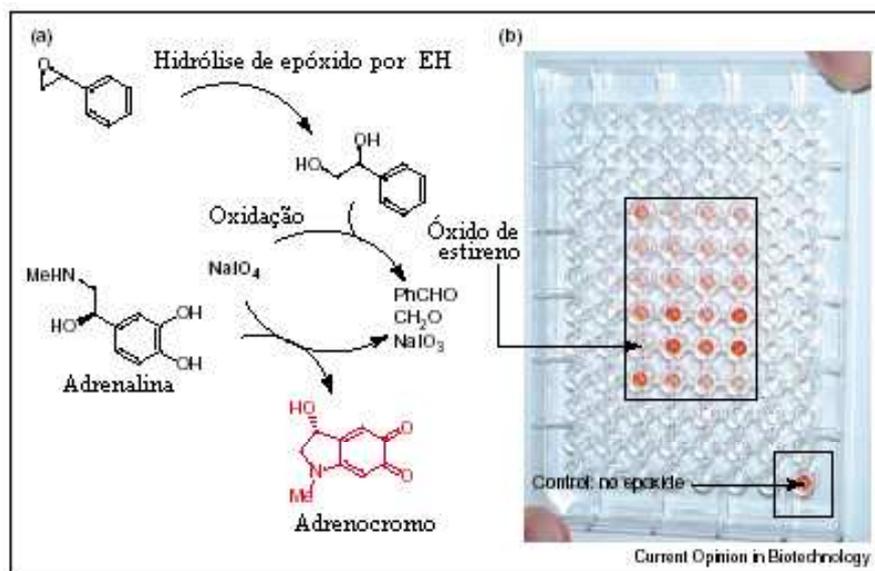
<sup>59</sup> Sordè, N.; Das, G.; Matile, S. *P. Natl. Acad. Sci. USA*, **2003**, *100*, 11964-11969.

A detecção indireta do produto também pode ser realizada pelo princípio de retro-titulação. Wahler e Reymond<sup>60</sup> demonstraram este fundamento num teste chamado “teste de adrenalina”. Este é um método colorimétrico baseado na retro-titulação de periodato de sódio. Durante ou após a reação enzimática, uma quantidade conhecida de periodato de sódio é adicionada para reagir com o 1,2-diol ou 1,2-aminoálcool, produtos de catálise enzimática empregando substratos como ésteres, amidas, fosfatos ou epóxidos. O periodato de sódio remanescente é então retro-titulado pela adição de um excesso de adrenalina, a qual reage quantitativa- e instantaneamente com o periodato de sódio para formar o adrenocromo de cor vermelha (**Esquema 14a**).<sup>61</sup> Conseqüentemente, a formação do produto resultante da atividade enzimática é inversamente proporcional à formação do adrenocromo; quanto menos intensa for a cor da mistura reacional, mais produto estará presente na mistura reacional (**Esquema 14b**). Este ensaio é compatível com várias condições operacionais, incluindo a utilização de co-solvente e diferentes valores de pH. Esta metodologia foi utilizada para testar a hidrólise de óleo vegetal e tributirina por lipases e esterases, abertura de epóxidos por epóxido-hidrolases e hidrólise de ácido fítico por fitases. Também foi empregada para triagem de esterases utilizando um arranjo de carboidratos poliacetilados.<sup>62</sup>

<sup>60</sup> Wahler, D.; Reymond, J.-L. *Angew. Chem. Int. Edit.* **2002**, *41*, 1229-1232.

<sup>61</sup> Goddard, J.-P.; Reymond, J.-L. *Curr. Opin. Biotech.* **2004**, *15*, 314-322.

<sup>62</sup> Wahler, D.; Boujard, O.; Lefèvre, F.; Reymond, J.-L. *Tetrahedron* **2004**, *60*, 703-710.

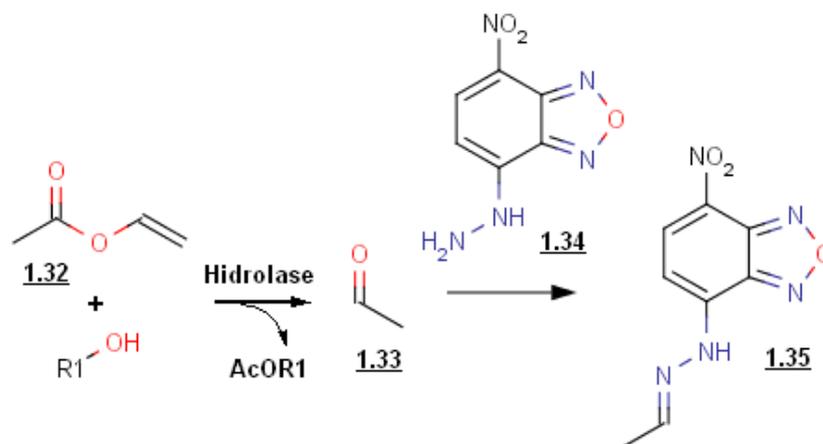


**Esquema 14** - (a) Princípio da detecção por retro-titulação de periodato no teste de adrenalina; (b) Visualização dos resultados pela intensidade da cor. Quanto menos intensa a coloração, maior será o consumo de periodato pelo produto da reação enzimática.<sup>61</sup>

### 1.3.2.2 Ensaio com detecção em tempo real

O monitoramento de uma reação enzimática no tempo real é possível sempre que o sensor de detecção não interfere na reação enzimática. Alguns dos testes mencionados acima também servem para monitoramento em tempo real. Como por exemplo, o teste para detecção de amidase com o reagente 7-cloro-4-nitrobenzofurazana (**Esquema 15**). De maneira análoga, a formação de hidrazona fluorogênica **1.35** por meio de 7-hidrazino-4-nitrobenzofurazana **1.34** permite monitorar em tempo real a liberação de acetaldeído **1.33** a partir de um éster vinílico **1.32** catalisada por lipases ou esterases em solvente orgânico<sup>63</sup> (**Esquema 15**).

<sup>63</sup> Konarzycka-Bessler, M.; Bornscheuer, U.T. *Angew. Chem. Int. Edit.* **2003**, *42*, 1418-1420.



**Esquema 15** – Detecção de lipases e esterases. Utilização de um éster vinílico qualquer e a 7-hidrazino-4-nitrobenzofurazana permite o monitoramento da reação catalisada por hidrolases pela fluorescência.<sup>63</sup>

Outro exemplo constitui o monitoramento da atividade de DNA nucleases utilizando-se um corante seletivo de dupla-hélice (PicoGreen<sup>®</sup>). Neste teste, a atividade é detectada continuamente pela diminuição da intensidade de fluorescência induzida pela liberação do corante.<sup>64</sup>

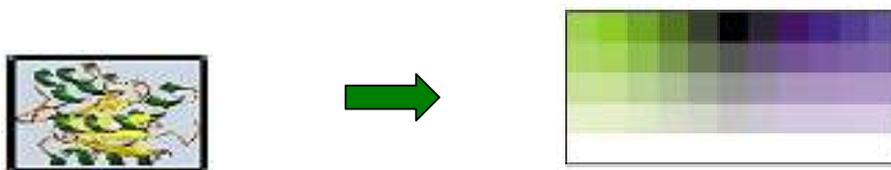
Além dos corantes e reagentes fluoro/cromogênicos, os complexos organometálicos também são utilizados em triagens enzimáticas. Por exemplo, o complexo calceína-cobre (não fluorescente) foi utilizado para monitorar as atividades de acilases, aminopeptidases e proteases.<sup>65</sup> Na presença de aminoácidos (produto da reação catalítica) na faixa de 0,1 a 1 mM, a reação resultante apresenta fluorescência verde 10 vezes mais intensa, devido ao deslocamento do cobre dentro do complexo calceína-cobre por aminoácidos quelantes, permitindo o monitoramento indireto da atividade enzimática através da fluorescência liberada pela calceína livre.

<sup>64</sup> Tolun, G.; Myers, R.S. *Nucleic Acids Res.* **2003**, *31*, e111 (6 paginas).

<sup>65</sup> Dean, K.E.S.; Klein, G.; Renaudet, O.; Reymond, J.-L. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2003**, *13*, 1653-1656.

**“Fingerprint” enzimático (Impressão digital)**

Como mencionado acima, um ensaio enzimático é uma ferramenta que permite visualizar a atividade de uma enzima. Na sua expressão mais simples é possível transformar uma atividade enzimática numa imagem de duas cores, por exemplo, branco poderia significar “*inativa*” e o preto, “*ativa*”. Esta imagem pode tomar maior nível de definição ao se adotar uma graduação de cor. Isto é possível pela obtenção de dados quantitativos dos ensaios. A imagem assim obtida de funções enzimáticas é chamada de “*impressão digital*” da atividade ou “*fingerprint*” enzimático (**Figura 3**).

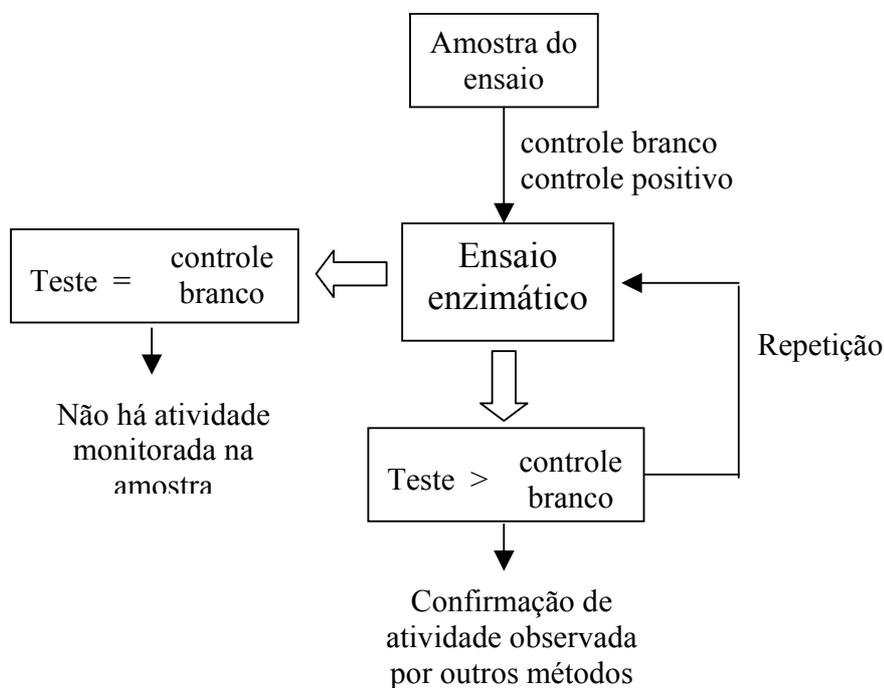


**Figura 3** –Impressão digital (“fingerprint”) da atividade enzimática. Cada cor indica uma atividade enzimática determinada cuja intensidade e cor está relacionada à atividade enzimática.<sup>35</sup>

A impressão digital da atividade enzimática de microrganismos não é um conceito novo, pois é utilizada desde a década de 1960 para identificação rotineira de microrganismos frente a dezenove substratos que reagem seletivamente com um tipo de enzima (API-ZYM comercializado por Biomerieux Inc).<sup>66</sup> Atualmente, a meta é coletar simultaneamente dados das atividades enzimáticas com substratos variados e/ou condições operacionais diferentes. Assim, a impressão digital permitiria utilizar o perfil de atividade para rotular e identificar uma enzima ou microrganismo, o qual constitui o pré-requisito para todas as aplicações dos ensaios enzimáticos.

<sup>66</sup> (a) <http://www.biomerieux.com> (b) Garcia-Martos, P.; Marin, P.; Hernandez-Molina, L.M.; Garcia-Agudo, L.; Aoufi, S.; Mira, J. *Mycopathologia* **2001**, *150*, 1-4.

As metodologias acima mencionadas constituem os ensaios de triagem de médio e alto desempenho mais importantes, lembrando que não há um ensaio enzimático universal e muitos deles se complementam. Assim, o desenvolvimento de novos ensaios de HTS para avaliação da atividade enzimática e excessos enantioméricos continua sendo uma área em expansão. Entretanto, é importante ressaltar que os resultados positivos obtidos nos ensaios enzimáticos por triagem de alto desempenho devem sempre ser confirmados por outros métodos independentes, *i.e.* biocatálise convencional\* (**Esquema 16**).



**Esquema 16** - Princípio de HTS para ensaios enzimáticos. O sinal produzido pela amostra-teste deve ser comparado ao controle branco (somente reagentes e soluções) e a uma enzima ativa como controle positivo. A confirmação final deve ser realizada por outros meios para o propósito desejado.

\* O termo “biocatálise convencional” utilizado neste trabalho se refere às reações biocatalíticas em pequenas escalas, entre 20-50 mL de meio reacional, realizadas em erlenmeyer.

---

# *Objetivos*

---



## 2. OBJETIVOS

O Brasil apresenta grande biodiversidade de microrganismos<sup>67</sup> com alto potencial para a descoberta de novas enzimas;<sup>68</sup> entretanto, eles são pouco explorados e para utilizá-los eficientemente, eles devem ser avaliados através de um estudo sistemático.

Os estudos realizados no grupo até o momento, na linha de biocatálise, focalizaram reações de oxidação por monooxigenases (oxidações de derivados de enxofre, e oxidações tipo Baeyer-Villiger) e hidrólise de epóxidos por epóxido-hidrolases. Durante esta trajetória, foi ponderado que o tempo dedicado em triagens biocatalíticas deveria ser otimizado com ensaios mais rápidos e menos dispendiosos. Neste contexto, foi considerado a triagem de alto desempenho uma tecnologia fundamental para a procura de novos catalisadores da biodiversidade.

Dada a importância da grande biodiversidade dos microrganismos no Brasil, o objetivo geral deste trabalho é implementar metodologias de triagens rápidas para detecção de epóxido-hidrolases e monooxigenases utilizando células íntegras com os seguintes objetivos específicos:

1. Implementar triagens enzimáticas de alto desempenho com sondas fluorogênicas;
2. Implementar triagens enzimáticas de alto desempenho com substratos “não modificados”;
3. Legitimar os resultados obtidos nas triagens de alto desempenho por biocatálise convencional.

---

<sup>67</sup> Pfenning, L.H. *Diversity of microfungi* In: *Biodiversity in Brazil: A First Approach*. Bicudo, C.E.M. and Menezes, N.A. (Eds), Brasília: CNPq, **1996**. p. 65-80.

<sup>68</sup> Strobel, G.A. *Crit. Rev. Biotechnol.* **2002**, 22, 315-333.

---

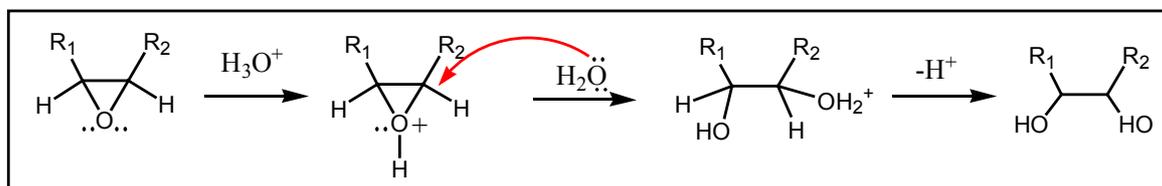
# *Triagem de epóxido-hidrolases*

---

### 3. TRIAGEM DE EPÓXIDO-HIDROLASES

#### 3.1. CONSIDERAÇÕES GERAIS

Nos sistemas vivos os epóxidos são formados por metabolismo oxidativo com a participação de monooxigenases do tipo citocromo P450. A tensão angular do anel de três átomos confere uma reatividade particular aos epóxidos. A abertura dos epóxidos em meios aquosos ácidos ou básicos produz o respectivo diol de acordo com o **Esquema 17**.



**Esquema 17** - Reação de abertura do epóxido em meio ácido aquoso.

Os epóxidos são tipicamente instáveis, reagem com nucleófilos e foram apontados como mutagênicos e carcinogênicos.<sup>69</sup> Conseqüentemente, é de vital importância, para os organismos vivos, regular os níveis destes epóxidos. Em geral, as epóxido-hidrolases convertem esses compostos em dióis vicinais pela adição régio- e estereoespecífica de uma molécula de água, transformando os substratos em produtos mais solúveis em água e menos tóxicos.

Do ponto de vista da química sintética os epóxidos quirais e dióis vicinais são intermediários-chave na síntese de uma série de compostos biologicamente ativos com elevado valor comercial.<sup>70</sup> Os epóxidos quirais podem ser obtidos através de vários métodos catalíticos interessantes e eficientes, entre os quais podemos citar a epoxidação de Sharpless e método de Jacobsen-Katsuki, os quais

<sup>69</sup> Adams, Jr. J.D.; Yagi, H.; Levin, W.; Jerina, D.M. *Chem. Biol. Interact.* **1995**, *95*, 57-77.

<sup>70</sup> a) Mischitz, M.; Faber, K. *Synlett* **1996**, *10*, 978-980. b) Weijers, C.A.G.M.; de Bont, J.A.M. *J. Mol. Catal. B-Enzym.* **1998**, *5*, 79-83.

forneem epóxidos com alto excesso enantiomérico e alto rendimento.<sup>71</sup> Entretanto, estas metodologias apresentam certas limitações que dependem da estrutura do substrato. Neste contexto, as epóxido-hidrolases constituem uma alternativa interessante, pois são biocatalisadores de fácil utilização e importantes para a síntese de intermediários quirais valiosos.<sup>72</sup>

### 3.1.1 Ocorrências e tipos de epóxido-hidrolases

As epóxido-hidrolases (EC 3.3.2.3) pertencem a uma sub-categoria de um amplo grupo de enzimas hidrolíticas que inclui esterases, proteases, desalogenases e lipases, e são enzimas que não necessitam de cofatores para atuarem.<sup>73</sup> Tais enzimas são encontradas em todos os tipos de organismos vivos, incluindo insetos, plantas e microrganismos e agem sobre uma grande variedade de epóxidos.<sup>74</sup>

Nos mamíferos há no mínimo 5 formas de epóxido-hidrolases (EH) que são química- e imunologicamente distintas<sup>75</sup>: a) colesterol 5,6-óxido hidrolase; b) hepoxilina A<sub>3</sub> hidrolase; c) leukotrieno A<sub>4</sub> hidrolase; d) epóxido-hidrolase solúvel e) epóxido-hidrolase microssomal (**Figura 4**). Dentre elas, apenas as duas últimas são conhecidas pela sua ação enzimática sobre compostos xenobióticos.

---

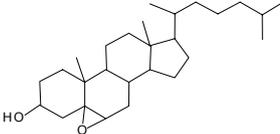
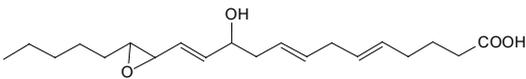
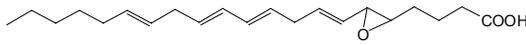
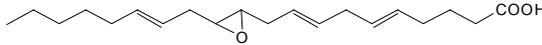
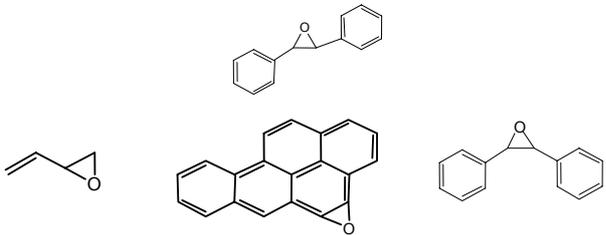
<sup>71</sup> a) Katsuki, T.; Sharpless, K.B. *J. Am. Chem. Soc.* **1980**, *102*, 5976-5978. b) Jacobsen, E.N.; Markó, I.; Mungall, W.S.; Schroder, G.; Sharpless, K.B. *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, *110*, 1968-1970. c) Kolb, H.C.; Sharpless, K.B. *Tetrahedron* **1992**, *48*, 10515-10530.

<sup>72</sup> Archelas, A.; Furstoss, R. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2001**, *5*, 112-119.

<sup>73</sup> Beetham J.K.; Grant, D.; Arand, M.; Garbarino, J.; Kiyosue, T.; Pinot, F.; Oesch, F.; Belknap, W.R.; Shinozaki, K.; Hammock, B.D. *DNA Cell Biol.* **1995**, *14*, 61-71.

<sup>74</sup> Weijers, C.A.G.M.; de Bont, J.A.M. *J. Mol. Catal. B-Enzym.* **1999**, *6*, 199-214.

<sup>75</sup> Fretland, A.J.; Omiecinski, C.J. *Chem. Biol. Interact.* **2000**, *129*, 41-59.

Epóxido hidrolases	Substratos
Colesterol óxido hidrolase	
Hepoxilina A <sub>8</sub> hidrolase	
Leukotriena A <sub>4</sub> hidrolase	
Epóxido hidrolase solúvel (EHs)	
Epóxido hidrolase microsomal (EHm)	

**Figura 4** - Diferentes tipos de EH de mamíferos com seus substratos.<sup>75</sup>

Em geral, as epóxido-hidrolases microsossomais (EHm) são eficientes para abertura de epóxidos mono e *cis*-dissubstituídos ligados a grupos lipofílicos, enquanto que as epóxido-hidrolases solúveis (EHs) são melhores para a abertura de epóxidos tri e tetra substituídos com geometria *trans*.<sup>76</sup> A EHm se diferencia das outras epóxido-hidrolases pois parece estar principalmente orientada para o metabolismo de compostos xenobióticos.<sup>77</sup> Substratos típicos incluem compostos tóxicos e pró-carcinogênicos, assim também os epóxidos derivados de drogas anticonvulsivas comumente utilizadas na terapia moderna.<sup>78</sup>

Epóxido-hidrolases de origem microbiana incluem as enzimas encontradas em bactérias, fungos e leveduras. As epóxido-hidrolases de origem bacteriana

<sup>76</sup> a) Ota, K.; Hammock, B.D. *Science* **1980**, *207*, 1479-1483. b) Halarnkar, P.P.; Zadeh, J.N.; Kuwano, E.; Jones, A.D.; Hammock, B.D. *Arch. Biochem. Biophys.* **1992**, *294*, 586-596.

<sup>77</sup> Oesch, F. *Xenobiotica* **1972**, *3*, 305-315.

<sup>78</sup> a) Hartsfield, J.K.; Holmes Jr, L.B.; Morel, J.G. *Biochem. Mol. Med.* **1995**, *56*, 131-143. b) Bellucci, G.; Berti, G.; Chiappe, C.; Lippi, A.; Marioni, F. *J. Med. Chem.* **1987**, *30*, 768-773.

foram estudadas por Faber e colaboradores,<sup>79</sup> utilizando, principalmente, bactérias do gênero *Rhodococcus*, *Mycobacterium*, *Arthrobacter*, *Mycoplasma*, *Nocardia* e *Corynebacterium*.

Epóxido-hidrolases de bactérias são ferramentas acessíveis em síntese orgânica devido a sua produção em larga escala. Entretanto, cada enzima tem suas limitações quanto ao tipo de substrato e também quanto à enantiosseletividade.

Furstoss e colaboradores<sup>80a</sup> e Archelas<sup>80b</sup> realizaram experimentos de hidrólise de epóxidos utilizando fungos filamentosos como *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, *Beauveria sulfurescens*, *Absidia coerulea*, *Acremonium alternatum*, *Mortierella isabellina*, *Chaetomium globosum* e *Syncephalastrum racemosum*, entre outros. Estas enzimas estão presentes nas células dos fungos crescidos em fontes simples de carbono, tais como glicose ou milhaina.

Botes e colaboradores<sup>81</sup> trabalharam com epóxido-hidrolases de leveduras *Rhodosporidium toruloides*, *Rhodotorula glutinis*, *Rhodotorula araucaria*, *Rhodotorula rubra*, *Trichosporon mucoides* e *Trichosporon jirovecii*. Estes microrganismos são fáceis de serem cultivados em grande escala e o processo de purificação do substrato pode ser realizado por meio de centrifugação das células inteiras.

---

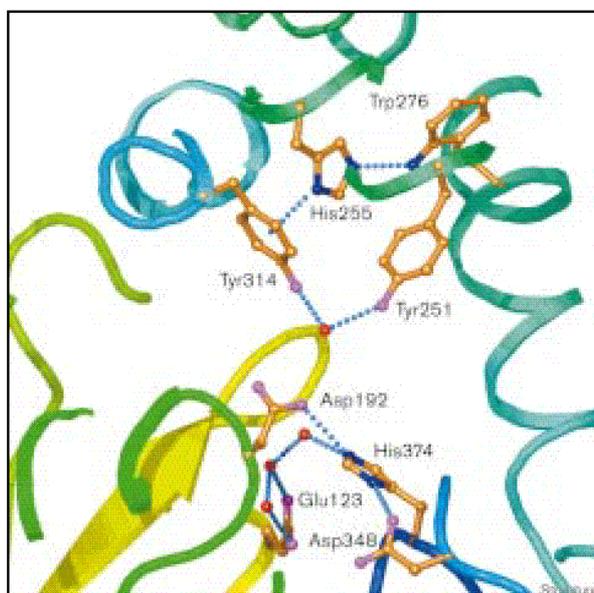
<sup>79</sup> a) Steinreiber, A.; Mayer, S.F.; Saf, R.; Faber, K. *Tetrahedron-Asymmetr.* **2001**, *12*, 1519-1528. b) Mayer, S.F.; Steinreiber, A.; Orru, R.V.A.; Faber, K. *Tetrahedron-Asymmetr.* **2001**, *12*, 41-43. c) Orru, R.V.A.; Mayer, S.F.; Kroutil, W.; Faber, K. *Tetrahedron* **1998**, *54*, 859-874.

<sup>80</sup> a) Pedragosa-Moreau, S.; Archelas, A.; Furstoss, R. *Tetrahedron Lett.* **1996**, *37*, 3319-3322. b) Archelas, A. *J. Mol. Catal. B-Enzym.* **1998**, *5*, 79-85. c) Archelas, A. *J. Mol. Catal. B-Enzym.* **1998**, *5*, 213-217.

<sup>81</sup> Botes, A.L.; Weijers, C.A.G.M.; Botes, P.J.; van Dyk, M.S. *Tetrahedron-Asymmetr.* **1999**, *10*, 3327-3336.

### 3.1.2 Estrutura e mecanismo de reação de epóxido-hidrolases

Uma descoberta interessante é a similaridade entre as EHs de *A. niger* e EHm de mamíferos. A proteína obtida desta espécie possui a tríade catalítica similar à tríade das espécies de mamíferos e pertence ao grupo das enzimas  $\alpha/\beta$ -hidrolases. A estrutura da epóxido-hidrolase de *A. niger* consiste de um dímero formado de duas subunidades de 44 kDa e foi elucidada por cristalografia de raio-X utilizando o método de Dispersão Anômala de Multi-Comprimento de Ondas.<sup>82</sup>



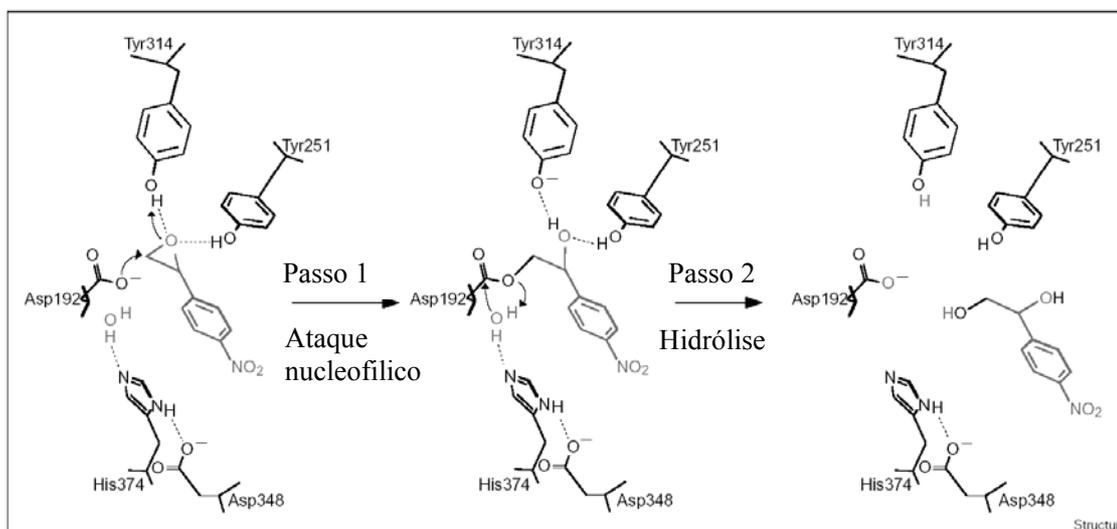
**Figura 5** - Tríade catalítica de epóxido-hidrolases de *Aspergillus niger* (Asp-192, His-374 e Asp-348) e as interações de ligações de hidrogênio mais importantes com os outros aminoácidos e moléculas de água.<sup>82</sup>

Na **Figura 5** observa-se o sítio catalítico formado pelo resíduos de ácido aspártico (Asp-192), a histidina (His-374) e o ácido aspártico (Asp-348). A

<sup>82</sup> Zou, J.; Hallberg, B.M.; Bergfors, T.; Oesch, F.; Arand, M.; Mowbray, S.L.; Jones, T.A. *Structure* **2000**, *8*, 111-122.

molécula de água (em vermelho), indica a posição do oxigênio do anel oxirano interagindo com duas tirosinas (Tyr-251 e Tyr-314). O chamado “sistema de interação de carga” (formado pelos resíduos His-374 e Asp-348 com a assistência do ácido glutâmico Glu-123) promove um reservatório de água perto do sítio ativo.<sup>82</sup>

A ligação inicial e posicionamento do substrato no sítio ativo da enzima ocorre provavelmente através da formação de ligação de hidrogênio entre o oxigênio do anel e os grupos hidroxilas de Tyr-251 e Tyr-314 (**Esquema 18**). No primeiro passo da reação enzimática, um dos átomos de carbono do anel oxirano sofre um ataque nucleofílico do grupo carboxilato lateral de Asp-192, dando lugar a formação de um éster intermediário (substrato-enzima) com a abertura do anel. O processo é facilitado através da doação simultânea de próton por um dos resíduos de tirosina. O segundo passo da reação consiste na hidrólise do éster intermediário por uma molécula de água no centro catalítico.<sup>82</sup> Esta molécula de água é ativada através da abstração de próton por His-374 e Asp-348 (ligados por pontes de hidrogênio) como um sistema de interação de carga, possivelmente assistido pelo resíduo Glu-123.



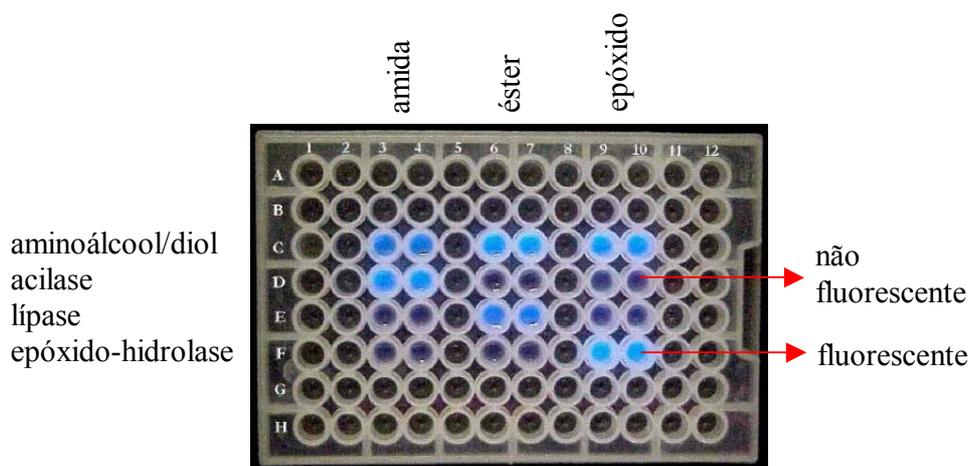
**Esquema 18** - Mecanismo de hidrólise do óxido de 4-nitroestireno pela EH de *Aspergillus niger*. Os resíduos estão desenhados de maneira que sejam o mais semelhante possível a suas posições e orientações reais. O primeiro passo catalítico é o determinante da velocidade da reação.<sup>82</sup>

### 3.2 TRIAGEM ENZIMÁTICA DE ALTO DESEMPENHO COM SONDAS FLUOROGÊNICAS PARA DETECÇÃO DE EPÓXIDO-HIDROLASES

Dentre as metodologias na literatura para epóxido-hidrolases foi escolhida a metodologia baseada na detecção através da fluorescência, desenvolvida pelo grupo do Prof. Dr. Reymond (**Esquema 6**, pag. 14). A detecção por fluorescência é de alta sensibilidade tornando a miniaturização deste ensaio bem mais fácil que os métodos tradicionais. Uma reação biocatalítica convencional requer aproximadamente 15 a 30 mg de substrato, considerando que a concentração recomendada dele é de 0,5 a 1,0 mg/mL (volume de reação = 30 mL). Entretanto, a triagem baseada em fluorescência utiliza tipicamente entre

0,004 a 0,01 mg de substrato por ensaio, reduzindo, desta maneira, a quantidade de substrato utilizado em milhares de vezes.

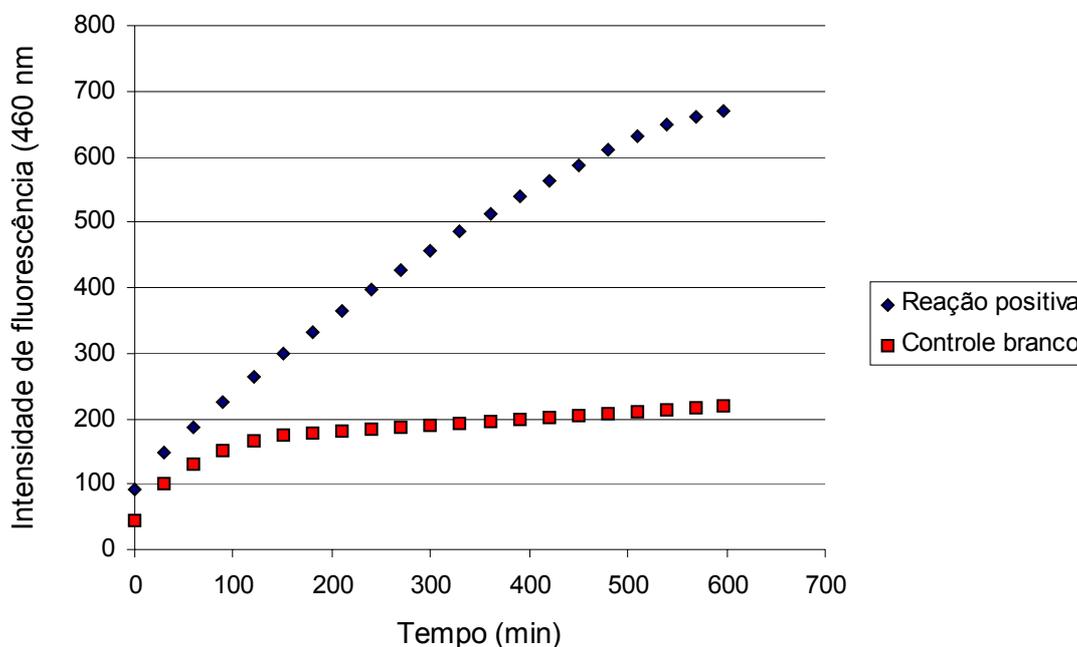
Estes experimentos são realizados em microplacas e a velocidade das reações pode ser acompanhada através da leitura/registro da fluorescência, sendo que esta é associada à liberação de umbeliferona no meio, a qual, por sua vez, é associada à biotransformação do substrato (**Figura 6**).



**Figura 6-** Reações específicas entre as sondas fluorogênicas catalisadas pela enzima correspondente e os respectivos controles positivos (aminoálcool e diol) Condições: 100 mg/mL de enzima, 100  $\mu$ M de substrato, 1 mM de  $\text{NaIO}_4$ , 2 mg/mL de BSA, 20 mM de tampão borato (pH 8,8), 30 min.<sup>10</sup>

Usualmente, os dados da intensidade de fluorescência obtidos ao longo do ensaio são processados e apresentados em gráficos, como ilustrado na **Figura 7**, para facilitar uma rápida comparação entre as reações de diferentes enzimas ou contra o controle branco, no qual a leitura final calculada é simplesmente a diferença entre a média das leituras com enzima (azul) e a média dos controles brancos (reação sem enzima, vermelho). Também é possível calcular a velocidade inicial da catálise; nesse caso, a fluorescência é convertida em

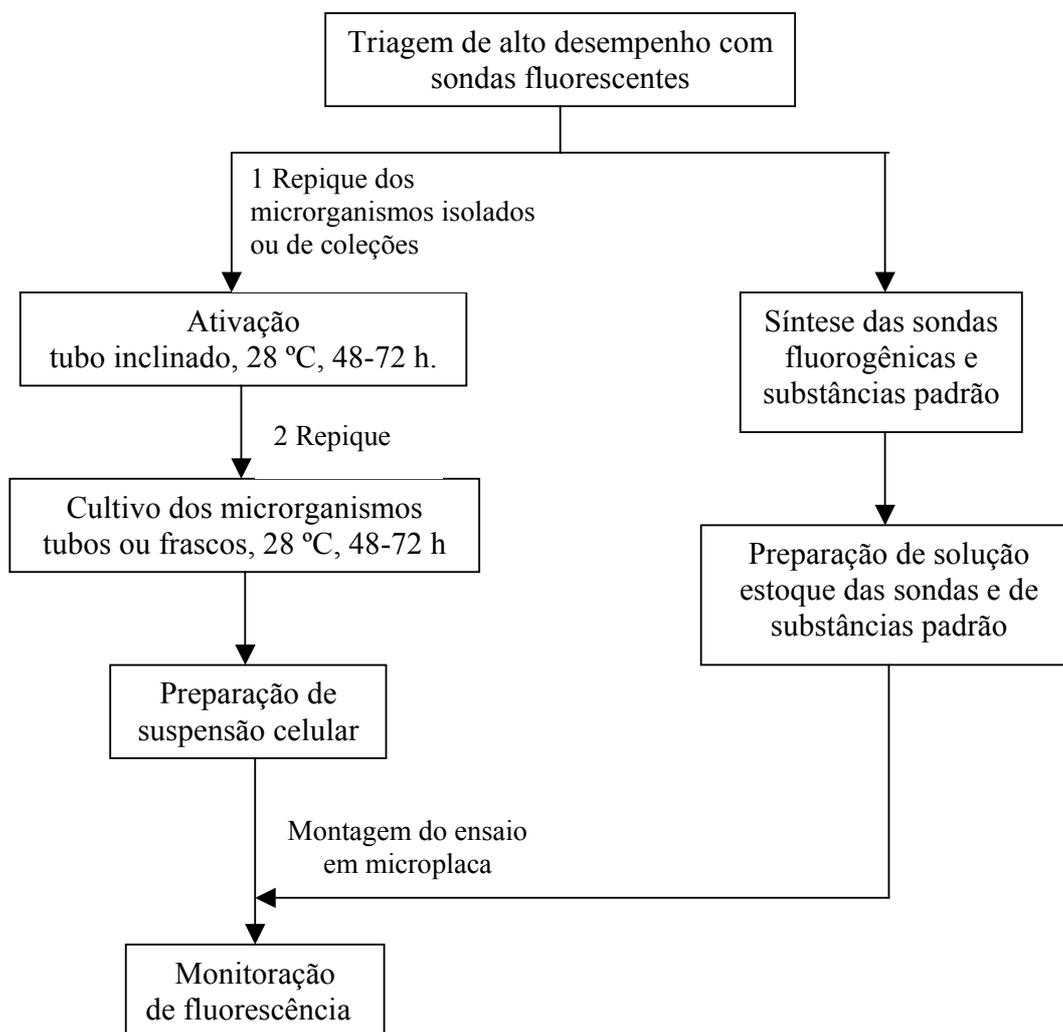
concentração de umbeliferona utilizando uma curva de calibração da umbeliferona na mesma condição do ensaio.



**Figura 7**– Um exemplo gráfico de uma reação enzimática positiva e o respectivo controle branco.

A aplicação da triagem de alto desempenho como ferramenta de rotina possibilita uma rápida construção de bancos de dados sobre o potencial enzimático de qualquer conjunto de microrganismos, e a possibilidade de fazê-lo a custo relativamente baixo torna os ensaios fluorogênicos altamente atraentes. No entanto, esta metodologia havia sido apenas aplicada a hidrolases purificadas necessitando de adaptação para triagem em células microbianas.<sup>21</sup>

Os ensaios de triagem de alto desempenho foram realizados de acordo com o experimento geral apresentado no **Fluxograma 2**, no qual as etapas iniciais foram as sínteses das sondas fluorogênicas.

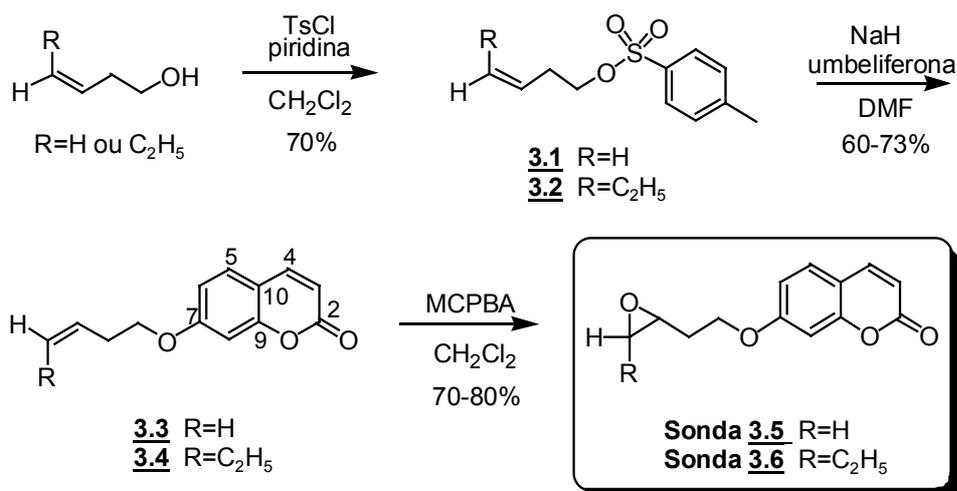


**Fluxograma 2** - Procedimento geral dos experimentos de triagem de alto desempenho.

### 3.3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

#### 3.3.1 Preparação das sondas fluorogênicas 3.5 e 3.6

A preparação dos epóxidos 3.5 e 3.6 (terminal e dissubstituído) derivados de umbeliferona (7-hidroxi-2H-1-benzopirran-2-ona), utilizados como sondas fluorescentes para epóxido-hidrolases, foi realizada conforme o **Esquema 19**.



**Esquema 19-** Rota sintética para a obtenção das duas sondas **3.5** e **3.6** para HTS de epóxido hidrolases.

Os tosilatos **3.1** e **3.2** foram facilmente obtidos, a partir dos álcoois correspondentes, com 70% de rendimento.<sup>83,84</sup> Os derivados tosilados apresentaram nos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  sinais entre  $\delta_{\text{H}}$  7,80 e 7,30 atribuídos aos hidrogênios do anel aromático e em  $\delta_{\text{H}}$  2,40 à metila do grupo tosila. No espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  revelou a presença de dois carbonos quaternários em  $\delta_{\text{C}}$  de 144,7 e 133,1 atribuídos aos carbonos benzênicos substituídos.

A alquilação da umbeliferona<sup>85</sup> com os tosilatos **3.1** e **3.2** na presença de NaH,<sup>86</sup> forneceu os compostos **3.3** e **3.4** com rendimentos médios de 60% - 70%. O sucesso das reações pode ser comprovado pelos espectros de RMN de  $^1\text{H}$ , que revelou a presença de sinais entre  $\delta_{\text{H}}$  7,60 a 6,20 atribuídos aos hidrogênios aromáticos da umbeliferona. A presença dos quatro carbonos quaternários em  $\delta_{\text{C}}$  162,0 (C7), 161,1 (C2), 155,7 (C9) e 112,4 (C10) para **3.3** e  $\delta_{\text{C}}$  162,2, 161,2,

<sup>83</sup> Ren, X.; Tuross, E.; Lake, C.H.; Churchill, M.R. *J. Org. Chem.* **1995**, *60*, 6468-6483.

<sup>84</sup> Kabalka, G.W.; Varma, M.; Varma, R.S. *J. Org. Chem.* **1986**, *51*, 2386-2388.

<sup>85</sup> Klein, G.; Reymond, J.-L. *Helv. Chim. Acta* **1999**, *82*, 400-406.

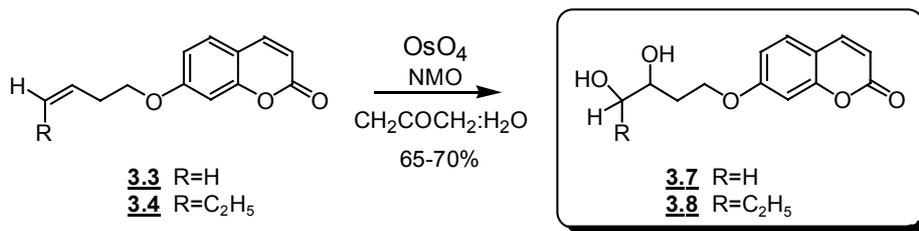
<sup>86</sup> Bhatia, S.K.; Hajdu, J. *J. Org. Chem.* **1988**, *53*, 5034-5039.

155,8 e 112,4 para **3.4** nos espectros de RMN de  $^{13}\text{C}$  evidenciaram a presença da porção umbeliferila nos dois produtos.

Os compostos **3.3** e **3.4** foram convertidos em epóxidos utilizando-se o ácido metacloroperbenzóico (MCPBA),<sup>87</sup> com rendimentos de aproximadamente 70% para a sonda **3.5** e 80% para a sonda **3.6**. A formação da sonda **3.5** (epóxido terminal) foi constatada por RMN de  $^1\text{H}$  pela ausência dos sinais em  $\delta_{\text{H}}$  5,90 e 5,17 (referentes aos três hidrogênios olefínicos do material de partida **3.3**) e pela presença de sinais em  $\delta_{\text{H}}$  2,60, 2,86 e 3,17 atribuídos aos três hidrogênios do anel oxirano. De maneira análoga, a obtenção da sonda **3.6** (epóxido dissubstituído) foi constatada por RMN de  $^1\text{H}$  pela presença de sinais em  $\delta_{\text{H}}$  3,17 e 2,98 correspondentes aos dois hidrogênios do anel oxirano de **3.6** e pelo desaparecimento dos sinais em  $\delta_{\text{H}}$  5,56 e 5,42 (referentes aos hidrogênios olefínicos do material de partida **3.4**).

Os dióis **3.7** e **3.8** (**Esquema 20**), utilizados como controles positivos nos testes de HTS, foram obtidos por reação de di-hidroxilação com tetróxido de ósmio ( $\text{OsO}_4$ ) e *N*-óxido de *N*-metilmorfolina (NMO) em acetona:água (2,5:1, v/v) a partir de **3.3** e **3.4**. Os dióis foram obtidos com rendimento de 65-70% calculado após purificação. Nos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  de **3.7** e **3.8** não foram detectados os sinais correspondentes aos hidrogênios olefínicos de **3.3** e **3.4** e foram observados sinais característicos de hidrogênios carbinólicos entre  $\delta_{\text{H}}$  3,90 e 3,50. Estas informações associadas aos íons moleculares de  $m/z$  250 (18 %) e de  $m/z$  278 (8 %) confirmaram a formação dos dióis **3.7** e **3.8**.

<sup>87</sup> Chai, K.-B.; Sampson, P. *Tetrahedron Lett.* **1992**, *33*, 585-588.

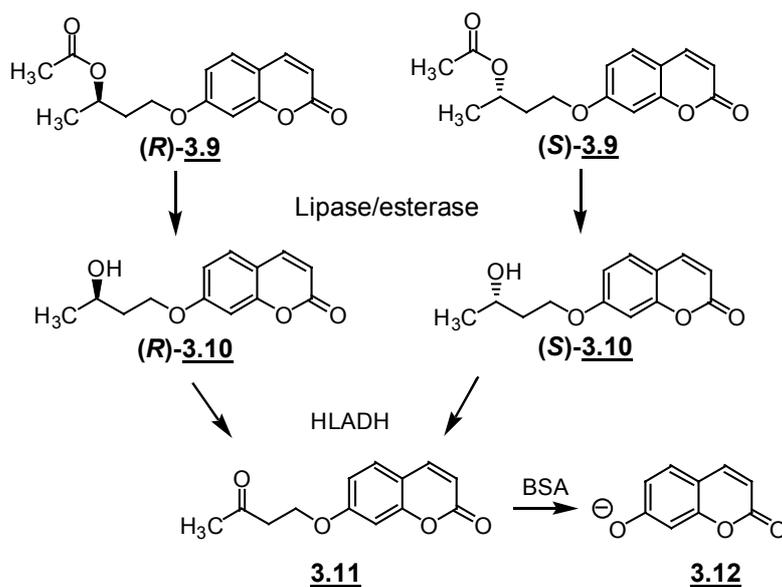


**Esquema 20** - Sínteses de dióis **3.7** e **3.8** a partir dos compostos **3.3** e **3.4**.

### 3.3.2 Sondas fluorogênicas enantiomericamente enriquecidas para detecção de epóxido-hidrolases

#### 3.3.2.1 Consideração geral

Sondas fluorescentes quirais derivadas de umbeliferona foram empregadas na determinação de enantiosseletividade da hidrólise de acetato por 30 lipases ou esterases (**Esquema 21**).<sup>88</sup>



**Esquema 21** – Ensaio baseado na leitura de fluorescência para avaliar da enantiosseletividade de lipase/esterase.<sup>88</sup>

<sup>88</sup> Klein, G., Reymond, J.-L. *Helv. Chim. Acta* **1999**, 82, 400-406.

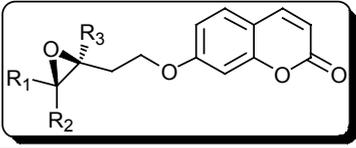
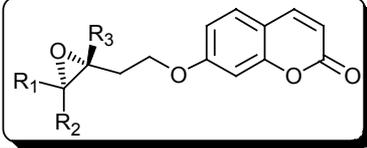
As fluorescências produzidas pela umbeliferona, provenientes das biotransformações dos substratos **(R)-3.9** e **(S)-3.9**, podem ser medidas e relacionadas às quantidades relativas de **(R)-3.10** e **(S)-3.10** para determinação de enantiosseletividades. Estes resultados foram validados pela quantificação dos álcoois **(R)-3.10** e **(S)-3.10** por cromatografia líquida de alta resolução (CLAE) com coluna quiral. Os valores de enantiosseletividades e dos excessos enantioméricos obtidos nos ensaios de HTS e CLAE apresentaram desvios de  $\pm 20\%$ .<sup>88</sup> O princípio desta idéia foi utilizado para a determinação de *ee* de outras enzimas, tais como acilases, epóxido-hidrolases, álcool desidrogenases, aldolases e fosfatases.<sup>89</sup> Vale lembrar que a desvantagem inerente da utilização de um substrato fluorogênico e cromogênico se aplica aqui também, além da inconveniência de determinar o excesso enantiomérico com os enantiômeros em experimentos separados. No entanto, espera-se que este tipo de abordagem seja útil e possa ser utilizada em testes preliminares de atividade enzimática.

### 3.3.2.2 Sondas para detecção de EH enantiomericamente enriquecidas

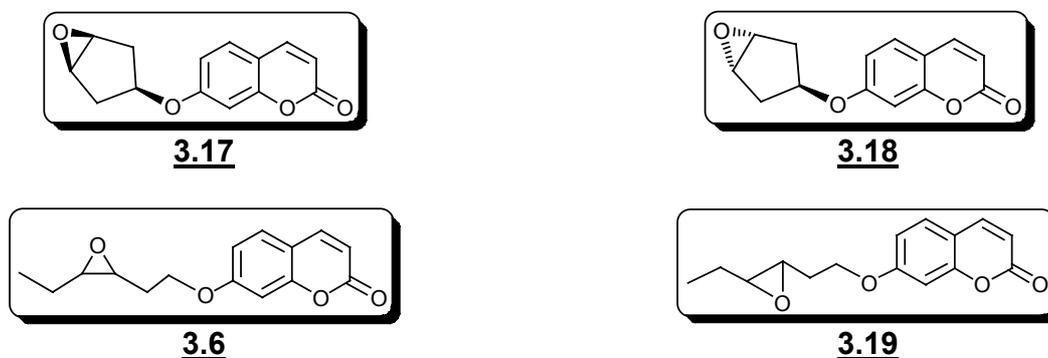
As sondas quirais **3.13** – **3.16** (Tabela 2) foram sintetizadas no grupo do Prof. Reymond.<sup>35</sup>

<sup>89</sup> a) Leroy, E.; Bense, N.; Reymond, J.-L. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2003**, *13*, 2105-2108. b) Lagarde, D.; Nguyen, H.-K.; Ravot, G.; Wahler, D.; Reymond, J.-L.; Hills, G.; Veit, T.; Lefevre, F. *Org. Process Res. Dev.* **2002**, *6*, 441-445. c) Reymond, J.-L.; Wahler, D. *ChemBioChem* **2002**, *3*, 701-708.

**Tabela 2** – Epóxidos quirais utilizados na detecção da enantiosseletividade de epóxido-hidrolases em microrganismos.

	$R_1$	$R_2$	$R_3$	
( <i>S</i> )- <b>3.13</b>	H	H	H	( <i>R</i> )- <b>3.13</b>
( <i>S</i> )- <b>3.14</b>	H	H	CH <sub>3</sub>	( <i>R</i> )- <b>3.14</b>
( <i>S</i> )- <b>3.15</b>	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	H	( <i>R</i> )- <b>3.15</b>
( <i>S,S</i> )- <b>3.16</b>	C <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	H	H	( <i>R,R</i> )- <b>3.16</b>

Neste conjunto de ensaios também foram empregados dois epóxidos meso, **3.17** e **3.18**, assim como os epóxidos racêmicos **3.6** e **3.19** para verificar a estereosseletividade *cis/trans*. (**Figura 8**), totalizando um conjunto de 12 sondas.



**Figura 8** – Outros substratos utilizados nesta parte do trabalho na determinação de seletividade de epóxido-hidrolases.

Estas quatro sondas (**Figura 8**) foram gentilmente cedidas pelo Prof. Reymond para os testes de epóxido-hidrolases enantiosseletivas.

Para facilitar a leitura, todos os substratos fluorogênicos utilizados nos experimentos de HTS para detecção de epóxido-hidrolases estão ilustrados juntos novamente na **Figura 9**



foram feitas frente a duas epóxido-hidrolases isoladas (EH de *A. niger* e de *R. glutinis*).<sup>21</sup>

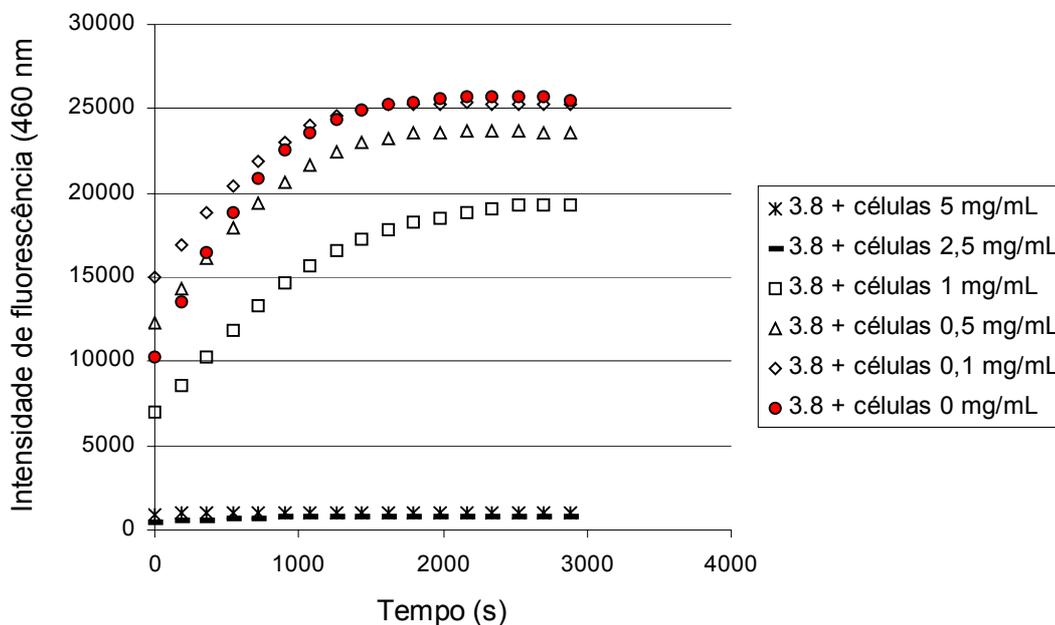
Visando adaptar este sistema para células íntegras, foi avaliada a influência das células microbianas sobre os reagentes utilizados no HTS. A principal preocupação foi com o consumo de NaIO<sub>4</sub> por polióis (sacarídeos) ligados à parede celular microbiana ou pela adsorção do álcool formado dentro das células, impedindo a oxidação deste e, conseqüentemente, a liberação de fluorescência.<sup>28</sup>

A influência da massa celular microbiana na leitura dos resultados da triagem de alto desempenho foi avaliada pela Dra. Beatriz Bicalho utilizando diferentes concentrações celulares de *Rodothorula glutinis* CCT 2182 frente ao diol **3.7**.<sup>91</sup> Esses experimentos permitiram estabelecer uma concentração de 0,1 mg/mL de células para bactérias e leveduras em triagens de epóxido-hidrolases.

A avaliação da influência das concentrações de células de fungos foi realizada neste trabalho utilizando *A. niger* CCT 1435 frentes aos dióis **3.7** e **3.8**. Conforme ilustrada na **Figura 10**, a suspensão celular de 0,1 mg/mL e, similarmente, de 0,5 mg/mL não prejudicaram a emissão de fluorescência (conseqüentemente permitem a detecção do produto formado), seguida pela suspensão celular de 1 mg/mL. Contrariamente, quando as suspensões celulares de *A. niger* CCT 1435 de 5 mg/mL e 2,5 mg/mL foram utilizadas a fluorescência não foi observada.

---

<sup>91</sup> Bicalho, B. “*Prospecção de antibióticos e biocatalisadores (haloperoxidasas e Baeyer-Villiger monoxigenases) em microrganismos*” Tese de doutorado, Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, **2003**.

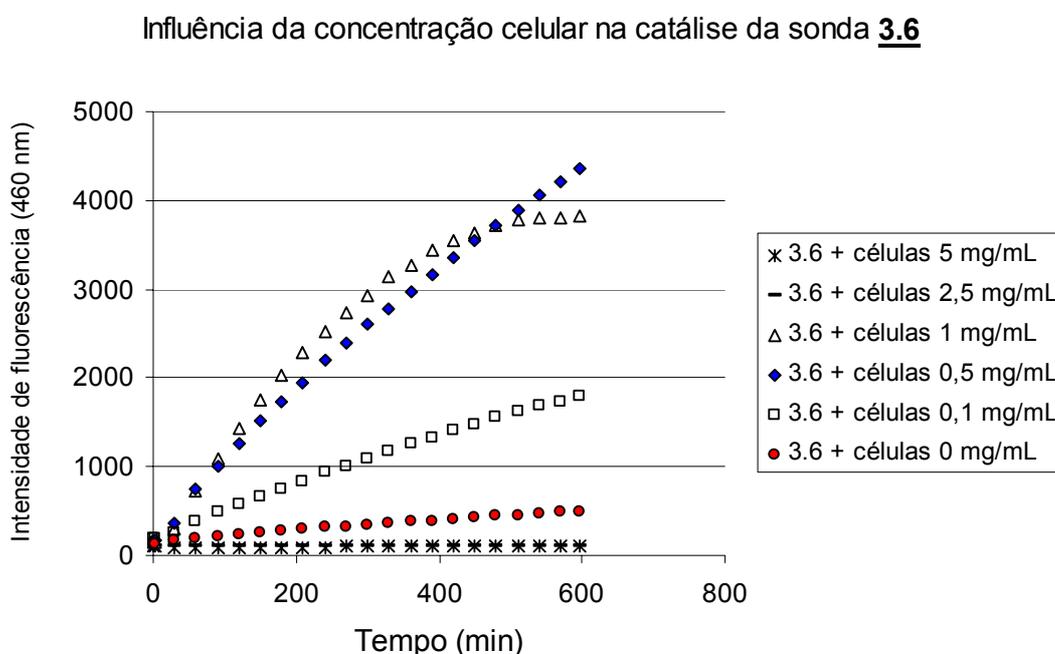


**Figura 10** – Influência da concentração celular na oxidação de **3.8** por periodato. Condições do ensaio: 100 µM de **3.8**, 1 mM de NaIO<sub>4</sub>, 2 mg/mL de BSA e diferentes suspensões celulares de *Aspergillus niger* CCT 1435 em 20 mM de tampão borato (pH 8,8).

Os resultados demonstraram que a intensidade da fluorescência é inversamente proporcional à concentração de células microbianas no meio. Isto confirmou o pressuposto de que o NaIO<sub>4</sub> poderia ser consumido por oxidação de constituintes celulares ou os dióis seriam adsorvidos pelas células. Nesses casos, os dióis formados nas reações biocatalíticas não são oxidados, interrompendo a seqüência que leva à liberação de umbeliferona.

### 3.3.3.2 Efeito das concentrações microbianas na biotransformação das sondas

Com o intuito de averiguar qual das três concentrações selecionadas anteriormente seria mais adequada para triagem da atividade enzimática (máxima emissão de fluorescência) foram avaliadas diferentes concentrações de suspensão celular com as sondas **3.5** e **3.6**. Conforme ilustra a **Figura 11**, as concentrações de 1 e 0,5 mg/mL foram as melhores, revelando uma intensa atividade enzimática deste microrganismo frente ao epóxido.

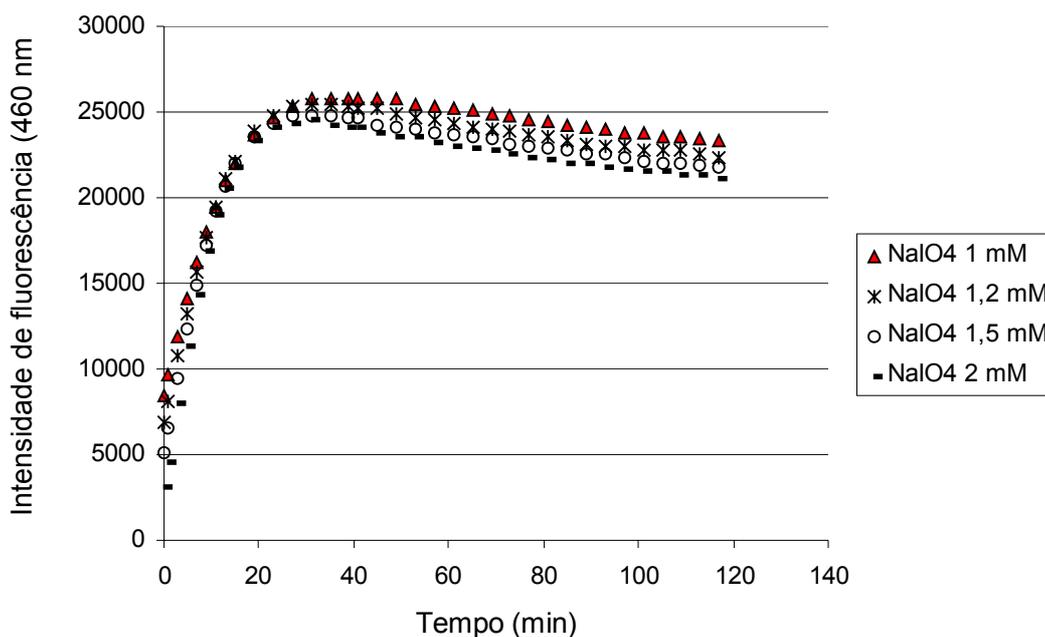


**Figura 11** -. Ensaios realizados com a sonda **3.6**, na presença de células de *A. niger* CCT 1435. Condições do ensaio: 100  $\mu$ M de **3.6**, 1 mM de  $\text{NaIO}_4$ , 2 mg/mL de BSA e diferentes suspensões celulares de *Aspergillus niger* CCT 1435 em 20 mM de tampão borato (pH 8,8).

Ponderando os dados obtidos, a concentração de 0,5 mg/mL foi considerada a melhor para os testes de rotina, levando em consideração a linearidade da resposta e diferenciação da reação controle.

### 3.3.3.3 Efeito da concentração de periodato na oxidação do diol

Uma vez estabelecida a concentração do microrganismo foi avaliada a influência do periodato de sódio na emissão de fluorescência. Foram testadas 4 concentrações de periodato: 1 mM, 1,2 mM, 1,5 mM e 2 mM utilizando o diol **3.8** na presença de *A. niger* CCT 1435 na concentração de 0,5 mg/mL (**Figura 12**). Neste experimento foi observado que as intensidades de fluorescência emitidas foram similares em diferentes concentrações de periodato de sódio.



**Figura 12** –Ensaio de oxidação do diol **3.8**, na presença de diferentes concentrações de NaIO<sub>4</sub>. Condições do ensaio: 100 μM de **3.8**, 1 a 2 mM de NaIO<sub>4</sub>, 2 mg/mL de BSA, 0,5 mg/mL de *Aspergillus niger* em 20 mM de tampão borato (pH 8,8) e diferentes concentrações de NaIO<sub>4</sub>.

Estas avaliações preliminares permitiram estabelecer que para triagens com células íntegras (**Tabela 3**) a concentração microbiana final em tampão borato pH 8,8 deverá ter 0,5 mg/mL para fungos e 0,1 mg/mL para bactérias e leveduras, e utilizando solução aquosa 1 mM de periodato de sódio.<sup>91</sup>

**Tabela 3** - Condições ótimas para detecção de epóxido-hidrolases usando células íntegras em triagens com sondas fluorescentes.

Microrganismo	Conc. celular <sup>a</sup>	Conc. celular <sup>b</sup>	Conc. de periodato
levedura/bactéria	0,1 mg/mL	0,1 mg/mL	1 mM
fungo	0,1 e 0,5 mg/mL	0,5 mg/mL	1 mM

<sup>a</sup> Concentração celular final que permite uma boa emissão de fluorescência do diol.

<sup>b</sup> Concentração celular final que resulta numa melhor observação da reação catalítica com a sonda.

### 3.3.4 Ensaio de HTS para detecção de EH por meio das sondas fluorogênicas 3.5 e 3.6

#### 3.3.4.1 Microrganismos

A maioria dos microrganismos investigados pertencem à Coleção de Culturas Tropicais - CCT - Fundação André Tosello, mas também foram incluídos microrganismos de outras coleções, como CBMAI - Coleção Brasileira de Microrganismos do Ambiente e da Indústria (CPQBA, Unicamp) e CBC - Coleção do Laboratório de Biocatálise (Unicamp) (**Tabela 4**), assim como microrganismos provenientes de água de formação de petróleo (**Tabela 5**) e linhagens isoladas do solo de várzea de Silves, Amazônia (**Tabela 6**).

**Tabela 4-** Microrganismos investigados nas de triagens de alto desempenho.

Microrganismo	Coleção Nº	Microrganismo	Coleção Nº
<i>Agrobacterium tumefaciens</i> <sup>b</sup>	CCT 6515	<i>Fusarium</i> sp. <sup>b</sup>	CBC 1018
<i>Alternaria alternata</i> <sup>a</sup>	CCT 1250	<i>Geotrichum candidum</i> <sup>b</sup>	CCT 1205
Arquea 6-10 <sup>b</sup>	CBC 2003	<i>Micrococcus luteus</i> <sup>a</sup>	CCT 2720
Arquea 2-15 <sup>b</sup>	CBC 2005	<i>Nodulisporium</i> sp. <sup>a</sup>	CCT 5552
<i>Aspergillus fumigatus</i> <sup>a</sup>	CCT 1277	<i>Pichia canadensis</i> <sup>a</sup>	CCT 2636
<i>Aspergillus niger</i> <sup>b</sup>	CCT 1435	<i>Pichia kluyeri</i> <sup>b</sup>	CCT 3365
<i>Aspergillus niger</i> <sup>a,b</sup>	CCT 4846	<i>Pichia stipitis</i> <sup>b</sup>	CCT 2617
<i>Aspergillus niger</i> <sup>a</sup>	CCT 5559	<i>Rhizopus</i> sp. <sup>a</sup>	CBC 1022
<i>Aspergillus ochraceus</i> <sup>a</sup>	CCT 1005	<i>Rhodococcus equi</i> <sup>a</sup>	CCT 0541
<i>Aspergillus oryzae</i> <sup>a,b</sup>	CCT 0975	<i>Rhodotorula glutinis</i> <sup>b</sup>	CCT 2182
<i>Aspergillus terreus</i> <sup>b</sup>	CCT 3320	<i>Rhodotorula minuta</i> <sup>b</sup>	CCT 1751
<i>Bacillus subtilis</i> <sup>b</sup>	CCT 0089	<i>Sacharomyces boulardii</i> <sup>a</sup>	CBC 3007
<i>Bacillus pumilus</i> <sup>b</sup>	CBMAI 0008	<i>Serratia liquefaciens</i> <sup>a,b</sup>	CCT 7262
<i>Candida albicans</i> <sup>a</sup>	CCT 0776	<i>Serratia marcescens</i> <sup>a</sup>	CCT 0710
<i>Citrobacter amalonaticus</i> <sup>b</sup>	CCT 4059	<i>Serratia marcescens</i> <sup>a</sup>	CCT 1480
<i>Citrobacter freundii</i> <sup>b</sup>	CCT 4055	<i>Serratia marcescens</i> <sup>a</sup>	CCT 2573
<i>Cunninghamella echinulata</i> <sup>a</sup>	CCT 4259	<i>Serratia plumuthica</i> <sup>b</sup>	CCT 4371
<i>Curvularia eragrostides</i> <sup>b</sup>	CCT 5634	<i>Serratia rubidea</i> <sup>a</sup>	CCT 1981
<i>Curvularia lunata</i> <sup>a</sup>	CCT 5628	<i>Serratia rubidea</i> <sup>b</sup>	CCT 5732
<i>Curvularia lunata</i> <sup>a</sup>	CCT 5629	<i>Trichoderma</i> sp. <sup>b</sup>	CCT 5551
<i>Drechslera halodes</i> <sup>b</sup>	CCT 5636	<i>Trichosporon cutaneum</i> <sup>b</sup>	CCT 1903
<i>Emericela nidulans</i> <sup>b</sup>	CCT 3119		

<sup>a</sup> Microrganismos ensaiados para detecção de EH com as sondas fluorogênicas **3.5** e **3.6**.

<sup>b</sup> Microrganismos ensaiados para detecção de EH com as sondas fluorogênicas quirais **3.13** – **3.16**, as sondas de epóxidos mesos **3.17-3.18**, e as sondas **3.6** e **3.19**.

**Tabela 5** – Linhagens isoladas de água de formação de petróleo<sup>a</sup> e testadas com a sonda **3.5** para epóxido-hidrolases.

Microrganismo	Número	Microrganismo	Número
<i>Bacillus</i> sp	CBC 0001	<i>Bacillus pumilus</i>	CBC 0002
<i>Bacillus megaterium</i>	CBC 0001	<i>Bacillus pumilus</i>	CBC 0003
<i>Bacillus pumilus</i>	CBC 0007	<i>Bacillus pumilus</i>	CBC 0004
<i>Bacillus pumilus</i>	CBC 0010	<i>Bacillus pumilus</i>	CBC 0006

<sup>a</sup> Linhagens isoladas pela doutoranda Suzan Pantaroto (Profa. Anita Marsaioli) e identificadas pela Dra. Valéria Maia de Oliveira (Pesquisadora, CPQBA).

**Tabela 6** - Microrganismos isolados do solo de várzea de Silves (AM)<sup>a</sup> utilizando na avaliação de epóxido-hidrolases frente as sondas **3.5** e **3.6**

Microrganismo de várzea de Silves			
AMA 1	AMA 13	AMA 26	AMA 35
AMA 3	AMA 17	AMA 27	AMA 36
AMA 4	AMA 18	AMA 28	SA 2
AMA 6	AMA 20	AMA 29	SA 5
AMA 7	AMA 21	AMA 32	SA 7
AMA 8	AMA 23	AMA 33	SA 8
AMA 10	AMA 25	AMA 34	SA 9

<sup>a</sup> 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.

Os microrganismos foram reativados e cultivados em meios adequados conforme descrito na parte experimental no **item 6.6**. As colônias desenvolvidas sobre a superfície do ágar foram removidas com o auxílio de uma espátula estéril e transferidas para um tubo de *Eppendorf*, as quais foram pesadas e ressuspensas em solução 20 mM de tampão borato (pH 8,8).

Devido ao grande número, estes microrganismos foram monitorados em diferentes experimentos, contendo: controle branco (sem a presença do

microrganismo), controle microbiano (não é adicionado substrato, no qual se investiga a possibilidade de auto-fluorescência microbiana) e controle positivo (no qual o substrato é substituído pelo produto da reação, com a finalidade de verificar uma interação negativa entre o produto da biocatálise com as células microbianas). Os testes foram realizados em duplicatas ou triplicatas.

### 3.3.4.2 Resultados e discussões

As reações foram realizadas em microplaca de polipropileno com 96 cavidades de acordo com o procedimento descrito na parte experimental (**item 6.7.3.4**). As reações foram monitoradas por um leitor de fluorescência durante 10 horas e as leituras foram feitas a cada 3 minutos, utilizando filtros de  $\lambda_{\text{ex}}$   $365 \pm 20$  nm e  $\lambda_{\text{em}}$   $460 \pm 20$  nm.

A **Tabela 7** apresenta o resumo dos experimentos positivos considerando uma diferença mínima de fluorescência de 50 unidades (u.f.r. = unidade relativa de fluorescência) entre a média das leituras dos microrganismos e a média dos controles brancos do mesmo experimento. De acordo com a seletividade enzimática na hidrólise dos epóxidos **3.5** e **3.6**, os microrganismos testados podem ser classificados em 3 conjuntos distintos: 1) microrganismos seletivos para a sonda **3.5** (epóxido terminal); 2) microrganismos seletivos para a sonda **3.6** (epóxido dissustituído) e 3) os microrganismos ativos, porém não seletivos, devido provavelmente à presença de dois tipos de EHs<sup>92</sup> ou presença de EHs não seletivas.

---

<sup>92</sup> Moussou, P., Archelas, A., Furstoss, R., Baratti, J.C. *Enzyme Microb. Tech.* **2000**, *26*, 414–420.

**Tabela 7** - Resumo dos testes positivos com as sondas **3.5** e **3.6** para detecção de epóxido-hidrolases.<sup>a,b</sup>

Entrada	Microrganismo	Intensidade de fluorescência	Intensidade de fluorescência
		<b>3.5</b>	<b>3.6</b>
1	<i>Alternaria alternata</i> CCT 1250	978	1062
2	<i>Aspergillus niger</i> CCT 4846	-	453
3	<i>Aspergillus niger</i> CCT 5559	-	123
4	<i>Bacillus pumilus</i> CBC 0007	111	nt <sup>c</sup>
5	<i>Bacillus pumilus</i> CBC 0010	57	nt
6	<i>Bacillus pumilus</i> CBC 0002	50	nt
7	<i>Candida albicans</i> CCT 0776	533	-
8	<i>Cunninghamella echinulata</i> CCT 4259	121	-
9	<i>Nodulisporium</i> sp. CCT 5552	-	173
10	<i>Rhizopus</i> sp CBC 1022	71	218
11	<i>Rhodococcus equi</i> CCT 0541	223	-
12	AMA 7	180	-
13	AMA 23	50	-
14	AMA 28	54	-
15	AMA 29	61	-
16	AMA 32	-	109
17	AMA 36	60	-
18	SA 2	74	-
19	SA 5	110	110
20	SA 7	136	-
21	SA 8	-	76

<sup>a</sup> Apenas estão apresentados os resultados positivos acima de 50 unidades de fluorescência relativa.

<sup>b</sup> Valor (unidade arbitrária de fluorescência) = diferença entre a média de duplicatas das amostras e a média de triplicatas do controle branco (substrato + sol. tampão + BSA + NaIO<sub>4</sub>) após 10 horas de reação. As células microbianas não apresentaram fluorescência detectável.

<sup>c</sup> nt = não testados.

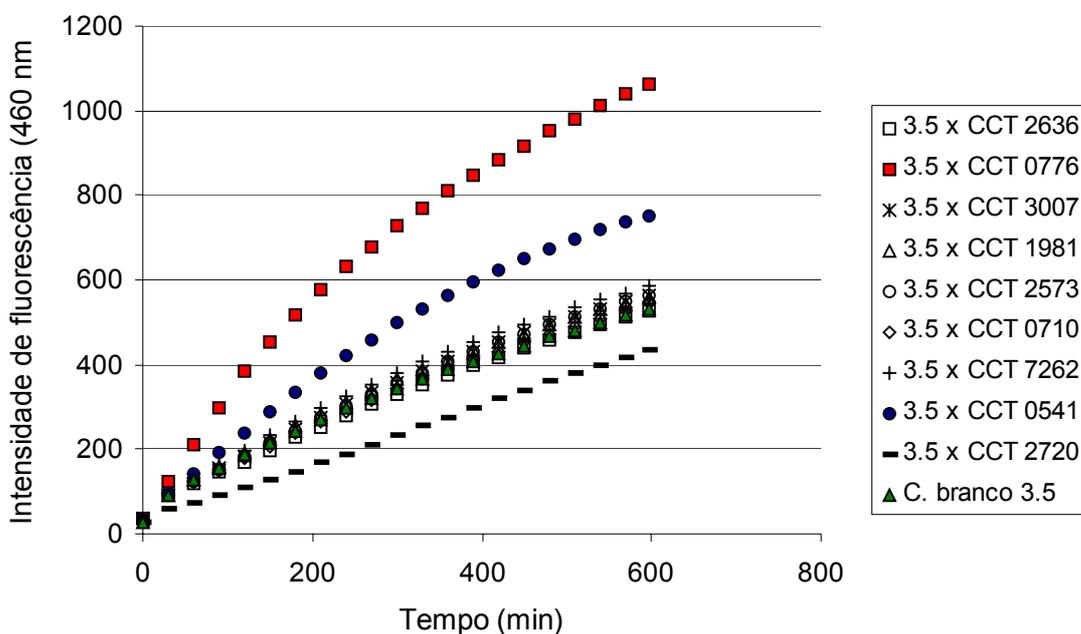
No primeiro grupo (entradas 7, 8, 11-15, 17, 18 e 20, **Tabela 7**), *Candida albicans* CCT 0776, *Rhodococcus equi* CCT 0541 (**Figura 13**) e AMA 7 se destacaram por apresentarem atividades de epóxido-hidrolases excelentes frente

ao epóxido terminal **3.5**. É interessante mencionar que *Rhodococcus* é um gênero com reconhecida atividade de epóxido-hidrolase, especialmente para epóxidos não impedidos.<sup>93</sup> Assim, de acordo com o ensaio de fluorescência, este microrganismo demonstrou a sua preferência pelo epóxido terminal. Também o gênero *Candida* sp apresentou preferência pelo 1,2-epóxido.<sup>74</sup> Weijers e de Bont encontraram atividade de epóxido-hidrolases, utilizando 1,2-epoxioctano como substrato, em onze entre as vinte e nove leveduras do gênero *Candida* sp.<sup>74</sup> Entretanto, os microrganismos AMA 7, SA2 e SA7 ainda não foram identificados.

Atividade de EH em linhagens de *Bacillus pumilus* não foram relatadas na literatura, nestes experimentos eles (entrada 4-6, **Tabela 7**) apresentaram atividade de EH frente à sonda **3.5**. As reações biocatalíticas convencionais com *B. pumilus* CBMAI 0008 confirmaram a presença de EH frente a 1,2-epoxioctano e epóxido de cicloexano e serão tratadas mais adiante.

---

<sup>93</sup> (a) Mischitz, M.; Mirtl, C.; Saf, R.; Faber, K. *Tetrahedron-Asymmetr.* **1996**, 7, 2041-2046.  
(b) Mayer, S. F.; Glueck, S. M.; Pogorevc, M.; Steinreiber, A.; Stampfer, W.; Kroutil W.; Faber, K. *J. Mol. Catal. B-Enzym.* **2002**, 18, 163-168.



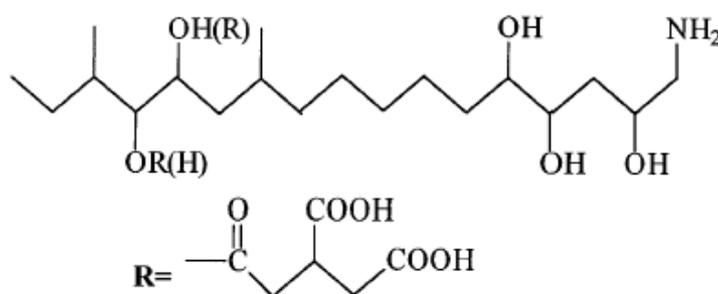
**Figura 13** - Detecção de EHs em *Candida albicans* CCT 0776 e *Rhodococcus equi* CCT 0541 utilizando a sonda **3.5**. Condições: 100  $\mu$ M de **3.5**, 0,1 ou 0,5 mg/mL de suspensões celulares, 2 mg/mL de BSA, 1 mM de NaIO<sub>4</sub>, 20 mM de tampão borato (pH 8,8),  $\lambda_{\text{ex}} = 365$  nm,  $\lambda_{\text{em}} = 460$  nm.

No segundo grupo (entradas 2, 3, 9, 16 e 21, **Tabela 7**), *A. niger* CCT 4846 se destacou com a melhor atividade. Este fato seria esperado, pois, o gênero *Aspergillus* é reconhecido como produtor de EH<sup>94</sup> e estes microrganismos (entrada 2 e 3) já haviam revelado suas preferências por epóxidos dissustituídos em ensaios tradicionais.<sup>95</sup> Assim, estes fungos apresentaram atividade de EH concordantes nos ensaios biocatalítico convencional e de fluorescência. Também, AMA 32 e SA 8, ambos isolados no nosso laboratório, apresentaram atividade frente à sonda **3.6**, entretanto, estes ainda não foram identificados.

<sup>94</sup> Morisseau, C.; Archelas, A.; Guitton, C.; Faucher, D.; Furstoss, R.; Baratti, J.C. *Eur. J. Biochem.* **1999**, *263*, 386-395

<sup>95</sup> Porto, A.L.M. “*Isolamento e triagem de microrganismos brasileiros por biocatálise e produção de metabólitos secundários*” Tese de doutorado, Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, **2002**.

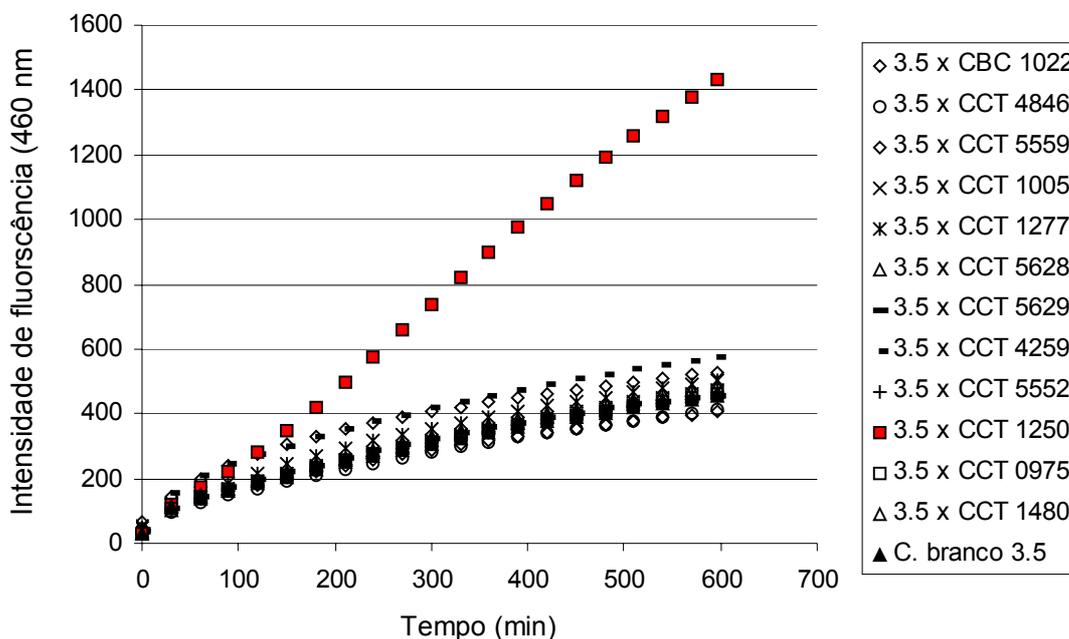
No terceiro grupo (entrada 1, 10 e 19, **Tabela 7**), *A. alternata* CCT 1250 (**Figura 15**) apresentou excelente atividade de EH frente a duas sondas de epóxidos. Pinot e colaboradores<sup>96</sup> relataram a presença de epóxido-hidrolase em *Alternaria alternata* f sp. *lycopersici* (Aal). Este é um fungo fitopatogênico que causa a doença dos talos de tomate pela produção de toxinas AAL (toxinas potencialmente carcinogênicas produzidas por *Alternaria alternata* f sp. *lycopersici*<sup>97</sup>). Estas toxinas (**Figura 14**) possuem dois pares de dióis vicinais livres ou esterificados, os quais poderiam ser introduzidos por EH que participam das rotas biossintéticas. A *Alternaria alternata* é morfológicamente similar a Aal, mas aparentemente não produz uma toxina detectável, apesar disso, apresenta também atividade de EH frente a vários epóxidos.<sup>96</sup> No caso de *Rhizopus* sp, não foi encontrado nenhuma referência da produção de epóxido-hidrolases, pois, usualmente, este gênero de microrganismo é melhor conhecido por atividade de lipases e esterases.



**Figura 14** – Estrutura da toxina produzida por *Alternaria alternata* f sp. *lycopersici*

<sup>96</sup> Pinot, F.; Caldas, E.D.; Schmidt, C.; Gilchrist, D.G.; Jones, A.D.; Winter, C.K.; Hammock, B.D. *Mycopathologia* **1998**, *140*, 51–58.

<sup>97</sup> Szurdoki, F.; Trousdale, E.; Ward, B.; Gee, S.J.; Hammock, B.D.; Gilchrist, D.G. *J. Agr. Food Chem.* **1996**, *44*, 1796-1803.



**Figura 15-** Detecção de EH em *A. alternata* CCT 1250 contra a sonda **3.5**. Condições: 100  $\mu$ M de **3.5**, 0,1 ou 0,5 mg/mL de suspensões celulares, 2 mg/mL de BSA, 1 mM de NaIO<sub>4</sub>, 20 mM de tampão borato (pH 8,8),  $\lambda_{\text{ex}} = 365$  nm,  $\lambda_{\text{em}} = 460$  nm.

Dentre os microrganismos que apresentaram atividade de epóxido-hidrolases, dez ainda não foram identificados (entrada 12-21 **Tabela 7**). Os microrganismos deste grupo integram a Coleção de Biocatálise (CBC) e estão sendo estudados por outros integrantes do nosso grupo.

### 3.3.4.3 Conclusão parcial

Por meio de ensaios preliminares foram determinadas as melhores condições para serem utilizadas nos testes de HTS utilizando células íntegras.

Nesta primeira parte foram testados 57 microrganismos (**Tabela 4-6**, sobrescrito letra a) frente às sondas **3.5** e **3.6** para a detecção de epóxido-hidrolases. Todos os experimentos foram realizados em duplicatas, o que rendeu

um total de 228 experimentos individuais (microrganismo x substrato), sem levar em conta os muitos controles brancos e positivos e controles para verificar a auto-fluorescência dos microrganismos, que são necessariamente realizados em todos os experimentos. Tal quantidade de experimentos só foi possível utilizando a metodologia de triagem rápida.

O sucesso da adaptação do ensaio de HTS com células íntegras foi diretamente relacionado à detecção de EHs. Um levantamento da literatura indicou que diversos gêneros aqui selecionados para EHs já eram conhecidos (entradas 1-7 e 11, **Tabela 7**) e cuja atividade catalítica estava em concordância com os ensaios de fluorescência. Dentre eles, a linhagem *Aspergillus niger* CCT 4846 já havia sido selecionada por sua atividade de EH através de biocatálise convencional, de tal modo que ela foi propositalmente incluída no conjunto de microrganismos testados servindo como controle positivo nos testes.

Estes resultados serviram para validar a metodologia de triagem com células íntegras cuja aplicação, na literatura, estava limitada à detecção em enzimas ou extratos enzimáticos.

Adicionalmente, estes experimentos permitiram a descoberta de vários microrganismos ainda não mencionados na literatura como produtores de epóxido-hidrolases e de outros ainda não identificados, todos isolados de biomas nacionais.

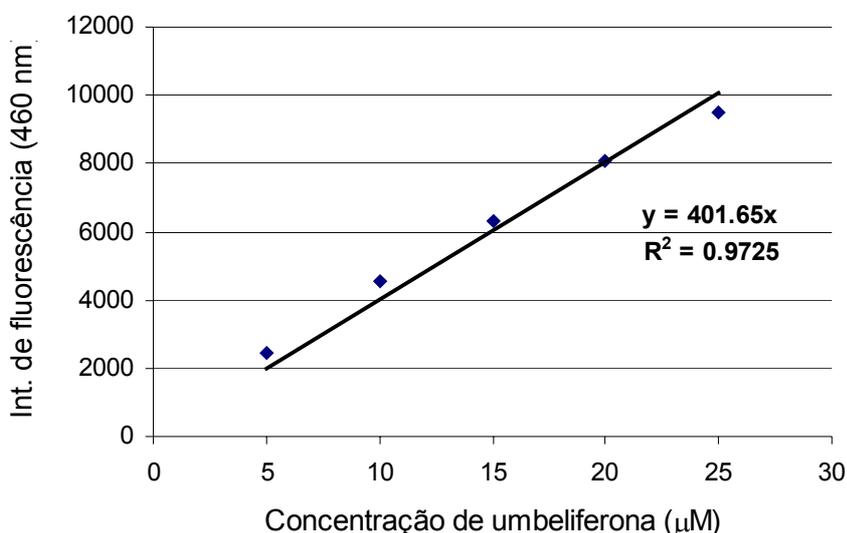
### *3.3.5 Ensaios de HTS para detecção de epóxido-hidrolases utilizando sondas enantiomericamente enriquecidas*

#### 3.3.5.1 Resultados e discussões

Empregando as condições estabelecidas e descritas anteriormente foram avaliados 25 microrganismos (**Tabela 4**, letra [b]) frente a 8 sondas quirais (**R** e **S**) **3.13** – **3.16**, as duas sondas cíclicas **3.17** e **3.18**, e o par de estereoisômeros

*cis/trans* **3.6** e **3.19**. (Figura 10) para detecção da enantiosseletividade das epóxido-hidrolases.<sup>35</sup> Os ensaios foram realizados em duplicata e com os enantiômeros puros totalizando 600 experimentos.

A conversão dos substratos (após 10 h de leitura) foi determinada transformando a diferença na intensidade de fluorescência entre a amostra e o controle branco, em concentração de umbeliferona, utilizando uma curva de calibração (Figura 16). A curva de calibração foi preparada a partir de diluições de uma solução estoque de 20 mM de umbeliferona em CH<sub>3</sub>CN:H<sub>2</sub>O (1:1, v/v) na presença de BSA (2 mg/mL) em 20 mM de tampão borato (pH 8,8) e solução aquosa de NaIO<sub>4</sub> (1 mM). Foi observado que a relação concentração/fluorescência era linear até uma concentração de 25 μM de umbeliferona. Acima dessa concentração, levava a um incremento não proporcional da fluorescência provavelmente devido à auto-supressão da fluorescência.



**Figura 16** – Curva de calibração de umbeliferona na presença de 2 mg/mL de BSA em 20 mM de tampão borato e solução aquosa de 1 mM de NaIO<sub>4</sub>.

Os valores das velocidades iniciais (**Tabela 8**) foram obtidos utilizando a parte linear das leituras de fluorescência e convertidas em valores de umbeliferona em pmoles/s. Desta maneira, a razão enantiomérica aparente (*E*-aparente) foi calculada comparando as velocidades iniciais resultantes.

$$E\text{-aparente} = \frac{\text{Velocidade do enantiômero rápido}}{\text{Velocidade do enantiômero lento}}$$

A velocidade inicial ( $V_{\text{inicial}}$ ) dos ensaios foi determinada subtraindo o valor de velocidade inicial da reação controle ( $V_{\text{controle}}$ ) do valor de velocidade inicial aparente ( $V_{\text{aparente}}$ ) catalisada pela enzima utilizando a seguinte fórmula:

$$V_{\text{inicial}} = V_{\text{aparente}} - V_{\text{controle}}$$

Os valores dos excessos enantioméricos ( $ee^*$ ) foram obtidos utilizando a seguinte fórmula:

$$\text{Excesso enantiomérico } (ee^*) = \frac{(F_A - F_{CA}) - (F_B - F_{CB})}{(F_A - F_{CA}) + (F_B - F_{CB})} \times 100$$

Sendo: A e B = par de enantiômeros, ou o par de meso-compostos ou o par de isômeros *cis/trans*.

$F_A$  = fluorescência registrada do substrato A ao término de 10 h de reação.

$F_B$  = fluorescência registrada do substrato B ao término de 10 h de reação.

$F_{CA}$  e  $F_{CB}$  = fluorescência registrada do controle branco, A ou B, ao término de 10 h de reação.

Os enantiômeros (*R* e *S*) foram colocados em diferentes poços e a leitura da intensidade da fluorescência de cada enantiômero permitiu o cálculo da *E*-estimada e de  $ee^*$  durante o tratamento de dados, considerando como se ambos

enantiômeros estivessem no mesmo poço. É necessário esclarecer que o  $ee^*$  calculado não corresponde ao  $ee$  "convencional", pois os substratos A e B (enantiômeros) foram avaliados isoladamente, portanto na ausência de competição entre os enantiômeros. Como mencionado na introdução, tal problemática conduz à obtenção de valores diferentes do real; e uma forma mais exata de obter o valor de  $E$  e de  $ee$  consiste na introdução de um substrato similar de modo a simular a competição.<sup>39</sup> No entanto, os valores obtidos indicam a presença de enzima enantio- ou estereosseletiva nos microrganismos. Os melhores resultados obtidos com os 25 microrganismos utilizando as 12 sondas estão na **Tabela 8**. Entretanto, é importante destacar que houve outros microrganismos com atividade menores.

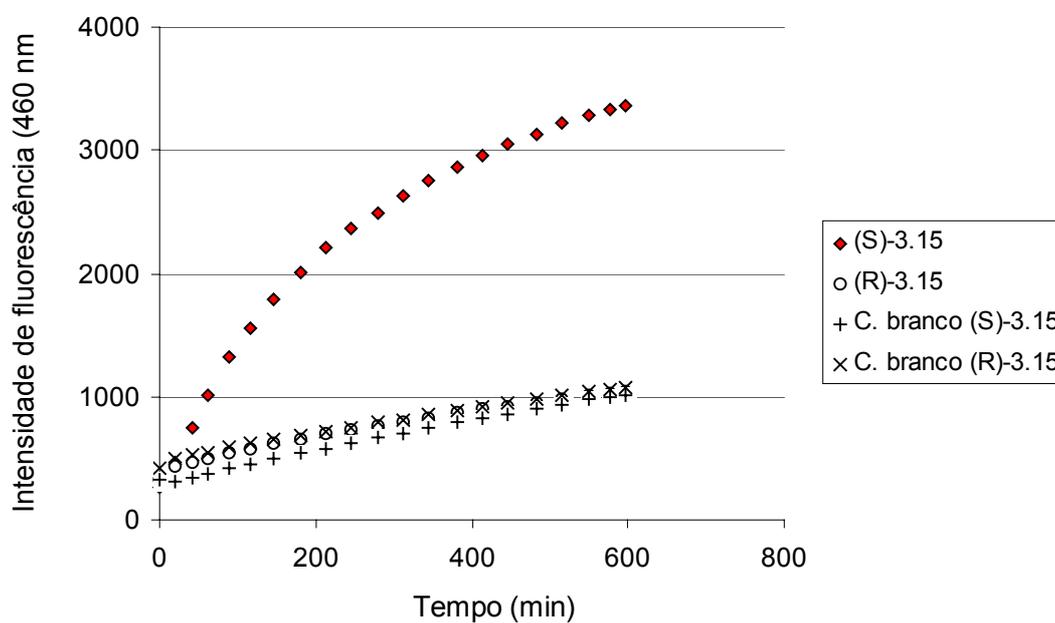
É possível observar que entre os 25 microrganismos testados, as epóxido-hidrolases de bactérias e fungos apresentaram melhores resultados que as leveduras. Foi possível observar também que os epóxidos dissustituídos são mais susceptíveis a abertura enantiosseletiva, fato já bem consagrado na literatura. Entre os resultados podemos destacar a enantiosseletividade apresentada pelo *Bacillus subtilis* CCT 0089 frente às sondas **3.14** e **3.15** (**Figura 17**) e o *Bacillus pumilus* CBMAI 0008 frente às mesmas sondas e a **3.16** (**Figura 18**). Os epóxidos cíclicos (**3.17** e **3.18**) que apresentam maior impedimento estérico não sofreram abertura enzimática detectável com os microrganismos testados. Contrariamente, os epóxidos terminais *R*- ou *S*-(**3.13**) sofreram abertura do anel com baixa enantiosseletividade, com exceção da *E. nidulans* CCT 3119 (**Tabela 8**).

Os valores de  $E$ -aparente revelaram a presença de duas epóxido-hidrolases altamente enantiosseletivas, a de *Bacillus subtilis* frente à sonda (*S*)-**3.15** e EH de *B. pumilus* frente à sonda (*S*)-**3.14**.

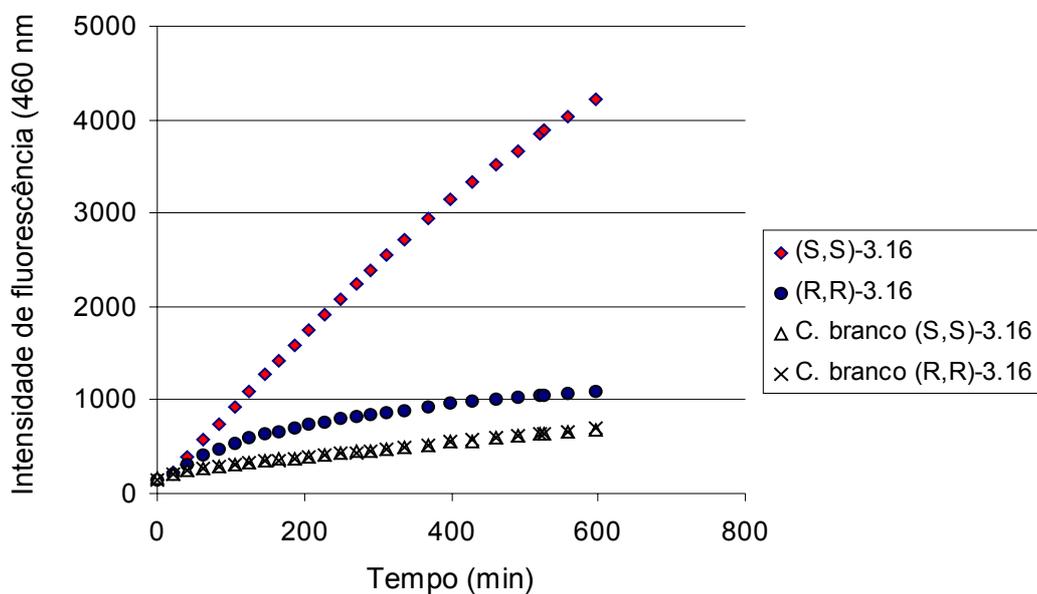
**Tabela 8** – Resumo dos resultados obtidos com as sondas fluorogênicas **3.13-3.19** e **3.6**.

Microrg.	Substrato	V <sub>inicial</sub> (pmoles/s)	<i>E</i> - aparente	Conv. (%) (10h)	<i>ee</i> ou estereosseletivi- dade(%)
<i>Bacillus subtilis</i> CCT 0089	( <i>S</i> )-3.14	367	10,2	5,64	94 % <i>ee</i>
	( <i>R</i> )-3.14	36		0,16	
	( <i>S</i> )-3.15	413	413,0	5,86	> 99 % <i>ee</i>
	( <i>R</i> )-3.15	0		0	
	3.6	1612	1,7 <sup>a</sup>	16,65	33 % <i>ed</i>
	3.19	965		8,32	
	( <i>S,S</i> )-3.16	1374	3,4	17,45	73% <i>ee</i>
	( <i>R,R</i> )-3.16	403		2,71	
<i>Bacillus pumilus</i> CBMAI 0008	( <i>S</i> )-3.14	388	388,0	9,54	> 99 % <i>ee</i>
	( <i>R</i> )-3.14	0		0	
	( <i>S</i> )-3.15	139	27,8	5,35	90 % <i>ee</i>
	( <i>R</i> )-3.15	5		0,28	
	3.6	211	1,4 <sup>a</sup>	6,60	47 % <i>ed</i>
	3.19	153		2,36	
	( <i>S,S</i> )-3.16	270	2,9	8,80	80 % <i>ee</i>
	( <i>R,R</i> )-3.16	94		0,98	
<i>A. oryzae</i> CCT 0975	( <i>S,S</i> )-3.16	70	7,8	1,24	75 % <i>ee</i>
	( <i>R,R</i> )-3.16	9		0,18	
<i>A. niger</i> CCT1435	( <i>S,S</i> )-3.16	246	2,6	5,80	78 % <i>ee</i>
	( <i>R,R</i> )-3.16	93		0,70	
<i>E. nidulans</i> CCT 3119	( <i>S</i> )-3.13	198	2,0	1,28	61 % <i>ee</i>
	( <i>R</i> )-3.13	391		5,22	
<i>R. glutinis</i> CCT 2182	3.6	75	4,4 <sup>a</sup>	1,01	48 %
	3.19	17		0,35	

<sup>a</sup> O valor de *E*-aparente corresponde a estereosseletividade *cis/trans*.



**Figura 17** – Detecção de EH enantiosseletiva de *B. subtilis* utilizando o par de sondas (S)-3.15 e (R)-3.15.



**Figura 18** - Detecção de EH enantiosseletiva de *B. pumilus* utilizando o par de sondas (S,S)-3.16 e (R,R)-3.16.

### 3.3.5.2 Conclusão parcial

Em termos de aplicação sintética, a estereosseletividade é a propriedade mais importante das enzimas, além da atividade catalítica. Este tipo de teste não permite prever a estereosseletividade das reações de epóxido-hidrolases, pois ignora o aspecto mecanístico destas enzimas (combinação de regioseletividade e enantioseletividade) além da problemática originada pela falta de competição entre os substratos. Entretanto, as velocidades iniciais obtidas permitiram o cálculo de estereosseletividades aparentes dos microrganismos frente aos substratos fluorogênicos quirais de uma forma rápida e simples. Também foi possível o cálculo de conversões e de excesso enantiomérico.

Neste contexto, conclui-se que a atividade enzimática assim obtida representa uma boa maneira de pré-avaliar rapidamente a enantioseletividade dos microrganismos.

## 3.4 HTS UTILIZANDO SUBSTRATOS NÃO MODIFICADOS PARA DETECÇÃO DE EPÓXIDO-HIDROLASES

### 3.4.1 Considerações gerais

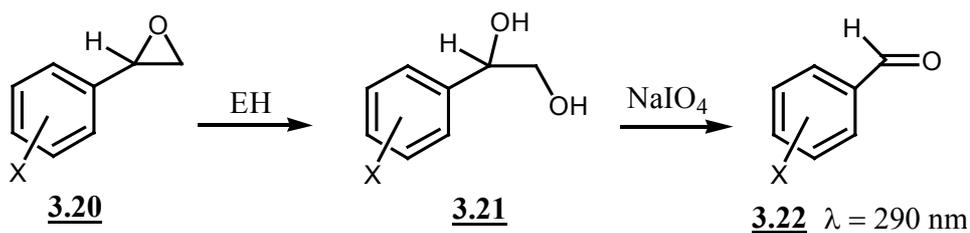
Epóxido-hidrolases hidrolisam oxiranos aos dióis correspondentes. Algumas dessas enzimas são altamente enantiosseletivas e foram rapidamente aplicadas para produção de epóxidos e/ou dióis vicinais enantiomericamente puros. Neste contexto, um ensaio enzimático que permite a triagem ou a quantificação de atividade de uma epóxido-hidrolase frente a um substrato de interesse é de suma importância. Apesar de vários ensaios terem sido relatados, testes associados ao potencial de uma triagem de alto desempenho para detecção de EH utilizando um epóxido “não modificado” são limitados.

A maioria dos ensaios utiliza o aumento ou diminuição de absorção UV/VIS para determinar hidrólise de epóxidos. Infelizmente, os coeficientes de absorção dos epóxidos são muito pequenos em comparação a outras substâncias presentes no extrato celular não refinado. Conseqüentemente, é necessário purificar as epóxido-hidrolases. Uma exceção é a utilização do óxido de *p*-nitroestireno que apresenta uma forte absorbância em UV a 280 nm.<sup>98</sup> Entretanto, o diol correspondente também absorve nessa região, de tal modo que, para a quantificação do diol formado, é necessário uma previa extração antes da medição de absorbância.

Outra metodologia similar foi relatada pelo grupo de Furstoss.<sup>49</sup> Utilizando também os derivados de óxido de estireno **3.20**, eles associaram o método com a utilização de periodato de sódio. Assim, o diol **3.21** obtido após a biotransformação, sofre a clivagem oxidativa na presença de periodato, formando o derivado de benzaldeído **3.22** com forte absorbância em 290 nm. (**Esquema 22**).

---

<sup>98</sup> Bhatnagar, T., Manoj, K.M., Baratti, J.C. *J. Biochem. Bioph. Meth.* **2001**, *50*, 1-13.



**Esquema 22** - Princípio de detecção de EH proposto por Furstoss e colaboradores.<sup>49</sup>

O principal problema deste tipo de método é a limitação dos substratos (nestes casos, somente óxido de estireno e derivados) para determinar atividade de epóxido-hidrolases. Uma metodologia mais versátil é o ensaio colorimétrico baseado na utilização de 4-(*p*-nitro-benzil)piridina.<sup>99</sup> Este reagente “mede” a diminuição da concentração de epóxido, formando-se um composto azul com os epóxidos não hidrolisados após a catálise enzimática. Porém, nem todos os epóxidos reagem com 4-(*p*-nitro-benzil)piridina para formar o composto azul.<sup>100</sup>

Outras metodologias que exploram a propriedade oxidativa de periodato de sódio, como parte da metodologia de detecção de epóxido-hidrolases possibilitando o uso de qualquer epóxido como substratos.<sup>100,101,60</sup>

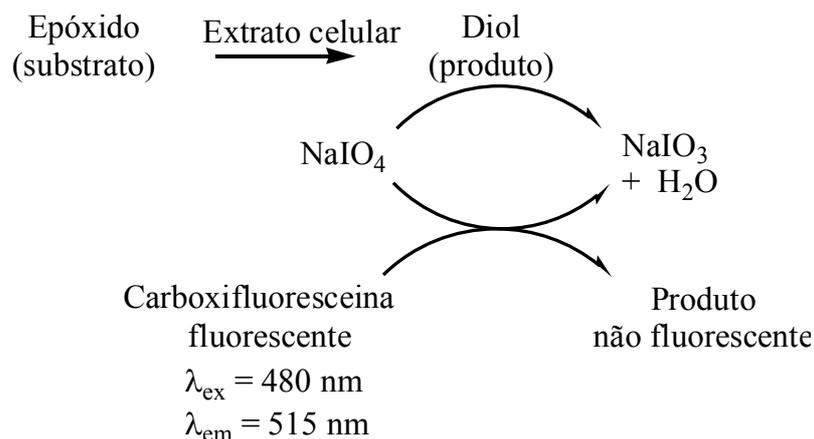
Um destes ensaios relatado por Schmid foi a detecção colorimétrica quantitativa do aldeído ou a cetona (produzido por clivagem oxidativa do diol pelo periodato) com o reagente de Schiff.<sup>100</sup> O composto de cor magenta formado por essa reação é monitorado a 560 nm. Para o funcionamento deste método, uma solução de sulfito de sódio é adicionada após a hidrólise enzimática de epóxido e antes da adição do reagente de Schiff, para eliminar o excesso de periodato.

<sup>99</sup> Zoher, F., Enzelberger, M.M., Bornscheuer, U.T., Hauer, B., Wohlleben, W., Schmid, R.D. *J. Biotechnol.* **2000**, *77*, 287-292.

<sup>100</sup> Doderer, K., Lutz-Wahl, S., Hauer, B., Schmid, R.D. *Anal. Biochem.* **2003**, *321*, 131-134.

<sup>101</sup> Doderer, K., Schmid, R.D. *Biotechnol. Lett.* **2004**, *26*, 835-839.

Outra metodologia relatada por Schmid foi um ensaio fluorogênico baseado no princípio de retro-titulação de periodato de sódio (**Esquema 23**),<sup>101</sup> em uma abordagem similar ao teste de adrenalina relatado previamente pelo grupo de Reymond.<sup>60</sup>



**Esquema 23** – Princípio de detecção de EH proposto por Schmid,<sup>101</sup> baseado na retro-titulação de periodato de sódio por carboxifluoresceína.

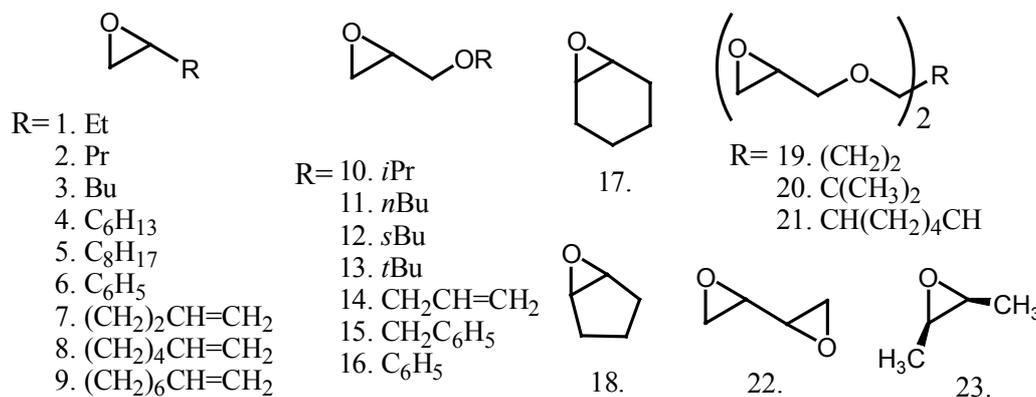
O excesso de periodato, após a reação enzimática, reage com a carboxifluoresceína destruindo a fluorescência deste composto. Assim, quanto maior for a atividade enzimática, maior será a quantidade de diol formado e menor será a quantidade de periodato remanescente. Nesse caso, a reação conserva uma maior quantidade de carboxifluoresceína adicionada, emitindo a fluorescência. Como os ensaios baseados na fluorescência, este método é bastante sensível e aplicável a todos tipos de epóxidos não sensíveis a periodato e que possam ser biotransformados em dióis.

Dentre estes tipos de testes, escolhemos o teste de adrenalina, visualizando a sua implementação com células íntegras. A metodologia mencionada acima e o teste de adrenalina têm o mesmo princípio, porém com método de detecção diferenciado, sendo o teste de adrenalina um método colorimétrico que mede a formação de adrenocromo a partir de adrenalina e periodato remanescente após a

reação enzimática (ver **Esquema 14**, pág 27).<sup>60</sup> Este ensaio foi testado não só com epóxido-hidrolases como também com vários tipos de enzimas hidrolíticas em diferentes valores de pH e permitiu a utilização de co-solventes.

### 3.4.2 Resultados e discussões

Foram estudados nove microrganismos (*R. glutinis* CCT 2182, *B. subtilis* CCT 0089, *A. niger* CCT 1435, *B. pumilus* CBMAI 0008, *E. nidulans* CCT 3119, *Trichoderma* sp CCT 5551, *Aspergillus oryzae* CCT 0975, *A. terreus* CCT 3320 e *A. niger* CCT 4846) para serem testados com 23 substratos (**1** – **23**) comercialmente disponíveis utilizando o teste de adrenalina (**Figura 19**).



**Figura 19-** Epóxidos (**1** – **23**) utilizados no teste de adrenalina para detecção de epóxido-hidrolases.

As reações (100 µL) foram realizadas em microplacas de poliestireno de 96 cavidades de acordo com o procedimento descrito na parte experimental (**item 6.7.4.3**). Os ensaios foram realizados com os 23 epóxidos além dos diferentes controles. Foram testadas duas concentrações celulares (0,1 e 0,5 mg/mL) e duas soluções tampão (tampão borato pH 8,8 e tampão fosfato salina –PBS– pH 7,4).

Para cada ensaio individual, a densidade óptica (DO) proveniente da hidrólise total de epóxido (DO<sub>aparente</sub>) foi determinada realizando subtração entre a leitura de DO<sub>célula</sub> (controle, só suspensão microbiana sem epóxido) e DO<sub>célula+epóxido</sub>

(**Equação 1**). Considerando a possibilidade de abertura espontânea dos epóxidos, a leitura da densidade óptica aparente deve ser corrigida. Assim, a  $DO_{\text{n\~{a}o-espec\~{i}fica}}$  foi determinada realizando-se a subtração entre a  $DO$  emitida por solução tampão e  $DO$  emitida pelo epóxido no mesmo tampão (**Equação 2**). Finalmente, a hidrólise biocatalítica do epóxido ( $DO_{\text{catal\~{i}tica}}$ ) foi, então, determinada subtraindo a  $DO_{\text{n\~{a}o-espec\~{i}fica}}$  da  $DO_{\text{aparente}}$  (**Equação 3**).

$$\text{(Eq. 1)} \Delta DO_{\text{aparente}} = DO_{\text{c\~{e}lula-}} - DO_{\text{c\~{e}lula+ep\~{o}xido}}$$

$$\text{(Eq. 2)} \Delta DO_{\text{n\~{a}o-espec\~{i}fica}} = DO_{\text{tamp\~{a}o-}} - DO_{\text{tamp\~{a}o+ep\~{o}xido}}$$

$$\text{(Eq. 3)} \Delta DO_{\text{catal\~{i}tica}} = \Delta DO_{\text{aparente}} - \Delta DO_{\text{n\~{a}o-espec\~{i}fica}}.$$

O valor da densidade óptica da **Equação 1** está relacionado com a hidrólise biocatalítica e espontânea do epóxido e o valor obtido na **Equação 2** está relacionado somente à hidrólise espontânea. Assim, a subtração dos valores obtidos na **Equação 1** e **Equação 2** fornece o valor de densidade óptica correspondente a catálise enzimática.

As hidrólises espontâneas foram significativas nas reações realizadas com tampão borato (pH 8,8), acarretando maior erro na determinação das reações biocatalíticas. Em solução tampão PBS (pH 7,4), apenas as células de menor concentração, *i.e.* 0,1 mg/mL deram resultados consistentes com o ensaio, fornecendo um valor de  $DO$  ( $DO_{\text{c\~{e}lula+ep\~{o}xido}}$ ) mais baixo que seu controle de referência em solução tampão ( $DO_{\text{tamp\~{a}o+ep\~{o}xido}}$ ).

Desta maneira, as leituras de  $DO$  dos experimentos realizados com 9 microrganismos utilizando 23 epóxidos (**1-23**, **Figura 19**) foram convertidas em gráfico de escala de cinza (**Figura 20**), no qual cada quadrado corresponde ao resultado obtido com um determinado epóxido vs microrganismo, sendo que o quadrado branco significa 0% de atividade catalítica e o preto corresponde a 100% de atividade, ou seja atividade máxima.

Microrganismo	maximo DOcat	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23
<i>B. pumilus</i>	0,27	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
<i>A. niger</i> 1435	0,14	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
<i>A. niger</i> 4846	0,37	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
<i>B. subtilis</i>	0,12	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
<i>Trichoderma</i> sp.	0,14	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
<i>R. glutinis</i>	0,17	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
<i>A. terreus</i>	0,09	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
<i>A. oryzae</i>	0,09	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
<i>E. nidulans</i>	0,00	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■

**Figura 20** - Perfis hidrolíticos dos 9 microrganismos frente a 23 epóxidos comerciais. Os microrganismos estão ordenados pelo decréscimo na atividade catalítica total. Condições: 1) 1 mM de epóxido, 0,1 mg/mL de suspensão microbiana e 1 mM de NaIO<sub>4</sub>, 10 horas a 28°C; 2) solução 1,5 mM de adrenalina.

Analisando o quadro da **Figura 20** é possível observar uma atividade geral e intensa em *B. pumilus* CBMAI 0008, com maior seletividade para o epóxido **21**, o qual é um di-epóxido (ver **Figura 19**). O *A. niger* CCT 4846 também demonstrou uma forte atividade com este substrato, o que era de alguma forma esperado, pois este microrganismo já foi estudado no grupo e é conhecido por produzir EH.<sup>95</sup> O segundo microrganismo mais ativo frente aos 23 substratos de acordo com o ensaio de adrenalina é o outro *A. niger* CCT 1435, o qual ainda não havia sido estudado. Adicionalmente, o ensaio de adrenalina também detectou a abertura de epóxido por *R. glutinis*, o qual possui reconhecida atividade de EH. Assim, a utilização desta metodologia permitiu a obtenção rápida do perfil hidrolítico dos microrganismos quanto às suas atividades de epóxido-hidrolases.

A conversão e a enantiosseletividade das epóxido-hidrolases dos dois microrganismos mais ativos foram avaliadas por biocatálise convencional utilizando o 1,2-epoxioctano e estes experimentos serão melhor discutidos a seguir.

### *3.4.3 Conclusão parcial*

O teste de adrenalina para triagem de epóxido-hidrolases já havia sido relatado utilizando enzimas isoladas e esta metodologia foi agora estendida à triagem de culturas de microrganismos utilizando células íntegras. Devido ao longo tempo de incubação (10 horas) houve hidrólise espontânea significativa dos epóxidos em solução tampão, especialmente em tampão borato (pH 8,8). Não obstante, as reações biocatalíticas foram melhor observadas com ensaios realizados em pH 7,4 e a concentração celular de 0,1 mg/mL, sendo estas condições consideradas as mais adequadas para uma triagem rápida.

O teste pode ser aplicado a outros grupos funcionais. Além disso, ao se fazer uma combinação de diferentes substratos com diferentes grupos funcionais é possível obter o perfil hidrolítico do microrganismo não só de epóxido-hidrolases, como também para uma série de outras enzimas. Esta metodologia é rápida, de fácil implementação e permite trabalhar com uma ampla gama de substratos não modificados, e, no caso de epóxido-hidrolases, é possível utilizar reagentes comercialmente disponíveis.

### 3.5 VALIDAÇÃO DOS ENSAIOS DE HTS PARA EPÓXIDO-HIDROLASES VIA BIOCATÁLISE CONVENCIONAL

Após a avaliação da atividade enzimática dos microrganismos aplicando técnicas de HTS é necessário validar os melhores resultados utilizando catálise convencional com substrato de interesse a fim de se obter informações sobre valores de conversão e excesso enantiomérico (*ee*).

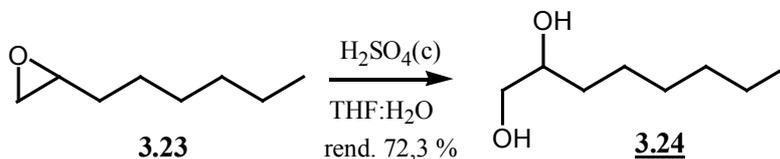
#### 3.5.1 Resultados e discussões

##### 3.5.1.1 Reações biocatalíticas com *Bacillus pumilus* CBMAI 0008 e *Aspergillus niger* CCT 1435

As epóxido-hidrolases de dois microrganismos (*A. niger* CCT 1435 e *B. pumilus* CBMAI 0008) foram selecionadas para uma investigação mais detalhada, pois não haviam sido estudadas anteriormente e se destacaram nos ensaios fluorogênicos e no teste de adrenalina. Os substratos selecionados foram o óxido de cicloexeno e ( $\pm$ )-1,2-epoxioctano. Com o óxido de cicloexeno, a abertura do oxirano não foi seletiva, assim decidimos concentrar atenção nas conversões de ( $\pm$ )-1,2-epoxioctano. O rendimento cromatográfico foi obtido por CG-EM empregando uma coluna capilar de sílica fundida HP-5 MS.

Para caracterizar o produto da biotransformação, preparou-se o ( $\pm$ )-1,2-octanodiol a partir do epóxido **3.23**, na presença de ácido sulfúrico em THF:H<sub>2</sub>O (1:1, v/v) com 72 % de rendimento após purificação por coluna cromatográfica, de acordo com o **Esquema 24**. Este composto apresenta por espectro de RMN de <sup>1</sup>H um conjunto de sinais entre  $\delta_H$  3,78 a 3,59 e em 3,41 atribuídos aos hidrogênios tipo carbinólicos e aos grupos hidroxilas. A presença dos dois carbonos carbinólicos foi destacada no espectro de RMN de <sup>13</sup>C em  $\delta_C$  72,4 e em 66,7. No espectro de massas

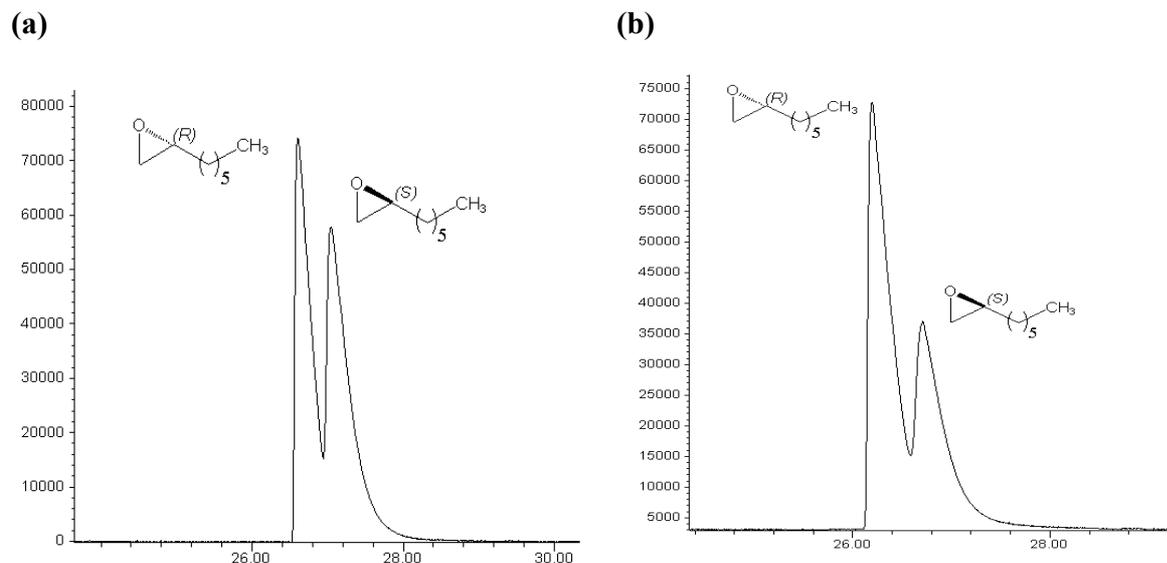
não foi observada a presença do íon molecular de  $m/z$  146, entretanto, foi observada a presença do pico M-1 decorrente da perda do radical  $\bullet\text{H}$  ( $m/z$  145).



**Esquema 24** – Preparação de (±)-1,2-octanodiol **3.24**.

A determinação dos excessos enantioméricos de (±)-1,2-epoxioctano e do produto de hidrólise (±)-1,2-octanodiol foi feita por cromatografia gasosa (CG) com o detector de ionização de chama (FID), empregando uma coluna capilar de sílica fundida com fase quiral. Após testar várias condições de análises em quatro colunas quirais,\* verificou-se que o melhor resultado, para a separação dos enantiômeros de (±)-1,2-epoxioctano, foi obtido utilizando-se a coluna capilar quiral Chrompak CD-Chirasil **Cromatograma 1**. A identificação dos enantiômeros foi realizada pela co-injeção com padrão de (*R*)-1,2-epoxioctano (Aldrich) nas mesmas condições de análise.

\* As quatro colunas são: (1) Chrompak, com a fase quiral Chirasil-β-ciclodextrina (25 m x 0,25 mm x 0,25 μm); (2) Lipodex E (2,6-Pe-3-Bu-γ-CD) – (28 m x 0,25 mm x 0,25 μm); (3) Permetilado, Per-O-Me-β-ciclodextrina (22 m x 0,25 mm x 0,25 μm), e (4) Heptakis (2,6-di-O-metil-o-pentil-3)-β-ciclodextrina (25m x 0,25 mm x 0,25 μm).

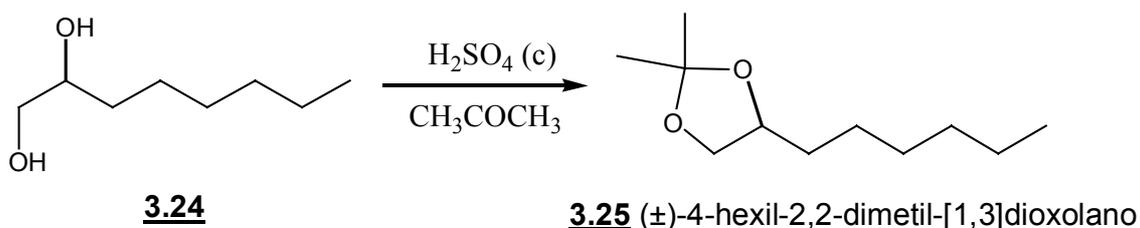


**Cromatograma 1** – Cromatograma (CG-FID) da resolução de **(a)** uma amostra racêmica de 1,2-epoxioctano; **(b)** co-injeção de *(R)*-1,2-epoxioctano (Aldrich) + amostra racêmica. As condições de análises: 40 °C/15 min, rampa de 1 °C/min até 55 °C, depois 25 °C/min até 180 °C,  $T_{inj} = 220$  °C,  $T_{det} = 240$  °C, pressão constante de 10 psi. Coluna: Chrompak, CD-Chirasil (25 m x 0,25 mm x 0,25  $\mu$ m).

No entanto, todas as condições empregadas permaneceram inapropriadas para a resolução de  $(\pm)$ -1,2-octanodiol e, a fim de resolver tal situação, o  $(\pm)$ -1,2-octanodiol foi derivatizado para a determinação dos excessos enantioméricos. A derivatização do diol foi inicialmente realizada com  $H_2SO_4$  na presença de acetona conforme descrito por Solladié e colaboradores.<sup>102</sup> (**Esquema 25**). A caracterização deste composto foi realizada pela observação no espectro de RMN de  $^1H$  de sinais de hidrogênios carbinólicos a  $\delta_H$  4,12-4,00 e 3,50 e um conjunto de sinais (16 hidrogênios) correspondentes aos cinco metilenos e duas metilas entre  $\delta_H$  1,72-1,15. A presença de duas metilas adicionais com relação ao material de partida foi observada no espectro de RMN de  $^{13}C$  em  $\delta_C$  27,1 e 25,8. Os dados de IV e RMN

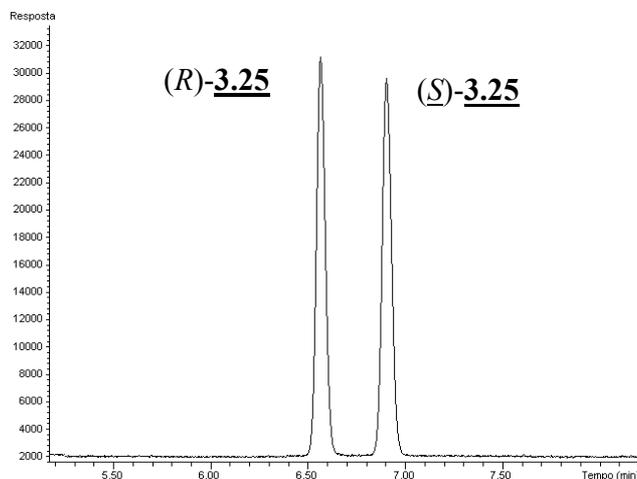
<sup>102</sup> Solladié, G.; Gressot, L.; Colobert, F. *Eur. J. Org. Chem.* **2000**, 2, 357-364

de  $^1\text{H}$  foram comparados com a literatura sendo eles compatíveis.<sup>103</sup> No espectro de massas também não foi observada a presença do íon molecular de  $m/z$  186, entretanto, foi observada a presença do pico M-1 decorrente da perda do radical  $\bullet\text{H}$  ( $m/z$  185).



### Esquema 25 - Derivatização do diol **3.24**

Após a derivatização, os enantiômeros do composto obtido (±)-4-hexil-2,2-dimetil-[1,3]dioxolano foram separados com sucesso utilizando a coluna Chrompack CD-Chirasil. (**Cromatograma 2**)



**Cromatograma 2** – Cromatograma (CG-FID) da resolução dos enantiômeros de (±)-4-hexil-2,2-dimetil-[1,3]dioxolano (**3.25**). As condições de análises foram: 100 °C/10 min, rampa de 30 °C/min até 180 °C,  $T_{inj}$  = 220 °C,  $T_{det}$  = 240 °C, pressão constante de 10 psi. Coluna: Chrompack, CD-Chirasil (25 m x 0,25 mm x 0,25  $\mu\text{m}$ ).

<sup>103</sup> Mirkhani, V.; Tangestaninejad, S.; Yadollahi, B.; Alipanah, L. *Catalysis Lett.* **2003**, *91*, 129-132.

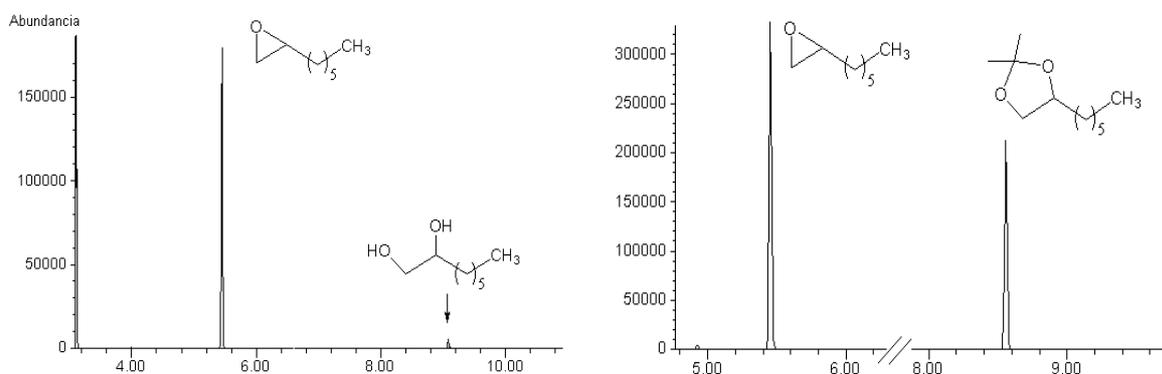
A derivatização do diol e a separação dos enantiômeros do acetonídeo foram realizadas com sucesso. Na prática, porém, este procedimento continuava sendo inapropriado para monitorar reações biocatalíticas de abertura de epóxidos, devido principalmente à própria presença de epóxido nas alíquotas das reações (epóxido remanescente), uma vez que este sofre abertura espontânea durante a derivatização pela presença de ácido sulfúrico, tornando impossível determinação do *ee* sem a prévia separação do epóxido e o diol através da coluna cromatográfica. Diante de tais dificuldades, resolvemos procurar outros caminhos.

A solução do problema foi alcançada ao utilizar outra metodologia de derivatização do diol **3.24** a acetonídeo **3.25** pelo emprego do 2,2-dimetoxipropano e *p*-tolueno sulfonato de piridínio (PPTS) em quantidade catalítica.<sup>104</sup> Este sistema apresenta a vantagem de empregar reagentes mais brandos para a derivatização do diol. Com o intuito de eliminar a etapa de separação do diol e do epóxido (por meio de coluna cromatográfica), foram montados dois experimentos. O primeiro foi realizado com uma mistura 1:1 (m/m) de ( $\pm$ )-1,2-octanodiol e ( $\pm$ )-1,2-epoxioctano e o segundo somente com o epóxido. Monitorando as duas reações mediante cromatografia de camada delgada (CCD) e CG-EM, obtivemos resultados satisfatórios. Na primeira reação, o ( $\pm$ )-1,2-octanodiol foi totalmente convertido em ( $\pm$ )-4-hexil-2,2-dimetil-[1,3]dioxolano. No segundo experimento, realizado de maneira idêntica ao primeiro, não foi observado sinal correspondente a 4-hexil-2,2-dimetil-[1,3]dioxolano, mesmo após 2 horas de reação, confirmando desta maneira a possibilidade de derivatizar o diol na presença de epóxido, sem a perda de enantiosseletividade (**Cromatograma 3**).

---

<sup>104</sup> Greene, T.W.; Wuts, P.G. *Protective groups in organic synthesis*, 3<sup>rd</sup> ed., New York: John Wiley & Sons, Inc., 1999. p 201-245.

(a) Antes da reação de derivatização. (b) duas horas após da derivatização.



**Cromatograma 3** - Cromatograma de íon totais (CG-EM) da reação de derivatização de 1,2-octanodiol na presença de 1,2-epóxiocetano. As condições de análises foram: 70 °C/2 min, rampa de 10 °C/min até 180 °C, depois, rampa de 20 °C/min até 290 °C,  $T_{inj}$  = 220 °C. Coluna capilar de sílica fundida HP-5 MS (30 m x 0,25 mm x 0,25  $\mu$ m).

### 3.5.1.2 Reações biocatalíticas com ( $\pm$ )-1,2-epoxioctano

Com a metodologia estabelecida para a determinação do excesso enantiomérico do diol **3.24** na presença do epóxido, as reações biocatalíticas com os dois microrganismos foram repetidas. Também foi realizada a biotransformação com o liofilizado do sobrenadante após separação das células de *B. pumilus* CBMAI 0008 por centrifugação. O curso da biotransformação ( $\pm$ )-1,2-epoxioctano em diol, porcentagem de conversão, *ee* do epóxido e do diol, assim como a configuração absoluta deles, encontram-se resumidos na **Tabela 9**.

**Tabela 9** - Reações de hidrólise do ( $\pm$ )-1,2-epoxioctano catalisada por *A. niger* CCT 1435 e *B. pumilus* CBMAI 0008 em tampão fosfato (pH 7,0).

Microrg.	Tempo (horas)	Conversão <sup>a</sup> (%)	<i>ee</i> <sup>b</sup> (epóxido residual %)	Epóxido (configuração absoluta) <sup>c</sup>	<i>ee</i> <sup>b</sup> (diol, %)	Diol (configuração absoluta) <sup>d</sup>
<i>A. niger</i>	2 h	77,8	13,1	( <i>S</i> )	49,1	( <i>R</i> )
	7 h	92,2	33,7	( <i>S</i> )	50,2	( <i>R</i> )
	24 h	> 99	25,8	( <i>S</i> )	25,3	( <i>S</i> )
<i>B. pumilus</i> (células)	2 h	28,6	5,8	( <i>S</i> )	20,5	( <i>R</i> )
	7 h	72,5	9,4	( <i>S</i> )	20,3	( <i>R</i> )
	24 h	> 99	22,6	( <i>S</i> )	64,2	( <i>S</i> )
<i>B. pumilus</i> (sobrenadante)	2 h	47,5	n.d. <sup>e</sup>	n.d.	21,3	( <i>R</i> )
	24 h	58,4	n.d.	n.d.	19,2	( <i>R</i> )
	48 h	> 99	n.d.	n.d.	7,7	( <i>R</i> )

<sup>a</sup> Conversão cromatográfica determinada por CG-EM.

<sup>b</sup> Excessos enantioméricos foram determinados por CG-FID.

<sup>c</sup> Comparação e co injeção com (*R*)-(+)-1,2-epoxioctano padrão adquirido de Aldrich.

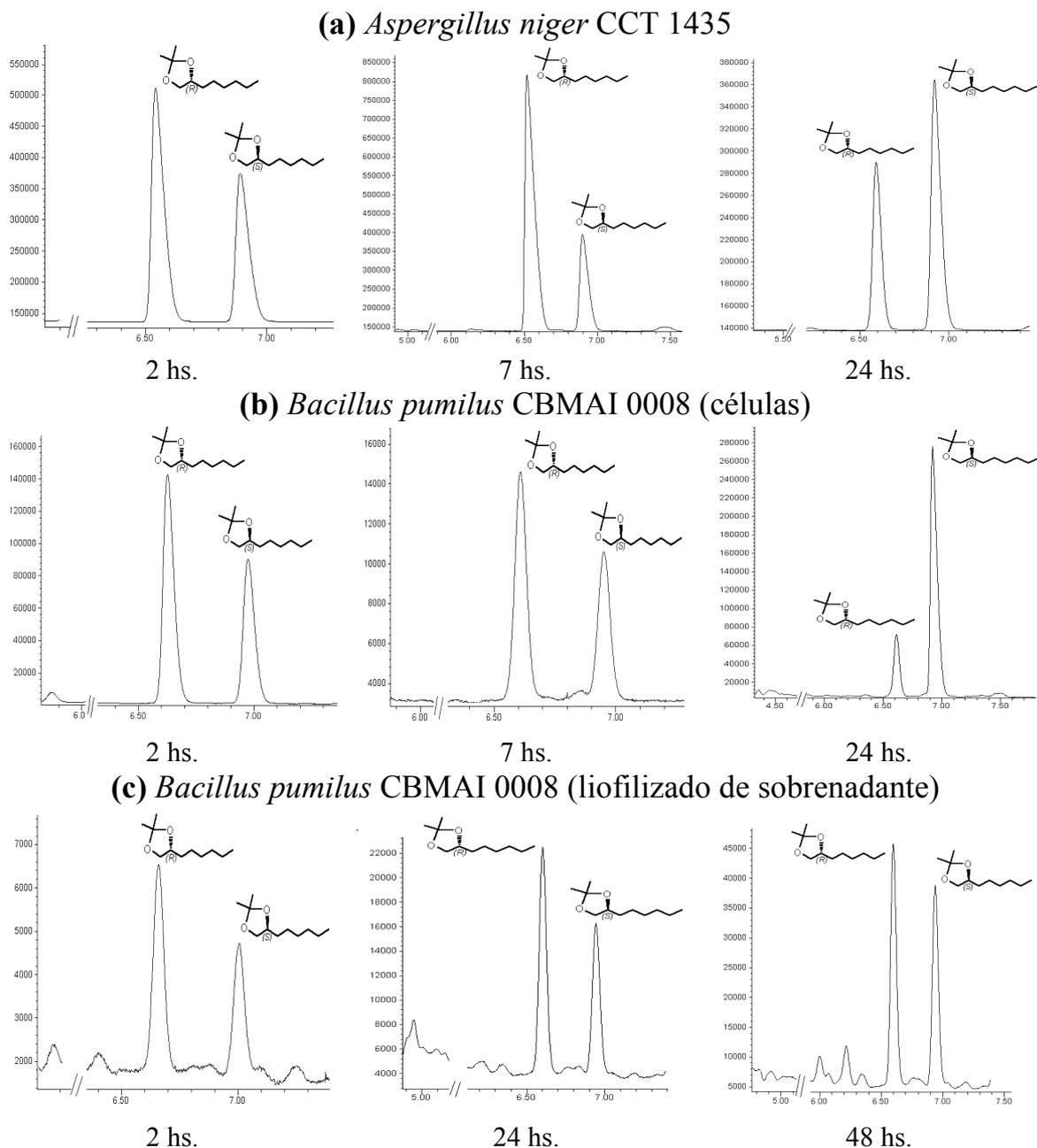
<sup>d</sup> Determinado pela comparação de valor de rotação óptica com o da literatura.<sup>105</sup>

<sup>e</sup> n.d.= não determinado.

Pela análise da **Tabela 9** pode-se observar que na reação com *A. niger*, após 7 horas, 92 % do substrato foi convertido em diol e com excesso de 50 %. Um breve cálculo leva a concluir que de 100 moléculas, das quais 50 eram *R* e 50 eram *S*, 92 sofreram hidrólise, resultando em 69 moléculas de diol com configuração (*R*) e 23 com configuração (*S*). Este resultado foi considerado estranho pois num processo de resolução cinética enzimática ideal obtém-se teoricamente o máximo do excesso enantiomérico quando a conversão alcança 50%; passando esse limite, o excesso começa a declinar chegando próximo a zero para conversão de 100 %. Além do mais, após conversão total do epóxido (24 h) houve inversão da configuração absoluta do enantiômero principal (tanto para o *A. niger* quanto para o

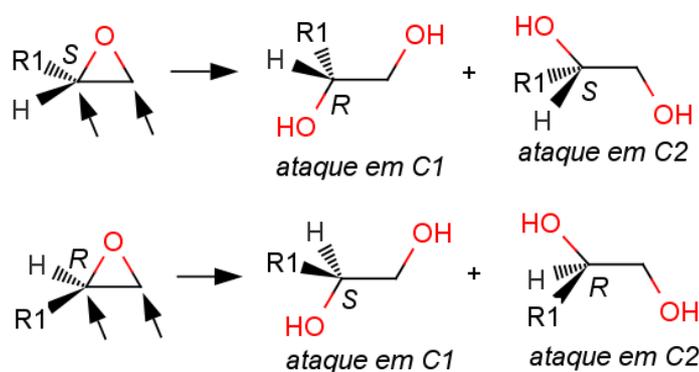
<sup>105</sup> Weijers, C.A.G.M.; Botes, A.L.; vanDyk, M.S.; de Bont, J.A.M. *Tetrahedron-Asymmetr.* **1998**, *9*, 467-473.

*B. pumillus*) e, particularmente expressivo, foi o excesso do enantiômero (*S*), no caso de *B. pumilus*, no qual a pureza óptica do diol formado inverteu-se de 20,3 % *ee* favorecendo a configuração (*R*) para 64,2 % *ee* de (*S*)-diol (**Tabela 9**). Interessantemente, esse fenômeno de inversão de configuração não aconteceu quando foi utilizado o liofilizado do sobrenadante do meio de crescimento de *B. pumilus* CBMAI 0008. Nesta reação, o maior excesso enantiomérico foi observado quando a conversão atingiu ~50 % e, quando a conversão chegou acima de 99 %, o *ee* diminuiu até 7,7 % indicando um processo de resolução cinética (**Cromatograma 4**).



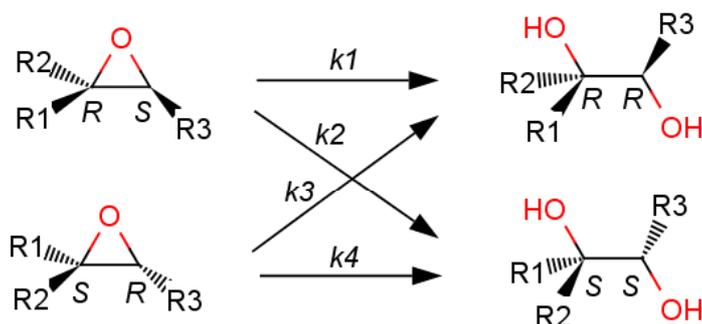
**Cromatograma 4** - Cromatogramas (CG-FID) obtidos para reação enzimática de 1,2-epoxioctano com células em repouso de **(a)** *A. niger* CCT 1435 com 2, 7, 24 hs, e **(b)** *B. pumilus* CBMAI 0008 com 2, 7, 24 hs. **(c)** Cromatogramas (GC-FID) obtidos para reação enzimática com o liofilizado do sobrenadante de *B. pumilus* CBMAI 0008 com 2, 24, 48 hs. Condições de análise (ver **Cromatograma 2**).

A hidrólise dos epóxidos mediadas pelas epóxido-hidrolases oferece um esquema teórico complexo, pelas possíveis combinações de enantiosseletividade e regioseletividade, as quais podem diferir de um enantiômero para outro<sup>79a,92</sup> (**Esquema 26**). Teoricamente, um nucleófilo (ou uma enzima) pode atacar um epóxido em qualquer um dos dois átomos de carbono do oxirano e fica claro que tal regioseletividade depende da natureza do nucleófilo, da estrutura do epóxido, das condições de reação e, para uma reação biocatalítica, da natureza da enzima.



**Esquema 26** – Dependência da configuração absoluta do diol na regioseletividade da biocatálise.<sup>92</sup>

Temos que enfatizar que, tanto a regioseletividade como os parâmetros cinéticos, podem ser diferentes de um enantiômero para outro, levando a resultados bastante intrigantes. A regioseletividade da abertura do anel de cada enantiômero durante a hidrólise de um substrato racêmico poderia levar a formação de um único produto enantiomericamente puro, seguindo o processo chamado de “enantioconvergência” (**Esquema 27**).<sup>92</sup>



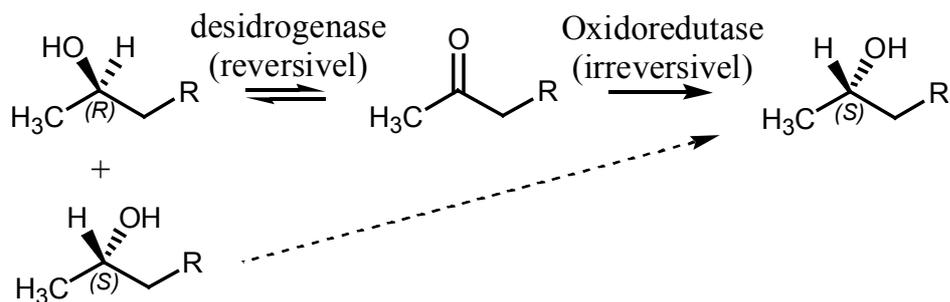
**Esquema 27** - Se os dois enantiômeros sofrerem hidrólise com regioseletividades diferentes ( $k_2 > k_1$  e  $k_4 > k_3$ ) formarão um mesmo diol.<sup>92</sup>

Analisando os dados obtidos, é possível atribuir os fatos observados às seguintes causas: 1) nestes microrganismos há mais de um processo enzimático de abertura de epóxidos com diferentes enantiosseletividades e regioseletividades; 2) há participação de outras enzimas permitindo a oxidação enantiosseletiva do diol formando a cetona (uma resolução cinética) para logo reduzir-se ao diol via desracemização do álcool (estereoinversão).

A estereoinversão do álcool secundário (**Esquema 28**) procede em geral pelo seguinte mecanismo: um enantiômero, por exemplo, (*R*)-álcool é seletivamente oxidado a cetona correspondente, catalisada por desidrogenase, enquanto o outro, (*S*)-álcool, permanece intacto (até aqui temos uma resolução cinética). No próximo passo, a cetona é reduzida para o (*S*)-álcool por outro sistema enzimático. O resultado disto é a conversão do álcool racêmico a um único enantiômero em rendimento potencialmente de 100%. Desta maneira, a estereoinversão supera a limitação de 50% de rendimento teórico, o máximo encontrado nas resoluções cinéticas de álcoois com enzimas ou microrganismos.<sup>106,107</sup>

<sup>106</sup> Goswami, A.; Mirfakhrae, K.D.; Patel, R.N. *Tetrahedron-Asymmetry* **1999**, *10*, 4239-4244.

<sup>107</sup> Stecher, H.; Faber, K. *Synthesis-Stuttgart* **1997**, *1*, 1-16.



**Esquema 28-** Processo global de estereoinversão enantioespecífica de um álcool secundário.

Este mecanismo foi proposto devido ao fato de, em alguns casos, a cetona correspondente ter sido identificada como um intermediário num processo de estereoinversão.<sup>108</sup> Hasegawa e colaboradores relataram vários gêneros de microrganismos com a habilidade de produzir (*S*)-1,2-pentanodiol com alto excesso enantiomérico, partindo do racemato por estereoinversão via oxidação do (*R*)-1,2-pentanodiol a 1-hidroxi-2-pentanona por uma álcool desidrogenase (*R*)-específica dependente de  $\text{NAD}^+$  e redução de 1-hidroxi-2-pentanona ao (*S*)-1,2-pentanodiol por um 2-ceto-1-álcool redutase (*S*)-específico dependente de  $\text{NADPH}$ .<sup>108</sup> Existem poucos relatos na literatura sobre desracemização de dióis por estereoinversão utilizando microrganismos.<sup>106,108,109,110</sup>

### 3.5.1.3 Reações biocatalíticas com ( $\pm$ )-1,2-octanodiol

Com o intuito de avaliar a possível ocorrência de desracemização do diol por estereoinversão foram realizadas reações biocatalíticas com *A. niger* e *B. pumilus* utilizando ( $\pm$ )-1,2-octanodiol, com e sem pré-incubação com ( $\pm$ )-1,2-epoxioctano. Os resultados encontram-se descritos na **Tabela 10** e no **Cromatograma 5**.

<sup>108</sup> Hasegawa, J.; Ogura, M.; Tsuda, S.; Maemoto, S.; Kutsuki, H.; Ohashi, T. *Agr. Biol. Chem. Tokio* **1990**, *54*, 1819-1827.

<sup>109</sup> Carnell, A.J.; Iacazio, G.; Roberts, S.M.; Willetts, A.J. *Tetrahedron Lett.* **1994**, *35*, 331-334.

<sup>110</sup> Matsumura, S.; Kawai, Y.; Takahashi, Y.; Toshima, K. *Biotechnol. Lett.* **1994**, *16*, 485-490.

**Tabela 10** – Reações de desracemização de ( $\pm$ )-1,2-octanodiol

Microrganismo	Tempo (h)	ee de ( <i>S</i> )-1,2-octanodiol	Visualização de sinal de 1-hidroxi-2-octanona <sup>b</sup>
<i>Bacillus pumilus</i> CBMAI 0008	48 h	95,6%	Sim <sup>c</sup>
<i>Bacillus pumilus</i> CBMAI 0008 <sup>a</sup>	33 h	95,5 %	Sim
<i>Aspergillus niger</i> CCT 1435	48 h	> 99,0%	Não
<i>Aspergillus niger</i> CCT 1435 <sup>a</sup>	33 h	97,6 %	Não

<sup>a</sup> Pre-incubação com o 1,2-epoxioctano por 20 h a 28° C e agitação a 150 rpm.

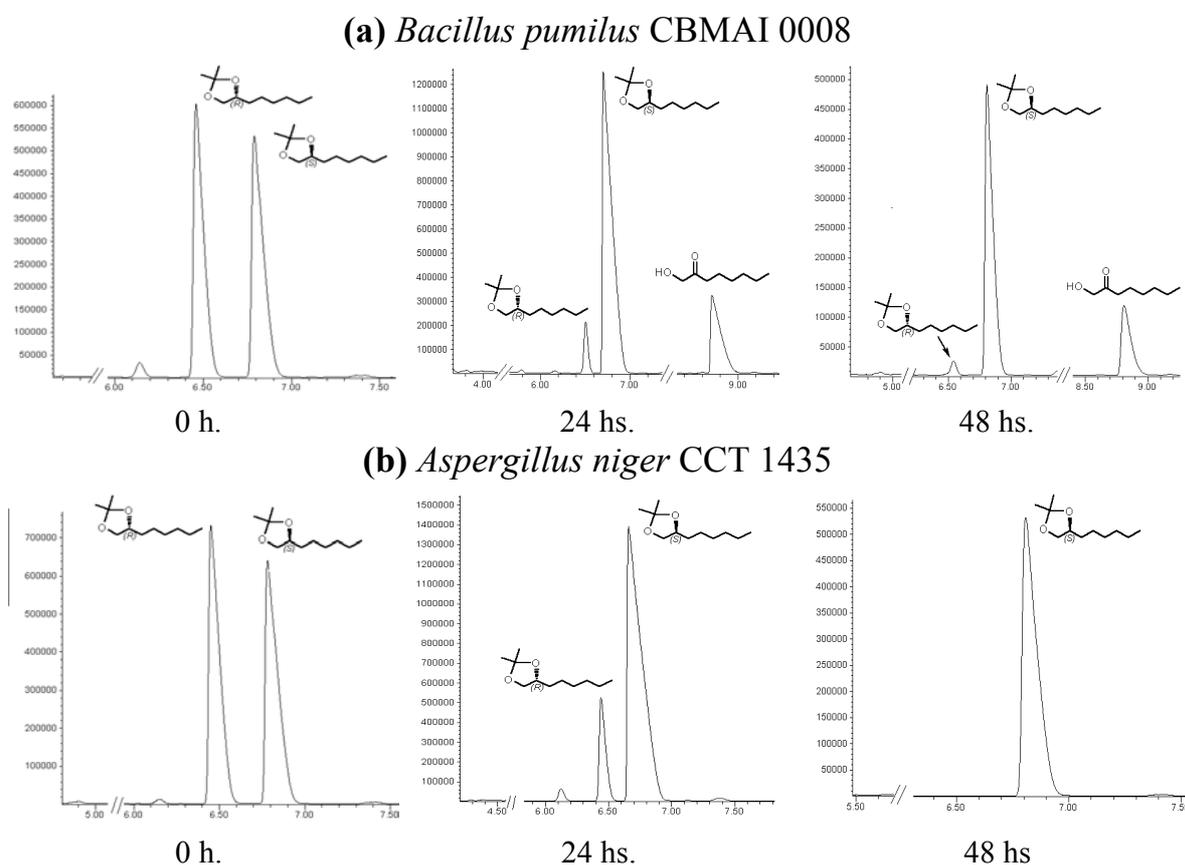
<sup>b</sup> Visualização por CG-EM.

<sup>c</sup> A bioconversão do diol a cetona foi de 55,5 % após 48 horas de reação, o cálculo foi realizado baseando no diol residual determinado por CG-EM.

Ao analisar estes resultados, ficou claro que os dois microrganismos podem desracemizar o 1,2-octanodiol produzindo o enantiômero *S* com alto *ee*. Entretanto, a formação de 1-hidróxi-2-octanona só foi observada nas reações biocatalíticas com *B. pumilus* e não foi detectada nas reações incubadas com *A. niger*.

No caso de *B. pumilus*, a presença da cetona e a conversão cromatográfica de aproximadamente 55 %, evidenciou-se que o alto excesso de (*S*)-diol é devido a uma resolução cinética. Contrariamente, no caso do *A. niger*, foi necessário realizar um experimento preparativo com ( $\pm$ )-1,2-octanodiol em tampão fosfato (pH 7,0). Este experimento permitiu a obtenção de 1,2-octanodiol em 88,5 % de rendimento após purificação por coluna de sílica e 83,5 % de *ee* favorecendo o enantiômero (*S*). Este foi confirmado pela leitura de rotação óptica:  $[\alpha]_{\text{D}}^{23} = -9,8$  (c=1,4 em metanol, *ee* = 83 %) e pela comparação dele com o valor da referência<sup>105</sup>  $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -13,6$  (c=1,0 em metanol, *ee* > 99 %). A reação controle (sem microrganismo) forneceu 91,1 % de rendimento de 1,2-octanodiol racêmico, após purificação por coluna cromatográfica. Conseqüentemente, estes conjuntos de resultados indicaram uma

reação de estereoinversão na presença de *A. niger* CCT 1435, o qual permitiu a obtenção do rendimento bem acima de 50 %.



**Cromatograma 5** - Cromatogramas (CG-FID) obtidos para reação enzimática de 1,2-octanodiol com células em repouso de **(a)** *B. pumilus* CBMAI 0008 com 0, 24, 48 hs, e **(b)** *A. niger* CCT 1435 com 0, 24, 48 h. As condições de análises foram: 100 °C/10 min, rampa de 30 °C/min até 180 °C,  $T_{inj} = 220$  °C,  $T_{det} = 240$  °C, pressão constante de 10 psi. Coluna: Chrompak, CD-Chirasil (25 m x 0,25 mm x 0,25  $\mu$ m).

Adicionalmente, foram testados três microrganismos: *B. pumilus* CBC 008 e 009, e o *A. niger* CCT 4846 frente ao 1,2-octanodiol (**Tabela 11**) para verificar a capacidade de resolução cinética ou de estereoinversão destas linhagens.

**Tabela 11-** Biocatálise de ( $\pm$ )-1,2-octanodiol com *B. pumilus* CBC 008 e 009 e *A. niger* CCT 4846.<sup>a</sup>

Microrganismo	Tempo (horas)	Conversão (%)	<i>e.e.</i> (diol, %)	Diol (configuração absoluta)
<i>Bacillus pumilus</i> CBC 008	18 h	45,2	74,6	<i>S</i>
	24 h	53,0	83,4	<i>S</i>
	48 h	64,8	n.d. <sup>b</sup>	n.d.
	72 h	68,7	96,2	<i>S</i>
<i>Bacillus pumilus</i> CBC 009	18 h	48,1	56,7	<i>S</i>
	24 h	48,0	67,7	<i>S</i>
	48 h	59,6	81,1	<i>S</i>
	72 h	58,0	86,3	<i>S</i>
<i>Aspergillus niger</i> CCT 4846	18 h	6,3	23,6	<i>S</i>
	24 h	41,4	60,4	<i>S</i>
	48 h	56,5	88,5	<i>S</i>
	72 h	56,3	90,0	<i>S</i>

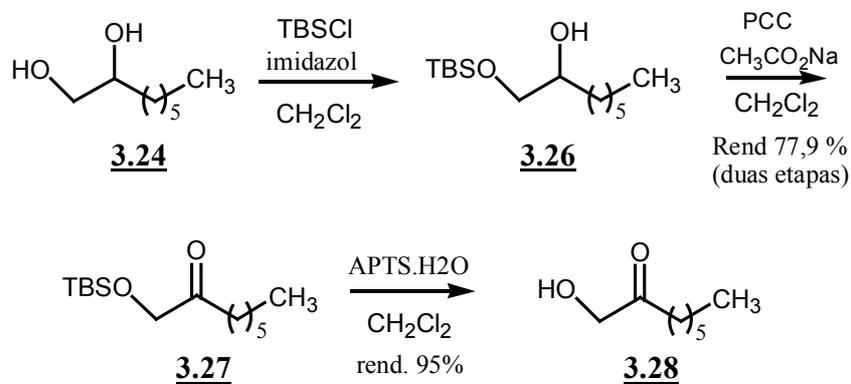
<sup>a</sup> O monitoramento das reações foi realizado até 120 h e as conversões cromatográficas das três reações ficaram perto de 50%. Porém, o *ee* do diol só foi determinado até o terceiro dia.

<sup>b</sup> Amostra perdida.

Estes três microrganismos se comportaram de maneira similar ao *B. pumilus* CBMAI 0008 produzindo 1-hidróxi-2-octanona e o (*S*)-diol com *ee* de 86 a 96 % e conversão de aproximadamente 50 %, indicando a ocorrência de resolução cinética do diol.

A presença de 1-hidróxi-2-octanona nas reações foi identificada pela comparação com padrão preparado conforme ilustrado no **Esquema 29**. A 1-hidróxi-2-octanona **3.28** foi sintetizada a partir de 1,2-octanodiol. Após proteção da hidroxila primária por meio de TBSCl, a hidroxila secundária foi oxidada utilizando PCC, obtendo o composto **3.27**. Desproteção do grupo TBS com o ácido *p*-toluenossulfônico monoidratado forneceu a 1-hidróxi-2-octanona caracterizada

por RMN de  $^{13}\text{C}$  pelo surgimento do carbono carbonílico em  $\delta_{\text{C}}$  209,6. No espectro de massas observou-se a ocorrência do íon molecular de  $m/z$  144 (1 %).



**Esquema 29** – Rota sintética para a obtenção de 1-hidróxi-2-octanona.

#### 3.5.1.4 Reações biocatalíticas com 1-hidróxi-2-octanona

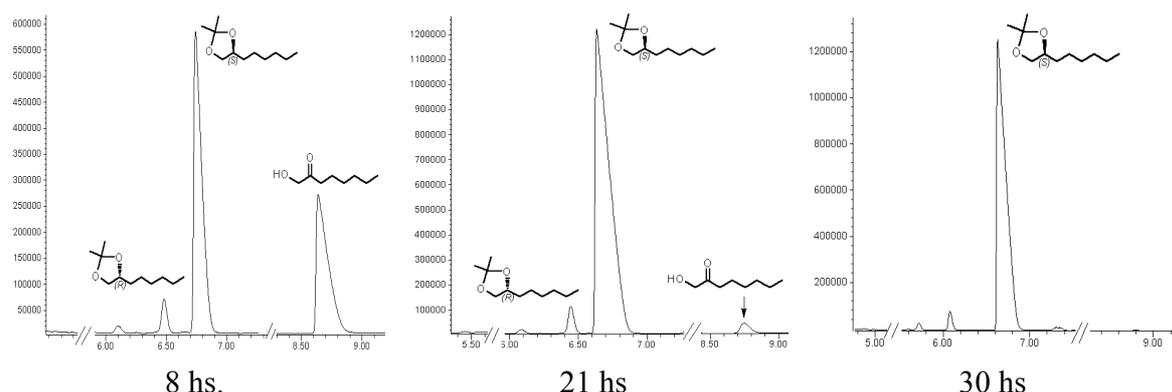
Para finalizar estes experimentos foram realizadas reações biocatalíticas com 1-hidróxi-2-octanona. Como esperado, a reação da cetona **3.28** com o *A. niger* produziu o (*S*)-1,2-octanodiol com um excesso enantiomérico de 80 % no estágio inicial da reação chegando a >99 % após 30 horas de reação (**Cromatograma 6**, **Tabela 12**). Contrariamente, como esperado também, nenhuma alteração na reação com *B. pumilus* CBMAI 0008 foi observada após 6 dias de monitoramento.

**Tabela 12** – Biotransformação de 1-hidróxi-2-octanona **3.28** por *A. niger* CCT 1435 e *B. pumilus* CBMAI 0008<sup>a</sup> em solução tampão fosfato (pH 7,0).

Microrganismo	Tempo (horas)	Conversão (%)	<i>e.e.</i> (diol, %)	Diol (configuração absoluta)
<i>Aspergillus niger</i> CCT 1435 <sup>b</sup>	2 h	17,7	79,8	( <i>S</i> )
	8 h	36,0	86,2	( <i>S</i> )
	21 h	87,6	93,1	( <i>S</i> )
	30 h	> 99	> 99,9	( <i>S</i> )

<sup>a</sup> Reações com *B. pumilus* foram monitoradas por 6 dias, no entanto, não foi observada a conversão de cetona **3.28** ao diol **3.24**.

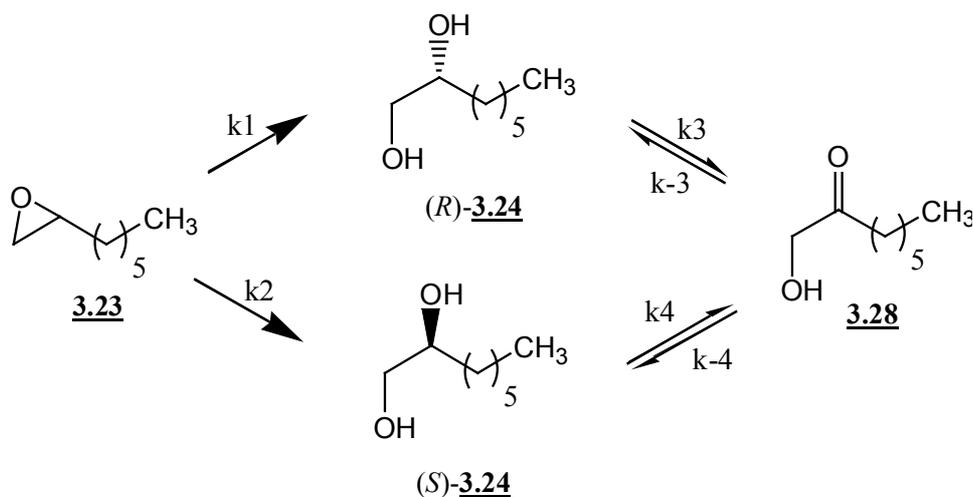
<sup>b</sup> Reações com *A. niger* foram monitoradas por 4 dias. Após de 30 horas, não houve mudança no valor de conversão e no valor do *ee* de (*S*)-**3.24** formado.



**Cromatograma 6** - Cromatogramas (CG-FID) obtidos para reação enzimática de 1-hidróxi-2-octanona com células em repouso de *A. niger* CCT 1435 com 8, 21, 30 hs. As condições de análises foram: 100 °C/10 min, rampa de 30 °C/min até 180 °C,  $T_{inj}$  = 220 °C,  $T_{det}$  = 240 °C, pressão constante de 10 psi. Coluna: Chrompak, CD-Chirasil (25 m x 0,25 mm x 0,25  $\mu$ m).

Resumindo, estes dados podem ser interpretados como se segue (**Esquema 30**): Primeiro, as atividades observadas com os epóxidos sugerem que o *A. niger* CCT 1435 e o *B. pumilus* CBMAI 0008 expressam atividades de epóxido-

hidrolases. No estágio inicial da bioconversão do 1,2-epoxioctano, esta enzima converte o epóxido racêmico no seu correspondente diol com moderada enantiosseletividade pela formação do enantiômero (*R*). Ao estender o tempo de incubação, uma (*R*)-oxidorreductase enantiosseletiva oxida o enantiômero (*R*) a 1-hidróxi-2-octanona, nos dois microrganismos, permitindo que o enantiômero (*S*) se acumule nas reações. No caso de *A. niger*, a cetona formada é imediatamente reduzida enantiosseletivamente, presumivelmente por uma segunda oxidorreductase, permitindo a formação adicional de (*S*)-1,2-octanodiol. Em *B. pumilus*, ao contrário, esta segunda oxidorreductase está ausente e conseqüentemente acumula-se cetona. A desracemização permite que os equivalentes redox se reciclem internamente se uma das oxidorreductases opera com NAD como cofator e a segunda utiliza o NADPH.



**Esquema 30** – Ação seqüencial de epóxido-hidrolase e oxidorreductases na biotransformação de ( $\pm$ )-1,2-epoxioctano e ( $\pm$ )-1,2-octanediol respectivamente, resultando a resolução total do diol em *A. niger* CCT 1435 e uma resolução cinética em *B. pumilus* CBMAI 0008. A sugestão para as constantes cinéticas é  $k_1 > k_2$ ;  $k_3 \gg k_4$ ;  $k_{-4} \gg k_{-3}$  para *A. niger*; e  $k_1 > k_2$ ;  $k_3 > k_4$  para *B. pumilus* (os valores de  $k_{-3}$  e  $k_{-4}$  devem ser extremamente pequenos ou não ocorrem).

### 3.5.2 Conclusão parcial

Ensaio por meio de reações biocatalíticas convencionais demonstraram que *B. pumilus* CBMAI 0008 e *A. niger* CCT 1435 são aptos à abertura de 1,2-epoxioctano de forma enantiosseletiva, validando os resultados obtidos na utilização de sondas quirais.

No caso do *B. pumilus*, este microrganismo não foi ainda mencionado na literatura como produtor de epóxido-hidrolases.

*B. pumilus* CBMAI 0008, *B. pumilus* CBC 008 e *B. pumilus* CBC 009 e o *A. niger* CCT 4846 demonstraram-se capazes de resolver cineticamente o ( $\pm$ )-1,2-octanodiol, permitindo a obtenção do enantiômero (*S*) em excessos enantioméricos muito bons.

No caso de *Aspergillus niger* CCT 1435, a ocorrência de estereoinversão foi confirmada pelos resultados obtidos nas reações biocatalíticas com 1,2-octanodiol e 1-hidróxi-2-octanona. Este microrganismo permitiu a obtenção de rendimento de 88 % de 1,2-octanodiol com 83,5 % de *ee* favorecendo o (*S*)-1,2-octanodiol a partir do racemato .

Foi também estabelecida, neste trabalho, uma metodologia que permitiu a derivatização do diol formado nas reações biocatalíticas na presença de epóxido sem prévia separação.

---

# *Triagem de monooxigenases*

---

## 4. TRIAGEM DE MONOOXIGENASES (MO)

### 4.1. CONSIDERAÇÃO GERAL

A aplicação de oxidoredutases para produção de moléculas quirais é uma estratégia sintética atrativa em química orgânica devido à alta quimio-, regio- e estereoespecificidade que podem ser alcançadas. Esta classe de enzimas catalisa a oxidação e redução de compostos orgânicos e são formadas por desidrogenases, oxidases, peroxidases e oxigenases.<sup>111</sup>

As oxigenases podem ser divididas novamente em duas categorias: monooxigenases (MOs) e dioxigenases (DOs), dependendo se um ou dois átomos de oxigênio são incorporados nos substratos (S):



As MOs requerem dois elétrons para reduzir o segundo átomo de oxigênio e formar água. Portanto, às vezes as monooxigenases são chamadas de “oxidases/oxigenases de função mista”, já que funcionam como oxigenases e como oxidases.<sup>112</sup> As DOs são subdivididas em intermoleculares ou intramoleculares dependendo se os dois átomos de oxigênio são incorporados em substratos separados ou não. Elas podem ser dependentes de cofatores ou independentes.<sup>113</sup> Exemplos de dioxigenases independentes de cofatores são as lipoxigenases, que catalisam a adição específica de oxigênio molecular em ácidos graxos poliinsaturados.<sup>113</sup>

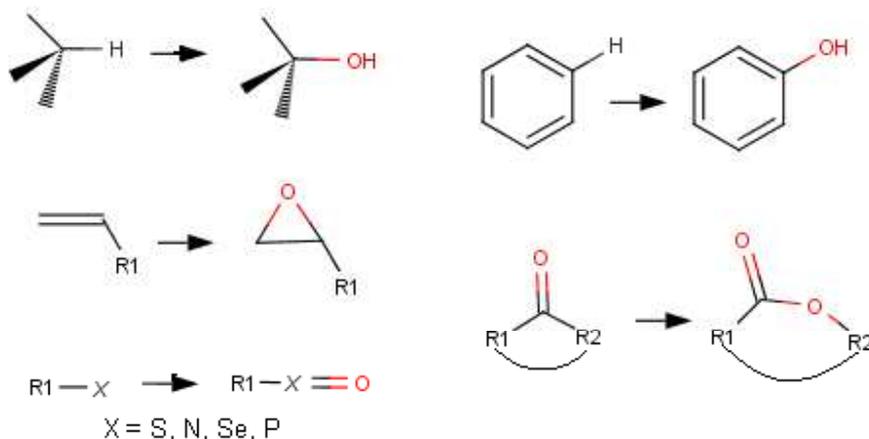
---

<sup>111</sup> Feng X. *Industrial Biotechnol.* **2005**, *1*, 38-50.

<sup>112</sup> Sono, M.; Roach, M.P.; Coulter, E.D.; Dawson, J.H. *Chem. Rev.* **1996**, *96*, 2841-2887.

<sup>113</sup> Li, Z.; van Beilen, J.B.; Duetz, W.A.; Schmid, A.; de Raadt, A.; Griengl, H.; Witholt, B. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2002**, *6*, 136-144.

As reações catalisadas pelas monooxigenases incluem as hidroxilações alifáticas e aromáticas, di-hidroxilações, oxidações de Baeyer-Villiger, oxidações de heteroátomos e epoxidações de alquenos (**Esquema 31**).<sup>114</sup>



**Esquema 31** - Reações de oxidação catalisadas por monooxigenases.<sup>114</sup>

As reações de hidroxilações e epoxidações são catalisadas por monooxigenases dependentes do citocromo P-450<sup>115</sup> e as reações de oxidações de heteroátomos e Baeyer-Villiger são realizadas por enzimas dependentes de flavinas.<sup>116</sup>

#### 4.1.1 Baeyer-Villiger monooxigenases

As reações de oxidação de Baeyer-Villiger (BV) resultam na produção de ésteres ou lactonas a partir de cetonas lineares e cíclicas e são reações de oxidação importantes em química orgânica. Em geral, esta reação (**Esquema 32**) é realizada por peroxiácidos, especialmente o ácido *m*-cloroperbenzóico.<sup>117</sup> Entretanto, tais oxidantes são instáveis, tóxicos e não estereosseletivos, além de não atender aos princípios da química verde. Adicionalmente, os peroxiácidos também promovem a

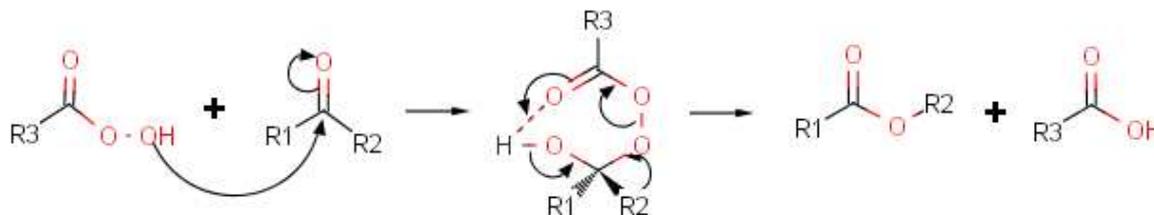
<sup>114</sup> Kamerbeek, N.M.; Janssen, D.B.; van Berkel, W.J.H.; Fraaije, M.W. *Adv. Synth. Catal.* **2003**, *345*, 667-678.

<sup>115</sup> Dawson, J.H.; Sono, M. *Chem. Rev.* **1987**, *87*, 1255-1276

<sup>116</sup> Walsh, C. *Accounts Chem. Res.* **1980**, *13*, 148-155

<sup>117</sup> Roberts, S.M.; Wan, P.W.H. *J. Mol. Catal. B-Enzym.* **1998**, *4*, 111-116.

oxidação de outros grupos funcionais como alcenos, tioéteres e aminas, o que torna necessário em muitos casos a utilização de grupos de proteção. Na procura de oxidantes seguros que permitam alta estereosseletividade, Strukul,<sup>118</sup> Bolm<sup>119</sup> e Lopp<sup>120</sup> obtiveram bons resultados com o desenvolvimento de catalisadores organometálicos quirais para BV assimétricas.



### Esquema 32- Oxidação de Baeyer-Villiger

A identificação do envolvimento de uma etapa de oxidação, mediada por monooxigenases no caminho metabólico de muitos microrganismos, permitiu a utilização destes e de enzimas isoladas como biocatalisadores para reações de Baeyer-Villiger assimétrica de vários substratos. Várias reações biocatalisadas foram introduzidas utilizando monooxigenases em síntese orgânica e demonstraram ser um caminho eficiente para produzir compostos interessantes, como lactonas (bicíclicas),<sup>121,122</sup> sulfóxidos,<sup>123,124</sup> sulfatos cíclicos<sup>125</sup> e tiosulfatos.<sup>126</sup>

<sup>118</sup> a) Gusso, A.; Baccin, C.; Pinna, F.; Strukul, G. *Organometallics* **1994**, *13*, 3442-3451. b)

Strukul, G.; Varagnolo, A.; Pinna, F. *J. Mol. Catal. A-Chem.* **1997**, *117*, 413-423.

<sup>119</sup> a) Bolm, C.; Schlingloff, G.; Weickhard, K. *Angew. Chem. Int. Edit.* **1994**, *33*, 1848, 1849. b)

Bolm, C.; Beckmann, O.; Kühn, T.; Palazzi, C.; Adam, W.; Rao, P.B.; Saha-Möller, C.R.

*Tetrahedron-Asymmetr.* **2001**, *12*, 2441-2446. c) Bolm, C.; Beckmann, O.; Palazzi, C. *Can. J. Chem.* **2001**, *79*, 1593-1597.

<sup>120</sup> Lopp, M.; Paju, A.; Kanger, T.; Pehk, T. *Tetrahedron Lett.* **1996**, *37*, 7583-7586.

<sup>121</sup> Alphand, V.; Furstoss, R. *J. Mol. Catal. B-Enzym.* **2000**, *9*, 209-217.

<sup>122</sup> Stewart, J. D. *Curr. Org. Chem.* **1998**, *2*, 195-216.

<sup>123</sup> Colonna, S.; Gaggero, N.; Pasta, P.; Ottolina, G. *Chem. Commun.* **1996**, *20*, 2303-2307.

<sup>124</sup> Chen, G.; Kayser, K.K.; Mihovilovic, M.D.; Mrstik, M.E.; Martinez, C.A.; Stewart, J.D. *New J. Chem.* **1999**, *23*, 827-832.

<sup>125</sup> Colonna, S.; Gaggero, N.; Carrea, G.; Pasta, P. *Chem. Commun.* **1998**, *7*, 415-416.

#### 4.1.1.1 Ocorrências e tipos Baeyer-Villiger monooxigenases

A primeira indicação de uma reação de BV biológica foi relatada em 1948 por Turfitt, observando a degradação de colestanona por *Proactinomyces erythropolis*.<sup>127</sup> Desde então, as oxidações tipo Baeyer-Villiger foram encontradas na biossíntese de muitos produtos naturais, como a síntese de aflatoxina em fungos, síntese de esteróides em plantas e síntese de toxinas em moluscos.<sup>128</sup> Estas enzimas também participam nas vias catabólicas de cetonas utilizadas como fontes de carbono e energia,<sup>129</sup> tais como: metilcetonas alifáticas, hidrocarbonetos alicíclicos, compostos aromáticos e terpenos. Elas também foram observadas nas rotas de degradação microbiana.

As Baeyer-Villiger monooxigenases (BVMOs) são flavoproteínas que dependem de grupo prostético e coenzimas para sua ação catalítica. De acordo com o grupo prostético e coenzima, as BVMOs podem ser divididas em dois tipos predominantes: BVMOs Tipo I-que contêm FAD (Dinucleotídeo de flavina e adenina) e usam NADPH (Dinucleotídeo de nicotinamida e adenina fosfatado) como fonte de elétrons, aparecem como monômeros, homodímeros ou homotetrâmeros; e BVMO Tipo II-que contêm FMN (Mononucleotídeo de flavina) como cofator, utilizam NADH (Dinucleotídeo de nicotinamida e adenina) como doador de elétrons e são compostas de trímeros  $\alpha_2\beta$ .<sup>130</sup> Uma exceção a esta regra constitui a BVMO de *Xanthobacter* sp. pois ela é dependente de FMN e NADPH.

Todas as BVMOs seqüenciadas até o presente constituem exemplos de BVMOs Tipo I baseado em suas propriedades bioquímicas (intracelular, solúvel,

---

<sup>126</sup> Colonna, S.; Gaggero, N.; Carrea, G.; Pasta, P.; Alphanh, V.; Furstoss, R. *Chirality* **2001**, *13*, 40-42.

<sup>127</sup> Turfitt, G.E. *Biochem. J.* **1948**, *42*, 376-383.

<sup>128</sup> Mihovilovic, M.D.; Müller, B.; Stanetty, P. *Eur. J. Org. Chem.* **2002**, *22*, 3711-3730.

<sup>129</sup> Walton, A.Z.; Stewart, J.D. *Biotechnol. Progr.* **2002**, *18*, 262-268.

<sup>130</sup> Willetts, A. *Trends Biotechnol.* **1997**, *15*, 55-62.

contém o FAD, dependente de NADPH, atividade específica de aproximadamente 10 U/mg, e sub-unidade assimétrica de ~60 kDa), as quais foram classificadas como ciclohexanona monooxigenase, (CHMO), ciclohexanona monooxigenase (CPMO), ciclododecanona monooxigenase (CDMO), esteróide monooxigenase (SMO) e 4-hidroxiacetofenona monooxigenase (HAPMO) de acordo com a reação preferencial.<sup>114</sup>

A CHMO isolada por Trudgill<sup>131</sup> da bactéria *Acinetobacter calcoaceticus* NCIMB 9871 é a monooxigenase mais estudada no que se refere a sua atividade biocatalítica. Esta enzima aceita uma faixa muito ampla de substratos, entre eles, a biciclo[3.2.0]hepta-2en-6-ona.<sup>132</sup>

As BVMOs são produzidas por muitas bactérias, tais como, *Acinetobacter calcoaceticus*, *Alcaligenes*, *Arthrobacter*, *Nocardia globerula*, *Pseudomonas putida*, *P. fluorescens*, *P. cepacia*, *Rhodococcus ruber*, *R. rhodochrous*, *Streptomyces*, *Xanthobacter*, *Brevibacterium*, *Mycobacterium tuberculosis*, entre outras.

A ocorrência de BVMOs não está restrita às bactérias. Sua presença já foi relatada em microrganismos eucarióticos como fungos e leveduras, tais como *Curvularia lunata*, *Aspergillus parasiticus*, *Cunninghamella echinulata*, *Beauveria*, *Cylindrocarpon radicumicola*, *Cylindrocarpon destructans*, *Exophiala jeanselmei*, *Dreschlera*, *Penicillium*, *Mucor*, *Cladosporium* e *Geotrichum candidum*.<sup>133</sup>

<sup>131</sup> Donoghue, N.A.; Norris, D.B.; Trudgill, P.W. *Eur. J. Biochem.* **1976**, *63*, 175-192

<sup>132</sup> Doig, S.D.; Simpson, H.; Alphand, V.; Furstoss, R.; Woodley, J.M. *Enzyme Microb. Tech.* **2003**, *32*, 347-355.

<sup>133</sup> Carballeira, J.D.; Alvarez, E.; Sinisterra, J.V. *J. Mol. Catal. B-Enzym.* **2004**, *28*, 25-32.

#### 4.1.1.2 Estrutura e mecanismo de reação Baeyer-Villiger monooxigenases

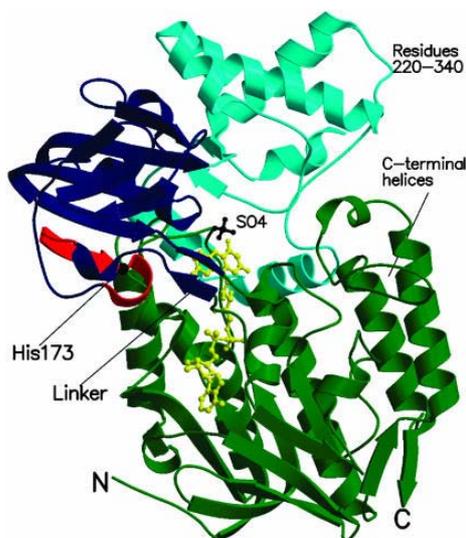
Dentre todas as proteínas de BVMOs clonadas e expressadas, a única proteína que produziu cristal adequado para análise por cristalografia de raio X é a fenilacetona monooxigenase (PAMO), que catalisa a conversão de fenilacetona no éster correspondente, produzida pela bactéria termofílica *Thermobifida fusca*.<sup>134</sup> A estrutura de PAMO foi obtida utilizando o método de Dispersão Anômala de um único comprimento de onda (single-wavelength anomalous dispersion). Esta proteína exibe alta homologia com as outras BVMO Tipo I e a unidade assimétrica consiste num monômero de 62 kDa, com 6 sítios de selênio e dois domínios (**Figura 21**): o domínio de ligação ao FAD (resíduos 10-158 e 390-542) e o domínio de ligação ao NADP(H) (resíduos 159-389).

A troca de Arg-217 ou de Lys-336 por alanina reduz a afinidade desta enzima por NADPH. O resíduo Lys-336 é um aminoácido conservado nos BVMOs Tipo I, assim como a seqüência de aminoácidos FXGXXXHXXXW<sup>135</sup> descoberta recentemente como a seqüência “fingerprint” que caracteriza exclusivamente a família de BVMOs Tipo I. Segundo a estrutura tridimensional, estes aminoácidos não fazem parte do sítio ativo, mas servem de conexão entre os dois domínios. Estudos de mutagênese demonstraram que a troca do resíduo His-173 (estritamente conservado na seqüência de fingerprint) em PAMO por alanina deixa a enzima totalmente inativa.

---

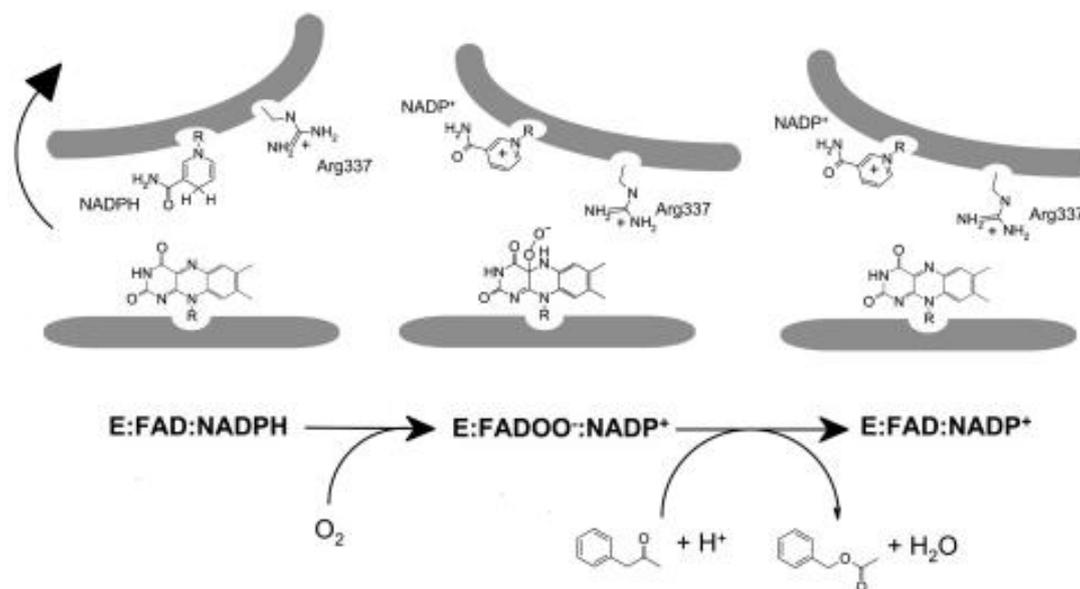
<sup>134</sup> Malito, E.; Alfieri, A.; Fraaije, M.W.; Mattevi, A. *P. Natl. Acad. Sci. USA* **2004**, *101*, 13157-13162

<sup>135</sup> Fraaije, M.W.; Kamerbee, N.M.; van Berkel, W.J.H.; Janssen, D.B. *FEBS Lett.* **2002**, *518*, 43-47.



**Figura 21** - Representação da estrutura terciária do monômero da fenilacetona monooxigenase. O domínio de ligação ao FAD (resíduos 10-158 e 390-542) é representado em verde, o domínio de ligação ao NADP (resíduos 159-389) representado em azul e a seqüência FXGXXXHXXXW (167-177) em vermelho. O cofator FAD é mostrado em amarelo.<sup>134</sup>

A transferência de hidreto da nicotinamida para o átomo N5 da flavina ocorre através do posicionamento adjacente da nicotinamida juntamente com a flavina, de modo que ocorra a sobreposição dos dois anéis. Assim, para esta enzima, o processo catalítico envolve o movimento da cadeia lateral da Arg-337, a qual deve se deslocar para longe da posição observada na estrutura cristalina e permitir a ligação da nicotinamida (**Esquema 33**).



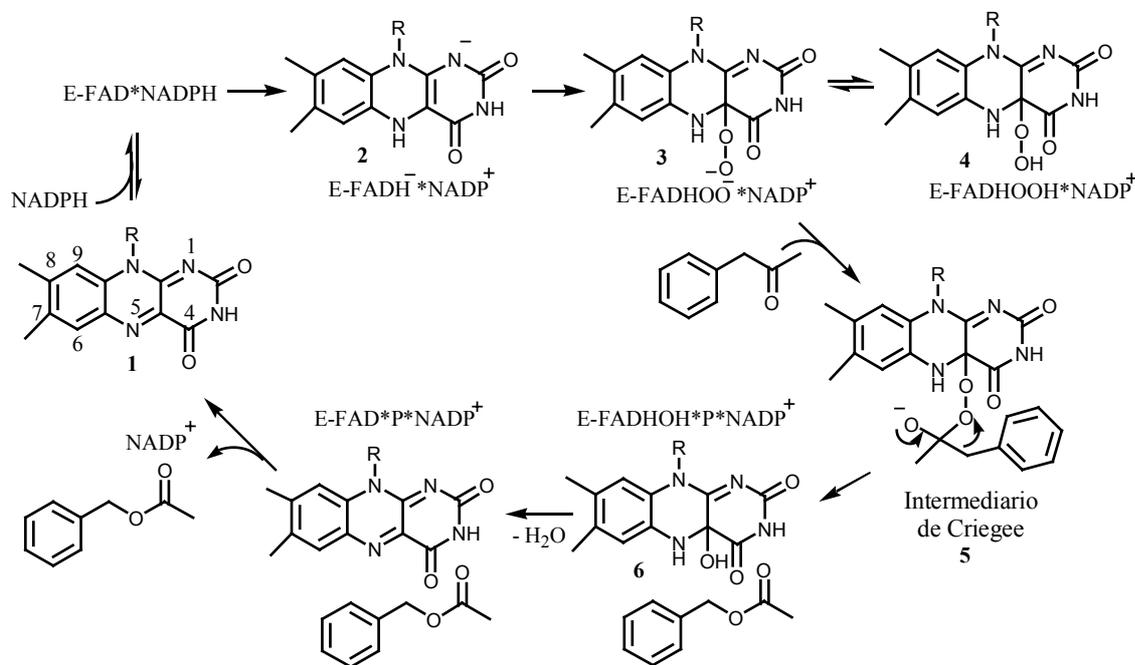
**Esquema 33** - Representação esquemática das mudanças conformacionais que ocorrem nas etapas catalíticas das reações de Baeyer-Villiger monooxigenases. O  $\text{NADP}^+$  permanece ligado à enzima conforme sugerido pela análise cinética da ciclohexanona monooxigenases.<sup>136</sup>

A análise cristalográfica forneceu uma base estrutural para o mecanismo da reação catalítica proposta (**Esquema 34**) com base em dados cinéticos medidos em várias BVMOs.<sup>136,137</sup> O processo biocatalítico inicia-se com a redução de FAD **1** (ligada à enzima, E-FAD) pelo NADPH, gerando um complexo reduzido **2**; este complexo reage rapidamente com  $\text{O}_2$  atmosférico para formar o ânion peróxido-flavina **3**, que se encontra em equilíbrio com a espécie hidroperóxido **4** como uma forma estabilizada na ausência de um substrato. O ânion peróxido **3** atua como nucleófilo atacando a carbonila do substrato, dando lugar à formação do “intermediário de Criegee” **5** e gera um éster/lactona e a hidróxido-flavina **6** por meio de um rearranjo. Finalmente, o ciclo catalítico é completado pela eliminação

<sup>136</sup> Sheng, D.W.; Ballou, D.P.; Massey, V. *Biochemistry-US* **2001**, *40*, 11156-11167.

<sup>137</sup> Kamerbeek, N.M.; Fraaije, M.W.; Janssen, D.B. *Eur. J. Biochem.* **2004**, *271*, 1-10.

de água desta espécie, regenerando o FAD oxidado e liberando o produto e o cofator.

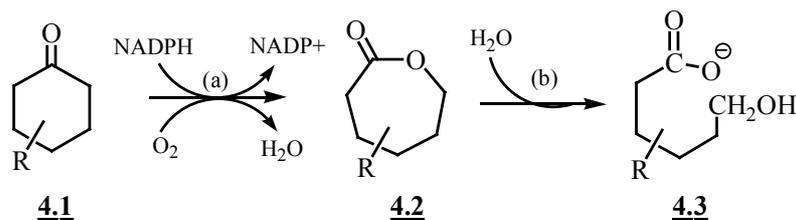


**Esquema 34** - Representação esquemática da reação de oxidação catalisada por Baeyer-Villiger monooxigenases com referência a fenilacetona monooxigenase.<sup>137</sup>

## 4.2 TRIAGEM ENZIMÁTICA DE ALTO DESEMPENHO PARA DETECÇÃO DE MONOOXIGENASES (MO)

Como mencionado anteriormente, a maioria dos ensaios de HTS foi projetada para detecção de atividade enzimática em proteínas purificadas ou em extratos enzimáticos. Neste sentido, essas metodologias de triagem rápida foram especialmente desenvolvidas para detecção de atividades hidrolíticas, ou seja, enzimas que não precisam de cofatores para realizar biotransformações. Contrariamente, as metodologias de HTS para detecção de monooxigenases, enzimas dependentes de cofatores, são extremamente limitadas.

Usualmente, os ensaios para triagem de atividade de BVMOs baseiam-se em detecção do produto (éster ou lactona) pelos métodos cromatográficos ou pelo monitoramento da oxidação do cofator nicotinamida<sup>138</sup>. O primeiro ensaio de triagem rápida para detecção de atividade de BVMOs foi desenvolvida pelo grupo de Littlechild<sup>139</sup> utilizando cetonas monocíclicas. (**Esquema 35**)



**Esquema 35** - Princípio de detecção de Baeyer-Villiger monooxigenases. (a) Enzima (com adição de cofator NADPH) ou células íntegras; (b) esterase.

O princípio do ensaio inspirou-se a partir da rota de degradação do cicloexanol a adipato pelo *Acinetobacter calcoaceticus* NCIMB 9871<sup>140</sup> e consiste em dois passos enzimáticos seqüenciais. Primeiro, a cetona cíclica **4.1** é transformada em lactona **4.2** pela ação de uma enzima ou microrganismo com atividade de BVMO e, em seguida, ocorre a abertura da lactona pela ação de uma esterase que é adicionada ao meio reacional. A reação positiva é identificada pela redução do pH da mistura reacional pela formação do ácido **4.3**.

O primeiro método fluorogênico para detectar BVMO foi relatado recentemente pelo grupo de Furstoss.<sup>28</sup> O princípio de detecção está ilustrado no **Esquema 36**: a oxidação da sonda fluorogênica **4.4** por uma BVMO resulta na formação do éster **4.5**, que sofre uma hidrólise espontânea ou enzimática (pela enzima hidrolítica presente nas células) formando o álcool **4.6**. Em seguida, ocorre a oxidação do álcool **4.6** a aldeído **4.7**, pela ação de HLADH/NAD<sup>+</sup> (álcool

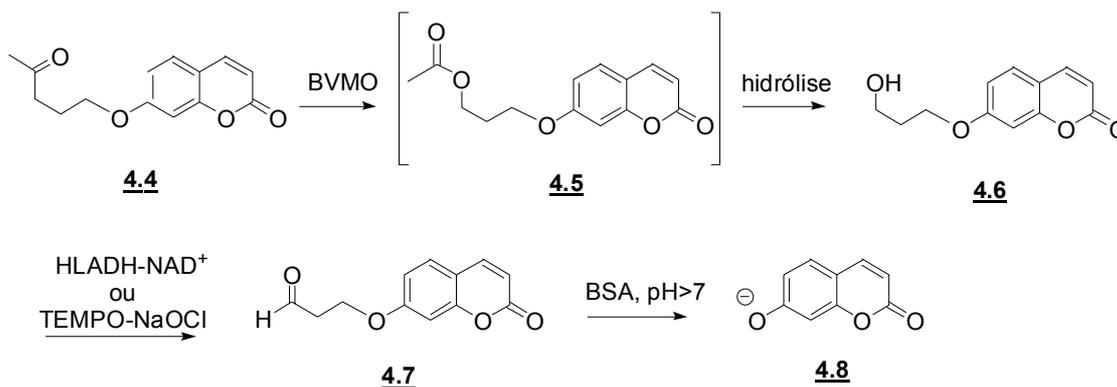
<sup>138</sup> Ryerson, C.C.; Ballon, D.P.; Walsh, C. *Biochemistry-US* **1982**, *21*, 2644-2655.

<sup>139</sup> Watts, A.B.; Beecher, J.; Whitcher, C.S.; Littlechild, J.A. *Biocatal. Biotransfor.* **2002**, *20*, 209-214.

<sup>140</sup> Donoghue, N.A.; Trudgill, P.W. *Eur. J. Biochem.* **1975**, *60*, 1-7.

desidrogenase de fígado de cavalo/nicotinamida adenina dinucleotídeo) ou pelo reagente químico TEMPO-NaOCl (TEMPO = *N*-oxil-2,2,6,6-tetrametilpiperidina), para finalmente sofrer a reação de  $\beta$ -eliminação com a liberação da umbeliferona

#### 4.8



**Esquema 36** - Princípio do ensaio fluorogênico para Baeyer-Villiger monooxigenases.<sup>28</sup>

A validação da metodologia neste trabalho foi realizada utilizando quatro microrganismos selvagens (*Acinetobacter calcoaceticus* NCIMB 9871, *Acinetobacter* sp. TD63, *Pseudomonas* sp. NCIMB 9872 e *Arthrobacter* sp. M5) e um recombinante *E. coli* TOP10 que expressa a cicloexanona monooxigenase do *A. calcoaceticus* NCIMB 9871, todos com atividade de BVMO reconhecida.<sup>141</sup> A abordagem deste ensaio é muito similar à proposta por Reymond para as enzimas hidrolíticas,<sup>10</sup> com uma etapa de hidrólise a mais na seqüência das reações. A terceira metodologia disponível atualmente na literatura é a metodologia desenvolvida numa cooperação entre o Prof. Reymond e a Profª. Anita Marsaioli<sup>29</sup> e será detalhada no tópico seguinte.

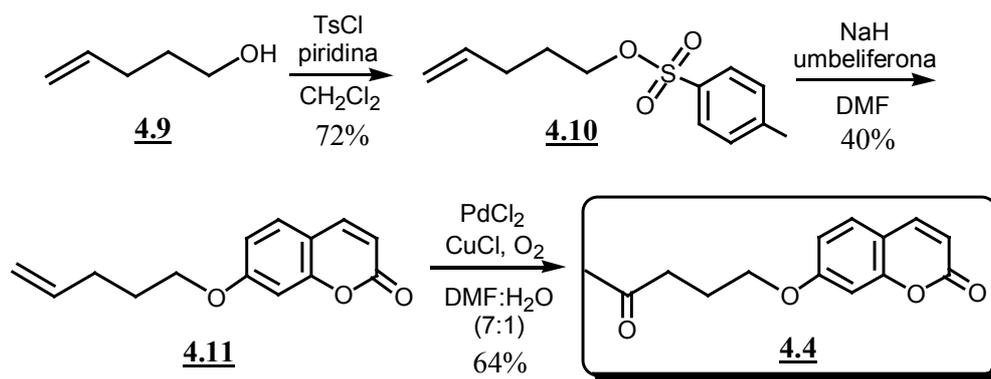
<sup>141</sup> (a) Simpson, H.D.; Alphan, V.; Furstoss, R. *J. Mol. Catal. B-Enzym.* **2001**, *16*, 101-108. (b) Alphan, V.; Furstoss, R. *J. Org. Chem.* **1992**, *57*, 1306-1309. (c) Gutiérrez, M.C.; Alphan, V.; Furstoss, R. *J. Mol. Catal. B-Enzym.* **2003**, *21*, 231-238.

É importante ressaltar que as reações de oxidação do tipo Baeyer-Villiger são uma linha de pesquisa do nosso grupo de biocatálise e que vinha sendo avaliada em microrganismos da biodiversidade brasileira através de ensaios biocatalíticos convencionais utilizando CG-EM/FID. Conseqüentemente, a implementação de um ensaio de HTS para detecção de monooxigenases com células microbianas ampliou os horizontes desta linha de pesquisa. Assim, de acordo com o **Fluxograma 2** (pag 46) iniciou-se a preparação das sondas para detecção de monooxigenases.

### 4.3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

#### 4.3.1 Preparação da sonda fluorogênica **4.4** para detecção de monooxigenases

A sonda **4.4** para detectar Baeyer-Villiger monooxigenases (**Esquema 37**) foi inspirada no trabalho de Furstoss e colaboradores<sup>142</sup> e sintetizada pela Dra. Beatriz Bicalho.<sup>91,143</sup> A preparação da sonda iniciou-se pela reação de tosilção do álcool olefínico **4.9** em CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, seguida de uma reação de alquilação com umbeliferona. Após a obtenção deste último composto, a dupla ligação é oxidada à cetona **4.4** na presença de cloreto de paládio e cloreto de cobre em DMF:H<sub>2</sub>O (7:1, v/v).



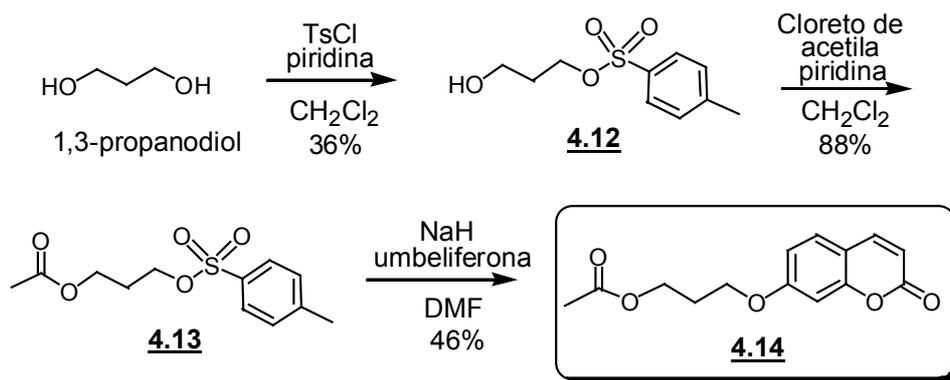
**Esquema 37** - Representação esquemática da síntese de sonda **4.4**.<sup>143</sup>

<sup>142</sup> Slegers, A.; Simpson, H.D.; Alphand, V.; Furstoss, R. *Biotrans* **2001**, p.381.

<sup>143</sup> Bicalho, B.; Chen, L. S.; Grognum, J.; Reymond, J.-L.; Marsaioli, A. J. *J. Brazil. Chem. Soc.* **2004**, *15*, 911-916.

A preparação do éster **4.14** (produto de oxidação da sonda **4.4**) foi realizada neste trabalho e está ilustrada no **Esquema 38**. O composto **4.12** foi obtido a partir do 1,3-propanodiol e cloreto de toсила (1:1), e a reação foi acompanhada por CCD para minimizar a quantidade do produto di-tosilado. Este composto foi caracterizado por RMN de  $^1\text{H}$  pela presença dos sinais em  $\delta_{\text{H}}$  7,79 e 7,35, atribuídos aos hidrogênios aromáticos e pela presença do sinal em  $\delta_{\text{H}}$  2,45 atribuído à metila aromática do grupo toсила. No espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  foi observado um conjunto de sinais entre  $\delta_{\text{C}}$  144 a 127 correspondentes aos carbonos benzênicos, e a presença de um sinal em  $\delta_{\text{C}}$  21,7 atribuído à metila aromática.

Na sequência, o derivado tosilado **4.12** foi acetilado na presença de cloreto de acetila<sup>144</sup> resultando na formação de **4.13** em 88% de rendimento. A caracterização deste composto foi realizada pela observação no espectro de RMN de  $^1\text{H}$  pela ausência do singlete largo em  $\delta_{\text{H}}$  2,25 (atribuído ao OH) do material de partida e pela presença de um singlete em  $\delta_{\text{H}}$  1,97 atribuído à metila do grupo acetila. A presença de uma metila adicional em relação ao material de partida foi confirmada pelo sinal em  $\delta_{\text{C}}$  20,8 no espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  e a presença do sinal em  $\delta_{\text{C}}$  170,5 correspondente ao carbono carboxílico.



**Esquema 38** - Rota sintética para a obtenção do padrão controle positivo **4.14**.

<sup>144</sup> Trost, B.M.; Chan, D.M.T. *J. Am. Chem. Soc.* **1983**, *105*, 2315-2325.

Finalmente, a alquilação da umbeliferona com o composto **4.13** resultou no éster **4.14** obtido como um sólido levemente amarelado. A caracterização do éster por RMN de  $^1\text{H}$  evidenciou a substituição dos sinais em  $\delta_{\text{H}}$  7,79 e 7,35, presentes no material de partida **4.13**, por um conjunto de cinco sinais entre  $\delta_{\text{H}}$  7,60 - 6,25, atribuídos aos cinco hidrogênios da porção umbeliferila. No espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  também foi observado a presença de quatro carbonos quaternários adicionais em  $\delta_{\text{C}}$  161,7; 160,9; 155,6; e 112,5.

A sonda **4.4** foi avaliada com respeito aos reagentes (HLADH,  $\text{NAD}^+$  e BSA)\* pela Dra. Beatriz Bicalho e empregada por ela para detectar atividade de BVMO em 11 microrganismos da coleção CCT.<sup>91</sup> Entretanto, sob as condições empregadas nenhum dos microrganismos testados demonstrou atividade enzimática significativa. Contudo, nas reações com *T. cutaneum* CCT 1903 e *S. rubidea* CCT 5732 apresentaram um aumento muito discreto da intensidade dos sinais de fluorescência sugerindo a presença de BVMO.<sup>143</sup>

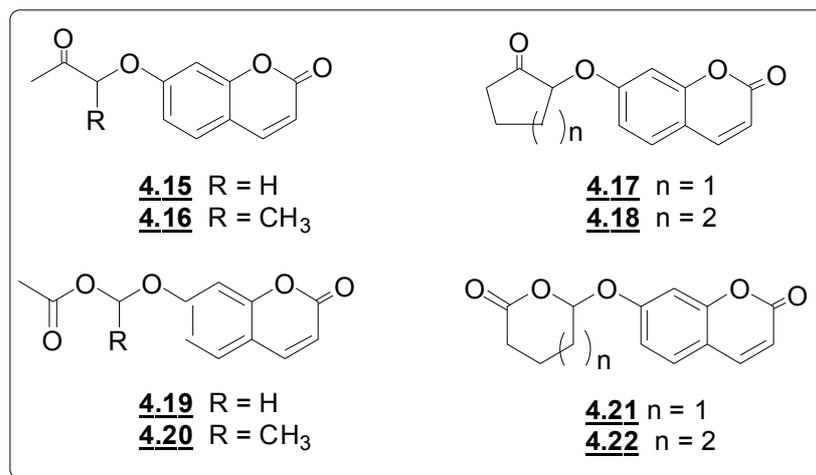
Assim, foram preparadas outras sondas para serem implementadas em HTS visando a detecção de monooxigenases em células íntegras.

#### 4.3.2 Sondas fluorogênicas **4.15** – **4.18** para detecção de monooxigenases

As novas sondas para detecção de monooxigenases consistem em quatro cetonas derivadas da umbeliferona, duas alifáticas **4.15** – **4.16** e duas cíclicas **4.17** – **4.18**, e seus respectivos ésteres e lactonas **4.19** – **4.22** foram utilizados como controles positivos (**Figura 22**).<sup>29</sup>

---

\* Esta parte do trabalho foi realizada antes da publicação do trabalho de Prof. Furstoss (ref 28).

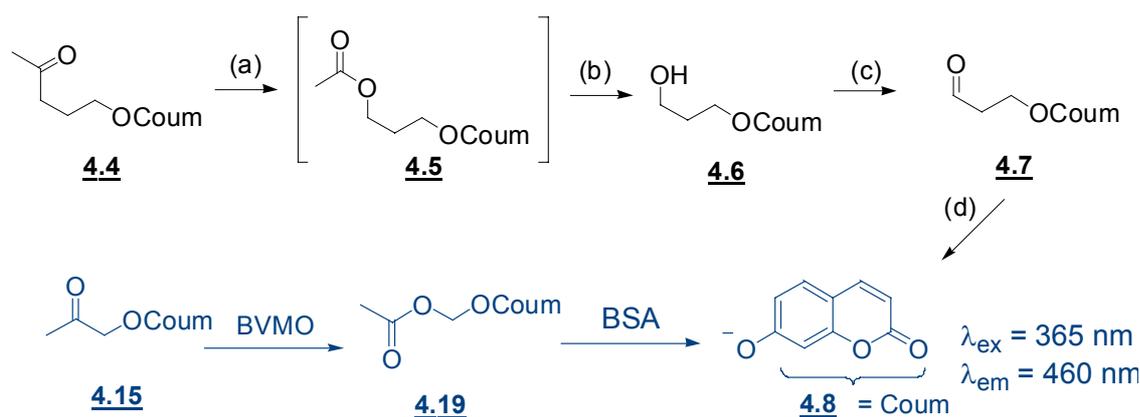


**Figura 22** - Sondas fluorogênicas **4.15** – **4.18** e os correspondentes ésteres e lactonas **4.19** – **4.22** utilizados para a detecção de monooxigenases.

As novas sondas **4.15** – **4.18** para detecção de monooxigenases foram preparadas, numa única etapa, por alquilação da umbeliferona com derivados de clorocetonas na presença de carbonato de potássio e iodeto de sódio. O tratamento destas sondas com o ácido *m*-cloroperbenzóico forneceram os adutos de Baeyer-Villiger **4.19** – **4.22**, que serviram de controles positivos.<sup>29</sup> Estas sondas foram sintetizadas e gentilmente cedidas pelo doutorando Renaud Sicard do grupo do Prof. Reymond.

Estas sondas são de detecção direta e mais fáceis de serem aplicadas do que a sonda **4.4**. Elas não dependem de uma hidrólise espontânea (ou catalisada por enzima hidrolítica presente nas células) e tampouco precisam de um segundo sistema enzimático, e.g. HLADH/NAD<sup>+</sup>, ou de um sistema de oxidação química, e.g. TEMPO-NaOCl, fazendo com que os testes com as sondas **4.15** – **4.18** sejam mais econômicos e fáceis de aplicar.

Uma comparação rápida entre a sonda **4.4** e a sonda **4.15** está ilustrada no **Esquema 39**. A rota de detecção com o substrato **4.4** precisa necessariamente de quatro reações catalíticas antes da liberação de umbeliferona. Esses processos puderam ser simplificados em um esquema direto, o qual depende somente da ação da enzima alvo e uma reação de eliminação promovida por BSA.



**Esquema 39** - Comparação dos ensaios fluorogênicos empregando a sonda **4.4** (em preto) e a nova sonda **4.15** (em azul). (a) BVMO; (b) hidrólise espontânea ou enzimática; (c) oxidação enzimática (HLADH-NAD<sup>+</sup>) ou química (TEMPO-NaOCl); (d) β-eliminação

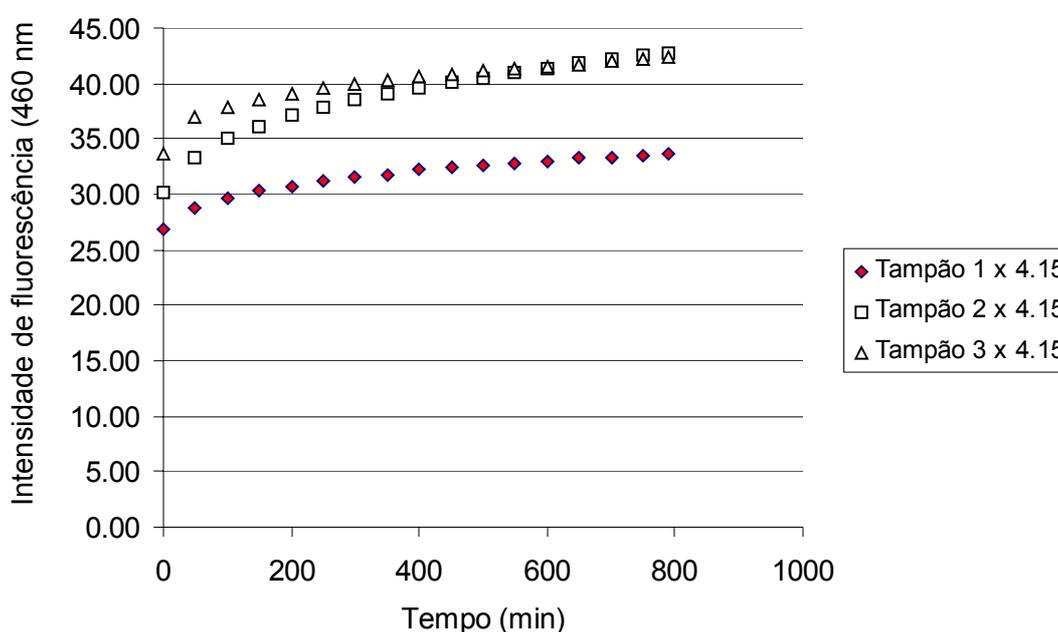
### 4.3.3 Adaptação de HTS com células íntegras para detecção de monooxigenases

Devido à simplificação do sistema de detecção (ver **Esquema 39**) não houve necessidade de avaliar as sondas **4.15** - **4.18** contra outros reagentes, pois utilizou-se a concentração celular de 0,5 mg/mL determinada nos experimentos anteriores e a mesma concentração das sondas e de BSA.

Foi verificada, porém, a estabilidade das sondas **4.15** - **4.18** e a emissão de fluorescência dos produtos **4.19** - **4.22** nas diferentes soluções tampão, com o intuito de selecionar a solução tampão que confere maior estabilidade aos

substratos e máxima emissão de fluorescência aos produtos. As três soluções tampão escolhidas foram: 20 mM de tampão borato (pH 8,8; T1); 100 mM de tampão glicina-NaOH (pH 9,6; T2); e 550 mM de tampão bicarbonato (pH 9,1; T3). Estas soluções tampão foram escolhidas uma vez que já foram empregadas e demonstraram diferença na intensidade de fluorescência.<sup>28</sup>

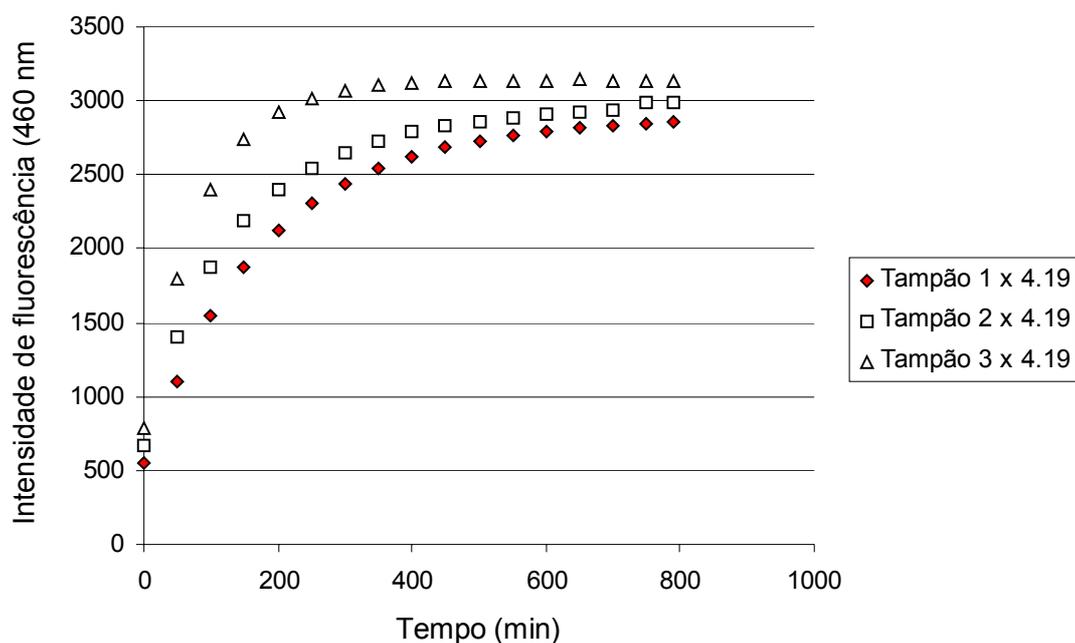
As condições de análise foram adaptadas às condições reais, substituindo as suspensões celulares pela solução tampão. Assim, em cada poço da microplaca adicionou-se 10  $\mu$ L de substrato ou de produto (2 mM), 100  $\mu$ L de solução tampão (T1, T2 ou T3) e 90  $\mu$ L de BSA (4,4 mg/mL em T1-T3). A **Figura 23** ilustra a estabilidade da sonda **4.15** nas três soluções tampão, para a qual observou-se maior estabilidade em tampão borato pH 8,8. As outras três sondas apresentaram comportamentos similares.



**Figura 23** - Influência das soluções tampão na estabilidade da sonda **4.15**.

Condições: 100  $\mu$ M da sonda **4.15** e solução 2 mg/mL de BSA.

A intensidade da fluorescência dos produtos de oxidação **4.19** – **4.22** (controles positivos) em tampão borato (T1) mostrou-se ligeiramente menor que a fluorescência no tampão glicina-NaOH (T2) e no tampão bicarbonato (T3) (**Figura 24**). Entretanto, a diferença foi pequena e considerando-se o fato de as sondas serem mais estáveis em tampão borato e por este já ter sido testado para vários tipos de enzimas, foi decidido continuar utilizando o mesmo para nosso teste de monooxigenases. Assim, as condições selecionadas para detecção de monooxigenases em células íntegras são: concentração final da sonda de 100  $\mu$ M, concentração final de BSA de 2 mg/mL e de suspensão celular de 0,5 mg/mL, em solução tampão borato pH 8,8.



**Figura 24** - Influência das soluções tampão na emissão de fluorescência de **4.19**

Condições: 100  $\mu$ M do éster **4.19** e solução 2 mg/mL de BSA.

#### 4.3.4 Ensaios de HTS para detecção de monooxigenases por meio das sondas fluorogênicas 4.15 – 4.18

De forma análoga aos ensaios para epóxido-hidrolases, foram realizados uma série de experimentos para detecção de atividades enzimáticas de monooxigenases, de acordo com o procedimento detalhado na parte experimental (item **6.8.3.3**). As reações controle (branco) foram realizadas substituindo-se a suspensão celular por solução tampão. Também foram incluídos controles positivos com os ésteres/lactonas 4.19 – 4.22. As reações foram monitoradas a cada 10 minutos em leitor de fluorescência durante 24 horas e os resultados estão apresentados na **Tabela 13**.

Como estas quatro sondas são inéditas, incluímos nos testes um conjunto de microrganismos (entradas 1-11, Tabela 13) de reconhecida atividade de monooxigenases frente a 3-hexil-ciclobutanona e 4-metil-cicloexanona.<sup>145</sup>

Foram observadas atividades de monooxigenases, com as sondas fluorogênicas para os seguintes microrganismos: *A. niger* CCT 5559 (entrada 2), *C. echinulata* CCT 4259 (entrada 5), *C. eragrostidis* CCT 5634 (entrada 6), *C. lunata* CCT 5629 (entrada 8) e *C. pallens* CCT 5654 (entrada 9) frente a diferentes sondas. Um sinal de fluorescência muito fraco foi observado com *G. candidum* CCT 1205 (entrada 10) frente à sonda 4.18. (**Tabela 13**). Estes resultados estão em concordância com os obtidos por biocatálise convencional com as cetonas supracitadas.<sup>145</sup>

Além disso, três microrganismos que não apresentaram atividade de BVMO na presença de 3-hexil-ciclobutanona e 4-metil-cicloexanona também não emitiram fluorescência nos ensaios com as quatro sondas (entrada 1, 4 e 11, **Tabela 13**). Estas concordâncias de respostas dos microrganismos indicam uma correlação de

<sup>145</sup> Gonçalves, R.A.C.; Porto, A.L.M.; Pinheiro, L.; Cagnon, J.R.; Manfio, G.P.; Marsaioli, A.J. *Food Technol. Biotech.* **2004**, *42*, 355-361.

82 %, validando desta maneira a utilização destas novas sondas para detecção de monooxigenases.

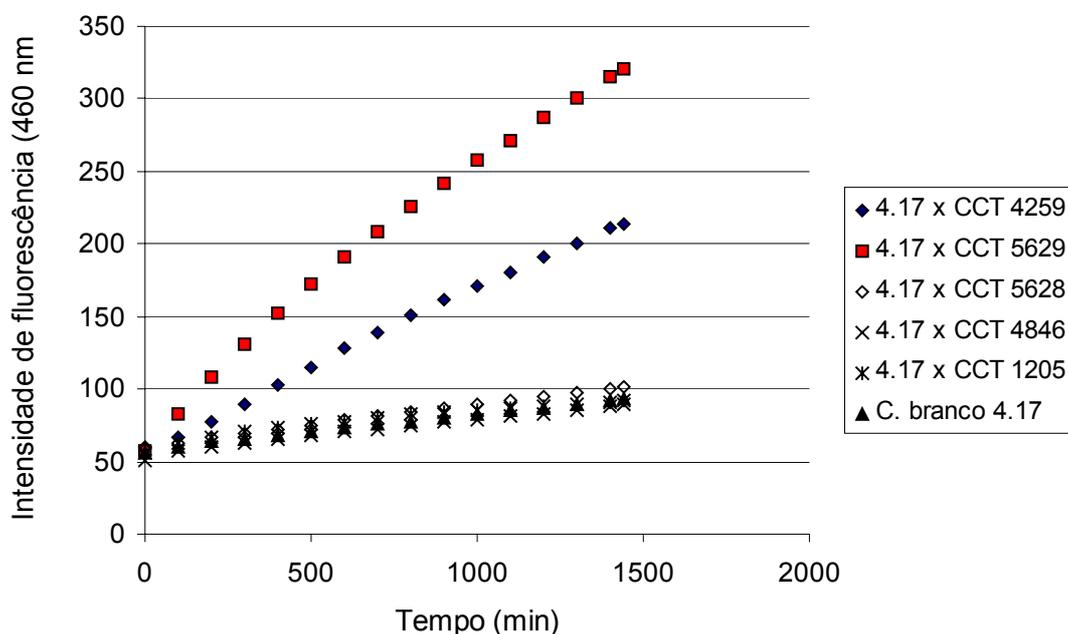
**Tabela 13**– Intensidade de fluorescência observada nos testes de 26 microrganismos com as sondas **4.15** – **4.18** para detecção de monooxigenases <sup>a</sup>

<b>Entrada</b>	<b>Microrganismo</b>	<b>4.15</b>	<b>4.16</b>	<b>4.17</b>	<b>4.18</b>
1	<i>Aspergillus niger</i> CCT 4846	-	-	-	-
2	<i>Aspergillus niger</i> CCT 5559	-	-	40	13
3	<i>Aspergillus oryzae</i> CCT 0975	-	-	-	-
4	<i>Aspergillus terreus</i> CCT 3320	-	-	-	-
5	<i>Cunninghamella echinulata</i> CCT 4259	90	70	120	13
6	<i>Curvularia eragrostidis</i> CCT 5634 <sup>b</sup>	16	-	110	3
7	<i>Curvularia lunata</i> CCT 5628	-	-	-	-
8	<i>Curvularia lunata</i> CCT 5629	-	-	230	7
9	<i>Curvularia pallescens</i> CCT 5654 <sup>b</sup>	9	-	110	4
10	<i>Geotrichum candidum</i> CCT 1205	-	-	-	5
11	<i>Trichoderma sp</i> CCT 5551	-	-	-	-
12	Fungo CCT 5560 <sup>b</sup>	-	-	29	17
13	Fungo CCT 5632 <sup>b</sup>	-	12	260	5
14	Fungo CCT 5661	10	-	-	30
15	<i>Rhizopus oryzae</i> CCT 4964 <sup>b</sup>	35	27	65	7
16	<i>Trichosporon cutaneum</i> CCT 1903	350	290	230	16
17	AMA 1	-	-	-	-
18	AMA 6	-	-	-	-
19	AMA 7 <sup>b</sup>	209	120	167	24
20	AMA 23	-	-	-	-
21	AMA 27	-	-	-	-
22	AMA 28 <sup>b</sup>	-	-	-	16
23	AMA 35 <sup>b</sup>	-	-	-	18
24	SA 2 <sup>b</sup>	-	-	24	-
25	SA 7	-	-	-	-
26	SA 8 <sup>b</sup>	-	36	-	-

<sup>a</sup> Valor (unidade arbitrária de fluorescência) = diferença entre a média de duplicatas das amostras e a média de triplicatas de controle branco (substrato + sol. tampão + BSA) após 24 horas de reação. Os controles com as células microbianas não apresentaram fluorescência detectável.

<sup>b</sup> Pré-incubação com substrato a 28 °C por 24 horas também.

O fungo *C. echinulata* CCT 4259 apresentou atividade considerável ao ser testada com as quatro sondas fluorogênicas (**Figura 25**, em azul), sendo que este gênero de microrganismo já é conhecido por possuir atividade de Baeyer-Villiger monooxigenase.<sup>146,147</sup> Este microrganismo e *C. lunata* CCT 5629 apresentaram atividade frente às cetonas cíclicas **4.17** (**Figura 25**, em vermelho) e **4.18**.



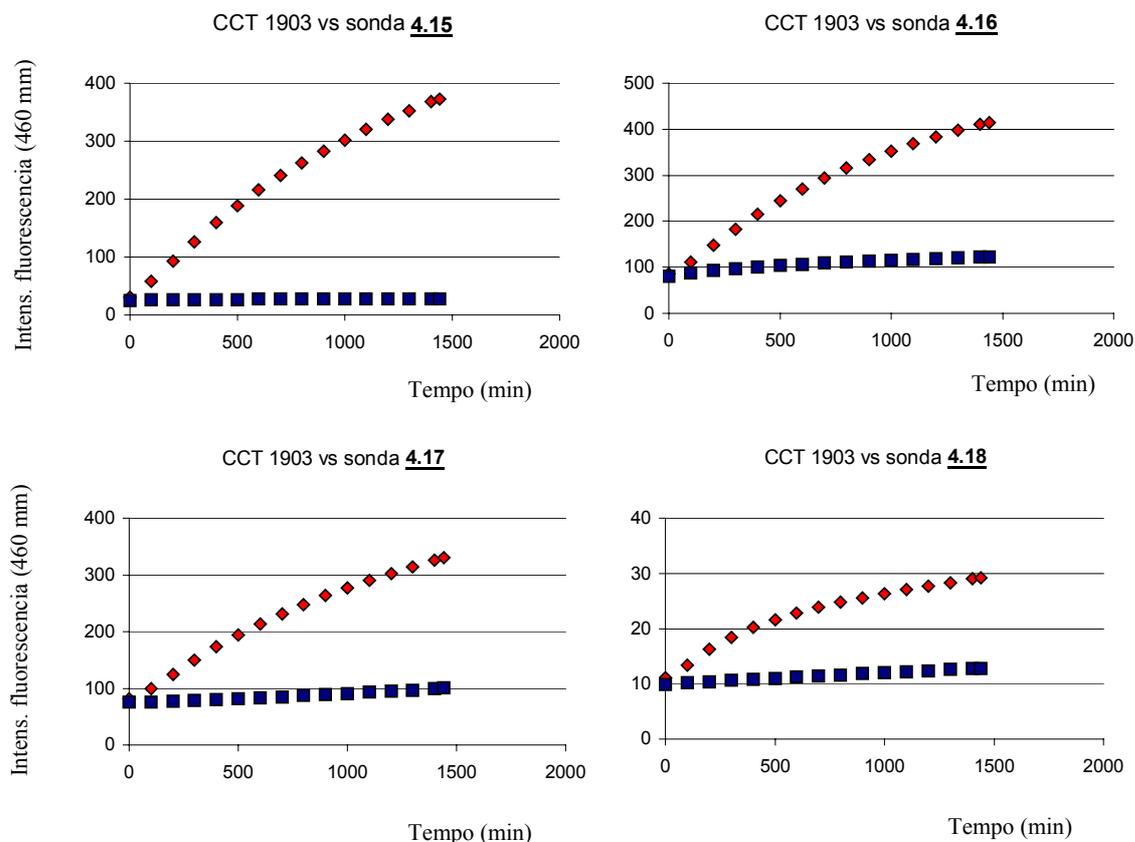
**Figura 25** - Triagem de atividade de monooxigenases em *Cunninghamella echinulata* CCT 4259, *Curvularia lunata* CCT 5629 e CCT 5628, *Aspergillus niger* 4846 e *Geotrichum candidum* CCT 1205 frente a sonda **4.17**. Condições: 100  $\mu$ M de substrato, 0,5 mg/mL de suspensão celular, 2 mg/mL de BSA em 20 mM de tampão borato (pH 8,8),  $\lambda_{\text{ex}} = 365$  nm,  $\lambda_{\text{em}} = 460$  nm.

<sup>146</sup> Fairlamb, I.J.S.; Grant, S.; Grogan, G.; Maddrell, D.A.; Nichols, J.C. *Org. Biomol. Chem.* **2004**, 2, 1831-1833

<sup>147</sup> Gonçalves, R.A.C. “*Intermediários Sintéticos Versáteis, Enantiomericamente Puros, Obtidos por Biocatálise*” Tese de doutorado, Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, **2002**.

*A. oryzae* CCT 0975 e *C. lunata* CCT 5628 demonstraram capacidade em transformar as cetonas cíclicas em lactona mas não foram ativos frente às sondas utilizadas (entrada 3 e 7, **Tabela 13**). Estes falsos negativos foram atribuídos a vários fatores: 1) condição de reação desfavorável no formato de microplaca (leitura de 24 hs contra ensaios biocatalíticos clássicos para BVMO de 72-90 horas em agitação); 2) seletividade de substrato de BVMO produzido por estes microrganismos; e 3) redução competitiva de cetonas **4.15** – **4.18** aos correspondentes álcoois, ao invés da reação de oxidação.

Entre os microrganismos não testados anteriormente *via* biocatálise convencional (entradas 12-26, **Tabela 13**), três apresentaram (entradas 15, 16 e 19) alta atividade catalítica positiva frente às quatro sondas empregadas (**Figura 26**). Entretanto, ao serem testados por biocatálise convencional, com várias cetonas estruturalmente distintas, a ação de BVMO não foi observada. Estes resultados falso-positivo mereceram uma atenção particular, que discutiremos nos ensaios de biocatálise convencional, nos quais será demonstrado que estes microrganismos possuem atividades de hidroxilases. Assim, as sondas inicialmente programadas para detectar BVMO apresentaram uma gama de detecção ampla e eficiente para monooxigenases em geral. O mecanismo da resposta da sonda frente a hidroxilase será discutido no tópico seguinte.



**Figura 26** – Reações representativas da triagem de atividade de monooxigenases frente às 4 sondas **4.15** – **4.18**. Condições: 100  $\mu$ M de substrato, 0,5 mg/mL de suspensão celular de *T. cutaneum* CCT 1903, 2 mg/mL de BSA, 20 mM de tampão borato (pH 8,8).  $\lambda_{\text{ex}} = 365$  nm,  $\lambda_{\text{em}} = 460$  nm.

#### 4.3.5 Conclusão parcial

Este trabalho constitui o primeiro relato na literatura de um ensaio no formato de HTS baseado na fluorescência e que utiliza células microbianas para a detecção de monooxigenases.\*

\* No ensaio relatado pelo Prof. Furstoss, eles realizam as biotransformações em volume de 50 mL em Erlenmeyer, após um tempo de reação retira-se uma alíquota do meio para realizar a leitura em microplaca na presença dos outros reagentes.

Dentre as três soluções tampão testadas, o melhor resultado foi obtido com a solução tampão borato para ser utilizada nos ensaios de HTS.

As quatro sondas fluorogênicas testadas aqui são inéditas e apresentam um esquema de detecção de fácil manipulação e mais econômico que o ensaio fluorogênico já relatado. Adicionalmente, elas são estruturalmente diferentes permitindo, desta maneira, a detecção de uma maior variedade de monooxigenases.

Entre os onze microrganismos testados anteriormente contra as cetonas *via* biocatálise convencional, nove deles foram concordantes com os testes de fluorescência (6 foram positivos e 3 foram negativos), validando desta maneira este ensaio com 82% de concordância. Desta maneira, podemos afirmar que este ensaio é altamente recomendável para triagens de monooxigenases em coleções de microrganismos.

Por meio destes ensaios foram detectados vários microrganismos com expressiva atividade de monooxigenases, entre eles o *T. cutaneum* CCT 1903, *R. oryzae* CCT 4964 e AMA 7.

## 4.4 VALIDAÇÃO DOS ENSAIOS DE HTS PARA MONOOXIGENASES VIA BIOCATÁLISE CONVENCIONAL

### 4.4.1 Resultados e discussões

#### 4.4.1.1 Reações biocatalíticas com *Trichosporon cutaneum* CCT 1903

Devido ao intenso sinal de fluorescência apresentado por *T. cutaneum* na triagem de monooxigenases, atribuído inicialmente a uma Baeyer-Villiger monooxigenase, este microrganismo foi testado com uma série de cetonas estruturalmente diferentes, totalizando quatorze experimentos com oito substratos diferentes (**Tabela 14**). Em todos os experimentos foram detectados os produtos de redução das cetonas exceto com 1-(4-metóxi-fenil)-heptanona e 1-(4-metóxi-fenil)-propanona.

**Tabela 14** - Reações biocatalíticas realizadas com *Trichosporon cutaneum* CCT 1903 com cetonas estruturalmente diferentes

Substrato	Condições experimentais	Resultado
2-heptanona	❖ Pre-incubação, células em repouso, tampão fosfato pH 7,0	Produto de redução: 2-heptanol
2-heptanona	❖ Células em repouso, tampão fosfato pH 7,0	Produto de redução: 2-heptanol
2-heptanona	❖ Células em crescimento, meio YM	Produto de redução: 2-heptanol
4-metil-cicloexanona	❖ Células em repouso, tampão fosfato pH 7,0	Produto de redução: 4-metil-cicloexanol ( <i>cis</i> e <i>trans</i> )
6-metil-5-hepten-2-ona	❖ Células em repouso, tampão fosfato pH 7,0	Produto de redução : 6-metil-5-hepten-2-ol
6-metil-5-hepten-2-ona	❖ Células em repouso, tampão fosfato pH 6,5	Produto de redução : 6-metil-5-hepten-2-ol
6-metil-5-hepten-2-ona	❖ Células em crescimento, meio YM	Produto de redução : 6-metil-5-hepten-2-ol
1-fenil-etanona	❖ Células em repouso, tampão fosfato pH 7,0	Produto de redução: 1-fenil-etanol
1-fenil-etanona	❖ Células em repouso, tampão fosfato pH 6,5	Produto de redução: 1-fenil-etanol
1-fenil-etanona	❖ Células em crescimento, meio YM	Produto de redução: 1-fenil-etanol
1-fenil-propanona	❖ Células em repouso, tampão fosfato pH 7,0	Produto de redução: 1-fenil-propanol
1-(4-metoxi-fenil)-heptanona	❖ Células em repouso, tampão fosfato pH 7,0	Não detectado
1-(4-hidroxi-fenil)-propanona	❖ Células em repouso, tampão fosfato pH 7,0	Não detectado
4,4-dimetil-cicloexanona	❖ Células em repouso, tampão fosfato pH 7,0	Produto de redução: 4,4-dimetil-cicloexanol

<sup>a</sup>Reação de biocatálise: cetona (20 mg) e massa microbiana úmida (2 g) foram misturadas em frascos de erlenmeyer (125 mL) contendo 20 mL de solução tampão fosfato pH 7,0 ou 6,5 (para células em repouso) ou 20 mL de solução YM (para células em crescimento). As reações foram mantidas sob agitação rotatória (28 °C, 150 rpm) e monitoradas por CG-EM.

Paralelamente, a doutoranda Lucimar Pinheiro (Profa. Anita Marsaioli) observou a epoxidação enantiosseletiva de uma dupla ligação realizada pelas células de *T. cutaneum* CCT 1903. Este fato sinalizou a ação de monooxigenase não pertencente a classe das BVMO.

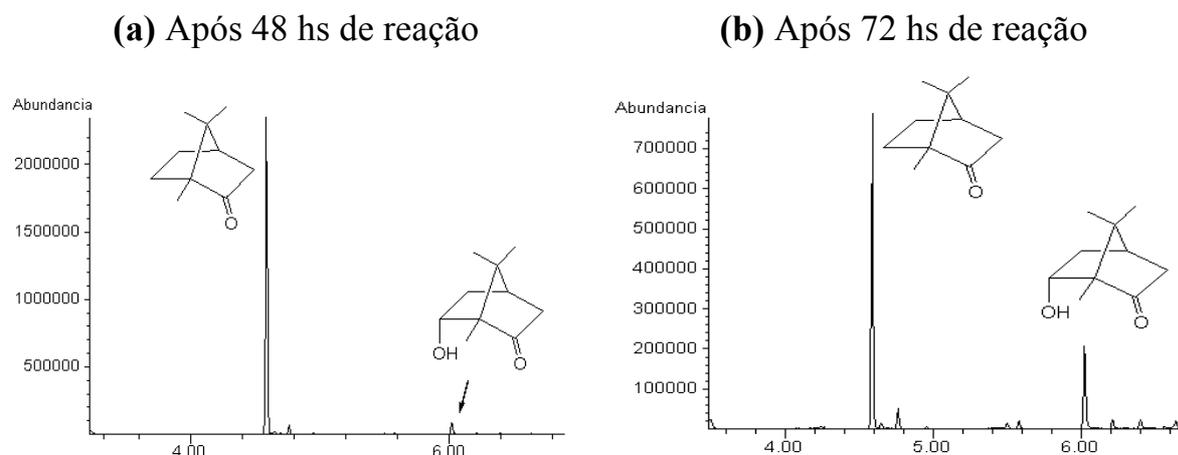
Visando um maior entendimento destes fatos, outros substratos ( $\alpha$ -pineno, 2-ciclopentenona, 1-*H*-indeno, cânfora e *cis*-jasmona como controle) foram testados para evidenciar a atividade biooxidativa do *T. cutaneum*. Não foram observados produtos de oxidação do  $\alpha$ -pineno, da 2-ciclopentenona e do 1-*H*-indeno. No entanto, a cânfora foi oxidada (**Cromatograma 7**) e o produto isolado foi caracterizado espectroscopicamente. O espectro de massas da cânfora oxidada apresentou íon molecular de  $m/z$  168, correspondente ao incremento de 16 unidades de massa atômica na cânfora (M.M. 152). Os espectros de IV e RMN de  $^1\text{H}$  e de  $^{13}\text{C}$  confirmaram a presença de um grupo hidroxila na molécula. No espectro de RMN de  $^1\text{H}$  foi observado a presença de um singlete largo em  $\delta_{\text{H}}$  1,71 correspondente ao grupo hidroxila e a presença de um carbono carbinólico foi confirmado no espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  em  $\delta_{\text{C}}$  75,8. Através da comparação dos deslocamentos químicos e constantes de acoplamento de RMN de  $^1\text{H}$  com os dados da literatura,<sup>148</sup> identificou-se o produto como 6-*endo*-hidroxicânfora (**Esquema 40**).

A hidroxilação microbiológica da cânfora é mencionada na literatura para várias espécies de microrganismos<sup>149,150</sup> e está sempre associada a uma atividade de enzimas do tipo P450.

<sup>148</sup> Ishikawa, T.; Kondo, K.; Kitajima, J. *Chem. Pharm. Bull.* **2003**, *51*, 32-39.

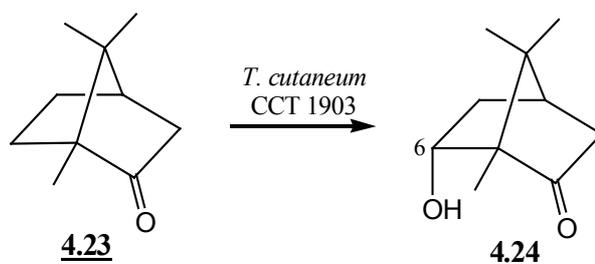
<sup>149</sup> Orihara, Y.; Noguchi, T.; Furuya, T. *Phytochemistry* **1994**, *35*, 941-945.

<sup>150</sup> Dus, K.M. *P. Natl. Acad. Sci. USA* **1984**, *81*, 1664-1668.



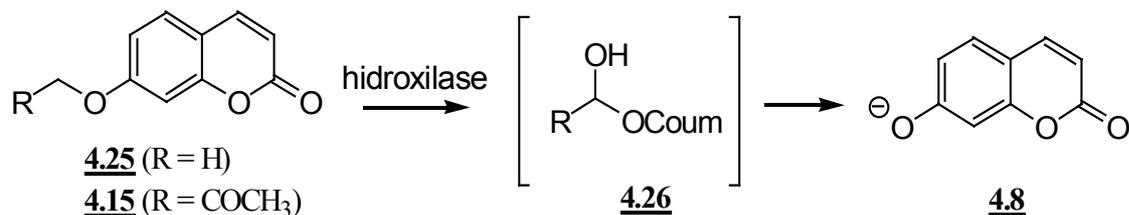
**Cromatograma 7** - Cromatograma de íon totais (CG-EM) da reação de hidroxilação da cânfora com células em repouso de *T. cutaneum* CCT 1903. Condições de análise:  $T_{\text{inicial}} = 60\text{ }^{\circ}\text{C}$ , rampa de  $20\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$  até  $290\text{ }^{\circ}\text{C}$ .  $T_{\text{inj}} = 240\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Coluna capilar de sílica fundida HP-5 MS (30 m x 0,25 mm x 0,25  $\mu\text{m}$ ).

Desta maneira, o sistema enzimático do fungo *T. cutaneum* CCT 1907 levou a uma hidroxilação da cânfora através de uma monooxigenase dependente de citocromo P-450<sup>112</sup> e não do tipo dependente de flavina.



**Esquema 40** – Produto de oxidação de cânfora por *T. cutaneum* CCT 1903

Conseqüentemente, a reação fluorogênica observada com *T. cutaneum* CCT 1903 e as sondas **4.15** – **4.16** é melhor explicada considerando a hidroxilação direta do grupo éter metilênico das sondas e a formação subsequente de um hemiacetal **4.26** instável na presença de BSA com posterior liberação da umbeliferona **4.8** (Esquema 41).

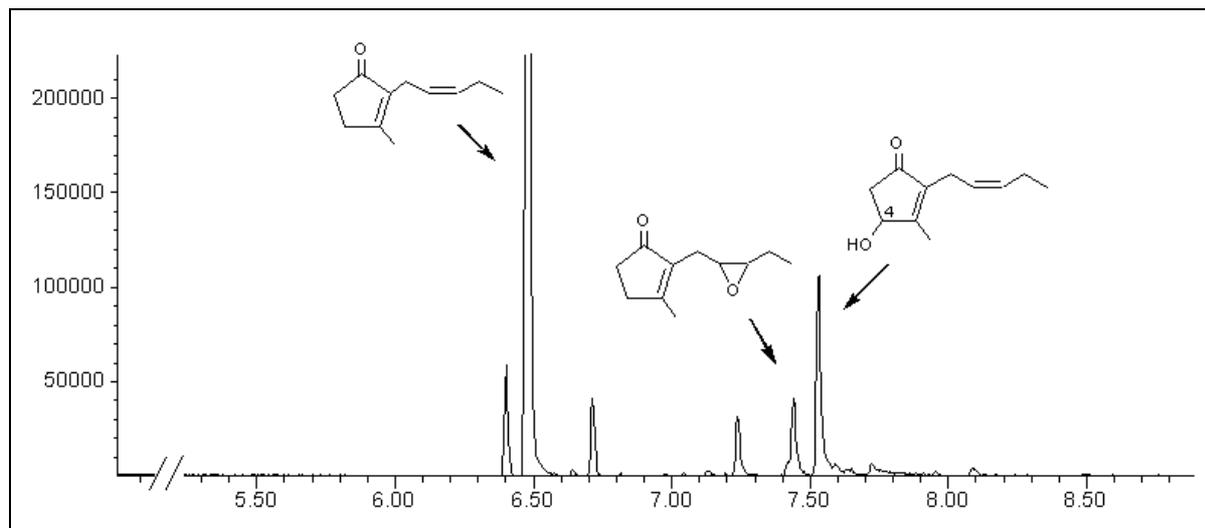


**Esquema 41** – Esquema representativo da detecção de hidroxilases com as sondas **4.15- 4.18**.

#### 4.4.1.2 Reações biocatalíticas com *Rhizopus oryzae* CCT 4964, AMA 7 e o fungo CCT 5632.

*R. oryzae* CCT 4964, AMA 7 e o fungo CCT 5632 emitiram fortes fluorescências no ensaio para monooxigenases. Para comprovar o tipo da MO foram realizados ensaios biocatalíticos frente a várias cetonas (multibioreação<sup>145</sup> com 3-metil-ciclopentanona, 2-metil-ciclohexanona, 4-metil-ciclohexanona e *cis*-jasmona). Todos os microrganismos apresentaram atividade de redutase frente às ciclohexanonas e atividade de monooxigenase oxidando a *cis*-jasmona (**Cromatograma 8**). A identificação dos produtos de oxidação epóxido de *cis*-jasmona (**E 57**, em anexo) e 4-hidróxi-*cis*-jasmona (**E 58**, em anexo) foi realizada pela comparação com os espectros de massas de padrões.<sup>151</sup> Diante destas evidências, foi sugerido que a atividade de MO destes microrganismos era do tipo hidroxilase.

<sup>151</sup> O padrão de fragmentação de 4-hidróxi-*cis*-jasmona foi fornecido pela doutoranda Lucimar Pinheiro, que sintetizou e caracterizou este produto por RMN.



**Cromatograma 8** - Cromatograma representativo de íon totais (CG-EM) da reação de oxidação da *cis*-jasmona. Condições de análise:  $T_{\text{inicial}} = 60 \text{ }^{\circ}\text{C}$ , rampa de  $20 \text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$  até  $290 \text{ }^{\circ}\text{C}$ .  $T_{\text{inj}} = 220 \text{ }^{\circ}\text{C}$ . Coluna capilar de sílica fundida HP-5 MS (30 m x 0,25 mm x 0,25  $\mu\text{m}$ ).

#### 4.4.1.3 Conclusão parcial

As reações biocatalíticas realizadas com *T. cutaneum* CCT 1903, *R. oryzae* CCT 4964, AMA 7 e o fungo CCT 5632 e várias cetonas evidenciaram a presença de monooxigenase do tipo hidroxilase.

No caso de *T. cutaneum* CCT 1903, o produto de oxidação da cânfora foi isolado, purificado e identificado por RMN de  $^1\text{H}$  e de  $^{13}\text{C}$  como sendo 6-*endo*-hidroxycânfora

Foi demonstrada a importância da comprovação dos resultados de HTS por meio de reações biocatalíticas convencionais. Esta estratégia é particularmente útil para diferenciar a atividade entre hidroxilase e Bayer-Villiger monooxigenase uma vez que os experimentos de fluorescência para MO implementados não permitiram distinguir uma atividade da outra.

---

## *Conclusão geral*

---

## 5 CONCLUSÃO GERAL

A implementação de triagem de alto desempenho para detecção do potencial enzimático com células microbianas foi realizada com sucesso para epóxido-hidrolase, Baeyer-Villiger monooxigenase e hidroxilase. Desta forma, os ensaios de HTS para monooxigenase e hidroxilase utilizando as células íntegras foram relatados pela primeira vez na literatura, resultado da cooperação entre o grupo do Prof. Dr. Jean-Louis Reymond e a Profa. Dra. Anita J. Marsaioli.

Foram encontradas as melhores condições para HTS utilizando células microbianas, uma vez que estas triagens detectam atividade enzimática cem vezes mais rápido que a biocatálise convencional e com uma redução do substrato utilizado maior que mil vezes.

A aplicação dos ensaios de HTS baseados em fluorescência para o monitoramento de atividades enzimáticas proporcionou uma avaliação simples e direta e permitiu a detecção de epóxido-hidrolases, monooxigenases e hidroxilases em diferentes linhagens microbianas. Vários microrganismos com atividades enzimáticas detectadas neste trabalho ainda não foram mencionados na literatura.

O teste de adrenalina foi adaptado para células íntegras e permitiu a determinação do perfil hidrolítico de epóxido-hidrolases utilizando epóxidos não modificados. Com esta metodologia é possível caracterizar, de maneira fácil, o perfil enzimático dos microrganismos utilizando os substratos de interesse. Entretanto, este teste ainda necessita de aprimoramento para torná-lo mais simples e eficiente.

Com estes resultados foram ampliadas as perspectivas para estudos futuros, sejam estes da caracterização enzimática de coleções de microrganismos, da aplicação de biocatálise em síntese orgânica e da obtenção das enzimas de interesse comercial.

Os ensaios biocatalíticos convencionais foram importantes para detalhar os resultados dos ensaios de alto desempenho. Por meio desta metodologia clássica foi possível determinar a propriedade de hidroxilação em *T. cutaneum* CCT 1903, *R. oryzae* CCT 4969, AMA 7 e o fungo CCT 5632 detectados com atividade de monooxigenases pelo ensaio de fluorescência. Uma vez que as sondas **4.15** – **4.18** apenas detectam a presença de monooxigenase, outros ensaios são indispensáveis para a diferenciação.

Por meio de reações biocatalíticas com ( $\pm$ )-1,2-epoxioctano, ( $\pm$ )-1,2-octanodiol e 1-hidróxi-2-octanona foi possível determinar que *B. pumilus* CBMAI 0008 e *A. niger* CCT 1435 apresentam epóxido-hidrolases de baixa enantiosseletividade que, associadas a oxidorredutases, levaram à produção de  $-(S)$ -1,2-octanodiol com alto excesso enantiomérico através de dois mecanismos distintos. Para *B. pumilus* CBMAI 0008, o mecanismo subsequente à abertura do epóxido foi uma resolução cinética do diol formado pela ação de uma oxidorredutase de alta enantiosseletividade que oxidou (*R*)-1,2-octanodiol a 1-hidróxi-2-octanona, resultando no (*S*)-1,2-octanodiol com  $> 95\%$  de *ee* e aproximadamente 50% de rendimento. No caso de *A. niger* CCT 1435, a reação biocatalítica que seguiu a epóxido-hidrolase foi uma resolução cinética dinâmica, na qual oxidorredutases participaram da oxidação do (*R*)-1,2-octanodiol a 1-hidróxi-2-octanona e da posterior redução a (*S*)-1,2-octanodiol num processo de estereoinversão, permitindo obter o (*S*)-1,2-octanodiol em alto excesso enantiomérico e rendimento acima de 80 %.

A detecção da capacidade de desracemização por estereoinversão em *Aspergillus niger* CCT 1435 corresponde atualmente a um fato inédito na literatura.

Os resultados deste trabalho já permitiram a publicação de dois artigos e estão sendo utilizados em outros que estão em fase final de elaboração.

---

*Parte experimental*

---

## 6 PARTE EXPERIMENTAL

### 6.1 REAGENTES E SOLVENTES

- Foram utilizados reagentes e solventes P.A. Sempre que necessário, os reagentes e solventes tratados foram obtidos conforme as metodologias já descritas.<sup>152</sup>
- As reações sensíveis à umidade foram realizadas em atmosfera de gás inerte seco (argônio ou nitrogênio) e as vidrarias foram previamente aquecidas a altas temperaturas sob vácuo.
- As soluções estoque de substâncias padrões e soluções tampão utilizadas nos experimentos de triagens de alto desempenho foram preparadas com H<sub>2</sub>O *milliQ*-deionizada.

### 6.2 MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS

- As cromatografias analíticas em camada delgada (CCD), para o monitoramento das reações e acompanhamento da purificação dos produtos por cromatografia em coluna, foram realizadas empregando-se cromatofolhas de alumínio (folha padrão, 20 x 20 cm), recobertas com sílica gel com ou sem indicador de fluorescência em UV<sub>254</sub>, da Merck (Darmstadt).
- A revelação dos compostos nas placas cromatográficas foi feita por irradiação com lâmpada UV<sub>254/365</sub> seguida da imersão das placas em uma solução de permanganato de potássio ou numa solução de *p*-anisaldeído (preparada pela mistura de *p*-anisaldeído, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, HOAc e EtOH, na proporção de 1:2:1:100 em

---

<sup>152</sup> (a) Perrin, D.D.; Armarego, W.L.F.; Perrin, D.R. *Purification of laboratory chemicals*, 2<sup>nd</sup> ed., Oxford: Pergamon Press, Ltd., **1980**. (b) Paquette, L.A. *Encyclopedia of reagents for organic synthesis*. West Sussex: John Wiley & Sons, Ltd., **1995**.

volumes, respectivamente) e subsequente aquecimento com pistola aquecedora.<sup>153</sup>

- As separações de compostos por cromatografia "flash" em coluna foram feitas utilizando-se sílica gel 60 (Merck, 0,040-0,063 mm, 230-400 mesh ASTM) e gradiente de eluição com solventes destilados. As frações coletadas foram comparadas por CCD e agrupadas por perfil de semelhança.
- As análises por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM) foram realizadas em cromatógrafo Agilent 6890 acoplado a um detector seletivo de massas HP 5973 operando com uma fonte de elétrons com energia de ionização de 70 eV. O espectrômetro de massas operou na faixa de  $m/z$  45-500. Para CG foi utilizada uma coluna capilar de sílica fundida HP-5 MS (30 m x 0,25 mm x 0,25  $\mu$ m, 5 % fenil-metilsiloxano). O cromatógrafo operou com fluxo constante de gás He de 1 mL/min, temperatura do injetor igual a 220 °C e temperatura da interface igual a 280 °C. As rampas de aquecimento variaram, sendo por isso relatadas junto aos respectivos experimentos. O volume injetado das amostras adequadamente diluídas (aproximadamente 1 mg/mL) foi *ca.* 1  $\mu$ L.
- A discriminação dos enantiômeros foi realizada em cromatógrafo Hewlett Packard 6890 e detector de ionização em chama (FID), equipado com uma coluna capilar de sílica fundida Chrompak, com a fase quiral Chirasil- $\beta$ -ciclodextrina (25 m de comprimento x 0,25 mm de diâmetro interno x 0,25  $\mu$ m de espessura do filme). As condições gerais de análise foram: velocidade do gás de arraste ( $H_2$ ) de 1 mL/min, temperatura do injetor igual a 220 °C e do detector igual a 240 °C. As rampas de aquecimento variaram, sendo, por isso, relatadas

---

<sup>153</sup> Casey, M.; Leonard, J.; Lygo, B.; Procter, G. *Advanced practical organic chemistry*. New York: Chapman & Hall, **1990**, p. 264.

junto aos respectivos experimentos. O volume injetado das amostras, adequadamente diluídas, foi *ca.* 1  $\mu\text{L}$ .

- Os excessos enantioméricos (*ee*) foram calculados após determinação das condições cromatográficas adequadas para a resolução dos enantiômeros de misturas racêmicas padrão de acordo com a equação abaixo:

$$ee = \frac{\text{área (+)} - \text{área (-)}}{\text{área (+)} + \text{área (-)}} \times 100$$

em que, a área (+) corresponde à área cromatográfica do isômero principal e a área (-) à área cromatográfica do isômero oposto.

- Para o cálculo da conversão utilizou-se pentadecano como padrão interno que foi adicionado em todas as alíquotas antes de serem analisadas por CG-EM. O Fator de Resposta (FR) foi obtido pela divisão entre a área do substrato e a área de substância padrão no tempo inicial (0 hora) do ensaio considerando 0 % de conversão. Assim, a conversão foi calculada utilizando a relação entre as áreas do substrato (restante) e a substância padrão nas alíquotas subseqüentes corrigida pelo FR.

### 6.3 MÉTODO ESPECTROMÉTRICO DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR

- Os espectros de RMN de  $^1\text{H}$  foram obtidos em espectrômetros Gemini 300P – Varian Instruments ( $B_0 = 7,05 \text{ T}$ ), operando a 300,067 MHz para  $^1\text{H}$  ou Varian INOVA-500 ( $B_0 = 11,7 \text{ T}$ ), operando a 499,885 MHz para  $^1\text{H}$ . Os deslocamentos químicos ( $\delta$ ) foram registrados em partes por milhão (ppm), tomando-se como padrões de referência interna o tetrametilsilano 0,03 % (TMS,  $\delta_{\text{TMS}} 0,00$ ), o clorofórmio ( $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta_{\text{CDCl}_3} 7,27$ ) ou o metanol ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ,  $\delta_{\text{CD}_3\text{OD}} 3,30$ ). A

multiplicidade das bandas de absorção dos prótons nos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  foi indicada segundo a convenção: s = singleto, sl = singleto largo, d = dubleto, t = tripleto, q = quarteto, quint. = quinteto, sext = sexteto, hept = hepteto, m = multipeto, dd = duplo dubleto, dt = duplo tripleto, dq = duplo quarteto, td = triplo dubleto, tl = tripleto largo, ddd = duplo duplo dubleto. As constantes de acoplamento ( $J$ ) foram citadas em Hz e os dados espectroscópicos estão organizados como segue:  $\delta$  deslocamento químico (integração, multiplicidade, constante de acoplamento, atribuição).

- Os espectros de RMN de  $^{13}\text{C}$  foram registrados em espectrômetros Gemini 300 – Varian Instruments operando a 75,452 MHz ou Varian INOVA-500 operando a 125,696 MHz para  $^{13}\text{C}$ . Os deslocamentos químicos ( $\delta$ ) foram registrados em partes por milhão (ppm), tomando-se como padrões de referência interna o tetrametilsilano (TMS,  $\delta_{\text{TMS}}$  0,0), o clorofórmio ( $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta_{\text{CDCl}_3}$  77,0) ou o metanol ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ,  $\delta_{\text{CD}_3\text{OD}}$  49,0).
- O número de hidrogênios ligados aos átomos de carbono foi determinado através dos espectros de RMN de  $^{13}\text{C}$ , com o auxílio das técnicas de RMN de  $^{13}\text{C}$ -DEPT 135° e DEPT 90° (“Distortionless Enrichment by Polarization Transfer”) onde  $\text{CH}_3/\text{CH}$  = sinal positivo,  $\text{CH}_2$  = sinal negativo e  $\text{C}_0$  = ausente.
- Foram utilizadas nas interpretações de alguns dos compostos as técnicas de RMN 2D: H,H-COSY, H,C-HSQC e H,C-HMBC.

## 6.4 MÉTODOS ESPECTROFOTOMÉTRICOS UV/VIS E DE FLUORESCÊNCIA

- As medidas de fluorescência das reações de biotransformação foram realizadas em leitores de fluorescência *Fluoroskan Ascent, Biosystem* utilizando filtros de  $\lambda_{\text{ex}}$  365  $\pm$  20 nm e  $\lambda_{\text{em}}$  460  $\pm$  20 nm. ou *Cytofluor-II, Multi-Well Plate*

*Reader Series 400, Perseptive Biosystems* utilizando filtros de  $\lambda_{\text{ex}}$   $360 \pm 20$  nm e  $\lambda_{\text{em}}$   $460 \pm 20$  nm. O aumento dos sinais de fluorescência nos sistemas testados foi relacionado à liberação de umbeliferona no meio reacional. Foram utilizadas microplacas de polipropileno com 96 cavidades (Costar 3363, fundo plano), as quais foram tampadas durante a aquisição da leitura de fluorescência realizada em temperatura ambiente.

- As medidas de densidade óptica (DO) nos ensaios de adrenalina foram realizadas por meio de um espectrofotômetro de microplaca *SpectraMax 250*, *Molecular Devices Corporation*, sendo as leituras registradas a 490 nm e temperatura ambiente. Foram utilizadas microplacas de poliestireno de 96 cavidades (Costar 3695, tipo A/2, fundo plano).

## 6.5 OUTRAS MEDIÇÕES

- Os valores de rotação óptica foram determinados em um polarímetro *Perkin Elmer* modelo 341, com lâmpada de sódio e precisão de  $0,001^\circ$ , empregando-se metanol como solvente.
- Os espectros de infravermelho foram obtidos em um aparelho *Thermo Nicolet IR200 Spectrometer* com uma resolução de  $4 \text{ cm}^{-1}$ . As amostras foram aplicadas diretamente sobre o cristal de Ge e as absorções vibracionais são expressas em número de ondas ( $\text{cm}^{-1}$ ).

## 6.6 MICRORGANISMOS

A maioria dos microrganismos investigados pertencem à Coleção de Culturas Tropicais (CCT, <http://www.cct.org.br/>), da Fundação André Tosello, no Parque Taquaral, Campinas, Brasil. Outra coleção de microrganismos foi a Coleção Brasileira de Microrganismos de Ambiente e Indústria (CBMAI, <http://www.cpqba.unicamp.br/cbmai>), do Centro Pluridisciplinar de Pesquisa

Química, Biológica e Agrícola (CPQBA) da UNICAMP, localizado na Vila Betel, Paulínia, Brasil (ver **Tabela 4**, pag 58 e **Tabela 13**, pag 120).

Há ainda microrganismos da Coleção do Laboratório de Biocatálise (CBC) do Instituto de Química. São microrganismos isolados no nosso laboratório como as linhagens provenientes de água de formação de petróleo (ver **Tabela 5**, pag 59) isoladas pela doutoranda Suzan Pantaroto de Vasconcellos (Profa. Dra. Anita Marsaioli) e identificados pela Dra. Valéria Maia de Oliveira (CPQBA) e coleção de microrganismos isolados do solo de várzea de Silves, Amazônia (ver **Tabela 6**, pag 59 e **Tabela 13**, pag 120) pela doutoranda Suzan Pantaroto de Vasconcello e Diego Senatore (IC, Profa. Anita Marsaioli).

### *6.6.1 Manutenção e reativação das linhagens em estudo.*

Os microrganismos foram reativados por 72-96 h a 29 °C em tubos de ensaio (h = 18 cm; Ø = 1,5 cm) contendo aproximadamente 15 mL do meio de cultivo específico sólido (tubos inclinados ou “slants”).

#### **6.6.1.1 Para ensaios de triagem de alto desempenho**

Após esse tempo, os microrganismos reativados foram crescidos nos tubos *Eppendorf* de 1,5 mL (contendo ~1 mL do meio sólido) ou nos tubos de ensaio normal descrito acima, por 24 a 48 horas a 29 °C. Assim, as colônias desenvolvidas foram removidas com o auxílio de uma espátula estéril e transferidas para um novo tubo *Eppendorf* estéril, onde foram pesadas. As células foram suspensas em solução tampão borato 20 mM pH 8,8 ou de solução tampão PBS (Phosphate-buffered saline, NaCl 160 mM, sol. fosfato aquoso 10 mM, pH 7,4) de forma a obter concentrações de 1 mg ou 0,2 mg por mL, dependendo do ensaio e do microrganismo.

A grande diferença morfológica dos microrganismos não permitiu um procedimento único para a preparação das suspensões homogêneas. Especialmente nos caso dos fungos, foi necessária uma habilidade particular para esta preparação. Normalmente, uma suspensão mais concentrada era preparada e submetida a uma agitação vigorosa no Vortex, sendo eventualmente necessário “despedaçar” os micélios dos fungos com ponteiras estéreis. A solução assim obtida foi diluída para atingir a concentração desejada. As bactérias e leveduras não apresentaram este problema.

#### 6.6.1.2 Para ensaios biocatalíticos convencionais

Após o tempo de reativação dos microrganismos, estes foram transferidos para Erlenmeyer de 250 mL contendo 50 mL do meio de cultivo líquido, por meio de uma alça estéril, e incubados por 3-4 dias a 29 °C sob agitação rotatória de 150 rpm. Após esse período de crescimento, as células dos fungos foram filtradas sob vácuo, em peneiras de 200 mesh e em seguida ressuspensas em solução tampão fosfato ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0,1 M, pH 7 ou pH 6,5) antes da adição do substrato para a biotransformação. No caso de bactéria ou levedura, as células foram centrifugadas a 5000 rpm durante 20 minutos, e ressuspensas em solução tampão fosfato ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0,1 M, pH 7 ou pH 6,5).

Nos experimentos com células em crescimento, elas foram ressuspensas em novo meio de cultura.

#### 6.6.1.3 Meios de cultivo destinados à manutenção e reativação das linhagens em estudo

##### 6.6.1.3.1 Meio NB

Meio caldo nutriente utilizado para reativação e crescimento das bactérias em geral. Composição: Caldo nutriente (20 g) e água destilada suficiente para completar 1000 mL de solução.

#### **6.6.1.3.2 Meio YM**

Meio de extrato de levedura e malte utilizado para reativação e crescimento das leveduras em geral e para *G. candidum* CCT 1205. Composição: Extrato de levedura (3 g), extrato de malte (3 g), peptona (5 g), glicose (10 g) e água destilada suficiente para completar 1000 mL de solução.

#### **6.6.1.3.3 Meio ME**

Meio de extrato de malte utilizado para reativação e crescimento dos fungos em geral. Composição: Extrato de malte (20 g) e água destilada suficiente para completar 1000 mL de solução.

#### **6.6.1.3.4 Meio hipertônico**

Meio de cultivo utilizado para reativação e crescimento das archeas em geral. Composição: Glicose (2 g), peptona (2 g), caseína hidrolisada (2 g), amido (2 g),  $K_2HPO_4$  (1,2 g),  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  (0,2 g), NaCl (100 g) e água suficiente para completar 1000 mL de solução.

#### **6.6.1.3.5 Meio de Xilana de bétula**

Este meio<sup>154</sup> foi utilizado especificamente para reativação e crescimento de *Bacillus pumilus* CBMAI 0008. Composição: Xilana, (10 g), Peptona (10 g), Tween 80 (1 g),  $(NH_4)_2SO_4$  (1,4 g),  $KH_2PO_4$  (2 g), uréia (0,3 g),  $CaCl_2 \cdot 2H_2O$  (0,4 g),  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  (0,3 g), 5 mL de  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$  (1g/L), 1,6 mL de  $MnSO_4 \cdot 7H_2O$  (1g/L), 1,4 mL de  $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$  (1g/L), 2 mL de  $CoCl_2$  (1g/L). Adicionar todos em

---

<sup>154</sup> Mandels, M.; Stenberg, D. *J. Ferment. Technol.* **1976**, *54*, 267-286.

800 mL de água, menos xilana, acertar o pH a 10 com NaOH 2 M, após isso, adicionar xilana e aquecer no microondas com potência 5, observando minuto a minuto até a dissolução. Em seguida, completar a solução com água destilada até 1000 mL.

Para a preparação de meio de cultivo sólido, simplesmente adiciona-se 20 g/L de ágar no meio líquido, mantendo os outros ingredientes na mesma proporção e preparado de modo idêntico ao meio líquido.

#### 6.6.1.4 Preparação de Solução Tampão de Sörensen ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 - \text{KH}_2\text{PO}_4$ )<sup>155</sup>

Inicialmente preparamos duas soluções estoque: 1) uma solução de fosfato dissolvendo 11,876 g do sal monoácido ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) em água destilada o suficiente para completar 1 L de solução; e 2) uma solução do sal di-ácido ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) dissolvendo 9,078 g em água destilada para completar 1 L de solução. Seguidamente, a solução tampão no pH desejado foi preparada de acordo com a seguinte **Tabela 11**.

**Tabela 11** - Solução Tampão de Sörensen.

pH	$\text{Na}_2\text{HPO}_4$ M / 15 (mL)	$\text{KH}_2\text{PO}_4$ M / 15 (mL)	pH	$\text{Na}_2\text{HPO}_4$ M / 15 (mL)	$\text{KH}_2\text{PO}_4$ M / 15 (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	0,5

<sup>155</sup> Assumpção, R.M.V.; Morita, T. *Manual de Soluções, Reagentes e Solventes: Padronização, Preparação e Purificação*. São Paulo: Edgard Blücher LTDA, **1968**. p. 276.

### 6.6.2 Procedimentos gerais adotados no laboratório de biocatálise

Todos os meios de cultura, soluções, placas de Petri, tubos de ensaio, pipetas e outros materiais utilizados em contato direto com os microrganismos foram autoclavados a 121 °C, 1,5 Pa, por 15 minutos ou então esterilizados em chama de bico de Bunsen. Todo o material utilizado com microrganismos foi depositado em bandeja de descarte contendo solução de HClO 5 % (em volume) e posteriormente esterilizado em autoclave a 121 °C durante 40 minutos.

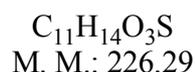
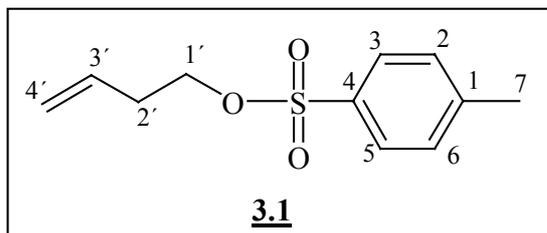
As soluções de álcool 70 % (em volume) e de hipoclorito de sódio 1 % (em volume) foram utilizadas para desinfetar as bancadas de trabalho e câmara de fluxo laminar. Praticamente todas as manipulações microbiológicas foram realizadas em câmaras de fluxo laminar, diminuindo a contaminação do material manipulado e do meio externo.

## 6.7 TRIAGEM DE EPÓXIDO-HIDROLASES

### 6.7.1 Preparação de sondas fluorogênicas para detecção de EH

#### 6.7.1.1 Procedimento geral para as reações de tosilção

A uma solução resfriada (0 °C) do álcool (15 mmoles) em CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (15 mL) foi adicionada piridina (2,4 mL, 30 mmoles) previamente tratada. A seguir, cloreto de *p*-toluenossulfonila (3,52 g, 18,5 mmoles) foi adicionado lentamente ao balão de reação mantendo a agitação constante num banho de gelo. A mistura foi mantida em agitação a temperatura ambiente por 12 h, após esse tempo foi vertida sobre uma solução gelada de HCl 2 M (10 mL) e extraída com CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3 x 20 mL). As fases orgânicas reunidas foram lavadas com soluções de NaHCO<sub>3</sub> 5 % (10 mL) e água (10 mL), secas sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anidro, filtradas e concentradas sob pressão reduzida para posterior purificação por cromatografia em coluna.

6.7.1.1.1 4-toluenossulfonato de 3-butenila (**3.1**)

Após purificação por cromatografia em coluna e eluída com hexano:acetato de etila (gradiente), foi obtido um líquido oleoso incolor (rendimento 70 %).

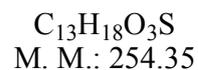
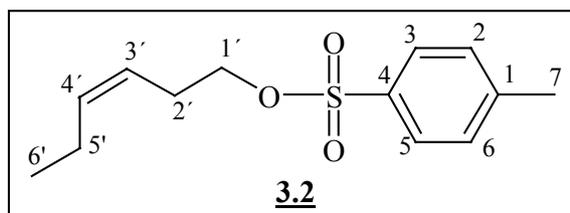
CCD (Hexano: AcOEt; 70:30, v/v)  $R_f = 0,70$ .

IV 2964, 2872, 1598, 1462, 1358, 1188, 1175, 1097, 961, 916, 814, 772  $\text{cm}^{-1}$ .

RMN de  $^1\text{H}$  (300,067 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta_{\text{TMS}}$  0,00):  $\delta$  7,79 (2 H, d,  $J = 8,0$ , H-3 e H-5), 7,35 (2 H, d,  $J = 8,0$ , H-2 e H-6), 5,78-5,60 (1 H, m, H-3'), 5,20-5,00 (2 H, m, H-4'), 4,07 (2 H, t,  $J = 6,7$ , H-1'), 2,46 (3 H, s, H-7), 2,40 (2 H, dt,  $J = 6,7; 2,6$ , H-2').

RMN de  $^{13}\text{C}$  (75,45 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta_{\text{CDCl}_3}$  77,0):  $\delta$  144,7 (C, C-1), 133,1 (C, C-4), 132,4 (CH, C-3'), 129,8 (2 CH, C-2 e C-6), 127,9 (2 CH, C-3 e C-5), 118,2 ( $\text{CH}_2$ , C-4'), 69,4 ( $\text{CH}_2$ , C-1'), 33,1 ( $\text{CH}_2$ , C-2'), 21,6 ( $\text{CH}_3$ , C-7).

IE/EM  $m/z$  (int. rel.): 226 ( $\text{M}^{+\bullet}$ , ausente), 224 (1), 155 (100), 91 (87), 65 (19), 54 (32).

6.7.1.1.2 4-toluenossulfonato de 3-hexenila (**3.2**)

Após purificação por cromatografia em coluna e eluída com hexano:acetato de etila (gradiente), foi obtido um líquido oleoso incolor (rendimento 70 %).

**CCD** (Hexano: AcOEt; 80:20, v/v)  $R_f = 0,60$ .

**IV** 2963, 2954, 1598, 1462, 1358, 1188, 1175, 1096, 963, 916, 814, 772  $\text{cm}^{-1}$ .

**RMN de  $^1\text{H}$**  (300,067 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta_{\text{TMS}}$  0,00)  $\delta$  7,78 (2 H, d,  $J = 8,2$ , H-3 e H-5), 7,34 (2 H, d,  $J = 8,2$ , H-2 e H-6), 5,56-5,40 (1 H, m, H-4' ou H-3'), 5,24-5,10 (1 H, m, H-3' ou H-4'), 4,00 (2 H, t,  $J = 7,0$ , H-1'), 2,45 (3 H, s, H-7), 2,39 (2 H, q,  $J = 7,0$ , H-2'), 1,98 (2 H, quint,  $J = 7,3$ , H-5'), 0,93 (3 H, t,  $J = 7,3$ , H-6').

**RMN de  $^{13}\text{C}$**  (75,45 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta_{\text{CDCl}_3}$  77,0):  $\delta$  144,7 (C, C-1), 135,5 (CH, C-3'), 133,3 (C, C-4), 129,8 (2 CH, C-2 e C-6), 127,9 (2 CH, C-3 e C-5), 122,0 (CH, C-4'), 69,8 ( $\text{CH}_2$ , C-1'), 27,0 ( $\text{CH}_2$ , C-2'), 21,6 ( $\text{CH}_3$ , C-7), 20,6 ( $\text{CH}_2$ , C-5'), 14,0 ( $\text{CH}_3$ , C-6').

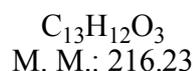
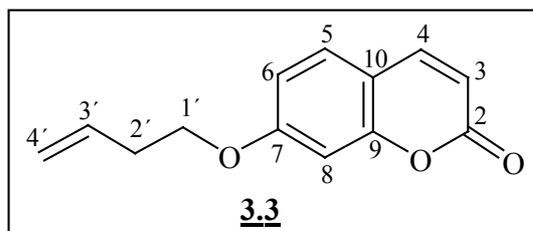
**IE/EM**  $m/z$  (int. rel.): 254 ( $\text{M}^{+\bullet}$ , ausente), 155 (39), 91 (66), 82 (100), 67 (78), 65 (20).

### 6.7.1.2 Procedimento geral para as reações de alquilação

A um balão de 3 bocas munido de condensador e de um funil de adição, atmosfera inerte e banho de gelo, contendo de *N,N*-dimetilformamida (DMF, 10 mL) foi adicionado NaH (60 % em parafina, 0,61 g, 15 mmoles) sob agitação. A seguir adicionou-se lentamente uma solução de 7-hidróxi-2*H*-1-benzopirano-2-ona (umbeliferona, 0,91 g, 5,6 mmoles) em DMF (10 mL) ao meio reacional. Após 30 min, foi adicionada lentamente uma solução do derivado tosilato (5 mmoles) em DMF (10 mL). Depois da adição, a temperatura foi elevada a 60 °C e mantida constante por 2 dias. A reação foi interrompida com adição de metanol (10 mL) a solução resultante foi evaporada a vácuo resultando num resíduo que foi dissolvido com acetato de etila (60 mL). A fase orgânica foi lavada com uma solução de

NaOH 2 M (10 mL), água (2 x 10mL), seca sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anidro, filtrada e concentrada sob pressão reduzida para posterior purificação por cromatografia em coluna.

#### 6.7.1.2.1 7-(3-butenoxi)-2H-1-benzopiran-2-ona (**3.3**)



Após purificação por cromatografia em coluna eluida com hexano:acetato de etila (gradiente), foi obtido um sólido cristalino levemente amarelado identificado como **3.3** (rendimento 50 %).

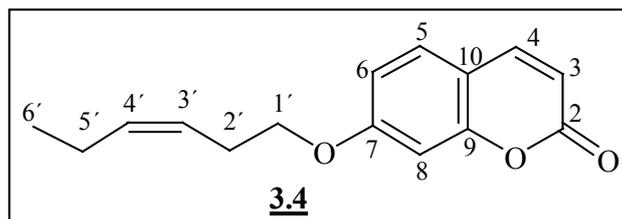
CCD (Hexano:AcOEt; 70:30, v/v) R<sub>f</sub> = 0,70.

IV 3086, 3047, 1722, 1708, 1610, 1507, 349, 1282, 1234, 1202, 1121, 1025, 990, 841, 831 cm<sup>-1</sup>.

RMN de <sup>1</sup>H (300,067 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ<sub>TMS</sub> 0,00): δ 7,63 (1 H, d, J = 9,5, H-4), 7,36 (1 H, d, J = 8,5, H-5), 6,84 (1 H, dd, J = 8,5; 2,5, H-6), 6,80 (1 H, d, J = 2,5, H-8), 6,24 (1 H, d, J = 9,5, H-3), 6,02-5,80 (1 H, m, H-3'), 5,32-5,04 (2 H, m, H-4'), 4,08 (2 H, t, J = 6,6, H-1'), 2,58 (2 H, q, J = 6,6, H-2').

RMN de <sup>13</sup>C (75,45 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ<sub>CDCl<sub>3</sub></sub> 77,0): δ 162,0 (C, C-7), 161,1 (C, C-2), 155,7 (C, C-9), 143,3 (CH, C-4), 133,7 (CH, C-3'), 128,6 (CH, C-5), 117,4 (CH<sub>2</sub>, C-4'), 113,0 (CH, C-3), 112,9 (CH, C-6), 112,4 (C, C-10), 101,3 (CH, C-8), 67,8 (CH<sub>2</sub>, C-1'), 33,4 (CH<sub>2</sub>, C-2').

IE/EM m/z (int. rel.): 216 (M<sup>+</sup>, 92), 188 (12), 162 (85), 134 (92), 105 (11), 89 (20), 77 (14), 63 (15), 55 (100).

6.7.1.2.2 7-(3-hexeniloxi)-2H-1-benzopiran-2-ona (3.4)

$C_{15}H_{16}O_3$   
M. M.: 244.29

Após purificação por cromatografia em coluna eluida com hexano:acetato de etila (gradiente), foi obtido um líquido oleoso. (rendimento 73 %).

CCD (hexano:AcOEt: 70:30, v/v)  $R_f = 0,55$ .

IV 2960, 2874, 1732, 1608, 1556, 1508, 1469, 1403, 1354, 1283, 1229, 1203, 1121, 1004, 891, 835  $cm^{-1}$

RMN de  $^1H$  (300,067 MHz,  $CDCl_3$ ,  $\delta_{TMS}$  0,00):  $\delta$  7,62 (1 H, d,  $J = 9,5$ , H-4), 7,36 (1 H, d,  $J = 8,4$ , H-5), 6,83 (1 H, dd,  $J = 8,4; 2,2$ , H-6), 6,80 (1 H, d,  $J = 2,2$ , H-8), 6,24 (1 H, d,  $J = 9,5$ , H-3), 5,62-5,50 (1 H, m, H-3' ou H-4'), 5,48-5,36 (1 H, m, H-3' ou H-4'), 4,01 (2 H, t,  $J = 7,0$ , H-1'), 2,57 (2 H, q,  $J = 7,0$  Hz, H-2'), 2,10 (2 H, quint,  $J = 7,5$ , H-5'), 1,00 (3 H, t,  $J = 7,5$ , H-6').

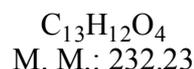
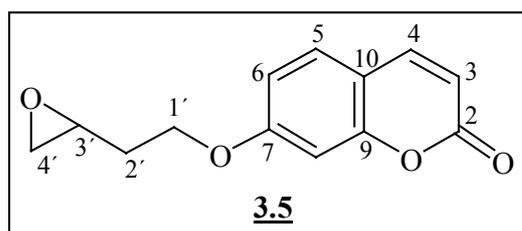
RMN de  $^{13}C$  (75,45 MHz,  $CDCl_3$ ,  $\delta_{CDCl_3}$  77,0):  $\delta$  162,2 (C, C-7), 161,2 (C, C-2), 155,8 (C, C-9), 143,4 (CH, C-4), 134,8 (CH, C-3'), 128,7 (CH, C-5), 123,4 (CH, C-4'), 113,0 (CH, C-3), 112,9 (CH, C-6), 112,4 (C, C-10), 101,4 (CH, C-8), 68,1 ( $CH_2$ , C-1'), 27,0 ( $CH_2$ , C-2'), 20,7 ( $CH_2$ , C-5'), 14,2 ( $CH_3$ , C-6').

IE/EM  $m/z$  (int. rel.): 244 ( $M^{•+}$ , ausente), 223 (8), 167 (3), 149 (100), 104 (7), 76 (5), 57 (12).

### 6.7.1.3 Procedimento geral para as reações de epoxidação

Num balão (25 mL) contendo uma solução de ácido metacloroperbenzóico (1,2 mmoles) em CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (5 mL) a 0 °C foi adicionada lentamente uma solução do alceno (1 mmoles) em CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3 mL). A reação foi deixada à temperatura ambiente sob agitação por 24 horas. Após esse tempo, foi adicionada uma solução de sulfito de sódio 10 % (10 mL) e a mistura resultante foi agitada por 1 hora para destruir o excesso de MCPBA. A fase orgânica foi então separada e a fase aquosa extraída com três porções de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (10 mL). As fases orgânicas combinadas foram lavadas com solução de NaHCO<sub>3</sub> 0,1 M (5 mL) e água destilada (5 mL) sucessivamente. Depois, foram secas sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anidro, filtradas e concentradas sob pressão reduzida para posterior purificação por cromatografia em coluna.

#### 6.7.1.3.1 7-(3,4-epóxi-butóxi)-2H-1-benzopiran-2-ona (**3.5**)



Após purificação por cromatografia em coluna eluída com hexano:acetato de etila (gradiente), foi obtido um sólido incolor de **3.5** (rendimento 80 %).

**CCD** (Hexano:AcOEt; 80:20, v/v) R<sub>f</sub> = 0,20.

**Ponto de fusão:** 67,8 –69,3 °C.

**IV** 3050, 2929, 1727, 1709, 1619, 1552, 1512, 1403, 1293, 1240, 1134, 1020, 905, 857, 827 cm<sup>-1</sup>

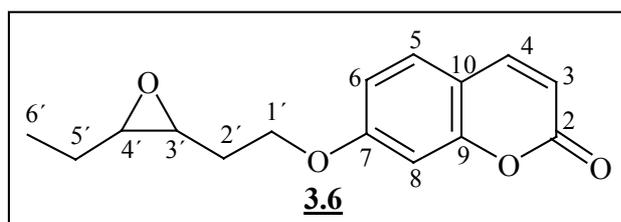
**RMN de <sup>1</sup>H** (300,067 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ<sub>TMS</sub> 0,00): δ 7,45 (1 H, d, J = 9,2, H-4), 7,38 (1 H, d, J = 8,4, H-5), 6,85 (1 H, dd, J = 8,4; 2,5, H-6), 6,83 (1 H, d, J = 2,5, H-8),

6,26 (1 H, d,  $J = 9,2$ , H-3), 4,32-4,02 (2 H, m, H-1'), 3,26-3,10 (1 H, m, H-3'), 2,86 (1 H, t,  $J = 4,7$ , H-4'b), 2,60 (1 H, dd,  $J = 4,7; 2,7$ , H-4'a), 2,26-2,06 (1 H, m, H-2'a), 2,04-1,86 (1 H, m, H-2'b).

**RMN de  $^{13}\text{C}$**  (75,45 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta_{\text{CDCl}_3}$  77,0):  $\delta$  161,7 (C, C-7), 161,0 (C, C-2), 155,7 (C, C-9), 143,2 (CH, C-4), 128,7 (CH, C-5), 113,1 (CH, C-3), 112,7 (CH, C-6), 112,6 (C, C-10), 101,4 (CH, C-8), 65,3 ( $\text{CH}_2$ , C-1'), 49,5 (CH, C-3'), 47,2 ( $\text{CH}_2$ , C-4'), 32,3 ( $\text{CH}_2$ , C-2').

**IE/EM  $m/z$**  (int. rel.): 232 ( $\text{M}^+$ , 73), 216 (8), 175 (12), 162 (40), 145 (15), 134 (100), 105 (15), 89 (31), 71 (28), 63 (18).

#### 6.7.1.3.2 7-(3,4-epóxi-hexilóxi)-2H-1-benzopirán-2-ona (**3.6**)



$\text{C}_{15}\text{H}_{16}\text{O}_4$   
M. M.: 260.29

Após purificação por cromatografia “flash” em coluna de sílica eluída com hexano:acetato de etila, foi obtido um sólido branco de (**5**) (0,93 g, 3,4 mmoles, 83 %).

**CCD** (hexano:AcOEt; 70:30, v/v)  $R_f = 0,46$ .

**IV** 3249, 2964, 2933, 2868, 1732, 1620, 1554, 1510, 1404, 1294, 1234, 1133, 1050, 975, 830, 718  $\text{cm}^{-1}$

**RMN de  $^1\text{H}$**  (300,067 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta_{\text{TMS}}$  0,00):  $\delta$  7,63 (1 H, d,  $J = 9,5$ , H-4), 7,37 (1H, d,  $J = 8,4$ , H-5), 6,85 (1 H, dd,  $J = 8,4$  e  $2,4$ , H-6), 6,82 (1 H, d,  $J = 2,4$ , H-8), 6,25 (1 H, d,  $J = 9,5$ , H-3), 4,20 (2 H, dd,  $J = 7,2$  e  $5,3$ , H-1'), 3,17 (1 H, dt,  $J = 7,2$

e 4,4, H-3' ou H-4'), 2,98 (1 H, td,  $J = 6,2$  e  $4,4$ , H-4' ou H-3'), 2,20-2,06 (1 H, m, H-2'a), 2,02-1,88 (1 H, m, H-2'b), 1,72-1,48 (2 H, m, H-5'), 1,09 (3 H, t,  $J = 7,3$ , H-6').

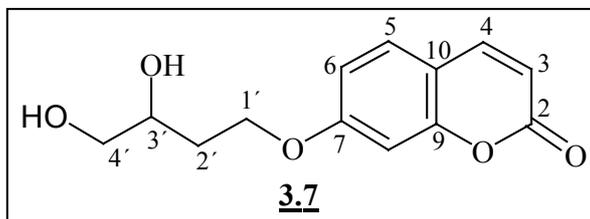
**RMN de  $^{13}\text{C}$**  (75,45 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta_{\text{CDCl}_3}$  77,0):  $\delta$  161,8 (C, C-7), 161,0 (C, C-2), 155,7 (C, C-4), 143,2 (C, C-9), 128,7 (CH, C-5), 113,2 (C, C-10), 112,7 (CH, C-6), 112,6 (CH, C-3), 101,4 (CH, C-8), 66,0 ( $\text{CH}_2$ , C-1'), 58,3 (CH, C-4' ou C-3'), 54,3 (CH, C-3' ou C-4'), 27,9 ( $\text{CH}_2$ , C-2'), 21,3 ( $\text{CH}_2$ , C-5'), 10,6 ( $\text{CH}_3$ , C-6').

**IE/EM  $m/z$**  (int. rel.): 260 ( $\text{M}^+$ , 100), 201 (14), 174 (48), 162 (34), 146 (22), 134 (58), 99 (22), 89 (23), 59 (33).

#### 6.7.1.4 Procedimento geral para as reações de di-hidroxilação

Num balão de fundo redondo (25 mL) contendo 1 mmol do alceno em 8 mL de acetona:agua (2,5:1, v/v) foi adicionado 1,2 mmol de N-óxido de N-metilmorfolina e 20  $\mu\text{L}$  de uma solução 0,2 M de  $\text{OsO}_4$  em *t*-butanol. A reação foi mantida sob agitação por 18 horas (acompanhamento por CCD) e terminada pela adição de 20 mL da solução saturada de NaCl e acetato de etila (1:1, v/v). O extrato orgânico combinado foi seco sobre  $\text{MgSO}_4$ , filtrado e o solvente removido sob pressão reduzida. As purificações foram realizadas por coluna cromatográfica.

##### 6.7.1.4.1 7-(3,4-di-hidróxi-butóxi)-2H-1-benzopiran-2-ona (**3.7**)



$\text{C}_{13}\text{H}_{14}\text{O}_5$   
M. M.: 250.25

Após purificação por coluna cromatográfica de sílica ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ :acetona, 7:3, v/v) forneceu **3.7** como um sólido (rendimento 72 %).

CCD (hexano:AcOEt; 25:75, v/v)  $R_f = 0,34$ .

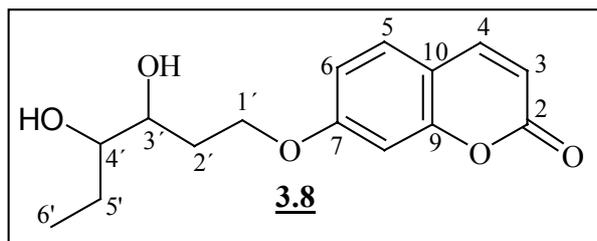
IV 3295, 3231, 2934, 1723, 1609, 1556, 1400, 1353, 1284, 232, 1130, 1059, 1016, 843  $\text{cm}^{-1}$ .

RMN de  $^1\text{H}$  (300,067 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ,  $\delta_{\text{TMS}}$  0,00)  $\delta$  7,83 (1 H, d,  $J = 9,5$  Hz, H-4), 7,48 (1 H, d,  $J = 8,4$  Hz, H-5), 6,90 (1 H, dd,  $J = 8,4, 2,6$ , H-6), 6,87 (1 H, d,  $J = 2,6$ , H-8), 6,20 (1 H, d,  $J = 9,5$  Hz, H-3), 4,27-4,13 (2 H, m, H-1'), 3,90-3,80 (1 H, m, H-3'), 3,59-3,46 (2 H, m, H-4'), 2,11-1,97 (1 H, m, H-2'a), 1,89-1,75 (1 H, m, H-2b').

RMN de  $^{13}\text{C}$  (75 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ,  $\delta_{\text{CD}_3\text{OD}}$  49,0)  $\delta$  164,2 (C-C-7), 163,7 (C, C-2), 157,4 (C, C-9), 146,1 (CH, C-4), 130,7 (CH, C-5), 114,5 (C, C-10), 114,3 (CH, C-3), 113,6 (CH, C-6), 102,6 (CH, C-8), 70,4 (CH, C-3'), 67,9 ( $\text{CH}_2$ , C-4'), 67,0 ( $\text{CH}_2$ , C-1'), 34,5 ( $\text{CH}_2$ , C-2').

IE/EM  $m/z$  (int. rel.): 250 ( $\text{M}^{*+}$ , 14), 219 (11), 175 (10), 162 (100), 145 (23), 134 (64), 117 (21), 89 (18).

#### 6.7.1.4.2 7-(3,4-di-hidróxi-hexilóxi)-2H-1-benzopiran-2-ona (**3.8**)



$\text{C}_{15}\text{H}_{18}\text{O}_5$   
M. M.: 278.30

Após purificação por coluna cromatográfica de sílica ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ :acetona, 7:3, v/v) forneceu **3.8** como um sólido (rendimento 68 %)

CCD (hexano:AcOEt; 25:75, v/v)  $R_f = 0,34$ .

IV 3249, 2964, 2933, 2868, 1732, 620, 1554, 1404, 1294, 1234, 1134, 1050, 830  $\text{cm}^{-1}$ .

**RMN de  $^1\text{H}$**  (300,067 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ,  $\delta_{\text{TMS}}$  0,00)  $\delta$  7,85 (1 H, d,  $J = 9,5$ , H-4), 7,50 (1 H, d,  $J = 8,7$ , H-5), 6,92 (1 H, dd,  $J = 8,7$ ; 2,2, H-6), 6,88 (1 H, d,  $J = 2,2$ , H-8), 6,22 (1 H, d,  $J = 9,5$ , H-3), 4,30-4,16 (2 H, m, H-1'), 3,70-3,59 (1 H, m, H-3' ou H-4'), 3,42-3,22 (1 H, m, H-4' ou H-3'), 2,26-2,12 (1 H, m), 1,88-1,62 (2 H, m), 1,50-1,33 (1 H, m), 1,01 (1 H,  $J = 7,5$ , H-6').

**RMN de  $^{13}\text{C}$**  (75 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ,  $\delta_{\text{CD}_3\text{OD}}$  49,0)  $\delta$  164,1 (C, C-7), 163,4 (C, C-2), 157,1 (C, C-9), 145,8 (CH, C-4), 130,4 (CH, C-5), 114,2 (CH, C-3), 113,9 (C, C-10), 113,2 (CH, C-6), 102,3 (CH, C-8), 77,5 (CH, C-4' ou C-3'), 72,2 (CH, C-3' ou C-4'), 67,0 ( $\text{CH}_2$ , C-1'), 33,1 ( $\text{CH}_2$ , C-2'), 26,7 ( $\text{CH}_2$ , C-5'), 10,6 ( $\text{CH}_3$ , C-6').

**IE/EM  $m/z$**  (int. rel.): 278 ( $\text{M}^+$ , 8), 219 (8), 175 (10), 162 (100), 134 (37), 89 (8).

### 6.7.2 Adaptação de HTS com células íntegras para detecção de EH

Todos os experimentos foram montados em microplacas com 96 cavidades e o acompanhamento dos ensaios foi realizado por leitura de fluorescência conforme descrito no **item 6.4**. As suspensões microbianas foram preparadas de acordo com o **item 6.6.1.1**. O aumento dos sinais de fluorescência nos sistemas testados foi relacionado à liberação de umbeliferona no meio reacional. Todos os ensaios foram realizados em duplicatas ou triplicatas.

#### 6.7.2.1 Influência da concentração celular na oxidação do diol

A concentração adequada de células microbianas foi avaliada por meio da leitura dos sinais de fluorescências provenientes de misturas compostas por: 10  $\mu\text{L}$  de uma solução de **3.7** ou **3.8** (2 mM) em  $\text{H}_2\text{O}:\text{CH}_3\text{CN}$  (1:1, v/v), 80  $\mu\text{L}$  de BSA (5 mg/mL) em tampão borato 20 mM pH 8,8, 10  $\mu\text{L}$  de solução aquosa de  $\text{NaIO}_4$  (20 mM) e 100  $\mu\text{L}$  de diferentes concentrações de suspensões celulares (0,2 mg/mL, 1

mg/mL, 2 mg/mL , 5 mg/mL e 10 mg/mL) de *A. niger* CCT 1435 preparadas no mesmo tampão borato.

#### 6.7.2.2 Influência da concentração celular na catálise das sondas

A melhor concentração de células microbianas para a realização dos ensaios foi avaliada por meio da leitura dos sinais de fluorescências provenientes de misturas compostas por: 10  $\mu$ L de uma solução de **3.5** ou **3.6** (2 mM) em H<sub>2</sub>O:CH<sub>3</sub>CN (1:1, v/v), 80  $\mu$ L de BSA (5 mg/mL) em tampão borato 20 mM pH 8,8, 10  $\mu$ L de solução aquosa de NaIO<sub>4</sub> (20 mM) e 100  $\mu$ L de diferentes concentrações de suspensões celulares (0,2 mg/mL, 1 mg/mL, 2 mg/mL , 5 mg/mL e 10 mg/mL) de *A. niger* CCT 1435 preparadas no mesmo tampão borato.

#### 6.7.2.3 Influência da concentração de NaIO<sub>4</sub> no sistema do ensaio

A oxidação do diol a aldeído por meio de diferentes concentrações de periodato, nas condições da triagem, foi avaliada por meio da leitura dos sinais de fluorescência provenientes de misturas compostas por: 10  $\mu$ L de uma solução de **3.8** (2 mM) em H<sub>2</sub>O:CH<sub>3</sub>CN (1:1, v/v), 80  $\mu$ L de BSA (5 mg/mL) em tampão borato 20 mM pH 8,8, 100  $\mu$ L de suspensão celular de *A. niger* CCT 1435 (1 mg/mL) em tampão borato e 10  $\mu$ L de solução aquosa de NaIO<sub>4</sub> preparadas em diferentes concentrações (20 mM, 24 mM, 30 mM e 40 mM).

### 6.7.3 HTS para detecção de EH com as sondas fluorogênicas

#### 6.7.3.1 Microrganismos

Os microrganismos utilizados nos testes de epóxido-hidrolases com sondas fluorogênicas estão listados na **Tabela 4, 5 e 6** (pag 58-59).

Estes microrganismos foram reativados, cultivados e preparados de acordo com o descrito no **item 6.6.1.1**.

### 6.7.3.2 Preparação de soluções

#### 6.7.3.2.1 Soluções estoque das sondas fluorogênicas

As sondas de epóxido-hidrolases foram inicialmente preparadas numa concentração de 20 mM em acetonitrila, numa segunda diluição de 10 vezes foi feito uma solução de 2 mM em H<sub>2</sub>O:CH<sub>3</sub>CN (1:1, v/v). Esta última constitui a solução de trabalho. Estas soluções foram sempre conservadas em geladeira e preparadas em pequeno volume de trabalho.

#### 6.7.3.2.2 Solução tampão borato 20 mM pH 8,8

A preparação da solução tampão borato 20 mM pH 8,8 foi realizada de acordo ao procedimento descrito em “*Preparation of buffers for use in enzyme studies*”.<sup>156</sup>

#### 6.7.3.2.3 Solução de periodato de sódio

A solução de periodato utilizada foi sempre recém preparada. Para uma solução 20 mM de periodato de sódio foram dissolvidos 4,3 mg em 1 mL de água *milliQ*.

#### 6.7.3.2.4 Solução de BSA

A solução de BSA foi preparada com a própria solução tampão. Para uma concentração final de 2 mg/mL na reação do ensaio (microplaca), foram dissolvidos 5 mg de BSA em 1 mL de solução tampão com agitação suave para evitar a formação de espuma.

---

<sup>156</sup>. Gomori, G. *Preparations of buffers for use in enzyme studies*. In: *Handbook of Biochemistry and Molecular Biology - Physical and Chemical data Vol 1*, 3<sup>rd</sup> ed., Fasman, G.D. (Ed), Boca Raton, Florida, CRC-Press Inc., 2000. p. 370-377.

### 6.7.3.3 Experimento de calibração de curva padrão de umbeliferona

Foi verificada em microplaca a conversão da intensidade de fluorescência em valores de concentração de umbeliferona de acordo com uma curva de calibração. A partir de uma solução estoque de umbeliferona 20 mM em H<sub>2</sub>O:CH<sub>3</sub>CN (1:1, v/v), foram preparadas soluções com concentrações finais de 5, 10, 15, 20, 25, 50, 75, 100, 125 e 150 µM. As reações foram montadas como descrito a continuação: a 10 µL de uma solução de umbeliferona foram adicionados 80 µL de BSA (5 mg/mL) em tampão borato, 100 µL da solução tampão borato 20 mM pH 8,8 e 10 µL de solução aquosa de NaIO<sub>4</sub> 20 mM.

### 6.7.3.4 Montagem das reações de HTS para EH com sondas fluorogênicas

As reações foram realizadas em microplacas de polipropileno com 96 cavidades. A 10 µL da solução de sonda (2 mM) em H<sub>2</sub>O:CH<sub>3</sub>CN (1:1, v/v), foram adicionados 80 µL de uma solução de BSA (5 mg/mL) em tampão borato 20 mM pH 8,8 e 100 µL das suspensões de células microbianas preparadas a 1 mg/mL (para fungos) e 0,2 mg/mL (para bactérias e leveduras). Por último, foram adicionados 10 µL de solução aquosa de NaIO<sub>4</sub> (20 mM) recém preparada. Reações controle (branco) foram realizadas de maneira análoga, substituindo a suspensão celular por solução tampão. Reações controle de auto-emissão de fluorescência pelos microrganismos foram realizadas substituindo 10 µL da solução de sonda pela solução tampão. Foram também realizados controles positivos substituindo a solução da sonda por solução do produto (no caso do epóxido, o produto foi o diol), mantendo as mesmas condições do ensaio, com a finalidade de certificar que a emissão de fluorescência não foi prejudicada pelas células. As reações foram

monitoradas a cada 3 minutos por um leitor de fluorescência durante 10 horas (**item 6.4**).

#### 6.7.4 HTS para detecção de EH com substratos não modificados (Teste de adrenalina)

##### 6.7.4.1 Microrganismos

A levedura (*Rhodotorula glutinis* CCT 2182), as bactérias (*Bacillus subtilis* CCT 0089 e *B. pumilus* CBMAI 0008) e os fungos (*Emericela nidulans* CCT 3119, *Trichoderma* sp CCT 5551, *A. oryzae* CCT 0975, *A. terreus* CCT 3320, *A. niger* CCT 4648 e *A. niger* CCT 1435) foram cultivados e, depois de crescidos, foram preparadas as suspensões celulares de acordo com o procedimento descrito no **item 6.6.1.1**.

Para preparar as suspensões microbianas, cada microrganismo foi pesado em 4 tubos de *Eppendorf*. Em dois deles, as células foram ressuspensas a concentração de 1 mg/mL em duas soluções tampão (tampão borato 20 mM pH 8,8 e tampão fosfato salina PBS pH 7,4) e nos outros dois tubos, as células foram ressuspensas a concentração de 0,2 mg/mL, utilizando também as duas soluções tampão mencionadas anteriormente.

##### 6.7.4.2 Preparação geral das soluções

###### 6.7.4.2.1 Soluções estoque dos substratos

Foram utilizados 23 epóxidos comerciais (Aldrich ou Fluka, **Figura 17**). Para utilização nos ensaios de adrenalina, foram preparadas soluções estoque de 100 mM em acetonitrila. Em seguida para solução de trabalho, elas foram diluídas 10 vezes ficando com uma concentração de 10 mM em acetonitrila.

#### 6.7.4.2.2 Solução de periodato de sódio

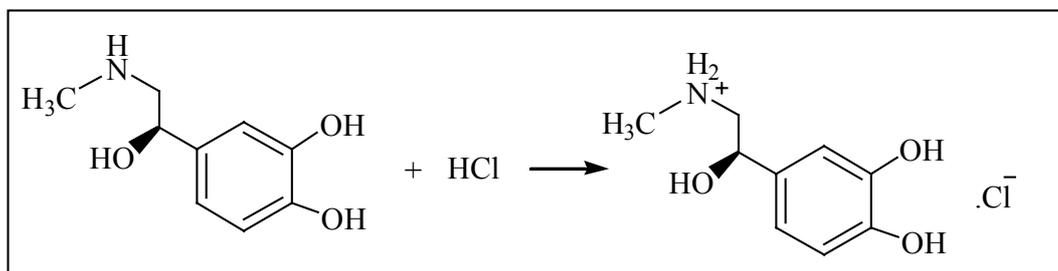
A solução de periodato utilizada foi sempre recém preparada. Para uma solução 10 mM de periodato de sódio dissolvemos 4,3 mg em 2 mL de água *milliQ*.

#### 6.7.4.2.3 Soluções tampão

A preparação da solução tampão borato está especificada no item 6.7.3.2.2. Entretanto a solução tampão PBS utilizada é disponível comercialmente (*Phosphate-buffered saline*, NaCl 160 mM, sol. fosfato aquoso 10 mM, pH 7,4).

#### 6.7.4.2.4 Preparação de solução de cloreto de adrenalina

Para sua utilização como revelador quantitativo de periodado de sódio nas reações foi necessário preparar sal de adrenalina a partir de L-adrenalina conforme o seguinte esquema:



O sal de adrenalina foi preparado pela adição de uma solução aquosa de HCl, *i.e.* 2 M. a uma quantidade conhecida de L-adrenalina, até a dissolução total da mesma, auxiliado por uma pequena agitação durante a adição do ácido. Após isso, procedeu-se à liofilização da solução para eliminar o excesso de ácido. Uma vez liofilizado, adicionou-se quantidade suficiente de água *milliQ* para obter uma solução de sal de adrenalina de 15 mM. Esta solução se conservou sempre na geladeira e foi utilizada no período de 3 dias após da preparação.

### 6.7.4.3 Montagem do teste de adrenalina

As reações foram realizadas em microplacas de poliestireno de meia área com 96 cavidades (Costar 3695, tipo A/2, fundo plano). As reações (100  $\mu\text{L}$ ) foram realizadas de acordo com o procedimento a seguir: a 10  $\mu\text{L}$  da solução de substrato (10 mM) em  $\text{CH}_3\text{CN}$ , foram adicionados 50  $\mu\text{L}$  das suspensões de células microbianas (1 mg/mL ou 0,2 mg/mL, em tampão borato pH 8,8 ou em tampão PBS pH 7,4) e 30  $\mu\text{L}$  da mesma solução tampão. Por último, foram adicionados 10  $\mu\text{L}$  de uma solução aquosa de  $\text{NaIO}_4$  (10 mM). A microplaca foi coberta com uma tampa e papel de alumínio e incubada a 28 °C por 10 horas. Antes da medição de absorbância, 10  $\mu\text{L}$  de uma solução aquosa de sal de adrenalina (15 mM) foi adicionada à mistura reacional. A absorção em 490 nm foi registrada, após um minuto da adição de adrenalina, por meio de um espectrofotômetro de microplaca (*Spectramax 250, Molecular Devices*) durante 5 minutos.

### 6.7.5 Validação dos ensaios de HTS para detecção de EH via biocatálise convencional

#### 6.7.5.1 Microrganismos

Baseando nos resultados de triagem com sondas fluorogênicas e teste de adrenalina foram escolhidos para ensaios biocatalíticos *Aspergillus niger* CCT 1435 e *Bacillus pumilus* CBMAI 0008.

Também foram realizados experimentos de resolução cinética de ( $\pm$ )-1,2-octanodiol com três microrganismos adicionais: *B. pumilus* CBC 008, *B. pumilus* CBC 009 e *A. niger* CCT 4846.

Os fungos foram reativados e cultivados em meio extrato de malte (**item 6.6.1.3.3**), *B. pumilus* CBMAI 0008 foi cultivado no meio xilana de bétula (**item 6.6.1.3.5**) e outros *Bacillus* foram cultivados em meio caldo nutriente (**item**

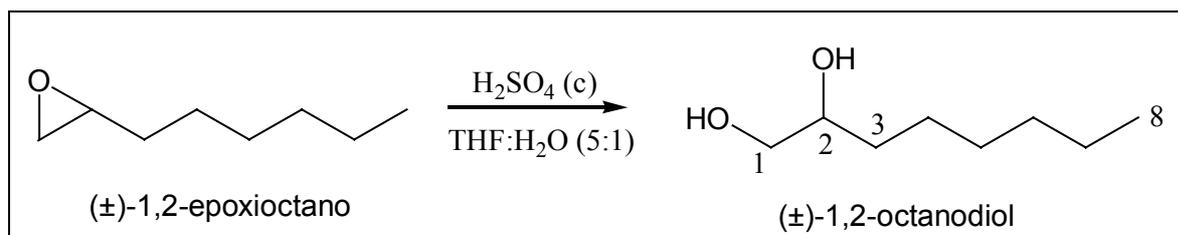
6.6.1.3.1), todos os procedimentos foram realizados de acordo ao descrito no **item 6.6.1.2.**

### 6.7.5.2 Substratos

Foram utilizados nesta parte experimental o óxido de cicloexeno e o ( $\pm$ )-1,2-epoxioctano que são substratos comerciais. Entretanto, foram sintetizados ( $\pm$ )-1,2-octanodiol e 1-hidroxi-2-octanona.

Para determinar o excesso enantiomérico do diol formado foi necessário derivatizar 1,2-octanodiol a 4-hexil-2,2-dimetil-[1,3]dioxolano.

#### 6.7.5.2.1 Síntese de ( $\pm$ )-1,2-octanodiol (3.24)



Num balão de fundo redondo (50 mL) contendo 1,2-epoxioctano (159,3 mg, 1,24 mmoles) em THF:H<sub>2</sub>O (5:1, v/v, 20 mL) foram adicionadas 5 gotas de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrado. A reação foi monitorada por CCD utilizando-se hexano:acetato de etila (2:1, v/v) como eluente. Após 4 horas, o THF foi evaporado sob pressão reduzida e a fase aquosa foi extraída com acetato de etila (10 mL, 3x). As fases orgânicas combinadas foram lavadas com soluções saturadas de NaHCO<sub>3</sub> (5 mL, 3 x) e de NaCl (5 mL, 2x). A fase orgânica resultante foi seca sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anidro e evaporada sob pressão reduzida. O produto bruto foi purificado por coluna cromatográfica, fornecendo 3.24 como um líquido incolor (117,4 mg, 0,8 mmols, 65 %). As análises por CG-EM foram realizadas sob as seguintes condições: 60-290 °C a 15 °C min<sup>-1</sup>, T<sub>inj</sub>= 220 °C, fluxo 1mL/min, split 30.

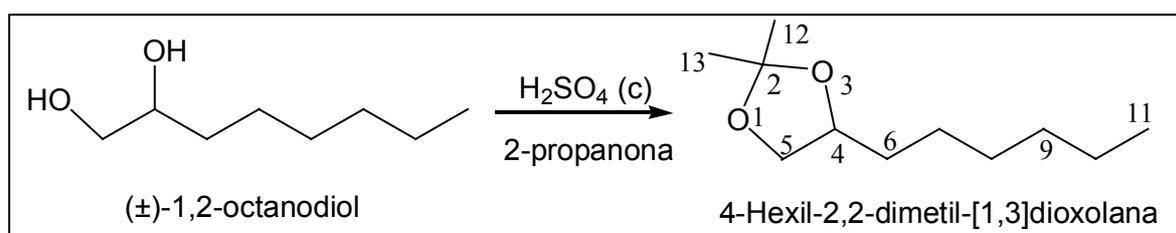
IV 3360, 2954, 2927, 2857, 1463, 1131, 1070, 1029, 866 cm<sup>-1</sup>

**RMN de  $^1\text{H}$**  (300,07 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta_{\text{TMS}}$  0,00):  $\delta$  3,78 -3,59 (4 H, m, H-1a, H-2 e 2 OH), 3,41 (1 H, dd,  $J = 10,8$  e  $7,9$ , H-1b), 1,46 -1,24 (10 H, m, H-3, H-4, H-5, H-6 e H-7), 0,88 (3 H, t,  $J = 6,6$ , H-8)

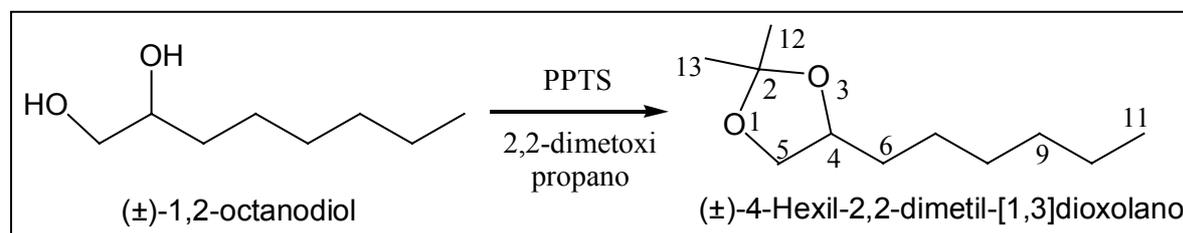
**RMN de  $^{13}\text{C}$**  (75,50 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta_{\text{CDCl}_3}$  77,0):  $\delta$  72,4 (CH, C-2), 66,7 ( $\text{CH}_2$ , C-1), 33,2 ( $\text{CH}_2$ , C-3), 31,8 ( $\text{CH}_2$ , C-6), 29,4 ( $\text{CH}_2$ , C-5), 25,6 ( $\text{CH}_2$ , C-4), 22,7 ( $\text{CH}_2$ , C-7), 14,1 ( $\text{CH}_3$ , C-8).

**IE/EM  $m/z$**  (int. rel.): 146 ( $\text{M}^{+\bullet}$ , ausente), 145 (2), 115 (32), 97 (83), 69 (21), 61 (15), 57 (13), 55 (100).

#### 6.7.5.2.2 Síntese de ( $\pm$ )-4-hexil-2,2-dimetil-[1,3]dioxolano **3.25** (técnica I)



A um balão de fundo redondo (10 mL) contendo uma solução resfriada (0 °C) de ( $\pm$ )-1,2-octanodiol (11 mg; 0,074 mmol) em acetona (3 mL) sob agitação, foi adicionada uma solução de acetona (1 mL) contendo 1 gota de  $\text{H}_2\text{SO}_4$ . A reação foi acompanhada por CCD, utilizando-se como eluente hexano:acetato de etila (2:1, v/v) Após 30 min, o meio reacional foi neutralizado com solução saturada de  $\text{NaHCO}_3$  (5 mL, 2 x) e extraída com hexano (5 mL, 3 x). As fases orgânicas combinadas foram lavadas com solução de  $\text{NaCl}$  saturada e seca sobre  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anidro. O solvente foi evaporado sob pressão reduzida e fluxo de nitrogênio, por ser este produto uma substância muito volátil. Purificação por cromatografia flash forneceu o produto como um líquido ligeiramente amarelo (5,1 mg, 0,027 mmols, 37 %). As análises por CG-EM foram realizadas sob as seguintes condições: 50-290 °C a 15 °C/min,  $T_{\text{inj}} = 240$  °C, fluxo 1 mL/min, split 30.

6.7.5.2.3 Síntese de (±)-4-hexil-2,2-dimetil-[1,3]dioxolano 3.25 (técnica II)

Num balão de fundo redondo (10 mL) contendo 25 mg de 1,2-octanodiol (0,171 mmoles) em 2,2-dimetoxipropano (4 mL) foram adicionados uns cristais de *p*-tolueno-sulfonato de piridinium (PPTS), à temperatura ambiente sob agitação. A reação foi monitorada por CCD utilizando-se como eluente hexano:acetato de etila (2:1, v/v). Após 2 horas, foi adicionada à mistura reacional hexano (20 mL) e lavada com soluções saturadas de NaHCO<sub>3</sub> (3 mL, 2 x) e de NaCl (3 mL). A fase orgânica resultante foi seca sobre MgSO<sub>4</sub> anidro, filtrada e evaporada o solvente sob pressão reduzida e fluxo baixo de nitrogênio. Purificação por coluna flash forneceu o produto como um líquido levemente amarelado (16,7 mg, 0,09 mmol, 53 %). As análises por CG-EM foram realizadas sob as seguintes condições: 50-290 °C a 15 °C/min, T<sub>inj</sub>= 240 °C, fluxo 1mL/min, split 30.

IV 2985, 2958, 2930, 2859, 1457, 1377, 1369, 1259, 1214, 1160, 1090, 1062, 1021, 857, 802 cm<sup>-1</sup>

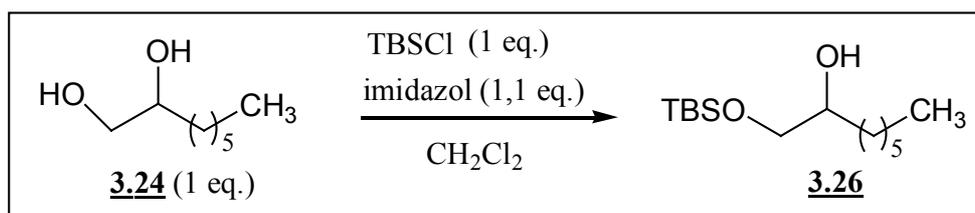
**RMN de <sup>1</sup>H** (300.07 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ<sub>TMS</sub> 0,00): δ 4,12-4,00 (m, 2H, H-5a e H-4), 3,50 (t, *J* 6,8 Hz, 1H, H-5b), 1,72 -1,15 (m, 16H, H-6, H-7, H-8, H-9, H-10, H-12 e H-13), 0,88 (t, *J* 6,4 Hz, H-11)

**RMN de <sup>13</sup>C** (75.50 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ<sub>CDCl<sub>3</sub></sub> 77,0): δ 108,5 (C, C-2), 76,2 (CH, C-4), 69,6 (CH<sub>2</sub>, C-5), 33,7 (CH<sub>2</sub>, C-9), 31,8 (CH<sub>2</sub>, C-6), 29,4 (CH<sub>2</sub>, C-8), 27,1 (CH<sub>3</sub>, C-12 ou C-13), 25,8 (CH<sub>3</sub>, C-12 ou C-13), 25,8 (CH<sub>2</sub>, C-7), 22,7 (CH<sub>2</sub>, C-10), 14,1 (CH<sub>3</sub>, C-11).

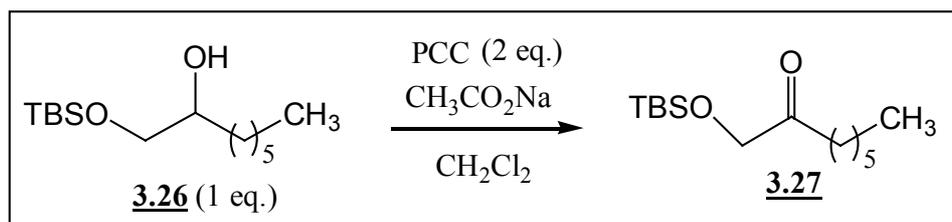
**IE/EM**  $m/z$  (int. rel.): 186( $M^{+}$ , ausente), 185 (1), 172(10), 171(100), 111(10), 101(14), 72(33), 69 (95), 55(28), 43 (67).

#### 6.7.5.2.4 Síntese de 1-hidróxi-2-octanona (**3.28**)

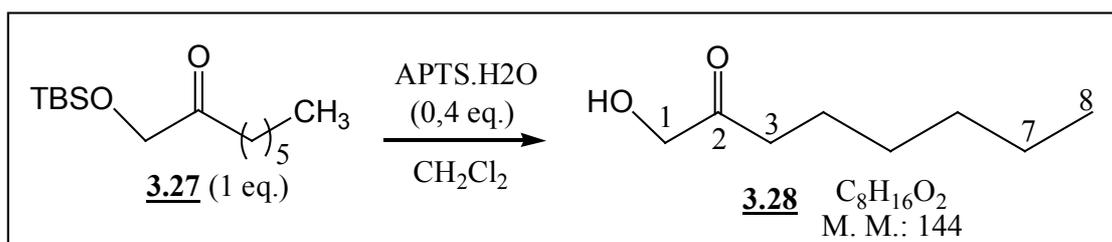
A 1-hidróxi-2-octanona foi preparada a partir de 1,2-octanodiol (**3.24**) em três etapas. A primeira etapa consiste a proteção do grupo hidroxila primária.



Inicialmente, a uma solução de 1,2-octandiol (510 mg, 3,5 mmoles) em CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> tratado (17 mL) foi adicionado imidazol (262 mg, 3,85 mmoles) e cloreto de *t*-butil-dimetilsilano (TBSCl, 527 mg, 3,5 mmoles) sob agitação constante a temperatura ambiente. Após 20 minutos de reação houve a formação de um precipitado branco e após 40 minutos houve consumo total do reagente de partida. Foi adicionada à mistura reacional uma solução saturada de NaCl (10 mL) e a fase orgânica foi separada. A fase aquosa foi extraída com três porções de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3 x 8 mL) e as fases orgânicas combinadas foram secas sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anidro, filtradas e evaporadas sob pressão reduzida, obtendo assim um liquido **3.26** com  $R_f = 0,47$  (hexano:AcOEt, 9:1, v/v). As análises por CG-EM foram realizadas sob as seguintes condições: 60-200 °C a 10 °C/min, 200-300 °C a 20 °C/min,  $T_{inj} = 220$  °C, fluxo constante de 1mL/min, split 30. **IE/EM**  $m/z$  (int. rel.): 260 ( $M^{+}$ , ausente), 203 (10), 105 (55), 89 (13), 75 (100), 73 (28), 69 (78), 55 (25).



Posteriormente, em um balão contendo uma solução de **3.26** (3,5 mmoles) em  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  tratado (15 mL) foi adicionado acetato de sódio e PCC (1,5 g, 7 mmoles). A reação foi mantida sob agitação constante em temperatura ambiente por 48 horas. Após desse tempo, a mistura reacional (cor preta) foi diluída com éter etílico (5x de volume), onde as fases orgânicas são separadas e o sólido escuro foi lavado com mais três pequenas porções de éter etílico. As fases orgânicas combinadas foram filtradas através de Florisil, secas sobre  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anidro e evaporadas sob pressão reduzida obtendo um líquido **3.27** com  $R_f = 0,59$  (hexano:AcOEt, 9:1, v/v). A análise por CG-EM foi realizada sob as seguintes condições: 60-160 °C a 10 °C/min, 160-300 °C a 25 °C/min,  $T_{\text{inj}} = 220$  °C, fluxo constante de 1 mL/min, split 50. **IE/EM**  $m/z$  (int. rel.): 258 ( $\text{M}^+$ , 1), 202 (17), 201 (100), 117 (39), 89 (15), 75 (36), 73 (30).



Finalmente, foi realizada a reação de desproteção do álcool primário. A uma solução de **5.9** (0,5330 mg, 2,06 mmoles) em  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (10 mL) foi adicionado o ácido *p*-tolueno sulfônico monohidratado (76 mg, 0,4 eq.). A reação foi mantida sob agitação constante em temperatura ambiente por 24 h. O produto foi obtido diretamente evaporando o solvente sob pressão reduzida. Após purificação por coluna cromatográfica foi obtido um líquido incolor de **3.28**. As análises por CG-

EM foram realizadas sob as seguintes condições: 50-180 °C a 15 °C/min, 180-290 °C a 30°C/min,  $T_{inj}$  = 220 °C, fluxo constante de 1 mL/min, split 50.

IV 3424, 2955, 2928, 2858, 1719, 1463, 1407, 1376, 1278, 1105, 1059  $cm^{-1}$ .

RMN de  $^1H$  (300,07 MHz,  $CDCl_3$ ,  $\delta_{TMS}$  0,00):  $\delta$  4,24 (2 H, s, H-1), 2,92 (1 H, sl, OH), 2,41 (2 H, t,  $J = 7,3$ , H-3), 1,63 (2 H, quint,  $J = 7,3$ , H-4), 1,38-1,22 (6 H, m, H-5, H-6, H-7), 0,88 (3H, t,  $J = 6,6$ , H-8).

RMN de  $^{13}C$  (75,50 MHz,  $CDCl_3$ ,  $\delta_{CDCl_3}$  77,0):  $\delta$  209,7 (C, C-2), 68,0 ( $CH_2$ , C-1), 38,5 ( $CH_2$ , C-3), 31,5 ( $CH_2$ , C-6), 28,9 ( $CH_2$ , C-5), 23,7 ( $CH_2$ , C-4), 22,5 ( $CH_2$ , C-7), 14,0 ( $CH_3$ , C-8).

IE/EM  $m/z$  (int. rel.): 144( $M^{+}$ , 1), 113 (100), 111 (21), 95 (12), 85 (48), 57 (40), 55 (65).

### 6.7.5.3 Montagem das reações biocatalíticas para epóxido-hidrolases

#### 6.7.5.3.1 ( $\pm$ )-1,2-epoxioctano (**3.23**) como substrato

As células foram crescidas e obtidas por meio de centrifugação para o *B. pumilus* CBMAI 0008 e por meio de filtração para o *A. niger* CCT 1435 conforme escrito no item **6.6.1.2**. As reações biocatalíticas foram realizadas em Erlenmeyers de 125 mL, adicionando-se aproximadamente 4 g (massa úmida) do microrganismo em solução tampão fosfato pH 7,0 (40 mL) e uma alíquota do substrato (40  $\mu$ L). As reações foram mantidas sob agitação rotatória constante de 150 rpm a 28 °C. Os controles das reações biocatalíticas foram realizados adicionando-se apenas os substratos no tampão fosfato (sem o microrganismo) e adicionando-se células no tampão fosfato (sem os substratos).

A abertura de epóxido ocorre num intervalo de tempo curto, assim, o período de monitoramento inicial foi de cada 30 minutos nas primeiras duas horas,

incluindo a 0 hora (logo após da adição do substrato no meio reacional), depois a cada 2-3 h e finalmente de 6 a 12 h. O monitoramento ocorre por um período de 24 h. A extração das alíquotas (duas alíquotas de 500  $\mu$ L e uma de 3 mL por cada tempo de extração e cada frasco de Erlenmeyer) se programou da seguinte maneira:

(a) Uma alíquota de 500  $\mu$ L do meio reacional, previamente saturada com NaCl, foi extraída com 495  $\mu$ L de acetato de etila, com adição de 5  $\mu$ L de pentadecano 5 mg/mL (padrão interno). Esta fração foi analisada por CG-EM para determinação de conversão cromatográfica do ensaio. As análises por CG-EM foram realizadas sob as seguintes condições: 50-180  $^{\circ}$ C a 15  $^{\circ}$ C/min, 180-290  $^{\circ}$ C a 30  $^{\circ}$ C/min,  $T_{inj}$ = 220  $^{\circ}$ C, fluxo constante de 1mL/min. Coluna HP-5 MS.

(b) Outra alíquota de 500  $\mu$ L do meio reacional, previamente saturada com NaCl, foi extraída com 1 mL de *n*-pentano. Esta fração foi analisada por CG-FID utilizando a coluna quiral Chrompak CD-Chirasil, para a determinação do excesso enantiomérico do epóxido. As análises por CG-FID foram realizadas sob as seguintes condições:  $T_{inicial}$  = 40  $^{\circ}$ C por 15 min, 40-55 a 1  $^{\circ}$ C/min, 55-180  $^{\circ}$ C a 15  $^{\circ}$ C/min, deixar em 180  $^{\circ}$ C durante 5 minutos.  $T_{inj}$ = 220  $^{\circ}$ C,  $T_{det}$ = 240  $^{\circ}$ C, pressão constante de 10 psi, splitless.

(c) A alíquota de 3 mL do meio reacional, previamente saturada com NaCl, foi extraída com éter etílico (2 x 2 mL). Esta fração foi destinada para análise do excesso enantiomérico de diol. A fase orgânica foi seca sobre  $Na_2SO_4$  anidro e evaporado o solvente com baixo fluxo de gás nitrogênio. Após isso, realizou-se a derivatização do diol catalisada por PPTS conforme descrito no **item 6.7.5.2.3**. O acetonideo obtido foi diluído em hexano bi-destilado e analisado por CG-FID com a coluna Chrompak CD-Chirasil sob as seguintes condições:  $T_{inicial}$  = 100  $^{\circ}$ C por 10 min, 100-180  $^{\circ}$ C a 30  $^{\circ}$ C/min, deixar em 180  $^{\circ}$ C durante 5 minutos.  $T_{inj}$ = 220  $^{\circ}$ C,  $T_{det}$ = 240  $^{\circ}$ C, pressão constante de 10 psi, splitless.

### 6.7.5.3.2 (±)-1,2 octanodiol (3.24) como substrato

Foram realizados com *B. pumilus* CBMAI 0008, *Bacillus pumilus* CBC 008 e 009, *A. niger* CCT 1435 e *A. niger* CCT 4846. Toda a parte experimental concernente à obtenção das células e montagem das reações, assim como o monitoramento da bioconversão foi similar ao descrito no **item 6.7.5.3.1**.

O período de monitoramento inicial foi de 6 h, 18 h, 24 h, e depois a cada 24 horas por 6 dias consecutivas. A extração das alíquotas (uma alíquotas de 500 µL e uma de 1 mL por cada tempo de extração e cada frasco de Erlenmeyer) se programou da seguinte maneira:

(a) A alíquota de 500 µL foi utilizada para verificar a presença de 1-hidróxi-2-octanona e o cálculo de conversão. Foi processada e analisada de maneira idêntica ao descrito no **item 6.7.5.3.1 (a)**, com uma ligeira mudança na rampa de CG-EM de acordo as seguintes condições: 50-180 a 10 °C/min, 180-290 a 30 °C/min,  $T_{inj}$ = 220 °C, fluxo constante de 1mL/min, splitless.

(b) A alíquota de 1 mL do meio reacional foi utilizada para análise do excesso enantiomérico do diol. Estas frações foram submetidas ao mesmo tratamento de reação de derivatização e analisadas por CG-FID utilizando a coluna Chrompak CD-Chirasil conforme descrito no **item 6.7.5.3.1 (c)**.

### 6.7.5.3.3 1-hidróxi-2-octanona (3.28) como substrato

Estes experimentos foram realizados com *A. niger* CCT 1435 e *B. pumilus* CBMAI 0008. Toda a parte experimental concernente à obtenção das células e montagem das reações, assim como o monitoramento da bioconversão, foi similar ao descrito no **item 6.7.5.3.1**.

O período de monitoramento foi de tempo em tempo e depois a cada 24 horas por 5 dias consecutivas. A extração das alíquotas (uma alíquota de 500 µL e uma de 2 mL por cada tempo de extração e cada frasco de Erlenmeyer),

processamento das alíquotas e análise por CG-EM e CG-FID foram realizados de maneira similar em **itens 6.7.5.3.2. (a) e (b)**.

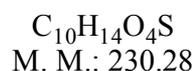
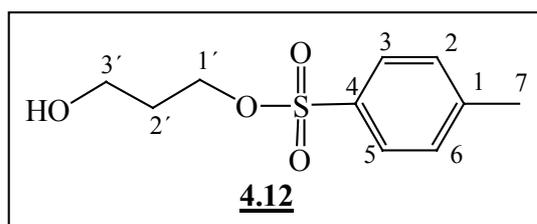
## 6.8 TRIAGEM DE MONOOXIGENASES

### 6.8.1 Preparação das sondas fluorogênicas para detecção de monooxigenases

#### 6.8.1.1 Preparação da substância padrão **4.14**

A substância padrão **4.14** foi preparada em 3 etapas, sendo que a primeira é a reação de tosilção, seguida de acetilação e por último a reação de alquilação com a umbeliferona.

##### 6.8.1.1.1 3-hidróxi-propil-p-toluenossulfonil éter (**4.12**)



A execução do procedimento experimental foi realizada conforme o procedimento geral para as reações de tosilção no **item 6.7.1.1**. Foi utilizado a mesma quantidade de equivalente de 1,3-propanodiol (1,14 g, 15 mmoles) e cloreto de 4-toluenossulfonila (2,86 g, 15 mmoles) em  $\text{CHCl}_3$  (15 mL), utilizando piridina como base (2,5 mL, 30 mmoles). Após purificação por cromatografia “flash” em coluna de sílica eluída com hexano:acetato de etila foi obtido um líquido oleoso ligeiramente amarelo de (**4.12**) (1,21 g, 5,3 mmoles, 35 %). As análises por CG-EM foram realizadas sob as seguintes condições: 70-300 °C a 15 °C/min,  $T_{\text{inj}} = 230$  °C, fluxo constante de 1 mL/min, split 50.

CCD (hexano:AcOEt, 70:30, v/v)  $R_f = 0,22$ .

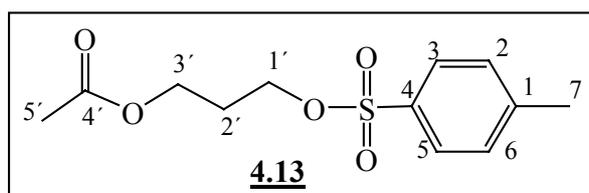
IV 3343, 2959, 2880, 1728, 1598, 1354, 1188, 1174, 1097, 1034, 931, 815  $\text{cm}^{-1}$ .

**RMN de  $^1\text{H}$**  (300,067 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta_{\text{TMS}}$  0,00):  $\delta$  7,79 (2 H, d,  $J = 8,1$ , H-3 e H-5), 7,35 (2 H, d,  $J = 8,1$ , H-2 e H-6), 4,17 (2 H, ddd,  $J = 6,1, 6,1, 2,2$ , H-1'), 3,71-3,67 (2 H, m, H-3'), 2,45 (3 H, s, H-7), 2,25 (1 H, sl, OH), 1,93-1,83 (2 H, m, H-2').

**RMN de  $^{13}\text{C}$**  (75,45 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta_{\text{CDCl}_3}$  77,0):  $\delta$  144,7 (C, C-1), 132,7 (C, C-4), 129,7 (CH, C-2 e C-6), 127,7 (CH, C-3 e C-5), 67,5 ( $\text{CH}_2$ , C-3'), 58,2 ( $\text{CH}_2$ , C-1'), 31,7 ( $\text{CH}_2$ , C-2'), 21,7 ( $\text{CH}_3$ , C-7).

**IE/EM  $m/z$**  (int. rel.): 230 ( $\text{M}^{*+}$ , ausente), 173 (58), 172 (61), 155 (34), 107 (14), 92 (26), 91 (100), 65 (29), 58 (42).

#### 6.8.1.1.2 3-acetóxi-propil-p-toluenossulfonil éter (4.13)



$\text{C}_{12}\text{H}_{16}\text{O}_5\text{S}$   
M. M.: 272.32

A uma solução resfriada (0 °C) de 4.12 (1,15 g, 5 mmoles) e piridina (1,5 mL, 17,5 mmoles) em  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (6 mL) sob agitação foi adicionado lentamente cloreto de acetila (0,69 g, 8,5 mmol). Após 30 min, 50 mL de AcOEt foram adicionados à mistura reacional. A seguir, a fase orgânica foi lavada com soluções de  $\text{NaHCO}_3$  saturada (10 mL, 2x),  $\text{CuSO}_4$  saturada (10 mL, 3x), água destilada (10 mL) e  $\text{NaCl}$  saturada (10 mL). A fase orgânica foi seca sobre  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anidro e concentrada sob vácuo, obtendo um líquido oleoso amarelo de 4.13 (1,20 g, 4,4 mmoles, 88 %). As análises por CG-EM foram realizadas sob as seguintes condições: 70-300 °C a 15 °C/min,  $T_{\text{inj}} = 230$  °C, fluxo constante de 1 mL/min, split 50.

CCD (hexano:AcOEt, 70:30, v/v)  $R_f = 0,72$ .

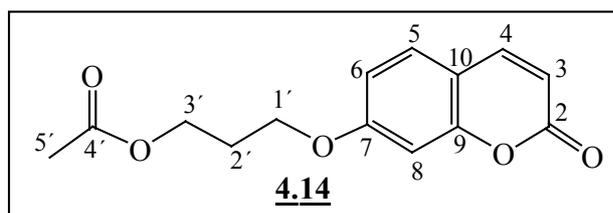
IV 2961, 2884, 1736, 1598, 1355, 1237, 1188, 1174, 1034, 931, 815  $\text{cm}^{-1}$

RMN de  $^1\text{H}$  (300,067 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta_{\text{TMS}} 0,00$ ):  $\delta$  7,79 (2 H, d,  $J = 8,1$ , H-3 e H-5), 7,35 (2 H, d,  $J = 8,1$ , H-2 e H-6), 4,05 – 4,16 (4 H, m, H-1' e H-3'), 2,45 (3 H, s, H-7), 2,04-1,94 (2 H, m, H-2'), 1,97 (3 H, s, H-5').

RMN de  $^{13}\text{C}$  (75,45 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta_{\text{CDCl}_3} 77,0$ ):  $\delta$  170,5 (C, C-4'), 144,7 (C, C-1), 132,7 (C, C-4), 129,7 (2 CH, C-2 e C-6), 127,8 (2 CH, C-3 e C-5), 66,8 ( $\text{CH}_2$ , C-3'), 60,1 ( $\text{CH}_2$ , C-1'), 28,3 ( $\text{CH}_2$ , C-2'), 21,7 ( $\text{CH}_3$ , C-7), 20,8 ( $\text{CH}_3$ , C-5').

IE/EM  $m/z$  (int. rel.): 272 ( $\text{M}^+$ , ausente), 172 (24), 155 (48), 101 (100), 92 (16), 91 (78), 65 (24), 57 (20).

#### 6.8.1.1.3 3-acetóxi-propil-7-umbeliferil éter (**4.14**)



$\text{C}_{14}\text{H}_{14}\text{O}_5$   
M. M.: 262,26

A execução do procedimento experimental foi realizada de acordo ao procedimento geral para as reações de alquilação no item 6.7.1.2. Foi utilizado composto **4.13** (1,06 g, 3,9 mmoles) e umbeliferona (0,66 g, 4,1 mmoles) em DMF (24 mL) e NaH (0,62 g, 60%, 12 mmoles). Após purificação por cromatografia “flash” em coluna de sílica e eluída com hexano:acetato de etila, foi obtido um cristal de cor levemente amarelado de **4.14** (0,26 g, 1 mmol, 26%). A análise por CG-EM foi realizada sob as seguintes condições: 100-300  $^{\circ}\text{C}$  a 15  $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ ,  $T_{\text{inj}} = 230$   $^{\circ}\text{C}$ , fluxo constante de 1 mL/min, split 50.

CCD (hexano:AcOEt, 80:20, v/v)  $R_f = 0,36$ .

**Ponto de fusão:** 67,9 – 68,9 °C

**IV** 2962, 2939, 1731, 1717, 1607, 1506, 1402, 1353, 1281, 1228, 1197, 1128, 1058, 838, 827 cm<sup>-1</sup>.

**RMN de <sup>1</sup>H** (499,885 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ<sub>TMS</sub> 0,00): δ 7,64 (1 H, d, *J* = 9,3, H-4), 7,37 (1 H, d, *J* = 8,4, H-5), 6,84 (1 H, dd, *J* = 8,4; 2,4, H-6), 6,80 (1 H, d, *J* = 2,4, H-8), 6,25 (1 H, d, *J* = 9,3, H-3), 4,27 (2 H, t, *J* = 6,2, H-3'), 4,11 (2 H, t, *J* = 6,2, H-1'), 2,16 (2 H, quint, *J* = 6,2, H-2'), 2,07 (3 H, s, H-5').

**RMN de <sup>13</sup>C** (125,70 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ<sub>CDCl<sub>3</sub></sub> 77,0): δ 170,7 (C, C-4'), 161,7 (C, C-7), 160,9 (C, C-2), 155,6 (C, C-9), 143,2 (CH, C-4), 128,6 (CH, C-5), 113,0 (CH, C-3), 112,7 (CH, C-6), 112,5 (C, C-10), 101,2 (CH, C-8), 64,9 (CH<sub>2</sub>, C-1'), 60,9 (CH<sub>2</sub>, C-3'), 28,4 (CH<sub>2</sub>, C-2'), 21,0 (CH<sub>3</sub>, C-5').

**IE/EM *m/z*** (int. rel.): 262 (M<sup>+</sup>, 12), 291 (7), 162 (13), 134 (26), 101 (100), 89 (12), 73 (16).

## 6.8.2 Adaptação de HTS com células íntegras para detecção de monooxigenases

### 6.8.2.1 Estabilidade das sondas em diferentes soluções tampão

As estabilidades das 4 sondas **4.15-4.18** em diferentes soluções tampão com diferentes pH foram avaliadas por meio da leitura dos sinais de fluorescência provenientes de misturas compostas por: 10 µL de uma solução da sonda (**4.15** – **4.18**) a 2 mM em H<sub>2</sub>O:CH<sub>3</sub>CN (1:1, v/v), 90 µL de uma solução de BSA a 4,4 mg/mL em diferentes soluções tampão: 1) tampão borato 20 mM pH 8,8; 2) tampão glicina-NaOH 100 mM pH 9,6 e; 3) tampão bicarbonato 550 mM pH 9,1 e por último 100 µL do tampão utilizado para completar o volume total de 200 µL.<sup>156</sup>

### 6.8.2.2. Emissão de fluorescência dos produtos em diferentes soluções tampão

A máxima emissão de fluorescência pelos ésteres e lactonas **4.19** - **4.22** em diferentes soluções tampão com diferentes pH foi avaliada por meio da leitura dos sinais de fluorescência provenientes de misturas compostas por: 10 µL de uma solução do ester ou lactona (**4.19** - **4.22**) a 2 mM em H<sub>2</sub>O:CH<sub>3</sub>CN (1:1, v/v), 90 µL de uma solução de BSA a 4,4 mg/mL em diferentes soluções tampão: 1) tampão borato 20 mM pH 8,8; 2) tampão glicina-NaOH 100 mM pH 9,6 e; 3) tampão bicarbonato 550 mM pH 9,1 por último 100 µL do tampão utilizado para completar o volume total de 200 µL.

### 6.8.3 *Triagem de alto desempenho com sondas fluorogênicas para detecção de monooxigenases*

#### 6.8.3.1 Microrganismos

Os microrganismos utilizados para teste de monooxigenases utilizando sondas fluorogênicas estão listados na **Tabela 13** (pag. 120). Eles foram crescidos nos meios de cultura correspondentes e preparadas para as suspensões de 1 mg/mL em solução tampão borato conforme escrito no **item 6.6.1.1**

#### 6.8.3.2 Preparação de soluções

As soluções de estoque e de trabalho das sondas fluorogênicas e solução tampão borato 20 mM pH 8,8 foram preparadas conforme descrito nos **itens 6.7.3.2.1 e 6.7.3.2.2**, respectivamente.

### 6.8.3.2.1 Solução de BSA

A solução de BSA é preparada com a própria solução tampão. Para uma concentração final na reação (microplaca) de 2 mg/mL, dissolveu-se 4,4 mg de BSA por mL de solução tampão. Durante a preparação desta solução, deve-se agitarla suavemente para ajudar na dissolução da proteína e evitar a formação de espuma.

### 6.8.3.3 Montagem das reações de HTS para monooxigenases com sondas fluorogênicas

As reações foram realizadas em microplacas de polipropileno com 96 cavidades. A 10  $\mu$ L das soluções 2 mM das sondas **4.15** – **4.18** em H<sub>2</sub>O:MeCN (1:1, v/v), foram adicionados 90  $\mu$ L de uma solução de BSA a 4,4 mg/mL em tampão borato 20 mM pH 8,8 e 100  $\mu$ L das suspensões de células microbianas preparada a 1 mg/mL em borato 20 mM pH 8,8, mantendo assim o volume total de 200  $\mu$ L. Reações de controle branco foram realizadas à semelhança, porém substituindo a suspensão celular por solução tampão. Reações de controle de auto-emissão de fluorescência pelo microrganismo foram realizadas substituindo 10  $\mu$ L da solução de sonda pela solução tampão. Além disso, também foram realizados controles positivos substituindo solução de sonda por solução do produto (neste caso seria o éster ou lactona), mantendo as mesmas condições do ensaio, com a finalidade de certificar-se que a emissão de fluorescência não foi prejudicada pelas células. As reações foram monitoradas por 24 h a intervalo de 10 minutos por um leitor de fluorescência (**item 6.4**).

#### 6.8.4 Validação dos ensaios de HTS para detecção de monooxigenases via biocatálise convencional

##### 6.8.4.1 Microrganismos

Os fungos *A. niger* CCT 4648, *A. niger* CCT 5559, *A. oryzae* CCT 0975, *A. terreus* CCT 3320, *C. echinulata* CCT 4259, *C. eragrostidis* CCT 5634, *C. lunata* CCT 5628, *C. lunata* CCT 5629, *C. pallescens* CCT 5654, *Trichoderma* sp CCT 5551 e *G. candidum* CCT 1205 foram estudados previamente no nosso laboratório em relação à produção de Baeyer-Villiger monooxigenases.<sup>147</sup> Os resultados destes estudos passaram a servir de validação dos ensaios fluorogênicos com os mesmos microrganismos, não havendo necessidade de repetir tais experimentos.

Entretanto, foram realizadas reações biocatalíticas frente a uma serie de substratos com *T. cutaneum* CCT 1903, *R. oryzae* CCT 4964, AMA 7 e o fungo CCT5632. Eles foram mantidos e cultivados de acordo com o procedimento geral descrito no **item 6.6.1.2**.

##### 6.8.4.2 Substratos utilizados

Foram testados 12 substratos disponíveis comercialmente com *T. cutaneum* CCT 1903: 2-heptanona, 4-metil-cicloexanona, 6-metil-5-hepten-2-ona, 1-fenil-etanona, 1-fenil-propanona, 1-(4-metoxi-fenil)-heptanona, 4,4-dimetil-cicloexanona,  $\alpha$ -pineno, 2-ciclopentenona, 1-*H*-indeno, cânfora e *cis*-jasmona.

Os microrganismos *R. oryzae* CCT 4964, AMA 7 e o fungo CCT5632 foram expostos a ensaio de multi-biorreação frente a: 3-metil-ciclopentanona, 2-metil-cicloexanona, 4-metil-cicloexanona e *cis*-jasmona. Todos estes substratos são também comerciais e foram utilizados sem nenhum tratamento prévio.

### 6.8.4.3 Montagem das reações biocatalíticas para monooxigenases

#### 6.8.4.3.1 *Trichosporon cutaneum* CCT 1903

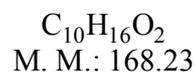
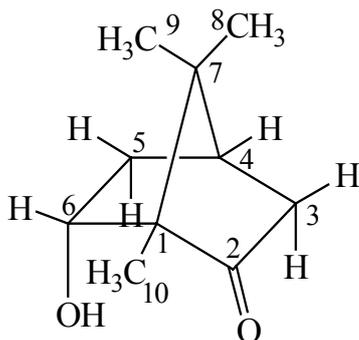
As células foram crescidas e obtidas por meio de centrifugação conforme escrito no **item 6.6.1.2**. As reações biocatalíticas (**Tabela 14**, pag. 126) foram realizadas em Erlenmeyers de 125 mL, onde as células foram ressuspensas (2 g, peso úmido) em solução tampão fosfato pH 7,0 ou pH 6,5 (20 mL) contendo 20 µL de substrato. Para biocatálise com células em crescimento, as células foram ressuspensas no meio de extrato de levedura e malte YM (20 mL) e 20 µL de substrato. Sendo que a concentração do substrato é mantida sempre a uma concentração de 1 µL/mL de suspensão. Os controles das reações biocatalíticas foram realizados adicionando-se apenas os substratos no tampão fosfato (sem o microrganismo) e adicionando-se células no tampão fosfato (sem os substratos). As reações foram mantidas sob agitação constante de 150 rpm a 28 °C.

As reações foram monitoradas retirando-se alíquotas de 1 mL a 6 h, 12 h, 24 h, depois a intervalo de 24 h por 5 dias. As alíquotas são saturadas com NaCl antes de realizar a extração com 990 µL de AcOEt mais 10 µL de pentadecano a 1 mg/mL (padrão interno). As amostras foram analisadas por CG-EM, empregando-se a coluna HP-5 MS - Crosslinked 5% fenil-metilsiloxano. As condições gerais de análise realizadas por CG-EM são: 50 °C a 290 °C a 20 °C/min,  $T_{inj.} = 220$  °C, fluxo=1 mL/min, splitless.

Para o isolamento e caracterização de 6-endo-hidroxicânfora produzida por *T. cutaneum* CCT 1093 utilizando cânfora como substrato foram realizados experimentos com as mesmas condições acima citadas, entretanto, numa escala maior. O produto foi extraído com AcOEt e purificado por meio de coluna cromatográfica utilizando como eluente AcOEt/hexano, onde as frações foram recolhidas por semelhança. O solvente foi evaporado sob pressão reduzida e foi

obtido um sólido amorfo submetido a análise espectral detalhada a continuação. As condições de análise realizadas por CG-EM são: 60 °C a 290 °C a 20 °C/min,  $T_{inj.}$  = 240 °C, fluxo = 1mL/min, split 50.

#### 6.8.4.3.1.1 Caracterização de 6-endo-hidroxicânfora



**CCD** (hexano:AcOEt, 75:25, v/v)  $R_f$  = 0,17.

**IV** 3455, 2962, 2872, 2361, 1736, 1450, 1412, 1392, 1259, 1070, 1021, 794  $cm^{-1}$

**RMN de  $^1H$**  (300,07 MHz,  $CDCl_3$ ,  $\delta_{TMS}$  0,00):  $\delta$  4,18 (1H, ddd,  $J$  = 9,0; 2,6 e 1,3, H-6<sub>exo</sub>), 2,55 (1H, dddd,  $J$  = 13,5; 9,0; 4,5 e 3,3, H-5<sub>exo</sub>), 2,43 (1H, ddd,  $J$  18,3; 4,8 e 3,3, H-3<sub>exo</sub>), 2,15 (1H, dd,  $J$  = 4,5 e 4,5, H-4), 2,00 (1H, d,  $J$  = 18,3, H-3<sub>endo</sub>), 1,71 (1H, sl, OH), 1,33 (1H, dd,  $J$  = 13,5 e 2,6, H-5<sub>endo</sub>), 0,98 (6H, s, H-8 e H-9), 0,84 (3H, s, H-10).

**RMN de  $^{13}C$**  (75,50 MHz,  $CDCl_3$ ,  $\delta_{CDCl_3}$  77,0):  $\delta$  217,4 (C, C-2), 75,8 (CH, C-6), 63,8 (C, C-1), 48,7 (C, C-7), 43,4 (CH<sub>2</sub>, C-3), 41,5 (CH, C-4), 37,6 (CH<sub>2</sub>, C-5), 20,7 (CH<sub>3</sub>, C-8 ou 9), 19,8 (CH<sub>3</sub>, C-8 ou 9), 7,2 (CH<sub>3</sub>, C-10).

**IE/EM  $m/z$**  (int. rel.): 168 ( $M^{+}$ , 6), 153 (100), 111 (26), 109 (30), 108 (74), 107 (88), 93 (62), 55 (20), 41 (34).

#### 6.8.4.3.2 Ensaio de multi-biorreação com *Rhizopus oryzae* CCT 4964, AMA 7 e o fungo CCT 5632

As células crescidas destes microrganismos foram filtradas ou centrifugadas conforme o item 6.6.1.2. As reações foram realizadas adicionando 2 g de massa úmida do microrganismo em 50 mL de tampão fosfato (pH 6,5) juntamente com 10 µL de cada um dos seguintes substratos: *cis*-jasmona, 3-metilciclopentanona, 2-metilciclohexanona e 4-metilciclohexanona. Os controles das reações biocatalíticas foram realizados adicionando-se apenas os substratos no tampão fosfato (sem o microrganismo) e adicionando-se células da levedura no tampão fosfato (sem os substratos). Estas suspensões foram novamente incubadas sob agitação (150 rpm) a 28 °C, e as reações de biocatálise foram acompanhadas retirando-se alíquotas de 1 mL a cada 2 h, 12 h, 24 h, depois a intervalo de 24 horas até o sexto dia. As alíquotas são saturadas com NaCl antes de realizar a extração com 990 µL de AcOEt mais 10 µL de pentadecano 5 mg/mL utilizado como padrão interno. As amostras foram analisadas por CG-EM, empregando-se a coluna HP-5MS - Crosslinked 5 % fenil-metilsiloxano. As condições de análises: 45 °C/5 min, depois 45-225 °C a 10 °C/min, seguido por 30 °C/min até 290 °C,  $T_{inj.} = 200$  °C, fluxo = 1mL/min, split 50.

---

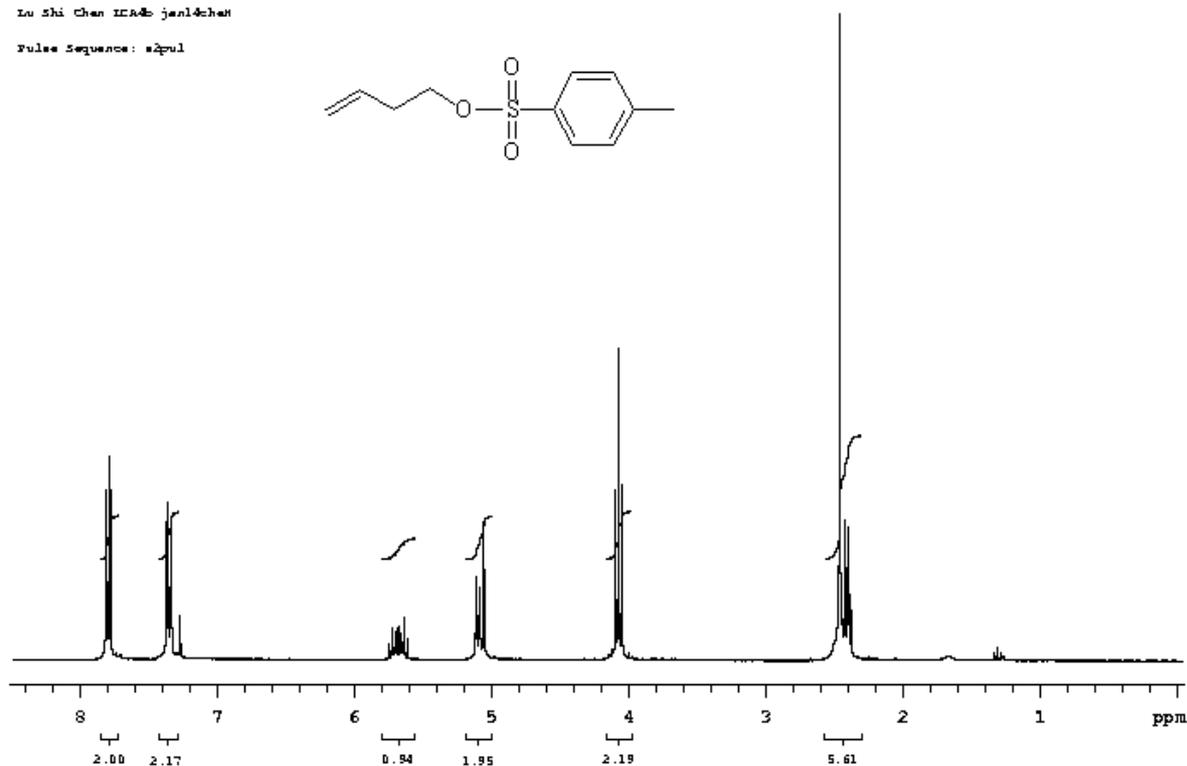
# *Anexos*

---

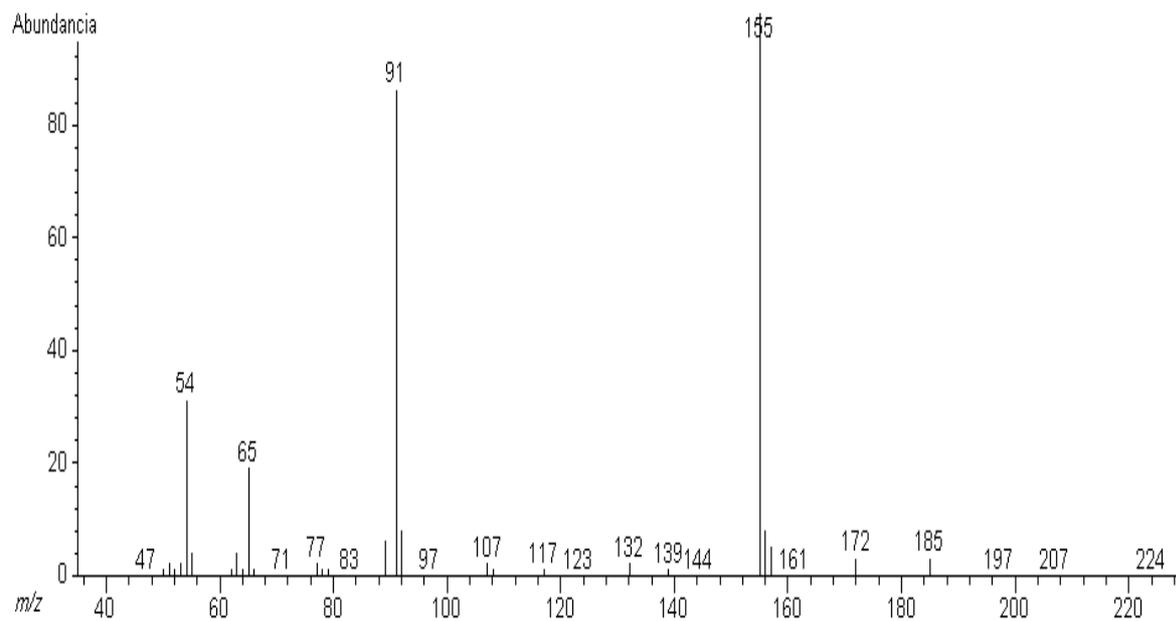
## 7 ANEXO

Lu Shi Chen ICAE@jnu.edu.cn

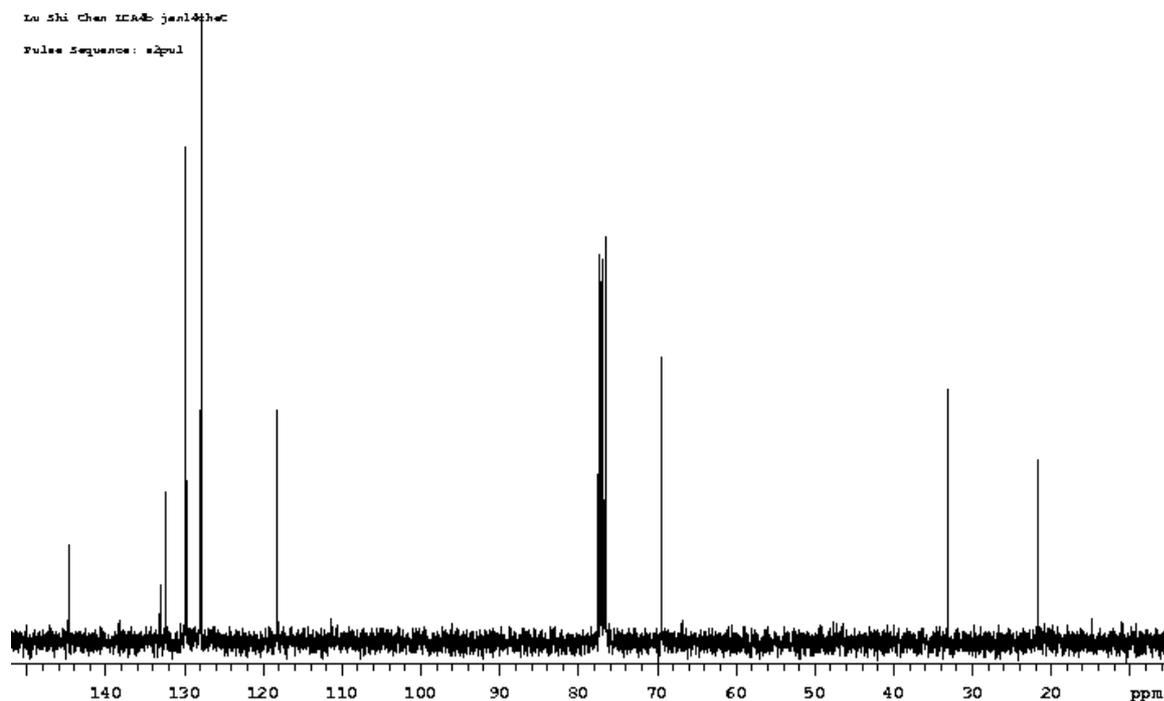
Pulse Sequence: zgpg30



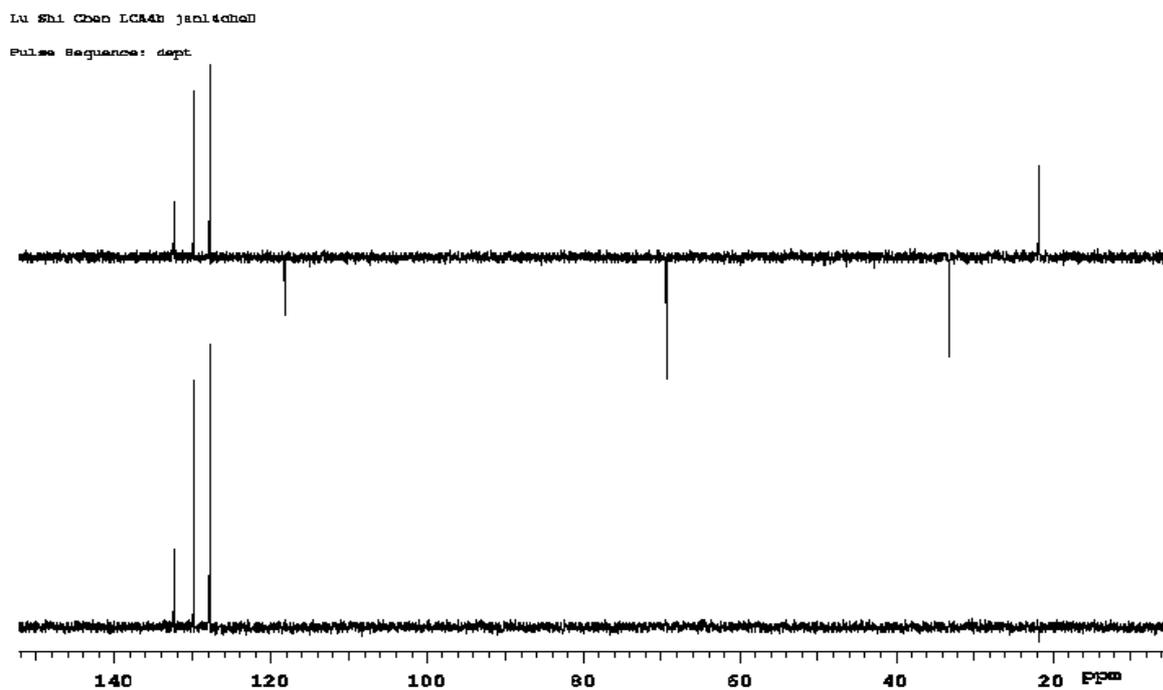
**E 1**– Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (300,07 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de 4-toluenosulfonato de 3-butenila **3.1**.



**E 2** – Espectro de massas (IE, 70 eV) de 4-toluenosulfonato de 3-butenila **3.1**.



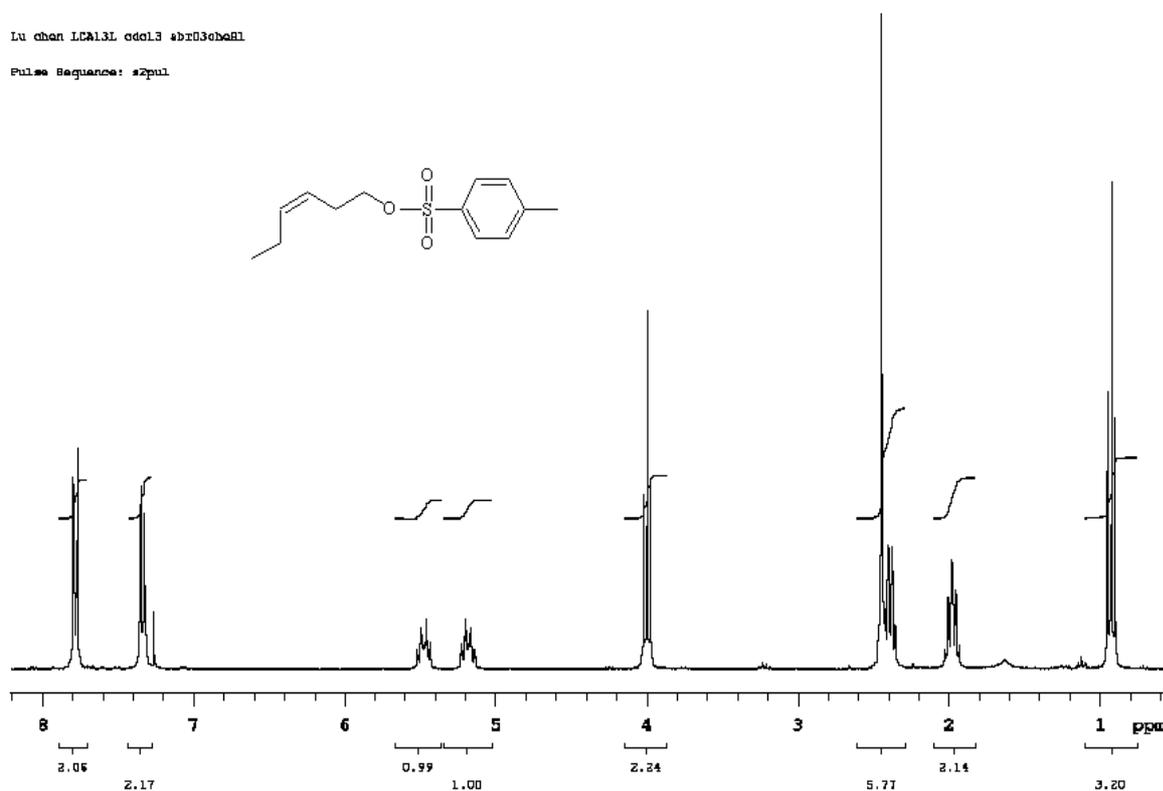
E 3 – Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (75,45 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de 4-toluenossulfonato de 3-butenila **3.1**.



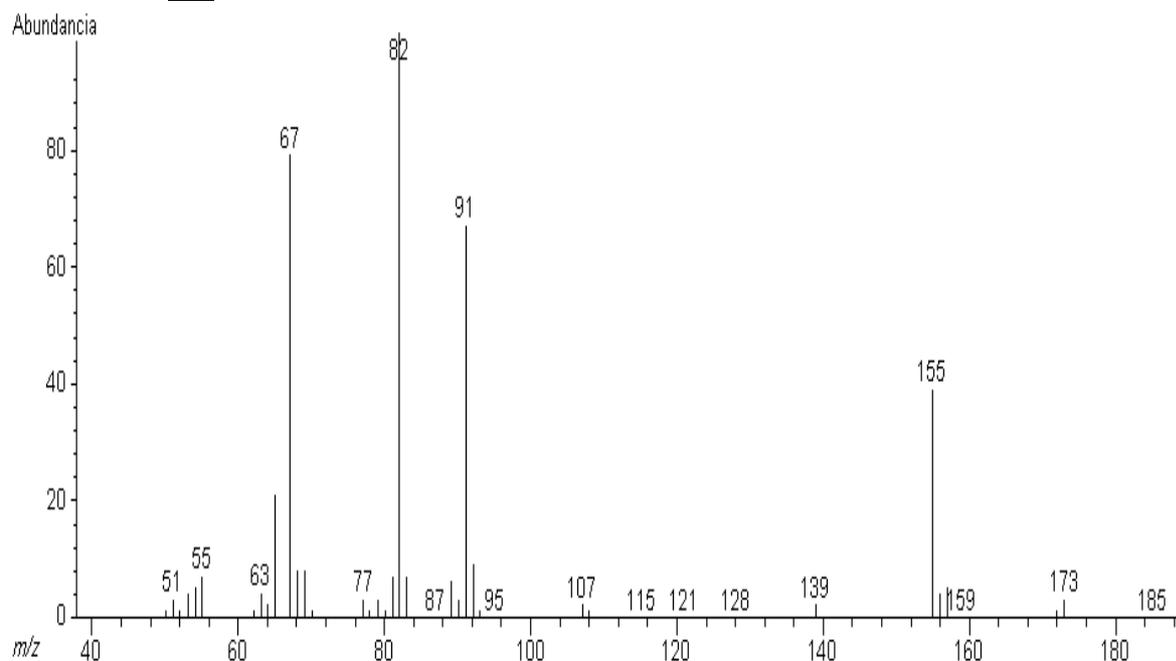
E 4 – Espectro DEPT 90 e 135° (75,45 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de 4-toluenossulfonato de 3-butenila **3.1**.

Lu chen LC413L cd013 #br030c01

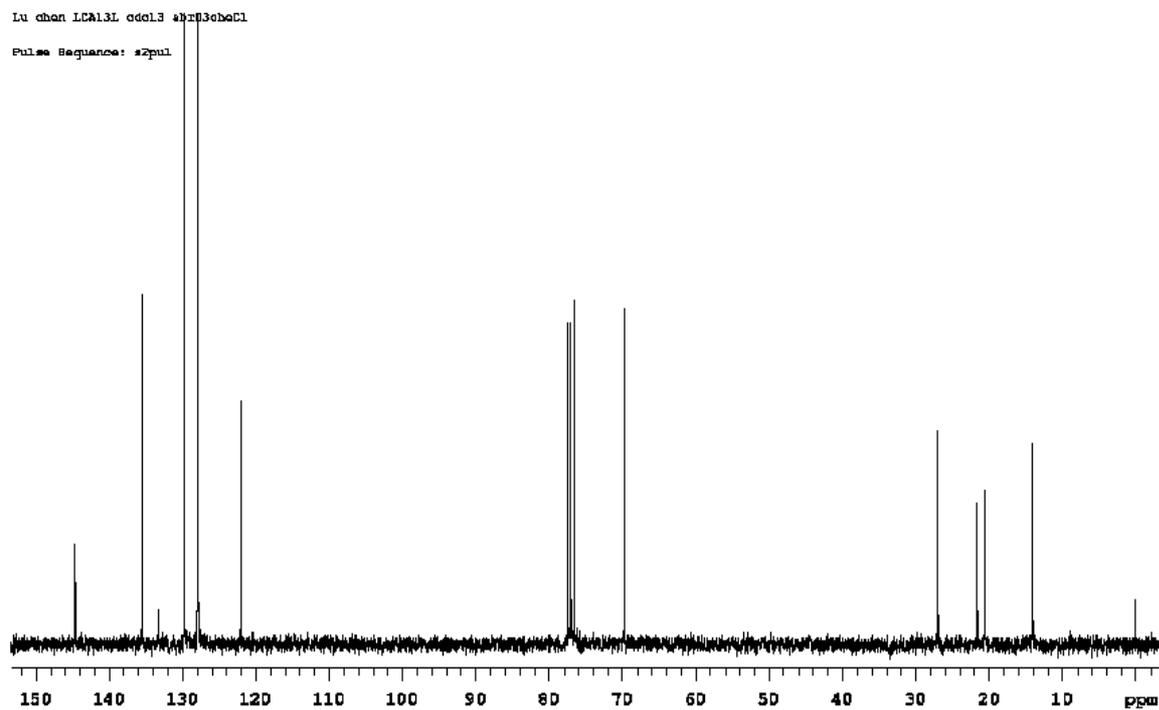
Pulse Sequence: szpu1



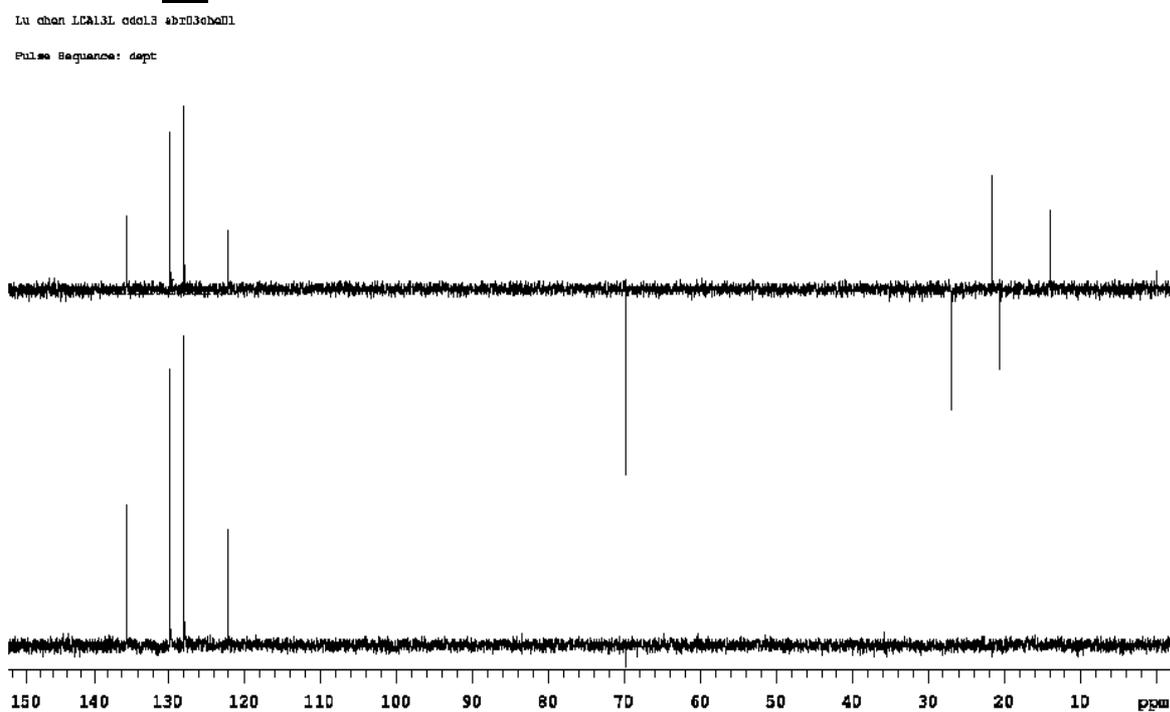
**E 5** – Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (300,07 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de 4-toluenossulfonato de 3-hexenila **3.2**.



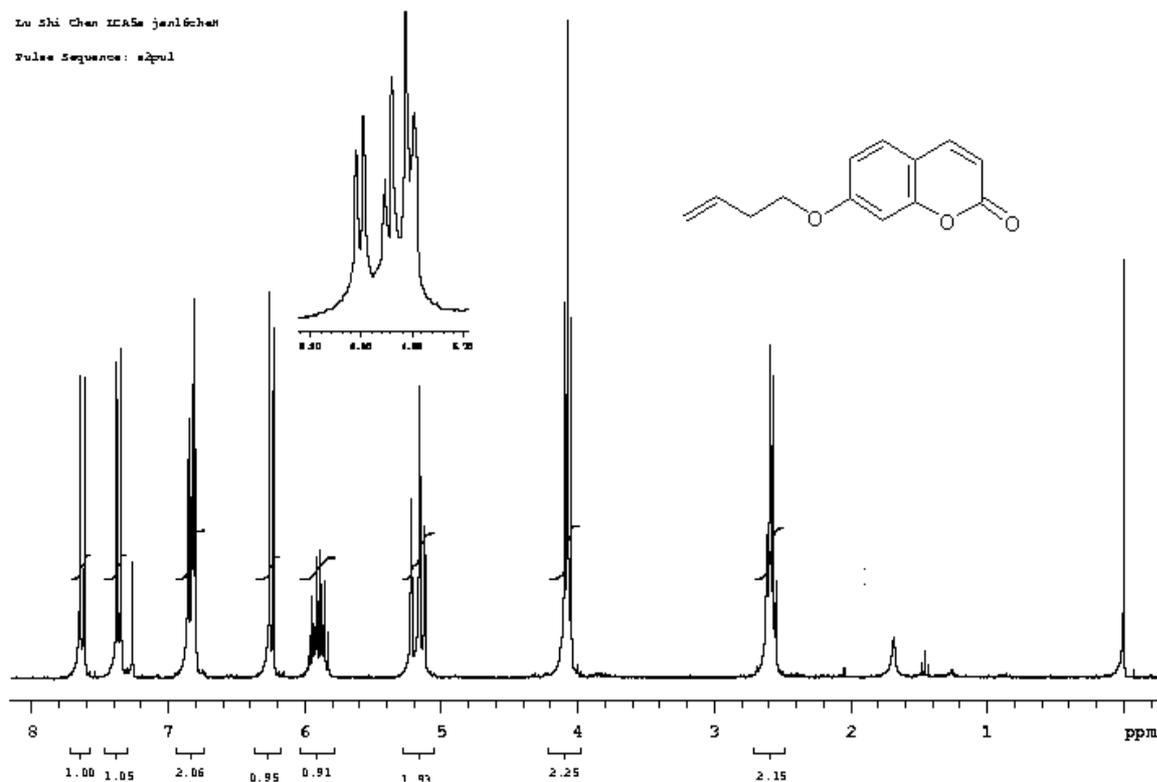
**E 6** – Espectro de massas (IE, 70 eV) de 4-toluenossulfonato de 3-hexenila **3.2**.



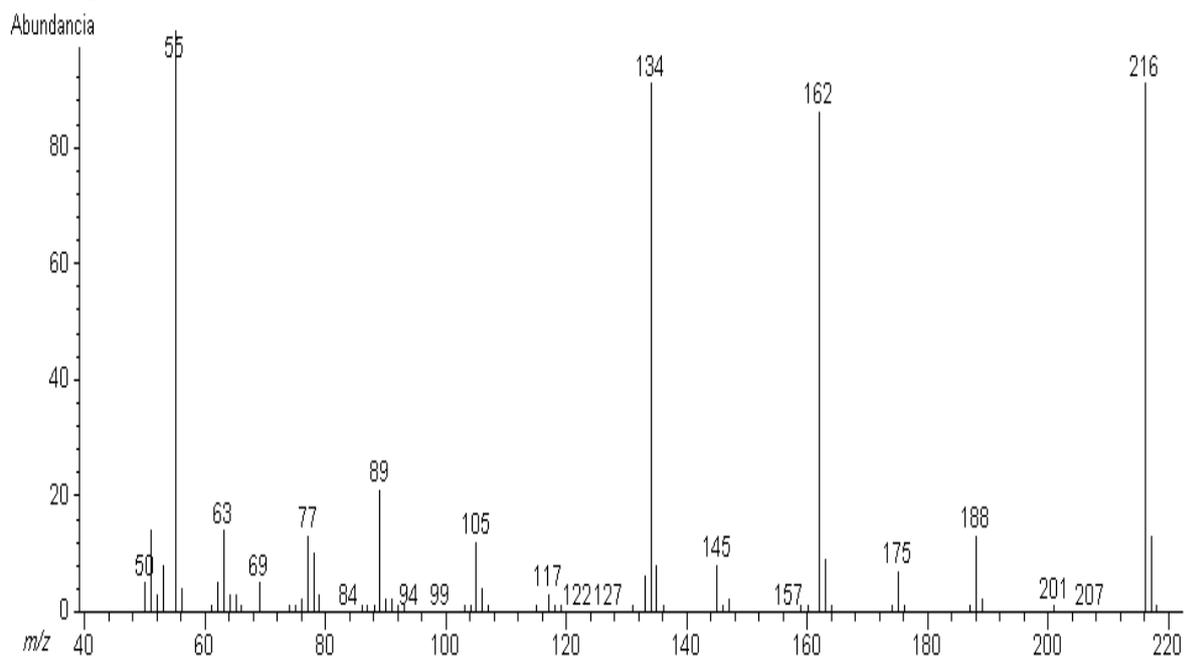
E 7 – Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (75,45 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de 4-toluenosulfonato de 3-hexenila 3.2.



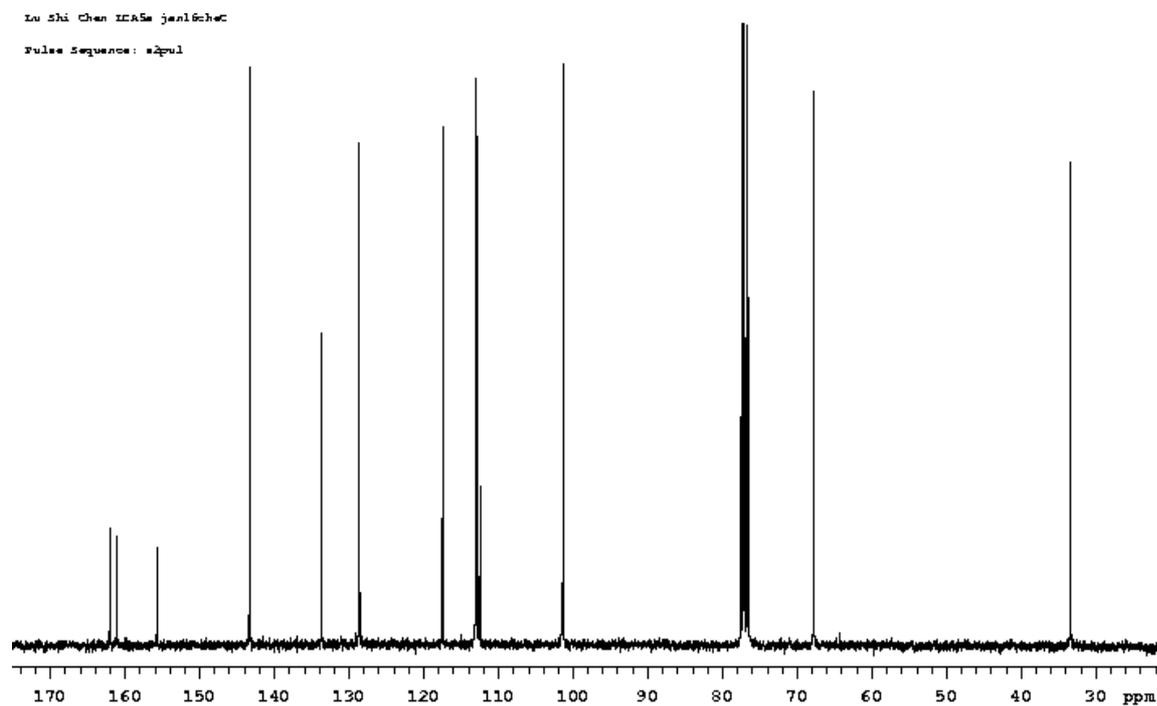
E 8 – Espectro DEPT 90 e  $135^\circ$  (75,45 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de 4-toluenosulfonato de 3-hexenila 3.2.



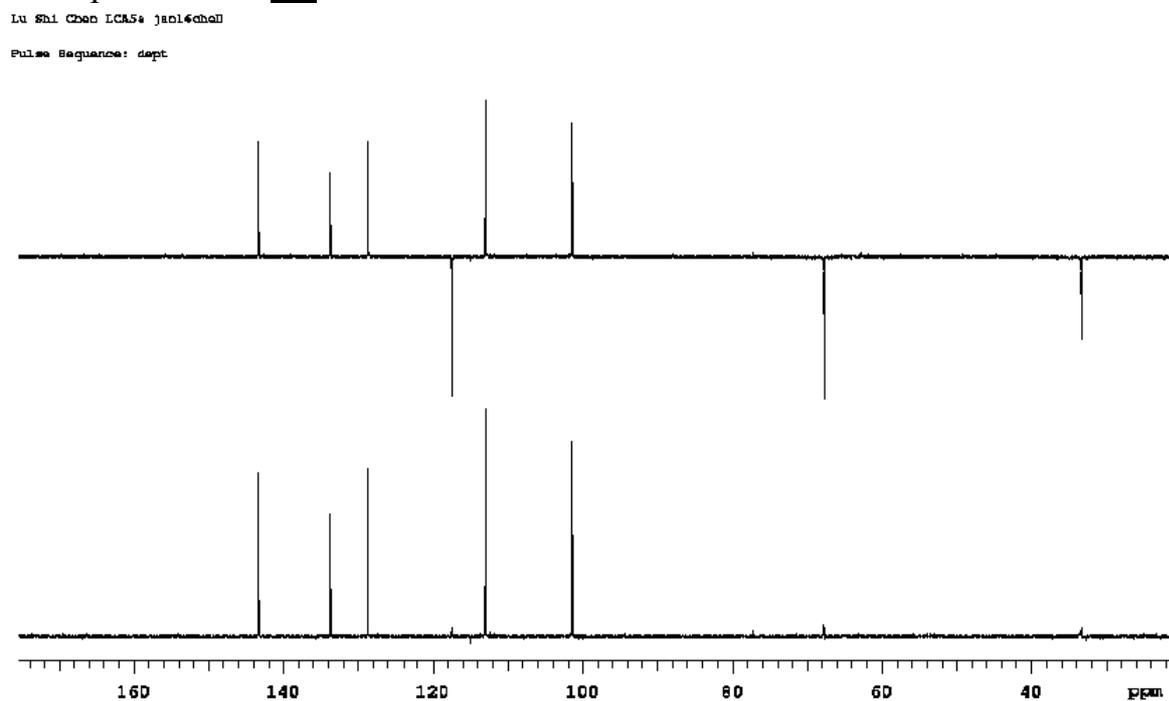
**E 9** – Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (300,07 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de 7-(3-butenóxi)-2H-1-benzopiran-2-ona **3.3**.



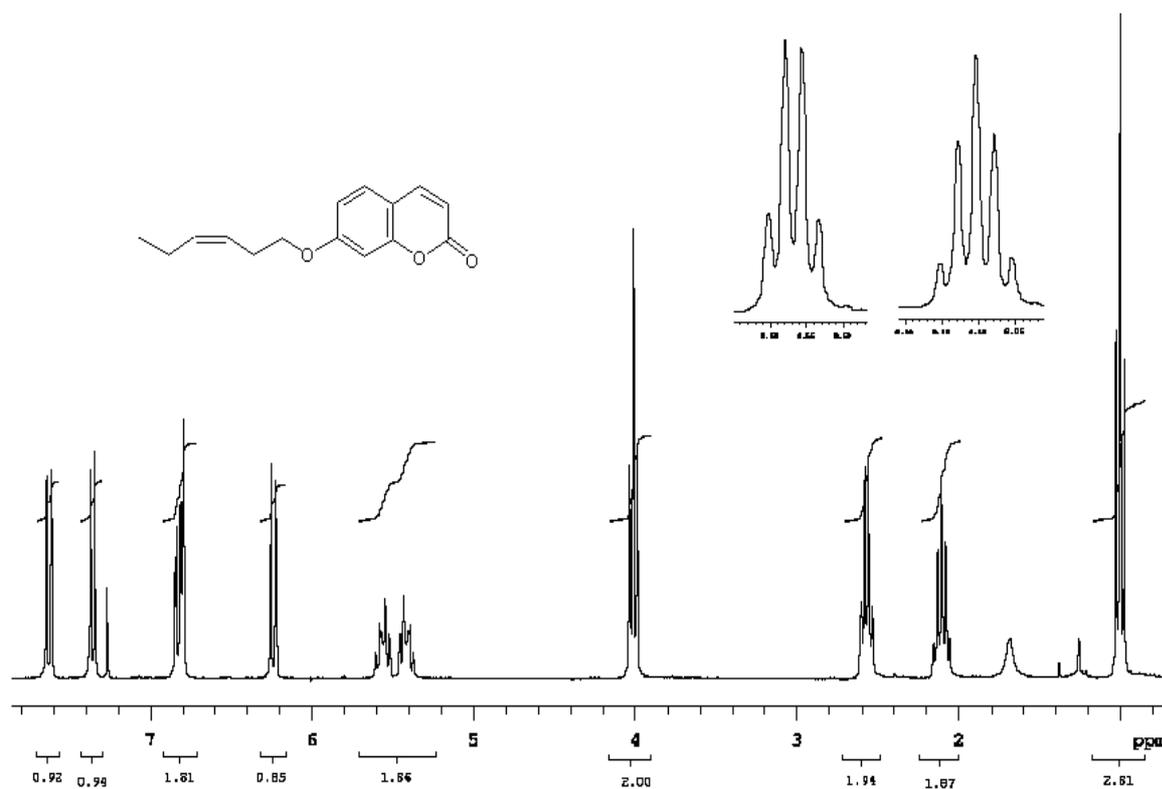
**E 10** – Espectro de masses (IE, 70 eV) de 7-(3-butenóxi)-2H-1-benzopiran-2-ona **3.3**.



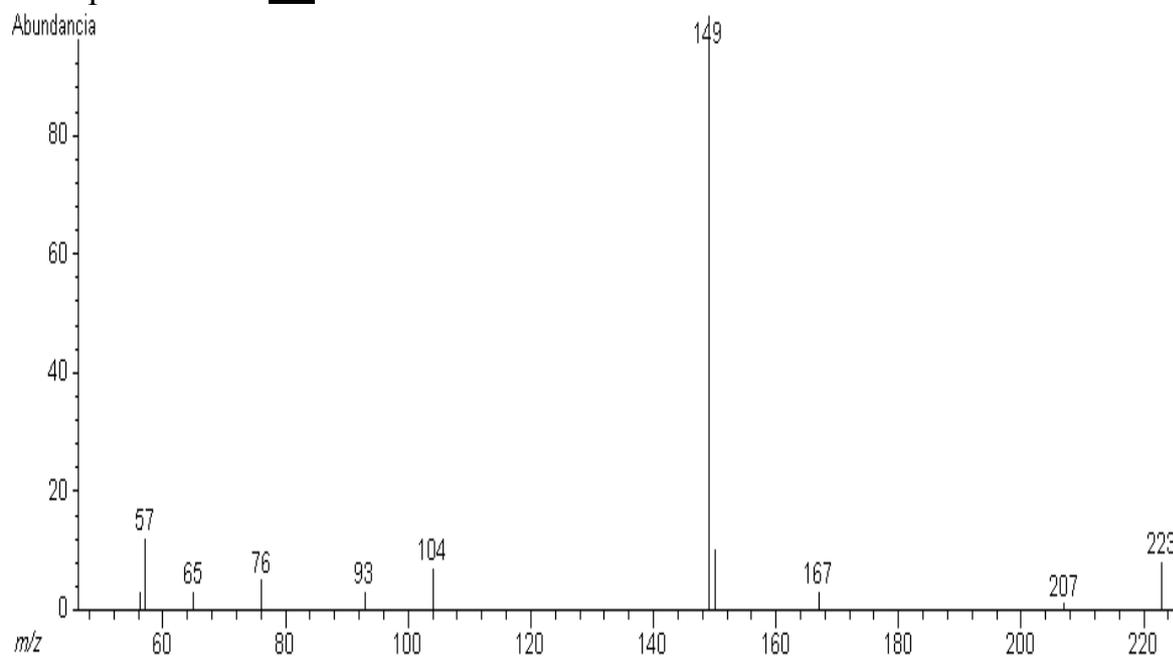
E 11 – Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (75,45 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de 7-(3-butenóxi)-2H-1-benzopiran-2-ona 3.3.



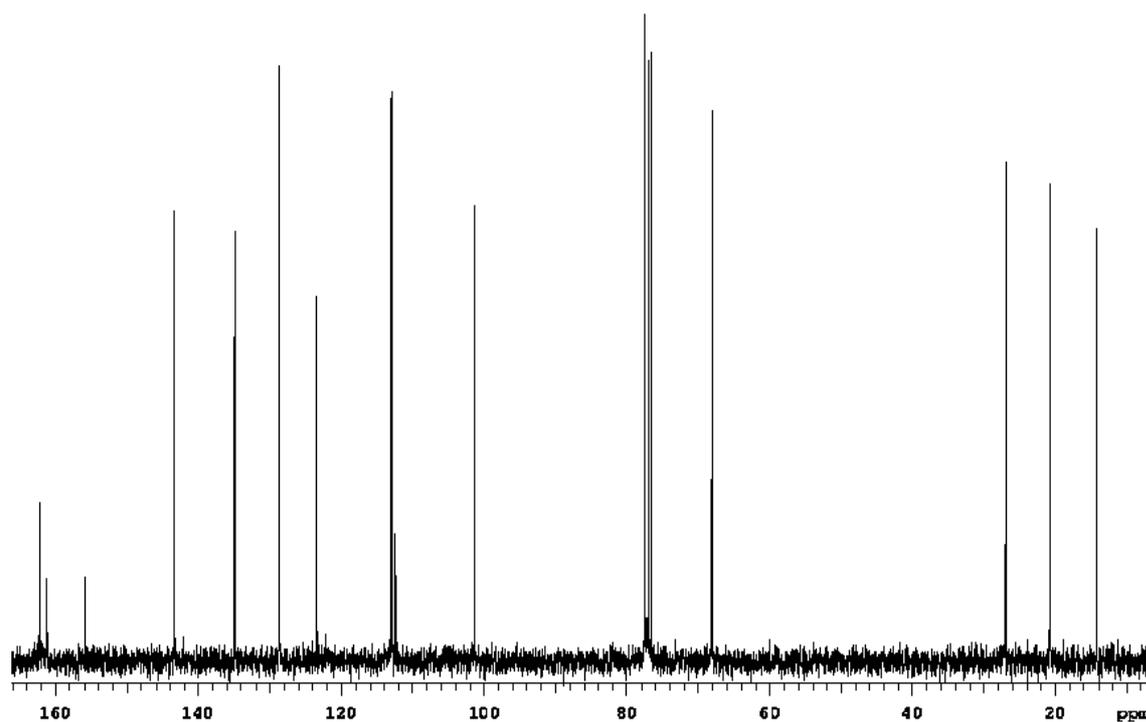
E 12 – Espectro DEPT 90 e  $135^\circ$  (75,45 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de 7-(3-butenóxi)-2H-1-benzopiran-2-ona 3.3.



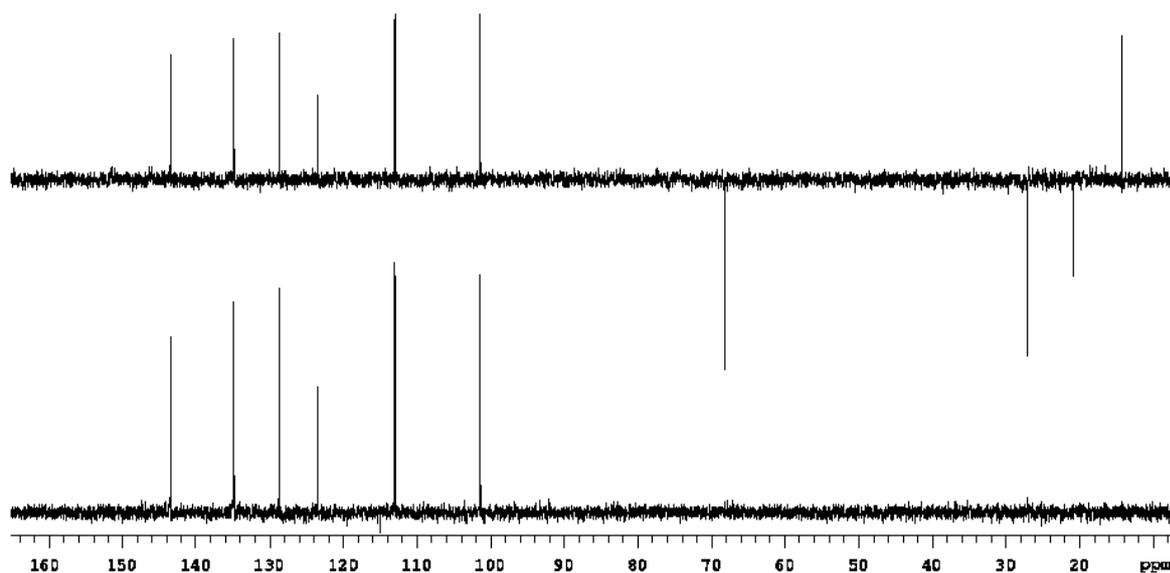
**E 13** – Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (300,07 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de 7-(3-hexenilóxi)-2H-1-benzopiran-2-ona **3.4**.



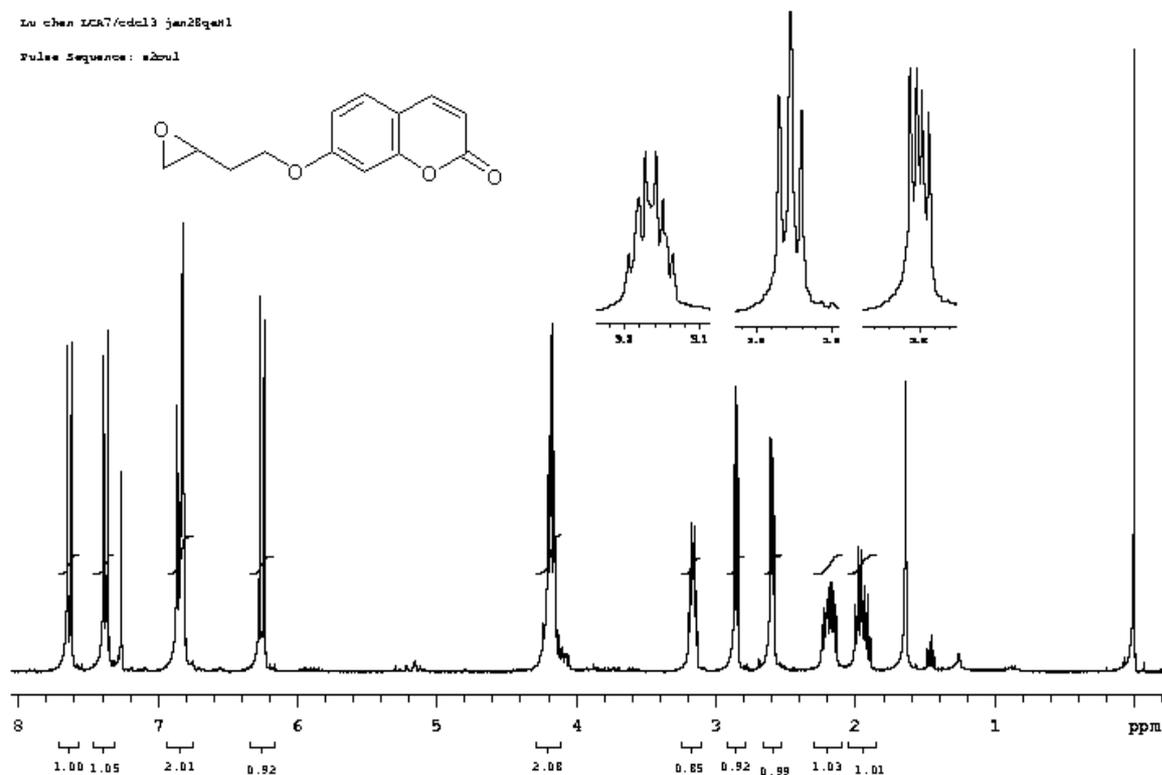
**E 14** – Espectro de massas (IE, 70 eV) de 7-(3-hexenilóxi)-2H-1-benzopiran-2-ona **3.4**.



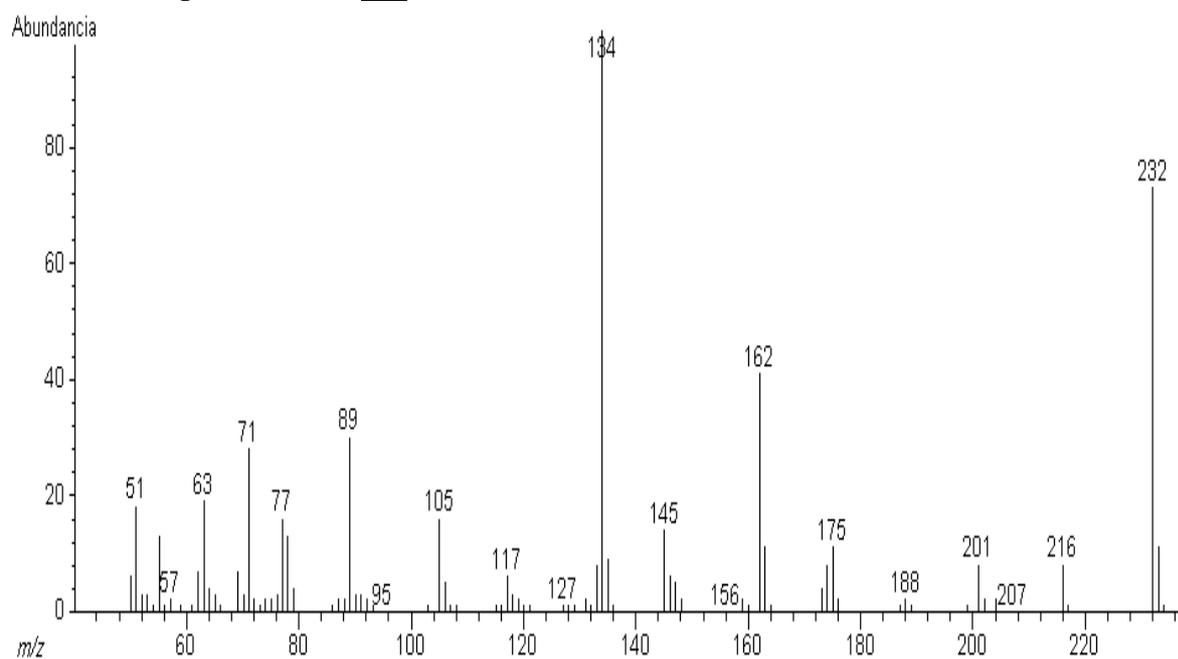
E 15 – Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (75,45 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de 7-(3-hexenilóxi)-2H-1-benzopiran-2-ona 3.4.



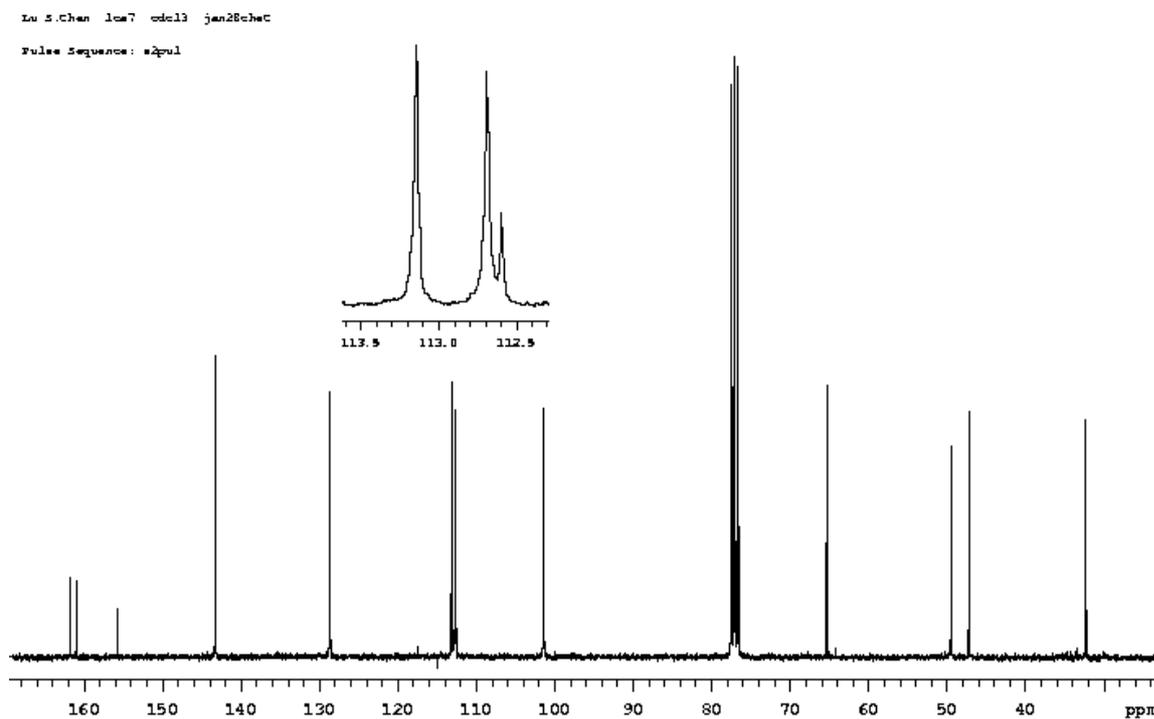
E 16 – Espectro DEPT 90 e 135° (75,45 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) do 7-(3-hexenilóxi)-2H-1-benzopiran-2-ona 3.4.



**E 17** – Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (300,07 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de 7-(3,4-epóxi-butóxi)-2H-1-benzopirán-2-ona **3.5**.

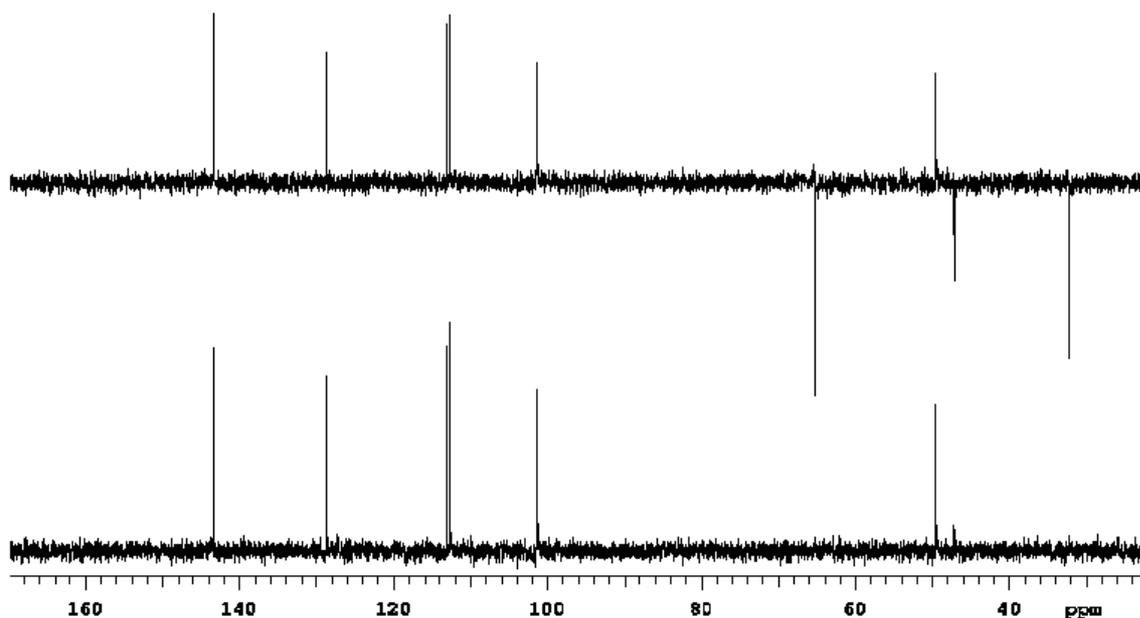


**E 18** – Espectro de massas (IE, 70 eV) de 7-(3,4-epóxi-butóxi)-2H-1-benzopirán-2-ona **3.5**.

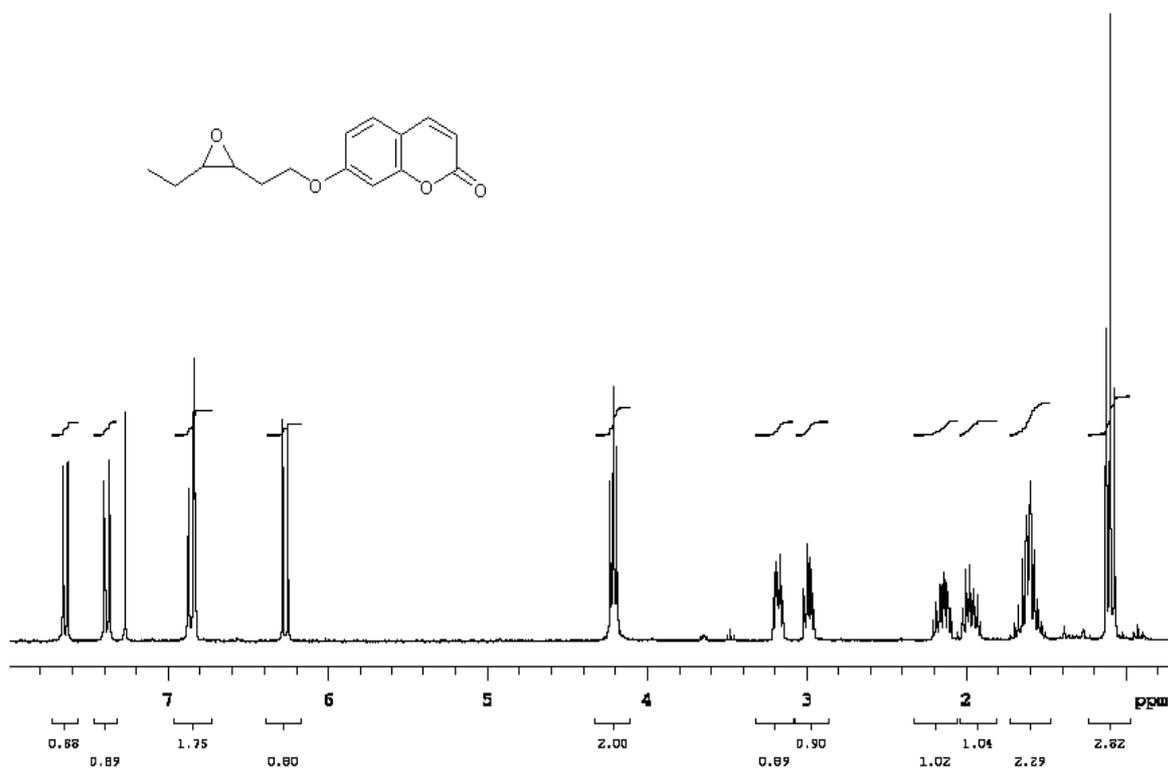


E 19 – Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (75,45 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de 7-(3,4-epóxi-butóxi)-2H-1-benzopirran-2-ona 3.5.

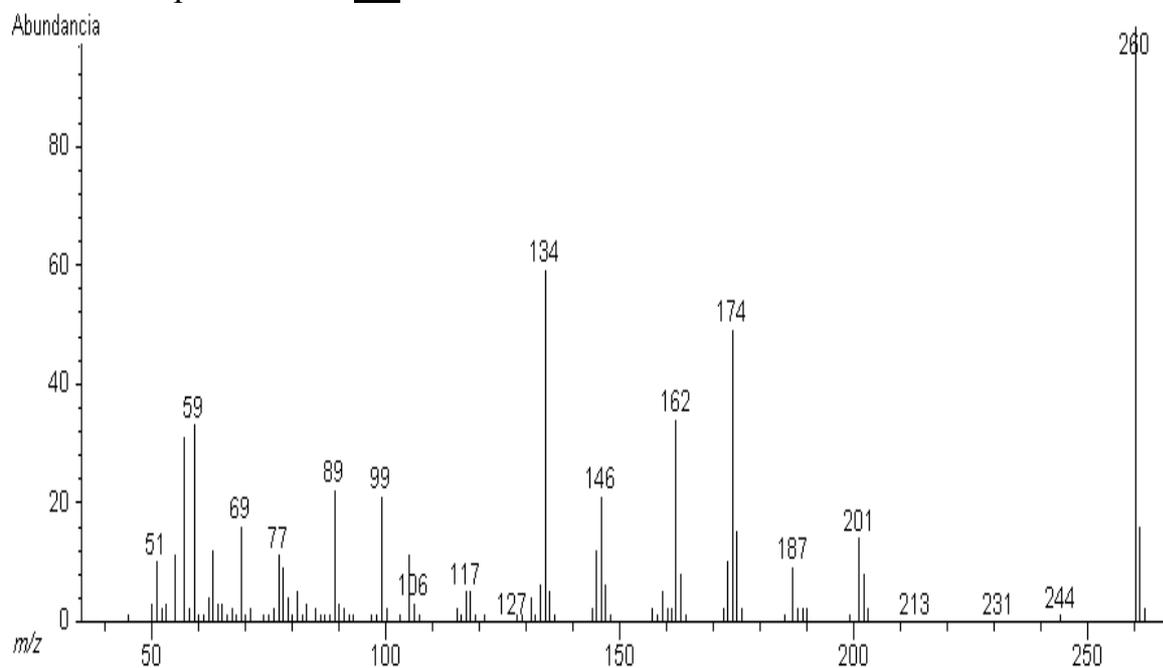
Lu Chen LCA7C/cdcl3 abzo8chaD  
Pulse Sequence: dept



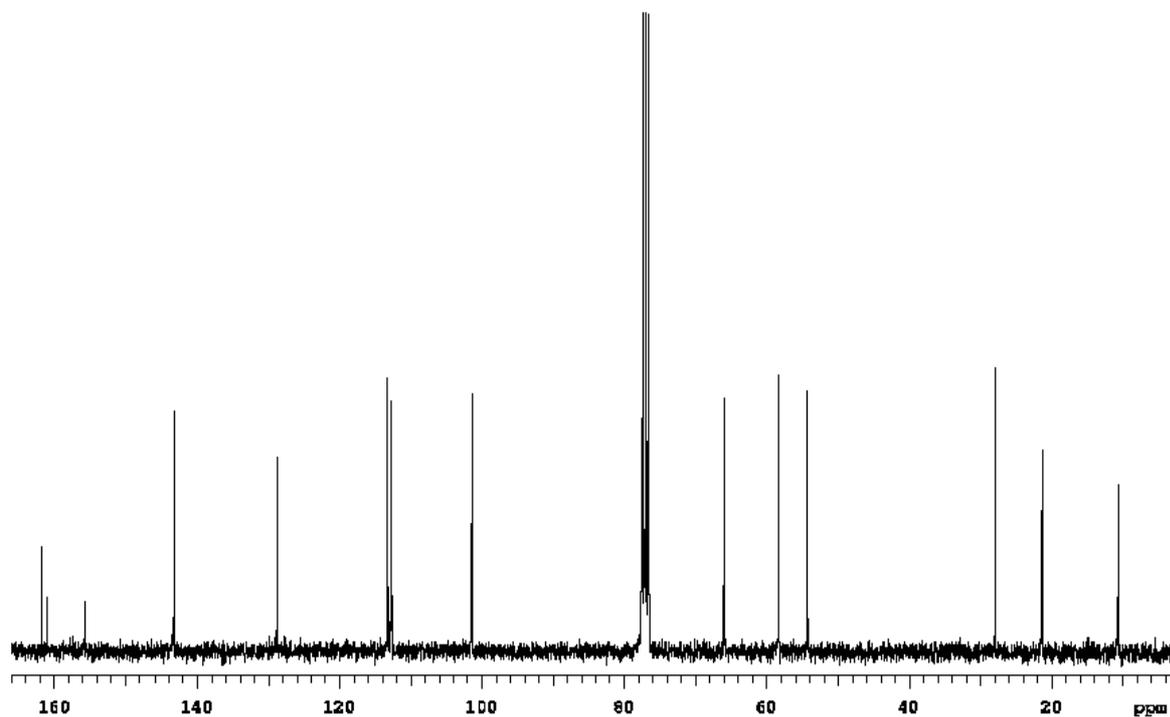
E 20 – Espectro DEPT 90 e  $135^\circ$  (75,45 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de 7-(3,4-epóxi-butóxi)-2H-1-benzopirran-2-ona 3.5.



**E 21** – Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (300,07 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de 7-(3,4-epóxi-hexilóxi)-2H-1-benzopirano-2-ona **3.6**.



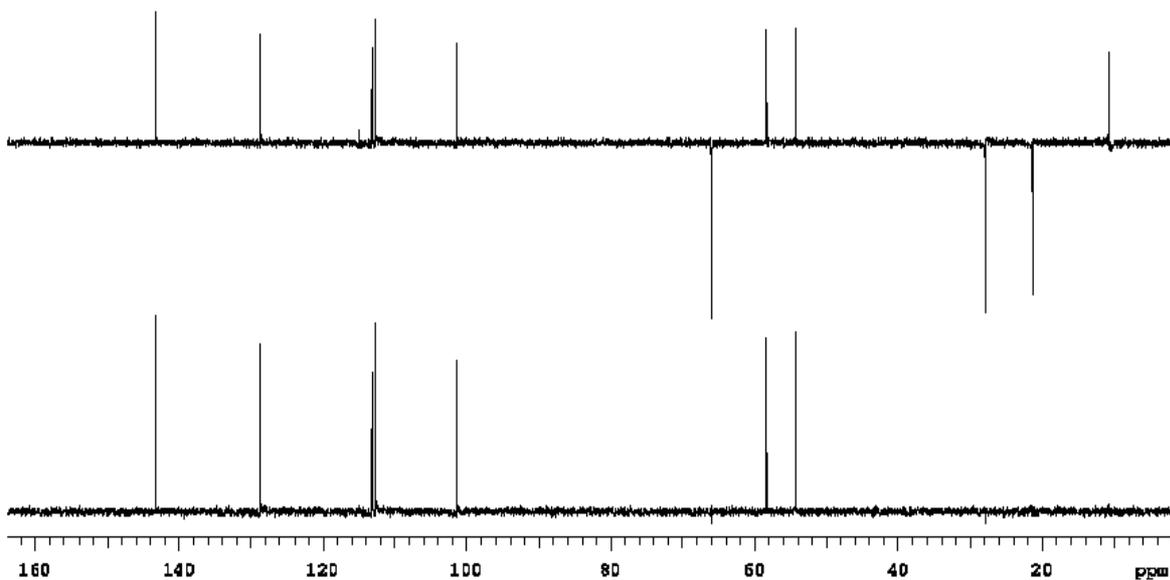
**E 22** – Espectro de massas (IE, 70 eV) de 7-(3,4-epóxi-hexilóxi)-2H-1-benzopirano-2-ona **3.6**.



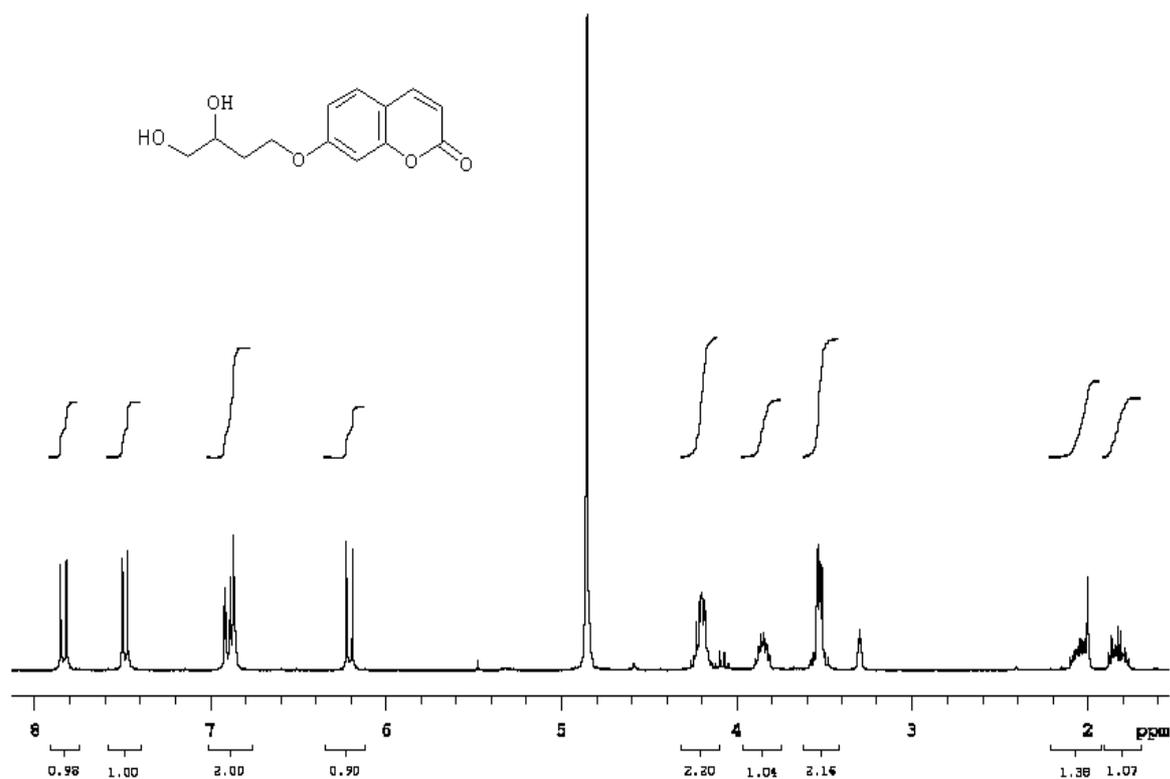
E 23 – Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (75,45 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de 7-(3,4-epóxi-hexilóxi)-2H-1-benzopirran-2-ona 3.6.

Lu Chen "RP2" dd013/bh5old ab:280bd01

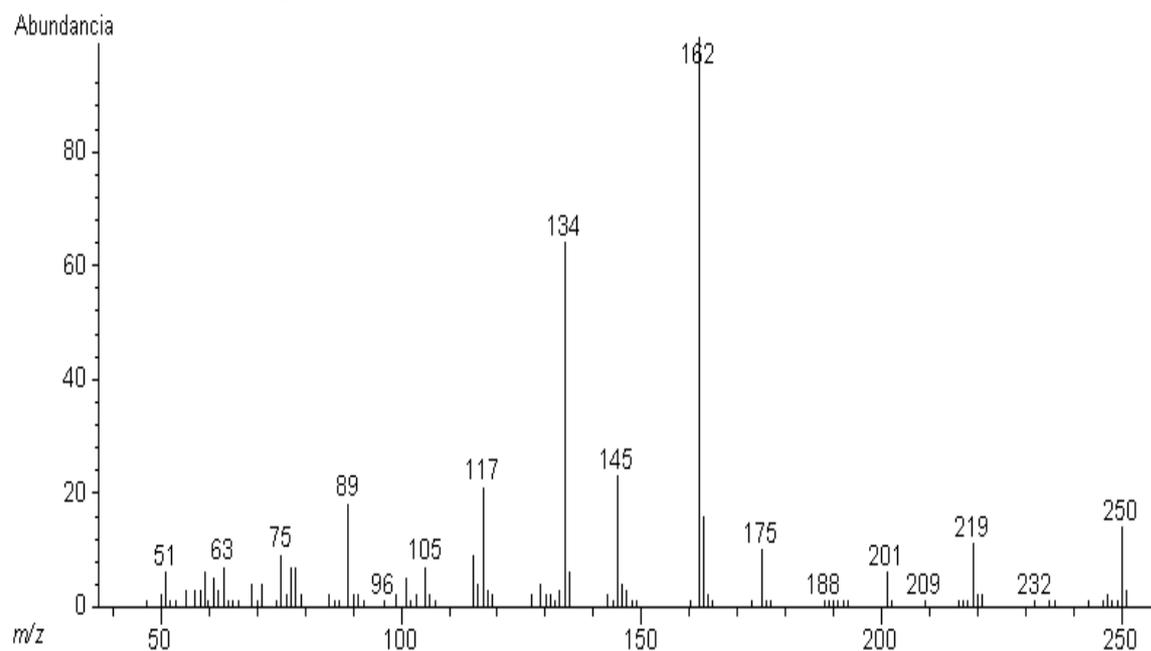
Pulse Sequence: dept



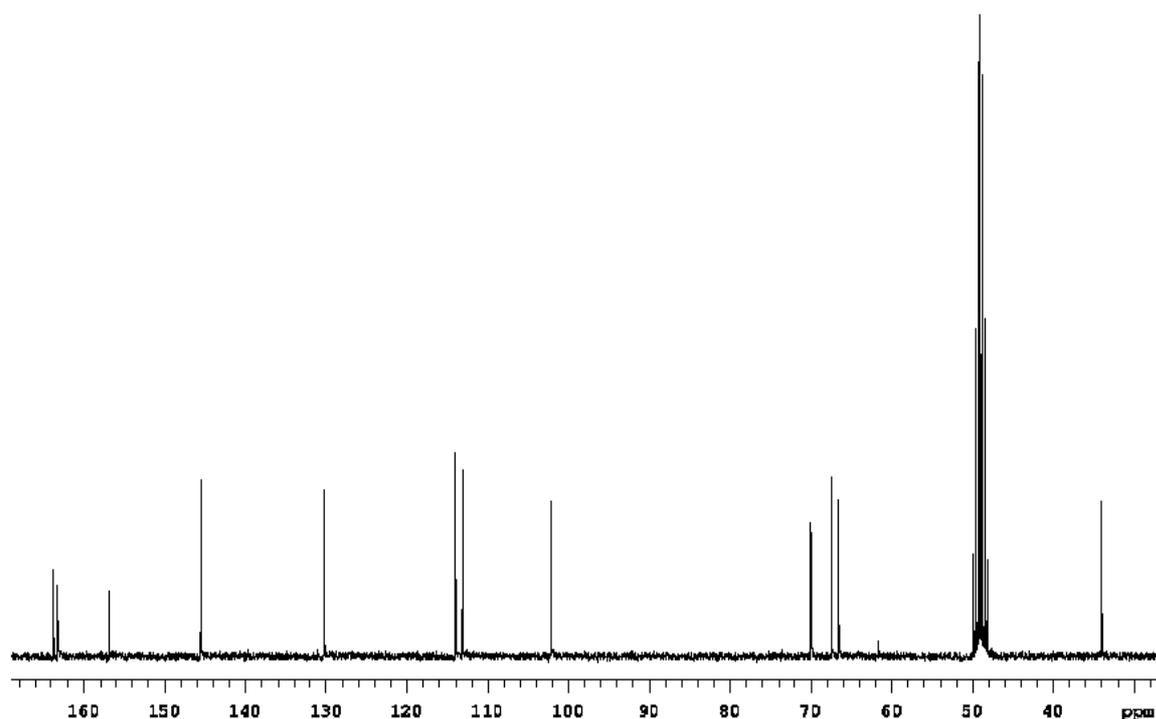
E 24 – Espectro DEPT 90 e  $135^\circ$  (75,45 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de 7-(3,4-epóxi-hexilóxi)-2H-1-benzopirran-2-ona 3.6.



**E 25** – Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (300,07 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) do 7-(3,4-di-hidróxi-butóxi)-2H-1-benzopirán-2-ona **3.7**.



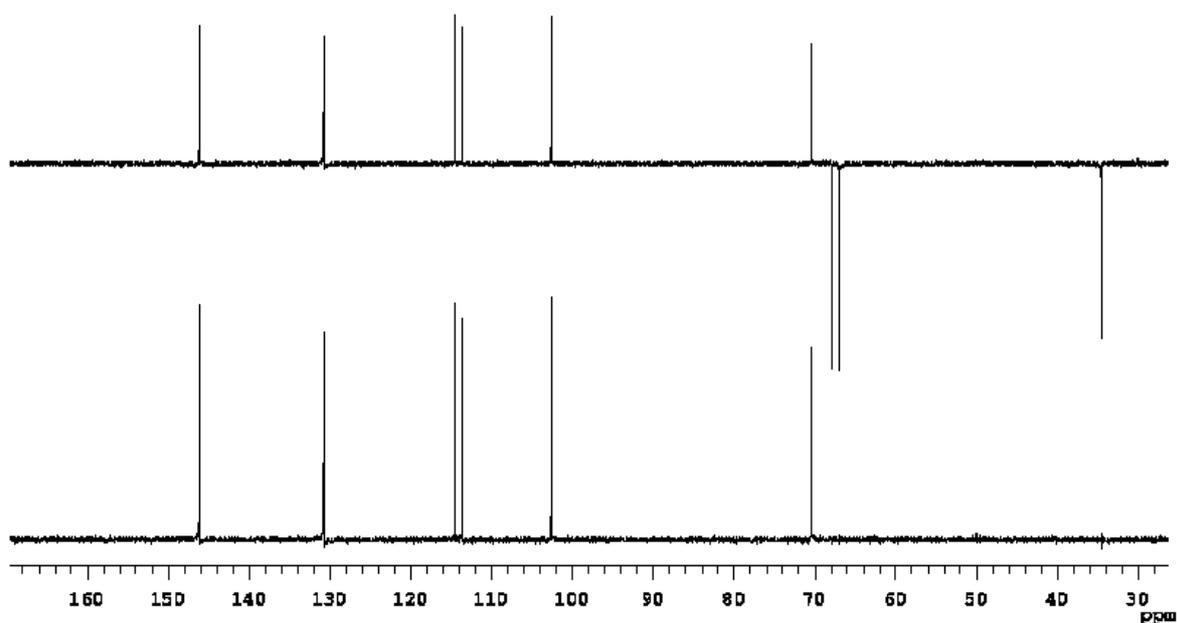
**E 26** – Espectro de massas (IE, 70 eV) de 7-(3,4-di-hidróxi-butóxi)-2H-1-benzopirán-2-ona **3.7**.



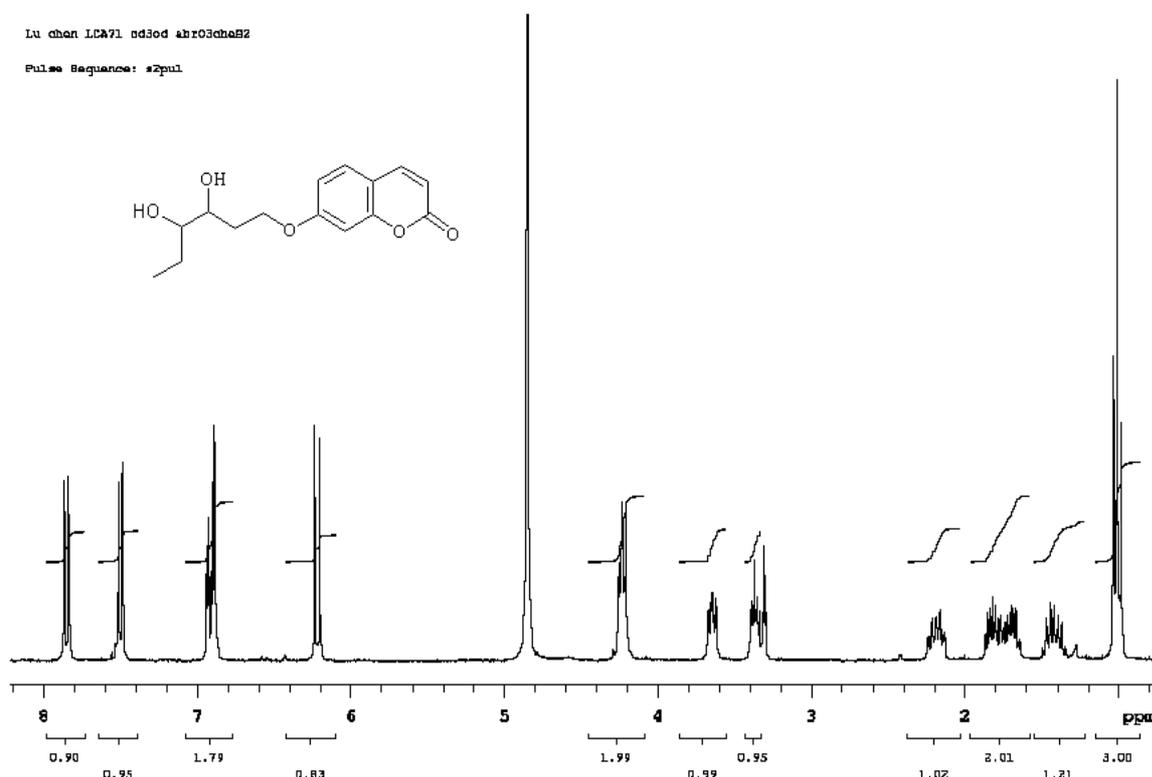
E 27 – Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (75,45 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) de 7-(3,4-di-hidróxi-butóxi)-2*H*-1-benzopiran-2-ona 3.7.

Lu Chen "Pop1" cd3od/bb501d shr28che02

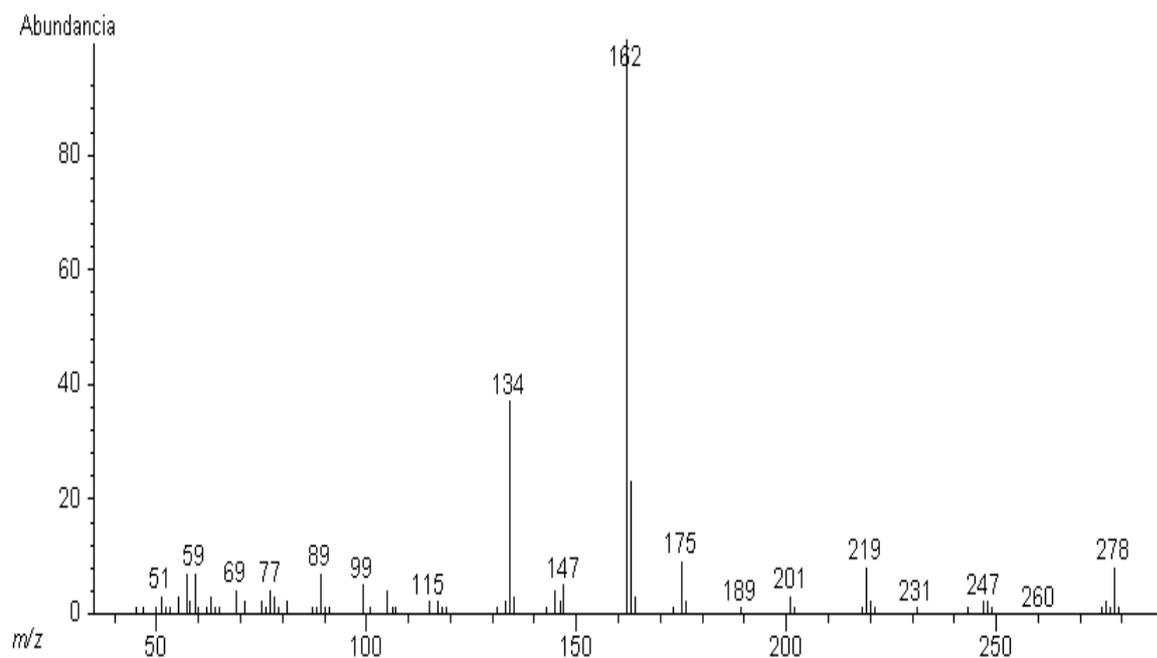
Pulse Sequence: dept



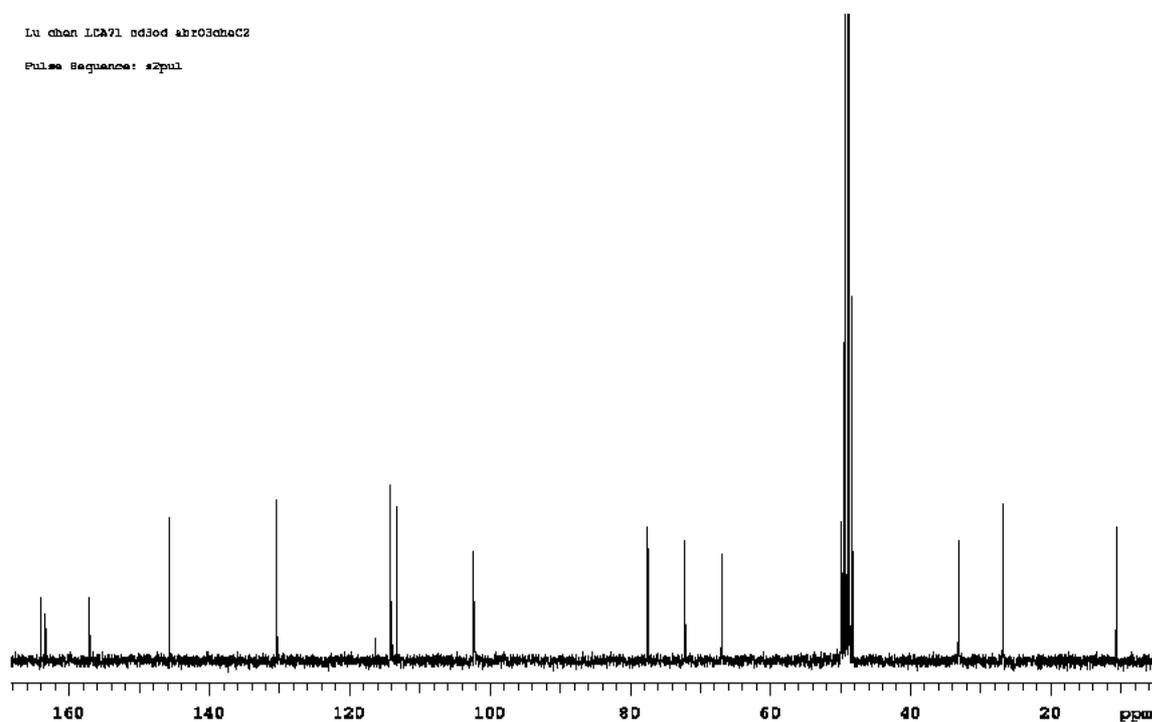
E 28 – Espectro DEPT 90 e 135° (75,45 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) do 7-(3,4-di-hidróxi-butóxi)-2*H*-1-benzopiran-2-ona 3.7.



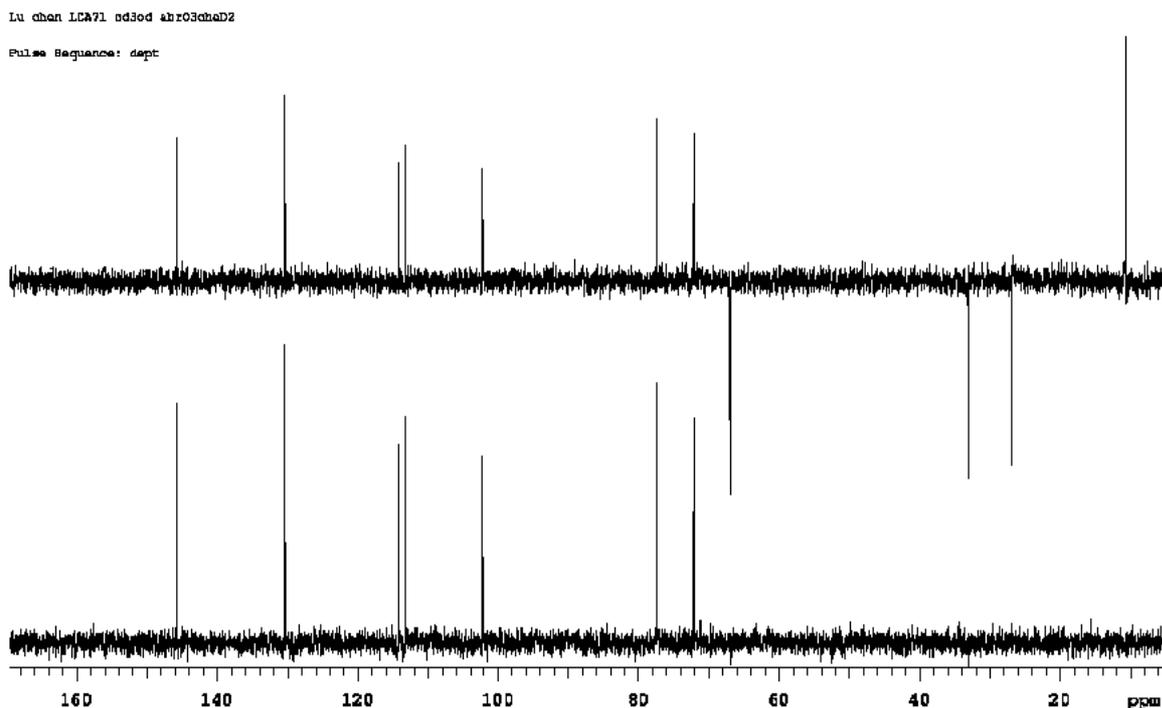
**E 29** – Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (300,07 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) de 7-(3,4-di-hidróxi-hexilóxi)-2H-1-benzopiran-2-ona **3.8**.



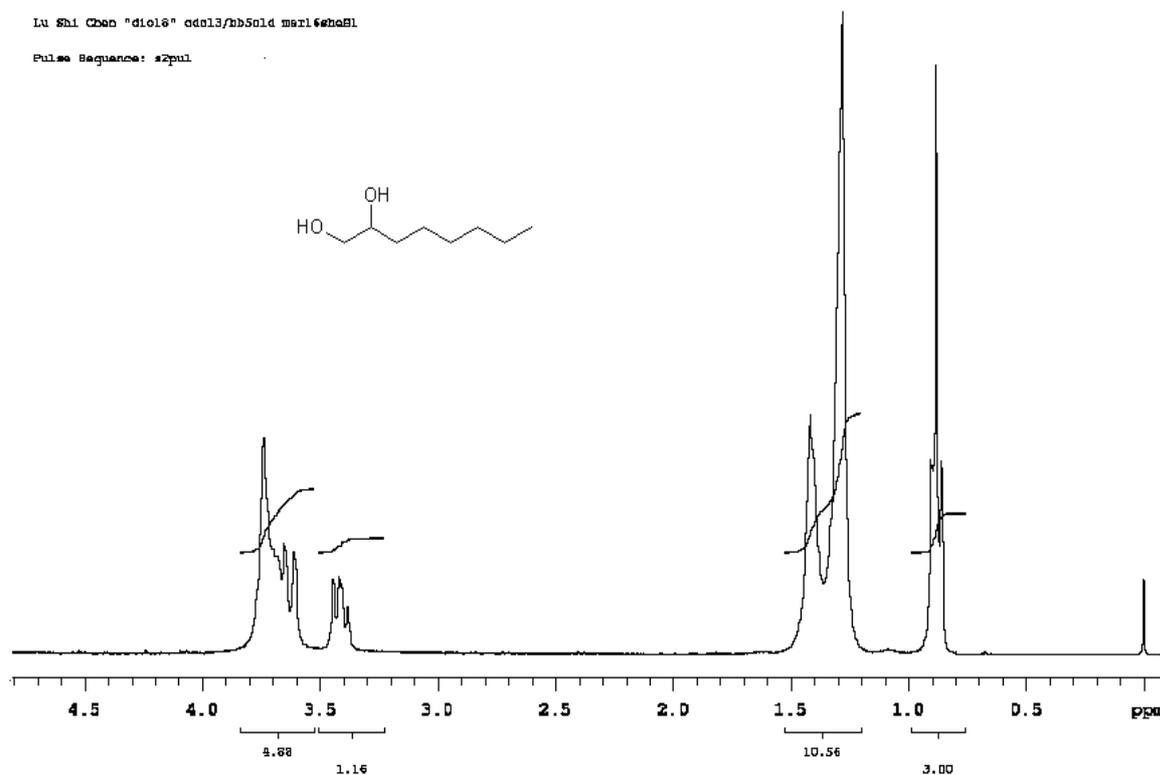
**E 30** – Espectro de massas (IE, 70 eV) de 7-(3,4-di-hidróxi-hexilóxi)-2H-1-benzopiran-2-ona **3.8**.



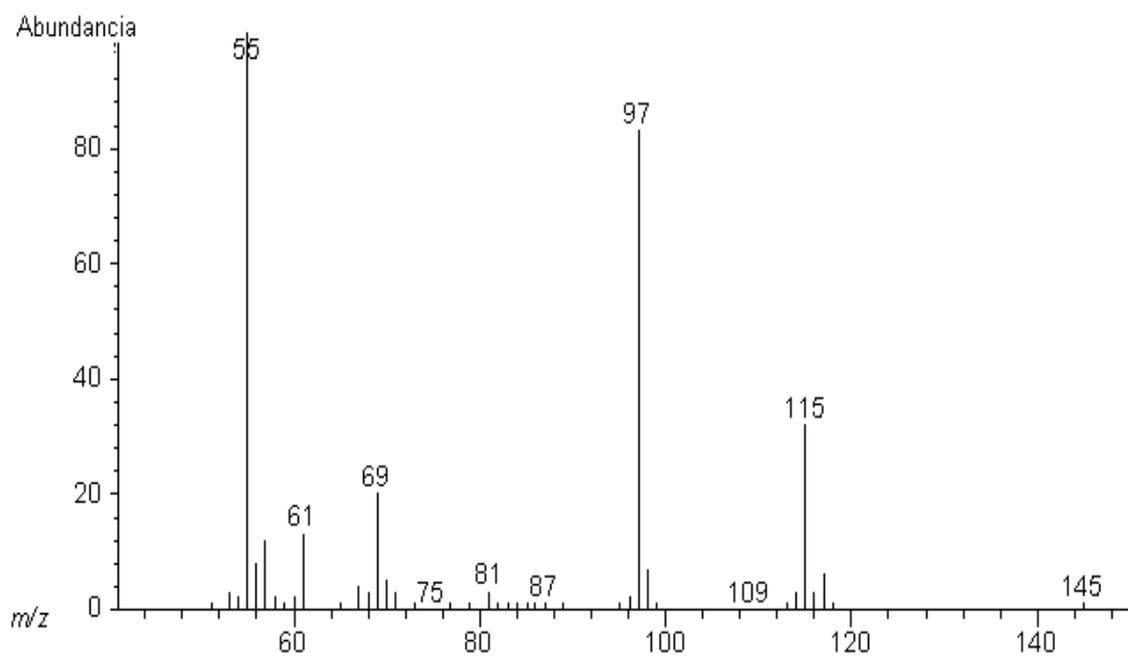
E 31 – Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (75,45 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) de 7-(3,4-di-hidróxi-hexilóxi)-2H-1-benzopiran-2-ona 3.8.



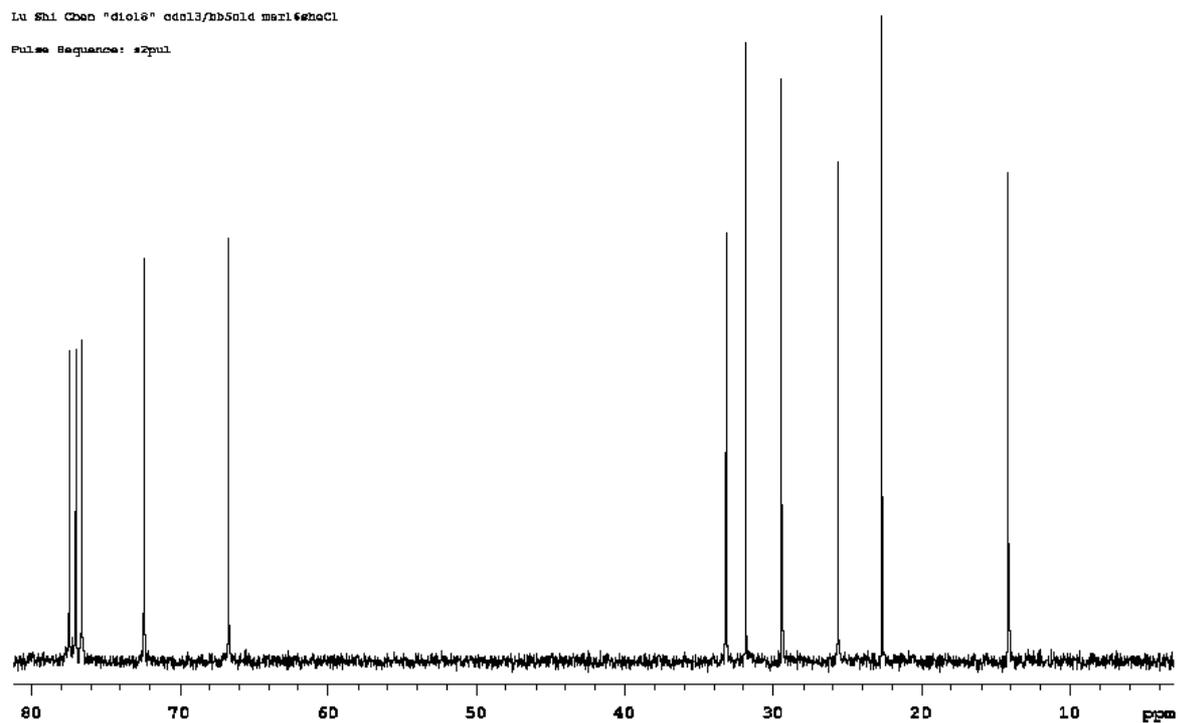
E 32 – Espectro DEPT 90 e  $135^\circ$  (75,45 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) de 7-(3,4-di-hidróxi-hexilóxi)-2H-1-benzopiran-2-ona 3.8.



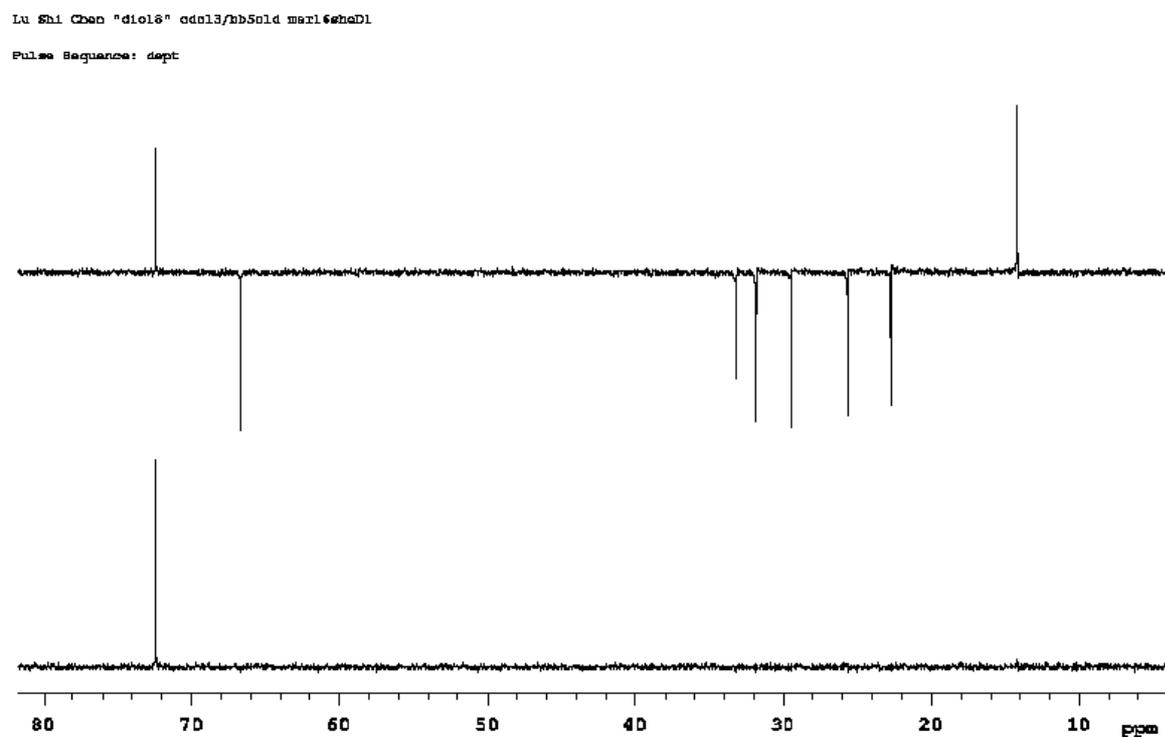
**E 33** – Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (300,07 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) do 1,2-octanodiol **3.24**.



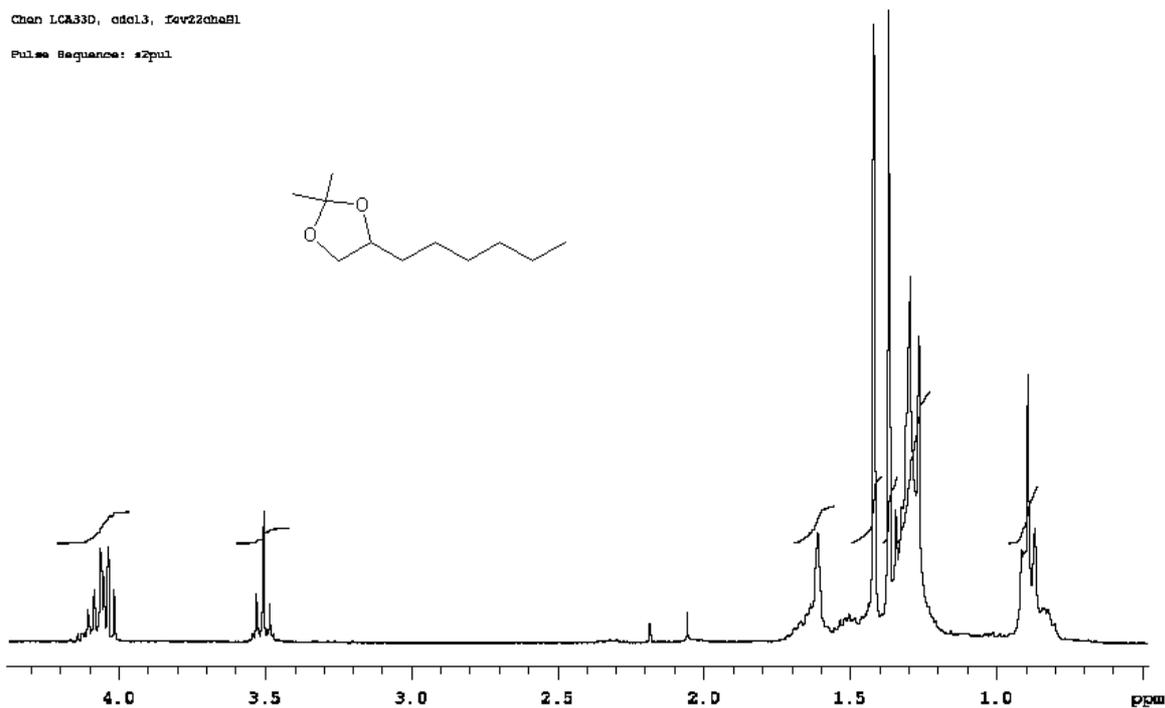
**E 34** – Espectro de massas (IE, 70 eV) do 1,2-octanodiol **3.24**.



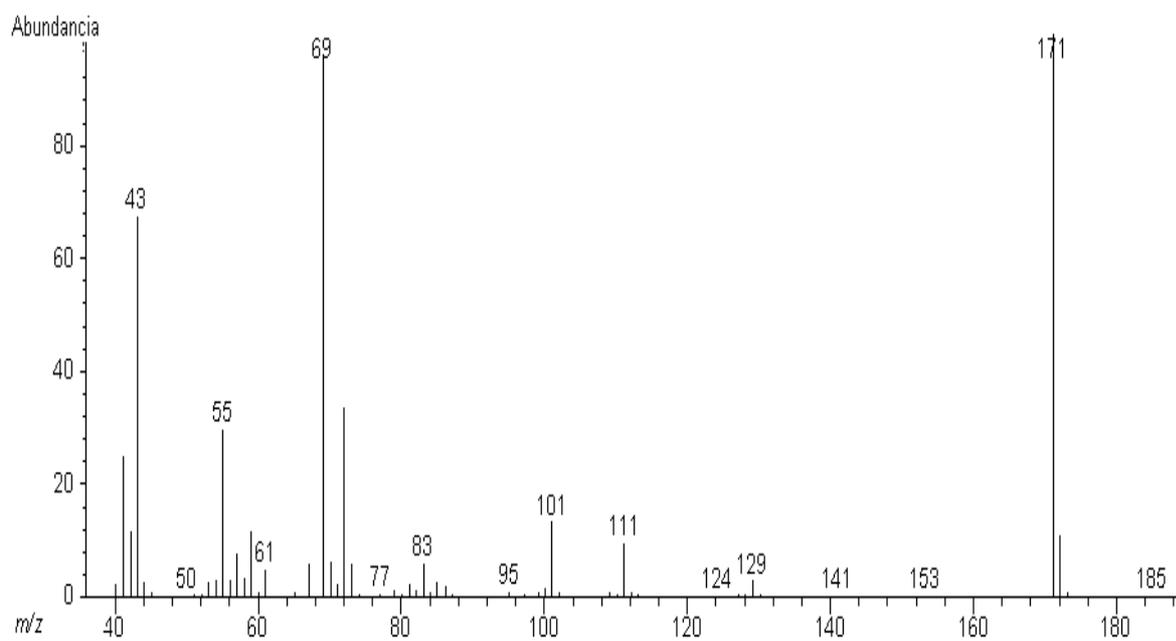
E 35 – Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (75,45 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) do 1,2-octanodiol 3.24.



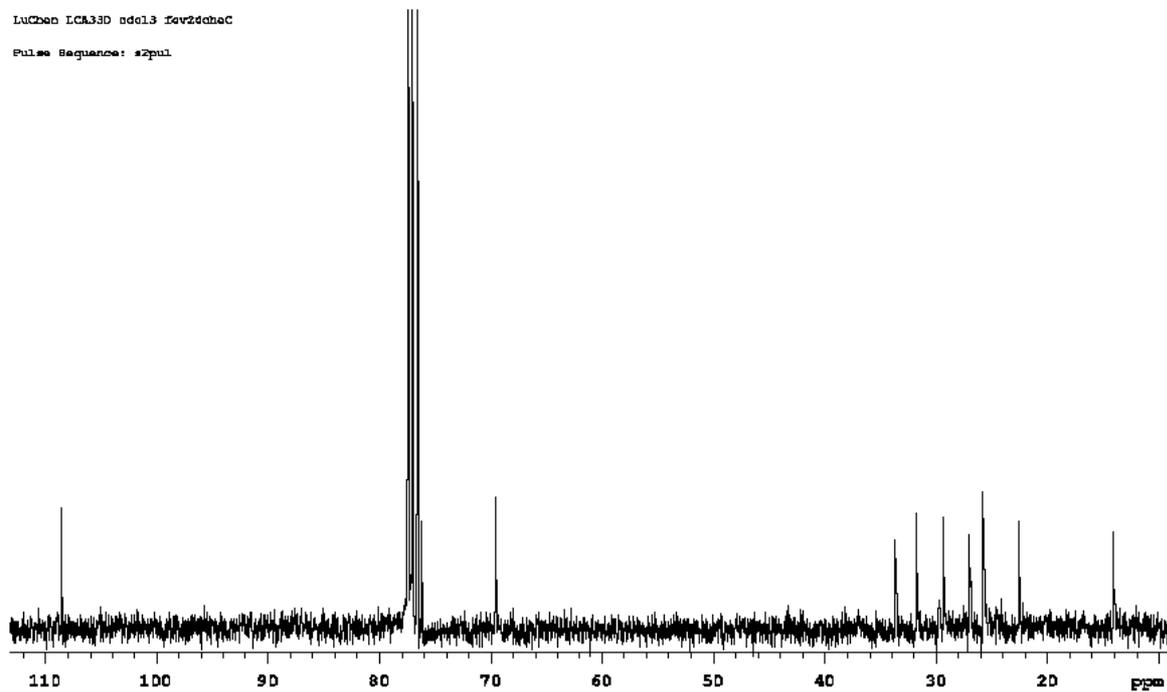
E 36 – Espectro DEPT 90 e  $135^\circ$  (75,45 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) do 1,2-octanodiol 3.24.



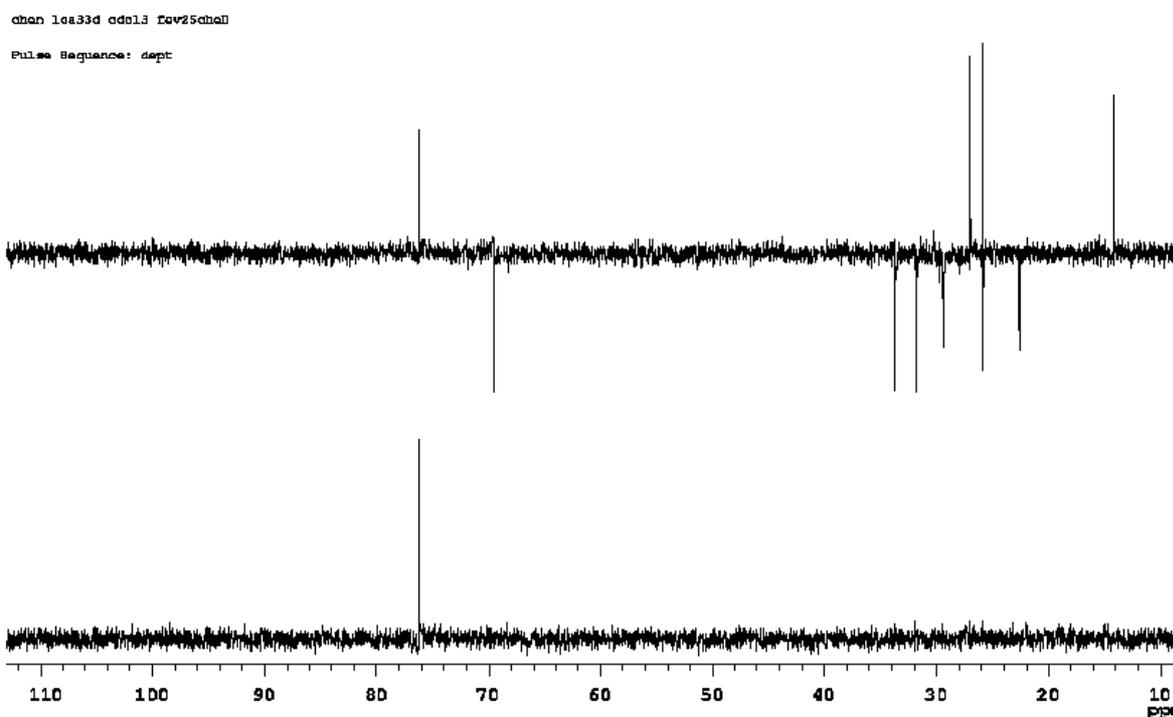
**E 37** – Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (300,07 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) do 4-hexil-2,2-dimetil-[1,3]dioxolano **3.25**.



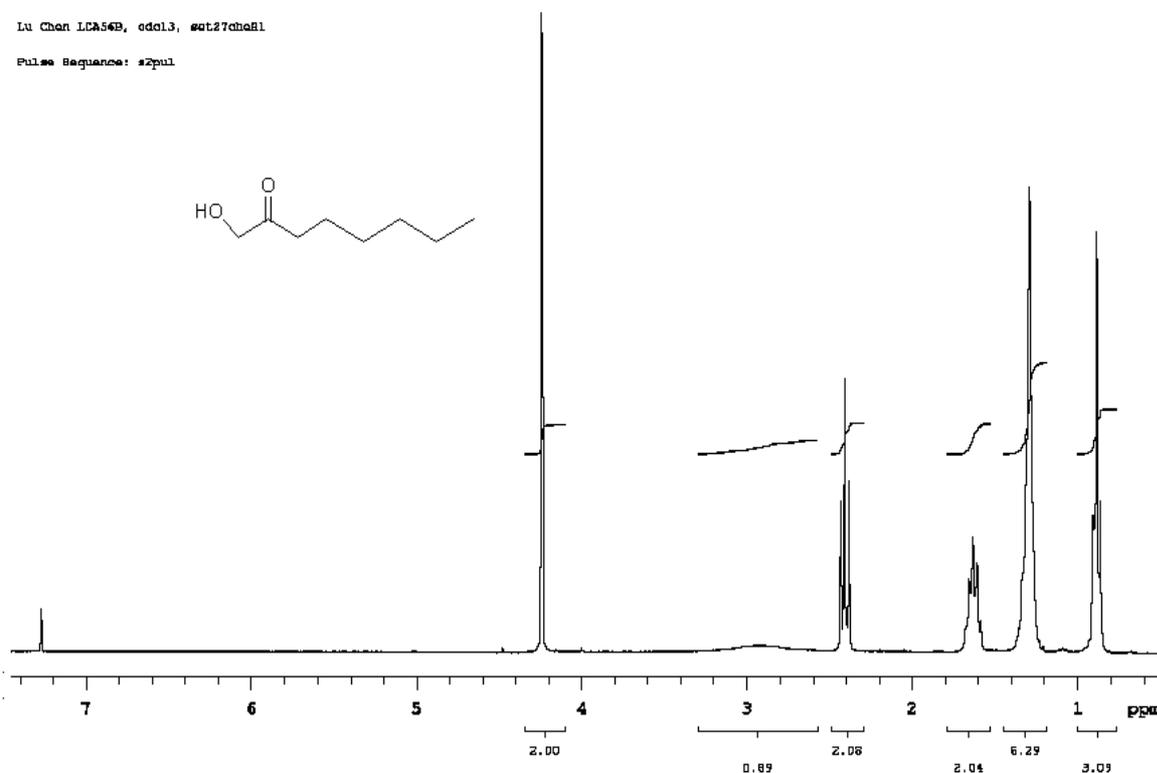
**E 38** – Espectro de massas (IE, 70 eV) do 4-hexil-2,2-dimetil-[1,3]dioxolano **3.25**.



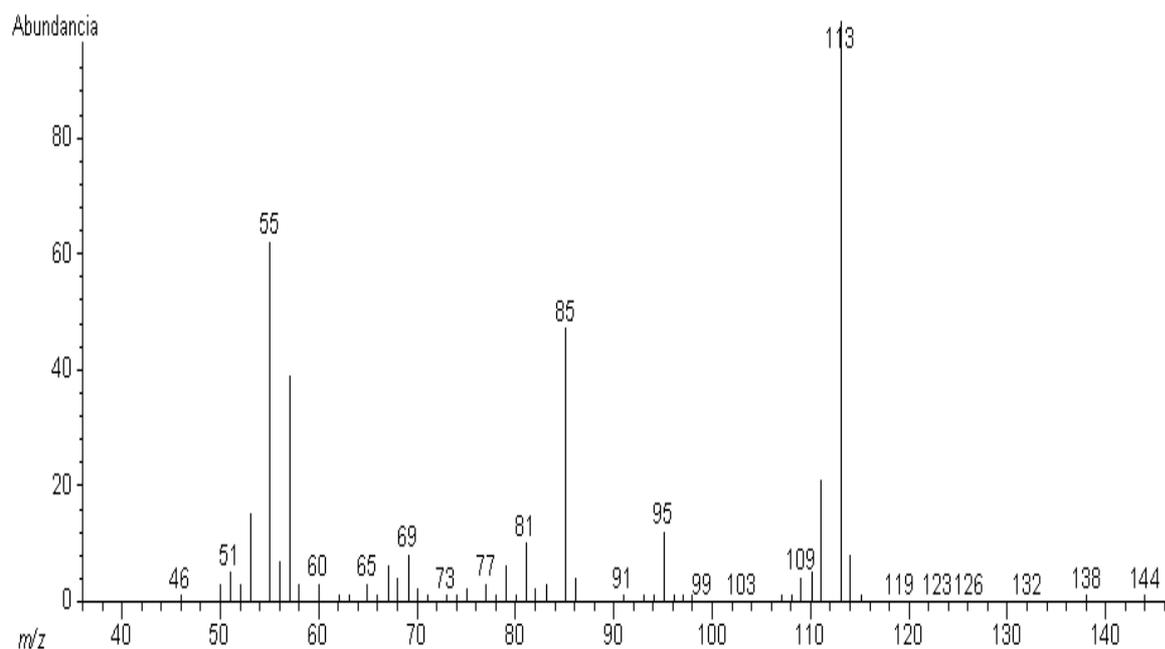
E 39 – Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (75,45 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) do 4-hexil-2,2-dimetil-[1,3]dioxolano 3.25.



E 40 – Espectro DEPT 90 e  $135^\circ$  (75,45 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) do 4-hexil-2,2-dimetil-[1,3]dioxolano 3.25.

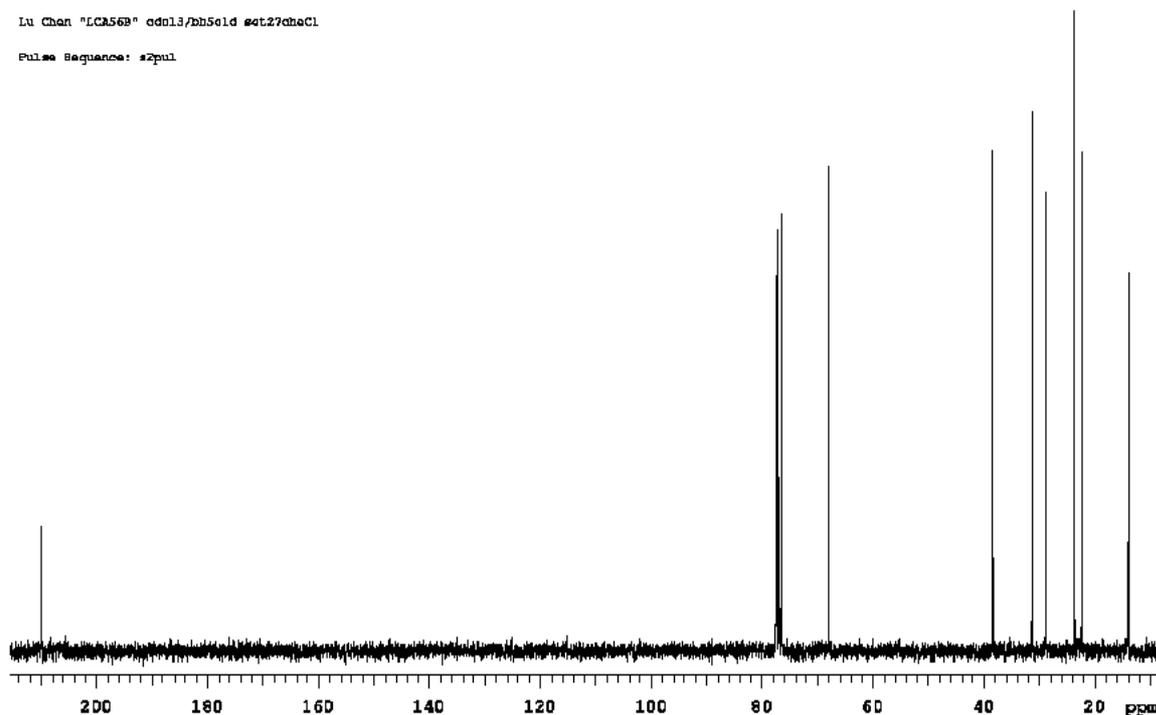


**E 41** – Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (300,07 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de 1-hidróxi-2-octanona **3.28**.



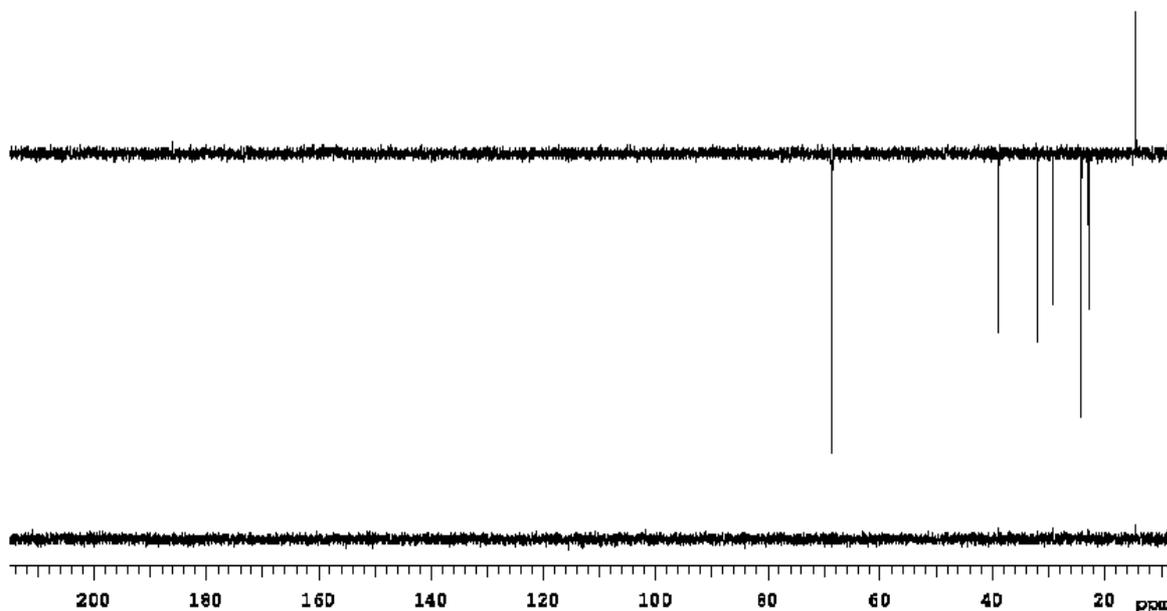
**E 42** – Espectro de massas (IE, 70 eV) de 1-hidróxi-2-octanona **3.28**.

Lu Chen "LC2563" cdn13/bh5e1d #et27cheCl  
Pulse Sequence: s2pul

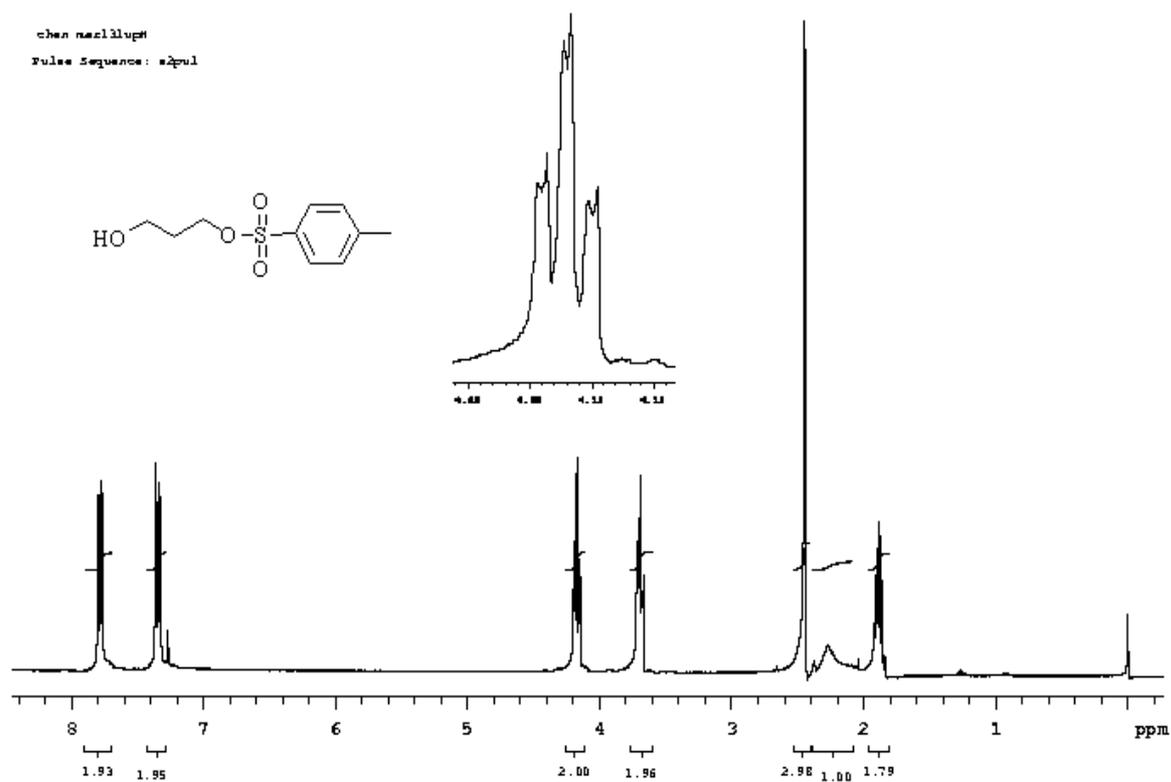


**E 43** – Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (75,45 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de 1-hidróxi-2-octanona **3.28**.

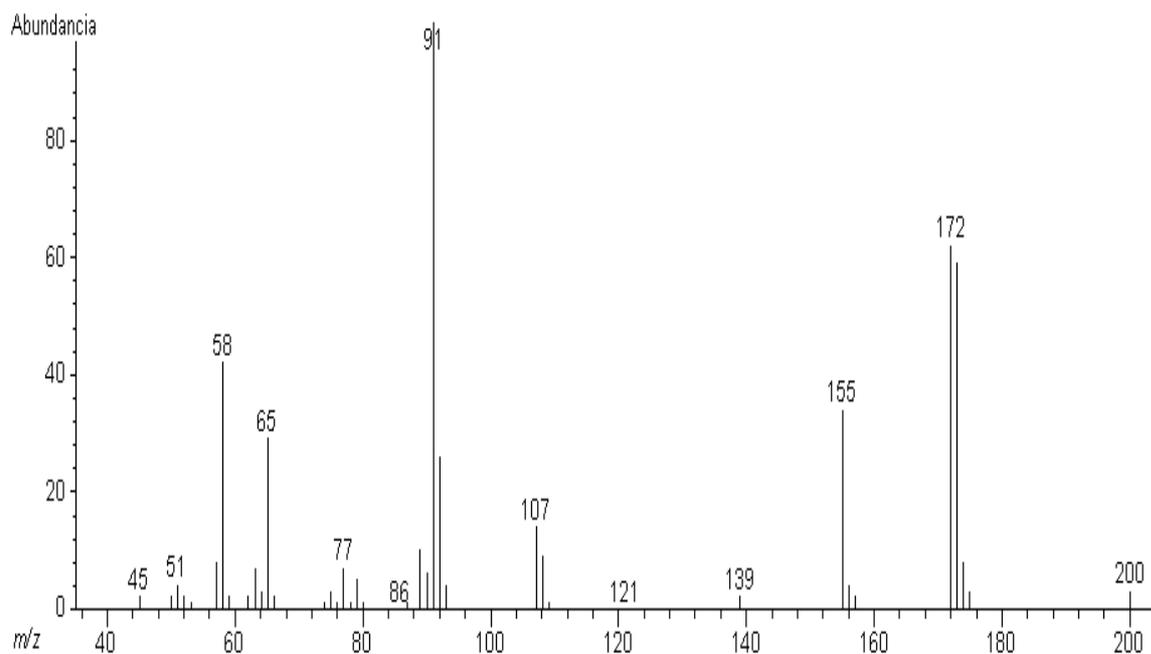
Lu Chen "LC2563" cdn13/bh5e1d #et27cheD1  
Pulse Sequence: dept



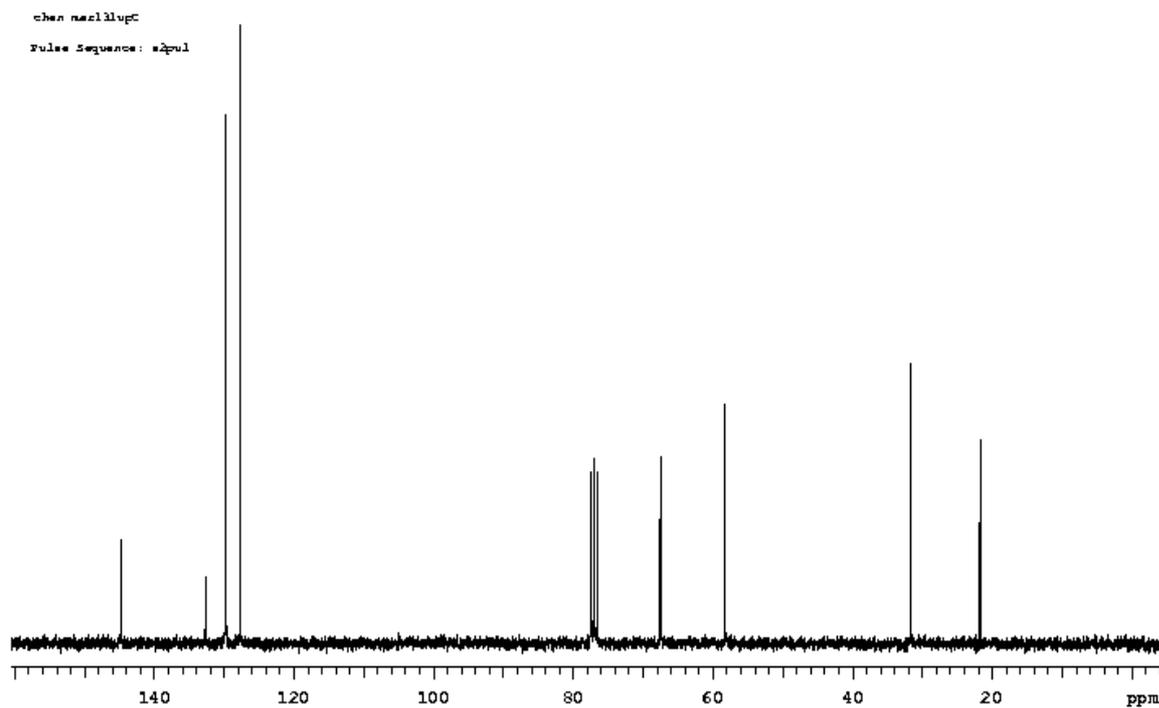
**E 44** – Espectro DEPT 90 e  $135^\circ$  (75,45 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de 1-hidróxi-2-octanona **3.28**.



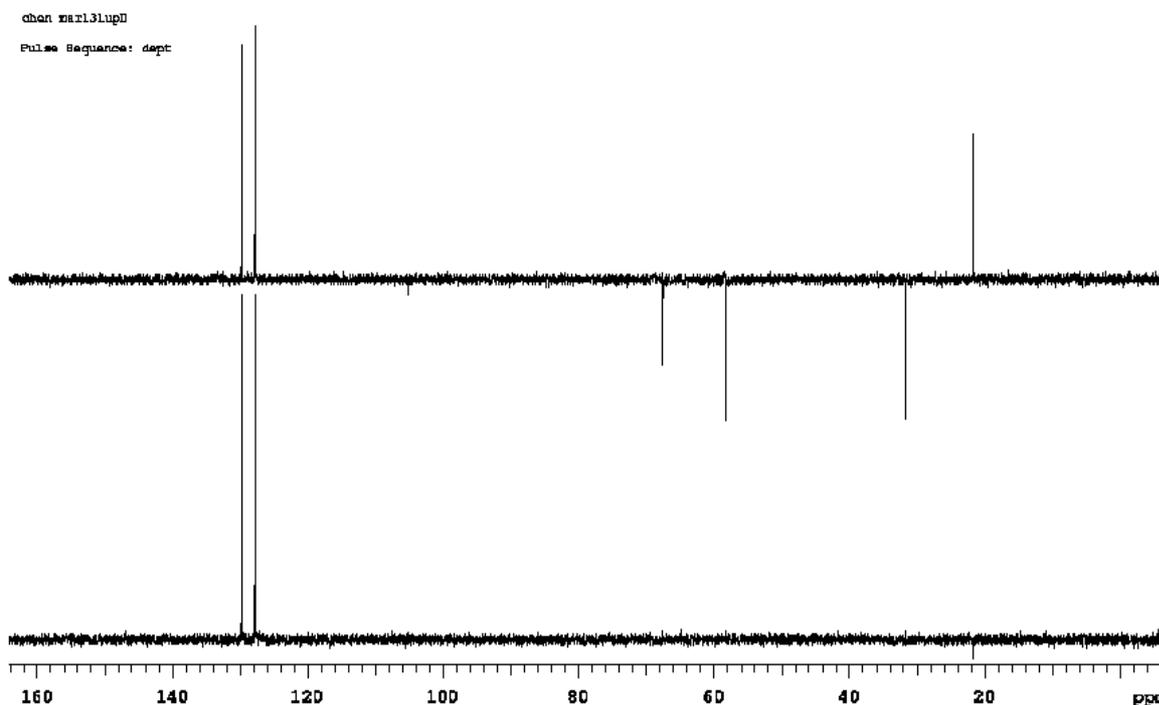
**E 45** – Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (300,07 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de 3-hidróxi-propil-*p*-toluenossulfonil éter **4.12**.



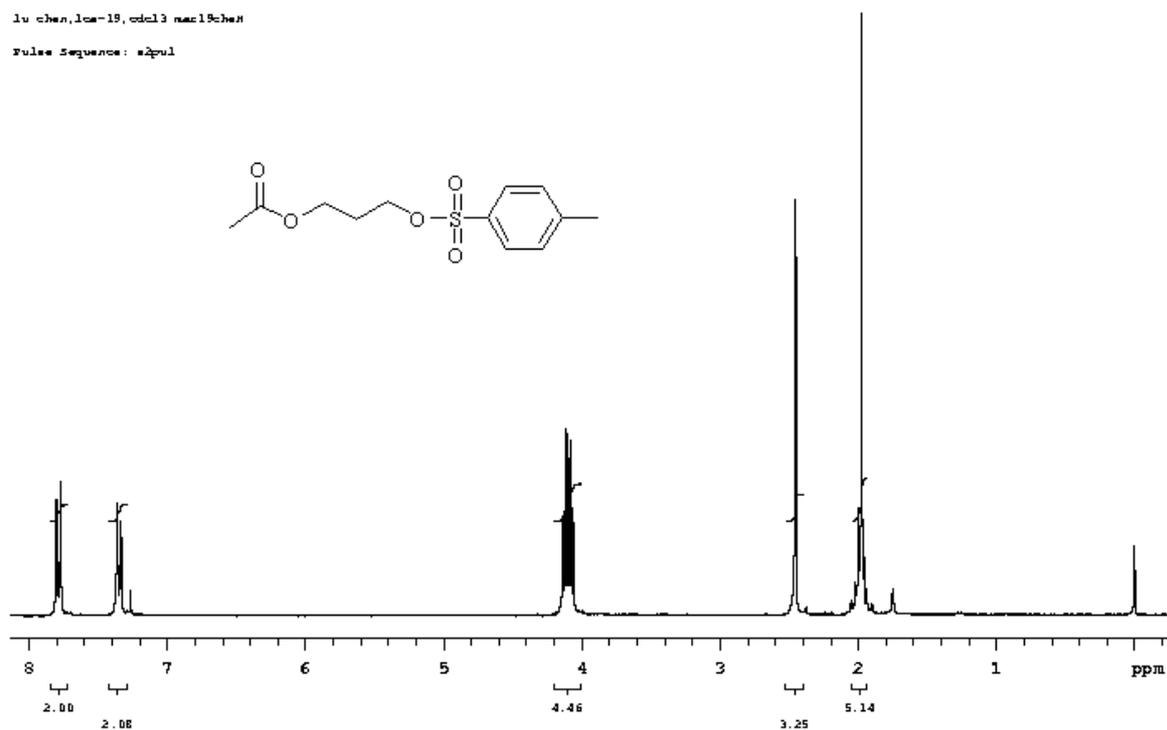
**E 46** – Espectro de massas (IE, 70 eV) de 3-hidróxi-propil-*p*-toluenossulfonil éter **4.12**.



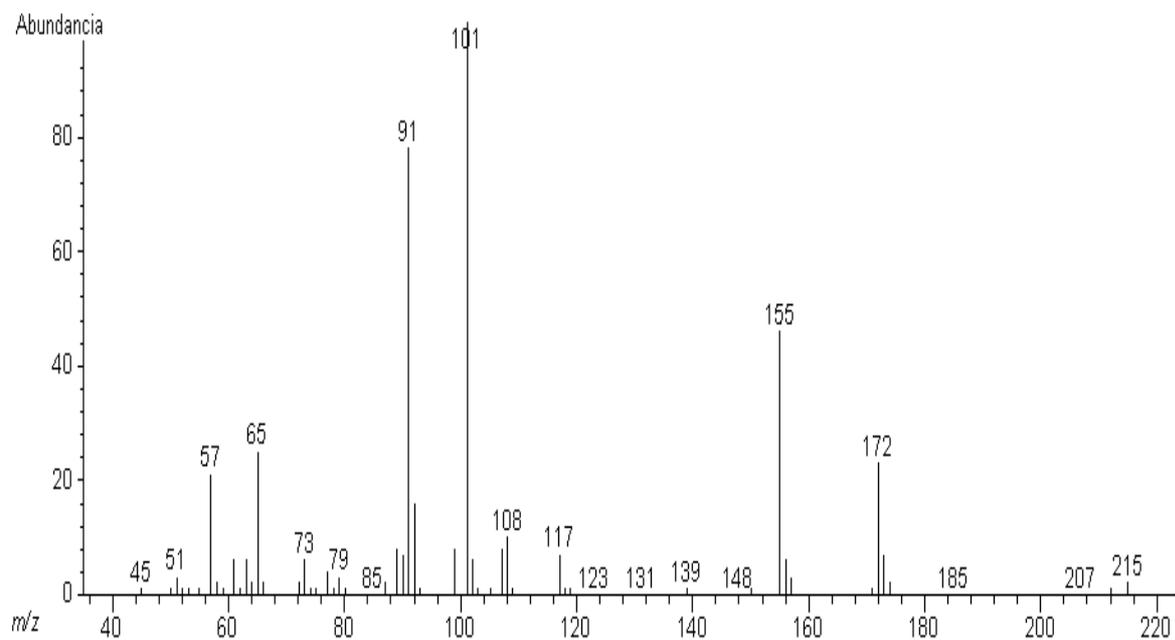
E 47 – Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (75,45 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de 3-hidróxi-propil-*p*-toluenossulfonil éter 4.12.



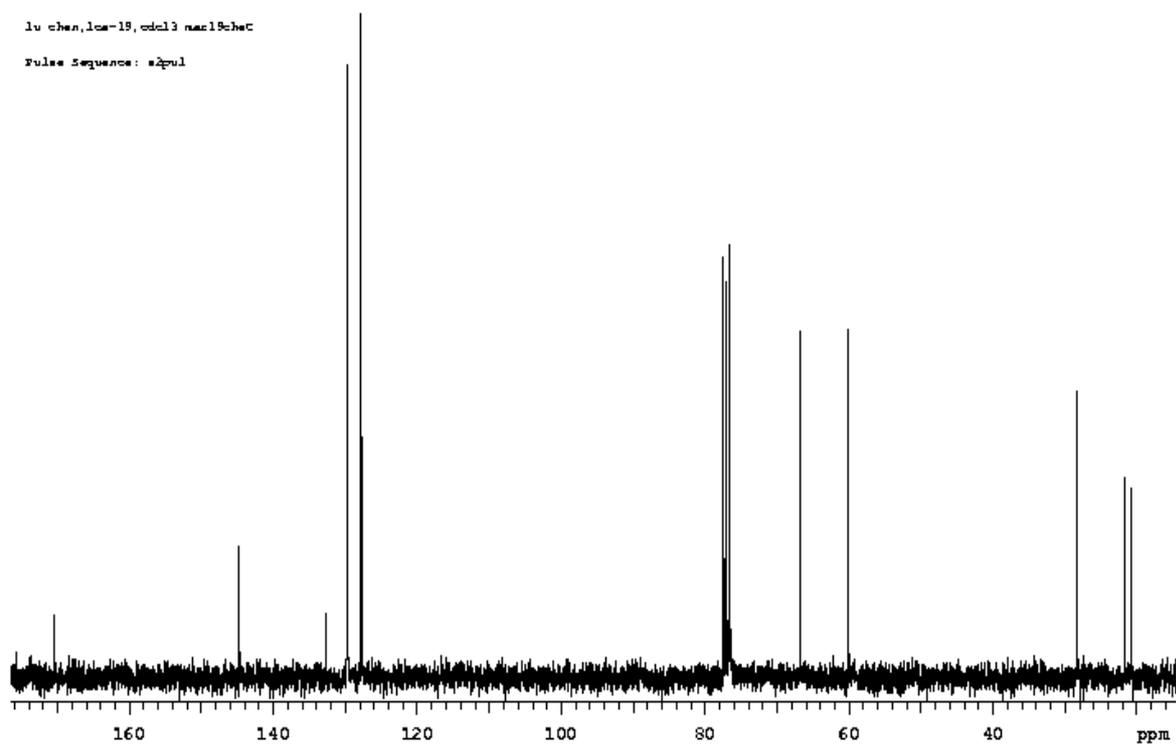
E 48 – Espectro DEPT 90 e  $135^\circ$  (75,45 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de 3-hidróxi-propil-*p*-toluenossulfonil éter 4.12.



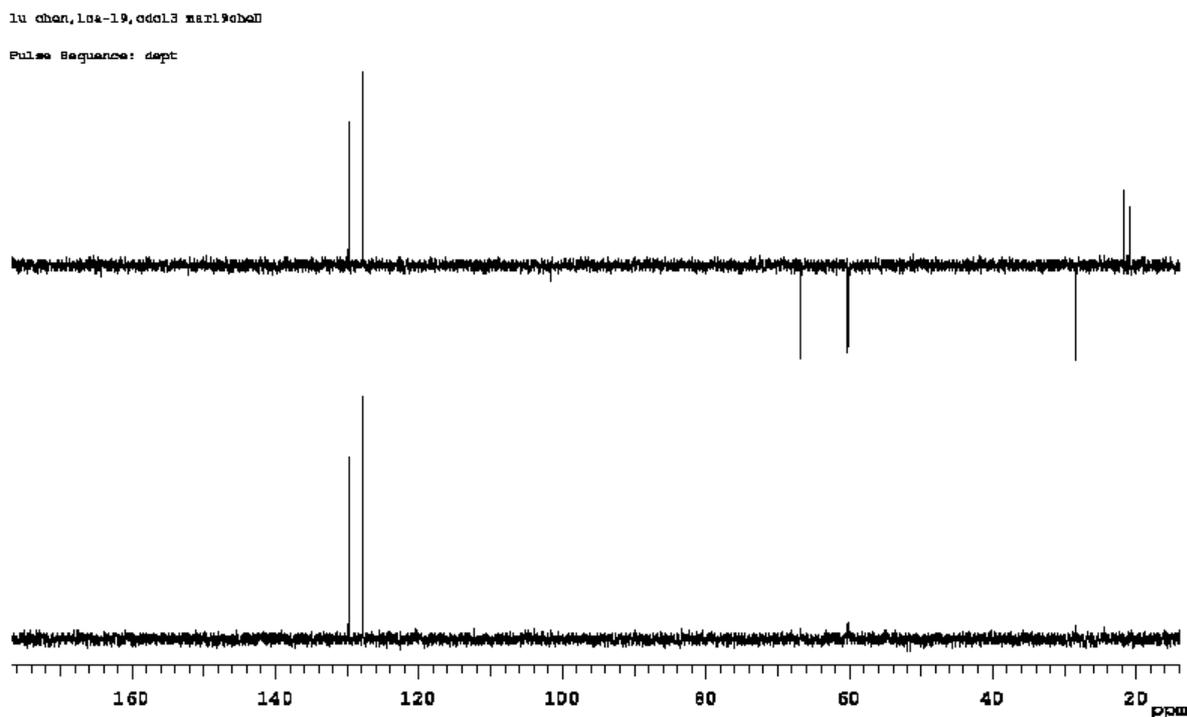
**E 49** – Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (300,07 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de 3-acetóxi-propil-*p*-toluenossulfonil éter **4.13**.



**E 50** – Espectro de massas (IE, 70 eV) de 3-acetóxi-propil-*p*-toluenossulfonil éter **4.13**.

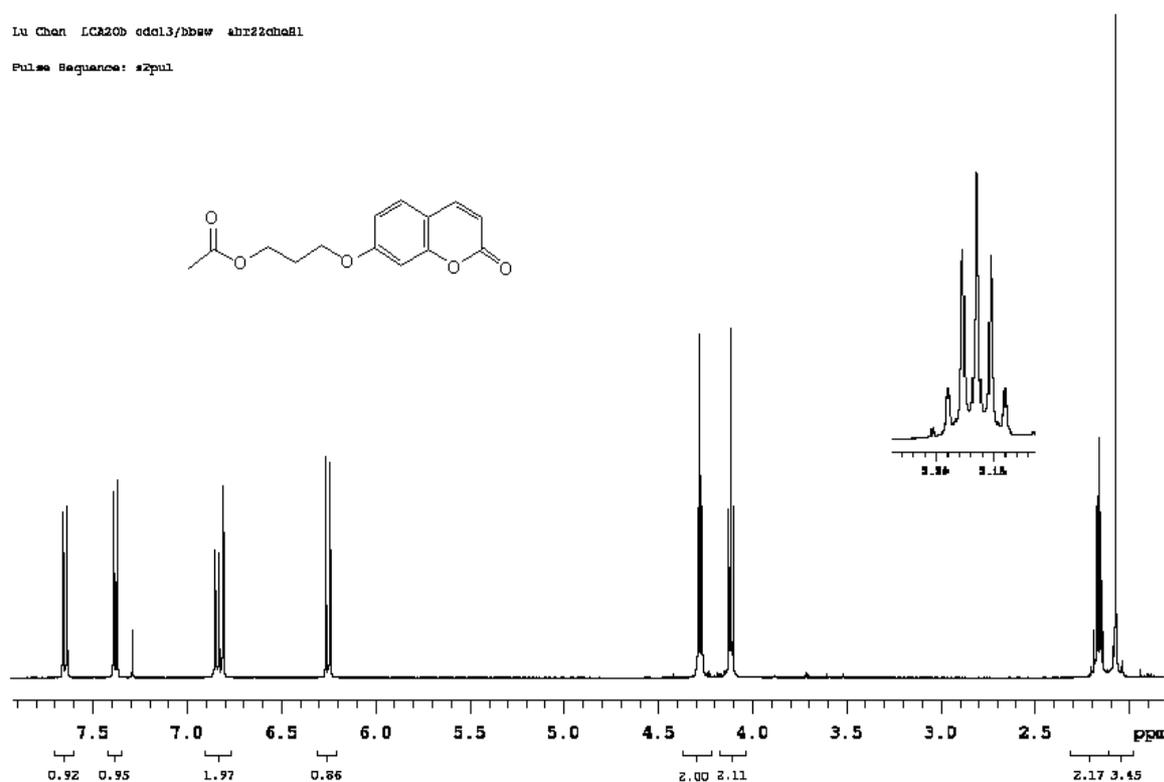


**E 51** – Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (75,45 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) do -acetóxi-propil-*p*-toluenossulfonil éter **4.13**.

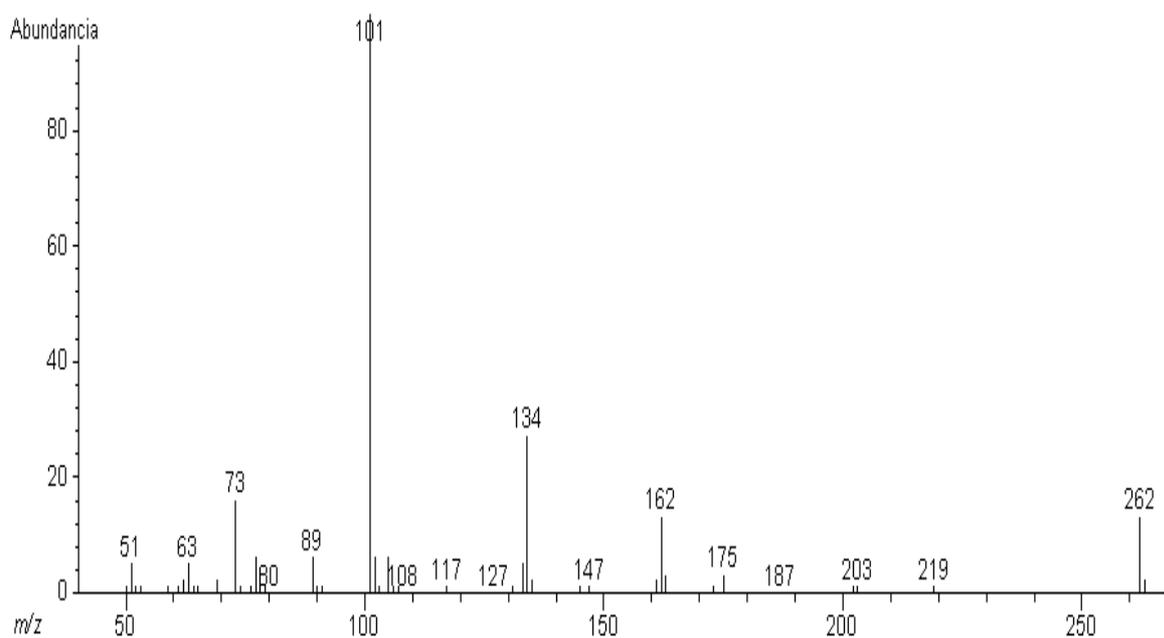


**E 52** – Espectro DEPT 90 e 135° (75,45 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) do -acetóxi-propil-*p*-toluenossulfonil éter **4.13**.

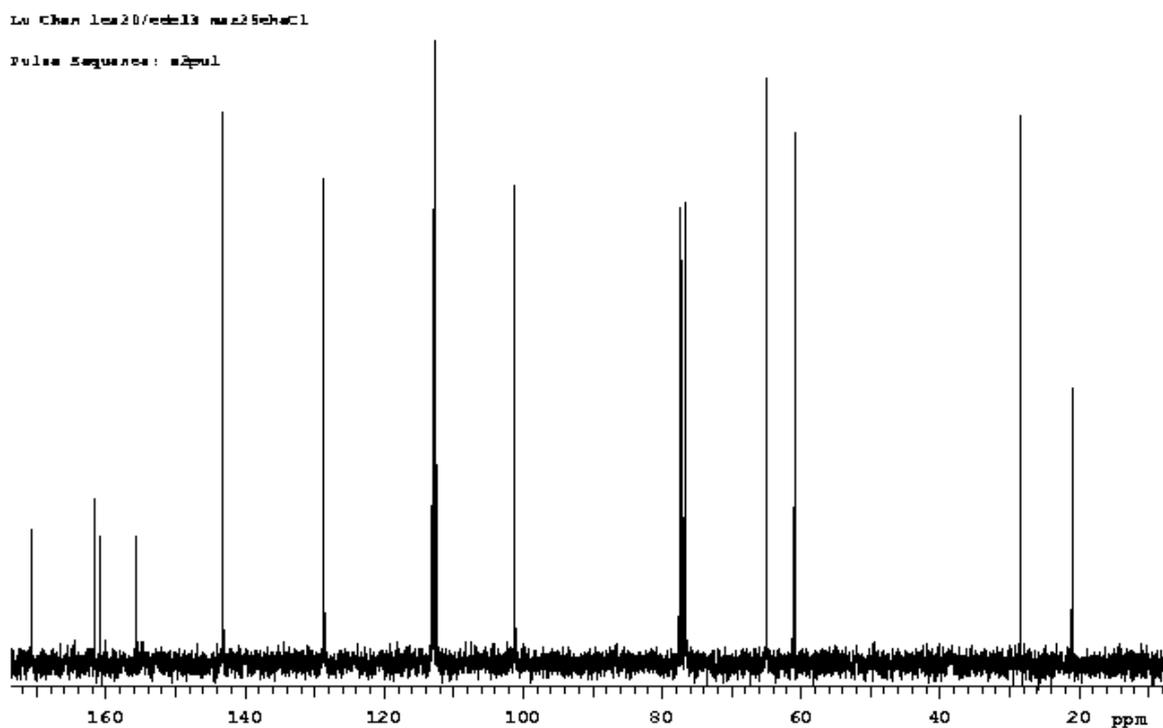
Lu Chen LC20b edd13/bbaw shr22che81  
Pulse Sequence: s2pul



**E 53** – Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (499,89 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) do 3-acetóxi-propil-7-umbeliferil éter **4.14**.



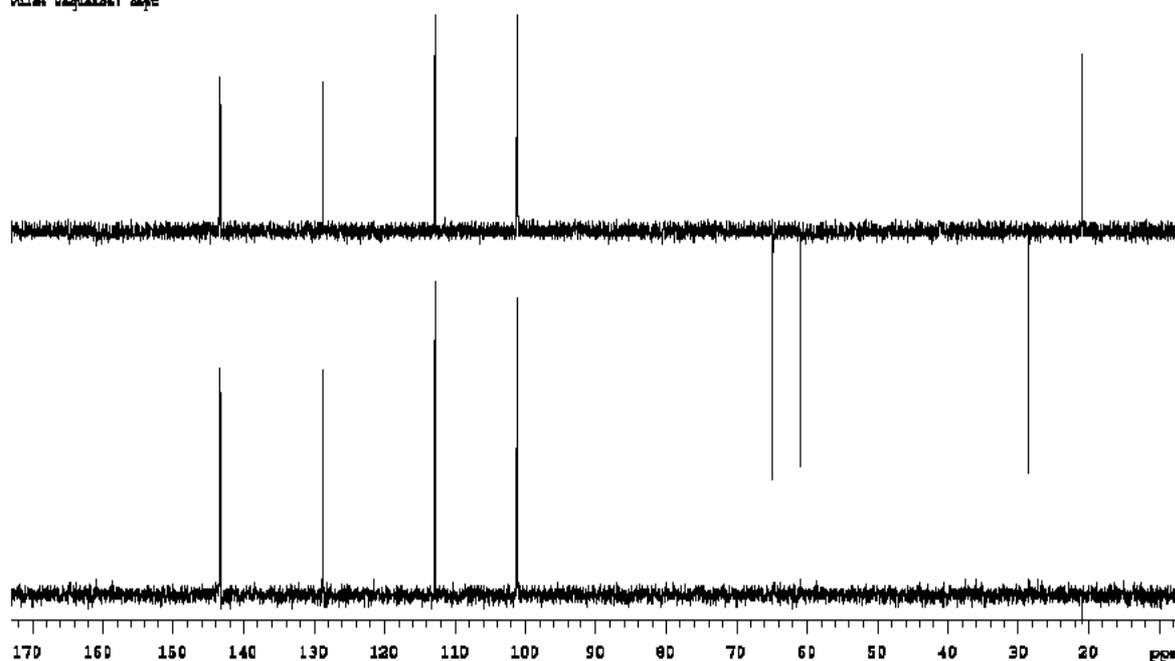
**E 54** – Espectro de massas (IE, 70 eV) do 3-acetóxi-propil-7-umbeliferil éter **4.14**.



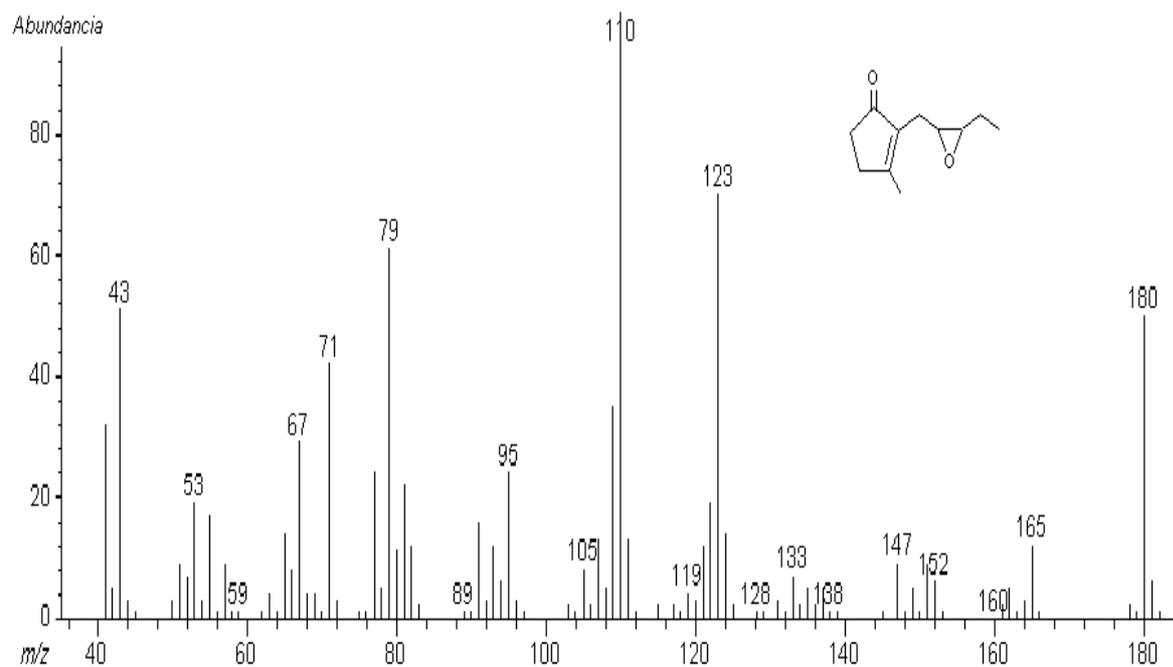
E 55 – Espectro de RMN de <sup>13</sup>C (125,70 MHz, CDCl<sub>3</sub>) do 3-acetóxi-propil-7-umbeliferil éter 4.14.

Lu Chen 1ea10/edc13 na25chaCl

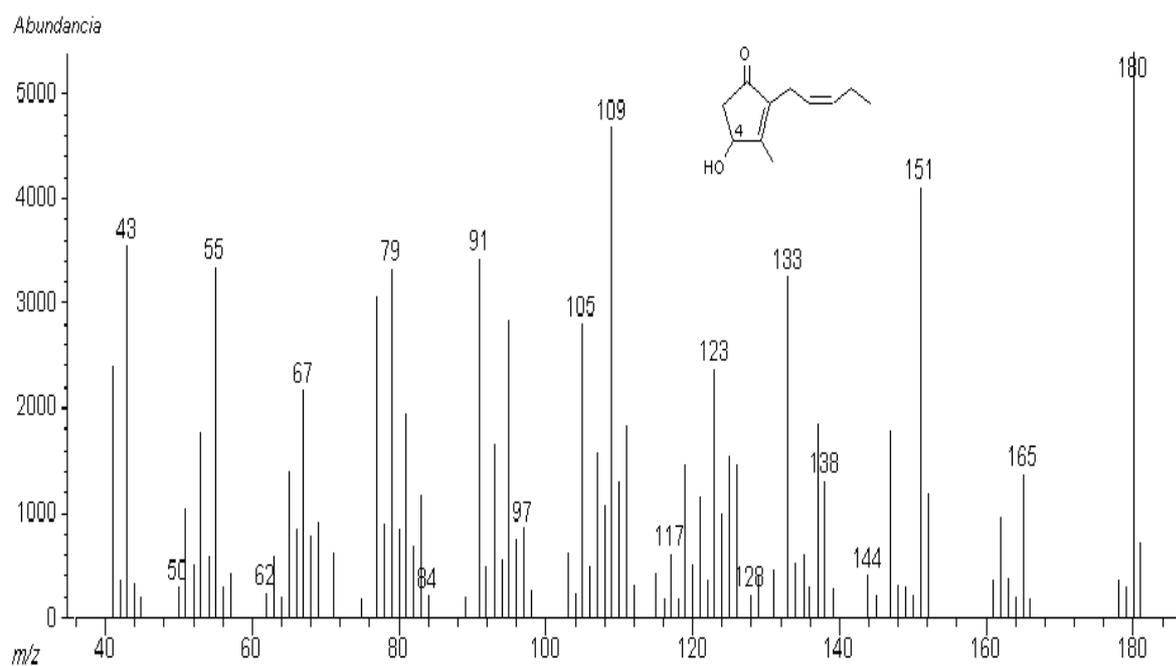
Pulse Sequence: dept



E 56 – Espectro DEPT 90 e 135° (125,70 MHz, CDCl<sub>3</sub>) do 3-acetóxi-propil-7-umbeliferil éter 4.14.



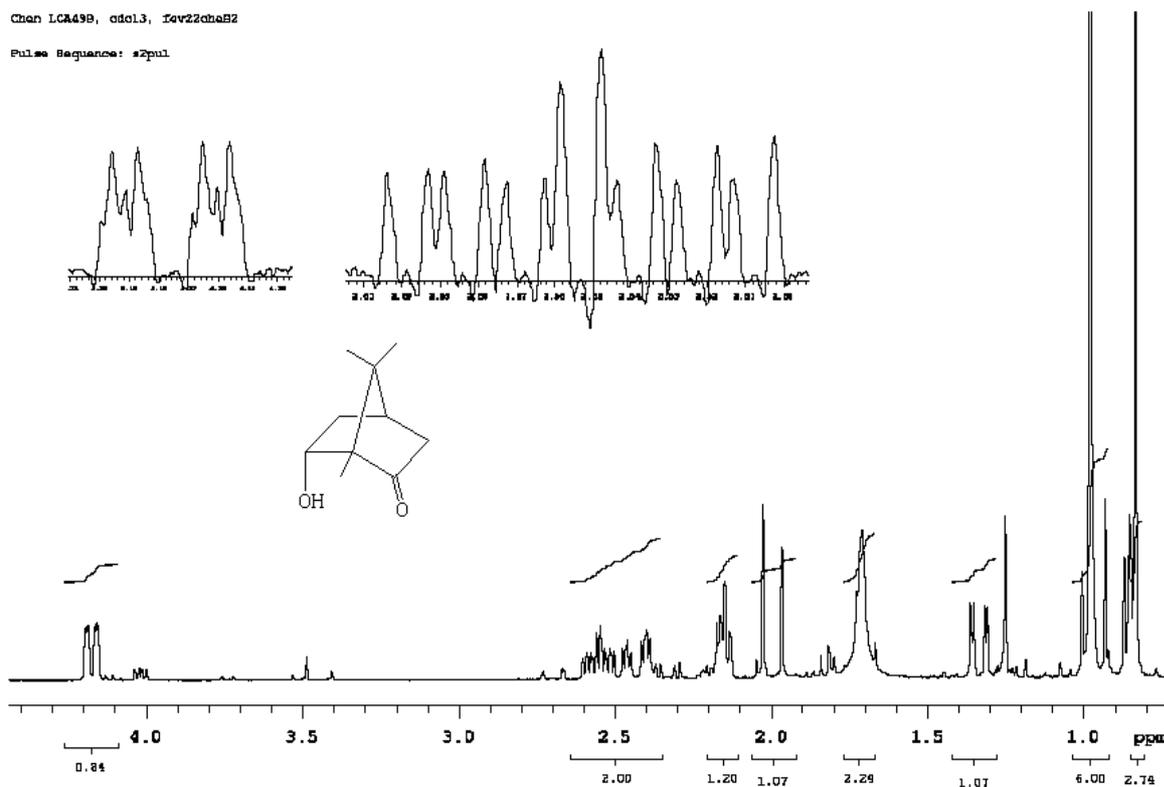
**E 57** – Espectro de massas (IE, 70 eV) de epóxido de *cis*-jasmona.



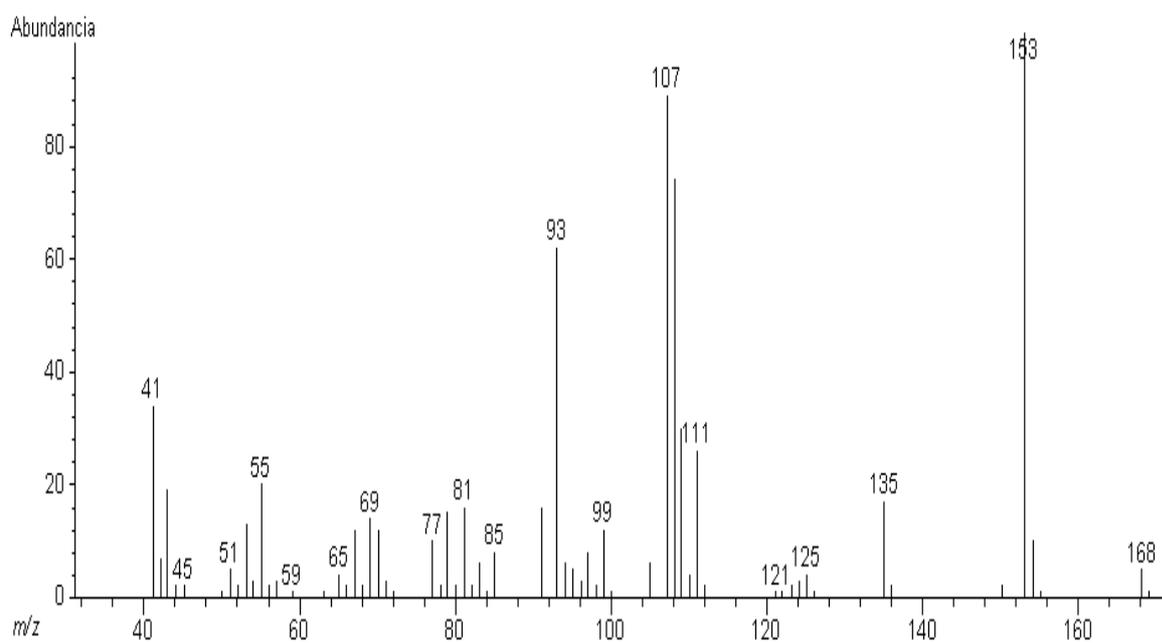
**E 58** – Espectro de massas (IE, 70 eV) de 4-hidróxi-*cis*-jasmona.

Chan LCA498, cdcl3, fcv22cha82

Pulse Sequence: s2pul



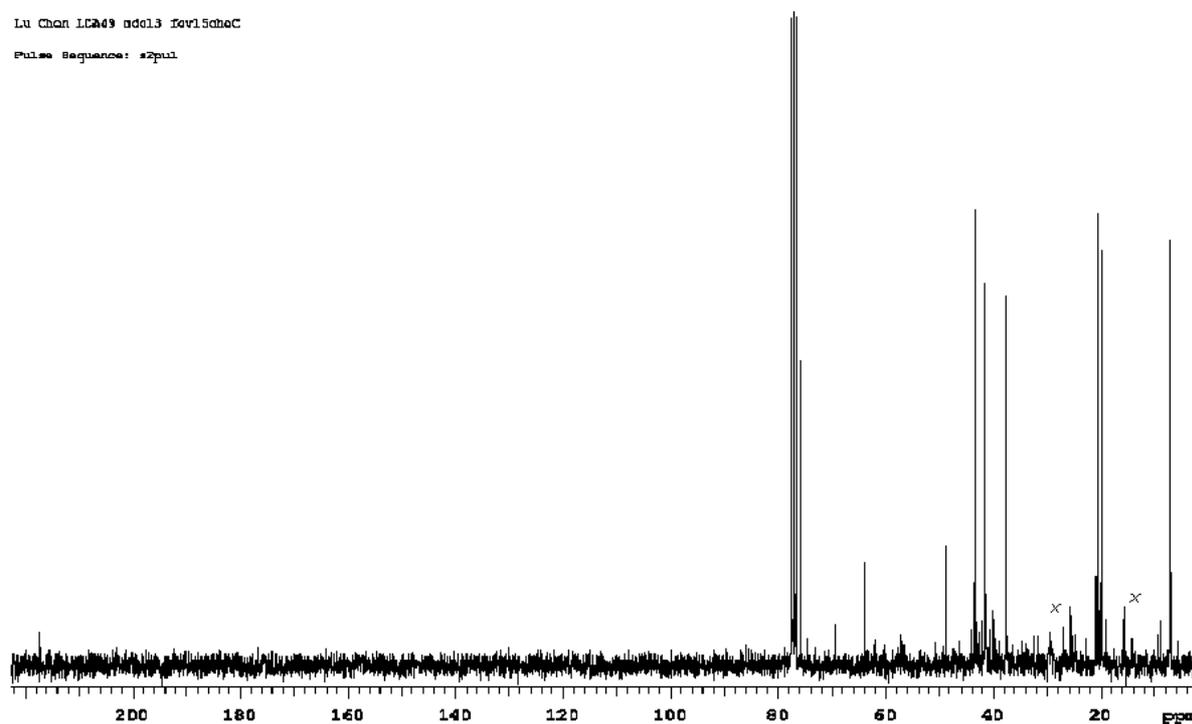
**E 59** – Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (300,07 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de 6-*endo*-hidroxicanfôra **4.24**.



**E 60** – Espectro de massas (IE, 70 eV) de 6-*endo*-hidroxicanfôra **4.24**.

Lu Chen LCA49 nd013 Iov15chaC

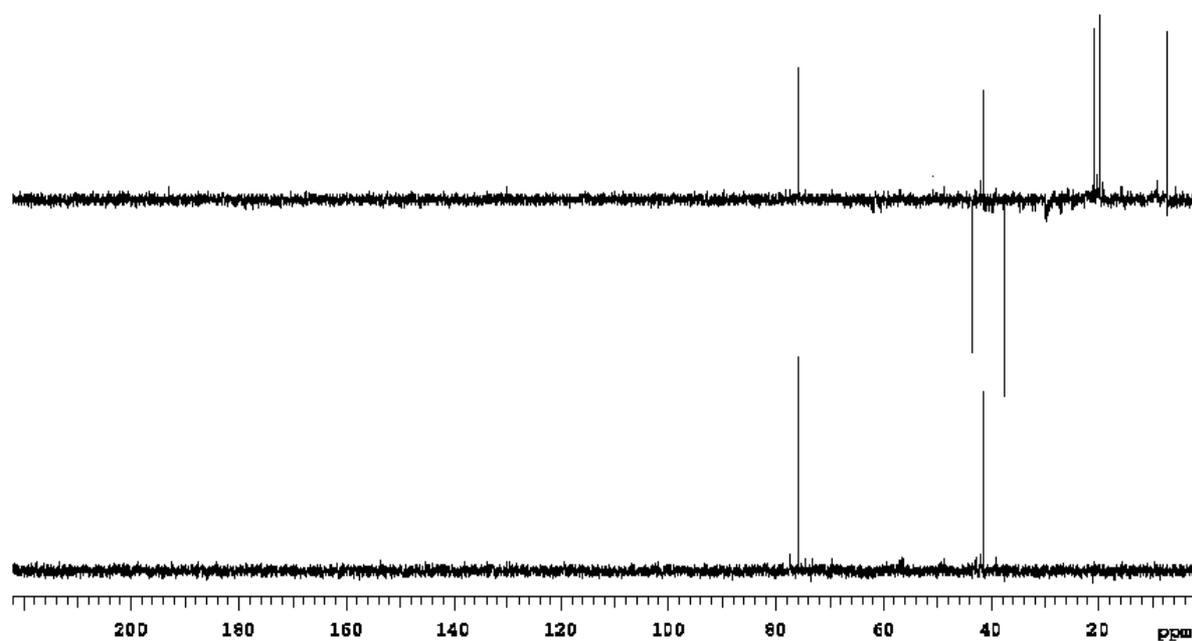
Pulse Sequence: s2pul



**E 61** – Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (75,45 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de 6-*endo*-hidroxicanfôra 4.24.

Lu Chen LCA49 nd013 Iov15chaD

Pulse Sequence: dept



**E 62** – Espectro DEPT 90 e 135° (75,45 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de 6-*endo*-hidroxicanfôra 4.24.

