UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DA NATUREZA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO QUÍMICA

ALANA BITTENCOURT VIEIRA DA SILVA

BIOTRANSFORMAÇÃO DE COMPOSTOS ACETILÊNICOS VISANDO A PREPARAÇÃO SUSTENTÁVEL DE INONAS E ÁLCOOIS PROPARGÍLICOS QUIRAIS

Recife
2020

ALANA BITTENCOURT VIEIRA DA SILVA

BIOTRANSFORMAÇÃO DE COMPOSTOS ACETILÊNICOS VISANDO A PREPARAÇÃO SUSTENTÁVEL DE INONAS E ÁLCOOIS PROPARGÍLICOS QUIRAIS

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal de Pernambuco e à Universidade de Nantes como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Química

Área de concentração: Química Orgânica

Orientador: Prof. Jefferson Luiz Princival

Recife

2020

Catalogação na fonte
Bibliotecária Mariana de Souza Alves CRB4-2105

S586b Silva, Alana Bittencourt Vieira da
Biotransformação de Compostos Acetilênicos Visando a Preparação Sustentável de Inonas e Álcoois Propargílicos Quirais/ Alana Bittencourt Vieira da Silva. – 2020.
206f.: il., fig., tab.

Orientador: Jefferson Luiz Princival.
Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. CCEN, Química, Recife, 2020.
Inclui referências, apêndices e anexos.

1. Química Orgânica. 2. Biocatálise. 3. Enzima. 4. Oxidoredução. I. Princival, Jefferson Luiz. (orientador) II. Título.

547 CDD (22. ed.) UFPE-CCEN 2020-194

ALANA BITTENCOURT VIEIRA DA SILVA

"Biotransformação de Compostos Acetilênicos Visando a Preparação Sustentável de Inonas e Álcoois Propargílicos Quirais."

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação no Departamento de Química Fundamental da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutora em Química.

Aprovado em: 07/01/2020

BANCA EXAMINADORA

Prof. Jefferson Luiz Princival (Orientador)
Departamento de Química Fundamental
Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Ricardo Oliveira da Silva
Departamento de Química Fundamental
Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Paulo Henrique Menezes da Silva
Departamento de Química Fundamental
Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Marcos Antonio de Morais Junior
Departamento de Genética
Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Rafael Augusto Soldi
Centro Universitário Osman da Costa Lins

Dedico este trabalho aos meus queridos pais e irmã por todo apoio e incentivo que sempre me deram.

AGRADECIMENTOS

A Universidade Federal de Pernambuco e ao Departamento de Química Fundamental, pela oportunidade de realização do doutorado. A Universidade de São Paulo- USP através do Instituto de Química pela oportunidade de desenvolver a colaboração.

Ao Prof. Jefferson Princival, pela orientação, conselhos, toda contribuição cientifica e apoio oferecido ao longo do desenvolvimento deste trabalho.

Ao Prof. Alcindo do Santos e laboratório, pela colaboração, suporte, e instruções conferidas ao longo do período que realizei parte da tese, no Instituto de Química da USP, cuja colaboração foi de extrema importância para conclusão a proposta do trabalho. A todos os colegas do laboratório LabSSeTe (e agregados), entre eles Gisele, Henrique, Lais, Daniel e Natalia, pelos momentos de descontração e apoio.

Ao Prof. Luiz Netto e ao Prof. Mario Barros, e equipes, pelas colaborações na Universidade de São Paulo – USP. Em especial aos colegas Fernando e Thiago do laboratório de Proteína Redox pela assistência e aprendizado adquiridos, nas etapas de biologia molecular.

Aos colegas e integrantes do Laboratório de Catálise Orgânica (LCO), em especial Dartagnan Pires, Emmanuel Dias, Jeisyanne Souza e Stephanie Nemesio por conselhos e conversas oferecidas.

A CAPES, CNPq e FACEPE pelo suporte financeiro e bolsa concedida.

A Central Analítica por estrutura laboratorial e análises realizadas no projeto

Aqueles que contribuíram direta ou indiretamente para o desenvolvimento deste trabalho.

RESUMO

A obtenção de fármacos na indústria farmacêutica cacere de metodologias mais biossustentáveis de obtenção de intermediários químicos. Nesse contexto, o presente trabalho trata do desenvolvimento de rotas quimioenzimáticas na obtenção de Inonas e álcoois propargílicos quirais, corriqueiramente utilizados como blocos de construção. Como proposta biocatalítica, uma enzima oxidase comercial Lacase, do microrganismo *Trametes versicolor,* foi empregada como biocatalisador oxidante num sistema enzima/mediador, para obtenção de cetonas propargílicas. Em sequência, através da tecnologia de DNA recombinante, foi expressa uma enzima carbonil redutase proveniente da bactéria *Gluconobacter oxydans* (GOX2036), para as reações de redução e obtenção da série dos álcoois propargílicos quirais. Os resultados de oxidação mostraram que o sistema oxidante Lacase/mediador, mostrou-se promissora para a formação de produtos oxidados com taxas de reação entre 1h-24h, com rendimentos de bons a excelentes (64-97%), utilizando-se água acídica como meio reacional (pH5,5-6,0), e temperatura ambiente. A presença de co-solventes mostrou-se necessária nas reações que resultaram em baixos rendimentos. Nos resultados obtidos com enzima de expressão em *E.coli,* foi possível a construção de dois plasmídeos pUC18 de coonagem e pET28 de expressão contendo a sequencia genética da enzima de interesse. As biotransformações de redução, com células integras expressadas permitiu obter álcoois de configuração (S), no geral, com excelentes excessos enantioméricos (>99%) e conversão, em tempos reacionais de 24-48h.

Palavras-chave: Biocatálise. Enzima. Oxidoredução.

ABSTRACT

Obtaining drugs in the pharmaceutical industry requires more biosustainable methodologies in the chemical intermediates. In tis in this direction that this thesis proposes to contribute to the development of chemoenzymatic routes in obtaining chiral Inonas and propargyl alcohols, commonly used as building blocks. As a biocatalytic proposal, a commercial Lacase oxidase enzyme, from the microorganism *Trametes versicolor*, was used as an oxidizing biocatalyst in an enzyme / mediator system to obtain propargyl ketones. In sequence, through the recombinant DNA technology, a carbonyl reductase enzyme from the bacterium *Gluconobacter oxydans* (GOX2036) was expressed, for the reduction reactions and obtaining the chiral propargyl alcohols series. The oxidation results showed that the Lacase / mediator oxidizing system, showed promise for the formation of oxidized products with reaction rates between 1h-24h, with good to excellent yields (64-97%), using acidic water as a reaction medium (pH 5.5-6.0), and at room temperature. The presence of co-solvents proved to be necessary in the reactions that resulted in low yields. In the results obtained with expression enzyme in E.coli, it was possible to construct two plasmids pUC18 of coonage and pET28 of expression containing the genetic sequence of the enzyme of interest. The reduction biotransformations, with expressed whole cells, allowed to obtain alcohols of configuration (S), in general, with excellent enantiomeric excesses (> 99%) and conversion, in reaction times of 24-48h.

Keywords: Biocatalysis. Enzyme. Oxireduction.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Mecanismo de transferência de hidreto para a carbonila em reação enzimáticas com oxidoretutases 31

Figura 2 - Álcoois propargílicos sintetizados 42

Figura 3 - Dupletos referentes ao acoplamento J4 dos 1H carbinólico e acetilênico do álcool 1a e 6a: a) dupletos álcool 1a (RMN 300HZ); b) dupletos álcool 6a. (RMN 400Hz). 43

Figura 4 - Espectro de RMN 13C dos álcoois 13a (a) e 15a (b) 44

Figura 5 - Espectros de RMN 13C dos álcoois 18a (a) e 19a (b) 44

Figura 6 - Oxidação do álcool 1a com Lacase/TEMPO em diferentes pH 47

Figura 7 - Conversão das reações de oxidação do sistema Lacase/TEMPO em diferentes sistemas aquosos, com pH 6 48

Figura 8 - Curva de calibração para determinação dos rendimentos das oxidações dos álcoois propargílicos 50

Figura 9 - Reação de oxidação em meio aquoso com sistema Lacase/TEMPO com o álcool propargílico 1ª 50

Figura 10 - Conversões do álcool 1a para cetona 1b em diferentes co-solventes em 5h de reação 53

Figura 11 - Espectros de RMN. a) Espectro de 1H do álcool 25 e cetona 25c. b) Espectro de 13C álcool 25 e cetona 25c 56

Figura 12 - Esquema da formação do plasmídeo via técnica de DNA recombinante 62

Figura 13 - Sequência genética da enzima carbonil redutase Gox2036 65

Figura 14 - Padrão eletroforético do gene isolado do genoma da bactéria Gluconobacter oxydans. M - padrão de fragmentação lambda BstEll. 1 – gene isolado da Gox2036 66

Figura 15 - Padrão eleroforético após eletroeluição: M – padrão labda, 1 - vetor pUC18, 2 – fragmento Gox2036 68

Figura 16 - Colônias após ligação do vetor pUC18 ao inserto da Gox2036 69

Figura 17 - Representação da MINIPREP; 1) Repique da colônia de DNA recombinante Gox2036-pUC18; 2) Padrão eletroforético após miniprep das 10 colônias contendo o vetor Gox2036-pUC18 70
Figura 18 – Padrão eletroforético das 4 colunas de pUC18- Gox2036 71
Figura 19 - Padrão eletroforético após eletroluição. M-padrao;1-pet28a, 2-Gox2036 72
Figura 20 - Padrão eletroforético da MINIPREP de 11 colônias da ligação pET28a-Gox2036 73
Figura 21 - Gel de SDS-PAGE dos Padrão proteico de céluas de E.coli transforadas com vetor Gox206-pET28a; A- sem indução com IPTG: B- com indução de IPTG; P - marcador de peso molecular 74
Figura 22 - a) Sequência de aminoácidos do vetor recombinante Gox2036-pET29b; b) Sequência de aminoácidos do vetor recombinante Gox2036-pET28a 75
Figura 23 - Construção do plasmídeo recombinante Gox2036-pET28a, e transcrição para proteina com cauda de histidina 76
Figura 24 - Perfil cromatográfico da amostra expressa a partir do vetor Gox2036-pET28a obtido em coluna de afinidade a íons metálicos utilizando gradiente de imidazol para eluição da proteína 77
Figura 25 - SDS-PAGE (12% poliacrilamida). Purificação na coluna de Ni da enzima Gox2036-pET28a; P – padrão de peso molecular; 6-56 alíquotas obtidas na purificação 77
Figura 26 - Efeito de cofatores na conversão da cetona 1b para o álcool 1a, com célula integra da enzima Gox2036, em tampão fosfato 100mM, pH 6 a 30 °C, após 12 h e 24h 80
Figura 27 - Efeito de co-solventes 2% na conversão da cetona 1b para o álcool 1a, com célula integra da enzima Gox2036, em tampão fosfato 100mM, pH 6 a 30 °C, após 12 h e 24h 81
Figura 28 - Variação nas concentrações do co-solvente. 2) Variando de 1-20% de tolueno; b) Variando de 1-5% DMSO 82

Figura 29 - Analise estrutural da Gox2036. a) Vista de perto do modelo de ligação de substrato na enzima. b) Relativa orientação do NADH ao substrato no sítio ativo 86
Figura 30 - Espectro de 1H dos álcool 4a e acetato 4c propargílicos 90
Figura 31 - Cromatograma em coluna quiral; a) Padrao racêmico alcool 1a; b) RCE utilizando CAL-B em 120min de reação 92
Figura 32 - Antidepressivos comercialmente encontrados, derivados de aminoálcoois..... 130
Figura 33 - Reações de hidroaminação interoleculra (A-D) e intramolecular (E-G)..... 135
Figura 34 - Espectro de RMN de 1H da enaminona 41..... 137
Figura 35 - Espectro de RMN 1H do composto 42..... 139
Figura 36 - Espectro de RMN de 13C do composto 42..... 139
Figura 37 - Cromatogramas da reação de hidroaminação entre alquinos terminais e anilina na presença de catalisador de Fe. a) álcool 4a; b) acetato 4c; c) produto de resolução cinética enzimática..... 141
Figura 38 - Fragmentação do composto com tempo de retenção de 19,23 do composto 50..... 142
Figura 39 - Espectro de RMN de 1H do composto 50..... 144
Figura 40 - Espectro de RMN de 13C do composto 50..... 144
Figura 41 - Perfil de fragmentação via CG-MS do composto 49 145
Figura 42 - Espectro de RMN do composto 52; a) Espectro de 1H; b) Espectro de 13C 147
Figura 43 - Espectros de RMN da β-hidroxinitrila 59; a) Espectro de 1H; b) Espectro de 13C..... 149
Figura 44 - Espectro de RMN de 1H da olefina 58 151
Figura 45 - Espectro de RMN de 13C da olefina 58 151
Figura 46 - Espectro de RMN de 1H do composto 59..... 154
Figura 47 - Espectro de RMN de 13C do composto 59..... 154

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1 - Transformações sintéticas industriais desempenhadas por enzimas 26

Esquema 2 - Síntese da D(-)Pantolactona usando microrganismos para bioredução 27

Esquema 3 - Síntese do fármaco Montelukast empregando screening de 80 microrganismos para etapa enantiomérica 27

Esquema 4 - Função de um mediador na atividade oxidativa da enzimática da Lacase ... 32

Esquema 5 - Redução esquemática com diferentes enzimas oxidoredutases para obtenção de álcoois quirais 34

Esquema 6 - Produtos obtidos através de reações com cetonas α,β conjugadas acetilênicas 35

Esquema 7 - Processo de desracemização por estereoinversão 38

Esquema 8 - Síntese dos álcoois racêmicos 40

Esquema 9 - Mecanismo de reação dos álcoois propargílicos 41

Esquema 10 - Mecanismo de reação prótico com reagente de Grignard 41

Esquema 11 - Preparação do diol propargílico 17a 42

Esquema 12 - Sistema de oxidação quimioenzimática do álcool 1a 46

Esquema 13 - Rearranjo de Meyer-Schuster em alcóois propargílicos 46

Esquema 14 - Mecanismo de oxidação de álcoois secundários promovida por TCCA 58

Esquema 15 - Reação de formação do MnO_2 59

Esquema 16 - Oxidação dos álcoois propargílicos empregando MnO_2 60

Esquema 17 - Mecanismo de ação do MnO2 em reação de oxidação 61

Esquema 18 - Exemplo de um sistema redox de obtenção de álcoois propargílicos 63

Esquema 19 - Mecanismo de acetilação de álcoois secundários com DMAP 89

Esquema 20 - Distinção enantiosseletiva catalisada por lipases 91

Esquema 21 - Resolução cinética enzimática do álcool 1a 91

Esquema 22 - Síntese da Fluoxetina e Tomoxetina com quiralidade promovida por resolução com lipase 131

Esquema 23 - Síntese dos dois enantiômeros da Fluoxetina e Duloxetina usando resolução para obtenção da quiralidade 132
Esquema 24 - Síntese da (S)-Duloxetina usando resolução com lipase para obtenção do álcool enantiomericamente enriquecido..... 132
Esquema 25 - Síntese da (S)-Duloxetina; usando Hidrogenação com ródio como catalisador assimétrico 133
Esquema 26 - Primeiras sínteses envolvendo hidroaminação 133
Esquema 27 - Hidroaminação Markovnikov e anti-Markovnikov 134
Esquema 28 - Mecanismo de ciclo adição a alquinos por complexo de imido-Ti 136
Esquema 29 - Síntese da enaminona 41 a partir da hidroaminação da alquinona 1b e anilina 40 137
Esquema 30 - Síntese das enaminonas com catalisadores de Zn 138
Esquema 31 - Hidroaminação com compostos propargílicos e anilina para obtenção de 49 140
Esquema 32 - Reação de hidroaminação com anilina 40 e álcool 6a 142
Esquema 33 - Hidroaminação com o álcool propargílico 1a 143
Esquema 34 - Reação de hidroaminação com catalisadores de Cu2+..... 143
Esquema 35 - Hidroaminação com catalisador de CeCl3 suportado em alumina 145
Esquema 36 - Reação de obtenção da cetonitrila 52 146
Esquema 37 - Mecanismo do estado de transição SN2 para obtenção da cetonitrila 52 . 146
Esquema 38 - Reação de abertura de epóxido para formação de β-hidroxinitrilas 148
Esquema 39 - Mecanismo da abertura de epóxido e formação da β-hidroxinitrila 55 148
Esquema 40 - Reação de oxidoredução da benzonitrila 52 com a enzima carbonil redutase recombinante pet28a/Gox2036 150
Esquema 41 - Síntese de obtenção da amina conjugada 58 150
Esquema 42 - Síntese de oxifuncionalização de olefinas 152
Esquema 43 - Formação do íon imino através da reação entre aldeídos e aminas..... 152
Esquema 44 - Adição nucleofíco da forma enólica à imina previamente formada 153
Esquema 45 - Reação de Mannich com amberlist..... 153

Esquema 46 - Mecanismo dos produtos formados na reação de Mannich; 1) Formação da cetoamina 65;2) Formação da enona 62; 3) Formação do produto de adição 1,4 ao enolato 62 156

LISTA DE EQUAÇÕES

Equação 1 - Cálculo do excesso enantiomérico em Resolução Cinética Enzimática 33
Equação 2 - Cálculo da razão enantiomérica (E) nas reações de Resolução cinética 34

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Classificação das enzimas por grupos principais[24] 30

Tabela 2 - Conversão para cetona 1b variando quantidades de TEMPO e Lacase 49

Tabela 3 - Oxidação quimioenzimática de inols com sistema Lacase/TEMPO[a] 51

Tabela 4 - Efeito do co-solvente AcOEt no sistema Lacase/TMEPO para melhorar os rendimentos da oxidação dos compostos 13a e 15a 54

Tabela 5 - Reação de oxidação dos álcoois secundários propargílicos e condições 58

Tabela 6 - Otimização das condições de oxidação com MnO_2 60

Tabela 7 - Oligonucleotídeos forward e reverse utilizados na reação de PCR do gene da Gox2036 66

Tabela 8 - Conversão (%) da cetona 1b para o álcool (S)-1a em pH de 6 a 9..... 79

Tabela 9 - Conversão da cetona 1b para o álcool 1a empregando celulas úmidas contendo Gox2036-pET28a e enzima Gox2036 isolada 79

Tabela 10 - Bioredução da série de cetonas propargilicao com a enzima recombinante E.coli/Gox2036/pET28a. 84

Tabela 11 - Bioredução da série de cetonas propargilicas alquilicas com a enzima recombinante E.coli/Gox2036-pET28a 87

Tabela 12 - Acetilação dos álcoois secundários catalisada por DMAP 88

Tabela 13 - Resultado de RCE obtidos variando condições reacionais com lipases comerciais..... 94

Tabela 14 - Primers para amplificação do gene da gox2036 para a clonagem no gene 110

Tabela 15 - Condições e enzimas de restrinção para digestão do plasmídeo de clonagem pUC18 111

Tabela 16 - Reação de ligação do vetor recombinante pUC18-Gox2036..... 112

Tabela 17 - Reações de digestão com EcoRI e HindIII 116

Tabela 18 - Reação de ligação dos vetores de expressão recombinante pET28a(+) e pET29b(+) 118

Tabela 19 - Condiçõea de amplificação por PCR do vetor recombinante pET28a/Gox2036 119
Tabela 20 - Métodos cromatográficos de análise das reações de biotransformação ... 122
Tabela 21 - Condições de rampa dos compostos biotransformados 122

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

$[\alpha]^D$	Rotação específica
AcOEt	Acetato de Etila
Bgl II	Enzima de restrição do microorganismo *Bacillus globiggi*
BLAST	Ferramenta Básica de Localização de Alinhamento Local
c	Conversão
CAL-B	*Candida antarctica* lipase-B
CBR	Carbonil Reductase - Carbonila Redutase
CCD	Cromatografia em Camada Delgada
CG	Cromatografia em fase Gasosa
C_S/C_R	Concentração enantiômero S/ Concentração enantiômero R
d	Dupleto
DCM	Diclorometano
dd	Duplo dupleto
ddt	Duplo duplo tripleto
DMAP	4-Dimetilaminopiridina
DMSO	Dimetil sufóxido
dNTP	Desoxirribonucleotídeos Fosfatados
E	Razão enantiomérica
E. coli BL21(DE3)	E. coli é uma expressão T7
E. coli DH5	célula de *E.coli* modificada
E.C.	Número de comissão enzimática
e.e.	Excesso enantiomérico
EcoR I	Enzima de restrição do microorganismo *Escherichia coli*
EDTA	Ácido Etilenodiamino tetra-acético
Gox	*Gluconobacter oxydans*
HInIII	Enzima de restrição do microorganismo *Haemophilus influenzae*
Hz	Hertz

IPTG	Isopropyl β-d-1-thiogalactopyranoside - Isopropil β-D-1-tiogalactopiranosida
IUBMB	União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular
IV	Infravermelho
J	Constante de acoplamento
kDa	Quilodalton
Lac Z	operon lac
LB	Meio de cultura Luria Bertani
LMS	Lacase/Mediador/System
m	Multipleto
MeCN	Acetonitrila
MINIPREP	Minipreparação de plasmídeo bacteriano
$NADH/NAD^+$	Dinucleótido de nicotinamida e adenina reduzido / oxidado
n-BuLi	*n*-Butillítio
ORFs	*Open Reading Frames*
PCR	Reação de cadeia de polimerase
pet	vetor de expressão
ppm	Parte por milhão
PRs	Protein Resistence
pUC	vetor de clonagem
qt	Quadrupleto
quint.	Quintupleto
RCE	Resolução cinética enzimática
RMN ^{13}C	Espectro de Ressonância magnética nuclear de carbono
RMN ^{1}H	Espectro de Ressonância magnética nuclear de hidrogênio
rpm	Rotação por minuto
s	Simpleto
SDR	Short-Chain Dehydrogenases - Desidrogenase/reductase de Cadeia Curta
SDS PAGE	Eletroforese de proteínas em gel de poliacrilamida

sext.	Sextupleto
t	Tripleto
T7	DNA polimerase
Taq –	DNA polimerase
TCCA –	Ácido tricloroisocianúrico
TEMPO –	(2,2,6,6-Tetrametilpiperidin-1-il)oxil
THF	Tetraidrofurano
tt	Tripleto de tripleto
XTBE	Tampão Tris/ácido bórico/EDTA
δ	Deslocamento químico em ppm

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 24

1.1 Síntese assimétrica e Química Fina 24

1.2 Biocatálise na indústria farmacêutica 25

1.3 Enzimas: classificação e obtenção 28

1.3.1 Oxidorreductases 30

1.3.1.1 Enzimas oxidases comerciais 31

1.3.2 Hidrolases 32

1.3.2.1 Resolução cinética 33

1.4 Álcoois secundários quirais como intermediários a partir de carbonílicos 34

1.4.1 Desracemização por estereoinversão 37

2 OBJETIVO: GERAL E ESPECÍFICOS 39

3 RESULTADOS 40

3.1 Síntese dos Padrões Racêmicos 40

3.2 Metodologia de oxidação visando a obtenção de Inonas 45

3.2.1 Método enzimático de oxidação Lacase/TEMPO 45

3.2.2 Métodos químicos de oxidação 56

3.2.2.1 Oxidação envolvendo TCCA como agente oxidante 56

3.2.2.2 Oxidação empregando MnO_2 como agente oxidante 59

3.3 Metodologia de redução para obtenção de álcoois propargílicos quirais 61

3.3.1 Construção do plasmídeo da Gox2036 recombinante 63

3.3.1.1 Amplificação do gene da enzima Gox2036 da bactéria Gluconobacter Oxydans 65

3.3.1.2 Escolha do plasmídeo de expressão 67

3.3.1.3 Construção do vetor de clonagem recombinante pUC18-Gox2036 67

3.3.1.4 Sequenciamento do gene da Gox2036 69

3.3.1.5 Subclonagem do vetor de expressão pET28a-Gox2036 e pET29b-Gox236 71

3.3.1.6 Indução enzimática com IPTG ... 73

3.3.1.7 Isolamento da enzima Gox2036 ... 75

3.3.2 Reduções usando carbonil redutase recombinante Gox2036-pET28a em E.coli ... 78

3.3.3.1 Obtenção dos Padrões acetato propargílicos racêmicos ... 87

3.3.3.2 Resolução Cinética Enzimática ... 90

4 CONCLUSÃO ... 95

5 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL ... 97

5.1 Síntese dos padrões racêmicos dos Álcoois propargílicos ... 98

5.2 Metodologia de oxidação visando a obtenção de inonas ... 103

5.2.1 Métodos enzimáticos de oxidação Lacase/TEMPO ... 103

5.2.2 Métodos químicos de oxidação ... 103

5.2.2.1 Oxidação envolvendo TCCA como agente oxidante ... 103

5.2.2.2 Oxidação envolvendo MnO2 como agente oxidante ... 103

5.3 Metodologias biocatalíticas para obtenção de álcoois propargílicos quirais ... 108

5.3.1 Técnicas em Biologia molecular ... 108

5.3.1.1 Crescimento bacteriano da gluconobacter oxydans ... 109

5.3.1.2 Extração do genoma da bactéria Gluconobacter Oxydans ... 109

5.3.1.3 Amplificação do gene por PCR ... 110

5.3.1.4 Clonagem de Gox2036 no vetor de clonagem pUC18 ... 110

5.3.1.4.1 Digestão do vetor de clonagem pUC18 e do produto de PCR ... 110

5.3.1.4.2 Reação de ligação do vetor de clonagem ao produto de PCR da GoX2036 ... 112

5.3.1.5 Preparação das bactérias Escherichia coli DH5α competentes para transformação do clone Gox2036-pUC18 ... 113

5.3.1.6 Transformação da bactéria Escherichia coli DH5α com o plasmídeo recombinante Gox2036-pUC18 ... 113

5.3.1.7 Mini preparativa para recuperação do DNA plasmidial pUC18-Gox2036 ... 114

5.3.1.8 Mini preparativa por protocolo PureRendimento™ para sequenciamento do DNA plasmidial pUC18-Gox2036 114

5.3.1.9 Extração do DNA plasmidial pUC18-Gox2036 em média escala TRITON prep. 114

5.3.1.10 Sequenciamento do vetor recombinante pUC18-Gox2036 115

5.3.1.11 Construção dos plasmídeos recombinantes de expressão Gox2036-pET28a(+) e Gox2036-pET29a(+) 115

5.3.1.12 Preparação das bactérias Escherichia coli BL21(DE3) competentes para transformação dos clones Gox2036-pET28a(+) e Gox2036-pET29a(+) 116

5.3.1.13 Digestão dos vetores recombinantes de expressão dos plasmídeos Gox2036-pET29a(+) e Gox2036-pET28a(+) 116

5.3.1.14 Purificação do DNA do gel de agarose 117

5.3.1.15 Reação de ligação dos vetores recombinantes de expressão pET28a(+) e pET29b(+) produto de PCR da Gox2036 117

5.3.1.16 Transformação da bactéria Escherichia coli DH5α com o plasmídeo recombinante Gox2036-pET28a(+) e Gox2036-pET29a(+) 118

5.3.1.17 Amplificação dos vetores recombinantes Gox2036-pET28a(+) e Gox2036-pET29a(+) por PCR de colônia 118

5.4.1 Expressão com IPTG para os vetores recombinantes pET28a(+) e pET29b(+) em E. coli BL21(DE3) 119

5.4.1.1 Analise do material proteico após indução dos vetores recombinantes pET28a(+) e pET29b(+) por gel de SDS-PAGE 120

5.4.1.1.1 Preparo da amostra 120

5.4.1.1.2 Preparo do gel SDS-PAGE 120

5.4.2 Purificação de proteína 121

5.4.3 Biocatálise empregando bactérias com plasmídeo pET28a/Gox2036 121

5.4.4 Biocatálise de resolução com lipases 123

5.4.4.1 Padrão dos acetatos propargílicos 123

REFERÊNCIAS 125
APÊNDICE A – PROPOSTA SINTÉTICA VISANDO A OBTENÇÃO DE DERIVADOS B-HIDROXILAMINICOS 130
APÊNDICE B – ESPECTROS DE RMN DE ^{1}H E ^{13}C 161
APÊNDICE C – SEQUENCIAMENTO DO GENE DA GOX2036 – COLÔNIA 4..... 202
ANEXO A - PROTOCOLO DE PURIFICAÇÃO DE DNA GENÔMICO E PLASMÍDEOS; 203

1 INTRODUÇÃO

1.1 Síntese assimétrica e Química Fina

O desenvolvimento de novas tecnologias quirais na área de síntese assimétrica é fundamental nos setores acadêmico e industrial. Isso se deve ao grande avanço nas pesquisas e da necessidade de se avaliar, de forma mais detalhada, drogas quirais.

Esse interesse está diretamente relacionado, sobretudo, à diferença na bioatividade que os fármacos quirais podem apresentar quando comparados à sua mistura racêmica. Recentemente, o uso de uma mistura racêmica para novos medicamentos só é permitido se todos os ensaios clínicos e toxicológicos forem realizados com cada enantiômero de forma separada(BIRKETT, 1989). Atualmente, em consequência disso, 56% dos fármacos vêm sendo comercializados como apenas um dos isômeros e em sua forma enantiomericamente pura(NGUYEN; HE; PHAM-HUY, 2006).

Baseado nisso, há a necessidade de se desenvolver metodologias sintéticas que visem a obtenção de um dos isômeros possíveis. No entanto, a busca por rotas de síntese baseadas em tecnologia quiral muitas vezes leva a um aumento significativo na geração de subprodutos e /ou rejeitos. Isso se deve ao fato de que, usualmente, rotas de síntese quirais apresentam um maior número de etapas, ou o uso de quantidades equimolares de auxiliares quirais. Sendo assim, com o intuito de se diminuir o impacto ambiental que esses resíduos possam causar, vem se estimulando cada vez mais, e de forma significativa, o desenvolvimento de rotas de síntese mais sustentável(ZYGMUNT et al., 2009).

Com isso, medidas e princípios mais ambientalmente amigáveis foram desenvolvidas e intituladas de Química Verde. Nelas as propostas de ações são ambientalmente menos impactantes desde o planejamento do produto até sua síntese, processamento, análise e seu destino após o uso(MARCO et al., 2019).

Por isso, o desenvolvimento de métodos que visem a obtenção de substâncias de forma mais sustentável torna-se essencial. Baseado nisso, criou-se os 12 princípios da química verde onde o emprego de biocatalisadores tornou-se uma alternativa, interessante, pois além de permitir a obtenção de compostos de forma enantio- estéreo- e regioseletiva, e ser economicamente viável, o processo é mais limpo.

Além disso, a aceleração das reações químicas por catálise pode ajudar, por exemplo, na economia de energia e menor geração de resíduos. Para os reagentes bioquímicos, quanto maior for a taxa de conversão e sua seletividade, maior será a sua viabilidade como reagente em reações quimicas(SHELDON; WOODLEY, 2018).

O crescente aumento no uso de catalisadores naturais é decorrente, principalmente, da necessidade em substituir catalisadores metálicos (geralmente constituídos de metais pesados ou de transição, custosos e mais agressivos ao ambiente) por catalisadores de origem natural(DAVIS; BOYER, 2001). Cerca de 10% do total das fármacos comercializados empregam rotas utilizando biocatalisadores(MATSUDA; YAMANAKA; NAKAMURA, 2009). Nestas, em sua maioria, as reações mais empregadas são hidrólise, esterificação, oxidorredução e desracemização.

Para obtenção de substratos orgânicos de forma seletiva, enzimas podem ser empregadas como catalisadores convencionais, e as propriedades que essas desempenham, originalmente no meio biológico,(DAVIS; BOYER, 2001) podem ser exploradas frente a substratos de origem sintética. A reatividade diferenciada que estes biocatalissadores podem exibir podem ser empregadas em rotas denominadas de quimioenzimáticas. Para isso, é primordial estabelecer o biocatalisador, empregando-o de forma isolada (enzima pura) ou através de células integras de microrganismos.

1.2 Biocatálise na indústria farmacêutica

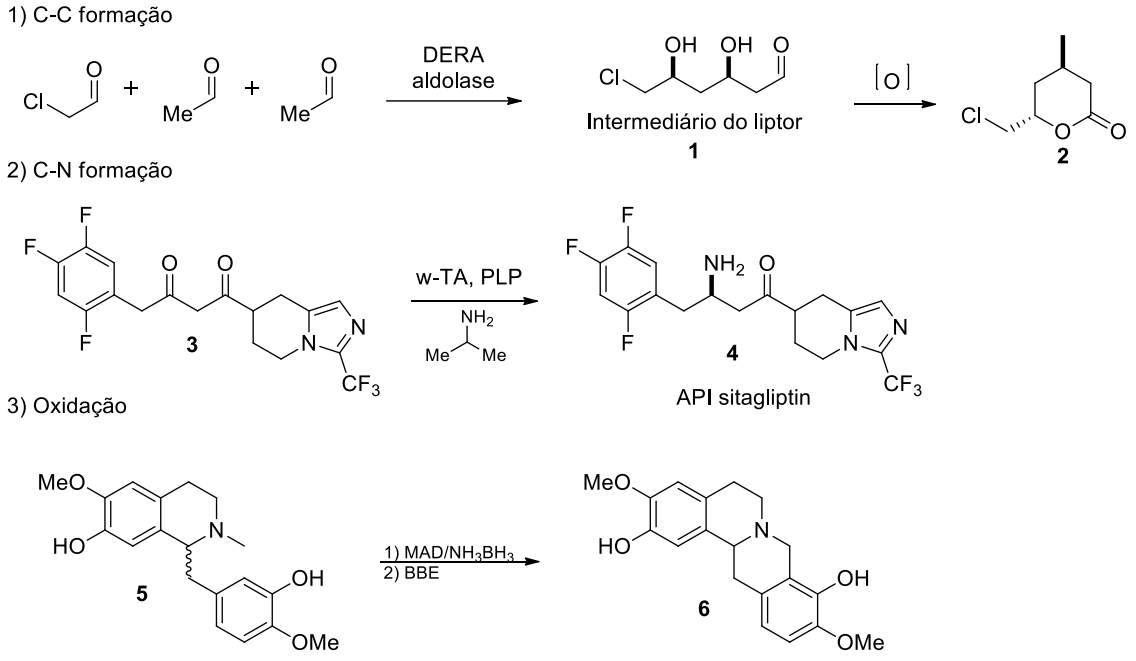
Nas rotas indutrais, que utilizam biocatalisadores nos processos sintéticos, alguns exemplos de reações encontradas são hidrólise, condensação, formação de ligação C-C, formação de ligação C-X, oxidação entre outros, representados no Esquema 1(HÇNIG et al., 2017).

Os processos biocataliticos diferem das sínteses químicas convencionais devido, principalmente, às propriedades dos biocatalisadores. Estabilidade das proteínas, cinética enzimática de atuação, condições industriais de processo são algumas das características. Essas propriedades por sua vez devem-se pelas atividades desempenhadas nas células, como

crescimento, indução de atividade enzimática ou uso de vias metabólicas para reações em múltiplos estágios(BISSWANGER, 2014).

Dessa maneira, independentemente de sua origem, a aplicação das enzimas, seja nos setores acadêmicos ou industriais, vem solidificando a biocatálise como uma área de grande importância para a produção de compostos com alto valor e atividade agregados. Essas propriedades catalíticas das enzimas estão relacionadas às funções que elas exercem originalmente no meio biológico(DAVIS; BOYER, 2001).

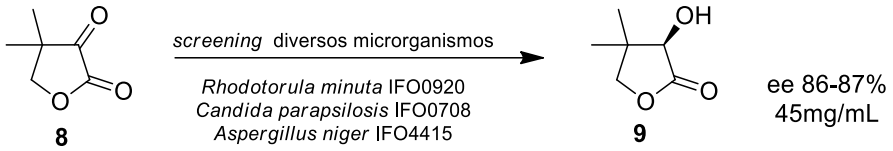
Esquema 1 - Transformações sintéticas industriais desempenhadas por enzimas



Existem alguns desafios para a obtenção de biocatalisadores e para o desenvolvimento bem-sucedido de um processo baseado em biotransformação, como seguir um planejamento estratégico para uma triagem enzimática (*screening*), e consequentemente potencializar os biocatalisadores. No desenvolvimento de novos processos, portanto, a primeira meta é estabelecer o biocatalisador, podendo obtê-lo na sua forma isolada (purificação proteica), comercial, ou através da célula integra, presente em microrganismos, por ser o ambiente natural das enzimas.

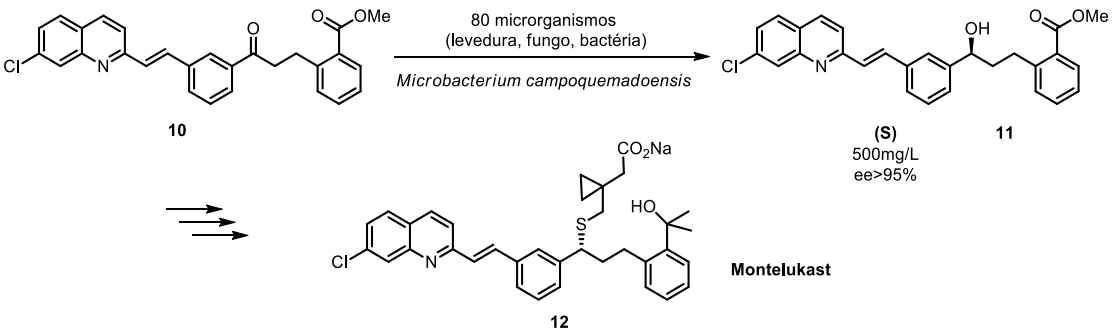
Realizar uma triagem enzimática com microrganismos, é maneira mais indicada para investigar possíveis enzimas candidatas a realizar novas biotransformações. Em 1991(NAKAMURA; YAMANAKA; HARADA, 2003), por exemplo, o auxiliar quiral na síntese assimétrica da D(-)Pantolactona **9** (atualmente comercial; 25g – R$501,00), envolveu a triagem com diversos microrganismos, entre eles 191 bactérias e 280 leveduras/fungos (entre outras fontes) para obtenção do produto enantiomérico com *ee* 86-87%, partindo da redução da Cetopantoil lactona **8**, onde os que melhor apresentaram redução foram os fungos *Candida* e *Aspergillus*, e a levedura *Rhodotorula* (Esquema 2).

Esquema 2 - Síntese da D(-)Pantolactona usando microrganismos para bioredução



Outro exemplo foi a produção do fármaco Montelukast **12**, comercializado para o tratamento asmático e alergias. Na etapa sintética de obtenção do produto enantiomérico, a investigação empregou cerca de 80 microrganismos, onde a bactéria *Microbacterium campoquemadoensis* (MB5614) apresentou-se como melhor biocatalisador após reduzir a carbonila em **10** obtendo o composto **11** com *ee* 95% (Esquema 3)(NAKAMURA; YAMANAKA; HARADA, 2003).

Esquema 3 - Síntese do fármaco Montelukast empregando screening de 80 microrganismos para etapa enantiomérica



Nos últimos 15 anos houve uma migração acentuada na natureza do biocatalizador. A eficácia em identificar, obter, testar e otimizar biocatalisadores para a síntese de intermediários

farmacêuticos foi demorada para gerar um impacto significativo de retorno. Os fatores principais que permitiram levar a um aumento na capacidade de desenvolver e implementar rotas biocatalíticas foram primeiro o acesso facilitado de obter enzimas, e o segundo a capacidade desempenhada em gerar essas proteínas por manipulação genética e engenharia molecular(TRUPPO, 2017).

Assim o uso industrial de reações enzimáticas requer uma combinação multidisciplinar de diferentes técnicas, como triagem de enzimas com propriedades apropriadas, o aperfeiçoamento de propriedades das enzimas via técnicas de biologia molecular, o aperfeiçoamento de propriedades das enzimas via técnicas de imobilização(SHELDON; WOODLEY, 2018),(LI; WANG; REETZ, 2018),(LIU; WU; LI, 2018). Porém para que se encontre a enzima ideal é necessário sobretudo identificar as reações desejadas através da abrangente gama de características funcionais das enzimas.

1.3 Enzimas: classificação e obtenção

Enzimas obtidas de microrganismos naturais vêm sendo empregadas, desde meados dos anos 60, para fins catalíticos industriais.(LAMBERT; MEERS; BEST, 1983) As estimativas mostram que desde 2008 a utilização dessas enzimas já correspondia a cerca de 90% do mercado(ILLANES, 2008). Este fato está associado ao excelente metabolismo celular desempenhado por eles, e consequente produção enzimática.

O interesse em fontes enzimáticas microbiológicas deve-se principalmente as funções desempenhadas pelos microrganismos, através do seu metabolismo energético. A versatilidade em realizar reações juntamente com a facilmente de reprodução, devido as necessidades nutricionais, os microrganismos se mostram como pioneiro para a descoberta de novas enzimas.

Estruturalmente, as enzimas são constituídas, em média, de 100 a 1000 aminoácidos, ligados covalentemente entre si por ligações peptídicas. Os grupamentos contidos na posição α dos aminoácidos apresentam natureza polar (hidrofílica), ou não polar (hidrofóbicas), que através das repulsões e atrações leva a uma conformação tridimensional (estrutura secundária) que levam ao enovelamento. O enovelamento dará as características intrínsecas da enzima(ILLANES, 2008). Através desse comportamento de enovelamento, as enzimas geram

regiões denominadas de sítio ativo. Essa região é onde as enzimas desempenham sua atividade catalítica.

A região do sítio ativo da enzima é formada por um arranjo específico de aminoácidos que permite à enzima desempenhar seu papel(DRAUZ; GRÖEGER; MAY, 2012). Os substratos interagem/posicionam-se no sitio ativo de forma ligada ou não ligada, levando a transformação do grupo funcional do substrato e com isso a biotransformação para formação dos produtos(ILLANES, 2008). A classificação da União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular (IUBMB) divide as reações catalisadas por enzimas em seis grupos principais (Tabela 1).

Os processos biocatalíticos diferem das sínteses químicas convencionais devido, principalmente, às propriedades de cinética e alto grau de conversão dos biocatalisadores. Outras características importantes são a estabilidade térmica e a possibilidade de realizar as reações tanto em meio aquoso quanto empregando solventes orgânicos.

As propriedades das enzimas se devem às suas atividades desempenhadas nas células, como crescimento, indução de atividade enzimática ou uso de vias metabólicas para reações em múltiplos estágios.(BISSWANGER, 2014)

A forma e a origem do biocatalisador empregado para biotransformações podem ser diversas. A decisão de utilizar enzimas isoladas ou microrganismos, ambos na sua forma livre ou imobilizada, depende de alguns fatores como tipo de reação, necessidade ou não de reciclar os cofatores e da escala em que será procedida a biotransformação(REETZ, 2013). Demirijian e colaboradores descreveram em 1983 procedimentos e planejamentos necessários para a descoberta de novas enzimas com potencial de catálise(DEMIRJIAN; SHAH; VARAS, 1991).

Existem alguns desafios para o desenvolvimento bem-sucedido de um processo de biocatálise comercial. Inicialmente, um plano de trabalho geral para explorar uma solução de biocatalisadores é realizado, seguindo um planejamento estratégico para uma triagem enzimática (*screening*). Dentre as fontes de enzimas capazes de biotransformar substratos sintétcos em álcoois secundários em sua forma enantiomeicamente pura ou enriquecida, as lipases e as oxidoredutases são as mais estudadas. As hidrolases por permitirem a resolução de álcoois e as oxidoredutases por promoverem a redução assimétrica de carbonilas(REETZ, 2013).

Tabela 1 - Classificação das enzimas por grupos principais[24]

Entrada	Classe	Tipo de reação catalisada
1	Oxidoredutases	Enzimas que catalisam reações de oxidação-redução envolvendo oxigenação, como C-H → C-OH, ou remoção de hidrogênio como CH(OH) → C=O e CH-C → C=C.
2	Transferases	Enzimas que mediam a transferência de grupos acila, açúcares, fosforil e grupos aldeídos ou cetonas, de uma molécula para outra.
3	Hidrolases	Enzimas que catalisam reações de hidrólise e formação de glicosídeos, anidridos e ésteres, bem como amidas, peptídeos e outras funções contendo a ligação C-N.
4	Isomerases	Podem efetuar várias isomerizações, incluindo migração da ligação C=C, isomerização *cis-trans* e racemização.
5	Liases	Essas enzimas catalisam reações de adição, usualmente de HX, a duplas ligações como C=C, C=N, e C=O, e também os processos reversos
6	Ligases	São também chamadas sintetases e mediam a formação ou clivagem de ligações C-C, C-O, C-S, C-N e ésteres de fosfato

Fonte: WATSON, J. D; 2015.

1.3.1 Oxidorreductases

As oxidoredutases são enzimas que catalisam reações pela transferência de elétrons e ou abstração de prótons(HOLLMANN; SCHMID, 2004), e são amplamente distribuídas entre organismos microbianos, vegetais e animais.

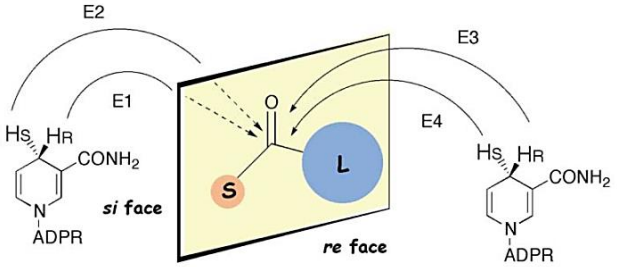
Entre as reações que essas enzimas desempenham, as reações redox compreendem uma grande variedade de transformações sintéticas essenciais. Atualmente, mais de 25% das enzimas conhecidas são oxidoredutases, e devido à sua biodiversidade e atividades diferentes, as oxidoredutases foram classificadas de acordo com a natureza do substrato oxidante como desidrogenases, oxigenases (monooxigenases e dioxigenases), oxidases e peroxidases(BURTON, 2003).

Embora exemplos industrialmente viáveis sejam provenientes de todos os grupos, a família de desidrogenases / redutases representa um alvo de estudo altamente atraente(XU, 2005), pois inclui um grande número de enzimas bem caracterizadas e prontamente acessíveis à comunidade científica e industrial.

As desidrogenases e redutases são enzimas que catalisam a redução de compostos carbonílicos e necessitam de um cofator para regenerar a atividade catalítica, tais como NADH, NADPH(OPPERMANN; MASER, 2000),(NAKAMURA; YAMANAKA; HARADA, 2003). As enzimas desidrogenase/redutase (SDR) compreendem um ampla e crescente família de oxidoredutases dependente de cofator, e atualmente chegam a 47000 sequências anexadas no banco de dados da "*Protein Data Bank*"(LIU et al., 2014)

O mecanismo de transferência de hidreto das oxidoredutases pode ser realizado por 4 diferentes maneiras, que vão depender do tipo de enzima que realiza a função redutora, e da característica das faces dos compostos carbonílicos (Figura 1). (NAKAMURA; YAMANAKA; HARADA, 2003)

Figura 1 - Mecanismo de transferência de hidreto para a carbonila em reação enzimáticas com oxidoretutases



Fonte: (NAKAMURA; YAMANAKA; HARADA, 2003)

Para a obtenção de álcoois quirais, importantes intermediários na síntese de novos fármacos temos as oxidoredutases como rotas de obtenção, em sistemas redox, por reduzem a carbonila enantioméricamente, e hidrolases, por resolução, por permitirem a enantioseletividade de um dos enantiômeros numas mistura racêmica, hidrolisando ou acetilando um dos enanentiômeros.(REETZ, 2013)

1.3.1.1 Enzimas oxidases comerciais

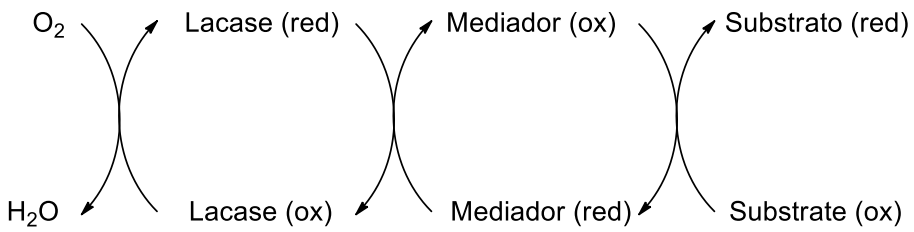
As Lacases (E.C. 1.10.3.2) pertencem à chamada família das oxidases azul-cobre(VOHRA; SATYANARAYANA, 2003). A função fisiológica desses biocatalisadores, que pode

ser secretado ou intracelular, é diferente nos vários organismos, mas todos catalisam processos de polimerização ou despolimerização. Nas plantas, elas estão envolvidas na formação da parede celular e, juntamente com as peroxidases, na lignificação: não há dúvida de que as Lacases estão entre as principais enzimas envolvidas nos processos de deslignificação por fungos de podridão branca(RIVA, 2006).

Mecanicamente, as reações de oxidação biocatalítica se enquadram em duas categorias: desidrogenação e reações de oxifuncionalização. No caso desidrogenativo, uma molécula receptora (principalmente um cofator de nicotinamida ou flavina,) abstrai um hidreto de um átomo de carbono substituído por heteroátomo.(DONG et al., 2018)

A oxidação aeróbica é um dos métodos mais sustentáveis e ecológicos para um processo de alta eficiência e redução de resíduos (fator E)(SHELDON, 2017). Entre eles, o uso de mediadores de radicais nitroxila ativados, como o TEMPO, provou ser uma alternativa valiosa para esta proposta. Apesar da oxidação de álcoois usando TEMPO como mediador ser bem conhecido, não há ainda nenhuma tentativa para estabelecer uma via catalítica quimioenzimáticas geral para a oxidação aeróbica de álcoois propargílicos secundários em alquinona em meios aquosos relatados.

Esquema 4 - Função de um mediador na atividade oxidativa da enzimática da Lacase



1.3.2 Hidrolases

As hidrolases são as enzimas mais importantes e amplamente utilizadas para aplicações industriais que excedem de longe as enzimas de outras classes(SCHMID et al., 2001). As enzimas dessa classe geralmente aceitam mais de um substrato e não é incomum que algumas enzimas dessa classe apresentem uma extensa gama de substratos, formando assim uma superfamília distinta.

Entre as hidrolases, as lipases são os biocatalisadores mais empregados, por aceitarem uma grande variedade de substratos de origem não natural e com importância

industrial(COSTA; DE AMORIM, 1999). O elevado potencial tecnológico destas enzimas se dá pela elevada disponibilidade, tolerância a diversos substratos, estabilidade em condições adversas, como emprego de solventes orgânicos como meio reacional e temperaturas mais altas.

As lipases estão entre as enzimas mais empregadas como biocatalisadores em síntese orgânica. As lipases (E.C. 3.1.1.3) são enzimas hidrolíticas presentes em diversos organismos, onde a função desempenhada por elas é a catálise hidrolítica de triacilgliceróis aos ácidos graxos correspondentes e glicerol(COSTA; DE AMORIM, 1999).

Essa classe de enzimas pode realizar tanto a hidrólise quanto a acetilação enantiosseletiva, levando ao produto resolvido com rendimento de até 50% para ambos os enantiômeros. Estas enzimas tem como característica sua estabilidade térmica, a ausência do uso de cofatores para regenerar o sítio catalítico, e a possibilidade de usar solventes orgânicos no processo. Dessa forma são muito utilizadas para obtenção de compostos enantioméricos, entre eles álcoois e acetatos, para síntese de novo compostos com atividade biológica(MACINTOSH; TODA, 2004).

1.3.2.1 Resolução cinética

Na resolução cinética a formação tanto de produto como substrato varia ao longo da reação. Dois conceitos importantes para verificar a eficiência das reações catalisadas por enzimas são o excesso enantiomérico (*ee*) e a taxa enantiomérica E. A pureza enantiomérica de qualquer composto é expressa em termos de excesso enantiomérico (*ee*) definido pela Equação 1, onde C_S e C_R são as concentrações do enantiômero S e do enantiômero R na mistura, respectivamente:

Equação 1 - Cálculo do excesso enantiomérico em Resolução Cinética Enzimática

$$\%\, ee_R = \frac{|R - S|}{R + S}\, x\, 100, \qquad ee = \frac{|C_s - C_R|}{C_s - C_R}$$

Como as lipases são quirais, elas possuem a capacidade de distinguir entre os dois enantiômeros de uma mistura racêmica. O parâmetro de escolha para descrever a

estereosselctividade ou a enantioseletividade da reação catalisada por lipase é a através da razão enantiomérica E.

O valor E é definido como a razão de especificidade constante para os dois enantiômeros.. A razão enantiomérica *E* pode também ser calculada a partir das concentrações dos enantiômeros, segundo a Equação 2, a RCE que apresenta um valor de E a 1, é considerada uma reação não seletiva. Assim, todos os processos devem visar o baixo fator E possível. Uma reação não seletiva tem um valor E de 1, enquanto um valor E acima de 20 é o mínimo para uma resolução aceitável (STRAATHOF; JONGEJAN, 1997).

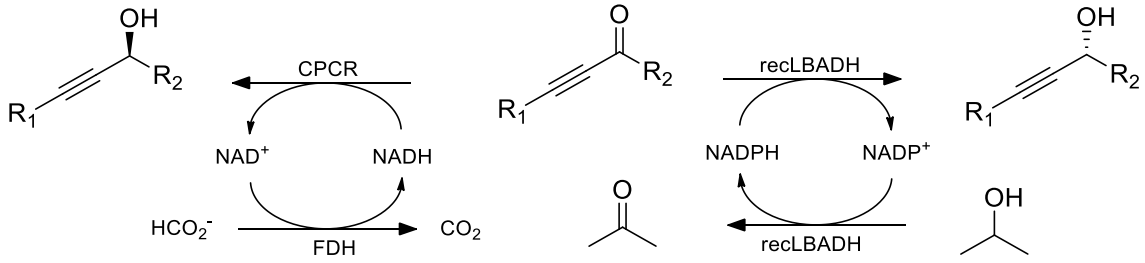
Equação 2 - Cálculo da razão enantiomérica (E) nas reações de Resolução cinética

$$E = \frac{\ln\,(C_s/C_{S0})}{\ln\,(C_R/C_{R0})}$$

1.4 Álcoois secundários quirais como intermediários a partir de compostos carbonílicos

Entre os precursores quirais, os álcoois propargílicos se destacam por poderem ser utilizados como intermediários, ou como blocos de construção, na síntese de diversos produtos naturais, incluindo alcaloides, feromônios, antibióticos, entre outros, que possuem atividade biológica(SCHUBERT et al., 2001). A redução assimétrica de cetonas propargílicas é um importante ponto de partida para a síntese formal. Schuber *et al*. reportou atividade redutora de duas enzimas, uma desidrogenase e outra redutase, em cetonas propargílicas em bons excessos e rendimentos(SCHUBERT et al., 2001). O mecanismo geral de redução é exposto no esquema 5.

Esquema 5 - Redução esquemática com diferentes enzimas oxidoredutases para obtenção de álcoois quirais

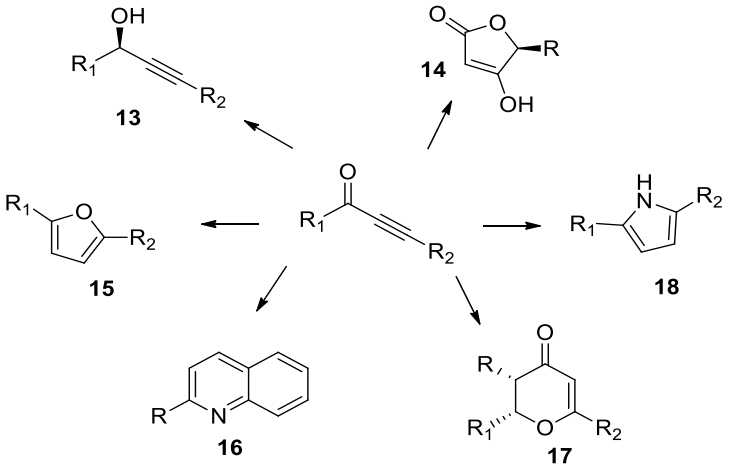


As reações de oxidação por serem umas das reações fundamentais em síntese orgânica, permitem a obtenção de compostos pró-quirais, e consequentemente um dos percursores para obtenção de álcoois quirais, são transformados, com a ajuda de microrganismos ou catalizadores, em moléculas de alta pureza ótica, sendo corriqueiramente empregado nos processos industriais(GALLETTI et al., 2014). Entretanto as metodologias ainda empregadas para oxidação de álcoois secundários sofrem apelos pois esses métodos precisam de duras condições experimentais e do uso de solventes orgânicos tóxicos, causando maior impacto ambiental como resíduos e poluição.

Devido à soma desses fatores, continua sendo necessário desenvolver metodologias mais sustentáveis, visando o aumento da eficiência de massa, e reações com economia de átomos, levando a metodologia vantagens significativas.

Síntese envolvendo compostos carbonílicos α,β-insaturados são importantes, principalmente devido ao sistema permitir a formação de ligação C-C por ser um sistema rico em elétrons, permitindo assim obter uma gama de blocos de construção relevantes para o setor farmacêutico. (SENGEE; SYDNES, 2011),(WHITTAKER; DERMENCI; DONG, 2016). Entre os compostos que podem ser sintetizados através de compostos acetilênicos estão os álcoois propargílicos quirais, lactonas, compostos furânicos e pirrólicos, quinolinas, entre outros. Estes, por sua vez, são intermediários sintéticos com relevância, e a obtenção destes blocos de construção torna-se significativo (Esquema 6)(WHITTAKER; DERMENCI; DONG, 2016).

Esquema 6 - Produtos obtidos através de reações com cetonas α,β conjugadas acetilênicas



As bio-oxidações apresentam como vantagem os altos níveis de seletividade (regio, quimio e estéreo) que são pertinentes e confiáveis quando se pretende emprega-los por exemplo na química fina ou indústria farmacêutica, que contém estruturas complexas e grupos funcionais sensíveis à oxidação, tornando-as, consequentemente, metodologias com forte valor agregado(LIU; WU; LI, 2018).

A presença de sistema um acetilênico vizinho a carbonila envolve uma gama de reações de adição caracterizado pela facilidade em sofrer ataque nucleofílico, favorecido por duas características estruturais principais, a presença de sistemas π rico em elétrons C=O e C≡C, e a eletronegatividade do oxigênio que com seu caráter retirador de elétrons permite o ataque ao carbono.

Portanto, uma estratégia sintética para obtenção de inonas pode ser realizado através da oxidação de álcoois, uma rota usual em síntese orgânica. Oxidação na sua maioria é fundamental em compostos orgânicos, entre eles os carbonílicos como cetonas, ésteres, aldeídos. Atualmente devido à grande necessidade de obtenção dos compostos carbonílicos, metodologias são frequentemente traçadas e melhoradas, para torna-las viáveis com rotas buscando as melhores condições.

A oxidação de álcoois para os correspondentes compostos carbonílicos é uma das mais importantes reações em química orgânica, e tem sido por tempos objetivo de muitos grupos de pesquisa. Atualmente há diversas maneiras de oxidações de álcoois secundários. Dentre as mais usuais estão oxidações de Dess-Martin, Jones, Oppenauer e Swern(LUCA et al., 2001). Porém algumas dessas metodologias apresentam elevada toxicidade, resíduos com peso molecular elevado, custo alto. A reação envolvendo periodinana de Dess-Martin (descoberta em 1983(CLAYDEN; GEEVES; WARREN, 2009)), por exemplo, apesar de ser bem utilizada para oxidação de álcoois secundários por sua seletividade, apresenta como desvantagem a obtenção de um intermediário (IBX) na síntese da periodana, que é explosivo, além da necessidade equivalente de álcool, gerando assim resíduos com peso molecular elevado.

Assim, a maioria destes procedimentos exige muitas vezes reagentes tóxicos, maior tempo de reação, alta temperatura, metais de transição, desenvolvendo assim problemas de segurança e custo dos reagentes utilizados. Portanto, encontrar metodologias que supram esses contratempos e supere as limitações dos métodos acima relatados são necessárias.

Especialmente para a indústria há diversas vantagens: redução de poluição, baixo custo, seletividade, simplicidade no processo e manuseio (esses fatores são especialmente importantes na indústria).

1.4.1 Desracemização por estereoinversão

Transformações assimétricas em substratos pró-quirais, em alto rendimento e excesso enantiomérico, representam uma opção interessante para síntese de blocos de construção(TURNER, 2010). No entanto, quando procura-se obter substratos quirais via compostos pro-quirais há duas principais rotas, via catálise química ou biocatálise. A primeira envolve catalisadores via hidrogenação assimétrica que necessita de catalisadores químicos, na sua maioria de metais como Rutênio, ou reagentes quirais de Boro(SHATSKIY et al., 2015). As obtenções via química de álcoois quirais tem caído em desuso visto o alto valor dos catalisadores. Assim alternativas biocatalíticas tem sido explorada para obtenção de substratos quirais enriquecidos.

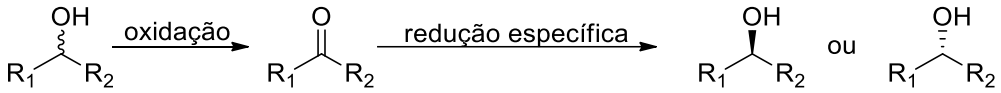
A desracemização de racematos alcoólicos fornece uma abordagem promissora por permitir ultrapassar o limite de rendimento de 50% dos métodos de resolução cinética usados tradicionalmente para obtenção de álcoois quirais. A desracemização de um racemato pode ser alcançada por resolução cinética dinâmica, esteroinversão ou enantioconvergência. Os sistemas de desracemização cíclica diferem tradicionalmente da inversão estéreo no uso de uma reação irreversível não seletiva combinada com uma segunda transformação seletiva que acumula o enantiômero que não é convertido(TURNER, 2010).

Como tal, um processo típico de desracemização cíclica envolve oxidação seletiva catalisada por enzima em um intermediário proquiral, que é então reduzido por redução química não seletiva (NASÁRIO et al., 2016). Dessa maneira, a desracemização por estereoinversão de compostos racêmicos torna-se uma alternativa promissora, pois permite através de racemato, obter o enantiômero de interesse em conversões de até 99%, via redução pro-quiral de compostos carbonílicos.

Nela a obtenção dos álcoois é feita inicialmente via oxidação não seletiva de álcoois racêmicos para as cetonas correspondentes, seguida da redução enantiosseletiva para apenas um dos enantiômeros do álcool (Esquema 7). No desenvolvimento dessas metodologias o

desafio torna-se encontrar enzimas ou microrganismos que permitam de maneira promissora, obter cetonas com altos rendimentos na etapa de oxidação, seguida de enzimas com alto poder redutor enantiosseletivo.

Esquema 7 - Processo de desracemização por estereoinversão



2 OBJETIVO: GERAL E ESPECÍFICOS

Explorar metodologias de obtenção de precursores quirais via rotar biocatalíticas, empregando enzimas comerciais e ezimas expressadas via DNA recombinante. Com isso, o objetivo deste trabalho foi o desenvolvimento de duas rotas quimioenzimáticas distintas, porém complementare, de obtenção de cetonas propargílicas e álcoois propargilicos quirais, usualmente aplicados como blocos de construção na síntese de fármacos opticamente ativos e produtos naturais. Essa última, de redução, de fundamental importância para o grupo, uma vez que é o primeiro trabalho do laboratório envolvendo a técnica de DNA recombinante.

Para tanto foram traçados os seguintes objetivos específicos:

- Síntese dos álcoois racêmicos com bons rendimentos;
- Desenvolvimento de uma metodologia para obtenção de Inonas em meio aquoso, a partir da oxidação dos álcoois;
- Estudo minucioso das condições experimentais para realizar a oxidação aeróbica de álcoois propargílicos, em meio aquoso, empregando o sistema Lacase/TEMPO;
- Efeito da temperatura, co-solventes e mediador frente as biooxidações;
- Construção de plasmídeos de clonagem e expressão contendo o gene da enzima proveniente de *Gluconobacter oxydans;*
- Proposta de metodologia de desracemização das Inonas, objetivando desenvolver redução assimétrica através da expressão gênica de uma carbonil redutase;
- Comparação com metodologias de resolução cinética enzimática, empregando algumas lipases comerciais.

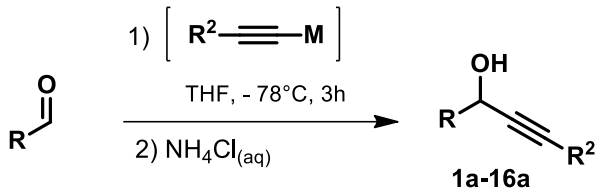
3 RESULTADOS

3.1 Síntese dos Padrões Racêmicos

Devido à baixa diversidade ou o alto custo de alguns álcoois propargílicos secundários em sua forma quiral, uma biblioteca desta classe de composto foi preparada. A estratégia de síntese, baseou-se na alquinilição de 20 aldeídos, contendo diferentes grupamentos.

Para os compostos de **1a-16a**, a preparação baseou-se em empregar reações de adição nucleofílica de acetliletos metálicos à carbonila de aldeídos (Esquema 8). Os produtos provenientes das reações de adição 1,2-, permitiu a preparação de uma biblioteca de compostos. Essas reações foram conduzidas em temperaturas baixas (-78° C), utilizando THF seco como solvente, e o progresso das reações foi acompanhado por cromatografia em camada delgada (CCD).

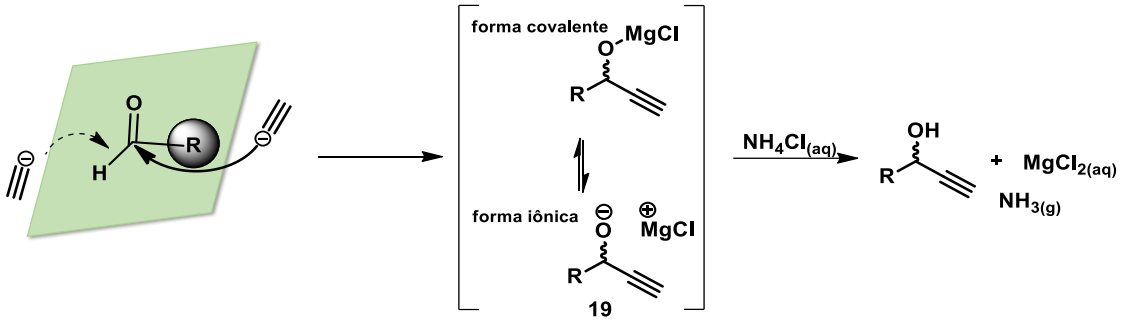
Esquema 8 - Síntese dos álcoois racêmicos



Nas reações em que o reagente de Grignard disponível comercialmente, foi utilizado o cloreto de etinilmagnésio. Já àquelas reações que necessitavam de análogos de organometálicos não disponíveis comercialmente, reagentes organilítio, foram previamente preparados, via desprotonação do acetileno com *n*-BuLi.

A reação dos compostos organometálicos, envolveu a reação de adição 1,2 à carbonila dos aldeídos pelos acetiletos, levando a formação de um alcóxido **19** e nova ligação C-C. Ao consumo total do material de partida, o intermediário foi protonado com solução aquosa de NH_4Cl, levando a formação dos álcoois de interesse (Esquema 9).

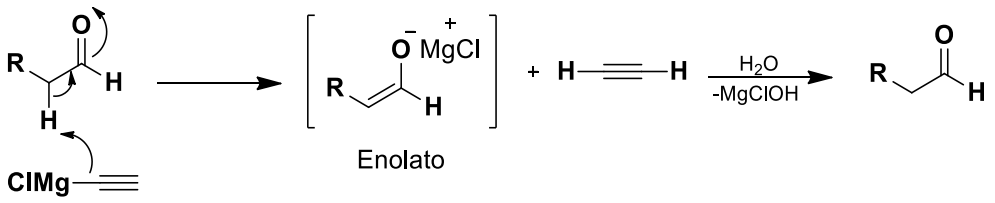
Esquema 9 - Mecanismo de reação dos álcoois propargílicos



No geral, os álcoois propargílicos foram obtidos em rendimentos de bons a excelentes (75-100%). Além disso, se apesentam, em sua maioria como óleos amarelados e são estáveis a temperatura ambiente.

A tentativa de utilizar aldeídos contendo hidrogênios enolizáveis na molécula, levou a baixos rendimentos. Esses rendimentos estão relacionados ao fato de aldeídos alifáticos terem como característica conterem um próton H_α carbonílicos ácido (pKa 19-22). Nesse caso o reagente de Grignard agiu como uma base, capturando o próton ácido, levando a formação do enolato, que compete com reações nucleofílicas a carbonilas. Essa reação é intitulada como reação prótica (Esquema 10)(ISENMANN, 2013). Dessa maneira os estudos de oxidação foram conduzidos apenas com o álcool alifático dec-1-yn-3-ol (**15a**).

Esquema 10 - Mecanismo de reação prótico com reagente de Grignard

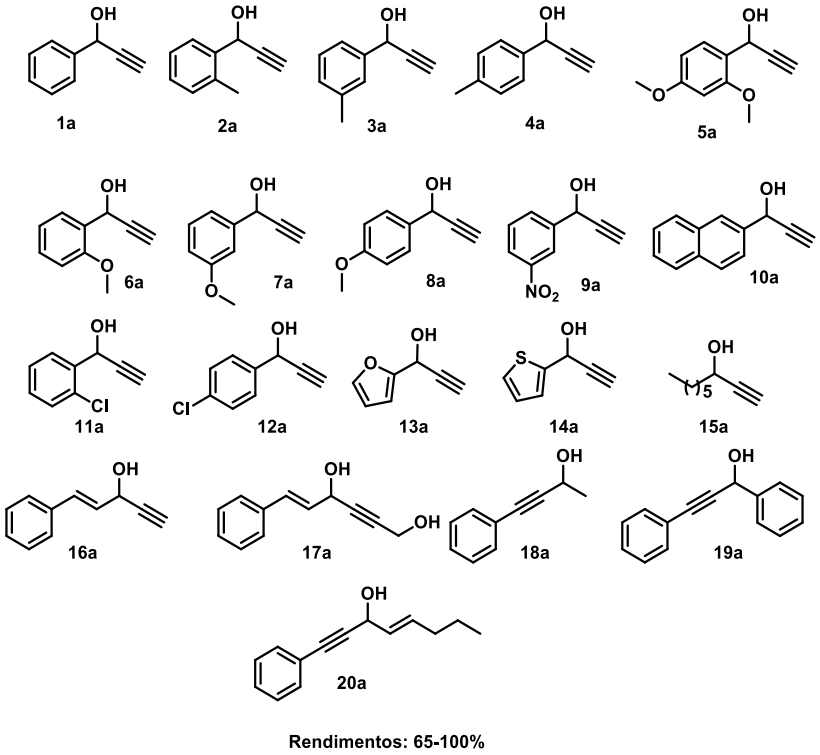


Dessa maneira, sintetizou-se uma série de álcoois propargílicos, (**1a-20a**) alguns aromáticos contendo substituintes na posição *orto*, *meta* e *para* (**2a-12a**), outros com heteroaromáticos (**13a e 14a**), alifáticos (**15a**), álcoois propargílicos com duplas (**16a-17a**) e álcoois com a região acetilênica interna (**18a-20a**) (Figura 2).

A metodologia de preparação dos compostos **18a-20a,** contendo a função acetilênica interna, foi realizada empregando o composto fenilacetileno como reagente alquinil lítio. Para

isso realizou-se a desprotonação do fenilacetileno com n-Butil lítio seguida da adição de 1,3 equivalentes do aldeído. Para obtenção do composto **18a** em excesso de acetaldeido foi necessário pois o acetaldeído tem um ponto de ebulição de 20,2°C e pode ser facilmente volatilizado.

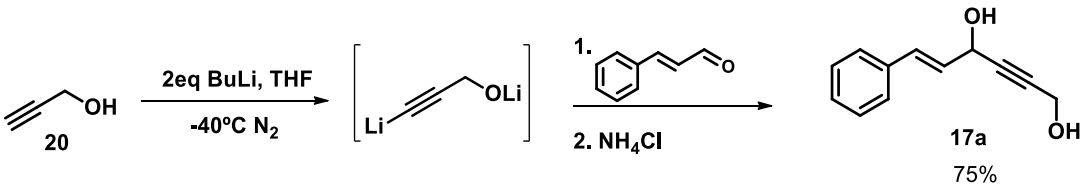
Figura 2 - Álcoois propargílicos sintetizados



Fonte: Autora (2020)

Para obtenção do diol porpargílico (**17a**), foi empregado o álcool comercial propargílico prop-2-in-1-ol, como fonte acetilênica do composto. Nesse caso foram necessários 2eq de BuLi. O primeiro equivalente para desprotonar o hidrogênio da hidroxila, e o segundo para desprotonar o hidrogênio acetilênico do álcool propargílico **20** (Esquema 11).

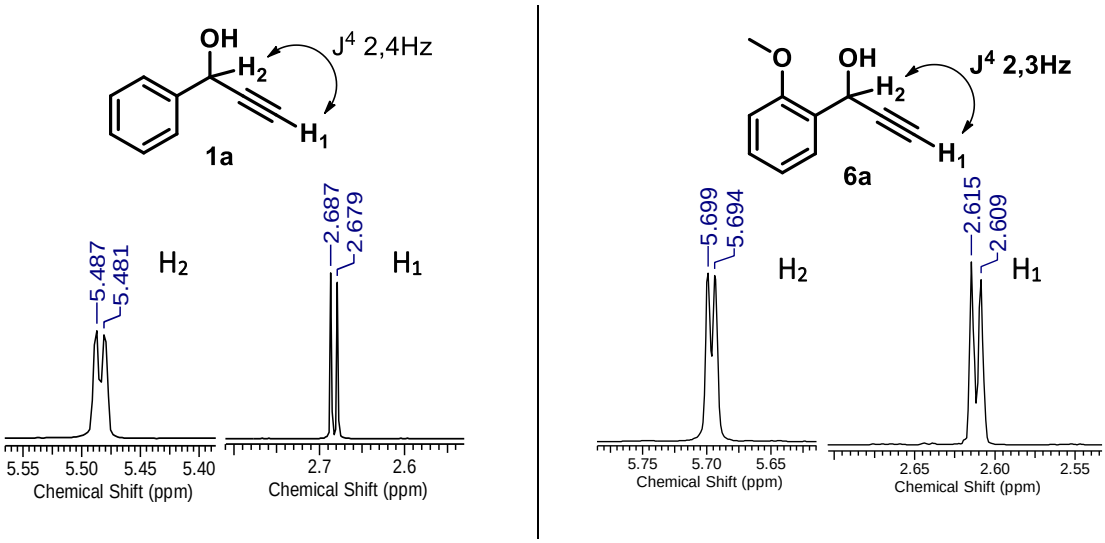
Esquema 11 - Preparação do diol propargílico 17a



A partir dos espectros obtidos de RMN de ^{1}H e ^{13}C dos respectivos álcoois, foi possível observar um padrão nos álcoois propargílicos evidenciado pelas funções químicas presentes nas moléculas. Nos espectros de RMN de ^{1}H observou a presença de dupletos na região entre δ2,0-3,0, referente ao hidrogênio alquílico terminal (acoplamento J^4 com o carbinólico), e na região de δ5,0-6,0 do hidrogênio carbinólico com o alquino. Com a porção acetilênica a distância de ligação é encurtada permitindo um acoplamento entre 2-3Hz (ROBERT M. SILVERSTEIN, FRANCIS X. WEBSTER, 2006). (Figura 4).

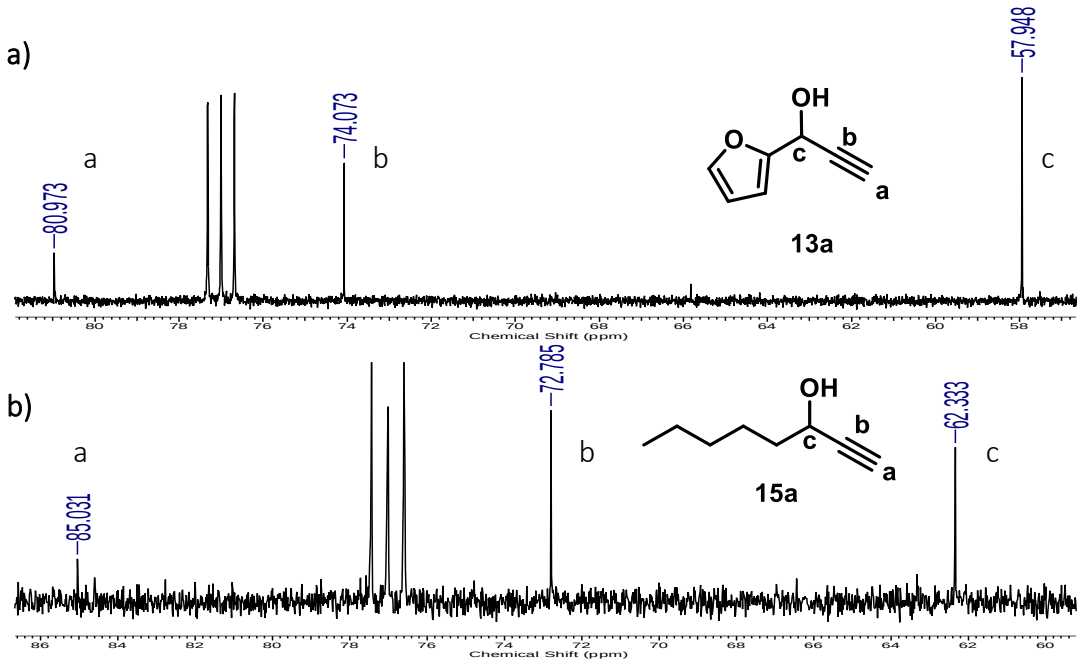
A análise dos espectros de RMN de ^{13}C também apresentam os sinais característicos referentes às funções nos álcoois propargílicos. Um deles está nos carbonos acetilênicos encontrados na região de 90-60ppm, onde o sinal de menor intensidade refere-se ao carbono mais substituído, nesse caso o carbono quaternário. Outra característica está no carbono carbinólico encontrado em regiões de 50-70ppm (Figura 4). Os compostos alifáticos apresentam a mesma características, porém com regiões de desblindagem menores devido à ausência da influência aromática.

Figura 3 - Dupletos referentes ao acoplamento J4 dos 1H carbinólico e acetilênico do álcool 1a e 6a: a) dupletos álcool 1a (RMN 300HZ); b) dupletos álcool 6a. (RMN 400Hz).



Fonte: Autora (2020)

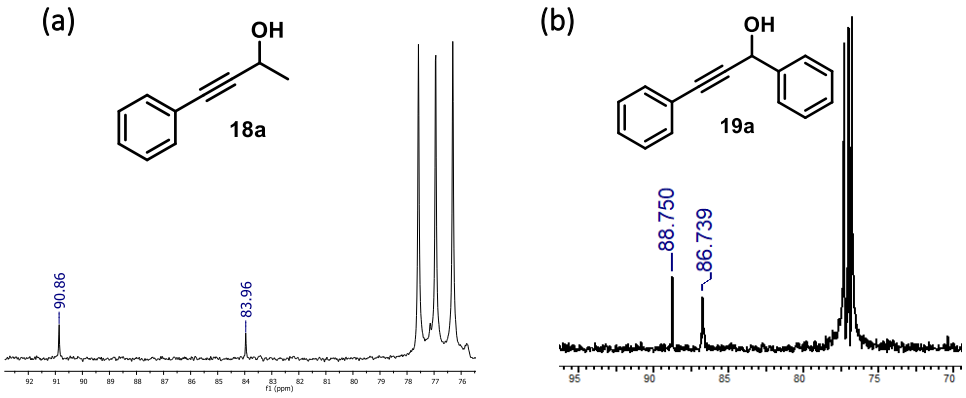
Figura 4 - Espectro de RMN 13C dos álcoois 13a (a) e 15a (b)



Fonte: Autora (2020)

Ao analisar os espectros de RMN ^{13}C referentes aos álcoois fenil acetilênicos **18a** a **19a** foi possível observar que a região acetilênica sofre leve desblidagem δ(85-90), quando comparados aos acetilênicos terminais δ(75-87), devido a influência da região aromática vizinha. A intensidade dos picos também faz referência a sua localidade, uma vez que carbonos quartenários (que não contem hidrogênios ligados) são sinais de baixa intensidade (Figura 5).

Figura 5 - Espectros de RMN 13C dos álcoois 18a (a) e 19a (b)



Fonte: Autora (2020)

Os demais espectros dos álcoois propargílicos encontram-se nos anexos. Considerando a desracemização dos álcoois secundários propargílicos como foco, após sintetizados e caracterizados, estes foram usados como intermediários nas metodologias de oxidações subsequentes e como padrões de referência paras as reações biocatalíticas de oxirredução com enzimas.

3.2 Metodologia de oxidação visando a obtenção de Inonas

Cetonas α-β acetilênicas (inonas) são blocos de construção corriqueiramente empregados na síntese de importantes moléculas bioativas(WHITTAKER; DERMENCI; DONG, 2016). Esses compostos também são conhecidos como intermediários importantes em síntese orgânica por sofrerem reações de adição conjugada(LIU et al., 2010), ciclização(SENGEE; SYDNES, 2011), e formação de heretociclicos(ALY; BROWN; HASSAN, 2014).

No presente trabalho, será ressaltado o emprego dessas cetonas conjugadas com uma porção acetilênica em reações enzimáticas de oxidorredução estereosseletivas, além das reações de hidroaminação, para aplicação como bloco de construção da síntese de compostos com atividade antidepressiva.

Assim, com a finalidade de obter essa classe de compostos, a partir dos álcoois secundários, foi planejada rotas de oxidação dos álcoois propargílicos secundários. O primeiro planejamento baseado na oxidação com o sistema biocatalítico oxidativo Lacase/Mediador (LMS), e comparando os resultados obtidos com métodos já descritos na literatura que empregam MnO_2 e TCCA, como agentes oxidantes.

3.2.1 Método enzimático de oxidação Lacase/TEMPO

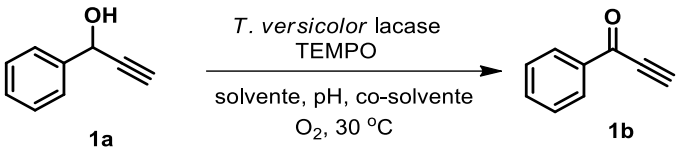
As oxidações envolvendo o sistema biocatalítico Lacase/TEMPO tem sido bastante difundido em reações biocatalíticas. Na sua maioria enquadra reações de álcoois primários e fenóis. Entretanto, sistemas biocatalíticos aeróbicos de oxidação empregando álcoois secundários propargílicos, para intermediários sintéticos, ainda foi pouco explorada.

A eficácia das oxidações envolvendo enzimas depende, muitas vezes, da característica em que estas têm em se comportar de forma diferente de quando estão em seu sistema

biológico natural. Para isso, visando a aplicação no processo de desracemização de álcoois secundários, foi necessário avaliar o seu comportamento/atividade em diferentes meios reacionais.

Dessa maneira, foi necessário inicialmente variar condições experimentais, tais como pH, solvente, co-solvente e equivalentes molares, para estabelecer os melhores parâmetros de conversão. Para isso foi variado o pH da solução, assim como o solvente, usando entre tampões e soluções acidificadas, presença e quantidade de co-solvente, além da concentração molar de enzima e de substrato. As reações iniciais de oxidações catalisadas com Lacase / TEMPO foram realizadas usando o composto **1a** (1-fenilprop-2-in-1-ol) como modelo na presença de quantidades fixas da Lacase de T*rametes versicolor* e TEMPO (Esquema 12).

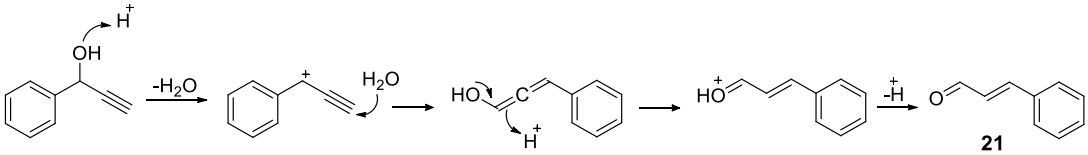
Esquema 12 - Sistema de oxidação quimioenzimática do álcool 1a



Dentre as variáveis possíveis de análise está o comportamento catalítico frente a mudança de pH. As enzimas apresentam em sua estrutura resíduos de aminoácidos que estão disponíveis para sofrer protonação. Cada enzima comporta-se de maneira diferenciada em diferentes valores de pH, podendo muitas vezes sofrer inibição ou desativação. Tendo em vista essa afirmativa foi necessário avaliar inicialmente o pH do meio reacional.

Além disso os compostos propargílicos, por apresentarem na sua estrutura um sistema conjugado, podem sofrer reações como hidratação para a forma ceto-enol ou rearranjo de Meyer-Schuster, levando a formação de enonas correspondentes, em pH ácidos (Esquema 13)(ENGEL; DUDLEY, 2009).

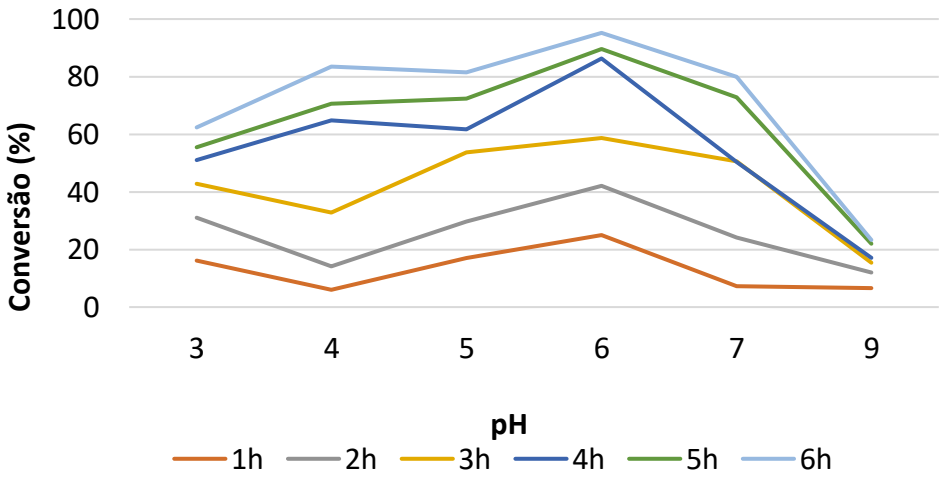
Esquema 13 - Rearranjo de Meyer-Schuster em alcóois propargílicos



Para isso, usando água como solvente inicial, foi analisada a reação em pH 3,0, 4,0, 5,0, 6,0 e 8,0, usando soluções de HCl (0,1M) e NaOH (0,1M) para ajuste do pH, esperando obter a maior taxa de conversão no menor espaço de tempo (Figura 6).

Como pode ser observado através da conversão do álcool, acompanhado por cromatografia, para cetona em um tempo de 5h, o pH influencia diretamente na taxa de conversão, e o melhor pH reacional está na faixa entre 5,5-6,0. O resultado encontrado para o álcool propargílico **1a**, quando comparado a literatura, onde a maioria dos estudos mostra que o pH entre 4,5 e 6,0 mostra-se como a faixa melhor para atividade máxima(VOHRA; SATYANARAYANA, 2003)·(DANA et al., 2017), elucidando o comportamento ideal do sistema Lacase/Mediador frente a essa faixa de pH (Figura 6).

Figura 6 - Oxidação do álcool 1a com Lacase/TEMPO em diferentes pH

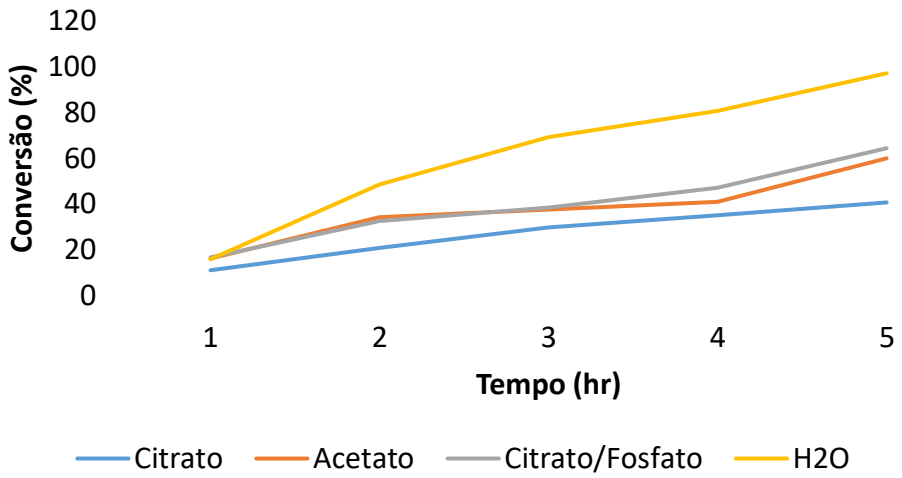


Fonte: Autora (2020)

Um outro parâmetro importante é a natureza do solvente da reação. Sabendo que o ambiente natural das enzimas são sempre os sistemas biológicos, ou seja, o meio que estão inseridas é aquoso, foi variada a natureza do tampão para acompanhar a interferências dos íons em solução na atividade. Os dados indicaram que o meio aquoso, com o ajuste de pH feito com HCl aquoso, apresenta as melhores conversões ao invés de soluções tamponadas. Entre os tampões, o tampão citrato/fostato após 5h de reação apresentou 96% e 64% de rendimento respectivamente (Figura 7).

Definiu-se então que entre os meios aquosos usados, o melhor para medição da atividade enzimática do sistema Lacase mediador, comparando os tampões citrato, acetato, citrato/fosfato e apenas água, conduzindo assim as demais oxidações nesse meio reacional.

Figura 7 - Conversão das reações de oxidação do sistema Lacase/TEMPO em diferentes sistemas aquosos, com pH 6



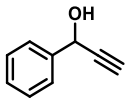
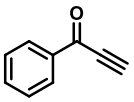
Fonte: Autora (2020)

O processo de otimização também foi direcionado para a determinação das quantidades equivalentes de enzima e TEMPO. Os estudos foram realizados variando a quantidade de enzima, para determinação da menor quantidade catalítica necessária para converter o substrato no menor tempo, sem tornar a metodologia inviável (baseado nos valores de TON, TOF e E-fator). Assim a quantidade de enzima foi verificada na concentração de 1U/mL e 13U/mL.

A quantidade do TEMPO também foi estudada no intuito de obter a menor quantidade catalítica que não inviabilizasse a oxidação com Lacase, visto que o mediador é extremamente necessário para tornar a reação mais rápida(FABBRINI; GALLI; GENTILI, 2002). Com base nos parâmetros iniciais, e usando o álcool **1a** como substrato, quando a concentração de enzima foi reduzida de 13U/mL para 1U/mL na presença de 10mol% de TEMPO, a cetona **1b** foi obtida com o mesmo rendimento, mas o tempo reacional de conversão foi quatro vezes maior (Tabela 2, entrada 1, e entrada 2 respectivamente).

Quando a quantidade de enzima foi reduzida para 1U/mL e 0,25U/mL, e a quantidade do TEMPO reduzida de 10 mol% a 3-5 mol%, a reação foi muito lenta, levando a resultados muito insatisfatórios (Tabela 2, entradas 3 e entrada 4, respectivamente), pois foram obtido rendimentos menores que 50% após cerca de 48h. Com isso, percebe-se que o uso de 13U/mL de Lacase de *T. versicolor* e 10 mol% TEMPO foi considerado a melhor condição de reação para a conversão de **1a** em **1b**, e adotar quantidades inferiores que essa não viabilizaram a metodologia.

Tabela 2 - Conversão para cetona 1b variando quantidades de TEMPO e Lacase

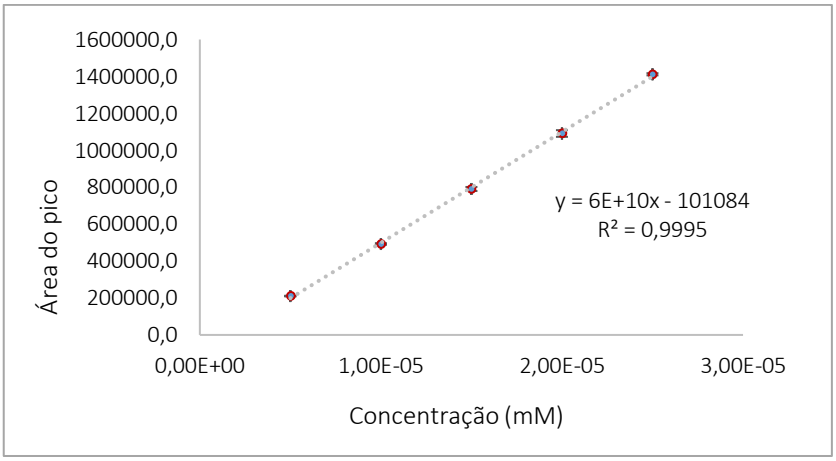
Entrada	Substrato	Cetona	[b]Rendimento (%)	Tempo (h)	Enzima (U/mL); TEMPO (mM)
1			93	1,5[a]	13 ; 12,5
2			93	6[c]	1 ; 12,5
3			48	24[d]	1, 7,5
4			32	48[e]	0,25 ; 2,5

[a] Condições: ar; temperatura ambiente; [subst.] 250 mM, [TEMPO] 12,5 mM, 13 U/mL de Lacase, em HCl aquoso (pH = 6,0).
[b] Rendimento isolado.[c][Enzima] 1 U/mL de Lacase; [TEMPO] 12,5 mM; d [Enzima] 1 U/mL de Lacase [TEMPO] 7,5 mM. [e][Enzima] 0,25 U / mL; [TEMPO] 2,5 mM.
Fonte: Autora (2020)

Com a metodologia de oxidação otimizada, baseado na conversão de **1b**, utilizando O_2 como fonte de oxigênio, as melhores condições ([TEMPO] 12,5 mM. 13U/mL de Lacase. em HCl aquoso (pH = 6,0)) foram aplicadas para a oxidação dos demais álcoois propargílicos secundários, a fim de demonstrar a robustez, escopo estrutural e limitações da metodologia, para obtenção das inonas com bons rendimentos.

Por se tratarem de reações em escala analítica os dados de conversão foram obtidos através correlação com padrão interno. Nesse caso foi necessário realizar a construção de uma curva analítica, utilizando cromatografia gasosa acoplada ao detector de ionização de chama (GC-FID) para determinar as concentrações através das áreas dos picos. Nesse contexto, o padrão interno empregado foi a acetofenona, e a curva foi construída através de 5 diferentes concentrações, em quadruplicada (Figura 8).

Figura 8 - Curva de calibração para determinação dos rendimentos das oxidações dos álcoois propargílicos



Fonte: Autora (2020)

Observando a curva analítica é possível, através da relação linear obtida, estabelecer a curva necessária para terminar as concentrações (R^2=0,9995). Assim, com a construção da curva analítica e validação, as demais reações de oxidação foram realizadas, todas padronizadas baseadas na concentração da solução mãe da curva de calibração, estabelecida em solução 50mM. As reações de oxidações foram feitas baseadas nas condições previamente padronizadas, como meio reacional água com pH 6,0, TEMPO 10 mol%, e enzima 13 U/mL.

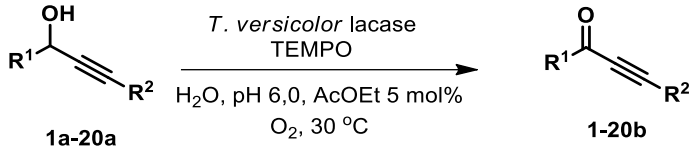
A reação pode ser também acompanhada visualmente, uma vez que o álcool, no início da reação, é parcialmente solúvel em água, e a cetona totalmente insolúvel, ao oxidar a reação apresenta sólido em suspensão, caracterizando a formação da cetona (Figura 10).

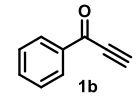
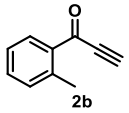
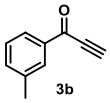
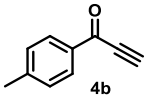
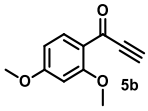
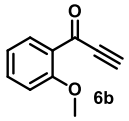
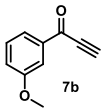
Figura 9 - Reação de oxidação em meio aquoso com sistema Lacase/TEMPO com o álcool propargílico 1a

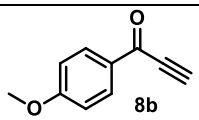
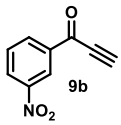
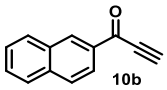
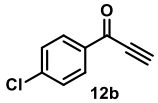
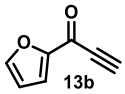
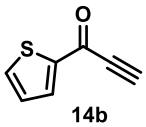
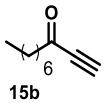
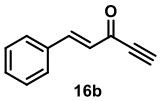
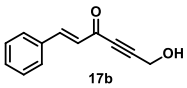
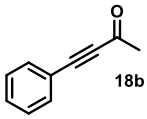
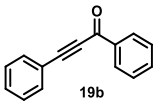
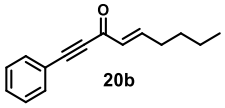
Fonte: Autora (2020)

As inonas obtidas nas condições reacionais testadas, apresentaram semelhanças nos rendimentos e tempos reacionais. Quando comparado com análogos estruturais, como por exemplo compostos *orto-, meta-* e *para-* substituídos (Tabela 3, entrada 2 a 12), compostos heteroaromáticos (Tabela 3, entrada 13 e 14), e demais, esses apresentam uma similaridade em rendimento e tempo reacional, sendo entre 6-10h o tempo reacional de oxidação, e rendimentos, de bons a excelentes, de 66-97%.

Tabela 3 - Oxidação quimioenzimática de inols com sistema Lacase/TEMPO[a]



Entrada	Composto	Rendimento (%)	Tempo (hr)	TON	TOF (h^{-1})	E-fator (kg/kg^{-1})
1	 1b	93	1.5	15346,5	10231,0	0,39
2	 2b	85	7	14026,4	2003,8	0,49
3	 3b	80	8	13201,3	1650,2	0,58
4	 4b	97	4	16006,6	4001,7	0,31
5	 5b	96	7	15841,6	2263,1	0,00
6	 6b	75	10	11551,2	1155,1	0,75
7	 7b	88	7	14521,5	2074,5	0,39

8		64	6	10561,1	1760,2	0,94
9		66	4	13531,4	1353,1	0,18
10		82	10	10891,1	2722,8	0,48
12		86	6	12871,3	2145,2	0,44
13		92	6[f]	15181,5	2530,3	0,53
14		70	6	11551,2	1925,2	1,22
15		78	8[f]	6435,6	804,5	0,85
16		17	24	1402,6	82,5	6,33
17		25	24	2062,7	85,9	3,70
18		94	8	15511,6	1938,9	0,35
19		72	12	11881,2	990,1	0,65
20		100	8	16501,7	2062,7	0,18

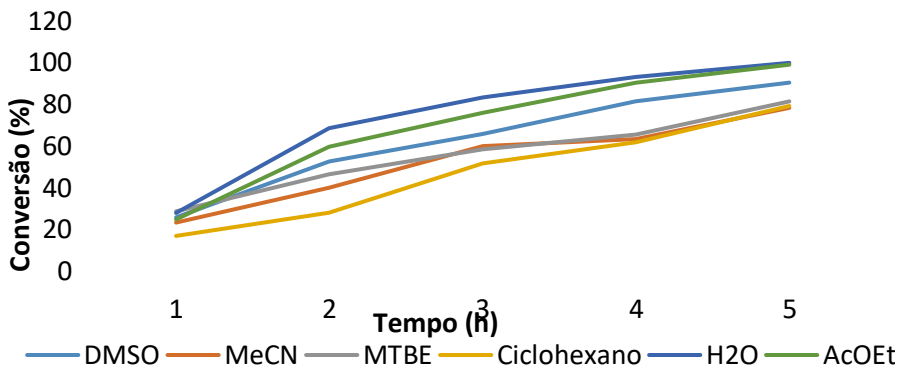
[a]Condições típicas: ar; temperatura ambiente; [subst.] 250 mM. [TEMPO] 12,5 mM. 13U/mL de Lacase. em HCl aquoso (pH = 6,0). [b] Rendimento isolado. [f]AcOEt 5% (v / v) foi usado. "*Turnover number*" = número de moles de produto por mol de precursor de catalisador; TOF = TON por hora. Fonte: Autora (2020)

Os compostos aromáticos α,β insaturados (**16b** e **17b**), no entanto, apresentaram rendimentos baixos e tempos reacionais de aproximadamente 24h, inviabilizando essa metodologia para essa classe de compostos (Tabela 3, entrada 16 e 17). Já os compostos que possuem a função acetilênica interna (vizinhas ao anel aromático), apresentaram no geral rendimentos maiores (72-100%), ainda que em tempos reacionais de 8-12 horas (Tabela 3, entrada 18 a 20). Como pode ser observado na Tabela 3, o método é geral, e permite a preparação de substratos aromáticos, com diferentes funcionalizações no anel. Os resultados apresentaram tempos de reações parecidos, entre compostos similares, com intervalos entre 1h a 24h de reação.

Para que uma metodologia seja considerada geral e aplicável, os rendimentos devem ser os melhores possíveis. Dessa maneira, foi decidido estudar a presença de co-solventes orgânicos no sistema oxidativo, com o intuito de aprimorar esses rendimentos. A presença de co-solventes no meio reacional permite que substratos com diferentes interações apresentem solubilidade distintas, pois solventes miscíveis ou não em água originaria sistemas mono- ou bifásicos, diferenciando a atividade enzimática. Assim a adição de co-solventes orgânicos pode melhorar a solubilidade de substratos hidrofóbicos e a estabilidade desse método catalítico.

Assim, o DMSO e MeCN foram estudados como aditivos em misturas monofásicas, enquanto ciclohexano, AcOEt e o MTBE foram adicionados para formar sistemas bifásicos. Entre eles, DMSO, e AcOEt proporcionaram as melhores conversões de oxidação (90-96%) entre os co-solventes empregados (Figura 10).

Figura 10 - Conversões do álcool 1a para cetona 1b em diferentes co-solventes em 5h de reação



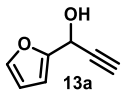
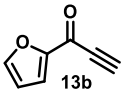
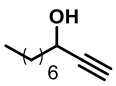
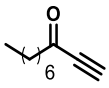
Fonte: Autora (2020)

Quando um derivado contendo furano e um substrato alquila foram usados, sob condições de reação semelhantes, os produtos desejados foram obtidos com rendimentos médios mais baixos. Portanto, objetivando melhorar a solubilidade dos compostos que apresentaram baixas taxas de conversão, foi adicionado um co-solvente AcOEt 5% (o que apresentou melhor conversão frente aos outros co-solventes) para verificar se haveria melhora ou não nos rendimentos.

Como pode ser observado na Tabela 4, quando AcOEt foi adicionado ao meio reacional o composto **13b** aumentou de 32% para 92% de rendimento (Tabela 4, entrada 1 e 2 respectivamente). Já o composto **16b**, sai de 45% para 78% de rendimento (Tabela 4, entrada 3 e 4). Dessa maneia foi possível comprovar a eficácia da adição de co-solvente em ensaios enzimáticos aquosos.

Os resultados obtidos para a síntese de **13b** e **15b**, utilizando o protocolo enzimático, representam uma atualização substancial, do ponto de vista sintético, uma vez que algumas dessas oxidações são corriqueiras, exigindo reagentes à base de metais pesados prejudiciais ao ambiente e condições de reação adversas.

Tabela 4 - Efeito do co-solvente AcOEt no sistema Lacase/TMEPO para melhorar os rendimentos da oxidação dos compostos 13a e 15a

Entrada	Substrato	Cetona	Rendimento (%) [b]	Tempo (h)
1	 13a	 13b	32	8[a]
2			92	6[c]
3	 15a	 15b	45	5[a]
4			78	8[c]

[a] Condições típicas: ar; temperatura ambiente; [subst.] 250 mM, [TEMPO] 12,5 mM, 13 U/mL de Lacase, em HCl aquoso (pH = 6,0). [b] rendimento isolado [c] AcOEt 5% (v / v) como co-solvente. Fonte: Autora (2020)

O resultado e a eficiência da metodologia atual, que resultou na formação de inonas em bons rendimentos, é resultado de efeitos simultâneos, atribuídos ao (a) ataque nucleofílico do

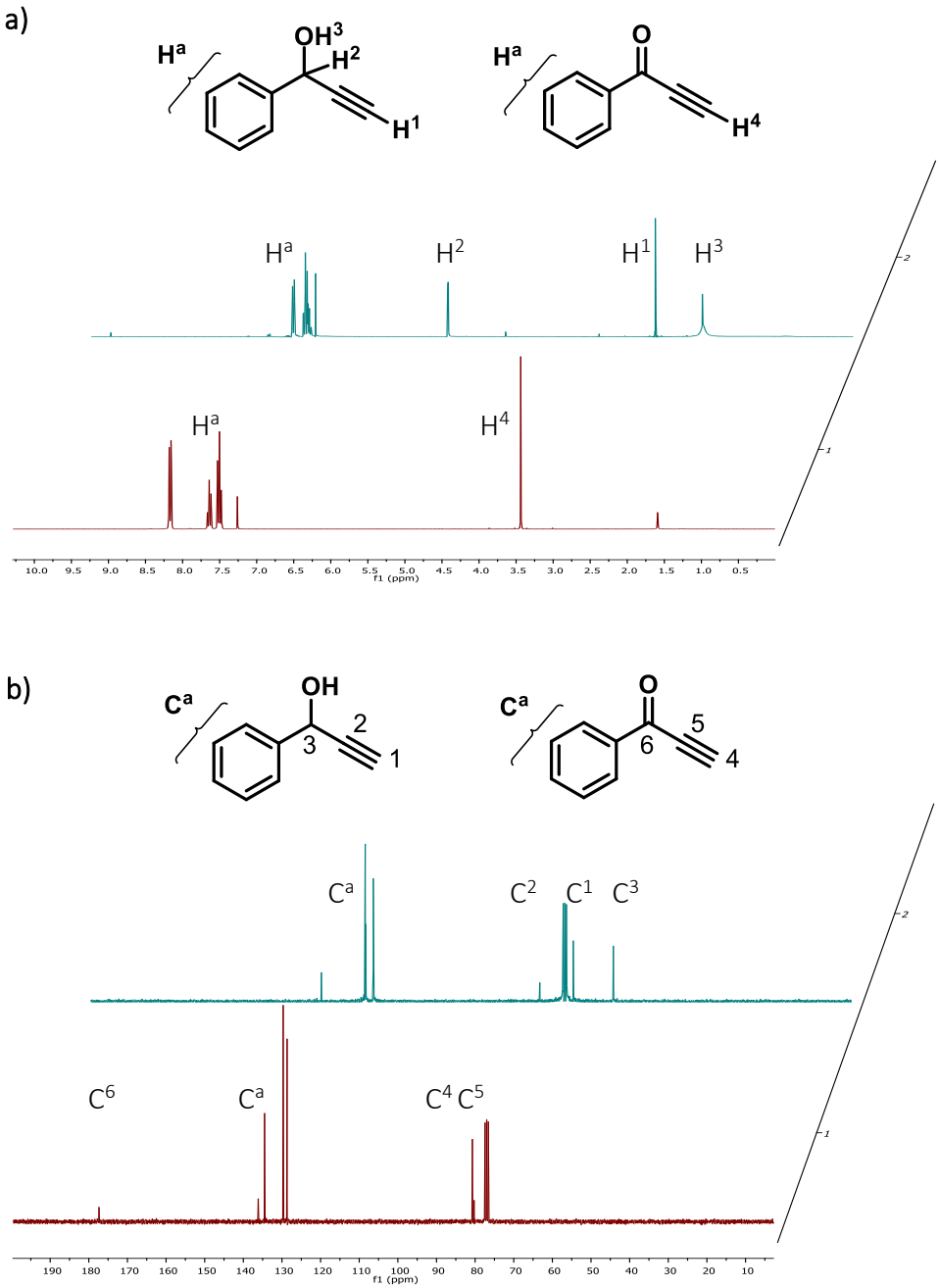
par de oxigênio de álcool propargílico no oxoamônio (continuamente regenerado pela Lacase) e (b) a taxa de desprotonação de α-CH no composto de alquinil-oxoamônio.

Baseado no fato das reações serem consideradas simples de reprodução, o protocolo desenvolvido também é considerado viável para o meio ambiente, robusto e útil em termos sintéticos, uma vez que não exige nenhum pré tratamento especial enzimático custoso e trabalhoso. As condições brandas de reação, a generalidade, a seletividade e os altos rendimentos alcançados, tornam o procedimento uma ferramenta promissora para o arsenal sintético na construção de moléculas complexas(SILVA et al., 2019).

Ao comparar os espectros de RMN de ^{1}H das cetonas acetilênicas aos respectivos álcoois de partida pode-se observar a ausência do hidrogênio carbinólico (ex: δ 5,48; Figura 11 a)) e consequente mudança de dupleto para singleto do hidrogênio acetilênico, que também apresenta um deslocamento devido ao efeito anisotrópico da carbonila (ex: δ 2,67 para δ 3,44; Figura 11 a)).

O ambiente químico também influência na desblindagem dos hidrogênios β no carbono aromático (ex: δ 7,56 para δ 8,16; Figura 11 a)). Já comparando os espectros de RMN de ^{13}C da cetona com o álcool, observamos o aparecimento do sinal referente ao carbono da carbonila da cetona (ex: δ 177,3; Figura 11 b)), e a ausência do carbono carbinólico e ligeiro deslocamento do carbono acetilênico vizinho à carbonila devido a desblindagem proporcionada pela mesma (ex: δ 64,4 e δ 74,8 para δ 80,2 respectivamente; Figura 11 b)).

Figura 11 - Espectros de RMN. a) Espectro de 1H do álcool 25 e cetona 25c. b) Espectro de 13C álcool 25 e cetona 25c



Fonte: Autora (2020)

3.2.2 Métodos químicos de oxidação

3.2.2.1 Oxidação envolvendo TCCA como agente oxidante

O TCCA é um potente desinfetante usado amplamente no âmbito doméstico e industrial, com aplicação bactericida, algicida, alvejante e desodorante, visto que apresenta um

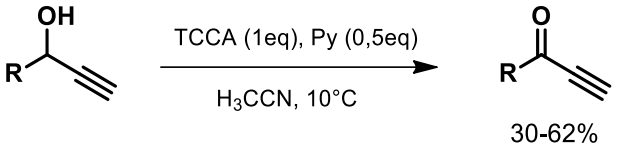
teor de cloro residual livre (matéria ativa) em torno de 90%. Desde que foi sintetizado pela primeira vez, em 1905, apenas em 1957 foi relatado seu uso na oxidação de álcoois (TILSTAM; WEINMANN, 2002).

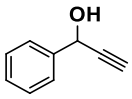
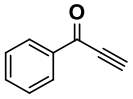
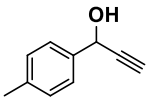
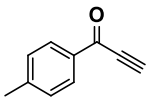
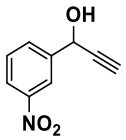
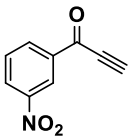
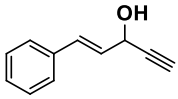
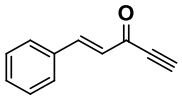
Sendo assim a oxidação com TCCA dos álcoois secundários propargílicos, além da vantagem do custo e viabilidade, foi escolhida por ainda não haver relatos de oxidação desses álcoois propargílicos por TCCA. Os estudos foram baseados em metodologias já descritas na literatura(TILSTAM; WEINMANN, 2002),(SUMMEREN et al., 2012). Nessa reação o álcool reage com o TCCA em acetonitrila, na presença de piridina, levando a cetonas com rendimentos de 30-62%. (Tabela 5).

De maneira geral, as cetonas foram obtidas com 2-3h de reação, e com rendimentos razoáveis. A metodologia apresenta como vantagem (comparadas a outras oxidações) o baixo custo do oxidante somado ao fácil manuseio e condições de reação. Ao submeter o álcool ao oxidante em meia hora já foi possível observar a parcial conversão ao produto de partida. Tais resultados são de extrema importância quando se objetiva uso industrial.

O mecanismo envolvendo reações com TCCA ainda não é totalmente elucidado. Um dos mecanismos abordados recentemente(SUMMEREN et al., 2012) trata inicialmente da piridina agindo como nucleófílo atacando o cloreto do TCCA, levando a formação do intermediário **A** Tris [N-cloropiridínio] cianureto. Em seguida o álcool propargílico reage com **A**, levando a formação de um oxi-cloreto, que após remoção do próton carbinólico, por reação com **B** leva a formação da alquinona, HCl e **C**. (Esquema 14).

Tabela 5 - Reação de oxidação dos álcoois secundários propargílicos e condições

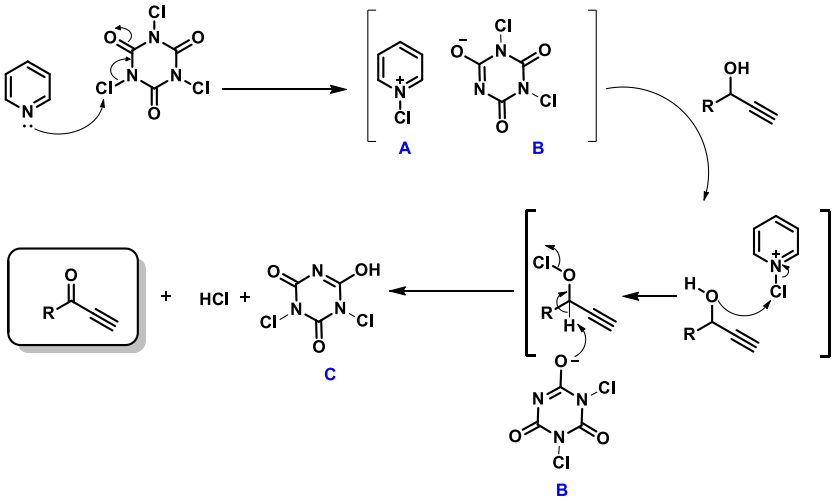


Entrada	Álcool	Composto	Cetona	Composto	Tempo de reação	Rendimento
1		1a		1b	2h	71%
2		4a		4b	2h	62%
3		9a		9b	3h	45%
4		16a		16b	3h	30%

Fonte: Autora (2020)

O TCCA por ser um agente de cloração e também um agente oxidante apresenta, no entanto, como principal desvantagem a cloração dos compostos acetilênicos nas oxidações. Nessas reações ao permanecer muitas horas sob reação ou ligeiro excesso de TCCA, ocorre a cloração da região alquilica e alquinilica, como no caso do álcool **1a**. Além disso o meio ácido fornecido pelo TCCA pode induzir ao rearranjo de Meyer-Schuster, o que diminuiria o rendimento da reação.

Esquema 14 - Mecanismo de oxidação de álcoois secundários promovida por TCCA



3.2.2.2 Oxidação empregando MnO_2 como agente oxidante

Um método alternativo para oxidação de álcoois secundários foi a utilização do dióxido de Manganês (MnO_2) O manganês é um mineral natural, abundante e de baixo custo. O Brasil encontra-se entre os 4 maiores produtores de minérios de manganês do mundo(GEOLOGICAL SURVEY, 2014). Sendo assim, explorar seu uso nas reações o torna uma alternativa em síntese.

O MnO_2 foi previamente preparado *in situ* pela adição lenta de $MnCl_2.H_2O$ em uma solução de $KMnO_4$, permanecendo por 24h para que todo Mn fosse transformado para Mn^{4+}. O precipitado formado é filtrado, lavado e calcinado, e consequentemente pronto para uso (Esquema 15).

Esquema 15 - Reação de formação do MnO_2

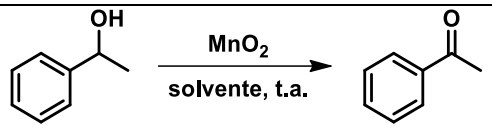
$$3Mn^{2+}_{(aq)} + 2MnO^{-}_{4\,(aq)} + 2H_2O \rightarrow 5MnO_{2(s)} + 4H^{+}_{(aq)}$$

Reações envolvendo MnO_2 como oxidante apresentam como vantagem o uso de solvente orgânicos e condições mais brandas de reação, como temperatura branda e solventes não tóxicos. Nessas oxidações foi utilizado AcOEt como solvente a temperatura ambiente. Os parâmetros da reação foram previamente otimizados através do estudo de oxidação com o álcool secundário 1-feniletanol **22**, obtendo a acetofenona **23**.

Nesse estudo a quantidade de equivalentes de MnO_2 foi variada de 1, 5 a 10 eq, em acetona, inicialmente. Em seguida os solventes AcOEt e THF foram também testados. Os resultados foram acompanhados por cromatografia gasosa acoplada ao FID, e a conversão determinada pelas relativas áreas dos picos (Tabela 6).

A otimização dos parâmetros de reação indica o solvente AcOEt como o mais adequado comparado aos outros estudados (Tabela 6, entrada 9 e 10). Observando os dados obtidos quando se compara o numero de equivalentes de MnO_2 utilizado, não foi possível verificar uma variação muito significativa usando 10 eq. Assim frente ao custo/benefício gerado ao utilizar o oxidante de MnO_2, optou-se por selecionar 5 eq pra conduzir as reações subsequentes (Tabela 6, entrada 3 e 4). Essa metodologia se demonstrou versátil uma vez que o *work up* da mesma envolveu uma filtração simples em celite e os rendimentos obtidos foram satisfatórios.

Tabela 6 - Otimização das condições de oxidação com MnO_2



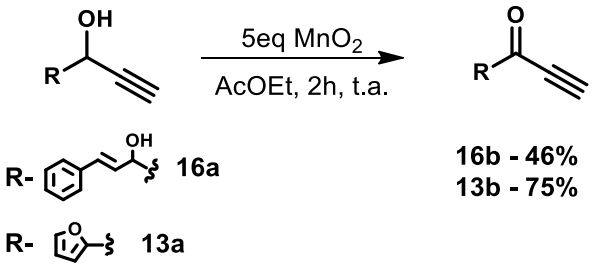
22 23

Entrada	Equiv. MnO_2	Solvente	Substrato/Produto	Tempo (hr)/Concentração % 1	4	24
1	1	Acetona	Álcool	85,93	83,30	16,50
2			Cetona	14,07	16,69	83,50
3	5		Álcool	38,76	29,08	16,12
4			Cetona	61,24	70,92	83,88
5	10		Álcool	20,30	8,50	0,00
6			Cetona	79,70	91,50	100,00
7	5	THF	Álcool	5,46	-	0,70
8			Cetona	94,53	-	99,30
9	5	AcOEt	Álcool	2,43	-	0,00
10			Cetona	97,57	-	100,00

Fonte: Autora (2020)

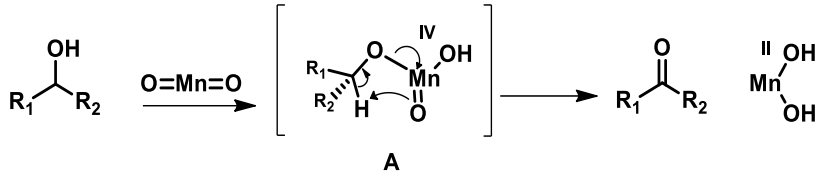
As demais reações com os álcoois **13a** e **16a** foram conduzidas num intervalo de 2h quando adicionamos 5eq de oxidante (Esquema 16).

Esquema 16 - Oxidação dos álcoois propargílicos empregando MnO_2



Ainda não há evidências suficientes do mecanismo de oxidação com MnO_2, porém acredita-se que há formação do complexo **A** devido a complexação do manganês ao oxigênio o álcool, seguido da oxidação e liberação do hidróxido de Mn(DUCE; HAIL; NORWOODT, 1990) (Esquema 17).

Esquema 17 - Mecanismo de ação do MnO2 em reação de oxidação



Analisando as metodologias de oxidação apresentadas pode inferir que a oxidação com Lacase mostrou-se mais promissora e aplicável quando comparadas às metodologias de oxidação com TCCA e MnO_2. A reação de oxidação dos álcoois propargílicos para a obtenção das alquinonas por oxidação com TCCA e MnO_2 ainda necessitando de etapas de otimização. Sendo assim, para aplicação nas etapas subsequentes de desracemização por esteroinversão a metodologia empregando a enzima Lacase foi escolhida.

3.3 Metodologia de redução para obtenção de álcoois propargílicos quirais

Nesta etapa do trabalho, e com o objetivo de investigar o comportamento de enzimas carbonil redutases, foi projetado o desenvolvimento de metodologias quimioenzimáticas de oxirredução, empregando diferentes fontes enzimáticas, para obtenção dos compostos na sua forma enantiopura.

Dessa maneira foi realizado um estudo comparativo entre o uso de microrganismos, enzimas comerciais e enzimas via DNA recombinante na biocatálise, objetivando principalmente reações de redução de cetonas propargílicas, e acetilação de álcoois secundários. Essa parte biocatalítica será dividida em dois direcionamentos: por redução com enzima carbonil redutase via DNA recombinante, e por resolução cinética enzimática com diferentes lipases.

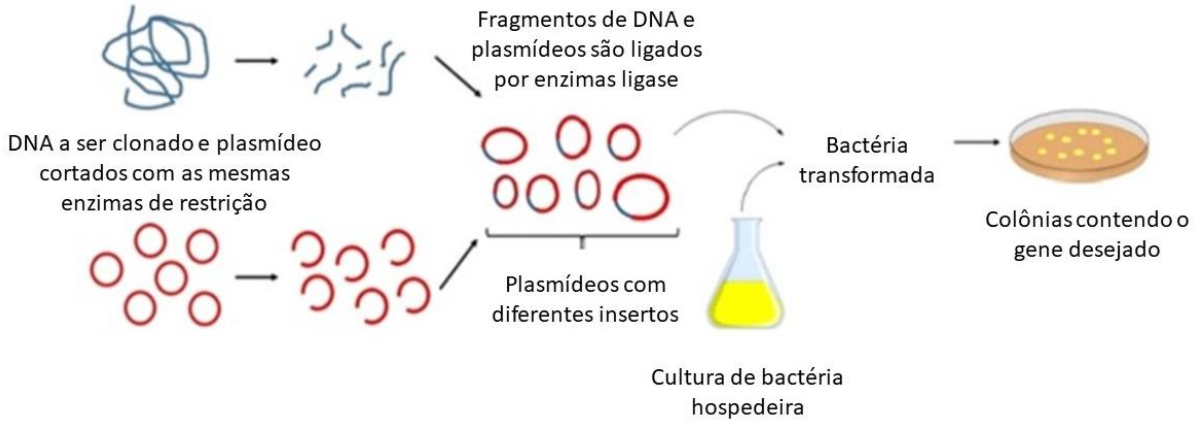
A tecnologia de DNA recombinante compreende em alterar material genético do organismo para obter características melhoradas e desejadas em organismos vivos ou como seus produtos de expressão. Esta tecnologia envolve a técnica central de clonagem, ou seja, ocorre a inserção de um fragmento de DNA, chamado de inserto, é ligado a outra molécula de DNA, o vetor, gerando assim o DNA recombinante(KHAN et al., 2016).

Após a construção do vetor, há necessidade de fazê-lo replicar. Essa replicação só é permitida se houver uma célula hospedeira para sua inserção, processo chamado de transformação. Essa nova célula contendo o vetor com inserto é agora chamada de célula transformada(KHAN et al., 2016).

Todo o processo de montagem do vetor é auxiliado por enzimas, que naturalmente já desenvolvem suas funções no organismo. Inicialmente, através da clivagem enzimática por enzimas endonucleases de restrinção, os fragmentos de DNA são obtidos (abertura do plasmídeo, ou fragmentos do inserto desejado). Cada endonuclease cliva em determinada sequência *Target*, chamados sítios de restrição.

Em seguida para que ocorra a ligação, as enzimas de DNA ligase agem conectando os fragmentos do gene ao vetor, por extremidades complementares palindrômicas(KHAN et al., 2016) (Figura 12). Com crescimento das colônias e ciclos de divisão celular ocorre consequentemente a propagação de milhares de moléculas de DNA idênticas, permitindo o isolamento para sequente aplicação.

Figura 12 - Esquema da formação do plasmídeo via técnica de DNA recombinante



Fonte: Autora (2020)

Desde o começo da tecnologia do DNA recombinante, a *Escherichia coli* é um dos hospedeiros mais utilizados para produção de proteínas recombinantes tanto em escala de laboratório como em escala industrial(ZHANG; LI; YE, 2010). Isso se deve principalmente pelo fato dessa bactéria apresentar algumas vantagens importantes, como baixa toxicidade,

facilidade de manipulação genética, grande disponibilidade de informação genética, crescimento rápido e alto nível de expressão do microrganismo em meios de baixo custo.

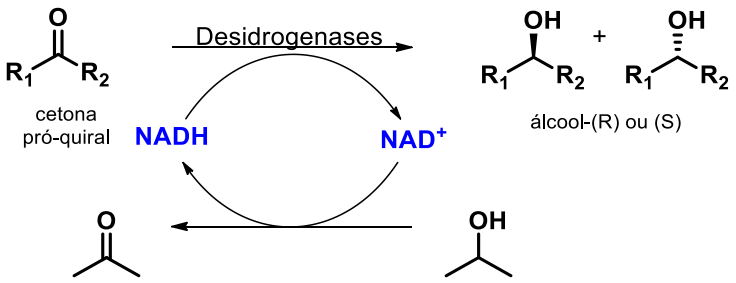
Essa tecnologia recombinante tem ampla aplicação. Ela pode ser usada na determinação da sequência de um gene e consequentemente, da proteína que ele codifica, tanto para elucidar mecanismos de replicação e expressão gênica, ou no desenvolvimento de culturas microbianas capazes de expressar substâncias úteis tais como vacinas e enzimas industriais em grandes quantidades, perpetuando assim um potencial inesgotável(KHAN et al., 2016).

Os biocatalizadores em células inteiras permitem a fácil implementação de cascatas enzimáticas que abrangem reações múltiplas, simplificando a regeneração do cofator, suprindo a integração de suprimentos necessários para reações enzimáticas(LIN; TAO, 2017). Além disso, a presença e a natureza protetora do envelope celular ajuda a estabilizar as enzimas e pode permitir aplicações de enzimas sob condições adversas de reação.

3.3.1 Construção do plasmídeo da Gox2036 recombinante

Na desracemização de álcoois secundários há necessidade de estabelecer um sistema redox eficaz para que após a obtenção das cetonas propargílica obter os álcoois na sua forma enantiopura, preferencialmente com excessos enantioméricos acima de 90%. Dessa maneira encontrar enzimas enantiosseletivas é imprescindível. As enzimas super expressas em células hospedeiras mostram-se uma alternativa promissora para o desenvolvimento da metodologia (Esquema 18), além de enzimas encontras em células íntegras de microrganismos.

Esquema 18 - Exemplo de um sistema redox de obtenção de álcoois propargílicos



A tecnologia via DNA recombinante permite, a partir da expressão enzimática, obter altas concentrações da enzima, que favorecem a obtenção enzimática em maiores escalas. Para isso, no entanto, há necessidade da construção de um plasmídeo, que será responsável pela produção de elevados níveis de enzima de interesse, através da indução das células hospedeiras, como *Escherichia coli*. Com o intuito de verificar a atividade enzimática de redução de uma carbonil redutase oriunda da bactéria *Gluconobacter oxydans* foi conduzida em um primeiro momento, a obtenção do gene e a construção do plasmídeo recombinante. A Figura 13 demonstra a sequência codificadora da proteína Gox2036 que foi amplificada através da técnica de PCR (*polymerase chain reaction*) e posteriormente clonada no vetor de expressão bacteriano pET. As sequências em negrito representam os oligonucleotídeos utilizados na reação de PCR. Os nucleotídeos sublinhados representam os sítios de clivagem para as enzimas de restrição HIndIII e EcoRI.

Os estudos envolvendo a obtenção de enzimas via DNA recombinante foram realizadas com duas colaborações: No Instituto de Biociências da USP sob supervisão do Prof. Luis Netto, e no Instituto de Ciências Biomédicas da USP, no Departamento de Microbiologia da Universidade de São Paulo – USP, em parceria com o Prof. Mário H. Barros. Nesses dois laboratórios foram conduzidos o isolamento do gene da enzima carbonil redutase, construção dos vetores plasmidiais, clonagem e expressão da enzima, além dos ensaios de biocatálise

Figura 13 - Sequência genética da enzima carbonil redutase Gox2036

EcoRI

5´Fw- cggaattcatgtccctttctggaaaaatcgccgcagtcacgggtgcagcccagggtatcggcaaggcc
attgcgcttcgtctggccaaggatggcgcggatgtcatcctgctcgacgtcaagcaggacacgcttgccgaaaccg
caaaggaagttgaagctctcggccggcgcgctgtggccctgacggccgatatcagcaaccgcgaccagttccgca
gcacgctggccgatgcagcaaagacgctcggcggcctggacatcatggtcaacaatgcggggatctgtcaggtca
agccgatcctggacatcgagcctgcggaaatcgagaagatcttcagcatcaacgttcagggcgtgctctggggcat
gcaggcggctgcgaccctcttcaaggagaagggcaccaagggcaagatcatcaatgcctgctcgatcgccggcc
atgaaggctatccccttctgggcgcctattccgcgaccaaattcgccgtccgcgccctgacgcagtcggccgccaa
ggaactcgcgtcctcgggcattaccgtcaattcctactgccccggcattgtcggaaccgacatgtgggtcacgatcg
acaagcgcatggccgaaatcaccggtacggaaatcggcgcgacctacaagaaatacgttgaaggaatcgctctt
ggccgcgtggagacggcggacgatgtggcgggcttcgtcgcctatttgtccagcagtgacgccgattacatgacgg
gtcagtccgtcctgatcgacggtggtctcgttttccgctgaaagcttcg-Rv3

HinIII

Fonte: *Data bank*

3.3.1.1 Amplificação do gene da enzima Gox2036 da bactéria Gluconobacter Oxydans

O gene da enzima oxidoredutase foi amplificado a partir do DNA genômico da bactéria *Gluconobacter oxydans*, cuja cultura foi previamente obtida por colaboração. Para obtenção de uma grande quantidade de células, ideal para isolamento do genoma, uma amostra da bactéria foi repicada em meio de cultura líquido malte, contendo nutrientes necessários para crescimento de bactérias. Após cerca de 6 horas, observou-se um crescimento ideal (OD_{600} 0,6) para isolamento do genoma da bactéria.

Para extrair o DNA genômino da bactéria foi utilizado o protocolo da "*Promega purification kit gram negative bactéria A1120*", disponível no laboratório, conforme

recomendações do fabricante. Na solução resultante encontra-se o DNA genômico da bactéria *Gluconobacter oxydans*, ao qual foi posteriormente utilizado como DNA molde n reação de PCR.

Os oligonucleotídeos utilizados na amplificação foram desenhados com base na sequência da Gox2036(LIU et al., 2014) e tiveram sítios de restrição para as enzimas Eco RI e Hind III incorporados preservando seus códons originais de iniciação e terminação. Estes sítios de restrição nos iniciadores empregados para a amplificação foram inseridos de forma a permitir sua subclonagem nos vetores de expressão.

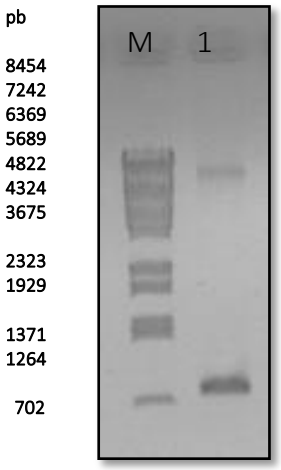
Tabela 7 - Oligonucleotídeos forward e reverse utilizados na reação de PCR do gene da Gox2036

Proteína	Oligos	Sequência
Gox2036	Gox2036F	5´Fw – CGGATTCATGTCCCTTTCTGGAAAAATC-3´
	Gox2036R	5´Ver- CGAAGCTTTCAGCGGAAAACGAGACC-3´

Fonte: LIU et al., 2014

Inicialmente, a qualidade e a concentração do DNA genômico obtido foi visualmente medida através da eletroforese em gel de agarose 1% (Figura 14) e, subsequentemente, confirmada através de leituras em espectrofotômetro (A260/A280), como descrito em materiais e métodos.

Figura 14 - Padrão eletroforético do gene isolado do genoma da bactéria Gluconobacter oxydans. M - padrão de fragmentação lambda BstEll. 1 – gene isolado da Gox2036



Fonte: Autora (2020)

A metodologia permitiu a obtenção de um DNA puro e de boa qualidade com rendimentos totais de 100 ng µL-1 suficiente para os experimentos seguintes. A eletroforese obtida mostra uma banda de aproximadamente 700pb, condizente com o tamanho estimado para o gene da gox2036, que contém 780 pares de base. O fragmento de DNA amplificado foi então digerido com as enzimas de restrição Eco-RI e Hind-III e posteriormente nos vetores de interesse.

3.3.1.2 Escolha do plasmídeo de expressão

A escolha do plasmídeo em sistemas recombinantes é uma das etapas mais importantes pois está diretamente relacionada a capacidade de expressão da proteína. Inicialmente, o gene da gox foi sub-clonado no vetor pUC18 e em seguida transferido para o vetor final de expressão pET. O vetor pUC18 contém em sua sequência o gene de resistência à ampicilina, e um gene (com seu promotor) para a enzima beta-galactosidase (lacZ), que permite através de um *polylinker* introduzir variados sítios de restrição.

O sistema pET é um sistema desenvolvido para a clonagem e expressão de proteínas recombinantes em *E. coli*(POTS, 2010). Os genes alvos são clonados em plasmídeos pet sob controle de transcrição forte do bacteriófago T7 e (opcionalmente) sinais de tradução. A expressão é induzida fornecendo uma fonte de RNA polimerase T7 na célula hospedeira.

Sendo assim, à disposição estavam plasmídeos pET (pET28 e pET29), e pUC18, sendo este último utilizado principalmente para clonagem. O vetor pUC18 apresenta resistência ao antibiótico ampicilina enquanto o pET28 e pET29 ao antibiótico kanamicina.

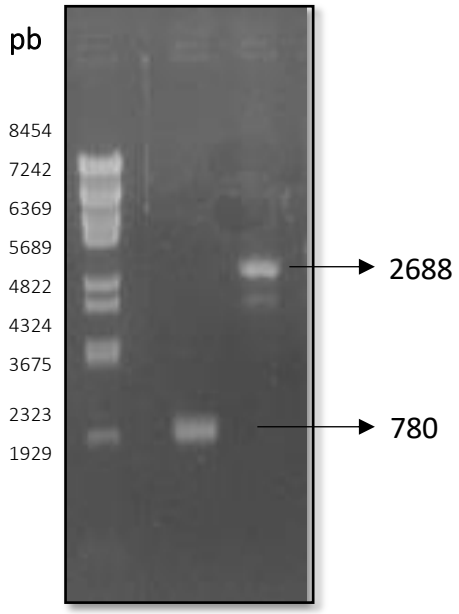
3.3.1.3 Construção do vetor de clonagem recombinante pUC18-Gox2036

Para realizar a ligação entre o gene de interesse e os vetores, foi necessário primeiramente obtê-los na forma fragmentada, para consequente realizar a ligação. Esse processo é similar às digestões anteriores apresentadas, porém diferenciando na etapa de fosforilação. Nessa digestão, adiciona-se as enzimas de restrição de maneira similar porém após 15 min de incubação adiciona-se a enzima fosfatase denominada CIP *(Calf-intestinal alkaline phosphatase)* para que não houvesse o inesperado da ligação entre as pontas

fosforiladas (originadas após o corte com as endonucleases), uma vez que estas são extremidades coesivas(BERNARD R, GLICK, JACK J. PASTERNAK, 2014).

O produto da digestão foi retirado do gel, purificado utilizando-se o kit "*Illustra*^{TM} *GFX*^{TM} *PCR DNA and gel Band purification Kit*', quantificado e utilizado na etapa seguinte. A confirmação, tanto da presença quando da quantidade de DNA fragmentado obtido, é feita novamente por eletroforese e nanodrop (Figura 15).

Figura 15 - Padrão eleroforético após eletroeluição: M – padrão labda, 1 - vetor pUC18, 2 – fragmento Gox2036



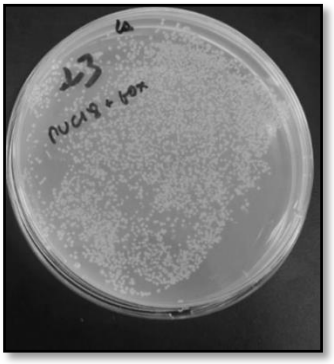
Fonte: Autora (2020)

Como pode ser observado, o padrão eletroforético apresentou a banda referente ao vetor e fragmento de DNA da Gox2036 em 700 pb e o do vetor pUC18 em aproximadamente 3000 pb. Assim a ligação entre o vetor e inserte foi realizada, e consequente transformação em células competentes de *E.coli*.

A ligação consiste em ligar as extremidades coesivas entre o vetor e o plasmideo e para que a ligação entre o plasmídeo e o fragmento genético ocorra é necessário, além do vetor e fragmento de DNA, uma enzima de ligação (T4 ligase) que catalisa a formação de uma ligação fosfodiéster entre terminais justapostos 5'-fosfato e 3'-hidroxil em terminais duplex de DNA(BERNARD R, GLICK, JACK J. PASTERNAK, 2014).

Estes foram submetidos a incubação por 1h, seguida de transformação em células *E. coli* DH5α competentes, e aplicação em placas de petri contendo ampicilina, referente ao sitio de resistência do plasmídeo. Após 24h de crescimento foi possível observar o crescimento quando comparado ao controle (Figura 16) indicando resultado positivo de construção. A construção nos vetores de clonagem foi denominada de pUC18-Gox2036.

Figura 16 - Colônias após ligação do vetor pUC18 ao inserto da Gox2036

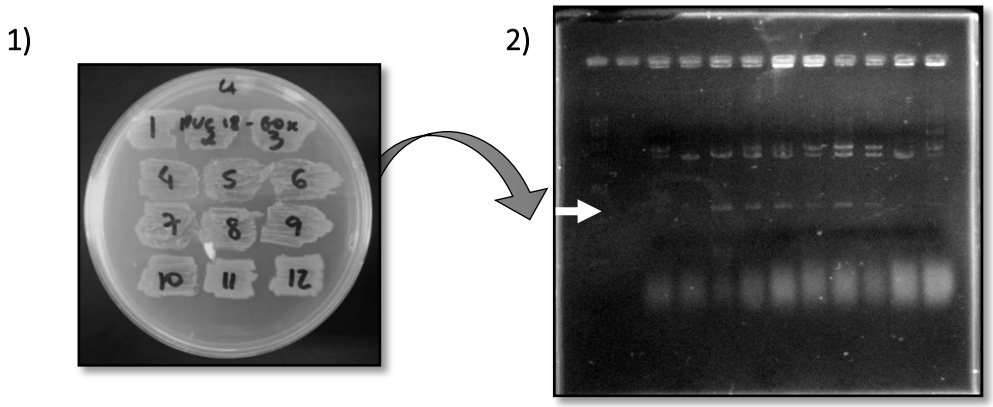


Fonte: Autora (2020)

3.3.1.4 Sequenciamento do gene da Gox2036

Colônias transformadas devem ser isoladas e expandidas para obtenção de mais material genético para sequenciamento. Dessa forma, algumas colônias foram selecionadas e expandidas para realização de MNIPREP (mini escala preparativa), que consiste em aumentar a escala do vetor-inserto. Na miniprep obtém-se um maior número de cópias do gene permitindo assim realizar manipulações químicas. Nela é feita um tratamento inicial de lise, com lisoenzima e RNase, para que ocorra a quebra celular e acesso ao DNA, além da adição do detergente SDS para remoção dos lipídios. Na lavagem com isopropanol ocorre a precipitação do DNA plasmidial isolado. A eletroforese confirma a ligação plasmidial e ilustra o perfil obtido (Figura 17).

Figura 17 - Representação da MINIPREP; 1) Repique da colônia de DNA recombinante Gox2036-pUC18; 2) Padrão eletroforético após miniprep das 10 colônias contendo o vetor Gox2036-pUC18



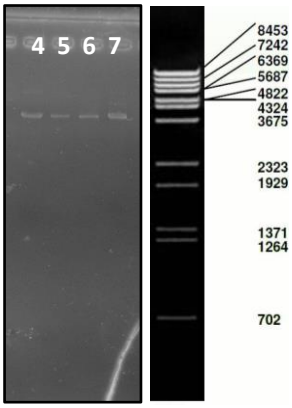
Fonte: Autora (2020)

O padrão eletroforético esperado é uma banda aproximadamente em 3466bp referente ao plasmídeo somado ao inserto (pUC18-Gox2036), uma banda referente ao plasmídeo, e outra ao inserto separadamente, caso houvesse a quebra do vetor. Pelo gel de agarose, é possível observar que algumas colônias apresentaram esse padrão e outras não. Aquelas que apresentaram melhor perfil foram selecionadas para replicação, entre elas as colônias 4, 5, 6 e 7. Essa replicação fez-se necessário para que pudéssemos sequenciar o gene da Gox2036.

Após crescimento das novas colônias foram submetidas a outra MINIPREP, porém dessa vez utilizando o protocolo da promega "*Pure Rendimento Plasmid Miniprep System*" A1220 (Anexo 2), disponível no laboratório. Esse kit proporciona um isolamento mais puro do fragmento, ideal para sequenciamento. Do produto obtido realizou-se novamente a digestão, com a enzima de restrição BglII, e observou-se um fragmento com aproximadamente 3500 pb referente ao vetor recombinante (Figura 18).

As amostras de DNA plasmidial extraídos pelo kit e pelo método de lise alcalina apresentaram em geral concentrações de 200 e 150 ng μL^{-1}. Dessa maneira os DNAs plasmidiais dos 4 prováveis clones positivos foram inicialmente considerados de boa qualidade e adequados para as análises de restrição e sequenciamento Os produtos obtidos da MINIPREP foram levados para o Centro de Estudos do Genoma Humano – Setor de Sequenciamento de DNA – USP para realizar o sequenciamento do fragmento e garantir a semelhança com a literatura(LIU et al., 2014) (Anexos 5).

Figura 18 – Padrão eletroforético das 4 colunas de pUC18- Gox2036



Fonte: Autora (2020)

Através do resultado do sequenciamento, observou que todas as colônias apresentaram porcentagem de similaridade maior que 97%, evidenciando a presença do gene da enzima carbonil redutase Gox2036 no vetor recombinante. Uma das colônias foi escolhida para realizar a extração de DNA plasmidial de bactéria em média escala e consequente armazenamento para manipulação genética.

3.3.1.5 Subclonagem do vetor de expressão pET28a-Gox2036 e pET29b-Gox236

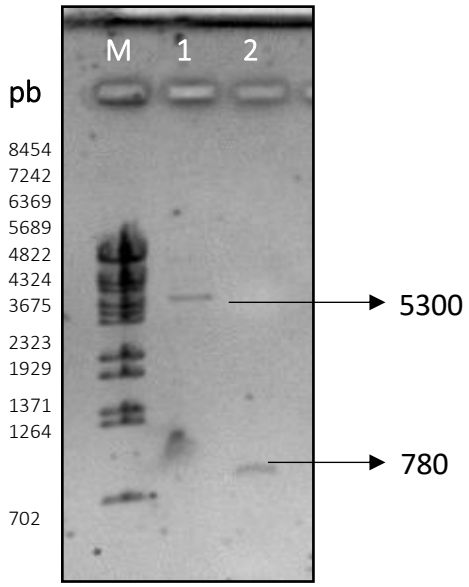
Com o vetor de clonagem construído e sequência genética elucidada, os vetores de expressão pET28a e pET29b foram construídos para expressar a proteína de interesse fusionada com uma cauda de seis histidinas, sequências já presentes nos plasmídeos comercializados. Os plasmídeos pETs tem aproximadamente o dobro dos pares de base do pUC18, e apresentam como região de resistência o antibiótico kanamicina, e outro gene que codifica para a proteína β-galactosidase localizado no sítio de múltipla clonagem.

Os plasmídeos pET28a e pET29b foram transformados, separadamente, por eletroporação em bactérias de *E. coli* DH5α competentes, para permitir o manuseio em maior proporcionalidade, e das colônias semeadas para obter maior escala do material genético. Nas placas continha o antibiótico de resistência Kanamicina para que houvesse o crescimento apenas dos vetores de resistência.

Após o crescimento individual dessas colônias, seus DNAs plasmidiais foram extraídos e clivados por enzimas de restrição para confirmar a presença do inserto. O produto obtido na

MINIPREP, do pET28a e pET29b, além do plasmídeo recombinante, foi submetido a digestão com as enzimas de restrição EcoRI e HindIII. Nessa digestão foi necessário, após cerca de 15min a 37 °C, adicionar o CIP para que não houvesse ligação das pontas fosforiladas, uma vez que é necessário ter as pontas coesivas livre para permitir a inserção do gene da Gox2036 nos vetores (Figura 19).

Figura 19 - Padrão eletroforético após eletroluição. M-padrao;1-pet28a, 2-Gox2036



Fonte: Autora (2020)

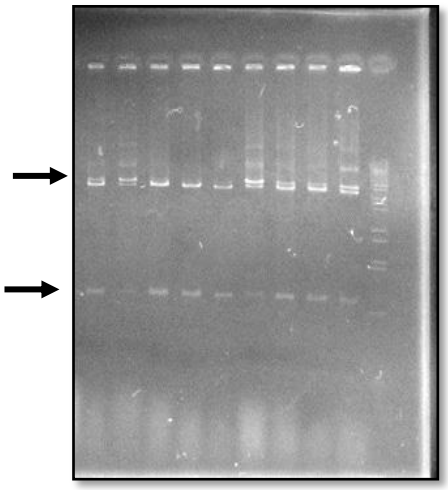
Os produtos da digestão de cerca de 700 pb e 5300 pb correspondente a Gox2036 e plasmídeos respetivamente, foram retirados do gel, purificados utilizando-se o kit "*Illustra™ GFX™ PCR DNA and gel Band purification Kit*', quantificados e utilizados na etapa de subclonagem nos vetores de expressão.

Com a pureza do fragmento da Gox2036 e plasmídeos confirmados foi realizada a ligação entre eles. Este seguiu a mesma metodologia estabelecida para o vetor pUC18, com enzimas T4 ligase e incubação por 1h. Após o tempo de incubação, transformação em bactérias BL21(DE), e plaqueamento, 10 diferentes colônias foram selecionadas para realizar MINIPREP, e o produto foi analisado por eletroforese (Figura 20).

A presença e o tamanho dos insertos confirmaram o sucesso das etapas de clonagem e transformação das bactérias. Estas amostras de DNA apresentaram em geral concentrações

variando de 100 a 150 ng.µL^{-1}, quantificados por nanoDrop. As amostras que apresentaram maior pureza e quantidade foram submetidas a média escalam para serem transformadas em BL21(DE3) e proceder com a indução da produção da enzima carbonil redutase recombinante, para os ensaios biocatalíticos.

Figura 20 - Padrão eletroforético da MINIPREP de 11 colônias da ligação pET28a-Gox2036



Fonte: Autora (2020)

3.3.1.6 Indução enzimática com IPTG

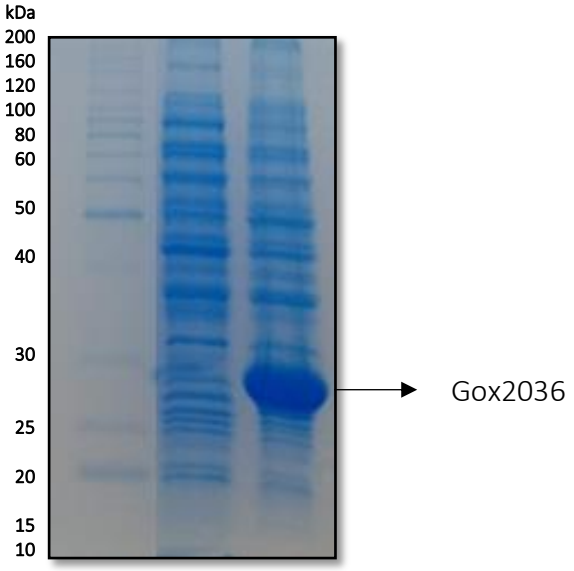
Na tentativa de obter cepas com acentuados níveis de expressão da enzima carbonil redutase foi necessário realizar uma indução nos vetores recombinante, presentes nas células transformadas de *E.coli* BL21 (DE3). Essa indução leva ao aumento dos níveis gênicos de interesse por expressão gênica regulada.

Estruturalmente falando os principais plasmídeos de expressão utilizam os promotores Lac, Tac e T7, os quais dirigem a transcrição dos segmentos adjacentes de DNA, e permitem obter as proteínas. O promotor Lac é semelhante ao utilizado pelas cepas tipo selvagem de *E. coli*, sendo então reprimido pela proteína repressora lacI na ausência de indutor (lactose ou isopropiltiogalactosídeo - IPTG) e induzido em sua presença

Para a indução, os vetores recombinantes Gox2036-pET28a e Gox2036-pET28a, contidos em células transformadas do pré-inoculo, foram inoculadas em meios de volumes maiores, após controle da densidade ótica, OD_{600} de 0,6 - 0,8, seguida da adição de IPTG 1mM,

30°C por 6h. Passado o período de indução, as células bacterianas resultantes foram coletadas por centrifugação, e analisadas por SDS-PAGE. No gel de SDS-PAGE foi observado o perfil de expressão comparado o meio com e sem indução, dos extratos brutos. A Figura 21 mostra um gel de SDS-PAGE a 15% obtido após submeter as amostras a condições desnaturantes.

Figura 21 - Gel de SDS-PAGE dos Padrão proteico de céluas de E.coli transforadas com vetor Gox206-pET28a; A- sem indução com IPTG: B- com indução de IPTG; P - marcador de peso molecular



Fonte: Autora (2020)

A presença da banda diferenciada na fração induzida B tem o tamanho esperado para a proteína Gox2036, aproximadamente 28 kDa, revelando sucesso na metodologia de expressão adotada. No meio sem a indução com IPTG mas contendo o plasmídeo recombinante não foi observada essa banda, ilustrando a necessidade da etapa de indução.

Quando foi observado o gel de SDS-PAGE do Gox2036-pET29b verificou-se a ausência dessa banda, tornando-se concludente que o material genético construído não gerava a proteína esperada, pois no plasmídeo recombinante Gox2036-pET29b ocorreu a transcrição de uma sequência diferente da acreditada após construção do vetor.

Ao perceber a sequência genética formada após contrução do plasmídeo Gox2036-pET29b, foi observado uma transcrição fora de série das tríades necessárias para transcrição da Gox2036. Isso deve-se ao fato de conter um par de base a menos no inicio da transcrição, que originou uma sequencia peptidica diferente (Figura 22, a)). Baseado nos resultados obtidos

de expressão, os experimentos posteriores foram conduzidos apenas com o vetor recombinante Gox2036-pET28a.

Figura 22 - a) Sequência de aminoácidos do vetor recombinante Gox2036-pET29b; b) Sequência de aminoácidos do vetor recombinante Gox2036-pET28a

a)

```
MKETAAAKFERQHMDSPDLGTLVPRGSMAISDPNSCPFLEKSPQSRVQPRVSARPLRFVW
PRMARMSSCSTSSRTRLPKPQRKLKLSAGALWP-RPISATATSSAARWPMQQRRSAAWTS
WSTMRGSVRSSRSWTSSLRKSRRSSASTFRACSGACRRLRPSSRRRAPRARSSMPARSPA
MKAIPFWAPIPRPNSPSAP-RSRPPRNSRPRALPSIPTAPALSEPTCGSRSTSAWPKSPV
RKSARPTRNTLKESLLAAWRRRTMWRASSPICPAVTPIT-RVSPS-STVVSFSAESLRPH
SSTTTTTTEIRLLTKPERKLSWLLPPLSNN-HNPLGPLNGS-GVFC-KEELYPD
```

b)

```
MSLSGKIAAVTGAAQGIGKAIALRLAKDGADVILLDVKQDTLAETAKEVEALGRRAVALT
ADISNRDQFRSTLADAAKTLGGLDIMVNNAGICQVKPILDIEPAEIEKIFSINVQGVLWG
MQAAATLFKEKGTKGKIINACSIAGHEGYPLLGAYSATKFAVRALTQSAAKELASSGITV
NSYCPGIVGTDMWVTIDKRMAEITGTEIGATYKKYVEGIALGRVETADDVAGFVAYLSSS
DADYMTGQSVLIDGGLVFR
```

Fonte: ExPASy ProtParam (2020)

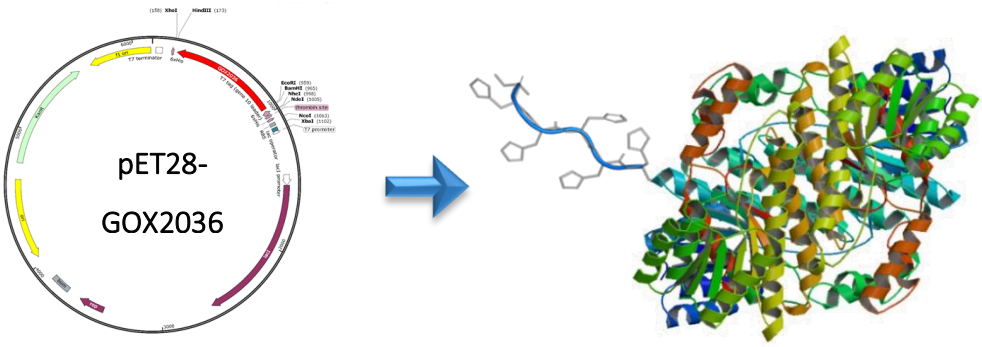
As células integras após indução foram tratadas de duas maneiras: A primeira, para conduzir os experimentos de biocatálise, foi centrifugada, lavada com água, e ressuspendida em tampão, e o procedimento será abordado no tópico 3.3.2. A segunda, pra os procedimentos de isolamento da proteína, as células foram lisadas na presença de tampão de lise tris-HCl, seguindo de purificação.

3.3.1.7 Isolamento da enzima Gox2036

O isolamento da proteina das células integras foi necessária para quantificação proteica e ensaios biocatalíticos subsequentes. O método escolhido para isso foi cromatografia de afinidade por troca iônica, na qual se baseia na afinidade diferencial que íons metálicos imobilizados em uma matriz sólida apresentam por certos grupamentos expostos na superfície da molécula em solução. Esta afinidade resulta de ligações de coordenação reversíveis formadas entre um íon metálico quelatado (Niquel) e resíduos de aminoácidos, tais como imidazol da histidina.

O plasmídeo escolhido pra isso pET28a contém em sua sequencia genética, uma sequencia que transcreve para 6 histidinas, e pode assim ser empregada na purificação por cromatografia de afinidade (Figura 23).

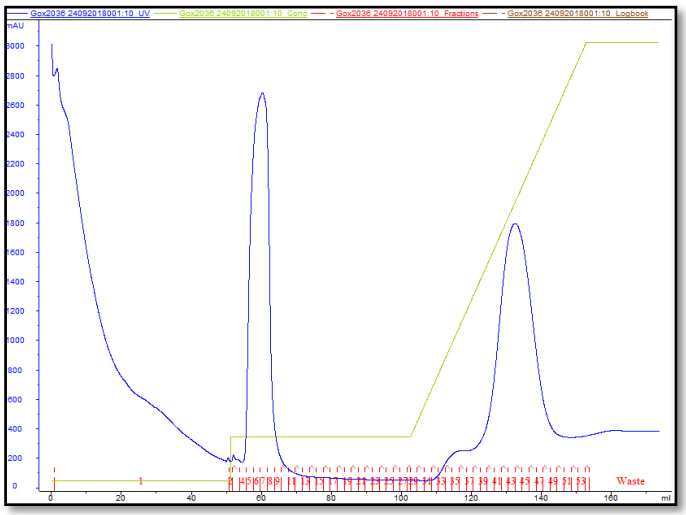
Figura 23 - Construção do plasmídeo recombinante Gox2036-pET28a, e transcrição para proteina com cauda de histidina



Fonte: Autora (2020)

As frações solúveis das culturas induzidas provenientes da lise celular foram submetidas à cromatografia de afinidade utilizando uma resina contendo níquel imobilizado. Nesse processo é necessário estabelecer porcentages de eluição gradativa de tampão de lise trisHCl contendo 0 a 500 mM de imidazol. Com esta metodologia a proteína foi eluída com uma porcentagem de imidazol de 0 a 100% e apresentou um pico bem definido (Figura 24). A leitura foi realizada em 280nm representada em azul, em verde o gradiente de imidazol de 0% a 100%, e em vermelho as frações coletadas enumeradas de 2 a 53, com frações de 2 mL cada

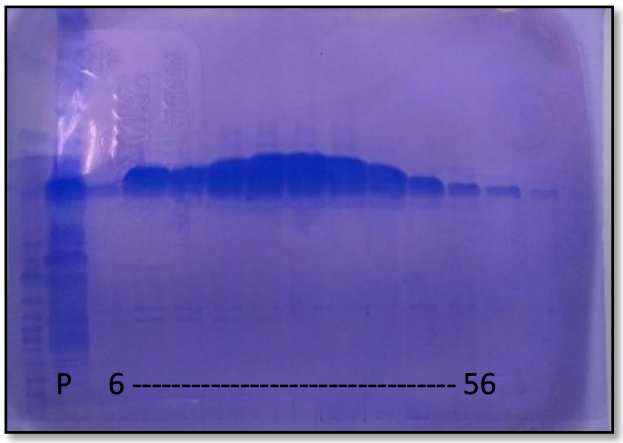
Figura 24 - Perfil cromatográfico da amostra expressa a partir do vetor Gox2036-pET28a obtido em coluna de afinidade a íons metálicos utilizando gradiente de imidazol para eluição da proteína



Fonte: Autora (2020)

As frações eluídas durante o processo cromatográfico foram analisadas por SDS-PAGE, apresentado na separação eletroforética em gel de poliacrilamida SDS-PAGE a 15% dos eluídos da coluna de Ni-NTA. Os poços de aplicação estão ilustrados na Figura 25. A purificação da proteína recombinante Gox2036-pET28a foi alcançada em um único passo cromatográfico. A pureza foi confirmada nas quais apresentaram uma única banda de aproximadamente 28 kDa, sob condições desnaturantes (Figura 25). Nessa figura é possivel observar a presença de contaminantes na fração 6, referente ao primeiro pico do cromatograma, já as amostas de 37 a 56 ilustra a proteina livre de contaminates.

Figura 25 - SDS-PAGE (12% poliacrilamida). Purificação na coluna de Ni da enzima Gox2036-pET28a; P – padrão de peso molecular; 6-56 alíquotas obtidas na purificação



Fonte: Autora (2020)

A quantificação da proteina foi realizada através da medida de absorbância da fração resultante após o procedimento de purificação. Esta massa molecular foi considerada mais próxima daquela obtida por SDS-PAGE e coerente com a massa teórica de 28 kDa proporcionada pelo software Protein Parameters Tools (expasy.org.) obtida através da sequência dos aminoácidos. A concentração foi obtida pela equação de Lamert-Beer (A = ε.c.l), onde o coeficiente de absertividade molar (ε = 21680). A quantidade de proteína isolada, partindo de 500mL de meio celular, foi de 13mg.

3.3.2 Reduções usando carbonil redutase recombinante Gox2036-pET28a em E.coli

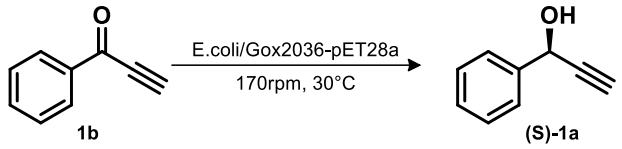
As alquinonas propargilicas foram selecionadas para as biorreduções com o objetivo de avaliar o potencial enantio- e quimiosseletivo da enzima carbonil redutase recombinante a fim de obter álcoois propargílicos quirais com altos graus de seletividadae, e poder empregá-los nas metodologias de desracemização, ou como precursor na síntese de macromoléculas.

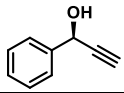
As reações foram realizadas utilizando células integras posterior indução com IPTG, e alguns experimentos com a proteína isolada. Para isso ao final da indução, células foram centrifugadas, lavadas com água para remoção de sais e outros interferentes do meio, e ressuspendidas em tampão fosfato 100 mM, pH 6,0. As concentrações para suspensão foram baseadas no peso das células úmidas, na concentração de 1g/mL. Esse material foi armazenado a -20°C com glicerol 10%, em eppendorfs, para conservação e uso posterior.

Para avaliar o poder redutor da enzima nos substratos carbonilicos foi necessário estabelecer incialmente um *screening* de condições experimentais. para determinar os melhores parâmetros para obtenção de excessos enantiomérios maiores no menor intervalo de tempo.

Inicialmente foi avaliado o melhor pH para realizar as reações de redução. Para isso a alquinona **1b** foi escolhida como substrato e foi avaliado a conversão em pH 6 a 9. Os dados obtidos são ilustrados na Tabela 8. Baseado nos resultados o pH escolhido para proceder as reações biocatalíticas foi pH 6, pois apresentou a maior conversão.

Tabela 8 - Conversão (%) da cetona 1b para o álcool (S)-1a em pH de 6 a 9

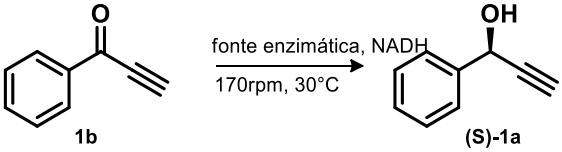


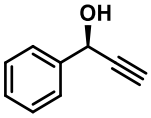
Substrato	pH 6		pH 7		pH 8		pH 9	
	c(%)	e.e(%)	c(%)	e.e(%)	c(%)	e.e(%)	c(%)	e.e(%)
	91,3	>99	90,9	>99%	89,8	>99	61,5	>99

[a] Condições reacionais: As reações foram realizadas em epperdorfs 2 mL contendo 100uL de solução resultante das células úmidas (1g/mL), 20mM da cetona dissolvida em 50 µL de DMSO. As reações biocatalisadas foram analisadas por CG/FID após as extrações das reações (24h, 170 rpm, 30°C). c=conversão;e.e=excesso enantiomético. Fonte: Autora (2020)

Sabendo que as reações com células integras podem apresentar reações paralelas devido a presença de outras enzimas no meio, foi avaliado comparativamente a enzima isolada e o extrato bruto, também com a alquinona padrão **1b**. Para isso foi utilizado a proteína após purificação e as células úmidas ressuspendidas em tampão fosfato 100 mM, pH 6 (Tabela 9).

Tabela 9 - Conversão da cetona 1b para o álcool 1a empregando celulas úmidas contendo Gox2036-pET28a e enzima Gox2036 isolada



Substrato[a]	Célula integra[b]		Enzima isolada[c]	
	c(%)	e(%)	c(%)	e(%)
	91	>99	93	>99%

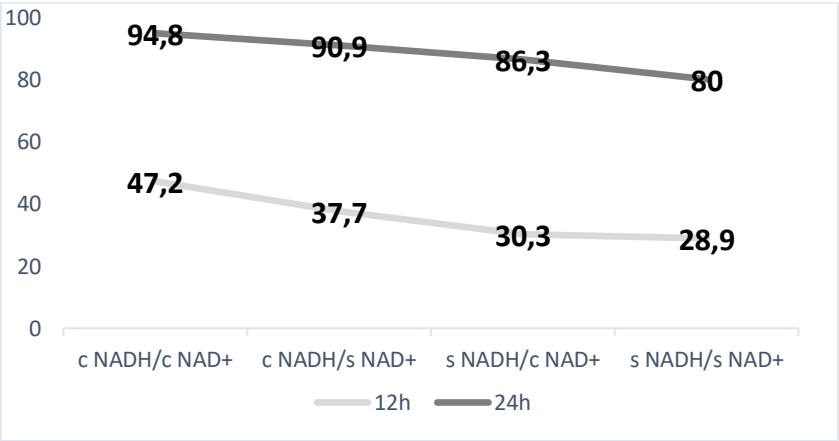
[a] Condições reacionais: As reações foram realizadas em epperdorfs 2 mL contendo 20mM da cetona dissolvida em 50 µL de DMSO, 1mM NADH, 0,5mM NAD^+, 50uL Isopropanol, 5mg de glicose. As reações biocatalisadas foram analisadas por CG/FID após as extrações das reações (24h, 170 rpm, 30°C). c=conversão;e=excesso enantiomético; [b] 100uL de solução resultante das células úmidas (1g/mL); [c]250uL de proteína 4mg/mL. Fonte: Autora (2020)

O resultado apresentado na Tabela 9, ilustra a capacidade similar de redução das Gox2036 tanto na forma de células integras como na forma isolada, pois apresentaram

conversões de 91% e 93% respectivamente. Esse resultado se mostra promissor pois uma vez que não há necessidade de isolamento da enzima para obter conversões acima de 90%, utilizar a enzima de forma integra permite tornar o sistema mais econômico, evitando o encarecer o processo pelas etapas de purificação da proteína, além da não necessidade de utilizar cofatores caros como NADH e NAD^+. Com isso os ensaios biocatáliticos foram conduzidos com as células úmidas após o processo de indução.

Nas reações de oxirredução, as enzimas realizam o processo redox e necessitam de cofatores para regenerar o sítio ativo. Dessa maneira foi verificada a necessidade de adição de cofatores no meio das células integras, como NADH e NAD^+, empregando-os de maneira isolada, em quantidades molares, e na ausência deles. Os resultados de conversão indicam que na ausência de NADH e NAD^+ elas são efetivas apresentando 80% de conversão do álcool em 48h. Entretanto na presença de 1 mM de NADH e 0,5mM de NAD^+ essa conversão é 14,8% mais efetiva, com conversão de 95% após 24h (Figura 26). Dessa maneira, foi deidido manter a presença destes, para regeneração dos cofatores intercelulares, e auxiliar nas maiores taxas de conversão dos substratos.

Figura 26 - Efeito de cofatores na conversão da cetona 1b para o álcool 1a, com célula integra da enzima Gox2036, em tampão fosfato 100mM, pH 6 a 30 °C, após 12 h e 24h

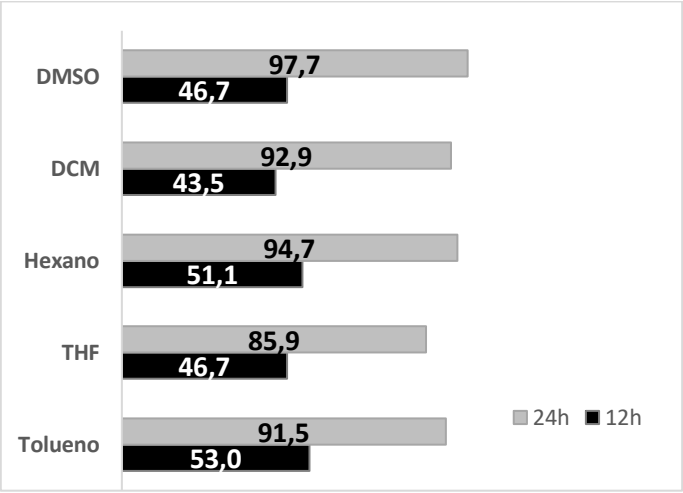


Fonte: Autora (2020)

Outro fator importante que pode ser explorado em reações de biocatálise, é a presença de co-solventes no meio reacional. Os co-solventes auxiliam na solubilidade dos substratos orgânicos, permitindo que há uma maior interação com o meio. Assim decidimos adicionar co-

solventes miscíveis e não miscíveis em água, originando sistemas mono e bifásicos. Entre os solventes escolhidos estavam tolueno, THF, hexano, diclorometano e DMSO (Figura 27).

Figura 27 - Efeito de co-solventes 2% na conversão da cetona 1b para o álcool 1a, com célula integra da enzima Gox2036, em tampão fosfato 100mM, pH 6 a 30 °C, após 12 h e 24h

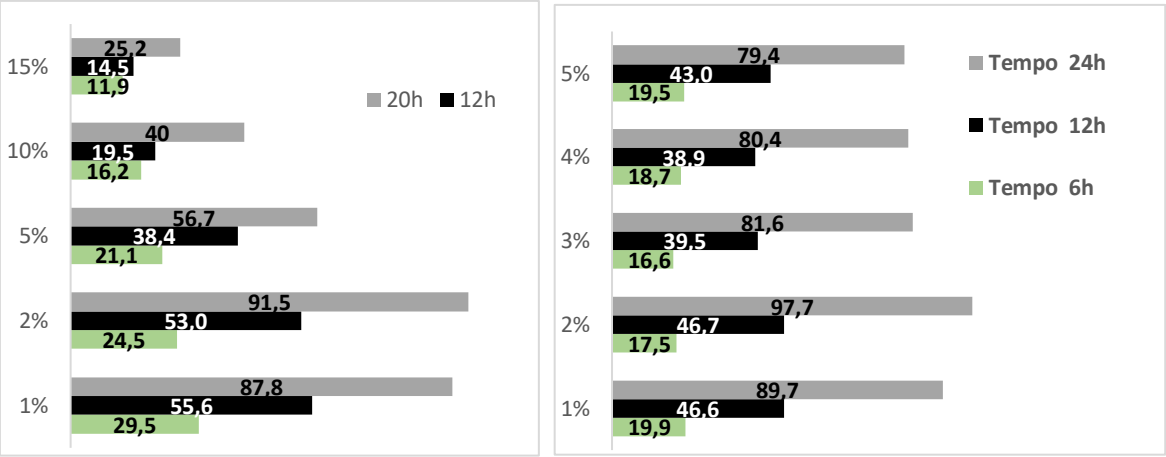


Fonte: Autora (2020)

Como pode ser observado na figura 27 os solventes que apresentaram maiores taxas de conversão nas primeiras 12h foram tolueno e hexano. No entanto após as 24h o solvente que apresentou melhor conversão foi DMSO. Com esses resultados fizemos uma variação percentual dos co-solventes tolueno e DMSO, para verificar a quantidade percentual que tornava os sistemas tóxicos para a enzima, diminuindo as taxas de conversão (Figura 28).

Os dados indicaram que ao aumentar a porcentagem de tolueno para 5% no meio reacional, as conversões do álcool diminuem consideravelmente levando a conversões de 56,7% em 20h. Já com DMSO essa queda foi menos acentuada, onde em 5% a porcentagem de conversão foi de 79,4%. Dessa maneira adicionar DMSO 2% volume ao meio reacional, pode permitir aos compostos com baixa solubilidade melhores taxas de conversões, sem compremeter drasticamente a atividade enzimática, e foi empregue nas reações com os demais álcoois propargílicos.

Figura 28 - Variação nas concentrações do co-solvente. 2) Variando de 1-20% de tolueno; b) Variando de 1-5% DMSO



Fonte: Autora (2020)

Para as reações biocatalíticas da série dos álcoois propargílcos foram adotadas as melhores condições após a realização do *screening*, antiormente citado. Dessa maneira, nas reações foram usados 100uL de solução bacteriana 1g/mL, tampão fosfato pH 6 100mM, 50uL de 2-propanol como co-substrato para reciclar o cofator, 5mg de glicose como fonte energética para a bactéria, e 50uL de DMSO para melhorar a solubilidade dos substratos. Alíquotas foram retiradas a cada 24h, até 120, para conferir a conversão para os álcoois quirais, e as reações foram realizadas em escala analítica (1mL). Os resultados estão ilustrados na Tabela 10.

É possível observar alguns padrões nos resultados obtidos. Os compostos aromáricos o-funcionalizados (Tabela 10, cetona **6b** e **11b**; Tabela10, entradas 6 e 11 respectivamente), quando continham substituintes eletronegativos como o-OMe e Cl, resultaram em tempos de reação menores (24h), comparados ao substituinte Me que necessitou de 120h para conversão (Tabela10, Entrada 2).

Nos compostos m-funcionalizados, observou-se uma similaridade a todos os compostos (cetonas **3b**, **7b** e **9b**, entrada 3, 7 e 9 respectivamente), com tempos de conversão de 24h. Ainda que o composto m-NO_2 (Tabela 10, cetona **9b**, entrada 9) tivesse conversão total com 48h, em 24h já havia convertido 73% da cetona para o álcool.

Já os compostos p-funcionalizados (Tabela 10, cetonas **4b**, **8b**, e **12b**, entradas 4,8 e 12 respectivamente), tiveram conversões opostas aos o-funcionalizados. Os compostos **7b** e **8b** (o-OMe e o-Cl; Tabela 10, entrada 7 e 8 respectivamente) converteram ao álcool em 24h

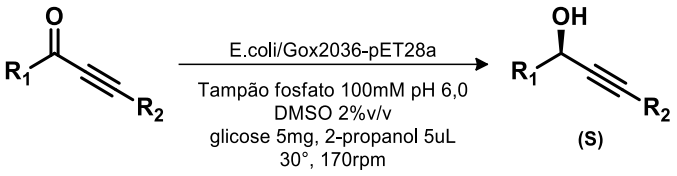
enquanto o composto o-Me (Tabela 10, cetona **4b**, entrada 4) precisou de 120h para ser convertido totalmente.

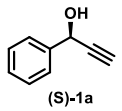
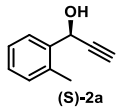
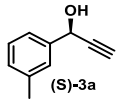
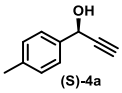
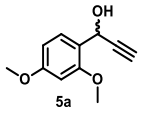
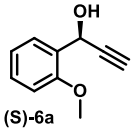
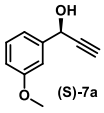
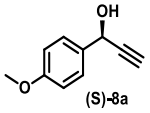
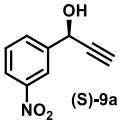
Outro ponto importante foi o volume do substituinte R_1. Quanto os compostos continham substituintes maiores que o anel aromático os tempos de conversão e até as conversões necessitavam de mais tempo. É o exemplo dos compostos **5b** e **10b** (Tabela 10, entrada 5 e 10 respectivamente), onde o substrato o- e p-funcionalizado com a metoxila gerou apenas 53% de conversão em 120h, e o substituinte naftaleno levou a conversão de 96% em 120h.

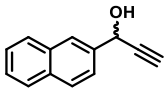
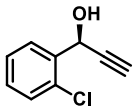
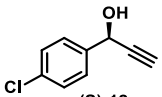
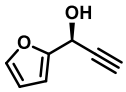
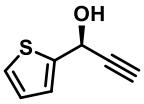
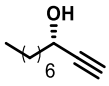
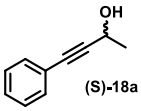
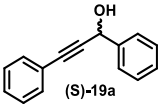
Curiosamente observou-se grande diferença entre os substratos acetilênicos com heteroaromáticos. Enquanto o percursor furânico (Tabela 10, cetona **13b**, entrada 13) apresentou conversão total em 24, seu análogo com enxofre (Tabela 10, cetona **14b**, entrada 14) precisou de 120h para completar a conversão. Este fato possivelmente se deve a capacidade da enzima de se ligar de forma não construtiva com substratos do tipo acetilênico contendo enxofre.

Por fim, comparando os compostos propargílicos contendo a função acetilênica interna (Tabela 10, cetona **16b** e **17b**, entrada 16 e entrada 17 respectivamente) foi possível observar que ao adicionar um substituinte volumoso em R_1 e R_2 (substrato **19b**), a conversão diminuiu consideravelmente quando comparado a R_2 volumoso e R_1 pequeno do substrato **18b**, >99,9 em 24h para 14,4% em 120h. Provavelmente esse resultado está associado ao encaixe do substrato ao sítio ativo da enzima ser dificultado pelo volume gerado pelos anéis aromáticos.

Tabela 10 - Bioredução da série de cetonas propargilicao com a enzima recombinante E.coli/Gox2036/pET28a.



Entrada	Álcool	Conversão[a] %	ee % (ca)	Tempo hr
1	 (S)-1a	>99	>99 (S)	24
2	 (S)-2a	>99	>99 (S)	120
3	 (S)-3a	>99	>99 (S)	24
4	 (S)-4a	>99	>99 (S)	24
5	 5a	53,7	-	120
6	 (S)-6a	>99	>99 (S)	48
7	 (S)-7a	>99	>99 (S)	24
8	 (S)-8a	>99	>99 (S)	120
9	 (S)-9a	>99	>99	48

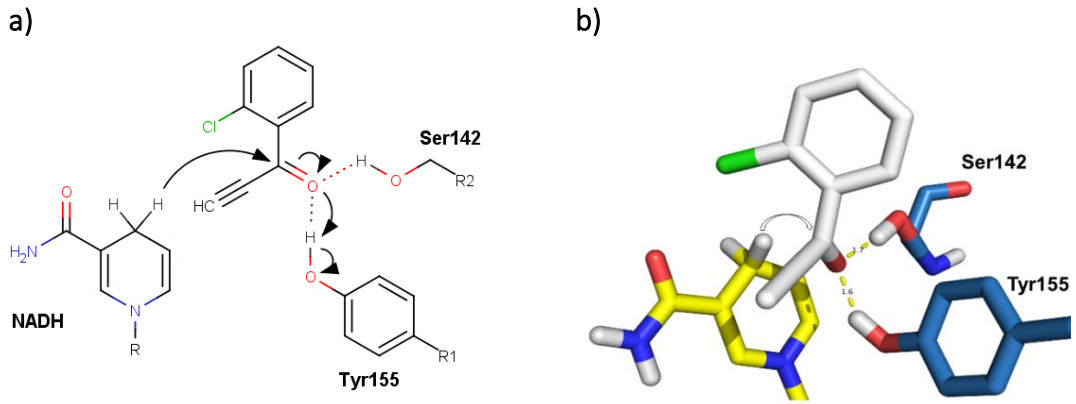
10	 10a	96,6	-	120
11	 (S)-11a	>99	>99(S)	24
12	 (S)-12a	>99	>99(S)	48
13	 (S)-13a	>99	>99%(S)	24
14	 (S)-14a	>99	>99(S)	120
15	 (S)-15a	>99	>99(S)	48
16	 (S)-18a	>99	-	24
17	 (S)-19a	14,4	-	120

[a] Condições reacionais: As reações foram realizadas em epperdorfs 2 mL contendo 20mM da cetona dissolvida em 50 µL de DMSO, 100uL de solução resultante das células úmidas de *E.coli*/Gox2036-pET28a (1g/mL), 1mM NADH, 0,5mM NAD^+, 50uL Isopropanol, 5mg de glicose. As reações biocatalisadas foram analisadas por CG/FID após as extrações das reações (20h, 170 rpm, 30°C). c = conversão determinada por CG-FID; ee = excesso enantiomérico determinada por CG-FID; ca = configuração absoluta determinada por polarimetria. Fonte: Autora (2020)

Dados anteriores da literatura abordam que o sítio ativo da Gox2036 contém uma cavidade hidrofóbica que consiste principalmente em Ile143, Tyr149, Leu152, Trp193 e

Tyr215(DENG et al., 2015). O átomo de oxigênio dos compostos carbonílicos formam ligações de hidrogênio com os resíduos Tyr155 e Ser142, e foram evidenciados serem essenciais para a atividade catalítica desidrogenases / redutases(FILLING et al., 2002), induzindo então a aproximação e encaixe do cofator NADH pela face *re* do composto carbonílio. Dessa maneira, comparando os resultados obtidos com a literatura para a enzima Gox2036, acredita-se que o átomo doador de hidreto do NADH só pode atacar por essa face, e através das configurações absolutas obtidas percebe-se que a enzima tem excelente preferência para seletividade Prelog para os substratos testados, pois a grande maioria resultou a álcoois com configuração S (Figura 29).

Figura 29 - Analise estrutural da Gox2036. a) Vista de perto do modelo de ligação de substrato na enzima. b) Relativa orientação do NADH ao substrato no sítio ativo



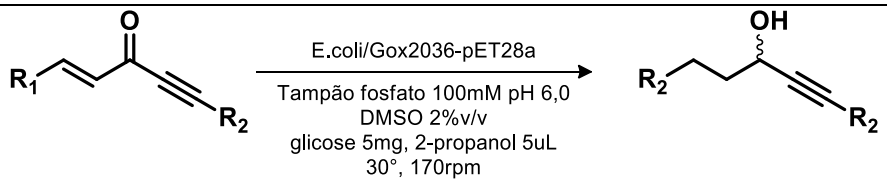
Fonte: Autora (2020)

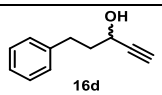
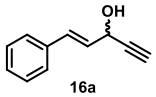
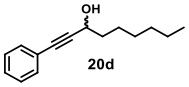
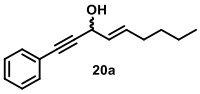
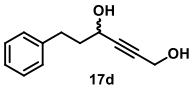
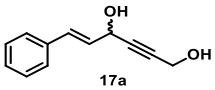
Na série dos compostos carbonílicos, foram selecionados também alguns que continham a função alquilica vizinha a carbonila, além da função acetilênica. Esses compostos apresentaram resultados interessantes. A redução além de acontecer na carbonila, levando a álcoois secundários, levou também a redução da ligação dupla resultando em ligação simples C-C. O composto **20b** após 24h já havia reduzido a carbonila e ligação dupla resultando no composto **20d** (Tabela 11, entrada 18). Já para o composto **17b** essa redução foi mais lenta e ocorreu em 48h (Tabela 11, entrada 20).

Por fim, ao acompanhar o percurso da reação pelas alíquotas a cada 24h, foi observado que o composto **16b** era reduzido primeiramente a carbonila, e ao decorrer da reação a

concentração do composto **16a** (Tabela 11, entrada 17) diminuía e o composto **16d** (Tabela 11, entrada 16) aumentava, indicando que inicialmente a redução da carbonila é necessária para poder acontecer a redução da dupla.

Tabela 11 - Bioredução da série de cetonas propargilicas alquilicas com a enzima recombinante E.coli/Gox2036-pET28a



Entrada	Álcool	Conversão[a] (%)	Tempo (hr)
16	 16d	85,9	120
17	 16a	14	120
18	 20d	>99%	24
19	 20a	-	24
20	 17d	>99%	48
21	 17a	-	48

[a] Condições reacionais: As reações foram realizadas em epperdorfs 2 mL contendo 20mM da cetona dissolvida em 50 µL de DMSO, 100uL de solução resultante das células úmidas de *E.coli*/Gox2036-pET28a (1g/mL), 1mM NADH, 0,5mM NAD^+, 50uL Isopropanol, 5mg de glicose. As reações biocatalisadas foram analisadas por CG/FID após as extrações das reações (20h, 170 rpm, 30°C). c=conversão;e=excesso enantiomético;

Fonte: Autora (2020)

3.3.3 Metodologia de obtenção dos álcoois propargílicos quirais por resolução com Lipases

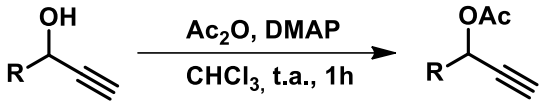
3.3.3.1 Obtenção dos Padrões acetato propargílicos racêmicos

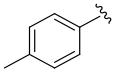
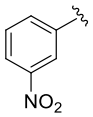
As resoluções enzimáticas com Lipases envolvem a resolução cinética de álcoois através da acetilação enantiosseletivas de um dos álcoois racêmicos frente ao outro, levando a

produtos com 50% de conversão. Para isso, após a obtenção e caracterização dos álcoois propargílicos foram realizadas reações para obtenção dos respectivos acetatos.

Dessa maneira, foi empregada a metodologia descrita na literatura para reação de acetilação. A obtenção dos acetatos em sua forma racêmica foi importante e necessária por permitir correlacionar os produtos biotransformados na resolução cinética, com os devidos padrões, por técnicas de análise, como a cromatografia gasosa. As reações de acetilação são reações no geral rápidas (1-2hr) e geram produtos com rendimentos bons a excelentes (Tabela 12).

Tabela 12 - Acetilação dos álcoois secundários catalisada por DMAP



Entrada	Álcool	(R)	Acetato	Rendimento %
1	**1a**		**1c**	98%
2	**4a**		**4c**	89%
3	**9a**		**9c**	50%
4	**13a**		**13c**	75%
5	**14a**		**14c**	60%

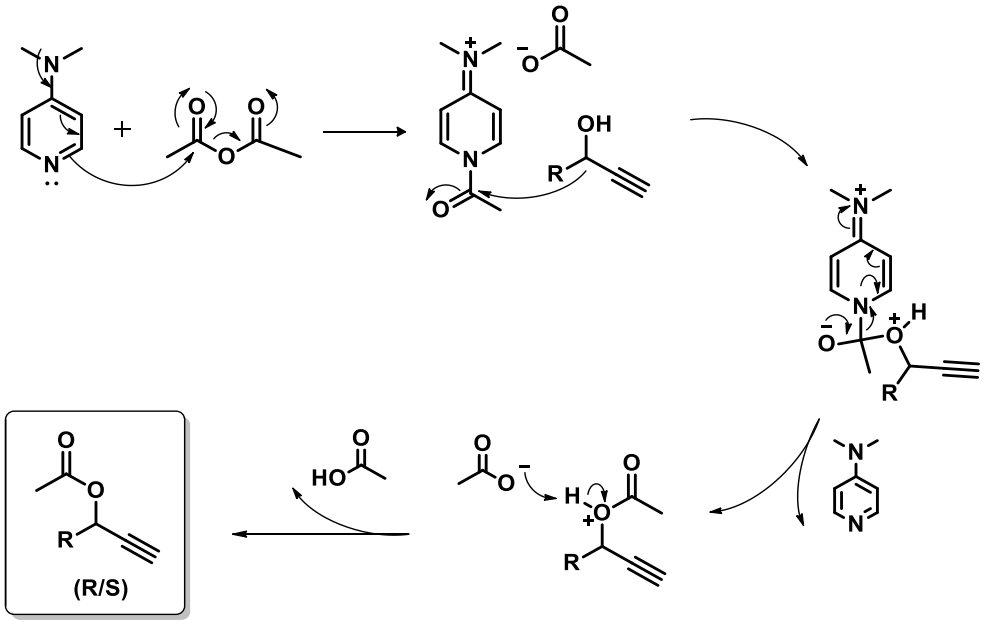
10mL de CH_2Cl, 1mmol álcool propargilico,1,5 eq de anidrido acético, 1,2 eq Et_3N, 10mol% DMAP. 2hr a temperatura ambiente.

Fonte: Autora (2020)

A metodologia comumente utilizada para as reações de acilação de álcoois é aquela em que se reage o álcool com o anidrido de ácido carboxílico desejado na presença de bases como piridina ou uma mistura de trietilamina com uma quantidade subestequiométrica de dimetilaminopiridina (DMAP). Nessa reação o doador de acila anidrido acético reage com o catalisador nucleofílico DMAP, que comumente realiza reações de transferência de grupo(XU

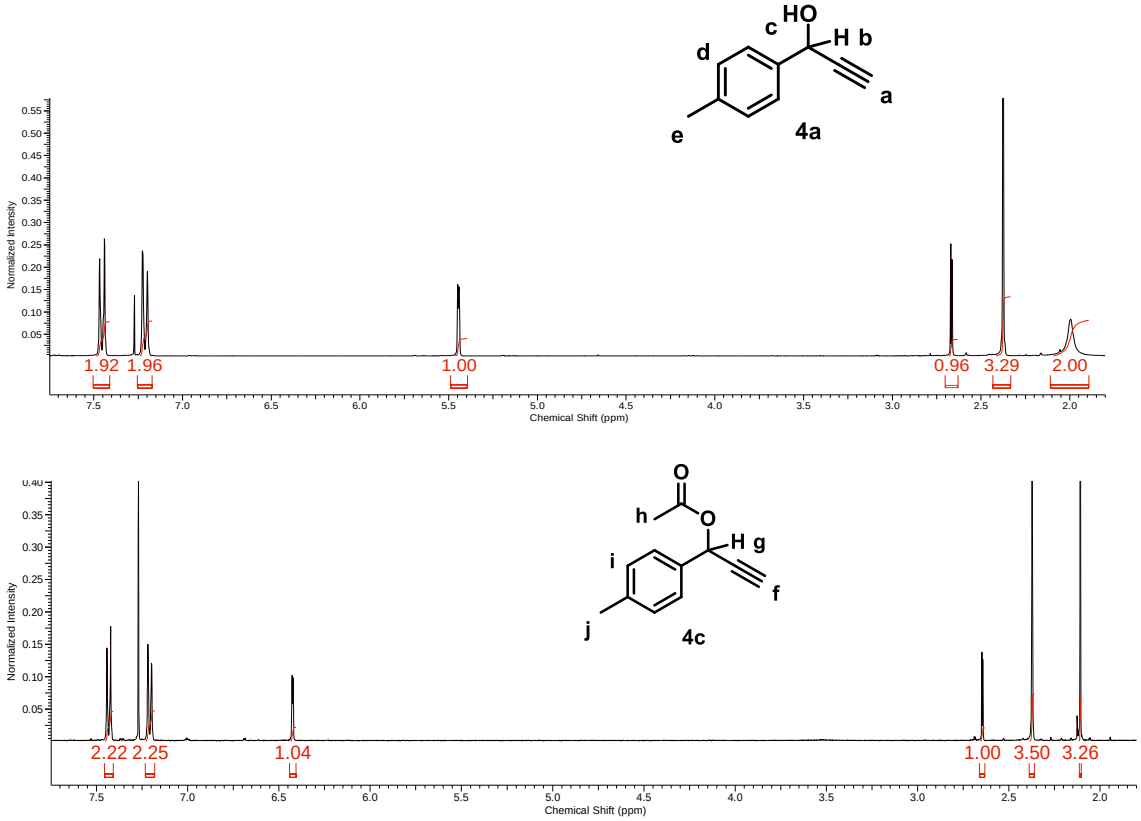
et al., 2005), levando a um catalisador acilado. Em seguida o catalisador sofre ataque nucleofílico do álcool e sequente formação do éster (Esquema 19).

Esquema 19 - Mecanismo de acetilação de álcoois secundários com DMAP



Comparando os dados espectrais de RMN de ^{1}H dos álcoois propargílicos e seus acetatos, e utilizando o composto **4a** e **4c** como referência respectivamente, foi observado que há o aparecimento da metila do acetato (δ 2,10) e ausência do sinal do hidrogênio da hidroxila (δ 1,99). Ocorre um deslocamento do dupleto carbinólico, saindo de um deslocamento de δ 5,44 para δ6,42, devido a influência do campo magnético gerado pela carbonila. (Figura 30)

Figura 30 - Espectro de 1H dos álcool 4a e acetato 4c propargílicos



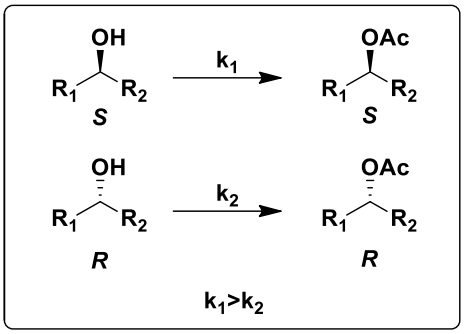
Fonte: Autora (2020)

Após síntese e caracterização dos padrões racêmicos dos álcoois e acetatos, reações de Resolução Cinética Enzimática foram conduzidas.

3.3.3.2 Resolução Cinética Enzimática

A Resolução Cinética Enzimática (RCE) por ser uma rota sintética que permite obter compostos quirais seletivos, foi empregada como alternativa para obtenção dos intermediários sintéticos enantiopuros, através da sua característica de separação dos racematos. Na RCE, nesse caso catalisada por lipases, ocorre a discriminação enantiosseletiva dos álcoois racêmicos, ou seja, acetilação de um enantiomêro preferencialmente ao outro induzida pela cinética da reação catalítica (Esquema 20).

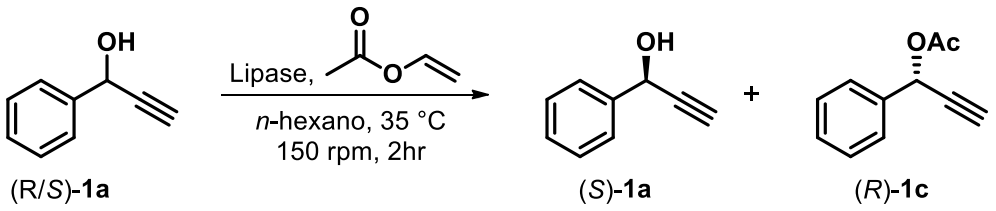
Esquema 20 - Distinção enantiosseletiva catalisada por lipases



Para isso foi necessária a obtenção dos parâmetros cromatográficos em coluna quiral como padrão de referência, a fim de estabelecer o cálculo dos excessos enantioméricos dos produtos resultantes da RCE. Na síntese foi empregada uma metodologia comumente usada para reações de acilação(XU et al., 2005).

Com os padrões racêmicos dos álcoois propargílicos e seus acetatos sintetizados, foi realizado o estudo comparativo empregando 5 diferentes lipases obtidas comercialmente, na resolução com o álcool propargílico **1a**. Nesse contexto preliminar, foi necessário estabelecer os parâmetros que apresentassem maior seletividade e curto tempo reacional de resolução, para em seguida encontrar as melhores condições reacionais variando solvente e temperatura (Esquema 21).

Esquema 21 - Resolução cinética enzimática do álcool 1a



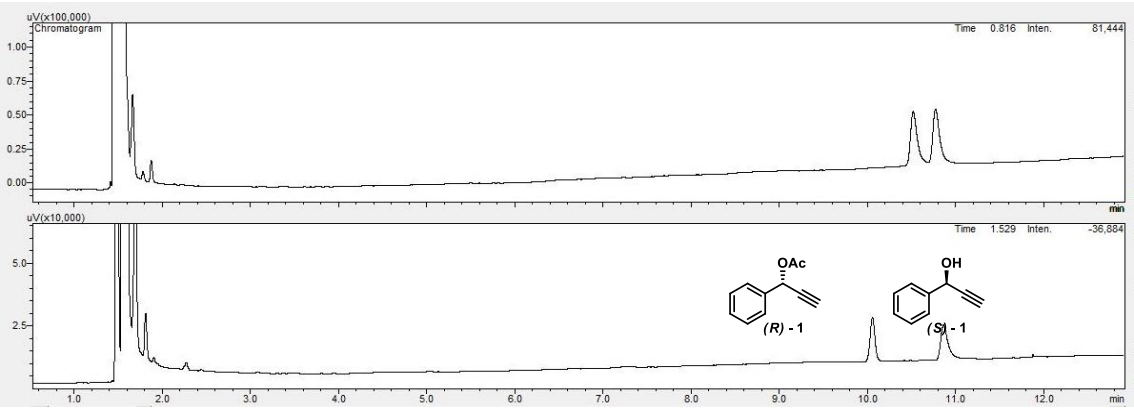
As condições estabelecidas inicialmente foram baseadas em trabalhos já desenvolvidos envolvendo a resolução de álcoois secundários por lipases, além de empregá-las comumente no laboratório(FILLAT et al., 2014; KO et al., 2009; MELAIS; ARIBI-ZOUIOUECHE; RIANT, 2016).

Em escala analítica foi observado o comportamento das lipases **CAL-B** (Novoenzym 455; lipase01), **A12LA** (Lipase A *"Amano" 12*; lipase 02), **AE07** (aa 07 *pseudomonas stutzeri*; lipase

03), **A2Ae011** (A2 AE 011 *alcaligenes spp*; lipase 04), **LA-A50** (*g amano 50*; lipase 05) comercialmente obtidas. Aquela que se mostrou mais versátil, apresentando melhores resultados de conversão, foi utilizada para os demais ensaios. Para realizar o *screening* partiu-se de 0,5mmoL e alíquotas retiradas a em 120min ou até acetilação completa de um dos álcoois.

O produto de resolução foi analisado por cromatografia em fase gasosa (CG) em fase estacionária quiral, contendo uma coluna com composição de 10% de *β*-ciclodextrina em cianopropil-fenil-metilpolisiloxano, (dimensões 30 m x 0.25 mm x 0.25 µm) que possibilitou a distinção dos enantiômeros devida interação diferenciada com a coluna (Figura 31). Os resultados obtidos com 120min de reação são apresentados na Tabela 13.

Figura 31 - Cromatograma em coluna quiral; a) Padrao racêmico alcool 1a; b) RCE utilizando CAL-B em 120min de reação



Fonte: Autora (2020)

Os resultados de resolução apresentados na Tabela 13 mostram a seletividade da enzima CAL-B ao álcool propargílico **(*S*)-1a**, levando ao produto resolvido em torno de 2 horas, enantiômero **(*S*)-1a** de 50% de conversão e >99% de excesso enantiomérico *ee%* (Figura 36 (b)). Resultado que também despertou interesse foi a seletividade cinética ao substrato, pois aos 10min de reação já era possível observar excesso enantiomérico cerca de 43,4%. (Figura 36 (a)).

Comparando esse resultado às outras lipases, a enzima AE07, no mesmo tempo reacional (120min), já apresentava seletividade ao substrato levando a conversão de 42,3 % e excesso enantiomérico de 84% para o enantiômero **(*S*)-1a**. Dessa forma, ainda que a lipase

AE07 (Tabela 13, Entrada 3) obtida de *Pseudomonas Stutzeri* se mostrasse seletivo ao substrato, os ensaios foram conduzidos utilizando a enzima CAL-B (Tabela 12, Entrada 1) como catalisador para os estudos de resolução cinética enzimática (RCE) dos demais álcoois propargílicos.

Quando ambiente enzimático está envolvido, a estrutura tridimensional da enzima depende tanto da sua cadeia carbônica proteica quanto do meio em que está inserida. Dessa forma o solvente e a temperatura influenciam diretamente no meio reacional conduzindo a atividade enzimática. Assim foi realizado uma triagem com diferentes solventes. Os resultados obtidos também estão apresentados na Tabela 13.

É possivel observar que após 2h de reação os solventes que se mostraram promissores foram o Hexano e Tolueno (Tabela 13, Entrada 9 e 10 respectivamente), ambos solventes apolares, por permitirem excessos acima de 98%. A eficiência enantiosseletiva desses processos depende muitas vezes da rigidez do sítio ativo. Quando a flexibilidade da proteína aumenta (devido ao aumento da constante dielétrica do solvente), o impedimento estérico exerce menor influência permitindo um aumento na reatividade do enantiômero resolvido(COSTA; DE AMORIM, 1999).

Outro paramêtro que apresenta importância nessas reações é a temperatura, cujo equilbrio reacional e estereoseletividade da enzima são diretamente afetados. Assim optou-se por variar a temperatura. Nos estudos iniciais é possivel notar uma variação, ainda que pequena, no excesso enantiomérico *ee%* quando variamos de 20°C a 40°C em escala de 10°C. Observando os valores no decorrer de 2horas conclui-se que a 40°C a CAL-B interage melhor com o alcool propargilico **1a** (Tabela 13, Entrada 12,13 e 14).

*Ta*bela 13 - Resultado de RCE obtidos variando condições reacionais com lipases comerciais

	Entrada		Tempo(min)	c(%) (*S*)-25	ee% (*S*)-25
Enzima [a]	1	CAL-B	120	49	>99
	2	A12LA	120	48,1	84
	3	AE07	120	42,3	>99
	4	A2AE011	120	30,65	85
	5	LA-A50	120	-	-
Solvente [b,e]	6	DCM	120	18,7	37,3
	7	AcOEt	180	21,4	42,8
	8	Acetona	180	17,2	34,5
	9	Hexano	120	49,1	98,3
	10	Tolueno	120	49,8	>99,9
	11	THF	120	16,1	12,8
Temp. [c,e]	12	20°C	120	49,76	99,0
	13	30°C	120	49,8	99,5
	14	40°C	120	49,99	99,9

1mL de solvente ([a,c] Hexano), 200mM álcool propargilico,1,5eq de anidrido acético, 10mg enzima. 2hr a temperatura ambiente. [e] enzima CAL-B; *Dados por GC-FID.*

Fonte: Autora (2020)

Baseado nos resultados de resolução cinética enzimática, a resolução com CAL-B apresentou como alternativa seletiva e economicamente viável uma vez que foi obtido 99,9% de ee% o álcool **(*S*)-1a** em aproximadamente 2h, ainda que a RCE apresenta como principal desvatagem rendimento máximo de reação cinética biocatalítica 50% para cada enantiômero.

4 CONCLUSÃO

A obtenção de intermediários quirais empregando biocatálise como meio se apresenta como uma tendência ascendente no campo de aplicação de síntese. Nesta perspectiva, o presente trablalho demonstrou a viabilidade do uso de reações enzimáticas para a preparação de precursores quirais opticamente ativos, possibilitando realizar estudos metodológicos para obtenção de álcoois propargílicos quirais e Inonas.

Os estudos na etapa de oxidação, monstram que a obtenção de cetonas propargilicas usando a metodologia enzimática com Lacase/TEMPO como mediador, levando a formação de produtos oxidados com taxas de reação entre 1h-24h, com bons a excenlentes rendimentos, e pela primeira vez ouve relatos da oxidação de álcoois propargílico usando essa metodologia.

Outro ponto de destaque foi, pelo fato de o meio envolvido nessas reações ser aquoso, o método tornou-se sustentável, com melhores rendimentos e mais ambientalmente limpo quando comprados ao custo benefício de outros catalisadores químicos já descritos na literatura. Além disso, a metodologia de oxidação se mostrou robusta, e passível de der aplicada empregando outros tipos de substratos, que não continham a função acetilênica em sua estrutura.

A reprodução de enzimas recombinantes e os plasmídeos recombinantes foram obtidos de maneira eficiente e reprodutivel, levando a obtenção dos vetores pUC18 de clonagem e pET28a de expressão. As expressões resultaram quantidades reprodutíveis e escaláveis de proteína de forma solúvel e passíveis de purificação, pois permitiu obter concentrações de DNA na escala de 150 a 200 ng μL^{-1}, quando utiliva-se 250mL de meio bacteriano expressado.

Cepas de E. coli superexpressando gox2036 juntamente com o cofator de reciclagem NADH-NAD + foram empregadas para redução de inonas na presença de substrato 20mM. Entre essas variantes, E. coli / pET28a-gox2036 e 1mM NADH-0,5mM NAD + exibiram a maior produtividade, com 1-fenil-2-propin-1-ol em uma alta taxa de produtividade. Foi possível obter álcoois de configuração S, com excelentes excessos enantioméricos (>99%) e conversão, em diferentes tempos de reação (24-72h). A carbonil redutase dependente de NADPH de Gluconobacter oxydans (GOx2036) foi definida como uma proposta promissora para redução enantiosseletiva de inonas.

Os resultados obtidos separadamente de oxidação de álcoois propargílicos racêmicos por lacase/TEMPO juntamente com a redução de inonas enantiosseletiva surge como uma nova metodologia de derracemização se empreagada sequencialmente. Esses resultados demonstraram que o processo biocatalítico desenvolvido é escalável e tem forte potencial para a preparação em escala industrial de álcoois de (S) -propargil.

Como metodologia alternativa de obetenção de álcoois propargilicos enantioméricos, a acetilação enantiosseletiva de lipases CAL-B e a AE07 mostraram-se eficientes na resolução dos álcoois propargílicos, obtendo-se o produto resolvido em menos de 2h, e o produto de resolução (S)-25 se apresentava com um ee% >99 e conversão de 50%.Essa metodologia pode se empregada como potencial metodologia de desracemizacao se utilizada com outra enzima oxidativa enantioseletiva.

5 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

As análises de cromatografia a gás foram realizadas em um cromatógrafo Shimadzu (modelo GC-2010 Plus), acoplado à coluna quiral Beta DexTM 120 (β-Ciclodextrina) c dimensões 30 m x 0.25 mm x 0.25 µm, utilizando detector de ionização em chamas (FID) e N_2 como gás de arraste.

As análises de RMN de 1H a 300 MHz e RMN de 13C 75 MHz, ^{1}H a 400 MHz e RMN de ^{13}C 100 MHz, ^{1}H a 500 MHz e RMN de ^{13}C 125 MHz foram realizadas num espectrômetro da VARIAN® modelo Unity Plus. Os deslocamentos químicos estão expressos em ppm, em relação ao pico residual do $CHCl_3$ (7,26 ppm) para todos os espectros de hidrogênio e em relação ao pico central do $CDCl_3$ (77 ppm), no caso dos espectros de carbono.

As reações de biotransformação foram realizadas numa incubadora orbital, modelo Marconi MA420, com controle de agitação orbital, tempo e temperatura que varia de 0°C a 72°C. O ângulo de desvio óptico foi determinado por um polarímetro digital da marca Jasco P-2000, empregando-se uma cubeta de 10 mL, a 22°C.

Os solventes e os reagentes obtidos comercialmente foram tratados segundo a literatura. Os compostos sintetizados foram submetidos à purificação em coluna com sílica gel, utilizando fase móvel hexano/AcOEt em diferentes proporções.

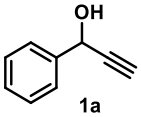
A bomba de vácuo utilizadas das filtrações biocatalíticas foi modelo Prismática, com vácuo máximo de 620,8 mmHg, e potência de 1/4Cv (186,65W).

Na determinação do pH dos meios de cultura foi utilizado o pHmetro instrutherm PH-720.

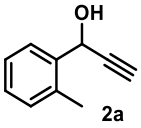
Os meios de cultura utilizados nos ensaios com fungos foram esterilizados em autoclave modelo prismatec vertical CS, com temperatura de operação 127 ºC temperatura máxima 143 ºC, pressão máxima de trabalho 1,5 kgf/cm², pressão de operação 1,5 kgf/cm².

5.1 Síntese dos padrões racêmicos dos Álcoois propargílicos

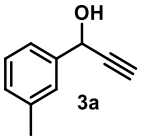
Sob uma atmosfera inerte (N_2), uma solução do aldeído (10 mmol) em THF seco (20 mL) foi adicionado lentamente, sob agitação magnética, à uma solução de cloreto de etinil magnésio (17mL, 0,6M em THF) a -45 °C. A reação foi deixada em agitação por 3h à temperatura ambiente. A mistura final foi tratada adicionando-se uma solução saturada de NH_4Cl (5 mL), seguida da extração com AcOEt(3x30 mL). A fase orgânica foi seca com sulfato de sódio anidro, filtrada e os solventes removidos em rotaevaporador. O material resultante foi submetido à purificação cromatográfica utilizando uma mistura hexano/AcOEt(7:1).



1-fenilprop-2-in-1-ol (**1a**): Fórmula molecular: C_9H_8O, MM: 132,16g/mol; Purificado por cromatografia com silica gel, e 4:1 Hexano/AcOEt como eluente. Rendimento: 99%; óleo amarelo.**RMN de ^{1}H** (300MHz, $CDCl_3$) δ7,54-7,54 (m, 2H), 7,43-7,34 (m, 3H), 5,47 (d, *J* =2,4Hz, 1H), 2,67 (d, *J* = 2,4Hz, 1H), 2,04 (s, 1H). **RMN de ^{13}C** (75 MHz, $CDCl_3$) δ140,0, 128,6, 128,5, 126,6, 83,5, 74,8, 64,4. **CAS:** 4187-87-5

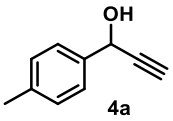


1-(o-tolil)prop-2-in-1-ol(**2a**): Fórmula molecular : $C_{10}H_{10}O$, MM: 146,19g/mol; Purificado por cromatografia com silica gel, e 4:1 Hexano/AcOEt como eluente. Rendimento: 93%; óleo amarelo. **RMN de ^{1}H** (500MHz, $CDCl_3$) δ7,67-7,65 (m, 1H), 7,25-7,19 (m, 3H), 5,62 (dd, *J* = 5,8Hz, *J* = 2,3Hz, 1H), 2,64 (d, *J* = 2,3Hz, 1H), 2,44 (s, 3H), 2,15 (d, *J* = 5,8Hz, 1H). **RMN de ^{13}C** (125 MHz, $CDCl_3$) δ 137,8, 135,9, 130,8, 128,6, 126,4, 126,3, 83,3, 74,7, 62,3, 18,9. **CAS:** 139416-71-0

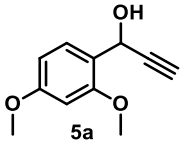


1-(m-tolil)prop-2-in-1-ol(**3a**): Fórmula molecular : $C_{10}H_{10}O$, MM: 146,19g/mol; Purificado por cromatografia com silica gel, e 4:1 Hexano/AcOEt como eluente. Rendimento: 90%; óleo amarelo. **RMN de ^{1}H** (500 MHz, $CDCl_3$) δ7,36 (s, 1H), 7,35(d, *J* = 7,6Hz, 1H), 7,27 (t, *J* = 7,6Hz, 1H), 7,15 (d, *J* = 2,2Hz, 1H), 5,43 (dd, *J* = 6,0Hz, *J* = 2,1Hz 1H), 2,66 (d, *J* = 2,2Hz, 1H),

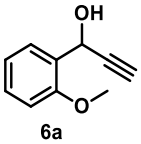
2,38 (s, 3H), 2,21 (d, *J* = 6,0Hz, 1H). **RMN de ^{13}C** (125 MHz, $CDCl_3$) δ140,0, 138,5, 129,3, 128,6, 127,2, 123,6, 83,6, 74,7, 64,5, 21,4. **CAS:** 29978-38-9



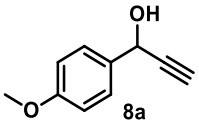
1-(p-tolil)prop-2-in-1-ol(**4a**): Fórmula molecular : $C_{10}H_{10}O$, MM: 146,19g/mol; Purificado por cromatografia com silica gel, e 4:1 Hexano/AcOEt como eluente. Rendimento: 98%; óleo amarelo. **RMN de ^{1}H** (300MHz, $CDCl_3$) δ7,44 (d, *J* = 8,1Hz, 2H), 7,20 (d, *J* = 8,1Hz, 2H), 5,43 (d, *J* = 2,1Hz, 1H), 2,65 (d, *J* = 2,1Hz, 1H), 2,36 (s, 3H), 1,98 (s, 1H). **RMN de ^{13}C** (75 MHz, $CDCl_3$) δ138,4, 137,2, 129,3, 126,5, 83,6, 74,6, 64,3, 21,1. **CAS:** 7342-07-6



1-(2,4-dimetoxifenil)prop-2-in-1-ol(**5a**)*:* Fórmula molecular : $C_{11}H_{12}O_3$, MM: 192,21g/mol; Purificado por cromatografia com silica gel, e 4:1 Hexano/AcOEt como eluente. Rendimento: 100%; sólido amarelo. **RMN de ^{1}H** ((400MHz, $CDCl_3$). δ7,48 (d, *J* = 8,4, 1H), 6,50-6,47 (m, 2H), 5,65 (dd, *J* = 6,0Hz, *J* = 2Hz, 1H), 3,86 (s, 3H), 3,81(s, 3H), 2,85 (d, J = 6,0Hz, 1H), 2,60 (d, *J* = 2Hz, 1H). **RMN de ^{13}C** (101 MHz, $CDCl_3$) δ 161,2, 157,8, 128,6, 121,0, 104,2, 98,9, 83,3, 73,8, 60,5, 55,5, 55,4. **CAS:** 101911-61-9

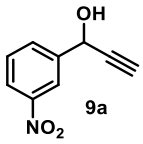


1-(2-metoxifenil)prop-2-in-1-ol(**6a**): Fórmula molecular : $C_{10}H_{10}O_2$, MM: 162,19g/mol; Purificado por cromatografia com silica gel, e 4:1 Hexano/AcOEt como eluente. Rendimento: 96%; óleo amarelo.**RMN de ^{1}H**(400MHz, $CDCl_3$). δ7,57 (dd, *J* = 7,6Hz, 1H), 7,33 (td, *J* = 8Hz, *J* = 1,6Hz, 1H), 6,98 (t, *J* = 7,6Hz, 1H), 6,91 (d, *J* = 8,0Hz, 1H), 5,69 (d, *J* = 2,2Hz, 1H), 3,89 (s, 3H), 2,61 (d, *J* = 2,2Hz, 1H), 1,43 (s, 1H). **RMN de ^{13}C** (101 MHz, $CDCl_3$) δ 156,7, 129,8, 128,2, 127,8, 120,9, 110,8, 83,0, 74,0, 61,0, 55,5, 30,3. **CAS:** 1776-12-1



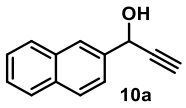
1-(4-metoxifenil)prop-2-in-1-ol(**8a**): Fórmula molecular : $C_{10}H_{10}O_2$, MM: 162,19g/mol; Purificado por cromatografia com silica gel, e 4:1 hexano/AcOEt como eluente.

Rendimento: 97%; óleo amarelo.**RMN de ^{1}H** (200MHz, $CDCl_3$) δ7,5 (d, *J* = 8Hz, 2H), 6,93 (d, *J* = 8Hz, 2H), 5,43 (s, 1H), 3,83 (s, 3H), 2,69 (d, *J* = 2,2Hz, 1H). **RMN de ^{13}C** (50 MHz, $CDCl_3$) δ159,7, 132,3, 128,0, 113,9, 83,7, 74,5, 63,9, 55,3. **CAS:** 19115-30-1



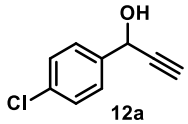
9a

1-(3-nitrofenil)prop-2-in-1-ol(**9a**): Fórmula molecular : $C_9H_7NO_3$, MM: 177,16g/mol; Purificado por cromatografia com silica gel, *e* 4:1 Hexano/AcOEt como eluente. Rendimento: 78%; óleo marrom.**RMN de ^{1}H** (300MHz, $CDCl_3$) δ8,42 (t, *J* = 1,8Hz, 1H), 8,18 (ddd, *J* = 8,2Hz, *J* = 2,2Hz, *J* = 0,7Hz, 1H), 7,89 (m, 1H), 7,57 (t, *J* = 7,9Hz, 1H), 5,57 (s, 1H), 3,12 (s, 1H), 2,04 (s,1H). **RMN de ^{13}C** (75 MHz, $CDCl_3$) δ 148,2, 142,0, 132,6, 129,6, 129,5, 123,2, 121,5, 82,3, 75,8, 63,1. **CAS:** 83494-25-1



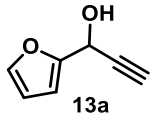
10a

1-(naftalen-2-il)prop-2-in-1-ol(**10a**): Fórmula molecular : $C_{13}H_{10}O$, MM: 182,22g/mol; Purificado por cromatografia com silica gel, e 4:1 Hexano/AcOEt como eluente. Rendimento: 95%; sólido amarelo.**RMN de ^{1}H** (400MHz, $CDCl_3$) δ7,87-7,82 (m, 3H), 7,55-7,43 (m, 3H), 6,09 (d, *J* = 2,5Hz, 1H), 5,09 (s, 1H), 2,01 (s, 1H). **RMN de ^{13}C** (100 MHz, $CDCl_3$) δ 135,0, 133,9, 130,4, 129,4, 128,7, 126,4, 125,9, 125,2, 124,5, 123,7, 83,2, 75,4, 62,6.**CAS:** 15100-93-3



12a

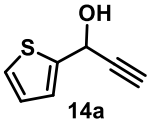
1-(4-clorofenil)prop-2-in-1-ol (**12a**): Fórmula molecular : C_9H_7ClO, MM: 166,02g/mol; Purificado por cromatografia com silica gel, e 4:1 Hexano/AcOEt como eluente. Rendimento: 84%; óleo amarelo.**RMN de ^{1}H** (400 MHz, CDCl3) δ7.49 (dd, *J* = 8,7 Hz, J= 2,0Hz, 2H), δ 7,6 (dd, *J* = 8,7 Hz, J= 2,0Hz, 2H), δ5,44 (s, 1H), δ 2,68 (d, *J* = 2.2 Hz, 1H), 2,33 (br s, 1H). **RMN de ^{13}C** (CDCl3, 100 MHz) δ 138,6, 134,6, 129,0, 128,1, 83,2, 75,4, 63,8. **CAS**:29805-11-6



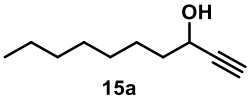
13a

1-(furan-2-il)prop-2-in-1-ol(**13a**): Fórmula molecular : $C_7H_6O_2$, MM: 122,12g/mol; Purificado por cromatografia com silica gel, e 4:1 hexano/AcOEt como eluente. Rendimento: 77%; óleo marrom. **RMN de ^{1}H** (400 MHz, $CDCl_3$) δ7,42 (s, 1H), 6,47 (d, *J* = 3,2Hz, 1H), 6,36 (t, *J*

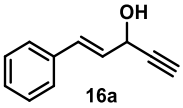
= 2Hz, 1H), 5,46 (s,1H), 2,65 (d, *J* = 2Hz, 1H). **RMN de ^{13}C** (100 MHz, $CDCl_3$) δ152,3, 143,1, 110,4, 107,9, 80,9, 74,0, 57,9. **CAS:** 695-82-9



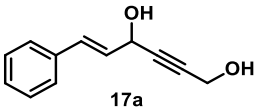
14a *1-(tiofen-2-il)prop-2-in-1-ol*(**13a**): Fórmula molecular : C_7H_6OS, MM: 138,19g/mol; Purificado por cromatografia com silica gel, *e* 4:1 Hexano/AcOEt as eluente. Rendimento: 89%; óleo laranja. **RMN de ^{1}H** (400 MHz, $CDCl_3$) δ7,31 (d, *J* = 5,2Hz, 1H), 7,20 (m, 1H), 6,98 (t, *J* = 4,4Hz, 1H), 5,68 (d, *J* = 5,6Hz, 1H), 2,75 (d, *J* = 6,8Hz, 1H), 2,69 (d, *J* = 1,6Hz, 1H). **RMN de ^{13}C** (100 MHz, $CDCl_3$) δ146,7, 129,4, 128,9, 128,4, 85,5, 80,0, 79,7, 79,4, 76,9, 62,7. **CAS:** 19212-35-2



15a *dec-1-in-3-ol*(**15a**): Fórmula molecular: $C_{10}H_{18}O$, MM: 154,25g/mol; Purificado por cromatografia com silica gel, e Hexano como eluente. Rendimento: 65%; white liquid. **RMN de ^{1}H** (300MHz, $CDCl_3$) δ4,37 (td, *J* = 6,3Hz, *J* = 1,8Hz, 1H), 2,46 (d, *J* = 1,8Hz, 1H), 1,98 (s, 1H), 1,76-1,68 (m, 2H), 1,46 (m, 2H), 1,29 (m, 8H), 0,88 (m, 3H). **RMN de ^{13}C** (75 MHz, $CDCl_3$) δ 85,0, 72,8, 62,3, 37,6, 31,7, 29,2, 25,0, 22,6, 14,1. **CAS:** 74824-53-6

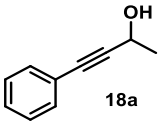


16a *(E)-1-fenilpent-1-en-4-in-3-ol*(**16a**): Fórmula molecular: $C_{11}H_{10}O$, MM: 158,20g/mol; Purificado por cromatografia com silica gel, e 4:1 Hexano/AcOEt como eluente. Rendimento: 74%; sólido amarelo. **RMN de ^{1}H** (300MHz, $CDCl_3$) δ8,43 (t, *J* = 1,8Hz, 1H), 8,19 (ddd, *J* = 8,1Hz, *J* = 2,1Hz, *J* = 0,9Hz, 1H), 7,89 (m, 1H), 7,57 (t, *J* = 7,8Hz, 1H), 5,57 (d, *J* = 1,5Hz, 1H), 2,74 (d, *J* = 2,5Hz, 1H). **RMN de ^{13}C** (75 MHz, $CDCl_3$) δ 148,3, 142,0, 132,6, 129,6, 123,3, 121,6, 82,3, 75,9, 63,2. **CAS:** 14604-31-0

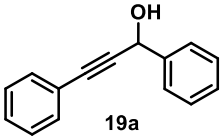


17a *(E)-6-fenilhex-5-en-2-ine-1,4-diol*(**17a**): Fórmula molecular: $C_{12}H_{12}O_2$, MM: 188,22g/mol; Purificado por cromatografia com silica gel, e 4:1 Hexano/AcOEt como eluente. Rendimento: 74%; liquido laranja. **RMN de ^{1}H** (300MHz, $CDCl_3$)7,40-7,37 (m, 2H), 7,33-7,25 (m, 3H), 6,47 (d, *J* = 15,9Hz, 1H), 6,28 (dd, *J* = 15,9Hz, *J* = 6Hz, 1H), 5,09 (dd, *J* = 6Hz, *J* = 1,5Hz, 1H),

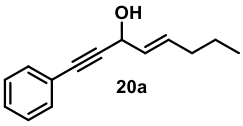
4,35 (d, *J* = 1,5Hz,2H), 2,77 (s, 1H). **RMN de ^{13}C** (75 MHz, $CDCl_3$) δ 135,9, 132,0, 128,6, 128,1, 127,6, 126,8, 84,7, 62,8, 50,9.



4-fenilbut-3-in-2-ol(**18a**): Fórmula molecular: $C_{10}H_{10}O$, MM: 200,28 g/mol; Purificado por cromatografia com silica gel, e 4:1 hexano/AcOEt como eluente. Rendimento: 75%; liquido amarelo. **RMN de ^{1}H** (200MHz, $CDCl_3$) δ7,48-7,43(m, 2H), 7,36-7,32 (m, 3H), 4,85-4,73 (m, 1H), 2,00 (d, *J* = 4,8Hz, 1H), 1,58 (d, *J* = 6,7Hz). **RMN de ^{13}C** (50 MHz, $CDCl_3$) δ131.6, 128.3, 128.2, 122.5, 90.9, 84.0, 58.8, 24.3. **CAS:** 73922-81-3



1,3-difeilprop-2-in-1-ol(**19a**): Fórmula molecular: $C_{15}H_{12}O$, MM: 208,26 g/mol; Purificado por cromatografia com silica gel, e 4:1 Hexano/AcOEt como eluente. Rendimento: 96%; líquido amarelo. **RMN de ^{1}H** (500MHz, $CDCl_3$) δ7,63-7,61(m, 2H), 7,48-7,46 (m, 2H), 7,42-7,39 (m, 2H), 7,36-7,30 (m, 2H), 5,69 (d, *J* = 5,4Hz, 1H), 2,33 (d, *J* = 5,4Hz, 1H). **RMN de ^{13}C** (125 MHz, $CDCl_3$) δ 140,7, 131,8, 128,7, 128,6, 128,4, 128,3, 126,7, 122,4, 88,7, 86,7, 65,1. **CAS:** 1817-49-8



(E)-1-feniloct-4-en-1-in-3-o(**20a**)*l*: Fórmula molecular: $C_{14}H_{16}O$, MM: 200,28 g/mol; Purificado por cromatografia com silica gel, e 4:1 hexano/AcOEt como eluente. Rendimento: 100%; líquido amarelo. **RMN de ^{1}H** (500MHz, $CDCl_3$) δ7,46-7,44(m, 2H), 7,32-7,29 (m, 3H), 5,95 (dtd, *J* = 15Hz, *J* = 7Hz, *J* =1Hz, 1H), 5,69 (ddt, *J* = 15Hz, *J* = 6,5Hz, *J* =1Hz, 1H), 5,06 (d, *J* = 6Hz, 1H), 2,07 (q, *J* = 7Hz, 2H), 1,45 (sext, *J* = 7,5Hz, 2H), 0,93 (t, *J* = 7,5Hz, 3H). **RMN de ^{13}C** (125 MHz, $CDCl_3$) δ 134,0, 131,7, 129,1, 128,4, 128,3, 122,6, 88,6, 85,9, 63,5, 34,0, 22,0, 13,7.

5.2 Metodologia de oxidação visando a obtenção de inonas

5.2.1 Métodos enzimáticos de oxidação Lacase/TEMPO

Em um balão foi adicionado o solvente (4mL), a enzima Lacase (16mg; 1U/mg) e TEMPO (10mol%), foram mantidos sob agitação magnética por 30min e atmosfera (borbulhamento) de O_2. Em seguida foi adicionado o álcool secundário (20mmol). A mistura reacional foi permanecida até consumo total do material de partida, acompanhando por alíquotas, sob atmosfera de O_2 e temperatura ambiente. Ao término a reação foi extraída com AcOEt (3x 5mL). A fase orgânica foi seca com MgSO4. A conversão do produto reacional foi analisada por cromatografia.

5.2.2 Métodos químicos de oxidação

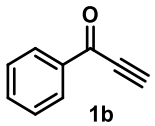
5.2.2.1 Oxidação envolvendo TCCA como agente oxidante

Uma solução de 15% de $NaHCO_3$ (3mL) foi adicionada em uma solução do álcool (1,0mmol) em acetona (20mL) sob agitação e mantidos a 0°C. Adicionou-se em seguida Tempo (2mol%), e o TCCA (2mmol) lentamente. Deixou-se chegar à temperatura ambiente. A mistura foi filtrada em celite sob vácuo e tratada com 5mL de solução saturada de Na_2CO_3. A fase aquosa extraída com AcOEt e seco com Na_2SO_4.

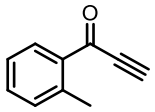
5.2.2.2 Oxidação envolvendo MnO2 como agente oxidante

Em um balão de 10mL foi acrescentado o álcool (1mmol) em AcOEt (5 mL), sob agitação magnética. Em seguida foi adicionado o MnO_2 (5 eq) e mantido por 2-5hr. Ao término, a solução foi filtrada com celite. O produto final foi purificado por coluna com hexano/AcOEt (6:1).

Para verificar o melhor solvente e números de equivalente do oxidante, foi realizado um screening com o álcool 1-feniletanol. Os solventes utilizados foram THF, acetona e AcOEt, e os equivalentes foram de 1, 5 e 10eq. As reações foram acompanhadas por CG-FID.

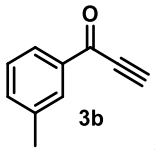


1b *1-fenil-2-propin-1-ona (**1b**)*: Fórmula molecular : C_9H_6O, MM: 130,14 g/mol; Purificado por cromatografia com silica gel, e 4:1 hexano/AcOEt como eluente. Rendimento: 97%; sólido amarelo. **RMN de ^{1}H** (300 MHz, $CDCl_3$ ppm) δ 8.17 (d, *J* = 7.2Hz, 2H), 7.64 (t, *J* = 7.2Hz, 1H), 7.50 (t, *J* = 7.5, 2H), 3.44 (s, 1H). **RMN de ^{13}C** (75 MHz, $CDCl_3$ ppm) δ 177.4, 136.1, 134.5, 129.7, 128.7, 80.7, 80.3. **CAS**-3623-15-2



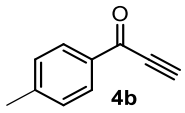
2b

1-(o-tolil)prop-2-in-1-ona(**2b**)*:* Fórmula molecular : $C_{10}H_8O$, MM: 144,17 g/mol; Purificado por cromatografia com silica gel, e 4:1 Hexano/AcOEt como eluente. Rendimento: 85%; sólido amarelo. **RMN de ^{1}H** (200 MHz, $CDCl_3$) δ 8,20 (dd, j = 7,6Hz, J = 1,2Hz, 1H), 7,50 (td, 7,4Hz, J = 1,4Hz, 1H), 7,37 (t, J = 7,4Hz, 1H), 7,33 (m, 1H), 3,14 (s, 1H), 2,66 (s, 3H). **RMN de ^{13}C** (50 MHz, $CDCl_3$) δ 178,8, 140,8, 134,6, 133,7, 133,3, 132,1, 125,9, 81,5, 79,5, 21,9. **CAS:** 59838-69-6



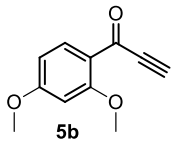
3b

1-(m-tolil)prop-2-in-1-ona(**3b**)*:* Fórmula molecular : $C_{10}H_8O$, MM: 144,17 g/mol; Purificado por cromatografia com silica gel, e 4:1 Hexano/AcOEt como eluente. Rendimento: %; sólido amarelo. **RMN de ^{1}H** (200 MHz, $CDCl_3$) δ7,98-7,96 (m,1H), 7,44 (d, J= 3Hz, 1H), 7,38 (t, J = 3,2Hz, 1H), 3,41 (s,1H), 2,43 (s, 3H). **RMN de ^{13}C** (50 MHz, $CDCl_3$) δ177,5, 138,6, 136,2, 135,3, 130,0, 128,6, 127,1 80,5, 80,4, 21,2. **CAS:**



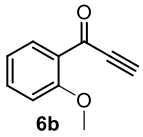
4b

1-(4-metilfenil)prop-2-in-1-ona(**4b**)**:** Fórmula molecular : $C_{10}H_8O$, MM: 144,17 g/mol; Purificado por cromatografia com silica gel, e 4:1 Hexano/AcOEt como eluente. Rendimento: 70%; líquido amarelo. **RMN de ^{1}H** (300 MHz, $CDCl_3$ ppm) δ 8.04 (d, *J* = 8.4Hz, 2H), 7.27 (d, *J* = 8.4Hz, 2H), 3.42 (s, 1H), 2.41 (s, 3H). **RMN de ^{13}C** (75 MHz, $CDCl_3$ ppm) δ177.1, 145.8, 133.8, 129.8, 129.4, 80.5, 80.3, 21.8. **CAS**-1776-13-2



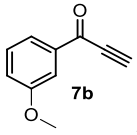
5b

1-(2,4-dimetoxifenil)prop-2-in-1-ona(**5b**)*:* Fórmula molecular : $C_{11}H_{10}O_3$, MM: 190,06 g/mol; Purificado por cromatografia com silica gel, e 4:1 Hexano/AcOEt como eluente. Rendimento: 93%; sólido amarelo. **RMN de ^{1}H** (300 MHz, $CDCl_3$ ppm) δ 8.10 (d, *J* = 8.7Hz, 1H), 6.54 (dd, *J* = 8.7 Hz, *J* = 2.4 Hz, 1H), 6.47 (d, *J* = 2.4Hz, 1H), 3.91 (s, 3H), 3.89(s, 3H), 3.31(s, 1H). **RMN de ^{13}C**: (75MHz, $CDCl_3$, ppm) δ 174.32, 165.87, 162.33, 136.07, 119.46, 105.13, 98.69, 82.22, 78.57, 55.82, 55.67. **CAS**:78725-31-2



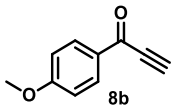
6b

1-(2-metoxifenil)prop-2-in-1-ona(**6b**): Fórmula molecular : $C_{10}H_8O_2$, MM: 160,17 g/mol; Purificado por cromatografia com silica gel, e 4:1 Hexano/AcOEt como eluente. Rendimento: 70%; líquido amarelo. **RMN de ^{1}H** (300 MHz, $CDCl_3$ ppm) δ 8.06 (d, *J* = 7.5Hz, 1H), 7.55 (t, *J* = 7.5Hz, 1H), 7.03 (m, 2H), 3.94 (s, 3H), 3.37 (s, 1H). **RMN de ^{13}C** (75 MHz, $CDCl_3$ ppm) δ 160.03, 148.72, 135.47, 133.22, 125.76, 120.28, 112.17, 79.29, 77.21, 55.82. **CAS**:1776-13-2



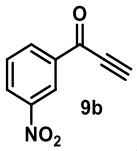
7b

1-(3-metoxifenil)prop-2-in-1-ona(**7b**): Fórmula molecular : $C_{10}H_8O_2$, MM: 160,17 g/mol; Purificado por cromatografia com silica gel, e 4:1 Hexano/AcOEt como eluente. Rendimento:75%; líquido amarelo. **RMN de ^{1}H** (200 MHz, $CDCl_3$ ppm) δ7,82 (dt, *J* = 7,6Hz, *J* = 1,4Hz, 1H), 7,66 (dd, *J* =2,4Hz, *J* = 1,4Hz, 1H), 7,44 (t, *J* = 8,0Hz, 1H), 7,21 (ddd, J = 8,0Hz, *J* = 2,4Hz, *J* = 1Hz, 1H) 3,89 (s, 3H), 3,45 (s, 1H). **RMN de ^{13}C** (50 MHz, $CDCl_3$ ppm) δ177,1, 159,8, 137,4, 129,7, 123,0, 121,4, 112,7, 80,6, 55,4. **CAS:** 252893-52-0



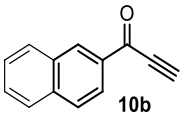
8b

1-(4-metoxifenil)prop-2-in-1-ona(**8b**): Fórmula molecular : $C_{10}H_8O_2$, MM: 160,0 g/mol; Purificado por cromatografia com silica gel, e 4:1 Hexano/AcOEt como eluente. Rendimento: 64%; sólido amarelo. **RMN de ^{1}H** (300 MHz, $CDCl_3$ ppm) δ 8.14 (d, *J* = 8.7Hz, 2H), 6.97 (d, *J* = 8.7Hz, 2H), 3.90 (s, 3H), 3.38 (s,1H).**RMN de ^{13}C** (75 MHz, $CDCl_3$ ppm) δ 164.78, 139.11, 132.15, 129.60, 113.95, 79.99, 77.22, 55.62.. **CAS**-16469-68-4

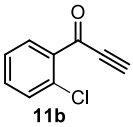


9b

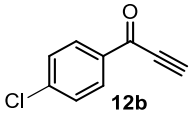
1-(3-nitrofenil)prop-2-in-1-ona(**9b**): Fórmula molecular : $C_9H_5NO_3$, MM: 175,0 g/mol; Purificado por cromatografia com silica gel, e 4:1 Hexano/AcOEt como eluente. Rendimento: 66%; solido marrom. **RMN de ^{1}H** (300MHz, $CDCl_3$, ppm) δ 8.97 (t, *J* = 2.1Hz, 1H), 8.48-46 (m, 2H), 7.73 (t, *J* = 8.1Hz, 1H), 3.61 (s,1H). **RMN de ^{13}C**: (75 MHz, $CDCl_3$, ppm) δ 174.91, 148.51, 137.29, 134.64, 130.02, 128.56, 124.57, 82.70, 79.41.**CAS**-302920-00-9



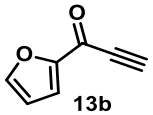
10b *1-(naftalen-2-il)prop-2-in-1-ona*(**10b**): Fórmula molecular : $C_{13}H_8O$, MM: 180,0 g/mol; Purificado por cromatografia com silica gel, e 4:1 Hexano/AcOEt como eluente. Rendimento: 82%; sólido amarelo. **RMN de ^{1}H** (300 MHz, $CDCl_3$, ppm) δ 9.21 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H), 8.62 (d, *J* = 7.2 Hz, 1H), 8.10 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H), 7.91 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H), 7.79 – 7.64 (m, 1H), 7.58 (t, *J* = 7.5 Hz, 2H), δ3.45 (*s*, 1H). **RMN de ^{13}C** (75 MHz, $CDCl_3$ ppm) δ 178.8, 135.7, 135.5, 133.8, 131.9, 130.7, 129.2, 128.6, 126.9, 125.88, 124.44, 81.68, 79.44. **CAS** – 8977156



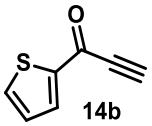
11b *1-(2-clorofenil)prop-2-in-1-ona*(**11b**): Fórmula molecular : C_9H_5ClO, MM: 164,59 g/mol; Purificado por cromatografia com silica gel, e 4:1 Hexano/AcOEt as eluente. Rendimento: 78%; sólido amarelo. **RMN de ^{1}H** (500 MHz, $CDCl_3$, ppm) δ8,03 (ddd, *J* = 7,7Hz, *J* = 1,5Hz, *J* = 0,5Hz, 1H), 7,42-40 (m, 2H), 7,34-7,31 (m, 1H), 3,40 (s,1H). **RMN de ^{13}C** (101 MHz, $CDCl_3$ ppm) δ 174,8, 135,2, 133,6, 132,8, 132,2, 130,7, 125,8, 81,2, 80,2. **CAS:** 3463-33-0



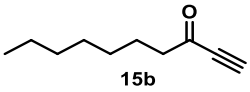
12b *1-(4-chlorophenyl)prop-2-yn-1-ona*: Fórmula molecular : C_9H_5ClO, MM: 164,59 g/mol; Purificado por cromatografia com silica gel, e 4:1 Hexano/AcOEt as eluente. Rendimento: 86%; sólido amarelo. **RMN de 1H** (300 MHz, $CDCl_3$, ppm) δ 8,08 (d, J = 8,7Hz, 2H), 7,46 (d, J = 8,7Hz, 2H), 3,45 (s,1H). **^{13}C RMN** (75 MHz, $CDCl_3$ ppm) δ176,0, 141,2, 134,5, 131,0, 129,1, 81,2, 79,9. **CAS:** 22959-34-8



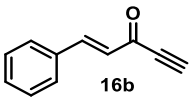
13b *1-(furan-2-yl)prop-2-yn-1-ona*(**13b**): Fórmula molecular : $C_7H_4O_2$, MM: 120,11 g/mol; Purificado por cromatografia com silica gel, e 4:1 Hexano/AcOEt as eluente. Rendimento: 92%; sólido marrom. **RMN de ^{1}H** (400 MHz, $CDCl_3$ ppm) δ 7.67 (s, 1H), 7.34(d, *J* = 3.6Hz, 1H), 6.54-6.52 (m, 1H), 3.27 (s, 1H). **RMN de ^{13}C** (100 MHz, $CDCl_3$ ppm) δ 151.99, 140.99, 136.77, 110.25, 101.05, 67.89, 67.68. **CAS**-15578-13-9



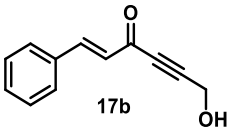
1-(tiofen-2-il)prop-2-in-1-ona(**14b**): Fórmula molecular : C_7H_4OS, MM: 137,17 g/mol; Purificado por cromatografia com silica gel, e 4:1 Hexano/AcOEt como eluente. Rendimento: 70%; sólido marrom. **RMN de ^{1}H** RMN de 1H (300 MHz, CDCl3) δ = 3.45 (s, 1H, CH), 7.09 (t, J = 4.5 Hz, 1H, arom.), 7.68 (d, J = 4.9 Hz, 1H, arom.), 7.88 (d, J = 3.8 Hz, 1H, arom.); **RMN de ^{13}C** (75 MHz, CDCl3) δ = 79.9, 80.0, 128.7, 136.2, 136.4, 144.1, 169.2 **CAS:** 15787-96-9 Sólido amarelo



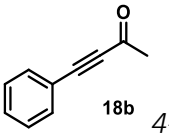
dec-1-in-3-ona(**15b**): Fórmula molecular: $C_{10}H_{16}O$, MM: 124,18 g/mol; Purificado por cromatografia com silica gel, e hexane como eluente Rendimento: 78%; óleo incolor. **RMN de ^{1}H** (200 MHz, $CDCl_3$ ppm) δ 3.21 (s, 1H), 2.59 (t, *J* = 10.8Hz, 2H), 1.72-1.64 (m, 2H), 1.30-1.28 (m, 8H), 0.91-0.85(m, 3H). **RMN de ^{13}C** (50 MHz, $CDCl_3$ ppm) δ 187.55, 81.38, 78.19, 45.37, 31.51, 28.85, 28.76, 23.68, 22.48, 13.95. **CAS:** 51953-86-7



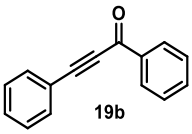
(E)-1-fenilpent-1-en-4-in-3-ona(**16b**): Fórmula molecular: $C_{11}H_{10}O$, MM: 158,20 g/mol; Purificado por cromatografia com silica gel, e 4:1 Hexano/AcOEt como eluente. Rendimento: 17%; Sólido marrom. **RMN de ^{1}H** (300 MHz, $CDCl_3$ ppm) δ7,86 (d, *J*= 16Hz, 1H), 7,58-7,54 (m, 2H), 7,44-7,40 (m, 3H), 6,78 (d, *J* = 16Hz, 1H), 3,30 (s, 1H). **RMN de ^{13}C** (75 MHz, $CDCl_3$ ppm) δ 177,57, 149,64, 133,81, 131,38, 129,09, 128,72, 127,95, 79,89, 79,26. **CAS:** 37401-88-0



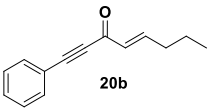
(E)-6-hidroxi-1-fenilhex-1-en-4-in-3-ona: Fórmula molecular : $C_{12}H_{12}O_2$, MM: 186,22 g/mol; Purificado por cromatografia com silica gel, e 4:1 Hexano/AcOEt como eluente. Rendimento: 25%; sólido marrom. **RMN de ^{1}H** (300 MHz, $CDCl_3$ ppm) δ7,86 (d, *J* = 15,9Hz, 1H), 7,60-7,59 (m, 2H), 7,45 (m, 3H), 6,80 (d, *J* = 15,9Hz, 1H), 4,58 (s, 1H), 2,49 (s,1H). **RMN de ^{13}C** (75 MHz, $CDCl_3$ ppm) δ178,1, 149,4, 133,9, 131,4, 129,1, 128,8, 127,9, 90,6, 82,9, 51,0. **CAS:** 56559-05-8



4-fenilbut-3-in-2-ona: Fórmula molecular: $C_{10}H_8O$, MM: 144,06 g/mol; Purificado por cromatografia com silica gel, e 4:1 Hexano/AcOEt como eluente. Rendimento: 94%; líquido amarelo. **RMN de ^{1}H** (200 MHz, $CDCl_3$ ppm) δ 7.60-7.55(m, 2H), 7.47-7.38(m, 3H), 2.46 (s,3H). **RMN de ^{13}C** (50 MHz, $CDCl_3$ ppm) δ 184.6, 133.0, 130.7, 128.6, 119.8, 90.3, 88.2, 32.7. **CAS**-73922-81-3



1,3-difenilprop-2-in-1-ona: Fórmula molecular: $C_{15}H_{10}O$, MM: 206,24 g/mol; Purificado por cromatografia com silica gel, e 4:1 Hexano/AcOEt como eluentee. Rendimento: 72%; óleo amarelo. **RMN de ^{1}H** (300 MHz, $CDCl_3$ ppm) δ 8.24 (d, *J* = 7.2Hz, 2H), 7.71-7.62 (m, 3), 7.55-7.41(m, 5H). **RMN de ^{13}C** (75 MHz, $CDCl_3$ ppm) δ 179.68, 136.89, 134.12, 133.07, 130.80, 129.58, 128.69, 128.63, 120.13, 93.11, 86.89. Rendimento:72%. **CAS**-7338-94-5



(E)-1-fenilnon-4-en-1-in-3-ona: Fórmula molecular: $C_{15}H_{18}O$, MM: 212,124 g/mol; Purificado por cromatografia com silica gel, e 4:1 Hexano/AcOEt como eluente. Rendimento: 100%; líquido amarelo. **RMN de ^{1}H** (300 MHz, $CDCl_3$) δ 7.60 (d, *J* = 6.9Hz, 2H), 7.46-7.26 (m, 4H), 6.25 (d, *J* = 15.6Hz, 1H), 2.36-2.29 (m, 2H), 1.58-1.54 (m, 4H), 0.99 (t, *J* = 7.2Hz, 3H). **RMN de ^{13}C** (75 MHz, $CDCl_3$) δ 178.6, 154.1, 132.8, 132.5, 130.5, 128.6, 120.2, 91.1, 86.3, 34.6, 21.2, 13.7. MS (EI) m/z (relative intensity) 198(14), 170(42), 155(57),141(71), 129(83) [M+], 115(97), 102(110), 91(121), 75(137), 63(149), 51(159), 39(173).

5.3 Metodologias biocatalíticas para obtenção de álcoois propargílicos quirais

5.3.1 Técnicas em Biologia molecular

Nessa etapa, além de descrever o isolamento do gene da bactéria, escolha e construção dos vetores plasmidiais, clonagem, e expressão, serão descritos os ensaios de conversão biocatalítica além das etapas de padronização dos ensaios.

A sequência genética da enzima oxidoreductase Gox2036 encontra-se no *GenBank*, um banco de dados onde contém as sequencias genéticas públicas já elucidadas e caracterizadas. A estrutura cristalográfica e sequencia peptídica encontra-se no banco de dados PDB com o nome de 3WTC, que permite encontrar a sequência de aminoácidos correspondente da proteína.

5.3.1.1 Crescimento bacteriano da gluconobacter oxydans

Para extração do DNA genômico da bactéria foi necessário inicialmente obter material celular de crescimento bacteriano. Para isso o meio de cultivo utilizado era composto por 10g de triptona, 5g de NaCl, 5g de extrato de levedura, 1g de glicose diluídos em 1L de água destilada. O meio era separado em erlenmeyers de 250mL e autoclavados. Após resfiramento, uma aliquota da bactéria é inoculada e permanecida em incubadora shaker a 150 rpm e 32°, por cerca de 6h.

5.3.1.2 Extração do genoma da bactéria Gluconobacter Oxydans

A metodologia segue o protocolo da promega, empresa fornecedora dos kits de purificação (Anexo 3). O ensaio de purificação foi realizado em 4 mL do meio com crescimento bacteriano. Inicialmente o meio foi centrifugado por 2min a 13000rpm, e o sobrenadante descartado. Para extração do DNA é necessário inicialmente realizar a lise celular. Assim ao pelet formado, após centrifugação, foi adicionado 600uL da solução “Nuclei Lysis” contida no kit e homogeneizada levemente com auxílio da pipETa. Em seguida foi incubado por 5min a 80°C, para então resfriar à temperatura ambiente e adição de 3uL da solução mix de RNAse. O sistema foi incubado a 37°C por 30min, seguido de resfriamento à temperatura ambiente.

Após a lise, foi necessário precipitar e remover o material proteico contido na solução. Para isso foi necessário adicionar 200uL de solução “protein precipitation” e vortexado, seguido de incubação por 5min no gelo, e centrifugado novamente a 13000rpm por 3min. O sobrenadante foi transferido para um outro eppendorff contendo 600uL de isopropanol, misturado e centrifugado novamente. Ao pelet resultante, na temperatura ambiente, foi adicionado aproximadamente 250uL de etanol 80% e misturado. Em seguida centrifugado novamente por 2min a 13000rpm, duas vezes. O etanol era então totalmente removido do pelet (seco por atmosfera livre) e o DNA foi reidratado com 100uL de “redydration solution”

por 1hr a 65°C. Esse material foi utilizado para amplificação da sequência do gene de interesse usando a técnica de reação em cadeia da polimerase - RCP (ou do inglês *polymerase chain reaction* PCR)

5.3.1.3 Amplificação do gene por PCR

O gene que codifica a enzima Gox2036 está presente no genoma da bactéria *Gluconobacter oxydans*. Para realizar o isolamento desse gene é necessário oligonucleotídeos (primers) que permitam a hibridização e consequentemente o isolamento e amplificação do gene de interesse. Nesse caso os *primers* foram comercializados, cuja sequência foi determinada pelas sequências nucleotídicas que codificam a enzima Gox2036 (Tabela 14).

Tabela 14 - Primers para amplificação do gene da gox2036 para a clonagem no gene

Primer	Sequência
Forward	5'-CGGAATTC**ATG**TCCCTTTCTGGAAAAATC-3'
Reverse	5'-CGAAGCTT**TCA**GCGGAAAACGAGACC-3'

As sequencias de iniciação e terminação de transcrição do gene de interesse estão em negrito. Os sítios de restrição estão sublinhados e correspondem as enzimas EcoR I e HindIII respectivamente. Fonte: LIU et al., 2014

A PCR consiste de: Tris-HCl 10 mM (pH 9.0), KCl 50 mM, $MgCl_2$ 1,5 mM, Triton X- 100 0,1%, 20 mM de cada dNTP, 10 pmoles de cada iniciador específico e 1 µg de DNA. À esta solução foi adicionada 1 U de Taq DNA polimerase (Invitrogen), gerando volume final de 20 µL, e uma gota de óleo mineral para evitar evaporação. A amplificação utilizando este par de iniciadores consistiu de um ciclo de desnaturação inicial de 95°C por 3 minutos, seguido de 37 ciclos de 94°C por 30 segundos, 56°C por 30 segundos e 72°C por 30 segundos, com um ciclo final de 72°C por 7 minutos

5.3.1.4 Clonagem de Gox2036 no vetor de clonagem pUC18

5.3.1.4.1 Digestão do vetor de clonagem pUC18 e do produto de PCR

A digestão do plasmídeo pUC18 e o vetor do DNA com enzimas de restrição foi necessária tanto para avaliar o perfil do gene obtido na PCR quanto para a construção do vetor

de clonagem. Esse procedimento é necessário pois o DNA obtido do genoma da bactéria está na forma enovelada, o que impediria de ser analisado por eletroforese, uma vez que é necessário separar fragmentos de DNA e outras macromoléculas por tamanho e carga. Assim para observar o perfil do DNA por eletroforese é necessário ele estar linearizado. As enzimas de restrição EcoRI e HindIII foram escolhidas baseadas nas sequencias de reconhecimento palindrômicas que são (5')G|GATCC(3') e (5')A|AGCTT(3') respectivamente (Tabela 15).

Tabela 15 - Condições e enzimas de restrinção para digestão do plasmídeo de clonagem pUC18

	Produto de PCR	pUC18
Tampão EcoRI	10uL	10uL
EcoRI	5uL	5uL
HindIII	5uL	5uL
DNA	20uL	-
Plasmídeo PUC18	-	10uL
H_2O	70uL	60uL

Fonte: Autora (2020)

Para o produto de PCR no procedimento de digestão o material foi incubado por 15mina 37°C, em seguida foi adicionado 2uL de CIP e novamente encubado por 45min. Já para o plasmídeo pUC18 foi apenas incubado por 1hr a 37°C. A adição do CIP (Fosfatase alcalina, vitelo intestinal) catalisa não especificamente a desfosforilação de 5 'e 3'ends de DNA e RNA, impedindo assim as ligações entre as pontas coesivas da digestão.

A eletroforese é uma técnica que permite analisar e separar fragmentos de DNA obtido através do tamanho do fragmento, e utiliza-se um gel de agarose que permita essa migração. Assim inicialmente foi necessário preparar o meio. Utilizou-se a concentração de 10g/L de agarose em tampão 1XTBE. O gel foi aquecido no micro-ondas por 30s em micro-ondas ou até solubilizar toda a agarose, tomando o cuidado de não evaporar muita água do meio (processo realizado parcionado). O meio foi então vertido na cubeta horizontal que

continha o pente para formação dos orifícios de aplicação. Após completa solidificação o gel foi colocado na cubeta.

Para que ocorra a passagem de corrente, e consequentemente a migração dos fragmentos no gel, é necessário um meio salino. Dessa maneira, no suporte do gel, foi adicionado tampão 1XTBE até cobertura completa do gel de agarose. O tampão XTBE contém Tris/Borato/EDTA que não permite mudar a acidez do meio, e consequentemente não prejudica o DNA. Com o auxílio de uma pipeta P50, o material da digestão foi inserido nos orifícios do gel cuidadosamente. Na cubeta foi aplicado uma diferença de potencial, através de uma fonte de voltagem (200V) por aproximadamente 40min. A corrente passa do polo para o positivo. Ao termino o gel foi analisado numa câmara UV.

5.3.1.4.2 Reação de ligação do vetor de clonagem ao produto de PCR da GoX2036

As reações de ligação do plasmídeo com o produto de PCR foram realizadas na presença da enzima ligase. Esta ligação foi adaptada de modo a maximizar a possibilidade de eficiência no experimento, acompanhando assim por intensidade da banda na eletroforese. As reações de ligação foram realizadas na presença da enzima T4 ligase. Em um eppendorf foram adicionados o vetor, o DNA produto de PCR, a enzima T4, tampão ligase e água (Tabela 16). O meio é permanecido a temperatura ambiente por 1hr.

Tabela 16 - Reação de ligação do vetor recombinante pUC18-Gox2036

	Ligação	Controle
pUC18	1uL	1uL
Produto de PCR	1uL	-
T4 DNA ligase	0,5uL	0,5uL
Tampão T4 10x	1uL	1uL
H_2O	7,5uL	6,5uL
Volume total	10uL	10uL

Fonte: Autora (2020)

5.3.1.5 Preparação das bactérias Escherichia coli DH5α competentes para transformação do clone Gox2036-pUC18

Para realizar a transformação de vetores em células de *E coli* é necessário que elas estejam competentes, pois assim permitirá que haja a inclusão do vetor na bactéria. Inicialmente foi necessário realizar um pré-inóculo. Amostras da bactéria modificada DH5α preservadas em glicerol a -80°C foram usadas para inocular em 10mL de meio LB e incubadas a 37°C overnight a 200rpm. Em seguida, o meio crescido no pré-inoculo foi transferido pra um erlemneyer contendo 1L de meio LB e novamente incubados a 37°C sob agitação de 200rpm até uma densidade ótica a 600nm (DO_{600}) entre 0,5 a1,0. Ao chegar na densidade ideal o meio foi particionado em tubos falcon estéreis de 50mL e mantidos em banho de gelo por 15min. Em seguida, os tubos foram centrifugados a 4000 *g* por 15min a 4°C e o sobrenadante descartado. O pelet foi gentilmente ressuspendido em 1L de água gelada, seguido de outra centrifugação a 4000 *g* por 15min a 4°C. Novamente foi descartado o sobrenadante, lavagem agora com 500mL de água, e centrifugação nas mesmas condições repetida. O sobrenadante novamente é descartado e o pelet ressuspendido em glicerol 10% gelado. Mais uma vez o meio foi centrifugado, sobrenadante descartado e ressupendido em 3mL de glicerol 10% gelado. Alíquotas de 40uL desse material resultante foram separadas (em gelo seco) e armazenadas a -80C.

5.3.1.6 Transformação da bactéria Escherichia coli DH5α com o plasmídeo recombinante Gox2036-pUC18

A transformação das células competentes de *Escherichia coli* D5Hα foi realizada por choque térmico. As células armazenas no freezers -80°C foram deixadas repousar em gelo por 15min para descongelamento. Dessa foram retirados 200uL e transferidas para eppendorffs estéreis. Em seguida, foram adicionados 10uL do plasmídeo recombinante pUC18-Gox2036 e deixados no gelo por 10min. Após esse intervalo, foi realizado o choque térmico por 2min a 42°C em banho maria, seguido da permanência no gelo por 30s. Por fim foi adicionado 1mL de meio LB, 15ug/mL do antibiótico ampicilina, agitado e mantido no banho seco por 40min a 37°C.

5.3.1.7 Mini preparativa para recuperação do DNA plasmidial pUC18-Gox2036

O procedimento preparativo é necessário quando se necessita de uma maior quantidade do plasmídeo para manuseio ou purificação. Inicialmente foi necessário preparar 4 soluções: Solução I (50mM glicose, 25mM Tris-HCl ph 8,0, 10mM de EDTA), *Lysis Buffer* (5mg/mL de lisozima e 0,002mg/mL de RNase, com o solvente sendo a Solução I), e Solução II (0,2M NaOH e 1% SDS), Solução II (7,5M NH_4OAc, 8g de acetato de amônia e 2mL de ácido acético glacial), Solução IV (Isopropanol com 0,2% TritonX-100). Da solução *"Lysis Buffer"* foram retirados 100uL e transferidos para um eppendorff. Com o auxílio de uma ponteira 100P, uma porção das células transformadas (raspagem) é transferida para essa solução e incubada por 1min no gelo. Em seguida, foram adicionados 200uL da solução II e misturado com a ponteira. Novamente a solução foi colocada no gelo, adicionados 150uL da solução III, misturado por inversão 3x e centrifugado por 5min a 4000g. O sobrenadante foi transferido para outro tubo de eppendorff e foi adicionado 300uL da Solução IV. Novamente foi misturado por inversão e centrifugado por 5min. O sobrenadante foi descartado e o pelet resultante foi lavado com etanol 80% 2x. O excesso do etanol foi removido em speedvac por 10min. Por fim o pelet é ressuspendido em 5uL de água Miliq.

5.3.1.8 Mini preparativa por protocolo PureRendimento™ para sequenciamento do DNA plasmidial pUC18-Gox2036

Para realizar o sequenciamento foi necessário realizar um miniprep porém utilizando um kit da promega® "*PureRendimento™ Palsmid Miniprem System*" encontrado em anexo 3. Esse protocolo permite obter um material mais puro possível, para que não haja contaminantes interferindo no sequenciamento.

5.3.1.9 Extração do DNA plasmidial pUC18-Gox2036 em média escala TRITON prep.

Quando necessita-se de uma grande escala do vetor recombinante, geralmente para sequenciamento e manuseio, é necessário fazer uma TRITON prep. Para isso inicialmente foi necessário crescer células transformadas contendo o vetor recombinante após a mini prep. Inicialmente células crescidas em meio LB/ágar foram raspadas e transferidas para um tubo falcon 15mL contendo 2mL contendo tampão de lise (1mL 25mM Tris, pH8,0, 0,125M EDTA, 1mL 0,25M sacarose, 5mg de lisozima, 10mg/mL RNase os dois últimos adicionados na hora).

O sistema foi incubado no gelo por 30min. Em seguida foi adicionado 1mL de 3X(TET) Mix de Lise (3mL 10% Triton X-100, 37mL de 0,5M de EDTA, 15mL de 1M Tris, pH8,0, e 45mL de água), seguido de ultra centrifugação 70000g, 4°C por 10min (para esse procedimento a solução foi transferida para tubos "U" próprios para alta centrifugação). O sobrenadante foi coletado e transferido para tubo falcon de 15mL, e adicionado 1V de fenol. Novamente centrifugado por 4000g, 5min. A fase aquosa foi coletada (fase superior), transferido para outro tubo e adicionados 1V de solção 24:1 clorofórmio:álcool isoamílico, e centrifugados. Novamente a fase aquosa foi coletada, adicionados 1/20V NaCl 5M e 2,5V de etanol 100%, e centrifugados por 10min a 4000g. O precipitado formado foi suspendido em 1,5mL de 2M NH_4OAc e 4,5ml de etanol 100%, misturado e centrifugado a 4500g, 10min a 4°C. Novamente o precipitado foi ressuspendido em 300uL de 2M de NH_4OAc, transferido para um eppendorff, adicionado 1ml de etanol 100%, misturado e centrifugado por 5min a temperatura ambiente. O precipitado resultante foi lavado 2x com etanol 80%, e seco em speedvac. Por fim ressupendido em 100uL de H_2O.

5.3.1.10 Sequenciamento do vetor recombinante pUC18-Gox2036

O sequenciamento foi realizado a partir do material obtido após Mini prerp do item vi. da seção X. Foram retirados 5uL da amostra e 2,5uL do primer YEp351F. Estes foram encaminhados para o Centro de Estudos do Genoma Humano – Setor de Sequenciamento de DNA da USP.

5.3.1.11 Construção dos plasmídeos recombinantes de expressão Gox2036-pET28a(+) e Gox2036-pET29a(+)

Na escolha do plasmídeo de expressão, a escolha dos sítios de restrição foi baseada na ausência dos mesmos no gene de interesse e na utilização de sítios de restrição comuns nos vetores de expressão pET28a(+) e pET29b(+).

Para realizar os estudos de expressão da proteína foi necessário a construção de plasmídeos recombinantes de expressão. Entre eles os do sistema pET (Novagen) são os mais amplamente usados e optamos por escolher dois disponíveis no laboratório, como o pET28a(+) e o pET29a(+), inicialmente com o intuito comparativo de expressão. Os vetores da série pET

são plasmídeos desenvolvidos para garantir reprodução e expressão de grandes quantidades da proteína de interesse. Estruturalmente ambos plasmídeos contém elementos importantes para realizar o processo de clonagem e expressão.

5.3.1.12 Preparação das bactérias Escherichia coli BL21(DE3) competentes para transformação dos clones Gox2036-pET28a(+) e Gox2036-pET29a(+)

O procedimento foi igual a seção 5.3.1.5, apenas com a diferença da cepa bacteriana, que nesse caso é a BL21(DE3), *E coli* modificada para facilitar a expressão de proteínas.

5.3.1.13 Digestão dos vetores recombinantes de expressão dos plasmídeos Gox2036-pET29a(+) e Gox2036-pET28a(+)

Para que fosse possível realizar a construção dos plasmídeos de expressão, foi necessário inicialmente obter o gene através do vetor de clonagem recombinante previamente construído pUC18-Gox2036. Para isso, antes de realizar a digestão foi necessário quantificar a concentração de DNA contido no vetor recombinante, e nos vetores pET28a(+) e pET29a(+), utilizando o espectrofotômetro NanoDrop® ND-1000.

Os plasmídeos foram digeridos com enzimas de restrição de acordo com a Tabela 17. As bandas correspondentes dos pares de base dos vetores e Gox2036 após a digestão e eletroforese, foram cortados e separados para isolamento do gene.

Tabela 17 - Reações de digestão com EcoRI e HindIII

	pUC18-Gox2036	pET28a(+)	pET29a(+)
Vetor	26,3uL	22,6uL	10uL
Tampão EcoRI	10uL	10uL	10uL
EcoRI	0,8uL	0,8uL	5uL
HindIII	0,5uL	0,5uL	5uL
H_2O	62,9	66,6	70uL

Fonte: Autora (2020)

5.3.1.14 Purificação do DNA do gel de agarose

Para purificação do gel foi seguido o protocolo *Illustra™ GFX™ PCR DNA and Gel Band purification Kit*. No kit continha tubo de eppendorf adaptados para a purificação (contendo filtros) e 4 diferentes soluções. Inicialmente foi necessário pesar os eppendorfs da purificação, a banda do gel contendo o DNA foi cortada com auxílio da luz UV e adicionada ao tubo. Novamente o tubo foi pesado para calcular a quantidade necessária de solução a adicionar: para cada 10mg de gel foi adicionado 10uL da solução tipo 3 - solução amarela. O sistema foi homogeneização por inversão, e para dissolver totalmente o gel o sistema foi incubado a 60°C. Dessa solução foi removido 600uL e transferido para tubos contendo coluna GFX MicroSpin™. O tubo contendo a solução foi incubado por 1min seguido de centrifugação por 30s a 16000g. A solução que passou pela coluna foi descartada. Esse procedimento foi repetido até toda solução ter passado. Em seguida 500uL do tampão de lavagem tipo 1 foi adicionado e o tubo centrifugado 30s a 16000g. A solução foi descartada e a coluna transferida para outro tubo limpo. Por fim 50uL da solução tipo 4 foi adicionado, o sistema incubado por 1min e novamente centrifugado por 30s a 16000g. A solução que passou pela coluna foi coletada e armazenada a -20°C.

5.3.1.15 Reação de ligação dos vetores recombinantes de expressão pET28a(+) e pET29b(+) produto de PCR da Gox2036

A reação de ligação foi similar ao seção 5.3.1.13. A ligação do gene da Gox2036 com os vetores de expressão pET28a(+) e pET29b(+) foi realizada com o produto após purificação do gel de agarose. A quantidade de vetor e as condições utilizadas estão apresentadas na Tabela 18.

Tabela 18 - Reação de ligação dos vetores de expressão recombinante pET28a(+) e pET29b(+)

	pET28a(+)	pET29b(+)	Controle
Vetor	7uL	2uL	1uL
DNA Gox2036	10uL	2uL	-
T4 DNA ligase	0,5uL	0,5uL	0,5uL
Tampão T4 10x	2uL	1uL	1uL
H_2O	0,5uL	4,5uL	7,5
Volume total	10uL	10uL	10uL

Fonte: Autora (2020)

5.3.1.16 Transformação da bactéria Escherichia coli DH5α com o plasmídeo recombinante Gox2036-pET28a(+) e Gox2036-pET29a(+)

As etapas de transformação dos plasmídeos recombinantes de expressão foram feitas por eletroporação. A eletroporação é uma técnica onde se aplica um campo elétrico nas células aumentando assim a permeabilidade da membrana, permitindo assim a introdução do material genético na bactéria. A eletroporaçao foi realizada utilizando cubetas de 1,0mL e o equipamento Bio-Rad Gene Pulser com os seguintes ajuste: 2,5V com choques de 1 pulso, X ohms de resistência, e X uF de capacitância.

Para realizar a eletroporação foi retirado 1uL da solução final após ligação e diluído 10X em água Miliq. Essa solução é adicionado em 50uL de células competentes. Em seguida, essa solução foi adicionado a cubeta, própria para eletroporação, seguido de um pulso. Após foi adicionado 1mL de meio LB e homogeneizado delicadamente. A solução foi mantida em shaker por 1hr a 37°C 180rpm.Por fim da solução resultante foram retirados 200uL e semeadas em meios seletivos, contendo o antibiótico de resistência do vetor recombinante (kanamicina, 15ug/mL), para que fosse possível a identificação dos clones transformantes e o controle.

5.3.1.17 Amplificação dos vetores recombinantes Gox2036-pET28a(+) e Gox2036-pET29a(+) por PCR de colônia

Para obter quantidade maior dos vetores recombinantes foi necessário realizar PCR de colônia. Sendo assim, após crescimento das células transformadas foram escolhidas 12

diferentes colônias isoladas e replicadas em placa. As colônias crescidas foram raspadas com auxilio de ponteiras P100 e mergulhadas em soluções da Tabela 19. As condições de amplificação foram similares a seção 5.3.1.3.

A amplificação utilizando este par de iniciadores consistiu de um ciclo de desnaturação inicial de 95°C por 5 minutos, seguido de 30 ciclos de 95°C por 30 segundos, 55°C por 30 segundos e 72°C por 3min, com um ciclo final de 72°C por 10 minutos. Essa sequência de ciclos foi repetida 35 vezes. O material resultante foi submetido a miniprep seguido de quantificação com Nanodrop.

Tabela 19 - Condiçõea de amplificação por PCR do vetor recombinante pET28a/Gox2036

	Quantidade
Tampão 10x	2,5uL
MgCl2	0,8uL
dNTP	0,4ul
Primer YEP351F	0,8ul
Primer YEP351R2	0,8uL
Taq caseiro	0,5uL
H_2O	19,2uL
Colônia bacteriana	-

Fonte: Autora (2020)

5.4.1 Expressão com IPTG para os vetores recombinantes pET28a(+) e pET29b(+) em E. coli BL21(DE3)

Os ensaios de expressão foram realizados usando cepas modificadas de *E.coli* BL21(DE3). As condições de expressão foram baseadas em trabalhos realizados anteriores(LIU et al., 2014), de forma a maximizar o rendimento e a solubilidade da proteína.

Os ensaios iniciais de expressão foram realizados utilizado como cepa hospedeira *E.coli* BL21(DE3), previamente transformadas com os vetores. Das placas contendo células crescidas transformadas foi realizado um pré-inóculo em 10mL meio LB, contendo uma concentração de 15ug/mL de antibiótico kanamicina. O pré-inoculo foi permanecido overnight. Para realizar o inóculo, foi medida a OD do pré-inóculo a fim de calcular o volume necessário para o inóculo (200mL de meio LB contendo 15ug/mL de kanamicina). A OD do inóculo foi analisada e ao chegar em OD_{600} de 0,6 foi adicionado IPTG 0,25mM. O meio foi induzido em shaker por 6h a 30°C e 180rpm. O procedimento foi realizado também em células transformadas de BL21(DE3)

contendo os plasmídeos sem o gene, e sem o plasmídeo para nível de controle. Ao término as células foram centrifugadas a 4000g, 4°C por 5min, lavadas com água, centrifugadas novamente e o sobrenadante foi descartado. As células úmidas foram pesadas e ressuspendidas em tampão fosfato 100mM, pH 6,0, com concentração 1g/mL de célula. A nível de estocagem as células foram conservadas com glicerol 10% e armazenadas a -20°C. Já para o isolamento da proteína foi seguido pelo protocolo de purificação, após análise em gel de SDS-PAGE.

5.4.1.1 *Analise do material proteico após indução dos vetores recombinantes pET28a(+) e pET29b(+) por gel de SDS-PAGE*

5.4.1.1.1 Preparo da amostra

Para realizar o gel de SDS-PAGE é necessário inicialmente preparar a amostra para que ela corra no gel. Dessa maneira, a alíquota retirada do material biológico induzido é centrifugada (2min, 13000rpm, 30°C) e o sobrenadante é descartado. Ao pelete é adicionado DTT (1uL) e solução azul (50uL), seguido de aquecimento por 5min a 95°C. Por fim, a solução resultante é centrifugada (5min, 13000rpm, 30°), e o sobrenadante reservado para aplicação no gel.

5.4.1.1.2 Preparo do gel SDS-PAGE

No sistema eletroforético foi utilizado gel de empilhamento de concentração igual a 5 % contendo bis-acrilamida:acrilamida: na proporção 0,8:30 (m/v) em Tris-HCl 0,5 M, pH 6,8 e SDS 0,1 % e gel de separação a 15% contendo bis-acrilamida:acrilamida na proporção 0,8:30 (m/v) em Tris-HCl 2,0 M, pH 8,8 e SDS 0,1 %. Os géis foram polimerizados em placas de vidro adaptáveis a sistemas verticais, as quais foram acopladas a seus respectivos reservatórios contendo tampão Tris-HCl a 25 mM contendo SDS a 0,1 % (m/v) utilizado como tampão de corrida.

Um volume de 10 µL de tampão Tris-HCl a 0,0625 M, pH 6,8 contendo glicerol 10 %, β-mercaptoetanol 5 % (v/v), SDS 2% e azul de bromofenol a 0,001 % (tampão de amostra) foi adicionado a 20 µL de todas as amostras submetidas a eletroforese. As soluções foram aquecidas a 100 oC por 5 min e aplicadas nos poços, num volume final de 20 µL.

5.4.2 Purificação de proteína

Após a indução com IPTG 6h/30°C o meio bacteriano crescido é centrifugado 5000rpm por 10min a 4°C. Em seguida o pelete formado é ressuspendido em água e novamente centrifugado nas mesmas condições. O sobrenadante é descartado e o pelete ressuspendido em agua (20mL) e lisozima (100uL). O tubo falcon contendo o material é colocado em um agitador circular por 10-20min, sob resfriamento (4°C). Ao término, o material é sonicado por 5min (15 ciclos de 20s sonicando e 60s repousando).

Após o sonicamento, é adicionado Estreptomicina 10% (2mL) e deixado sob agitação magnética, no gelo, por 20min. Ao término, centrifugar a 15000rpm por 40min a 4°C.

5.4.*3 Biocatálise empregando bactérias com plasmídeo pET28a/Gox2036*

Em um eppendorf contendo uma suspensão de 100mg/mL de células úmidas de *E.coli* recombinante (pET28a/Gox2036), 1mL de tampão fosfato 100mM pH6,0, foram adicionados 20mM do substrato dissolvidos em 30uL mL de DMSO. Incubou-se a 30°C e 700 rpm, com 50uL de isopropanol, 5mg de glicose. Para regenerar o co-substrato foram adicionados 0,5mM de NAD^+ e 1,0mM de NADH. Alíquotas periódicas foram retiradas, extraídas com AcOEt, secas sob sulfato de sódio e analisadas por cromatógrafo gasoso equipado com uma coluna quiral.

5.4.3.1 Análises cromatográficas

As biotransformações foram analisadas por GC-FID. As análises GC-FID foram realizadas em um sistema Shimadzu GC-2010 equipado com um autoinjetor AOC-20i usando H2 como gás de transporte. A identificação dos compostos foi feita por detecção via detector de ionização de chama (FID) e comparação dos tempos de retenção aos compostos sintetizados. Para quantificação das transformações, foram elaboradas curvas de calibração com os padrões autênticos. As condições e programas do GC são fornecidos na tabela 20 e 21.

Tabela 20 - Métodos cromatográficos de análise das reações de biotransformação

Método de anáilise	Coluna	Injetor temp. [°C]	Pressão kPa	Detector temp. [°C]
ee values (GC-FID)	CP-Chiral DEX-CB	200	100	220
	DB-5	270	122.6	300

Column DB-5 (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany), length: 30m x 0.25mm, 0.25µm, 5% Diphenyl/95% Dimethylpolysiloxan
Comlumn Beta DexTM 12 0(Supelco Analytical, Germany), length: 30 m x 0.25 mm x 0.25 µm, 20% (β-DEX 120) β-cyclodextrin

Tabela 21 - Condições de rampa dos compostos biotransformados

Entrada	Comp.	Condições de rampa	Coluna	Tempo total análise [min]	Tempo de retenção [min]
1	1a	100 °C, 5 °C/min to 190 °C, 50 °C/min to 200 °C, hold 3 min	CP-Chiral DEX-CB	27,5	(9,4-9,6)
2	1b				7,6
3	2a	100 °C, 5 °C/min to 190 °C, 50 °C/min to 200 °C, hold 3 min	CP-Chiral DEX-CB	27,5	(15,2-15,8)
4	2b				10,2
5	3a	100 °C, 5 °C/min to 190 °C, 50 °C/min to 200 °C, hold 3 min	CP-Chiral DEX-CB	27,5	(14,5-15)
6	3b				10,8
7	4a	100 °C, 5 °C/min to 190 °C, 50 °C/min to 200 °C, hold 3 min	CP-Chiral DEX-CB	27,5	10,8-11,2
8	4b				9,5
9	5a	80 °C 3 min, 30 °C/min to 280 °C 3min	DB-5	12,7	8,0
10	5b				8,4
11	6a	100 °C, 5 °C/min to 190 °C, 50 °C/min to 200 °C, hold 3 min	CP-Chiral DEX-CB	27,5	(21-21,5)
12	6b				20
13	7a	100 °C, 5 °C/min to 190 °C, 50 °C/min to 200 °C, hold 3 min	CP-Chiral DEX-CB	27,5	17,8-18,2
14	7b				10,6

15 16	**9a** **9b**	100 °C, 5 °C/min to 190 °C, 50 °C/min to 200 °C, hold 3 min	CP-Chiral DEX-CB	27,5	23,5-23,8 22,8
17 18	**10a** **10b**	80 °C 3 min, 30 °C/min to 280 °C 3min	DB-5	12,7	8,5 8,4
19 20	**11a** **11b**	100 °C, 5 °C/min to 190 °C, 50 °C/min to 200 °C, hold 3 min	CP-Chiral DEX-CB	27,5	(11,2-11,4) 9,5
21 22	**13a** **13b**	100 °C, 5 °C/min to 190 °C, 50 °C/min to 200 °C, hold 3 min	CP-Chiral DEX-CB	27,5	
23 24	**14a** **14b**	100 °C, 5 °C/min to 190 °C, 50 °C/min to 200 °C, hold 3 min	CP-Chiral DEX-CB	27,5	
25 26	**18a** **18b**	70 °C 1 min, 20 °C/min to 280 °C 5min	DB-5	16.50	6,8 6,6
27 28	**19a** **19b**	100 °C 1 min, 20 °C/min to 200 °C 5min, 10°C/min to 250, 20°C/min to 300 3min	DB-5	14,67	9,8 10,2
29 30	**20a** **20b**	70 °C 1 min, 20 °C/min to 280 °C 5min	DB-5	16,5	9,8 10,1

5.4.4 Biocatálise de resolução com lipases

5.4.4.1 Padrão dos acetatos propargílicos

Os acetatos propargílicos foram sintetizados a partir dos respectivos álcoois propargílicos racêmicos. Num balão de 10mL foram adicionados 1 mmol do álcool de interesse seguida da adição de 1,5eq de anidrido acético, 1,2eq Et_3N e catalítica quantidade de DMAP (10mol%) em CH_2Cl_2 (10mL). A mistura reacional é permanecida por 2hr. Ao término adiciona HCl 0,1M, $NaHCO_3$ saturado e finalmente solução salina. A mistura é extraída com AcOEt. Seca com $NaSO_4$ e rotaevaporada. O produto reacional é submetido a coluna cromatográfica com Hex/AcOEt 6:1.

5.4.4.2 Resolução Cinética Enzimática

Em um eppendorf com capacidade para 2mL adicionou-se o álcool propargílico (0,25mmol), seguido do solvente 1 mL (*n*-henaxo) e 1eq de acetato de vinila (20uL). A CAL-B foi pesada (5 mg) e em adicionada rapidamente a solução. Em seuguida, foi permanecida do Shaker por até 2h, sob agitação de 150rpm e temperatura de 20-40°C. O acompanhamento da resolução foi via CG quiral, utilizando-se os acetatos e álcoois como padrões. Depois de realizada uma análise de conversão, via CG, a CAL-B foi removida por filtração e a solução resultante foi concentrada a vácuo. O resíduo orgânico foi submetido à coluna cromatográfica de sílica para se obter os respectivos enantiômeros separadamente, utilizando-se como eluentee o sistema 4:1 Hexano/AcOEt.

REFERÊNCIAS

ALEX, K. et al. Zinc-promoted hydrohydrazination of terminal alkynes: An efficient domino synthesis of indoles. **Angewandte Chemie - International Edition**, v. 47, n. 12, p. 2304–2307, 2008.

ALI, I. S.; SUDALAI, A. Pd-catalyzed kinetic resolution of benzylic alcohols : a practical synthesis of (R) -tomoxetine and (S) -fluoxetine hydrochlorides. **Tetrahedron Letters**, v. 43, p. 5435–5436, 2002.

ALY, A. A.; BROWN, A. B.; HASSAN, A. A. **Advances in Heterocyclic Chemistry: Heterocycles from the Reaction of Thione Groups with Acetylenic Bonds**. [s.l: s.n.].

BAHRI, J. ET AL. Hydroamination of terminal alkynes with secondary amines catalyzed by copper: regioselective access to amines. **Chem. Commun.**, v. 51, n. 56, p. 11210–11212, 2015.

BARTOLI, G. et al. Improved Heteroatom Nucleophilic Addition to Electron-Poor Alkenes Promoted by CeCl 3 , 7H 2 O / NaI System Supported on Alumina in Solvent-Free Conditions. **Journal Organic Chemical**, v. 3, n. c, p. 169–174, 2005.

BERNARD R, GLICK, JACK J. PASTERNAK, C. L. P. **Molecular Biotechnology: Principles and Applications of Recombinant DNA**. [s.l: s.n.]. v. XXXIII

BIRKETT, D. J. Racemates or Enantiomers: Regulatory Approaches. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, v. 16, n. 6, p. 479–483, 1989.

BISSWANGER, H. Enzyme assays. **Perspe**, p. 41–55, 2014.

BRACHER, F.; LITZ, T. An efficient chemoenzymatic route to the antidepressants (R)-fluoxetine and (R)-tomoxetine. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 4, n. 6, p. 877–880, 1996.

BRUNET, J.-J.; NEIBECKER, D. **Catalytic Hydroamination of Unsaturated Carbon-Carbon Bonds**. [s.l: s.n.]. v. 4

BURTON, S. G. Oxidizing enzymes as biocatalysts. **Trends in biotechnology**, v. 21, n. 12, p. 543–9, dez. 2003.

CHUN, Z.; NING, J. Dioxygen activation under ambient conditions: Cu-catalyzed oxidative amidation-diketonization of terminal alkynes leading to α-ketoamides. **Journal of the American Chemical Society**, v. 132, n. 1, p. 28–29, 2010.

CLAYDEN, J.; GEEVES, N.; WARREN, S. **Organic Chemistry**. 6. ed. [s.l.] Oxford, 2009.

COSTA, V. E. U.; DE AMORIM, H. L. N. O emprego de lipases como agentes de resolução cinética de enantiômeros em síntese orgânica: Aspectos gerais sobre a influência do solvente. **Quimica Nova**, v. 22, n. 6, p. 863–873, 1999.

DANA, M. et al. Biotechnological and industrial applications of laccase: A review. **Journal of Applied Biotechnology Reports**, v. 4, n. 4, p. 675–679, 2017.

DAVIS, B. G.; BOYER, V. Biocatalysis and enzymes in organic synthesis. **Nat. Prod. Rep.**, v. 18, p. 618–640, 2001.

DEMIRJIAN, D. C.; SHAH, P. C.; VARAS, F. M. **Screening for Novel Enzymes**. [s.l.] Springer Berlin Heidelberg, 1991.

DENG, J. et al. Journal of Molecular Catalysis B : Enzymatic Efficient synthesis of optically active halogenated aryl alcohols at high substrate load using a recombinant carbonyl reductase from Gluconobacter oxydans. **J. Mol. Cat. B. Enz**, v. 118, p. 1–7, 2015.

DONG, J. J. et al. Biocatalytic Oxidation Reactions: A Chemist's Perspective. **Angewandte Chemie - International Edition**, v. 57, n. 30, p. 9238–9261, 2018.

DOYE, S. Development of the Ti-Catalyzed Intermolecular Hydroamination of Alkynes. **Synlett**, n. 10, p. 1653–1672, 2004.
DRAUZ, K.; GRÖEGER, H.; MAY, O. **Enzyme Catalysis in Organic Synthesis**. [s.l: s.n.]. v. 1
DUCE, S. L.; HAIL, L. D.; NORWOODT, T. J. Observation of a large isotope effect in the manganese dioxide oxidation of benzyl alcohol. v. 34, n. 11, p. 146–148, 1990.
ENGEL, D. A.; DUDLEY, G. B. The Meyer–Schuster rearrangement for the synthesis of α,β-unsaturated carbonyl compounds. **Organic & Biomolecular Chemistry**, v. 7, n. 20, p. 4149, 2009.
FABBRINI, M.; GALLI, C.; GENTILI, P. Comparing the catalytic efficiency of some mediators of laccase. **Journal of Molecular Catalysis - B Enzymatic**, v. 16, n. 5–6, p. 231–240, 2002.
FILLAT, A. et al. Kinetic resolution of esters from secondary and tertiary benzylic propargylic alcohols by an improved esterase-variant from Bacillus sp. BP-7. **Catalysis Today**, v. 255, p. 16–20, 2014.
FILLING, C. et al. Critical residues for structure and catalysis in short-chain dehydrogenases/reductases. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 28, p. 25677–25684, 2002.
FUKUMOTO, Y. et al. Anti-Markovnikov Addition of Both Primary and Secondary Amines to Terminal Alkynes Catalyzed by the TpRh(C 2 H 4) 2 /PPh 3 System. **Journal of the American Chemical Society**, v. 129, n. 45, p. 13792–13793, 2007.
GALLETTI, P. et al. Laccase-Mediator System for Alcohol Oxidation to Carbonyls or Carboxylic Acids : Toward a Sustainable Synthesis of Profens. p. 2684–2689, 2014.
GEOLOGICAL SURVEY. **Mineral Commodity Summaries 2014**, 2014. (Nota técnica).
HÇNIG, M. et al. Enantioselective Chemo- and Biocatalysis: Partners in Retrosynthesis. **Angew. Chem. Int. Ed.**, n. 56, p. 8942–8973, 2017.
HOLLMANN, F.; SCHMID, A. Electrochemical regeneration of oxidoreductases for cell-free biocatalytic redox reactions. **Biocatalysis and Biotransformation**, v. 22, n. 2, p. 63–88, 2004.
HOWK, B. W. et al. Alkali Metal-catalyzed Amination of Olefins. **J. Am. Chem. Soc.**, v. 76, n. 7, p. 1899–1902, 1954.
HU, Q. et al. ZnCl2-promoted asymmetric hydrogenation of ??-secondary-amino ketones catalyzed by a P-chiral rh-bisphosphine complex. **Angewandte Chemie - International Edition**, v. 54, n. 7, p. 2260–2264, 2015.
ILLANES, A. **Enzyme Biocatalysis**. [s.l: s.n.].
ISENMANN, A. F. **Princípios da Síntese Orgânica**. 2ª ed. Timóteo, MG: 2013, 2013.
JOUBRAN, L. et al. Arylpropanolamines incorporating an antioxidant function as neuroprotective agents. **Australian Journal of Chemistry**, v. 56, n. 6, p. 597–605, 2003.
KAMAL, A. et al. Lipase mediated resolution of ??-azidoalcohols in aqueous and organic media: Synthesis of (R)- and (S)-fluoxetine and duloxetine. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 58, n. 1–4, p. 132–137, 2009.
KAMAL, A.; KHANNA, G. B. R.; RAMU, R. Chemoenzymatic synthesis2 of both enantiomers of fluoxetine, tomoxetine and nisoxetine: Lipase-catalyzed resolution of 3-aryl-3-hydroxypropanenitriles. **Tetrahedron Asymmetry**, v. 13, n. 18, p. 2039–2051, 2002.
KHAN, S. et al. Role of recombinant DNA technology to improve life. **International Journal of Genomics**, v. 2016, 2016.
KO, S. J. et al. Kinetic resolution of fluorinated propargyl alcohols by lipase-catalyzed enantioselective transesterification. **Tetrahedron Asymmetry**, v. 20, n. 10, p. 1109–1114, 2009.
LAMBERT, P. W.; MEERS, J. L.; BEST, D. J. The Production of Industrial Enzymes [and Discussion].

Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences, v. 300, p. 263–282, 1983.
LEHMANN, F.; PILOTTI, Å.˚; LUTHMAN, K. Efficient large scale microwave assisted Mannich reactions using substituted acetophenones. Molecular Diversity, v. 7, n. 2–4, p. 145–152, 2003.
LEPORI, C.; HANNEDOUCHE, J. First-Row Late Transition Metals for Catalytic (Formal) Hydroamination of Unactivated Alkenes. Synthesis (Germany), v. 49, n. 6, p. 1158–1167, 2017.
LI, C. et al. Amidate complexes of titanium and zirconium: a new class of tunable precatalysts for the hydroamination of alkynes. Chemical Communications, v. 356, n. 2, p. 2462–2463, 2003.
LI, G.; WANG, J.; REETZ, M. T. Biocatalysts for the pharmaceutical industry created by structure-guided directed evolution of stereoselective enzymes. Bioorganic & Medicinal Chemistry, v. 26, n. 7, p. 1241–1251, 2018.
LIN, B.; TAO, Y. Whole - cell biocatalysts by design. p. 1–12, 2017.
LIU, J.; WU, S.; LI, Z. Recent advances in enzymatic oxidation of alcohols. Current Opinion in Chemical Biology, v. 43, p. 77–86, 2018.
LIU, X. et al. Characterization of a putative stereoselective oxidoreductase from Gluconobacter oxydans and its application in producing ethyl (R)-4-chloro-3-hydroxybutanoate ester. Molecular Biotechnology, v. 56, n. 4, p. 285–295, 2014.
LIU, Y.-K. et al. Reaction of *N* -Tosylated Imines with α,β-Acetylenic Ketones via Organozinc Species. Synthetic Communications, v. 40, n. 13, p. 1944–1953, 2010.
LUCA, L. DE et al. A Very Mild and Chemoselective Oxidation of Alcohols to Carbonyl Compounds LETTERS A Very Mild and Chemoselective Oxidation of Alcohols to Carbonyl Compounds. Synthesis, v. 19, p. 5–7, 2001.
LUIZ F. T. NOVAES, J. C. P. Avanços recentes na Hidroaminação de Compostos Insaturados. Química Nova, p. 1–14, 2017.
M??LLER, T. E. et al. Hydroamination: Direct addition of amines to Alkenes and Alkynes. Chemical Reviews, v. 108, n. 9, p. 3795–3892, 2008.
MACINTOSH, A.; TODA, F. Enantiomer separation fundamentals and practical methods. [s.l: s.n.].
MARCO, B. A. DE et al. Evolution of green chemistry and its multidimensional impacts : A review. Saudi Pharmaceutical Journal, v. 27, n. 1, p. 1–8, 2019.
MATSUDA, T.; YAMANAKA, R.; NAKAMURA, K. Recent progress in biocatalysis for asymmetric oxidation and reduction. Tetrahedron: Asymmetry, v. 20, n. 5, p. 513–557, mar. 2009.
MELAIS, N.; ARIBI-ZOUIOUECHE, L.; RIANT, O. The effect of the migrating group structure on enantioselectivity in lipase-catalyzed kinetic resolution of 1-phenylethanol. Comptes Rendus Chimie, v. 19, n. 8, p. 971–977, 2016.
MITSUDOME, T. et al. Convenient and efficient Pd-catalyzed regioselective oxyfunctionalization of terminal olefins by using molecular oxygen as sole reoxidant. Angewandte Chemie - International Edition, v. 45, n. 3, p. 481–485, 2006.
NAKAMURA, K.; YAMANAKA, R.; HARADA, T. Recent developments in asymmetric reduction of ketones with biocatalysts. Tetrahedron Asymmetry, v. 14, n. 60, p. 2659–2681, 2003.
NASÁRIO, F. D. et al. Deracemization of 1-phenylethanol via tandem biocatalytic oxidation and reduction. Tetrahedron Asymmetry, v. 27, n. 9–10, p. 404–409, 2016.
NEGISHI, E. I. Magical power of transition metals: Past, present, and future (Nobel Lecture). Angewandte Chemie - International Edition, v. 50, n. 30, p. 6738–6764, 2011.
NGUYEN, L. A.; HE, H.; PHAM-HUY, C. Chiral Drugs: An Overview. International Journal of Biomedical Science : IJBS, v. 2, n. 2, p. 85–100, 2006.

OPPERMANN, U. C.; MASER, E. Molecular and structural aspects of xenobiotic carbonyl metabolizing enzymes. Role of reductases and dehydrogenases in xenobiotic phase I reactions. **Toxicology**, v. 144, n. 1–3, p. 71–81, 3 abr. 2000.
OWENS, J. Can making a correlation be patented? **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 4, n. 12, p. 950–950, 2005.
PAL, R.; SARKAR, T.; KHASNOBIS, S. Amberlyst-15 in organic synthesis. **Arkivoc**, v. 2012, n. 1, p. 570–609, 2012.
POTS, J. pET System Manual Table. In: **Novagen**. [s.l: s.n.]. v. 172p. NP.
RAMANA, P. V. et al. Amberlyst-15: An Efficient and reusable heterogeneous catalyst for the synthesis of β-amino carbonyl compounds. **Organic Communications**, v. 8, n. 4, p. 6175, 2015.
REETZ, M. T. Biocatalysis in organic chemistry and biotechnology: past, present, and future. **Journal of the American Chemical Society**, v. 135, n. 34, p. 12480–96, 28 ago. 2013.
RIVA, S. Laccases: blue enzymes for green chemistry. **Trends in Biotechnology**, v. 24, n. 5, p. 219–226, 2006.
ROBERT M. SILVERSTEIN, FRANCIS X. WEBSTER, D. J. K. **Spectrometric Identification of Organic Compounds**. 7th. ed. [s.l: s.n.].
SCHMID, A. et al. Industrial biocatalysis today and tomorrow. v. 409, n. January, 2001.
SCHUBERT, T. et al. Enantioselective Synthesis of Both Enantiomers of Various Propargylic Alcohols by Use of Two Oxidoreductases. **European Journal of Organic Chemistry**, v. 2001, n. 22, p. 4181, nov. 2001.
SENGEE, M.; SYDNES, L. K. Specific conjugate addition to α,β-acetylenic ketones. **Pure and Applied Chemistry**, v. 83, n. 3, p. 587–596, 2011.
SHATSKIY, A. et al. Ruthenium-Catalyzed Asymmetric Transfer Hydrogenation of Propargylic Ketones. **ChemCatChem**, v. 7, n. 23, p. 3818–3821, 2015.
SHELDON, R. A. The: E factor 25 years on: The rise of green chemistry and sustainability. **Green Chemistry**, v. 19, n. 1, p. 18–43, 2017.
SHELDON, R. A.; WOODLEY, J. M. **Role of Biocatalysis in Sustainable ChemistryChemical Reviews**, 2018.
SILVA, A. B. V. DA S. et al. A sustainable access to Ynones through Laccase/TEMPO-catalyzed metal- and halogen-free aerobic oxidation of propargylic alcohols in aqueous medium. **Catalysis Communications**, 2019.
SREEVALLI, W. et al. Green Trends in Mannich Reaction. **Mini-Reviews in Organic Chemistry**, v. 11, n. 1, p. 97–115, 2014.
STRAATHOF, A. J. J.; JONGEJAN, J. A. The enantiomeric ratio: Origin, determination and prediction. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 21, n. 8, p. 559–571, 1997.
SUMMEREN, R. P. VAN et al. Catalysis Science & Technology The oxidation of alcohols with trichloroisocyanuric acid : pyridine from base to organocatalyst. **Catalysis Science & Technology**, p. 2052–2056, 2012.
TILSTAM, U.; WEINMANN, H. Trichloroisocyanuric Acid: A Safe and Efficient Oxidant. **Organic Process Research & Development**, v. 1, p. 384–393, 2002.
TRUPPO, M. D. Biocatalysis in the Pharmaceutical Industry : The Need for Speed. **ACS Med. Chem. Lett.**, v. 8, p. 476–480, 2017.
TURNER, N. J. Deracemisation methods. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 14, n. 2, p. 115–121, 2010.
VOHRA, A.; SATYANARAYANA, T. Laccases: Microbial sources, production, purification, and

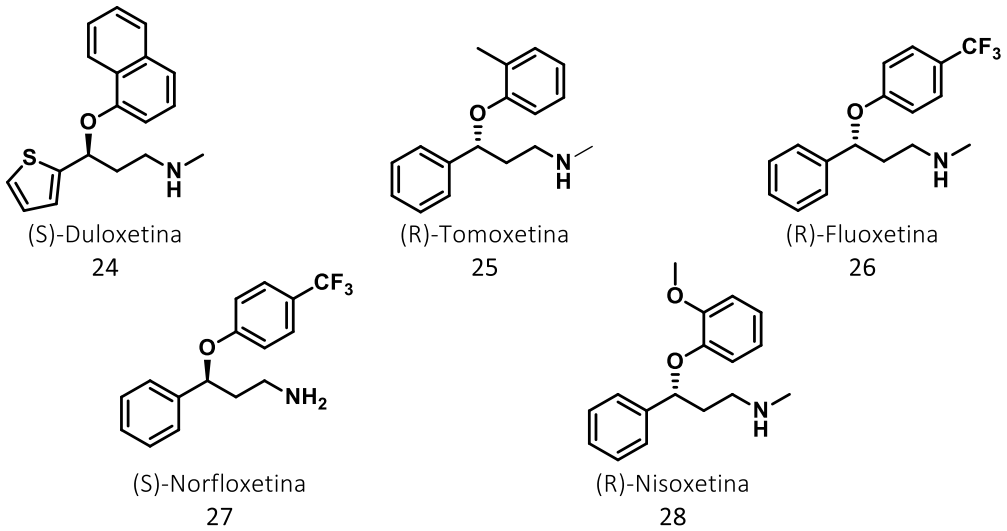
potential biotechnological applications. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 23, n. 1, p. 29–60, 2003.
WALSH, P. J.; BARANGER, A. M.; BERGMAN, R. G. Stoichiometric and catalytic hydroamination of alkynes and allene by zirconium bisamides Cp2Zr(NHR)2. **Journal of the American Chemical Society**, v. 114, n. 5, p. 1708–1719, 1992.
WANG, Y. et al. Wacker-Type Oxidation and Dehydrogenation of Terminal Ole fi ns Using Molecular Oxygen as the Sole Oxidant without Adding Ligand. n. entry 9, p. 21–24, 2014.
WHITTAKER, R. E.; DERMENCI, A.; DONG, G. Synthesis of Ynones and Recent Application in Transition-Metal-Catalyzed Reactions. **Synthesis (Germany)**, v. 48, n. 2, p. 161–183, 2016.
XU, F. Applications of oxidoreductases: Recent progress . **Industrial Biotechnology**, v. 1, n. 1, p. 38–50, 2005.
XU, S. et al. The DMAP-catalyzed acetylation of alcohols - A mechanistic study (DMAP = 4-(dimethylamino)pyridine). **Chemistry - A European Journal**, v. 11, n. 16, p. 4751–4757, 2005.
YANG, J. et al. Acid-catalyzed cascade reactions of enaminones with aldehydes: C-H functionalization to afford 1, 4-dihydropyridines. **European Journal of Organic Chemistry**, n. 22, p. 4189–4193, 2010.
ZHANG, Y.; LI, Z.; YE, Q. Enhanced production of human epidermal growth factor under control of the phoA promoter by acetate-tolerant Escherichia coli DB15 in a chemically defined medium. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, v. 15, n. 4, p. 626–634, 2010.
ZHIMIN, O. et al. Synthesis of duloxetine intermediate (S)-3-Chloro-1-(2-thienyl)-1-propanol with liquid-core immobilized candida pseudotropicalis 104. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 168, n. 8, p. 2297–2308, 2012.
ZYGMUNT, B. et al. Green analytical chemistry in sample preparation for determination of trace organic pollutants. v. 28, n. 8, p. 943–951, 2009.

APÊNDICE A – PROPOSTA SINTÉTICA VISANDO A OBTENÇÃO DE DERIVADOS B-HIDROXILAMINICOS

Antidepressivos derivados de β-hidroxiaminas

Dentre as classes de medicamentos com alto impacto social, e que possuem a característica quiral em sua estrutura, os antidepressivos apresentam destaque. Como exemplo, pode-se citar alguns antidepressivos derivados de β-hidroxiaminas, como a Duloxetina **24**, Tomoxetina **25**, Fluoxetina **26**, seu enantiômero Norfloxetina **27**, e Nisoxetina **28**. Essas substâncias são importantes fármacos utilizados no tratamento de desordens psiquiátricas e problemas metabólicos(ALI; SUDALAI, 2002) (Figura 32).

Figura 32 - Antidepressivos comercialmente encontrados, derivados de aminoálcoois



Fonte: ALI; SUDALAI, (2002)

Dos exemplos de bioisósteros apresentados acima, a Fluoxetina desempenha papel de extrema relevância no tratamento de ansiedade, alcoolismo, dores crônicas, desordem compulsiva, entre outros(BRACHER; LITZ, 1996). Estes compostos (**24-28**), atualmente chegam a movimentar aproximadamente 3 bilhões de dólares por ano em vendas (KAMAL; KHANNA; RAMU, 2002). Em relação a Duloxetina, além de ser um importante antidepressivo, desenvolve

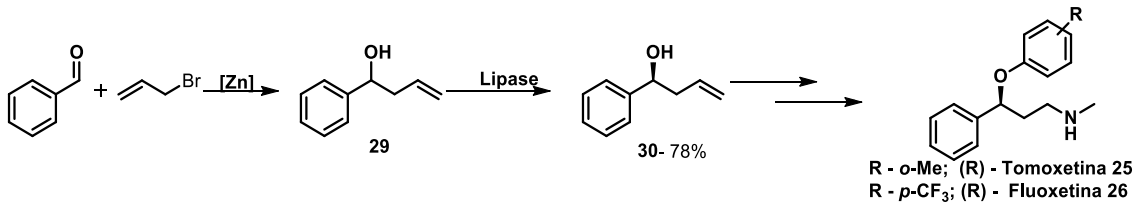
também, função de inibição ao neurotransmissor Noradrenalina, e possui eficiência no tratamento de incontinência urinária(ZHIMIN et al., 2012).

A atividade farmacológica desempenhada pelos enantiômeros de um mesmo fármaco podem ser diferentes. No caso da Tomoxetina, por exemplo, o isômero *(R)* é duas vezes mais potente que o racemato, e se comparado com o isômero *(S),* o mesmo é 9 vezes mais potente(KAMAL; KHANNA; RAMU, 2002).

Por isso, vem aumentando cada vez mais o desenvolvimento de metodologias alternativas, que visem a preparação destes fármacos. Desde que a primeira síntese da Fluoxetina foi apresentada em 1970(OWENS, 2005), diversos esforços tem sido realizados de modo a desenvolver novas rotas sintéticas de obtenção deste compostos e seus análogos.

Um exemplo é rota quimioenzimática desenvolvida em 1996, por Bracher et al., que tratou da resolução do álcool alílico **6**, empregando uma lipase comercial. Essa rota teria ainda mais 4 etapas sintéticas, levando a formação da Fluoxetina e Tomoxetina, em suas formas enantioméricamente enriquecidas, em um rendimento global menor que 50% (Esquema 22)

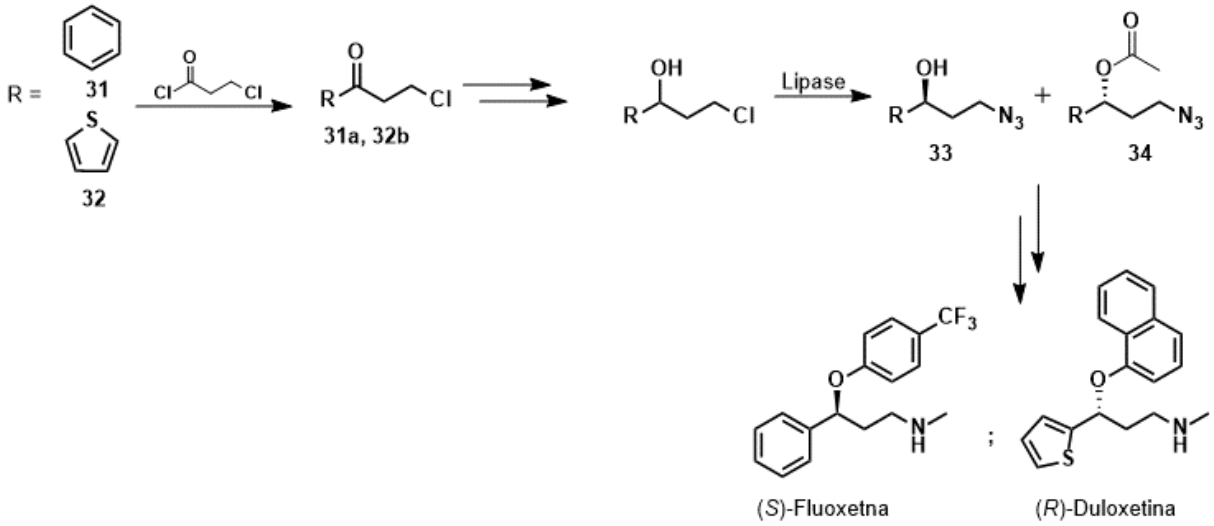
. Esquema 22 - Síntese da Fluoxetina e Tomoxetina com quiralidade promovida por resolução com lipase



Fonte: OWENS(2005)

Tempos depois, em 2009(KAMAL et al., 2009), a resolução com lipases foi novamente empregada para obtenção de blocos quirais **33** e **34**, onde a resolução foi realizada na azida **34**, o que levou à formação dos compostos quirais para a síntese enantiosseletiva da Fluoxetina e Duloxetina com 7 etapas sintéticas, e rendimentos globais de aproximadamente 30% (Esquema 23).

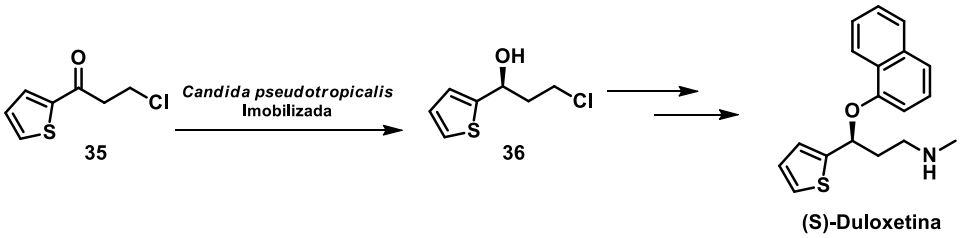
Esquema 23 - Síntese dos dois enantiômeros da Fluoxetina e Duloxetina usando resolução para obtenção da quiralidade



Fonte: KAMAL et al.,(2009)

Outra forma de realizar transformações quimioenzimáticas, é o emprego de células íntegras. Sendo assim, em 2012, foi proposta uma síntese da *(S)*-Duloxetina onde foi empregado na etapa enantiomérica da síntese o fungo *Candida pseudotropicalis* imobilizado em alginato de sódio(ZHIMIN et al., 2012). Essa reação prevê, após a obtenção do enantiômero puro, mais 3 etapas sintéticas até a obtenção do fármaco (Esquema 24).

Esquema 24 - Síntese da (S)-Duloxetina usando resolução com lipase para obtenção do álcool enantiomericamente enriquecido

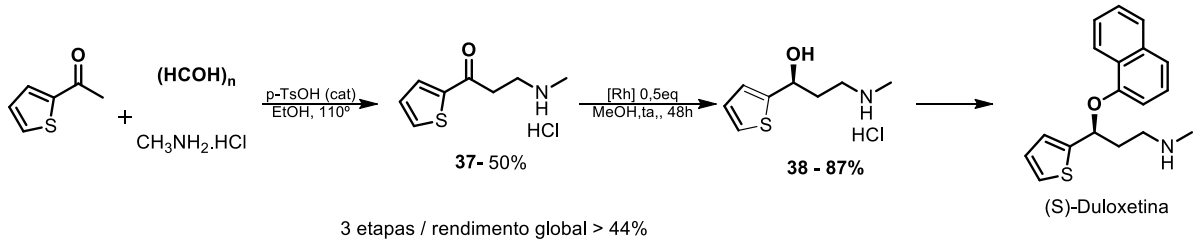


Fonte: ZHIMIN et al., (2012)

Recentemente (2015), um estudo envolvendo a redução enantiosseletiva, agora promovida pela hidrogenação mediante um complexo de ródio(HU et al., 2015), foi descrito. A rota descrita, utiliza um composto cetoamínico **37**, obtido por Reação de Mannich com 50% de

rendimento. O rendimento global até a 2 etapa era de 44%, e a síntese era alcançada em 3 etapas. (Esquema 25).

Esquema 25 - Síntese da (S)-Duloxetina; usando Hidrogenação com ródio como catalisador assimétrico

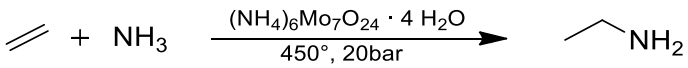


Fonte: HU et al., 2015

Dentre os principais métodos de obtenção de aminas descritos, a hidroaminação de sistemas conjugados ativados representa uma alternativa interesante(BARTOLI et al., 2005). No entanto, reações de hidroaminação entre alquenos e alquinos não ativados são difíceis de ocorrer sem adição de catalisadores. Isso se deve, principalmente, à repulsão eletrônica entre o par isolado de elétrons do átomo de nitrogênio da amina e o sistema π rico em elétrons dos compostos insaturados, resultando assim numa alta energia de ativação (DOYE, 2004).

A reação de hidroaminação teve seus primeiros estudos em meados do século XX(HOWK et al., 1954), onde condições muito energéticas utilizando óxidos metálicos eram empregadas (Esquema 26).

Esquema 26 - Primeiras sínteses envolvendo hidroaminação

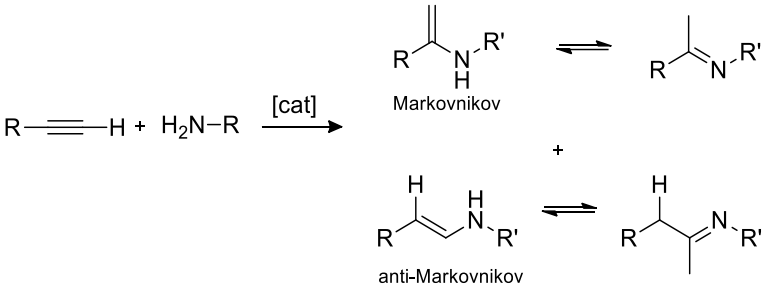


Fonte: HOWK et al., 1954

Metodologias de obtenção de b-aminocetonas

Décadas depois, alternativas sintéticas empregando condições mais brandas, e controle regiosseletivo, visando à preparação de produtos Markovinikov, começaram a ser procuradas(WALSH; BARANGER; BERGMAN, 1992). O produto obtido da hidraminação de alquinos é uma enamina que tautomeriza para seu isômero de imine, onde podem ser obtidos dois produtos (Esquema 27).

Esquema 27 - Hidroaminação Markovnikov e anti-Markovnikov



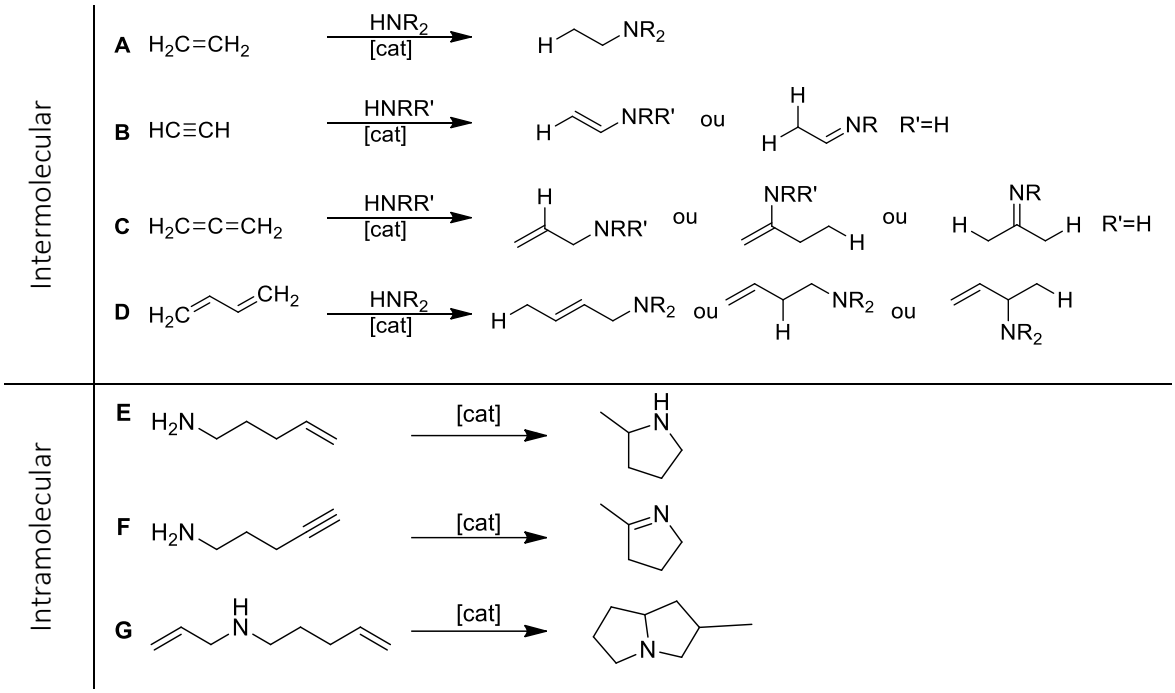
Fonte: WALSH; BARANGER; BERGMAN, (1992)

Desde o trabalho pioneiro baseado em catalisadores metálicos do grupo IV até agora, diversos estudos foram reportados, empregando catálise metálica em reações de hidroaminação de alquinos(LUIZ F. T. NOVAES, 2017),(NEGISHI, 2011). Entre esses estudos, a hidroaminação de alquinos catalisada por ouro, por exemplo, apresentou atividade interessante quando empregado uma série de compostos nitrogenados, tais como a hidrazina, as aminas aromáticas e as aminas alifáticas(BAHRI, 2015).

A hidroaminação, catalisada por ródio (Rh), entre alquinos terminais e aminas primárias e secundárias, ambas gerando produtos anti-Markovnikov, foi primeiramente relatada em 2007(FUKUMOTO et al., 2007). Já utilizando catalisadores de paládio (Pd), no entanto, gerou uma mistura de compostos oriundos de produtos Markovinikov, quando reações de fenilacetileno e aminas alifáticas secundarias era empregadas (M??LLER et al., 2008). Assim essas hidroaminações podem ocorrer de forma intermolecular ou intramolecular(BRUNET; NEIBECKER, 2001) (Figura 33).

Uma forma de contornar a possível formação de subprodutos nessas reações, tem sido a realização de reações de hidroaminação entre alquinos e hidrazinas, na presença de catalisadores contendo sais de zinco, tais como $ZnCl_2$ e $Zn(OTf)_2$ (ALEX et al., 2008). Estas reações são conduzidas pela presença dos ácidos de Lewis, gerando produtos de reação com auto grau de seletividade

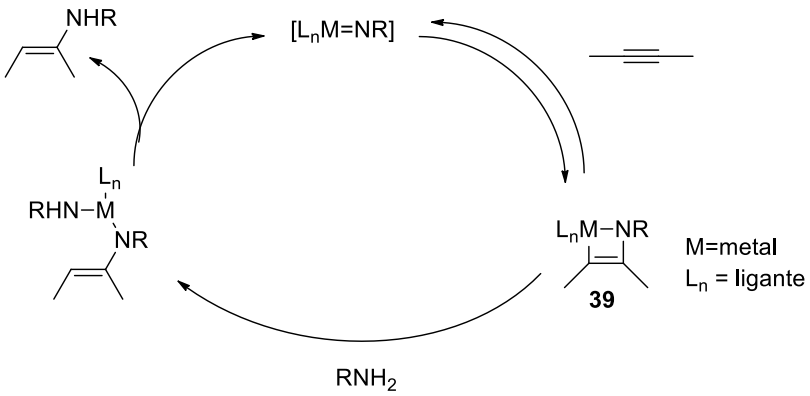
Figura 33 - Reações de hidroaminação interoleculra (A-D) e intramolecular (E-G)



Fonte: Autora (2020)

Outros catalisadores empregados neste tipo de reação (objetivando anti-Markovnikov produtos), são os baseados em complexos metálicos de Titânio (DOYE, 2004). Na maioria dos últimos trabalhos, os apontam em reações de hidroaminações de alquinos elevada seletividade e rendimentos(DOYE, 2004),(LI et al., 2003). O mecanismo dessas reações está representado no Esquema 7 abaixo.(DOYE, 2004) O mecanismo proposto é similar ao reportado para catalisadores baseados em Zr, mesma família que o Ti, que passa pelo intermediário **39** (Esquema 28).

Esquema 28 - Mecanismo de ciclo adição a alquinos por complexo de imido-Ti



Como continuidade dos experimentos envolvendo biocatálise, essa etapa teve por objetivo aplicar os métodos quimioenzimáticos desenvolvidos no capítulo anterior, na preparação de intermediários chave para a síntese de derivados de β-hidroxilaminas. Com isso, após otimização das condições experimentais, e obtenção dos compostos propargílicos em grande escala, estudou-se criar um método geral de preparação de intermediários sintéticos aplicáveis na síntese dos antidepressivos Fluoxetina, Duloxetina e Tomoxetina.

As rotas sintéticas empregadas tinham como intuito preparar β-hidroxilaminas em um menor número de etapas e de forma mais sustentável, quando comparadas com a literatura. Neste contexto, seria possível fornecer dados alternativos àqueles onde a utilização de catalisadores metálicos, condições reacionais drásticas e uso de auxiliares quirais em quantidades estequiométricas são necessários para obter essa classe de compostos.

Primeiramene seria empregado catalisadores de zinco, ferro e cobre nos álcoois na presença de aminas primárias e secundárias. Em seguida, outras metodologias como oxifuncionalização de olefinas e reações de Manich seriam utilizadas com o mesmo intuito.

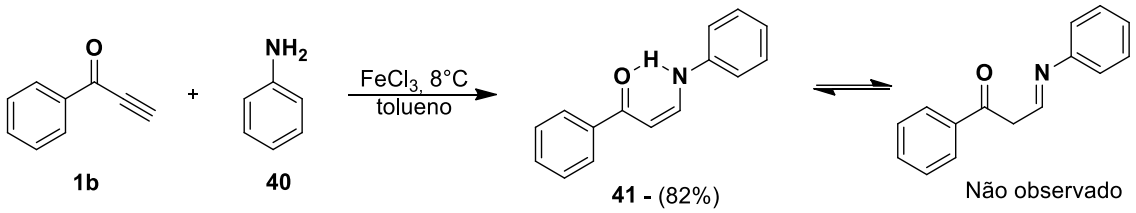
Resultados

Hidroaminação é uma reação de adição de amina à ligações múltiplas C-C, como por exemplo alquenos, alquinos, dienos ou alenos(BRUNET; NEIBECKER, 2001). A hidroaminação de Inonas (alquinos conjugados com uma carbonila) são realizadas pela adição conjugada,1,4-de um grupo amino à ligação C-C, levando a formação de enaminonas.

Inicialmente, as reações de hidroaminação foram conduzidas reagindo uma inona terminal na presença de uma amina primária na presença de um catalisador metálico. Sendo assim, foi possível comparar, entre os substratos testados, a eficiência da hidroaminação, juntamente com a formação de subprodutos.

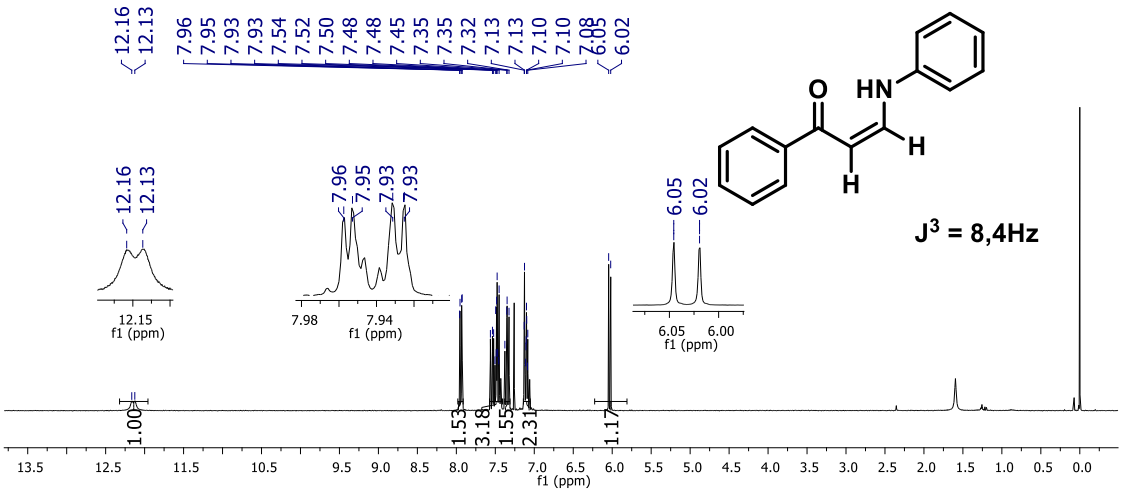
Com isso, após submeter a cetona **1b** e anilina **40** à reação de adição 1,4-, na presença de catalisador de $FeCl_3$, baseado em uma metodologia previamente descrita(YANG et al., 2010), algumas observações foram possíveis de serem feitas. O isômero **41** foi obtido com 82% de rendimento, como único isômero. Isso pode ser explicado devido a ligação intramolecular do oxigênio da carbonila da enaminona com o hidrogênio da enamina (Esquema 29).

Esquema 29 - Síntese da enaminona 41 a partir da hidroaminação da alquinona 1b e anilina 40



A caracterização foi realizada por espectros de RMN de ^{1}H e ^{13}C, onde foi confirmado o isômero *cis* devido ao acoplamento dos hidrogênios da enaminona **41** ser J^3 = 8,4Hz, relativo a acoplamento cis e não trans (entre 11-18Hz) característico de acoplamento *E* (ROBERT M. SILVERSTEIN, FRANCIS X. WEBSTER, 2006) (Figura 43).

Figura 34 - Espectro de RMN de 1H da enaminona 41

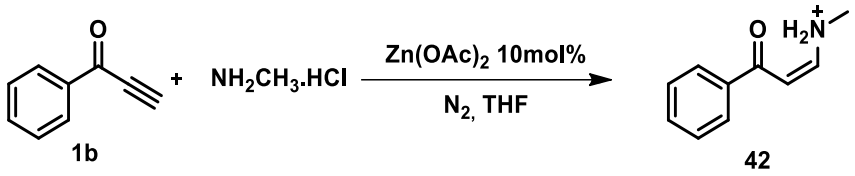


Fonte: Auotora (2020)

Após estudos iniciais de síntese de enaminonas, foi conduzida a obtenção do intermediário de interesse dos antidepressivos. Nesse momento era necessária uma fonte da amina primária metil amina. Devido à vantagem de os fármacos serem comercializados na forma de sal de hidrocloreto, somada a estabilidade, utilizamos a metil amina hidroclorada como material de partida para a obtenção da região nitrogenada das enaminonas. O procedimento com a metil amina hidroclorada foi baseado em metodologia descrita para síntese de índoles(ALEX et al., 2008), com catalisadores de Zn (Esquema 30).

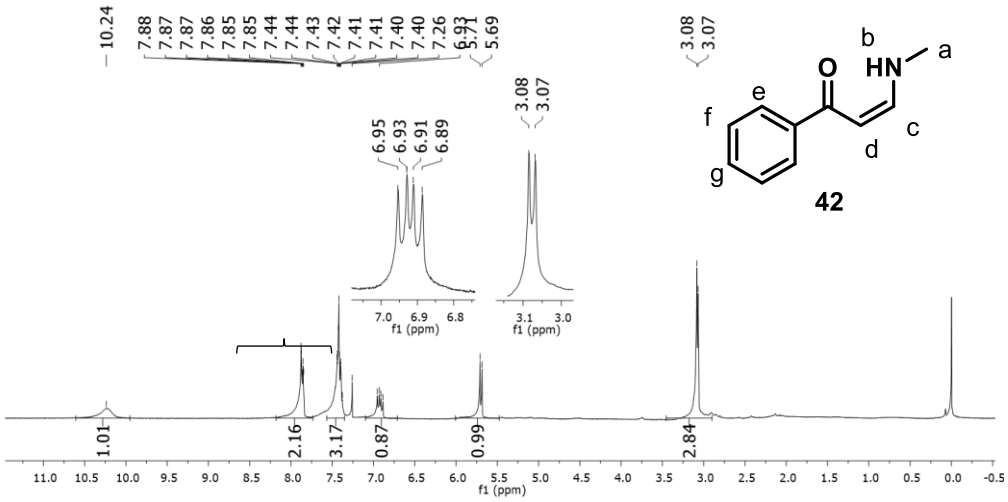
Na metodologia baseada(ALEX et al., 2008) o autor empregou uma série de catalisadores de metais de transição, entretanto optamos por aqueles que apresentaram maiores rendimentos e conversão. Entre eles estão os sais de $ZnCl_2$, $Zn(OTf)_2$ e $Zn(OAc)_2$. Após o tempo reacional estabelecido foi verificado que as reações com $Zn(OTf)_2$ geraram muitos subprodutos assim como as com $ZnCl_2$ quando metil amina era usada, e a enaminona **42** foi obtida preferencialmente quando $Zn(OAc)_2$ era usado.

Esquema 30 - Síntese das enaminonas com catalisadores de Zn



As análises de RMN de ^{1}H e ^{13}C confirmam a enaminona. No espectro de ^{1}H é possível observar o dubleto em δ3,08 com integral de 3H referente a metila da metilamina acoplando com o H da amina (J^3 = 4,5Hz), o dubleto em δ5,70 com acoplamento J^3 = 7,0 referente ao hidrogênio β do isômero *Z*. Por fim o duplo dubleto em δ6,92 referente ao hidrogênio α acoplando cis com o H_d (J^3 = 7,0Hz) e com o hidrogênio da amina (J^3 = 12,9Hz) (Figura 35).

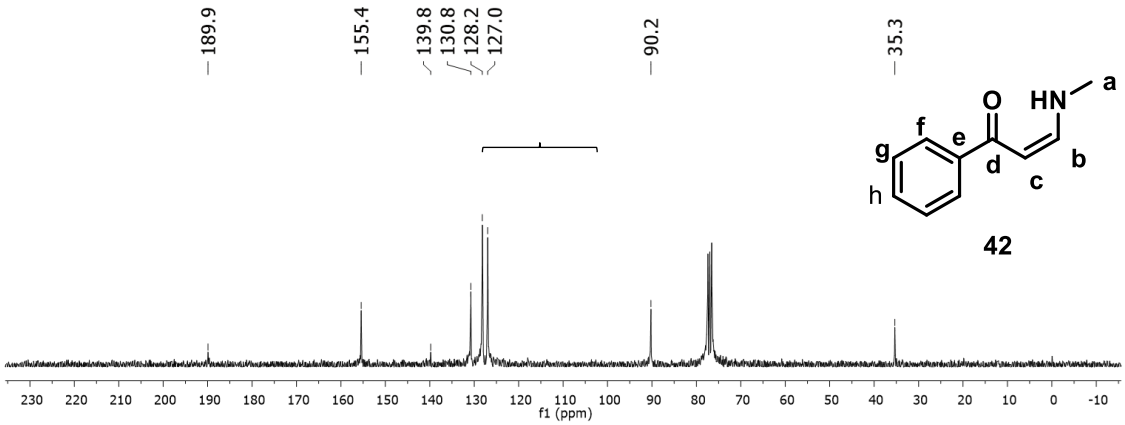
Figura 35 - Espectro de RMN 1H do composto 42



Fonte: Auotora (2020)

Observando agora o espectro de ^{13}C há a metila C_a da metil amina em δ 35,3. Em δ 90,2 e δ 155,4 os carbonos da dupla ligação, o segundo mais desblindado devido à região eletrônica da amina ligeiramente ligada ao carbono. E por fim os carbonos da região aromática de δ 127,0 a δ 139,8, e a carbonila em δ 189,9 (Figura 36).

Figura 36 - Espectro de RMN de 13C do composto 42



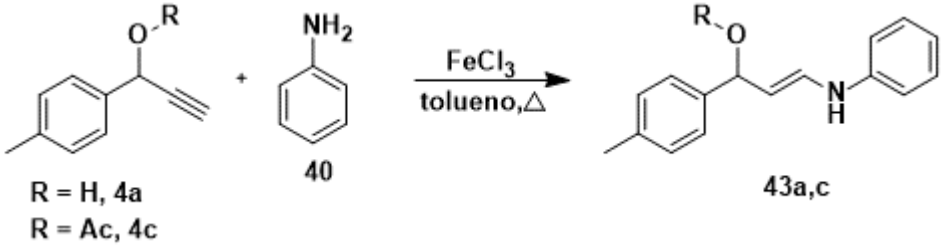
Fonte: Auotora (2020)

Como tínhamos a intenção de testar os alcoois propargílicos em reações de hidraminação, alguns fatores precisaram ser levados em conta.

Reações de adição à sistemas conjugados são corriqueiramente encontrados como opção para formação de novas ligações C-R. No entanto, o emprego de álcoois propargílicos e seus derivados são pouco elucidados na literatura. Por isso, primeiramente o comportamento desses álcoois propargílicos frente às metodologias propostas foi examinado.

Dessa maneira, o álcool **4a** e seu respectivo acetato **4c** foram submetidos a reação de acoplamento com anilina na presença de $FeCl_3$ como catalisador (Esquema 31).

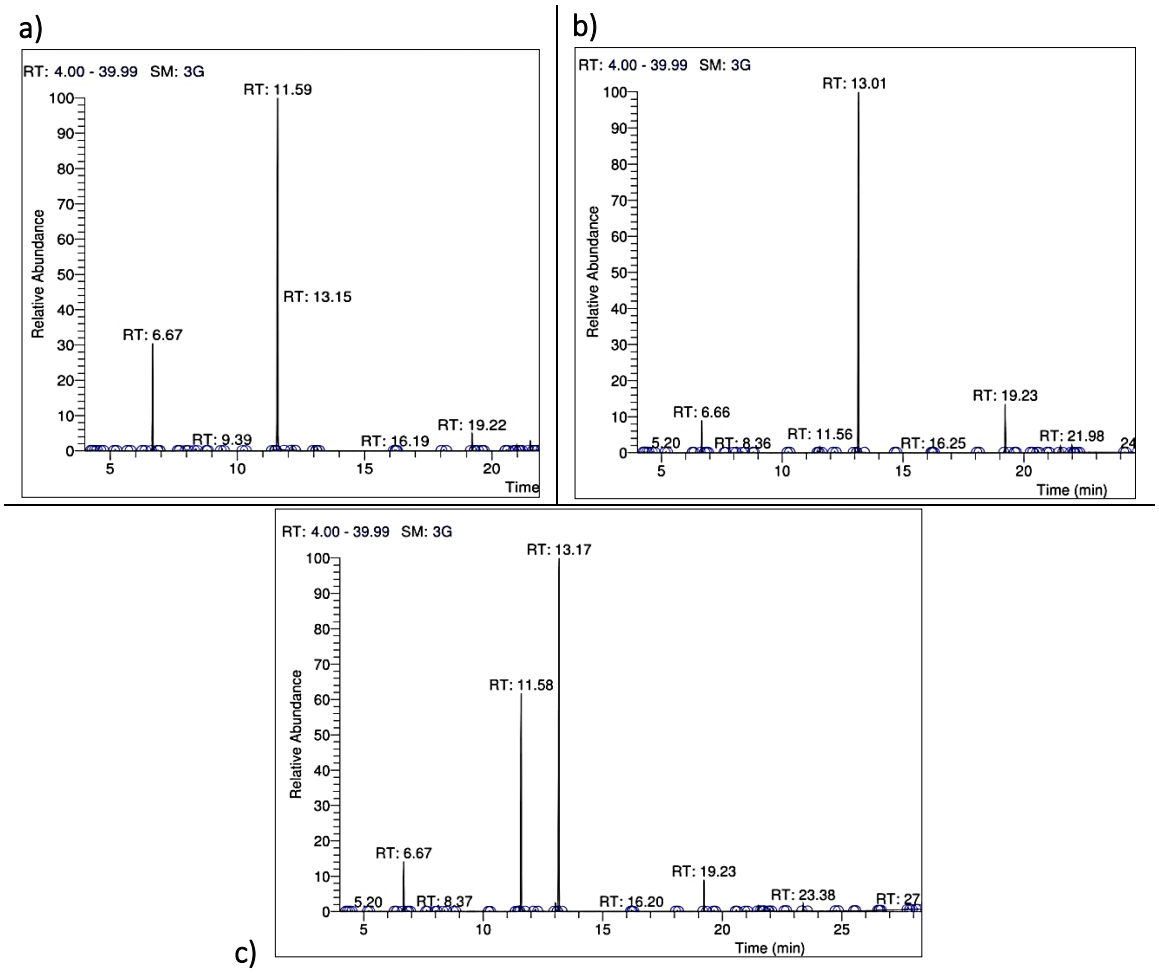
Esquema 31 - Hidroaminação com compostos propargílicos e anilina para obtenção de 49



A reação inicialmente foi acompanhada por cromatografia em camada delgada (CCD), e após 72hr foi analisada por CG-MS. Analisando o cromatograma pode ser observado um pico em 6,67 referente a anilina, um em 11,59 relativo ao álcool **4a**, e um terceiro pico com tempo de retenção em 13,17 min referente ao acetato **4c**, ambos materiais de partida da reação. Algo que apareceu em comum nos três cromatogramas, foi o pico com tempo de retenção em 19,23 min. Após análise da fragmentação do pico correspondente, é indicativo a formação do produto de acoplamento (Figura 37).

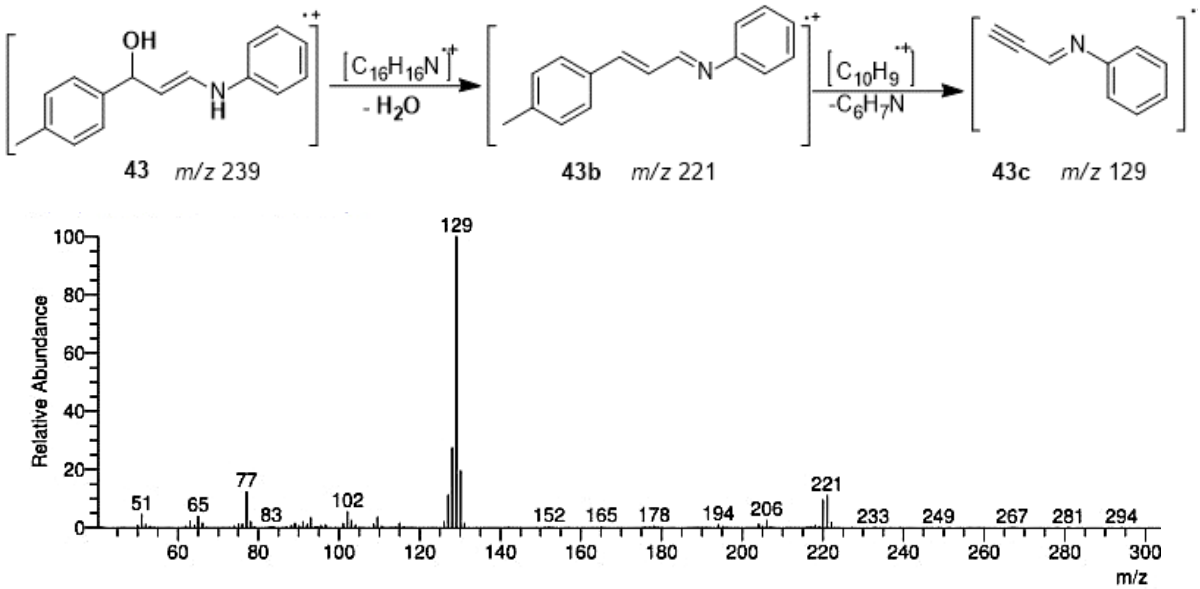
Ao analisar o perfil de fragmentação do sinal de 19,23min, observou-se os principais picos da amostra, chegando a seguinte sequência de fragmentação (Figura 38). Nela foi observado o pico [M-18] em m/z 221 (Figura 38, espécie 43b) caracterizando a saída de água da amostra, e o pico em m/z 129 (Figura 38, espécie 43c) característico da saída do grupamento aromático. O íon molecular (Figura 38, espécie 43), por se tratar de um álcool allilico/benzílico, não aparece, pois, trata-se de uma espécie pouco estável e facilmente fragmentada.

Figura 37 - Cromatogramas da reação de hidroaminação entre alquinos terminais e anilina na presença de catalisador de Fe. a) álcool 4a; b) acetato 4c; c) produto de resolução cinética enzimática



Fonte: Auotora (2020)

Figura 38 - Fragmentação do composto com tempo de retenção de 19,23 do composto 50

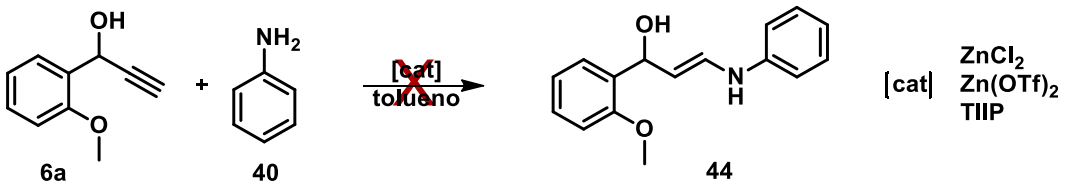


Fonte: Auotora (2020)

Sendo assim, pôde-se aferir que estava sendo formado o produto de hidromaninação da anilina com as triplas terminais. Com o resultado obtido percebe-se que reações de hidroaminação empregando os álcoois propargílios poderiam ser usados na síntese de hidroxiaminas porém havia a necessidade de aprimorar a reatividade frente a esses compostos. Dessa maneira, outras metodologias foram buscadas e testadas de forma a aumentar a cinética da reação, diminuir o tempo e aumentar a conversão para o produto de hidroaminação.

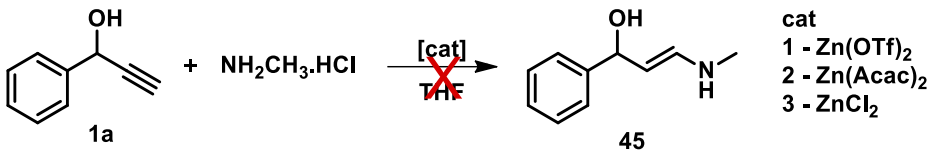
Assim foi utlizado os catalisadores utilizados anteriormente para a síntese de enaminonas. Entretanto ao reagir o álcool **6a** e anilina **40** sob aquecimento em tolueno, na presença dos catalisadores não foi observado produto de hidroaminação após 48hr (Esquema 32).

Esquema 32 - Reação de hidroaminação com anilina 40 e álcool 6a



Por outro lado, com a metil amina hidroclorada, após 24hr de reação foi possível verificar que o $ZnCl_2$ forneceu total conversão do álcool (Esquema 33). Entretanto o produto formado não foi o produto de hidroaminação **45**.

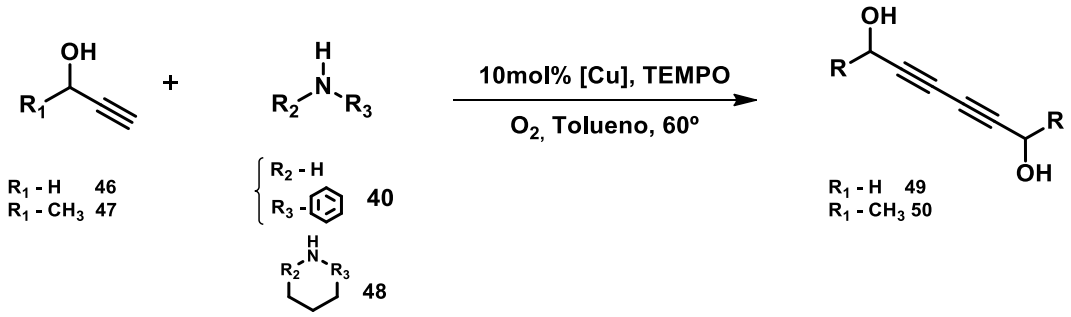
Esquema 33 - Hidroaminação com o álcool propargílico 1a



Após os resultados com catalisadores de Zn nossos esforços forsam conduzidos para reações com catalisadores de cobre. Catalisadores de cobre são comumente usados por desempenhar uma série de reações, entre elas hidroaminação[12]. Os estudos foram direcionados no primeiro momento com álcoois propargílicos comeriais **46** e **47**, na presença de amina primária **40** e secundária **48**. Os catalisadores de cobre utilizados foram $CuBr_2$ e $CuCl_2$.

Na literatura os sais de cobre halogenados foram empregados nos acoplamentos e formação de ligação C-N, C-C e C-P, levando a formação de β-cetoamidas(CHUN; NING, 2010). Assim os experimentos foram baseados na mesma metodologia mudando, entretanto, alguns reagentes (Esquema 34).

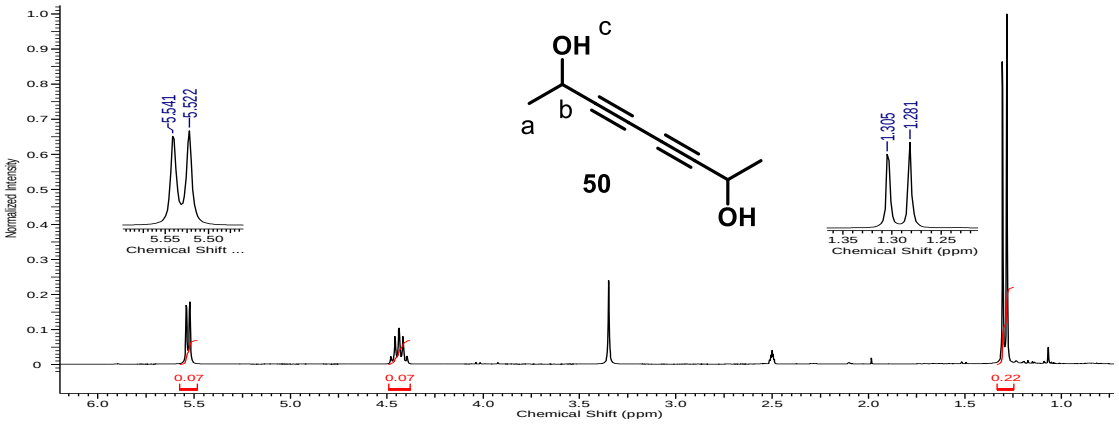
Esquema 34 - Reação de hidroaminação com catalisadores de Cu2+



A reação levou a formação de apenas um produto. Ao observar os espectros de ^1H de RMN do composto **47** e o cromatograma de GC-MS do composto **50**, evidenciamos o acoplamento C-C dos alquinos terminais preferencialmente ao acoplamento C-N (Esquema 13).

No espectro de RMN de ^{1}H há um dupleto em δ1,29 com integral 3 referente a metila H_a acoplando com o H_b carbinólico. Um quinteto em δ4,44 referente ao acoplamento do H_b carbinólico com o H_c da hidroxila e H_a metila, e por fim um dupleto em δ5,53 do H_C da hidroxila com o H_b carbinólico (Figura 39).

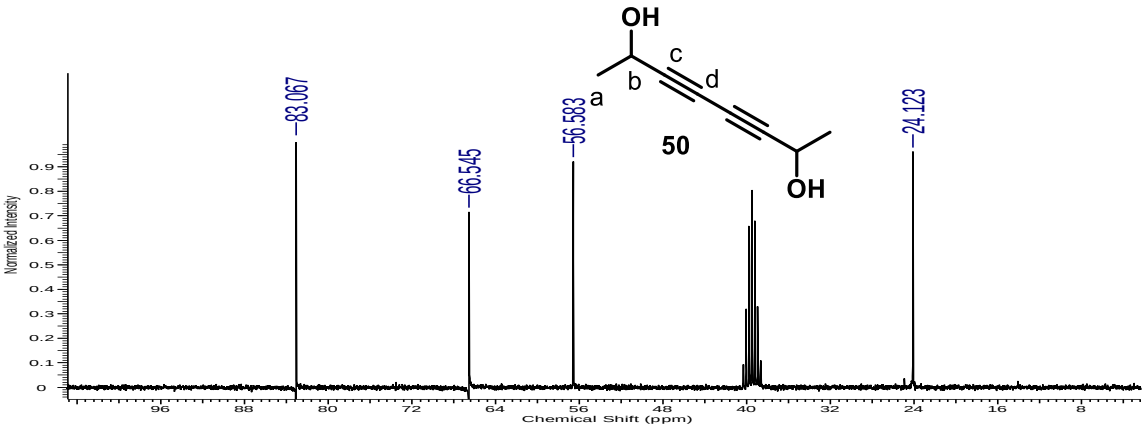
Figura 39 - Espectro de RMN de 1H do composto 50



Fonte: Auotora (2020)

No espectro de RMN de ^{13}C há 4 sinais, o primeiro refere-se ao C_a da metila em δ24,1, em seguida está o C_b carbinólico em δ58,6, e os carbonos acetilênicos C_c e C_d em δ68,6 e δ83,1 (Figura 40).

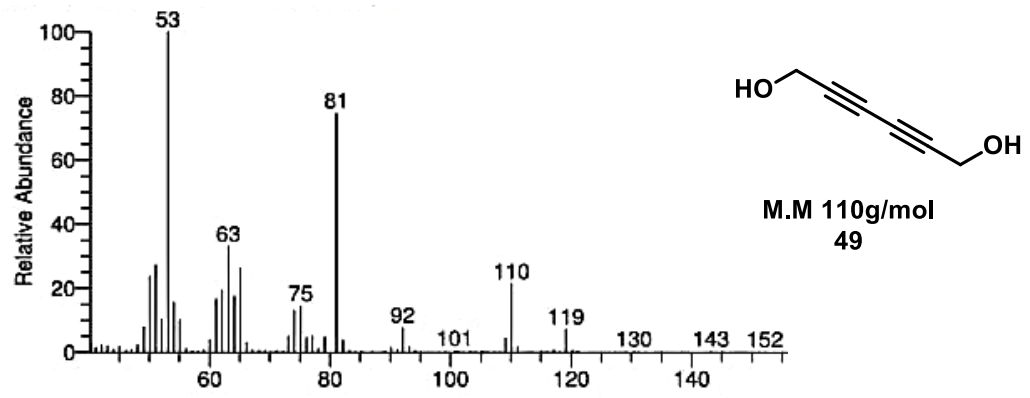
Figura 40 - Espectro de RMN de 13C do composto 50



Fonte: Auotora (2020)

Partindo do álcool propargílico **46** também foi possível obter o acoplamento entre alquinos terminais, evidenciado pela fragmentação via CG-MS (Figura 41)

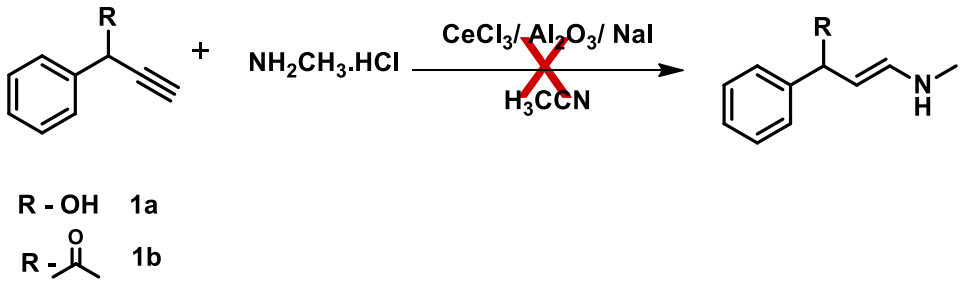
Figura 41 - Perfil de fragmentação via CG-MS do composto 49



Fonte: Auotora (2020)

Além dos catalisadores acima mencionados, o catalisador o $CeCl_3$, da família dos lantanídeos, foi empregado baseado na metodologia de Marcantoni e colaboradores(BARTOLI et al., 2005), onde o ácido de lewis é suportado em alumina na presença de NaI, para desempenhar adição 1,4 de Michael. Assim empregamos esse sistema catalítico nas reações de hidroaminação do álcool propargílico **1a** e alquinona **1b** (Esquema 35).

Esquema 35 - Hidroaminação com catalisador de CeCl3 suportado em alumina

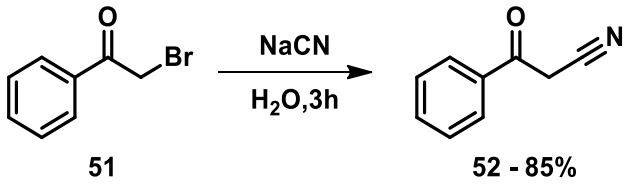


Devido a versatilidade dos lantanídeos em desempenhar diferentes mecanismos, ainda não foi possível caracterizar o produto destas reações.

Já as cetonitrlas e β-hidroxinitrilas são blocos de construção de uma série de compostos e permitem a preparação de β-hidroxiamidas, β-hidroxiacidos, amino álcoois entre outros. Dessa forma o interesse em obtê-las na sua forma enantiomérica é desejável e tem sido difundido. Com o intuito de obter padrões de hidroxinitrilas e cetonitrilas para as reações bioatalíticas metodologias descritas na literatura foram utilizadas(KAMAL; KHANNA; RAMU, 2002),(JOUBRAN et al., 2003).

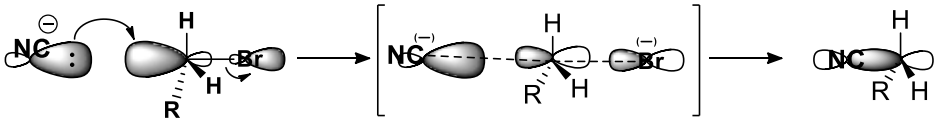
Na reação, o reagente de partida 2-Bromo Acetofenona **51** pôde ser convertido em Cetonitrila pela substituição nucleofílica do bromo pelo cianeto presente no sal (NaCN) levando ao composto **52** (Esquema 36).

Esquema 36 - Reação de obtenção da cetonitrila 52



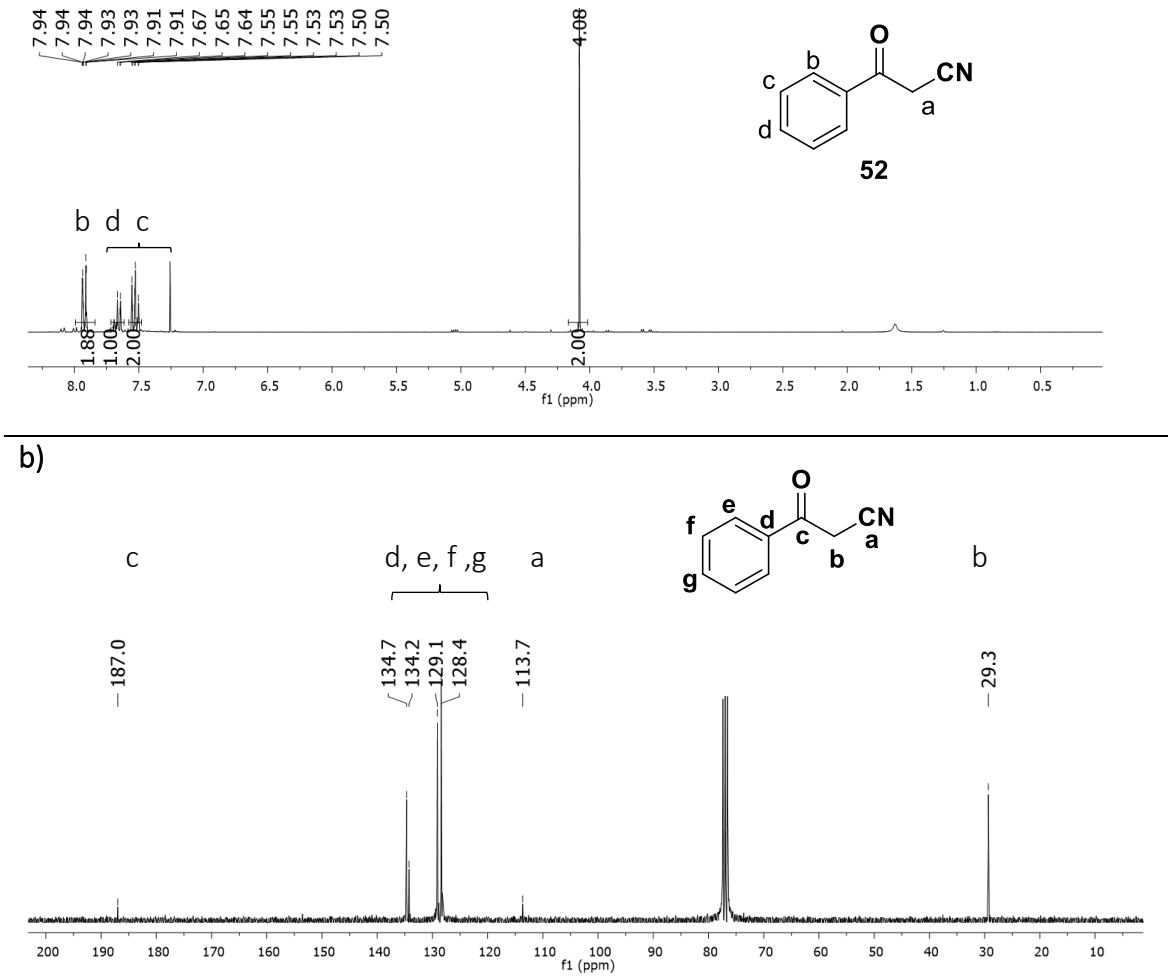
A síntese por essa metodologia apresenta como vantagem altos rendimentos e a ausência de processos de purificação. Trata-se de uma reação S_N2 pois temos um carbono primário diretamente ligado a um bom grupo de saída (Br^-), e o cianeto como nucleófilo livre em solução (Esquema 37).

Esquema 37 - Mecanismo do estado de transição SN2 para obtenção da cetonitrila 52



A caracterização do produto **52** por técnica de RMN está apresentada na figura abaixo No espectro de ^1H há o singleto com integral para 2H em δ4,08 e a região aromática (δ7,50-7,94) (Figura 42, a)). Já no espectro de ^{13}C aparece os picos em δ113,7 referente ao carbono da nitrila, δ29,3 ao carbono α CH_2, a região aromática, e por fim a carbonila em δ187,0 (Figura 42, b)).

Figura 42 - Espectro de RMN do composto 52; a) Espectro de 1H; b) Espectro de 13C



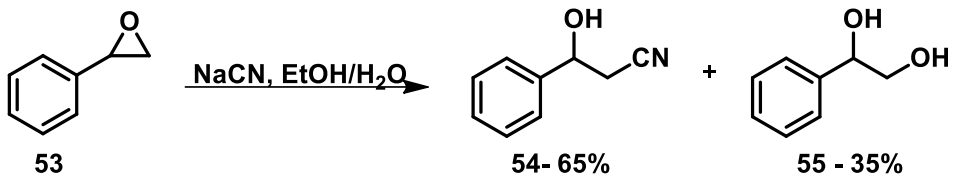
Fonte: Auotora (2020)

Para obtenção da β-hidroxintrila, ao invés do álcool de ser obtido a partir da redução da cetona **52**, optou-se por realizar a abertura de epóxido na presença de cianeto de sódio em solução alcoólica de etanol. A escolha foi baseada devido a economia em uma etapa sintética para obtenção dos precursores racêmicos.

Epóxidos são éteres cíclicos, com anéis de três membros, mais reativos que os demais éteres devido à instabilidade ocasionada pela tensão do anel. São comumente utilizados em

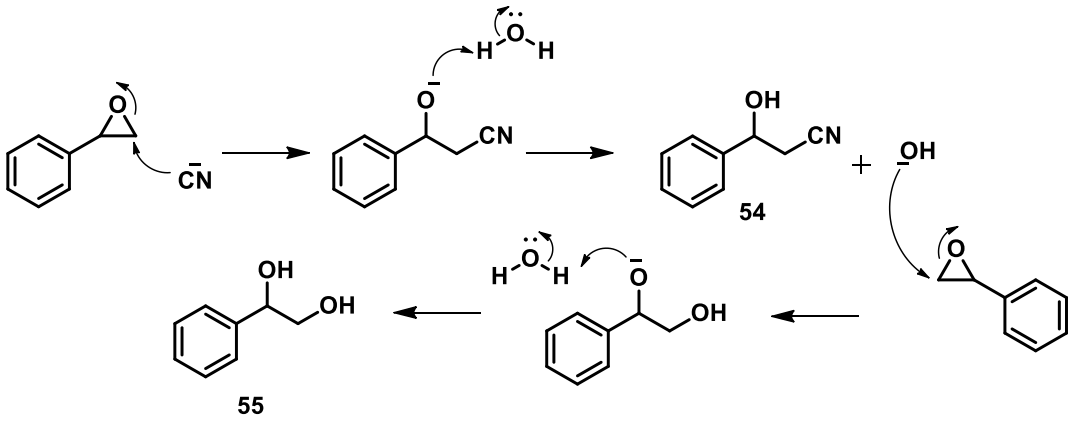
síntese por apresentaram reações S_N2 regioseletivas. Dessa maneira, utilizou-se óxido de estireno **53** na presença de cianeto de sódio como base, em meio alcóolico (Esquema 38).

Esquema 38 - Reação de abertura de epóxido para formação de β-hidroxinitrilas



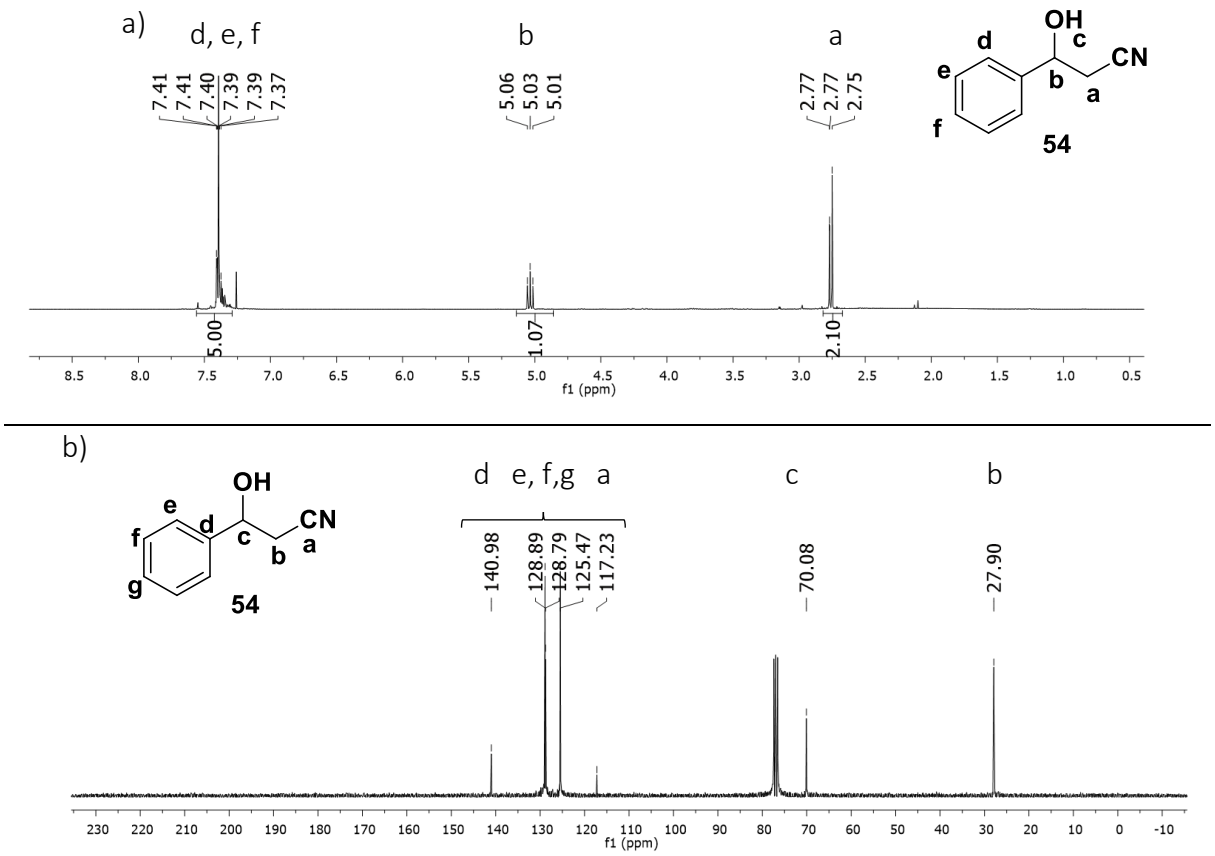
Nessa reação foi obtido como subproduto o diol **55** como reação competitiva, uma vez que no meio há a presença de íons hidroxilas oriundas da água (Esquema 39).

Esquema 39 - Mecanismo da abertura de epóxido e formação da β-hidroxinitrila 55



A caracterização foi feita por RMN e GC-MS. No espectro de RMN de ^1H é possível observar um sinal dupleto em δ2,77 referente aos hidrogênios α vizinhos a nitrila e um tripleto em δ5,05 referente ao hidrogênio do carbono carbinólico (Figura 43, a)). Já o espectro de RMN de ^{13}C observa o sinal em δ27,9 referente ao carbono secundário, em δ70,1 o carbinólico e em δ117,2 o carbono da nitrila, característico da região entre δ110-130 ppm e de baixa intensidade (Figura 43, b)).

Figura 43 - Espectros de RMN da β-hidroxinitrila 59; a) Espectro de 1H; b) Espectro de 13C

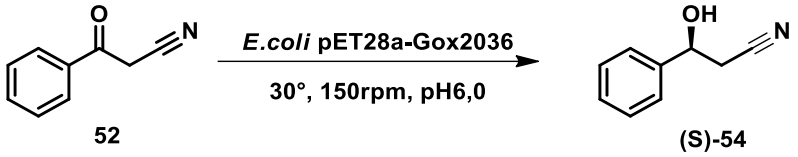


Fonte: Auotora (2020)

Após a obtenção dos padrões 52 e 54, foi realizada a reação de biocatálise com a enzima via DNA recombinante, previamente descrita no capitulo 1, para a benzoacetonitrila **52**. Os resultados mostraram conversão para o enantiomero (*S*)-54, em 24h de reação, ilustrando dessa maneira, uma metodologia biocatalitica promissora para obtenção do álcool quiral (*S*)-3-hidroxi-3-fenilpropanaminonitrila

Este pode ser usado como bloco de construção para a síntese do antidepressivo fluoxetina (Esquema 40), com mais 3 etapas na rota sintética, primeiro por redução da nitrila para amina, seguida de alquilação, e por fim esterificação do álcool.

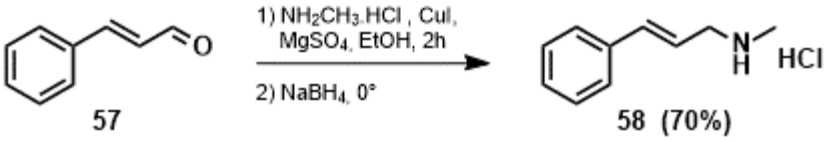
Esquema 40 - Reação de oxidoredução da benzonitrila 52 com a enzima carbonil redutase recombinante pet28a/Gox2036



Como rota sintética alternativa à produção de cetoaminas, a oxifuncionalização de olefinas apresentou-se como uma alternativa A oxifuncionalização trata-se de uma oxidação direta de ligações múltiplas C-C, catalisada principalmente por paládio (Pd) na presença de O_2 gasoso(MITSUDOME et al., 2006; WANG et al., 2014). Para produzir o intermediário cetoaminíco, inicialmente foi necessário obter amina conjugada à olefina.

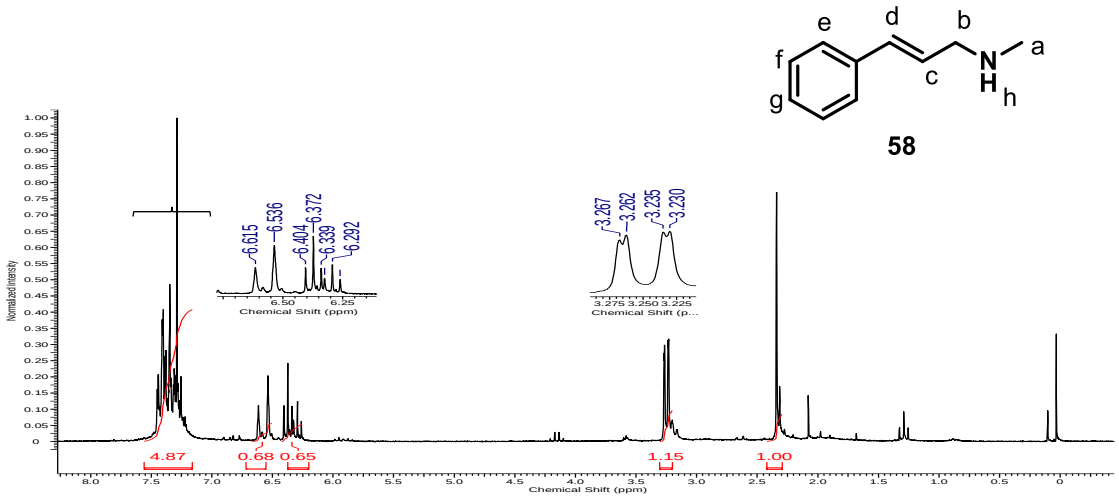
A síntese baseou-se na obtenção da amina insaturada **58** partindo do cinamaldeido **57**, levando a rendimentos de 70% (Esquema 41).

Esquema 41 - Síntese de obtenção da amina conjugada 58



Nessa reação a metilamina atua como nucleófilo à carbonila do aldeído levando a formação da imina. Por sua vez, essa imina é pouco estável, necessitando *in situ* ser reduzida com $NaBH_4$. Dessa maneira foi possível obter a olefina **58** com 60% de rendimento. Esta foi então caracterizada, via caracterização de RMN, sendo possível observar no espectro de ^1H o singleto em δ2,34 referente a metila H_a, um duplo dubleto em δ3,25 referente ao acoplamento com o H_c da olefina com J^3= 6,4Hz e J^4= 1Hz com o outro H_d da dupla ligação. Em δ6,33 há um duplo tripleto referente ao H_c acoplando J^3=16Hz trans com o H_d, e J^3=6,4Hz com o H_b. Por fim, a região aromática e o hidrogênio da amina na região de δ7,25-7,45 com integral 6 (Figura 44).

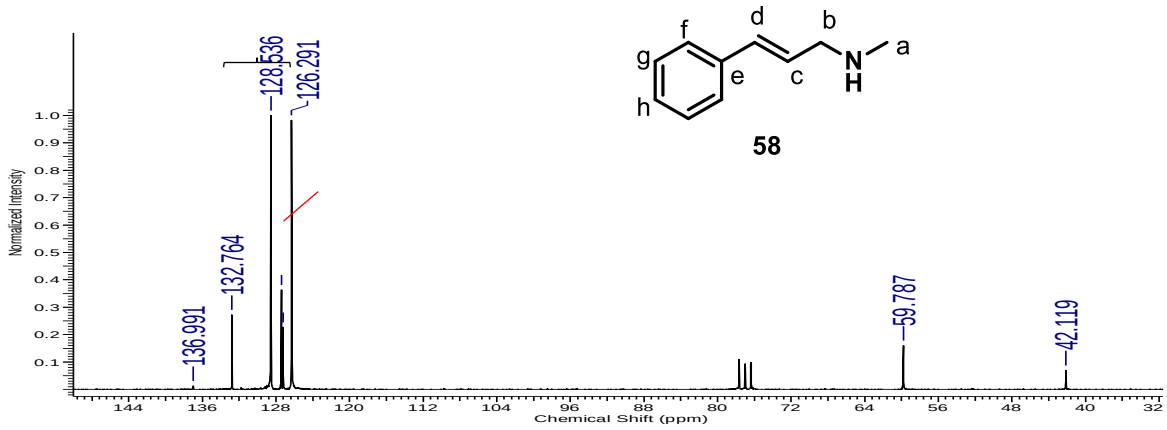
Figura 44 - Espectro de RMN de 1H da olefina 58



Fonte: Auotora (2020)

Já no espectro de RMN de ^{13}C observa-se o sinal em δ42,2 C_a referente a metila terminal, δ59,8 do carbono α á amina C_b, os carbonos da olefina C_c e C_d em δ127,2 e δ127,4,e por fim os carbonos da região aromática $C_{e,f,g,h}$ em δ126,3, δ128,5, δ132,7, δ137,0 (Figura 45).

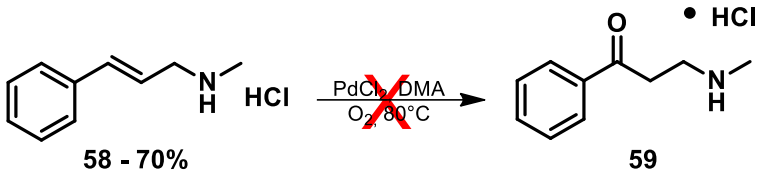
Figura 45 - Espectro de RMN de 13C da olefina 58



Fonte: Auotora (2020

Em seguida o composto **58** foi submetido a reação catalisadas por Pd na presença de oxigênio. Entretanto, não foi possível observar produtos de oxifuncionalização, necessitando assim de etapas de otimização dessas condições (Esquema 21).

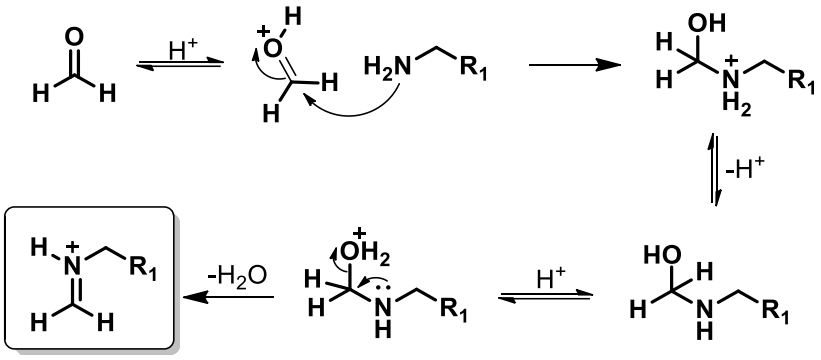
Esquema 42 - Síntese de oxifuncionalização de olefinas



Alternativamente às metodologias acima apresentadas, buscou-se outra síntese promissora para obtenção desses intermediários sintéticos. A Reação de Mannich apresenta-se um método robusto, onde ocorre a introdução de um grupamento amino na posição α à carbonila, sendo também reações multicomponentes que permitem o acoplamento de dois ou mais compostos *in situ*(PAL; SARKAR; KHASNOBIS, 2012; SREEVALLI et al., 2014)·(LEHMANN; PILOTTI; LUTHMAN, 2003).

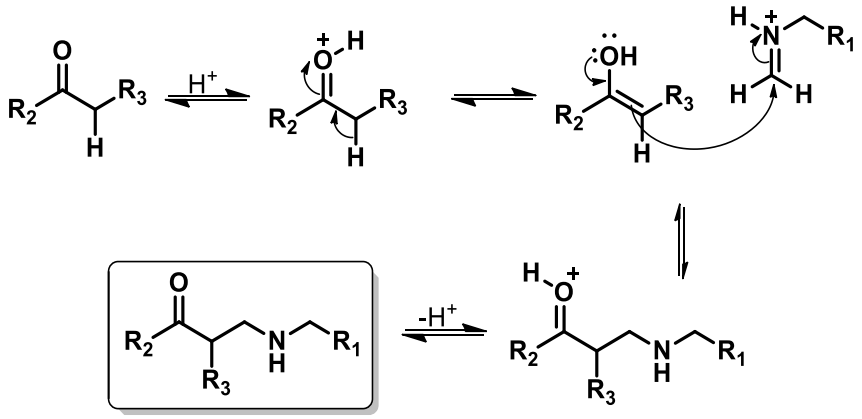
Nas reações de Mannich ocorre o acoplamento entre um aldeído, uma cetona e uma amina, onde há inicialmente a formação do íon imínio pela reação nucleofílica da amina com a carbonila do aldeído. (Esquema 43).

Esquema 43 - Formação do íon imino através da reação entre aldeídos e aminas



Em seguida, a cetona contendo hidrogênio alfa, em equilíbrio com sua forma enólica, age como nucleófilo ao carbono do íon imínio, levando ao produto de adição 1,2 (Esquema 44).

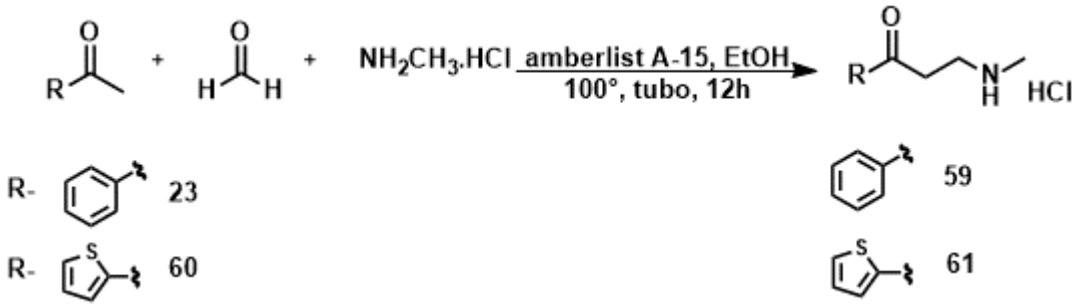
Esquema 44 - Adição nucleofíco da forma enólica à imina previamente formada



No intuito de obter o intermediário sintético das classes de antidepressivos para realizar reações de biocatálise, empregando a enzima carbonil redutase recombinante, previamente preparada, os estudos da reação de mannich foram iniciados.

Inicialmente realizou-se adaptações da metodologia, variando algumas condições experimentais. Inicialmente foi empregada a metodologia abordada por Zhang e colaboradores(HU et al., 2015), onde são reagidos a metilamina, acetofenona e o paraformaldeido na presença de catalítica quantidade de p-toluenosulfoxido (p-TsOH). Porém variamos o *p*-TSOH para amberlist-15 (Esquema 45), baseado na metodologia recentemente desenvolvida(RAMANA et al., 2015).

Esquema 45 - Reação de Mannich com amberlist



Após análise dos espetros de RMN de 1H e 13C era esperado como produto o composto **59/61**. O produto **59** obtido na reação foi submetido à análises de RMN de ^{1}H e ^{13}C, e os espectros são ilustrados nas Figuras 46 e 47, porém foi observado uma inconsistência quando os espectros eram analisados, ao compará-los ao produto esperado.

Figura 46 - Espectro de RMN de 13C do composto 59

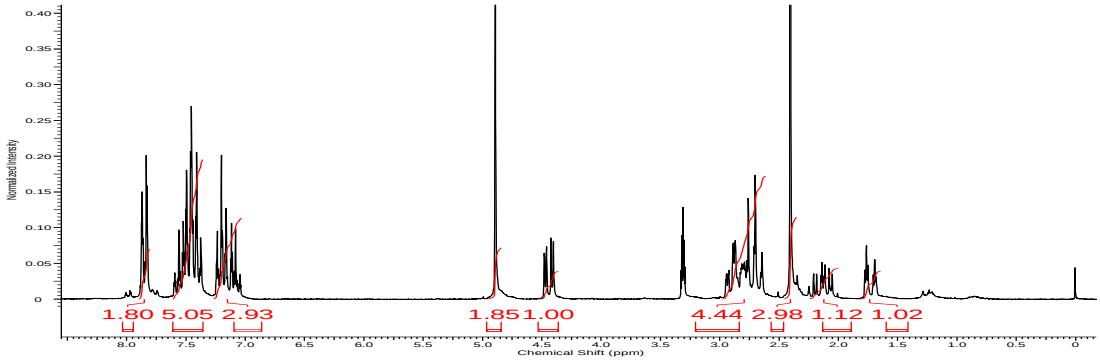
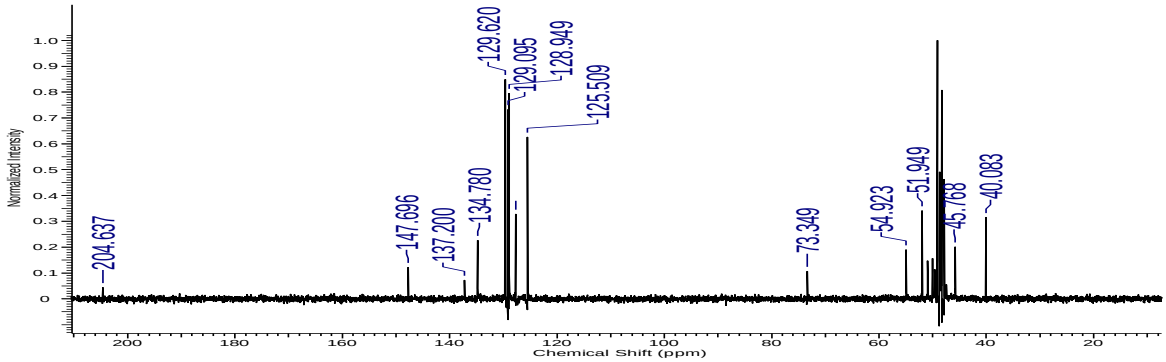


Figura 47 - Espectro de RMN de 1H do composto 59



Fonte: Auotora (2020)

Ao descobrir o produto gerado, foi possível chegar ao seguinte mecanismo (Esquema 46). Primeiramente há a formação do composto de adição do enolato a imina, levando ao cetoamina **59** (Esquema 46, 1)). Entretanto nessas condições o enolato da acetofenona age como eletrófilo na carbonila do aldeído, levando a enona **62** (Esquema 46, 2)). Por sua vez, no decorrer do tempo reacional, abmos reagentes formados reagem entre si através da adição 1,4 da amina ao alqueno da enona, levando ao produto **64** (Esquema 46, 3)).

Para obtenção do precursor dos antidepressivos fluoxetina, duloxetina e tomoxetina, propusemos inicialmente reações de hidroaminação utilizando catalisadores metálicos. Os catalisadores metálicos nessas reações são necessários pois eles contornam a alta barreira de ativação da reação causada pela repulsão eletrônica entre os dois parceiros (tripla ligação dos acetilênicos e nitrogênio das aminas).

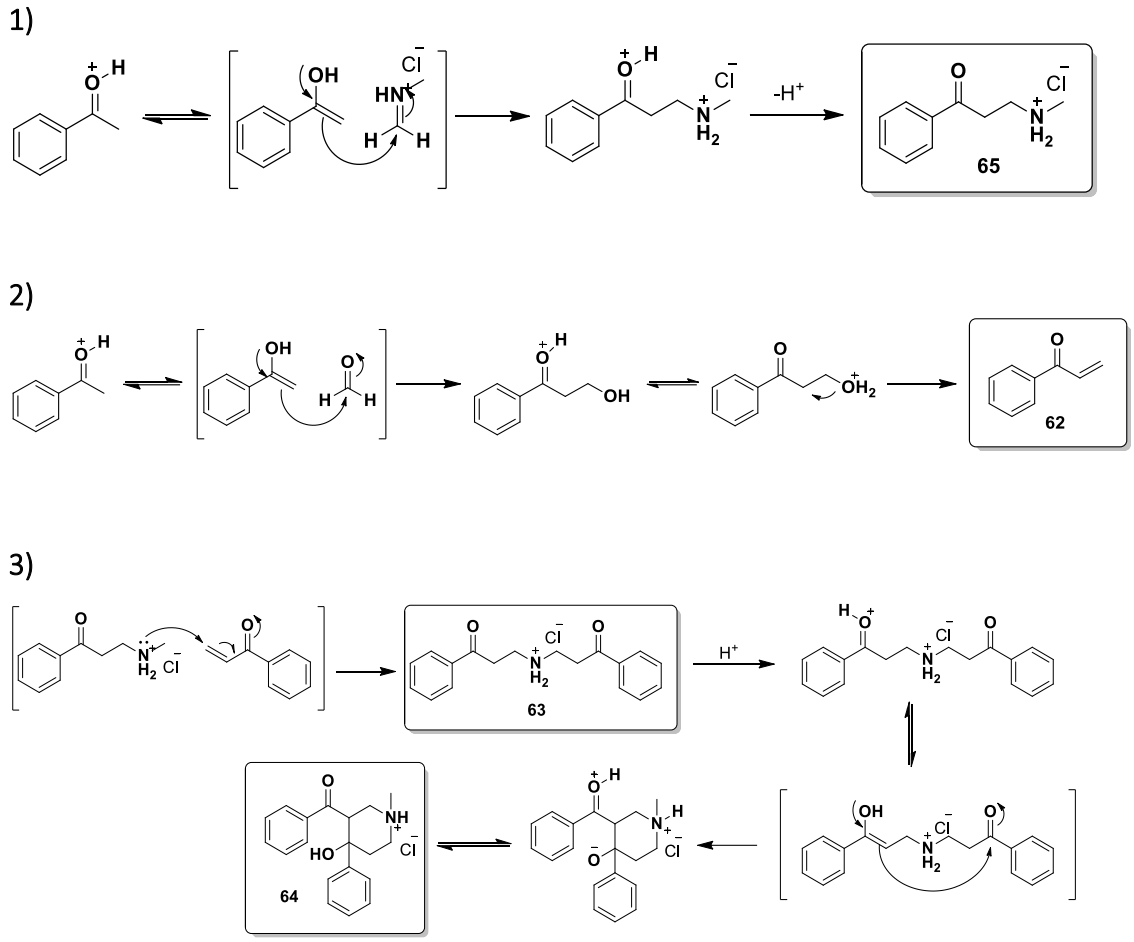
Uma característica comum dos metais ácidos de Lewis, é a ativação eletrônica em relação ao ataque nucleofílico pela coordenação π da ligação tripla carbono-carbono ao metal.

Da mesma forma, catalisadores básicos dos grupos da família 1-5, fornecem a reatividade desencadeada primeiramente pela desprotonação da amina por um catalisador fortemente básico, levando à formação de um complexo reativo metal-amido(LEPORI; HANNEDOUCHE, 2017). Dessa maneira, as metodologias empregadas com Zn Fe e Cu, interagem diferentemente com sistemas conjugados, o que desencadeia uma somatória de mecanismos e possibilidades de obtenção de compostos acoplados.

Ainda que promissoras as hidroaminações, por permitirem através de uma reação *one pot* obter o bloco de construção principal, elas demostraram ser ainda limitadas, quando se utiliza álcoois propargílicos como intermediários. Com as cetonas α-β conjugadas esse problema é suprido pois a conjugação torna o sistema menos energético e consequentemente mais favorável. As metodologias alternativas utilizando Zn e Fe, para obtenção dos percussores antidepressivos, testados até o presente momento, nos levaram a catalisadores com Zn serem os mais indicados para hidroxiaminação de ligações triplas, levando a produtos de hidroaminação anti-Markovnikov.

Uma metodologia alternativa buscada para obtenção das hidroxiaminas foi através de nitrilas. Por serem metodologia vastamente encontradas, e com bons rendimentos, a proposta sintética quando somada a bioredução por enzimas carbonil redutases recombinantes, demonstrou ser promissora para obtenção desse bloco de construção.

Esquema 46 - Mecanismo dos produtos formados na reação de Mannich; 1) Formação da cetoamina 65;2) Formação da enona 62; 3) Formação do produto de adição 1,4 ao enolato 62



Outra metodologia que foi utilizada para o desenvolveminto e obtenção de cetoaminas foi através da oxifuncionalização de olefinas, conhecida como oxidação de Tsuji-Wacker. Ela é uma das reações mais importantes que tem extensas aplicações sintéticas em laboratórios e indústrias e é catalisada por paládio. Os principais contratempos encontradaos nessasmetologias são decomposição de paládio, isomerização de olefina subprodutos clorados, entre outros.

Dessa maneira, ainda que a primeira etapa, de obtenção da enamina apresentasse alto rendimento e fosse de fácil reprodução, a etapa de oxifuncionalização não foi satisfatória, necessitando dados experimentais e mudanças nos parâmetros reacionais para que fosse promissora a metodologia.

Por fim, como metodologia para obtenção de cetoaminas, temos as metodologias de Mannich. Ainda que sejam altamente difundidas para acoplamento A3, quando empregado sais de aminas primárias, tornam a metodologia menos eficaz, o que torna uma etapa da reação menos energética e mais reativa, entretando a segunda mais lenta. Dessa maneira subprodutos de reação apresentam maiores rendimentos do que o produto cetoaminico.

Dessa maneira, pode-se aferir que as metodologias propostas ainda se tornam limitadas para serem aplicadas como métodos de obtenção dos intermediaros hidroaminicos e cetoaminicos propostos, necessitando de outras condições reacionais.

As reações de hidroaminação mostraram-se regiosseletivas, levando a formação do produto anti-markovinikov, de forma majoritária. No entanto, os álcoois ainda necessitam de um estudo mais detalhado, além de um aprimoramento das condições reacionais.

Ainda que os produtos de hidroaminação, empregando catalisador baseado em zinco, não tenham sido obtidos, indícios por GC-MS mostram que os catalisadores promoveram o acoplamento entre álcoois propargílicos.

O composto carbonilico contendo uma nitrila mostrou-se ser o mais apropriado para obtenção do álcool quiral (*S*). Um precursor direto para síntese total dos antidrepessivos derivados de hidroxiaminas.

Por fim, oxifuncionalização de olefinas, ainda que uma metodologia bastante difundida, não indicou produto de oxidação em enaminas, necessitando de alinhamento das condições reacionais.

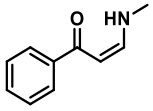
Procedimento experimental

Os procedimentos utilizados estão abaixo relacionados às tentativas de obtenção dos intermediários antidepressivos

Para a hidroaminação com sais de Zn^{2+} Inicialmente os sais de Zn (0,75 mmol) foram solubilizados em THF sob atmosfera de N_2. A amina (1,95mmol) e o alquino (1,5mmol) são adicionados nesta solução. A solução foi mantida sob aquecimento (90°C) por ate 24h. Ao término, remover o solvente e colunar com AcOEt/DCM (20:1).

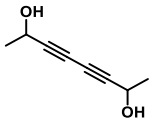
Oxido de alumínio (Al_2O_3) foi adicionado a uma mistura de $CeCl_3.7H_2O$ (0,68g, 1,82mmol) e NaI (0,23, 1,55mmol) em acetonitrila (10mL). A mistura foi mantida sob agitação

overnight. Após a acetonitrila foi removida a vácuo. Ao sólido resultante foi adicionado os reagente de hidroaminação (1,35mmol). A solução resultante é permanecido por até 24hr a 35°C. o produto é removido por filtração em alumina usando éter como solvente. A solução é rotaevaporada e colunada com AcOEt/hexano 4:1



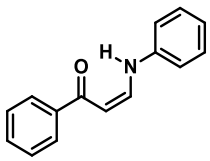
Fórmula molecular: $C_9H_8O_3$, MM: g/mol. Purificado por cromatografia com silica gel, e 10:1 Metanol/DCM como eluente. Rendimento: 80%; sólido branco amarelado **RMN** de **^{1}H**: (300 MHz, $CDCl_3$, ppm) δ 3,08 (d, J^3 = 4,5Hz, 3H), δ5,7 (J^3 = 7,0Hz, 1H), δ6,92 (dd, J^3 =7,0, J^3 = 12,9), δ7,40-7,47 (m, 3H), δ7,84-7,88 (m,2H), δ10,21 (s, 1H). **RMN** de **^{13}C**: (300 MHz, $CDCl_3$, ppm) δ35,4, δ90,3, δ127,0, δ128,2, δ130,8, δ139,8, δ155,4, δ189,9.

Na hidroaminação com sais de cobre (Cu^{2+}), inicialmente mistura-se o catalisador de Cobre (0,025mmol), TEMPO (4mg, 0,025mmoL), o alquino (1,25mmol), piridina (1mmol) em tolueno sob atmosfera de O_2 (1atm). A mistura reacional é agitada sob temperatura de 60°C por até 18hr. Após resfriamento a temperatura ambiente, a mistura foi concentrada e purificada por cromatografia com Hexano/AcOEt4:1.



Fórmula molecular: $C_8H_{10}O_2$, MM: g/mol. Purificado por cromatografia com silica gel, e 4:1 hexano/acetato como eluente. Rendimento: 95%; óleo branco amarelado. **RMN** de **^{1}H**: (300 MHz, $CDCl_3$, ppm) δ1,29 (d, J^3 = 7,2Hz, 3H), δ4,48 (q, J^3 = 7,2Hz, 1H), δ5,54 (d, J^3 = 5,7, 1H).**RMN** de **^{13}C**: (300 MHz, $CDCl_3$, ppm): δ24,1, δ56,6, δ66,5, δ83,0.

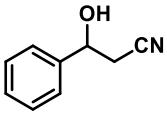
Nas hidroaminações om sais de Fe^{3+}, em tolueno foi adicionado a cetona (0,5mmol), seguida da adição de anilina (1mmol), $FeCl_3$ seco (10mol%). A reação permaneceu sob aquecimento 80°C por 1h. Ao término, a solução é filtrada em sílica, o solvente é removido por rotaevaporador. O composto é purificado com AcOEt/hex 6:1.



Fórmula molecular – $C_9H_8O_3$. MM: de **^{1}H**: (400 MHz, $CDCl_3$, ppm) □ ppm 6.04 (d, *J*=7.83 Hz, 1 H), 7.07 - 7.10 (m, 2 H), 7.11 - 7.15 (m, 2 H), 7.33 - 7.39 (m, 1 H), 7.44 - 7.46 (m,

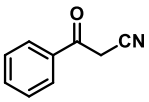
2 H), 7.46 - 7.49 (m, 2 H), 7.50 (t, *J*=1.57 Hz, 1 H), 7.51 - 7.54 (m, 1 H), 7.56 (d, *J*=7.83 Hz, 1 H), 7.93 - 7.97 (m, 2 H). **RMN** de **^{13}C**: (400 MHz, $CDCl_3$, ppm)

Para a síntese dos compostos nitrílicos foram necessários a síntese da hidroxiamina e da cetonitrila. Essas metodologias já estão descritas na literatura**.** Em uma solução contendo o óxido de estireno (1g, 50mmol) em etanol (50ml) é adiocionado água (150mL). Após agitação por 5 min é adicionado o cianeto de sódio (3,5g, 75mmol), seguido de agitação overnight sob temperatura ambiente. Ao término, soluçao é concentrada a 25% do volume. A soluçao resultant é extraida 3x com acetate de etila. (3x30mL), lavado com soluçao salina, e seco com $NaSO_4$ anidro. O solvente é rotaevaporado e o produto purificado com hexane/acetate de etila 4:1. Rendimento 35%



FM – C_9H_9NO. **CAS** –. **RMN** de **^{1}H**: (300 MHz, $CDCl_3$, ppm) δ2,77 (d, J^3 =7,2Hz, 2H), δ5,05 (t, J^3 = 7,2Hz, 1H), δ7,41-7,37 (m, 5H). **RMN** de **^{13}C**: (300 MHz, $CDCl_3$, ppm) δ27,9, δ70,1, δ117,2 δ125,5, δ128,8, δ128,9, δ141,0.

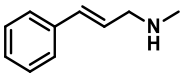
Para preparar a cetonitrila uma solução contendo NaCN (0,74g, 15,07mmol) em águas (10mL) é adicionada lentamente a uma solução de 2-Bromo acetofeona (1,00g, 5,02mmol) em Metanol, sob agitação e atmosfera inerte de N2. A mistura e deixada a temperatura ambiente por 3h. Ao término é concentrada com rotaevaporador até 1/3 do volume. Adicionar 10mL de agua seguida da adição de ácido acético até pH 3, ou até gerar precipitado ao fundo. Este precipitado é filtrado, obtendo-se um sólido amarelo. Rendimento 80%.



FM – C_9H_7NO. **CAS** –. **RMN** de **^{1}H**: (300 MHz, $CDCl_3$, ppm) δ4,08 (s, 2H), δ7,50- 7,55 (m, 2H), δ7,69- 7,64 (m, 1H), δ7,94- 7,90 (m, 2H) **RMN** de **^{13}C**: (300 MHz, $CDCl_3$, ppm) δ29,3, δ113,7, δ128,4, δ129,1 δ134,2, δ134,7 δ187,0.

Por fim as metotodologias de oxifuncionalizacao e manich são descritas como: Em um tubo selado são adicionados o aldeído (1mmol) e a amina (1,5mmol) em 4mL de etanol, contendo $MgSO_4$ (1mmol) e CuI 10mol%. A reação é permanecida até 10hr. Em seguida adiciona-se $NaBH_4$ 0,4mmol, permanecendo por mais 2h. Ao término adicionar NaCl aquoso.

Extrair com AcOEt, secar com $NaSO_4$ e rotaevaporar. O produto é purificado com AcOEt/dicloro 10:1.



FM – $C_9H_8O_3$. **CAS** –. **RMN** de **^{1}H**: (200 MHz, $CDCl_3$, ppm) δ 2,34(s, 1H), δ3,25 (dd, J^3 = 6,4Hz, J^4 = 1Hz, 2H), δ6,34 (dt, J^3 = 16Hz, J^3 = 6,4Hz, 1H), δ6,58 (d, J^3 = 16Hz, 1H), δ7,,25-7,45 (m, 5H). **RMN** de **^{13}C**: (200 MHz, $CDCl_3$, ppm): δ42,1, δ59,8, δ126,3, δ127,2, δ127,4, δ128,5, δ132,8, δ140,0

Uma mistura de acetofenona (1mmol), metilamina hidroclorada (1,1mmol), polímero de paraformaldeido (1,4mmol) e p-TsOH (0,01mmol), em etanol (5mL) é aquecida em tubo de shlenk a 110° por 20h. Após resfriar a temperatura ambiente e o solvente evaporado a vácuo, o produto é purificado com DCM/Metanol (20:1).

APÊNDICE B – ESPECTROS DE RMN DE ^{1}H E ^{13}C

Fig. 1Espectro de 1H do álcool 1-fenilprop-2-in-1-ol 1a

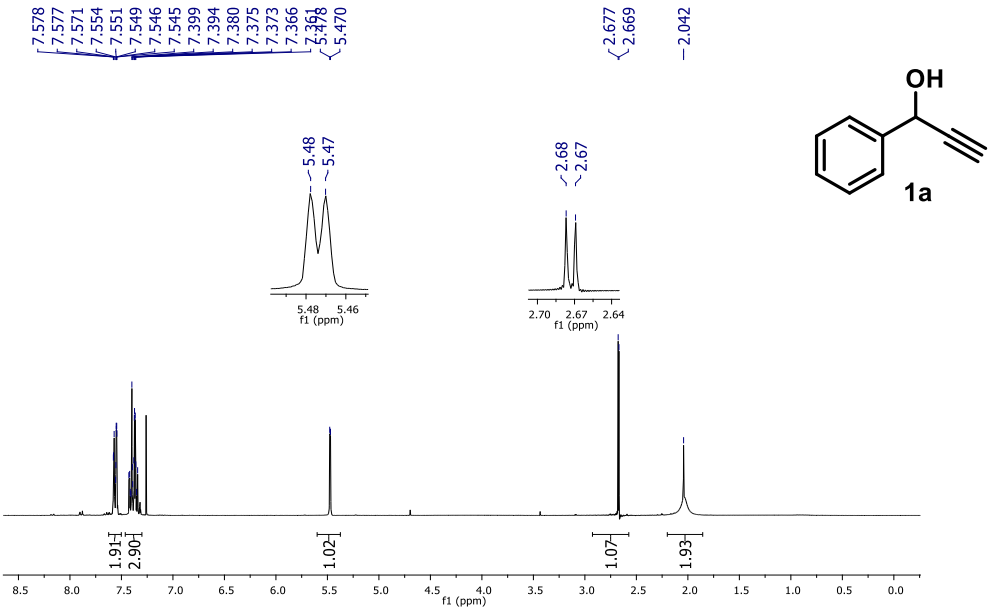


Fig. 2.Espectro RMN 13C do álcool 1-fenilprop-2-in-1-ol 1a

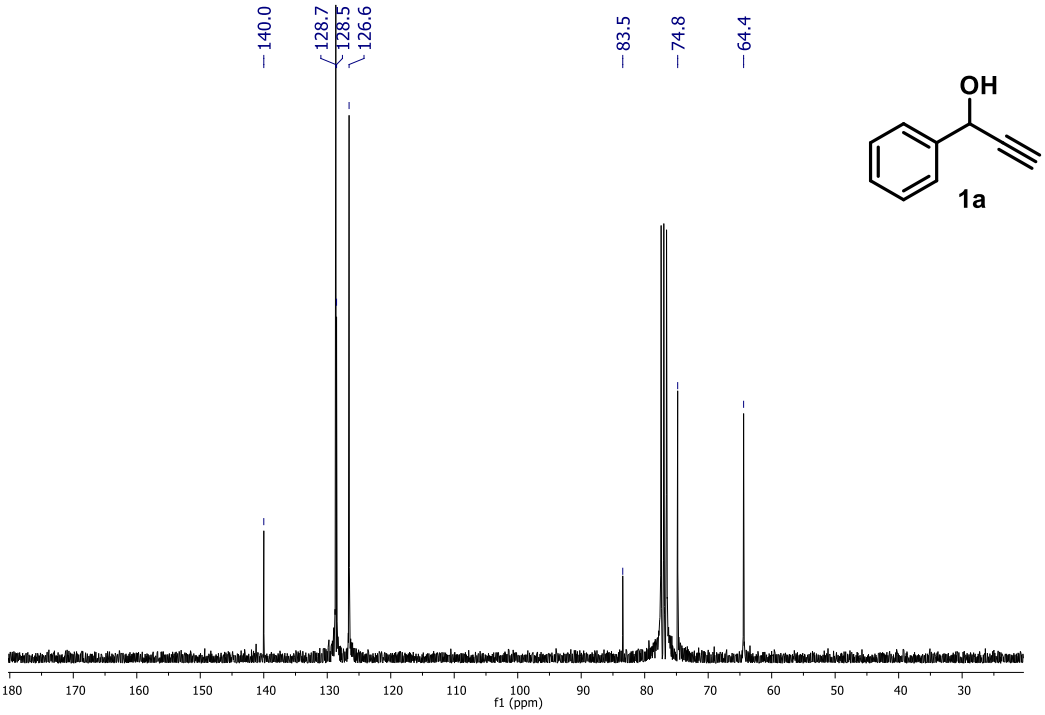


Fig. 3. Espectro de 1H do álcool 1- (o-tolil) prop-2-in-1-ol 2a

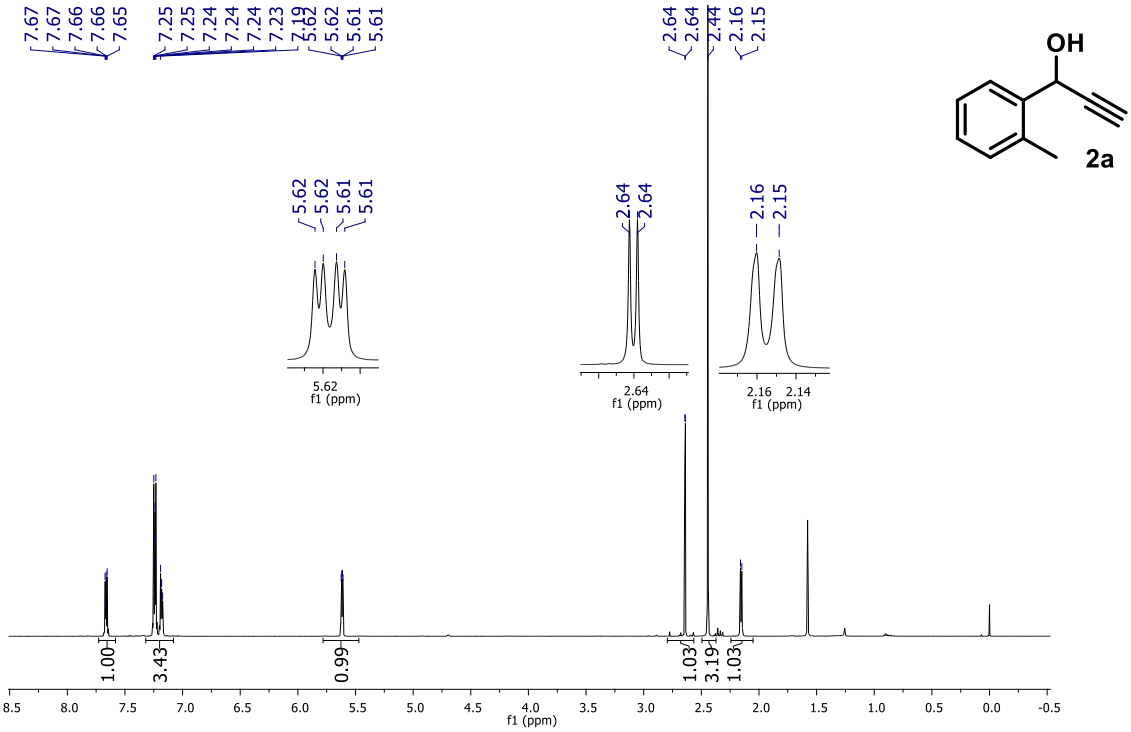


Fig. 4.. Espectro de 13C do álcool 1- (o-tolil) prop-2-in-1-ol 2a

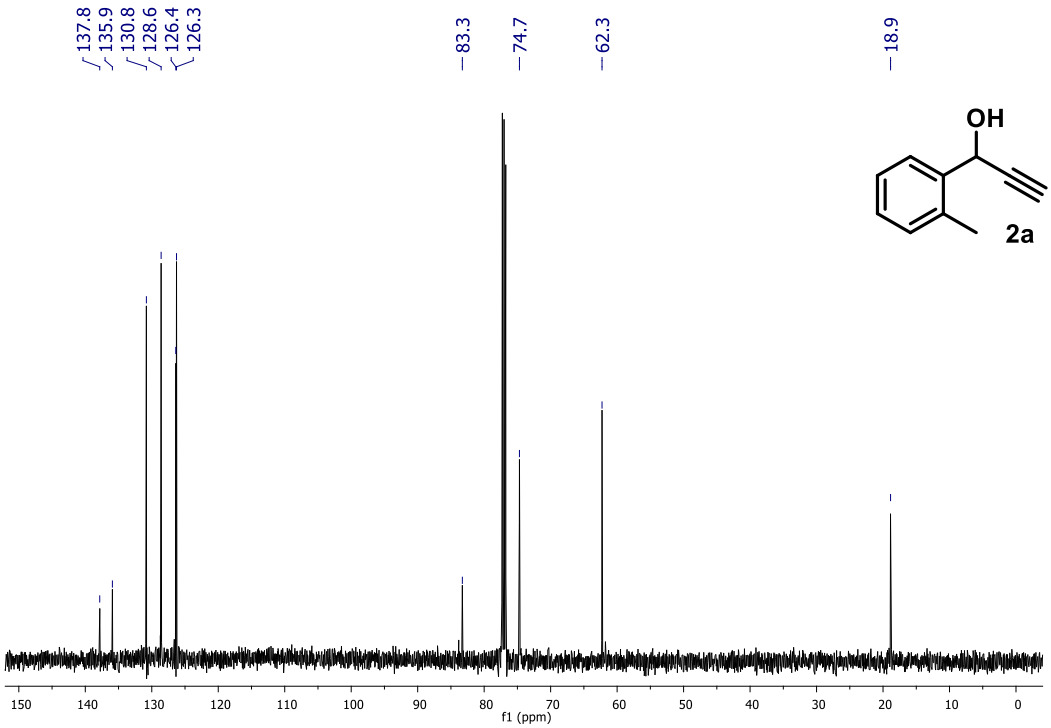


Fig. 5. Espectro de 1H do álcool 1- (m-tolil) prop-2-in-1-ol 3a

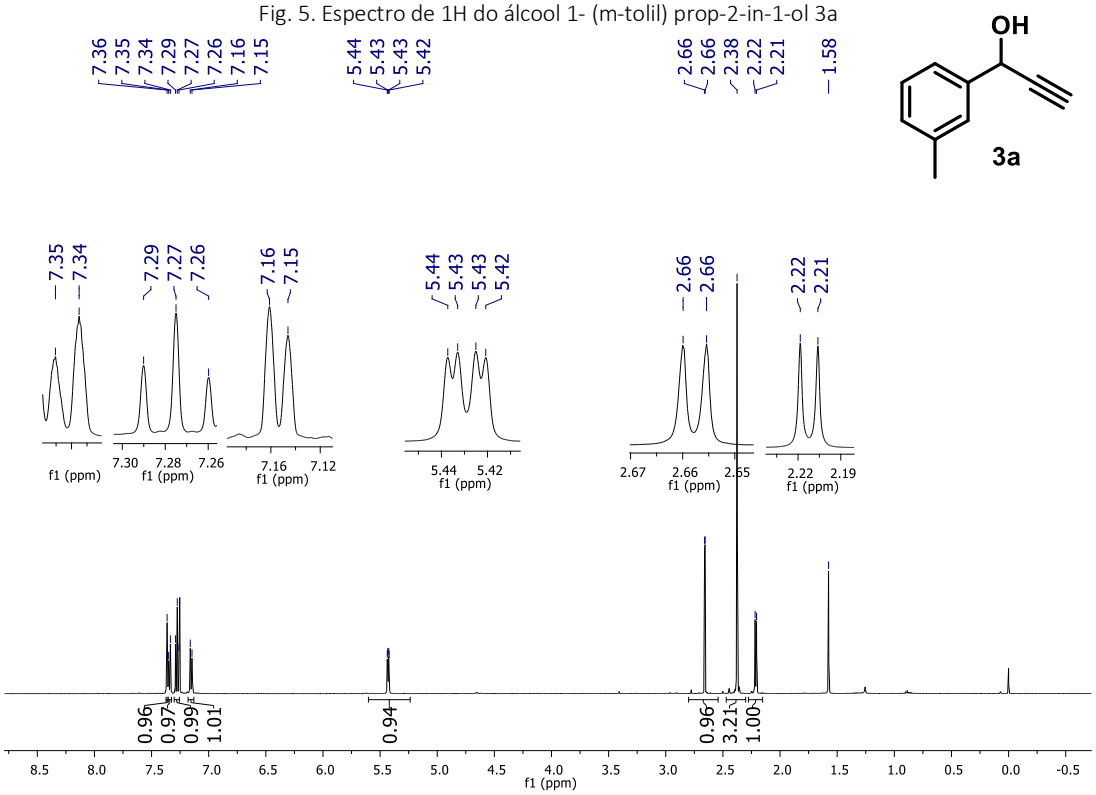


Fig. 6.Espectro de 13C do álcool 1- (m-tolil) prop-2-in-1-ol 3a

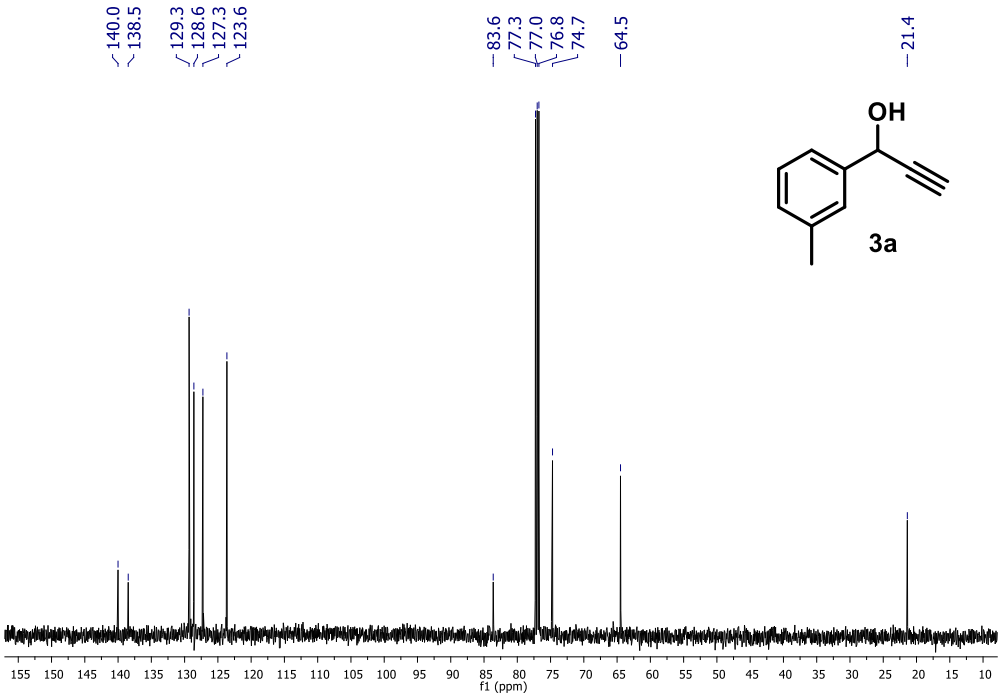


Fig. 7. Espectro de 1H do álcool 1- (p-tolil) prop-2-in-1-ol 4a

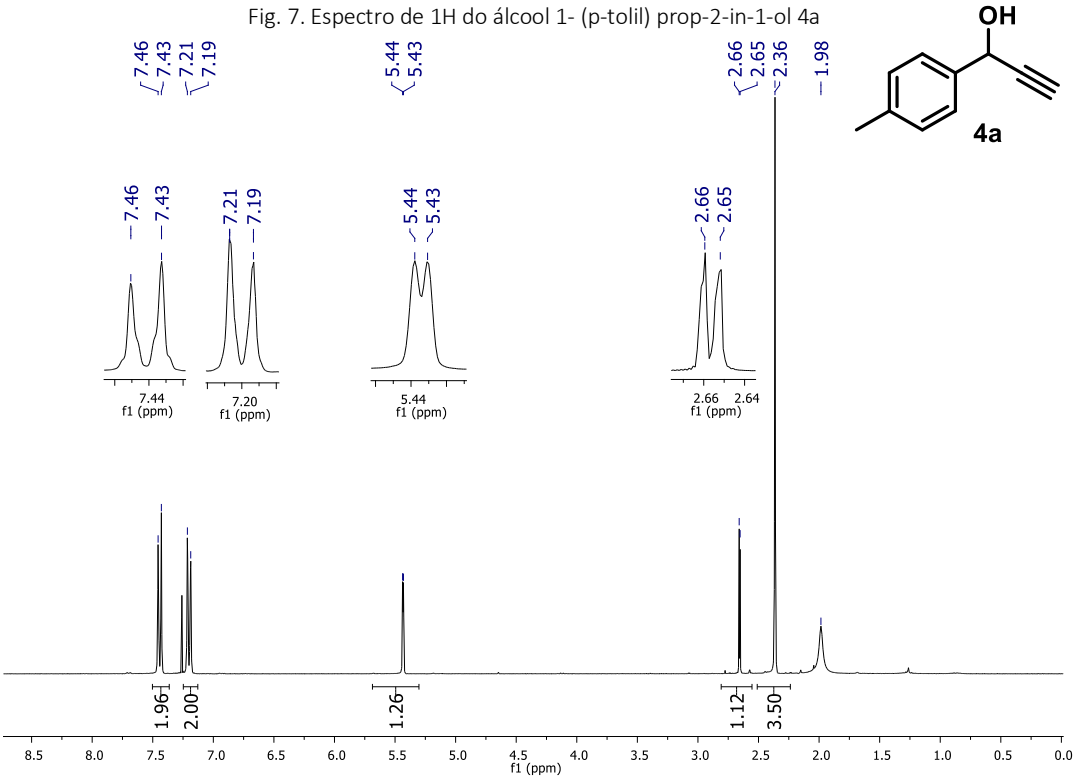


Fig. 8. Espectro de 13C do álcool 1- (p-tolil) prop-2-in-1-ol 4a

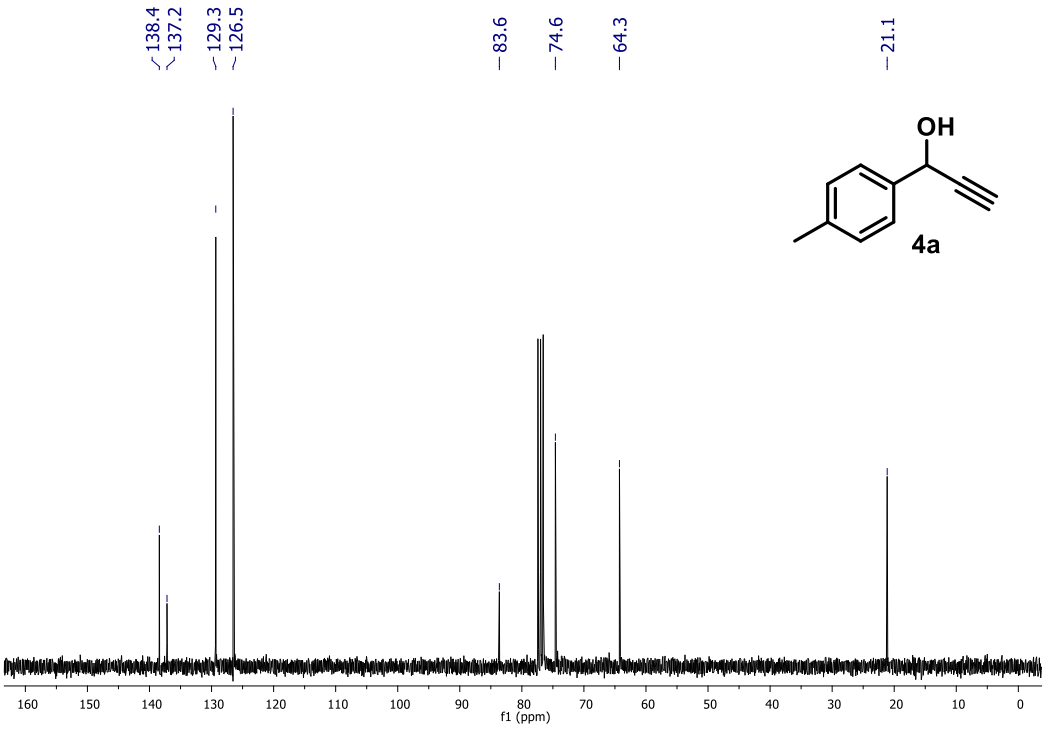


Fig. 9. Espectro de 1H do álcool 1- (2,4-dimetoxifenil) prop-2-in-1-ol 5ª

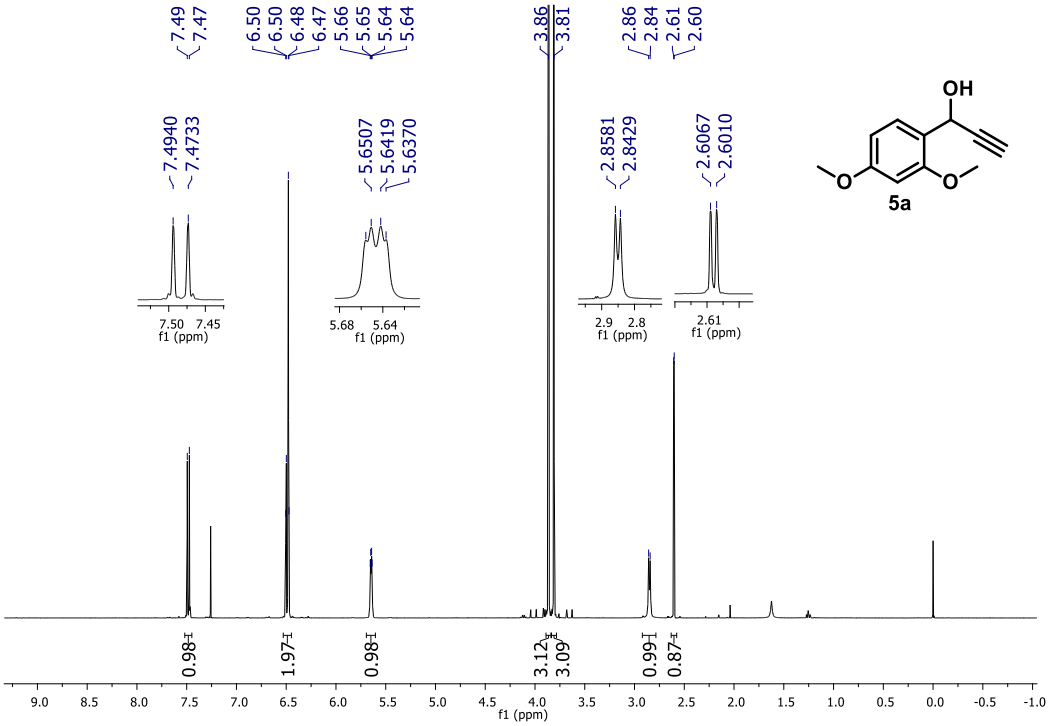


Fig. 10. Espectro de 13C do álcool 1- (2,4-dimetoxifenil) prop-2-in-1-ol 5a

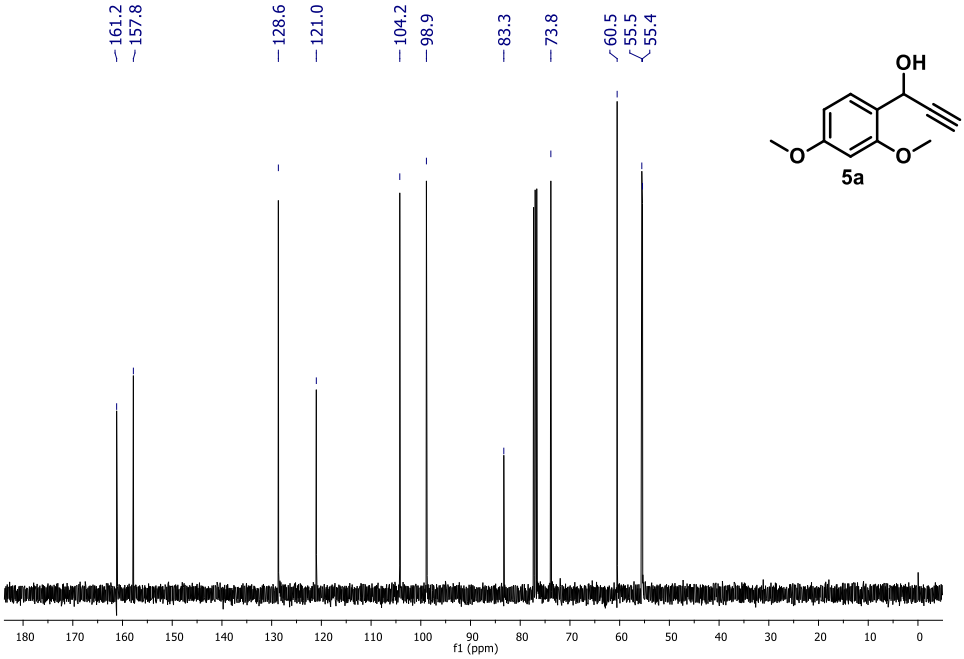


Fig. 11. Espectro de 1H do álcool 1- (2-metoxifenil) prop-2-in-1-ol 6a

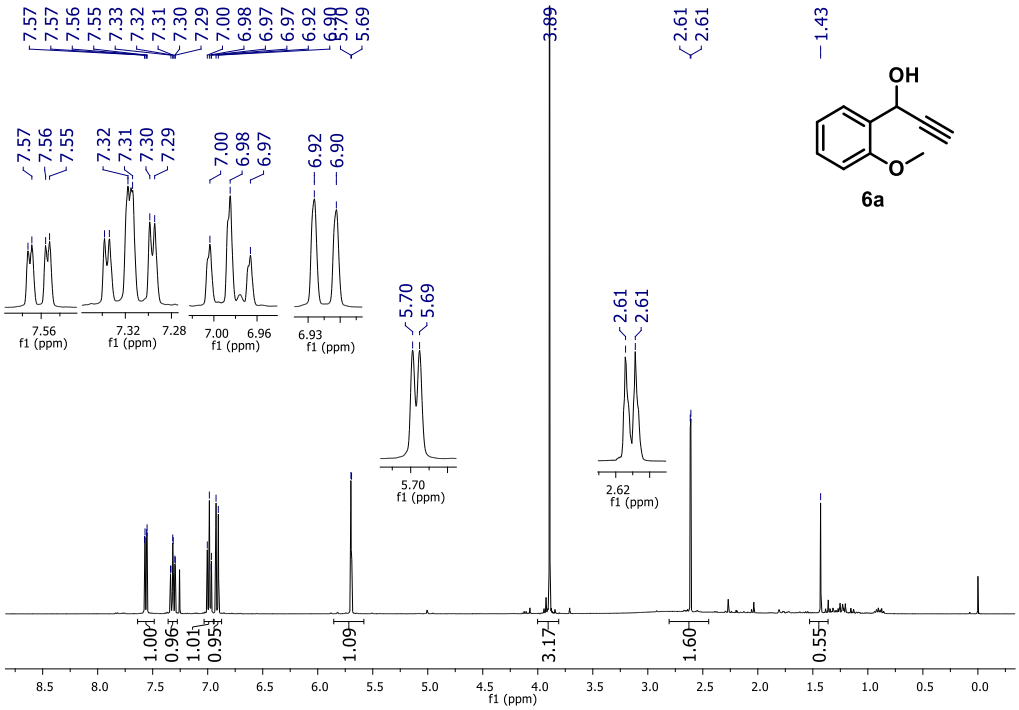


Fig. 12. Espectro de 13C do álcool 1- (2-metoxifenil) prop-2-in-1-ol 6a

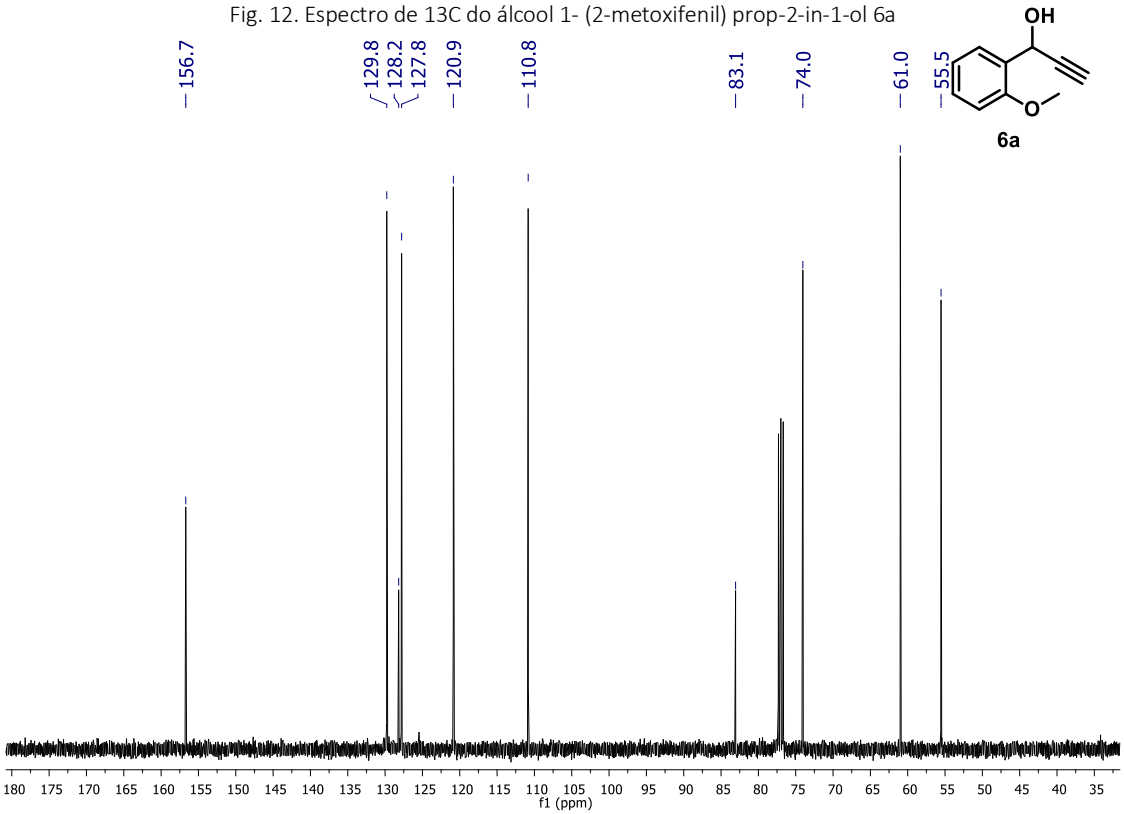


Fig. 13. Espectro de 1H do álcool 1- (4-metoxifenil) prop-2-in-1-ol 8a

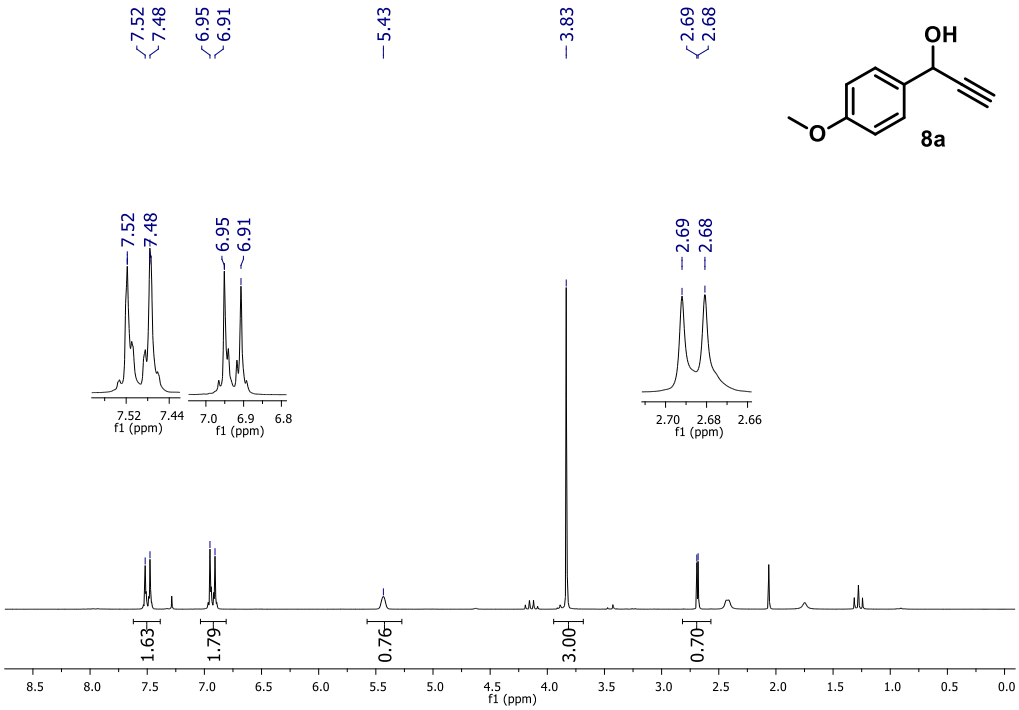


Fig. 14. Espectro de 13C do álcool 1- (4-metoxifenil) prop-2-in-1-ol 8a

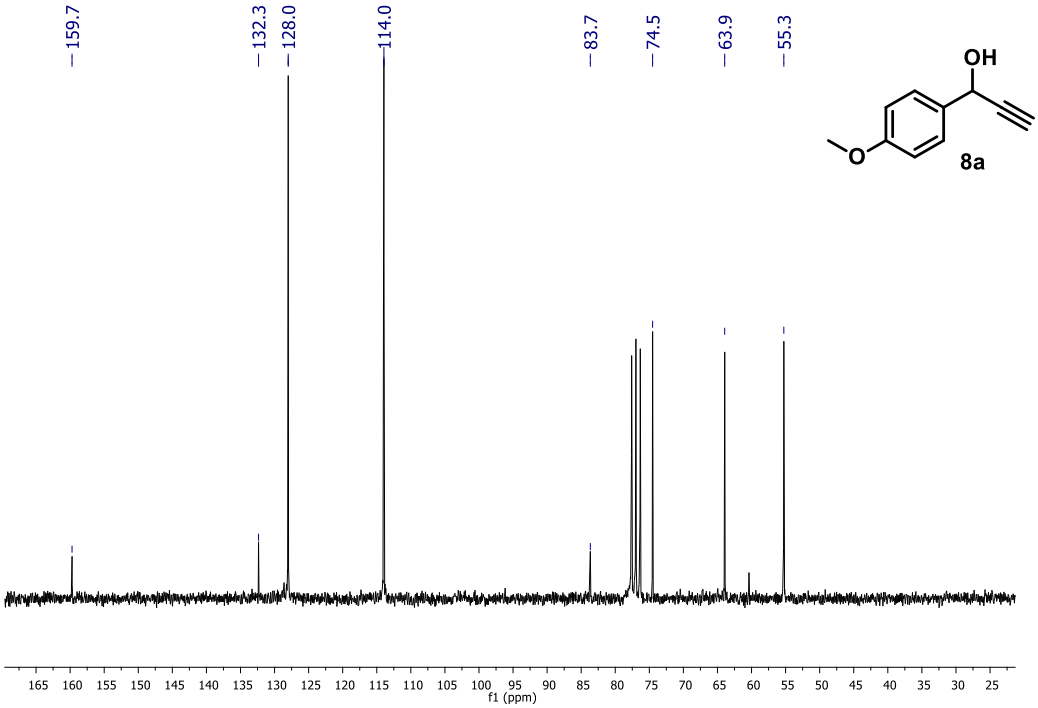


Fig. 15. Espectro de 1H do álcool 1- (3-nitrofenil) prop-2-in-1-ol 9a

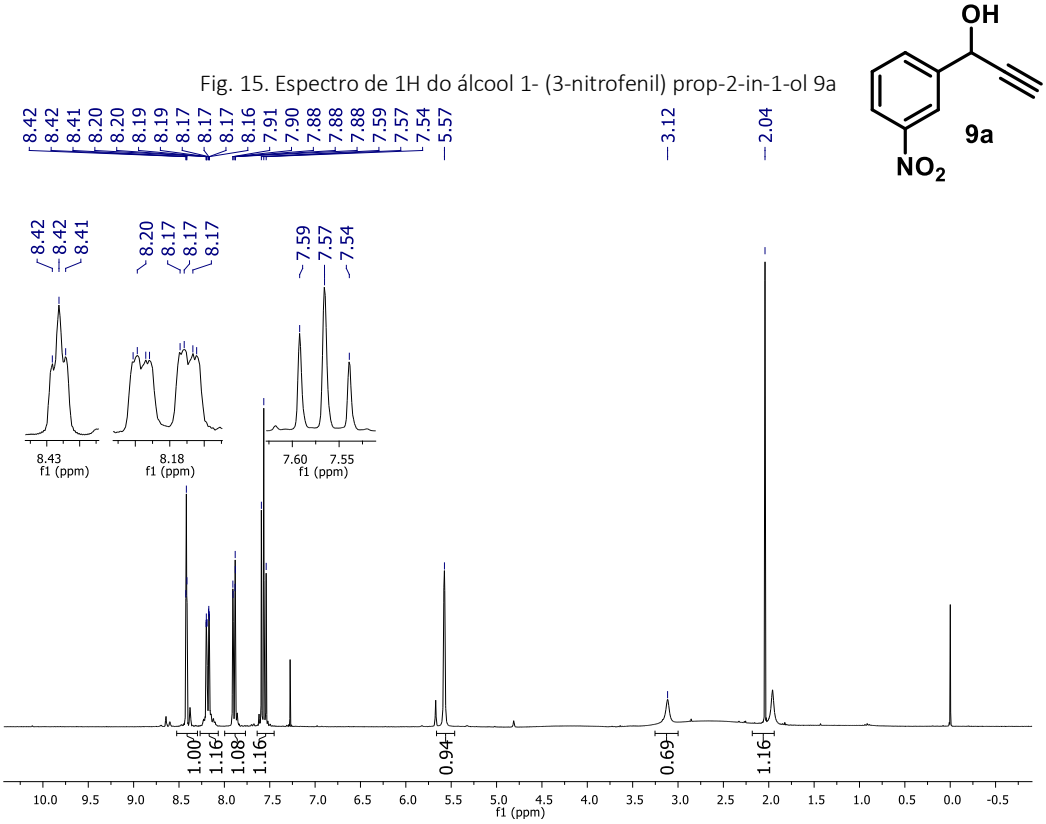


Fig. 16. Espectro de 13C do álcool 1- (3-nitrofenil) prop-2-in-1-ol 9a

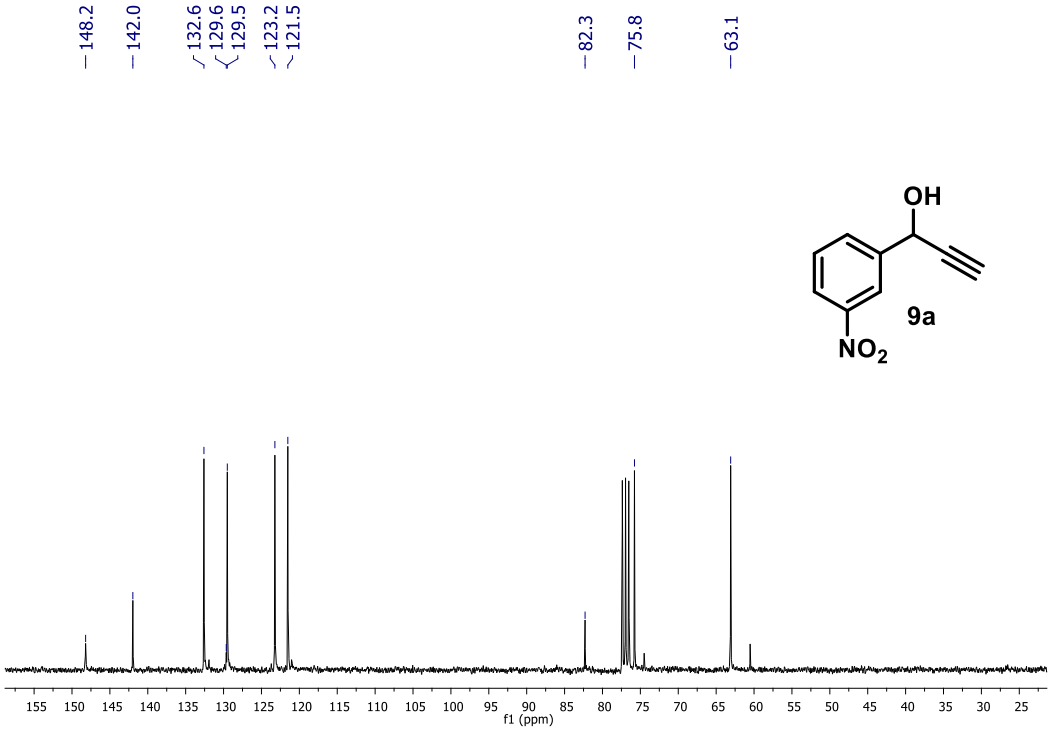


Fig. 17. Espectro de 1H do álcool 1- (naftalen-2-il) prop-2-in-1-ol 10a

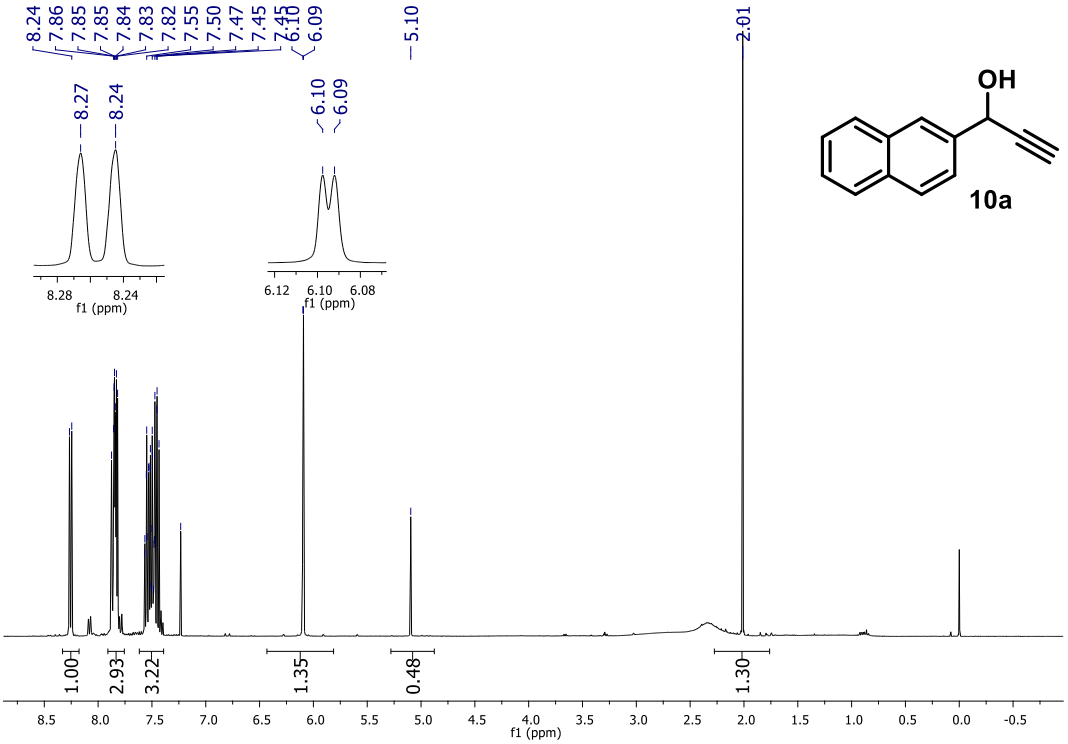


Fig. 18. Espectro de 13C do álcool 1- (naftalen-2-il) prop-2-in-1-ol 10a

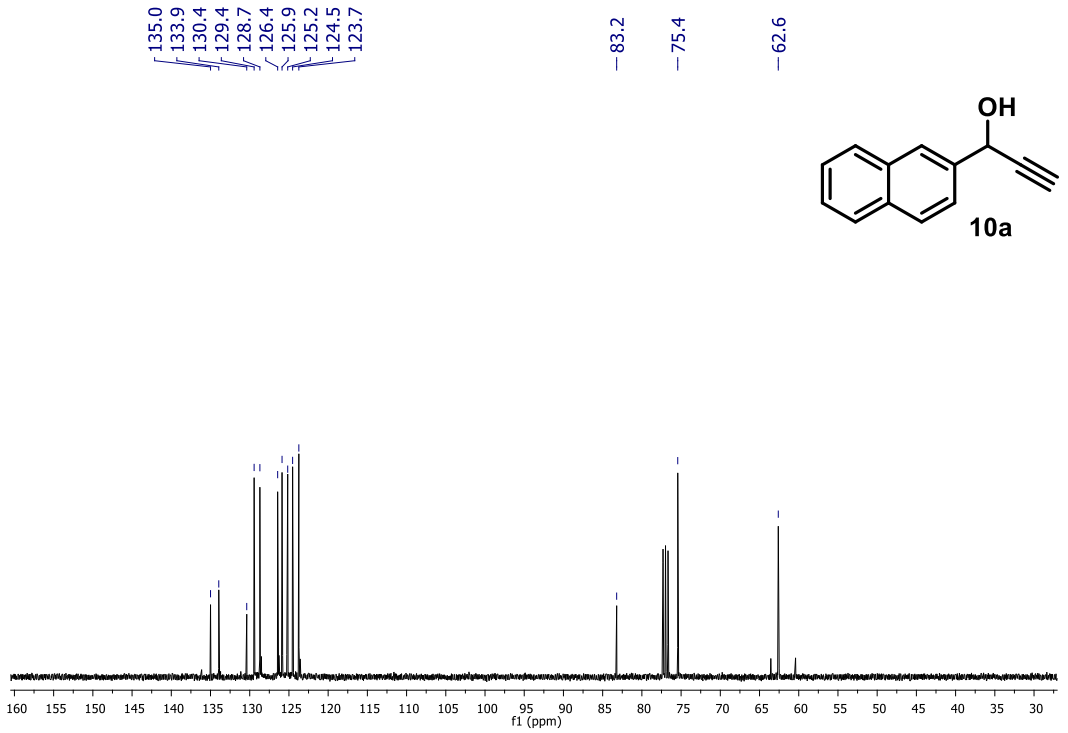


Fig. 19. Espectro de 1H do álcool 1- (furan-2-il) prop-2-in-1-ol 13a

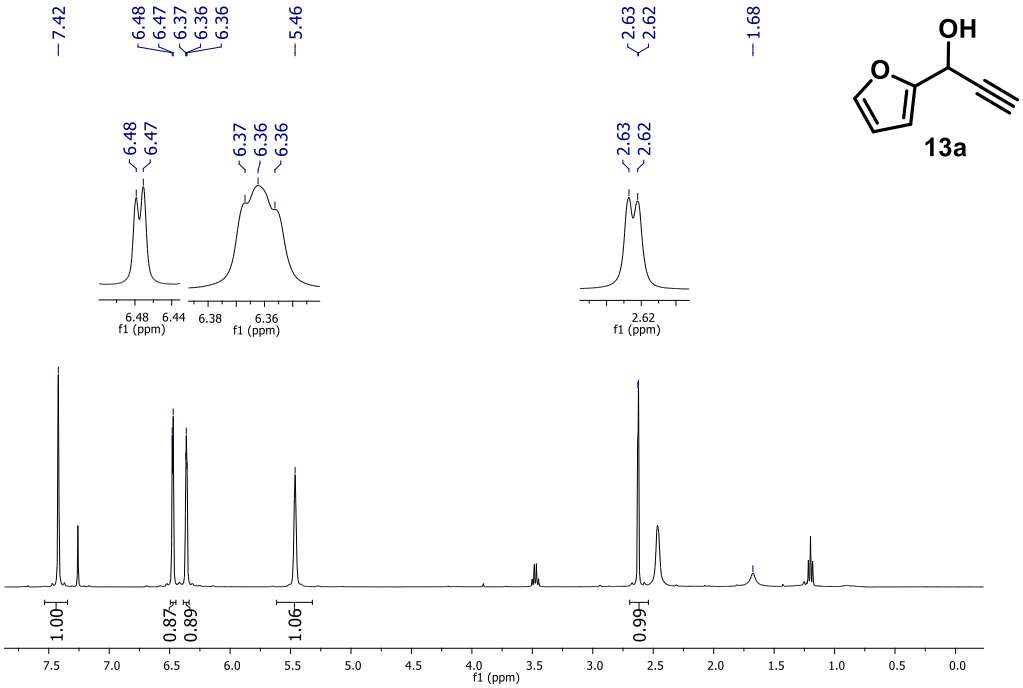


Fig. 20. Espectro de 13C do álcool 1- (furan-2-il) prop-2-in-1-ol 13a

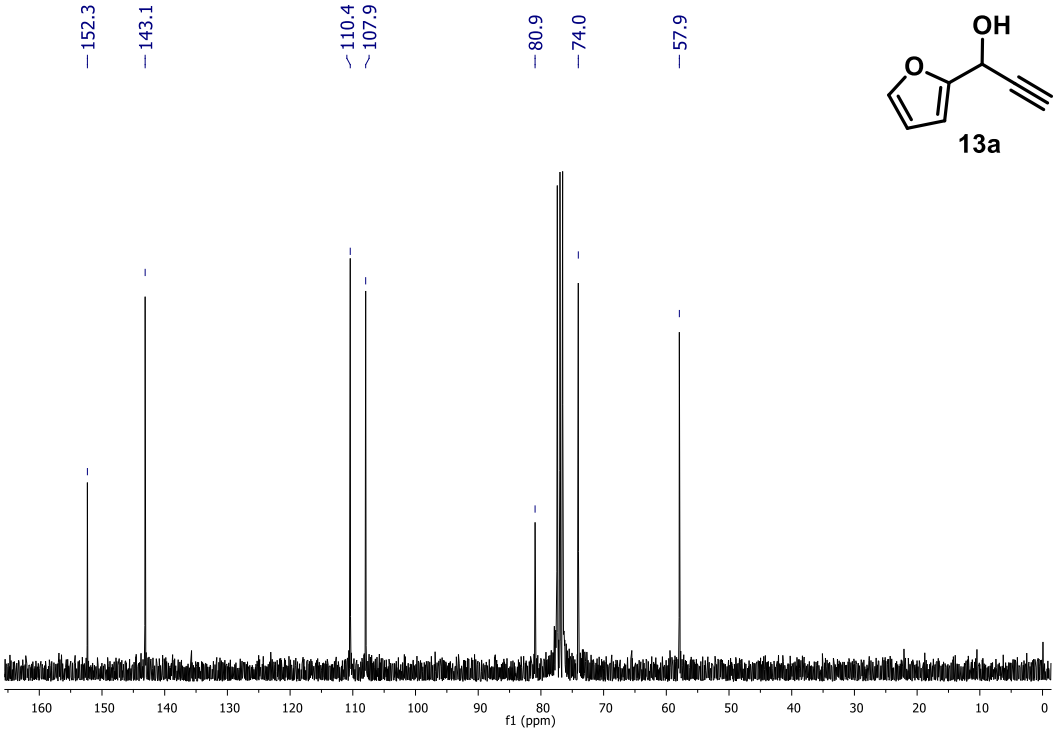


Fig. 21. Espectro de 1H do álcool 1-- (tiofen-2-il) prop-2-in-1-ol 14a

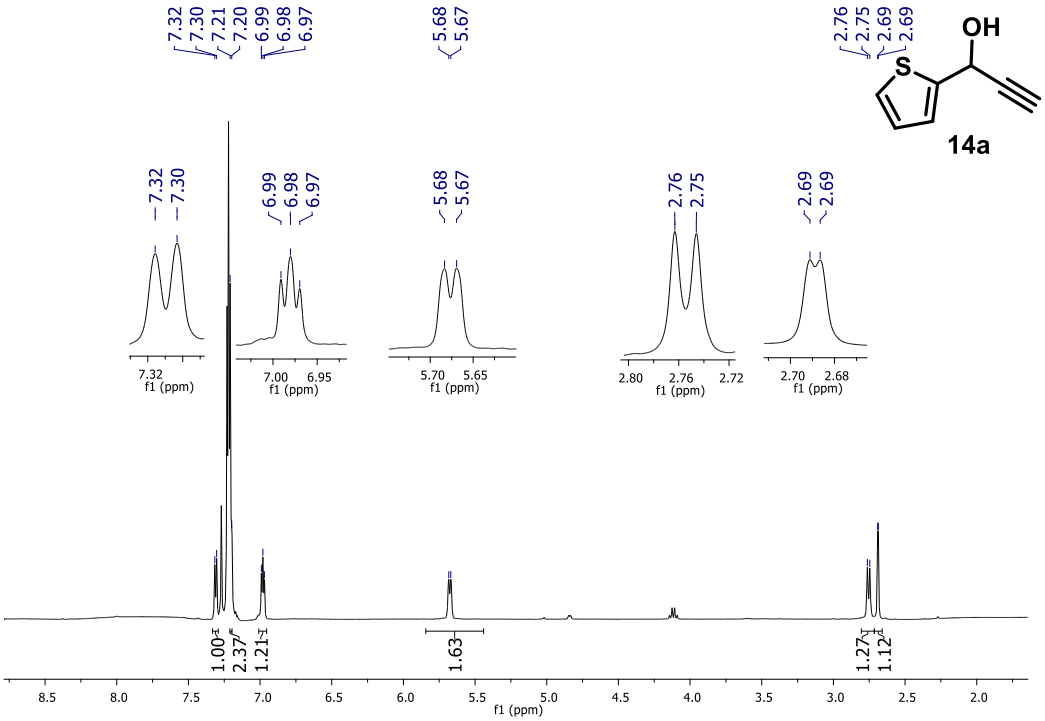
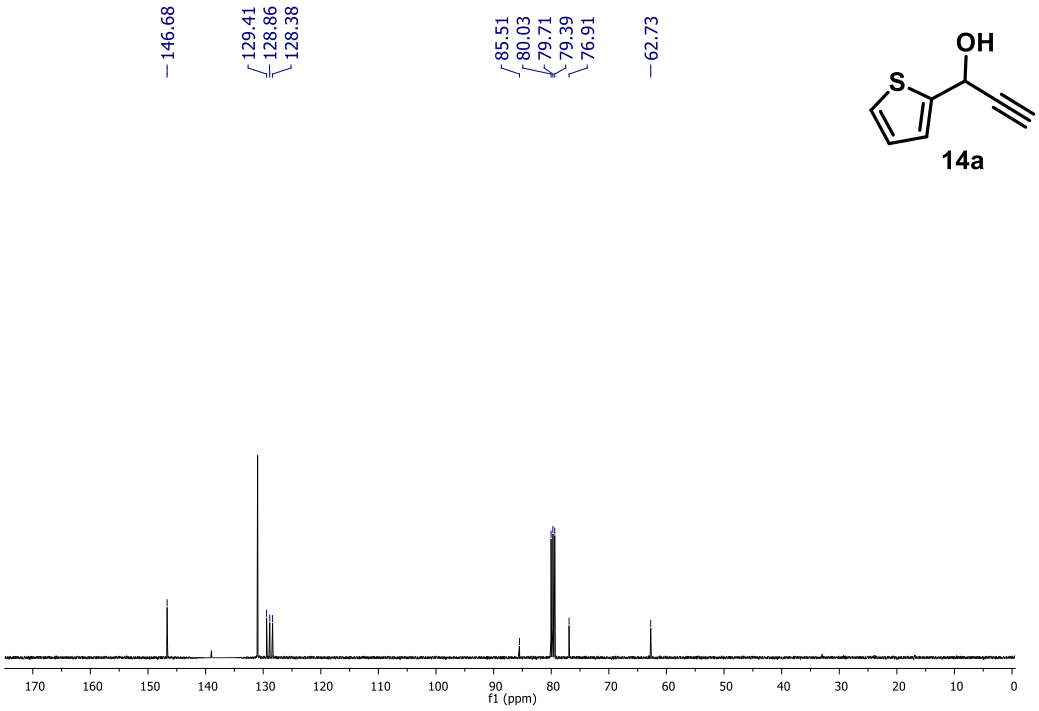


Fig. 22. Espectrode 13C do álcool 1- (tiofen-2-il) prop-2-in-1-ol 14a



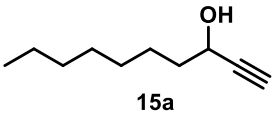


Fig. 23. Espectro de 1H do álcool dec-1-in-3-ol 15a

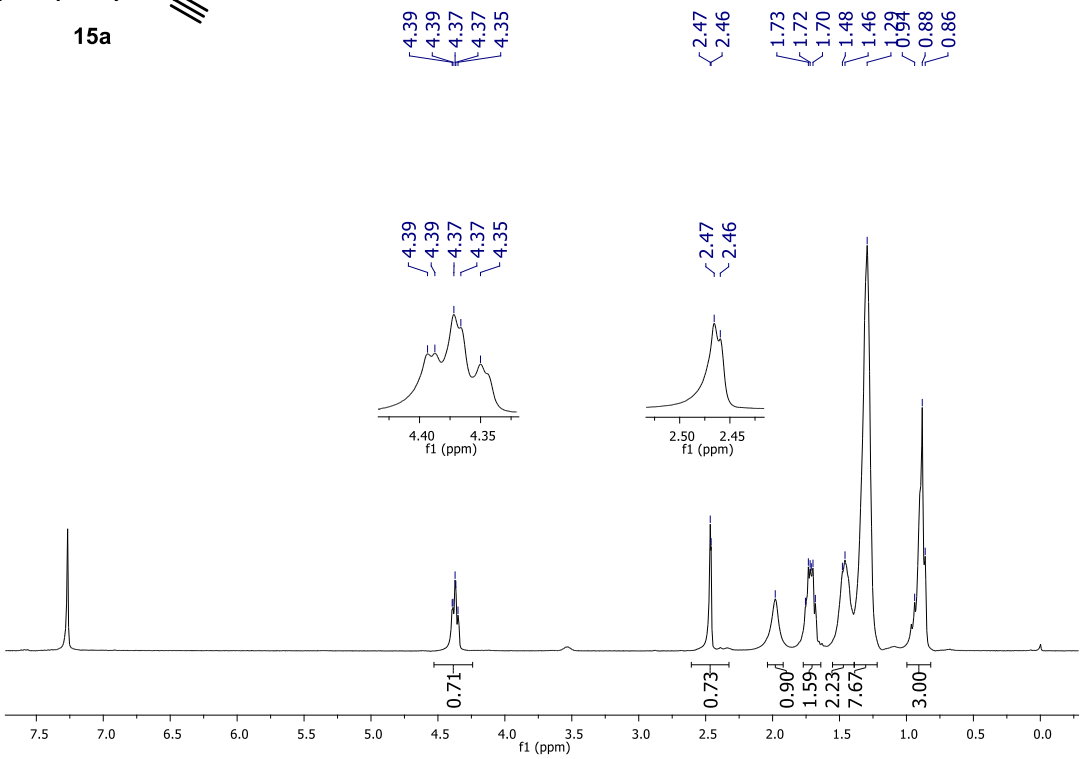


Fig. 24. Espectro de 13C do álcool dec-1-in-3-ol 15a

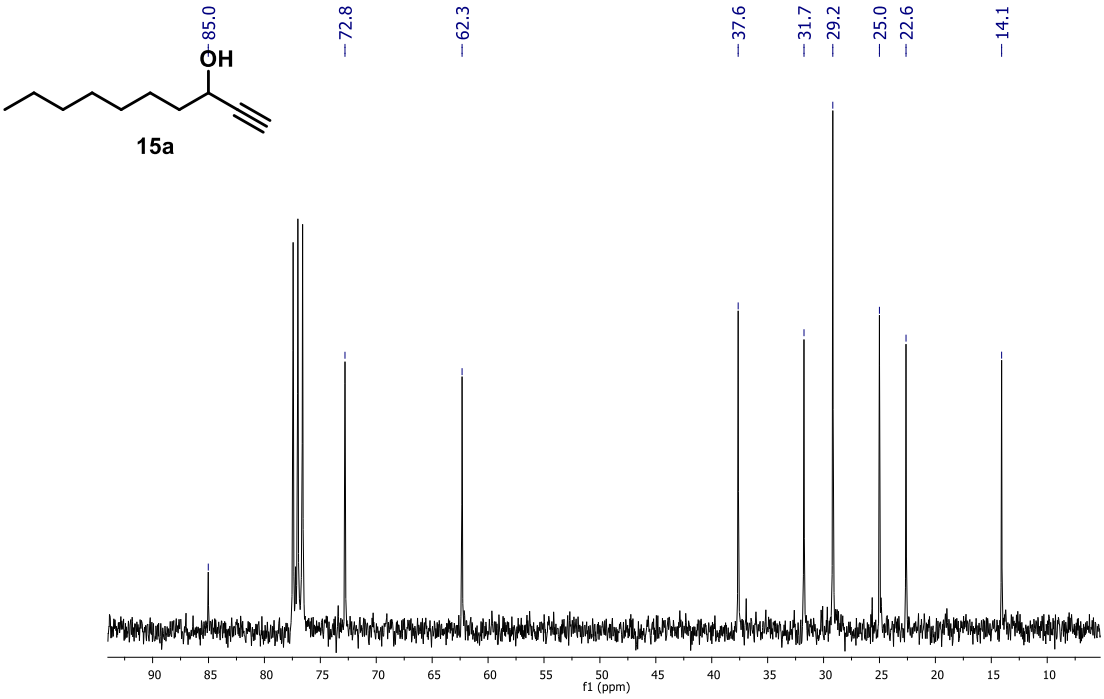


Fig. 25. Espectro de 1H do álcool (E) -1-fenilpent-1-en-4-in-3-ol 16a

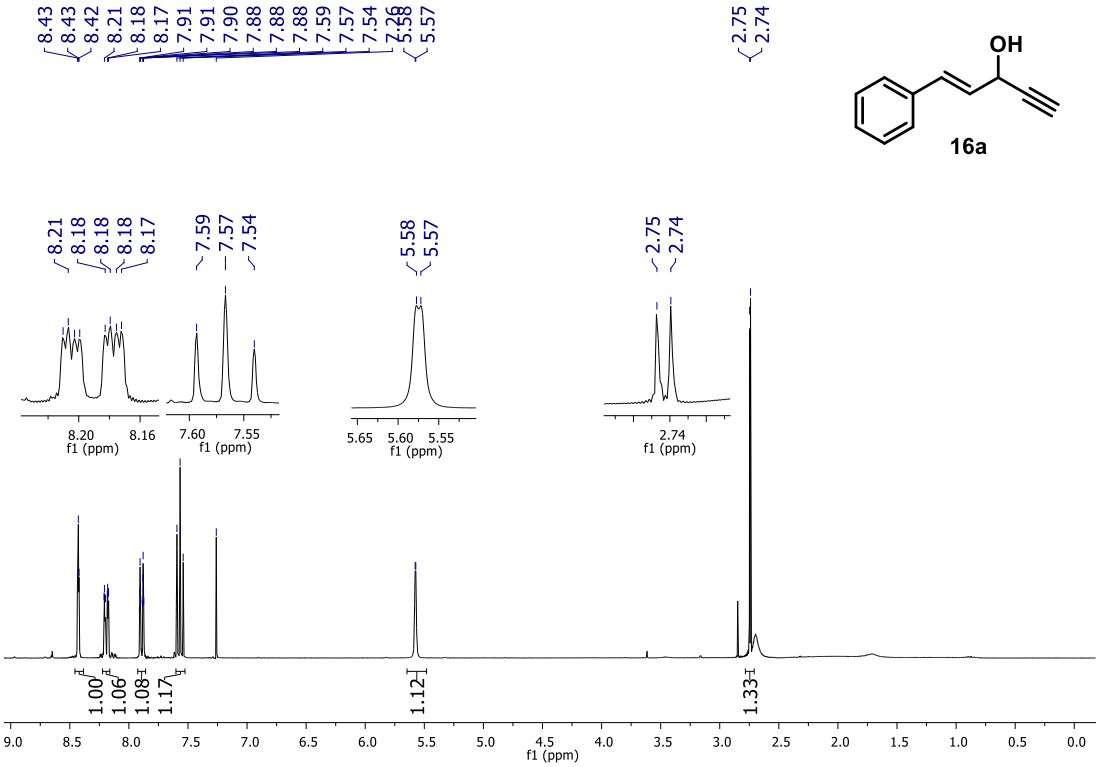


Fig. 26. Espectro de 13C do álcool (E) -1-fenilpent-1-en-4-in-3-ol 16a

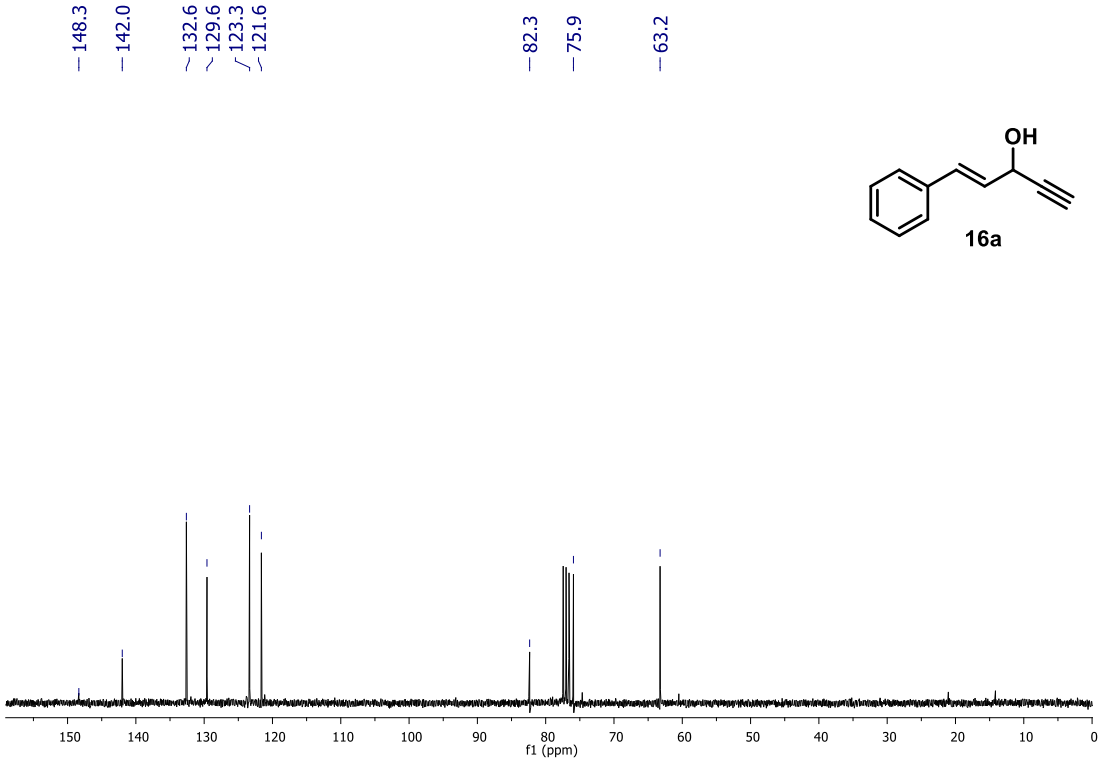


Fig. 27. Espectro de 1H do álcool (E) -6-fenil-hex-5-en-2-ina-1,4-diol 17a

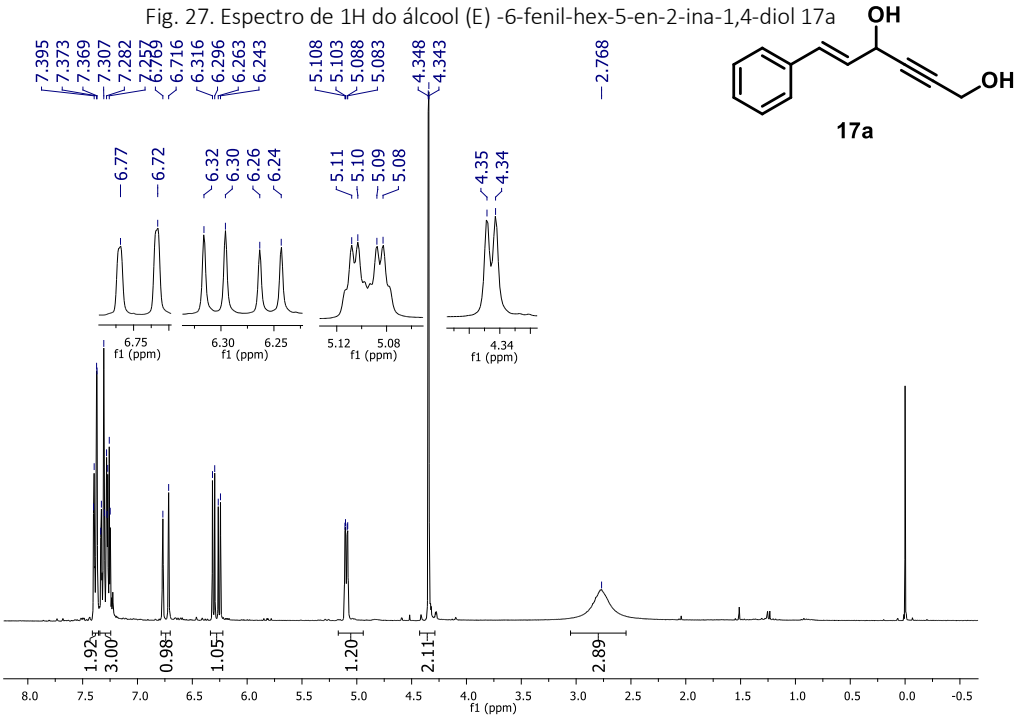


Fig. 28. Espectro de 13C do álcool (E) -6-fenil-hex-5-en-2-ina-1,4-diol 17a

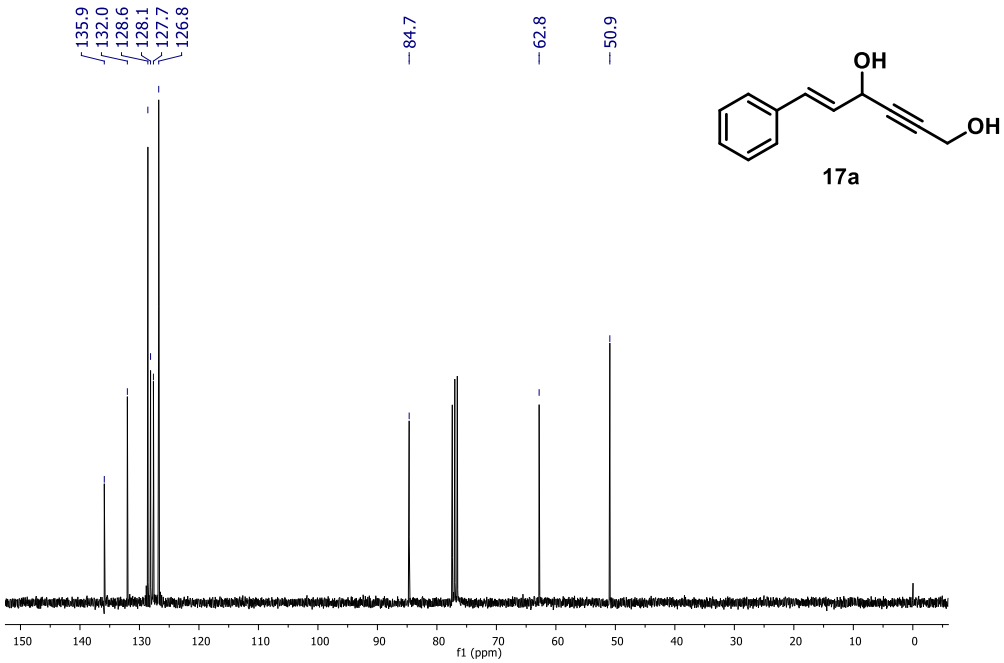


Fig. 29. Espectro de 1H do álcool 4-phenylbut-3-yn-2-ol 18a

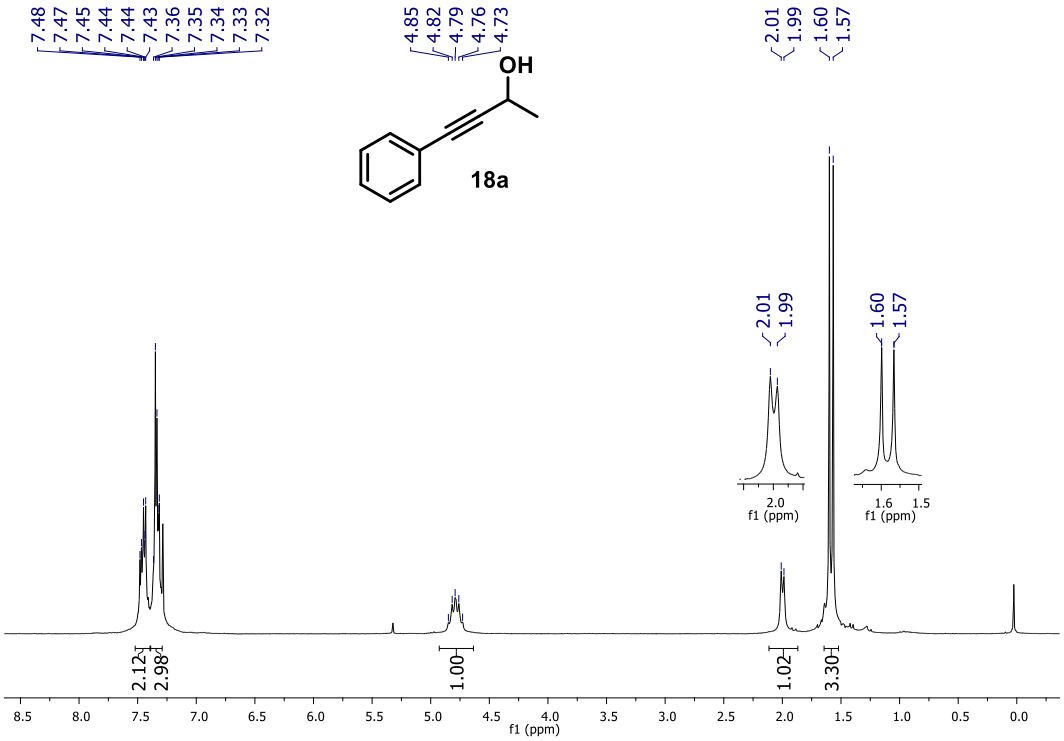


Fig. 30. Espectro de 13C do álcool 4-phenylbut-3-yn-2-ol 18a

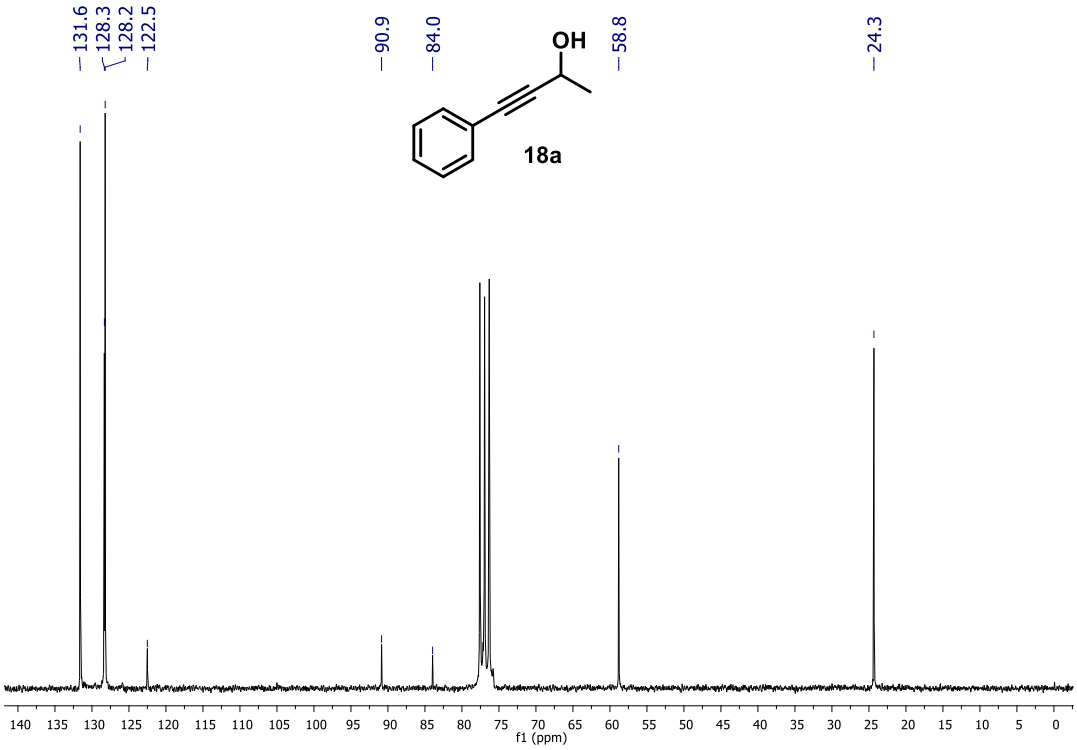


Fig. 31. Espectro de 1H do álcool 1,3-difenilprop-2-in-1-ol 19a

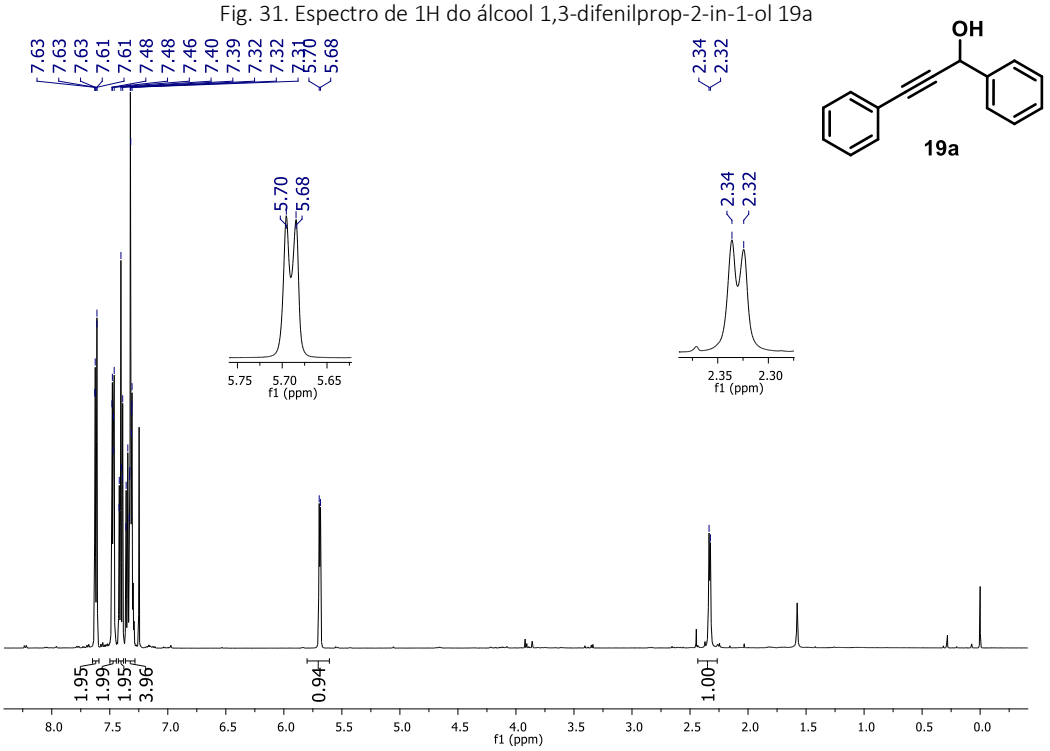


Fig. 32. Espectro de 13C do álcool 1,3-difenilprop-2-in-1-ol 19a

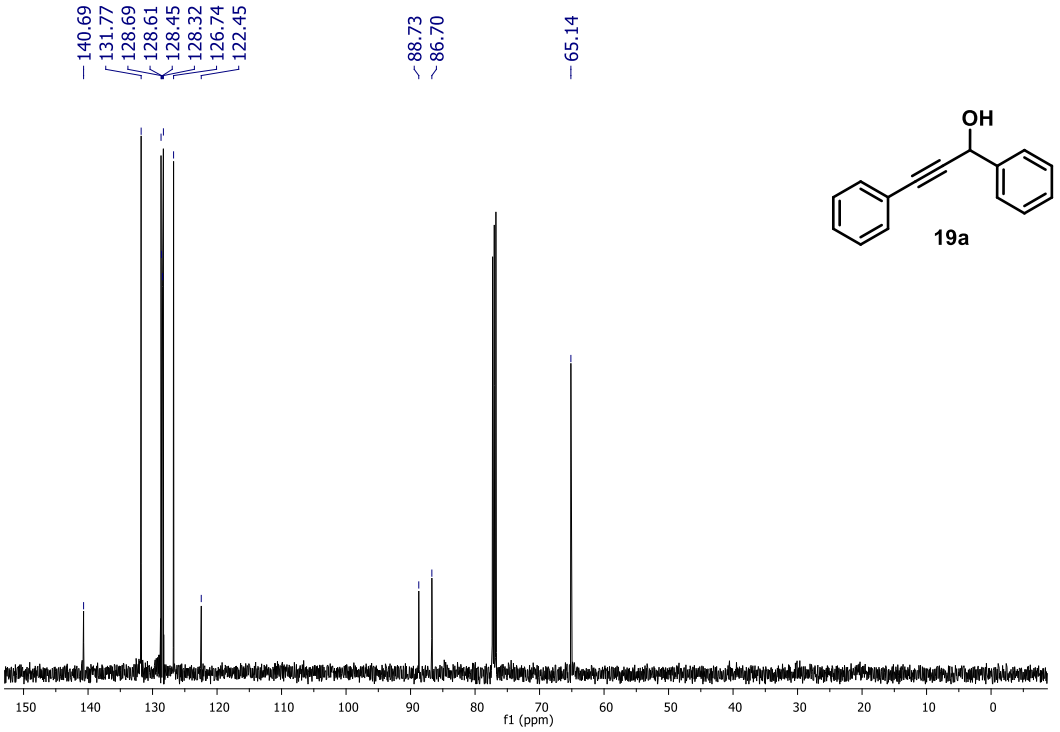


Fig. 33. Espectro de 1H do álcool (E) -1-feniloct-4-en-1-in-3-ol 20a

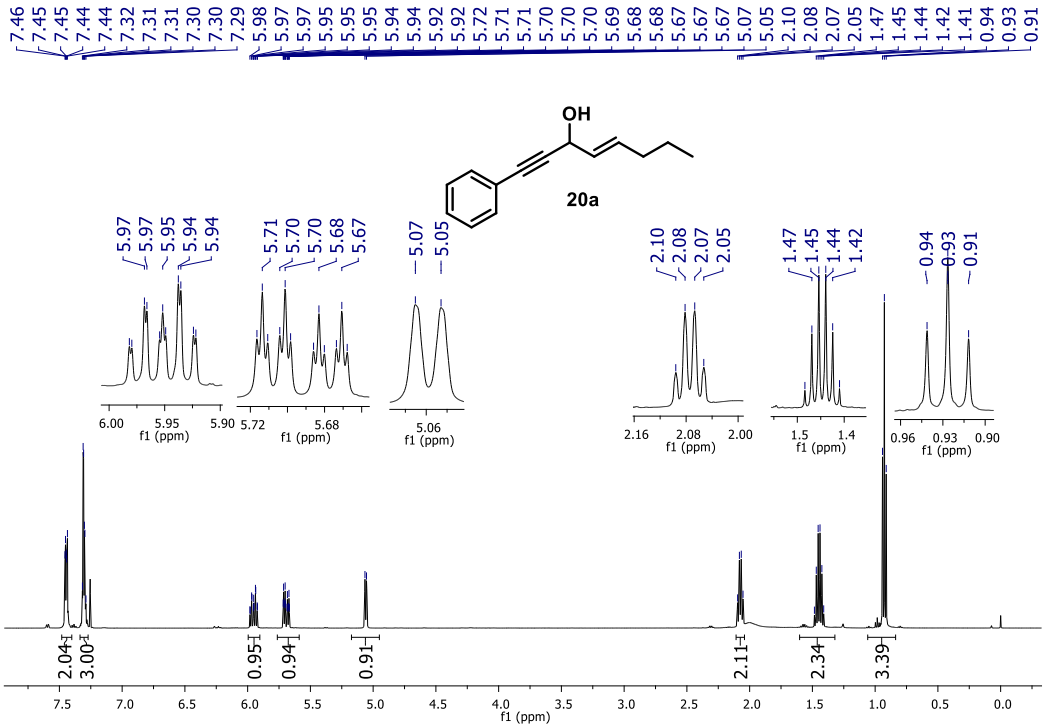


Fig. 34. Espectro de 13C do álcool (E) -1-feniloct-4-en-1-in-3-ol 20a

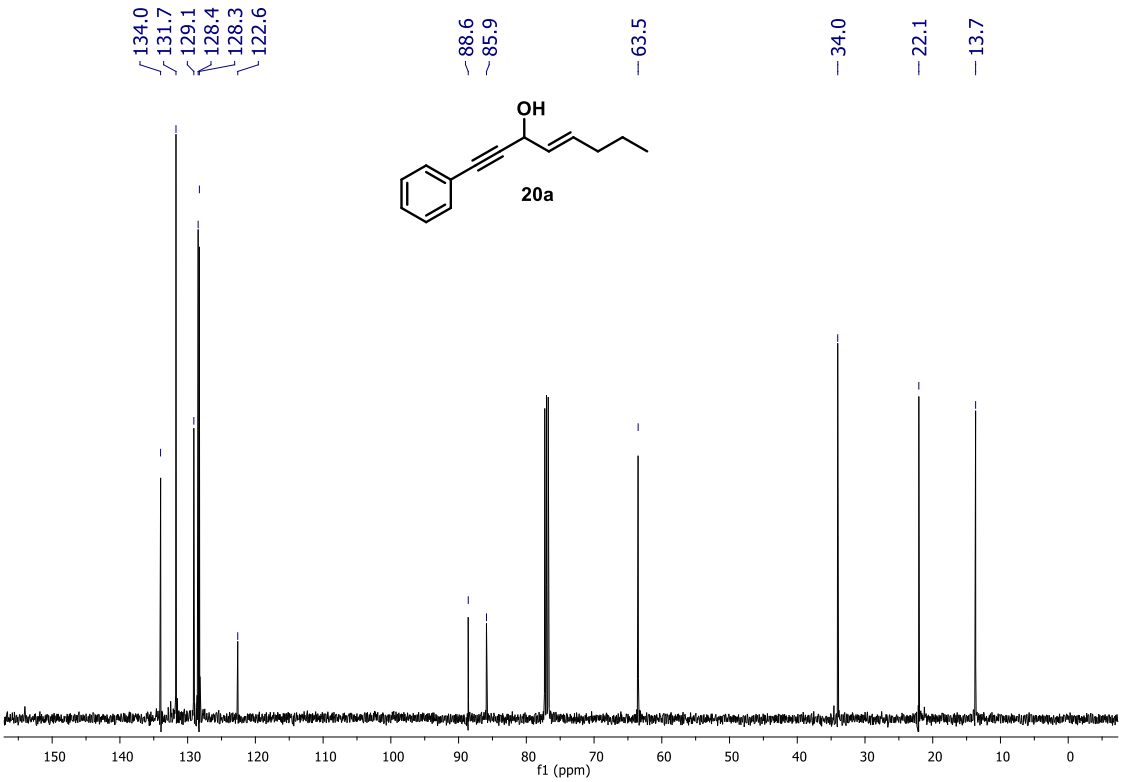


Fig. 35. Espectro de 1H da cetona 1-fenilprop-2-in-1-ona 1b

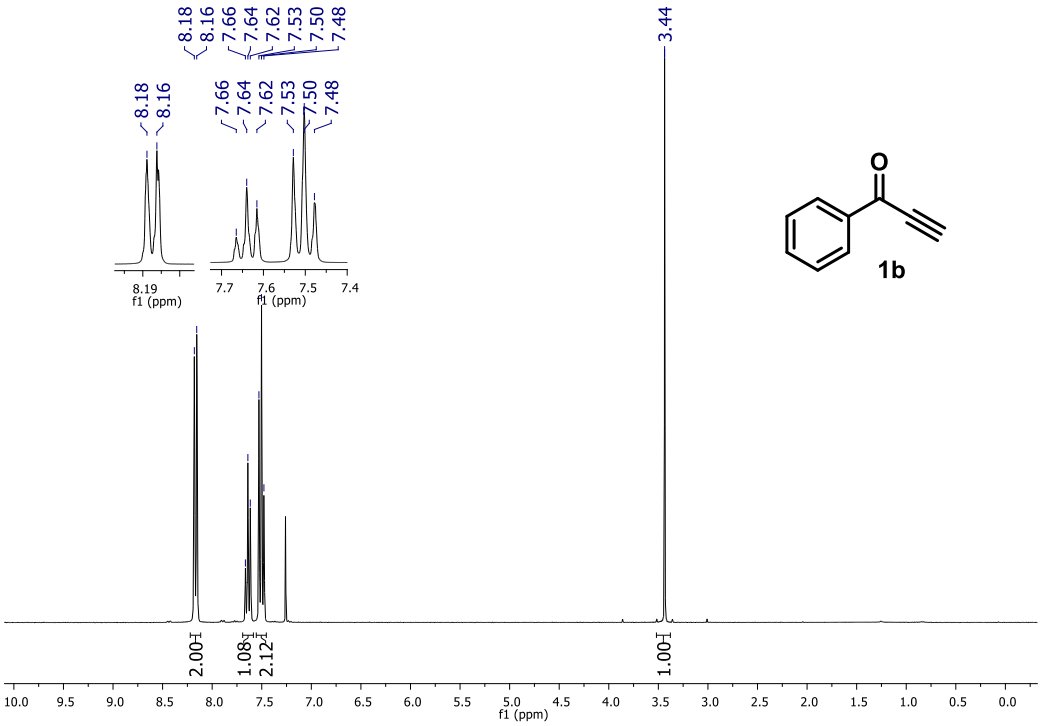


Fig. 36. Espectro de 13C da cetona 1-fenilprop-2-in-1-ona 1b

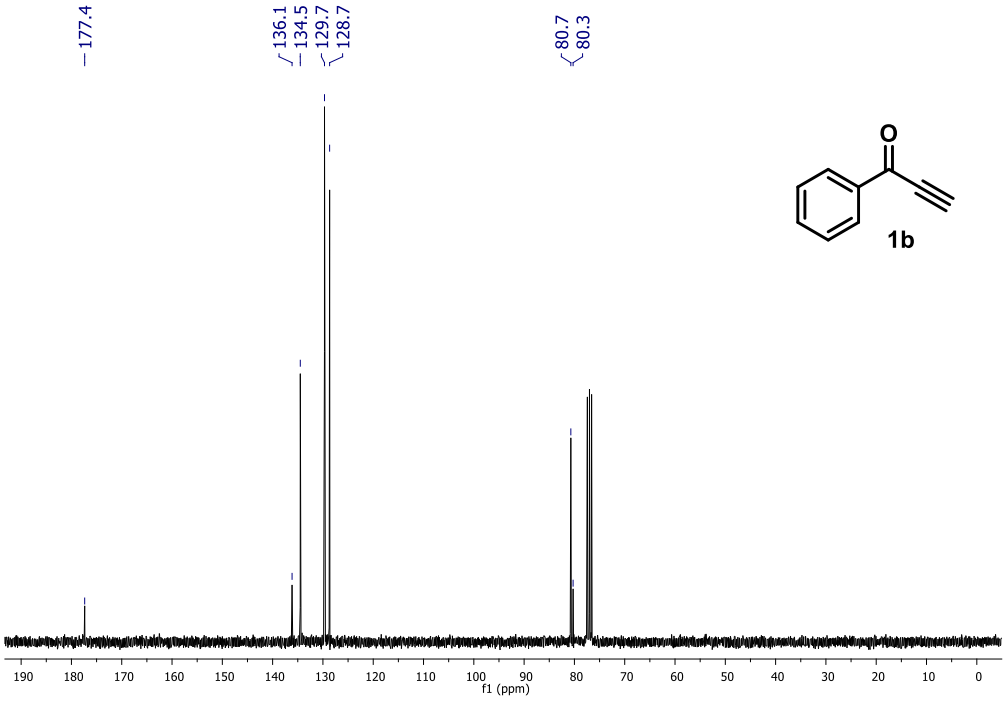


Fig. 37.Espectro de 1H da cetona 1- (o-tolil) prop-2-in-1-ona 2b

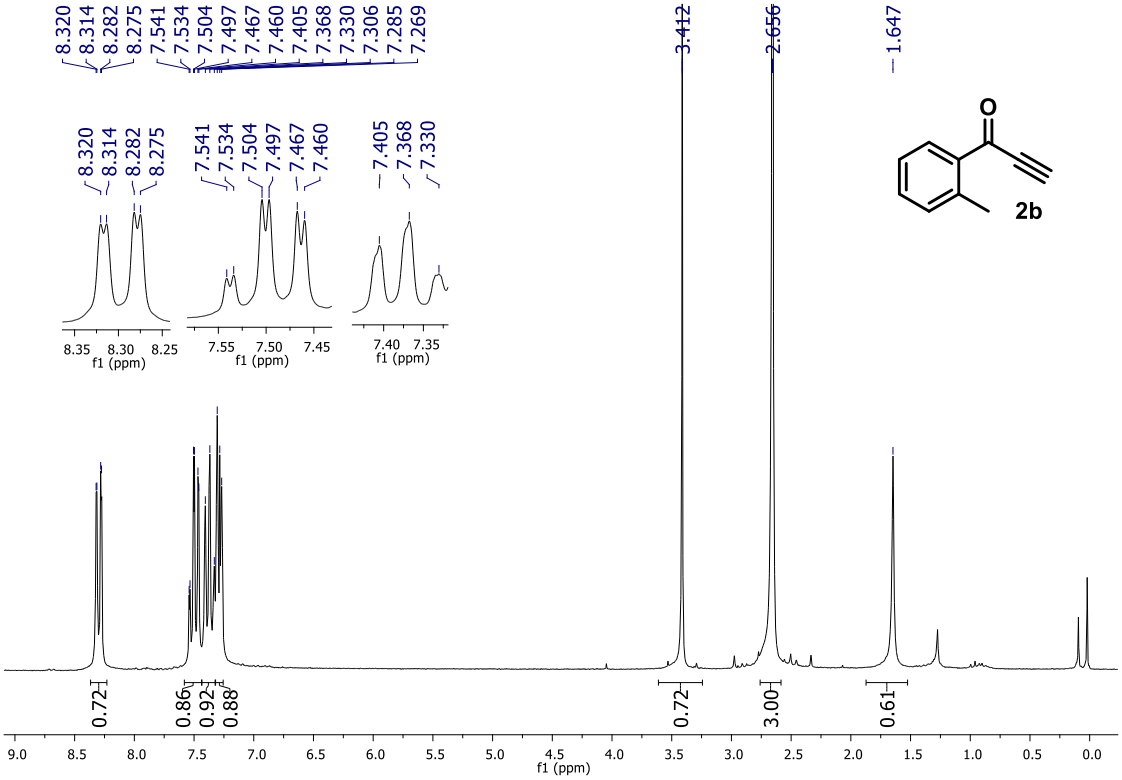


Fig. 38. Espectro de 13C da cetona 1- (o-tolil) prop-2-in-1-ona 2b

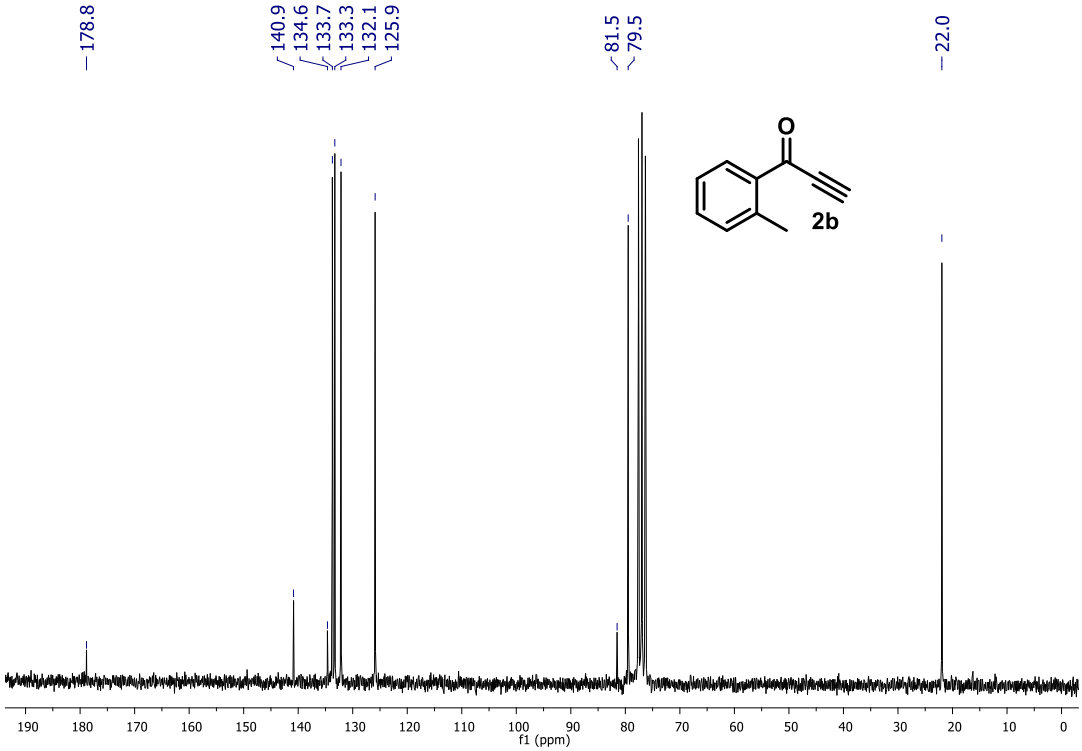


Fig. 39. Espectro de 1H da cetona 1- (m-tolil) prop-2-in-1-ona 3b

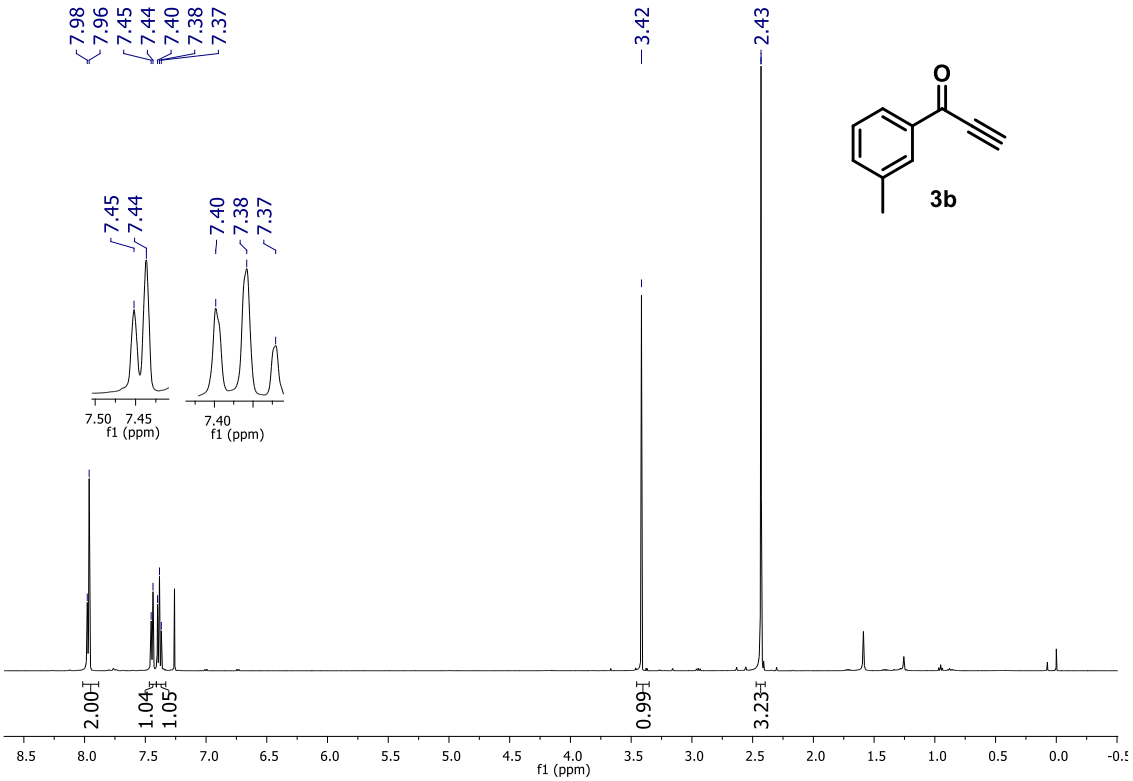


Fig. 40. Espectro de 13C da cetona 1- (m-tolil) prop-2-in-1-ona 3b

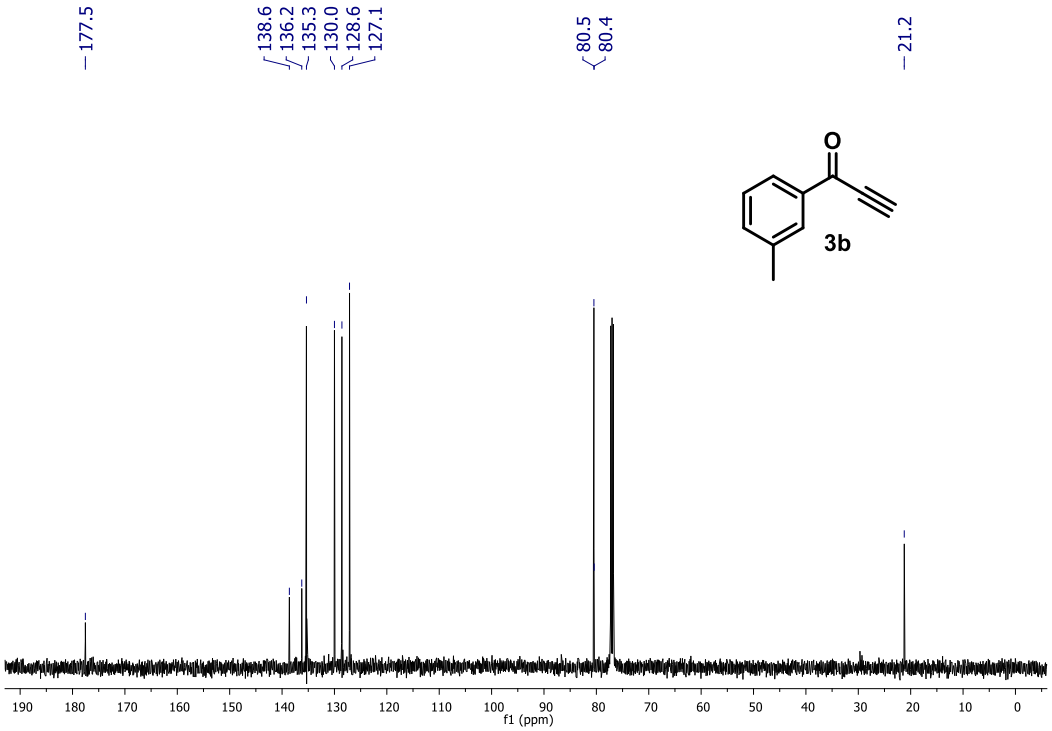


Fig. 41. Espectro de 1H da cetona 1- (p-tolil) prop-2-in-1-ona 4b

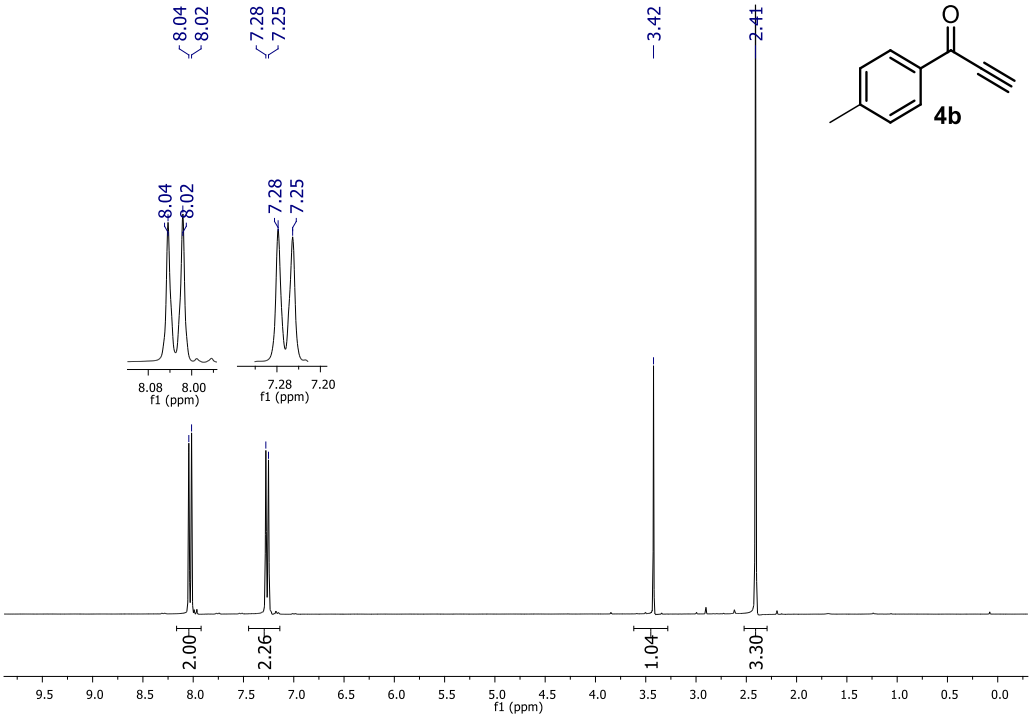


Fig. 42. Espectro de 13C da cetona 1- (p-tolil) prop-2-in-1-ona 4b

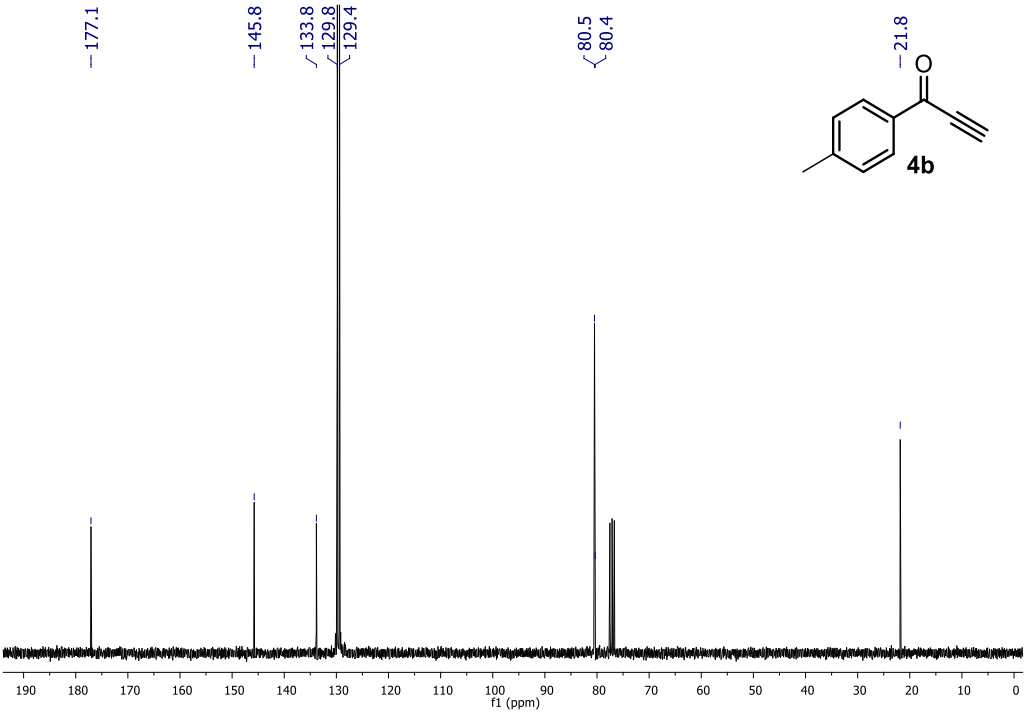


Fig. 43. Espectro de 1H da cetona 1- (2,4-dimetoxifenil) prop-2-in-1-ona 5b

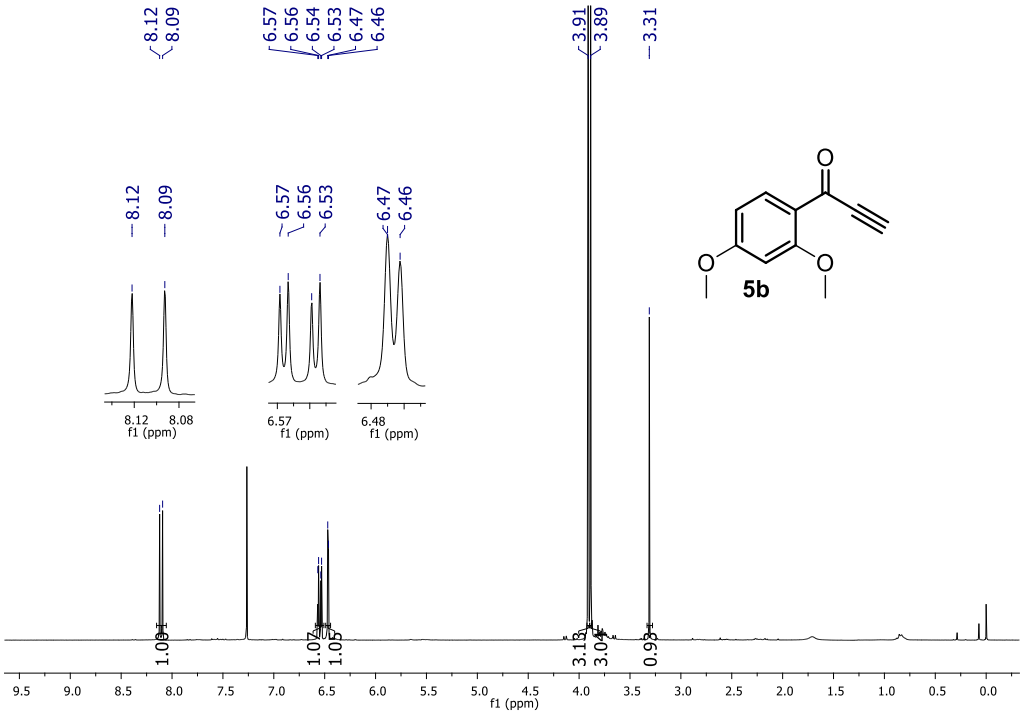


Fig. 44. Espectro de 13C da cetona 1- (2,4-dimetoxifenil) prop-2-in-1-ona 5b

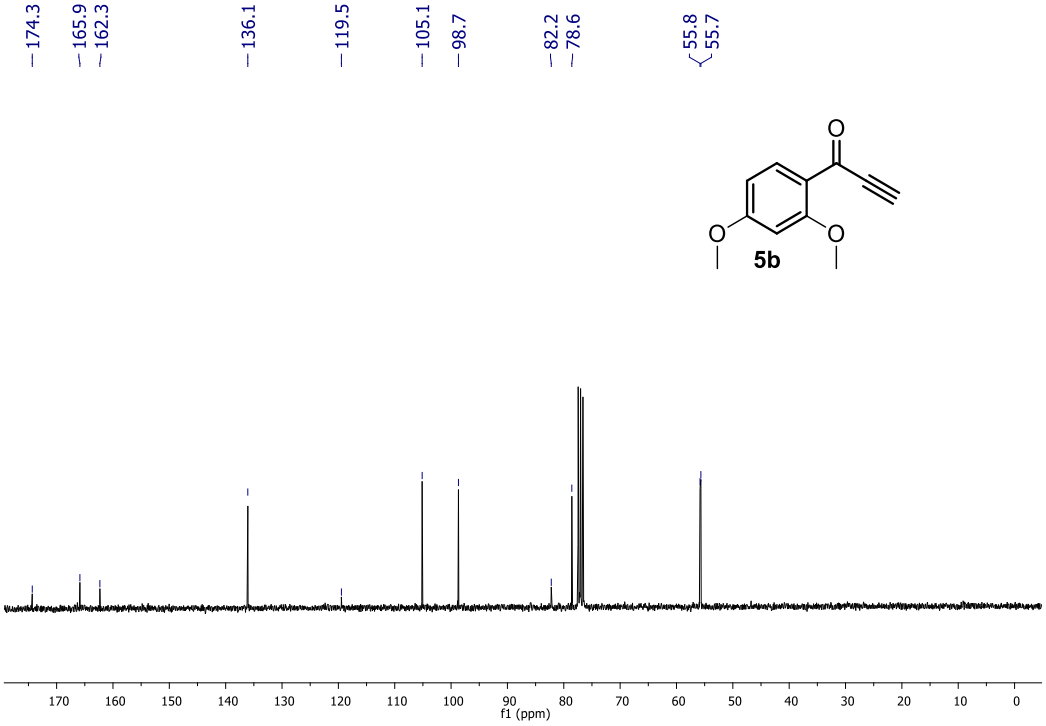


Fig. 45. Espectro de 1H da cetona 1- (2-metoxifenil) prop-2-in-1-ona 6b

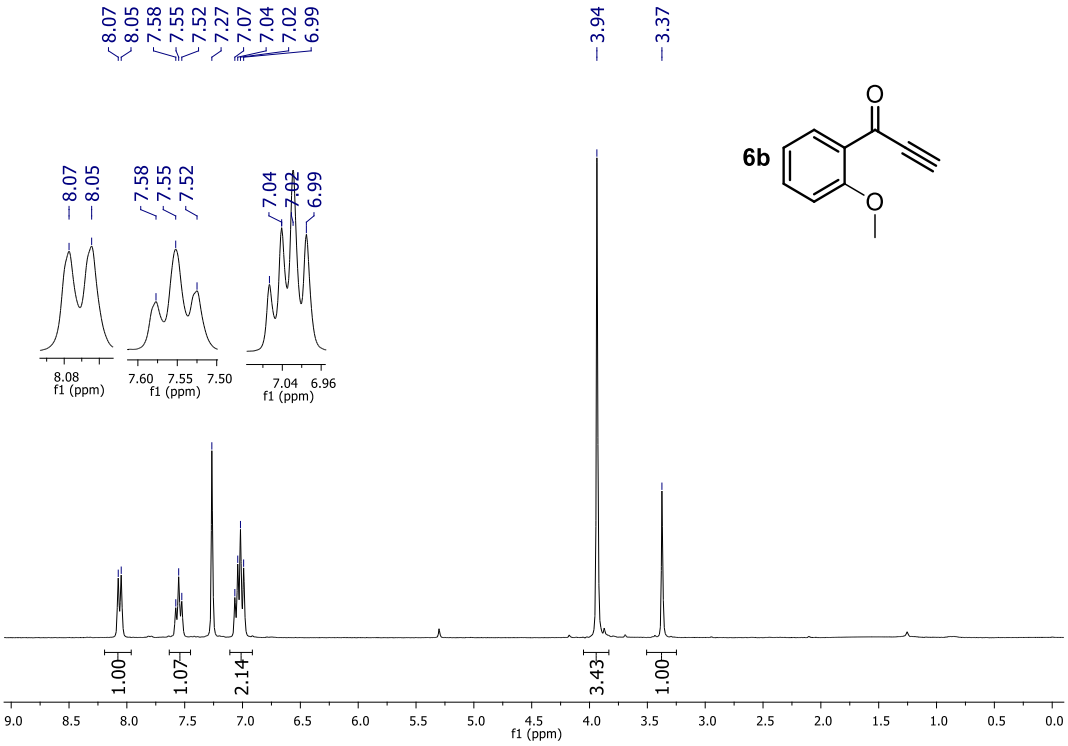


Fig. 46. Espectro de 13C da cetona 1- (2-metoxifenil) prop-2-in-1-ona 6b

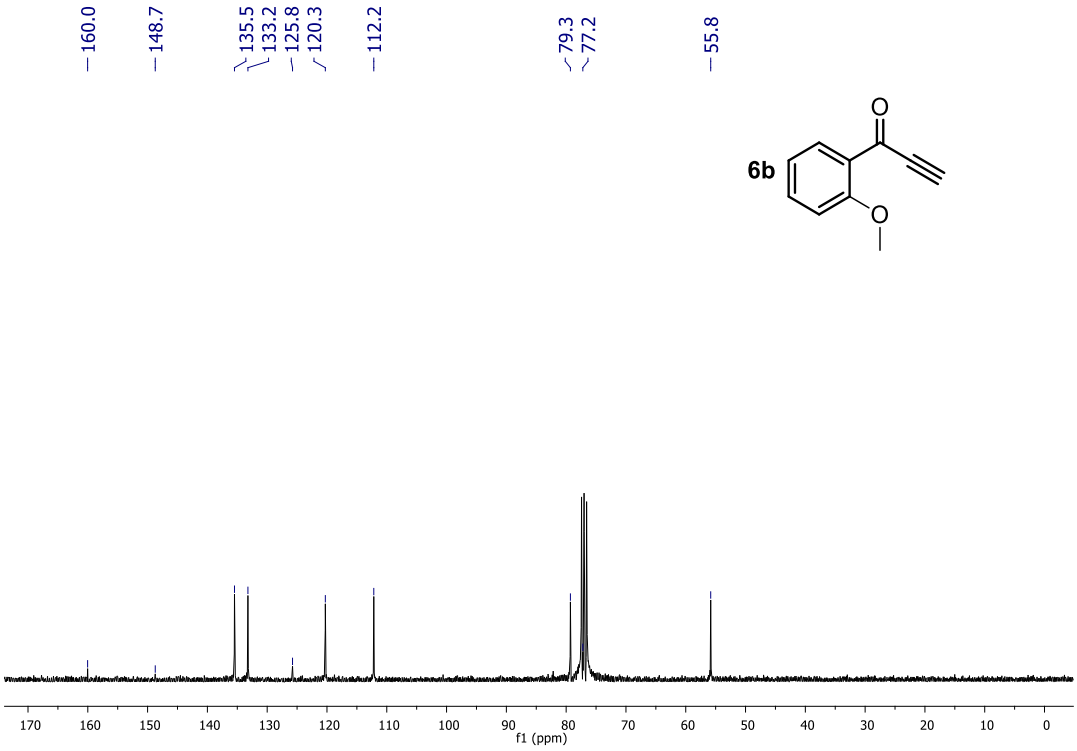


Fig. 47. Espectro de 1H da cetona 1- (3-metoxifenil) prop-2-in-1-ona 7b

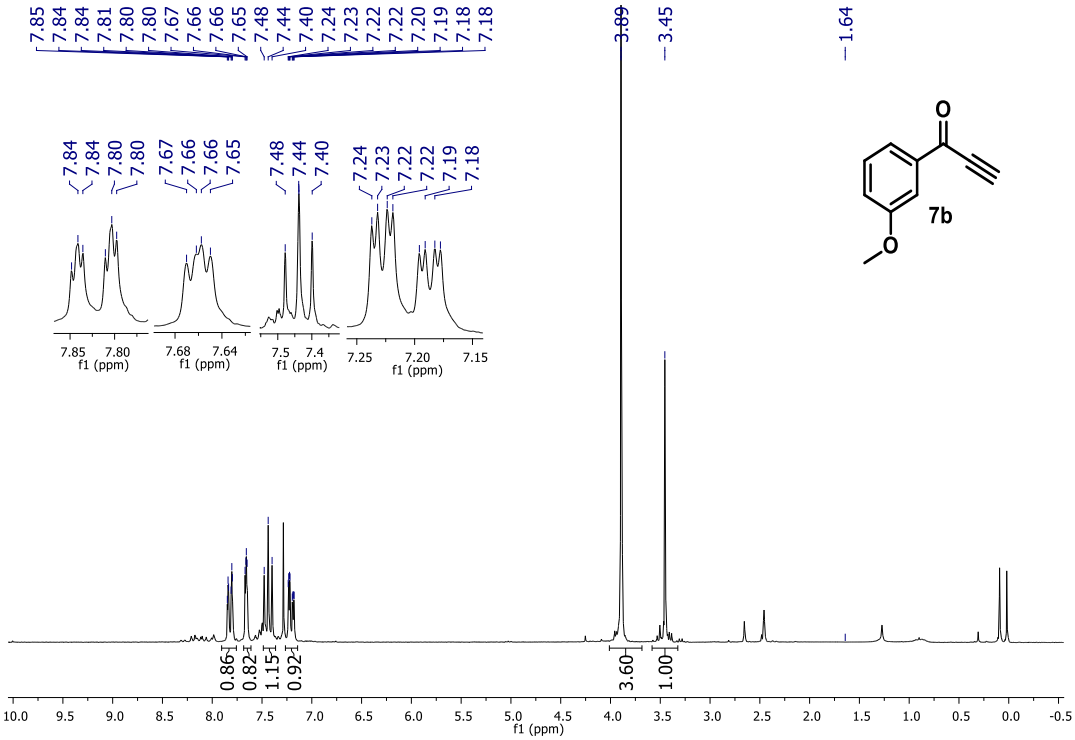


Fig. 48.Espectro de 13C da cetona 1- (3-metoxifenil) prop-2-in-1-ona 7b

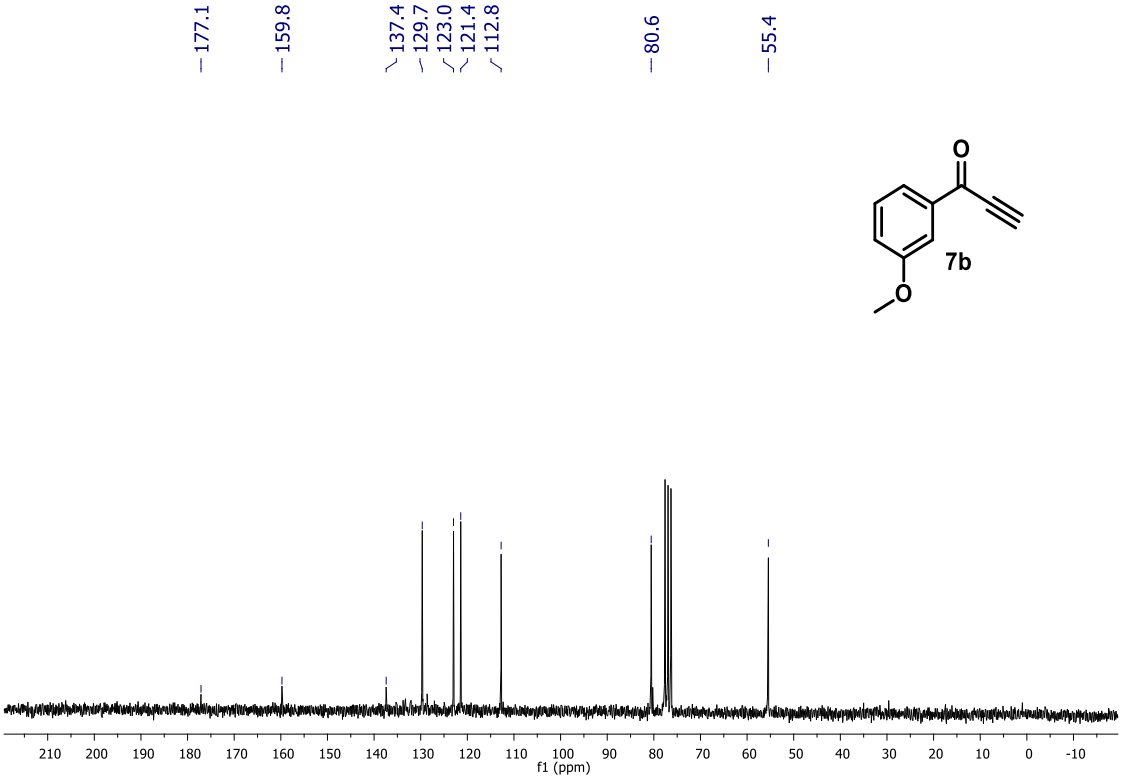


Fig. 49. Espectro de 1H da cetona 1- (4-metoxifenil) prop-2-in-1-ona 8b

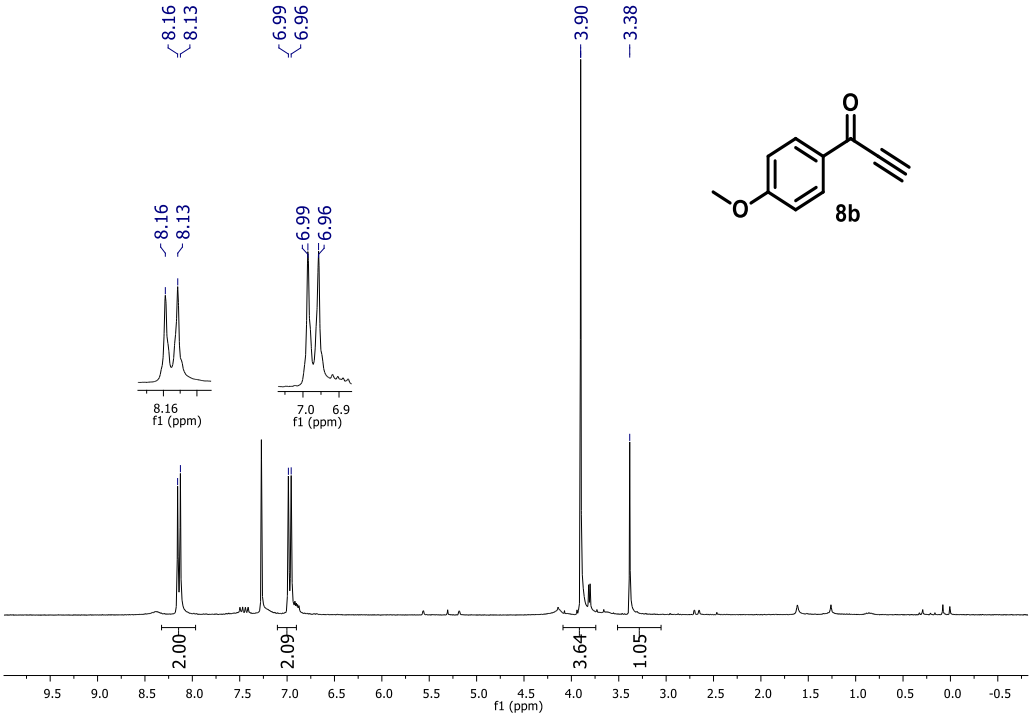


Fig. 50. Espectro de 13C da cetona 1- (4-metoxifenil) prop-2-in-1-ona 8b

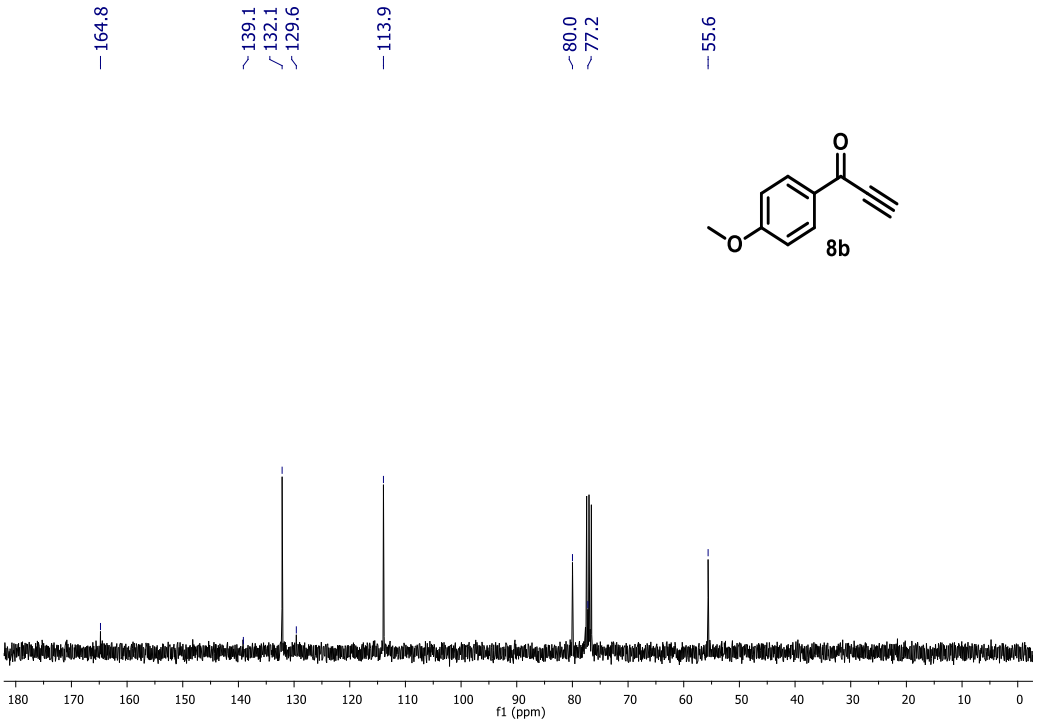


Fig. 51. Espectro de 1H da cetona 1- (3-nitrofenil) prop-2-in-1-ona 9b

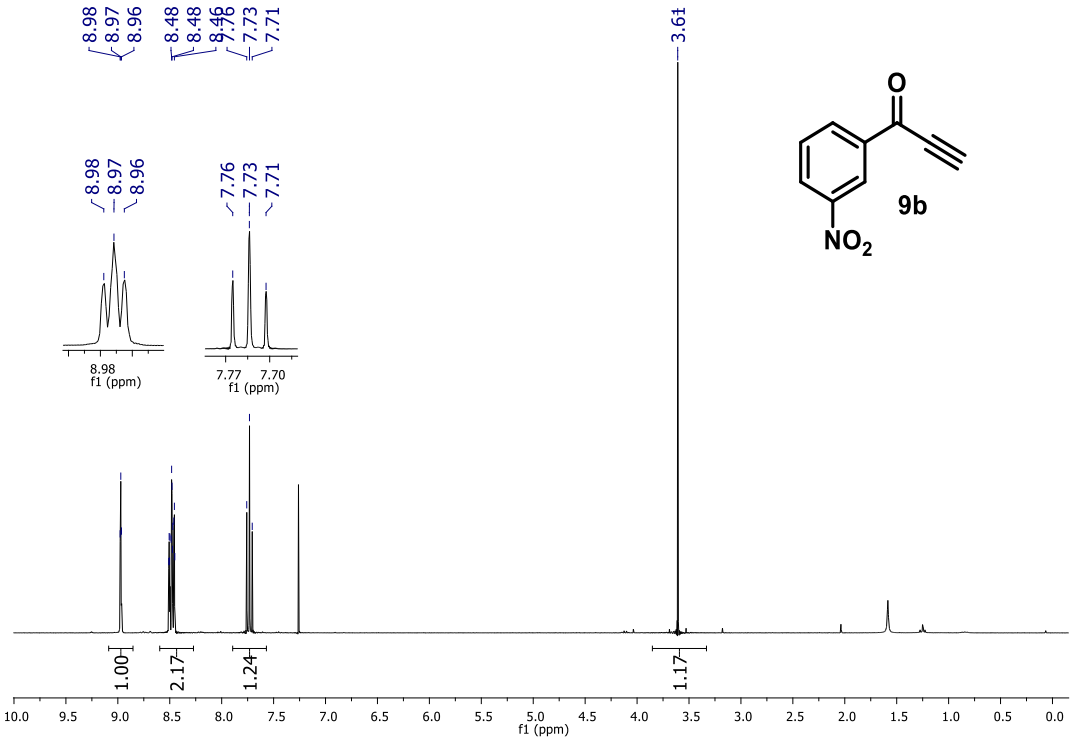


Fig. 52. Espectro de 13C da cetona 1- (3-nitrofenil) prop-2-in-1-ona 9b

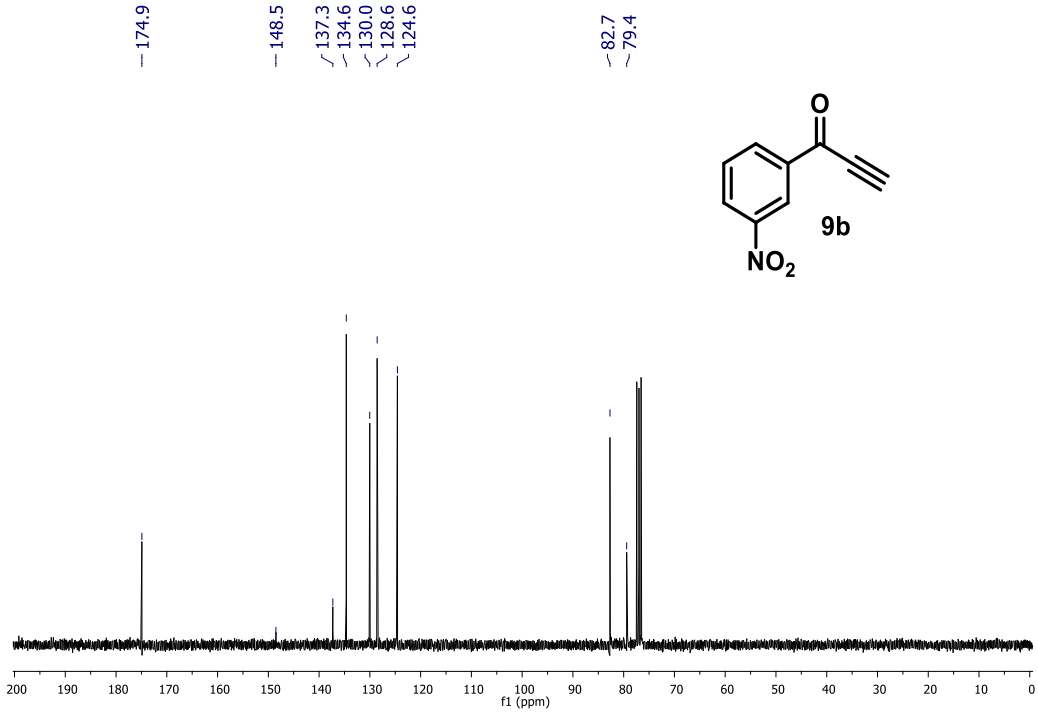


Fig. 53. Espectro de 1H da cetona 1- (naftalen-2-il) prop-2-in-1-ona 10b

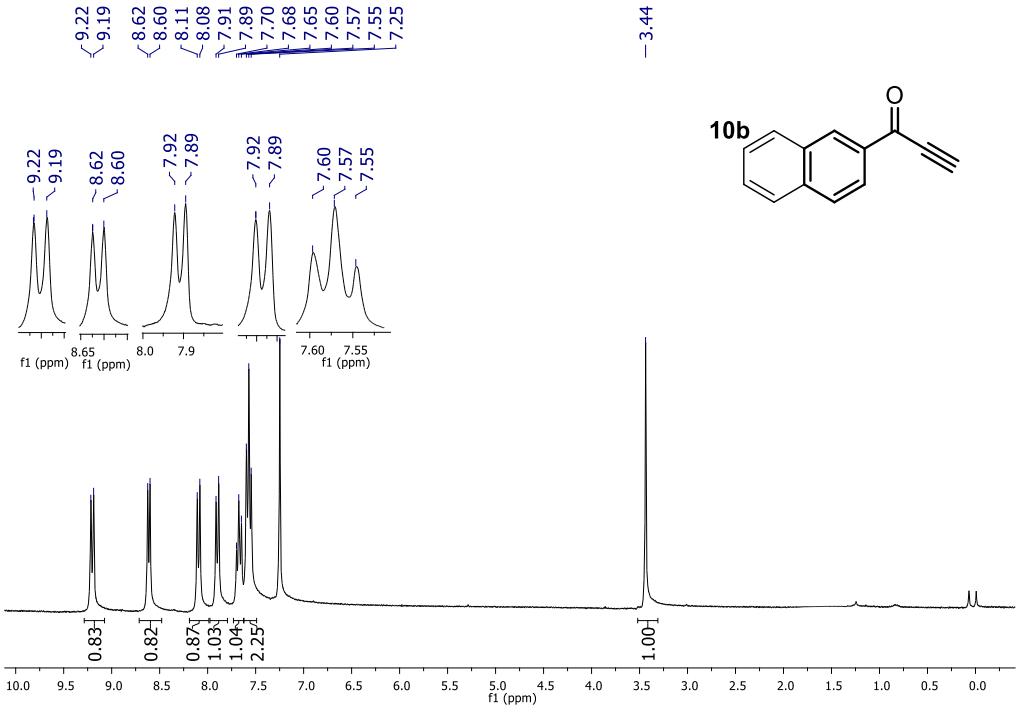


Fig. 54. Espectro de 13C da cetona 1- (naftalen-2-il) prop-2-in-1-ona 10b

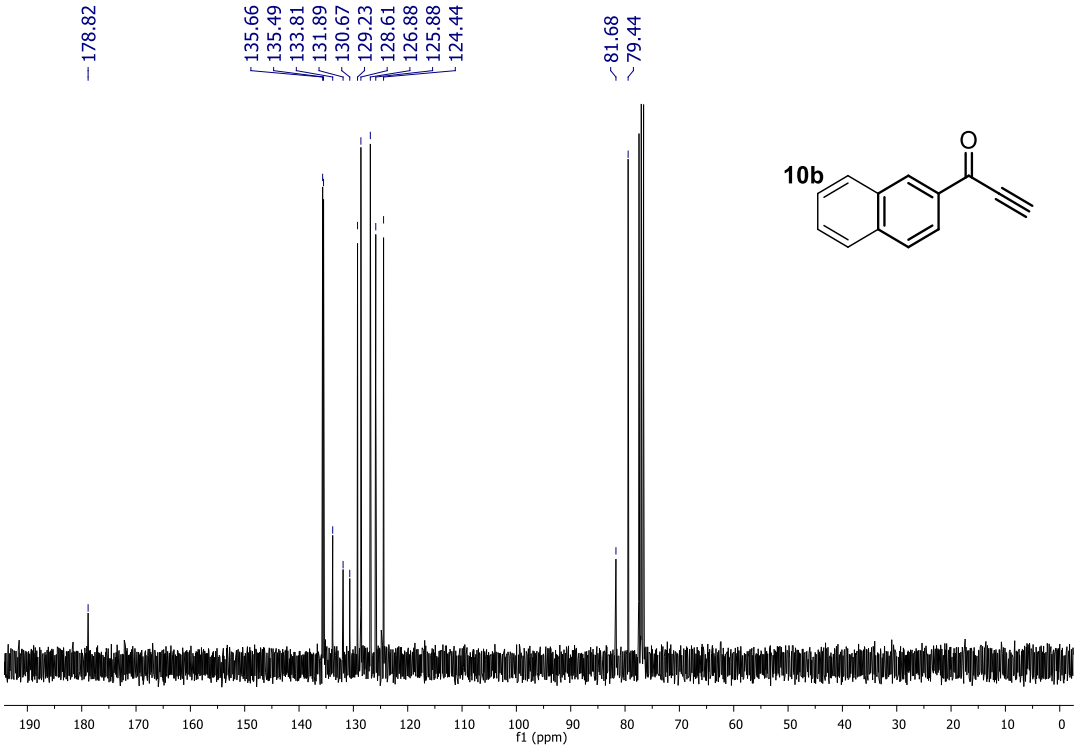


Fig. 55. Espectro de 1H da cetona 1- (2-clorofenil) prop-2-in-1-ona 11b

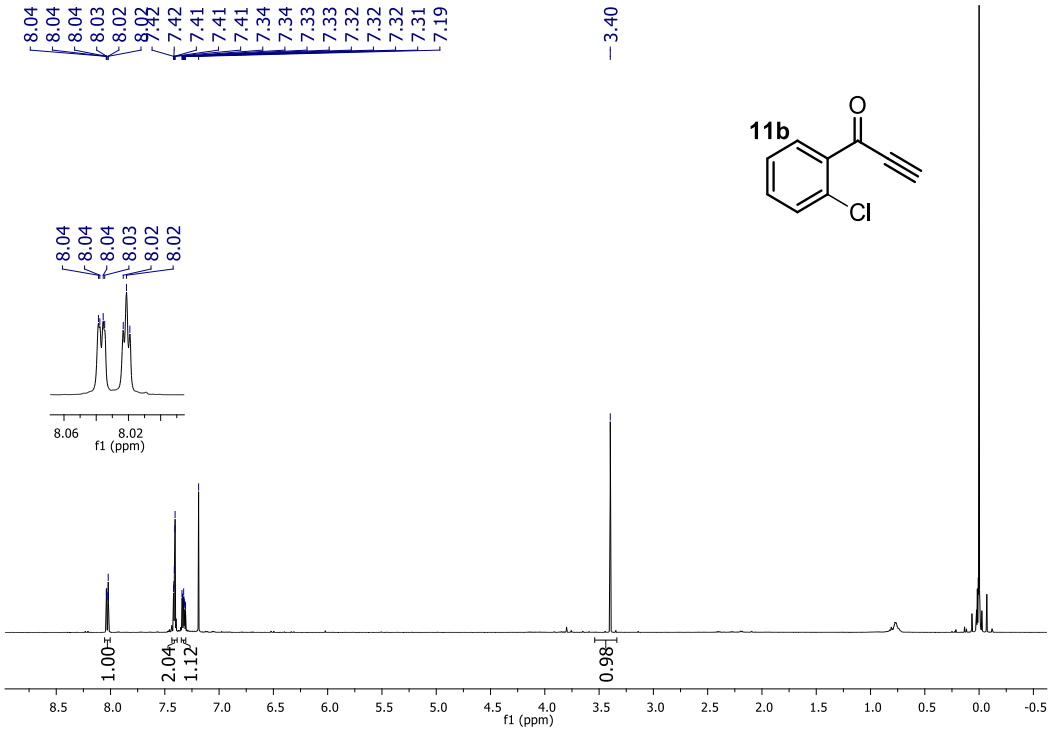


Fig. 56. Espectro de 13C da cetona 1- (2-clorofenil) prop-2-in-1-ona 11b

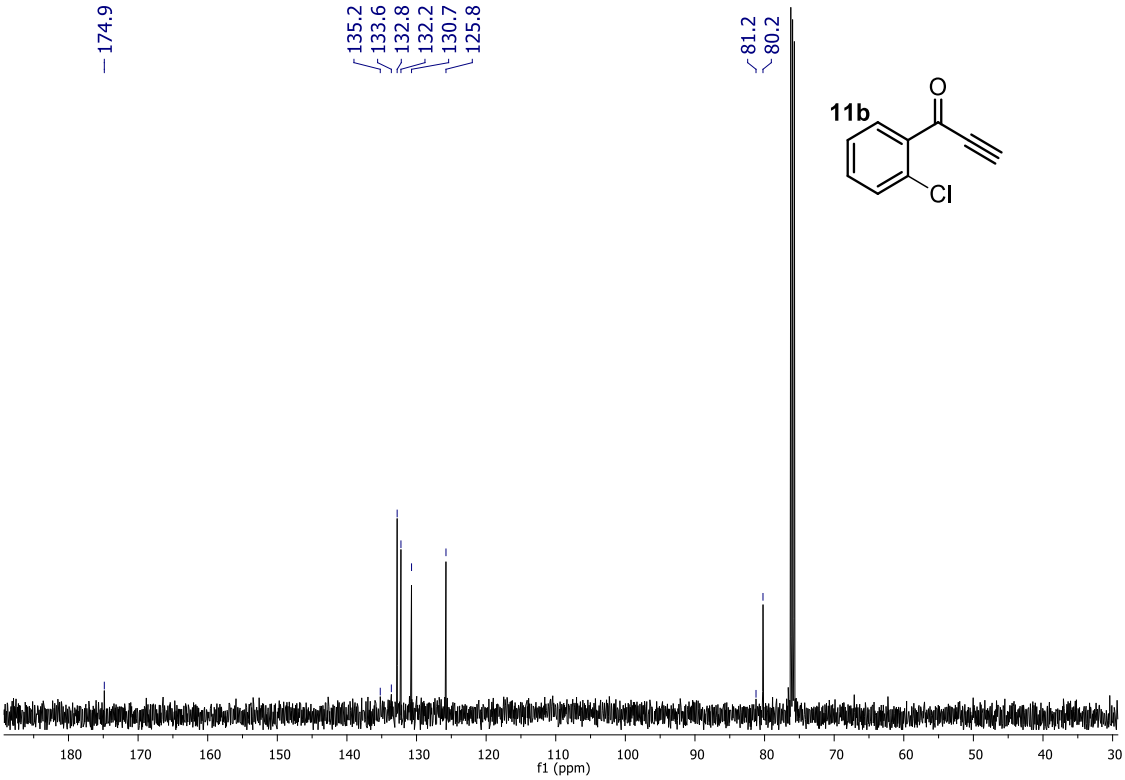


Fig. 57. Espectro de 1H da cetona 1- (4-clorofenil) prop-2-in-1-ona 12b

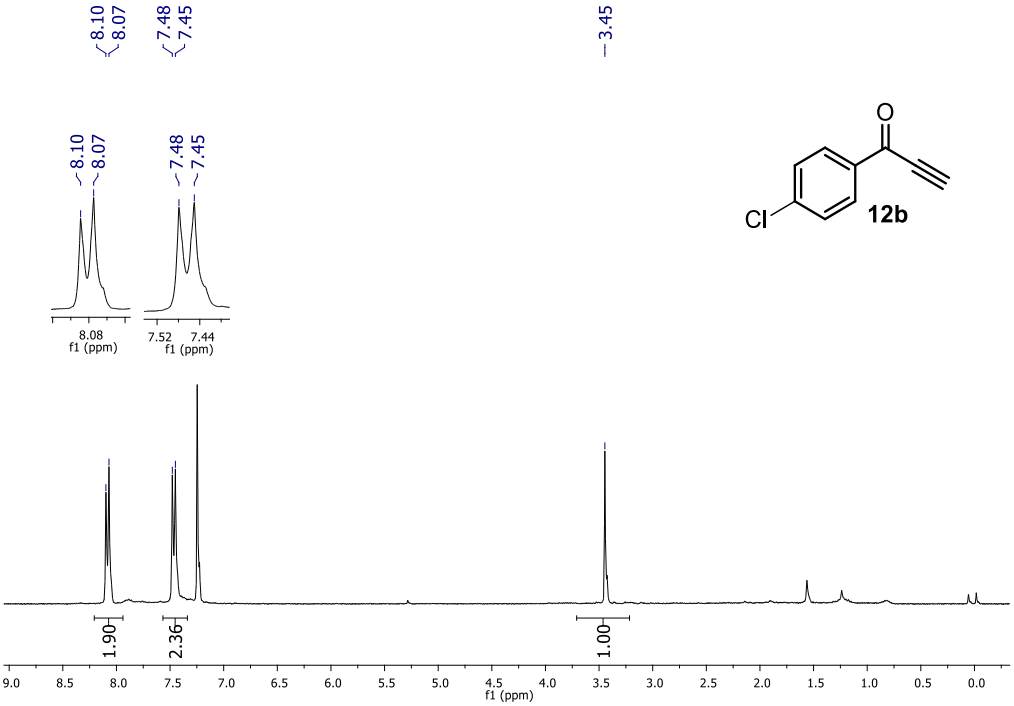


Fig. 58. Espectro de 13C da cetona 1- (4-clorofenil) prop-2-in-1-ona 12b

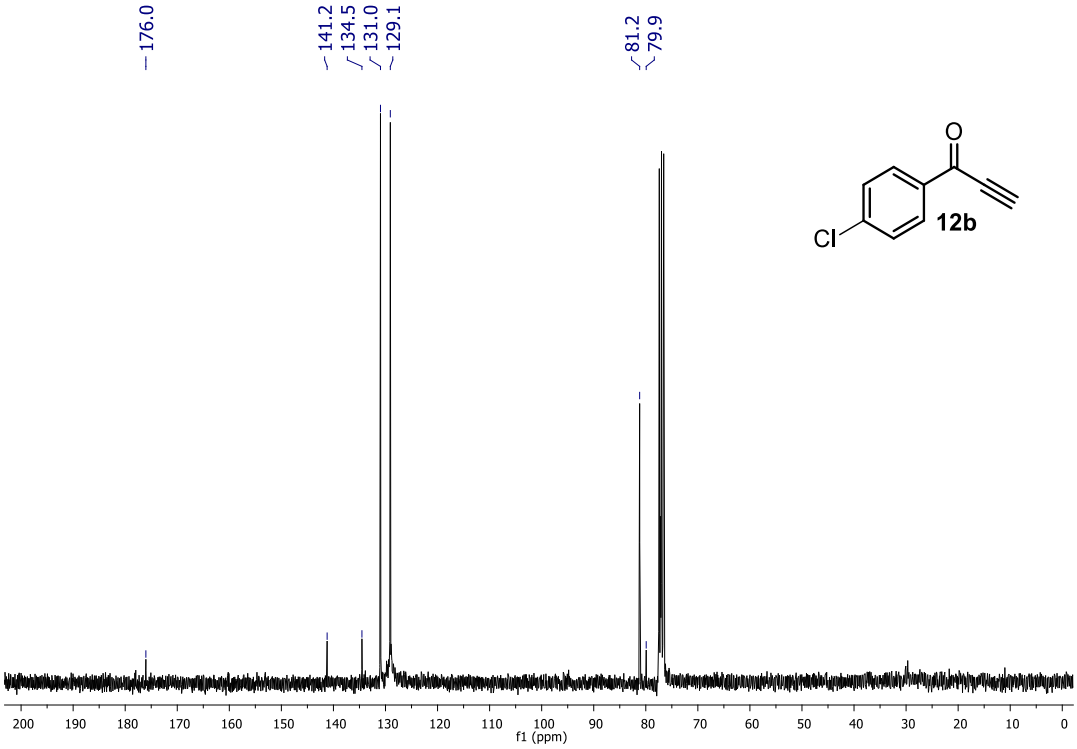


Fig. 59. Espectro de 1H da cetona 1- (furan-2-il) prop-2-in-1-ona 13b

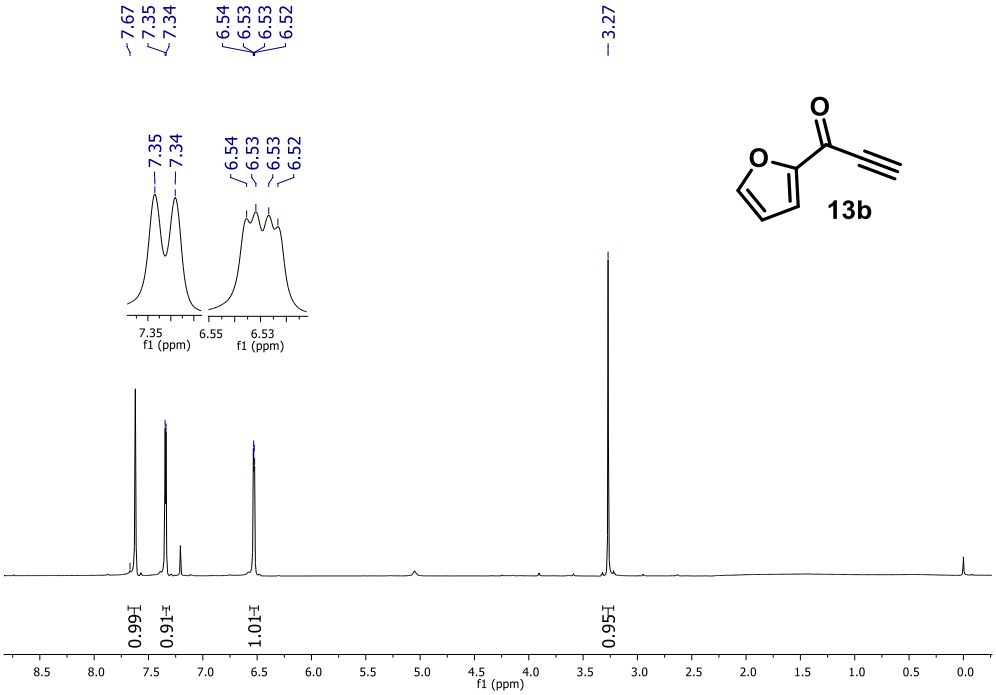


Fig. 60. Espectro de 13C da cetona 1- (furan-2-il) prop-2-in-1-ona 13b

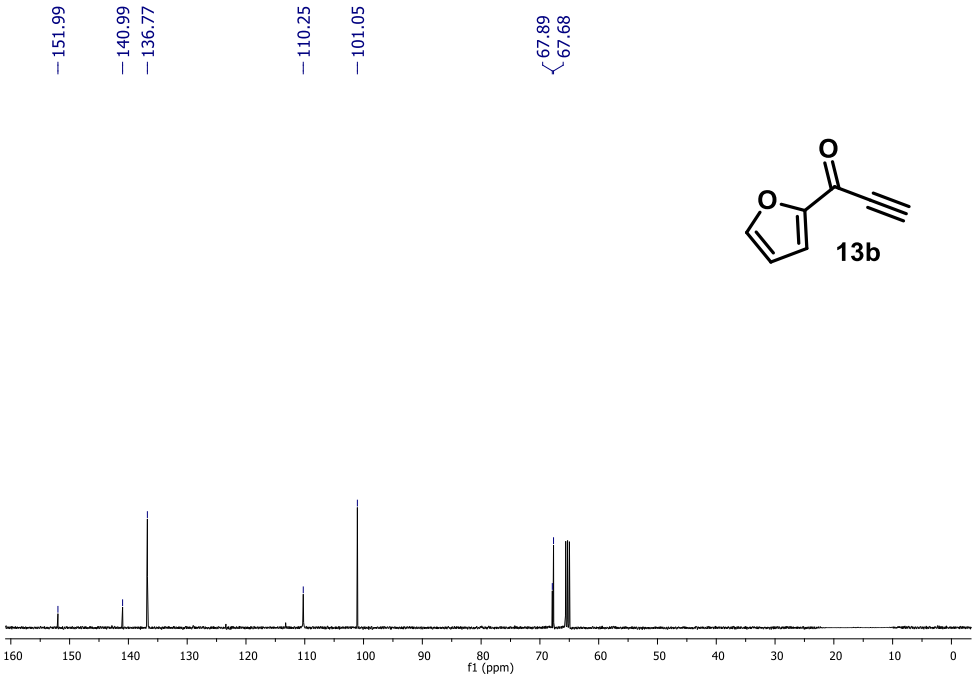


Fig. 61. Espectro de 1H da cetona dec-1-in-3-ona 15b

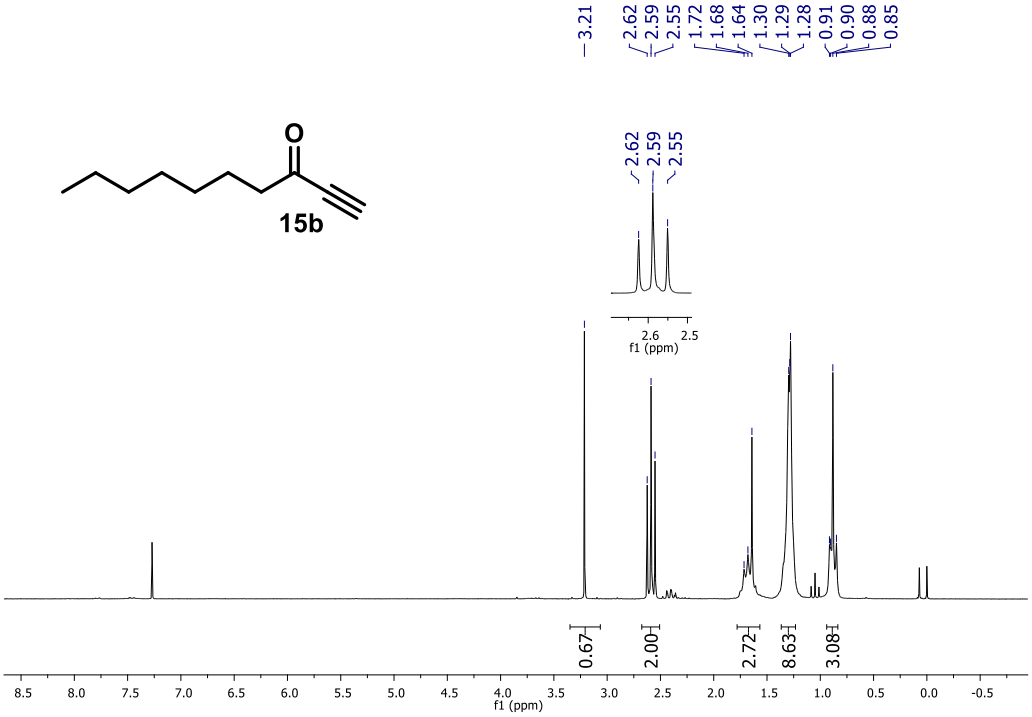


Fig. 62. Espectro de 13C da cetona dec-1-in-3-ona 15b

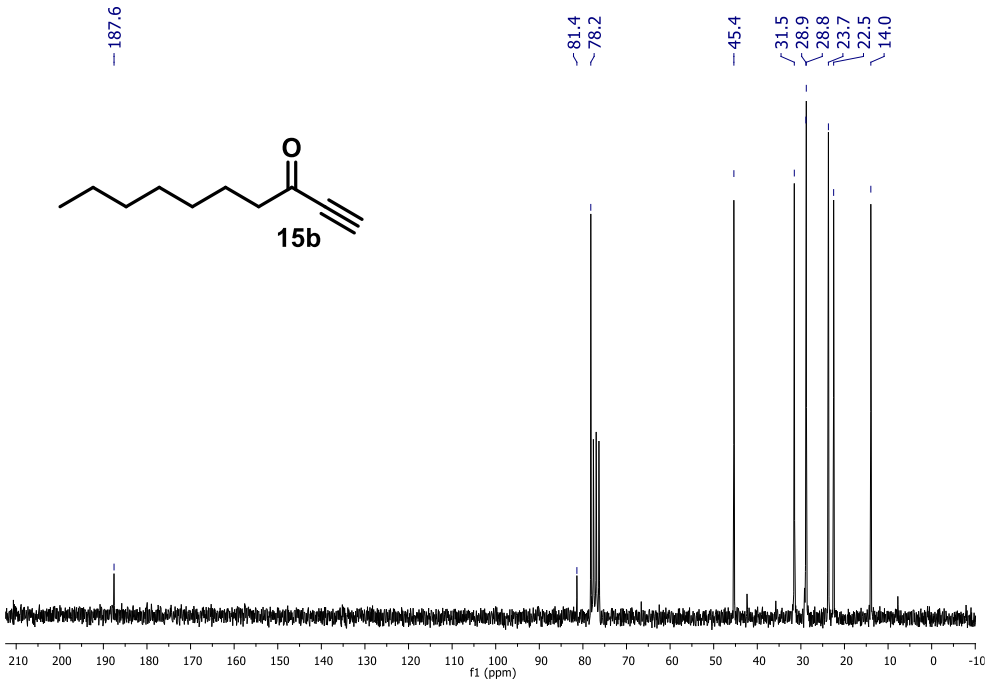


Fig. 63. Espectro de 1H da cetona (E) -1-fenilpent-1-en-4-in-3-ona 16b

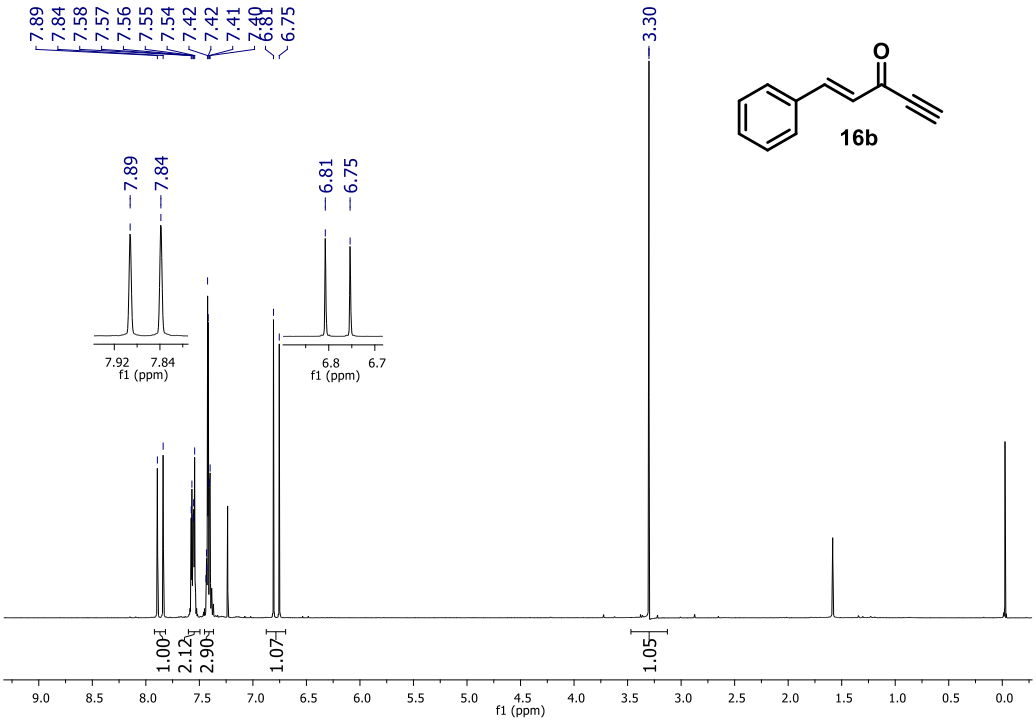


Fig. 64.Espectro de 13C da cetona (E) -1-fenilpent-1-en-4-in-3-ona 16b

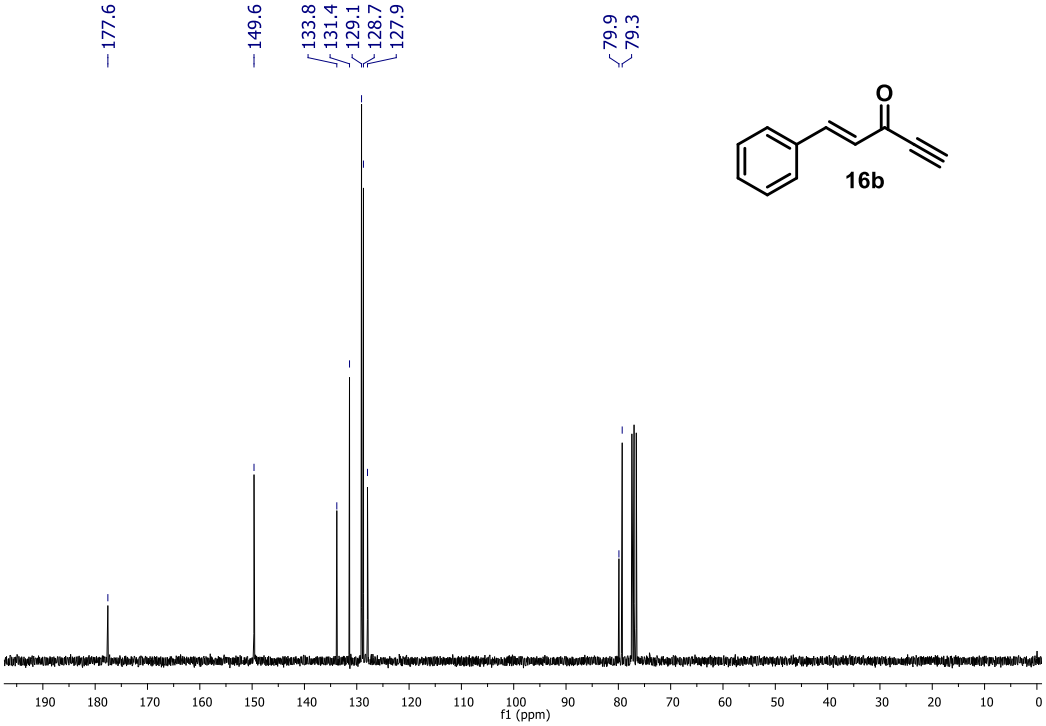


Fig. 65.Espectro de 1H da cetona (E) -6-hidroxi-1-fenil-hex-1-en-4-in-3-ona 17b

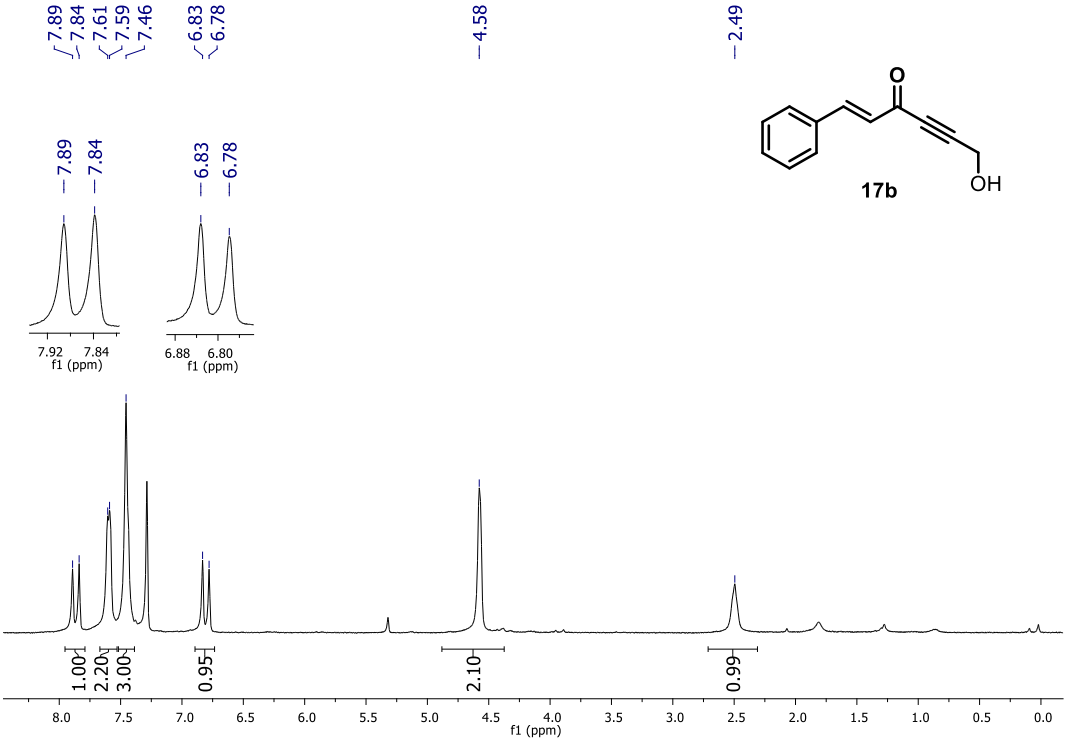


Fig. 66. Espectro de 13C da cetona (E) -6-hidroxi-1-fenil-hex-1-en-4-in-3-ona 17b

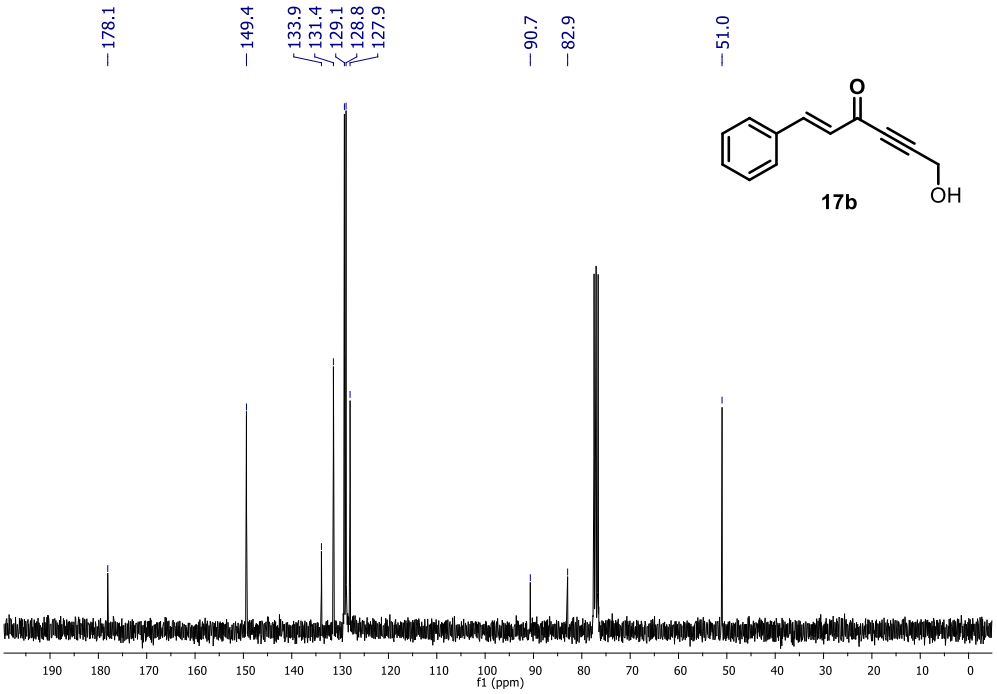


Fig. 67.Espectro de 1H da cetona 4-fenilbut-3-in-2-ona 18b

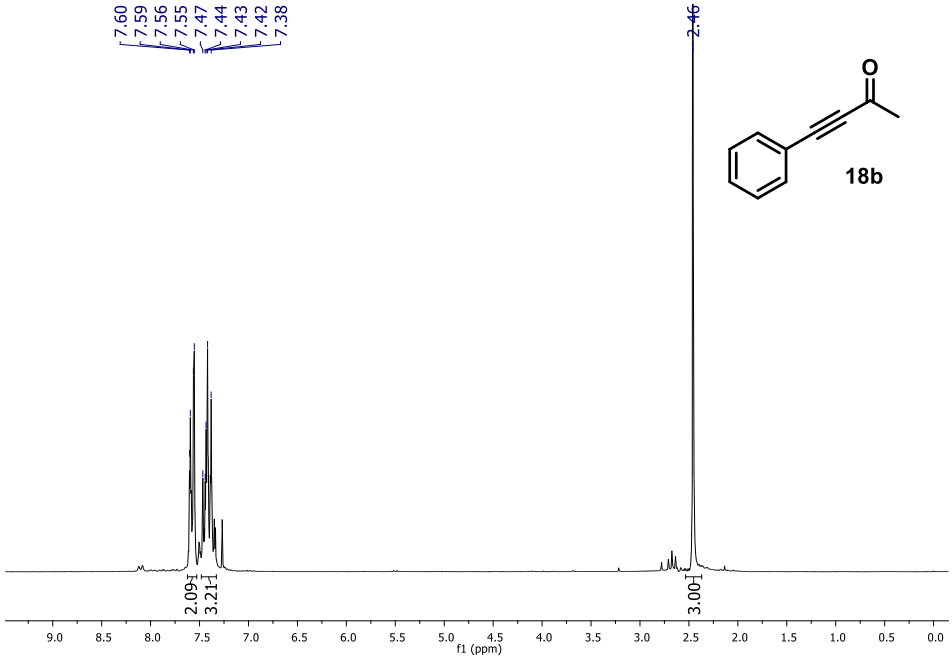


Fig. 68. Espectro de 13C da cetona 4-fenilbut-3-in-2-ona 18b

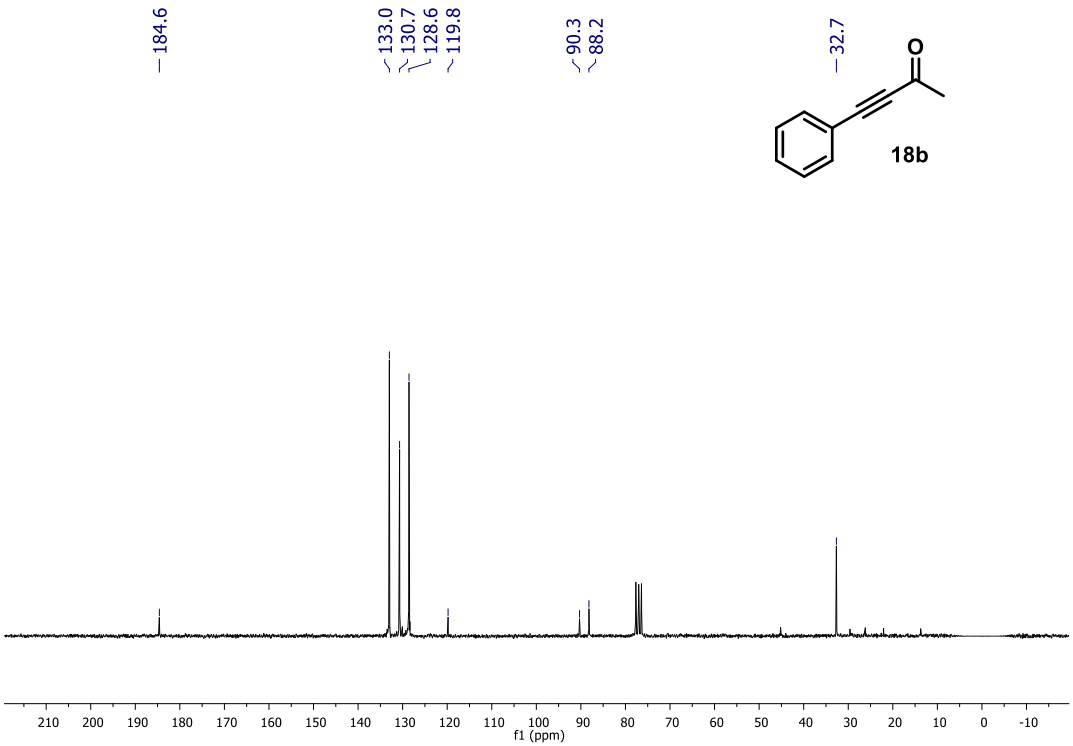


Fig. 69. Espectro de 1H da cetona 1,3-difenilprop-2-in-1-ona 19b

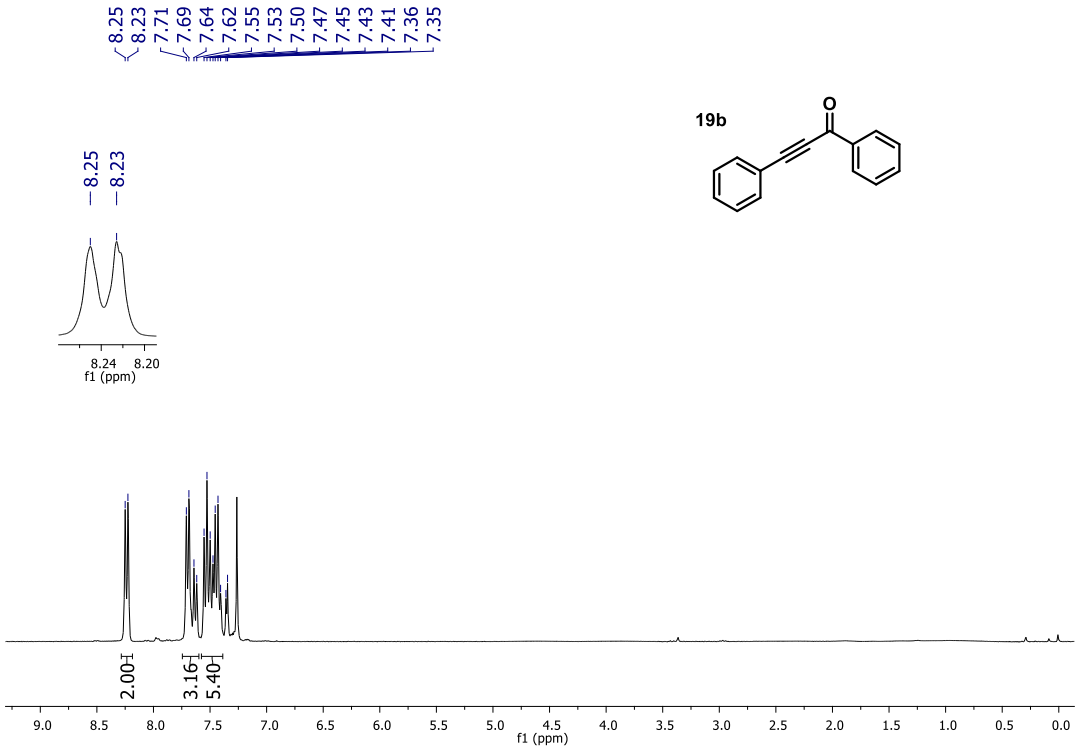


Fig. 70.Espectro de 13C da cetona 1,3-difenilprop-2-in-1-ona 19b

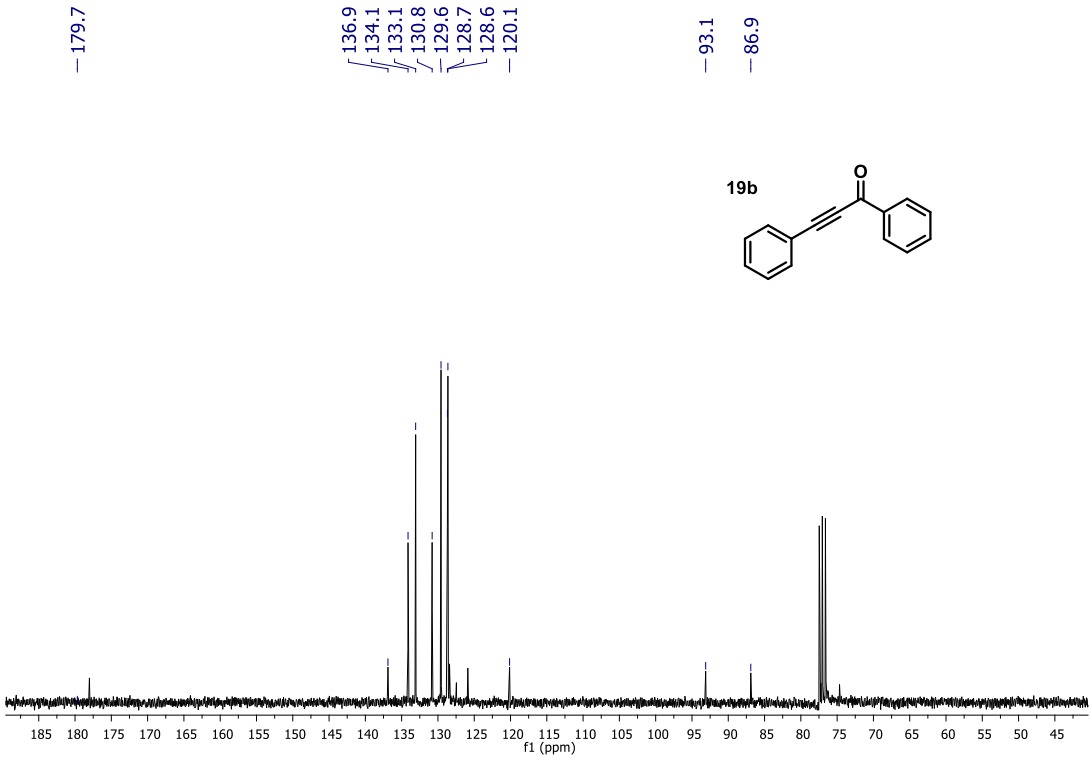


Fig. 71.Espectro de 1H da cetona (E)-1-feniloct-4-en-1-in-3-ona 20b

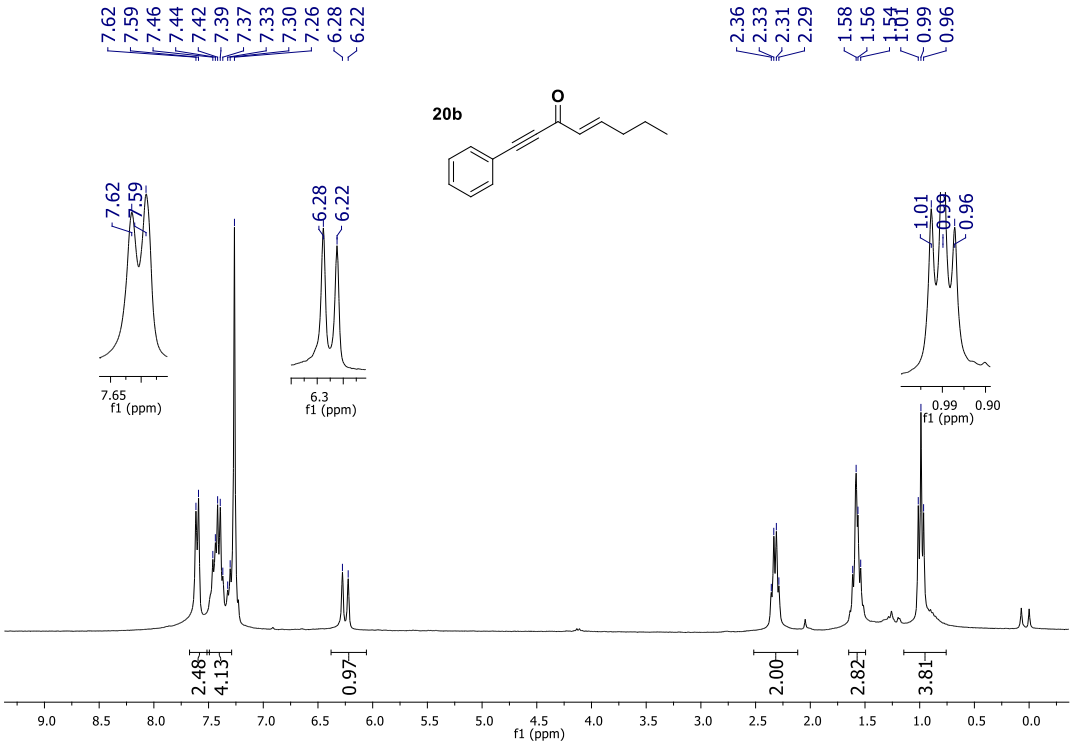


Fig. 72. Espectro de 13C da cetona (E)-1-feniloct-4-en-1-in-3-ona 20b

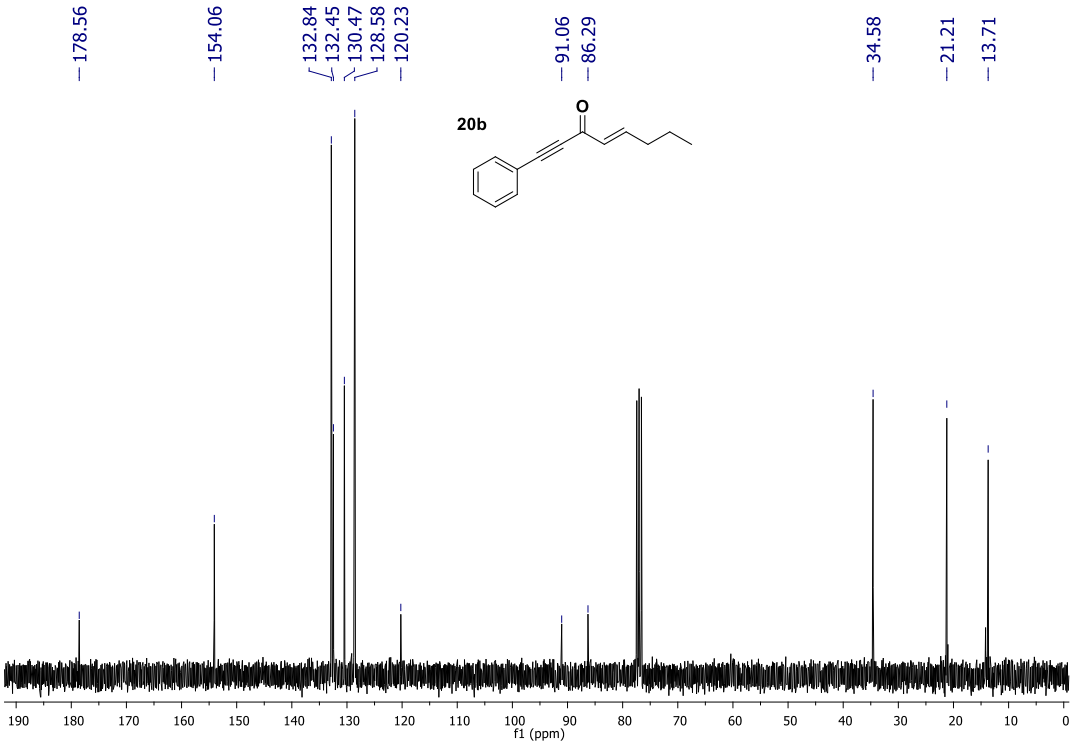


Fig. 73. Espectro de 1H da enaminona (Z) -1-fenil-3- (fenilamino) prop-2-en-1-ona 41

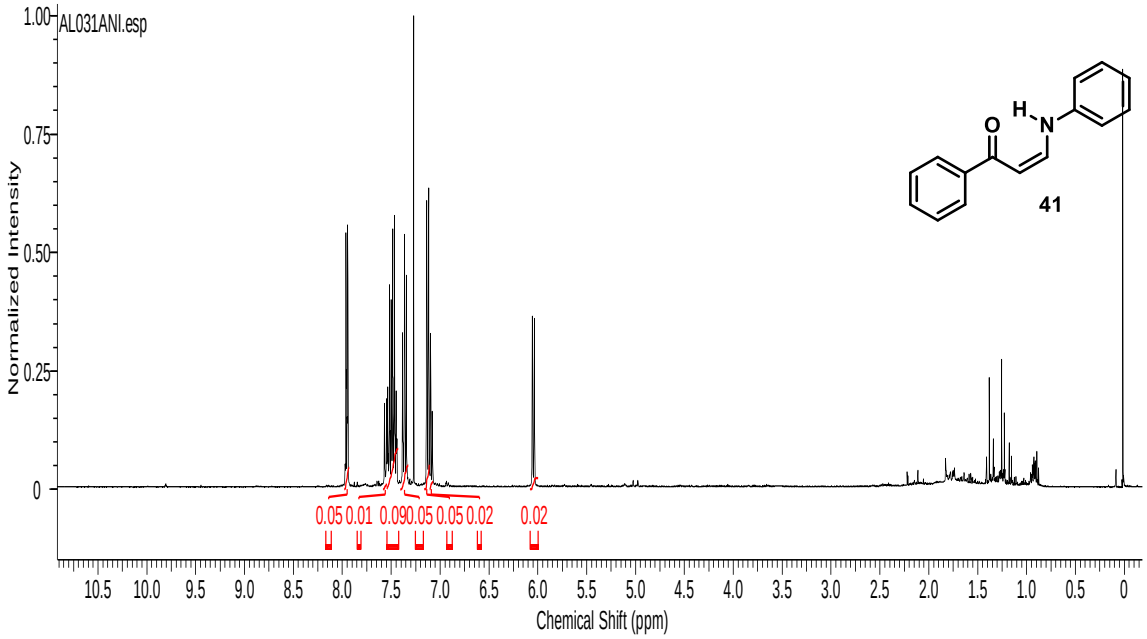


Fig. 74. Espectro de 13C da enaminona (Z) -1-fenil-3- (fenilamino) prop-2-en-1-ona 41

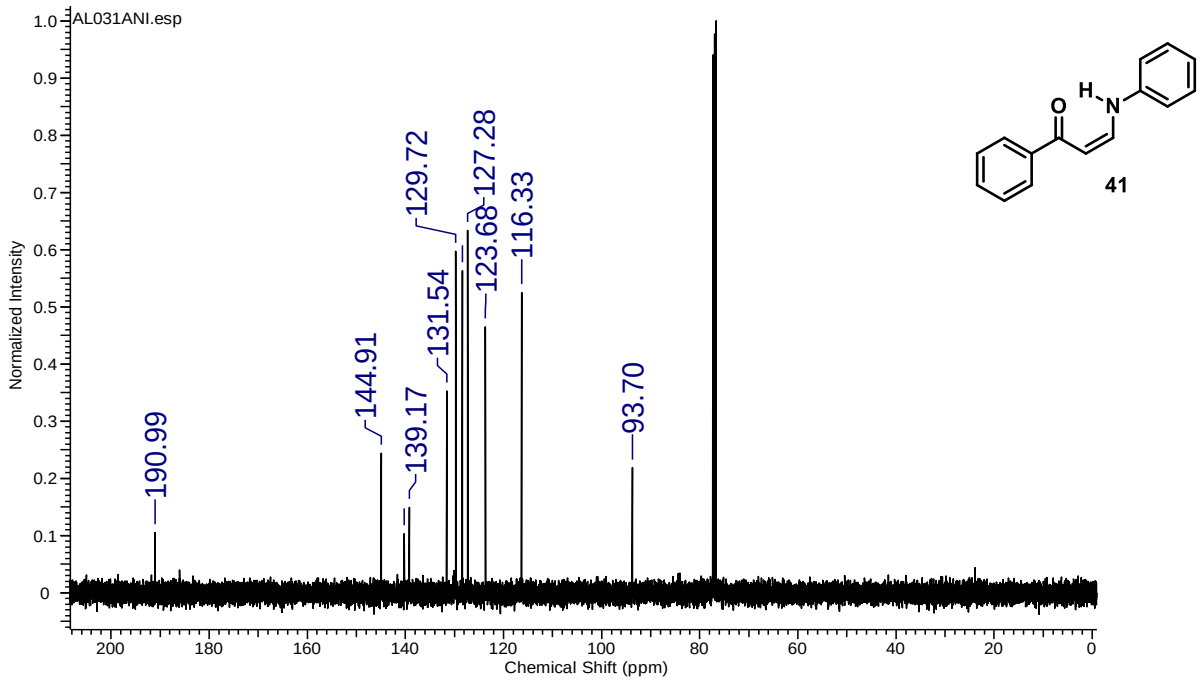


Fig. 75. Espectro de 1H da enaminona (Z) -3- (metilamino) -1-fenilprop-2-en-1-ona 42

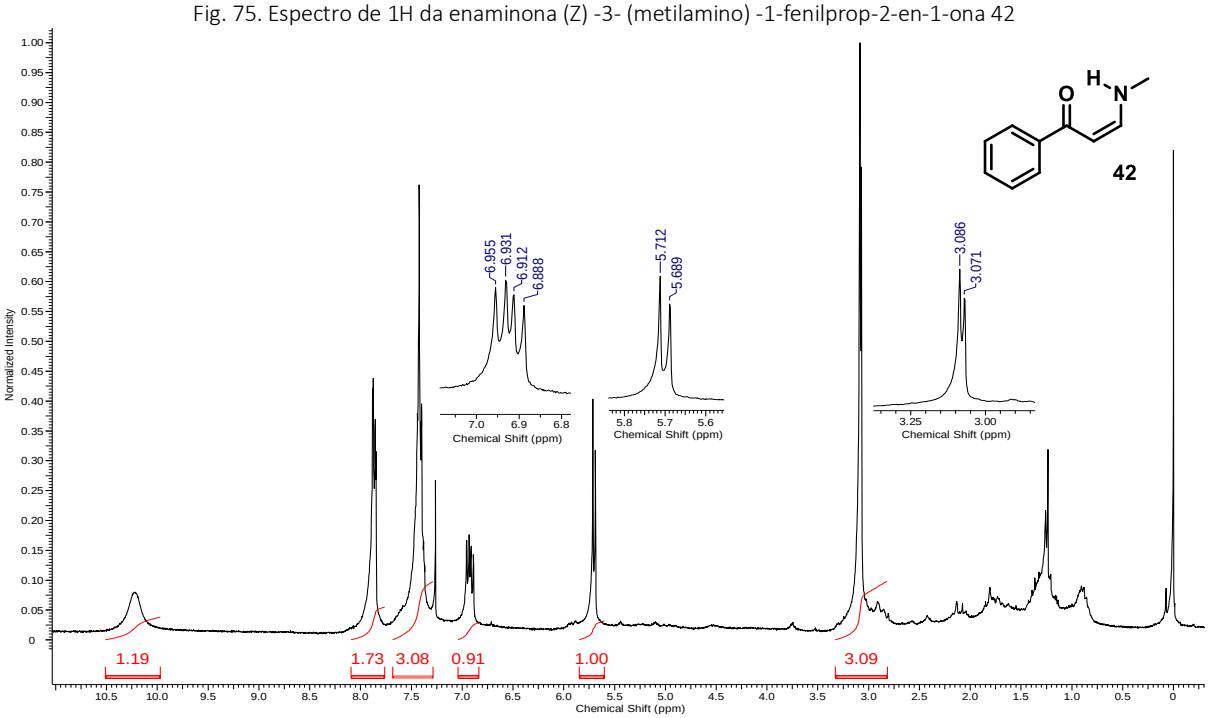


Fig. 76. Espectro de 13C da enaminona (Z) -3- (metilamino) -1-fenilprop-2-en-1-ona 42

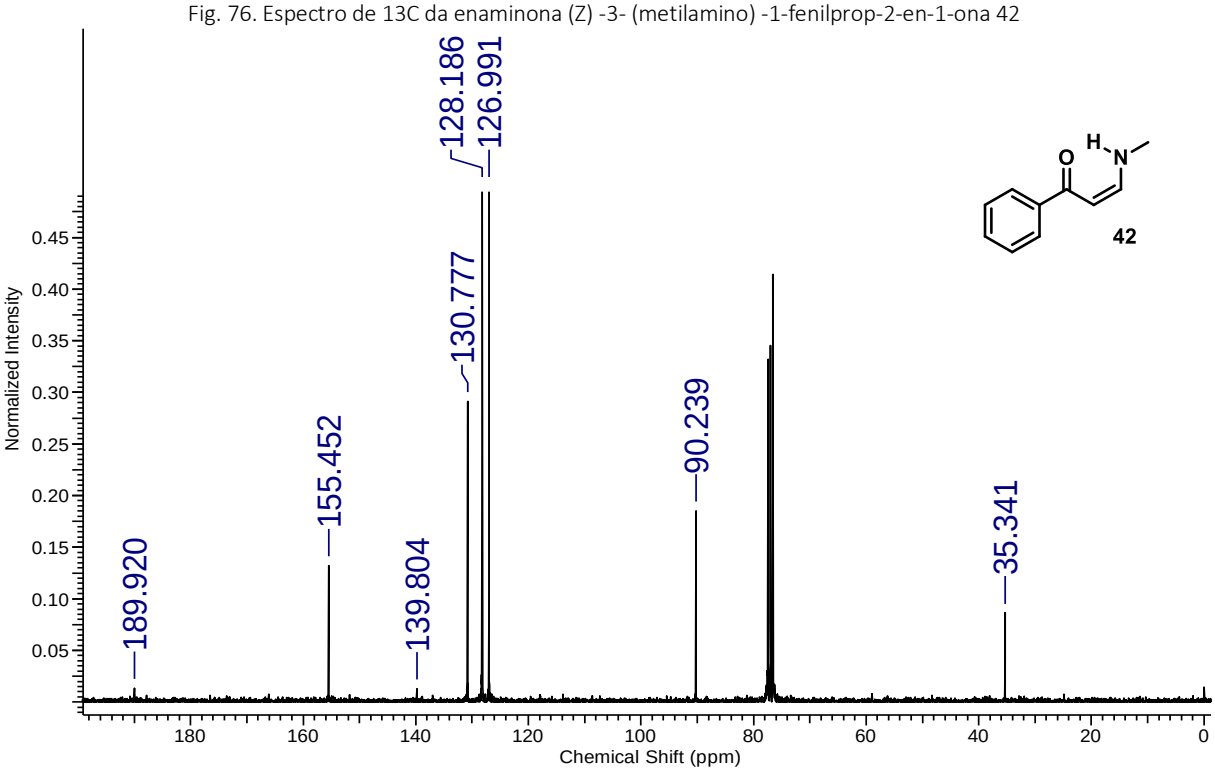


Fig. 77. Espectro de 1H do diol octa-3,5-diine-2,7-diol 50

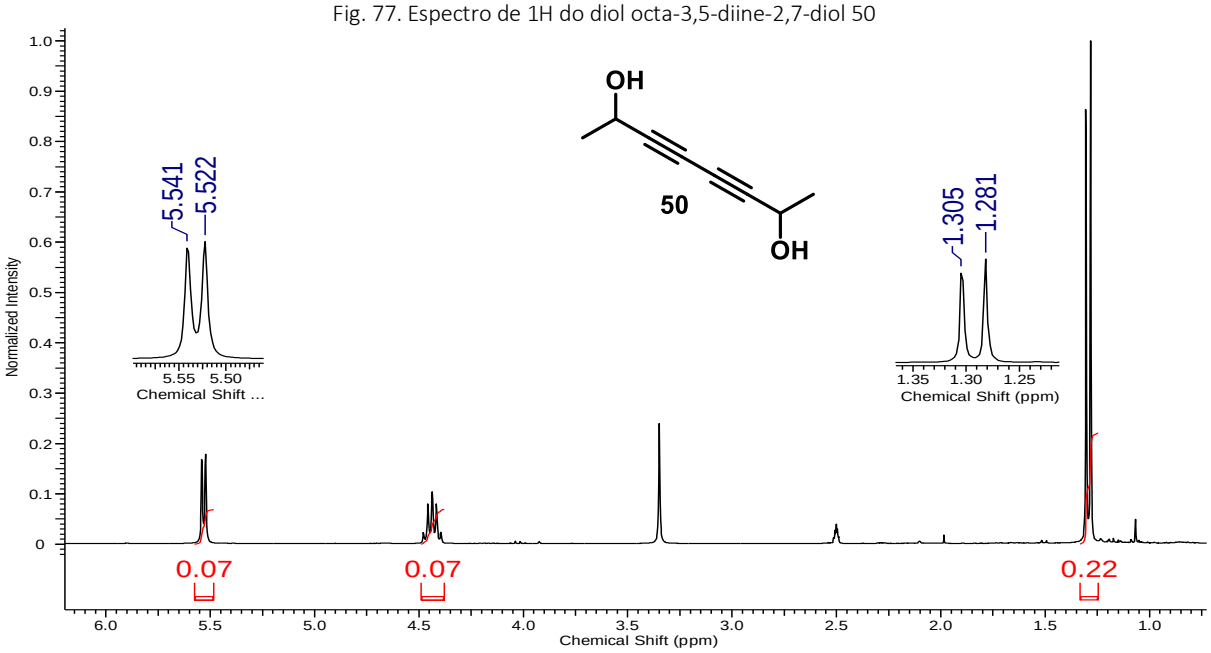


Fig. 78.Espectro de 13C do diol octa-3,5-diine-2,7-diol 50

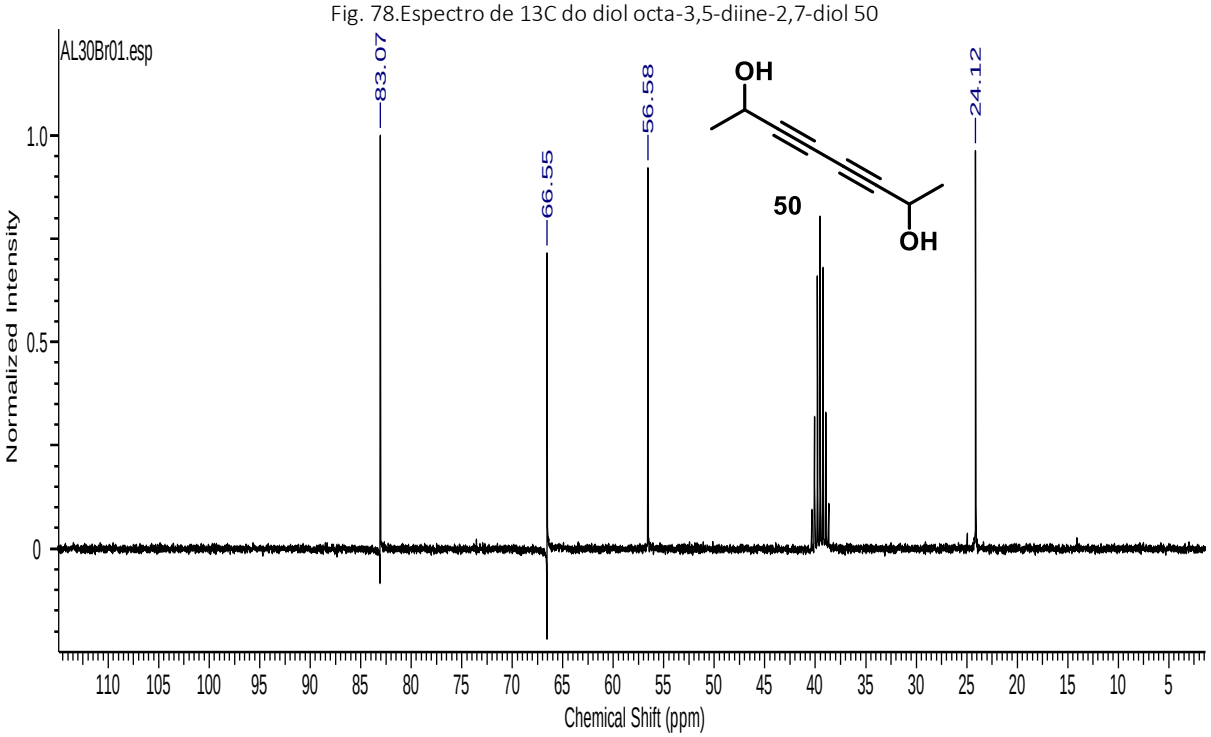


Fig. 79. Espectro de 1H da nitrila 3-oxo-3-fenilpropanenitrilo 52

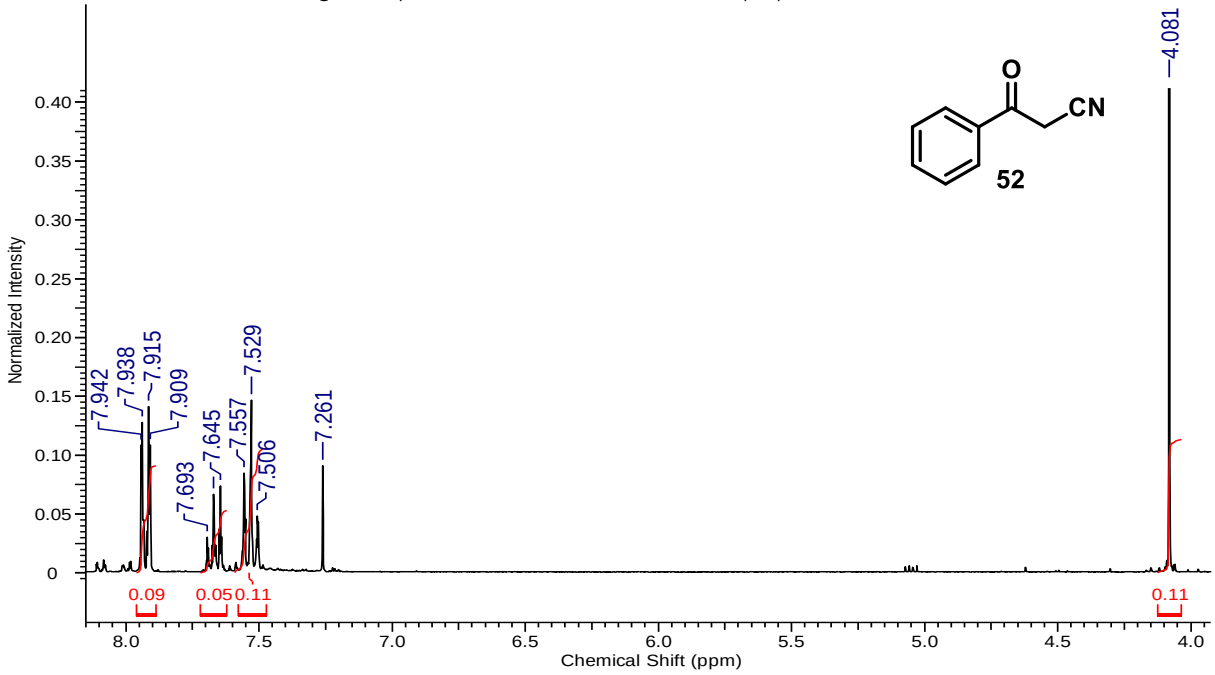


Fig. 80. . Espectro de 13C da nitrila 3-oxo-3-fenilpropanenitrilo 52

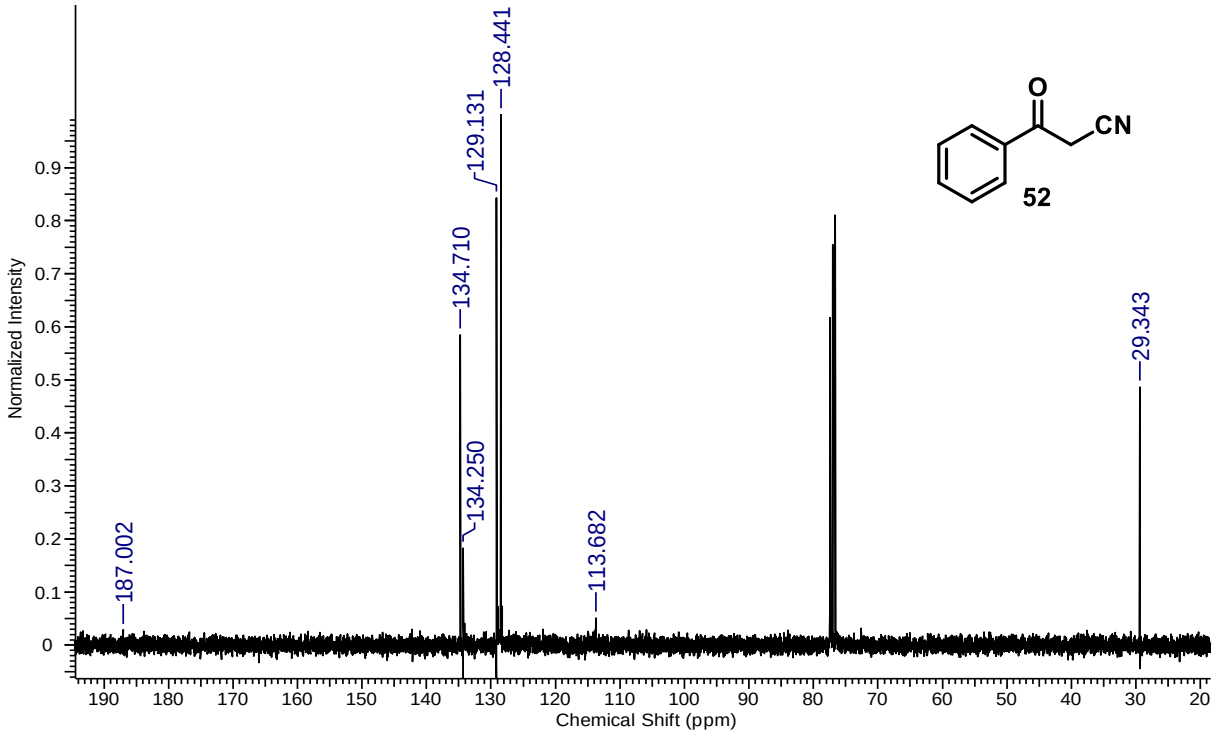


Fig. 81. Espectro de 1H da hidroxinitrila 3-hidroxi-3-fenilpropanenitrilo 54

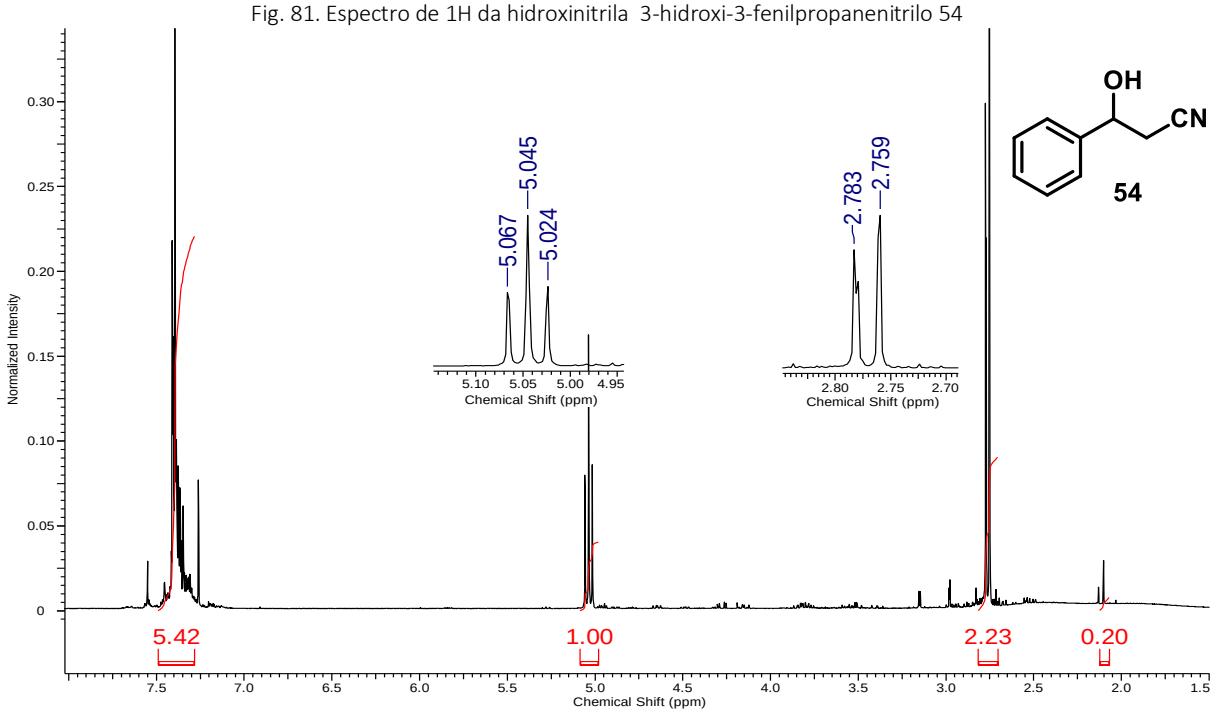
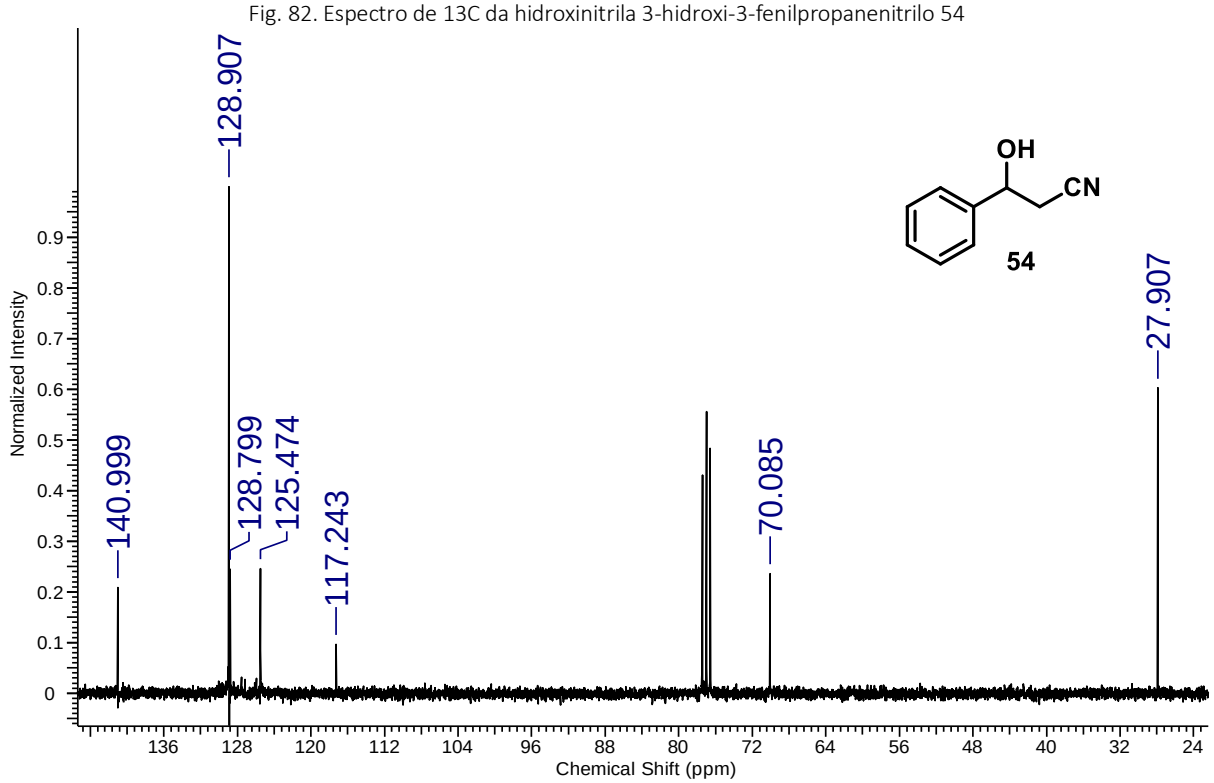


Fig. 82. Espectro de 13C da hidroxinitrila 3-hidroxi-3-fenilpropanenitrilo 54



APÊNDICE C – SEQUENCIAMENTO DO GENE DA GOX2036 – COLÔNIA 4

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
MB-1 sequence exported from MB-1.ab1	1343	1343	100%	0.0	98%	Query_153277

Alignments

MB-1 sequence exported from MB-1.ab1

Sequence ID: Query_153277 Length: 902 Number of Matches: 1
Range 1: 22 to 789

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand	Frame
1343 bits(727)	0.0()	763/780(98%)	12/780(1%)	Plus/Plus	

Features:

```
Query  1    ATGTCCCTTTCTGGAAAAATCGCCGCAGTCACGGGTGCAGCCCAGGGTATCGGCAAGGCC  60
            ||||||||||||| |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  22   ATGTCCCTTTCTGG-AAAATCGCCGCAGTCACGGGTGCAGCCCAGGGTATCGGCAAGGCC  80

Query  61   ATTGCGCTTCGTCTGGCCAAGGATGGCGCGGATGTCATCCTGCTCGACGTCAAGCAGGAC  120
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  81   ATTGCGCTTCGTCTGGCCAAGGATGGCGCGGATGTCATCCTGCTCGACGTCAAGCAGGAC  140

Query  121  ACGCTTGCCGAAACCGCAAAGGAAGTTGAAGCTCTCGGCCGGCGCGCTGTGGCCCTGACG  180
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  141  ACGCTTGCCGAAACCGCAAAGGAAGTTGAAGCTCTCGGCCGGCGCGCTGTGGCCCTGACG  200

Query  181  GCCGATATCAGCAACCGCGACCAGTTCCGCAGCACGCTGGCCGATGCAGCAAAGACGCTC  240
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  201  GCCGATATCAGCAACCGCGACCAGTTCCGCAGCACGCTGGCCGATGCAGCAAAGACGCTC  260

Query  241  GGCGGCCTGGACATCATGGTCAACAATGCGGGGATCTGTCAGGTCAAGCCGATCCTGGAC  300
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  261  GGCGGCCTGGACATCATGGTCAACAATGCGGGGATCTGTCAGGTCAAGCCGATCCTGGAC  320

Query  301  ATCGAGCCTGCGGAAATCGAGAAGATCTTCAGCATCAACGTTCAGGGCGTGCTCTGGGGC  360
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  321  ATCGAGCCTGCGGAAATCGAGAAGATCTTCAGCATCAACGTTCAGGGCGTGCTCTGGGGC  380

Query  361  ATGCAGGCGGCTGCGACCCTCTTCAAGGAGAAGGGCACCAAGGGCAAGATCATCAATGCC  420
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||    |||||||||||||||||||
Sbjct  381  ATGCAGGCGGCTGCGACCCTCTTCAAGGAGAAGGGCACCWWKGGCAAGATCATCAATGCC  440

Query  421  TGCTCGATCGCCGGCCATGAAGGCTATCCCCTTCTGGGCGCCTATTCCGCGACCAAATTC  480
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  441  TGCTCGATCGCCGGCCATGAAGGCTATCCCCTTCTGGGTGCCTATTCCGCGACCAAATTC  500

Query  481  GCCGTCCGCGCCCTGACGCAGTCGGCCGCCAAGGAACTCGCGTCCTCGGGCATTACCGTC  540
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  501  GCCGTCCGCGCCCTGACGCAGTCGGCCGCCAAGGAACTCGCGTCCTCGGGCATTACCGTC  560

Query  541  AATTCCTACTGCCCCGGCATTGTCGGAACCGACATGTGGGTCACGATCGACAAGCGCATG  600
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  561  AATTCCTACTGCCCCGGCATTGTCGGAACCGACATGTGGGTCACGATCGACAAGCGCATG  620

Query  601  GCCGAAATCACCGGTACGGAAATCGGCGCGACCTACAAGAAATACGTTGAAGGAATCGCT  660
            |||| |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  621  GCCG-AATCACCGGTACGGAAATCGGCGCGACCTACAAGAAATACGTTGAAGGAATCGCT  679

Query  661  CTTGGCCGCGTGGAGACGGCGGACGATGTGGCGGGCTTCGTCGCCTATTTGTCCAGCAGT  720
            |||||||||||| |||| ||||||||||||||||||||||||||||||| |||||||||||
Sbjct  680  CTTGGCCGCGTG-AGAC-GCGGACGATGTGGCGGGCTTCGTCGCCTATTTGT-CAGCAGT  736

Query  721  GACGCCGATTACATGACGGGTCAGTCCGTCCTGATCGACGGTGGTCTCGTTTTCCGCTGA  780
            |||||||| |||||||| |||||| ||| |||||||| ||||| |||||| | ||||||
Sbjct  737  GACGCCGAT-ACATGACGG-TCAGTC-GTC-TGATCGACG-TGGTCYCGTTT-C-GCTGA  789
```

ANEXO A - PROTOCOLO DE PURIFICAÇÃO DE DNA GENÔMICO E PLASMÍDEOS;

Protocolo de purificação de DNA genômico

Wizard® Genomic DNA Purification Kit

INSTRUCTIONS FOR USE OF PRODUCTS A1120, A1123, A1125 AND A1620.

Quick PROTOCOL

Isolation of Genomic DNA from Gram Positive and Gram Negative Bacteria

Pellet Cells

Centrifuge 1ml of overnight culture for 2 minutes at 13,000–16,000 × *g**. Discard the supernatant.

A. For Gram Positive Bacteria

1. Suspend cells in 480µl 50mM EDTA.
2. Add lytic enzyme(s) (120µl) [lysozyme and/or lysostaphin].
3. Incubate at 37°C for 30–60 minutes.
4. Centrifuge for 2 minutes at 13,000–16,000 × *g** and remove supernatant.
5. Go to Step 1, **Lyse Cells** (below).

B. For Gram Negative Bacteria

Go to Step 1, **Lyse Cells** (below).

Lyse Cells

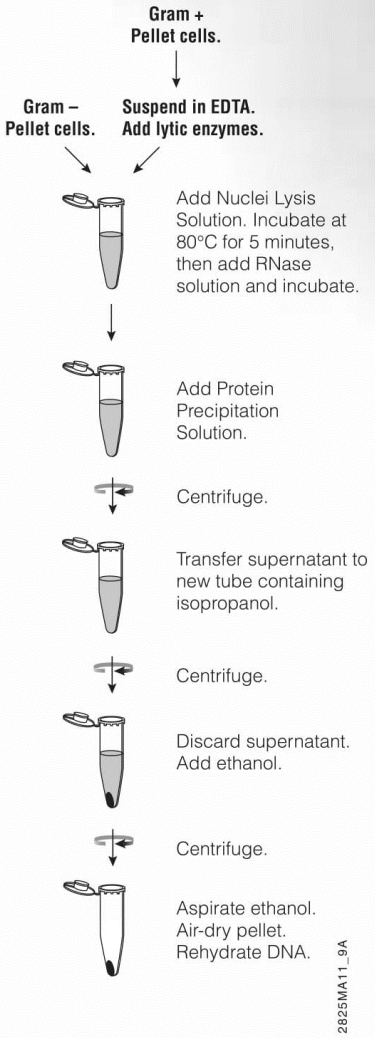
1. Add 600µl Nuclei Lysis Solution. Pipet gently to mix.
2. Incubate for 5 minutes at 80°C, then cool to room temperature.
3. Add 3µl of RNase Solution. Mix, incubate at 37°C for 15–60 minutes, then cool to room temperature.

Protein Precipitation

4. Add 200µl of Protein Precipitation Solution. Vortex.
5. Incubate on ice for 5 minutes.
6. Centrifuge at 13,000–16,000 × *g** for 3 minutes.

DNA Precipitation and Rehydration

7. Transfer the supernatant to a clean tube containing 600µl of room temperature isopropanol. Mix.
8. Centrifuge as in "Pellet Cells" above, and decant the supernatant.
9. Add 600µl of room temperature 70% ethanol. Mix.
10. Centrifuge for 2 minutes at 13,000–16,000 × *g**.
11. Aspirate the ethanol and air-dry the pellet for 10–15 minutes.
12. Rehydrate the DNA pellet in 100µl of Rehydration Solution for 1 hour at 65°C or overnight at 4°C.



*Maximum speed on a microcentrifuge.

Additional protocol information is available in Technical Manual #TM050, available online at: **www.promega.com**

ORDERING/TECHNICAL INFORMATION:
www.promega.com • Phone 608-274-4330 or 800-356-9526 • Fax 608-277-2601

Promega

©1999–2010 Promega Corporation. All Rights Reserved.

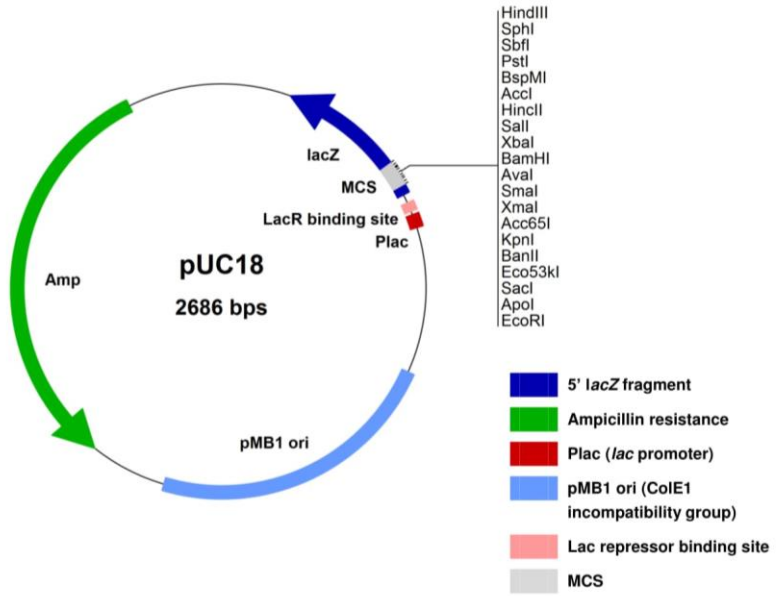
Printed in USA. Revised 10/10
Part #9FB022

Plasmídeos

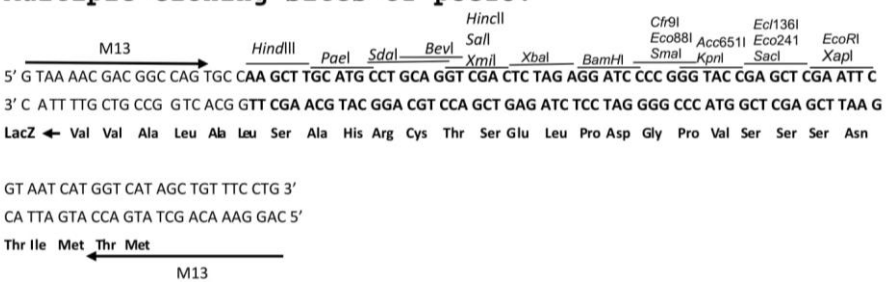
Cloning Vector pUC18

Product Information Sheet
 # V33002

Vector Map



Multiple Cloning Sites of pUC18:



pET-29a-c(+) Vectors

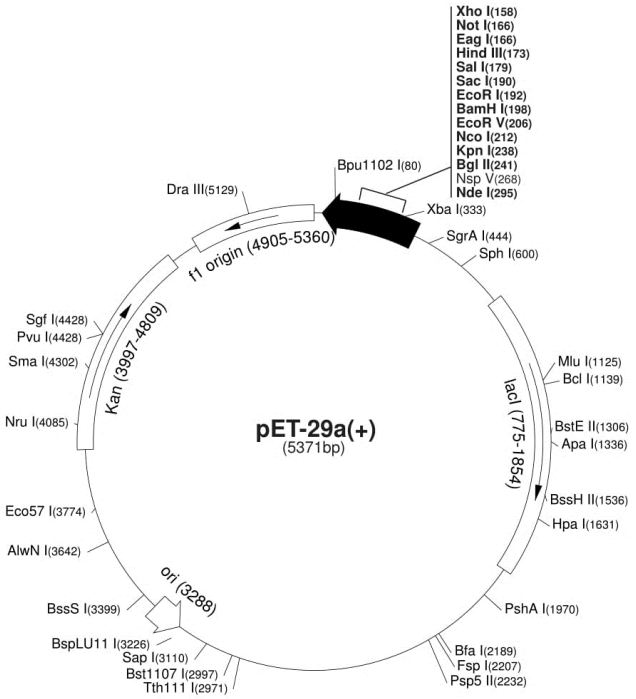
TB076 12/98

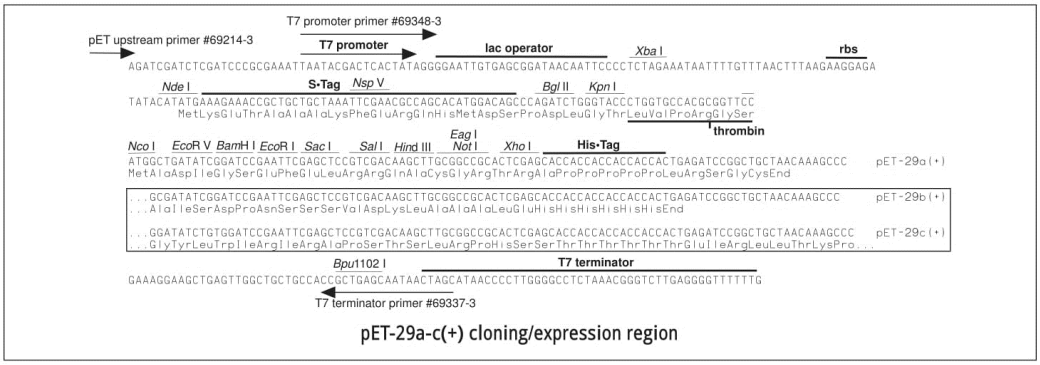
	Cat. No.
pET-29a DNA	69871-3
pET-29b DNA	69872-3
pET-29c DNA	69873-3

The pET-29a-c(+) vectors carry an N-terminal S•Tag™/thrombin con□guration plus an optional C-terminal His•Tag® sequence. Unique sites are shown on the circle map. Note that the sequence is numbered by the pBR322 convention, so the T7 expression region is reversed on the circular map. The cloning/expression region of the coding strand transcribed by T7 RNA polymerase is shown below. The f1 origin is oriented so that infection with helper phage will produce virions containing single-stranded DNA that corresponds to the coding strand. Therefore, single-stranded sequencing should be performed using the T7 terminator primer (Cat. No. 69337-3).

pET-29a(+) sequence landmarks	
T7 promoter	368-384
T7 transcription start	367
S•Tag coding sequence	249-293
Multiple cloning sites (*Nco* I - *Xho* I)	158-217
His•Tag coding sequence	140-157
T7 terminator	26-72
lacI coding sequence	775-1854
pBR322 origin	3288
Kan coding sequence	3997-4809
f1 origin	4905-5360

The maps for pET-29b(+) and pET-29c(+) are the same as pET-29a(+) (shown) with the following exceptions: pET-29b(+) is a 5370bp plasmid; subtract 1bp from each site beyond *Bam*H I at 198. pET-29c(+) is a 5372bp plasmid; add 1bp to each site beyond *Bam*H I at 198.





pET-29a-c(+) cloning/expression region

pET-28a-c(+) Vectors

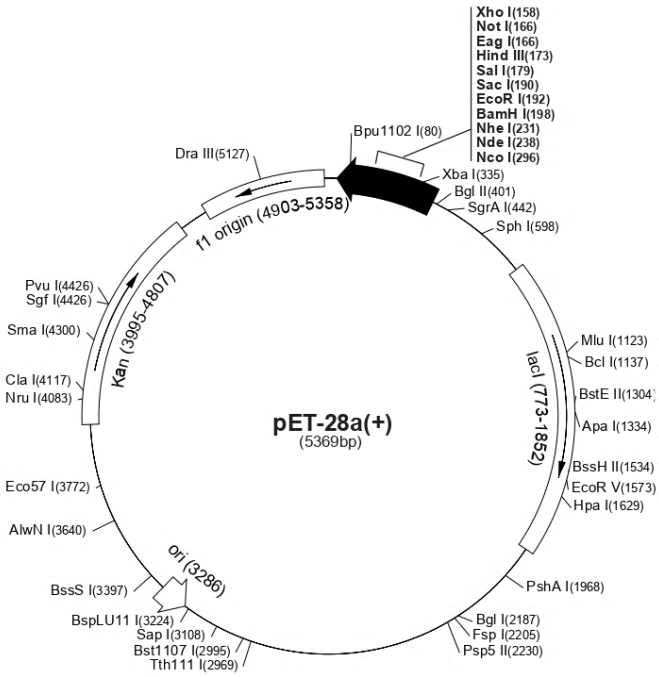
TB074 12/98

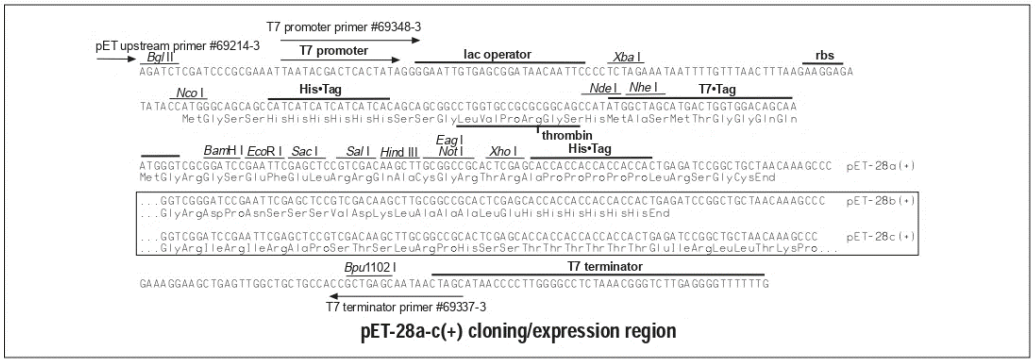
	Cat. No.
pET-28a DNA	69864-3
pET-28b DNA	69865-3
pET-28c DNA	69866-3

The pET-28a-c(+) vectors carry an N-terminal His•Tag®/thrombin/T7•Tag® configuration plus an optional C-terminal His•Tag sequence. Unique sites are shown on the circle map. Note that the sequence is numbered by the pBR322 convention, so the T7 expression region is reversed on the circular map. The cloning/expression region of the coding strand transcribed by T7 RNA polymerase is shown below. The f1 origin is oriented so that infection with helper phage will produce virions containing single-stranded DNA that corresponds to the coding strand. Therefore, single-stranded sequencing should be performed using the T7 terminator primer (Cat. No. 69337-3).

pET-28a(+) sequence landmarks	
T7 promoter	370-386
T7 transcription start	369
His•Tag coding sequence	270-287
T7•Tag coding sequence	207-239
Multiple cloning sites (*Bam*H I - *Xho* I)	158-203
His•Tag coding sequence	140-157
T7 terminator	26-72
lacI coding sequence	773-1852
pBR322 origin	3286
Kan coding sequence	3995-4807
f1 origin	4903-5358

The maps for pET-28b(+) and pET-28c(+) are the same as pET-28a(+) (shown) with the following exceptions: pET-28b(+) is a 5368bp plasmid; subtract 1bp from each site beyond *Bam*H I at 198. pET-28c(+) is a 5367bp plasmid; subtract 2bp from each site beyond *Bam*H I at 198.





pET-28a-c(+) cloning/expression region