

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ  
CENTRO DE CIÊNCIAS  
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ORGÂNICA E INORGÂNICA  
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

**TASSO GABRIEL COELHO MONTENEGRO**

**SÍNTESE QUIMIOENZIMÁTICA DE DERIVADOS DO CLORANFENICOL E  
TIANFENICOL E ESTUDO QUÍMICO BIOGUIADO DE FUNGOS  
ASSOCIADOS À ASCÍDIA *EUDISTOMA VANNAMEI***

**FORTALEZA – CEARÁ  
2011**

**TASSO GABRIEL COELHO MONTENEGRO**

**SÍNTESE QUIMIOENZIMÁTICA DE DERIVADOS DO CLORANFENICOL E  
TIANFENICOL E ESTUDO QUÍMICO BIOGUIADO DE FUNGOS  
ASSOCIADOS À ASCÍDIA *EUDISTOMA VANNAMEI***


**Tese Apresentada Curso de Doutorado em  
Química do Departamento de Química  
Orgânica e Inorgânica da Universidade Federal  
do Ceará, como requisito para obtenção do  
grau de Doutor em Química.**

**Área de concentração Química Orgânica**

**Orientadora: Maria da Conceição Ferreira de  
Oliveira**

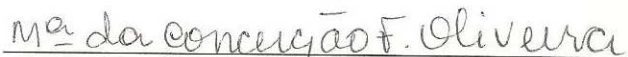
**FORTALEZA – CEARÁ  
2011**

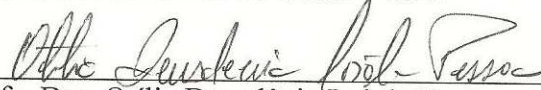
Esta Tese foi aprovada como parte dos requisitos necessários à obtenção do Grau de Doutor em Química, outorgado pela Universidade Federal do Ceará, em cuja Biblioteca de Ciências e Tecnologia/UFC encontra-se à disposição dos interessados.

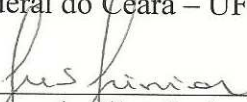
  
Tasso Gabriel Coelho Montenegro


TESE APROVADA EM: 24/10/2011

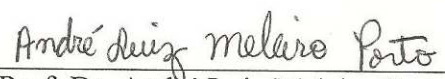
EXAMINADORES:

  
Prof. Dra. Maria da Conceição Ferreira de Oliveira  
Universidade Federal do Ceará – UFC

  
Prof. Dra. Otilia Deusdênia Loiola Pessoa  
Universidade Federal do Ceará – UFC

  
Prof. Dr. José Nunes da Silva Junior  
Universidade Federal do Ceará – UFC

  
Prof. Dr. Leandro Helgueira de Andrade  
Universidade de São Paulo – (USP)

  
Prof. Dr. André Luiz Meleiro Porto  
Universidade de São Paulo – (USP)

A Deus

Aos meus pais, Vansier e Onofrisa

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela vida, a graça e capacidade que me concedeu.

A meus pais, José Vansier Del Mar Montenegro Pinheiro e Onofrisa Coelho Montenegro, pelo apoio constante em cada passo dessa caminhada, aos meus irmãos, Samuel, Raphael e Gaby por estarem sempre a meu lado.

A minha orientadora, professora Maria da Conceição Ferreira de Oliveira, pelos ensinamentos e por acreditar em minha vontade de vencer mais essa barreira na construção de meu caminho e aperfeiçoamento acadêmico, disponibilidade e exemplo, tanto de pessoa como de profissional.

A Minha namorada Natália Nogueira Saraiva pela ajuda, atenção, incentivo, carinho, respeito, amizade.....

A todos os professores do Curso de Pós-Graduação em Química Orgânica da Universidade Federal do Ceará, responsáveis direta ou indiretamente por minha formação.

Aos professores: Jair Mafezoli (UFC), Vânia Maria Maciel Melo (UFC), Letícia Veras Costa Lotufo (UFC), Mary Anne Sousa Lima (UFC), Edson Rodrigues Filho (UFSCar), Vicente Gotor Santamaria (Uniovi), Vicente Gotor Fernandez (Uniovi) e Ivan Lavandeira (Uniovi) pela contribuição no desenvolvimento do trabalho.

A todos os meus amigos de curso, Bartholomeu, Daniel, Fátima, Gizelle, Jackson, Neto, Praxedes, Ricardo, Reinaldo, Francisco, André, Max, Diego, Isabel, Conceição, Bruna, Carol, Barbara, Sebastião e Leandro que foram de fundamental importância em minha jornada.

Aos colegas do RMN e Massa pelos espectros obtidos.

Aos funcionários do Departamento de Química Orgânica e Inorgânica pelos serviços prestados.

A CAPES, CNPq e FUNCAP, pelo apoio financeiro.

## RESUMO

Este trabalho descreve: 1) síntese quimioenzimática de ésteres do cloranfenicol (1) e tianfenicol (2), utilizando lipases como fonte biocatalítica; 2) avaliação do potencial antitumoral de fungos marinhos isolados da ascídia *Eudistoma vannamei*. Na primeira parte, realizou-se a síntese enzimática de dois derivados monoacilados de cloranfenicol (1), através de reações de hidrólise de derivados diacilados, e oito derivados monoacilados do tianfenicol (2), pela acilação e hidrólise enzimática do tianfenicol e derivados diacilados, respectivamente. Os seguintes parâmetros foram variados: enzima, solvente, temperatura, pH e proporção entre solvente e agente hidrolítico e, na hidrólise enzimática dos derivados de cloranfenicol diacilados, os melhores resultados foram com a mistura de CH<sub>3</sub>CN:tampão fosfato (pH 7) na proporção de 20:80, CAL-B como biocatalisador, temperatura de 20 °C, agitação de 250 rpm e tempo reacional de 24 h. A reação de acilação enzimática do tianfenicol (2), utilizando CAL-B como biocatalisador e ésteres vinílicos como doadores de grupos acila, se mostrou bastante eficiente, com altos índices de conversão e seletividade. Os processos forneceram unicamente os produtos de acilação da hidroxila menos impedida (3'-OH). A eficiência da enzima CAL-B reciclada na reação de acilação do tianfenicol (2) foi investigada, sendo possível concluir que esta se mantém ativa durante os cinco processos reacionais testados. A hidrólise enzimática dos derivados diacilados do tianfenicol forneceu, majoritariamente, os produtos de hidrólise na posição 3. Na segunda parte do trabalho, foram isoladas 11 cepas fúngicas (EV1 a EV11) da ascídia *E. vannamei*, as quais foram cultivadas em meio líquido BD (batata-dextrose) com objetivo de realizar um estudo bioguiado através da avaliação da atividade citotóxica de seus extratos e frações. Foram ensaiados os extratos acetotílico do meio líquido e metanólico do micélio, previamente separados. Os extratos mais ativos foram os oriundos de EV10 e EV11, os quais foram identificados como *Aspergillus* sp. por análise molecular. O fungo EV10 foi cultivado em grande escala para fracionamento bioguiado e isolamento dos metabólitos secundários bioativos. Foi possível isolar quatro micotoxinas: meleína, *cis*-4-hidroximeleína, *trans*-4-hidroximeleína e ácido penicílico, dentre as quais, somente o ácido penicílico foi identificado como responsável pela atividade do extrato.

Palavras-chave: cloranfenicol, tianfenicol, *Eudistoma vannamei*, fungo marinho, *Aspergillus* sp., ácido penicílico, atividade antitumoral.

## ABSTRACT

This work describes: 1) chemoenzymatic synthesis of chloramphenicol (**1**) and thiamphenicol (**2**) esters, using lipases as biocatalyst source; 2) investigation of the antitumor potential of fungi isolated from the marine ascidian *Eudistoma vancouveriense*. In the first part, it was carried out the enzymatic synthesis of two monoacyl derivatives of chloramphenicol (**1**), through the hydrolysis of the diacyl derivatives, and eight monoacyl derivatives of thiamphenicol (**2**), by the enzymatic acylation and hydrolysis of thiamphenicol and diacyl derivatives, respectively. The following parameters were varied: enzyme, solvent, temperature, pH and proportion between solvent and agent hydrolytic, and in enzymatic hydrolysis of the diacyl derivatives of chloramphenicol, the best results were reached when using a mixture of CH<sub>3</sub>CN: phosphate buffer (pH 7) in the proportion 20:80, CAL-B as biocatalyst, temperature of 20 ° C, 250 rpm and reaction time of 24 h. The enzymatic acylation of thiamphenicol (**2**), using CAL-B as biocatalyst and vinyl esters as acyl donor groups, was very efficient, with high conversion and selectivity. The processes provided only products of the acylation of the less hindered hydroxyl group (3'-OH). The efficiency of the recycled CAL-B in the acylation of thiamphenicol (**2**) was investigated, being possible to conclude that its activity was maintained during the five tested reactions. Enzymatic hydrolysis of diacylated derivatives of thiamphenicol, provided mostly the hydrolysis products in position 3. In the second part of this work, we isolated 11 fungal strains (EV1 to EV11) associated to the ascidian *E. vancouveriense*, which were cultivated in liquid BD (potato dextrose) in order to conduct a bioguided study by evaluating the cytotoxic activity of their extracts and fractions. The ethylacetate extracts of the liquid medium and methanol extracts from the mycelium, previously separate, were assayed and the most active extracts were those from EV10 and EV11, which were identified as *Aspergillus* sp. by molecular analysis. EV10 was grown on a larger scale allowing the bioguided fractionation and isolation of bioactive secondary metabolites. It was possible to isolate four mycotoxins: mellein, *cis*-4-hydroxymellein, *trans*-4-hydroxymellein and penicillic acid, among which only the later compound was identified as responsible for the activity of the extract.

**Keywords:** chloramphenicol, thiamphenicol, *Eudistoma vancouveriense*, marine fungus, *Aspergillus* sp., penicillic acid, antitumor activity.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estruturas do clorafenicol ( <b>1</b> , R = NO <sub>2</sub> ) e tianfenicol ( <b>2</b> , R = SO <sub>2</sub> Me) .....	20
Figura 2 – Enantiopreferência prevista por Klazlaukas para reações de acilação de alcoóis e hidrólise de ésteres racêmicos (GOTOR-FERNÁNDEZ, BRIEVA & GOTOR, 2006). .....	20
Figura 3 - Produtos de biotransformação de cloranfenicol ( <b>1</b> ) por esporos e células inteiras de <i>Streptomyces griseus</i> (EL-KERSH & PLOURDE, 1976). .....	26
Figura 4 – A) Espectro de RMN <sup>1</sup> H de <b>1</b> , MeOD, 300 MHz; B) Espectro de RMN <sup>1</sup> H de <b>1a</b> , CDCl <sub>3</sub> , 300 MHz; C) Espectro de RMN <sup>13</sup> C de <b>1a</b> , CDCl <sub>3</sub> , 75 MHz. ....	30
Figura 5 - A) Espectro de RMN <sup>1</sup> H de <b>2a</b> , CDCl <sub>3</sub> , 300 MHz; B) Espectro de RMN <sup>13</sup> C de <b>2a</b> , CDCl <sub>3</sub> , 75 MHz. ....	31
Figura 6 - A) Espectro de RMN <sup>1</sup> H de <b>1b</b> , CDCl <sub>3</sub> , 300 MHz; B) Espectro de RMN <sup>13</sup> C de <b>1b</b> , CDCl <sub>3</sub> , 75 MHz. ....	32
Figura 7 - A) Espectro de RMN <sup>1</sup> H de <b>2b</b> , CDCl <sub>3</sub> , 300 MHz; B) Espectro de RMN <sup>13</sup> C de <b>2b</b> , CDCl <sub>3</sub> , 75 MHz. ....	33
Figura 8 - A) Espectro de RMN <sup>1</sup> H de <b>1c</b> , CDCl <sub>3</sub> , 300 MHz; B) Espectro de RMN <sup>13</sup> C de <b>1c</b> , CDCl <sub>3</sub> , 75 MHz.....	34
Figura 9 - A) Espectro de RMN <sup>1</sup> H de <b>2c</b> , CDCl <sub>3</sub> , 300 MHz; B) Espectro de RMN <sup>13</sup> C de <b>2c</b> , CDCl <sub>3</sub> , 75 MHz.....	35
Figura 10 - Espectro de RMN <sup>1</sup> H de <b>1f</b> , CDCl <sub>3</sub> , 300 MHz. ....	36
Figura 11 – Cromatogramas das reações de hidrólise de <b>1a</b> utilizando como solvente orgânico: A) CH <sub>3</sub> CN; B) 1,4-dioxano; C) THF, a 30 °C de temperatura.....	38
Figura 12 - Cromatogramas das reações de hidrólise de <b>1a</b> utilizando como solvente orgânico: A) CH <sub>3</sub> CN; B) 1,4-dioxano; C) THF, a 20 °C de temperatura.....	40
Figura 13 - Cromatograma das reações de hidrólise de <b>1a</b> , pH do tampão: A) 5,5; B) 6,0; C) 6,5 a 20 °C de temperatura. ....	42
Figura 14 - Cromatograma das reações de hidrólise de <b>1a</b> , pH do tampão: A) 7,5; B) 8,0; C) 8,5 a 20 °C de temperatura. ....	43
Figura 15– Cromatogramas das reações de Hidrólise de <b>1a</b> , utilizando as proporções de solventes/tampão: A) 0,5:95, B) 10:90, C) 50: 50, D) 80:20 .....	45
Figura 16 – Cromatogramas das reações de hidrólise de: A) <b>1b</b> , B) <b>1c</b> , C) <b>1d</b> , D) <b>1e</b> , E) <b>1f</b> .....	47



Figura 17 – Espectros de RMN <sup>1</sup> H de: A) <b>2</b> , MeOD, 300 MHz; B) <b>4a</b> , CDCl <sub>3</sub> , 300MHz. .....	50
Figura 18 - Espectro de RMN <sup>13</sup> C de <b>4a</b> , CDCl <sub>3</sub> , 125MHz. ....	51
Figura 19 - A) Espectro de RMN <sup>1</sup> H de <b>6a</b> , CDCl <sub>3</sub> , 300MHz; B) Espectro de RMN <sup>13</sup> C de <b>6a</b> , CDCl <sub>3</sub> , 125MHz. ....	52
Figura 20 - A) Espectro de RMN <sup>1</sup> H de <b>4b</b> , CDCl <sub>3</sub> , 300MHz; B) Espectro de RMN <sup>13</sup> C de <b>4b</b> , CDCl <sub>3</sub> , 125MHz. ....	53
Figura 21 - A) Espectro de RMN <sup>1</sup> H de <b>6b</b> , CDCl <sub>3</sub> , 300MHz; B) Espectro de RMN <sup>13</sup> C de <b>6b</b> , CDCl <sub>3</sub> , 125MHz. ....	54
Figura 22 - A) Espectro de RMN <sup>1</sup> H de <b>4c</b> , CDCl <sub>3</sub> , 300MHz; B) Espectro de RMN <sup>13</sup> C de <b>4c</b> , CDCl <sub>3</sub> , 125MHz.....	55
Figura 23 - A) Espectro de RMN <sup>1</sup> H de <b>6c</b> , CDCl <sub>3</sub> , 300MHz; B) Espectro de RMN <sup>13</sup> C de <b>6c</b> , CDCl <sub>3</sub> , 125MHz.....	56
Figura 24 - Cromatogramas das reações de acilação enzimática de <b>2</b> utilizando como doador de acila: A) acetato de vinila, B) propionato de vinila, C) decanoato de vinila, D) laurato de vinila e E) palmitato de vinila.....	58
Figura 25 - Valores de conversão dos produtos obtidos e tempos reacionais de acilação de <b>2</b> . ....	59
Figura 26 – Cromatogramas das reacções de hidrólise de: A) <b>4a</b> , B) <b>4b</b> .....	61
Figura 27 - A) cloranfenicol ( <b>1</b> ), B) 1',3'-diacetato de cloranfenicol ( <b>1a</b> ), C) 1'-acetato de cloranfenicol ( <b>2a</b> ), CLAE, fluxo de 0,8 mL/min, Hexano:isopropanol (80:20), 40°C, 18 bar, 10 µL de injeção, coluna quiral AS.....	68
Figura 28 - A) cloranfenicol ( <b>1</b> ), B) 1',3'-dipropionato de cloranfenicol ( <b>1b</b> ), C) 1'-propionato de cloranfenicol ( <b>2b</b> ), CLAE, fluxo de 0,8 mL/min, Hexano:isopropanol (80:20), 40°C, 18 bar, 10 µL de injeção, coluna quiral AS. ....	69
Figura 29 - A) cloranfenicol ( <b>1</b> ), B) 1',3'-didecanoato de cloranfenicol ( <b>1c</b> ), C) 1'-decanoato de cloranfenicol ( <b>2c</b> ), CLAE, fluxo de 0,8 mL/min, Hexano:isopropanol (80:20), 40°C, 18 bar, 10 µL de injeção, coluna quiral AS. ....	70
Figura 30 - A) cloranfenicol ( <b>1</b> ), B) 1',3'-dilaurato de cloranfenicol ( <b>1d</b> ), C) 1'-laurato de cloranfenicol ( <b>2d</b> ), CLAE, fluxo de 0,8 mL/min, Hexano:isopropanol (80:20), 40°C, 18 bar, 10 µL de injeção, coluna quiral AS.....	71
Figura 31 - A) cloranfenicol ( <b>1</b> ), B) 1',3'-dipalmitato de cloranfenicol ( <b>1e</b> ), C) 1'-palmitato de cloranfenicol ( <b>2e</b> ), CLAE, fluxo de 0,8 mL/min, Hexano:isopropanol (80:20), 40°C, 18 bar, 10 µL de injeção, coluna quiral AS. ....	72

Figura 32 - A) cloranfenicol ( <b>1</b> ), B) 1',3'-dibenzoato de cloranfenicol ( <b>1f</b> ), C) 1'-benzoato de cloranfenicol ( <b>2f</b> ), CLAE, fluxo de 0,8 mL/min, Hexano:isopropanol (80:20), 40°C, 18 bar, 10 µL de injeção, coluna quiral AS. ....	73
Figura 33 - A) tianfenicol ( <b>2</b> ), B) 1',3'-diacetato de tianfenicol ( <b>4a</b> ), C) 3'-acetato de tianfenicol ( <b>6a</b> ), CLAE, fluxo de 0,8 mL/min, Hexano:isopropanol (75:25), 40°C, 20 bar, 10 µL de injeção, coluna quiral AS. ....	79
Figura 34 – cromatogramas de: A) tianfenicol ( <b>2</b> ), B) dipropionato de 1',3'-tianfenicol ( <b>4b</b> ), C) propionato de 3'-tianfenicol ( <b>6b</b> ), CLAE, fluxo de 0,8 mL/min, Hexano:isopropanol (75:25), 40°C, 20 bar, 10 µL de injeção, coluna quiral IA. ....	80
Figura 35 - A) tianfenicol ( <b>2</b> ), B) didecanoato de 1',3'-tianfenicol ( <b>4c</b> ), C) decanoato de 3'-tianfenicol ( <b>6c</b> ), CLAE, fluxo de 0,8 mL/min, Hexano:isopropanol (75:25), 40°C, 20 bar, 10 µL de injeção, coluna quiral AS. ....	81
Figura 36 - A) tianfenicol ( <b>2</b> ), B) 1',3'-dilaurato de tianfenicol ( <b>4d</b> ), C) 3'-laurato de tianfenicol ( <b>6d</b> ), CLAE, fluxo de 0,8 mL/min, Hexano:isopropanol (75:25), 40°C, 20 bar, 10 µL de injeção, coluna quiral AS. ....	82
Figura 37 - A) tianfenicol ( <b>2</b> ), B) 1',3'-dipalmitato de tianfenicol ( <b>4e</b> ), C) 3'-palmitato de tianfenicol ( <b>6e</b> ), CLAE, fluxo de 0,8 mL/min, Hexano:isopropanol (75:25), 40°C, 20 bar, 10 µL de injeção, coluna quiral AS. ....	83
Figura 38 – Estrutura da didemnina B ( <b>27</b> ) (NEWMAN & CRAGG, 2004).....	88
Figura 39 – Estrutura da vitilevuamida ( <b>28</b> ) (KIJOA & SAWANGWONG, 2004).....	89
Figura 40 – Estruturas dos monoterpenos conicaquinona A e B ( <b>29</b> e <b>30</b> ), Tiaplídiaquinona A e B ( <b>31</b> e <b>32</b> ) e aplidinona A, B e C ( <b>33</b> , <b>34</b> e <b>35</b> respectivamente) (AIELLO <i>et al</i> , 2003; AIELLO <i>et al</i> , 2005a; AIELLO <i>et al</i> , 2005b). ....	89
Figura 41 – Estruturas dos pitholideos A – D e ( <i>R</i> )-5-metilmeleina (WANG, BORGESON & CREWS, 1997) .....	91
Figura 42 – Estruturas dos ácidos tanzawaico E ( <b>40</b> ) e F ( <b>41</b> ) (MALMSTRØM, CHRISTOPHERSEN & FRISVAD, 2000).....	91
Figura 43 – Estruturas dos benzopiranos <b>43</b> e <b>44</b> (MALMSTRØM, CHRISTOPHERSEN & FRISVAD, 2000).....	92
Figura 44 – Estrutura da criptosfaerolida ( <b>45</b> ) (OH <i>et al</i> , 2010).....	92
Figura 45 – Estrutura da JBIR-27 ( <b>46</b> ) e JBIR-28 ( <b>47</b> ) além de sporogen-AO1 ( <b>48</b> ) e fomenona ( <b>49</b> ) (MOTOHASHI <i>et al</i> , 2009).....	93
Figura 46 – Equilíbrio tautomérico entre as formas aberta e fechada do ácido penicílico. ....	94

Figura 47 - Fotografia das 11 cepas dos fungos endossimbiontes (EV1-EV11) isolados da ascídia <i>E. vancouverensis</i> .....	98
Figura 48 - Percentual de inibição do crescimento celular (IC%) das amostras em duas linhagens tumorais testadas na dose única de 50 µg/mL Valores são média ± DPM. .	100
Figura 49 - Percentual de inibição do crescimento celular (IC%) das amostras em duas linhagens tumorais testadas na dose única de 50 µg/mL.....	101
Figura 50 - Percentual de inibição do crescimento (IC%) (50µg/mL) das frações EV10LP-F1 a EV10LP-F5. ....	103
Figura 51 - Percentual de inibição do crescimento (IC%) (50µg/mL) das frações EV10LP-F2.1 a EV10LP-F2.3 .....	104
Figura 52 - Percentual de inibição do crescimento (IC%) (50g/mL) das frações EV10LP-F3-1 a EV10LP-F3-2.....	105
Figura 53 - Percentual de inibição do crescimento (IC%) (50µg/mL) das substâncias EV10S1 (meleína), EV10S2 ( <i>cis</i> -4-hidroximeleína), EV10S3 ( <i>trans</i> -4-hidroximeleína), EV10S4 (Ac. penicílico).....	105
Figura 54 - Estrutura da isocumarina meleína.....	107
Figura 55 - Espectro de Infra-vermelho da meleína. ....	108
Figura 56 - Espectro de RMN <sup>1</sup> H 500 MHz em CDCl <sub>3</sub> da meleína .....	109
Figura 57 - Espectro de RMN <sup>13</sup> C 125 MHz em CDCl <sub>3</sub> da meleína.....	109
Figura 58 - Estrutura da isocumarina <i>cis</i> -4-hidroximeleína .....	110
Figura 59 - Espectro de Infra-vermelho da <i>cis</i> -4-hidroximeleína .....	111
Figura 60 - Espectro de RMN <sup>13</sup> C 125 MHz em CDCl <sub>3</sub> da <i>cis</i> -4-hidroximeleína. ....	112
Figura 61 - Espectro de RMN <sup>1</sup> H 500 MHz em CDCl <sub>3</sub> da <i>cis</i> -4-hidroximeleína .....	112
Figura 62 - Espectro de massas de <i>cis</i> -4-hidroximeleína. ....	113
Figura 63 - Estrutura da isocumarina <i>trans</i> -4-hidroximeleína .....	114
Figura 64 - Espectro de RMN <sup>1</sup> H com irradiação seletiva 500 MHz em CDCl <sub>3</sub> da <i>trans</i> -4-hidroximeleína.....	115
Figura 65 - Espectro de RMN <sup>1</sup> H 500 MHz em CDCl <sub>3</sub> da <i>trans</i> -4-hidroximeleína.....	115
Figura 66 - Espectro de massas de <i>trans</i> -4-hidroximeleína. ....	116

Figura 67 - Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ 125 MHz em $\text{CDCl}_3$ da <i>trans</i> -4-hidroximeleína. . .	116
Figura 68 - Estrutura do ácido penicílico .....	117
Figura 69 - Espectro de Infra-vermelho da ácido penicílico .....	118
Figura 70 - Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ 125 MHz em $\text{CDCl}_3$ do ácido penicílico.....	119
Figura 71 - Espectro de RMN $^1\text{H}$ 500 MHz em $\text{CDCl}_3$ do ácido penicílico.....	119
Figura 72 - Espectro de massas de alta resolução do ácido penicílico.....	120

### LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1 – Acetilação regio e estereosseletiva do cianidol ( <b>3</b> ) utilizando CAL-B e acetato de viníla em acetonitrila (FERNÁNDEZ-SOLARES <i>et al</i> , 2004).....	21
Esquema 2 – Acetilação regioseletiva da andrografolida ( <b>4</b> ) utilizando PSL-C e acetato de viníla em acetona (CHEN, TAN & HUANG, 2010).....	21
Esquema 3 - Acilação regioseletiva do 3- <i>O</i> - angeloilengenol ( <b>6</b> ) utilizando CAL-B e doadores de acila distintos (TENG <i>et al</i> , 2009).....	22
Esquema 4 - Acetilação regioseletiva da <i>D</i> -ribose ( <b>10</b> ) utilizando Lipases, doadores de acila e solventes distintos (SEBRÃO, SÁ & NASCIMENTO, 2010). .....	22
Esquema 5 - Hidrólise regioseletiva da 3'-5'-di- <i>O</i> -lenulinila ( <b>18</b> ) utilizando Lipases distintas (GARCIA <i>et al</i> , 2002).....	23
Esquema 6 - Screening de lipases para a reação hidrólise regioseletiva dos $\beta$ -monosacarídeos acetilados ( <b>21</b> e <b>22</b> ) (FILIPE <i>et al</i> , 2007). .....	24
Esquema 7 - Screening de lipases para a reação hidrólise regioseletiva do crotepoxido ( <b>23</b> ). .....	24
Esquema 8 - Reação de acetilação enzimática de <b>1</b> por extrato de células de <i>E. coli</i> (SHAW, 1967).....	25
Esquema 9 - Produção enzimática de ésteres do cloranfenicol (OTTOLINA, CARREA & RIVA, 1989).....	27
Esquema 10 - Preparo de derivados de <b>1</b> em diferentes solventes (DAUGS, 2000).....	27
Esquema 11 - síntese de derivados de <b>2</b> utilizando diferentes doadores de acila (SHI <i>et al</i> , 2005).....	28
Esquema 12 - Acetilação d cloranfenicol ( <b>1</b> ) por métodos químicos.....	29

Esquema 13 – Reação de hidrólise enzimática de <b>1b</b> – <b>1f</b> .....	46
Esquema 14 – Síntese químico-enzimática de 1'-palmitato-3'-acetato de cloranfenicol ( <b>7</b> ). .....	48
Esquema 15 - reação de hidrólise enzimática de 1'-palmitato-3'-acetato de cloranfenicol ( <b>7</b> ) .....	48
Esquema 16 – Acilação do tianfenicol ( <b>2</b> ) por métodos químicos.....	49
Esquema 17 - Reação de acetilação enzimática de tianfenicol ( <b>2</b> ).....	57
Esquema 18 - Reação de hidrólise enzimática de <b>4a</b> e <b>4b</b> .....	60
Esquema 19 - Reação de acetilação química de cloranfenicol ( <b>1</b> ). .....	65
Esquema 20 - Reação de hidrólise de cloranfenicol diacetilado .....	66
Esquema 21 - Reação dos derivados de cloranfenicol diacilados <b>1b-1f</b> .....	67
Esquema 22 - Reação de acetilação enzimática de <b>1</b> .....	74
Esquema 23 - Reação de acetilação química de <b>1</b> , utilizando cloreto de palmitoila como agente acilante .....	75
Esquema 24 - Reação de hidrólise enzimática de <b>7</b> .....	75
Esquema 25 - Reação de acilação química de tianfenicol ( <b>2</b> ). .....	76
Esquema 26 - Reação de acilação enzimática de tianfenicol ( <b>2</b> ). .....	77
Esquema 27 – sequencia biossintética do ácido penicílico a partir do ácido orselínico	94

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Reações de hidrólise de <b>1a</b> utilizando diferentes solventes orgânicos (conversão %). .....	37
Tabela 2 – Reação de hidrólise de <b>1a</b> a 20 e 30 °C (conversão %) .....	39
Tabela 3 – Reação de hidrólise de <b>1a</b> utilizando pH de 5,5 a 8,5 (conversão %) .....	41
Tabela 4 – Reação de hidrólise de <b>1a</b> variando-se a proporção entre tampão e solvente (conversão %).....	44
Tabela 5 – Reação de hidrólise de <b>1b</b> – <b>1f</b> (conversão %) .....	46

Tabela 6 - Dados de RMN $^{13}\text{C}$ ( $\delta$ ppm) de tianfenicol ( <b>2</b> ) e derivados mono e diacetilados. ....	51
Tabela 7 - Reação de hidrólise de <b>4a</b> e <b>4b</b> (conversão %). ....	60
Tabela 8 - Agentes acilantes utilizados nas reações de acilação enzimática de <b>1</b> .....	65
Tabela 9 - Agentes acilantes utilizados na reação de acilação química de tianfenicol ( <b>2</b> ) e (%) dos eluentes utilizados na purificação dos produtos.....	76
Tabela 10 - Ésteres vinílicos utilizados na reação de acilação enzimática de tianfenicol ( <b>2</b> ) .....	77
Tabela 11 - Quantidades de ésteres vinílicos utilizados nas reações de acilação de <b>2</b> ... 78	
Tabela 12 – Espécies de fungos produtores de ácido penicílico (AP) descritas na literatura no período de 2000 a 2011.....	94
Tabela 13 – Massas dos extratos do micélio e meio líquido após cultivo em pequena escala. ....	99
Tabela 14- Massas dos extratos (mg) do micélio e meio líquido após desengorduramento.....	100
Tabela 15 - Dados de RMN de $^1\text{H}$ e $^{13}\text{C}$ $\delta$ de EV10S1 e comparação com dados descritos na literatura.....	108
Tabela 16 - Dados de RMN de $^1\text{H}$ e $^{13}\text{C}$ de EV10S2 e comparação com dados descritos na literatura.....	111
Tabela 17 - Dados de RMN de $^1\text{H}$ e $^{13}\text{C}$ $\delta$ de EV10S4 e comparação com dados descritos na literatura.....	118

## LISTA DE FLUXOGRAMAS

Fluxograma 1 - Fluxograma de obtenção dos extratos brutos dos 11 fungos isolados de <i>Eudistoma vanammei</i> .....	124
---	-----

## LISTA DE SIGLAS

**AP** ácido penicílico

**BD** batata-dextrose

**BDA** batata-dextrose-agar

**CAL-B** lipase *de Candida antarctica*

**CCDA** cromatografia em camada delgada analítica

**CLAE** cromatografia líquida de alta eficiência

**DMAP** *N,N*-4-dimetilaminopiridina

**ee** excesso enantiomérico

**EM** espectrometria de massa

**IV** infravermelho

**Lit** literatura

**OTA** ocratoxina

**RMN <sup>13</sup>C** ressonância magnética nuclear de carbono 13

**RMN <sup>1</sup>H** ressonância magnética nuclear de hidrogênio

**THF** tetrahidrofurano

**UV** ultravioleta

**DOX** doxorubicina

## SUMÁRIO

1	CAPÍTULO 1 .....	19
1.1	INTRODUÇÃO.....	19
1.2	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA .....	20
1.3	RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	29
1.3.1	Estudo químico-enzimático e síntese de ésteres de cloranfenicol ( <b>1</b> ) .....	29
3.1.1	Acetilação do cloranfenicol por via química ( <b>1</b> ) .....	29
1.3.1.2	Estudo de hidrólise enzimática de 1',3'-acetato de cloranfenicol ( <b>1a</b> ) .....	37
1.3.1.2.1	Seleção da enzima .....	37
1.3.1.2.2	Estudo da influência do solvente nas reações de hidrólise enzimática de <b>1a</b> .....	37
1.3.1.2.4	Estudo da influência do pH nas reações .....	41
1.3.1.2.5	Estudo da influência da proporção tampão: solvente nas reações.....	44
1.3.1.2.6	Hidrólise enzimática de derivados diacilados de cloranfenicol ( <b>1b</b> – <b>1f</b> ) .....	46
1.3.2	Estudo químico-enzimático e síntese de derivados de tianfenicol ( <b>2</b> ) .....	49
1.3.2.1	Acilação química de tianfenicol ( <b>2</b> ) .....	49
1.3.2.2	Acilação enzimática de tianfenicol ( <b>2</b> ) .....	57
1.3.2.3	Estudo cinético da reação de acilação enzimática de tianfenicol ( <b>2</b> ) .....	59
1.3.2.4	Estudo de reutilização de enzima em reações de acilação de tianfenicol ( <b>2</b> ) .....	59
1.3.2.5	Hidrólise enzimática dos derivados de tianfenicol diacilados <b>4a</b> e <b>4b</b> .....	60
1.4	PARTE EXPERIMENTAL.....	62
1.4.1	Métodos Cromatográficos .....	62
1.4.1.1	Cromatografia em gel de sílica.....	62
1.4.1.2	Solventes.....	62
1.4.1.3	Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) .....	62
1.4.2	Métodos espectrométricos .....	63
1.4.2.1	Espectrometria no infravermelho (IV) .....	63
1.4.2.2	Espectrometria de massas (EM) .....	63
1.4.2.3	Espectrometria de ressonância magnética nuclear (RMN) .....	63
1.4.3	Reagentes e solventes utilizados.....	64
1.4.4	Síntese de derivados de cloranfenicol ( <b>1</b> ).....	65
1.4.4.1	Acilação química de cloranfenicol ( <b>1</b> ) .....	65
1.4.4.2	Hidrólise enzimática de cloranfenicol diacetilado ( <b>1a</b> ).....	66
1.4.4.3.1	Efeito do solvente .....	66
1.4.4.3.2	Efeito da temperatura .....	66
1.4.4.3.3	Efeito do pH .....	67
1.4.4.3.4	Efeito da proporção solvente/tampão .....	67
1.4.4.5	Quantificação dos derivados de cloranfenicol obtidos por hidrólise.....	67
1.4.4.6	Síntese de 3'-acetato -1'-palmitato de cloranfenicol ( <b>7</b> ) .....	74
1.4.4.6.1	Acetilação enzimática de cloranfenicol ( <b>1</b> ) .....	74
1.4.4.6.2	Acilação química do acetato de 3'-cloranfenicol ( <b>3a</b> ) .....	74
1.4.4.7	Hidrólise enzimática 3'-acetato -1'-palmitato de cloranfenicol ( <b>7</b> ) .....	75
1.4.5	Síntese de derivados de tianfenicol ( <b>2</b> ).....	76
1.4.5.1	Síntese química de derivados de tianfenicol ( <b>2</b> ).....	76
1.4.5.2	Reação de acilação enzimática de tianfenicol ( <b>2</b> ).....	77
1.4.5.3	Estudo cinético da reação de acilação enzimática de tianfenicol ( <b>2</b> ) .....	77
1.4.5.4	Reciclagem de enzima em reações de acilação de tianfenicol ( <b>2</b> ).....	78



1.4.5.5 Hidrólise enzimática dos derivados de tianfenicol diacilados <b>4a-4b</b> .....	78
1.4.5.6 Quantificação dos derivados de tianfenicol ( <b>2</b> ) .....	78
1.5 CONCLUSÕES .....	84
2 CAPÍTULO 2 .....	87
2.1 INTRODUÇÃO .....	87
2.1.1 Química de produtos naturais de fungos marinhos .....	87
2.2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA .....	88
2.2.2 Ácido penicílico (AP) .....	93
2.3 RESULTADOS E DISCUSSÕES .....	98
2.3.1 Isolamento dos fungos .....	98
2.3.2 Estudo da atividade citotóxica dos extratos dos isolados EV1 – EV11 .....	98
2.3.3 Identificação molecular de EV-10 e EV-11 .....	102
2.3.4 Estudo químico bioguiado de <i>Aspergillus</i> sp. (EV10) .....	102
2.3.4.1 Fracionamento cromatográfico de EV10LP .....	102
2.3.4.2 Fracionamento cromatográfico de EV10LP-F2 .....	103
2.3.4.2.1 Fracionamento cromatográfico de EV10LP-F2.2 .....	104
2.3.4.2.2 Fracionamento cromatográfico de EV10LP-F2.3 .....	104
2.3.4.3 Atividade citotóxica dos compostos isolados .....	105
2.3.5 Determinação estrutural dos compostos isolados .....	107
2.3.5.1 Determinação estrutural de EV10S1 .....	107
2.3.5.2 Determinação Estrutural de EV10S2 .....	110
2.3.5.3 Determinação estrutural de EV10S3 .....	114
2.3.5.4 Determinação estrutural de EV10S4 .....	117
2.4 PARTE EXPERIMENTAL .....	121
2.4.1 Métodos Cromatográficos .....	121
2.4.1.1 Cromatografia em gel de sílica .....	121
2.4.1.2 Solventes .....	121
2.4.1.3 Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) .....	121
2.4.2 Métodos espectrométricos .....	122
2.4.2.1 Espectrometria no infravermelho (IV) .....	122
2.4.2.2 Espectrometria de massas (EM) .....	122
2.4.2.3 Espectrometria de ressonância magnética nuclear (RMN) .....	122
2.4.6.1 Coleta das Acídias e isolamento dos fungos .....	123
2.4.6.3 Estudo químico de EV10 .....	125
2.4.6.3.1 Preparação dos meios de cultura .....	125
2.4.6.3.1.1 Meio BD (batata-dextrose) .....	125
2.4.6.3.1.2 Meio BDA (batata-dextrose-ágar) .....	125
2.4.6.3.2 Identificação molecular de EV-10 e EV-11 .....	125
2.4.6.3.3 Preparação do extrato bruto de <i>Aspergillus</i> sp. (EV10) .....	125
2.4.6.3.3.1 Fracionamento cromatográfico de EV10LP .....	126
2.4.6.3.3.1.1 Fracionamento cromatográfico de EV10LP-F2 .....	126
2.4.6.3.3.1.2 Fracionamento cromatográfico de EV10LP-F3 .....	126
2.5 CONCLUSÕES .....	127
3 CONSTANTES FÍSICAS .....	128
4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	151
ANEXOS .....	156

# Capítulo 1

Síntese Quimioenzimática de Derivados do

Síntese Quimioenzimática de Derivados do  
Cloranfenicol e Tianfenicol

# 1 CAPÍTULO 1

## 1.1 INTRODUÇÃO

O termo biocatálise pode ser bem definido como uma reação de um composto químico em um sistema vivo, não necessariamente fazendo parte do metabolismo de um organismo. Por outro lado, o termo biocatálise é mais amplamente empregado em reações químicas mediadas por meios biológicos, tais como: enzimas isoladas, células inteiras ou extrato de células livres (HUDLICKY & REED, 2009).

A partir da redescoberta de que enzimas podem manter sua atividade em solventes orgânicos, o uso de enzimas em processos biocatalíticos tem ganhado bastante atenção, não somente pelo fato de trabalharem em solventes orgânicos anidros, mas também por adquirirem notável estabilidade, especificidade enantiomérica e capacidade de catalisarem reações incomuns, impossíveis em meio aquoso (WANG, GUAN & HE, 2011). Empregando-se processos biocatalíticos em substituição aos processos sintéticos tradicionais obtém-se um ganho considerável na quimio, regio e estereosseletividades, sob condições ecologicamente corretas e em um menor número de etapas reacionais (KIM, POLLARD & WOODLEY, 2007).

Dentre as enzimas de interesse em biocatálise, destacam-se as lipases (GOTOR-FERNÁNDEZ, BRIEVA & GOTOR, 2006; VILLENEUVE, 2007), que são capazes de promover reações de acilação e hidrólise (GHASEMI *et al*, 2010). As lipases vêm sendo amplamente empregadas na resolução cinética de álcoois, ácidos, ésteres e amidas racêmicos para formar compostos enantiomericamente puros, bem como na dessimetriação de compostos pro-quirais. Estas enzimas apresentam a vantagem de poderem ser ativas em solventes orgânicos e não necessitarem da adição de co-fatores. Lipases microbianas têm sido amplamente aplicadas em vários ramos, tais como: alimentos, cosméticos, produtos farmacêuticos, agroquímicos, matéria-prima, têxtil, biodiesel, processamento de óleos industriais. (GOTOR-FERNÁNDEZ, BRIEVA & GOTOR, 2006; GHASEMI *et al*, 2010).

Assim, o objetivo da primeira parte deste trabalho foi investigar rotas biocatalíticas eficientes para a produção de derivados de cloranfenicol (**1**) e tianfenicol (**2**) (Figura 1) utilizando lipases.

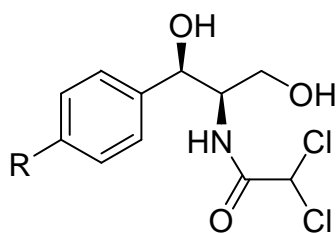


Figura 1 - Estruturas do clorafenicol (1, R = NO<sub>2</sub>) e tianfenicol (2, R = SO<sub>2</sub>Me)

## 1.2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

### 1.2.1 Uso de lipases em reações de acilação de álcoois e hidrólise de ésteres

Lipases mostram maior enantiosseletividade para alcoóis secundários do que para primários e terciários. Assim, de acordo com a regra de Kazlauskas, em um álcool secundário, se o grupo de maior volume (L) tem prioridade em relação ao grupo de volume médio (M), o álcool-(R) reagirá preferencialmente para formar o éster. A mesma estereosseletividade é observada para a hidrólise de ésteres secundários, onde observa-se sempre a formação do álcool-(R), de acordo com a Figura 2 (GOTOR-FERNÁNDEZ, BRIEVA & GOTOR, 2006).

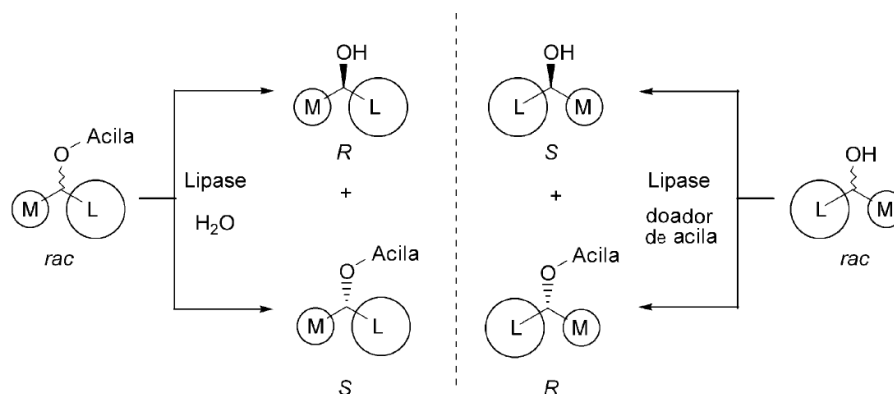
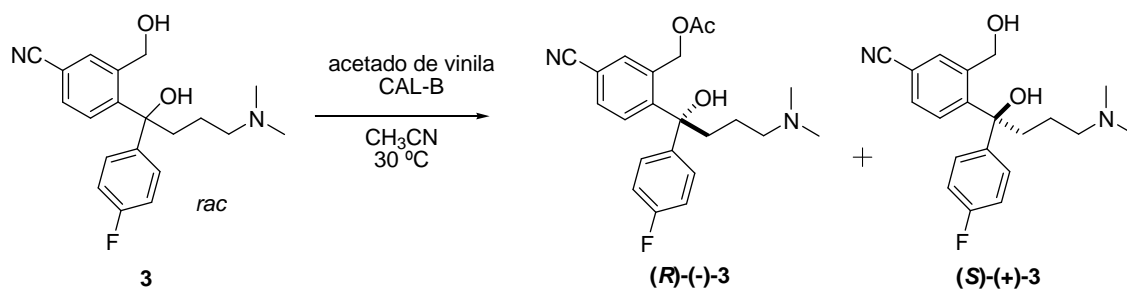


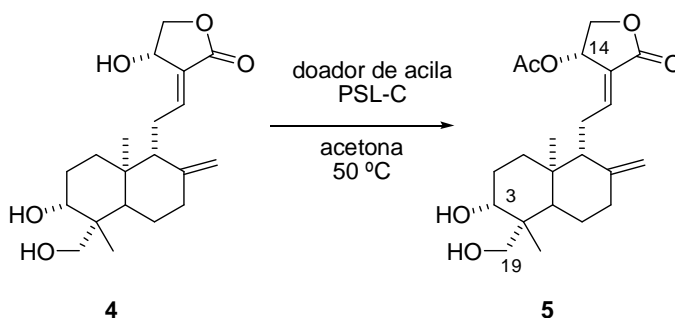
Figura 2 – Enantiopreferência prevista por Kazlauskas para reações de acilação de álcoois e hidrólise de ésteres racêmicos (GOTOR-FERNÁNDEZ, BRIEVA & GOTOR, 2006).

Fernández-Solares e colaboradores investigaram a resolução enzimática do cianidol (3), um importante intermediário na síntese do antidepressivo (S)-(+)-citolopram opticamente puro, usando varias lipases e diferentes doadores de acila em condições variadas. Os melhores resultados foram obtidos quando utilizaram CAL-B e acetato de vinila em acetonitrila (Esquema 1). Nesse estudo, ficou evidenciado que CAL-B catalisa a acilação do álcool primário com alta enantiosseletividade (FERNÁNDEZ-SOLARES *et al*, 2004).



Esquema 1 – Acetilação regio e estereosseletiva do cianidol (**3**) utilizando CAL-B e acetato de vinila em acetonitrila (FERNÁNDEZ-SOLARES *et al*, 2004).

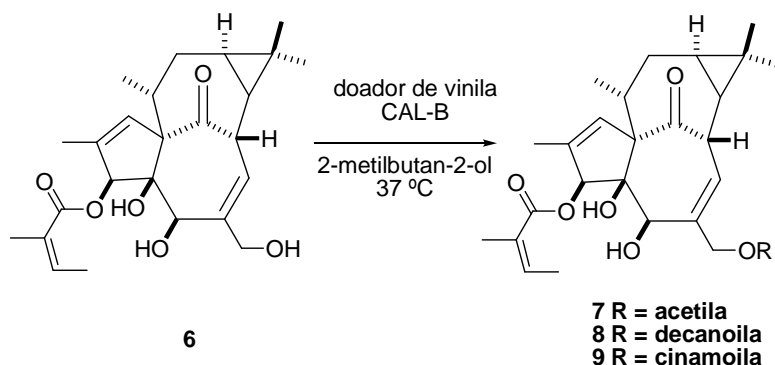
Utilizando Lipases PSL-C imobilizadas de *Burkholderia cepacia*, Chen, Tan e Huang realizaram a acetilação regioseletiva da andrografolida (**4**), um produto natural que apresenta atividade anticâncer, antiinflamatória, antibiótica, antialérgica e antidiabética, bastante utilizado na medicina tradicional nos países do sudeste asiático. A reação, quando realizada a 50 °C em acetona (Esquema 2), mostrou-se extremamente eficiente (99,0% de conversão) e seletiva para 14-acetato de andrografolida (**5**) formado como único produto (CHEN, TAN & HUANG, 2010).



Esquema 2 – Acetilação regioseletiva da andrografolida (**4**) utilizando PSL-C e acetato de vinila em acetona (CHEN, TAN & HUANG, 2010).

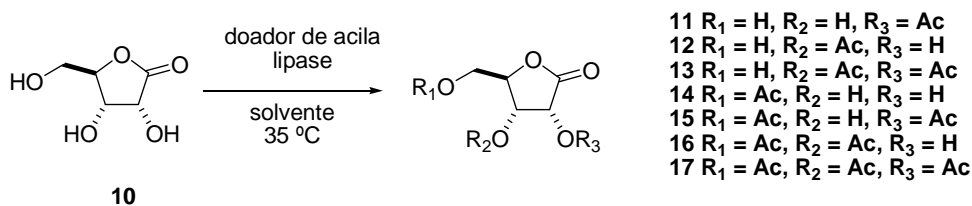
Um procedimento semelhante foi utilizado por Teng e colaboradores visando à obtenção de novos agentes quimioterapêuticos. Em seus estudos, os autores realizaram a síntese de ésteres do 3-*O*-angeloilengenol (**6**) através de reações de acilação utilizando CAL-B e acetato de vinila, decanoato de vinila e cinamato de vinila como doadores de acila, em 2-metilbutan-2-ol (Esquema 3). Para cada doador de acila, um único produto monoacilado em C-20 foi obtido. Decorridos 6h de reação, 90% de **6** foi convertido ao seu derivado acetilado **7**. A conversão total de **6** em **8** e **9** se deu após 24h. Os novos compostos foram avaliados quanto a sua atividade antitumoral perante as células de

melanoma MM96L e apresentaram atividades semelhantes ao composto de partida (TENG *et al*, 2009).



Esquema 3 - Acilação regioseletiva do 3-*O*- angeloilgenol (**6**) utilizando CAL-B e doadores de acila distintos (TENG *et al*, 2009).

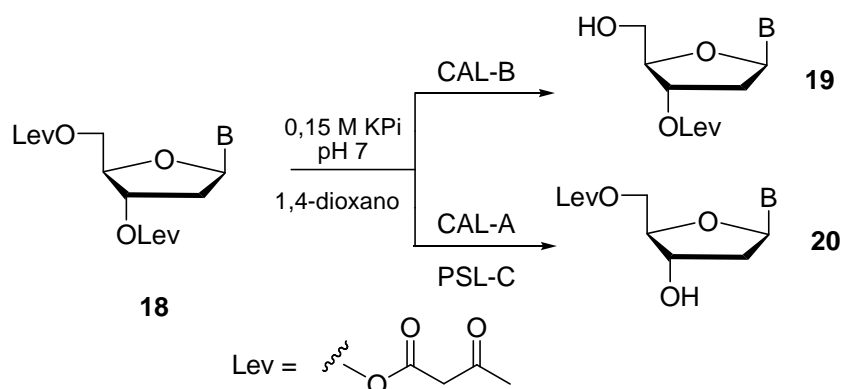
Mais recentemente, Sebrão, Sá e Nascimento utilizaram dez lipases comerciais e duas lipases imobilizadas do micélio de fungos da Amazônia como biocatalisadores da reação de acilação da lactona *D*-ribose (**10**) com uma variedade de doadores de grupamento acila em solventes não aquosos (Esquema 4). Parâmetros como lipases, doador de acila, solvente, influência da água e reutilização da enzima foram avaliados. Quando CAL-B e acetato de vinila em acetonitrila seca foram utilizados, a reação mostrou-se altamente regioseletiva e o mono éster **14** foi observado com único produto (99% de conversão). No entanto, lipases de *Burkholderia cepacia* (PSL-C e PSL-D), *Pseudomonas fluorescens* (AK) e *Thermomyces langinosus* (Lipozyme TL-IM) formaram uma mistura de compostos di e triacetilados, em baixos valores de conversão (SEBRÃO, SÁ & NASCIMENTO, 2010).



Esquema 4 - Acetilação regioseletiva da *D*-ribose (**10**) utilizando Lipases, doadores de acila e solventes distintos (SEBRÃO, SÁ & NASCIMENTO, 2010).

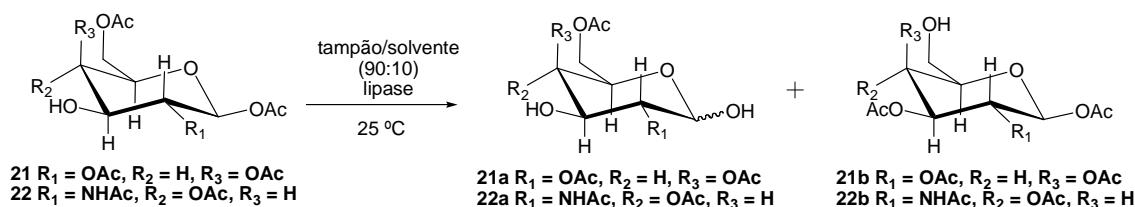
Por outro lado, o uso de lipases em reações de hidrólise regioseletiva de ésteres se mostra uma ferramenta de grande utilidade em síntese orgânica. No ano de 2002, Garcia e colaboradores publicaram a síntese dos 3'- e 5'-*O*-levulinil-2'-deoxinucleosídeos (**19** e **20**, respectivamente, Esquema 5) a partir da hidrólise

enzimática regioseletiva do derivado 3'-5'-di-*O*-levulinila (**18**), evitando varios passos de proteção/desproteção (GARCIA *et al*, 2002). Nesse trabalho, *Candida antarctica* lipase B (CAL-B) mostrou alta seletividade para o éster 5'-*O*-levulinato formando 3'-*O*-levulinil-2-deoxinucleosídio (**19**) em > 80% de rendimento isolado (Esquema 5). Por outro lado, *Pseudomonas cepacia* lipase (PSL-C) imobilizada e *Candida antarctica* lipase A (CAL-A) mostraram seletividades em direção oposta e hidrolisaram o éster 3'-*O*-levulinato formando 5'-*O*-levulinil-2-deoxinucleosideo (**20**) em rendimento > 80% (GARCIA *et al*, 2002).



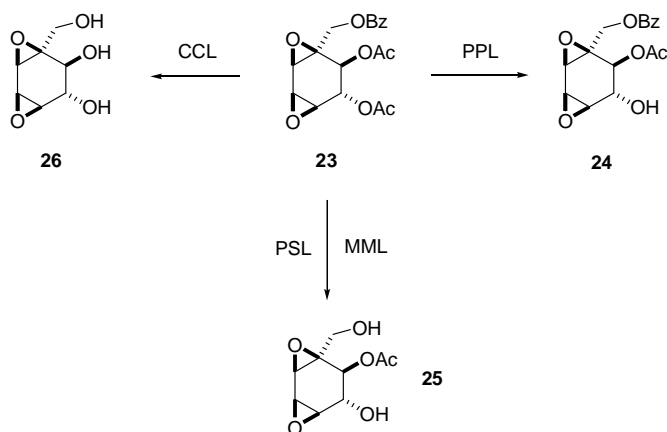
Esquema 5 - Hidrólise regioseletiva da 3'-5'-di-*O*-levulinila (**18**) utilizando Lipases distintas (GARCIA *et al*, 2002).

Filice e colaboradores realizaram um *screening* de lipases para a hidrólise regioseletiva de  $\beta$ -monosacarídeos acetilados. Nesse estudo, foram avaliadas, quanto ao seu potencial regioseletivo, as lipases de *Pseudomonas fluorescens* (PFL), *Candida rugosa* (CRL), *Thermomyces lanuginosa* (TLL), *Rhizomucor miehei* (RML), *Candida antarctica* B (CAL-B), *Candida antarctica* A (CAL-A), *Aspergillus niger* (ANL) e *Aspergillus oryzae* (AOL). As reações foram realizadas em uma mistura de tampão fosfato pH 5:acetonitrila (90:10) e observou-se que a lipase imobilizada de *Aspergillus niger* (ANL) foi o biocatalizador que apresentou melhores resultados na hidrólise de **21** e **22**. Os produtos monohidroxilados **21a** (95% de conversão) e **22b** (75% de conversão) foram obtidos após uma hora de reação (Esquema 6). As enzimas PFL, AOL, CRL e RML também apresentaram bastante regioseletividade para produção de **21a** e **21b**, tornando possível a obtenção de **21b** em 30% de rendimento. A lipase PFL foi capaz de hidrolisar **22** formando **22a** em 25% de rendimento total (FILICE *et al*, 2007).



Esquema 6 - Screening de lipases para a reação hidrólise regioseletiva dos  $\beta$ -monossacarídeos acetilados (**21 e 22**) (FILIPPE *et al.*, 2007).

Um procedimento semelhante foi empregado por Nazir e colaboradores no estudo da hidrólise enzimática do crotepoxido (**23**), um produto natural isolado de *Piper cubeb* Cass DC, que apresenta significativa atividade antitumoral contra carcinoma de pulmão e carcinosarcoma de Walker. Foram testadas quanto a sua atividade hidrolítica as lipases *Pseudomonas fluorescens* lipase (PFL), *Mucor miehei* lipase (MML), *Pseudomonas cepacia* lipase (PSL), Lipase M Amano (LM), *Aspergillus niger* lipase (APL), *Candida cylindraceae* lipase (CCL) e *Porcine pancreas* lipase (PPL) (NIGHAT *et al.*, 2007). Não foi observada conversão nas reações catalisadas por PFL, APL e LM, mas MML, PSL e PPL foram ativas e apresentaram regioseletividades distintas para a hidrólise de **23**. CCL foi ativa, mas sem seletividade (Esquema 7) (NAZIR *et al.*, 2009).



Esquema 7 - Screening de lipases para a reação hidrólise regioseletiva do crotepoxido (**23**).

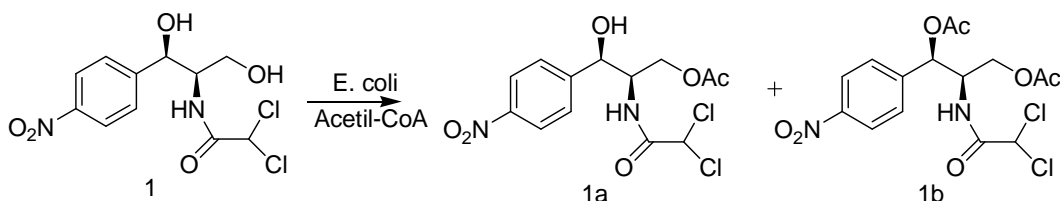


### 1.2.1 Os antibióticos cloranfenicol (**1**) e tianfenicol (**2**)

Cloranfenicol (**1**, Figura 1, Pag 20), também conhecido como cloromicetina e paraxina, é um antibiótico natural produzido por *Streptomyces venezuelae*, isolado pela primeira vez em 1947, e que possui uma ampla gama de atividade antimicrobiana. Este fármaco é amplamente usado na medicina veterinária contra infecções no trato urinário e outras doenças bacteriológicas. Por outro lado, o tratamento com cloranfenicol em humanos se restringe à tireóide, disenteria e infecções bacteriológicas oculares, apresentando efeitos adversos tais como leucemia infantil e síndrome do bebê cinzento (GEORGE, NARINA & SUDALAI, 2006). Como apenas o enantiômero 2*R*, 3*R* é ativo, provavelmente este é o primeiro antibiótico obtido comercialmente na forma opticamente ativa por síntese química (HARJA *et al*, 2006).

Tianfenicol (**2**, Figura 1, Pag 20) é um análogo sintético do cloranfenicol (**1**), que apresenta ampla atividade contra bactérias gram-positivas e gram-negativas, tendo sua primeira síntese realizada em 1952 devido a sua atividade biológica potente. Atualmente, várias sínteses são encontradas na literatura (LU, CHEN & LIN, 2008).

No ano de 1967 surgiu o primeiro relato de preparo de derivados de cloranfenicol (**1**) por via enzimática (SHAW, 1967). Em seu trabalho, Shaw mostrou que o mecanismo de inativação da atividade antibiótica de **1** por *E. coli* se dá através de uma acetilação enzimática. Em seus experimentos, o autor provou que cloranfenicol na presença de extrato de células de *E. coli* e acetil-coenzima A gerava os produtos de mono (**1a**) e diacetilação (**1b**), Esquema 8.



Esquema 8 - Reação de acetilação enzimática de **1** por extrato de células de *E. coli* (SHAW, 1967).

Mais tarde, El-Kersh e Plourde (EL-KERSH & PLOURDE, 1976) descreveram a biotransformação do cloranfenicol (**1**) por esporos e células inteiras de *Streptomyces griseus*. Nesse trabalho foi avaliada a perda da atividade antibiótica de **1** através de fermentação utilizando varias fontes de carbono distintas, sendo possível o isolamento de 6 compostos (Figura 3): 1-acetato de cloranfenicol (**1c**) ; 3-acetato de cloranfenicol (**1b**); 3-propionato de cloranfenicol (**1d**); 3-isobutirato de cloranfenicol (**1e**); 3-isovalerato de cloranfenicol (**1f**); 3-butirato de cloranfenicol (**1g**). Todos os compostos foram testados quanto a sua atividade antibiótica, porém nenhum deles apresentou resultados positivos.

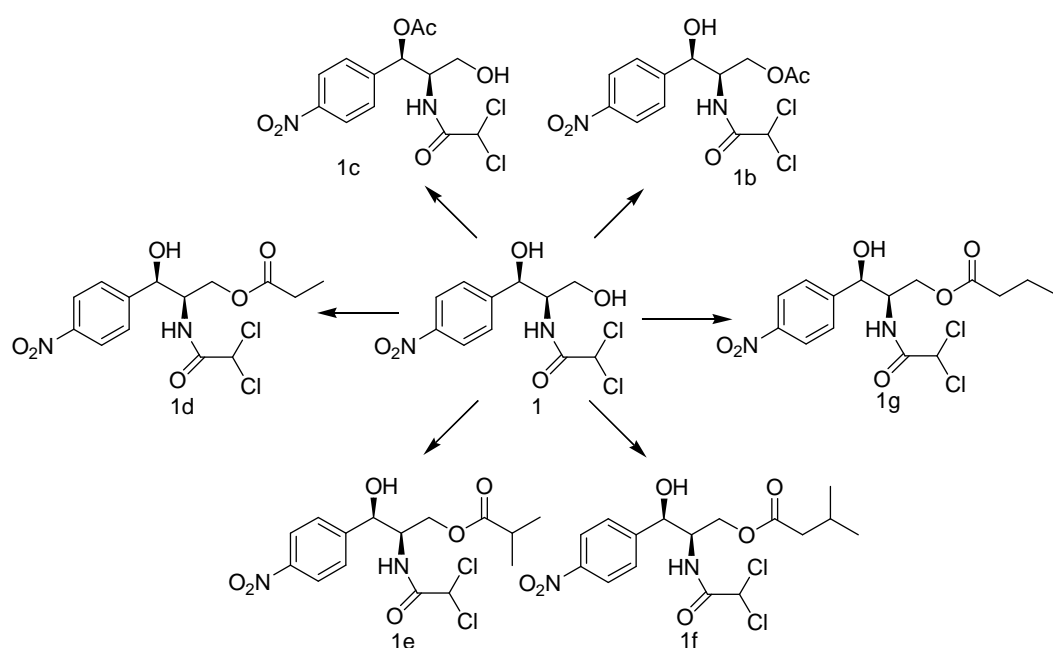
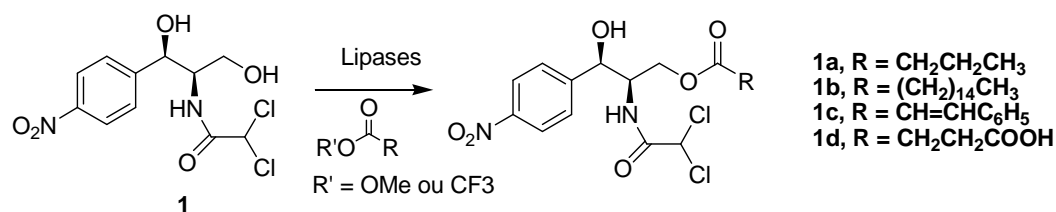


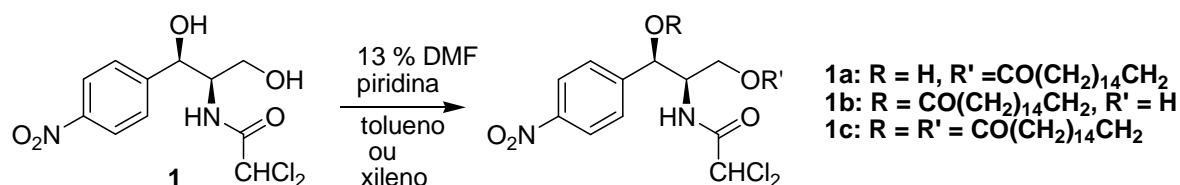
Figura 3 - Produtos de biotransformação de cloranfenicol (**1**) por esporos e células inteiras de *Streptomyces griseus* (EL-KERSH & PLOURDE, 1976).

O primeiro trabalho de síntese de derivados de cloranfenicol (**1**) utilizando enzimas isoladas foi descrito por Ottolina e colaboradores. A esterificação regioseletiva de cloranfenicol (**1**) foi realizada utilizando como biocatalisadores lipases em acetona e distintos doadores de grupos acila (Esquema 9). Ésteres alifáticos e aromáticos de diferentes tipos foram introduzidos seletivamente na hidroxila primária pela modificação de vários parâmetros, tais como: temperatura, solvente e fonte de lipase (OTTOLINA, CARREA & RIVA, 1989).



Esquema 9 - Produção enzimática de ésteres do cloranfenicol (OTTOLINA, CARREA & RIVA, 1989).

No mesmo ano Daus desenvolve um processo para o preparo do antibiótico palmitato de 3-cloranfenicol sem usar cloreto metileno melhorando a produção bem como o proporcionando um aumento dos rendimentos e qualidade dos produtos (Esquema 10). A adição de DMF como um co-solvente permitiu o uso de tolueno ou xileno para a reação e o isolamento (DAUGS, 2000).

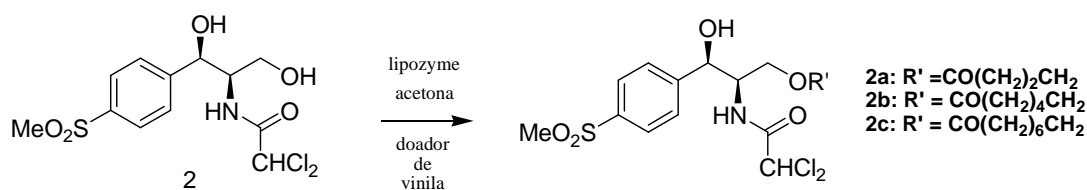


Esquema 10 - Preparo de derivados de **1** em diferentes solventes (DAUGS, 2000).

A distribuição do produto observada pela concorrência na esterificação de grupos hidroxila primários e secundários de cloranfenicol foi bastante diminuída e um estudo cinético estimou uma diferença de 1000 vezes nas constantes de velocidade para os dois locais. Um pequeno aumento nos níveis de impureza durante os ensaios de produção foi observado para a reação durante o processo no qual foi prorrogado tempo necessário na escala de 1000 kg.

Tianfenicol (**2**, Figura 1, Pág 18) é um análogo sintético de cloranfenicol (**1**), atualmente produzido em grandes quantidades, com cerca de 100 toneladas por ano, e usado como antibiótico humano e veterinário. Uma vez que apenas o enantiomero (1*R*,2*R*) é ativo, algumas sínteses foram desenvolvidas, nas quais o composto enantiomericamente puro foi obtido através de resoluções.

No ano de 1989 é relatado na literatura o primeiro trabalho de síntese de derivados de tianfenicol (**2**) utilizando-se enzimas isoladas, seguindo o mesmo procedimento descrito anteriormente para cloranfenicol (**1**) (OTTOLINA, CARREA & RIVA, 1989). Posteriormente, Shi e colaboradores publicaram a produção de três ésteres vinílicos do tianfenicol, Esquema 11, utilizando diferentes doadores acila de cadeia carbônica com comprimentos variados (C4, C6 e C10). Os ésteres foram sintetizados regioseletivamente em 73%, 81%, 63% de rendimento, respectivamente, empregando-se Lipozyme® imobilizada como catalisador, em acetona a 50 ° C por 12 horas (SHI *et al*, 2005).



Esquema 11 - síntese de derivados de **2** utilizando diferentes doadores de acila (SHI *et al*, 2005).

De fato, acetilação do cloranfenicol (**1**) e tianfenicol (**2**) utilizando lipases e doadores de acila vinílicos leva a compostos acilados em 3'. Diante da importância biológica do **1** e **2**, faz-se necessário a obtenção dos compostos acilados em 1' através da hidrólise dos derivados de **1** e **2** diacilados, bem a como produção de novos ésteres de **2** através de acilação enzimática utilizando distintos doadores de acila.

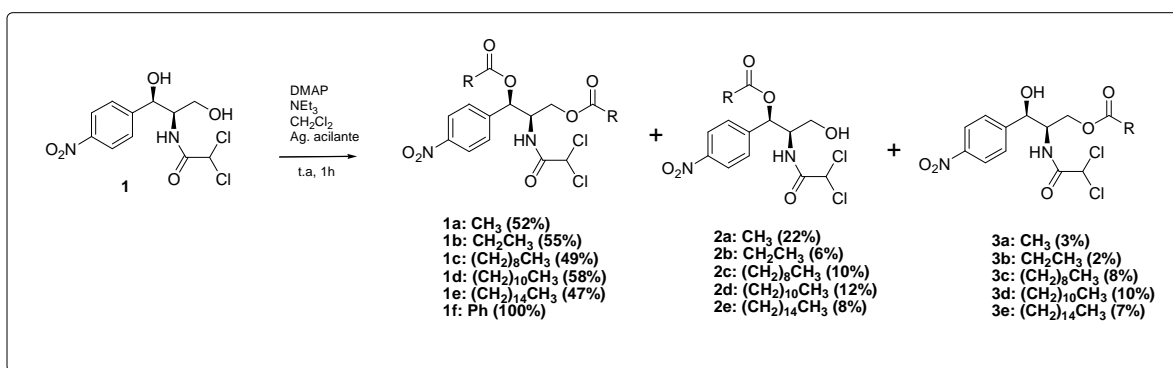
## 1.3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

### 1.3.1 Estudo quimio-enzimático e síntese de ésteres de cloranfenicol (1)

Os resultados discutidos a seguir tratam do estudo de condições e parâmetros racionais visando à obtenção de derivados do cloranfenicol (1) com alta regioseletividade. Para isso, os produtos foram inicialmente sintetizados por via química e utilizados como padrões. Após o ajuste de alguns parâmetros reacionais, realizou-se a síntese por via enzimática dos derivados de 1.

#### 3.1.1 Acetilação do cloranfenicol por via química (1)

Desenvolveu-se a síntese, por via química, dos ésteres do cloranfenicol mono e diacilado (Esquema 12), os quais serviram como padrões para as metodologias de análise em cromatografia em camada delgada e CLAE. Os produtos foram purificados por cromatografia (Item 1.4.4.1, Pág. 65) e caracterizados por RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ .



Esquema 12 - Acetilação do cloranfenicol (1) por métodos químicos.

Nesta etapa, para cada reação foram obtidos três produtos **1(a – f)**, **2(a – e)** e **3(a – e)**, que quando analisados por RMN exibiram as seguintes características:

O espectro de RMN  $^1\text{H}$  de **1a** (Figura 4B) apresentou, além dos vários sinais observados para cloranfenicol (1) (Figura 4A, Pág. 30), dois sinais intensos em  $\delta$  2,06 (s, 3H) e  $\delta$  2,17 (s, 3H) respectivamente, referentes a duas metilas dos grupos acetila. O espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  de **1a** (Figura 4C) apresentou, além de vários outros sinais, dois em  $\delta$  20,77 e  $\delta$  20,98 referentes às duas metilas dos grupos acetila, além dos dois sinais em  $\delta$  169,77 e  $\delta$  170,66 referentes a duas carbonilas de éster. Comparando-se os dados de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  de 1 e **1a** chegou-se a conclusão de que **1a** trata-se do produto diacetilado, denominado 1',3'-diacetato de cloranfenicol.

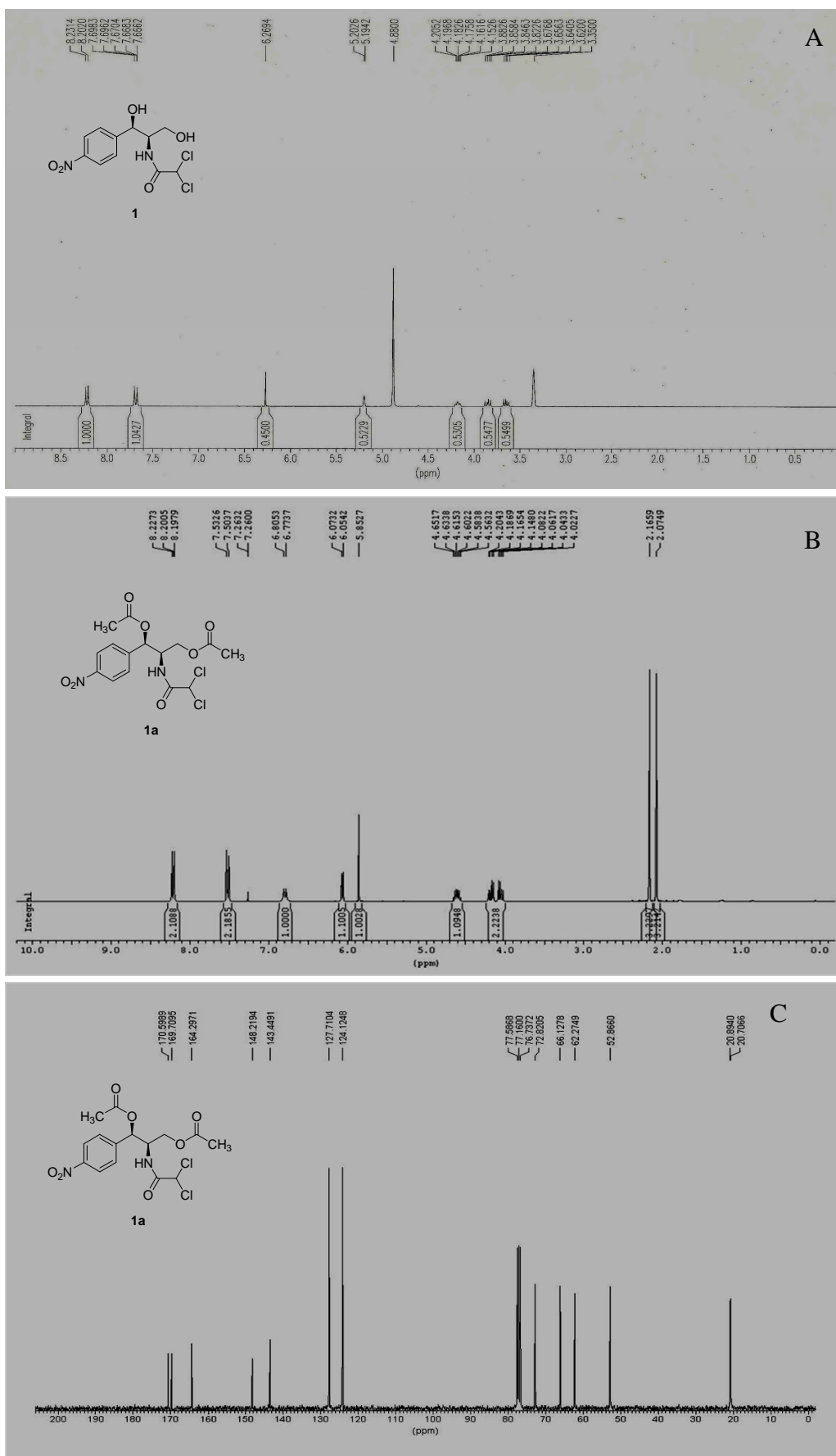


Figura 4 – A) Espectro de RMN  $^1\text{H}$  de **1**, MeOD, 300 MHz; B) Espectro de RMN  $^1\text{H}$  de **1a**,  $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz; C) Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  de **1a**,  $\text{CDCl}_3$ , 75 MHz.

O espectro de RMN  $^1\text{H}$  de **2a** (Figura 5A) apresentou além dos vários sinais observados para cloranfenicol (**1**) (Figura 4A, Pág. 30), um sinal intenso em  $\delta$  2,17 (s, 3H), referente a uma metila de grupo acetila. A presença do grupo acetila nesse derivado foi também confirmada através dos sinais em  $\delta$  21,50 e  $\delta$  170,43 observados no espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  de **2a** (Figura 5B). Comparando-se os dados de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  de **1** e **2a** chegou-se a conclusão de que **2a** tratava-se do derivado monoacetilado. Comparando-se os dados obtidos para **2a** com dados da literatura (OTTOLINA, CARREA & RIVA, 1989), chegou-se a conclusão de que **2a** trata-se de 1'-acetato de cloranfenicol.

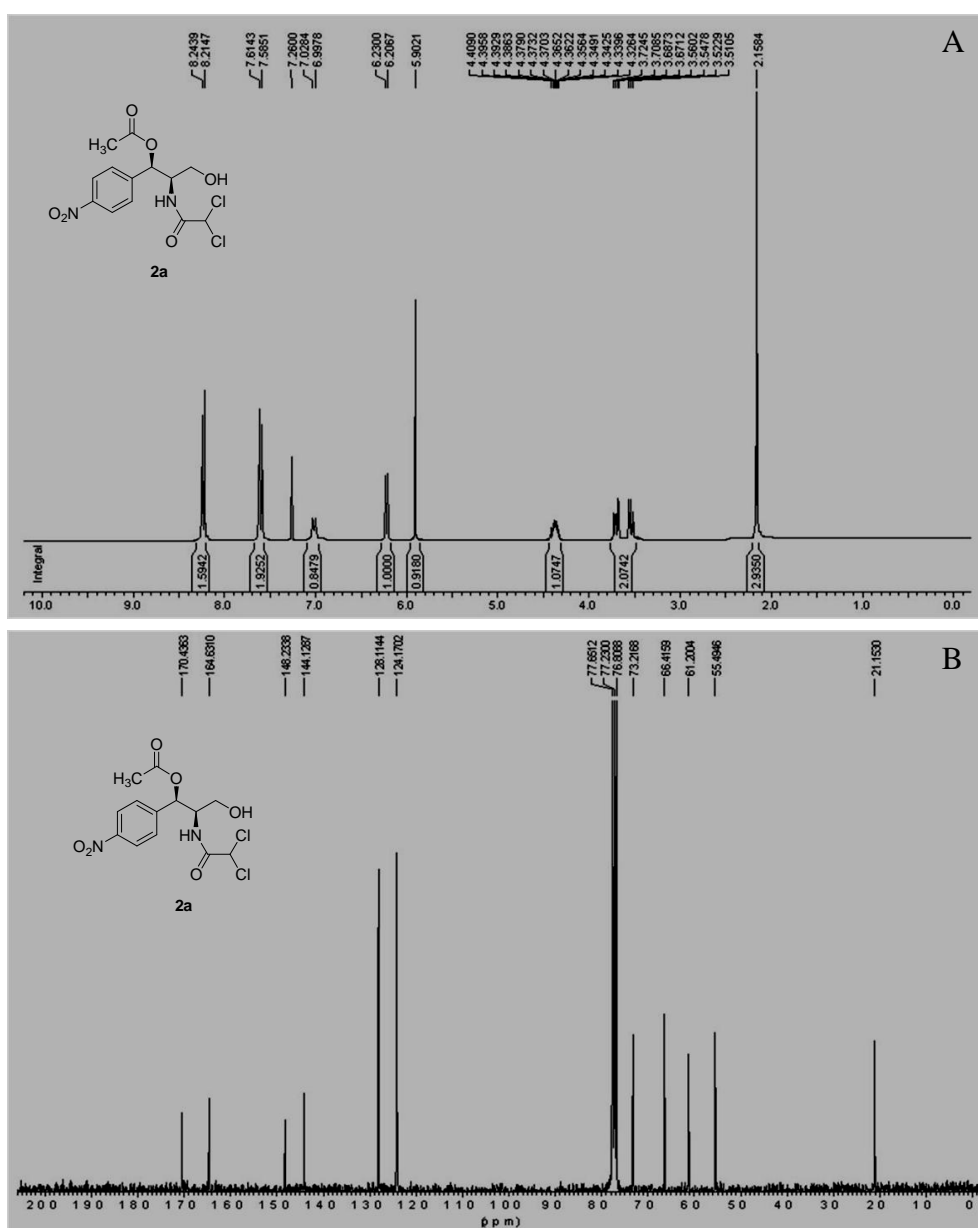


Figura 5 - A) Espectro de RMN  $^1\text{H}$  de **2a**,  $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz; B) Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  de **2a**,  $\text{CDCl}_3$ , 75 MHz.

O espectro de RMN  $^1\text{H}$  de **1b** (Figura 6A) apresentou além dos vários sinais observados para cloranfenicol (**1**) (Figura 4A, Pág. 30), um sinal intenso em  $\delta$  1,15 (m, 6H), referente a dois grupos  $-\text{CH}_3$  e um sinal em  $\delta$  2,39 (m, 4H) referente a dois grupos  $-\text{CH}_2$ . O espectro de RNM  $^{13}\text{C}$  de **1b** (Figura 6B) apresentou dois sinais em  $\delta$  9,10 e  $\delta$  9,17 referentes a duas metilas, dois sinais em  $\delta$  27,51 e  $\delta$  27,67 referentes a dois grupos  $-\text{CH}_2$  (confirmados por RNM  $^{13}\text{C}$ -DEPT, ver Anexos), bem como dois sinais em  $\delta$  173,29 e  $\delta$  174,15 referente a duas carbonilas de éster. Comparando-se os dados de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  de **1** e **1b** chegou-se a conclusão de que **1b** trata-se do produto diacilado chamado 1',3'-dipropionato de cloranfenicol.

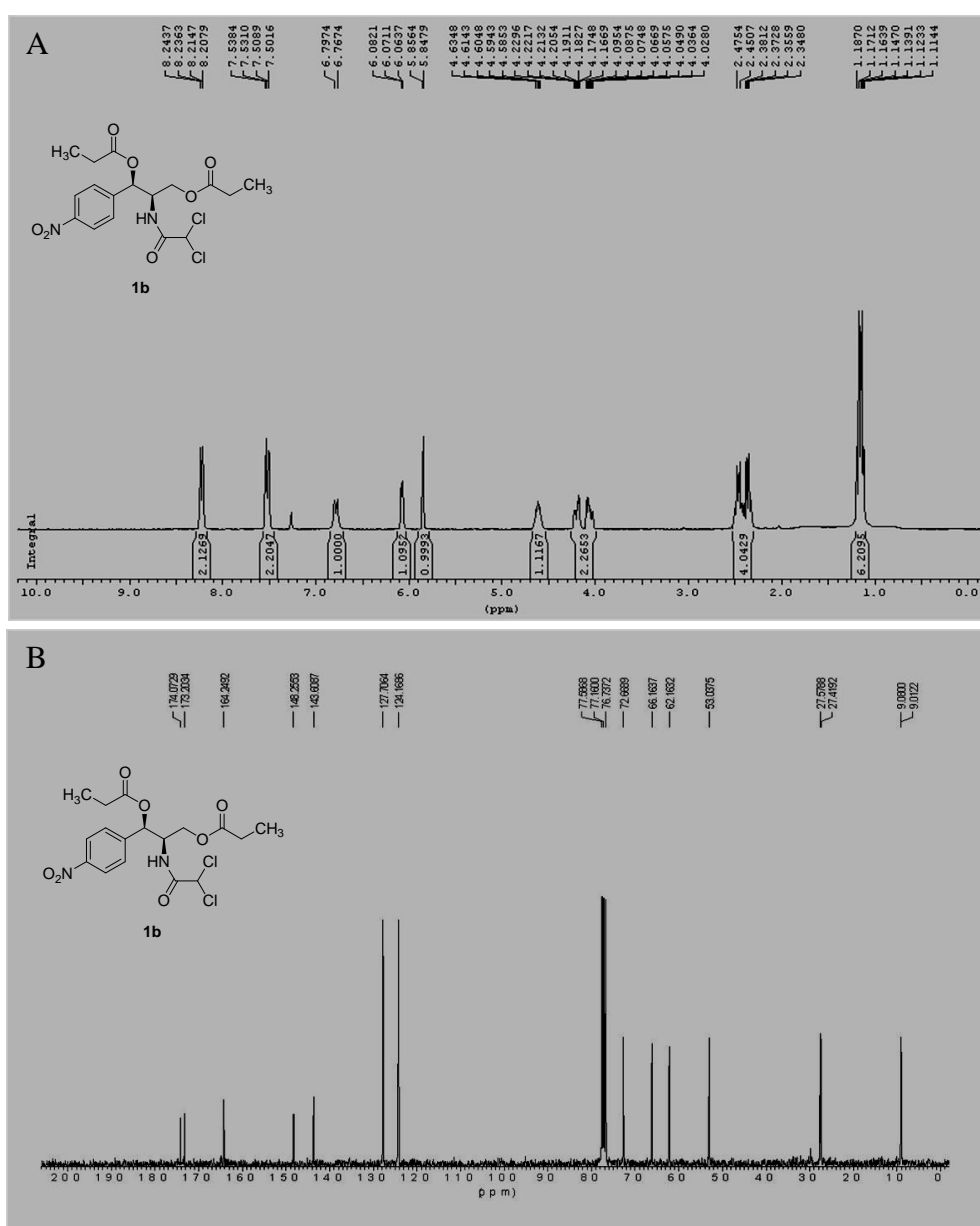


Figura 6 - A) Espectro de RMN  $^1\text{H}$  de **1b**,  $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz; B) Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  de **1b**,  $\text{CDCl}_3$ , 75 MHz.



O espectro de RMN  $^1\text{H}$  de **2b** (Figura 7A) apresentou além dos vários sinais observados para cloranfenicol (**1**) (Figura 4A, Pág. 30), um sinal intenso em  $\delta$  1,16 (t,  $J = 7,7$  Hz, 3H) referente a um grupo  $-\text{CH}_3$  e um sinal em  $\delta$  2,45 (q,  $J = 7,7$  Hz, 2H) referente a um grupo  $-\text{CH}_2$ . O espectro de RNM  $^{13}\text{C}$  de **2b** (Figura 7B) apresentou, além de vários outros sinais, um em  $\delta$  9,13 referentes a uma metila e um sinal em  $\delta$  27,77 referente a um grupo  $-\text{CH}_2$  (confirmado por RNM  $^{13}\text{C}$ -DEPT, ver Anexos), bem como um sinal em  $\delta$  173,85 referente a uma carbonila de éster. Comparando-se os dados de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  de **1** e **2b** chegou-se a conclusão de que **2b** trata-se de um produto monoacilado. Comparando-se os dados obtidos para **2b** com dados da literatura (OTTOLINA, CARREA & RIVA, 1989), chegou-se a conclusão de que **2b** trata-se de 1'-propionato de cloranfenicol.

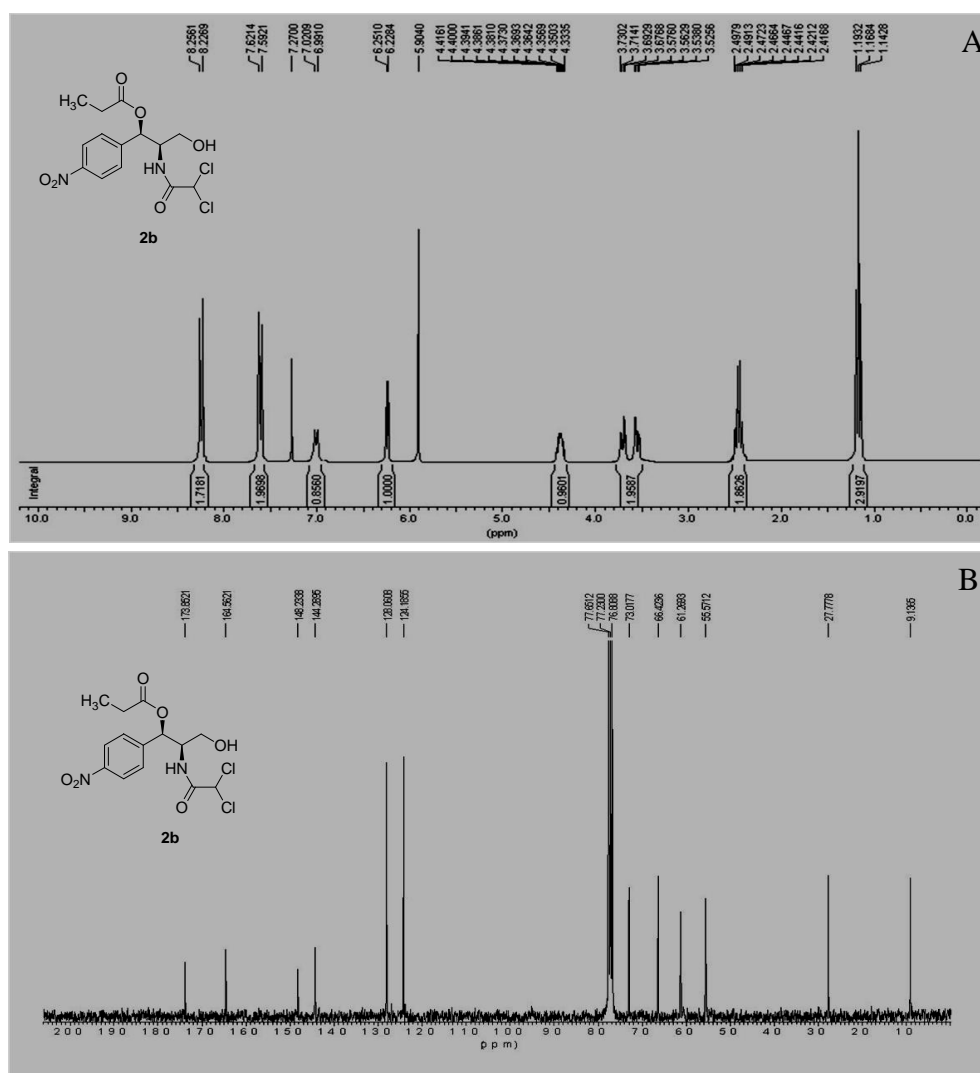


Figura 7 - A) Espectro de RMN  $^1\text{H}$  de **2b**,  $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz; B) Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  de **2b**,  $\text{CDCl}_3$ , 75 MHz.



O espectro de RMN  $^1\text{H}$  de **2c** (Figura 9A) apresentou além dos vários sinais observados para cloranfenicol (**1**) (Figura 4A, Pág. 30), dois sinais intensos, sendo um em  $0,87\ \delta$  (t,  $J = 7,0\ \text{Hz}$ , 3H), referente a um grupo  $-\text{CH}_3$  e outro em  $\delta 1,25$  (s, 16H) característico de cadeia lateral formada por vários grupos  $-\text{CH}_2$  ligados entre si. Além destes, foram ainda observados um sinal em  $\delta 1,63$  (m, 2H) referente a dois grupos  $-\text{CH}_2$  e um sinal em  $\delta 2,42$  (t,  $J = 7,9\ \text{Hz}$ , 2H) referente a hidrogênios  $\alpha$  carbonila. O espectro de RNM  $^{13}\text{C}$  de **2c** (Figura 9B) apresentou, além de vários outros sinais, um em  $\delta 14,29$  referente a um grupo  $-\text{CH}_3$ , cinco sinais entre  $\delta 22,85$  e  $\delta 34,40$  referentes a oito grupos  $-\text{CH}_2$  (confirmados por RNM  $^{13}\text{C}$ -DEPT, ver Anexos), bem como um sinal em  $\delta 173,34$  referente a uma carbonila de éster. Os dados apresentados sugeriram que **2c** trata-se de um produto monoacilado. Comparando-se os dados obtidos para **2c** com dados da literatura (OTTOLINA, CARREA & RIVA, 1989), chegou-se a conclusão de que **2c** trata-se de 1'-decanoato de cloranfenicol.

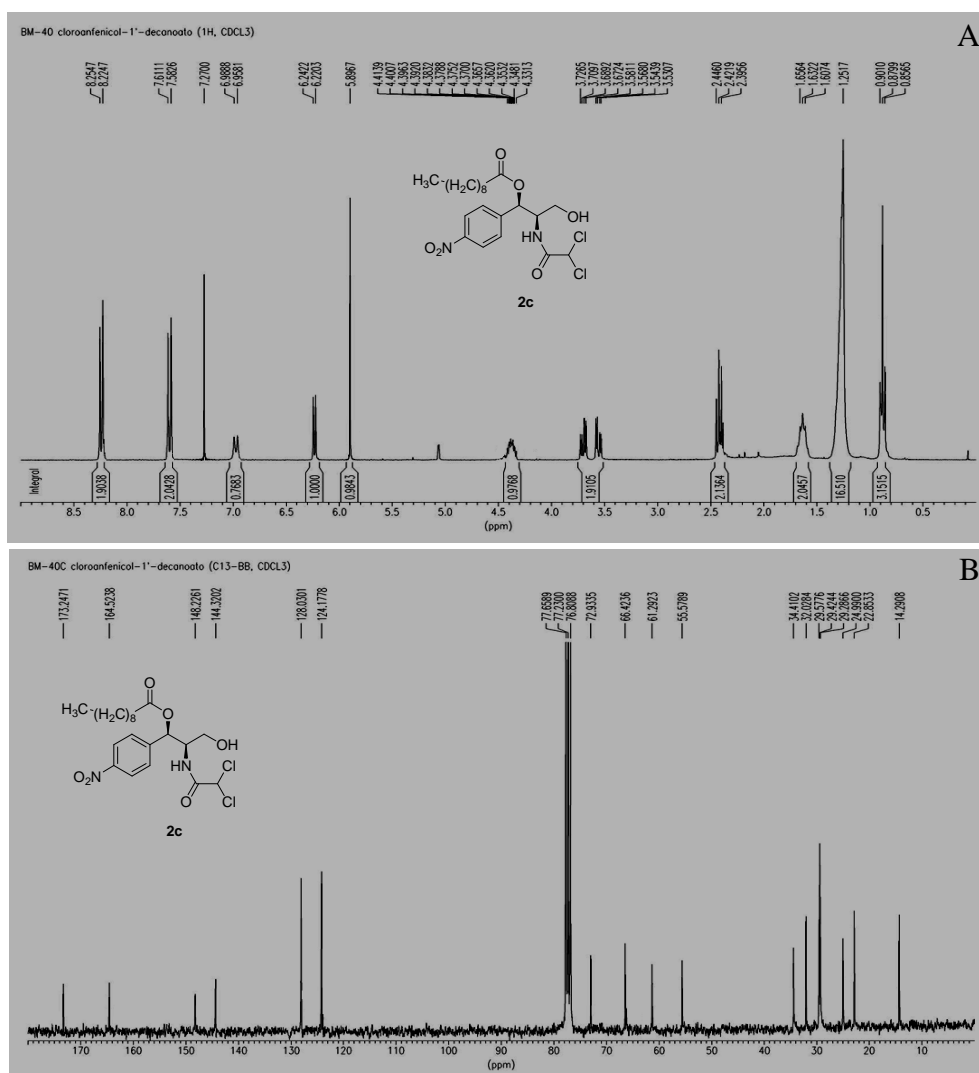


Figura 9 - A) Espectro de RMN  $^1\text{H}$  de **2c**,  $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz; B) Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  de **2c**,  $\text{CDCl}_3$ , 75 MHz. 35

Os espectros de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  de **1c**, **1d** e **1e** são bastante parecidos (ver Anexos), sendo eles diferenciados unicamente pelo tamanho da cadeia lateral. O mesmo ocorre para os derivados **2c**, **2d** e **2e**, os quais foram identificados comparando-se os seus dados espectrométricos com dados descritos na literatura (OTTOLINA, CARREA & RIVA, 1989) para esses mesmos compostos.

O espectro de RMN  $^1\text{H}$  **1f** (Figura 10) apresentou além dos vários sinais observados para cloranfenicol (**1**) (Figura 4A, Pág. 30), sinais em  $\delta$  7,42 - 7,68 (m, 8H),  $\delta$  7,97 - 8,0 (m, 2H),  $\delta$  8,05 - 8,08 (m, 2H) e  $\delta$  8,25 (d,  $J = 8,8$  Hz, 2H), sugerindo a presença de três anéis aromáticos. Comparando-se os dados de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  de **1** e **1f** chegou-se a conclusão de que **1f** trata-se do produto diacetilado chamado 1',3'-dibenzoato de cloranfenicol.

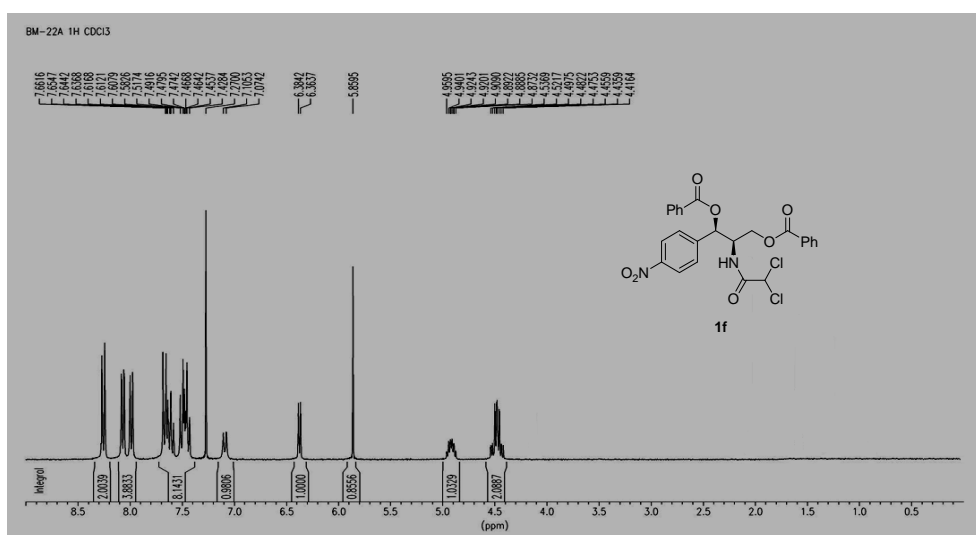


Figura 10 - Espectro de RMN  $^1\text{H}$  de **1f**,  $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz.

Dados da literatura mostram que a acetilação enzimática de análogos do cloranfenicol (**1**), produz apenas o produto de acetilação da hidroxila primária **3a** (GOTOR *et al*, 2008). Deste modo, resolveu-se estudar reações de hidrólise enzimática do 1',3'-diacetato de cloranfenicol (**1a**), afim de se obter como produto majoritário 1'-acetato de cloranfenicol (**2a**).

### 1.3.1.2 Estudo de hidrólise enzimática de 1',3'-acetato de cloranfenicol (**1a**)

Para realização da reação de hidrólise enzimática de **1a**, as condições foram otimizadas pela variação de parâmetros tais como: enzima, temperatura, solvente orgânico, pH do tampão e proporção solvente/tampão, com o intuito de se obter **2a** na maior proporção possível.

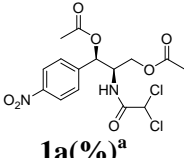
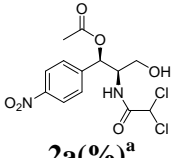
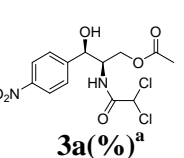
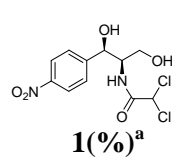
#### 1.3.1.2.1 Seleção da enzima

Inicialmente, as enzimas CAL-B, LIPASE PS Amano SD e LIPASE PS Amano IM, foram testadas na reação de hidrólise de **1a** (Item 4.4.2, pág. 105). Uma reação controle foi realizada na ausência de enzimas. Análise por CCDA dos extratos reacionais revelaram a formação de produtos de hidrólise somente para a reação catalisada por CAL-B, sendo esta enzima a empregada nas demais reações.

#### 1.3.1.2.2 Estudo da influência do solvente nas reações de hidrólise enzimática de **1a**

A influência do solvente na reação de hidrólise enzimática de **1a** foi investigada, uma vez que a literatura descreve esse parâmetro reacional como sendo muito importante na formação dos produtos (FRANSSEN *et al.*, 1998). A metodologia empregada nesse processo está descrito, no Item 1.4.4.3.1, Pág 66. Os solventes testados foram CH<sub>3</sub>CN, 1,4-dioxano e THF, os quais se mostraram capazes de solubilizar o substrato. Os produtos obtidos foram analisados por CLAE e os resultados encontram-se na Tabela 1.

Tabela 1 - Reações de hidrólise de **1a** utilizando diferentes solventes orgânicos (conversão %).

Reação	Solvente	 <b>1a(%)<sup>a</sup></b>	 <b>2a(%)<sup>a</sup></b>	 <b>3a(%)<sup>a</sup></b>	 <b>1(%)<sup>a</sup></b>
<b>1</b>	CH <sub>3</sub> CN	17,5	74,5	0	8,0
<b>2</b>	1,4-Dioxano	73,0	9,0	0	18,0
<b>3</b>	THF	54,0	30,5	0	15,5

<sup>a</sup> Quantificado por CLAE, Condições reacionais: Enzima CAL-B, Solvente/tampão 80:20, pH = 7, 30 °C e 250 rpm por 24 h Condições de análise: fluxo de 0,8 mL/min, Hexano:isopropanol (80:20), 40 °C, 18 bar, 10 µL de injeção, coluna quiral AS

Os cromatogramas apresentados na Figura 11(A-C), Pág. 38, bem como os dados apresentados na Tabela 4, mostram, claramente, que há uma maior seletividade quando o solvente utilizado nas reações de hidrólise de **1a** foi CH<sub>3</sub>CN (Reação 1).

Nesse caso, 82,5% do substrato de partida foram hidrolisados após 24 horas de reação, tendo como produto majoritário **2a** (74,5%) e apenas 8,0% de cloranfenicol (**1**). Na reação realizada em THF (Reação 3), apenas 30,5% de **2a** e 15,5% de **1** foram formados no mesmo período de tempo. Apenas 27% de **1a** foram hidrolisados quando 1,4-dioxano foi empregado como solvente (Reação 2), sendo que **2a** (9%) foi obtido como produto minoritário da reação e o cloranfenicol (**1**) foi formado em 18% de conversão. Vale ressaltar que em nenhum caso foi observada a formação de **3a**.

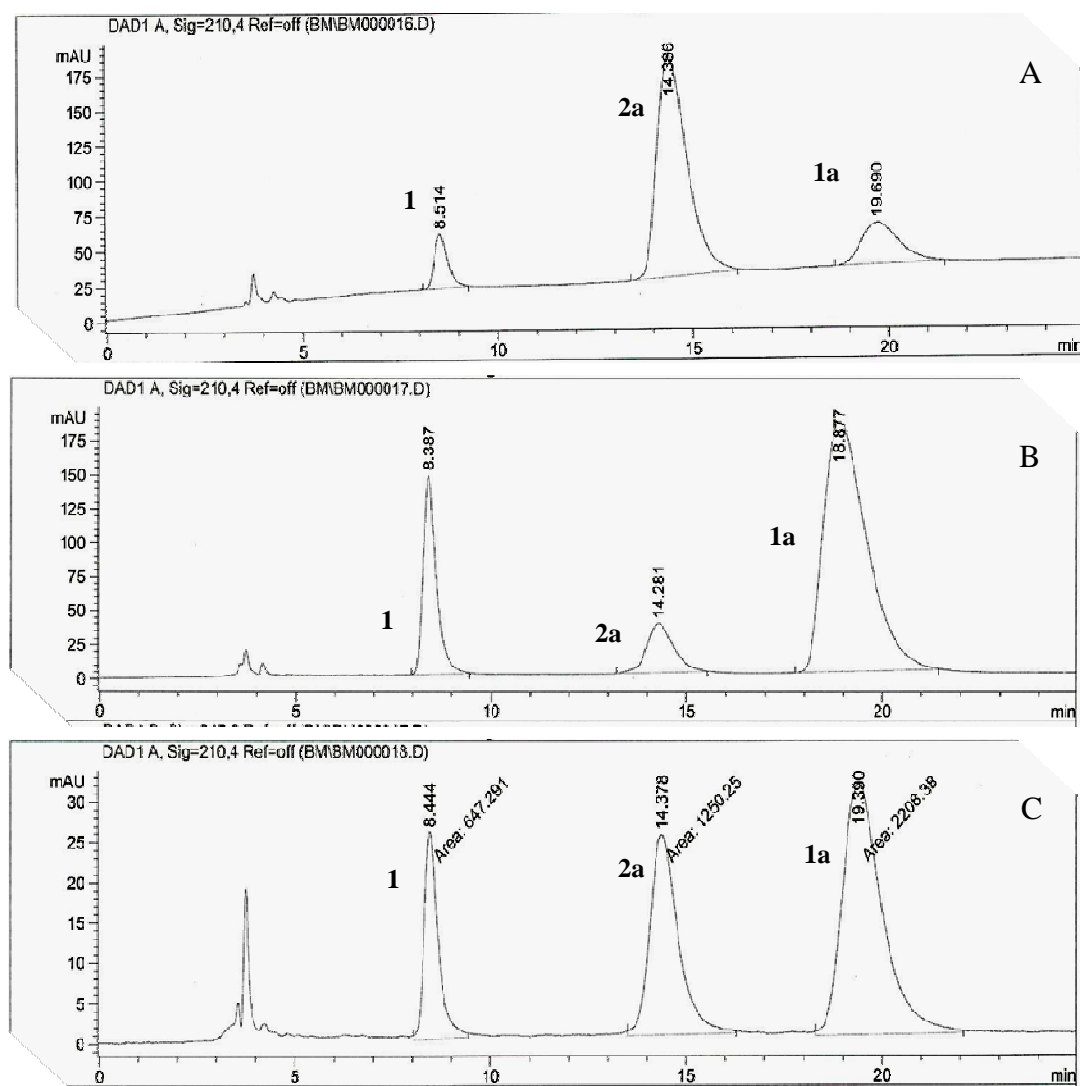
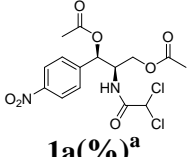
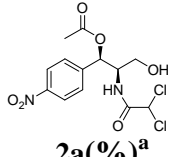
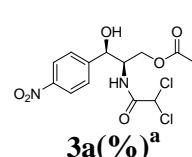
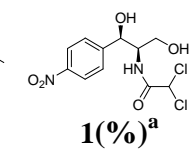


Figura 11 – Cromatogramas das reações de hidrólise de **1a** utilizando como solvente orgânico: A) CH<sub>3</sub>CN; B) 1,4-dioxano; C) THF, a 30 °C de temperatura.

### 1.3.1.2.3 Estudos da influência da temperatura nas reações

Em um segundo estudo, investigou-se a influência da temperatura de reação a fim de se comparar com os dados obtidos anteriormente. A metodologia empregada nesse processo esta descrita no Item 1.4.4.3.2, Pág 66. Os produtos obtidos foram analisados por CLAE, como mostrado na Figura 12(A-C), Pág 40, e os resultados encontram-se na Tabela 2.

Tabela 2 – Reação de hidrólise de **1a** a 20 e 30 °C (conversão %)

Reação	Solvente	T(°C)	 <b>1a(%)<sup>a</sup></b>	 <b>2a(%)<sup>a</sup></b>	 <b>3a(%)<sup>a</sup></b>	 <b>1(%)<sup>a</sup></b>
<b>1</b>	CH <sub>3</sub> CN	30	17,5	74,5	0	8,0
<b>2</b>	CH <sub>3</sub> CN	20	7,5	78,0	0	14,5
<b>3</b>	1,4-Dioxano	30	73,0	9,0	0	18,0
<b>4</b>	1,4-Dioxano	20	63,0	14,0	0	23,0
<b>5</b>	THF	30	54,0	30,5	0	15,5
<b>6</b>	THF	20	20,5	67,5	0	12,0

<sup>a</sup> Quantificado por CLAE

Condições reacionais: Enzima CAL-B, CH<sub>3</sub>CN/tampão 80:20, pH = 7 e 250 rpm por 24 h

Condições de análise: fluxo de 0,8 mL/min, Hexano:isopropanol (80:20), 40 °C, 18 bar, 10 µL de injeção, coluna quiral AS

A Tabela 2 confirma que em ambas as temperaturas a reação foi mais seletiva quando se utilizou CH<sub>3</sub>CN como solvente da reação. Observou-se ainda que, em todos os casos, os processos realizados a 20 °C foram os que apresentaram maiores conversões e seletividades. Na reação realizada em CH<sub>3</sub>CN, a diminuição da temperatura promoveu um pequeno aumento na proporção de **2a** e uma inversão nas proporções de **1a** e **1**. Quando o processo foi realizado utilizando-se 1,4-dioxano como solvente, observou-se um aumento de mais 10% na conversão de **1a** e na proporção dos produtos **2a** e **1**. No caso específico do emprego de THF como solvente, observou-se um aumento de 33% na conversão de **1a** e um aumento de mais 37% na seletividade. Embora esta tenha sido a condição que apresentou melhores resultados com a diminuição da temperatura, os resultados obtidos com CH<sub>3</sub>CN ainda foram os melhores.

Desta forma, optou-se por continuar trabalhando com CH<sub>3</sub>CN como solvente orgânico, realizando-se as reações a 20 °C.

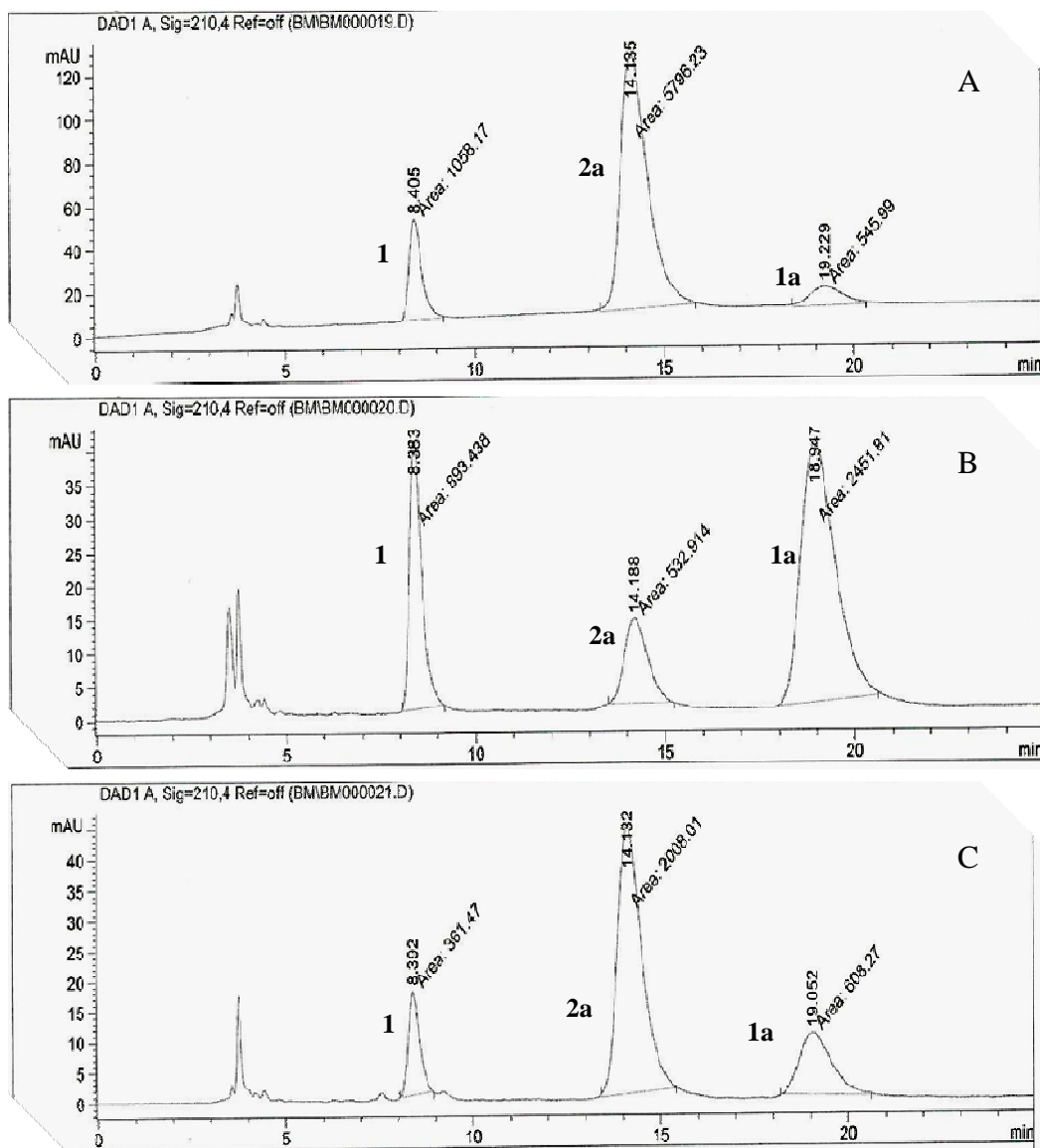


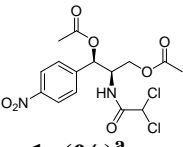
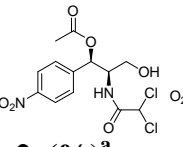
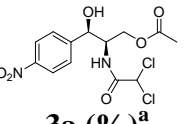
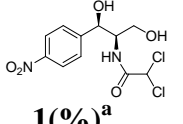
Figura 12 - Cromatogramas das reações de hidrólise de **1a** utilizando como solvente orgânico: A) CH<sub>3</sub>CN; B) 1,4-dioxano; C) THF, a 20 °C de temperatura.



### 1.3.1.2.4 Estudo da influência do pH nas reações

Investigou-se ainda a influência do pH da reação na conversão de **1a** e na proporção dos produtos formados. A metodologia empregada nesse processo esta descrita no Item 1.4.4.3.3, Pág 67. Os produtos obtidos foram analisados por CLAE, como mostrado nas Figuras 13(A-C) Pág 42, e 14(A-C) Pág 43, e os resultados encontram-se apresentados na Tabela 3.

Tabela 3 – Reação de hidrólise de **1a** utilizando pH de 5,5 a 8,5 (conversão %)

Reação	pH	 <b>1a(%)<sup>a</sup></b>	 <b>2a(%)<sup>a</sup></b>	 <b>3a (%)<sup>a</sup></b>	 <b>1(%)<sup>a</sup></b>
<b>1</b>	5,5	81,7	9,8	0	8,5
<b>2</b>	6,0	42,9	56,1	0	1,0
<b>3</b>	6,5	38,1	59,4	0	2,5
<b>4</b>	<b>7,0</b>	<b>7,5</b>	<b>78,0</b>	<b>0</b>	<b>14,5</b>
<b>5</b>	7,5	39,7	47,8	0	12,5
<b>6</b>	8,0	33,1	51,8	0	15,1
<b>7</b>	8,5	31,6	50,7	0	17,7

<sup>a</sup> Quantificado por CLAE

Condições reacionais: Enzima CAL-B, CH<sub>3</sub>CN/tampão 80:20, 20 °C e 250 rpm por 24 h

Condições de análise: fluxo de 0,8 mL/min, Hexano:isopropanol (80:20), 40 °C, 18 bar, 10 µL de injeção, coluna quiral AS

É sabido que as enzimas lipases têm suas maiores atividades catalíticas na faixa de pH de 6,0 a 7,5. Estudos similares revelaram que em pH ácido algumas lipases apresentam baixa estabilidade (WATANABE *et al*, 1977).

Desta forma, as reações foram realizadas variando-se o pH de 5,5 a 8,5 a fim de comparar os resultados com os anteriormente obtidos nas reações realizadas a pH 7,0.

Analisando a Tabela 3 é possível observar que os melhores resultados foram obtidos quando a reação foi realizada em pH 7,0 e que a diminuição do pH levou a uma diminuição na conversão de **1a**. em pH 5,5, observou-se a menor proporção do produto **2a** (9,8%). A reação realizada em pH 6,0 (reação 2) mostrou-se bastante seletiva, formando **2a** em 56,1% e apenas 1% de **1**. Em pH 7,0 houve um aumento na conversão, mas diminuição da seletividade. Quando as reações foram realizadas em pH acima de 7,0, foram observadas menores variações na conversão de **1a** e na proporção dos

produtos **2a** e **1**. Entretanto, observou-se que nessa faixa de pH o diol **1** é formado em proporções maiores que aquelas obtidas nas reações realizadas em pH menor que 7,0.

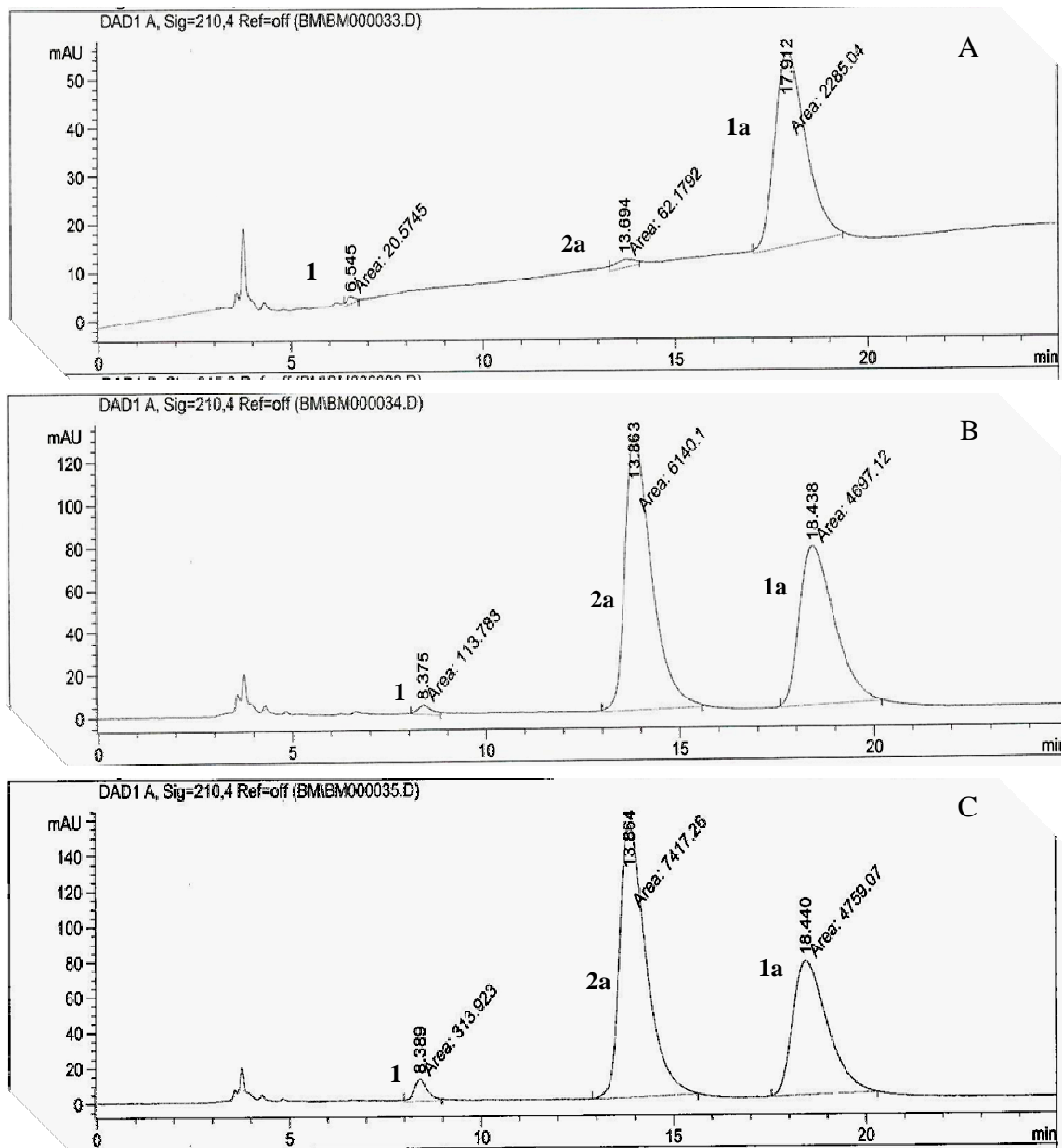


Figura 13 - Cromatograma das reações de hidrólise de **1a**, pH do tampão: A) 5,5; B) 6,0; C) 6,5 a 20 °C de temperatura.

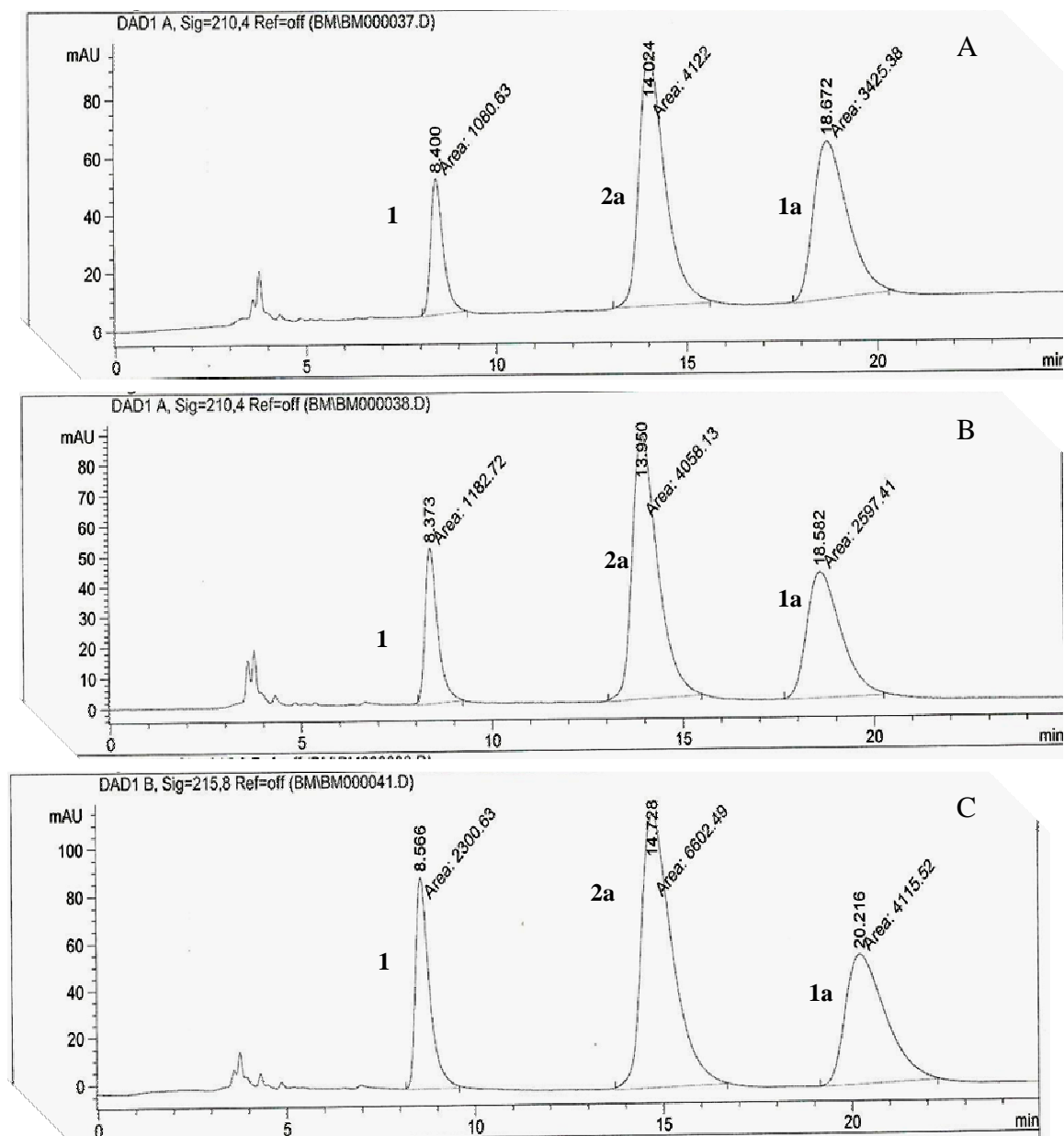
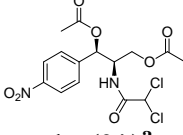
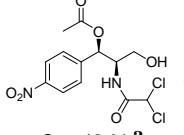
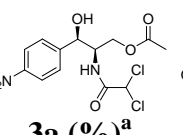
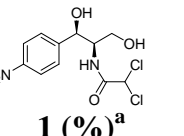


Figura 14 - Cromatograma das reações de hidrólise de **1a**, pH do tampão: A) 7,5; B) 8,0; C) 8,5 a 20 °C de temperatura.

### 1.3.1.2.5 Estudo da influência da proporção tampão: solvente nas reações

Investigou-se também a influência da proporção de tampão fosfato e solvente orgânico, a fim de se comparar com os dados obtidos anteriormente. A metodologia empregada nesse processo está descrito no Item 1.4.4.3.4, Pág 67. Os produtos obtidos foram analisados por CLAE (Figura 15, Pág 45) e os resultados, bem como os valores de temperatura testados, encontram-se na Tabela 4.

Tabela 4 – Reação de hidrólise de **1a** variando-se a proporção entre tampão e solvente (conversão %)

Reação	Tampão fosfato 0,1M	CH <sub>3</sub> CN				
			<b>1a (%)<sup>a</sup></b>	<b>2a (%)<sup>a</sup></b>	<b>3a (%)<sup>a</sup></b>	<b>1 (%)<sup>a</sup></b>
<b>1</b>	95%	5%	83,0	4,0	0	13,0
<b>2</b>	90%	10%	40,5	42,0	0	17,5
<b>3</b>	<b>80%</b>	<b>20%</b>	<b>17,5</b>	<b>74,5</b>	<b>0</b>	<b>8,0</b>
<b>4</b>	50%	50%	79,0	9,0	6,0	6,0
<b>5</b>	20%	80%	88,0	9,5	2,0	1,0

<sup>a</sup> Quantificado por CLAE

Condições reacionais: Enzima CAL-B, pH = 7, 20 °C e 250 rpm por 24 h

Condições de análise: fluxo de 0,8 mL/min, Hexano:isopropanol (80:20), 40 °C, 18 bar, 10 µL de injeção, coluna quiral AS

De acordo com os dados mostrados na Tabela 4, fica claro que os melhores resultados são os obtidos anteriormente quando se utilizou uma proporção de 80:20 tampão:CH<sub>3</sub>CN. O aumento da quantidade de tampão fosfato levou à formação de apenas 17% de produto hidrolisado, ao passo que a diminuição da quantidade de tampão no meio reacional (Reações 4 e 5) levou à uma diminuição na conversão e regioseletividade. Garcia e colaboradores utilizaram essa mesma proporção de tampão/solvente (80:20) para a reação de hidrólise enzimática de 3',5'-di-*O*-levulinil-nucleosídeos e obtiveram distintos produtos utilizando distintas enzimas (GARCIA *et al*, 2002). Nazir e colaboradores obtiveram resultados satisfatórios na hidrólise regioseletiva do croteóxido utilizando uma proporção 70:30 (tampão/solvente) em seus experimentos (NAZIR *et al*, 2009).

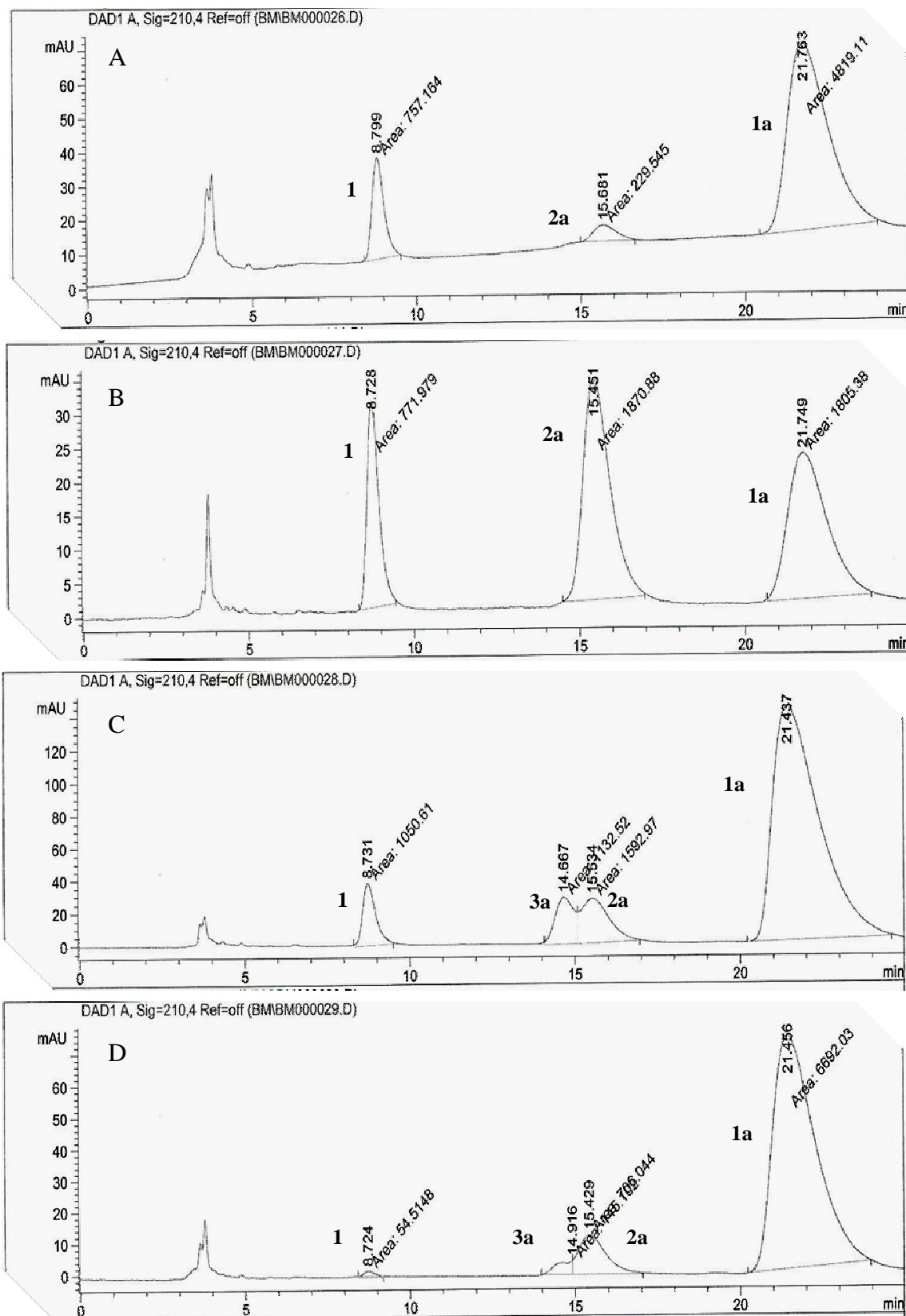
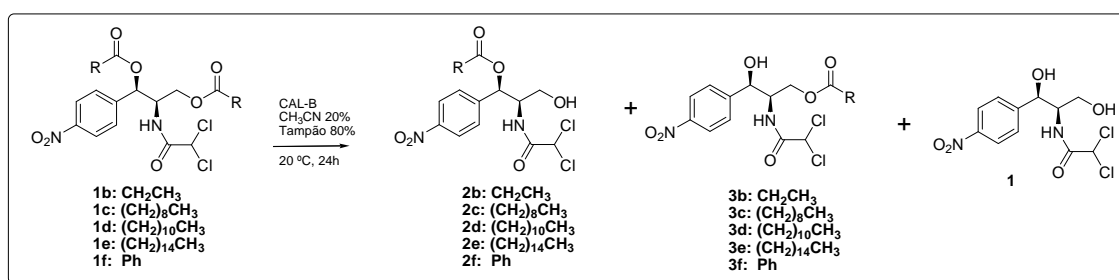


Figura 15– Cromatogramas das reações de Hidrólise de **1a**, utilizando as proporções de solventes/tampão: A) 0,5:9,5, B) 10:90, C) 50: 50, D) 80:20

### 1.3.1.2.6 Hidrólise enzimática de derivados diacilados de cloranfenicol (**1b** – **1f**)

Os experimentos discutidos no Item 3.2.1 indicaram que as melhores condições para hidrólise enzimática de **1a** foi aquela onde se utilizou CAL-B como biocatalisador, em uma mistura de CH<sub>3</sub>CN e tampão fosfato pH = 7,0 na uma proporção de 20:80, temperatura de 20 °C, 250 rpm e tempo de 24h. Desta forma, decidiu-se aplicar tais condições na reação de hidrólise dos derivados de cloranfenicol diacilados (**1b-1f**), os quais se diferenciam pela natureza dos grupamentos alquílicos e arílicos das moléculas (Esquema 13).



Esquema 13 – Reação de hidrólise enzimática de **1b** – **1f**

Os produtos obtidos foram analisados por CLAE (Figura 16(A-E), Pág 45) e os resultados bem como os substratos empregados encontram-se na Tabela 5.

Tabela 5 – Reação de hidrólise de **1b** – **1f** (conversão %)

Reação	(R)	<b>1b-1f</b> (%) <sup>a</sup>	<b>2b-2f</b> (%) <sup>a</sup>	<b>3b-3f</b> (%) <sup>a</sup>	<b>1</b> (%) <sup>a</sup>
<b>1</b>	CH <sub>2</sub> Me	18,8 ( <b>1b</b> )	73,5 ( <b>2b</b> )	3,3 ( <b>3b</b> )	4,4
<b>2</b>	(CH <sub>2</sub> ) <sub>8</sub> Me	89,9 ( <b>1c</b> )	10,1 ( <b>2c</b> )	0 ( <b>3c</b> )	0
<b>3</b>	(CH <sub>2</sub> ) <sub>10</sub> Me	95,8 ( <b>1d</b> )	4,2 ( <b>2d</b> )	0 ( <b>3d</b> )	0
<b>4</b>	(CH <sub>2</sub> ) <sub>14</sub> Me	100 ( <b>1e</b> )	0 ( <b>2e</b> )	0 ( <b>3e</b> )	0
<b>5</b>	Ph	100 ( <b>1f</b> )	0 ( <b>2f</b> )	0 ( <b>3f</b> )	0

<sup>a</sup> Quantificado por CLAE

Condições reacionais: Enzima CAL-B, proporção CH<sub>3</sub>CN/tampão 20:80 pH = 7, 20 °C, 250 rpm por 24 h

Condições de análise: fluxo de 0,8 mL/min, Hexano:isopropanol (80:20), 40 °C, 18 bar, 10 µL de injeção, coluna quiral AS

Analisando os dados da Tabela 5 pode-se observar que a hidrólise de **1b** levou à formação de 73,5% do produto desejado **2b** e 3,3% do regioisômero **3b**. Foi possível observar também que o aumento do tamanho da cadeia lateral (R) do grupo acila no

substrato promoveu uma diminuição significativa da ação hidrolítica da enzima, até um ponto onde não mais se observou reação. Esses resultados sugerem um possível impedimento estérico exercido pelo grande número de carbonos na cadeia lateral, o que impossibilita a formação do complexo entre o substrato e o sítio ativo da enzima.

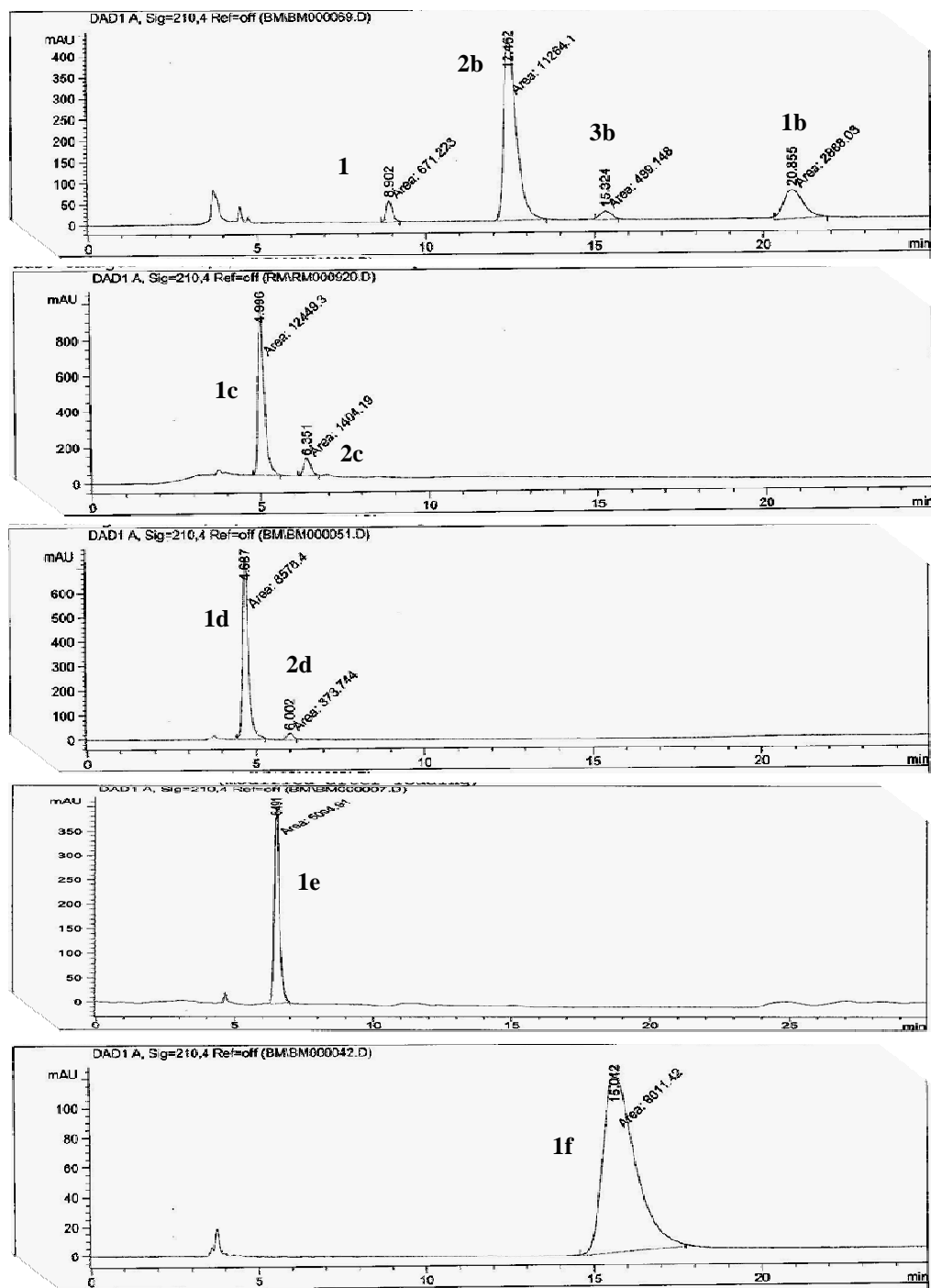
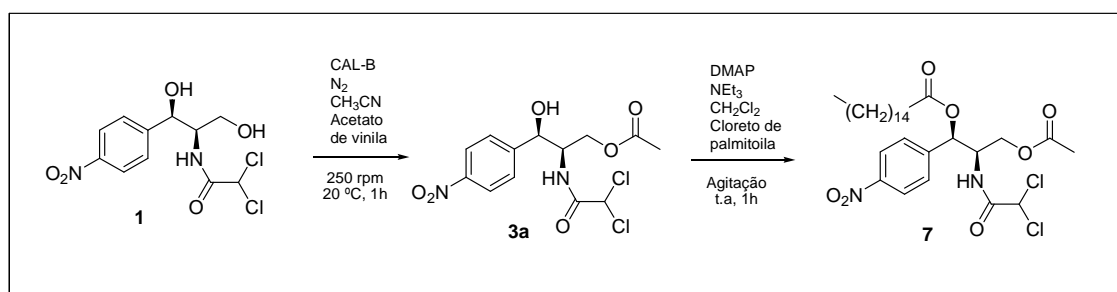


Figura 16 – Cromatogramas das reações de hidrólise de: A) 1b, B) 1c, C) 1d, D) 1e, E) 1f.

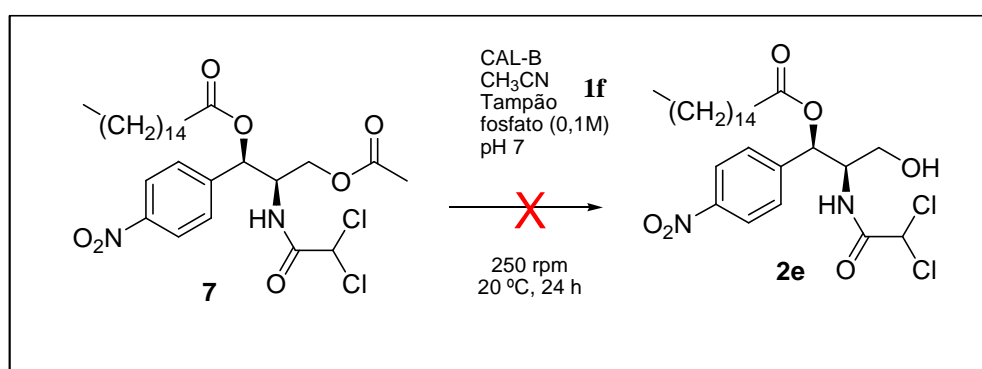
### 1.3.1.2.7 Síntese e hidrólise enzimática de 3'-acetato-1'-palmitato de cloranfenicol (7)

Os resultados anteriormente obtidos revelaram que quanto menor o número de carbonos do grupamento acila na posição menos impedida (3'), um maior valor de conversão é obtido. Nesse sentido, optou-se por realizar a reação de hidrólise do 3'-acetato-1'-palmitato de cloranfenicol contendo um grupo mais volumoso (palmitato) na posição (1') e um grupo menos volumoso (acila) na posição (3'). Inicialmente, realizou-se a acetilação enzimática do cloranfenicol (**1**), conforme Item 4.4.6.1, Pág 74. Seguido da acilação do derivado acetilado (**3a**) utilizando-se cloreto de palmitoila como agente acilante (Item 1.4.4.6.2, Pág 74) (Esquema 14).



Esquema 14 – Síntese químio-enzimática de 1'-palmitato-3'-acetato de cloranfenicol (**7**).

A reação de hidrólise enzimática de 1'-palmitato-3'-acetato de cloranfenicol (**7**) foi realizada (Esquema 14) utilizando-se as condições otimizadas anteriormente na hidrólise de cloranfenicol-1',3'-acetato (**1a**) (Item 1.4.4.7, Pág 75).



Esquema 15 - reação de hidrólise enzimática de 1'-palmitato-3'-acetato de cloranfenicol (**7**)



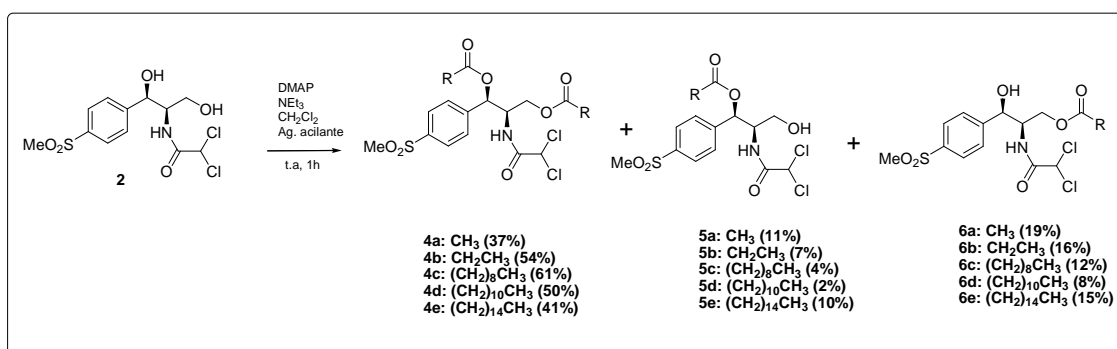
Após 24 horas sob condições reacionais, evaporou-se o solvente sob pressão reduzida e a mistura reacional foi purificada. Entretanto, análise por RMN  $^1\text{H}$ , (ANEXOS) confirmou que o produto se tratava do material de partida (**7**), confirmando que o impedimento estérico exercido pela longa cadeia lateral é um dos fatores que impossibilitam a reação de hidrólise enzimática de **1c** – **1e** nessas condições.

### 1.3.2 Estudo químico-enzimático e síntese de derivados de tianfenicol (**2**)

Dados da literatura afirmam que a acilação do tianfenicol utilizando doadores de acila vinílicos catalisada por lipases tem como único produto o tianfenicol acilado na posição 3' (SHI *et al*, 2005). Visando obter, regioseletivamente, novos derivados acilados do tianfenicol (**2**), realizou-se uma reação de acilação enzimática utilizando CAL-B como catalisador e distintos doadores de acila vinílicos para a obtenção dos compostos acilados na posição 3'. Para a obtenção dos compostos acilados na posição 1', optou-se por realizar reações de hidrólise do diacetato de 1',3'-tianfenicol (**4a**) e dipropionato de 1',3'-tianfenicol (**4b**).

#### 1.3.2.1 Acilação química de tianfenicol (**2**)

Desenvolveu-se a síntese química dos derivados do tianfenicol mono e diacilados (Item 1.4.5.1, Pág 76) de acordo com o Esquema 16. Os mesmos serviram como padrões para as metodologias de análise em cromatografia em camada delgada e CLAE (Item 1.4.5.6, Pág 78). Os produtos foram purificados por cromatografia em gel de sílica, analisados por CLAE e caracterizados por RMN  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ -BB e  $^{13}\text{C}$ -DEPT (ANEXOS)



Esquema 16 – Acilação do tianfenicol (**2**) por métodos químicos.

Nesta etapa, para cada reação foram obtidos três produtos **4x**, **5x** e **6x** (onde x = a, b, c, d, e), os quais foram isolados e analisados por ressonância magnética nuclear de hidrogênio-1 e carbono-13 (RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ , respectivamente).

O espectro de RMN  $^1\text{H}$  de **4a** (Figura 17B) apresentou, além dos vários sinais observados para tianfenicol (**2**) (Figura 17A), dois sinais intensos em  $\delta$  2,07 (s, 3H) e  $\delta$  2,15 (s, 3H) referentes a duas metilas. O espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  de **4a** (Figura 18) apresentou, além de vários outros sinais, dois em  $\delta$  20,77 e  $\delta$  20,97 referentes a duas metilas, bem como dois sinais em  $\delta$  169,84 e  $\delta$  170,68 referentes a duas carbonilas de éster. Comparando-se os dados de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  de **2** e **4a** (Tabela 6, Pág 51), chegou-se a conclusão de que **4a** tratava-se do produto diacetilado 1',3'-diacetato de tianfenicol.

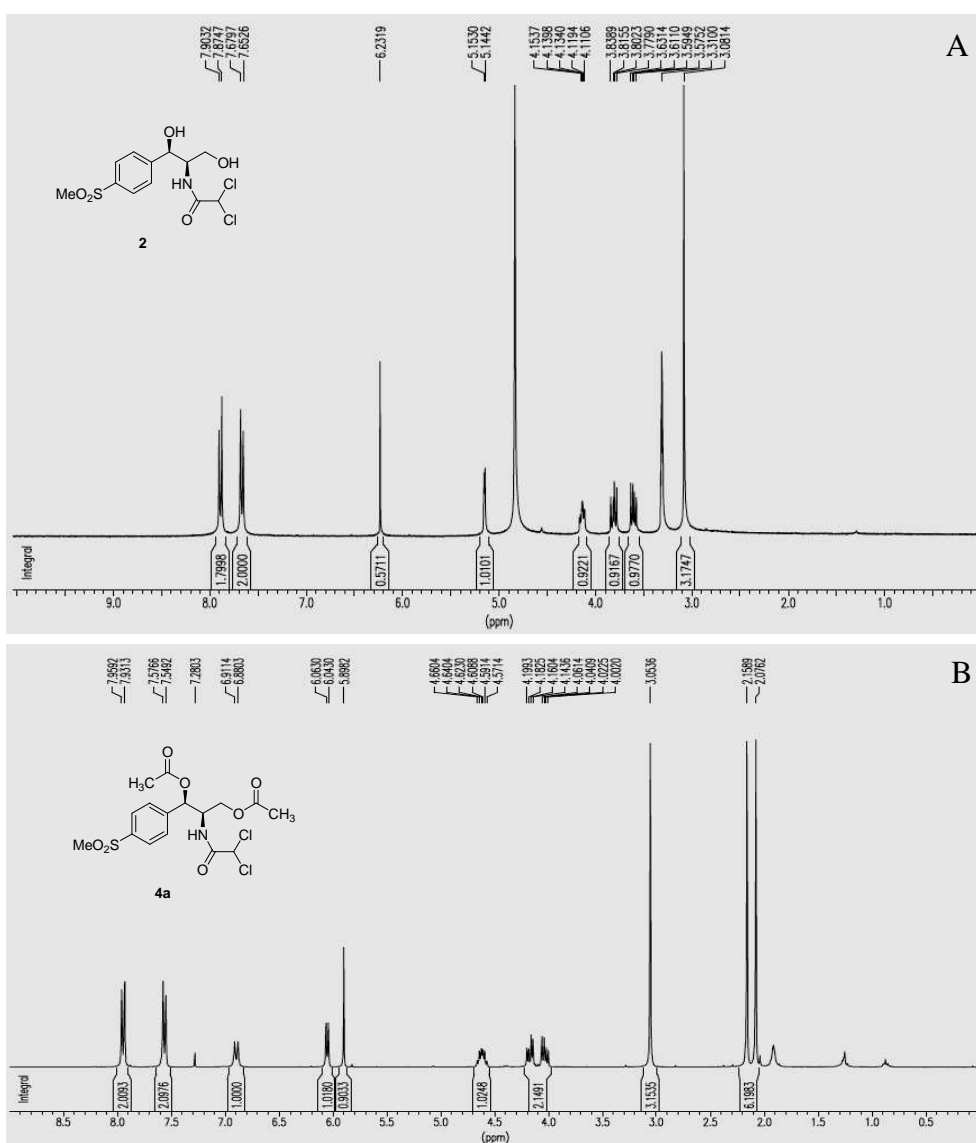


Figura 17 – Espectros de RMN  $^1\text{H}$  de: A) **2**, MeOD, 300 MHz; B) **4a**,  $\text{CDCl}_3$ , 300MHz.

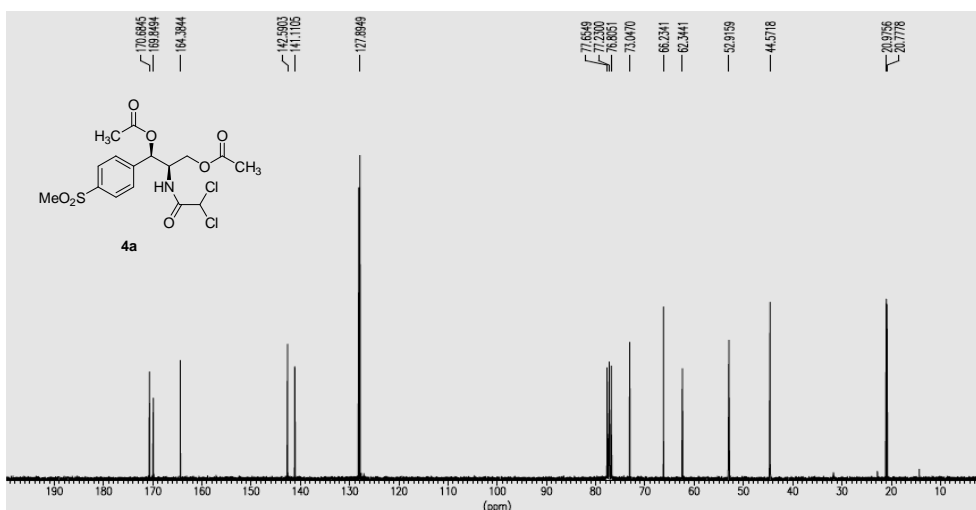


Figura 18 - Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  de **4a**,  $\text{CDCl}_3$ , 125MHz.

O espectro de RMN  $^1\text{H}$  de **6a** (Figura 19A, Pág 52) apresentou, além dos vários sinais observados para tianfenicol (**2**) (Figura 17A, Pág 50), um sinal intenso em  $\delta$  2,08 (s, 3H), referente a uma metila. O espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  de **6a** (Figura 19B, Pág 52) apresentou, além de vários outros sinais, um em  $\delta$  21,50 referente a uma metila, além de um sinal em  $\delta$  170,43 referente a uma carbonila de éster. Comparando-se os dados de RMN  $^{13}\text{C}$  obtidos para **6a** com dados da literatura (SHI *et al.*, 2005), observou-se uma mudança no valor do deslocamento químico de C-3 de  $\delta$  62,3 para  $\delta$  63,2 e em C-2 de  $\delta$  58,2 para  $\delta$  54,3 (Tabela 6), caracterizando o composto acilado na posição 3'. Assim, concluiu-se de que **6a** tratava-se do 3'-acetato de tianfenicol.

Tabela 6 - Dados de RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\delta$  ppm) de tianfenicol (**2**) e derivados mono e diacetilados.

Número do carbono	tianfenicol ( <b>2</b> ) <sup>a</sup> (SHI <i>et al.</i> , 2005)	3'-acetato de tianfenicol ( <b>6a</b> ) <sup>b</sup>	1',3'-acetato de tianfenicol ( <b>4a</b> ) <sup>b</sup>
1	71.44	70,76	73.04
2	58.18	54,53	52.91
3	62.31	63,16	62.23
4	164.65	164,58	164.38
5	67.70	66,31	66.23
6	141.15	139,65	141.11
7	128.04	127,44	128.08
8	127.97	127,14	127.89
9	149.75	147,24	142.59
10	44.53	44,64	44.57
3'C=O	-	171,47	170,68
1'C=O	-	-	169,84
3'-Me	-	20,98	20,97
1'-Me	-	-	20,77

(a) 125 MHz,  $\text{CDCl}_3$

(b) 75 MHz,  $\text{CDCl}_3$

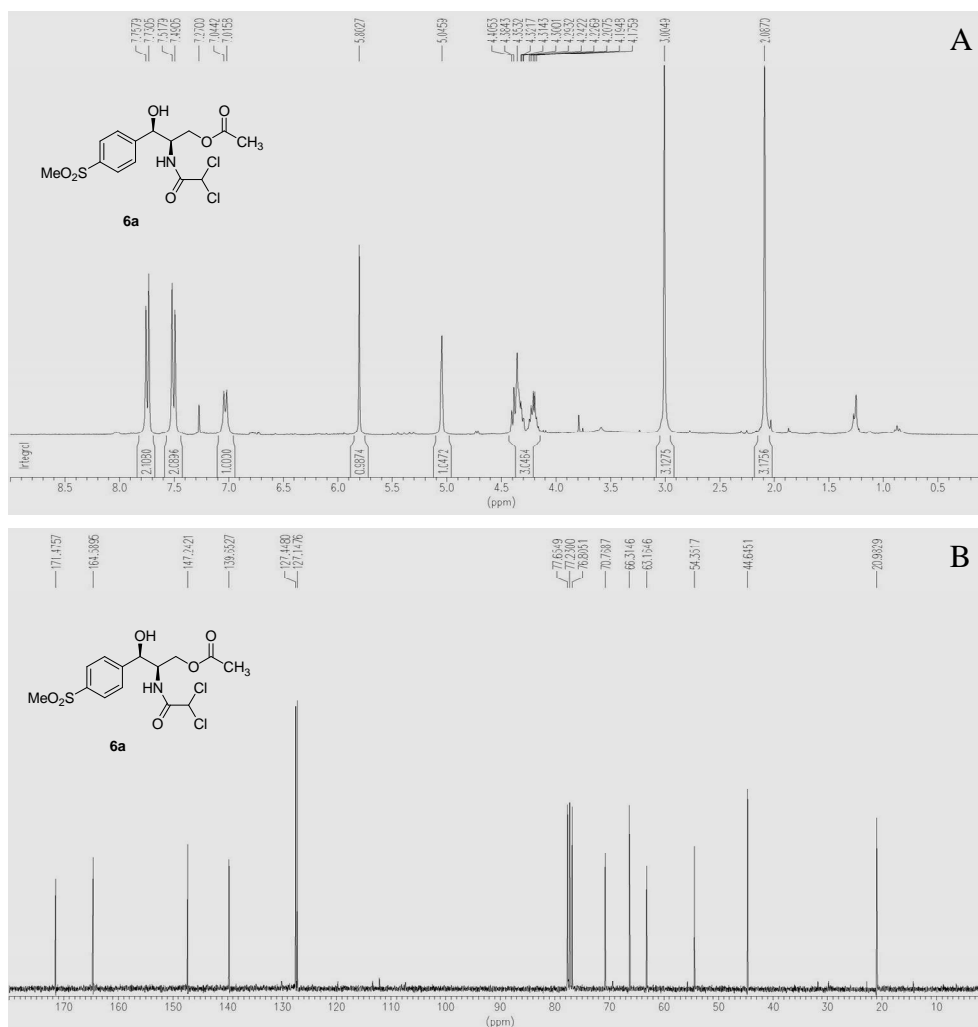


Figura 19 - A) Espectro de RMN  $^1\text{H}$  de **6a**,  $\text{CDCl}_3$ , 300MHz; B) Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  de **6a**,  $\text{CDCl}_3$ , 125MHz.

O espectro de RMN  $^1\text{H}$  de **4b** (Figura 20A, Pág 53) apresentou, além dos vários sinais observados para tianfenicol (**2**) (Figura 17A, Pág 50), um sinal intenso em  $\delta$  1,13 (m, 6H), referente a dois grupos  $-\text{CH}_3$  e um sinal em  $\delta$  2,38 (m, 4H) referente a dois grupos  $-\text{CH}_2$ . O espectro de RNM  $^{13}\text{C}$  de **4b** (Figura 20B, Pág 53) apresentou, além de vários outros sinais, dois em  $\delta$  9,03 e  $\delta$  9,11 referentes a duas metilas, dois sinais em  $\delta$  27,43 e  $\delta$  27,59 referentes a dois grupos  $-\text{CH}_2$  (confirmados por RMN  $^{13}\text{C}$ -DEPT, ver Anexos), bem como dois sinais em  $\delta$  173,27 e  $\delta$  174,08 referentes a duas carbonilas de éster. Comparando-se os dados de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  de **2** (SHI *et al*, 2005) e **4b** chegou-se a conclusão de que **4b** tratava-se do produto diacilado 1',3'-dipropionato de tianfenicol.

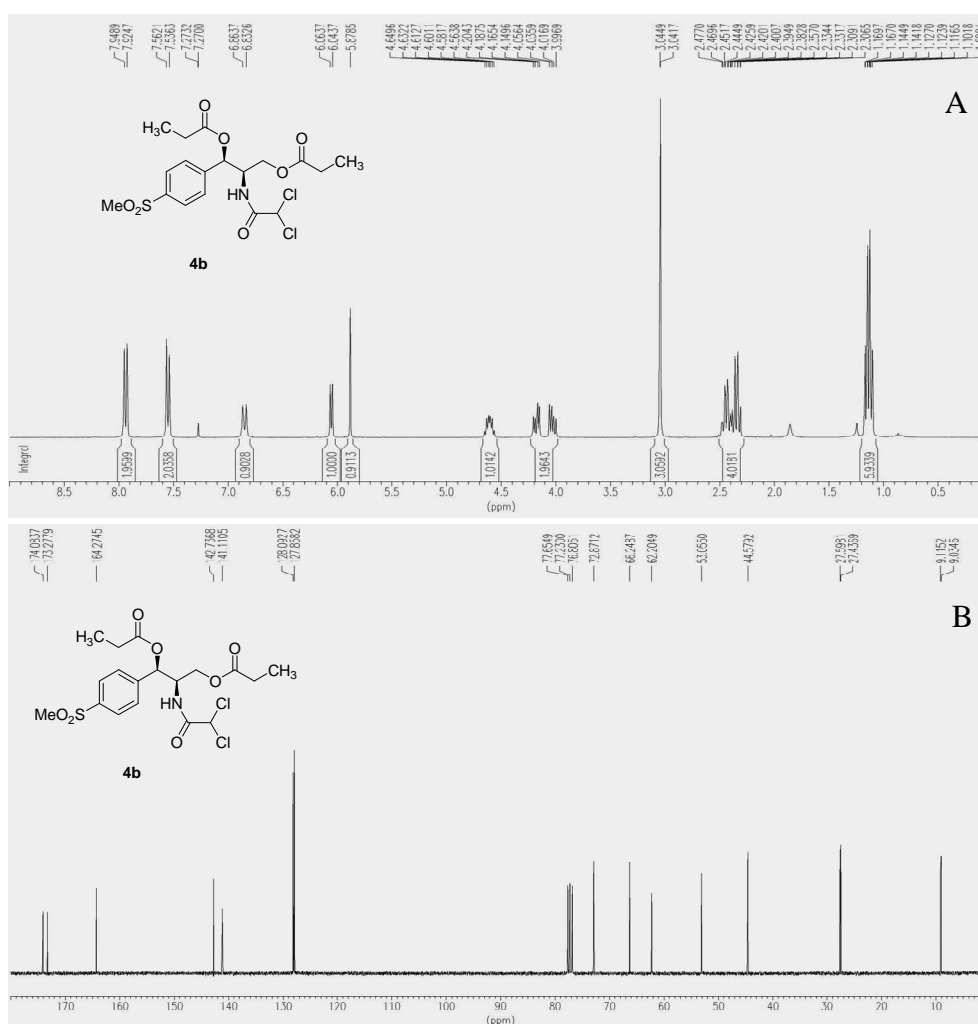


Figura 20 - A) Espectro de RMN <sup>1</sup>H de **4b**, CDCl<sub>3</sub>, 300MHz; B) Espectro de RMN <sup>13</sup>C de **4b**, CDCl<sub>3</sub>, 125MHz.

O espectro de RMN <sup>1</sup>H de **6b** (Figura 21A, Pág 54) apresentou, além dos vários sinais observados para tianfenicol (**2**) (Figura 17A, Pág 50), um sinal intenso em  $\delta$  1,13 (t,  $J = 7,5$  Hz, 3H) referente a um grupo -CH<sub>3</sub> e um sinal em  $\delta$  2,45 (q,  $J = 7,5$  Hz, 2H) referente a um grupo -CH<sub>2</sub>. O espectro de RNM <sup>13</sup>C de **6b** (Figura 21B, Pág 54) apresentou, além de vários outros sinais, um em  $\delta$  9,16 referentes a uma metila e um sinal em  $\delta$  27,61 referente a um grupo -CH<sub>2</sub> (confirmado por RNM <sup>13</sup>C-DEPT, ver Anexos), bem como um sinal em  $\delta$  174,87 referente a uma carbonila de éster. Comparando-se os dados de RMN <sup>13</sup>C obtidos para **6b** com dados da literatura (SHI *et al*, 2005), observou-se uma mudança no valor do deslocamento químico de C-3 de  $\delta$  62,3 para  $\delta$  63,0 e em C-2 de  $\delta$  58,2 para  $\delta$  54,4, caracterizando o composto acilado na posição 3'. Dessa forma, concluiu-se de que **6b** tratava-se do 3'-propionato de tianfenicol.

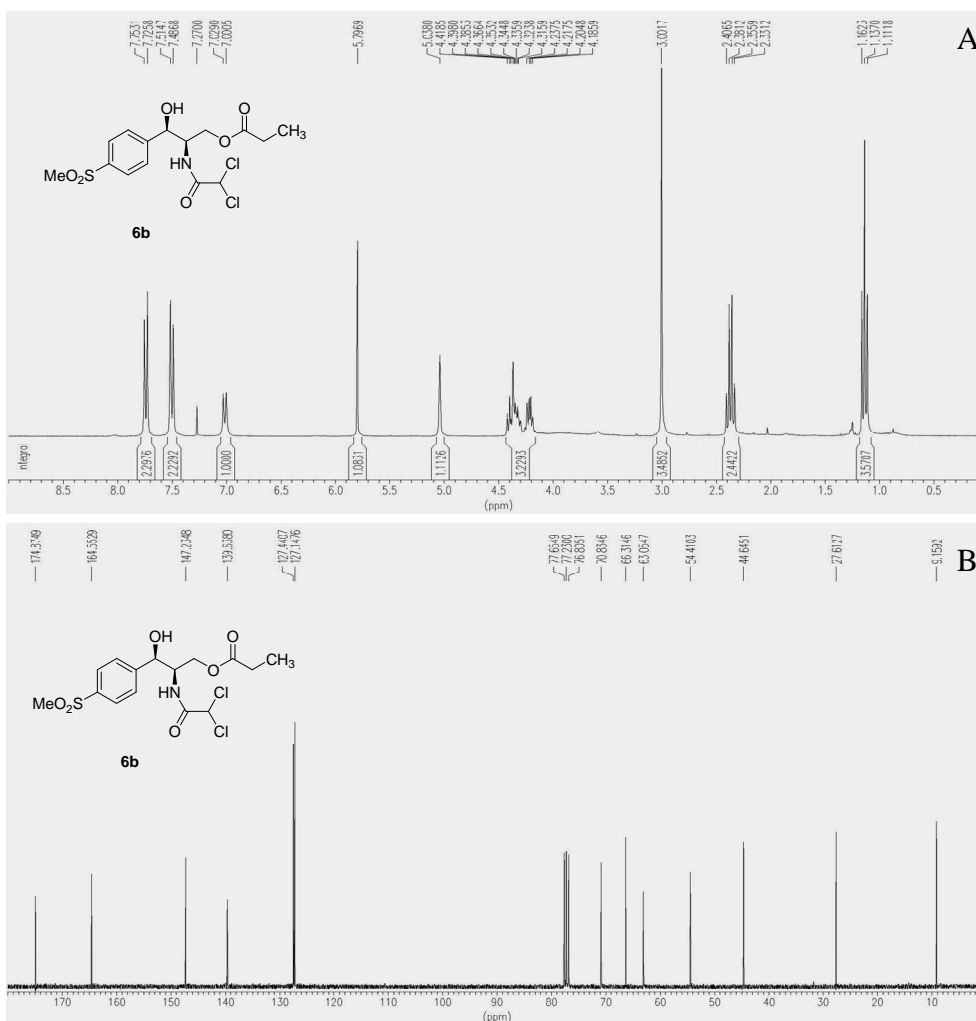


Figura 21 - A) Espectro de RMN  $^1\text{H}$  de **6b**,  $\text{CDCl}_3$ , 300MHz; B) Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  de **6b**,  $\text{CDCl}_3$ , 125MHz.

O espectro de RMN  $^1\text{H}$  de **4c** (Figura 22A, Pág 55) apresentou, além dos vários sinais observados para tianfenicol (**2**) (Figura 17A, Pág 50), dois sinais intensos, sendo um em  $\delta$  0,88 (m, 6H), referente a dois grupos  $-\text{CH}_3$  e outro em  $\delta$  1,27 (s, 24H), característico de cadeia lateral formada por vários grupos  $-\text{CH}_2$  ligados entre si. Foram também observados um sinal em  $\delta$  1,63 (m, 4H), referente a dois grupos  $-\text{CH}_2$ , e dois sinais em  $\delta$  2,27 (t,  $J = 7,7$  Hz, 2H) e  $\delta$  2,38 (t,  $J = 7,2$  Hz, 2H), referentes a hidrogênios  $\alpha$  carbonila. O espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  de **4c** (Figura 22B, Pág 55) apresentou, além de vários outros sinais, um em  $\delta$  14,06, referente a dois grupos  $-\text{CH}_3$ , cinco sinais entre  $\delta$  22,62 e  $\delta$  34,02 referentes a dezesseis grupos  $-\text{CH}_2$  (confirmados por RNM  $^{13}\text{C}$ -DEPT, ver Anexos), bem como dois sinais em  $\delta$  172,38 e  $\delta$  173,26, referentes a duas carbonilas de éster. Comparando-se os dados de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  de **2** (SHI *et al*, 2005) e **4c** chegou-

se a conclusão de que **4c** tratava-se do produto diacilado 1',3'-didecanoato de tianfenicol.

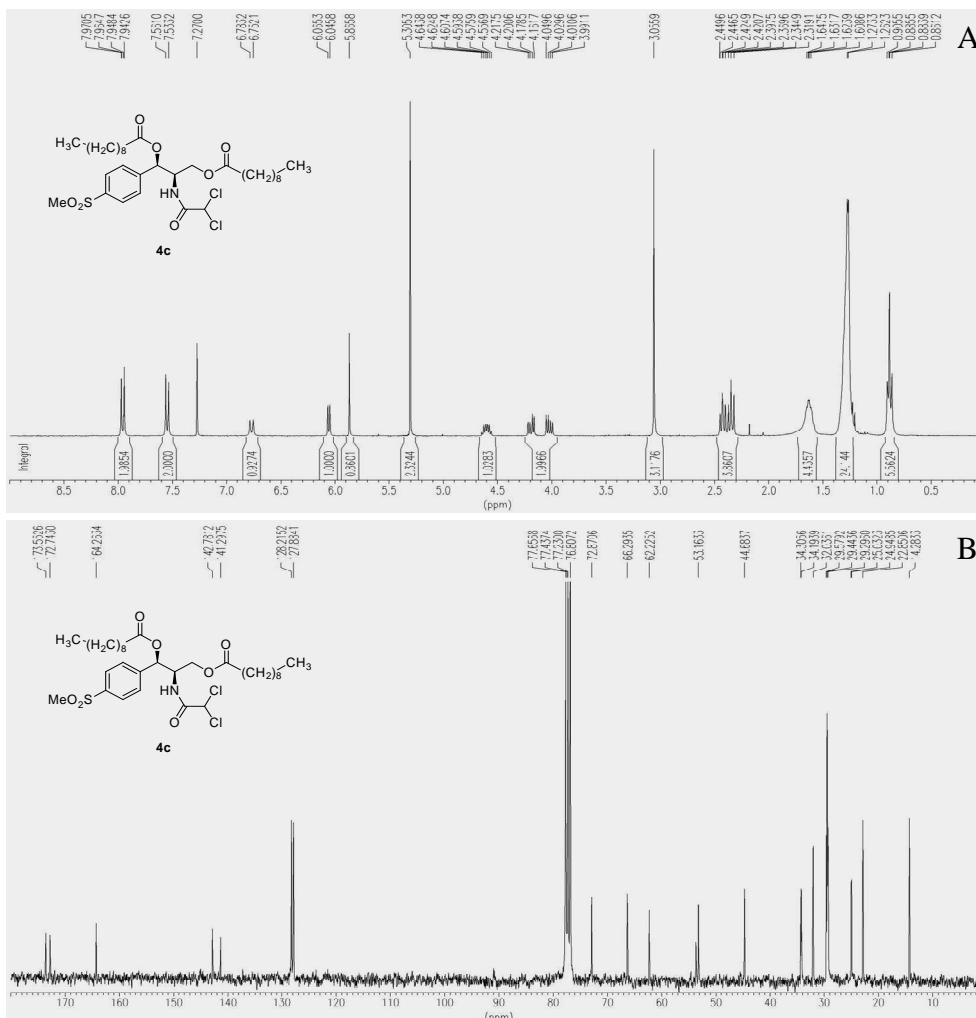


Figura 22 - A) Espectro de RMN  $^1\text{H}$  de **4c**,  $\text{CDCl}_3$ , 300MHz; B) Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  de **4c**,  $\text{CDCl}_3$ , 125MHz.

O espectro de RMN  $^1\text{H}$  de **6c** (Figura 23A, Pág 56) apresentou, além dos vários sinais observados para tianfenicol (**2**) (Figura 17A, Pág 50), um sinal intenso em  $\delta$  0,88 (t,  $J = 7,7$  Hz, 3H), referente a um grupo  $-\text{CH}_3$ , e outro em  $\delta$  1,27 (s, 16H), característico de cadeia lateral formada por vários grupos  $-\text{CH}_2$  ligados entre si. Observou-se ainda um sinal em  $\delta$  1,64 (m, 2H), referente a dois grupos  $-\text{CH}_2$ , e um sinal em  $\delta$  2,37 (t,  $J = 7,4$  Hz, 2H), referente a hidrogênios  $\alpha$  carbonila. O espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  de **6c** (Figura 23B, Pág 56) apresentou um sinal em  $\delta$  14,28, referente a um grupo  $-\text{CH}_3$ , vários sinais entre  $\delta$  22,85 e  $\delta$  34,32, referentes a oito grupos  $-\text{CH}_2$  (confirmados por RNM  $^{13}\text{C}$ -DEPT, ver Anexos), e um sinal em  $\delta$  174,45 referente a uma carbonila de éster.

Comparando-se os dados de RMN  $^{13}\text{C}$  obtidos para **6c** com dados da literatura (SHI *et al*, 2005), observou-se uma mudança no valor do deslocamento químico de C-3 de  $\delta$  62,3 para  $\delta$  62,7 e em C-2 de  $\delta$  58,2 para  $\delta$  54,4, caracterizando o composto acilado 3'-decanoato de tianfenicol.

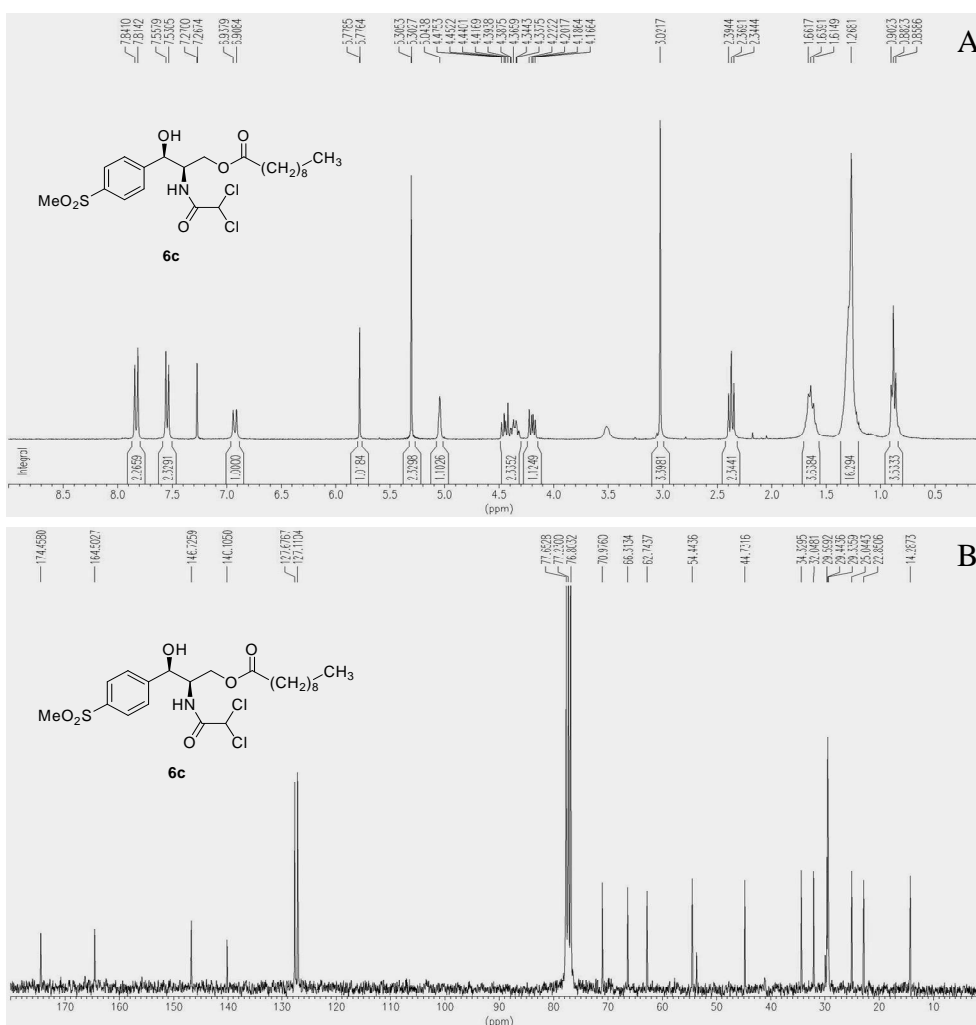


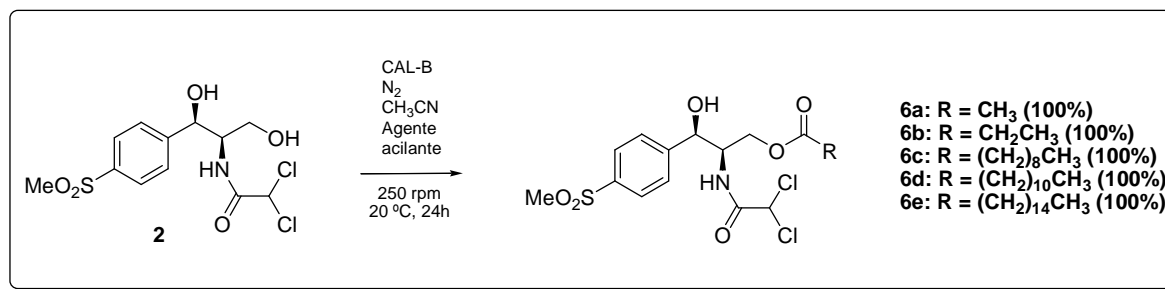
Figura 23 - A) Espectro de RMN  $^1\text{H}$  de **6c**,  $\text{CDCl}_3$ , 300MHz; B) Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  de **6c**,  $\text{CDCl}_3$ , 125MHz.

Os espectros de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  de **4c**, **4d** e **4e** são bastante parecidos (ver Anexos), sendo eles diferenciados unicamente pelo tamanho da cadeia lateral. O mesmo ocorre com os derivados **6c**, **6d** e **6e**, os quais foram identificados comparando-se os seus dados espectrais com os descritos na literatura (SHI *et al*, 2005) para os mesmos compostos.



### 1.3.2.2 Acilação enzimática de tianfenicol (**2**)

Buscando-se obter derivados de tianfenicol com alto grau de seletividade, realizou-se uma reação de acilação enzimática (Esquema 17) de acordo com o item 1.4.5.2, Pág 77. Os produtos foram purificados por cromatografia em gel de sílica utilizando como eluente uma mescla de solventes orgânicos, analisados por CLAE e caracterizado por RMN  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ -BB e  $^{13}\text{C}$ -DEPT (ANEXOS).



Esquema 17 - Reação de acetilação enzimática de tianfenicol (**2**).

Em todos os casos obteve-se 100% de conversão de tianfenicol (**2**) em **6a** – **6e** (Figura 24A-E, Pág 58), ficando evidente o alto grau de regioseletividade na reação de acetilação enzimática de **2** utilizando-se todos os tipos de doadores de acila. A reação se processou em 24 h e somente a hidroxila menos impedida foi acetilada. Estudos similares foram descritos na literatura por Shi e colaboradores, os quais obtiveram derivados de **2** acilados na posição 3' utilizando ésteres divinílicos como doadores de acila (SHI *et al*, 2005). Resultados similares também foram obtidos por Ottolina e colaboradores quando utilizaram o mesmo procedimento para acilação de cloranfenicol (**1**) (OTTOLINA, CARREA & RIVA, 1990).

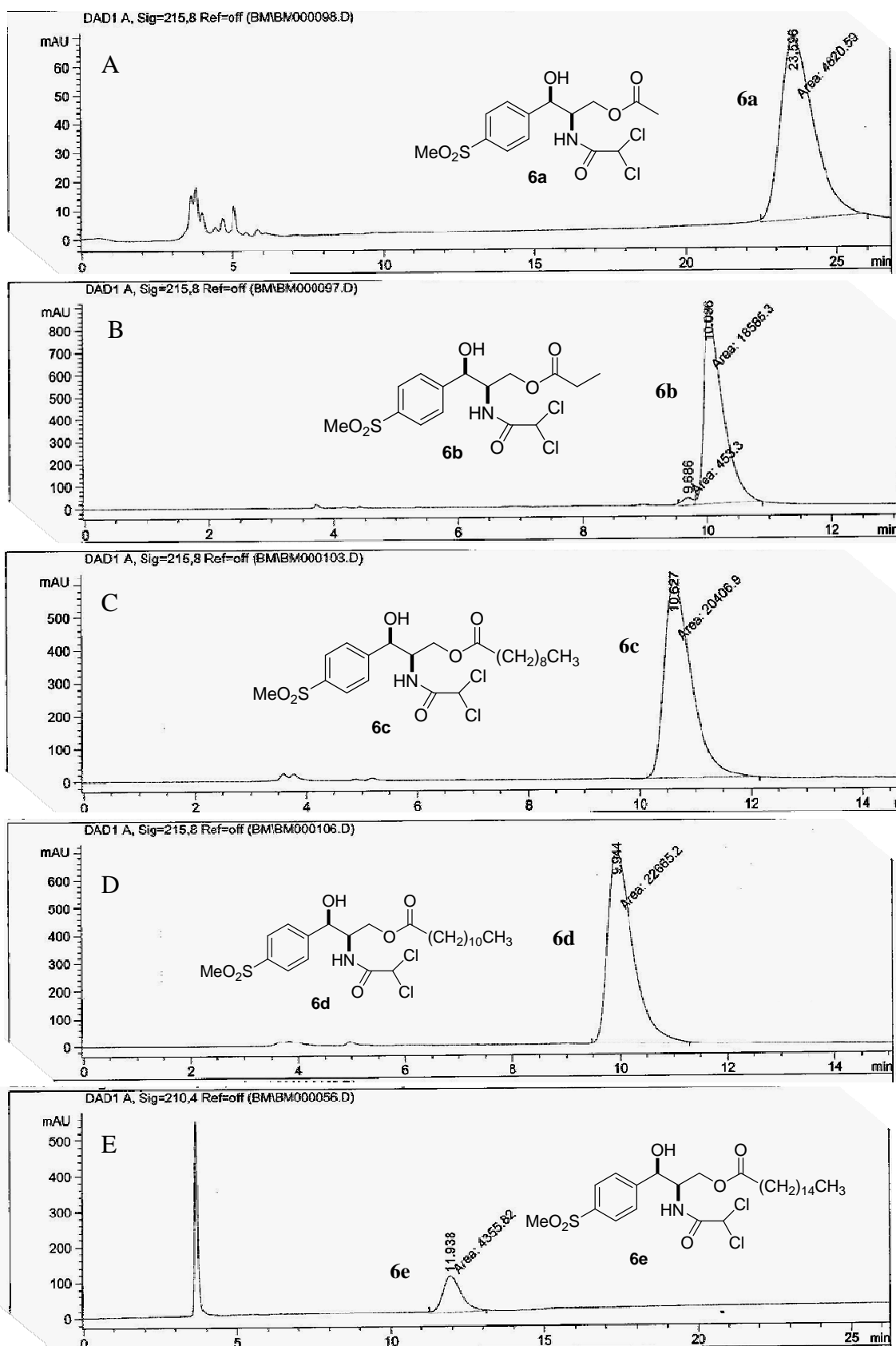


Figura 24 - Cromatogramas das reações de acilação enzimática de **2** utilizando como doador de acila: A) acetato de vinila, B) propionato de vinila, C) decanoato de vinila, D) laurato de vinila e E) palmitato de vinila.

### 1.3.2.3 Estudo cinético da reação de acilação enzimática de tianfenicol (2)

Um segundo estudo foi realizado na tentativa de diminuir o tempo reacional. Para isso, o experimento foi montado de acordo com o Item 1.4.5.3, Pág 77. Alíquotas de 15 µL foram retiradas a cada hora e analisadas por CLAE, e os dados obtidos encontram-se dispostos na Figura 25.

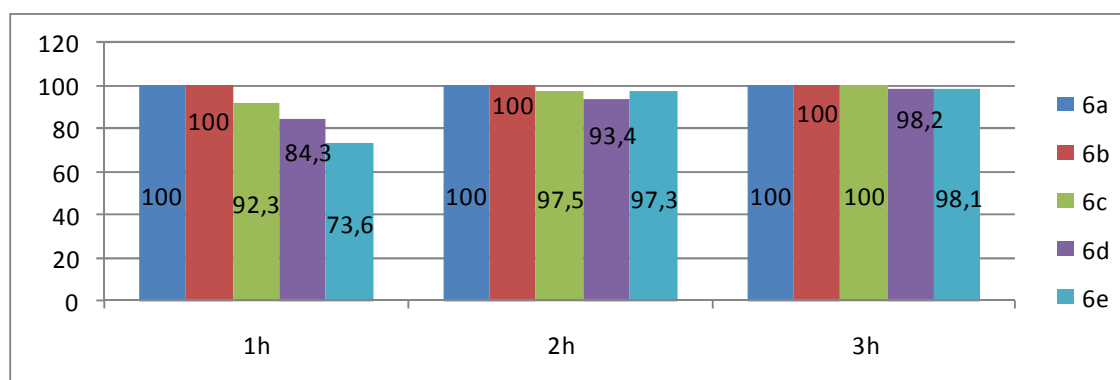


Figura 25 - Valores de conversão dos produtos obtidos e tempos reacionais de acilação de 2.

<sup>a</sup> Quantificado por CLAE, Condições reacionais: CAL-B, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, N<sub>2</sub>, agente acilante e 250 rpm

Os dados da Figura 25 mostram o quão rápido e seletivo são os processos realizados enzimaticamente. As reações realizadas com acetato e propionato de viníla como doador de acila se completaram em 1 hora, enquanto as demais reações, com doadores de acila mais volumosos, completaram cerca de 98 % em no máximo 3 horas.

### 1.3.2.4 Estudo de reutilização de enzima em reações de acilação de tianfenicol (2)

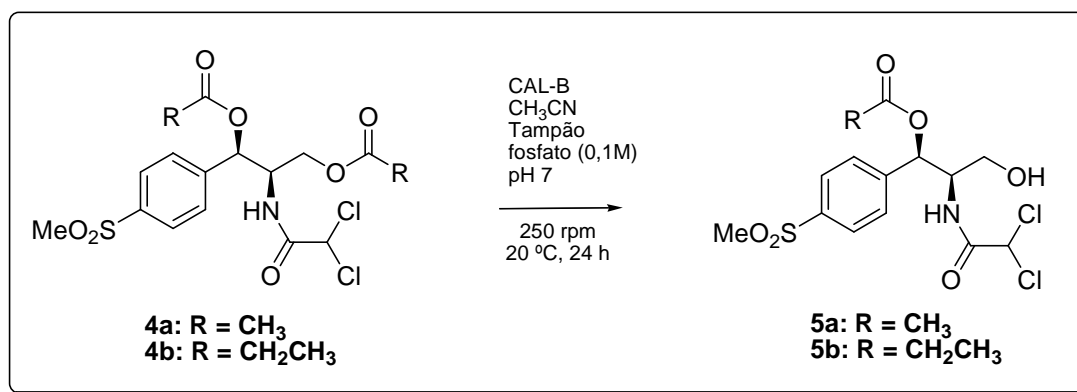
O próximo passo do estudo foi verificar a reutilização do catalisador empregado nos processos de acetilação enzimática. A reação foi realizada de acordo com o Item 1.4.5.4, Pág 78. Após 2 horas, encerrou-se a reação, filtrou-se, lavou-se a enzima, a qual foi reutilizada em uma reação posterior.

Foram realizados cinco processos utilizando as mesmas enzimas. Em todas as reações o produto **6c** foi formado com 100% de conversão.

### 1.3.2.5 Hidrólise enzimática dos derivados de tianfenicol diacilados **4a** e **4b**

Para este estudo, apenas **4a** e **4b** foram submetidos à reação de hidrólise enzimática devido ao fato de que ficou comprovado, em estudos anteriores, que a reação não ocorria em substratos que possuíam uma cadeia lateral extensa.

Visando-se obter tianfenicol-1'-acetato (**5a**) e tianfenicol-1'-propionato (**5b**), realizou-se a hidrólise enzimática de **4a** e **4b** (Esquema 18) de acordo com o Item 1.4.5.5, Pág 78. O andamento da reação foi acompanhado por CCDA e após 24 hora encerrou-se a reação. Separou-se as enzimas do meio reacional por filtração simples, evaporou-se o solvente a pressão reduzida e o produto reacional foi analisado por CLAE e os dados obtidos encontram-se na Tabela 7.



Esquema 18 - Reação de hidrólise enzimática de **4a** e **4b**.

Tabela 7 - Reação de hidrólise de **4a** e **4b** (conversão %).

Reação	R	4 (%) <sup>a</sup>	5 (%) <sup>a</sup>	6 (%) <sup>a</sup>	2 (%) <sup>a</sup>
1	CH <sub>3</sub>	 <b>4a</b> (15,2)	 <b>5a</b> (80,8)	 <b>6a</b> (0,0)	 <b>2</b> (4,0)
2	CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	 <b>4b</b> (8,8)	 <b>5b</b> (68,6)	 <b>6b</b> (18,5)	 <b>2</b> (4,1)

<sup>a</sup> Quantificado por CLAE

Condições reacionais: Enzima CAL-B, CH<sub>3</sub>CN/tampão 80:20, pH = 7 e 250 rpm por 24 h

Condições de análise: fluxo de 0,8 mL/min, Hexano:isopropanol (80:20), 40 °C, 18 bar, 10 µL de injeção, coluna quiral AS

A Tabela 7 mostra resultados satisfatórios e bastante semelhantes aos obtidos na reação de hidrólise de derivados diacilados de cloranfenicol (**1**), comprovando a reprodutibilidade do método. A hidrólise de **4a** foi bastante seletiva, enquanto na hidrólise de **4b** se perde um pouco de seletividade devido à formação de **6b** (Figura 26).

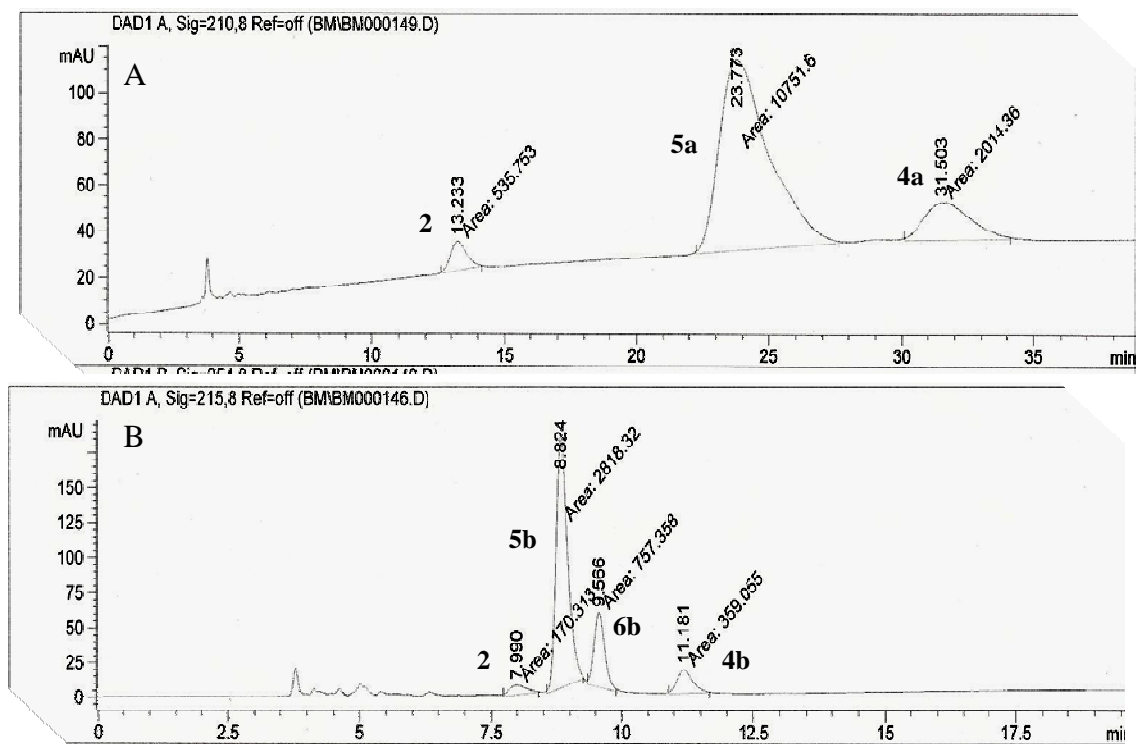


Figura 26 – Cromatogramas das reacções de hidrólise de: A) **4a**, B) **4b**.

Os resultados discutidos nos Itens 1.3.1.2 a 1.3.1.2.7, que trata da síntese quimioenzimática de derivados do cloranfenicol, foram publicados na literatura (*Tetrahedron*, 67, 2858, 2011), Anexos.

## 1.4 PARTE EXPERIMENTAL

### 1.4.1 Métodos Cromatográficos

#### 1.4.1.1 Cromatografia em gel de sílica.

As cromatografias de adsorção em coluna foram realizadas utilizando gel de sílica da Vetec ( $\phi$  mm 0,063-0,200), cód. 195, gel de sílica 60 da Merck ( $\phi$  mm 0,040-0,063) e Sephadex LH-20 Merck. O comprimento e diâmetro das colunas utilizadas variaram de acordo com as quantidades de amostras a serem cromatografadas.

As cromatografias de adsorção em camada delgada preparativa (CCDP) e analítica (CCDA) foram realizadas em cromatofolhas de alumínio, 20 cm x 20 cm, cobertas com gel sílica 60 F<sub>254</sub> com CaSO<sub>4</sub> da Merck. A revelação das substâncias nas cromatoplacas foi feita pela exposição das mesmas à radiação ultravioleta (254 e 365 nm), empregando-se uma lâmpada UV modelo UVSL-25 da Mineral Light. No caso de CCDP, a faixa correspondente ao fator de retenção da substância desejada foi removida da cromatoplaca e extraída com solvente orgânico.

#### 1.4.1.2 Solventes

Os solventes empregados nas sínteses e resoluções cinéticas foram secos, destilados e armazenados sob atmosfera de nitrogênio no Laboratório de Bioorgânica da Universidade de Oviedo.

Os solventes utilizados nas separações, assim como nas análises cromatográficas foram de procedência PA - Synth<sup>®</sup> e Vetec<sup>®</sup>. As análises por CLAE foram feitas com solvente grau CLAE - Tedia<sup>®</sup>.

#### 1.4.1.3 Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

As separações cromatográficas por CLAE, dos derivados de cloranfenicol e tianfenicol foram realizadas em um Hewlett Packard 1100 Chromatography, com detector de ultravioleta (UV), do Departamento de Química Orgânica e Inorgânica da Universidade de Oviedo (Espanha), utilizando-se as colunas Chiralpak AS e Chirapak IA, variando as condições de análise de acordo com o substrato específico.

As análises por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) dos constituintes químicos de *Aspergillus* sp. (EV10) foram realizadas em um sistema Shimadzu® UFLC, equipado com um detector UV-Vis, com arranjo de diodos modelo SPD-M20A, utilizando uma faixa de 210-400 nm. As separações foram feitas usando uma coluna de fase normal Phenomenex, luna 5u sílica (2), 100A 250 x 4.60 mm, 5µm).

## 1.4.2 Métodos espectrométricos

### 1.4.2.1 Espectrometria no infravermelho (IV)

Os espectros de infravermelho foram obtidos utilizando o espectrômetro PERKIN-ELMER 1720-X FT, usando discos de NaCl para amostras líquidas solúveis em clorofórmio ou KBr para as amostras sólidas do Laboratório de Bioorgânica da Universidade de Oviedo.

### 1.4.2.2 Espectrometria de massas (EM)

Os espectros de massas foram obtidos em cromatógrafo acoplado a detector de massas OHP1100 (MS) por experimentos ESI+.

### 1.4.2.3 Espectrometria de ressonância magnética nuclear (RMN)

Os espectros de ressonância magnética nuclear de hidrogênio-1 e carbono-13 (RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ ) unidimensionais foram obtidos em espectrômetros Bruker, modelo Avance DPX-300, operando na frequência de hidrogênio a 300 MHz e na frequência do carbono a 75 MHz, com pulso de frequência e transformada de Fourier (FT) do Laboratório de Bioorgânica da Universidade de Oviedo. Nos espectros de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ , os deslocamentos químicos ( $\delta$ ) foram expressos em partes por milhão (ppm) e referenciados pelos picos do hidrogênio e do carbono pertencentes às moléculas residuais não deuteradas dos solventes.

Os solventes utilizados na dissolução das substâncias foram clorofórmio ou metanol deuterados. Os seguintes valores foram empregados como referência:  $^1\text{H}$  = (s,  $\delta$  7,27);  $^{13}\text{C}$  = (t,  $\delta$  77,23) para clorofórmio e  $^1\text{H}$  = (m,  $\delta$  3,31);  $^{13}\text{C}$  = (t,  $\delta$  49,15) para metanol. As multiplicidades das bandas de absorção do hidrogênio nos espectros de RMN  $^1\text{H}$  foram indicadas segundo a convenção: s (simpleto), d (duplete), dd (duplo

duplete), t (triplete), q (quarteto) e m (multiplete). O padrão de hidrogenação dos carbonos foi descrito segundo a convenção: C (carbono não hidrogenado); CH (carbono metínico); CH<sub>2</sub> (carbono metilênico) e CH<sub>3</sub> (carbono metílico) e foi determinado através da técnica DEPT (*Distortionless Enhancement by Polarization Transfer*) com ângulo de nutação de 135° (CH e CH<sub>3</sub> com amplitudes em oposição ao CH<sub>2</sub>).

#### 1.4.3 Reagentes e solventes utilizados

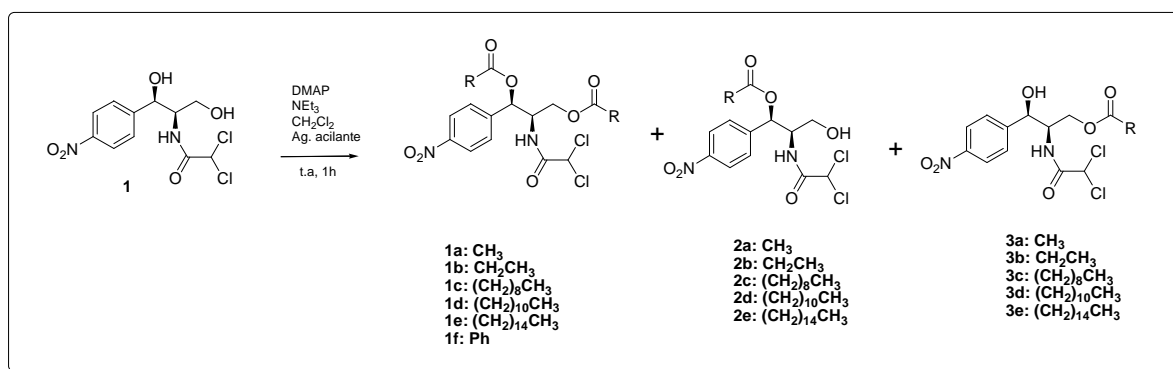
- 4-dimetilaminopiridina (DMAP) de procedência Acros Organics;
- Acetato de viníla de procedência Fluka;
- Anidrido acético (Ac<sub>2</sub>O) de procedência Sigma-Aldrich;
- Anidrido propiônico de procedência Sigma-Aldrich;
- Trietilamina (Et<sub>3</sub>N) de procedência Sigma-Aldrich;
- Lipase de *Candida antarctica* tipo B (CAL-B, Novozyme 435, 7300 PLU/g) de procedência Novo Nordisk Co;
- Lipase OS Amano SD de *Burkholderia cepacia* de procedência Amano;
- Lipase OS Amano IM de *Burkholderia cepacia* de procedência Amano;
- Cloreto de dcanoila de procedência Sigma-Aldrich;
- Cloreto de lauroila de procedência Sigma-Aldrich;
- Cloreto de palmitoila de procedência Sigma-Aldrich;
- Cloreto de benzolila de procedência Sigma-Aldrich;
- Propionato de viníla de procedência Fluka;
- Decanoato de viníla de procedência Fluka;
- Palmitato de viníla de procedência Fluka;
- Laurato de viníla de procedência Fluka;
- Benzoato de viníla de procedência Fluka;



## 1.4.4 Síntese de derivados de cloranfenicol (1)

### 1.4.4.1 Acilação química de cloranfenicol (1)

A uma solução de cloranfenicol (250,0 mg, 0,77 mmol) em 3,1 mL de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  seco, adicionou-se DMAP (18,9 mg, 0,15 mmol),  $\text{NEt}_3$  (161,3  $\mu\text{L}$ , 1,16 mmol) e por último 1,16 mmol do agente acilante (Tabela 8). A mistura reacional permaneceu sob agitação em atmosfera de nitrogênio a temperatura ambiente durante 1 h (Esquema 19). Transcorrido este tempo, evaporou-se o solvente sob pressão reduzida e o mistura reacional foi purificado por cromatografia em gel de sílica utilizando-se como fase móvel a mistura 60% AcOEt/hexano.



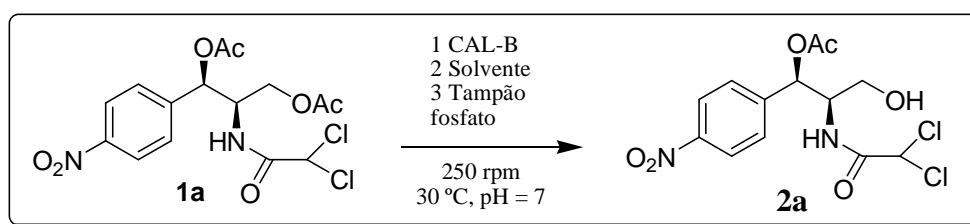
Esquema 19 - Reação de acetilação química de cloranfenicol (1).

Tabela 8 - Agentes acilantes utilizados nas reações de acilação enzimática de 1

	Agente acilante	R
a	Anidrido acético (109,0 $\mu\text{L}$ , 1,16 mmol)	$\text{CH}_3$
b	Anidrido propionico (148,7 $\mu\text{L}$ ; 1,16 mmol)	$\text{CH}_2\text{CH}_3$
c	Cloreto de dcanoila (240,2 $\mu\text{L}$ , 1,16 mmol)	$(\text{CH}_2)_8\text{CH}_3$
d	Cloreto de lauroila (276,0 $\mu\text{L}$ , 1,16 mmol)	$(\text{CH}_2)_{10}\text{CH}_3$
e	Cloreto de palmitoila (352,0 $\mu\text{L}$ , 1,16 mmol)	$(\text{CH}_2)_{14}\text{CH}_3$
f	Cloreto de benzoila (134,8 $\mu\text{L}$ ; 1,16 mmol)	Ph

#### 1.4.4.2 Hidrólise enzimática de cloranfenicol diacetilado (**1a**)

A uma solução de **1a** (30,0 mg, 0,073 mmol) em 150  $\mu$ L de solvente, adicionou-se 600  $\mu$ L de tampão fosfato pH 7,0; 100 mM e 1:1 de enzima (CAL-B, lípase PS Amano SD e lipase PS Amano IM), em peso em relação a **1a** sendo o processo a 30 °C e 250 rpm. Alíquotas foram analisadas periodicamente por CCDA e interrompou-se a reação decorridos 24 h. Por último, a enzima foi filtrada e lavada com AcOEt (3 x 10 mL). Evaporou-se o solvente a pressão reduzida. O produto (**3a**) (Esquema 20) foi purificado por cromatografia em CCDF utilizando-se como eluente a mistura 60% AcOEt / hexano.



Esquema 20 - Reação de hidrólise de cloranfenicol diacetilado

#### 1.4.4.3 Padronização das condições reacionais de hidrólise de **1a**

##### 1.4.4.3.1 Efeito do solvente

A uma solução de **1a** (30 mg, 0,073 mmol) em 150  $\mu$ L de solvente (CH<sub>3</sub>CN, THF, 1,4-dioxano), adicionou-se 600  $\mu$ L de tampão fosfato pH 7,0; 100 mM e CAL-B (1:1 em peso em relação a **1a**), sendo a reação realizada a 20 °C e 250 rpm. Decorridos 24 h a mistura reacional foi extraída com CH<sub>2</sub>CL<sub>2</sub> e analisada por CLAE.

##### 1.4.4.3.2 Efeito da temperatura

A uma solução de **1a** (30 mg, 0,0734 mmol) em 150  $\mu$ L de CH<sub>3</sub>CN, adicionou-se 600  $\mu$ L de tampão fosfato pH 7,0; 100 mM e CAL-B (1:1 em peso em relação a **1a**), sendo o processo a 20 e 30 °C e 250 rpm. Decorridos 24 h a mistura reacional foi extraída com CH<sub>2</sub>CL<sub>2</sub> e analisada por CLAE.

#### 1.4.4.3.3 Efeito do pH

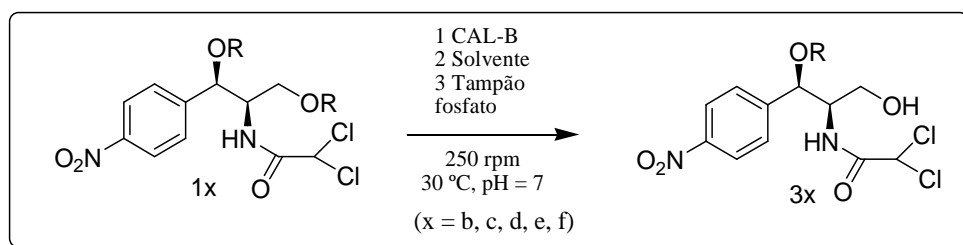
A uma solução de **1a** (30 mg, 0,0734 mmol) em 150  $\mu\text{L}$  de solvente, adicionou-se 600  $\mu\text{L}$  de tampão fosfato pH (5,0; 5,5; 6,0; 6,5; 7,0; 7,5; 8,0; 8,5) 100 mM e CAL-B (1:1 em peso em relação a **1a**), sendo o processo a 20  $^{\circ}\text{C}$  e 250 rpm. Decorridos 24 h a mistura reacional foi extraída com  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  e analisada por CLAE.

#### 1.4.4.3.4 Efeito da proporção solvente/tampão

A uma solução (0,1M) de **1a** (30 mg, 0,0734 mmol) adicionou-se  $\text{CH}_3\text{CN}$ /tampão fosfato pH 7,0; 100 mM (5:95, 10:90, 20:80, 50:50 e 80:20) % e CAL-B (1:1 em peso em relação a **1a**), sendo o processo a 20  $^{\circ}\text{C}$  e 250 rpm. Decorridos 24 h a mistura reacional foi extraída com  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  e analisada por CLAE.

#### 1.4.4.4 Hidrólise enzimática dos derivados de cloranfenicol diacilados **1b-1f**

A uma solução de **1b-1f** (30,0 mg, 0,073 mmol) em 150  $\mu\text{L}$  de solvente, adicionou-se 600  $\mu\text{L}$  de tampão fosfato pH 7,0; 100 mM e CAL-B (1:1 em peso em relação a **1a**), sendo o processo a 20  $^{\circ}\text{C}$  e 250 rpm (Esquema 21). Decorridos 24 h a mistura reacional foi extraída com  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  e analisada por CLAE.



Esquema 21 - Reação dos derivados de cloranfenicol diacilados **1b-1f**

#### 1.4.4.5 Quantificação dos derivados de cloranfenicol obtidos por hidrólise

A quantificação dos derivados de cloranfenicol foi realizada através de curvas de calibração dos produtos obtidos pelo método químico clássico. Soluções estoques desses derivados nas concentrações de 0,05 – 0,5 mmol foram analisadas em CLAE e os valores numéricos referentes às áreas foram plotados em uma curva de calibração (concentração *versus* área).

Para análise por CLAE, 1,0 mg das amostras foram dissolvida em 1,0 mL de hexano/isopropanol 10% e estocadas em pequenos *vials*. As condições utilizadas para análise dessas amostras estão descritas nas Figuras 27 a 32.

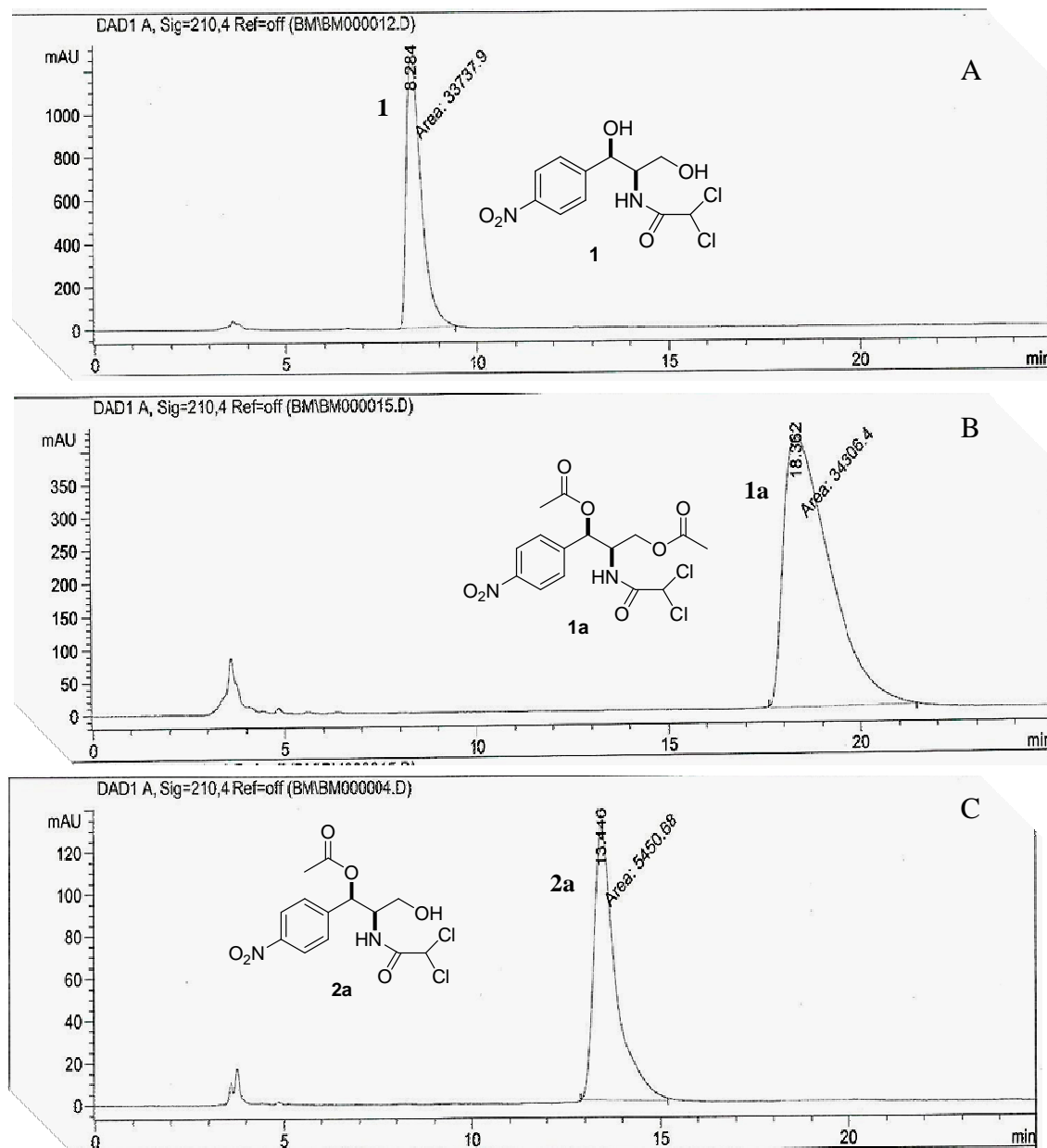


Figura 27 - A) clorfenicol (**1**), B) 1',3'-diacetato de clorfenicol (**1a**), C) 1'-acetato de clorfenicol (**2a**), CLAE, fluxo de 0,8 mL/min, Hexano:isopropanol (80:20), 40°C, 18 bar, 10 µL de injeção, coluna quiral AS.

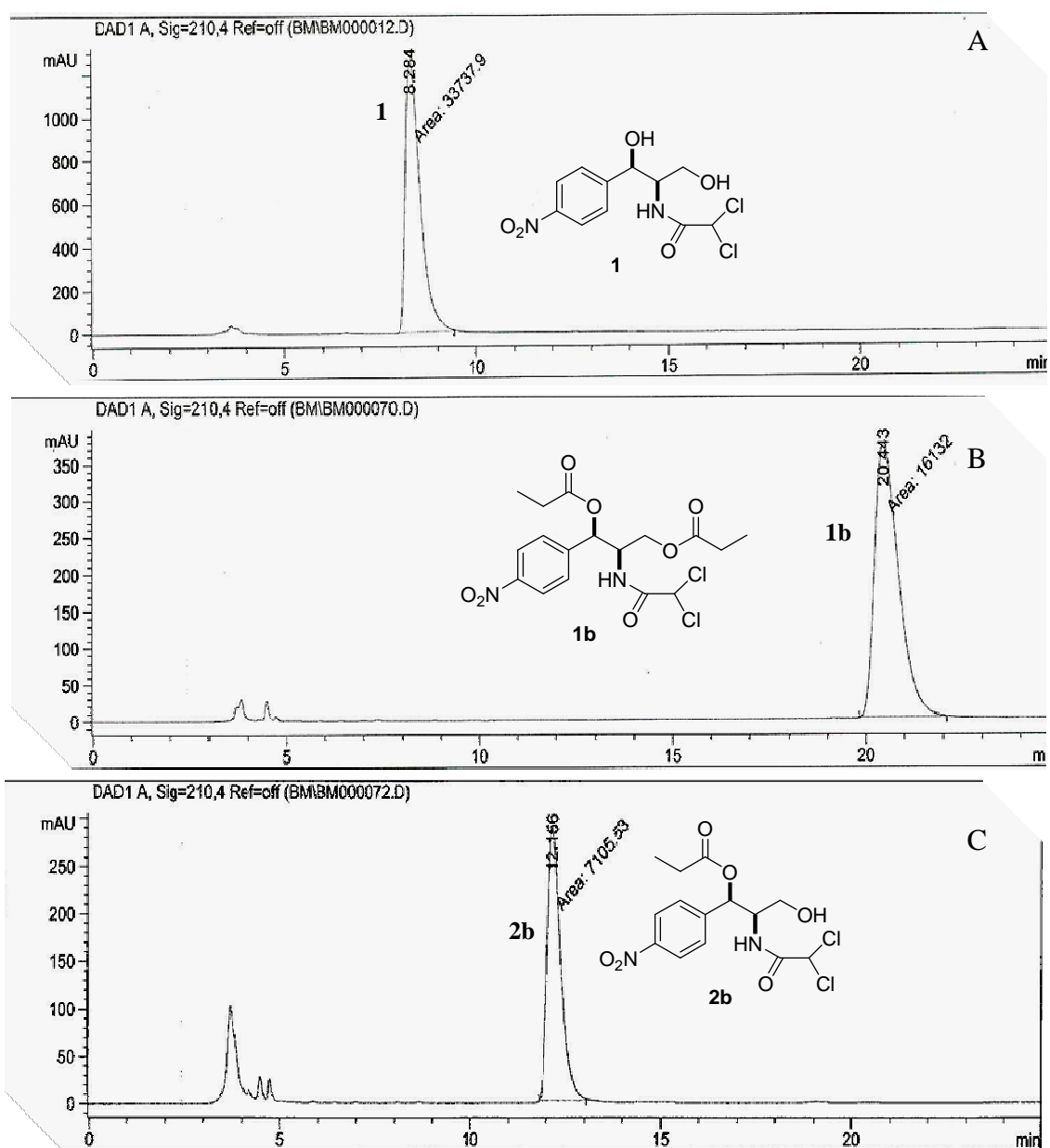


Figura 28 - A) cloranfenicol (**1**), B) 1',3'-dipropionato de cloranfenicol (**1b**), C) 1'-propionato de cloranfenicol (**2b**), CLAE, fluxo de 0,8 mL/min, Hexano:isopropanol (80:20), 40°C, 18 bar, 10 µL de injeção. coluna quiral AS.

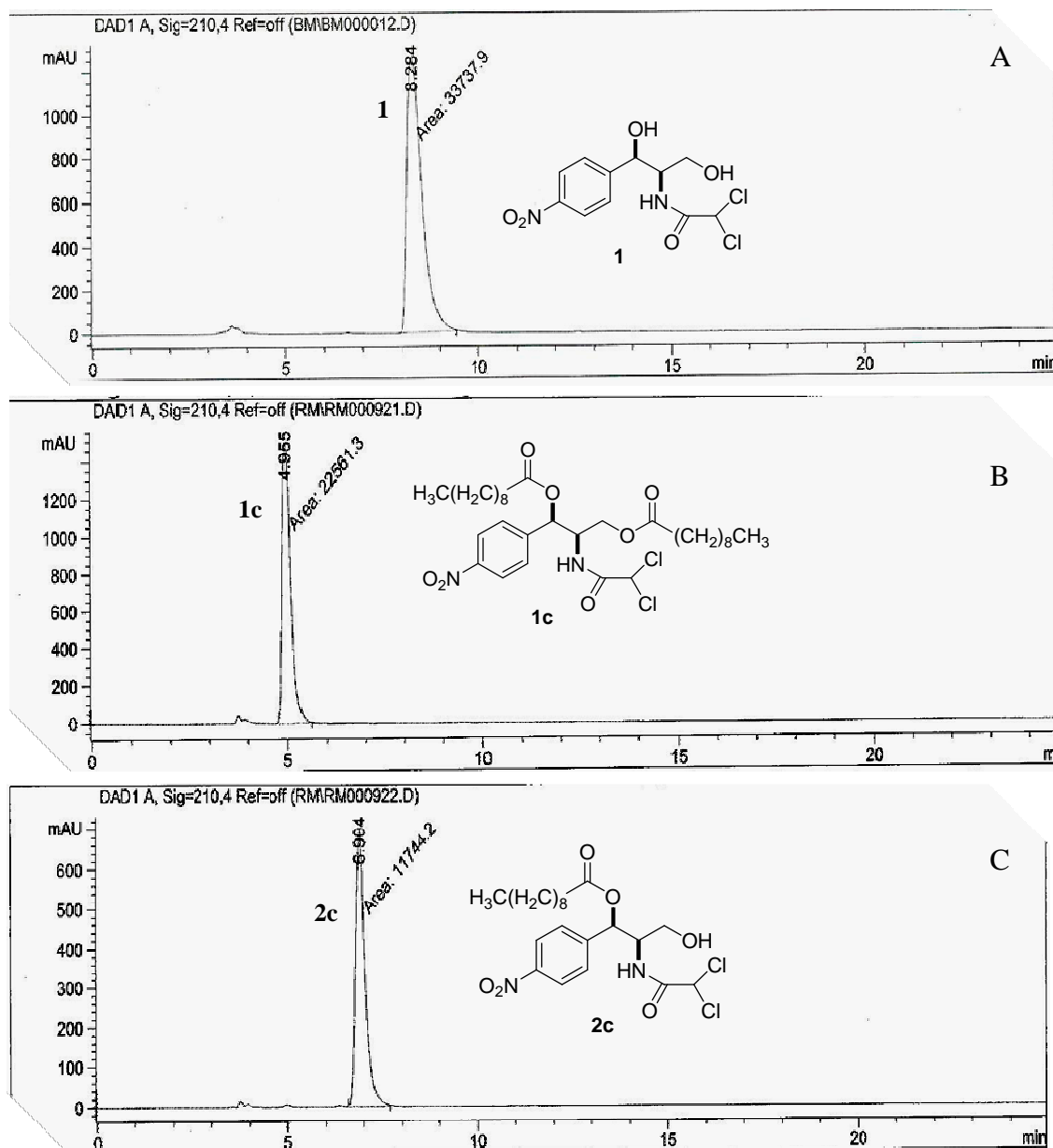


Figura 29 - A) cloranfenicol (**1**), B) 1',3'-didecanoato de cloranfenicol (**1c**), C) 1'-decanoato de cloranfenicol (**2c**), CLAE, fluxo de 0,8 mL/min, Hexano:isopropanol (80:20), 40°C, 18 bar, 10 µL de injeção, coluna quiral AS.

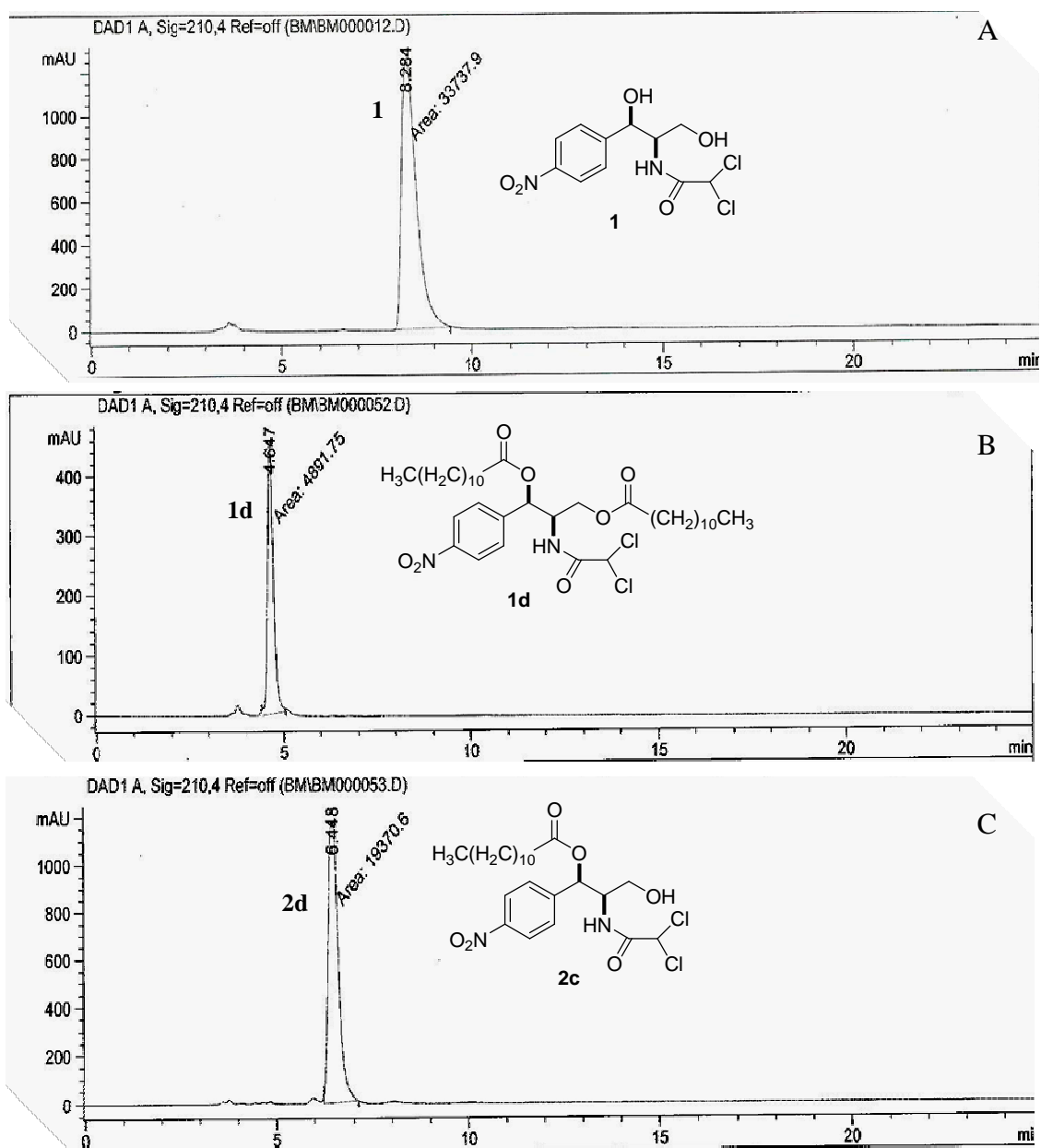


Figura 30 - A) clorfenicol (**1**), B) 1',3'-dilaurato de clorfenicol (**1d**), C) 1'-laurato de clorfenicol (**2d**), CLAE, fluxo de 0,8 mL/min, Hexano:isopropanol (80:20), 40°C, 18 bar, 10 µL de injeção, coluna quiral AS.

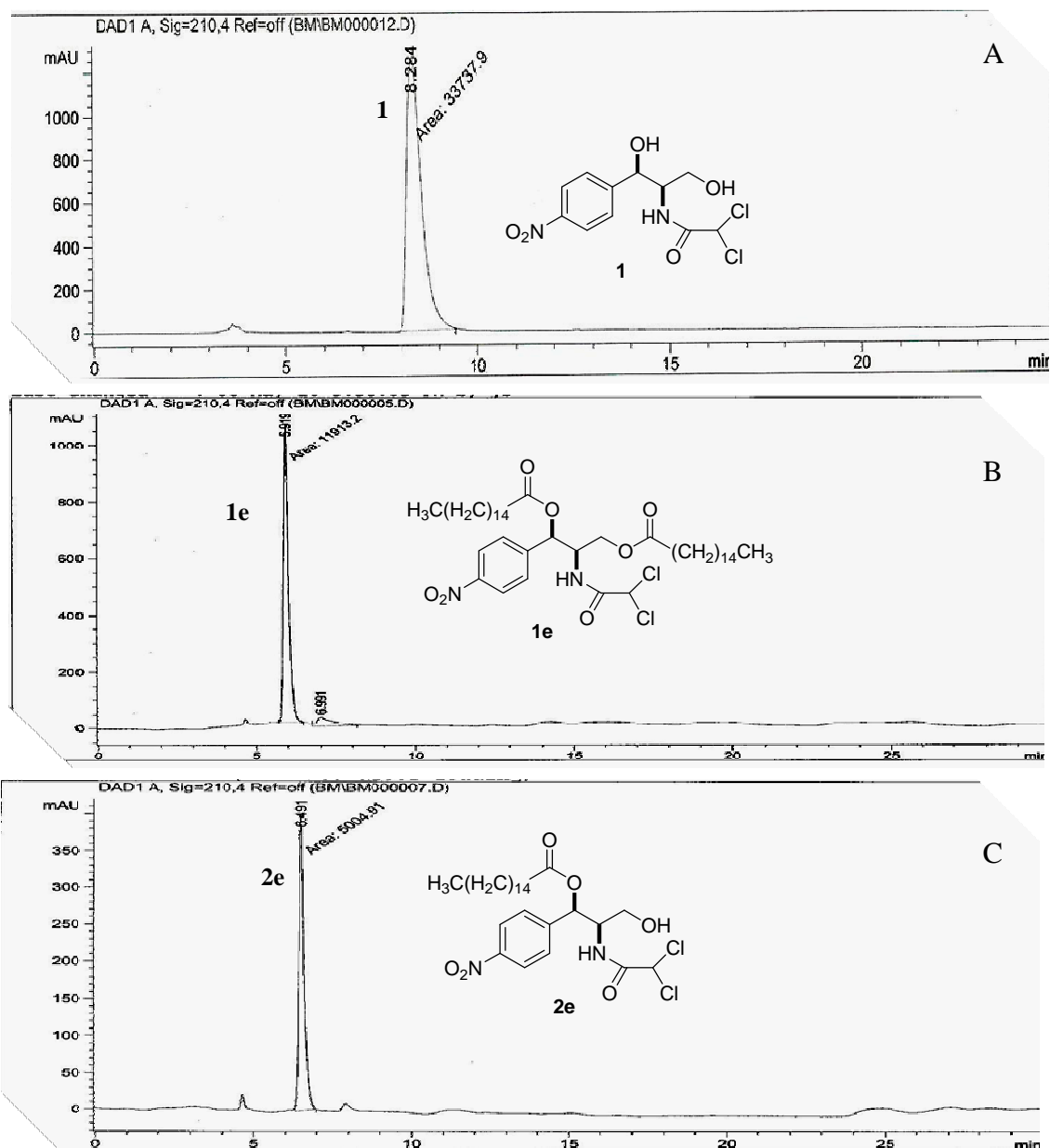


Figura 31 - A) cloranfenicol (**1**), B) 1',3'-dipalmitato de cloranfenicol (**1e**), C) 1'-palmitato de cloranfenicol (**2e**), CLAE, fluxo de 0,8 mL/min, Hexano:isopropanol (80:20), 40°C, 18 bar, 10 µL de injeção, coluna quiral AS.



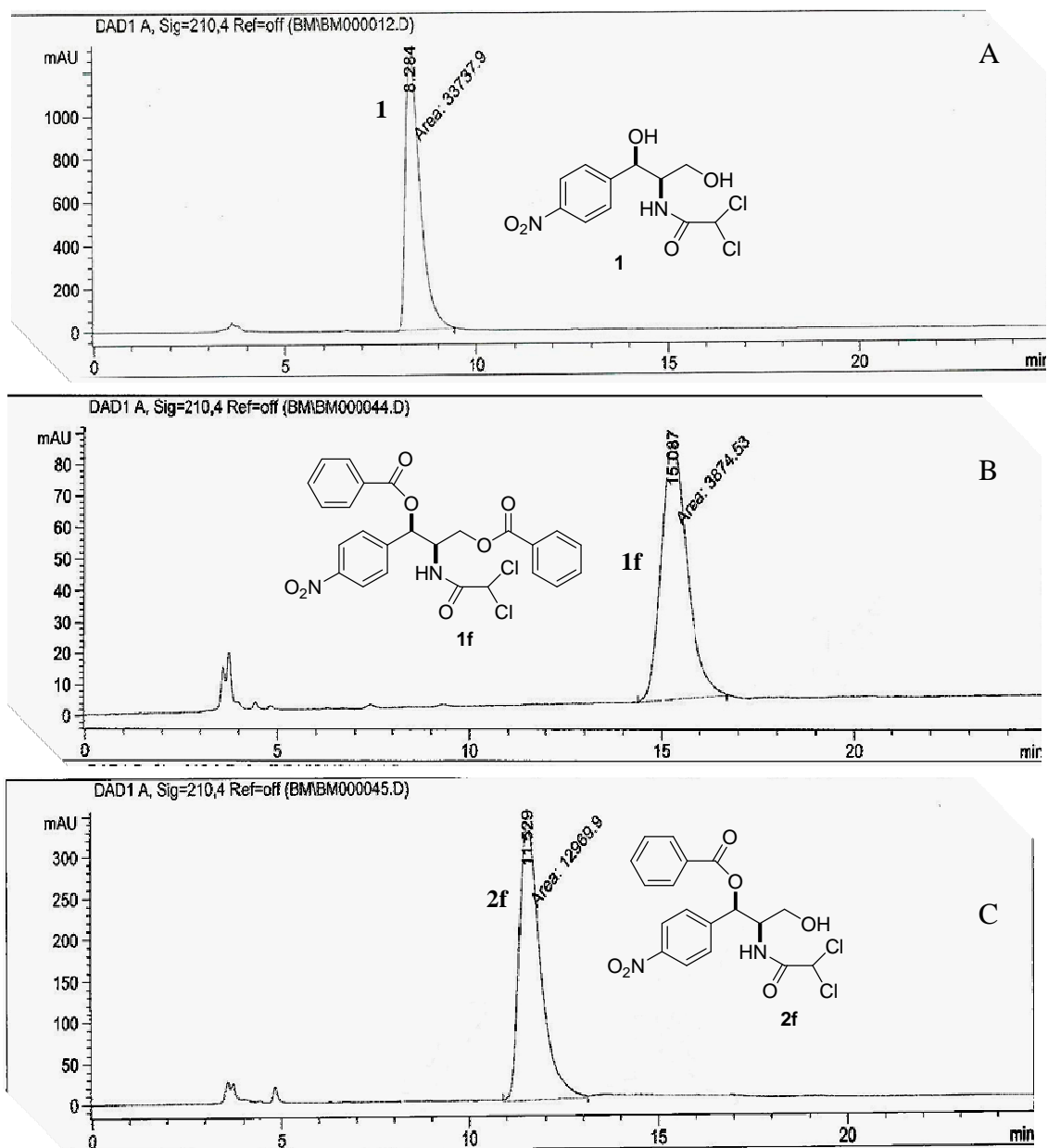
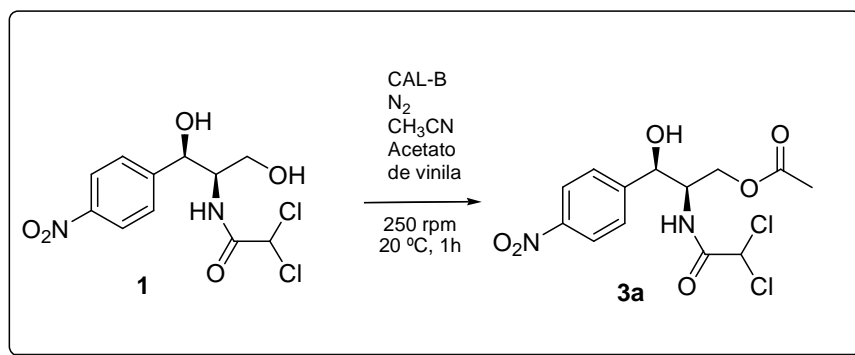


Figura 32 - A) cloranfenicol (1), B) 1',3'-dibenzoato de cloranfenicol (1f), C) 1'-benzoato de cloranfenicol (2f), CLAE, fluxo de 0,8 mL/min, Hexano:isopropanol (80:20), 40°C, 18 bar, 10 µL de injeção, coluna quiral AS.

#### 1.4.4.6 Síntese de 3'-acetato -1'-palmitato de cloranfenicol (7)

##### 1.4.4.6.1 Acetilação enzimática de cloranfenicol (1)

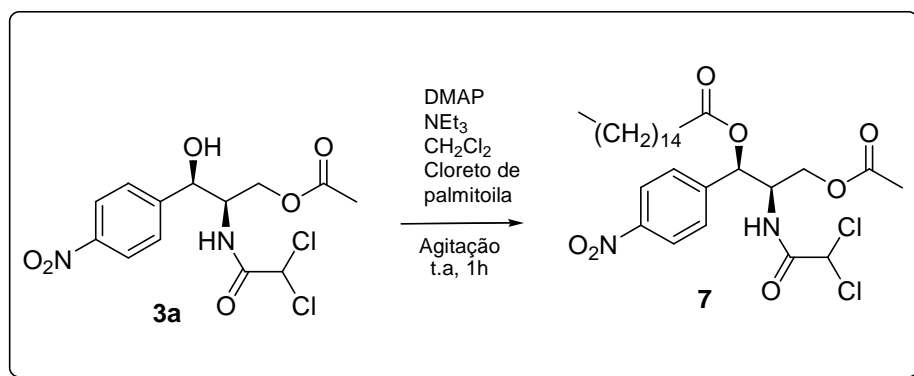
A uma solução de cloranfenicol (**1**) (200,0 mg, 0,62 mmol) em 4,13 mL de CH<sub>3</sub>CN seco, adicionou-se CAL-B (1:1 em peso), e por último o acetato de vinila (285,30 µL, 3,10 mmol). A mistura reacional permaneceu sob agitação e em atmosfera de nitrogênio a 20°C e 250 rpm durante 24 h. Transcorrido este tempo, evaporou-se o solvente a pressão reduzida e o produto reacional foi purificado por cromatografia em gel de sílica utilizando-se como fase móvel a mistura AcOEt/hexano 40% (Esquema 22).



Esquema 22 - Reação de acetilação enzimática de **1**

##### 1.4.4.6.2 Acilação química do acetato de 3'-cloranfenicol (**3a**)

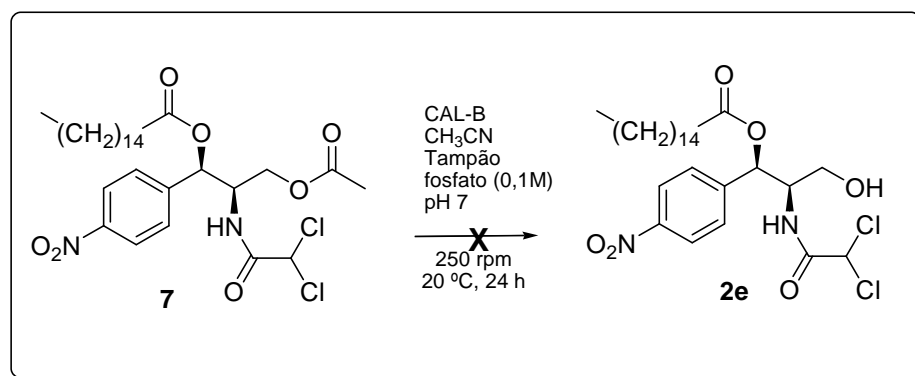
A uma solução do acetato de 3'-cloranfenicol (**3a**) (198,0 mg, 0,54 mmol) em 5,42 mL de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> seco, adicionou-se DMAP (13,3 mg, 0,11 mmol), NEt<sub>3</sub> (90,36 µL, 0,65 mmol) e por último o cloreto de palmitoíla (197,5 µL, 0,65 mmol). A mistura reacional permaneceu sob agitação e em atmosfera de nitrogênio a temperatura ambiente durante 1 h. Transcorrido este tempo, evaporou-se o solvente a pressão reduzida e o produto reacional foi purificado por cromatografia em gel de sílica utilizando-se como fase movel a mistura AcOEt/hexano 30% ( Esquema 23).



Esquema 23 - Reação de acetilação química de **1**, utilizando cloreto de palmitoila como agente acilante

#### 1.4.4.7 Hidrólise enzimática 3'-acetato -1'-palmitato de cloranfenicol (**7**)

A uma solução de **7** (35,0 mg, 0,06 mmol) em 116,0  $\mu$ L de solvente, adicionou-se 464,0  $\mu$ L de tampão fosfato pH 7,0; 100 mM e CAL-B (1:1 em peso em relação a **1a**), sendo o processo a 20 °C e 250 rpm. Alíquotas foram analisadas periodicamente por CCDA e parou-se a reação depois de 24 h. Por último, a enzima foi filtrada e lavada com AcOEt (3 x 10 mL). Evaporou-se o solvente a pressão reduzida. O produto reacional foi purificado por cromatografia em CCD preparativa utilizando-se como eluente hexano/AcOEt 30% (Esquema 24).

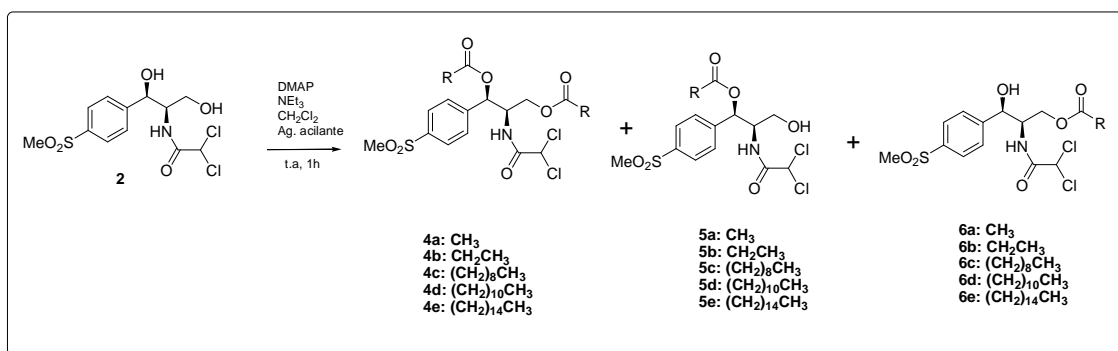


Esquema 24 - Reação de hidrólise enzimática de **7**

## 1.4.5 Síntese de derivados de tianfenicol (2)

### 1.4.5.1 Síntese química de derivados de tianfenicol (2)

A uma solução de tianfenicol **2** (100,0 mg, 0,28 mmol) em 2,80 mL de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> seco, adicionou-se DMAP (3,4 mg, 0,028 mmol), NEt<sub>3</sub> (58,5 μL, 0,42 mmol) e por último 1,5 eq. do agente acilante correspondente **a-f** (Tabela 9) em relação a **2**. A mistura reacional permaneceu sob agitação e em atmosfera de nitrogênio a temperatura ambiente durante 1 h (Esquema 25). Transcorrido este tempo, evaporou-se o solvente a pressão reduzida e o produto reacional foi purificado por cromatografia em gel de sílica utilizando-se como fase móvel uma mistura de solventes orgânicos (Tabela 15).



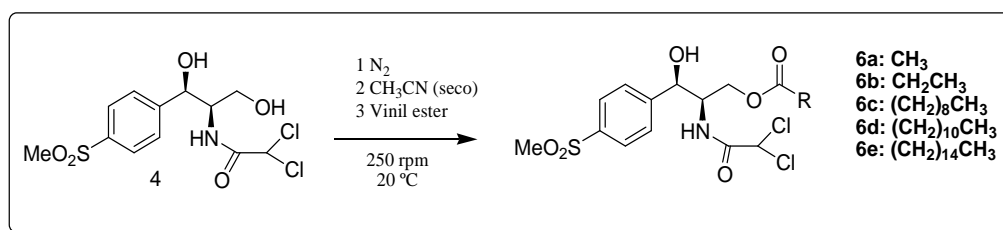
Esquema 25 - Reação de acilação química de tianfenicol (2).

Tabela 9 - Agentes acilantes utilizados na reação de acilação química de tianfenicol (2) e (%) dos eluentes utilizados na purificação dos produtos.

	Agente acilante	R	(%) Eluentes
<b>a</b>	Anidrido acético (39,72 μL; 0,42 mmol)	CH <sub>3</sub>	60% AcOEt/hexano
<b>b</b>	Anidrido propiônico (53,97 μL; 0,42 mmol)	CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	60% AcOEt/hexano
<b>c</b>	Cloreto de decanoíla (87,36 μL; 0,42 mmol)	(CH <sub>2</sub> ) <sub>8</sub> CH <sub>3</sub>	30% AcOEt/hexano
<b>d</b>	Cloreto de lauroíla (100,11 μL; 0,42 mmol)	(CH <sub>2</sub> ) <sub>10</sub> CH <sub>3</sub>	30% AcOEt/hexano
<b>e</b>	Cloreto de palmitoíla (127,76 μL; 0,42 mmol)	(CH <sub>2</sub> ) <sub>14</sub> CH <sub>3</sub>	20% AcOEt/hexano

#### 1.4.5.2 Reação de acilação enzimática de tianfenicol (**2**)

A uma solução de tianfenicol (**2**, 50,0 mg, 0,14 mmol) e CAL-B (1:1 em peso em relação a **2**) em 1,40 mL de CH<sub>3</sub>CN seco, sob atmosfera de nitrogênio, adicionou-se 5 eq. do correspondente éster vinílico **4a-f** (Tabela 16). A mistura reacional permaneceu em agitação a 20 °C e 250 rpm por 24 h (Esquema 26). Transcorrido este tempo, evaporou-se o solvente a pressão reduzida e o produto reacional foi purificado por cromatografia em gel de sílica utilizando-se como fase móvel uma mistura de solventes orgânicos de acordo com a Tabela 10.



Esquema 26 - Reação de acilação enzimática de tianfenicol (**2**).

Tabela 10 - Ésteres vinílicos utilizados na reação de acilação enzimática de tianfenicol (**2**)

Y	Ésteres vinílicos	R	Eluentes (%)
a	Acetato de vinila (64,7 µL; 0,70 mmol)	CH <sub>3</sub>	60% AcOEt/hexano
b	Propionato de vinila (70,0 µL; 0,70 mmol)	CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	60% AcOEt/hexano
c	Decanoato de vinila (157,1 µL; 0,70 mmol)	(CH <sub>2</sub> ) <sub>8</sub> CH <sub>3</sub>	30% AcOEt/hexano
d	Laurato de vinila (182,0 µL; 0,70 mmol)	(CH <sub>2</sub> ) <sub>10</sub> CH <sub>3</sub>	20% AcOEt/hexano
e	Palmitato de vinila (198,2 µL; 0,70 mmol)	(CH <sub>2</sub> ) <sub>14</sub> CH <sub>3</sub>	20% AcOEt/hexano

#### 1.4.5.3 Estudo cinético da reação de acilação enzimática de tianfenicol (**2**)

A uma solução de tianfenicol (**2**, 30,0 mg, 0,42 mmol) e CAL-B (1:1 em peso em relação a **2**) em 842,0 µL de CH<sub>3</sub>CN seco, sob atmosfera de nitrogênio, adicionou-se o éster vinílico **a-f** correspondente (Tabela 11). A mistura reacional permaneceu em agitação a 20 °C e 250 rpm. Alíquotas foram analisadas por CLAE a cada 60 minutos e parou-se a reação após o consumo total de **2**.

Tabela 11 - Quantidades de ésteres vinílicos utilizados nas reações de acilação de **2**.

Ésteres vinílicos	
<b>a</b>	Aceteto de viníla (38,8 µg; 0,42 mmol)
<b>b</b>	Propionato de viníla (45,8 mg; 0,42 mmol)
<b>c</b>	Decanoato de viníla (94,2 mg; 0,42 mmol)
<b>d</b>	Laurato de viníla (109,5 mg; 0,42 mmol)
<b>e</b>	Palmitato de viníla (138,3 mg; 0,42 mmol)

#### 1.4.5.4 Reciclagem de enzima em reações de acilação de tianfenicol (**2**)

A uma solução de tianfenicol (**2**, 50,0 mg, 0,14 mmol) e CAL-B (1:1 em peso em relação a **2**) em 1,40 mL de CH<sub>3</sub>CN seco, sob atmosfera de nitrogênio, adiciona-se decanoato de viníla (182 µL, 0,70 mmol). A mistura reacional permaneceu em agitação a 20 °C e 250 rpm por uma hora. Transcorrido esse período, a enzima foi filtrada e lavada com CH<sub>3</sub>CN (3 x 10 mL) e seca para reutilização. Evaporou-se o solvente a pressão reduzida e o produto reacional foi analisado por CLAE. As enzimas foram reutilizadas em quatro ciclos.

#### 1.4.5.5 Hidrólise enzimática dos derivados de tianfenicol diacilados **4a-4b**

A uma solução de **4a** (30,0 mg, 0,0699 mmol) e **4b** (30,0 mg, 0,0639 mmol) em 150 µL de solvente, adiciona-se 600 µL de tampão fosfato pH 7,0, 100 mM e CAL-B (1:1 em peso em relação a **4a**), sendo o processo a 20 °C e 250 rpm. Decorridos 24 h a mistura reacional foi extraída com CH<sub>2</sub>CL<sub>2</sub> e analisada por CLAE.

#### 1.4.5.6 Quantificação dos derivados de tianfenicol (**2**)

A quantificação dos derivados de tianfenicol foi realizada através de curvas de calibração dos produtos obtidos pelo método químico clássico. Soluções estoques desses compostos nas concentrações de 0,05 – 0,5 mmol foram analisadas em CLAE e os valores numéricos referentes às áreas foram plotados em uma curva de calibração (concentração *versus* área). Para análise por CLAE, 1,0 mg das amostras foram dissolvida em 1,0 mL de hexano/isopropanol 10% e estocadas em pequenos vial. As condições utilizadas para análise dessas amostras estão descritas nas Figuras 33 (Pág 79) a 37 (Pág 83).

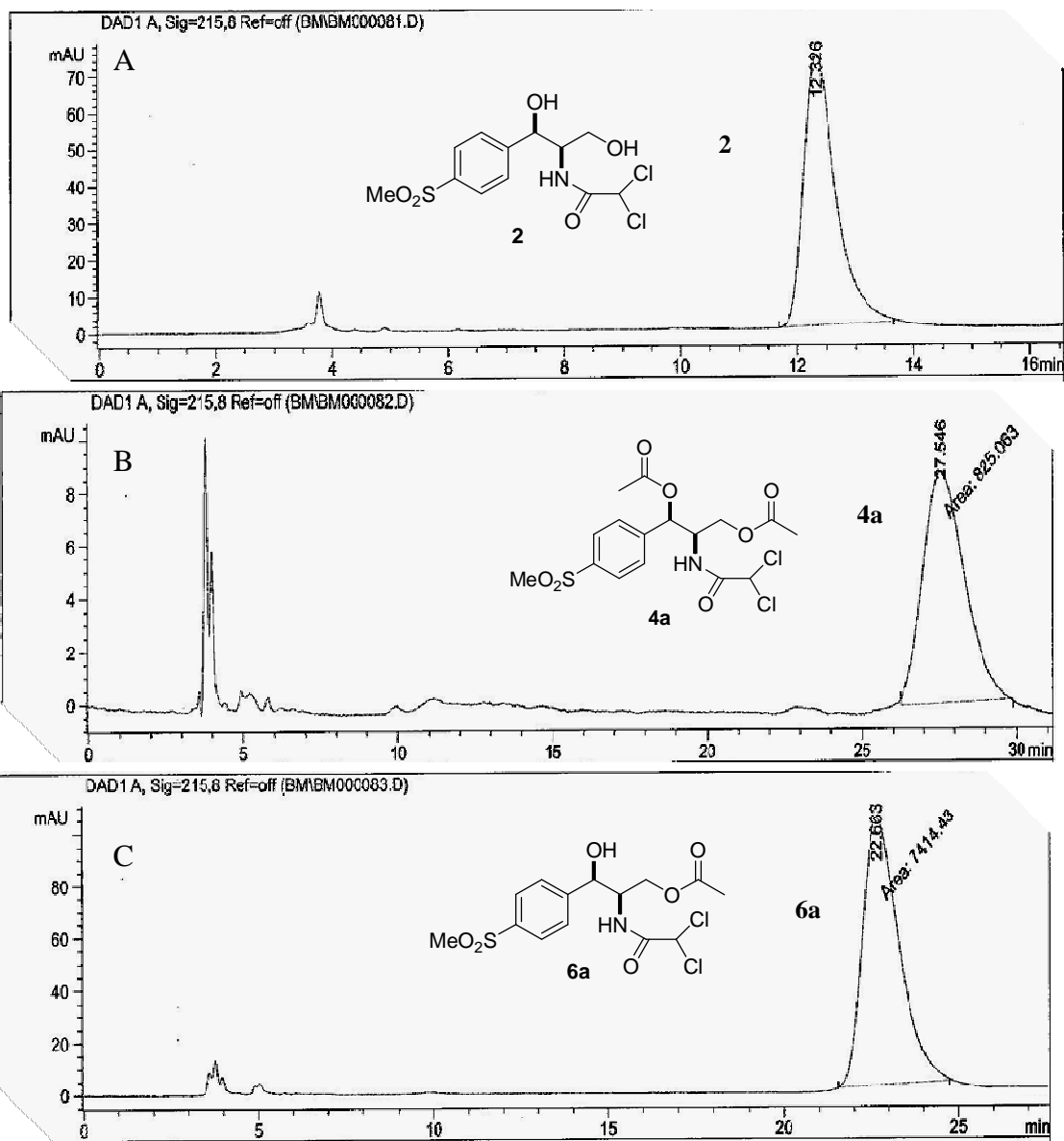


Figura 33 - A) tianfenicol (2), B) 1',3'-diacetato de tianfenicol (4a), C) 3'-acetato de tianfenicol (6a), CLAE, fluxo de 0,8 mL/min, Hexano:isopropanol (75:25), 40°C, 20 bar, 10 µL de injeção, coluna quiral AS.

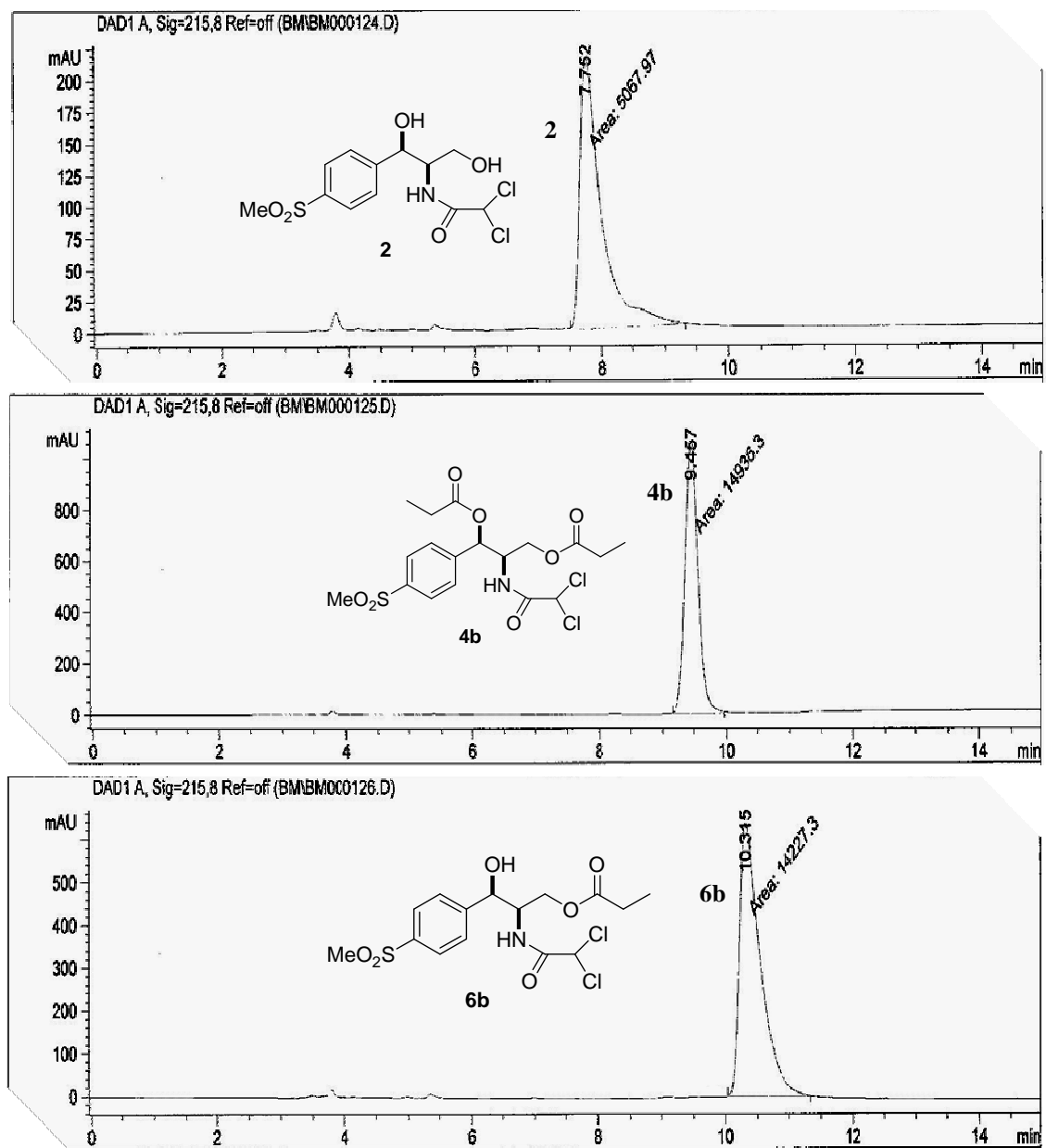


Figura 34 – cromatogramas de: A) tianfenicol (**2**), B) dipropionato de 1',3'-tianfenicol (**4b**), C) propionato de 3'-tianfenicol (**6b**), CLAE, fluxo de 0,8 mL/min, Hexano:isopropanol (75:25), 40°C, 20 bar, 10 µL de injeção, coluna quiral IA.



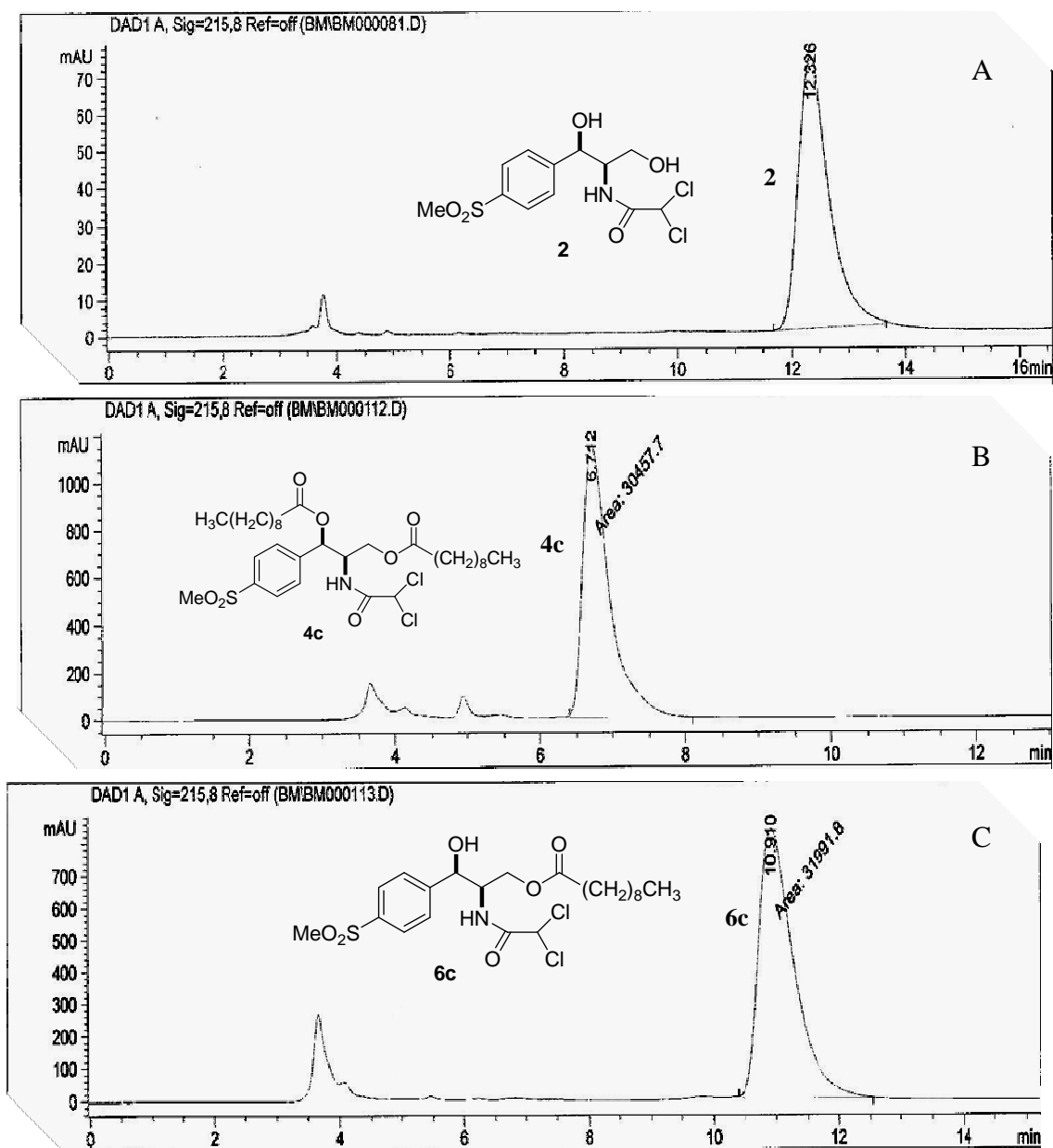


Figura 35 - A) tianfenicol (2), B) didecanoato de 1',3'-tianfenicol (4c), C) decanoato de 3'-tianfenicol (6c), CLAE, fluxo de 0,8 mL/min, Hexano:isopropanol (75:25), 40°C, 20 bar, 10 µL de injeção, coluna quiral AS.

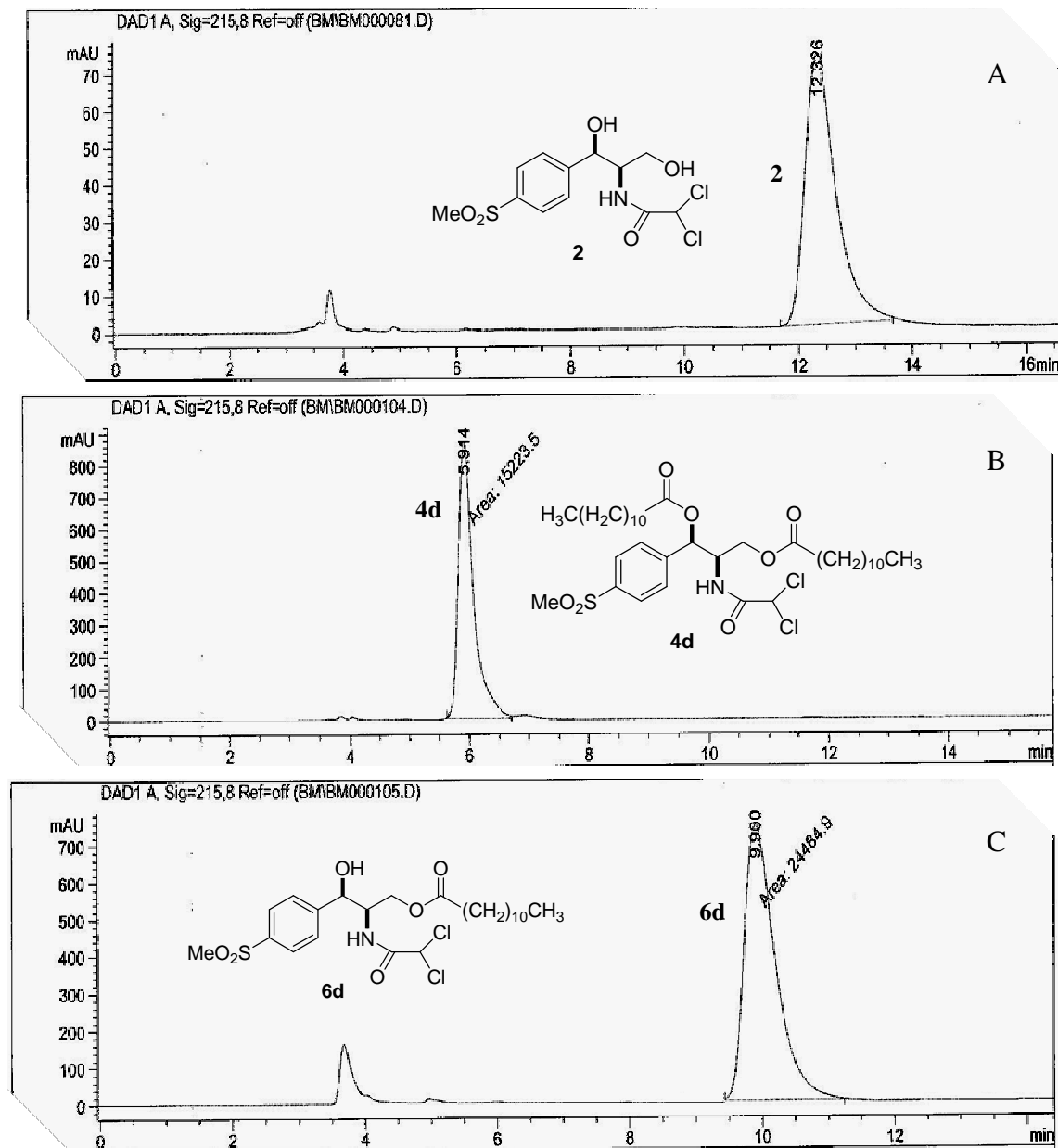


Figura 36 - A) tianfenicol (**2**), B) 1',3'-dilaurato de tianfenicol (**4d**), C) 3'-laurato de tianfenicol (**6d**), CLAE, fluxo de 0,8 mL/min, Hexano:isopropanol (75:25), 40°C, 20 bar, 10 µL de injeção, coluna quiral AS.

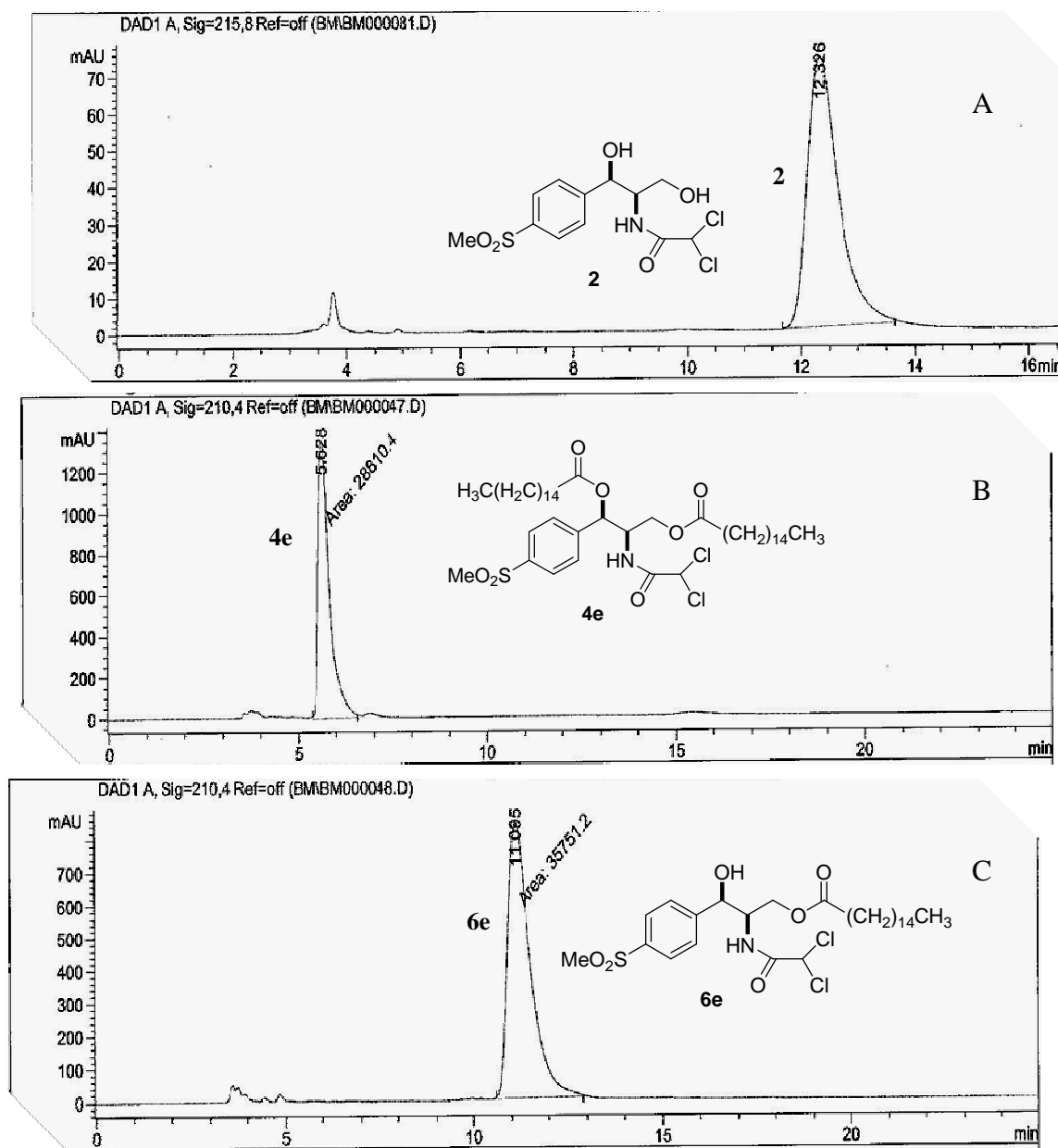


Figura 37 - A) tianfenicol (**2**), B) 1',3'-dipalmitato de tianfenicol (**4e**), C) 3'-palmitato de tianfenicol (**6e**), CLAE, fluxo de 0,8 mL/min, Hexano:isopropanol (75:25), 40°C, 20 bar, 10 µL de injeção, coluna quiral AS.

## 1.5 CONCLUSÕES

A primeira parte do trabalho teve como objetivo investigar rotas biocatalíticas eficientes para a produção de derivados de cloranfenicol (**1**) e tianfenicol (**2**) utilizando lipases. Neste trabalho, foram realizadas as sínteses enzimáticas de dois derivados de cloranfenicol (**1**), através de reações de hidrólise de derivados diacilados, e oito derivados do tianfenicol (**2**), sendo seis deles obtidos por reação de acilação e dois obtidos através de reações de hidrólise de derivados diacilados. As condições reacionais foram otimizadas através da variação de parâmetros tais como: enzima, solvente, temperatura, pH e proporção entre solvente e agente hidrolítico.

Na hidrólise enzimática dos derivados de cloranfenicol diacilados, os melhores resultados foram alcançados quando se utilizou uma mistura de CH<sub>3</sub>CN: tampão fosfato pH 7 na proporção de 20:80, CAL-B como biocatalisador, temperatura de 20 °C, agitação de 250 rpm e tempo reacional de 24 h. Neste estudo, foi possível concluir que o tamanho da cadeia carbônica do grupo acila é um fator determinante na reatividade dos derivados diacilados, sendo a hidrólise do derivado **1a** a mais seletiva.

Desse modo, a reação de hidrólise enzimática do 1',3'-diacetato de cloranfenicol (**1a**) e 1',3'-dipropionato de cloranfenicol (**1b**) mostrou ser uma rota eficiente na produção dos derivados de cloranfenicol monoacilados na posição 1' (**2a** e **2b**, respectivamente) em relação ao método de acilação por via química e via enzimática.

A reação de acilação enzimática do tianfenicol (**2**), utilizando CAL-B como biocatalisador e éster vinílico como doadores do grupo acila, se mostrou bastante eficiente, com altos índices de conversão e seletividade. Como esperado, os processos forneceram unicamente o produto de acilação da hidroxila menos impedida (3'-OH).

A eficiência da enzima CAL-B reciclada na reação de acilação do tianfenicol (**4**) foi investigada, sendo possível concluir que esta se mantém ativa durante os cinco processos reacionais testados.

A reação de hidrólise enzimática de tianfenicol-1',3'-diacetato (**4a**), se mostrou bastante seletiva, na qual foi observada a formação de 80,8 % do tianfenicol-1'-acetato

(**5a**). Menor taxa de conversão e seletividade foi observada na hidrólise enzimática de Cloranfenicol-1',3'-diacetonato (**4b**).

Assim como no caso das reações de hidrólise dos derivados do cloranfenicol diacilados, a reação de hidrólise enzimática do 1',3'-diacetato de tianfenicol (**4a**) e 1',3'-dipropionato de tianfenicol (**5b**) mostrou ser uma rota eficiente na produção dos derivados de tianfenicol monoacilados na posição 1' (**5a** e **5b**, respectivamente) em relação ao método de acilação por via química e via enzimática.

# Capítulo 2

Estudo Químico Bioguiado de Fungos  
Associados à *Ascidia Eudistoma vannamai*

## 2 CAPÍTULO 2

### 2.1 INTRODUÇÃO

#### 2.1.1 Química de produtos naturais de fungos marinhos

Fungos marinhos constituem uma rica fonte de novos compostos, estruturalmente diversificados, com atividade anticancerígena, antibacteriana e antiviral. Em muitos casos, a produção desses metabólitos bioativos está associada a um mecanismo de defesa contra colonização de suas superfícies por outros microorganismos ou alguns invertebrados (PAUL, RITSON-WILLIAMS & SHARP, 2011).

A literatura recente descreve a existência de 530 espécies (321 gêneros) de fungos filamentosos marinhos, sendo 424 espécies (251 gêneros) de Ascomycetos, 94 espécies (61 gêneros) de fungos anamórficos e apenas 12 espécies (9 gêneros) de basidiomicota (RATEB & EBEL *et al*, 2011). Dentro do filo ascomycota, o gênero *Aspergillus* ganha destaque, pois é amplamente distribuído na natureza. Espécies desse gênero são consideradas fungos de solo, decompositores e colonizadores de culturas agrícolas, e estão entre os fungos mais comuns na natureza.

O objetivo da segunda parte deste trabalho foi avaliar o potencial atitumoral dos extratos de fungos marinhos, previamente isolados da ascídia *Eudistoma vannamei*, espécie endêmica do litoral nordeste do Brasil (JIMENEZ *et al*, 2007). Através de um estudo bioguiado dos extratos fúngicos, elegeu-se a cepa mais ativa, a qual foi cultivada e posteriormente identificada como *Aspergillus* sp., com o intuito de isolar e caracterizar seus metabólitos secundários bioativos.

## 2.2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

### 2.2.1 Organismos marinhos como fonte de moléculas bioativas

Ascídias são organismos dominantes em muitos ecossistemas marinhos e são amplamente distribuídas pelos oceanos. O sucesso ecológico desses organismos está na habilidade de produzir metabólitos secundários importantes como mecanismos de defesa (JIMENEZ *et al*, 2003).

Pertencentes ao subfilho Urochordata (Tunicata), as ascídias são conhecidos por a sua grande diversidade química e durante os últimos 25 anos se mostraram produtoras uma ampla gama de moléculas citotóxicas. Entre os seis primeiros compostos derivados de organismos marinhos que atingiram os ensaios clínicos como agentes antitumorais, três são derivados de ascídias, como prova do grande potencial destes organismos como uma nova fonte de compostos antitumorais (MENNA, 2009).

A didemnina B (**27**) (Figura 38), isolada pela primeira vez em 1981 da ascídia *Trididemnum solidum* no Caribe, é o primeiro produto natural marinho que entrou em ensaios clínicos anticâncer. Os primeiros ensaios a revelaram como um potente inibidor do crescimento de uma série células tumorais humanas *in vitro* chegando a serem feitos testes de fase 1 e fase 2. Porém, devido à alta toxicidade e baixa solubilidade, os ensaios foram encerrados (NEWMAN & CRAGG, 2004).

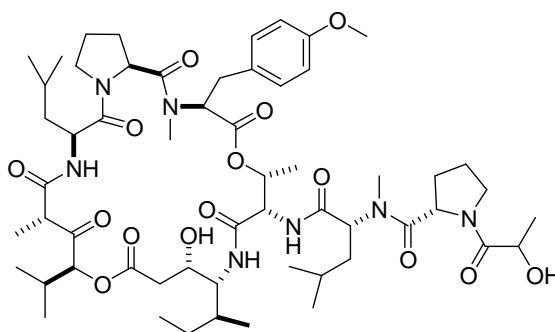


Figura 38 – Estrutura da didemnina B (**27**) (NEWMAN & CRAGG, 2004)

Vitilevuamida (**28**, Figura 39) é um peptídeo cíclico bioativo que foi isolado a partir das ascídias *Didemnum cuculiferum* e *Polysyncraton lithostrotum*. Pesquisas sobre o mecanismo de ação deste peptídeo cíclico marinho revelam que vitilevuamide inibe a polimerização da tubulina encerrando o ciclo celular das células alvo.



Vitilevuamida apresenta atividade *in vivo* contra o células linfocítica leucemica P388 (KIJJOA & SAWANGWONG, 2004).

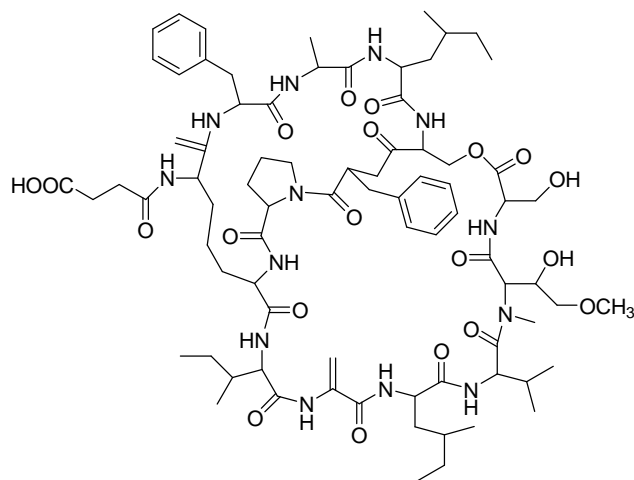


Figura 39 – Estrutura da vitilevuamida (**28**) (KIJJOA & SAWANGWONG, 2004)

Um extenso estudo de *Amaroucium conicum*, coletada ao longo da costa da Sardenha, levou ao isolamento de um grupo de novos meroterpenos **29-35** (Figura 40), cujas estruturas têm em comum um anel dioxotiazina e atividades citotóxicas e propriedades pró-apoptóticas *in vitro* (AIELLO *et al*, 2003; AIELLO *et al*, 2005a; AIELLO *et al*, 2005b).

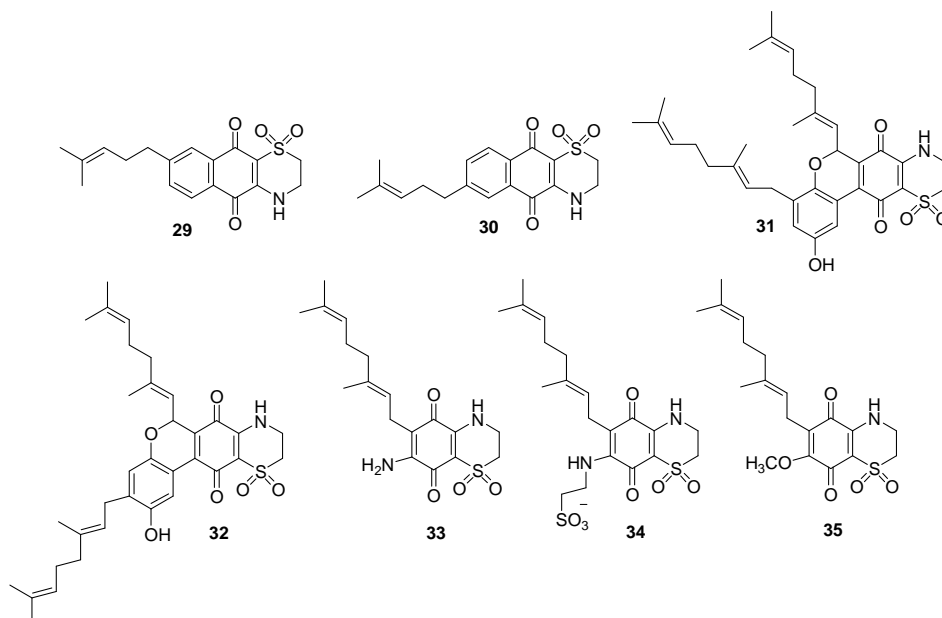


Figura 40 – Estruturas dos monoterpenos conicaquinona A e B (**29** e **30**), Tiaplidiaquinona A e B (**31** e **32**) e aplidinona A, B e C (**33**, **34** e **35** respectivamente) (AIELLO *et al*, 2003; AIELLO *et al*, 2005a; AIELLO *et al*, 2005b).

A atividade citotóxica das conicaquinonas A e B (**29** e **30**, respectivamente) foi avaliada *in vitro* frente às células de glioma (C6) e basidiófilo leucêmica (RBL-2H3), ambas em ratos, mostrando ser marcante, IC<sub>50</sub> cerca de 10 µg/ml, e seletiva para glioma (C6). As tiaplidiaquinonas A e B (**31** e **32**, respectivamente), as quais apresentam uma estrutura tetracíclica incomum, se mostraram bastante citotóxicas frente a linhagem de células Jurkat, derivado de um linfoma T humano, com IC<sub>50</sub> cerca de 3 µg/ml, sendo comparadas com os valores da doxorubicina. Testes em células leucêmicas Jurkat mostraram que aplididinona C (**35**) é inativa, aplididinona A (**33**) é moderadamente citotóxica, enquanto aplididinona B (**34**) não foi testada AIELLO *et al*, 2003; AIELLO *et al*, 2005a; AIELLO *et al*, 2005b). Estudos no mecanismo de ação dos compostos (**29** – **32**) mostraram que todos atuam como indutores de apoptose pela superprodução intracelular de espécie de oxigênio reativo (LAWEN *et al*, 1994).

O gênero *Eudistoma* é o mais diverso da família dos Polycitoridae e muitas espécies são encontradas nas regiões tropicais. A espécie *E. vannamai* é endêmica do nordeste do Brasil, sendo encontrada desde o litoral do Ceará até o litoral da Bahia (JIMENEZ *et al*, 2007).

Estudando a atividade do extrato diclorometano de *E. vannamei*, Jimenez e colaboradores encontraram resultados satisfatórios de citotoxicidade perante células leucêmicas HL-60 (JIMENEZ *et al*, 2007).

Além do seu potencial biológico, ascídias também são conhecidas por estarem associadas a uma rica diversidade de microrganismos, principalmente fungos e bactérias (MENEZES *et al*, 2010). Porém, dos novos compostos derivados de fungos marinhos publicados na literatura até meados de 2010, apenas 3% tem ascídias como fonte de fungos (RATEB & EBEL *et al*, 2011).

Desde que foi, acidentalmente, descoberta a produção de cefalosporina C por uma cultura de *Cephalosporium* obtido na costa da Sardenha, os fungos marinhos têm sido investigados quanto ao seu potencial químico. Nos últimos anos, metabólitos secundários obtidos a partir de derivados fúngicos marinhos são alvo de interesse da comunidade científica, pois muitos deles apresentam estruturas incomuns e possuem propriedades biológicas importantes (RATEB & EBEL *et al*, 2011).

Uma cultura de *Pithomyces* sp. isolado da ascidia *Oxycorinya fasciculari*, natural do mar Indo-Pacífico, levou ao isolamento dos pitholideos A – D (**36**, **37**, **38** e **39**, respectivamente) e (*R*)-5-metilmeleina (**40**) (Figura 41), as substâncias foram testadas quanto suas atividades citotóxicas, mas não apresentaram resultados significativos (WANG, BORGESON & CREWS, 1997).

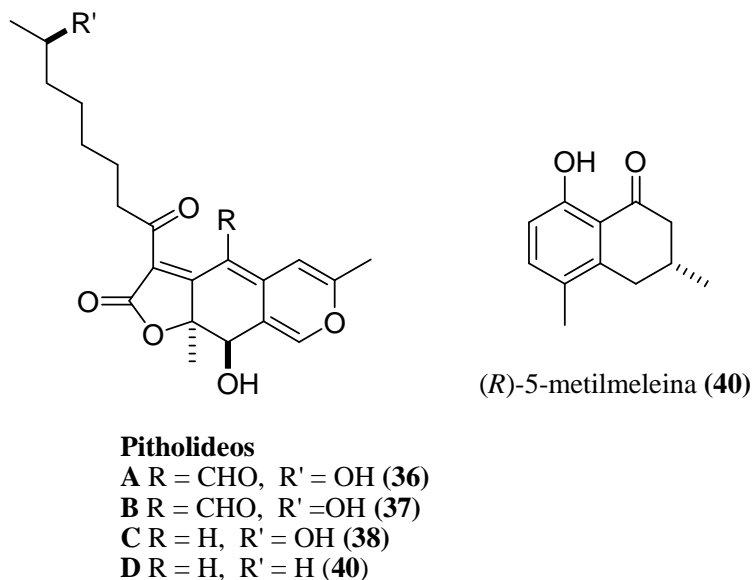


Figura 41 – Estruturas dos pitholideos A – D e (*R*)-5-metilmeleina (WANG, BORGESON & CREWS, 1997)

O estudo do metabolismo secundário do fungo *Penicillium steckii* isolado de uma ascidia desconhecida, coletada na costa da Venezuela, levou ao isolamento de dois novos ácidos carboxílicos, ácido tanzawaico E (**41**) e F (**42**) (Figura 42) e os benzopiranos 3,7-dimetil-1,8-dihidroxi-6-metoxi-isocromano (**43**) e 3,7-dimetil-8-hidroxi-6-metoxi-isocromano (**44**) (Figura 43) (MALMSTRØM, CHRISTOPHERSEN & FRISVAD, 2000).

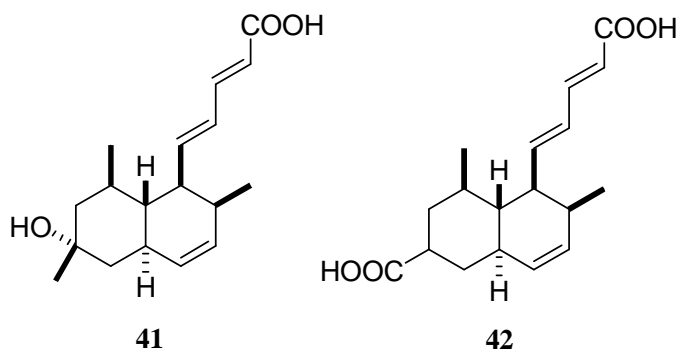


Figura 42 – Estruturas dos ácidos tanzawaico E (**40**) e F (**41**) (MALMSTRØM, CHRISTOPHERSEN & FRISVAD, 2000).

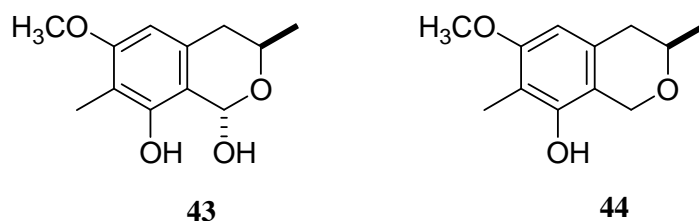


Figura 43 – Estruturas dos benzopiranos **43** e **44** (MALMSTRØM, CHRISTOPHERSEN & FRISVAD, 2000).

Oh e colaboradores publicaram o isolamento de um novo sesquiterpeno eremofilano chamado criptosfaerolida (**45**) (Figura 44) a partir do cultivo do fungo *Cryptosphaeria* sp. Isolado de uma ascidia não identificada nas Bahamas. O novo composto exibiu citotoxicidade frente à linhagem de células HCT-116 (carcinoma de cólon) com valor de  $IC_{50}$  4,5  $\mu$ M (OH *et al.*, 2010).

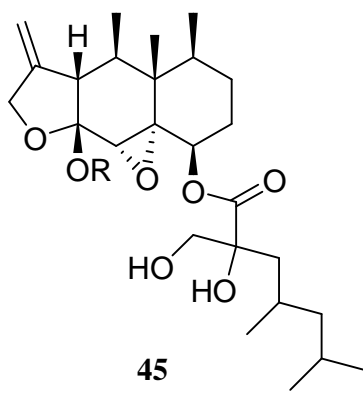


Figura 44 – Estrutura da criptosfaerolida (**45**) (OH *et al.*, 2010)

Ao investigar o metabolismo secundário do fungo *Penicillium* sp. isolado da ascidia *Didemnum molle* coletado nas Ilhas Ishigaki, Japão, Motohashi e colaboradores isolaram dois novos sesquiterpenos chamados JBIR-27 (**46**) e JBIR-28 (**47**) além de sporogen-AO1 (**48**) e fomenona (**49**) (Figura 45). Os compostos **47**, **48** e **49** apresentaram citotoxicidade frente à linhagem de células tumorais Hella com valores de  $IC_{50}$  92; 8,3 e 19  $\mu$ M, respectivamente, enquanto que **46** apresentou-se inativo a uma concentração de 80  $\mu$ M (MOTOHASHI *et al.*, 2009).

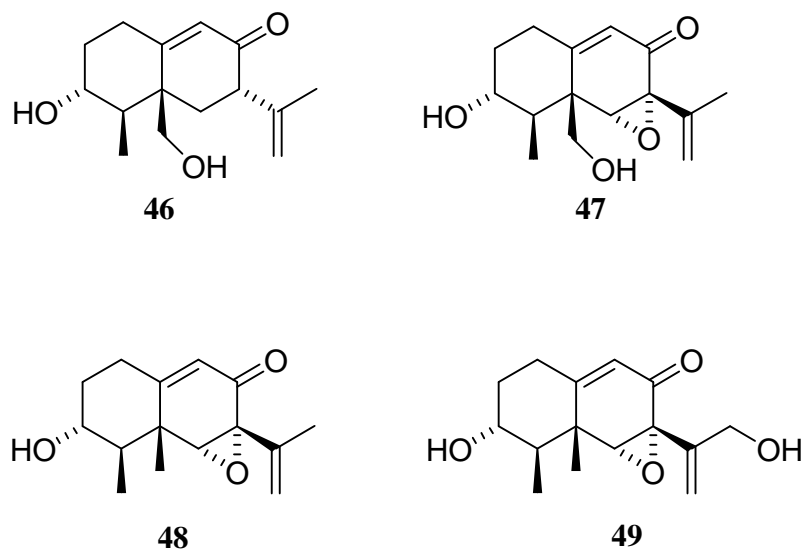


Figura 45 – Estrutura da JBIR-27 (**46**) e JBIR-28 (**47**) além de sporogen-AO1 (**48**) e fomenona (**49**) (MOTOHASHI *et al*, 2009)

Diante do potencial de fungos e ascídias como produtores de compostos bioativos, resolveu-se investigar o potencial citotóxico de metabólitos secundários produzidos por fungos associados à *Eudistoma vannamei*, através de fracionamento bioguiado.

### 2.2.2 Ácido penicílico (AP)

A identificação do ácido penicílico (AP) como responsável pela atividade citotóxica de extratos e frações ativas de *Aspergillus* sp, descritas na parte II deste trabalho, motivou a realização de um levantamento bibliográfico acerca dessa micotoxina. A pesquisa foi realizada utilizando-se as bases de dados *Web of Science*, *Science direct* e *Scifinder*, restringindo-se aos últimos dez anos.

Ácido penicílico é uma micotoxina, isolada pela primeira vez em 1913 como metabólito secundário de *Penicillium puberulum*, que teve sua estrutura elucidada em 1936. Do ponto de vista estrutural, ele é constituído de um anel lactônico de cinco membros e pode ser encontrado em um equilíbrio tautomérico (Figura 46) entre uma estrutura aberta e outra cíclica (KANG *et al*, 2007).

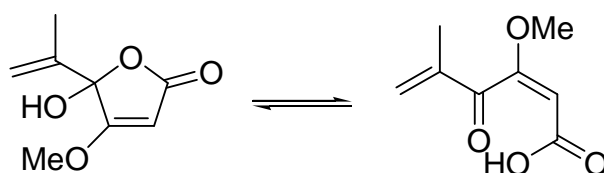
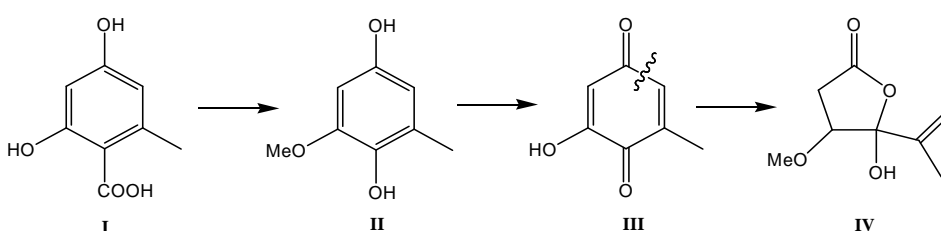


Figura 46 – Equilíbrio tautomérico entre as formas aberta e fechada do ácido penicílico.

A biossíntese de AP inicia-se pela metilação do ácido orselínico (**I**), seguido por descarboxilação levando a formação de **II**. Este último é posteriormente oxidado a benzoquinona **III**, que sofre uma clivagem oxidativa e forma o ácido penicílico, Esquema 27 (SHAN *et al*, 1996).



Esquema 27 – sequencia biossintética do ácido penicílico a partir do ácido orselínico

A literatura relata os gêneros *Penicillium* e *Aspergillus* como produtores de AP (FRISVAD & FILTENBORG, 1983), tendo sido sugerido ser um indicador quimiotaxonômico para espécies de *Penicillium* que o produzem (PATERSON, VENÂNCIO & LIMA, 2006). A Tabela 12 apresenta as espécies produtoras de AP.

Tabela 12 – Espécies de fungos produtores de ácido penicílico (AP) descritas na literatura no período de 2000 a 2011.

ESPÉCIES	REFERÊNCIA
<i>Penicillium aurantiogriseum</i>	SAMSON & FRISVAD, 2004; RUNDBERGET, SKAAR, & FLAØYEN, 2004
<i>P. carneum</i>	SAMSON & FRISVAD, 2004
<i>P. freii</i>	SAMSON & FRISVAD, 2004
<i>P. tulipae</i>	SAMSON & FRISVAD, 2004; OVERY, & FRISVAD, 2003
<i>P. viridicatum</i>	SAMSON & FRISVAD, 2004; RUNDBERGET, SKAAR, & FLAØYEN, 2004; KUMAR, BASU & RAJENDRAN, 2008
<i>P. radícicola</i>	SAMSON & FRISVAD, 2004; OVERY, & FRISVAD, 2003
<i>P. polonicum</i>	SAMSON & FRISVAD, 2004; NIELSEN, 2003

<i>P. neochinulatum</i>	SAMSON & FRISVAD, 2004
<i>P. cyclopium</i>	SAMSON & FRISVAD, 2004
<i>P. melanocolidium</i>	SAMSON & FRISVAD, 2004
<i>P. albocoremium</i>	OVERY, & FRISVAD, 2003
<i>P. brasilianum</i>	SCHURMANN, SALLUM & TAKAHARA, 2010
<i>P. simplicissicatum</i>	TAKAHASHI <i>et al</i> , 2008
<i>P. puberulum</i>	TAKAHASHI <i>et al</i> , 2008
<i>P. roqueforti</i>	ERDOGAN, GURSES & SERT, 2003
<i>P. chrysogenum</i>	KUMAR, BASU, RAJENDRAN, 2008
<i>P. commune</i>	KUMAR, BASU, RAJENDRAN, 2008
<i>P. citrinum</i>	DELGADO <i>et al</i> , 2011
<i>P. crustosum</i>	KOKKONEN, JESTOI, & RIZZO, 2005
<i>P. nordicum</i>	KOKKONEN, JESTOI, & RIZZO, 2005
<i>P. verrucosum</i>	KOKKONEN, JESTOI, & RIZZO, 2005
<i>Aspergillus melleus</i>	KIMURA, NAKAHARA & FUJIOKA, 1996; NOONIM, 2008; FRISVAD <i>et al</i> , 2004
<i>A. westerdijkiae</i>	NOONIM, 2008; FRISVAD <i>et al</i> , 2004
<i>A. sclerotium</i>	NOONIM, 2008; KANG <i>et al</i> , 2007; FRISVAD <i>et al</i> , 2004
<i>A. ocraceus</i>	NIELSEN, 2003; FRISVAD <i>et al</i> , 2004
<i>Aspergillus</i> sp.	DONG <i>et al</i> , 2010
<i>A. auricomus</i>	FRISVAD <i>et al</i> , 2004
<i>A. bridgeri</i>	FRISVAD <i>et al</i> , 2004
<i>A. cretensis</i>	FRISVAD <i>et al</i> , 2004
<i>A. flocculosus</i>	FRISVAD <i>et al</i> , 2004
<i>A. insulicola</i>	FRISVAD <i>et al</i> , 2004
<i>A. neobridgeri</i>	FRISVAD <i>et al</i> , 2004
<i>A. ostianus</i>	FRISVAD <i>et al</i> , 2004
<i>A. persii</i>	FRISVAD <i>et al</i> , 2004
<i>A. petrakii</i>	FRISVAD <i>et al</i> , 2004
<i>A. pseudoelegans</i>	FRISVAD <i>et al</i> , 2004
<i>A. roseoglobulosus</i>	FRISVAD <i>et al</i> , 2004
<i>A. sulphureus</i>	FRISVAD <i>et al</i> , 2004
<i>Neopetromyces muricatus</i>	FRISVAD <i>et al</i> , 2004
<i>Malbranchea aurantiaca</i>	MARTINEZ-LUIS <i>et al</i> , 2005
<i>Lachnum papyraceum</i>	SHAN <i>et al</i> , 1996

Como pode ser observado através da análise dos dados apresentados na Tabela 12, das 41 espécies descritas como produtora de AP, 51% e 42% são dos gêneros *Penicillium* e *Aspergillus*, respectivamente. Somente as espécies *Neopetromyces muricatus*, *Malbranchea aurantiaca* e *Lachnum papyraceum* aparecem como não sendo desses dois gêneros.

Do ponto de vista biológico, o ácido penicílico é tóxico, com dose letal de 7,0 mg/Kg em ratos. Além disso, também apresentou atividade carcinogênica em porcos (DICKENS & JONES, 1961). Quando administrado em conjunto com ocratoxina A (OTA) na dieta de porcos, provoca um aumento do efeito nefrotóxico da OTA (STOEVE *et al*, 2001).

O ácido penicílico apresenta atividade antibiótica contra as bactérias gram-positivas *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Listeria monocytogenes* ATCC 15313 e *Bacillus cereus* ATCC 1177 e gram-negativas *Salmonella typhimurium* ATCC 14028, *Escherichia coli* ATCC 25922 e *Citrobacter freundii* ATCC 8090 (SCHURMANN, SALLUM & TAKAHARA, 2010). A atividade antibiótica de AP está associada à inibição do sistema *quorum sensin* (QS), que é um canal complexo regulatório que governa a expressão de uma série de fatores de virulência bacteriana, tal como, a formação de biofilmes diminuindo a capacidade de remoção pelo sistema imune inato (ESCAICH, 2008). Mais especificamente, AP é um inativador irreversível da enzima GDP-manose desidrogenase, responsável pela síntese de alginato para os biofilmes (KIMMEL & TIPTON, 2005).

Esse metabólito secundário revelou atividade inibitória da enzima acetilcolinesterase (SCHURMANN, SALLUM & TAKAHARA, 2010), atividade herbicida contra varias ervas daninhas e atividade antifúngica contra espécies de *Phytophthora* (KANG *et al*, 2007).

A literatura relata a atividade citotóxica de ácido penicílico sobre vários tipos de células. Suzuki e colaboradores descreveram o efeito citotóxico de AP em células HeLa e sugeriu que esta micotoxina inibe a divisão do núcleo, sem afetar a síntese de DNA. Os mesmos autores também demonstraram a atividade antitumoral de AP contra células Ehrlich e Leucemica SN-36 ascite carcinomas em ratos (SUZUKI *et al*, 1971).

Komagata e colaboradores demonstraram a toxicidade desta micotoxina em células PC12 feocromocitoma, um modelo útil para o estudo da diferenciação neuronal adrenérgica (KOMAGATA *et al*, 1996). He e colaboradores investigaram a citotoxicidade de AP frente a quatro linhagens de células humanas de câncer [NCI-H460 (grandes células de pulmão), MCF-7 (mama), SF-268 (glioma CNS), MIA Pa Ca-



2 ( pancreático)] e algumas células de fibroblastos humanos normais primárias (WI-38), demonstrando que AP é seletivamente citotóxica contra grandes células de pulmão e linhagens de células de câncer de pâncreas (HE *et al*, 2004).

Bando e colaboradores demonstraram que o ácido penicílico inibe a apoptose Fas ligante induzida (BANDO *et al*, 2003), e mais recentemente, o efeito de AP a proliferação de células PHA-estimulada PBM humana foi demonstrada por Stoev e colaboradores (STOEV *et al*, 2009).

Essa micotoxina é bastante encontrada em frutas e grãos, porém há na literatura vários trabalhos sobre isolamento sob condições de fermentação, sendo os principais meios de cultivo: batata-dextrose (BD), extrato de levedura-sucrose (ELS) e czapek-dox (KANG *et al*, 2007).

## 2.3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

### 2.3.1 Isolamento dos fungos

O isolamento de fungos associados à ascídia *E. vancouverensis* foi realizado através do emprego da técnica de *Spread Plate* (Item 2.4.6.1, Pág 123), em meio BDA (batata-dextrose-agar) e um total de onze cepas (EV1 – EV11) foram isoladas desse organismo marinho (Figura 47). Embora EV9, EV10 e EV11 apresentassem algumas similaridades morfológicas, estes foram considerados isolados diferentes e todos cultivados para estudo da atividade citotóxica.

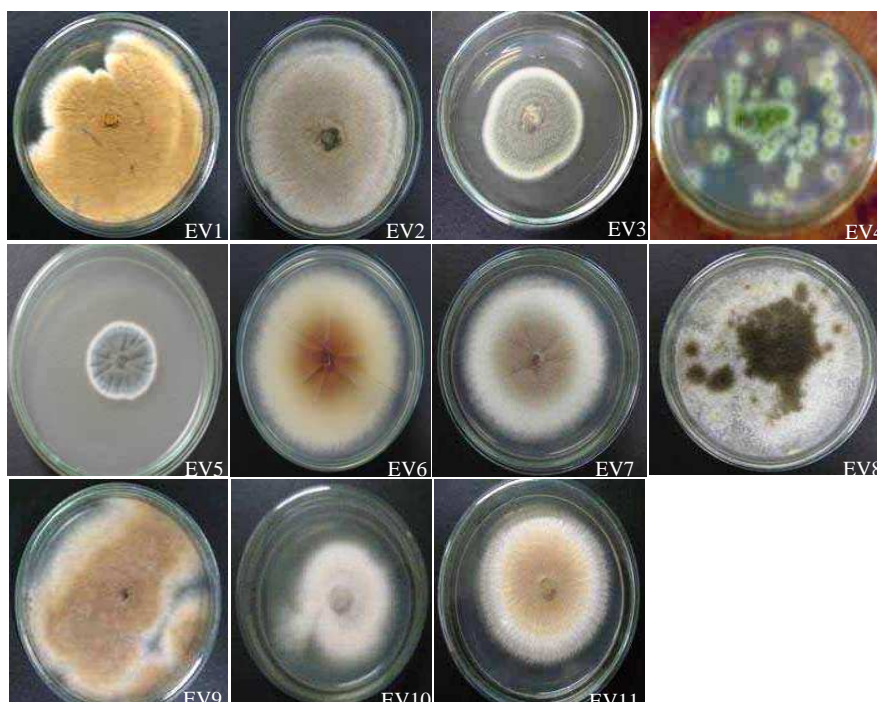


Figura 47 - Fotografia das 11 cepas dos fungos endossimbiontes (EV1-EV11) isolados da ascídia *E. vancouverensis*

### 2.3.2 Estudo da atividade citotóxica dos extratos dos isolados EV1 – EV11

Os isolados EV1 – EV11 foram cultivados em pequena escala (3 Erlenmeyer de 250 mL) durante 21 dias em meio BD (batata-dextrose). Após separação por filtração, o micélio e o meio líquido foram extraídos com solventes orgânicos, gerando os respectivos extratos (Tabela 13).

Tabela 13 – Massas dos extratos do micélio e meio líquido após cultivo em pequena escala.

<b>FUNGO</b>	<b>Extrato MeOH micélio (mg)</b>	<b>Extrato AcOEt meio líquido (mg)</b>
<b>EV1</b>	650,0	85,1
<b>EV2</b>	195,0	11,5
<b>EV3</b>	900,0	11,9
<b>EV4</b>	415,0	13,6
<b>EV5</b>	602,0	223,4
<b>EV6</b>	663,0	49,2
<b>EV7</b>	603,0	9,6
<b>EV8</b>	909,0	22,1
<b>EV9</b>	783,0	19,8
<b>EV10</b>	865,0	11,7
<b>EV11</b>	736,0	8,0

Conforme pode ser observado na Tabela 13, em todos os casos, a maior massa foi obtida na extração do micélio. Esse resultado era esperado, uma vez que, normalmente, o micélio apresenta alto teor de ácidos graxos (RUESS *et al*, 2002).

Os extratos foram submetidos à atividade citotóxica frente às linhagens de células tumorais humanas, MDA-MB435 (mama) e HCT-8 (cólon). Os resultados encontram-se na Figura 48, Pág. 100.

A partir dos dados apresentados na Figura 48 é possível observar que dos extratos oriundos do meio líquido, aqueles provenientes dos fungos EV4, EV5, EV6, EV9, EV10 e EV11 apresentaram os maiores percentuais de inibição das linhagens de células tumorais testadas. Vale ressaltar que os extratos oriundos do micélio dos fungos EV9, EV10 e EV11 também apresentaram resultados significativos frente às mesmas células tumorais.

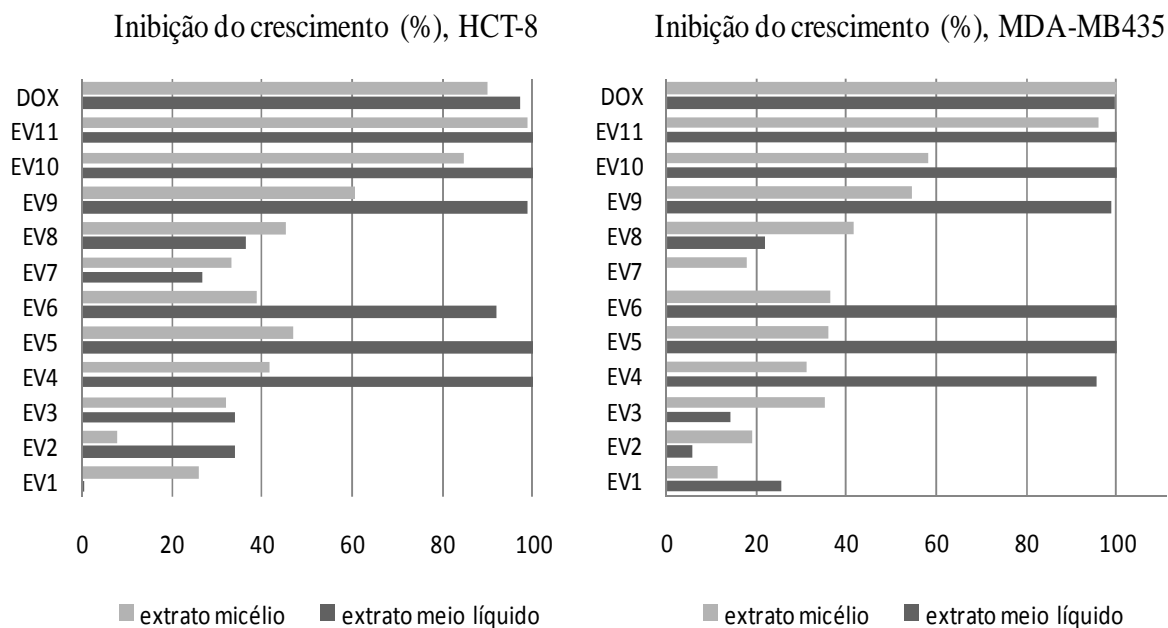


Figura 48 - Percentual de inibição do crescimento celular (IC%) das amostras em duas linhagens tumorais testadas na dose única de 50 µg/mL. Valores são média ± DPM.

Posteriormente, pequenas alíquotas dos extratos que se apresentaram ativos foram dissolvidos em acetonitrila e submetidos à partição líquido-líquido, utilizando-se hexano como solvente. Esse processo gerou duas frações oriundas do meio líquido e duas oriundas do micélio. As massas das frações encontram-se na Tabela 14, sendo possível observar que as maiores massas foram encontradas nas frações hexano.

Tabela 14- Massas dos extratos (mg) do micélio e meio líquido após desengorduramento

Fungo	Fração meio líquido (fração CH <sub>3</sub> CN)	Fração meio líquido (fração hexano)	Fração micélio (fração CH <sub>3</sub> CN)	Fração micélio (fração hexano)
EV4	6,3	1,3	-	-
EV5	10,6	2,6	-	-
EV6	6,1	1,6	6,7	2,1
EV9	5,3	2,0	10,4	3,0
EV10	3,6	1,0	6,0	2,2
EV11	5,4	2,4	7,7	2,5

Todas as frações foram novamente bioensaiadas frente às linhagens de células tumorais humanas MDA-MB435 (mama), HCT-8 (cólon), e os resultados encontram-se dispostos na Figura 49.

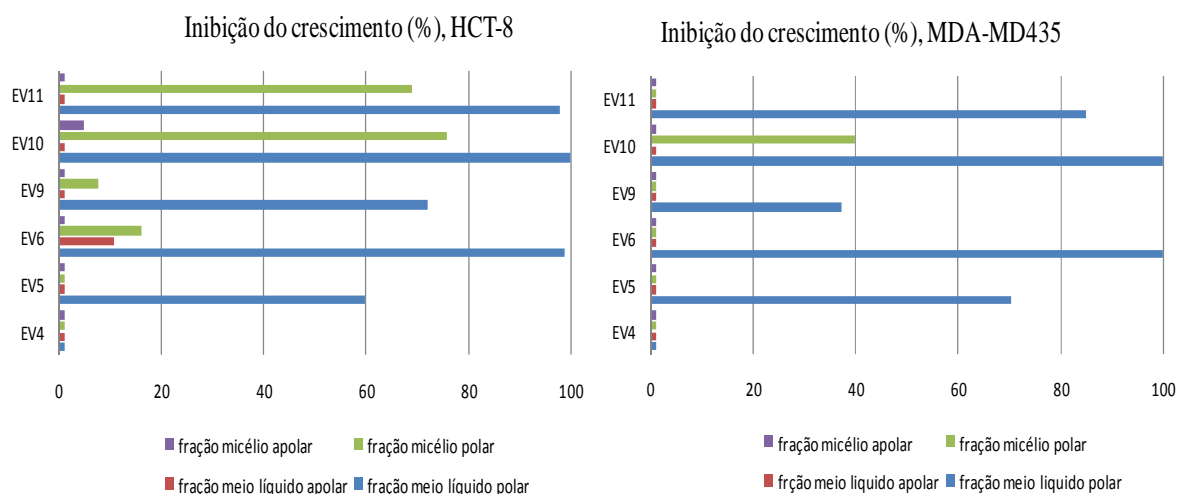


Figura 49 - Percentual de inibição do crescimento celular (IC%) das amostras em duas linhagens tumorais testadas na dose única de 50 µg/mL.

Os dados apresentados na Figura 49 mostram que as substâncias ativas encontram-se nas frações polares, principalmente nas frações oriundas do meio líquido. Dentre as frações oriundas do micélio, a fração polar se destacou como única fração ativa. Nenhuma das frações testadas do fungo EV4 apresentou atividade.

Apenas as frações polares do meio líquido dos fungos EV5, EV6 e EV9 apresentaram atividade significativa. As frações polares do meio líquido e do micélio dos fungos EV10 e EV11 apresentaram-se ativas frente as célula HCT-8. Frente a célula MDA-MD435 apenas a fração polar do meio líquido mostrou-se ativa. Em virtude desses resultados, os fungos EV10 e EV11 foram selecionados para estudo visando o isolamento bioguiado dos metabólitos secundários bioativos.

### 2.3.3 Identificação molecular de EV-10 e EV-11

Os isolados EV-10 e EV-11 foram submetidos à identificação taxonômica molecular, a qual revelou que os dois isolados apresentam sequências da região ITS similar e formam um agrupamento na árvore filogenética suportado por um valor de 96% de homologia com *Aspergillus* sp.

Esse resultado corrobora com a observação discutida anteriormente (Item 2.3.1, Pág. 98), sobre a similaridade morfológica entre EV10 e EV11.

Em função desse resultado, EV10 foi selecionado para cultivo em grande escala e fracionamento bioguiado dos extratos ativos.

### 2.3.4 Estudo químico bioguiado de *Aspergillus* sp. (EV10)

O fungo EV10 foi cultivado em grande escala nas mesmas condições empregadas para o cultivo em pequena escala (Item 2.4.6.3.3, Pág 125). Desse cultivo, foram obtidos as frações EV10MP 450 mg (fração polar) e EV10MAp (fração apolar) oriundas do micélio, e as frações EV10LP 4,80 g (fração polar) e EV10LAp (fração apolar), oriundas do meio líquido. As frações apolares EV10MAp e EV10LAp foram descartadas com base nos resultados preliminares de atividade citotóxica dos extratos.

#### 2.3.4.1 Fracionamento cromatográfico de EV10LP

A fração EV10LP (450,0 mg) foi solubilizada em metanol e submetida à cromatografia de exclusão em Sephadex LH-20 (camada de 45,0 cm em um funil cilíndrico de 2,0 cm de diâmetro externo) utilizando-se metanol como eluente.

Foram obtidas 50 frações de 2 mL, que após análise em CCD foram agrupadas em cinco subfrações EV10LP-F1 (37,6 mg; 8,4%) , EV10LP-F2 (120,0 mg; 26,7%), EV10LP-F3 (80,3 mg; 17,8%), EV10LP-F4 (25,4 mg; 5,6%) e EV10LP-F5 (14,2 mg; 3,2%). As frações foram testadas quanto a sua citotoxicidade *in vitro* contra células tumorais, cujos resultados (percentual de inibição do crescimento (IC%)) encontram-se apresentados na Figura 50.

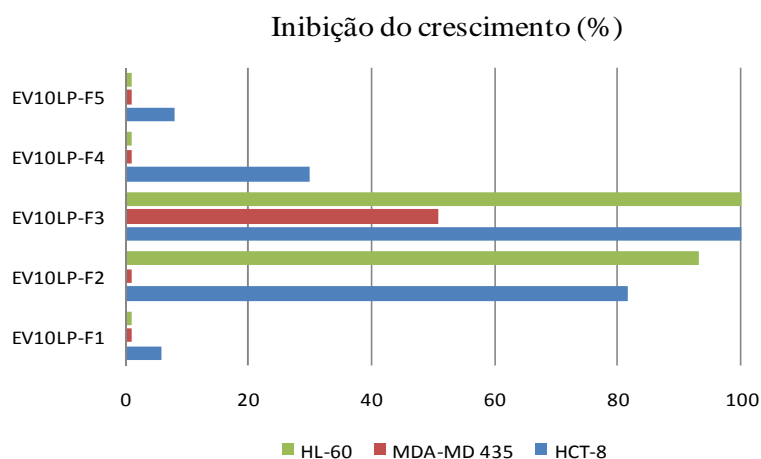


Figura 50 - Percentual de inibição do crescimento (IC%) (50µg/mL) das frações EV10LP-F1 a EV10LP-F5.

Das frações testadas, apenas EV10LP-F2 e EV10LP-F3 apresentaram atividade citotóxica, sendo que EV10LP-F2 apresentou atividade contra HL-60 e HCT8, enquanto EV10LP-F3 apresentou-se ativo contra todas as linhagens de células testadas (HL-60, HCT-8 e MDA-MB435). Com base neses resultados, as duas frações foram selecionadas para o isolamento dos compostos bioativos.

#### 2.3.4.2 Fracionamento cromatográfico de EV10LP-F2

EV10LP-F2 (120,0 mg) foi submetida a fracionamento cromatográfico em gel de sílica (camada de 22,00 cm em um funil cilíndrico de 2,0 cm de diâmetro externo) e eluída com a mistura acetato de etila:hexano (30:70), resultando em 35 frações de 2 mL, que após análise em CCD foram agrupadas para gerar as subfrações EV10LP-F2-1 (7,1 mg; 5,9%), EV10LP-F2-2 (40,4 mg; 33,7%) e EV10LP-F2.3 (18,3 mg; 15,3%). As frações foram testadas quanto a sua citotoxicidade *in vitro* contra células tumorais, cujos resultados (percentual de inibição do crescimento (IC%)) encontram-se apresentados na Figura 51.

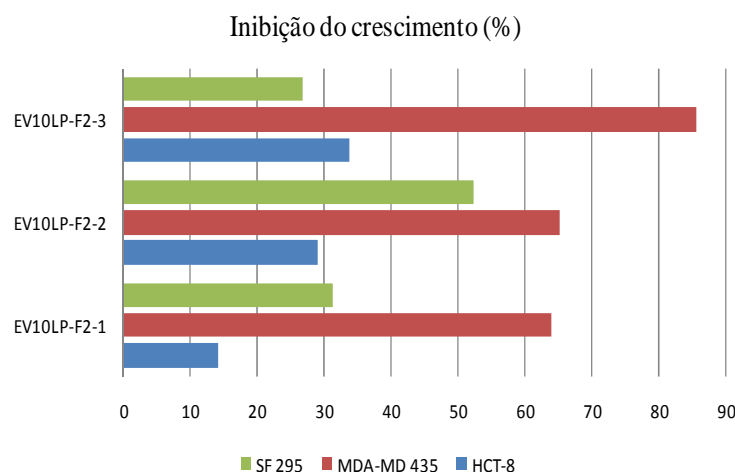


Figura 51 - Percentual de inibição do crescimento (IC%) (50µg/mL) das frações EV10LP-F2.1 a EV10LP-F2.3

A subfração EV10LP-F2.1 apresentou-se como um sólido amorfo de cor branca, o qual foi chamado de **EV10S1** e identificado como sendo a isocumarina meleína (Item 2.3.5.1, Pág. 107).

#### 2.3.4.2.1 Fracionamento cromatográfico de EV10LP-F2.2

A subfração EV10LP-F2.2 (40,4 mg) foi submetida a fracionamento cromatográfico por CLAE (coluna de phenomenex, luna 5u sílica (2) e fluxo de 4,7 mL/min) utilizando a mistura acetato de etila:hexano (40:60) como eluente. Este processo levou ao isolamento de duas substâncias em forma de cristais, as quais foram denominadas **EV10S2** (6,8 mg, 17%), identificada como sendo a isocumarina *cis*-4-hidroximeleína (Item 2.3.5.2, Pág. 100), e **EV10S3** (11 mg, 27%), identificada como sendo a isocumarina *trans*-4-hidroximeleína (Item 2.3.5.3, Pág. 104).

#### 2.3.4.3 Fracionamento cromatográfico de EV10LP-F3

EV10LP-F3 (80,3 mg) foi submetida ao fracionamento cromatográfico em gel de sílica (camada de 22,00 cm em um funil cilíndrico de 2,0 cm de diâmetro externo). Após eluição com a mistura acetato de etila:hexano (30:70), foram obtidas 40 frações de 2 mL, que após análise em CCD foram agrupadas para gerar as subfrações EV10LP-F3.1 (3,3 mg; 4,1%) e EV10LP-F3.2 (22,0 mg; 27,4%). As frações foram testadas quanto a sua citotoxicidade *in vitro* contra células tumorais e os resultados (percentual de inibição do crescimento (IC%)) encontram-se apresentados na Figura 52.



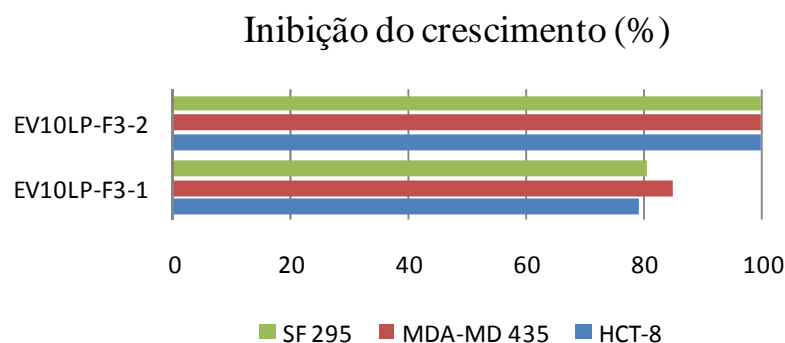


Figura 52 - Percentual de inibição do crescimento (IC%) (50g/mL) das frações EV10LP-F3-1 a EV10LP-F3-2.

Com base nesses resultados de atividade citotóxica, a subfração EV10LP-F3.2 foi refractionada por CLAE (coluna phenomenex, luna 5u sílica (2) e fluxo de 4,7 mL/min), utilizando a mistura acetato de etila:hexano (50:50) como eluente, fornecendo uma substância pura em forma de cristais amarelos, **EV10S4** (8,3 mg, 38%), identificada como sendo o ácido penicílico (Item 2.3.5.4, Pág. 107).

#### 2.3.4.4 Atividade citotóxica dos compostos isolados

Todas as substâncias isoladas foram testadas quanto a sua citotoxicidade *in vitro* contra células tumorais e os resultados (Percentual de inibição do crescimento (IC%)) encontram-se apresentados na Figura 53.

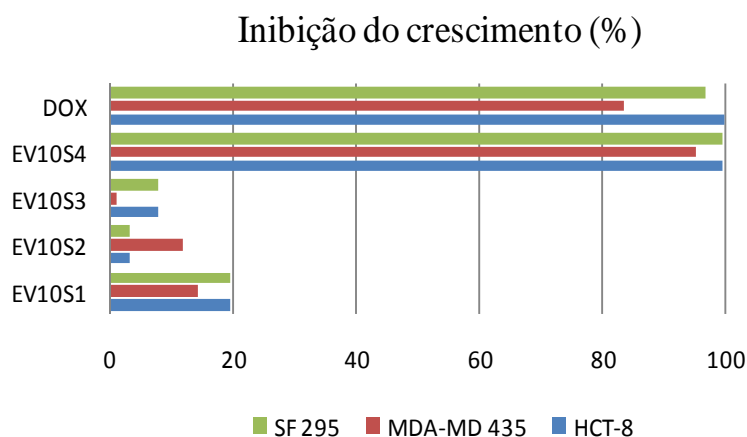


Figura 53 - Percentual de inibição do crescimento (IC%) (50µg/mL) das substâncias EV10S1 (meleína), EV10S2 (*cis*-4-hidroximeleína), EV10S3 (*trans*-4-hidroximeleína), EV10S4 (Ac. penicílico).

Como pode ser observado, dentre as substâncias testadas, somente o ácido penicílico (**EV10S4**) apresentou atividade citotóxica. Esses resultados sugeriram que o ácido penicílico é o metabólito secundário responsável pela atividade citotóxica observada nos extratos e frações de EV10.

Como já mencionado (Item 2.2.2, pág. 93) a atividade citotóxica dessa micotoxina já é descrita na literatura (SUZUKI *et al*, 1971; KOMAGATA *et al*, 1996; HE *et al*, 2004; BANDO *et al*, 2003; STOEV *et al*, 2009), entretanto, contra células tumorais diferentes daquelas investigadas neste trabalho.

## 2.3.5 Determinação estrutural dos compostos isolados

### 2.3.5.1 Determinação estrutural de **EV10S1**

O espectro de **EV10S1** na região do IV (Figura 55, Pág. 108) apresentou, além de outras absorções, estiramento da ligação (C-OH) em  $\nu$  3399, estiramentos da ligação  $C_{sp^3}$ -H em  $\nu$  2919 e 2852  $cm^{-1}$ , estiramentos C=C em  $\nu$  1618 e 1464  $cm^{-1}$ . A banda em  $\nu$  1117  $cm^{-1}$  foi atribuída a estiramento C-O. O estiramento em  $\nu$  1674  $cm^{-1}$  foi associado a estiramento C=O de éster conjugado. O espectro de RMN  $^1H$  (Figura 56, Pág. 109) de **EV10S1** mostrou sinais em  $\delta$  6,70 (d,  $J = 10,0$  Hz, 1H);  $\delta$  6,90 (d,  $J = 10,0$  Hz, 1H) e  $\delta$  7,42 (m, 1H), característicos de hidrogênios ligados a carbonos  $sp^2$  de anel aromático. Foi observado sinal em  $\delta$  4,74 (m, 1H), associado a hidrogênio ligado a carbono oxigenado. O sinal em  $\delta$  1,54 (d,  $J = 6,5$  Hz, 3H) foi atribuído a uma metila e aquele em  $\delta$  11,04 (s, 1H) foi atribuído ao hidrogênio hidroxílico, estando este último com deslocamento de hidroxila quelada. O espectro de RMN  $^{13}C$  - BB (Figura 57, Pág. 109) de **EV10S1** apresentou dez linhas espectrais, entre os quais uma de grupo metila ( $\delta$  20,9), uma de carbonila conjugada quelada de éster ( $\delta$  170,1), uma de carbono  $sp^3$  ( $\delta$  34,4), uma de carbono  $sp^3$  oxigenado ( $\delta$  76,3) e seis de carbonos  $sp^2$  ( $\delta$  108,5 -  $\delta$  170,1).

A análise dos dados espectrométricos e comparação com dados da literatura (Tabela 15) permitiram sugerir para **EV10S1** a estrutura de uma isocumarina substituída na posição C-3 por um grupo metila, chamada meleína (Figura 54) (DIMITRIADIS, GILL & HARTE, 1997).

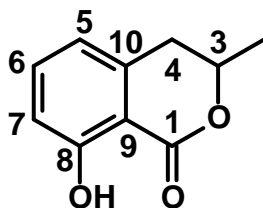


Figura 54 - Estrutura da isocumarina meleína

Tabela 15 - Dados de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$   $\delta$  de EV10S1 e comparação com dados descritos na literatura.

C	RMN $^1\text{H}$		RMN $^{13}\text{C}$	
	EV10S1 <sup>a</sup>	Lit. <sup>b</sup>	EV10S1 <sup>c</sup>	Lit. <sup>d</sup>
1			170,2	169,9
3	4,74 (m, 1H)	4,73 (m, 1H)	76,3	76,1
4	2,94 (d, $J = 10,0$ Hz, 2H)	2,93 (d, $J = 7,5$ Hz, 2H)	34,8	34,6
5	6,90 (d, $J = 10,0$ Hz, 1H)	6,89 (d, $J = 8,3$ Hz, 1H)	118,1	117,9
6	7,42 (m, 1H)	7,41 (m, 1H)	136,4	136,1
7	6,70 (d, $J = 10,0$ Hz, 1H)	6,69 (d, $J = 7,3$ Hz, 1H)	116,5	116,2
8			162,4	162,1
9			108,5	108,2
10			139,6	139,3
-CH <sub>3</sub>	1,54 (d, $J = 5,0$ Hz, 3H)	1,53 (d, $J = 6,3$ Hz, 3H)	20,9	20,8
8-OH	11,0 (s, 1H)	11,0 (s, 1H)		

(a) 500 MHz, CDCl<sub>3</sub> (b) 300 MHz, CDCl<sub>3</sub> (DIMITRIADIS, GILL & HARTE, 1997)  
(c) 125 MHz, CDCl<sub>3</sub> (d) 75 MHz, CDCl<sub>3</sub> (DIMITRIADIS, GILL & HARTE, 1997)

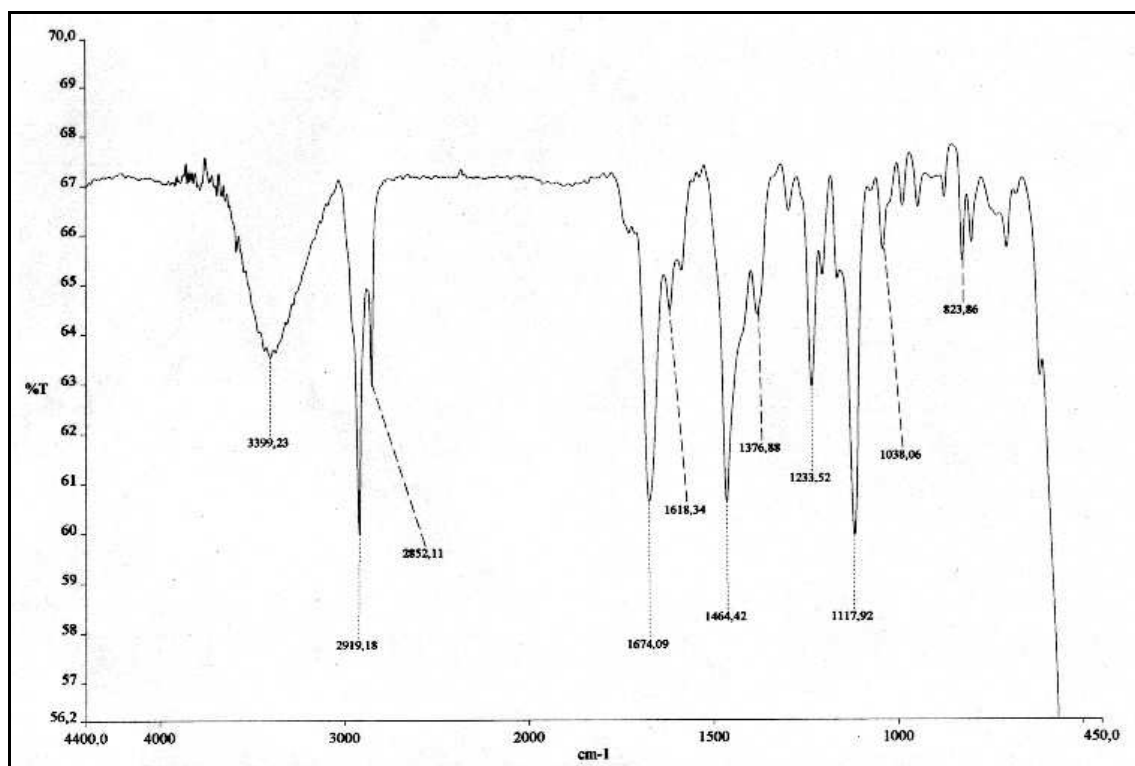


Figura 55 - Espectro de Infra-vermelho da meleína.

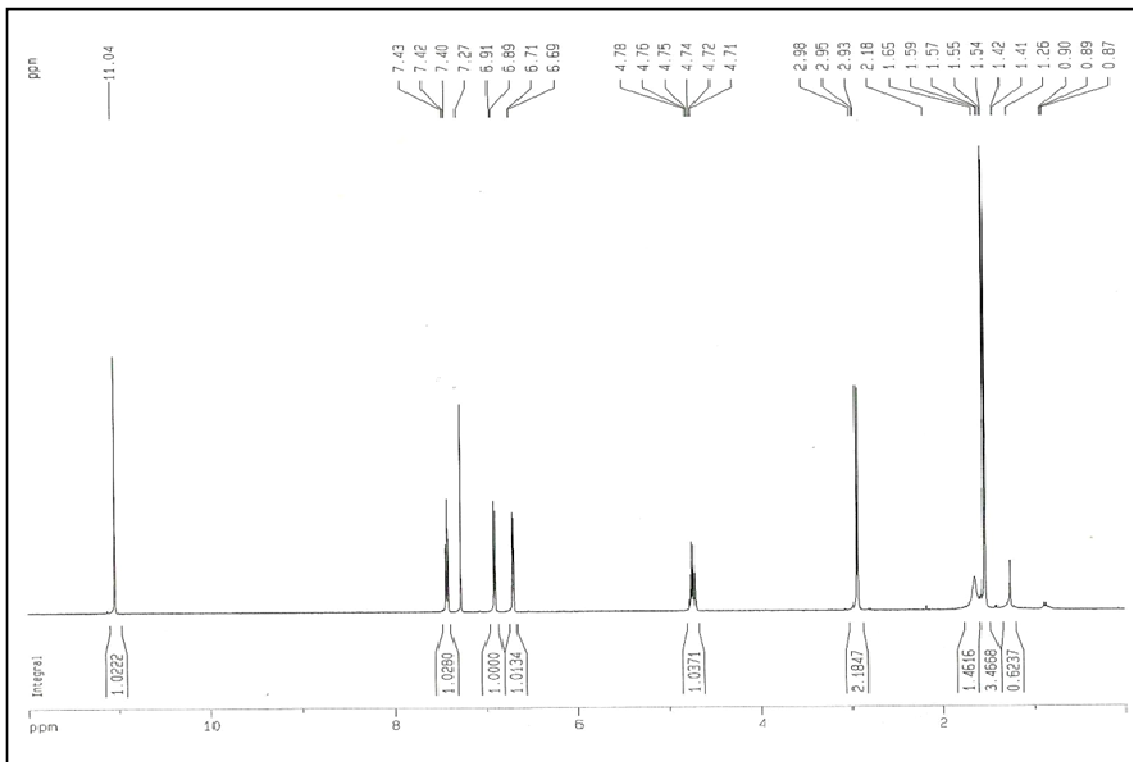


Figura 56 - Espectro de RMN  $^1\text{H}$  500 MHz em  $\text{CDCl}_3$  da meleína

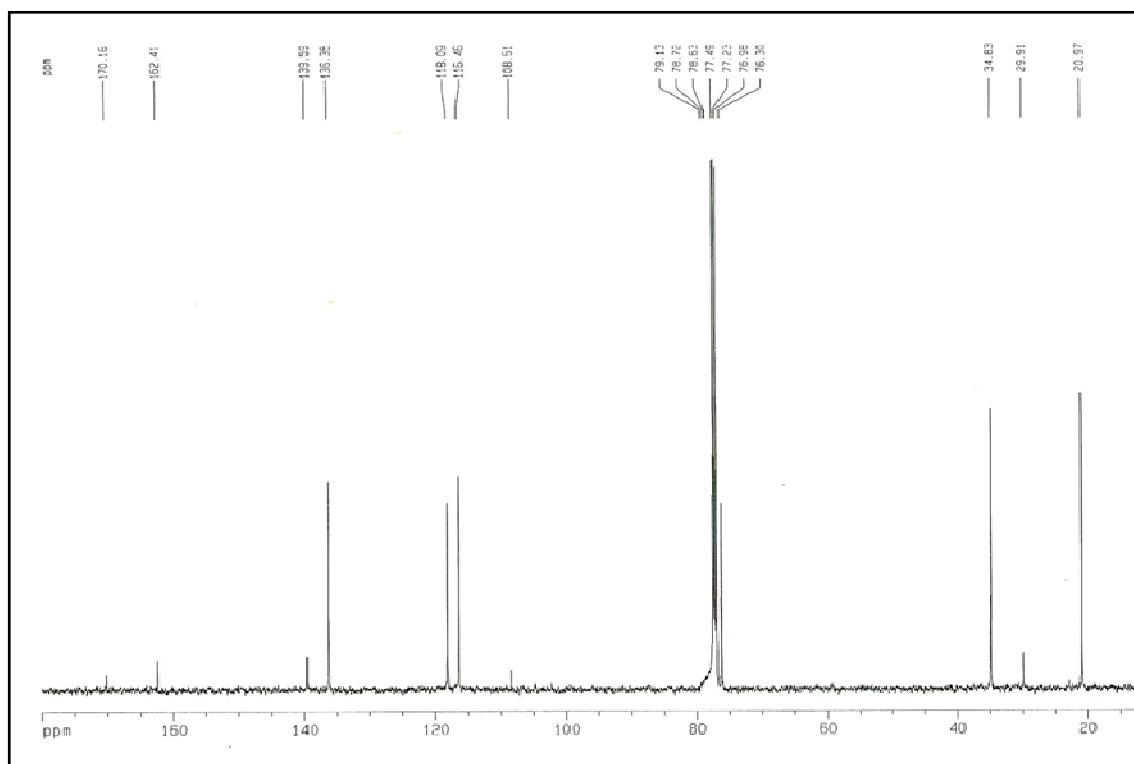


Figura 57 - Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  125 MHz em  $\text{CDCl}_3$  da meleína

### 2.3.5.2 Determinação Estrutural de **EV10S2**

O espectro de **EV10S2** na região do IV (Figura 59, Pág. 111) apresentou, além de outras absorções, estiramento de ligação O-H em  $\nu$  3402  $\text{cm}^{-1}$ , estiramento de ligação  $\text{C}_{\text{sp}^3}\text{-H}$  em  $\nu$  2939  $\text{cm}^{-1}$  e estiramento  $\text{C}=\text{C}$  aromático em  $\nu$  1487  $\text{cm}^{-1}$ . A banda em  $\nu$  1051  $\text{cm}^{-1}$  foi atribuída a estiramento C-O. O estiramento em  $\nu$  1654  $\text{cm}^{-1}$  foi associado a estiramento  $\text{C}=\text{O}$  de éster conjugado (PAVIA; LAMPMAN; KRIZ, 1996). O espectro de RMN  $^1\text{H}$  (Figura 60, Pág. 112) de **EV10S2** mostrou sinais em  $\delta$  7,54 (d,  $J = 8,5$ ; 7,3 Hz, 1H);  $\delta$  7,04 (d,  $J = 8,5$  Hz, 1H) e  $\delta$  6,93 (d,  $J = 8,5$  Hz, 1H), característicos de hidrogênios de anel aromático. Foram observados sinais em  $\delta$  4,70 (qd,  $J = 6,5$  e 1,0 Hz, 1H) e  $\delta$  4,60 (d,  $J = 2,0$  Hz, 1H), associados aos hidrogênios ligados aos carbonos  $\text{sp}^3$  oxigenados. O valor da constante de acoplamento de 2,0 Hz calculada para os sinais em  $\delta$  4,71 e  $\delta$  4,59 mostra relação *cis* entre os mesmos. O sinal em  $\delta$  1,60 (d,  $J = 6,5$  Hz, 3H) foi atribuído a uma metila e aquele em  $\delta$  11,0 (s, 1H) a hidrogênio hidroxílico, estando este último com deslocamento de hidroxila quelada. O espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  - BB (Figura 61, Pág. 112) de **EV10S2** apresentou dez linhas espectrais, das quais uma de grupo metila ( $\delta$  16,3), uma de carbonila conjugada quelada de éster ( $\delta$  169,4), duas de carbonos  $\text{sp}^3$  oxigenados ( $\delta$  67,5 e  $\delta$  78,4) e seis de carbonos  $\text{sp}^2$  ( $\delta$  107,1 -  $\delta$  162,3). Com os dados obtidos por RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  pode-se sugerir a fórmula molecular  $\text{C}_{10}\text{H}_{10}\text{O}_4$ , a qual está de acordo com o pico referente à molécula protonada ( $[\text{M} + \text{H}]^+$ ) em  $m/z$  195 Daltons obtido por espectrometria de massa com ionização por *electrospray* no modo positivo (Figura 62, Pág. 113). A análise dos dados espectrométricos permitiu sugerir para **EV10S2** a estrutura de uma isocumarina substituída nas posições C-3 e C-8 por grupos hidroxila e em C-3 por uma metila (Figura 58). Essa isocumarina, denominada *cis*-4-hidroximeleína, foi isolada de vários fungos (COLE *et al.*, 1971; CAMARDA; MERLINI; NASINI, 1976; HOLKER, SIMPSON, 1981). A comparação com dados da literatura, descrita na Tabela 16, confirma a estrutura proposta (ASHA *et al.*, 2004).

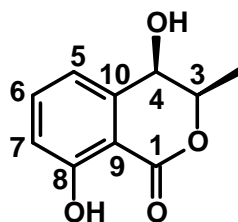


Figura 58 - Estrutura da isocumarina *cis*-4-hidroximeleína

Tabela 16 - Dados de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  de EV10S2 e comparação com dados descritos na literatura

C	RMN $^1\text{H}$		RMN $^{13}\text{C}$	
	EV10S2 <sup>a</sup>	(Lit) <sup>b</sup>	EV10 S2 <sup>c</sup>	(Lit) <sup>d</sup>
1			169,4	162,0
3	4,70 (qd, $J = 6,5; 2,0$ Hz, 1H)	4,67(qd, $J = 6,5; 1,5$ Hz, 1H)	78,4	77,9
4	4,60 (d, $J = 2,0$ Hz, 1H)	4,55 (sl, 1H)	67,5	67,1
5	6,93 (d, $J = 8,5$ Hz, 1H)	6,90 (d, $J = 7,0$ Hz, 1H)	118,8	118,1
6	7,54 (dd, $J = 8,5; 7,3$ Hz, 1H)	7,47 (d, $J = 7,0$ Hz, 1H)	137,3	137,0
7	7,04 (d, $J = 8,5$ Hz, 1H)	7,01 (d, $J = 7,0$ Hz, 1H)	118,5	118,4
8			162,3	162,0
9			107,1	106,9
10			140,7	140,8
3-CH <sub>3</sub>	1,60 (d, $J = 6,5$ Hz, 3H)	1,56 (d, $J = 6,5$ Hz, 3H)	16,3	15,9
4-OH	1,80 (sl, 1H)	3,26 (sl, 1H)		
8-OH	11,0 (s, 1H)	11,0 (s, 1H)		

(a) 500 MHz, CDCl<sub>3</sub> (b) 500 MHz, CDCl<sub>3</sub> (ASHA *et. al.*, (1980)  
(c) 125 MHz, CDCl<sub>3</sub> (d) 125 MHz, CDCl<sub>3</sub> (ASHA *et al.*, 2004)

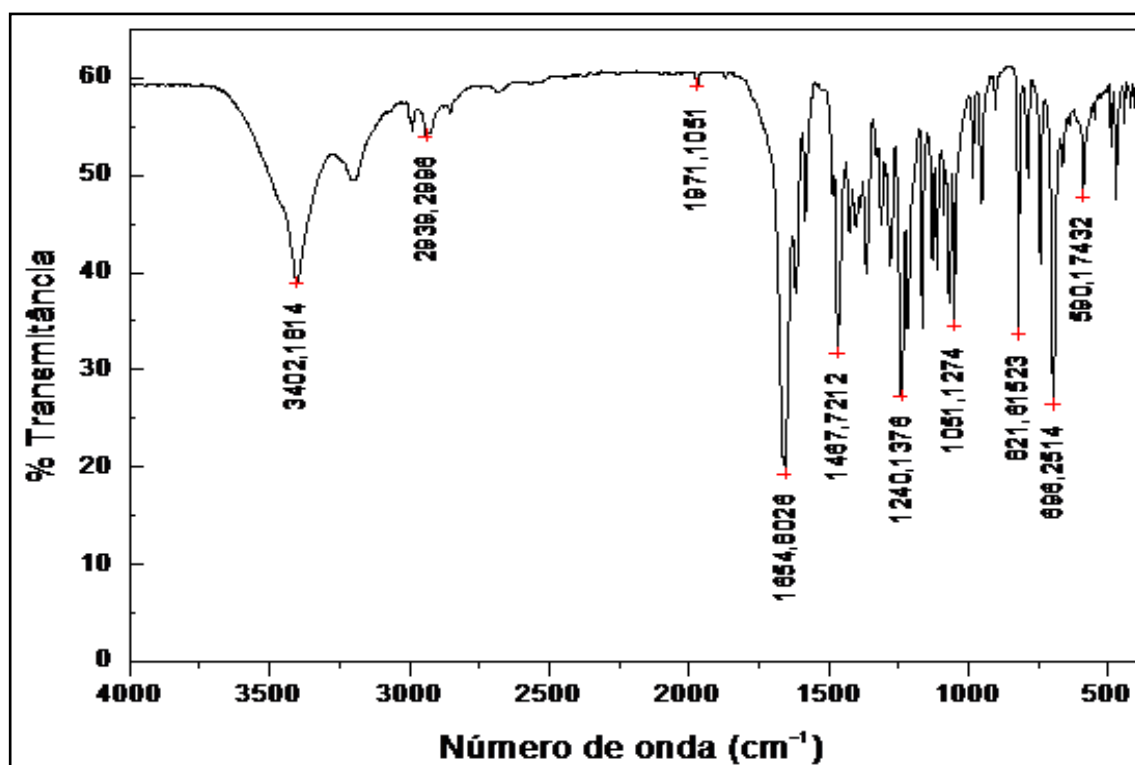


Figura 59 - Espectro de Infra-vermelho da *cis*-4-hidroximeleína

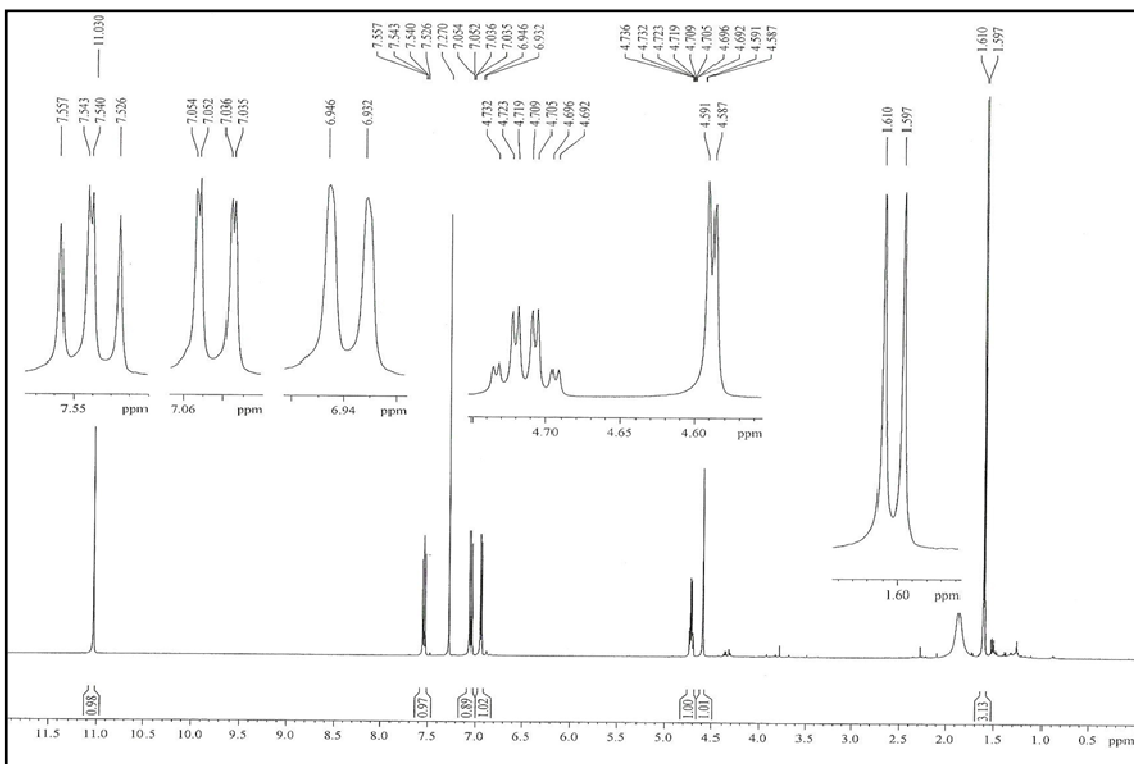


Figura 61 - Espectro de RMN  $^1\text{H}$  500 MHz em  $\text{CDCl}_3$  da *cis*-4-hidroximeleína

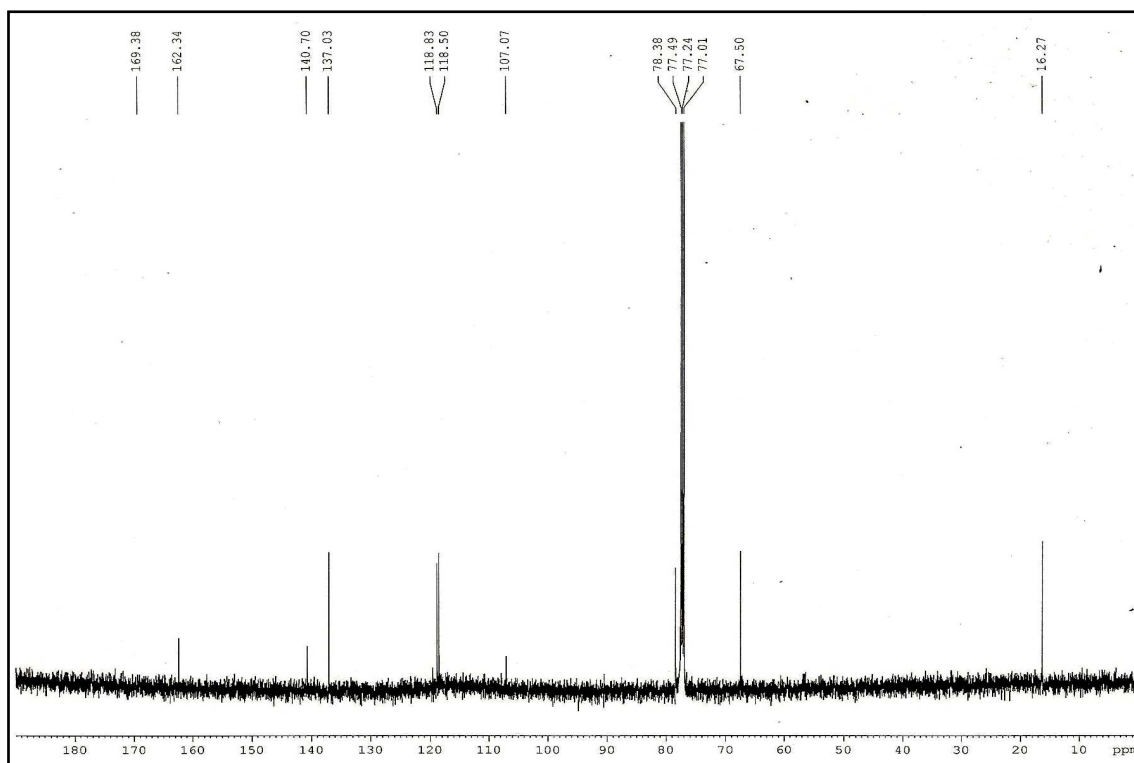


Figura 60 - Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  125 MHz em  $\text{CDCl}_3$  da *cis*-4-hidroximeleína.



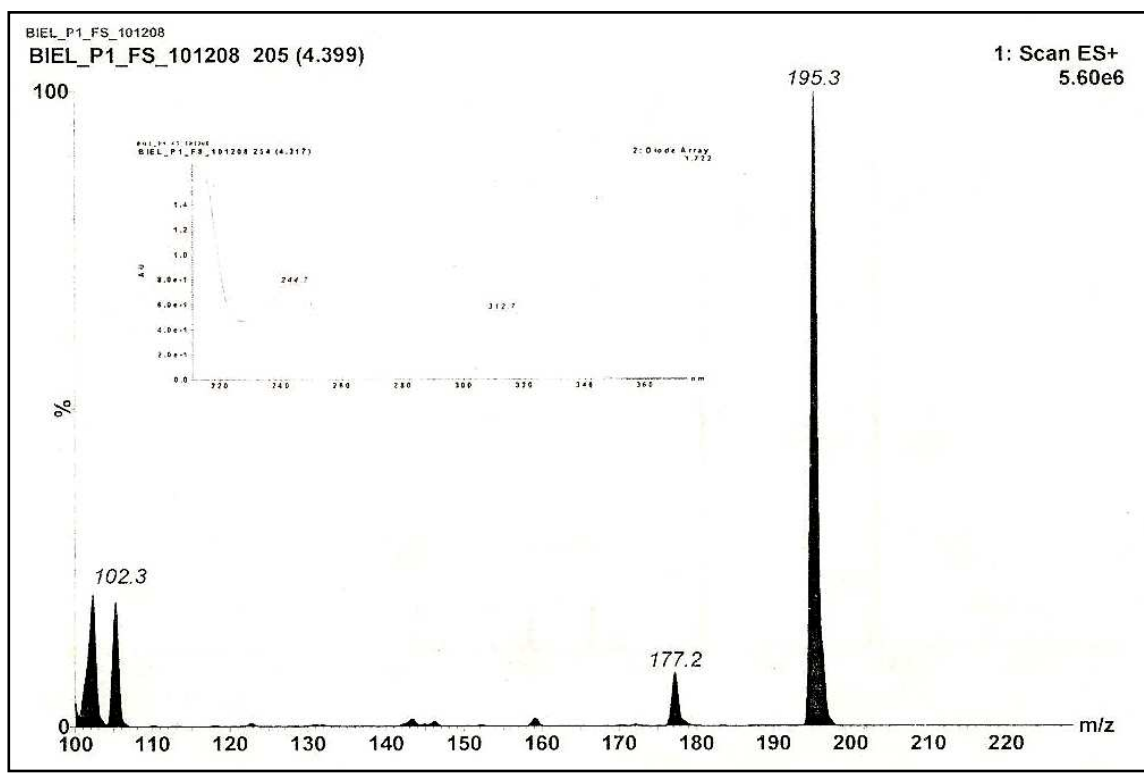


Figura 62 - Espectro de massas de *cis*-4-hidroximeleína.

### 2.3.5.3 Determinação estrutural de **EV10S3**

O espectro de RMN  $^1\text{H}$  (Figura 64, Pág. 115) de **EV10S3** mostrou sinais em  $\delta$  7,55 (t,  $J = 8,0$  Hz, 1H);  $\delta$  7,04 (d,  $J = 8,5$  Hz, 1H) e  $\delta$  7,0 (d,  $J = 8,5$  Hz, 1H) característicos de hidrogênios ligados a carbonos  $\text{sp}^2$  de anel aromático. Foi observado ainda sinal em  $\delta$  4,60 (m, 2H) associado a hidrogênios ligados aos carbonos alifáticos oxigenados.

O sinal em  $\delta$  1,52 (d,  $J = 5,5$  Hz, 3H) foi atribuído a uma metila e aqueles em  $\delta$  1,80 (sl, 1H) e  $\delta$  11,0 (s, 1H) a hidrogênios hidroxílicos, sendo este último quelado. O espectro de RMN  $^1\text{H}$  com desacoplamento homonuclear (Figura 65, Pág. 115) mostrou dois sinais em  $\delta$  4,62 (d,  $J = 11,1$  Hz, 1H) e  $\delta$  4,64 (d,  $J = 11,1$  Hz, 1H) sugerindo uma relação *trans* entre os mesmos.

O espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  - BB (Figura 66, Pág. 116) de **EV10S3** apresentou dez linhas espectrais, das quais uma de grupo metila ( $\delta$  17,9), uma de carbonila conjugada quelada de éster ( $\delta$  168,5), duas de carbonos  $\text{sp}^3$  oxigenados ( $\delta$  69,2 e  $\delta$  79,9) e seis de carbonos  $\text{sp}^2$  ( $\delta$  106,7 -  $\delta$  162,0). Com os dados obtidos por RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  pode-se sugerir a fórmula molecular  $\text{C}_{10}\text{H}_{10}\text{O}_4$ , a qual está de acordo com o pico referente à molécula protonada ( $[\text{M} + \text{H}]^+$ ) em  $m/z$  195 Daltons obtido com ionização por *electrospray* no modo positivo (Figura 67, Pág. 116). A análise dos dados espectrométricos permitiu sugerir para **EV10S3** a estrutura de uma isocumarina substituída nas posições C-4 e C-8 por grupos hidroxila e em C-3 por uma metila (Figura 63), denominada *trans*-4-hidroximeleína (ASHA *et al*, 2004).

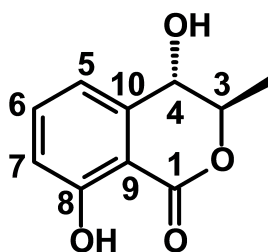


Figura 63 - Estrutura da isocumarina *trans*-4-hidroximeleína

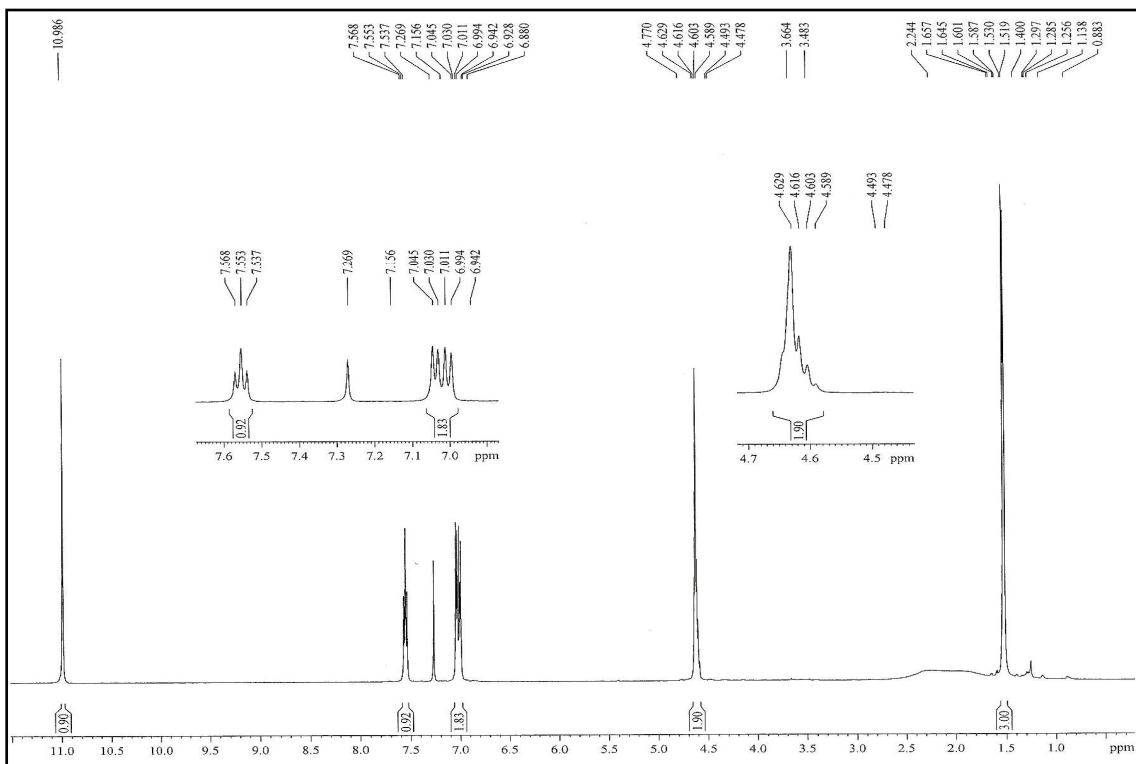


Figura 65 - Espectro de RMN  $^1\text{H}$  500 MHz em  $\text{CDCl}_3$  da *trans*-4-hidroximeleína.

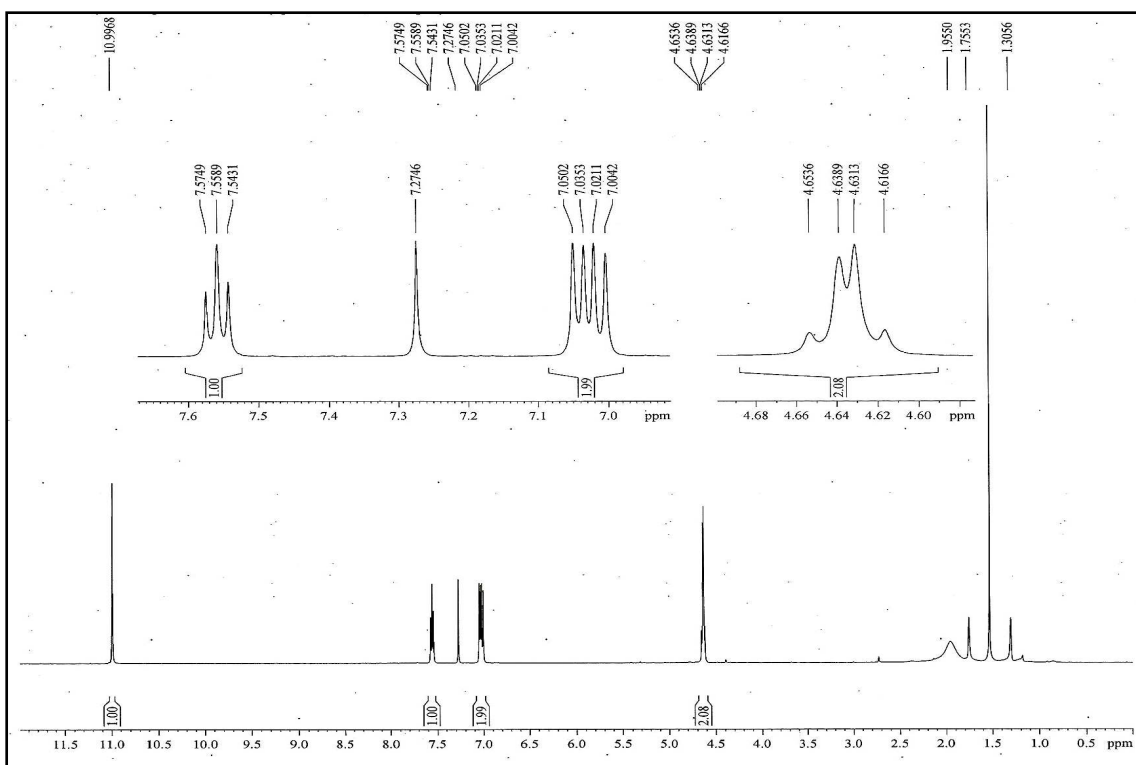


Figura 64 - Espectro de RMN  $^1\text{H}$  com irradiação seletiva 500 MHz em  $\text{CDCl}_3$  da *trans*-4-hidroximeleína

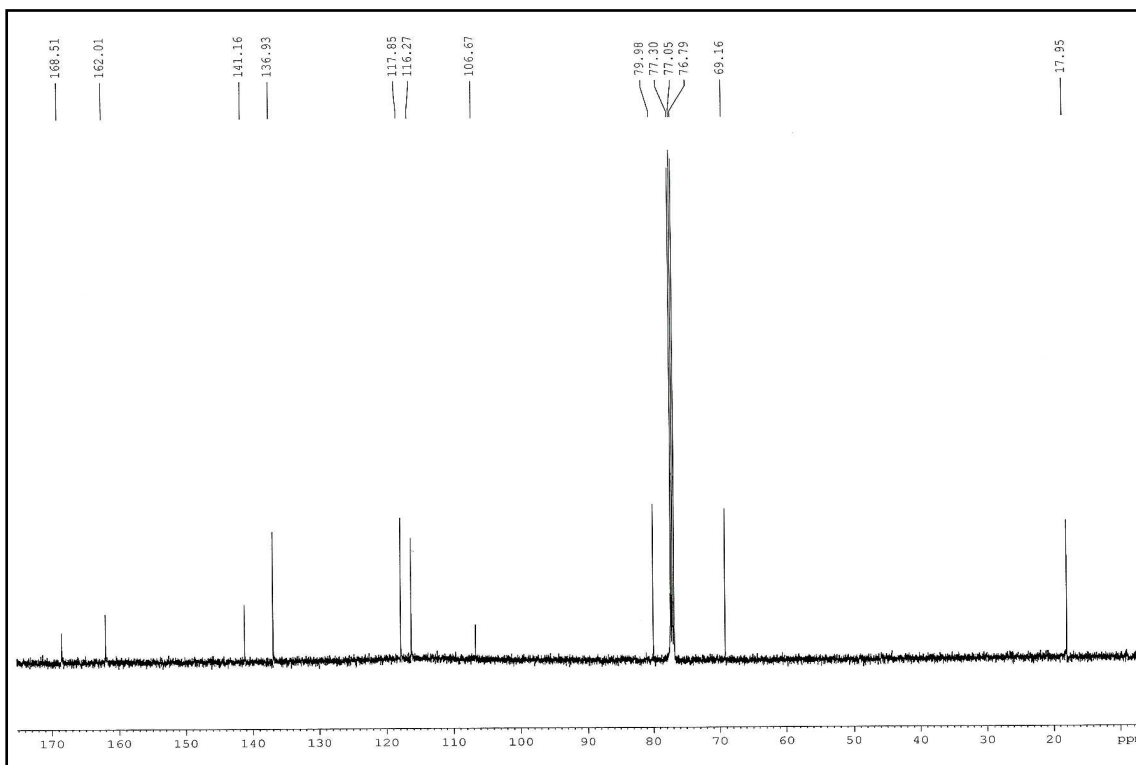


Figura 67 - Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  125 MHz em  $\text{CDCl}_3$  da *trans*-4-hidroxiemeleína.

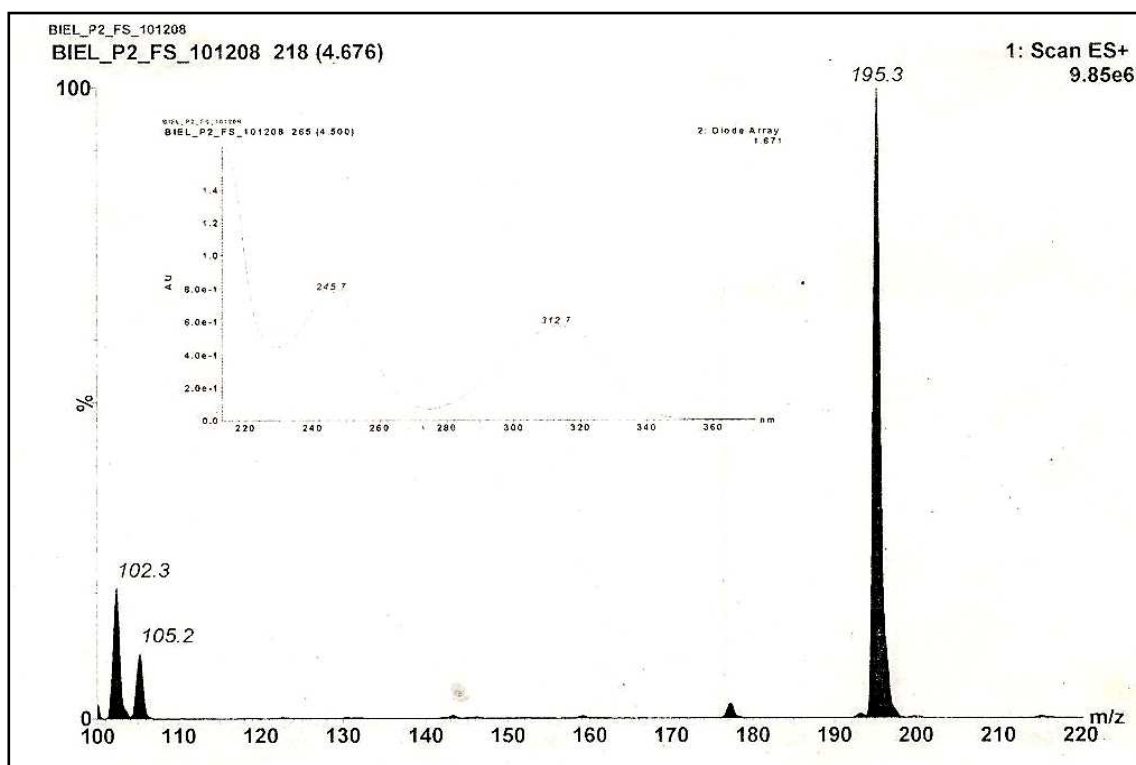


Figura 66 - Espectro de massas de *trans*-4-hidroxiemeleína.

#### 2.3.5.4 Determinação estrutural de **EV10S4**

O espectro de **EV10S4** na região do IV (Figura 69, Pág. 118) apresentou, além de outras absorções, estiramento da ligação O-H em  $\nu$  3114  $\text{cm}^{-1}$ , estiramentos C=C em  $\nu$  1456  $\text{cm}^{-1}$ . A banda em 1632 foi atribuída a estiramento C-O-C de éter vinílico. O estiramento em  $\nu$  1714  $\text{cm}^{-1}$  foi associado a estiramento C=O de lactona conjugada (FUJIOKA, KIMURA & NAKAHARA, 1996).

O espectro de RMN  $^1\text{H}$  (Figura 70, Pág. 119) de **EV10S4** mostrou sinal em  $\delta$  1,75 (s, 3H), associado a uma metila, sinal em  $\delta$  3,91 (s, 3H), característico de hidrogênios ligados a carbono  $\text{sp}^3$  oxigenado, além de sinais em  $\delta$  5,14 (s, 1H);  $\delta$  5,18 (s, 1H) e  $\delta$  5,47 (s, 1H), associados a hidrogênios ligados a carbonos  $\text{sp}^2$ .

O espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  - BB (Figura 71, Pág. 119) de **EV10S4** apresentou oito linhas espectrais, referentes a um grupo metila ( $\delta$  17,5), um grupo metoxila ( $\delta$  60,1). Um carbono  $\text{sp}^2$  ( $\delta$  116,6) característico de dupla terminal e uma carbonila de éster conjugada ( $\delta$  179,7).

O espectro de massas de alta resolução de **EV10S4** obtido com ionização por *electrospray* no modo negativo, exibiu o pico referente à molécula desprotonada ( $[\text{M}-\text{H}]^-$ ) em  $m/z$  169,0532 (Figura 72, Pág. 120). A análise dos dados espectrométricos permitiu sugerir para **EV10S4** a estrutura da micotoxina chamada ácido penicílico (Figura 68), a qual já foi isolada de vários outros fungos do gênero *Aspergillus* (Item 2.2.2, pág. 93). A comparação com dados da literatura, descrita na Tabela 17, confirma a estrutura proposta (KIMURA, NAKAHARA E FUJIOKA, 1996).

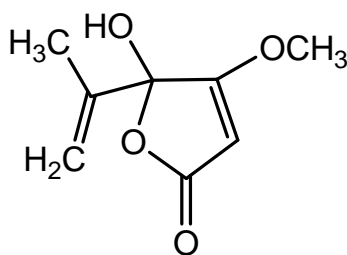


Figura 68 - Estrutura do ácido penicílico

Tabela 17 - Dados de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$   $\delta$  de EV10S4 e comparação com dados descritos na literatura

C	RMN $^1\text{H}$		RMN $^{13}\text{C}$	
	EV10S4 <sup>a</sup>	(Lit) <sup>b</sup>	EV10S4 <sup>c</sup>	(Lit) <sup>d</sup>
1			179,7	179,7
2	4,95 (s, 1H)	5,13 (s, 1H)	89,4	89,5
3			171,8	172,1
4			103,3	103,6
5			139,6	139,7
6	5,19 (s, 1H); 5,47 (s, 1H)	5,17 (s, 1H); 5,47 (s, 1H)	118,5	116,7
7	1,75 (s, 3H)	1,77 (s, 3H)	17,5	17,5
8	3,90 (s, 3H)	3,90 (s, 3H)	60,2	60,1

(a) 500 MHz,  $\text{CDCl}_3$  (b) 500 MHz,  $\text{CDCl}_3$  (KANG *et al.*, 2004)  
 (c) 75 MHz,  $\text{CDCl}_3$  (d) 125 MHz,  $\text{CDCl}_3$  (KANG *et al.*, 2004)

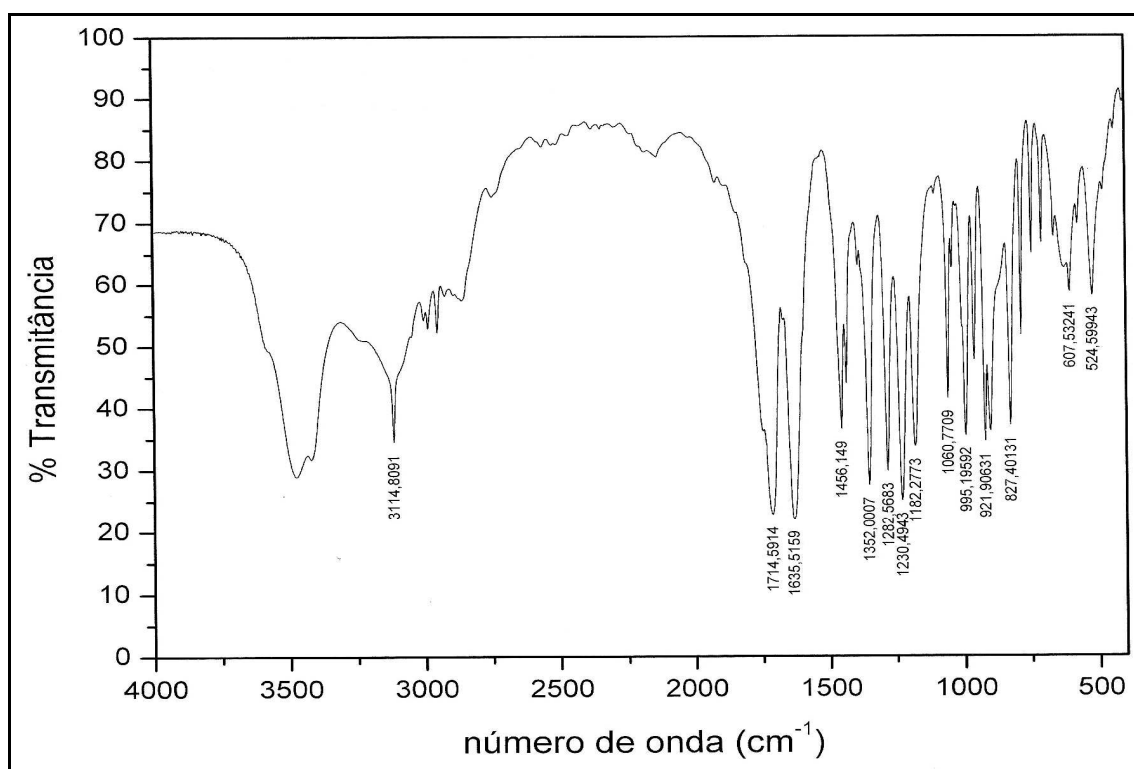


Figura 69 - Espectro de Infra-vermelho da ácido penicílico

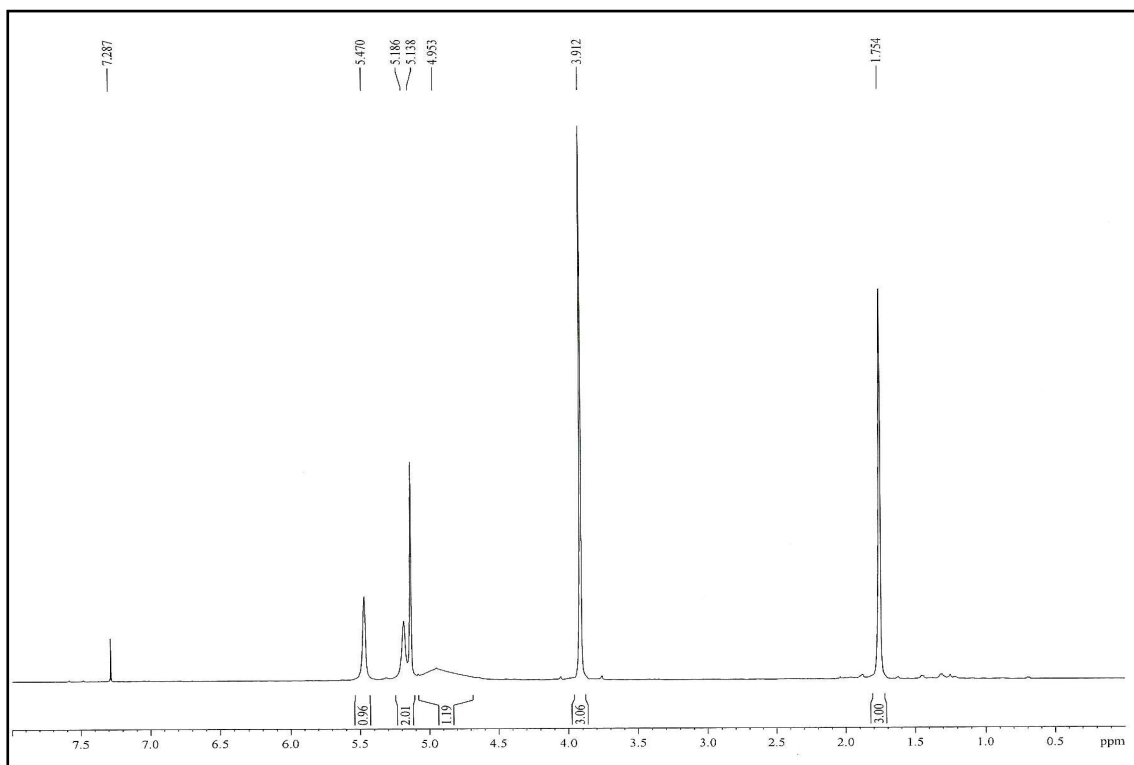


Figura 71 - Espectro de RMN  $^1\text{H}$  500 MHz em  $\text{CDCl}_3$  do ácido penicílico

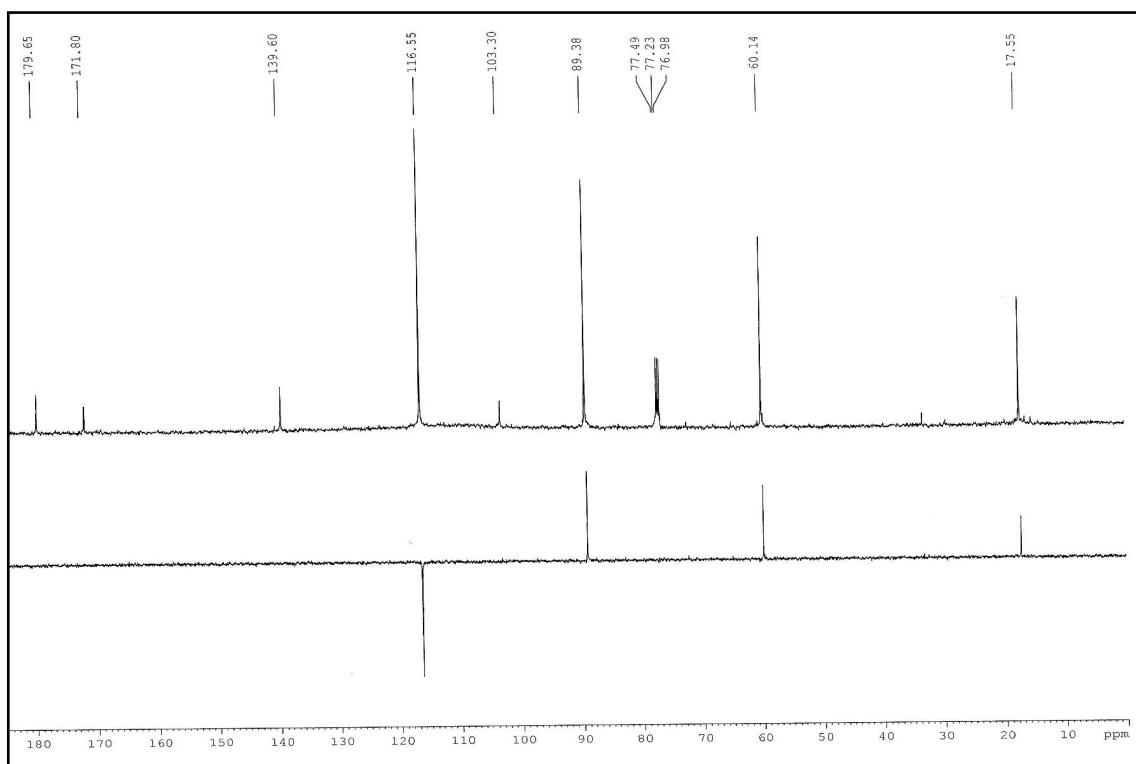


Figura 70 - Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  125 MHz em  $\text{CDCl}_3$  do ácido penicílico

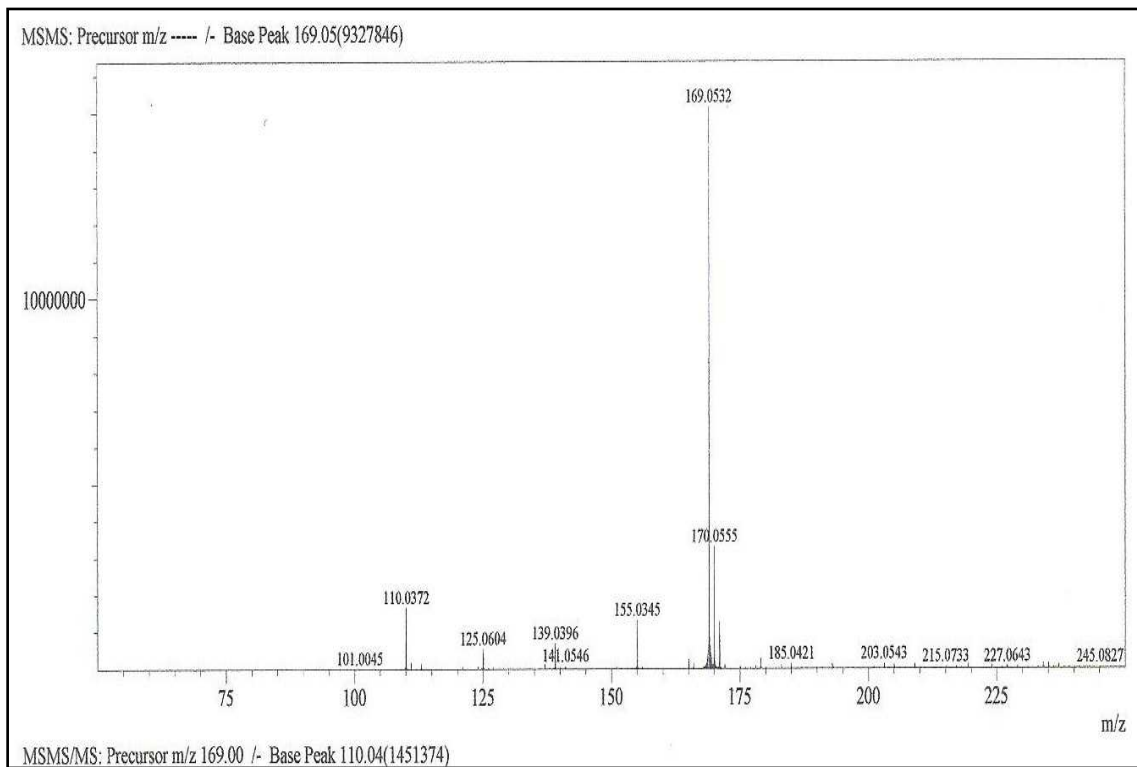


Figura 72 - Espectro de massas de alta resolução do ácido penicílico.



## 2.4 PARTE EXPERIMENTAL

### 2.4.1 Métodos Cromatográficos

#### 2.4.1.1 Cromatografia em gel de sílica

As cromatografias de adsorção em coluna foram realizadas utilizando gel de sílica da Vetec ( $\phi$  mm 0,063-0,200), cód. 195, gel de sílica 60 da Merck ( $\phi$  mm 0,040-0,063) e Sephadex LH-20 Merck. O comprimento e diâmetro das colunas utilizadas variaram de acordo com as quantidades de amostras a serem cromatografadas.

As análises cromatográficas em camada delgada analítica (CCDA) foram realizadas em cromatofolhas de alumínio, 3 cm x 5 cm, cobertas com gel sílica 60 F<sub>254</sub> com CaSO<sub>4</sub> da Merck. A revelação das substâncias nas cromatoplasmas foi feita pela exposição das mesmas à radiação ultravioleta (254 e 365 nm), empregando-se uma lâmpada UV modelo UVSL-25 da Mineral Light ou pulverizadas com solução de vanilina-ácido perclórico em etanol ou solução de permanganato de potássio seguido de aquecimento.

#### 2.4.1.2 Solventes

Os solventes utilizados nas separações, assim como nas análises cromatográficas foram de procedência PA - Synth<sup>®</sup> e Vetec<sup>®</sup>. As análises por CLAE foram feitas com solvente grau CLAE - Tedia<sup>®</sup>.

#### 2.4.1.3 Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

As análises por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) dos constituintes químicos de *Aspergillus* sp. (EV10) foram realizadas em um sistema Shimadzu<sup>®</sup> UFLC, equipado com um detector UV-Vis, com arranjo de diodos modelo SPD-M20A, utilizando uma faixa de 210-400 nm. As separações foram feitas usando uma coluna de fase normal Phenomenex, luna 5u sílica (2), 100A 250 x 4.60 mm, 5 $\mu$ m).

## 2.4.2 Métodos espectrométricos

### 2.4.2.1 Espectrometria no infravermelho (IV)

Os espectros de absorção na região do infravermelho (IV) foram obtidos Departamento de Química Orgânica e Inorgânica da Universidade Federal do Ceará (UFC), em espectrômetro Shimadzu<sup>®</sup> modelo FTIR 8300 utilizando pastilhas de NaCl para as amostras líquidas e/ou solúveis em clorofórmio.

### 4.2.2 Espectrometria de massas (EM).

A aquisição dos espectros de massas foi realizada em um equipamento Micromass<sup>®</sup> Quattro LC (triplo quadrupolo), equipado com fontes de ionização ESI e APCI no Departamento de Química da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar).

Os espectros de massas de alta resolução foram adquiridos usando um espectrômetro de massa mod. Shimadzu<sup>®</sup> LCMS-IT-TOF (225-07100-34) equipado com fonte de ionização por *electrospray*, do Laboratório de Espectrometria de Massa do Nordeste (LEMANOR) na UFC.

### 2.4.2.3 Espectrometria de ressonância magnética nuclear (RMN)

Os espectros de ressonância magnética nuclear de hidrogênio-1 e carbono-13 (RMN <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C) unidimensionais foram obtidos em espectrômetros Bruker, modelo Avance DPX-500, operando na frequência de hidrogênio a 500 MHz e na frequência do carbono a 125 MHz, com pulso de frequência e transformada de Fourier (FT) do Centro Nordestino de Aplicação e Uso de Ressonância Magnética Nuclear (CENAUREMN), da Universidade Federal do Ceará UFC.

Nos espectros de RMN <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C, os deslocamentos químicos ( $\delta$ ) foram expressos em partes por milhão (ppm) e referenciados pelos picos do hidrogênio e do carbono pertencentes às moléculas residuais não deuteradas dos solventes.

Os solventes utilizados na dissolução das substâncias foram clorofórmio ou metanol deuterados. Os seguintes valores foram empregados como referência: <sup>1</sup>H = (s,  $\delta$  7,27); <sup>13</sup>C = (t,  $\delta$  77,23) para clorofórmio e <sup>1</sup>H = (m,  $\delta$  3,31); <sup>13</sup>C = (t,  $\delta$  49,15) para

metanol. As multiplicidades das bandas de absorção do hidrogênio nos espectros de RMN  $^1\text{H}$  foram indicadas segundo a convenção: s (simpleto), d (duplete), dd (duplo duplete), t (triplete), q (quarteto) e m (multiplete).

O padrão de hidrogenação dos carbonos foi descrito segundo a convenção: C (carbono não hidrogenado); CH (carbono metínico);  $\text{CH}_2$  (carbono metilênico) e  $\text{CH}_3$  (carbono metílico) e foi determinado através da técnica DEPT (*Distortionless Enhancement by Polarization Transfer*) com ângulo de nutação de  $135^\circ$  ( $\text{CH}$  e  $\text{CH}_3$  com amplitudes em oposição ao  $\text{CH}_2$ ).

#### 2.4.6.1 Coleta das Ascídias e isolamento dos fungos

A coleta das Ascídias foi realizada na praia da Taiba, situada no município de São Gonçalo do Amarante - Ceará, na região no mesolitoral ( $03^\circ 34, 931' \text{ S}$ ;  $038^\circ 54, 469' \text{ W}$ ). Os animais coletados foram armazenados em água do mar estéril e levados ao laboratório. Uma massa de 5g dos animais foi pesada e lavada com álcool 70% e água do mar estéril para remoção dos microrganismos da superfície. As Ascídias foram maceradas e transferidas para 50 mL de água do mar estéril. Em seguida, realizaram-se diluições seriadas em tubos possuindo água do mar estéril. As diluições foram plaqueadas, usando-se a técnica de "Spread Plate", em meio BDA (batata-dextrose-agar) seguindo-se o procedimento descrito na literatura (LIU *et al*, 2006).

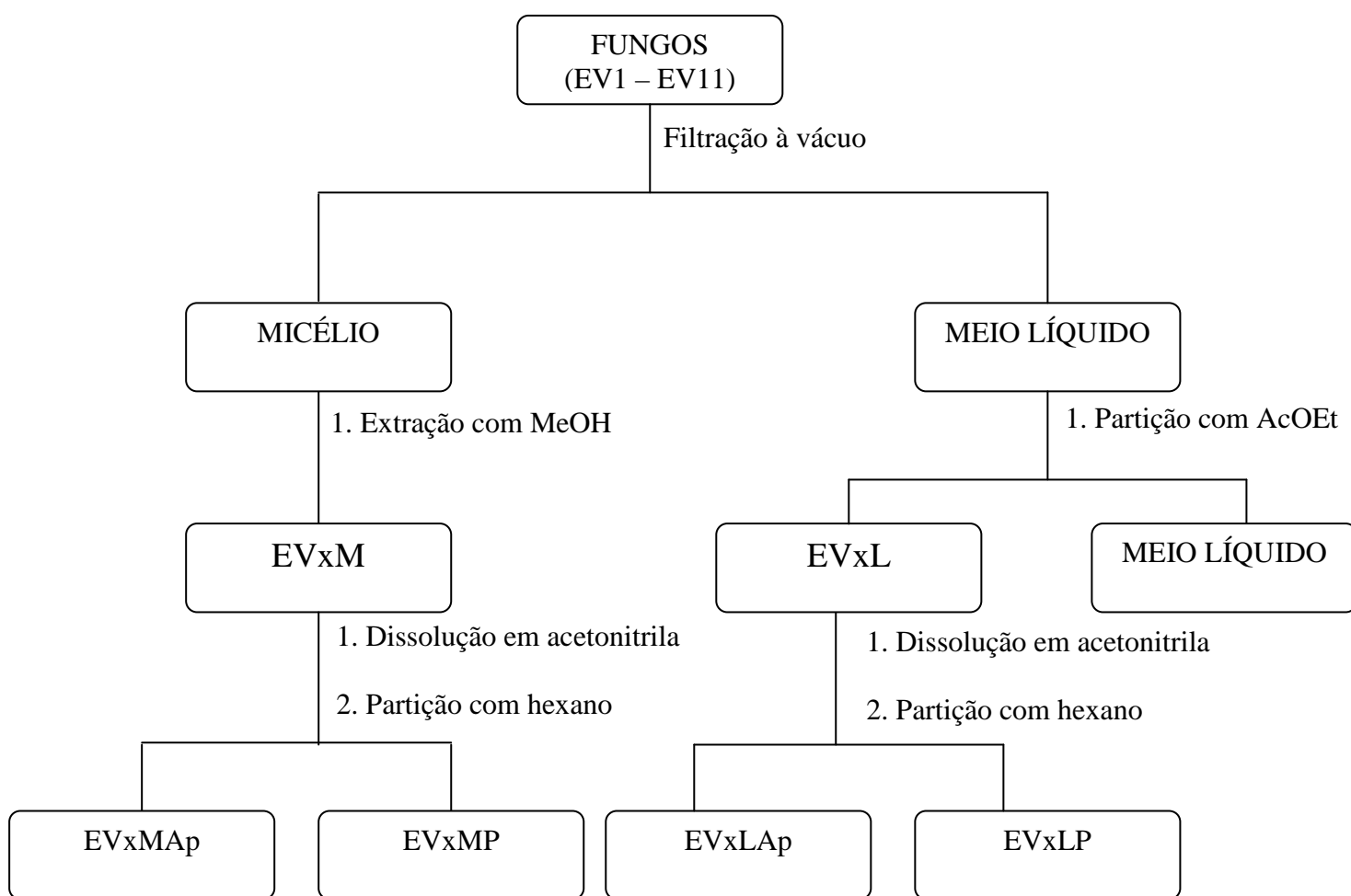
#### 2.4.6.2 Preparação dos extratos brutos e fracionamento bioguiado de EV1 – EV11

Após o crescimento dos fungos em placas de Petri contendo o meio BDA (batata, dextrose e ágar) à  $29^\circ \text{C}$  por aproximadamente 7 dias, pequenos discos de meios BDA contendo fungos foram transferidos assepticamente para frascos Erelmeyer de 500 mL contendo 150 mL meio líquido BD (batata, dextrose). Foram utilizados 4 frascos Erelmeyer, sendo 3 frascos com fungos e 1 como controle para cada fungo. Após 21 dias de crescimento, o micélio (biomassa) foi separado do meio líquido por filtração a vácuo.

O micélio foi extraído com metanol, gerando as frações EV1M a EV11M, e o meio líquido foi submetido a uma partição líquido-líquido, utilizando-se acetato de etila como solvente orgânico, para gerar os extratos EV1L a EV11L. Posteriormente, os

extratos foram concentrados a vácuo e dissolvidas em acetonitrila. Particionamento com hexano gerou as frações EV1MP a EV11MP (frações polares - acetonitrila) e EV1MAp a EV11MAp (frações apolares - hexano), oriundas do micélio, e EV1LP a EV11LP (frações polares - acetonitrila) e EV1LAp a EV11LAp (frações apolares - hexano) oriundas do meio líquido (Fluxograma 1).

Todas as frações foram concentradas sob pressão reduzida e enviadas ao Laboratório de Oncologia Experimental (LOE) da Universidade Federal do Ceará para testes de atividade citotóxica.



Fluxograma 1 – Metodologia de obtenção dos extratos brutos dos 11 fungos isolados de *Eudistoma vanammei*, 21 dias, meio BD.

### 2.4.6.3 Estudo químico de EV10

#### 2.4.6.3.1 Preparação dos meios de cultura

Na preservação do microrganismo e no cultivo prévio dos mesmos em placas de Petri foi utilizado o meio de cultura sólido batata-dextrose-ágar (BDA). No estudo químico de EV10 utilizou-se o meio de cultura líquido batata-dextrose (BD).

Depois de preparados, os meios foram distribuídos em Erlenmeyer ou placas de Petri e autoclavados à 121 °C por 15 minutos antes da inoculação do microrganismos. O volume de cada meio nos Erlenmeyer variou em função de cada experimento.

##### 2.4.6.3.1.1 Meio BD (batata-dextrose)

O meio de cultura BD foi preparado utilizando o caldo proveniente do cozimento de batata inglesa em água destilada (200,0 g/L), seguido de filtração e adição de glicose (20,0 g/L).

##### 2.4.6.3.1.2 Meio BDA (batata-dextrose-ágar)

O meio de cultura BDA foi preparado utilizando o caldo proveniente do cozimento de batata inglesa em água destilada (200,0 g/L), seguido da filtração e adição de glicose (20,0 g/L) e ágar (17,0 g/L).

#### 2.4.6.3.2 Identificação molecular de EV-10 e EV-11

Os isolados EV-10 e EV-11 foram submetidos à identificação taxonômica molecular na Divisão de Recursos Microbianos do Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas (CPQBA-Unicamp), cujas análises estão registradas sob o número de processo CPQBA 007-10 DRM e o laudo encontra-se em Anexos.

##### 2.4.6.3.3 Preparação do extrato bruto de *Aspergillus* sp. (EV10)

EV10 foi cultivado em placas de Petri contendo o meio BDA (batata, dextrose e ágar) à 29 °C por aproximadamente 7 dias. Pequenos discos de meios contendo os fungos crescidos foram transferidos assepticamente para frascos Erlenmeyer de 500 mL contendo meio líquido BD (batata, dextrose). Foram utilizados 30 frascos Erlenmeyer

de 500 mL, contendo 150 mL do meio de cultura BD (batata-dextrose), sendo 28 frascos com fungos e 2 como controle. Após 21 dias de crescimento, o micélio (biomassa) foi separado do meio líquido por filtração a vácuo. O micélio foi extraído utilizando-se metanol como solvente e gerou a fração EV10M. O meio líquido foi submetido a uma partição líquido-líquido utilizando-se acetato de etila como solvente orgânico, gerando a fração EV10L.

Ambas as frações EV10M e EV10L foram concentradas a vácuo e dissolvidas em acetonitrila e, posteriormente, particionadas com hexano para fornecer as frações EV10MP (fração CH<sub>3</sub>CN), EV10MAp (fração hexano), oriundas do micélio, e EV10LP (fração CH<sub>3</sub>CN) e EV10LAp (fração hexano), oriundas do meio líquido.

#### 2.4.6.3.3.1 Fracionamento cromatográfico de EV10LP

A fração EV10LP (450,0 mg) foi solubilizada e fracionada isocraticamente com metanol, em um funil cilíndrico de 2,0 cm de diâmetro externo, com uma camada de 45,0 cm de Sephadex LH-20. Foram obtidas 50 frações de 2 mL, que após análise em CCDA foram agrupadas.

##### 2.4.6.3.3.1.1 Fracionamento cromatográfico de EV10LP-F2

A fração de EV10LP-F2 (120,0 mg) foi solubilizada e fracionada, isocraticamente, com uma mistura de acetato de etila e hexano (30:70), em um funil cilíndrico de 6,50 cm de diâmetro externo, com uma camada de 22,0 cm de gel de sílica. Foram obtidas 35 frações de 2 mL, que após análise em CCDA foram agrupadas.

A fração EV10LP-F2.2 (40,4 mg) foi refracionada isocraticamente por CLAE (Item 4.1.3, Pág 84) utilizando uma mistura de acetato de etila e hexano (40:60) com fluxo de 4,7 mL/min.

##### 2.4.6.3.3.1.2 Fracionamento cromatográfico de EV10LP-F3

A fração EV10LP-F3 (80,0 mg) foi solubilizada e fracionada, isocraticamente, com acetato de etila:hexano (30:70), em um funil cilíndrico de 6,5 cm de diâmetro externo, com uma camada de 22,0 cm de gel de sílica. Foram obtidas 40 frações de 2 mL, que após análise em CCDA foram agrupadas.

A fração EV10LP-F3.2 (22,0 mg) foi refractionada isocraticamente por CLAE utilizando uma mistura de acetato de etila e hexano (30:70) com fluxo de 4,7 mL/min. Foi observado um pico majoritário o qual foi recolhido e analisado por RMN.

## 2.5 CONCLUSÕES

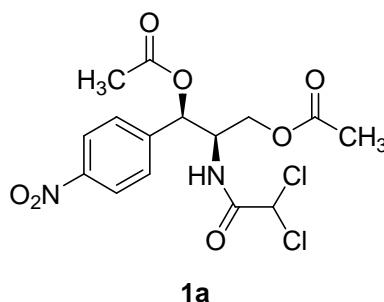
A segunda parte deste trabalho teve como objetivo avaliar o potencial citotóxico dos extratos de fungos marinhos isolados da ascídia *Eudistoma vannamei*. Nesta parte do trabalho foi possível isolar 11 cepas (EV1 a EV11), sendo EV10 e EV11 as que apresentaram os extratos mais ativos, identificadas como *Aspergillus* sp. após análise molecular.

Apartir dos resultados da atividade citotóxica, os extratos brutos das cepas selecionadas foram então submetidos a fracionamentos e ao final a cepa EV10 foi escolhida para estudo em grande escala.

O fracionamento bioguiado das frações ativas levou ao isolamento das micotoxinas meleína, *cis*-4-hidroximeleína, *trans*-4-hidroximeleína e ácido penicílico, dentre as quais somente o ácido penicílico apresentou atividade citotóxica. Diante desse resultado, pode-se concluir que o ácido penicílico era o constituinte responsável pela atividade citotóxica do fungo.

### 3 CONSTANTES FÍSICAS

#### Dados espectroscópicos do (2'R,3'R) 1',3'-diacetato de cloranfenicol (1a)



**R<sub>f</sub>** 0,46 (60% AcOEt/hexano).

**Pf** = 142–144 °C.

**IV** (NaCl): 3055, 2987, 2305, 1749, 1703, 1527, 1421, 1350, 1265, 1049 cm<sup>-1</sup>.

**RMN <sup>1</sup>H** (CDCl<sub>3</sub>, 300,13 MHz): 2,07 (s, 3H), 2,16 (s, 3H), 4,02-4,20 (m, 2H), 4,57-4,65 (m, 1H), 5,08 (s, 1H), 6,06 (d, *J* = 5,6 Hz, 1H), 6,82 (d, *J* = 9,5 Hz, 1H), 7,52 (d, *J* = 8,8 Hz, 2H), 8,22 (d, *J* = 8,8 Hz, 2H).

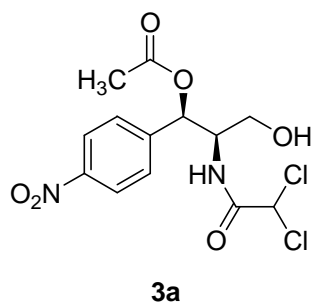
**RMN <sup>13</sup>C** (CDCl<sub>3</sub>, 75,5 MHz): 20,5 (CH<sub>3</sub>), 20,7 (CH<sub>3</sub>), 52,6 (CH), 62,1 (CH<sub>2</sub>), 65,9 (CH), 72,6 (CH), 123,9 (2CH), 127,5 (2CH), 143,2 (C), 148,0 (C), 164,1 (C), 169,5 (C), 170,4 (C).

**EMAR** (IES) encontrada: 429,0240; calculada: C<sub>15</sub>H<sub>16</sub>Cl<sub>2</sub>N<sub>2</sub>NaO<sub>7</sub> [(M+Na)<sup>+</sup>]: 429,0227;

**[α]<sub>D</sub><sup>20</sup>** = - 5,0 (c 0,7, CHCl<sub>3</sub>).



### Dados espectroscópicos do (2'*R*,3'*R*) 1'-acetato de cloranfenicol (3a)



**R<sub>f</sub>** 0,42 (60% AcOEt/hexano).

**IV** (NaCl): 3055, 2986, 2305, 1744, 1699, 1608, 1526, 1421, 1350, 1265, 1228, 1046 cm<sup>-1</sup>.

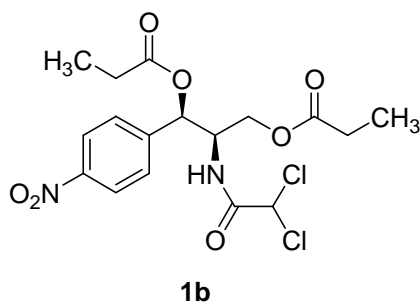
**RMN <sup>1</sup>H** (CDCl<sub>3</sub>, 300,13 MHz): 2,1 (s, 3H), 3,52–3,73 (m, 2H), 4,33-4,41 (m, 1H), 5,9 (s, 1H), 6,23 (d, *J* = 7,0 Hz, 1H), 7,02 (d, *J* = 9,2 Hz, 1H), 7,60 (d, *J* = 8,8 Hz, 2H), 8,23 (d, *J* = 8,8 Hz, 2H).

**RMN <sup>13</sup>C** (CDCl<sub>3</sub>, 75,5 MHz): 21,1 (CH<sub>3</sub>), 55,5 (CH), 62,2 (CH<sub>2</sub>), 66,4 (CH), 73,2 (CH), 124,2 (2CH), 128,1 (2CH), 144,1 (C), 148,2 (C), 164,6 (C), 170,4 (C).

**EMAR** (IES) calculada: C<sub>13</sub>H<sub>14</sub>Cl<sub>2</sub>N<sub>2</sub>NaO<sub>6</sub> [(M+Na)<sup>+</sup>]: 387,0121; encontrada: 387,0129.

**[α]<sub>D</sub><sup>20</sup>** = - 6,8 (1,0 CHCl<sub>3</sub>).

**Dados espectroscópicos do (2'R,3'R) 1',3'-dipropionato de cloranfenicol (1b)**



**R<sub>f</sub>** 0,58 (60% AcOEt/hexano).

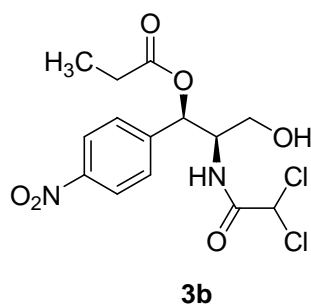
**IV** (NaCl): 3055, 2987, 2305, 1747, 1703, 1608, 1526, 1421, 1350, 1265, 1167, 1084 cm<sup>-1</sup>.

**RMN <sup>1</sup>H** (CDCl<sub>3</sub>, 300,13 MHz): 1,11 – 1,19 (m, 6H), 2,32–2,48 (m, 4H), 4,04-4,23 (m, 2H), 4,58-4,67 (m, 1H), 5,87 (s, 1H), 6,08 (d, *J* = 5,7 Hz, 1H), 6,84 (d, *J* = 9,5 Hz, 1H), 7,52 (d, *J* = 8,8 Hz, 2H), 8,22 (d, *J* = 8,8 Hz, 2H).

**RMN <sup>13</sup>C** (CDCl<sub>3</sub>, 75,5 MHz): 9,1 (CH<sub>3</sub>), 9,2 (CH<sub>3</sub>), 27,5 (CH<sub>2</sub>), 27,7 (CH<sub>2</sub>), 53,1 (CH), 62,2 (CH<sub>2</sub>), 66,2 (CH), 72,8 (CH), 124,3 (2CH), 127,8 (2CH), 143,6 (C), 148,3 (C), 164,3 (C), 173,3 (C), 174,2 (C).

**EMAR** (IES) calculada: C<sub>17</sub>H<sub>20</sub>Cl<sub>2</sub>N<sub>2</sub>NaO<sub>7</sub> [(M+Na)<sup>+</sup>]: 457,0540; encontrada: 457,0555  
**[α]<sub>D</sub><sup>20</sup>** = - 6,1 (0,7 CHCl<sub>3</sub>).

### Dados espectroscópicos do (2'*R*,3'*R*) 1'-propionato de cloranfenicol (3b)



**R<sub>f</sub>** 0,44 (60% AcOEt/hexano).

**Pf** = 114–117 °C.

**IV** (NaCl): 3055, 2987, 2305, 1746, 1899, 1608, 1525, 1421, 1351, 1265, 1169, 1083 cm<sup>-1</sup>

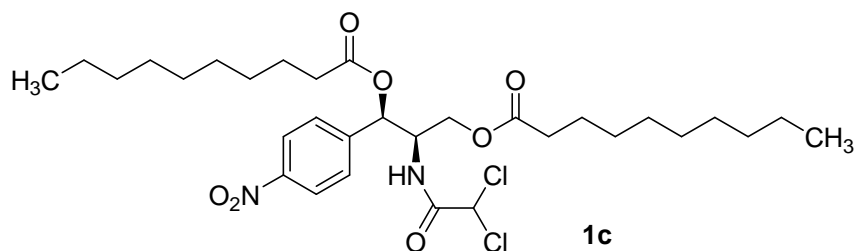
**RMN** <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 300,13 MHz): 1,16 (t, *J* = 7,7 Hz, 3H), 2,45 (q, *J* = 7,7 Hz, 2H), 3,52 - 3,73 (m, 2H) 4,33-4,41 (m, 2H), 5,90 (s, 1H), 6,24 (d, *J* = 6,8 Hz, 1H), 7,00 (d, *J* = 9,2 Hz, 1H), 7,21 (d, *J* = 8,8 Hz, 2H), 8,24 (d, *J* = 8,8 Hz, 2H).

**RMN** <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>, 75,5 MHz): 9,1 (CH<sub>3</sub>), 27,8 (CH<sub>2</sub>), 55,6 (CH), 61,3 (CH<sub>2</sub>), 66,4 (CH), 77,0 (CH), 124,2 (2CH), 128,0 (2CH), 144,3 (C), 148,2 (C), 164,6 (C), 173,8 (C).

**EMAR** (IES) calculada: C<sub>14</sub>H<sub>16</sub>Cl<sub>2</sub>N<sub>2</sub>NaO<sub>6</sub> [(M+Na)<sup>+</sup>]: 401,0278; encontrada: 401,0290.

[α]<sub>D</sub><sup>20</sup> = - 5,6 (0,6 CHCl<sub>3</sub>).

**Dados espectroscópicos do (2'R,3'R) 1',3'-didecanoato de cloranfenicol (1c)**



**R<sub>f</sub>** 0,60 (30% AcOEt/hexano).

**IV** (NaCl):  $\nu$  3317, 2926, 2855, 1747, 1695, 1609, 1526, 1464, 1349, 1237, 1155, 1109, 1066  $\text{cm}^{-1}$ .

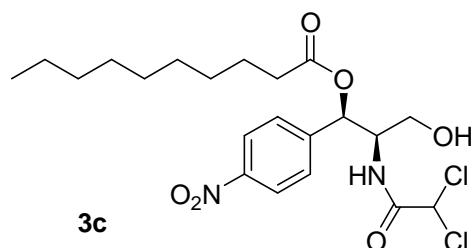
**RMN <sup>1</sup>H** ( $\text{CDCl}_3$ , 300,13 MHz):  $\delta$  0,85 (t,  $J = 5,9$  Hz, 6H), 1,26 (s, 24H), 1,58-1,65 (m, 4H), 2,31-2,45 (m, 4H), 4,01-4,21 (m, 2H), 4,56-4,65 (m, 1H), 5,85 (s, 1H), 6,05 (d,  $J = 5,5$  Hz 1H), 6,77 (d,  $J = 9,4$  Hz, 1H), 7,50 (d,  $J = 8,8$  Hz, 2H), 8,22 (d,  $J = 8,8$  Hz, 2H).

**RMN <sup>13</sup>C** ( $\text{CDCl}_3$ , 75,5 MHz):  $\delta$  14,0 (2 $\text{CH}_3$ ), 22,6 (2 $\text{CH}_2$ ), 24,7 (2 $\text{CH}_2$ ), 24,8-29,4 (8 $\text{CH}_2$ ), 31,8 (2 $\text{CH}_2$ ), 33,9 (2 $\text{CH}_2$ ), 52,8 (CH), 61,9 ( $\text{CH}_2$ ), 70,0 (CH), 72,4 (CH), 124,0 (2CH), 127,4 (2CH), 143,5 (C), 148,0 (C), 164,0 (C), 172,4 (C), 173,3 (C).

**EMAR** (IES) calculada:  $\text{C}_{31}\text{H}_{48}\text{Cl}_2\text{N}_2\text{NaO}_7$  [(M+Na)<sup>+</sup>]: 653,2750; encontrada: 653,2731.

**[ $\alpha$ ]<sub>D</sub><sup>20</sup>** = - 6,19 (1,4  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ).

**Dados espectroscópicos do (2'R,3'R) 1'-decanoato de cloranfenicol (3c)**



**R<sub>f</sub>** 0,24 (40% AcOEt/hexano).

**Pf** = 99-101 °C.

**IV** (KBr):  $\nu$ , 3055, 2928, 2856, 1735, 1698, 1642, 1526, 1421, 1350, 1265, 1154, 1111, 1062  $\text{cm}^{-1}$ .

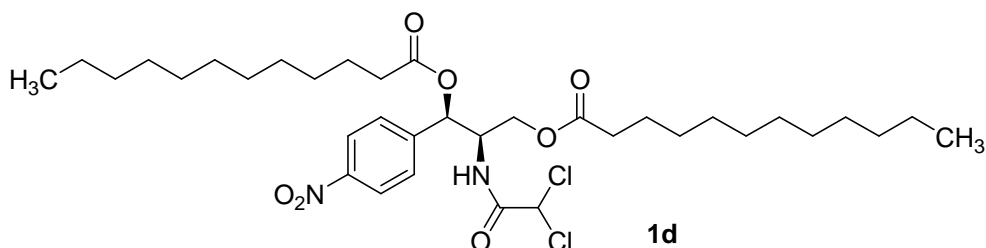
**RMN <sup>1</sup>H** ( $\text{CDCl}_3$ , 300,13 MHz):  $\delta$  0,88 (t,  $J = 7,0$  Hz, 3H), 1,25 (s, 12H), 1,61-1,65 (m, 2H), 2,42 (t,  $J = 7,9$  Hz, 2H), 3,62 (ddd,  $J = 6,0, 12,0, 30,0$  Hz, 2H), 4,33-4,41 (m, 1H), 5,06 (s, 1H), 6,23 (d,  $J = 6,6$  Hz, 1H), 6,95 (d,  $J = 9,0$  Hz, 1H), 7,59 (d,  $J = 8,7$  Hz, 2H), 8,24 (d,  $J = 8,7$  Hz, 2H).

**RMN <sup>13</sup>C** ( $\text{CDCl}_3$ , 75,5 MHz):  $\delta$  14,3 ( $\text{CH}_3$ ), 22,8 ( $\text{CH}_2$ ), 24,9 ( $\text{CH}_2$ ), 29,3-29,6 ( $4\text{CH}_2$ ), 32,0 ( $\text{CH}_2$ ), 34,4 ( $\text{CH}_2$ ), 55,5 (CH), 61,3 ( $\text{CH}_2$ ), 66,4 (CH), 72,9 (CH), 124,1 ( $2\text{CH}$ ), 128,0 ( $2\text{CH}$ ), 144,3 (C), 148,2 (C), 164,5 (C), 173,2 (C).

**EMAR** (IES) calculada:  $\text{C}_{21}\text{H}_{30}\text{Cl}_2\text{N}_2\text{NaO}_6$  [(M+Na)<sup>+</sup>]: 499,1373; encontrada: 499,1398.

**$[\alpha]_D^{20}$**  = - 4,16 (0,8  $\text{CH}_3\text{Cl}$ ).

**Dados espectroscópicos do (2'R,3'R) 1',3'-dilaurato de cloranfenicol (1d)**



**R<sub>f</sub>** 0,63 (30% AcOEt/hexano).

**Pf** = 41-43 °C.

**IV** (NaCl):  $\nu$  3054, 2928, 2855, 2306, 1743, 1703, 1608, 1527, 1465, 1350, 1265, 1152, 1111,  $\text{cm}^{-1}$ .

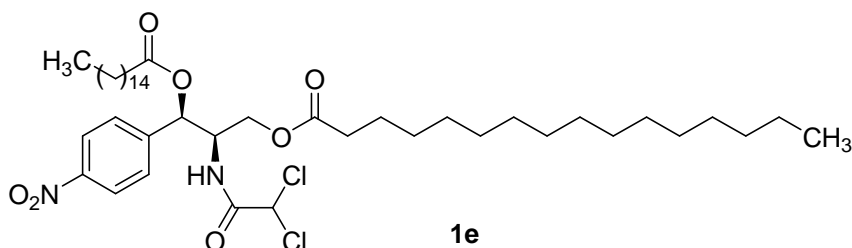
**RMN <sup>1</sup>H** ( $\text{CDCl}_3$ , 300,13 MHz):  $\delta$  0,87 (t,  $J = 7,0$  Hz, 6H), 1,25 (s, 32H), 1,59-1,65 (m, 4H), 2,34 (t,  $J = 9,0$  Hz, 2H), 2,43 (t,  $J = 9,0$  Hz, 2H), 4,12 (ddd,  $J = 6,0, 12,0, 30,0$  Hz, 2H), 4,56-4,65 (m, 1H), 5,85 (s, 1H), 6,07 (d,  $J = 5,7$  Hz 1H), 6,76 (d,  $J = 9,2$  Hz, 1H), 7,51 (d,  $J = 8,8$  Hz, 2H), 8,23 (d,  $J = 8,8$  Hz, 2H).

**RMN <sup>13</sup>C** ( $\text{CDCl}_3$ , 75,5 MHz):  $\delta$  14,3 (2CH<sub>3</sub>), 22,8 (2CH<sub>2</sub>), 24,9 (2CH<sub>2</sub>), 25,0-29,7 (12CH<sub>2</sub>), 33,1 (2CH<sub>2</sub>), 34,2 (2CH<sub>2</sub>), 53,1 (CH), 62,2 (CH<sub>2</sub>), 66,2 (CH), 72,7 (CH), 124,2 (2CH), 127,7 (2CH), 143,7 (C), 148,3 (C), 164,2 (C), 172,6 (C), 173,5 (C).

**EMAR** (IES) calculada: C<sub>35</sub>H<sub>56</sub>Cl<sub>2</sub>N<sub>2</sub>NaO<sub>7</sub> [(M+Na)<sup>+</sup>]: 709,3400; encontrada: 709,3347.

**[ $\alpha$ ]<sub>D</sub><sup>20</sup>** = -1,99 (c = 1,0 CH<sub>3</sub>Cl).

### Dados espectroscópicos do (2'R,3'R) 1',3'-dipalmitato de cloranfenicol (1e)



**R<sub>f</sub>** 0,92 (60% AcOEt/hexano).

**Pf** = 48-50 °C.

**IV** (NaCl): 3054, 2927, 2854, 2305, 1744, 1703, 1527, 1421, 1350, 1265, 1156, 1113 cm<sup>-1</sup>.

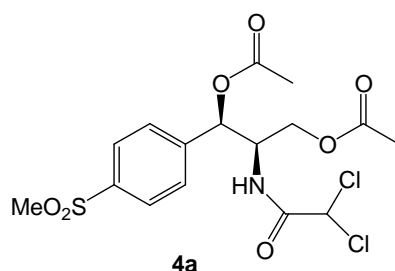
**RMN <sup>1</sup>H** (CDCl<sub>3</sub>, 300,13 MHz): 0,88 (t, *J* = 6,7 Hz, 6H), 1,26 (s, 48H), 1,59-1,66 (m, 4H), 2,34 (t, *J* = 7,4 Hz, 2H), 2,43 (t, *J* = 7,4 Hz, 2H), 4,12 (ddd, *J* = 6,0, 12,0, 33,0 Hz, 2H), 4,56–4,65 (m, 1H), 5,85 (s, 1H), 6,07 (d, *J* = 5,7 Hz, 1H), 6,76 (d, *J* = 9,4 Hz, 1H), 7,51 (d, *J* = 8,5 Hz, 2H), 8,23 (d, *J* = 8,5 Hz, 2H).

**RMN <sup>13</sup>C** (CDCl<sub>3</sub>, 75,5 MHz): 14,3 (2CH<sub>3</sub>), 22,9 (2CH<sub>2</sub>), 24,9 (2CH<sub>2</sub>), 29,2 – 29,6 (2OCH<sub>2</sub>), 32,1 (2CH<sub>2</sub>), 34,3 (2CH<sub>2</sub>), 53,1 (CH), 62,2 (CH<sub>2</sub>), 66,2 (CH), 72,7 (CH), 124,2 (2CH), 127,7 (2CH), 141,2 (C), 142,8 (C), 164,2 (C), 172,7 (C), 173,5 (C).

**EMAR** (IES) calculada: C<sub>43</sub>H<sub>72</sub>Cl<sub>2</sub>N<sub>2</sub>NaO<sub>7</sub> [(M+Na)<sup>+</sup>]: 821,4629; encontrada: 821,4586;

**[α]<sub>D</sub><sup>20</sup>** = - 1,61 (1,0 CHCl<sub>3</sub>).

**Dados espectrais do (2'R,3'R) 1',3'-diacetato de tianfenicol (4a)**



**R<sub>f</sub>** 0,26 (60% AcOEt/hexano).

**Pf** = 115-117.

**IV** (NaCl):  $\nu$  3055, 2987, 2412, 2305, 1750, 1703, 1523, 1421, 1316, 1265, 1153, 1049  $\text{cm}^{-1}$ .

**RMN <sup>1</sup>H** ( $\text{CDCl}_3$ , 300,13 MHz): 2.07 (s, 3H), 2.16 (s, 3H), 3.05 (s, 3H), 4.14 (ddd,  $J$  = 6.0, 12.0, 31.0 Hz, 2H), 4.57 - 4.66 (m, 1H), 5.88 (s, 1H), 6.05 (d,  $J$  = 6.0 Hz, 1H), 6.89 (d,  $J$  = 9.3 Hz, 1H), 7.55 (d,  $J$  = 8.2 Hz, 2H), 7.93 (d,  $J$  = 8.2 Hz, 2H).

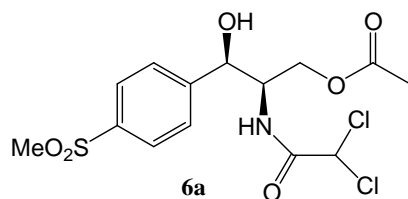
**<sup>13</sup>C-NMR** ( $\text{CDCl}_3$ , 75.5 MHz): 20.8 ( $\text{CH}_3$ ), 20.9 ( $\text{CH}_3$ ), 44.5 ( $\text{CH}_3$ ), 52.9 (CH), 62.3 ( $\text{CH}_2$ ), 66.2 (CH), 73.1 (CH), 127.9 (2CH), 128.1 (2CH), 141.1 (C), 142.6 (C), 164.4 (C), 169.8 (C), 170.7 (C).

**EMAR** (IES) calculada para  $\text{C}_{16}\text{H}_{19}\text{Cl}_2\text{NNaO}_7\text{S}$  (M): 462,0151; encontrada: 462,0176.

**$[\alpha]_{\text{D}}^{20}$**  = - 3,89 (1,0  $\text{CHCl}_3$ ).



**Dados espectrais do (2'R,3'R) 3'-acetato de tianfenicol (6a)**



**R<sub>f</sub>** 0,18 (60% AcOEt/hexano).

**Pf** = 133-135.

**IV** (NaCl):  $\nu$  3055, 2987, 1743, 1699, 1521, 1421, 1316, 1265, 1151,  $\text{cm}^{-1}$ .

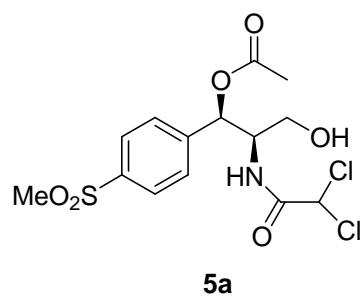
**RMN <sup>1</sup>H** ( $\text{CDCl}_3$ , 300,13 MHz): 2.08 (s, 3H), 3.00 (s, 3H), 4.17 - 4.40 (m, 3H), 5.04 (s, 1H), 5.80 (s, 1H), 7.03 (d,  $J = 8.5$  Hz, 1H), 7.50 (d,  $J = 8.2$  Hz, 2H), 7.74 (d,  $J = 8.2$  Hz, 2H).

**RMN <sup>13</sup>C** ( $\text{CDCl}_3$ , 75.5 MHz): 20.9 ( $\text{CH}_3$ ), 44.6 ( $\text{CH}_3$ ), 54.3 (CH), 63.1 ( $\text{CH}_2$ ), 66.3 (CH), 70.7 (CH), 127.1 (2CH), 127.4 (2CH), 139.6 (C), 147.2 (C), 164.5 (C), 171.4 (C).

**EMAR** (IES) calculado para  $\text{C}_{14}\text{H}_{17}\text{Cl}_2\text{NNaO}_6\text{S}$  (M): 420,0046; encontrado: 420,0057.

**$[\alpha]_{\text{D}}^{20}$**  = + 0,75 (0,8  $\text{CHCl}_3$ ).

**Dados espectrais do (2'R,3'R) 1'-acetato de tianfenicol (5a)**



**R<sub>f</sub>** (60% EtOAc/hexane): 0,15

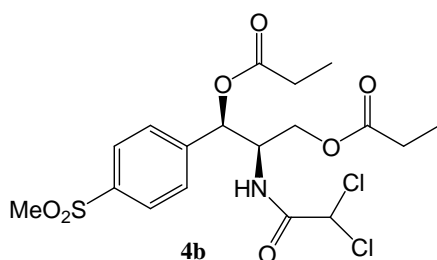
**IV** (NaCl):  $\nu$  3328, 3019, 2928, 1735, 1688, 1533, 1410, 1303, 1225, 1147,  $\text{cm}^{-1}$ .

**RMN <sup>1</sup>H**(CDCl<sub>3</sub>, 300,13 MHz): 2,13 (s, 3H), 3,06 (s, 3H), 3,57 (ddd,  $J = 4,10; 11,3; 41,2$  Hz, 2H), 4,33 - 4,38 (m, 1H), 5,94 (s, 1H), 6,18 (d,  $J = 7,2$  Hz, 1H), 7,10 (d,  $J = 9,2$  Hz, 1H), 7,63 (d,  $J = 8,3$  Hz, 2H), 7,93 (d,  $J = 8,3$  Hz, 2H)

**NMR <sup>13</sup>C**(CDCl<sub>3</sub>, 75,5 MHz): 21,1 (CH<sub>3</sub>), 44,6 (CH<sub>3</sub>), 55,6 (CH), 61,0 (CH<sub>2</sub>), 66,4 (CH), 73,4 (CH), 128,0 (2CH), 128,2 (2CH), 140,9 (C), 143,4 (C), 164,7 (C), 170,4 (C)

**EMAR** (IES) calculada for C<sub>14</sub>H<sub>17</sub>Cl<sub>2</sub>NNaO<sub>6</sub>S (M): 420,0083; encontrada: 420,0046;  
[ $\alpha$ ]<sub>D</sub><sup>20</sup> = - 3,6 (0,5, CHCl<sub>3</sub>).

### Dados espectrais do (2'R,3'R) 1',3'-dipropionato de tianfenicol (4b)



**R<sub>f</sub>** (60% AcOEt/hexano): 0,46.

**Pf** = 105-107.

**IV** (NaCl):  $\nu$  3059, 2928, 2305, 1743, 1707, 1527, 1463, 1313, 1267, 1151, 1084  $\text{cm}^{-1}$ .

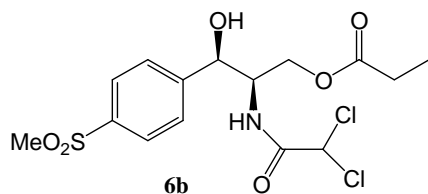
**RMN <sup>1</sup>H** ( $\text{CDCl}_3$ , 300,13 MHz): 1,12 (t,  $J = 7,5$  Hz, 3H), 1,15 (t,  $J = 7,5$  Hz, 3H), 2,34 (q,  $J = 7,5$  Hz, 2H), 2,43 (q,  $J = 7,5$  Hz, 2H), 3,04 (s, 3H), 4,14 (ddd,  $J = 5,3; 11,7; 33,0$  Hz, 2H), 4,60 (m, 1H), 5,88 (s, 1H), 6,04 (d,  $J = 6,0$  Hz, 1H), 6,88 (d,  $J = 9,3$  Hz, 1H), 7,55 (d,  $J = 8,2$  Hz, 2H), 7,93 (d,  $J = 8,2$  Hz, 2H).

**RMN <sup>13</sup>C** ( $\text{CDCl}_3$ , 75,5 MHz): 9,0 ( $\text{CH}_3$ ), 9,1 ( $\text{CH}_3$ ), 27,4 ( $\text{CH}_2$ ), 27,6 ( $\text{CH}_2$ ) 44,6 ( $\text{CH}_3$ ), 53,0 (CH), 62,3 ( $\text{CH}_2$ ), 66,2 (CH), 72,8 (CH), 127,9 (2CH), 128,1 (2CH), 141,1 (C), 142,7 (C), 173,3 (C), 174,1 (C).

**EMAR** (IES) calculado para  $\text{C}_{18}\text{H}_{23}\text{Cl}_2\text{NNaO}_7\text{S}$  (M): 490,0484; encontrado: 490,00464.

$[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -3,7$  (1,0  $\text{CHCl}_3$ ).

**Dados espectrais do (2'R,3'R) 3'-propionato de tianfenicol (6b)**



**R<sub>f</sub>** 0,33 (60% AcOEt/hexano).

**Pf** = 111-113.

**IV** (NaCl):  $\nu$  3055, 2987, 2305, 1743, 1699, 1521, 1421, 1315, 1265, 1151, 1088  $\text{cm}^{-1}$ .

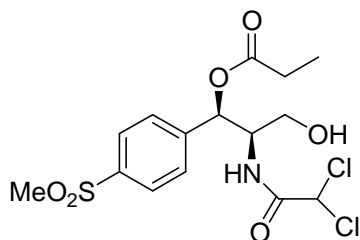
**RMN <sup>1</sup>H** ( $\text{CDCl}_3$ , 300,13 MHz): 1,13 (t,  $J = 7,5$  Hz, 3H), 2,36 (q,  $J = 7,5$  Hz, 2H), 3,00 (s, 3H), 4,18 - 4,23 (m, 1H), 4,29 - 4,41 (m, 2H), 5,04 (s, 1H), 5,80 (s, 1H), 7,27 (d,  $J = 8,5$  Hz, 1H), 7,50 (d,  $J = 8,2$  Hz, 2H), 7,74 (d,  $J = 8,2$  Hz, 2H);

**RMN <sup>13</sup>C** ( $\text{CDCl}_3$ , 75,5 MHz): 9,1 ( $\text{CH}_3$ ), 27,6 ( $\text{CH}_2$ ), 44,6 ( $\text{CH}_3$ ), 54,4 (CH), 63,0 ( $\text{CH}_2$ ), 66,6 (CH), 70,8 (CH), 127,1 (2CH), 127,4 (2CH), 139,6 (C), 147,2 (C), 164,5 (C), 174,8 (C);

**EMAR** (IES) calculado para  $\text{C}_{15}\text{H}_{19}\text{Cl}_2\text{NNaO}_6\text{S}$  (M): 434,0218; encontrado: 434,0202.

**$[\alpha]_{\text{D}}^{20}$**  = + 0,11 (1,0  $\text{CHCl}_3$ ).

**Dados espectrais do (2'R,3'R) 1',3'-didecanoato de tianfenicol (5b)**



**R<sub>f</sub>** (60% AcOEt/hexane): 0,25.

**Pf** = 109-111.

IV (NaCl):  $\nu$  3497, 3289, 2929, 1727, 1684, 1556, 1462, 1369, 1300, 1151, 1084  $\text{cm}^{-1}$ .

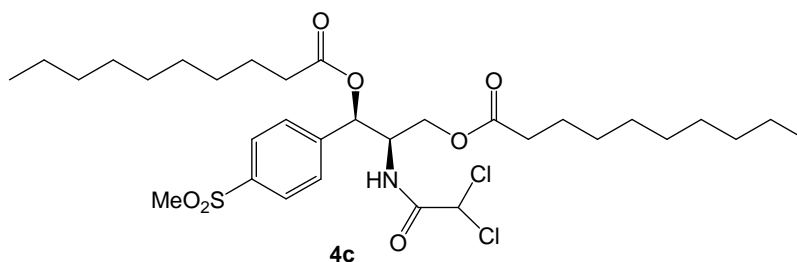
**RMN <sup>1</sup>H** ( $\text{CDCl}_3$ , 300,13 MHz): 1,14 (t,  $J = 7,5$  Hz, 3H), 2,42 (q,  $J = 7,5$  Hz, 2H), 3,05 (s, 3H), 3,57 (ddd,  $J = 4,62; 11,4; 51,6$  Hz, 2H), 4,31 - 4,38 (m, 1H), 5,93 (s, 1H), 6,19 (d,  $J = 7,2$  Hz, 1H), 7,09 (d,  $J = 9,2$  Hz, 1H), 7,63 (d,  $J = 8,3$  Hz, 2H), 7,93 (d,  $J = 8,3$  Hz, 2H).

**RMN <sup>13</sup>C** ( $\text{CDCl}_3$ , 75,5 MHz): 9,1 ( $\text{CH}_3$ ), 27,8 ( $\text{CH}_2$ ), 44,6 ( $\text{CH}_3$ ), 55,7 (CH), 61,0 ( $\text{CH}_2$ ), 66,5 (CH), 73,3 (CH), 128,0 (2CH), 128,2 (2CH), 140,9 (C), 143,6 (C) 164,6 (C), 173,8 (C).

**EMAR** (IES) calculado for  $\text{C}_{15}\text{H}_{19}\text{Cl}_2\text{NNaO}_6\text{S}$  (M): 434,0202; encontrado: 434,0241.

$[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -4,4$  (1,0  $\text{CHCl}_3$ ).

**Dados espectrais do (2'R,3'R) 1',3'-didecanoato de tianfenicol (4c)**



**R<sub>f</sub>** 0,87 (60% AcOEt/hexano).

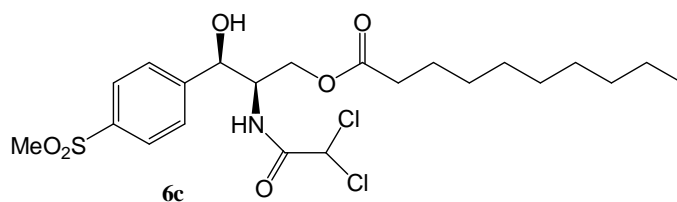
**IV** (NaCl):  $\nu$  3054, 2928, 2856, 2305, 1743, 1703, 1522, 1421, 1317, 1265, 1153  $\text{cm}^{-1}$ .

**RMN <sup>1</sup>H** ( $\text{CDCl}_3$ , 300,13 MHz): 0,88 (t,  $J = 6,8$  Hz, 6H), 1,26 (s, 24H), 1,63 (t,  $J = 4,6$  Hz, 4H), 2,35 (t,  $J = 7,7$  Hz, 2H), 2,42 (t,  $J = 7,7$  Hz, 2H), 3,05 (s, 3H), 4,10 (ddd,  $J = 5,5; 12,0; 33,0$  Hz, 2H), 4,55 – 4,62 (m, 1H), 5,86 (s, 1H), 6,05 (d,  $J = 6,0$  Hz, 1H), 6,76 (d,  $J = 9,3$  Hz, 1H), 7,55 (d,  $J = 8,2$  Hz, 2H), 7,95 (d,  $J = 8,2$  Hz, 2H).

**RMN <sup>13</sup>C** ( $\text{CDCl}_3$ , 75,5 MHz): 14,3 (2 $\text{CH}_3$ ), 22,8 (2 $\text{CH}_2$ ), 24,9 (2 $\text{CH}_2$ ), 29,3 – 29,6 (8 $\text{CH}_2$ ), 32,0 (2 $\text{CH}_2$ ), 34,2 (2 $\text{CH}_2$ ), 44,6 ( $\text{CH}_3$ ), 53,1 (CH), 62,2 ( $\text{CH}_2$ ), 66,3 (CH), 72,8 (CH), 127,9 (2CH), 128,2 (2CH), 141,3 (C), 142,7 (C), 172,7 (C), 173,5 (C).

**EMAR** (IES), calculado para  $\text{C}_{32}\text{H}_{52}\text{Cl}_2\text{NNaO}_7\text{S}$  (M): 686,2664; encontrado: 686,2656.

**Dados espectrais do (2'R,3'R) 3'-decanoato de tianfenicol (6c)**



**R<sub>f</sub>** 0,67 (60% AcOEt/hexano).

**Pf** = 85-87.

**IV** (NaCl):  $\nu$  3055, 2928, 2856, 2305, 1743, 1699, 1519, 1421, 1316, 1265, 1151 cm<sup>-1</sup>.

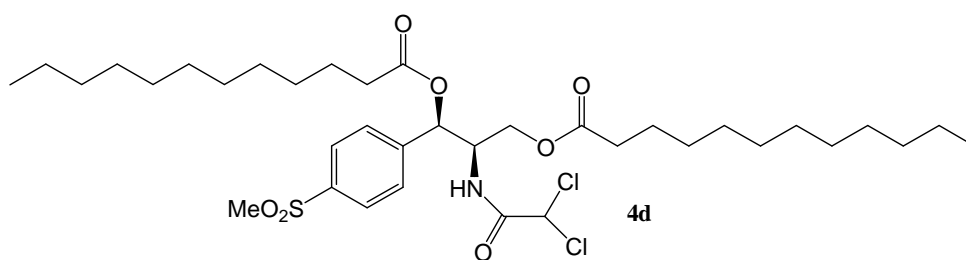
**RMN** <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 300,13 MHz): 0,88 (t, *J* = 7,1 Hz, 3H), 1,26 (s, 12H), 1,63 (t, *J* = 7,2 Hz, 2H), 2,36 (t, *J* = 7,4 Hz, 2H), 3,02 (s, 3H), 4,16 – 4,47 (m, 3H), 5,04 (s, 1H), 5,30 (s, 2H), 5,7 (s, 1H), 6,92 (d, *J* = 8,8 Hz, 1H), 7,54 (d, *J* = 8,2 Hz, 2H), 7,82 (d, *J* = 8,2 Hz, 2H).

**RMN** <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>, 75,5 MHz): 14,3 (CH<sub>3</sub>), 22,8 (CH<sub>2</sub>), 25,0 (CH<sub>2</sub>), 29,3 – 29,5 (4CH<sub>2</sub>), 32,0 (CH<sub>2</sub>), 34,3 (CH<sub>2</sub>), 44,7 (CH<sub>3</sub>), 54,4 (CH), 62,7 (CH<sub>2</sub>), 66,3 (CH), 70,9 (CH), 127,1 (2CH), 127,6 (2CH), 140,1 (C), 146,7 (C), 164,5 (C), 174,4 (C).

**HRMS** (IES), calculado para C<sub>22</sub>H<sub>33</sub>Cl<sub>2</sub>NNaO<sub>6</sub>S (M): 532,1307; encontrado: 532,1298.

[ $\alpha$ ]<sub>D</sub><sup>20</sup> = + 3,4 (0,8, CHCl<sub>3</sub>).

**Dados espectrais do (2'R,3'R) 1',3'-dilaurato de tianfenicol (4d)**



**R<sub>f</sub>** 0,75 (60% AcOEt/hexano).

**Pf** = 48-50.

**IV** (NaCl):  $\nu$  3055, 2928, 2855, 2306, 1743, 1703, 1522, 1421, 1317, 1265, 1152  $\text{cm}^{-1}$ .

**RMN <sup>1</sup>H** ( $\text{CDCl}_3$ , 300,13 MHz): 0,88 (t,  $J = 6,6$  Hz, 6H), 1,25 (s, 32H), 1,61 (s, 4H), 2,32 (t,  $J = 8,6$  Hz, 2H), 2,40 (t,  $J = 8,6$  Hz, 2H), 3,04 (s, 3H), 4,10 (ddd,  $J = 5,7; 11,7; 37,0$  Hz, 2H), 4,55 – 4,64 (m, 1H), 6,04 (d,  $J = 6,0$  Hz, 1H), 6,76 (d,  $J = 9,3$  Hz, 1H), 7,55 (d,  $J = 8,2$  Hz, 2H), 7,95 (d,  $J = 8,2$  Hz, 2H).

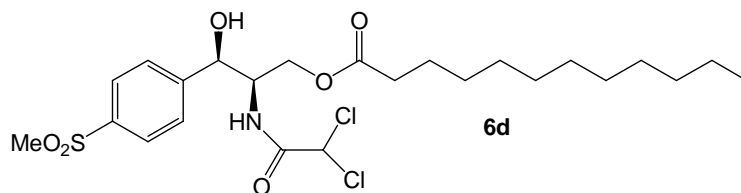
**RMN <sup>13</sup>C** ( $\text{CDCl}_3$ , 75,5 MHz): 14,2 (2 $\text{CH}_3$ ), 22,8 (2 $\text{CH}_2$ ), 24,9 (2 $\text{CH}_2$ ), 29,2 – 29,6 (12 $\text{CH}_2$ ), 32,0 (2 $\text{CH}_2$ ), 34,2 (2 $\text{CH}_2$ ), 44,6 ( $\text{CH}_3$ ), 53,1 (CH), 62,2 ( $\text{CH}_2$ ), 66,2 (CH), 72,8 (CH), 127,9 (2CH), 128,1 (2CH), 141,2 (C), 142,8 (C), 164,2 (C), 172,7 (C), 173,5 (C);

**EMAR** (IES), calculado para  $\text{C}_{36}\text{H}_{59}\text{Cl}_2\text{NNaO}_7\text{S}$  (M): 742,3294; encontrado: 742,3282.

**$[\alpha]_{\text{D}}^{20}$**  = - 0,64 (1,0  $\text{CHCl}_3$ ).



### Dados espectrais do (2'R,3'R) 3'-laurato de tianfenicol (6d)



**R<sub>f</sub>** 0,47 (60% AcOEt/hexano).

**Pf** = 94-96.

**IV** (NaCl):  $\nu$  3055, 2928, 2855, 2306, 1733, 1699, 1519, 1421, 1316, 1265, 1151  $\text{cm}^{-1}$ .

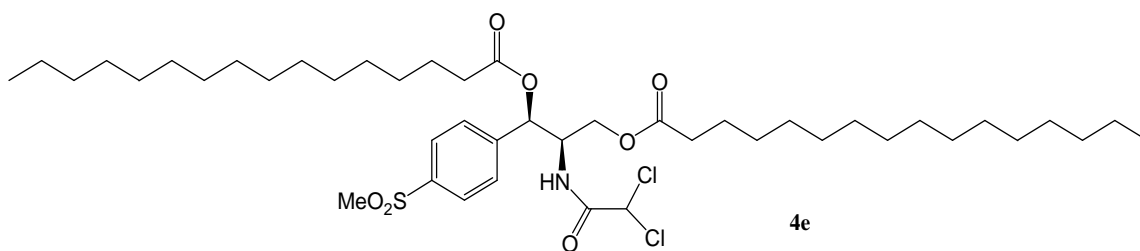
**RMN <sup>1</sup>H** ( $\text{CDCl}_3$ , 300,13 MHz): 0,88 (t,  $J = 7,2$  Hz, 3H), 1,26 (s, 16H), 1,63 (t,  $J = 7,2$  Hz, 2H), 2,35 (t,  $J = 7,6$  Hz, 2H), 3,0 (s, 3H), 4,17 – 4,44 (m, 3H), 5,04 (s, 1H), 5,78 (s, 1H), 6,97 (d,  $J = 8,7$  Hz, 1H), 7,52 (d,  $J = 8,2$  Hz, 2H), 7,77 (d,  $J = 8,2$  Hz, 2H).

**RMN <sup>13</sup>C** ( $\text{CDCl}_3$ , 75,5 MHz): 14,3 ( $\text{CH}_3$ ), 22,8 ( $\text{CH}_2$ ), 25,0 ( $\text{CH}_2$ ), 29,3 – 29,8 (6 $\text{CH}_2$ ), 32,1 ( $\text{CH}_2$ ), 34,3 ( $\text{CH}_2$ ), 44,7 ( $\text{CH}_3$ ), 54,4 (CH), 62,9 ( $\text{CH}_2$ ), 66,3 (CH), 70,9 (CH), 127,1 (2CH), 127,5 (2CH), 139,8 (C), 147,0 (C), 174,4 (C).

**EMAR** (IES), calculado para  $\text{C}_{24}\text{H}_{37}\text{Cl}_2\text{NNaO}_6\text{S}$  (M): 560,1639; encontrado: 560,1611.

$[\alpha]_{\text{D}}^{20} = + 0,62$  (1,0  $\text{CHCl}_3$ ).

### Dados espectrais do (2'*R*,3'*R*) 1',3'-dipalmitato de tianfenicol (4e)



**R<sub>f</sub>** 0,86 (60% AcOEt/hexano).

**Pf** = 47-49.

**IR** (NaCl):  $\nu$  3054, 2927, 2854, 2306, 1743, 1703, 1522, 1466, 1317, 1265, 1153  $\text{cm}^{-1}$ .

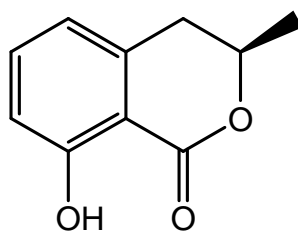
**RMN <sup>1</sup>H** ( $\text{CDCl}_3$ , 300,13 MHz): 0,87 (t,  $J = 6,7$  Hz, 6H), 1,24 (s, 48H), 1,61 (s, 4H), 2,32 (t,  $J = 8,6$  Hz, 2H), 2,42 (t,  $J = 8,6$  Hz, 2H), 3,04 (s, 3H), 4,10 (ddd,  $J = 6,1; 12,0; 35,0$  Hz, 2H), 4,55 – 4,64 (m, 1H), 5,86 (s, 1H), 6,04 (d,  $J = 6,0$  Hz, 1H), 6,83 (d,  $J = 9,3$  Hz, 1H), 7,55 (d,  $J = 8,2$  Hz, 2H), 7,93 (d,  $J = 8,2$  Hz, 2H).

**RMN <sup>13</sup>C** ( $\text{CDCl}_3$ , 75,5 MHz): 14,2 (2 $\text{CH}_3$ ), 22,8 (2 $\text{CH}_2$ ), 24,9 (2 $\text{CH}_2$ ), 29,2 – 29,6 (12 $\text{CH}_2$ ), 32,0 (2 $\text{CH}_2$ ), 34,2 (2 $\text{CH}_2$ ), 44,6 ( $\text{CH}_3$ ), 53,1 (CH), 62,2 ( $\text{CH}_2$ ), 66,2 (CH), 72,8 (CH), 127,9 (2CH), 128,1 (2CH), 141,2 (C), 142,8 (C), 164,2 (C), 172,7 (C), 173,5 (C);

**EMAR** (IES), calculado para  $\text{C}_{44}\text{H}_{75}\text{Cl}_2\text{NNaO}_7\text{S}$  (M): 854,4555; encontrado: 854,4534.

**$[\alpha]_D^{20}$**  = - 1,6 (1,0  $\text{CHCl}_3$ ).

Dados espectrais da meleína ((*R*)-3,4-dihidro-8-hidroxi-3-metilisocromen-1-ona)

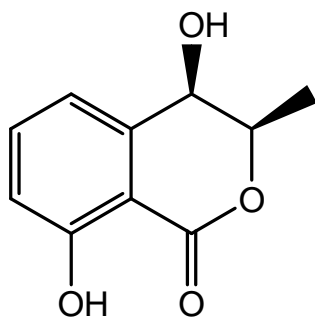


IV (KBr):  $\nu$  2919, 2852, 1674, 1618, 1674, 1464, 1233, 823  $\text{cm}^{-1}$ .

RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz): 1.54 (d,  $J = 6,5$  Hz, 3H), 2.94 (d,  $J = 10,0$  Hz, 2H), 4.71 (m, 1H), 6.93 (d,  $J = 7,3$  Hz, 1H), 7.04 (dd,  $J = 8,5; 1,0$  Hz, 1H), 7.42 (m, 1H), 11.0 (s, 1H).

RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 125 MHz): 21,0 ( $\text{CH}_3$ ), 34,8 ( $\text{CH}_2$ ), 76,3 (CH), 108,5 (C), 116,5 (CH), 118,1 (CH), 136,4 (CH), 139,6 (C), 162,4 (C), 170,2 (C).

Dados espectrais da *cis* 4-hidroxiemeína ((3*R*,4*R*)-3,4-dihidro-4,8-dihidroxi-3-metilisocromen-1-ona)



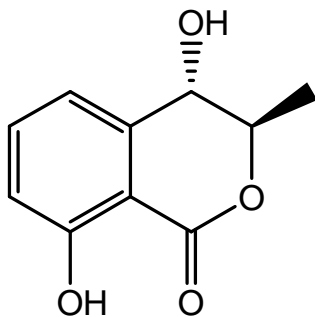
IV (KBr):  $\nu$  3402, 2938, 1971, 1654, 1487, 1240, 1051, 821  $\text{cm}^{-1}$ .

**RMN  $^1\text{H}$**  ( $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz): 1,60 (d,  $J = 6,5$  Hz, 3H), 4,59 (d,  $J = 2,0$  Hz 1H), 4,71 (qd,  $J = 6,5$ ; 1,0 Hz, 1H), 6,93 (d,  $J = 7,0$  Hz, 1H), 7,04 (dd,  $J = 8,5$ ; 1,0 Hz, 1H), 7,54 (dd,  $J = 7,0$ , 8,5 Hz, 1H), 11,0 (s, 1H).

**RMN  $^{13}\text{C}$**  ( $\text{CDCl}_3$ , 125 MHz): 16,3 ( $\text{CH}_3$ ), 67,5 (CH), 78,4 (CH), 107,1 (C), 118,5 (CH), 118,8 (CH), 137,0 (CH), 140,7 (CH), 162,3 (CH), 169,4 (CH).

**EM-ES** 195,5 ( $[\text{M} + \text{H}]^+$ ), 177,5 (100), 149,5 (92), 131,5 (16), 121,5 (14), 103,5 (12).

Dados espectrais de *trans* 4-hidroximeleína ((3*R*,4*S*)-3,4-dihidro-4,8-dihidroxi-3-metilisocromen-1-ona).

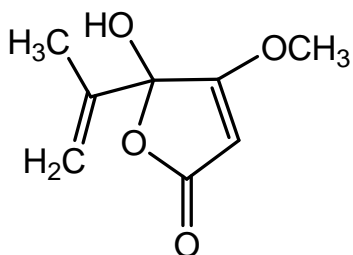


**RMN <sup>1</sup>H** (CDCl<sub>3</sub>, 500 MHz): 1,52 (d, *J* = 5,5 Hz, 3H), 4,60 (m, 1H), 4,71 (m, 1H), 7,0 (d, *J* = 8,5 1H), 7,04 (d, *J* = 8,5 1H), 7,54 (m, 1H), 11,0 (s 1H).

**RMN <sup>13</sup>C** (CDCl<sub>3</sub>, 125 MHz): 17,9 (CH<sub>3</sub>), 69,2 (CH), 80,0 (CH), 106,7 (C), 116,3 (CH), 116,8 C(5), 136,9 (CH), 141,2 (C), 162,0 (C), 169,5 (C).

**EM-ES** 195,5 ([M + H]<sup>+</sup>), 177,5 (23), 149,5 (100), 131,5 (7), 121,5 (4), 103,5 (8).

Dados espectrais do ácido penicílico (5-hidroxi-4-metoxi-5-(prop-1-en-2-il)furan-2(5H)-ona).



**IV** (KBr):  $\nu$  3114, 1714, 1635, 1456, 1230, 1060, 827  $\text{cm}^{-1}$ .

**RMN  $^1\text{H}$**  ( $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz): 4,95 (s, 1H), 5,19 (s, 1H); 5,47 (s, 1H), 1,75 (s, 3H).

**RMN  $^{13}\text{C}$**  ( $\text{CDCl}_3$ , 125 MHz): 17,5 ( $\text{CH}_3$ ), 89,4 (CH), 103,3 C(4), 118,5 ( $\text{CH}_2$ ), 139,6 C(6), 179,7 C(1).

**EM-ES** 171,1 (100  $[\text{M} + \text{H}]^+$ ), 153,1 (21), 125,1 (25).

#### 4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AIELLO, A.; FATTORUSSO, E.; LUCIANO, P.; MACHO, A.; MENNA, M.; MUNOZ, E., *J. Med. Lett.* 48, 3410, **2005a**.
- AIELLO, A.; FATTORUSSO, E.; LUCIANO, P.; MANGONI, A.; MENNA, M., *Eur. J. Org. Chem.* 23, 5024, **2005b**.
- AIELLO, A.; FATTORUSSO, E.; LUCIANO, P.; MENNA, M.; ESPOSITO, G.; IUVONE, T.; PALA, D., *Eur. J. Org. Chem.* 5, 898, **2003**.
- ASHA, K. N.; CHOWDHURY, R.; HASAN, C. M.; RASHID, M. A., *Acta Pharm.*, 54, 57, **2004**.
- BANDO, M.; HASEGAWA, M.; TSUBOI, Y.; MIYAKE, Y.; SHIINA, M.; ITO, M.; HANDA, H.; NAGAI, K.; KATAOKA, T., *J. Biol. Chem.*, 278, 5786, **2003**.
- CAMARDA, L.; MERLINI, L.; NASINI, G.; *Phytochemistry*, 15: 537, **1976**.
- CHEN, Z. G.; TAN, R. X.; HUANG, M.; *Process Biochem* 45, 415, **2010**.
- COLE, R. J.; MOORE, J. H.; DAVIS, N. D.; KIRKSEY, J. W.; DIENER, U. L.; *J. Agr. Food. Chem.*, 19, 909, **1971**.
- DAUGS, E. D., *Org. Process. Res. Dev.*, 4, 301, **2000**.
- DELGADO, S.; NÚÑEZ, F.; SÁNCHEZ, B.; BERMÚDEZ, E.; RODRÍGUEZ, J. M., *Food Res. Int.*, 44, 304, **2011**.
- DICKENS, F.; JONES, H. E. H., *Brit. J. Cancer*, 15, 85, **1961**.
- DIMITRIADIS, C.; GILL, M.; HARTE, M. F., *Tetrahedron-Asymmetr.* 8, 13, 2153, **1997**.
- DONG, Z.; ZHENG, Z. H.; LU C. H.; SHEN Y. M., *Chin. J. Nat. Med.*, 8, 370, **2010**.
- EL-KERSH, T. A.; PLOURDE, J. R., *J. Antibiot.*, 292, **1976**.
- ERDOGAN, A.; GURSES, M.; SERT, S., *Int. J. Food. Microbiol.*, 85, 83, **2003**.
- ESCAICH S., *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 12, 400, **2008**.
- FABER, K.; *Biotransformations in Organic Chemistry*; 4<sup>o</sup> ed.; Spring; Berlin; **2000**.
- FILICE, M.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; TERRENI, M.; GUIBAN, J. M.; PALOMO, J. M., *J. Mol. Catal. B-Enzym.* 49, 12, **2007**.
- FRISVAD, J. C.; FILTENBORG, O., *Appl. Environ. Microbiol.* 46, 1301, **1983**.

FRISVAD, JENS C.; FRANK, J. M.; HOUBRAKEN, J. A. M. P.; KUIJPERS, A. F.A.; SAMSON, R. A. *Stud. Mycol.*, 50, 23, **2004**.

GARCÍA, J.; FERNÁNDEZ, S.; FERRERO, M.; SANGHVI, Y .S.; GOTOR, V., *J. Org. Chem.* 67, 4513, **2002**.

GEORGE, S.; NARINA S. V.; SUDALAI, *Tetrahedron*, 62, 10202, **2006**.

GHASEMI, Y.; RASOUL-AMINI, S.; KAZEMI, A.; ZARRINI, G.; MOROWVAT, M. H.; KARGAR, M., *Microbiology*, 80, 4, 483, **2011**.

GOTOR, V., ALFONSO, I., GARCIA-URDIALES, E.; *Asymmetric Organic Synthesis with Enzymes*; 1<sup>a</sup> Ed.; WILEY-VCH Verlag GmbH and Co. KGaA; Weinheim; **2008**.

GOTOR-FERNÁNDEZ, V.; BRIEVA, R.; GOTOR, V., *J. Mol. Catal. B-Enzym.*, 40, 111, **2006**.

GREGORY, P.H., *The Microbiology of the Atmosphere*. London, UK: Leonard Hill (Books) Ltd, **1973**.

HAJRA, S.; KARMAKAR, A.; MAJI T.; MEDDA, A. K., *Tetrahedron*, 62, 8959, **2006**.

HE, J.; WIJERATNE, E. M. K.; BASHYAL, B. P.; ZHAN, J.; SELIGA, C. J.; LIU, M. X.; PIERSON, E. E.; PIERSON, L. S.; VANETTEN, H. D.; GUNATILAKA, A. A. L. *J. Nat. Prod.*, 67, 1985, **2004**.

HOLKER, J. S. E.; SIMPSON, T. J., *J. Chem. Soc. Perk. T. 1*, 1397, **1981**.

HUDLICKY, T.; REED, J. W., *Chem. Soc. Rev.*, 38, 3117, **2009**.

JONES, E. B. G.; SAKAYAROJ, J.; SUETRONG, S.; SOMRITHIPOL, S.; PANG, K. L., *Fungal Diversit.*, 35, 1, **2009**.

KANG, S. W.; KIM, S. W., *Biotech. Let.* 26, 695, **2004**.

KANG, S. W.; PARK, C. H.; HONG, S. I.; KIM, S. W., *Bioresource Technol.*, 98, 191, **2007**.

KIJJOA, A.; SAWANGWONG P., *Mar. Drugs* 73, **2004**.

KIM, P. Y.; POLLARD, D. J.; WOODLEY, J. M., *Biotechnol. Progr.*, 23, 74, **2007**.

KIMMEL, J. L.; TIPTON, P. A., *Arch. Biochem. Biophys.*, 441, 132, **2005**.

KOHLMEYER, J.; KOHLMEYER, E., *Marine Mycology: The Higher Fungi*, Academic Press, New York, **1979**.

KOKKONEN, M.; JESTOI, M.; RIZZO, A., *Int. J. Food. Microbiol.*, 99, 207, **2005**.



- KOMAGATA, D.; FUJITA, S.; YAMASHITA, N.; SAITO, S.; MORINO, T., *The Journal of Antibiotics*, 49, 958, **1996**.
- KUMAR, V.; BASU, M. S.; RAJENDRAN, T. P., *Crop Prot.*, 27, 891, **2008**.
- LAWEN, A.; MARTINUS, R. D.; MCMULLEN, G. L.; NAGLEY, P.; VAILLANT, F.; WOLVETANG, E. J.; LINNANE, A. W., *Mol. Aspects. Med.* 15, 13, **1994**.
- LIU, J. Y.; HUANG, L. L.; YE, Y. H.; ZOU, W. X.; GUO, Z. J.; TAN, R. X., *J. Appl. Microbiol.*, 100, 195, **2006**.
- LU, W. A.; CHEN, P.; LIN, G., *Tetrahedron*, 64, 7822, **2008**.
- MALMSTRØM, J.; CHRISTOPHERSEN, C.; FRISVAD, J. C., *Phytochemistry*, 54, 301, **2000**.
- MARTÍNEZ-LUIS, S.; GONZÁLEZ, M. C.; ULLOA, M.; MATA, R., *Phytochemistry*, 66, 1012, **2005**.
- MENEZES, C. B. A.; BONUGLI-SANTOSA, R. C.; MIQUELETTO, P. B.; PASSARINI, M. R. Z.; SILVA, C. H. D.; JUSTOA, M. R.; LEALA, R. R.; FANTINATTI-GARBOGGINI, F.; OLIVEIRA, V. M.; BERLINCK, R. G. S.; SETTE, L. D., *Microbiol. Res.* 165, 466, **2010**.
- MENNA, M., *Phytochem. Rev.* 8, 461, **2009**.
- MISLIVEC, P. B.; DIETER, C. T.; BRUCE, V. R., *Mycologia*, 67, 1187, **1975**.
- MOTOHASHI, K.; HASHIMOTO, J.; INABA, S.; KHAN, S. T.; KOMAKI, H.; NAGAI, A.; TAKAGI, M.; SHIN-YA, K., *J. Antibiot.*, 62, 274, **2009**.
- NAZIR, N.; KOUL, S.; QURISHI, M. A.; TANEJA, S. C.; QAZI, G. N., *J. Mol. Catal. B-Enzym.* 59, 121, **2009**.
- NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M., *Curr. Med. Chem.* 11, 1693, **2004**.
- NIELSEN, K. F., *Fungal Genet. Biol.*, 39, 103, **2003**.
- NOONIM, P.; MAHAKARNCHANAKUL, W.; NIELSEN, K. F.; FRISVAD, J. C.; SAMSON, R. A., *Int. J. Food. Microbiol.*, 128, 197, **2008**.
- OH, H.; JENSEN, P. R.; MURPHY, B. T.; FIORILLA, C.; SULLIVAN, J. F.; RAMSEY, T.; FENICAL, W., *J. Nat. Prod.*, 73, 998, **2010**.
- OTOLINA G.; CARRIEA G.; RIVA S., *J. Org. Chem.*, 55, 2366, **1990**.
- OVERY, D. P. & FRISVAD, J. C., *System. Appl. Microbiol.*, 26, 631, **2003**.
- PATEL, R. N., *Coordin. Chem. Rev.*, 252, 659, **2008**.

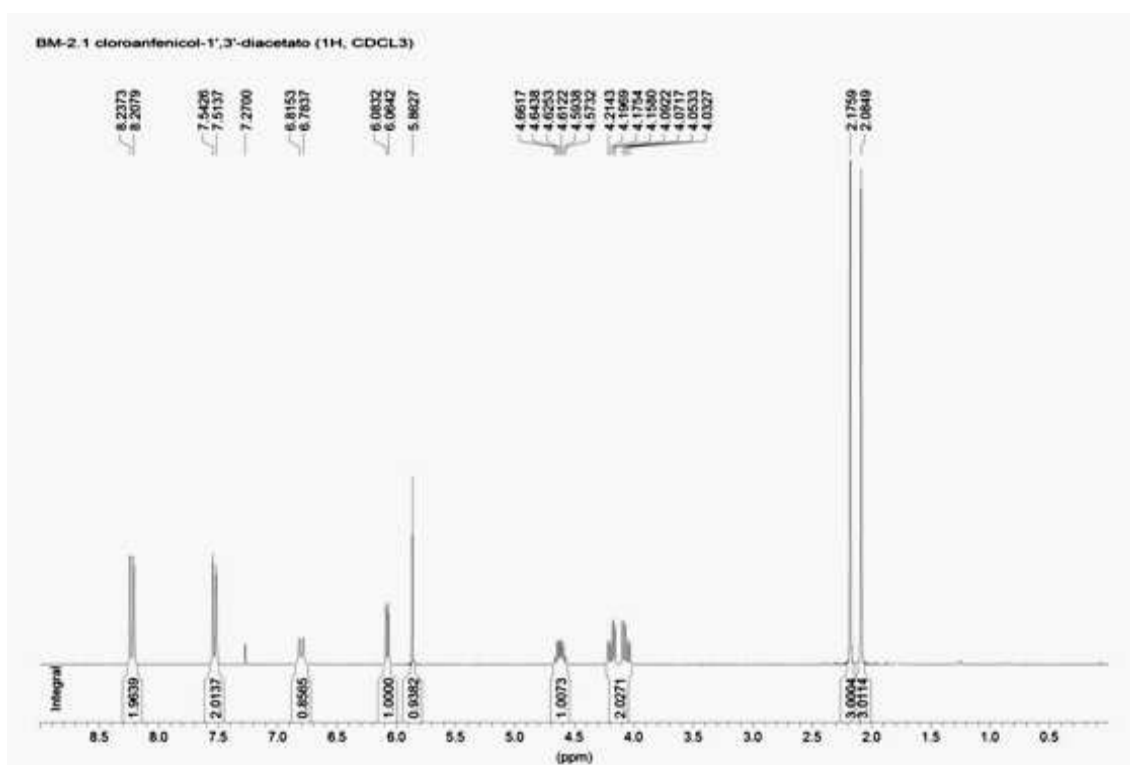
- PAUL, V. J.; RITSON-WILLIAMS R.; SHARP, K., *Nat. Prod. Rep.*, 28, 345, **2011**.
- RATEB, M. E., EBEL, R., *Nat. Prod. Rep.*, 28, 290, **2011**.
- RUESS, L.; HAGGBLOM, M. M.; GARCÍA ZAPATA, E. J.; DIGHTON, J., *Soil Biol. Biochem.*, 34, 745, **2002**.
- RUNDBERGET, T.; SKAAR, I.; FLAØYEN A., *Int. J. Food. Microbiol.*, 90, 181, **2004**.
- SAMSON, R. A.; FRISVAD, J. C., *Stud. Mycol.*, 49, 01, **2004**.
- SCHÜRMAN, B. T. M.; SALLUM, W. S. T.; TAKAHASHI J. A., *Quim. Nova*, 33, 1044, **2010**.
- SEBRÃO, D.; SÁ, M. M.; NASCIMENTO, M. G., *Process Biochem* 46, 551, **2011**.
- SHAN, R.; ANKE, H.; STADLER, M.; STEMER, O., *Tetrahedron*, 52, 10249, **1996**.
- SHAW, W. V., *J. Biol. Chem.*, 25, 687, **1967**.
- SHI, Y. Z.; CHEN, Z. C.; WANG, N.; WU, Q.; LIN, X. F., *Chinese Chem. Lett.*, 16, 45, **2005**.
- SOLARES, L. F.; BRIEVA, R.; QUIRÓS, M.; LLORENTE, I.; BAYOD, M.; GOTOR, V., *Tetrahedron: Asymmetry* 15, 341, **2004**.
- STOEV, S. D.; VITANOV, S.; ANGUELOV, G.; PETKOVA-BOCHAROVA, T.; CREPPY, E. E., *Vet. Res. Commun.*, 25, 205, **2001**.
- STOEV, S.; DENEV, S.; DUTTON, M.; NKOSI, B. *Open Toxicol. J.*, 2, 1, **2009**.
- SUZUKI, S.; KIMURA, T.; SAITO, F.; ANDO, K., *Agr. Biol. Chem.*, 35, 287, **1971**.
- TAKAHASHI, J. A.; MONTEIRO DE CASTRO, M. C.; SOUZA, G. G.; LUCAS, E. M. F.; BRACARENSE, A. A. P.; ABREU, L. M.; MARRIEL, I. E.; OLIVEIRA, M. S.; FLOREANO, M. B.; OLIVEIRA, T. S., *J. Mycol. Med.*, 18, 198, **2008**.
- TENG, R.W.; MCMANUS, D.; AYLWARD, J.; OGBOURNE, S.; JOHNS, J.; PARSONS, P.; BACIC, A., *Fitoterapia* 80, 233, **2009**.
- VILLENEUVE, P., *Biotechnol. Adv.*, 25, 515, **2007**.
- WANG, C. H.; GUAN, Z.; HE, Y. H., *Green Chem.*, 13, 2048, **2011**.
- WANG, G. Y. S.; BORGESON, B. M.; CREWS, P., *Tetrahedron letters*, 49, 8449, **1997**.

WATANABE, N.; OTA Y.; MINODA, Y.; YAMADA, K., *Agric. Biol. Chem.*, 41, 1353, **1977**.

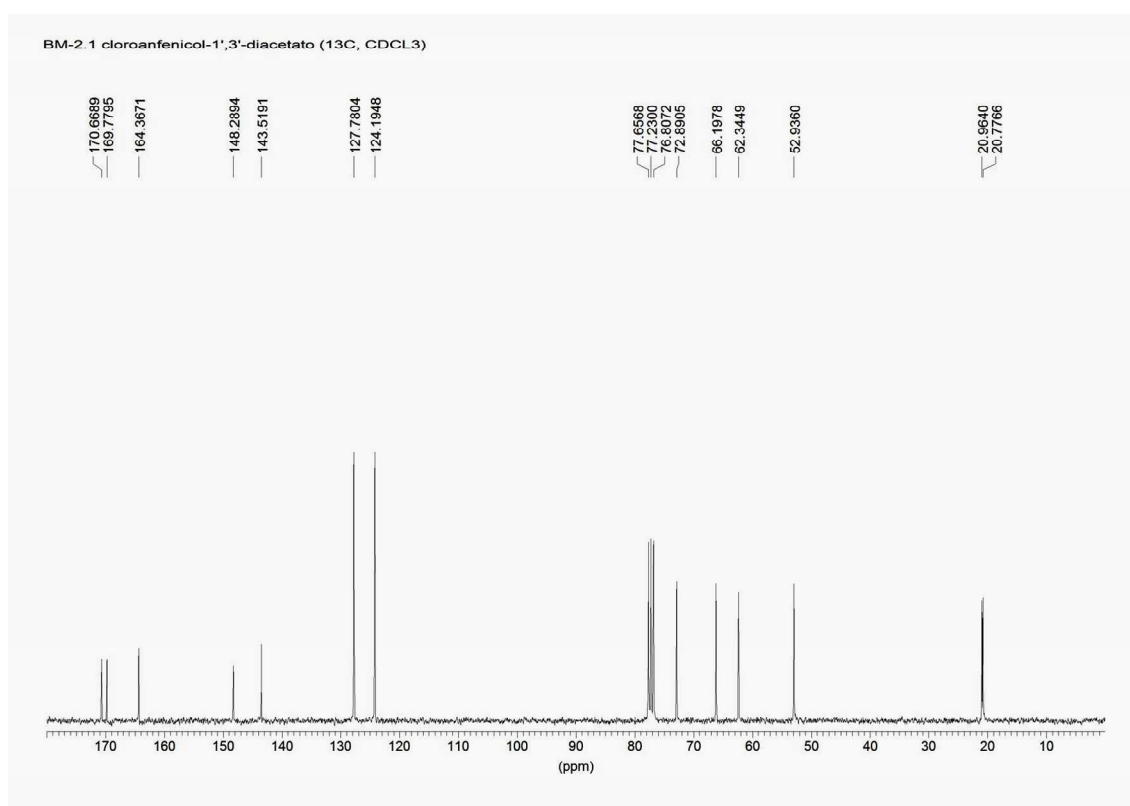
WOODLEY, J. M., *Trends Biotechnol.*, 26 (6), 321, **2009**.

XU, J. Z.; TAKASAKI, A.; KOBAYASHI, H.; ODA, T.; YAMADA, J.; MANGINDAAN, R. E. P.; UKAI, K.; NAGAI AND, H.; NAMIKOSHI, M., *J. Antibiot.*, 59, 451, **2006**.

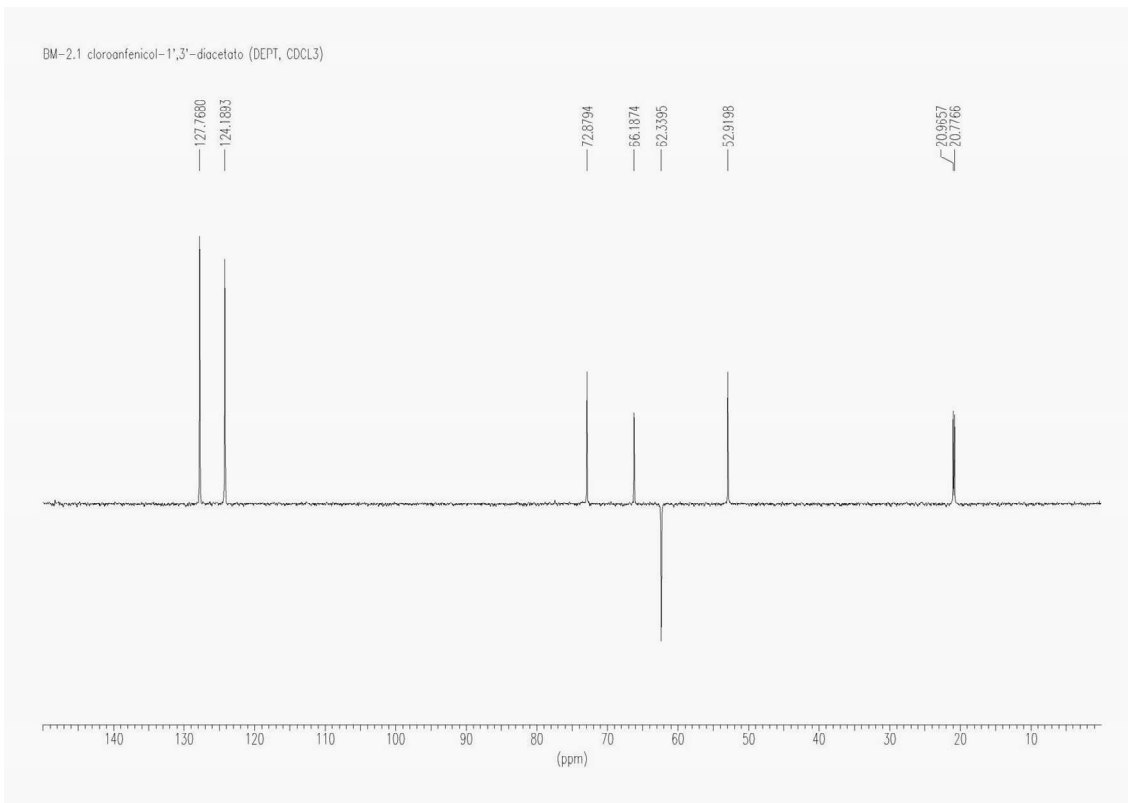
## ANEXOS



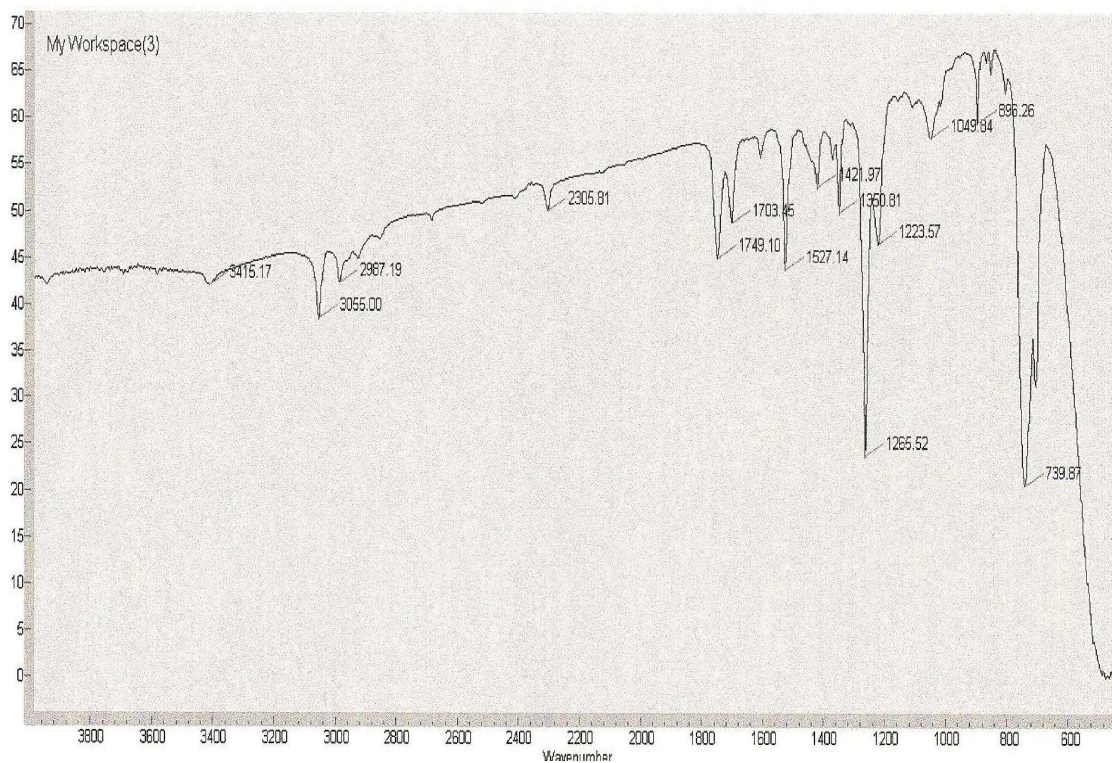
Anexo 1 – Espectro de RMN <sup>1</sup>H de **1a**, CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz



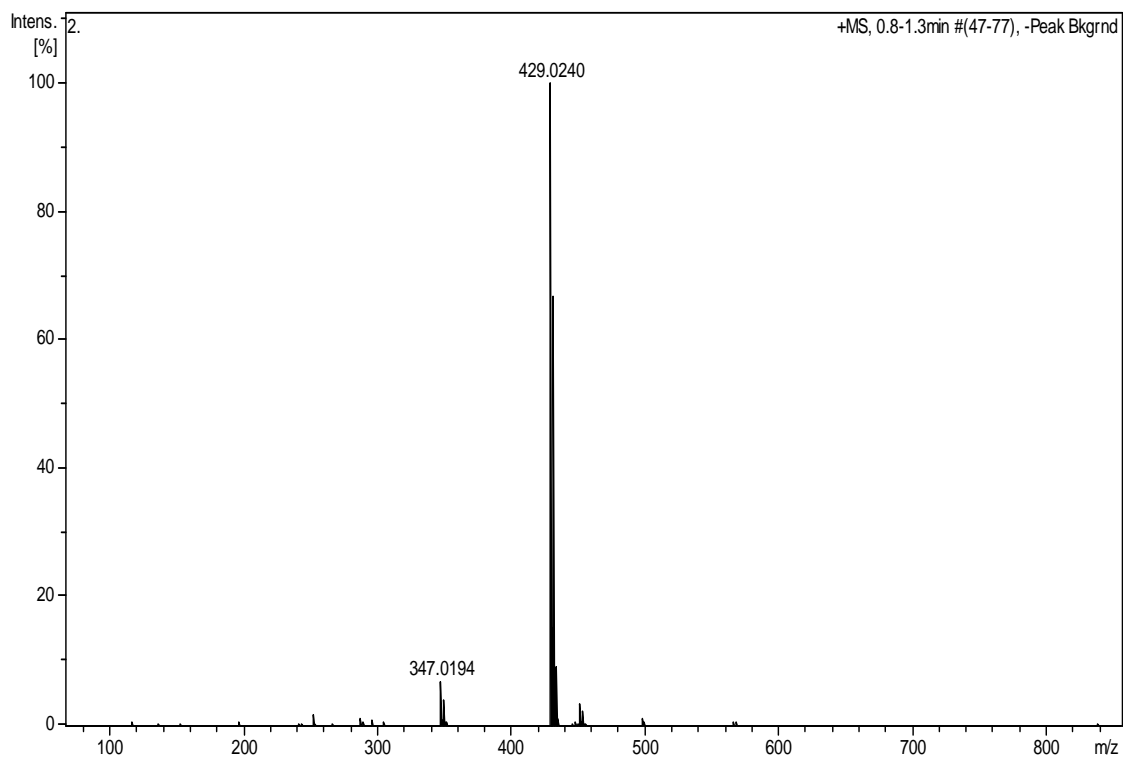
Anexo 2 – Espectro de RMN <sup>13</sup>C-BB de **1a**, CDCl<sub>3</sub>, 73 MHz



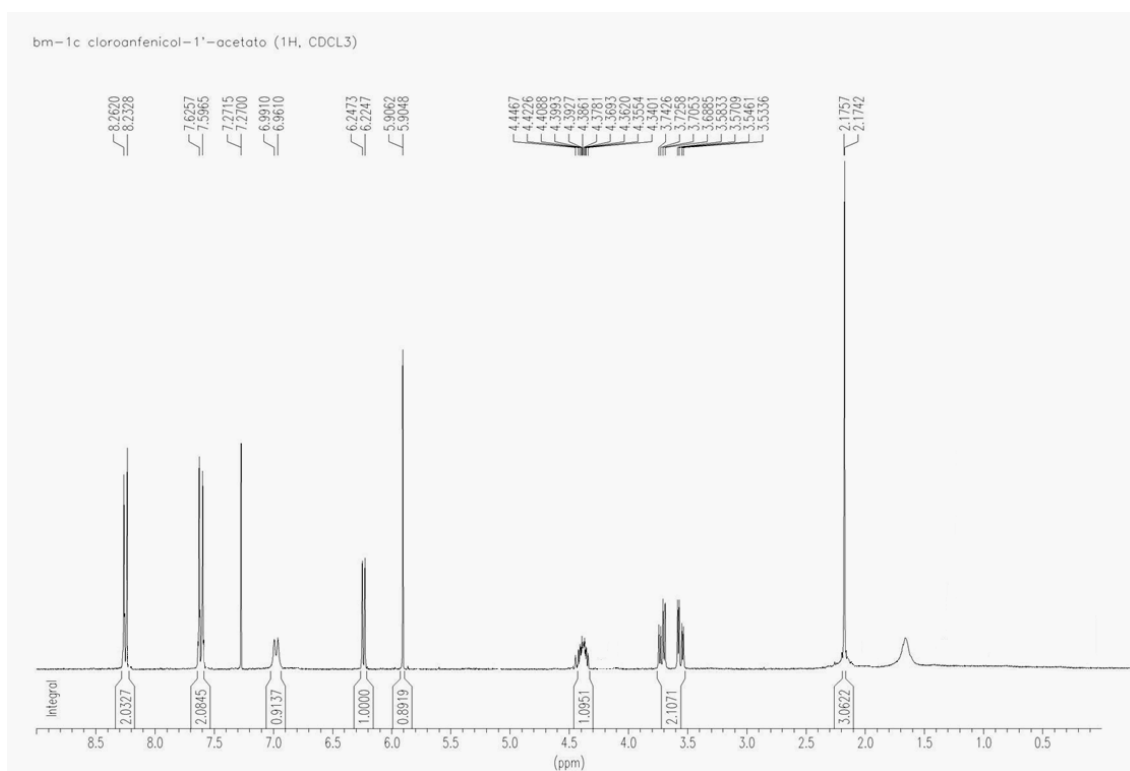
Anexo 3 – Espectro de RMN 13C-DEPT 135 de **1a**, CDCl<sub>3</sub>, 75 MHz



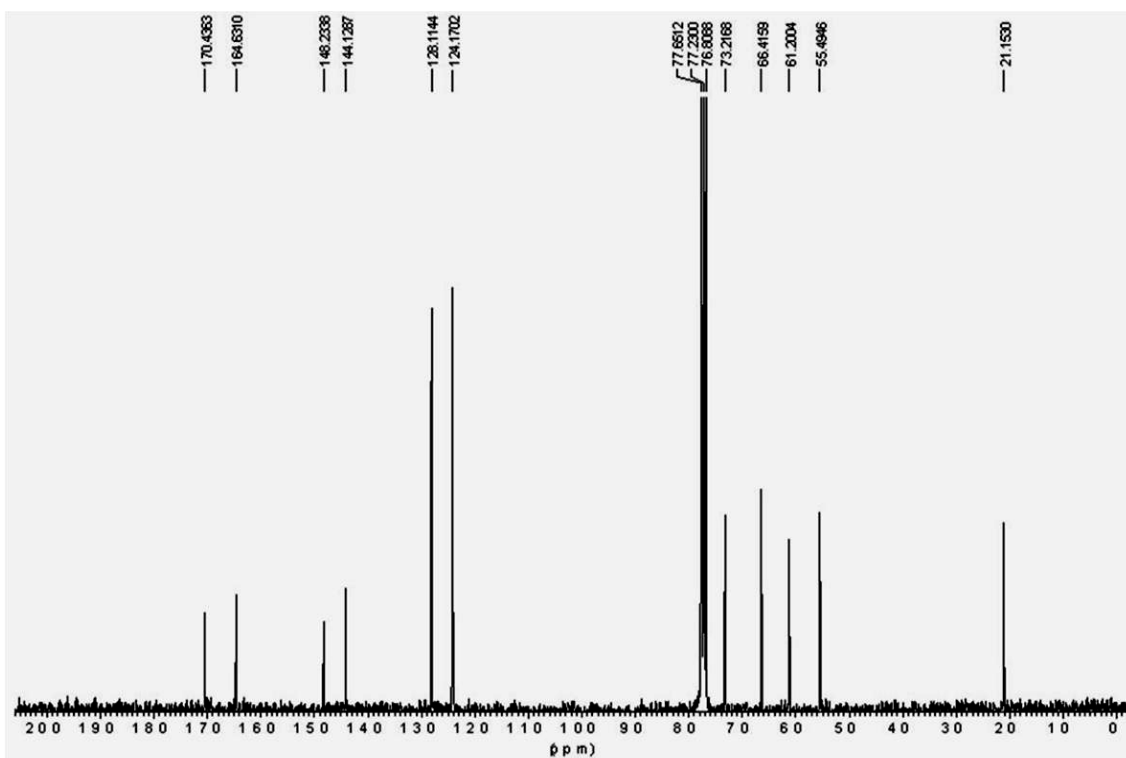
Anexo 4 – Espectro de IV de **1a**, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>.



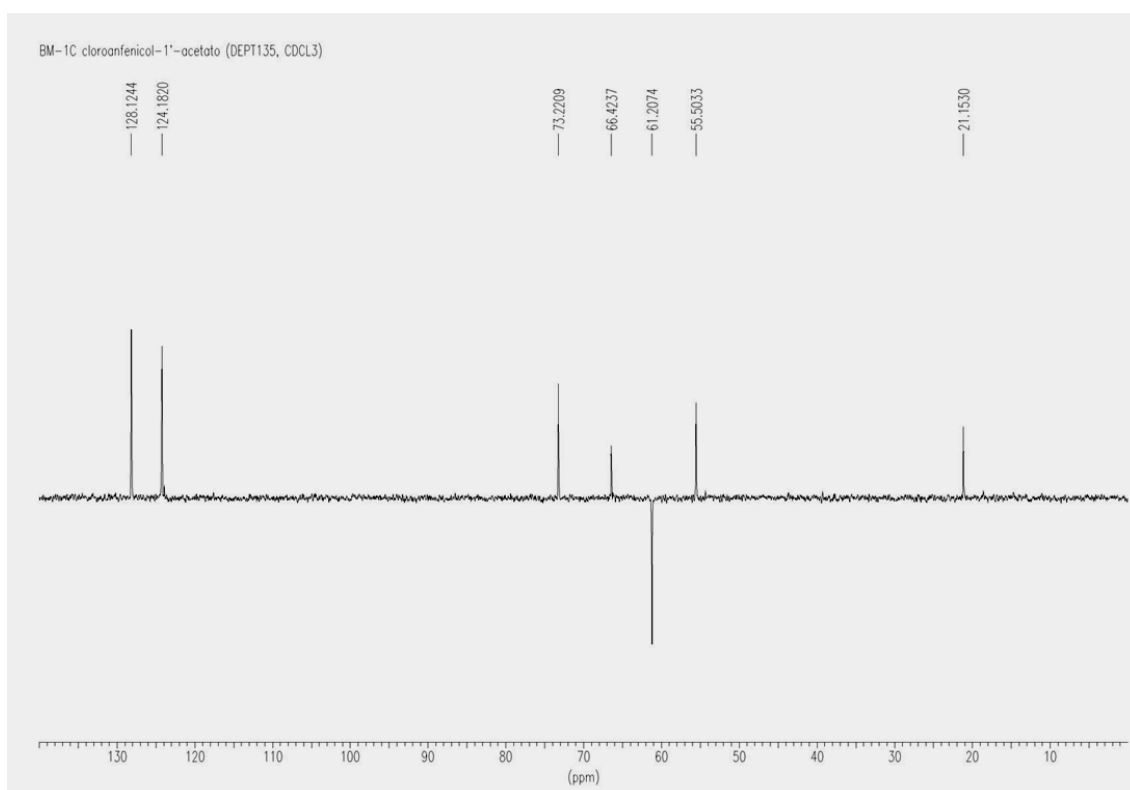
Anexo 5 – Espectro de massa exata de **1a**.



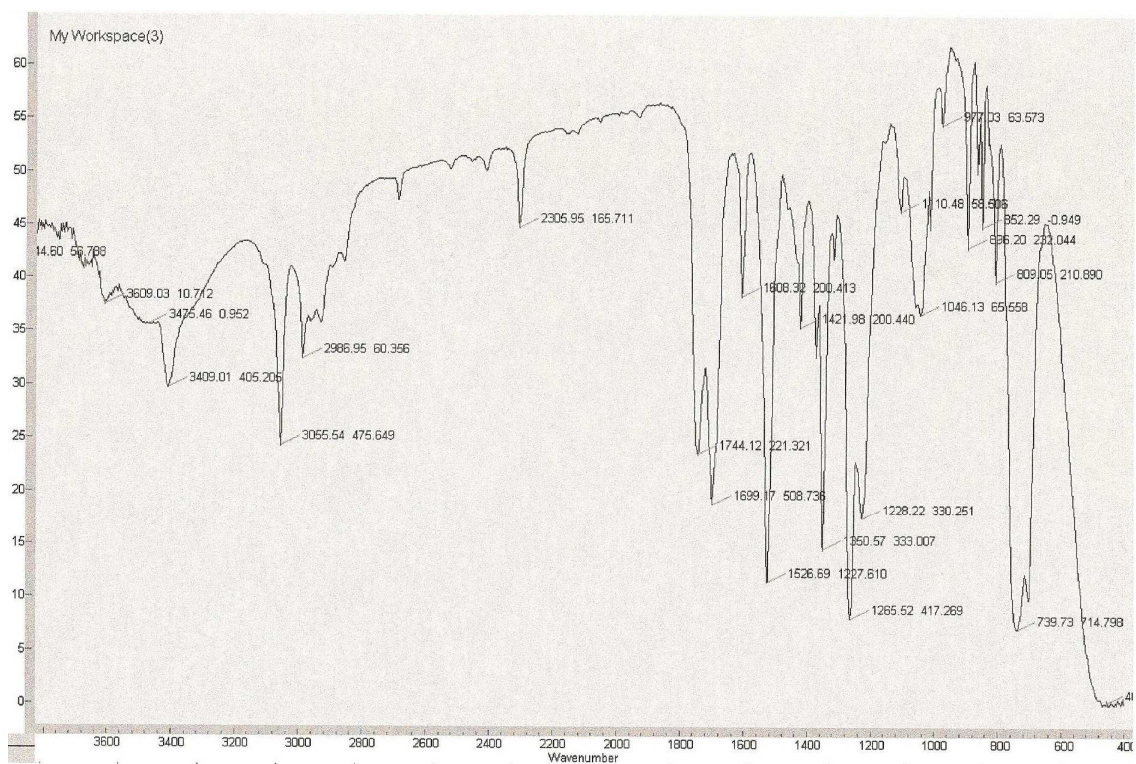
Anexo 6 – Espectro de RMN 1H de **2a**, CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz



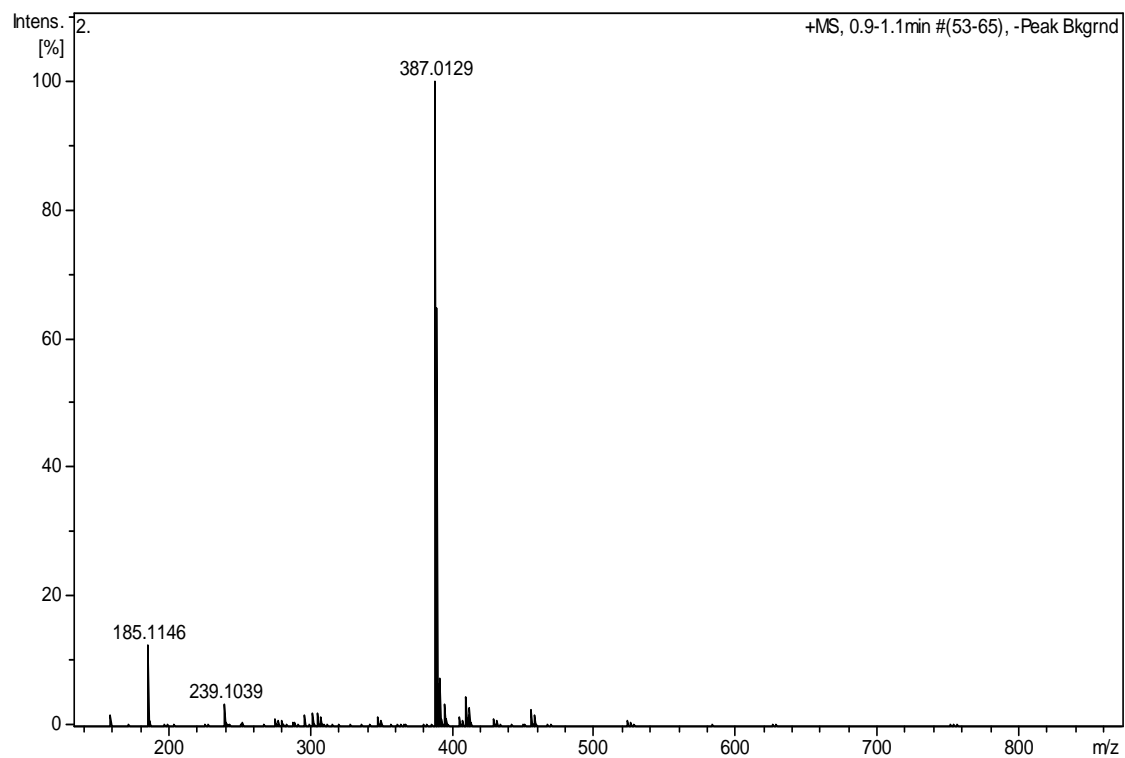
Anexo 7 – Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$ -BB de **2a**,  $\text{CDCl}_3$ , 75 MHz



Anexo 8 – Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$ -DEPT 135 de **2a**,  $\text{CDCl}_3$ , 75 MHz

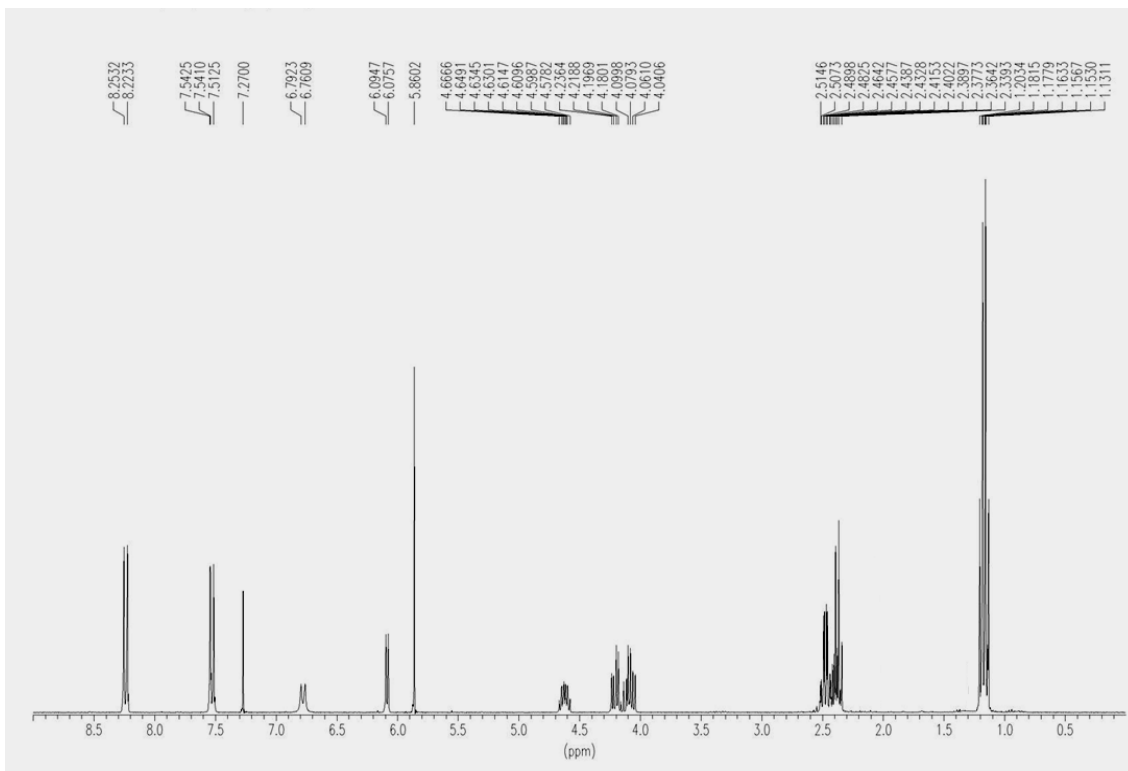


Anexo 9 - Espectro de IV de **2a**, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>.

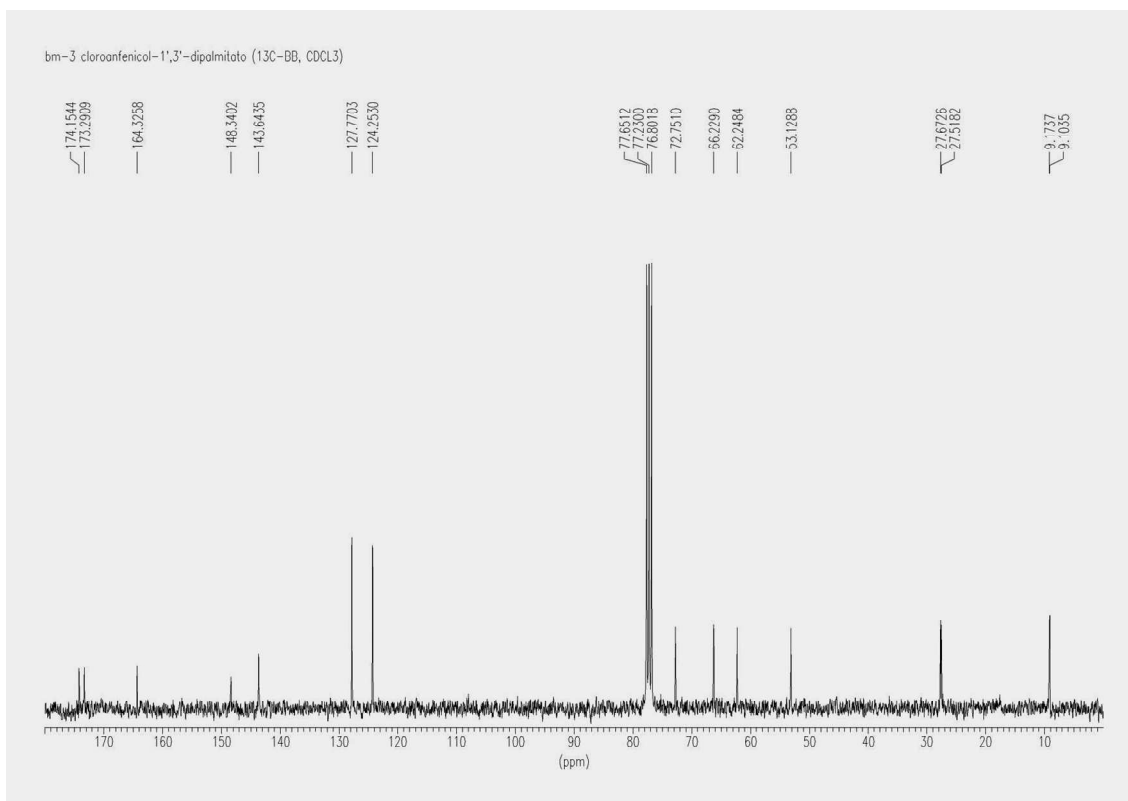


Anexo 10 - Espectro de massa exata de **2a**.

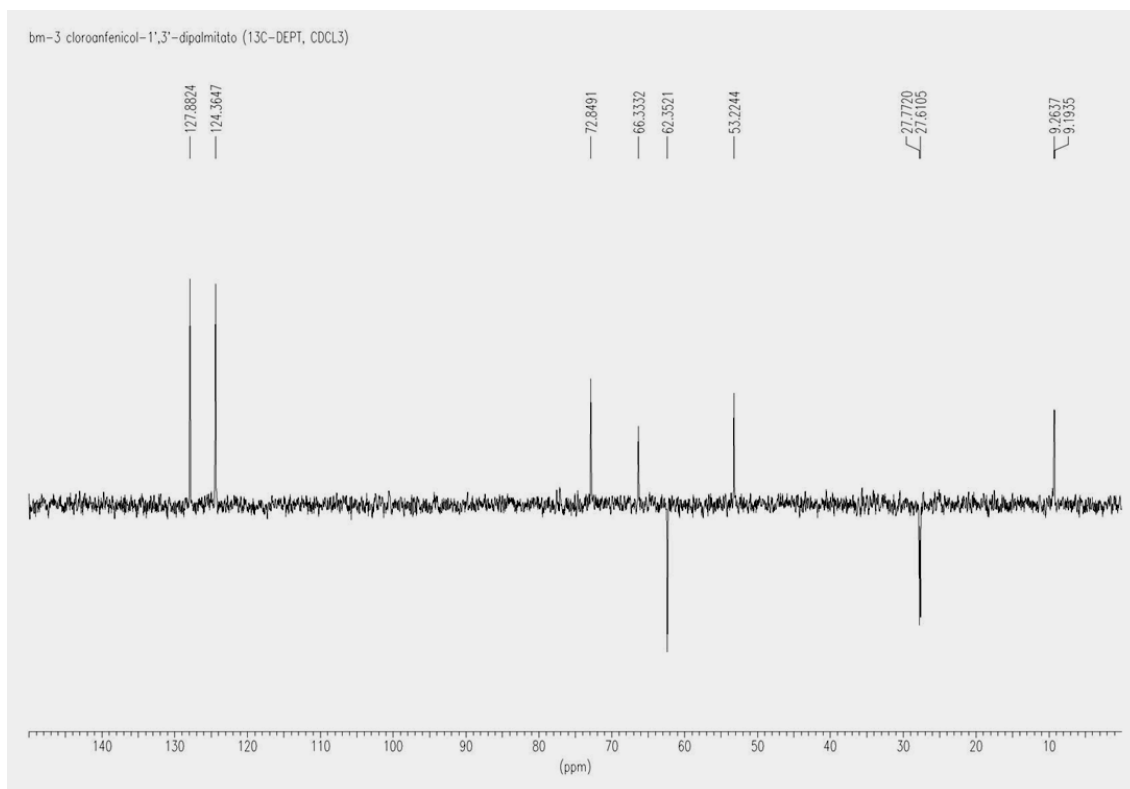




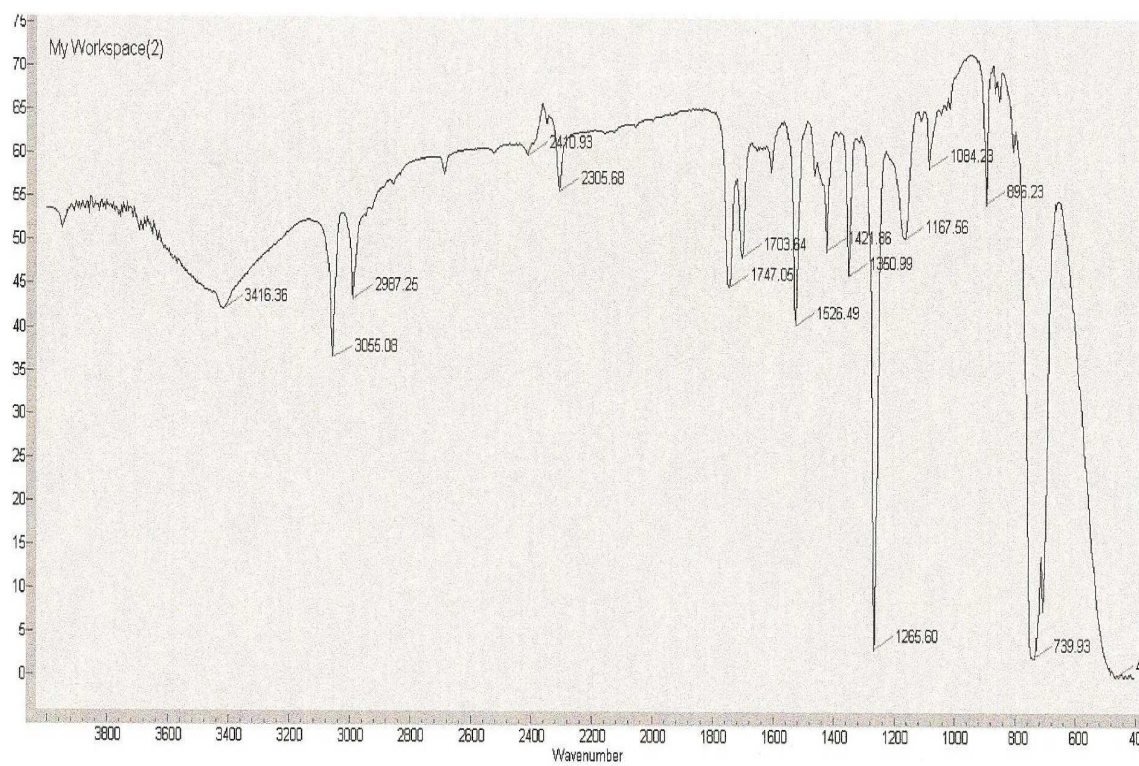
Anexo 11 – Espectro de RMN  $^1\text{H}$  de **1b**,  $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz



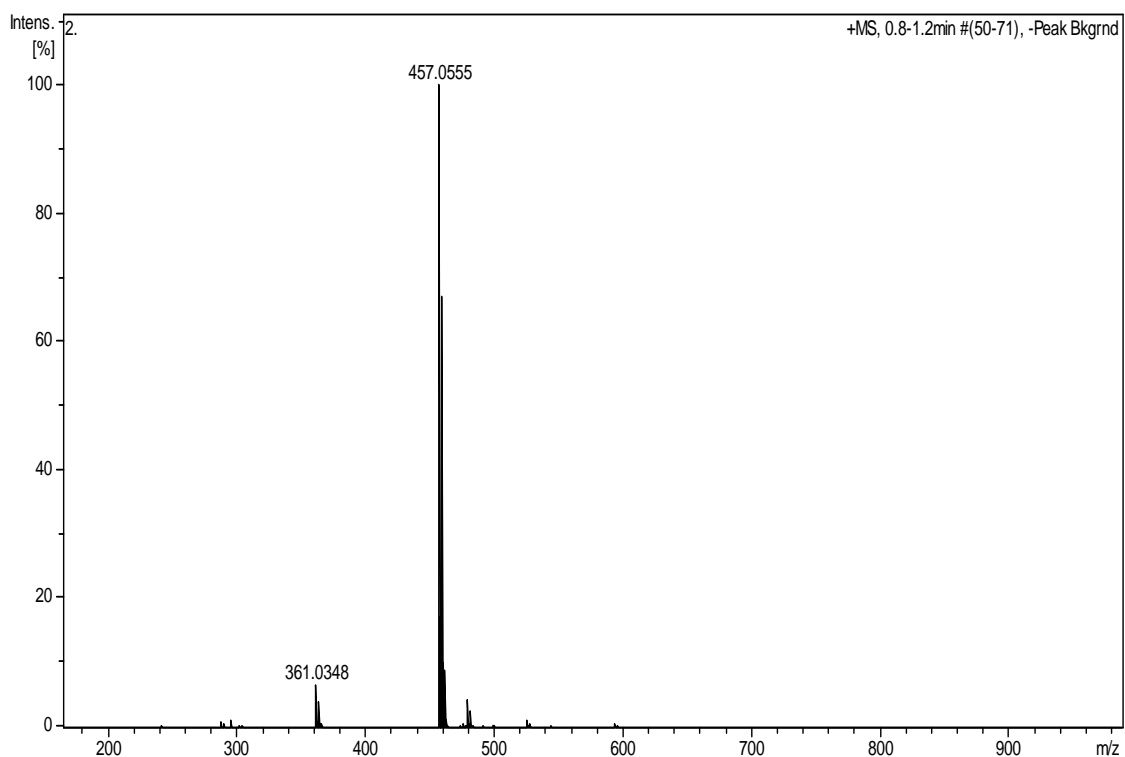
Anexo 12 – Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$ -BB de **1b**,  $\text{CDCl}_3$ , 75 MHz



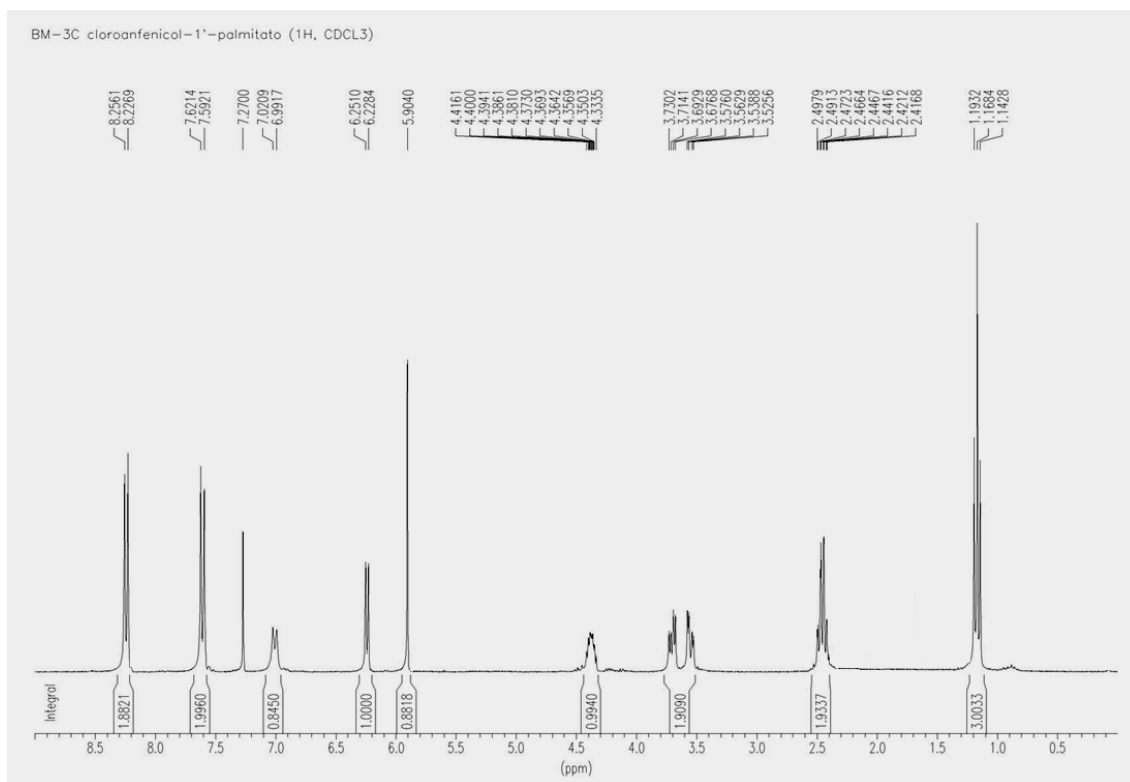
Anexo 13 – Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$ -DEPT 135 de **1b**,  $\text{CDCl}_3$ , 75 MHz



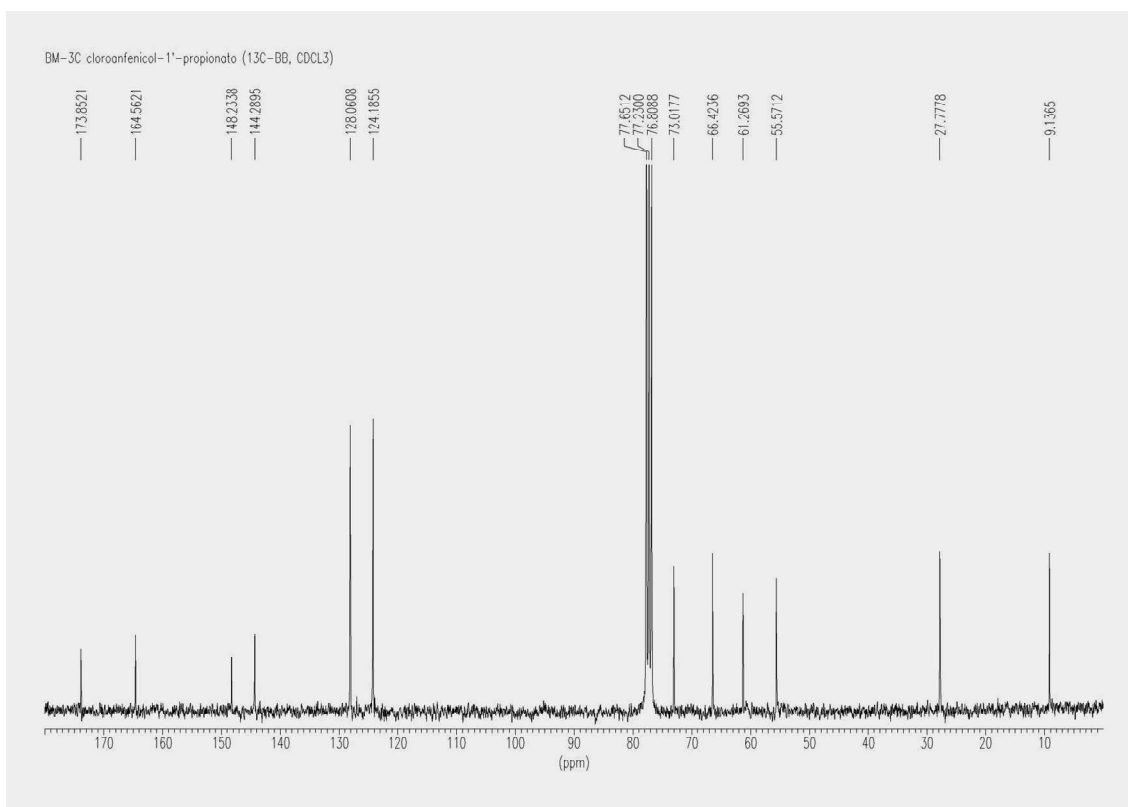
Anexo 14 – Espectro de IR de **1b**,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ .



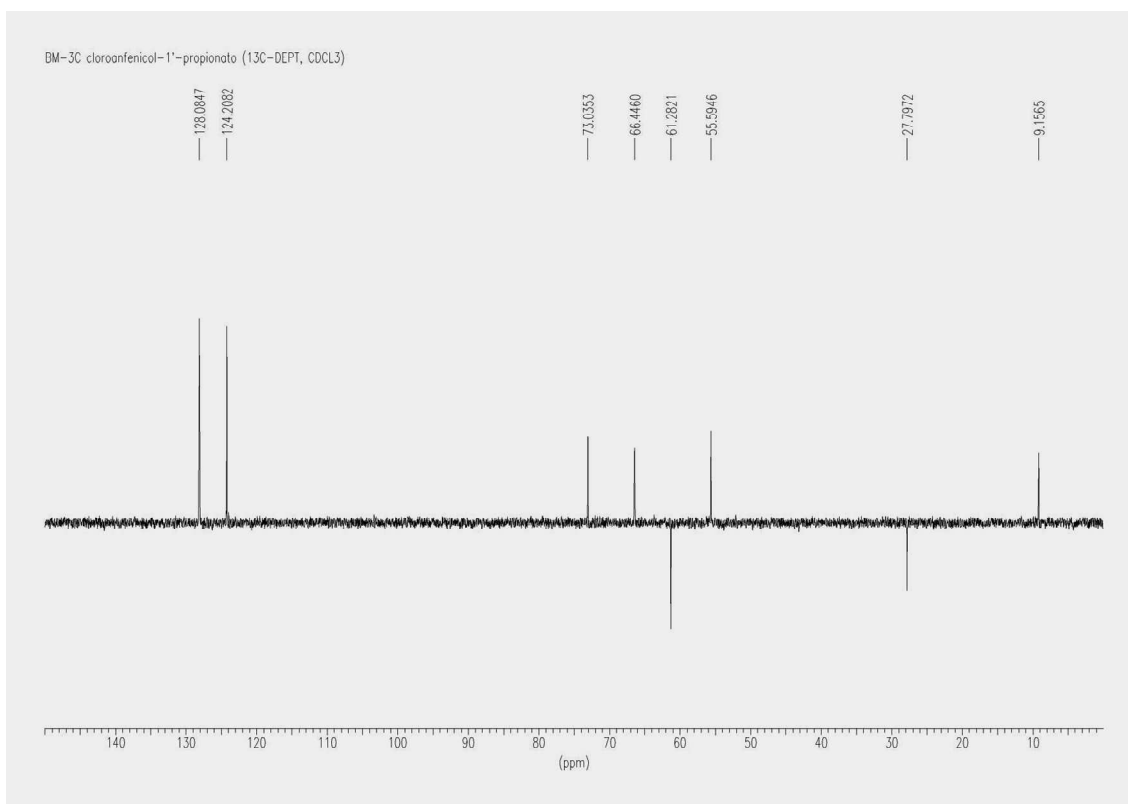
Anexo 15 – Espectro de massa exata de **1b**.



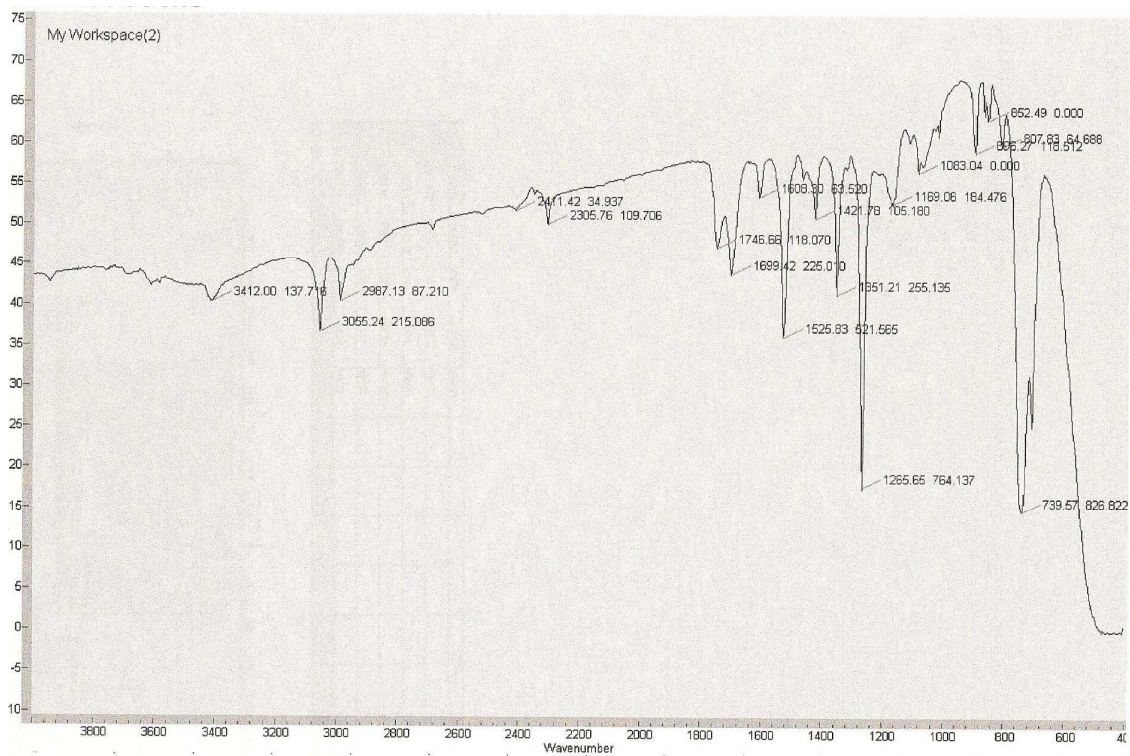
Anexo 16 – Espectro de RMN <sup>1</sup>H de **2b**, CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz



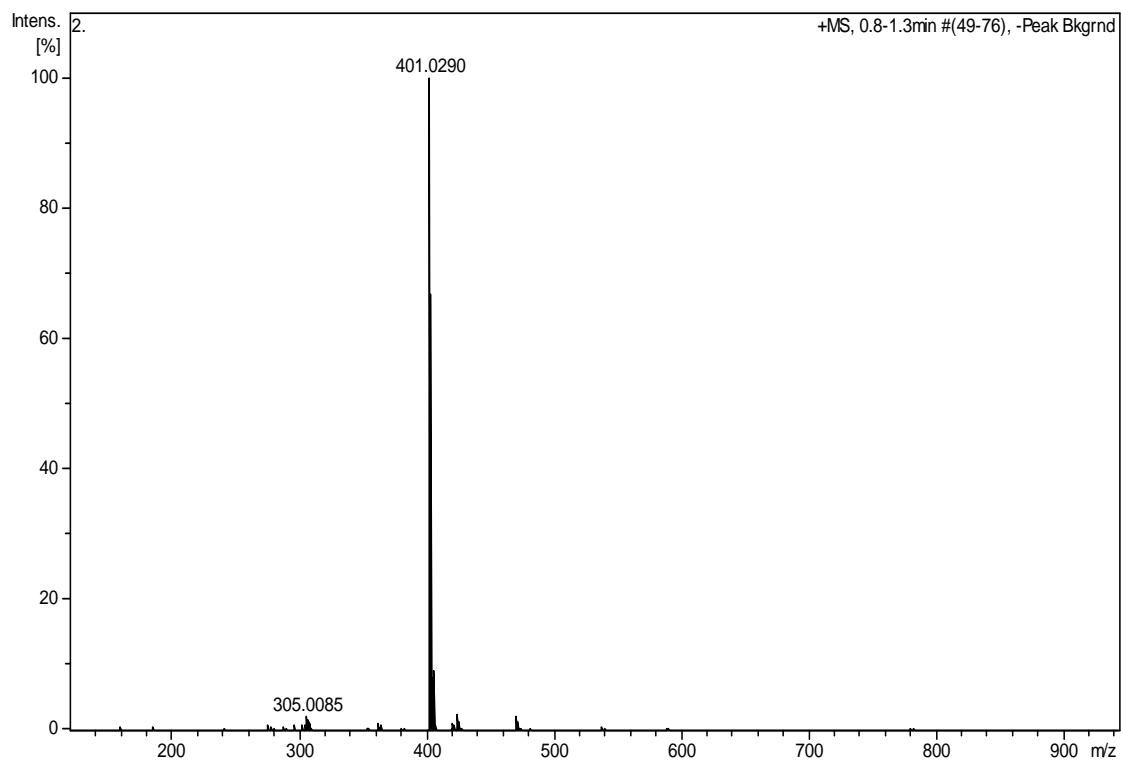
Anexo 17 – Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$ -BB de **2b**,  $\text{CDCl}_3$ , 75 MHz



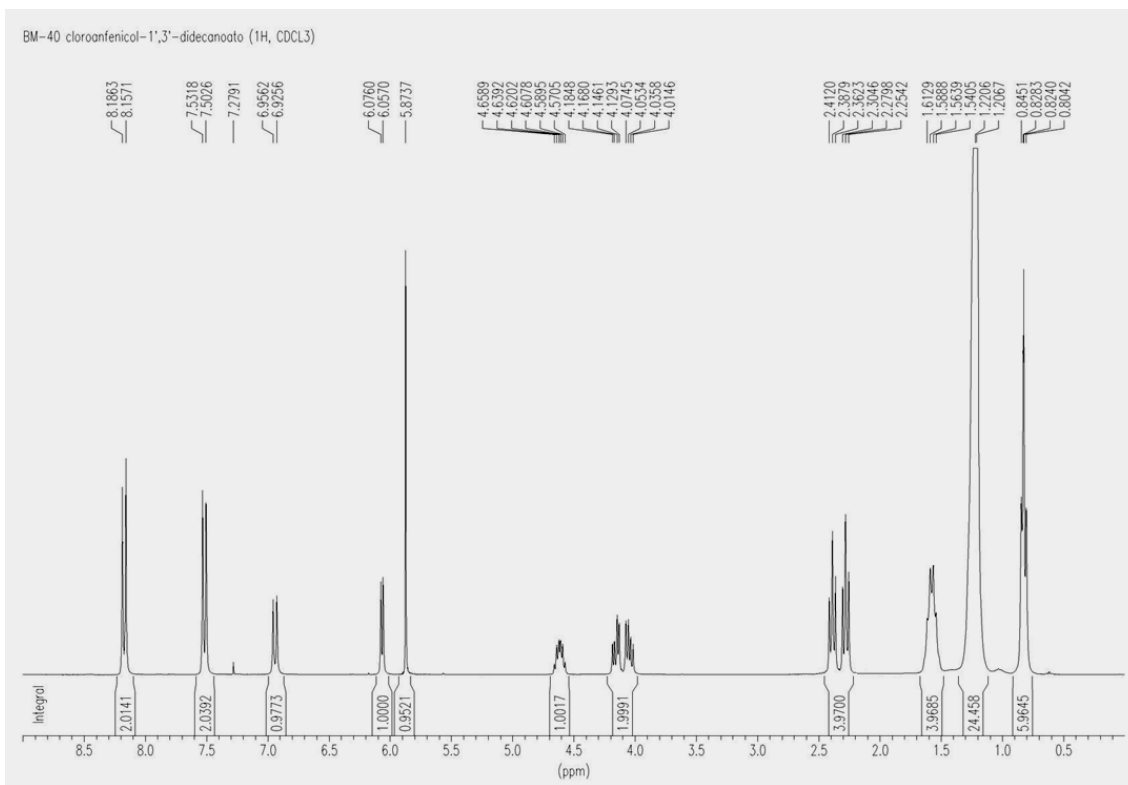
Anexo 18 – Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$ -DEPT 135 de **2b**,  $\text{CDCl}_3$ , 75 MHz



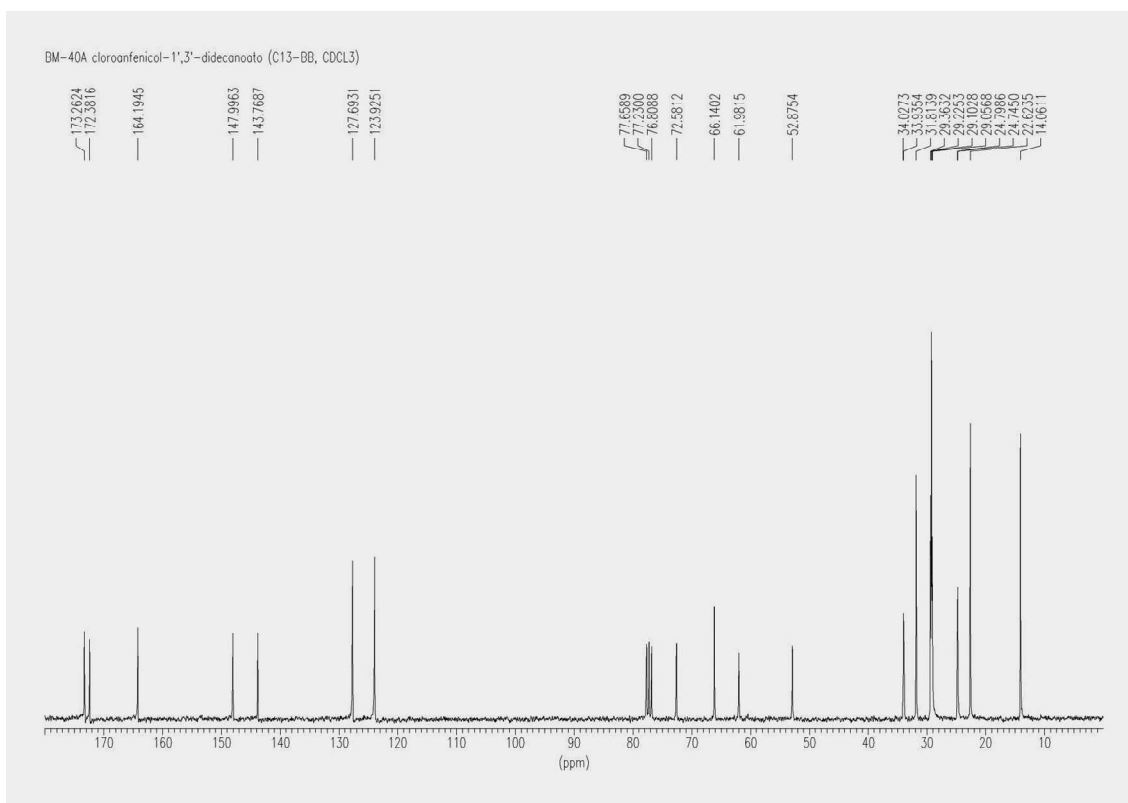
Anexo 19 - Espectro de IR de **2b**, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>.



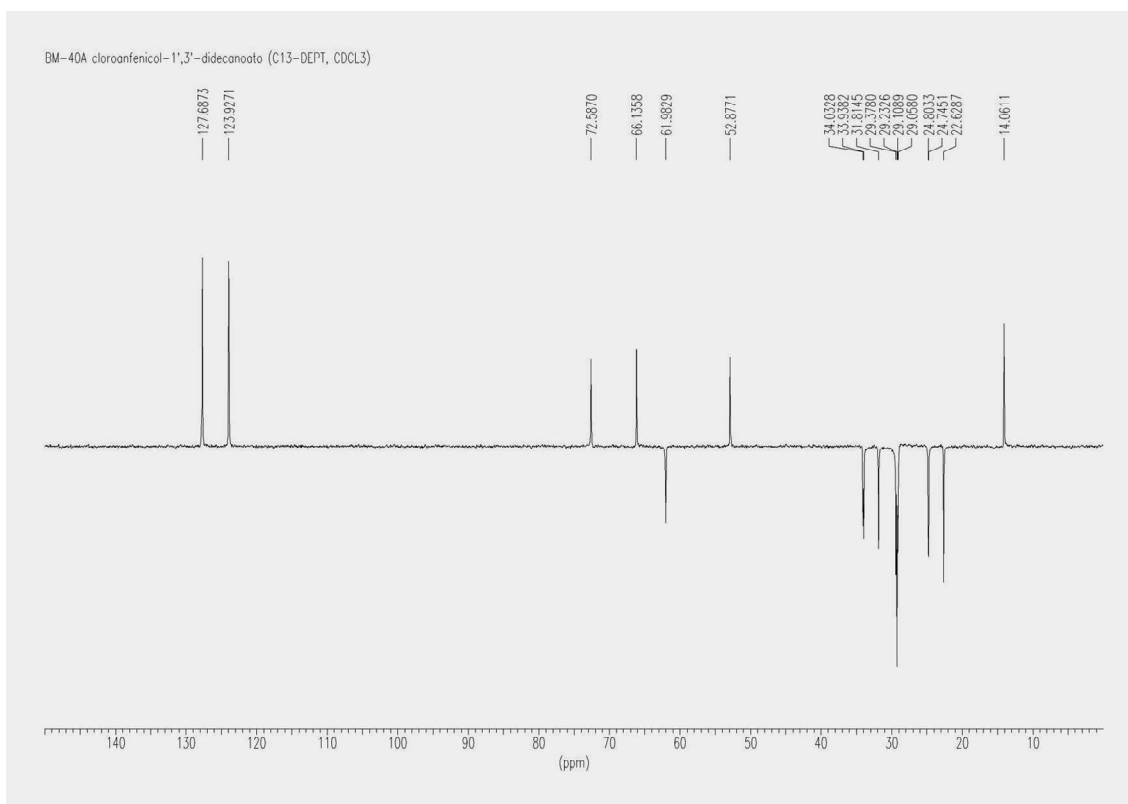
Anexo 20 – Massa exata de **2b**.



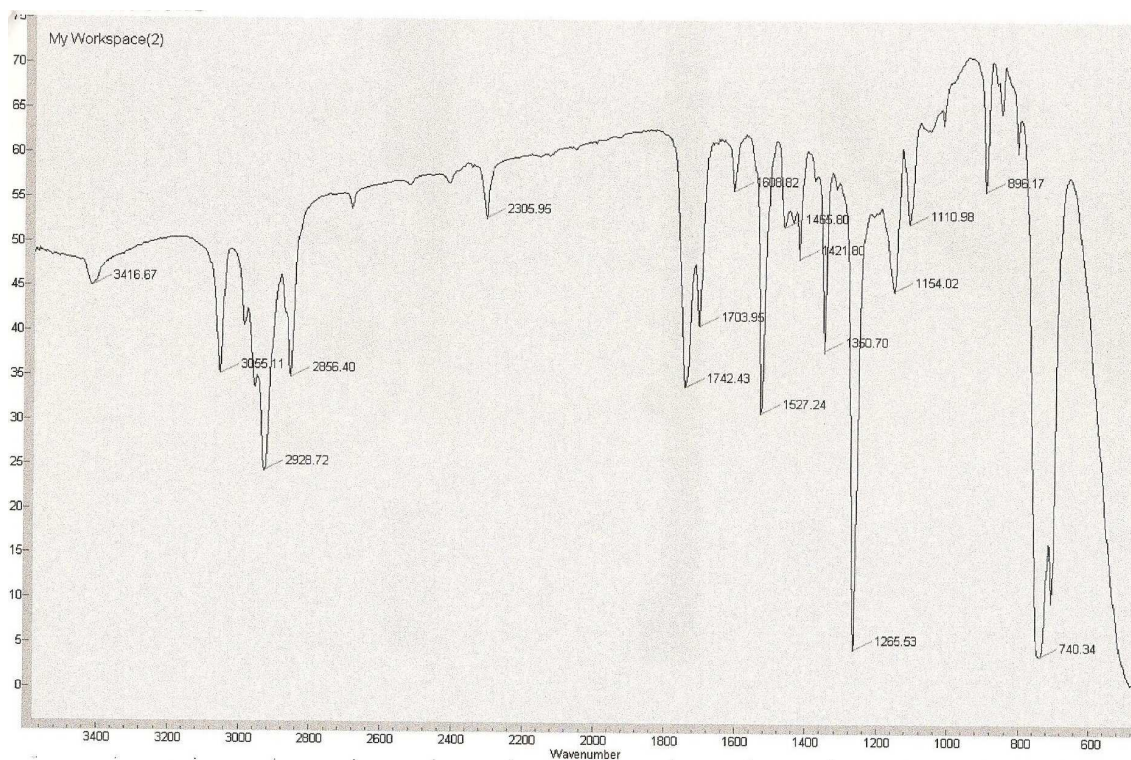
Anexo 21 – Espectro de RMN  $^1\text{H}$  de **1c**,  $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz



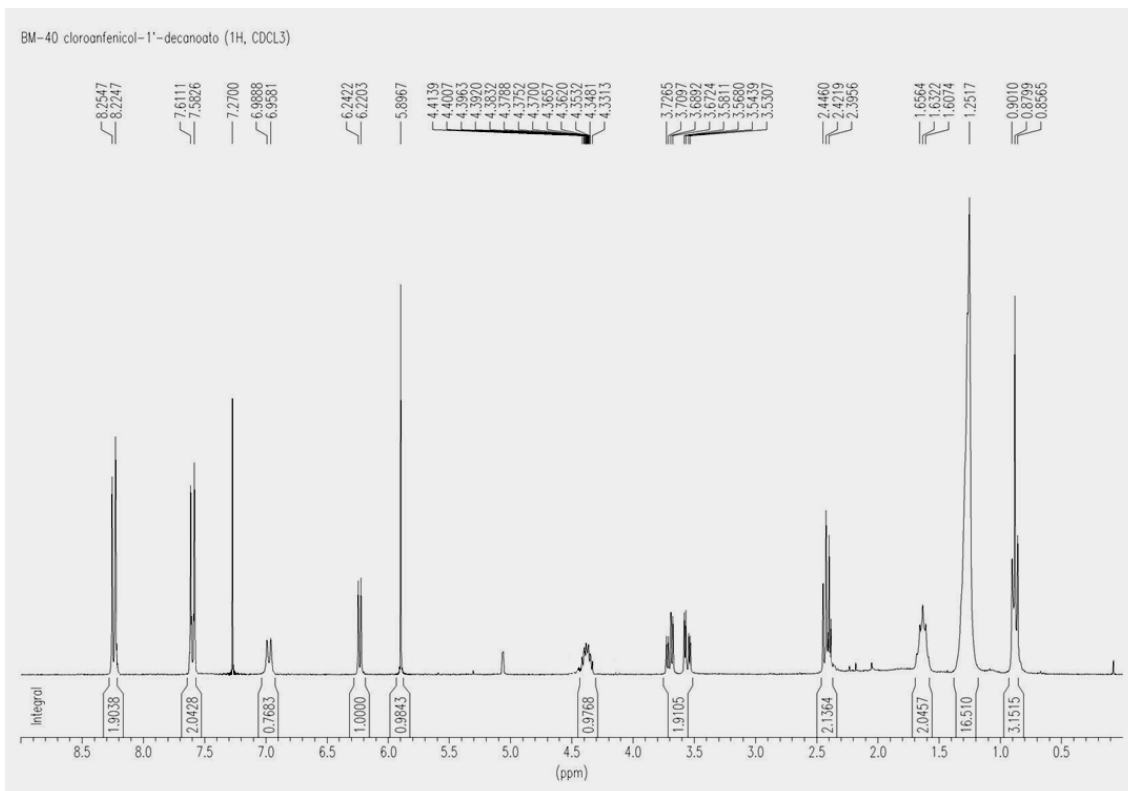
Anexo 22 – Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$ -BB de **1c**,  $\text{CDCl}_3$ , 75 MHz



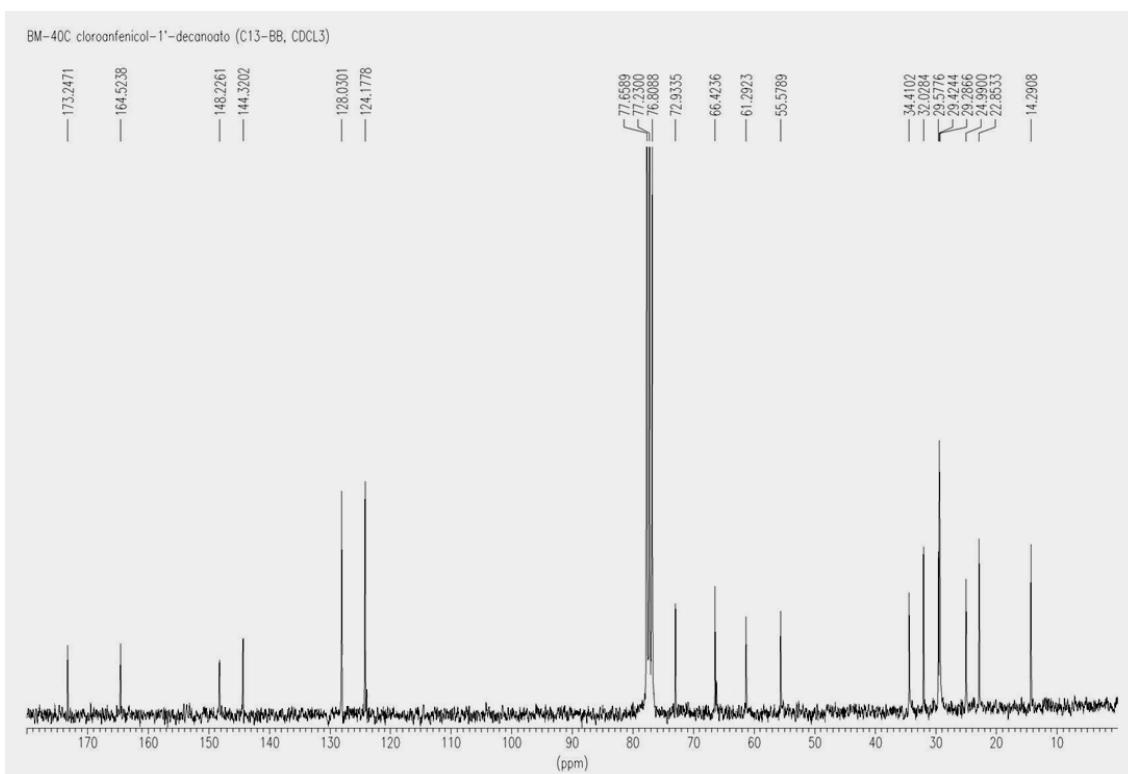
Anexo 23 – Espectro de RMN <sup>13</sup>C-DEPT de **1c**, CDCl<sub>3</sub>, 75 MHz



Anexo 24 - Espectro de IR de **1c**, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>.

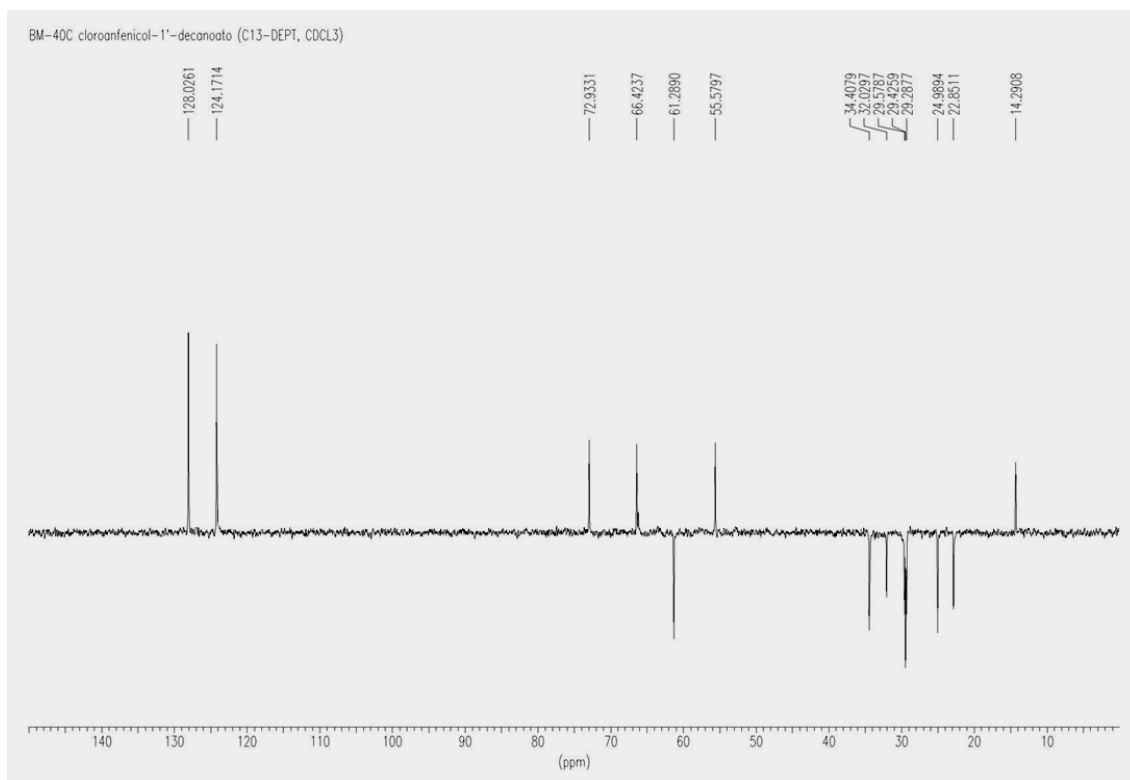


Anexo 25 – Espectro de RMN <sup>1</sup>H de **2c**, CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz

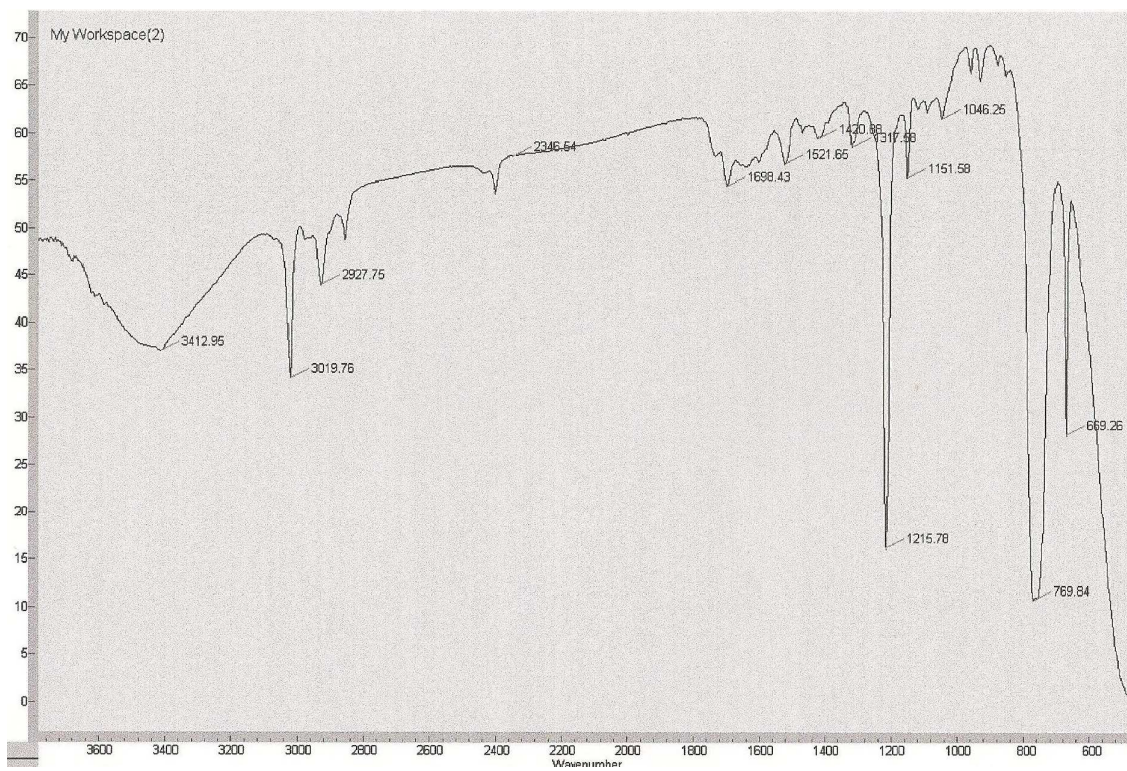


Anexo 26 – Espectro de RMN <sup>13</sup>C-BB de **2c**, CDCl<sub>3</sub>, 75 MHz

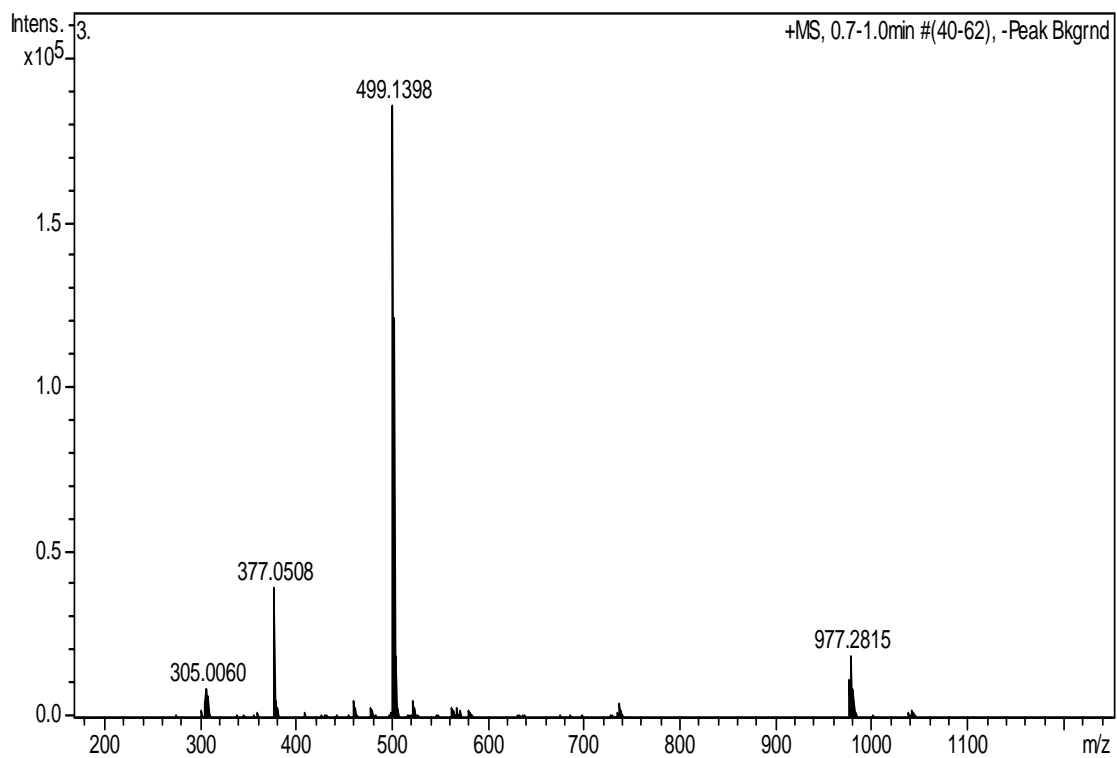




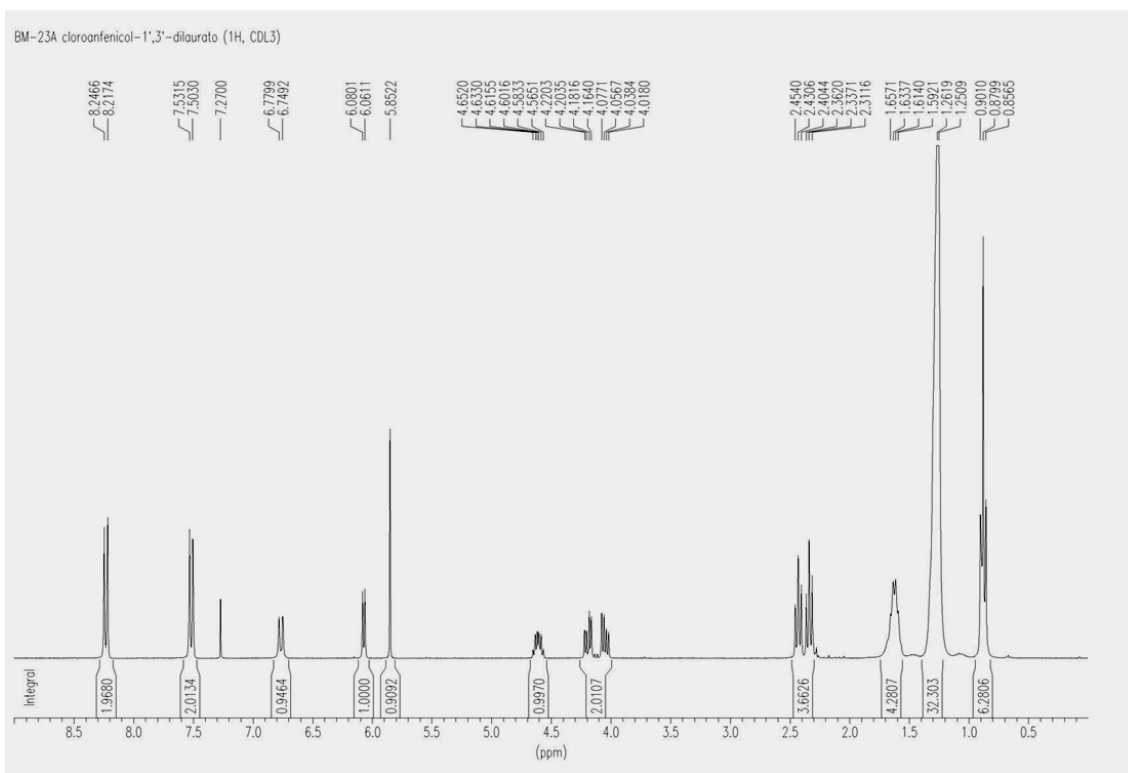
Anexo 27 – Espectro de RMN <sup>13</sup>C-DEPT de **2c**, CDCl<sub>3</sub>, 75 MHz



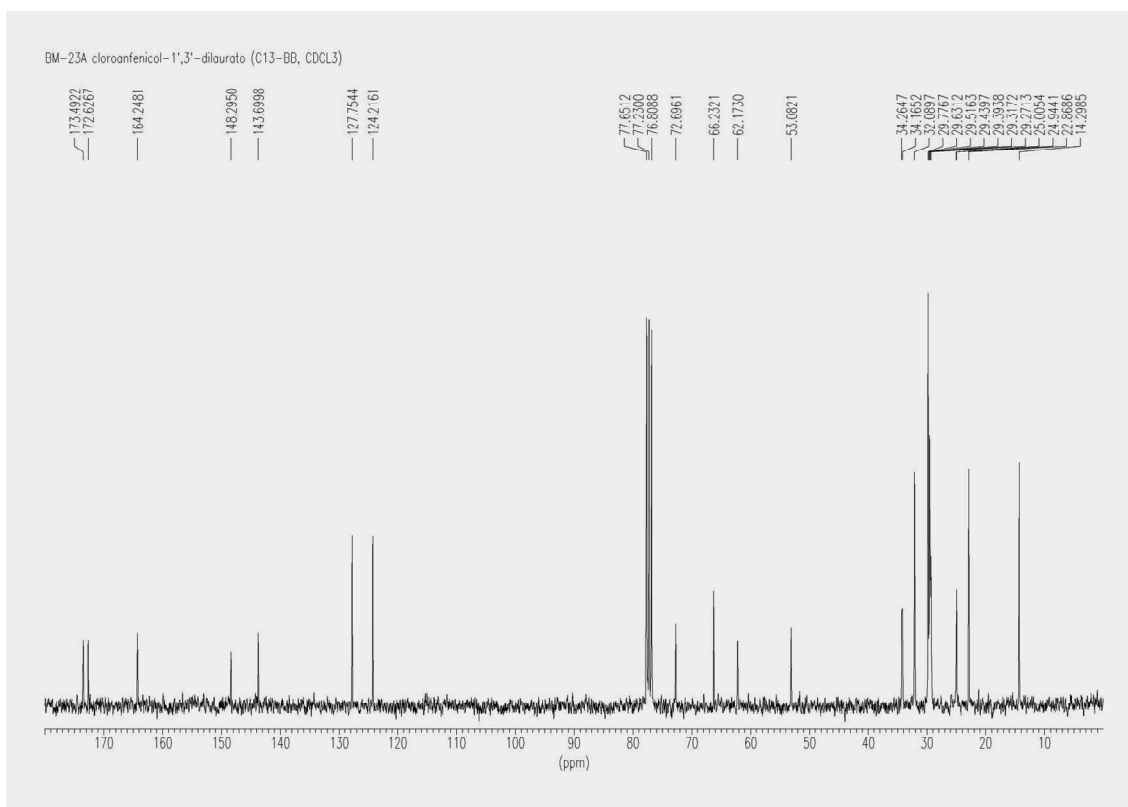
Anexo 28 – Espectro de IV de **2c**, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>.



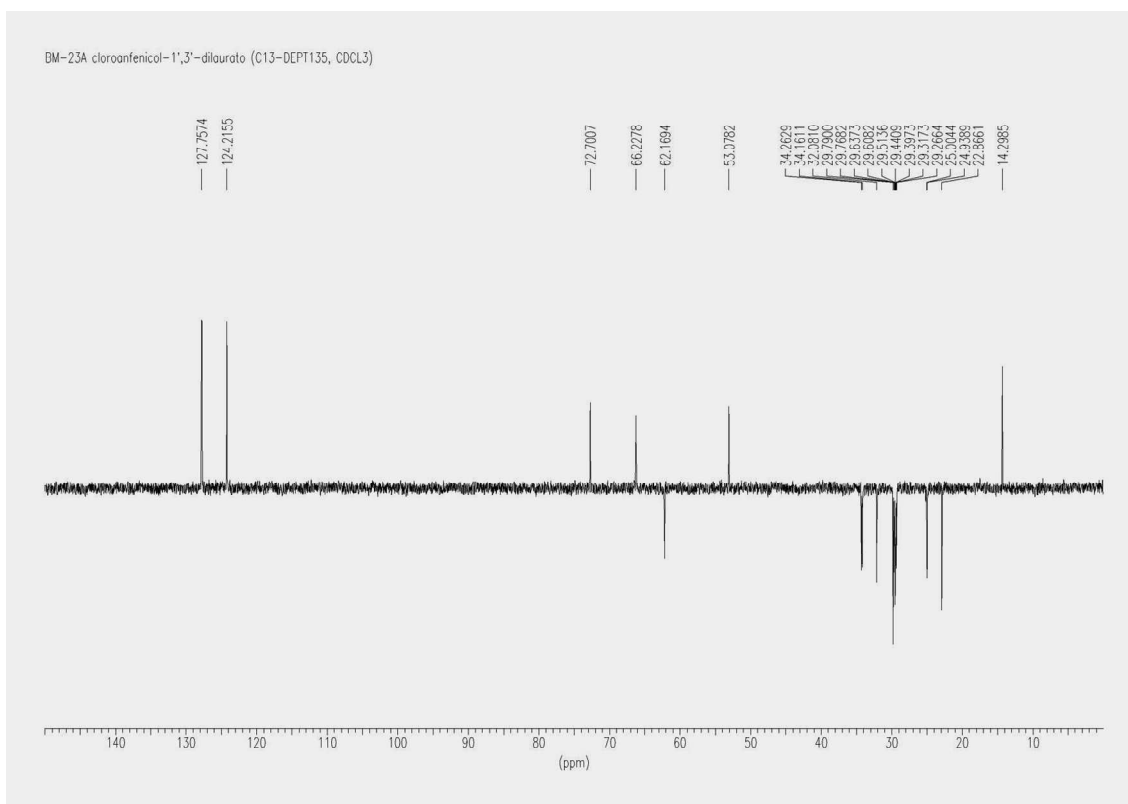
Anexo 29 – Espectro de massa exata de **2c**.



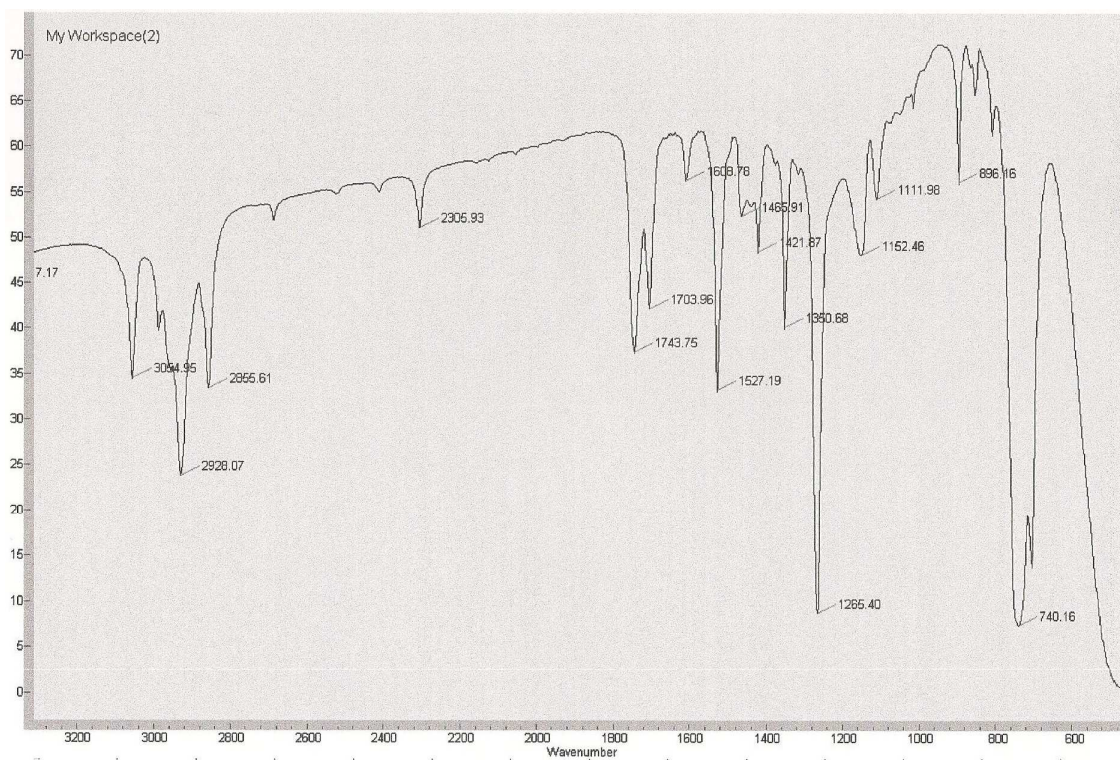
Anexo 30 – Espectro de RMN <sup>1</sup>H de **1d**, CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz.



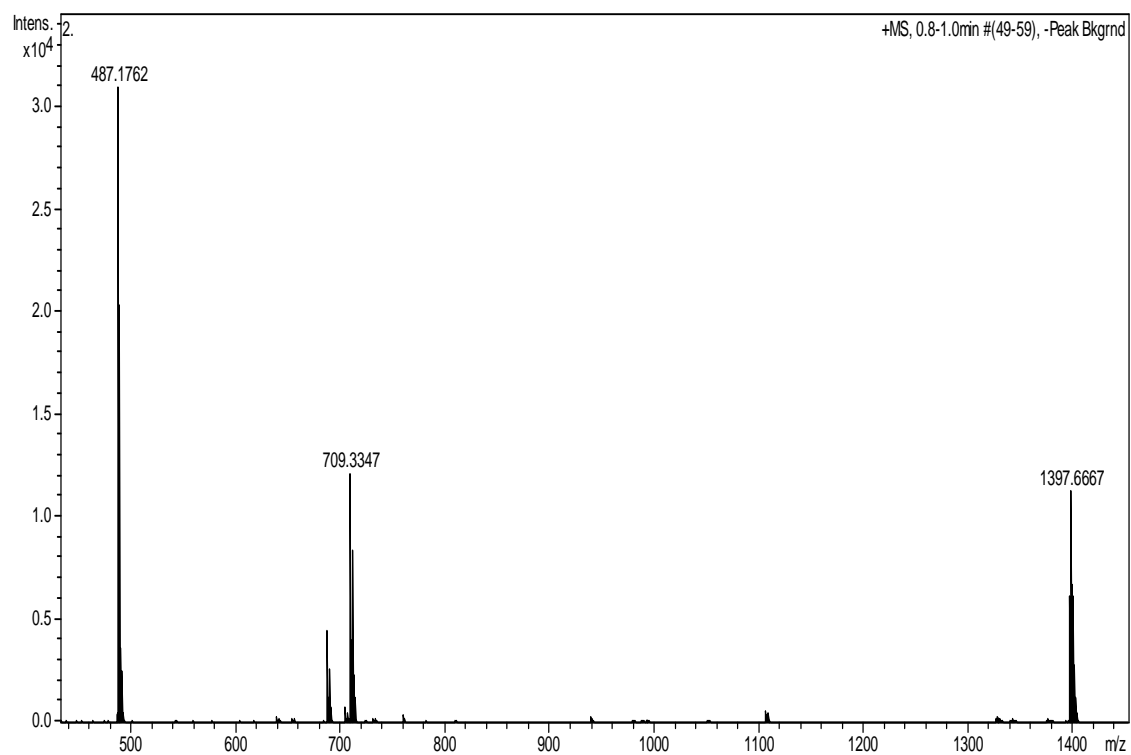
Anexo 31 – Espectro de RMN <sup>13</sup>C-BB de **1d**, CDCl<sub>3</sub>, 75 MHz



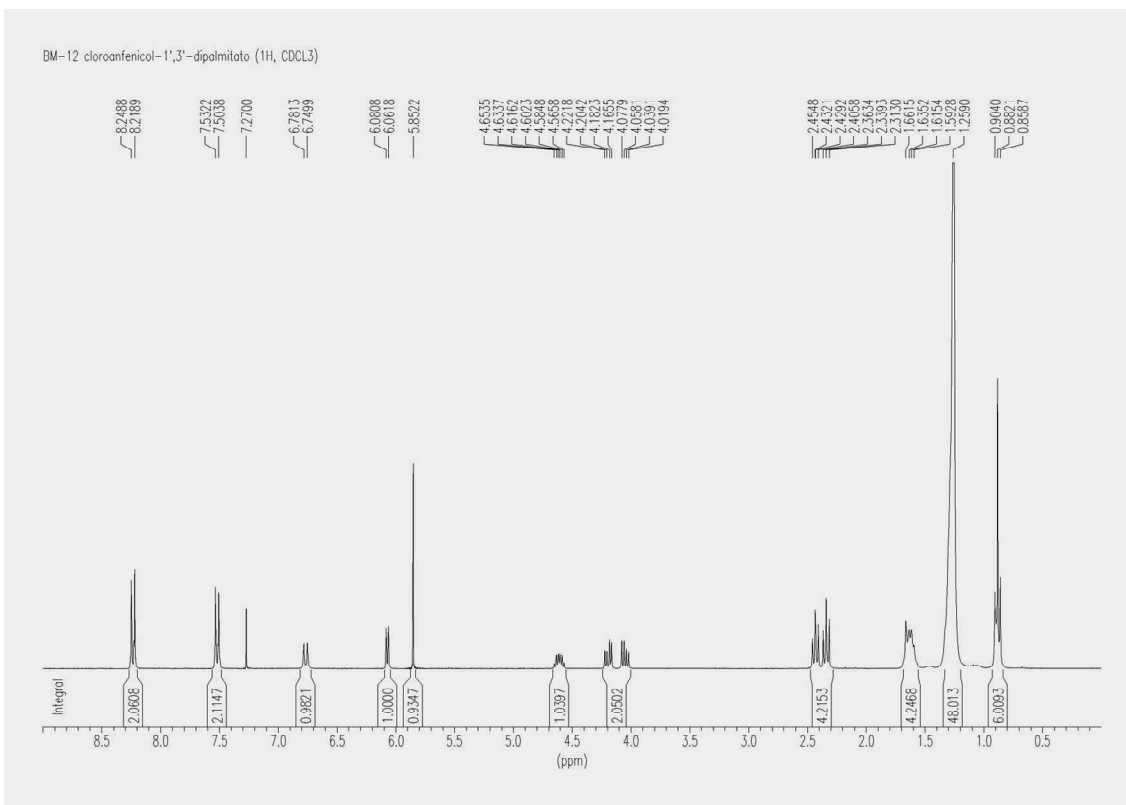
Anexo 32 – Espectro de RMN <sup>13</sup>C-DEPT de **1d**, CDCl<sub>3</sub>, 75 MHz



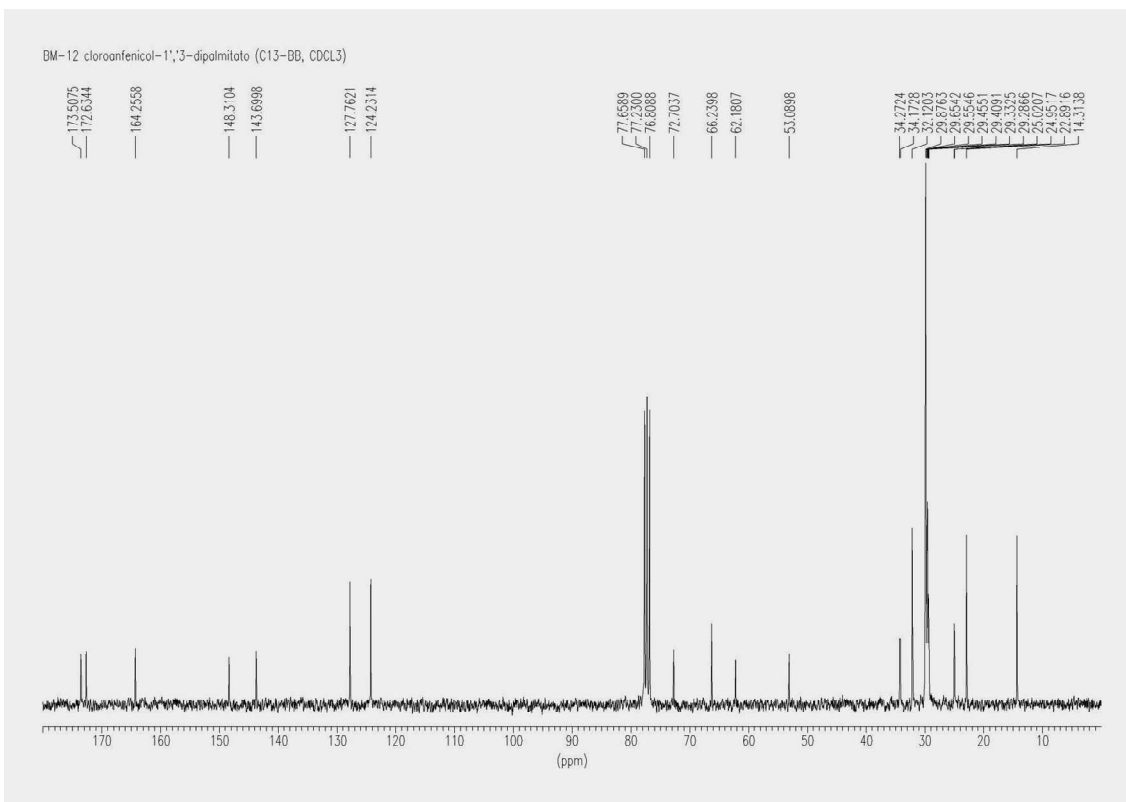
Anexo 33 – Espectro de IV de **1d**, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>.



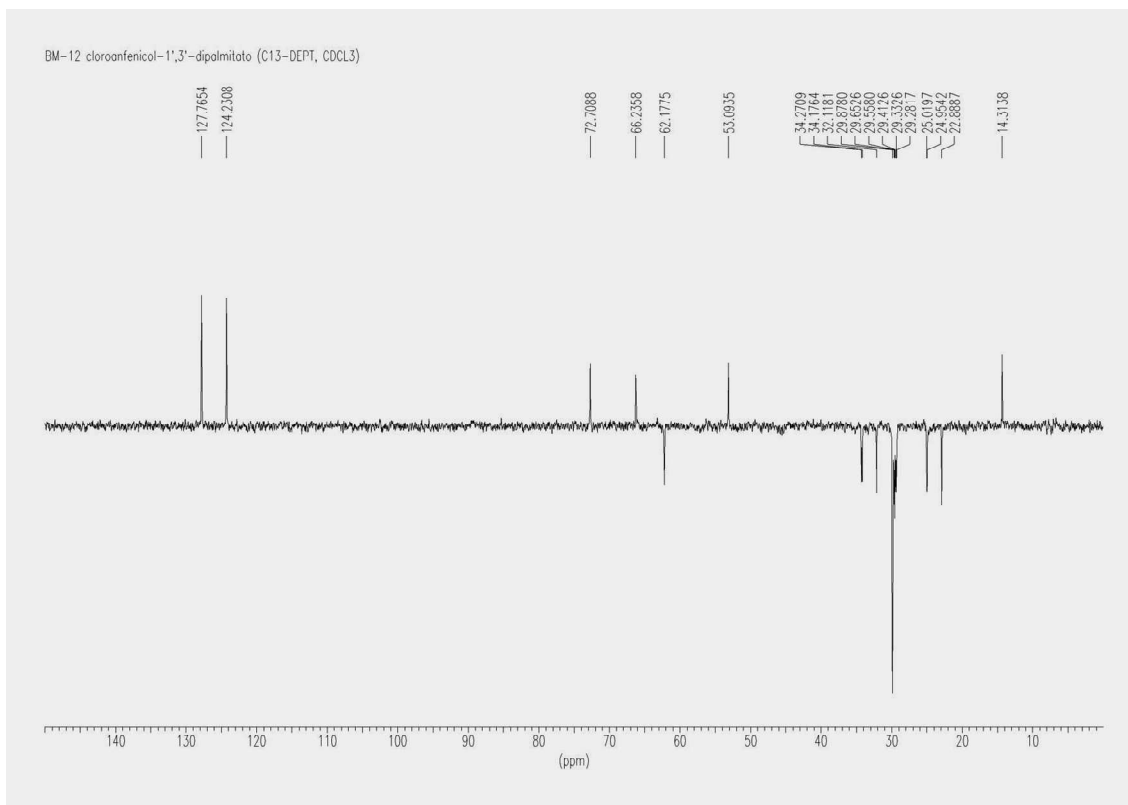
Anexo 34 – Espectro de massa exata de **1d**.



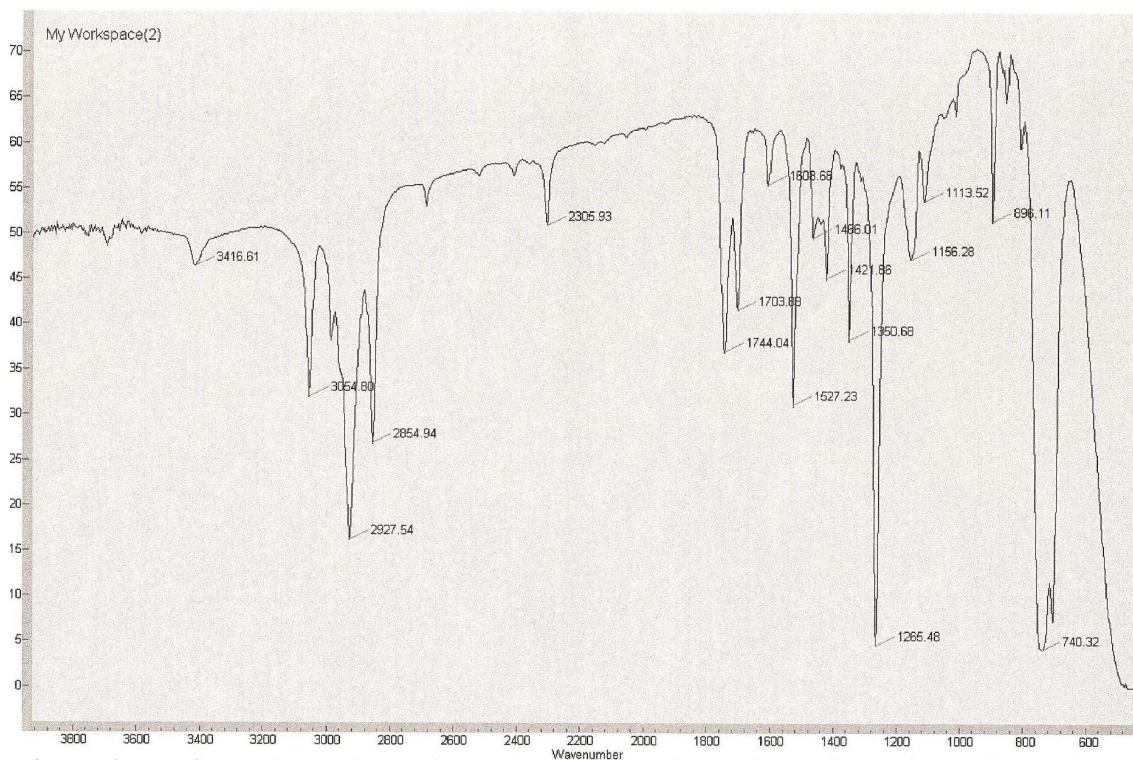
Anexo 35 – Espectro de RMN <sup>1</sup>H de **1e**, CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz



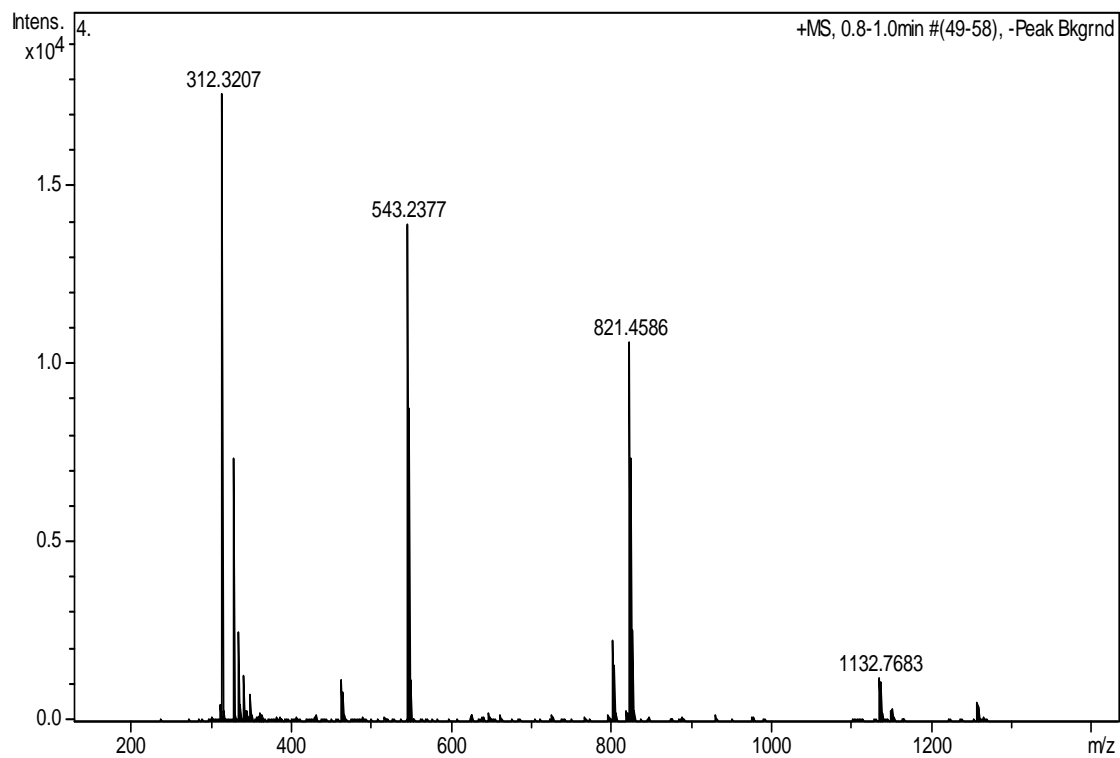
Anexo 36 – Espectro de RMN <sup>13</sup>C-BB de **1e**, CDCl<sub>3</sub>, 75 MHz



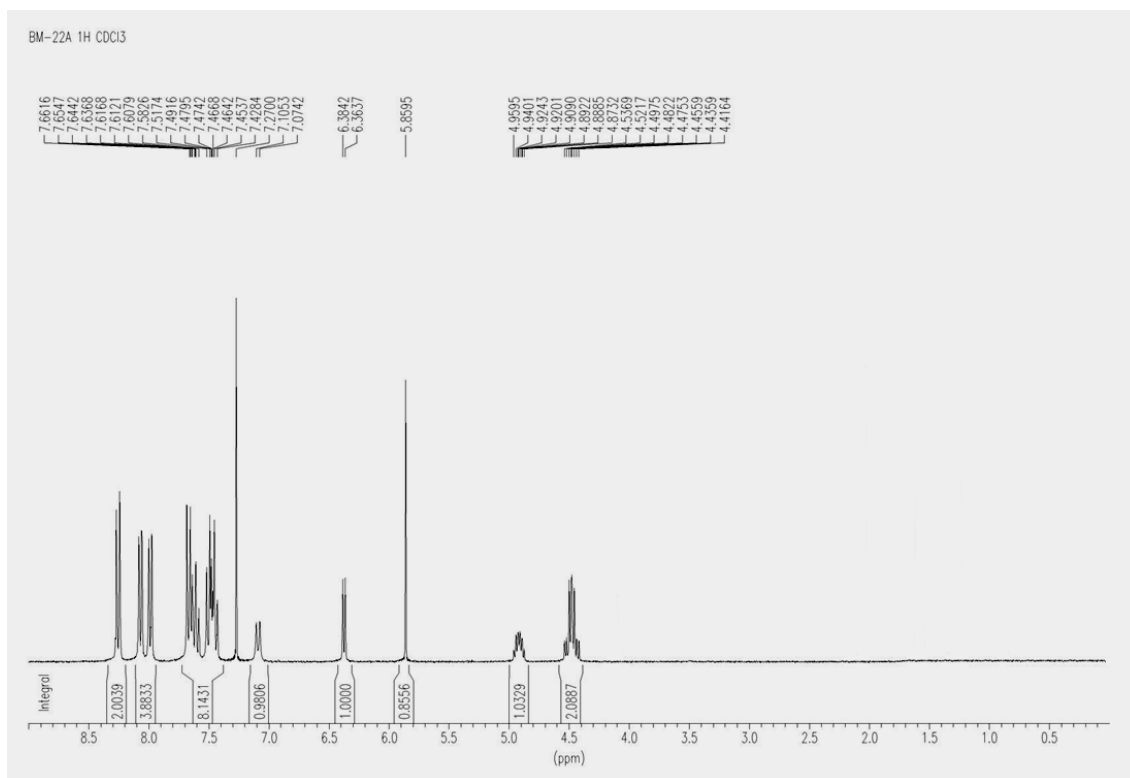
Anexo 37 – Espectro de RMN <sup>13</sup>C-DEPT de **1e**, CDCl<sub>3</sub>, 75 MHz



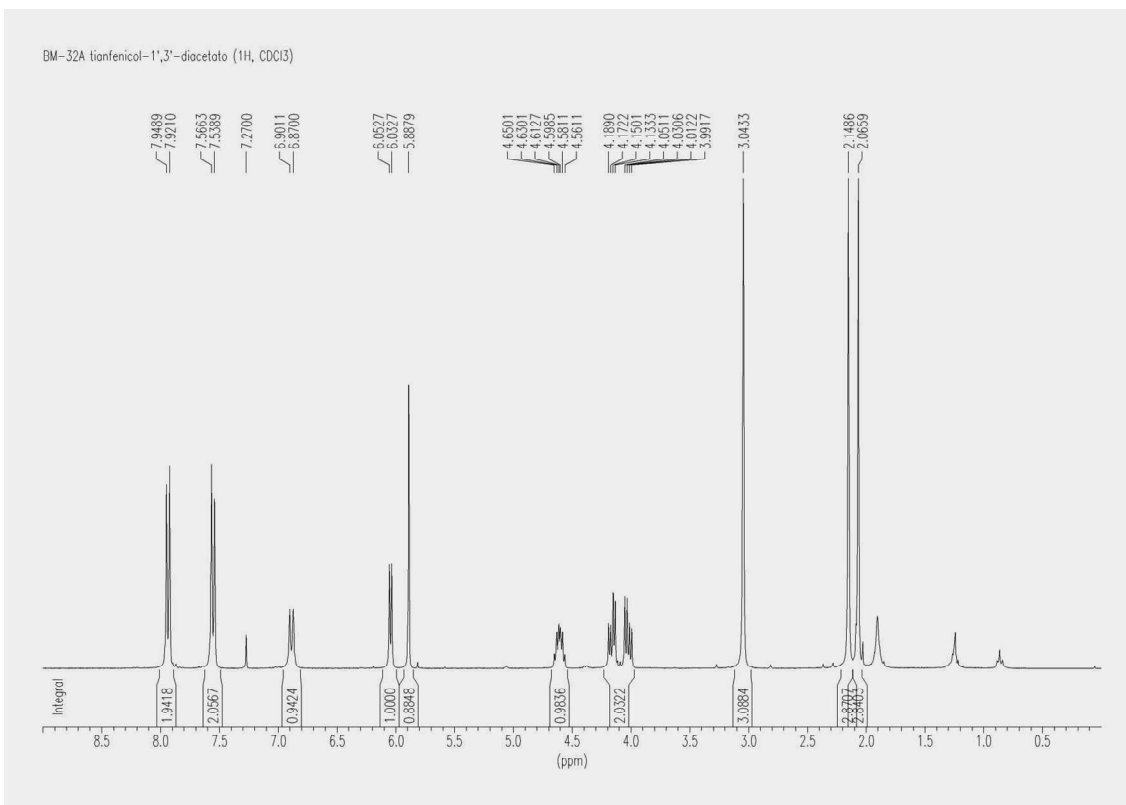
Anexo 38 – Espectro de IV de **1e**, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>.



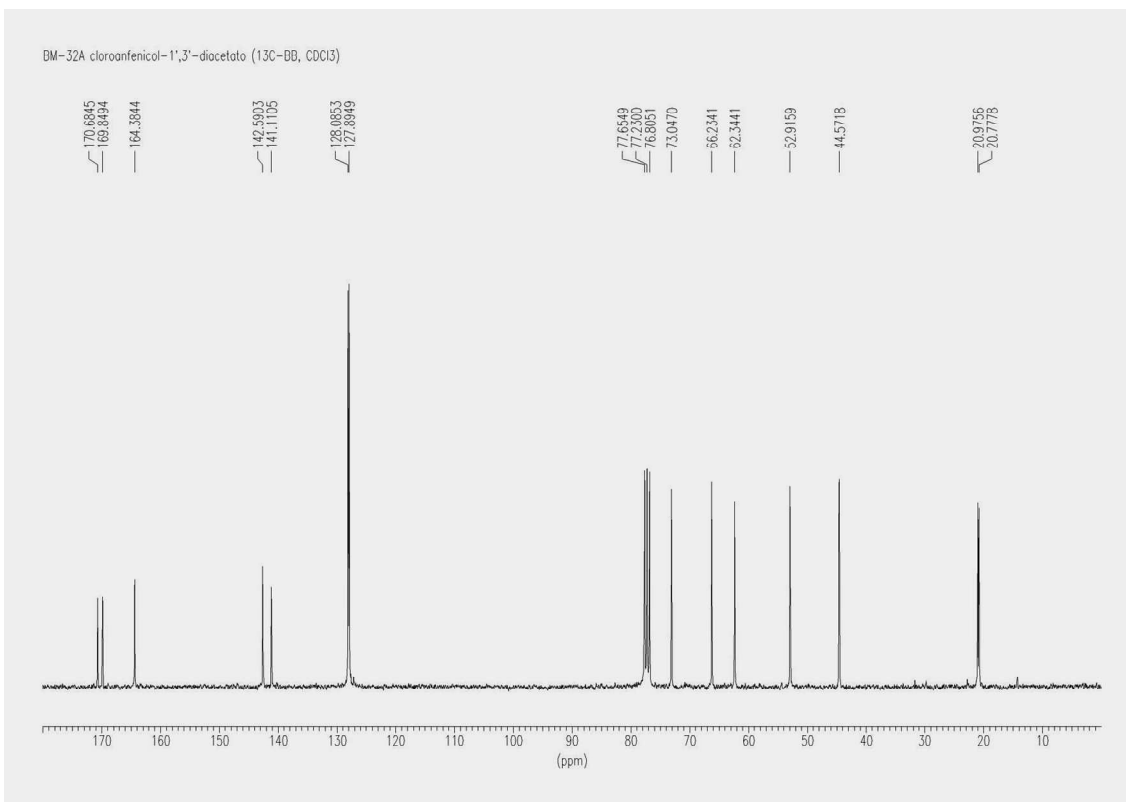
Anexo 39 – Espectro de massa exata de **1e**.



Anexo 40 – Espectro de RMN <sup>1</sup>H de **1f**, CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz

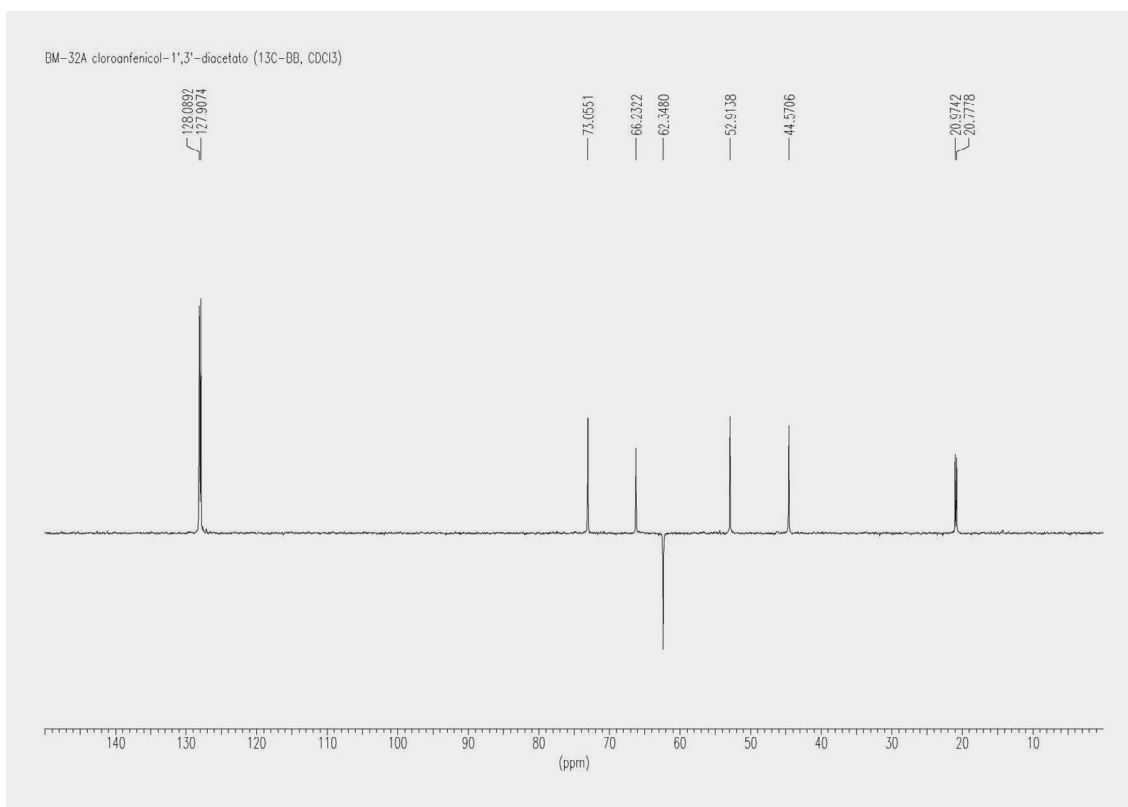


Anexo 41 – Espectro de RMN  $^1\text{H}$  de **4a**,  $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz

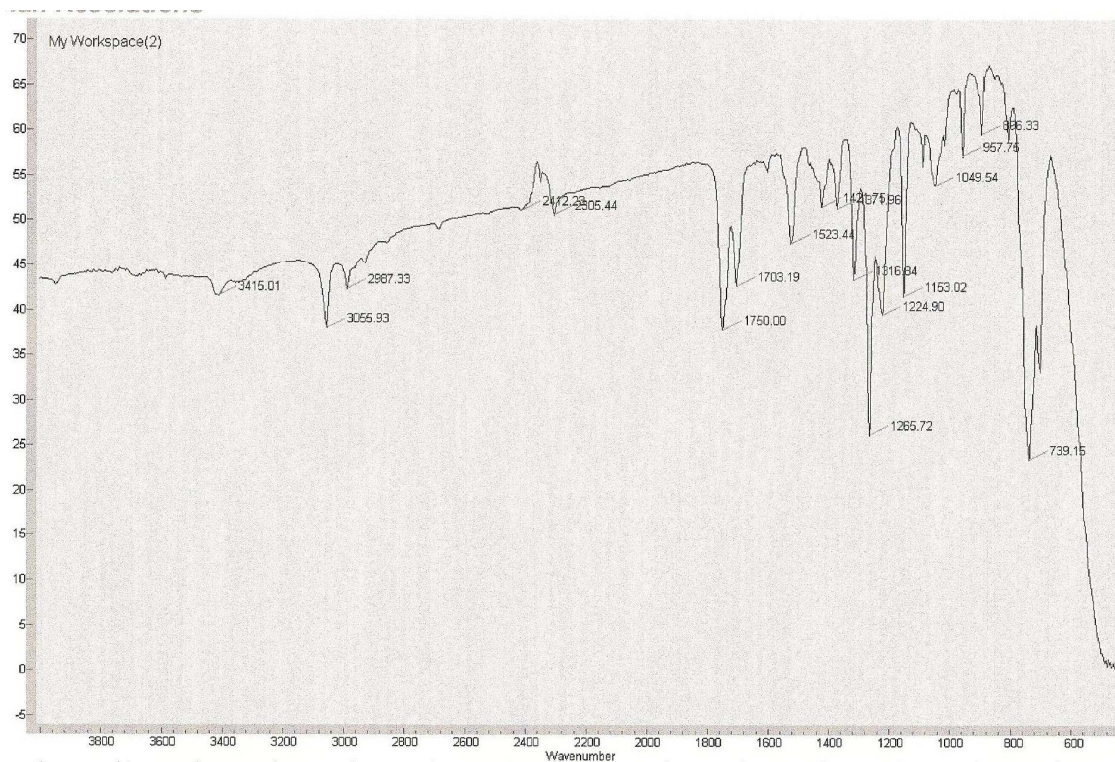


Anexo 42 – Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$ -BB de **4a**,  $\text{CDCl}_3$ , 75 MHz

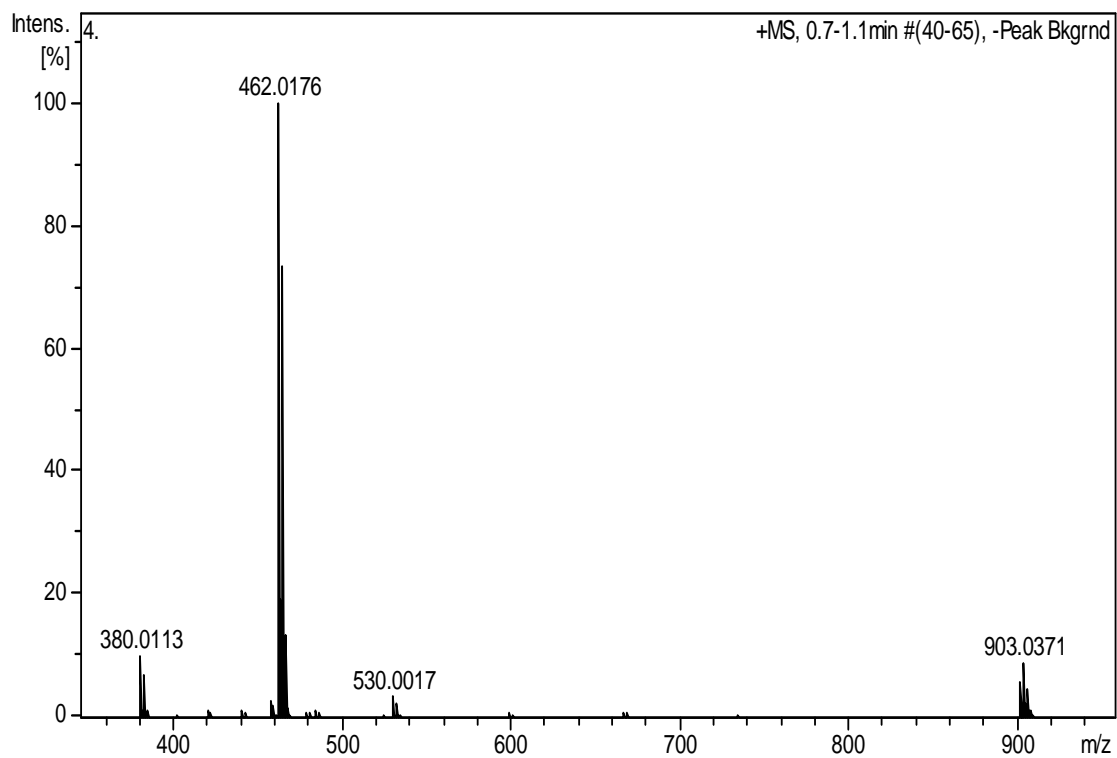




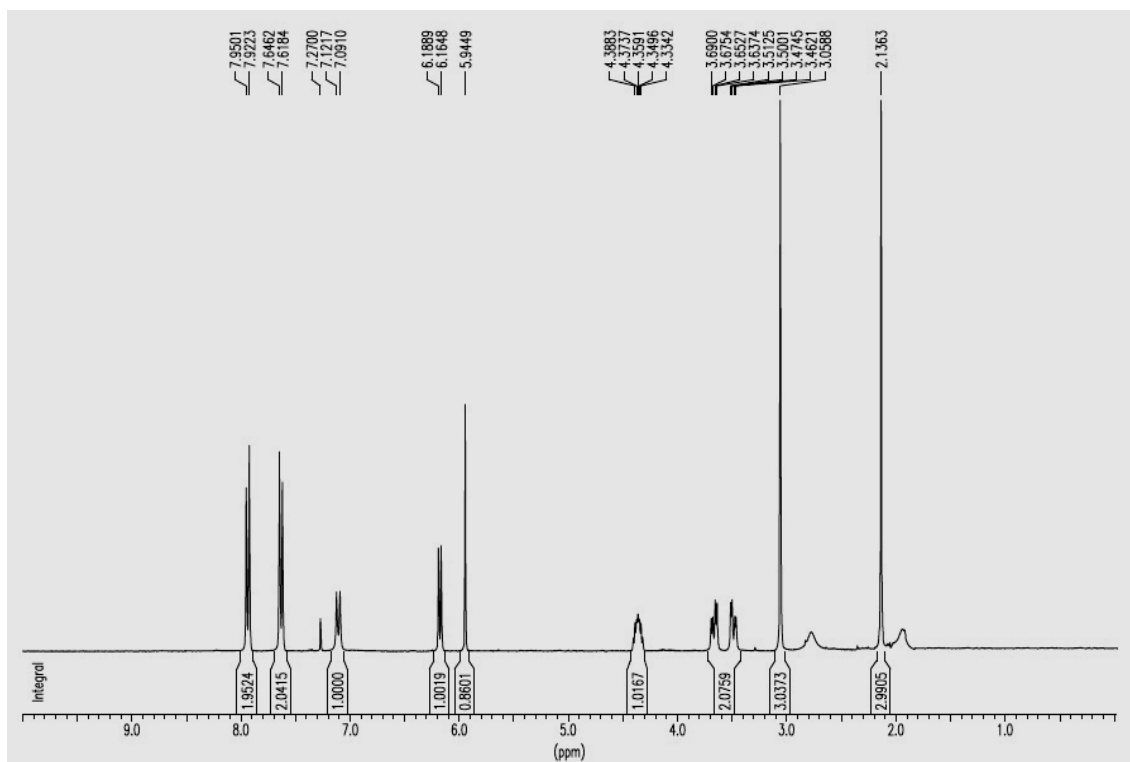
Anexo 43 – Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$ -DEPT de **4a**,  $\text{CDCl}_3$ , 75 MHz



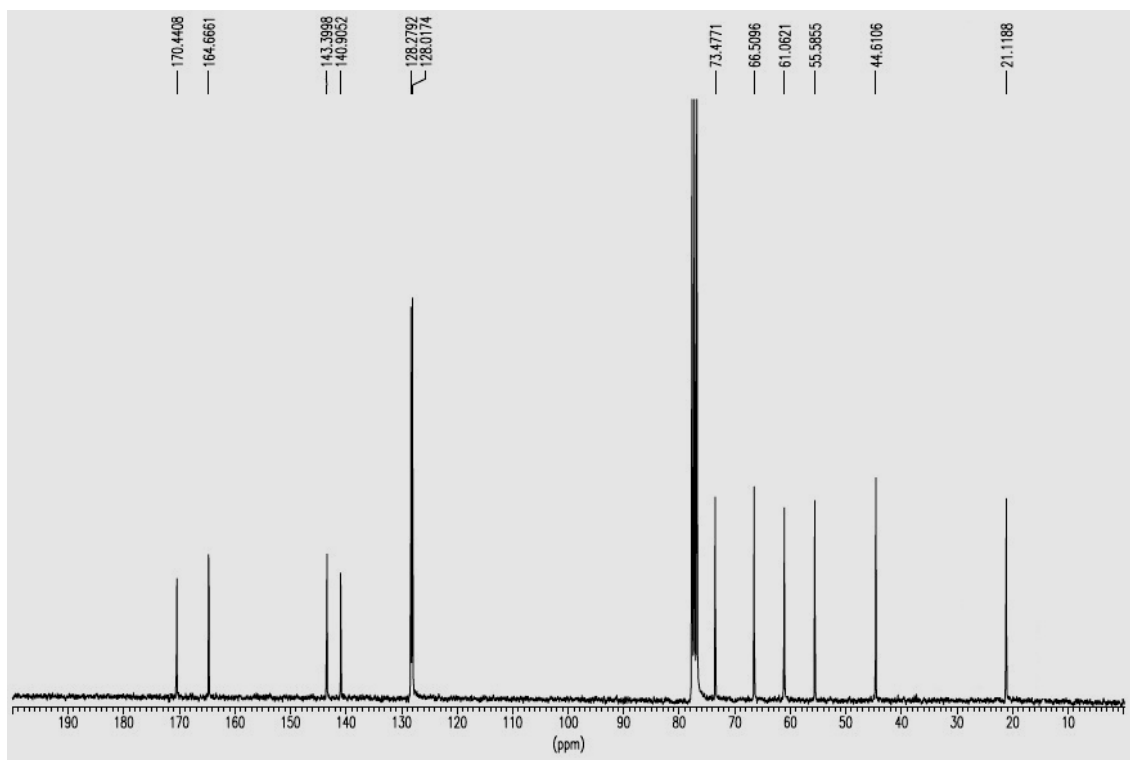
Anexo 44 – Espectro de IV de **4a**,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ .



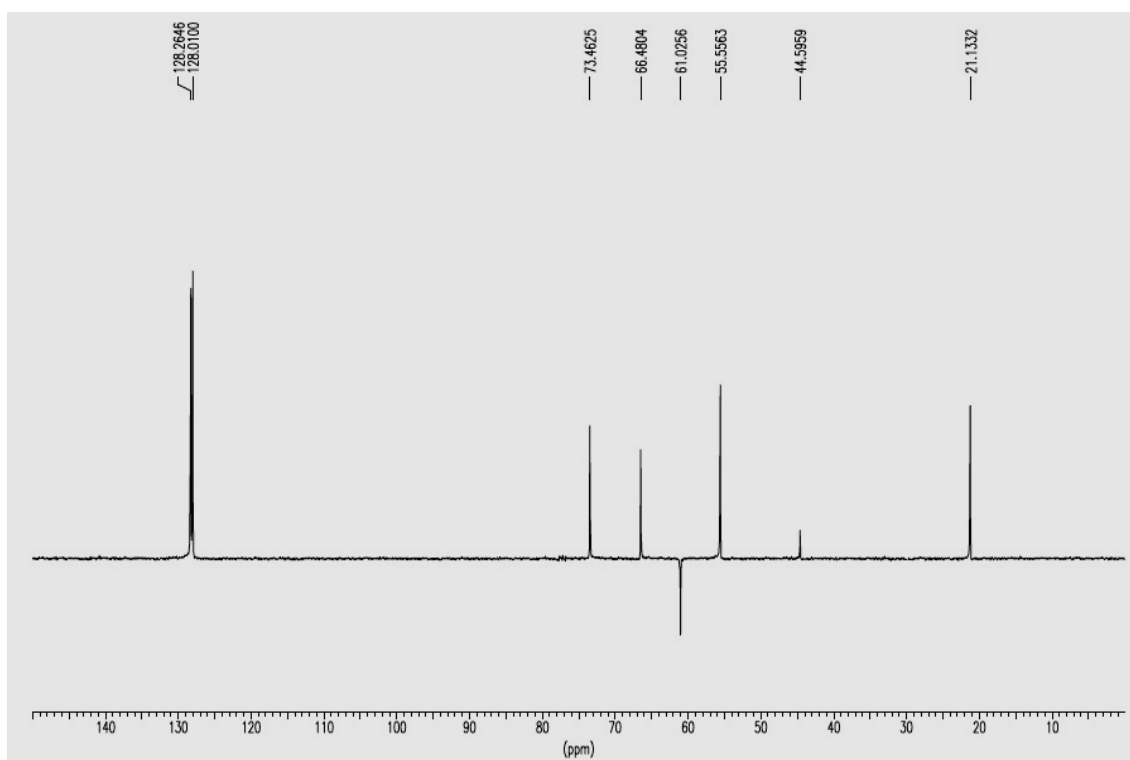
Anexo 45 – Espectro de massa exata de **4a**.



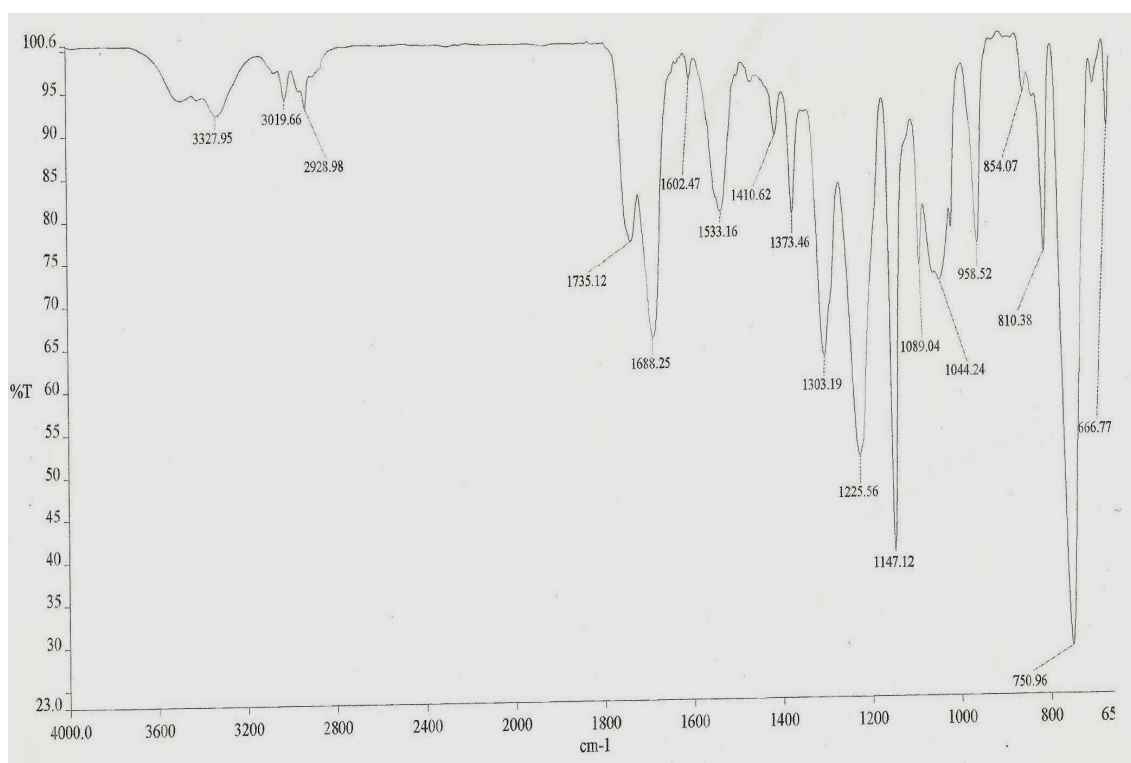
Anexo 46 - Espectro de RMN <sup>1</sup>H de **5a**, CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz



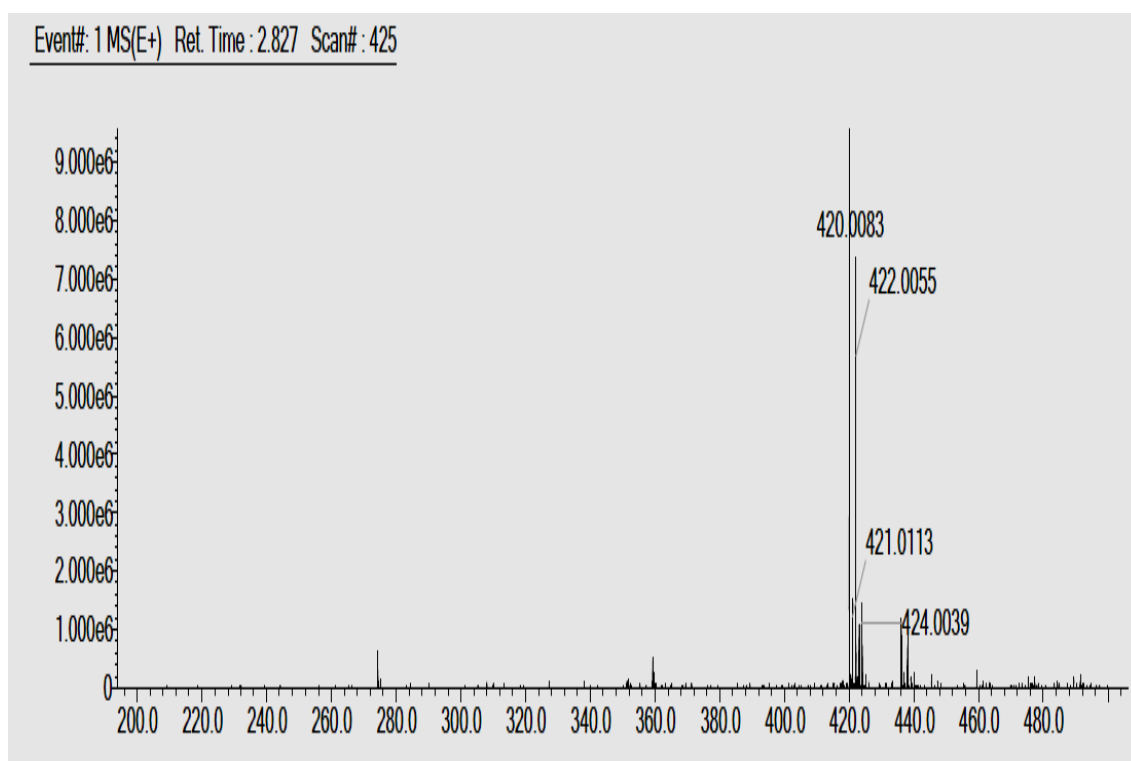
Anexo 47 - Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$ -BB de **5a**,  $\text{CDCl}_3$ , 75 MHz



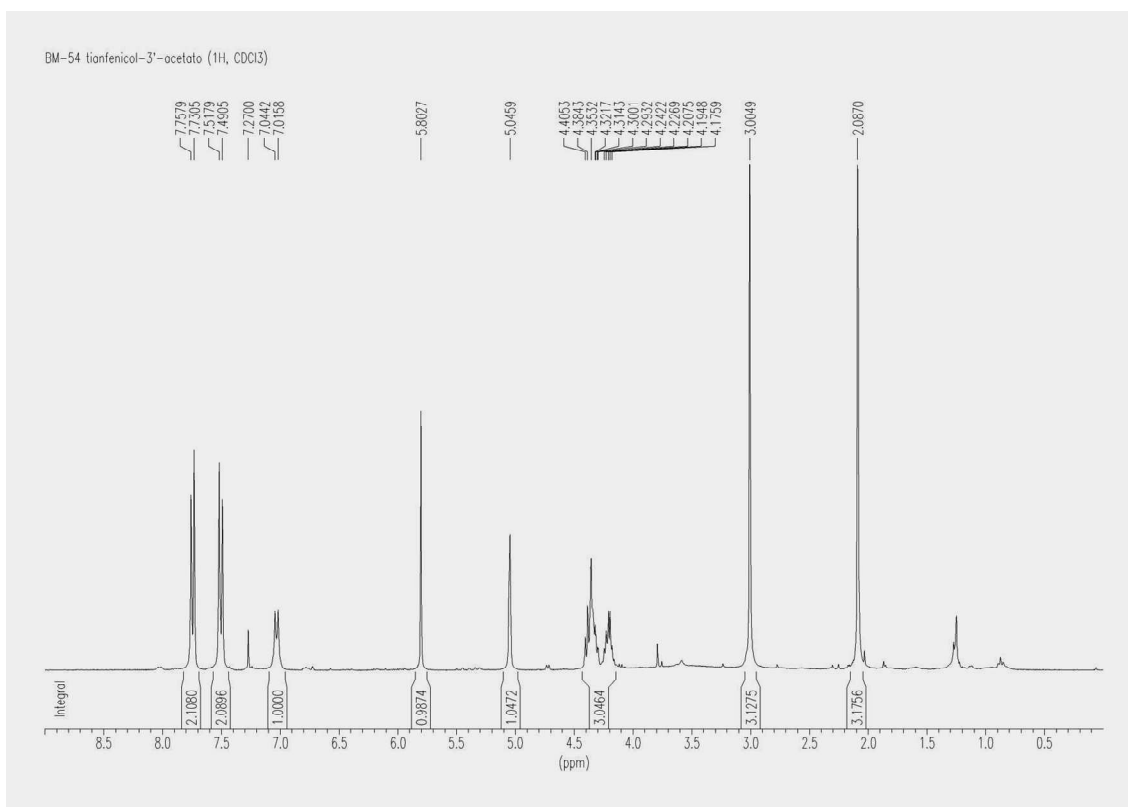
Anexo 48 - Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$ -DEPT de **5a**,  $\text{CDCl}_3$ , 75 MHz



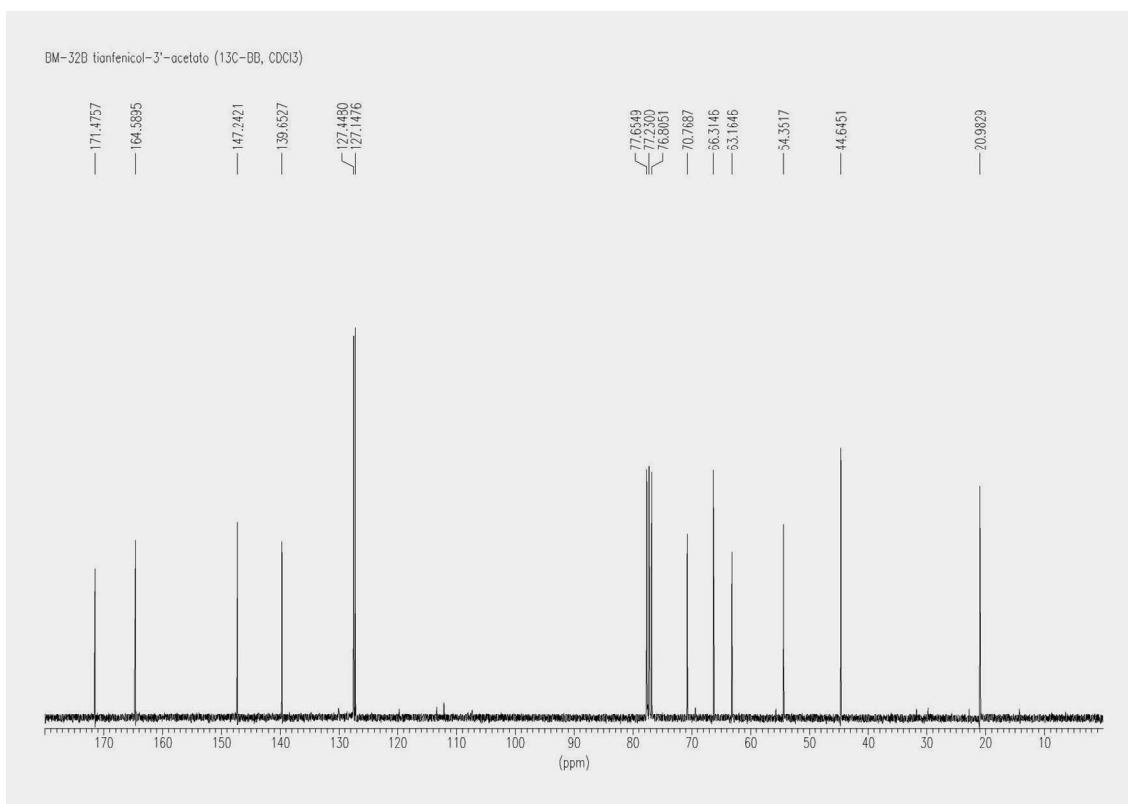
Anexo 49 - Espectro de IV de **5a**, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>.



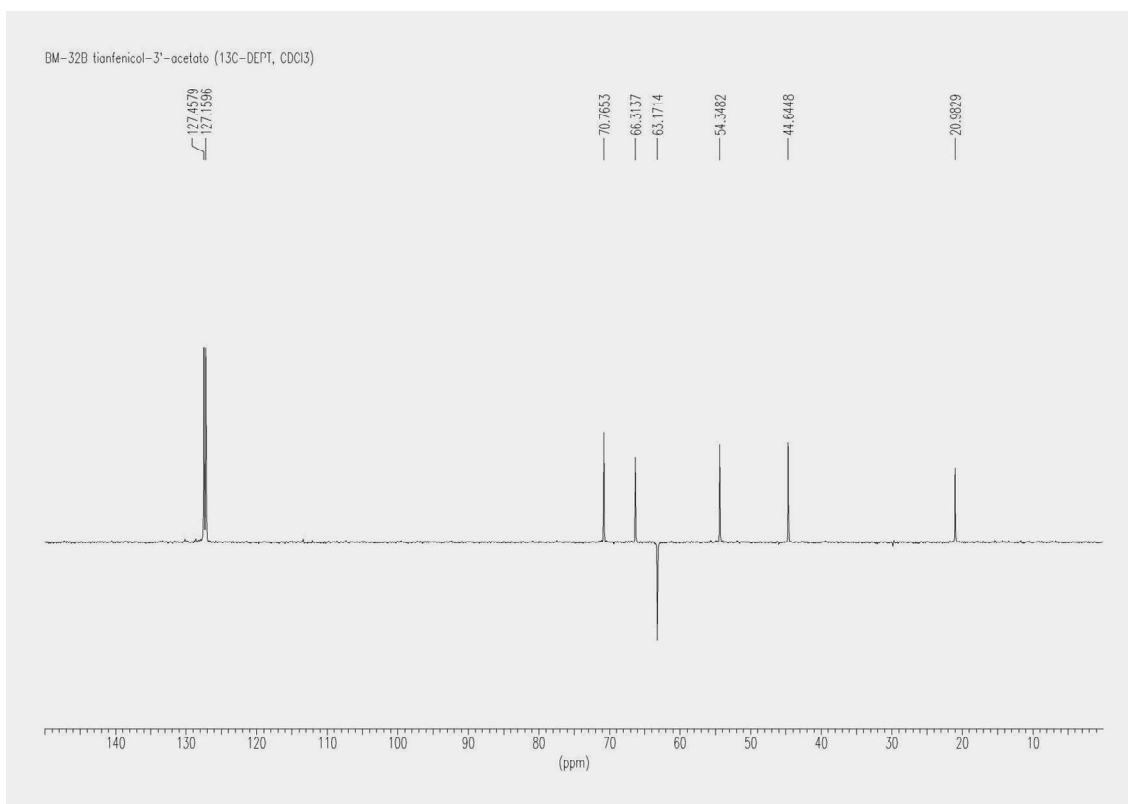
Anexo 50 – Espectro de massa de **5a**



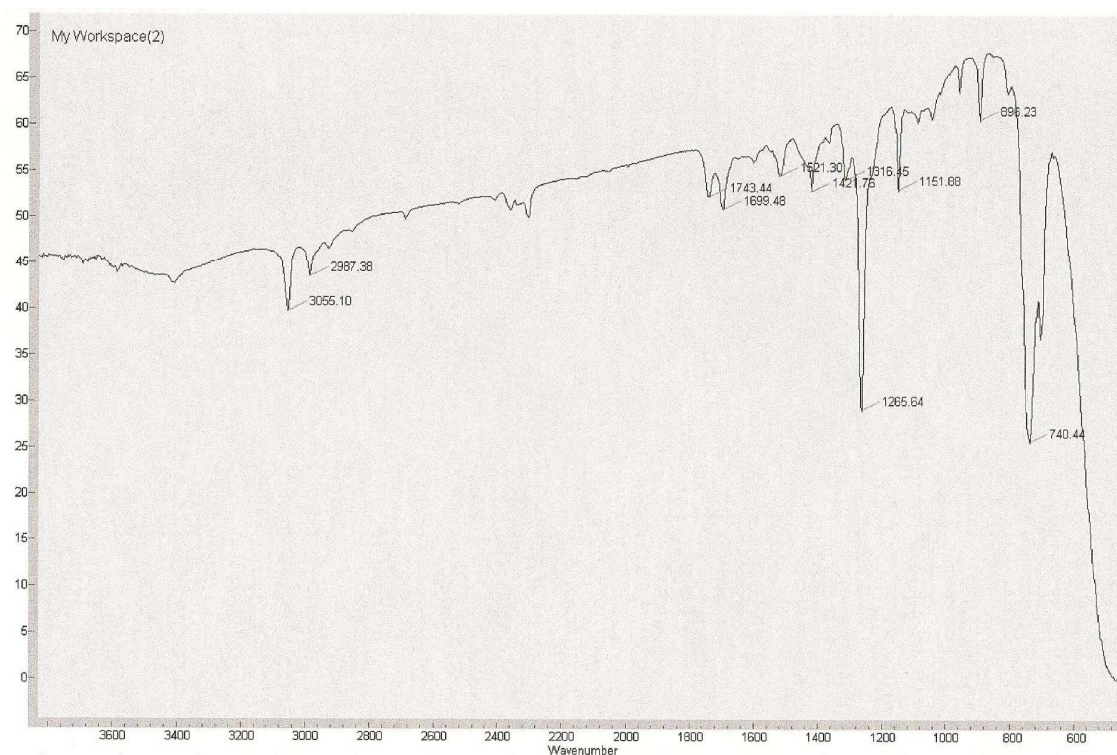
Anexo 51 – Espectro de RMN  $^1\text{H}$  de **6a**,  $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz



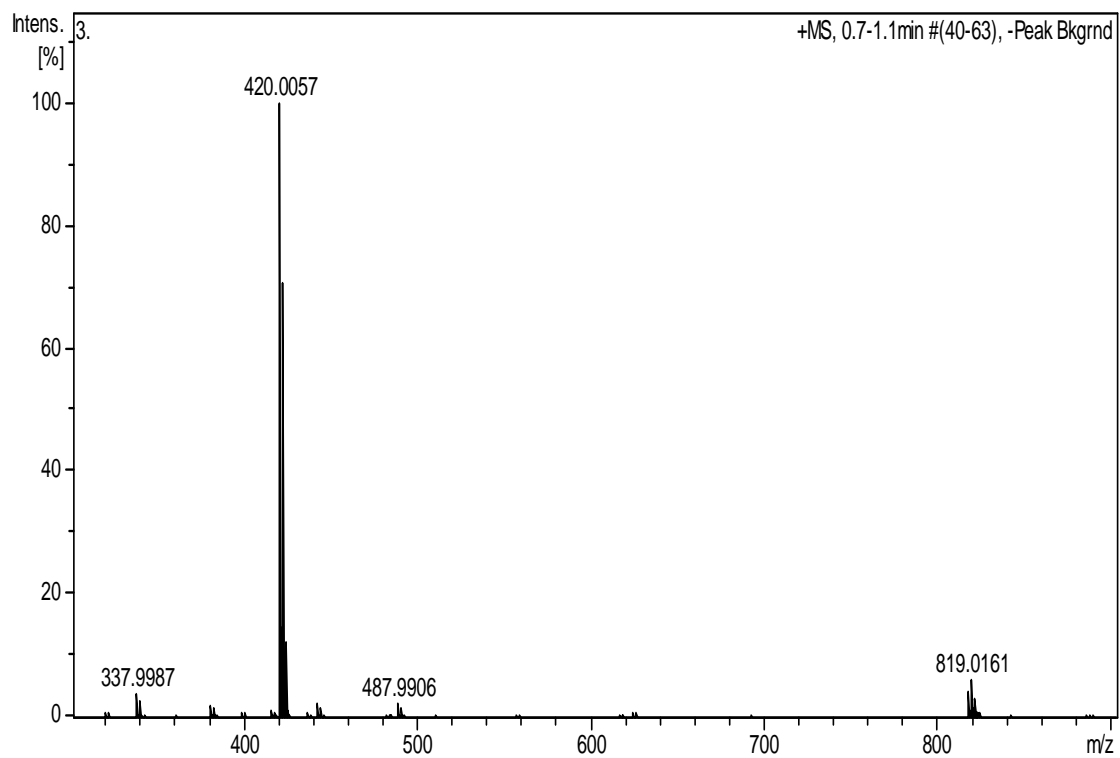
Anexo 52 – Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$ -BB de **6a**,  $\text{CDCl}_3$ , 75 MHz



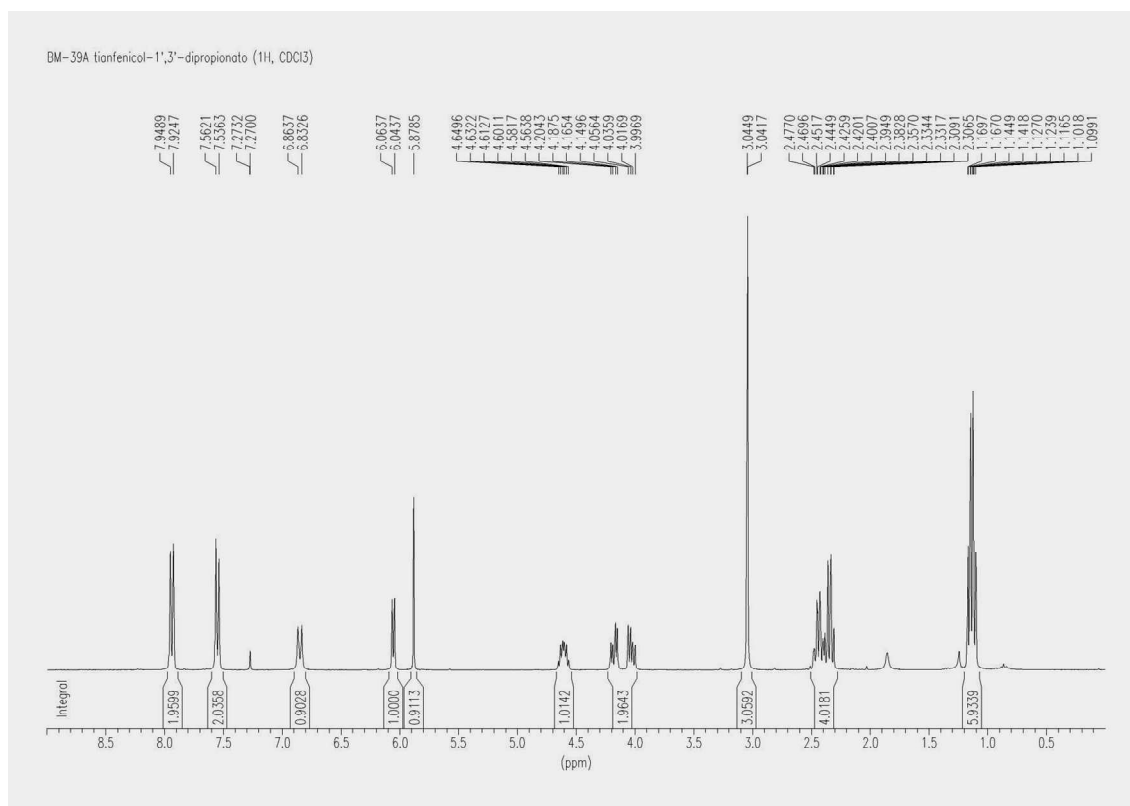
Anexo 53 – Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$ -DEPT de **6a**,  $\text{CDCl}_3$ , 75 MHz



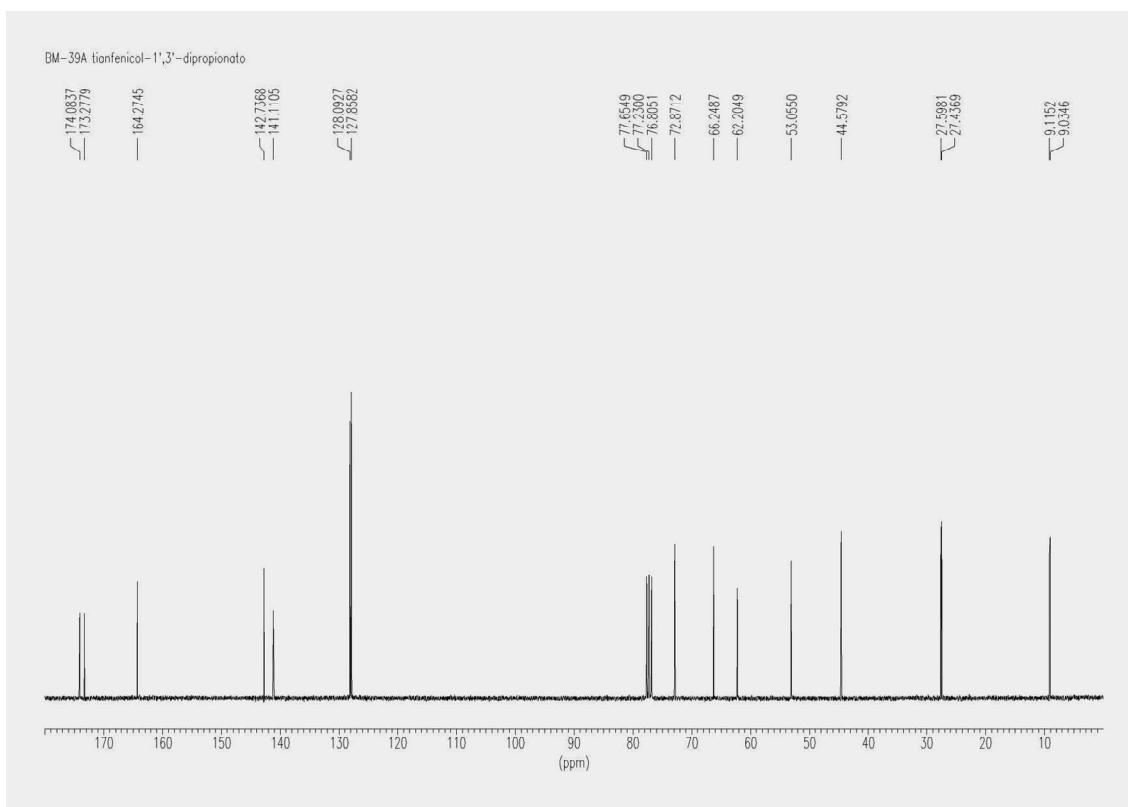
Anexo 54 – Espectro de IV de **6a**,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ .



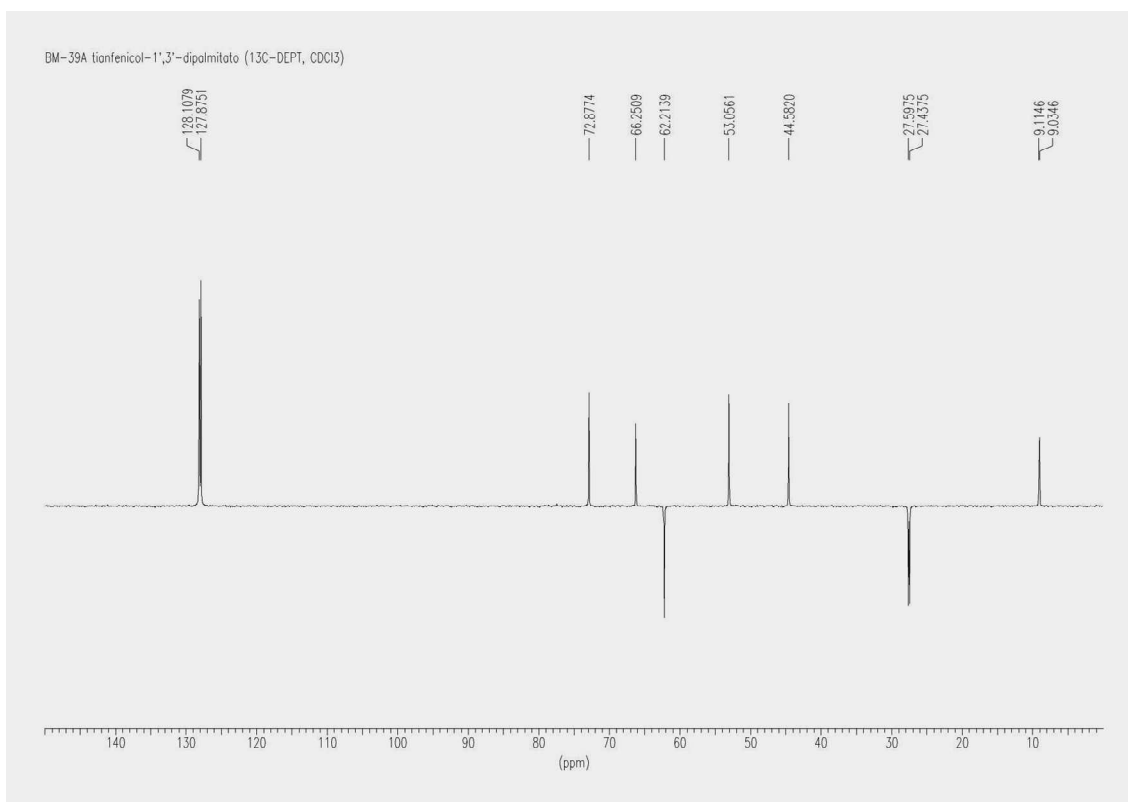
Anexo 55 – Espectro de massa exata de **6a**.



Anexo 56 – Espectro de RMN <sup>1</sup>H de **4b**, CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz

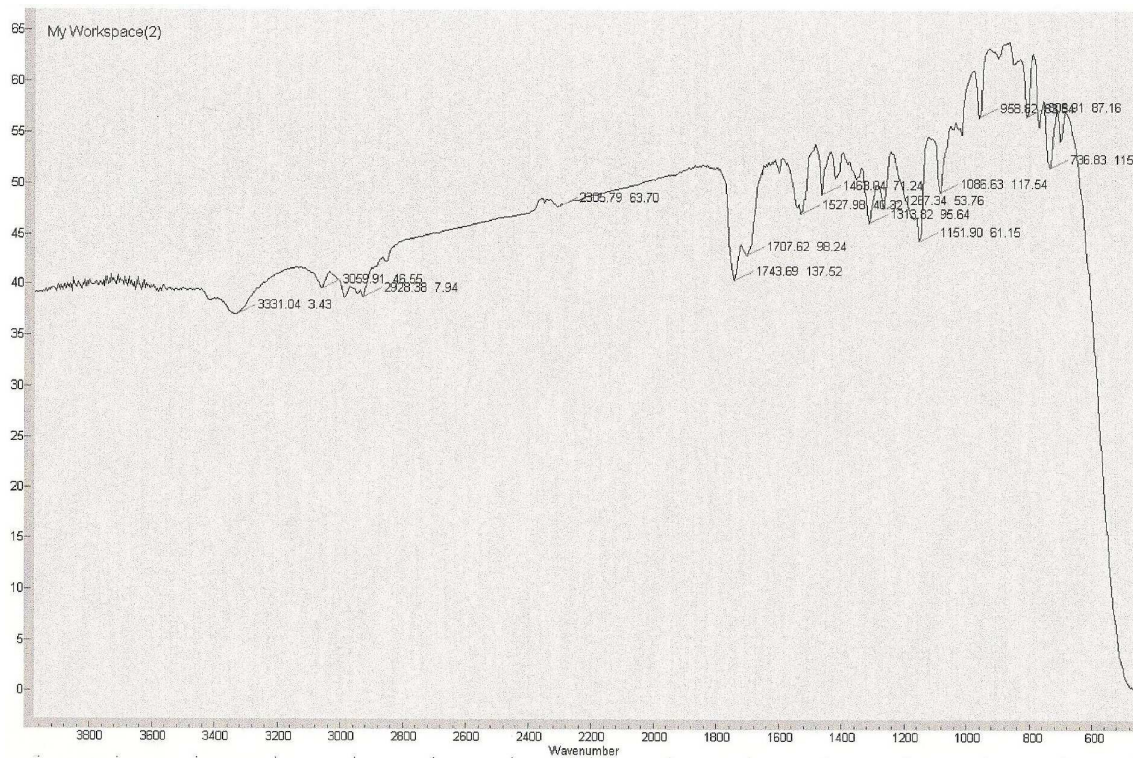


Anexo 57 – Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$ -BB de **4b**,  $\text{CDCl}_3$ , 75 MHz

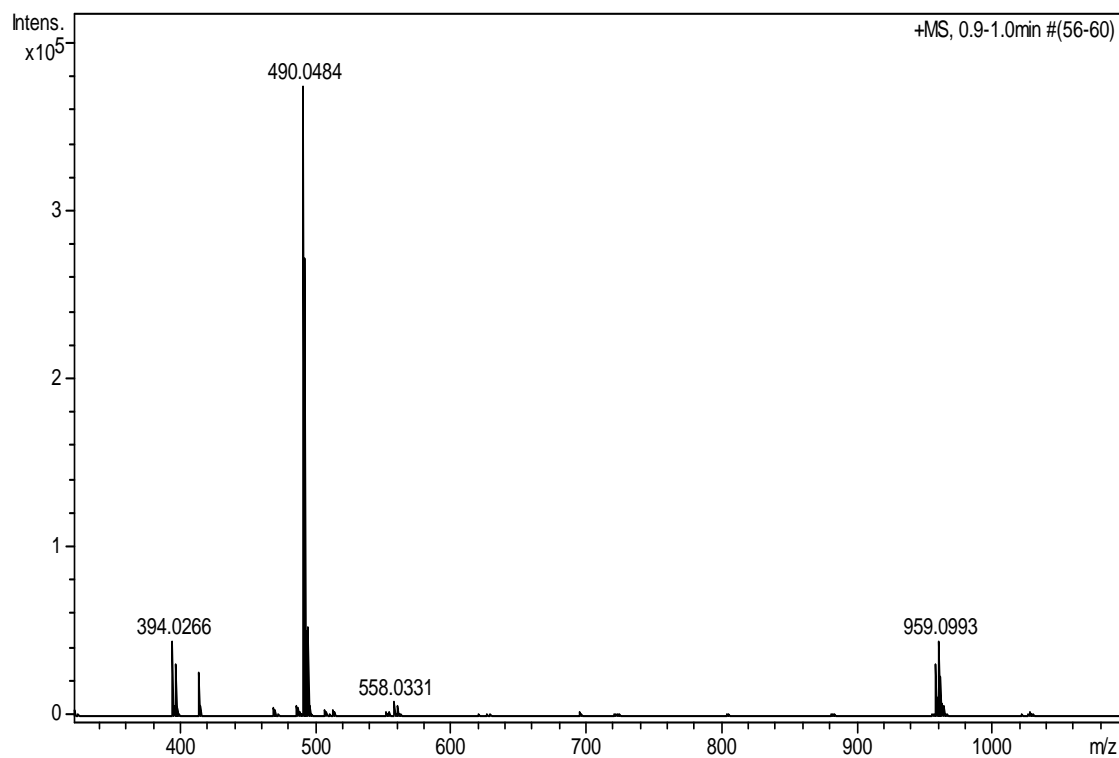


Anexo 58 – Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$ -DEPT de **4b**,  $\text{CDCl}_3$ , 75 MHz

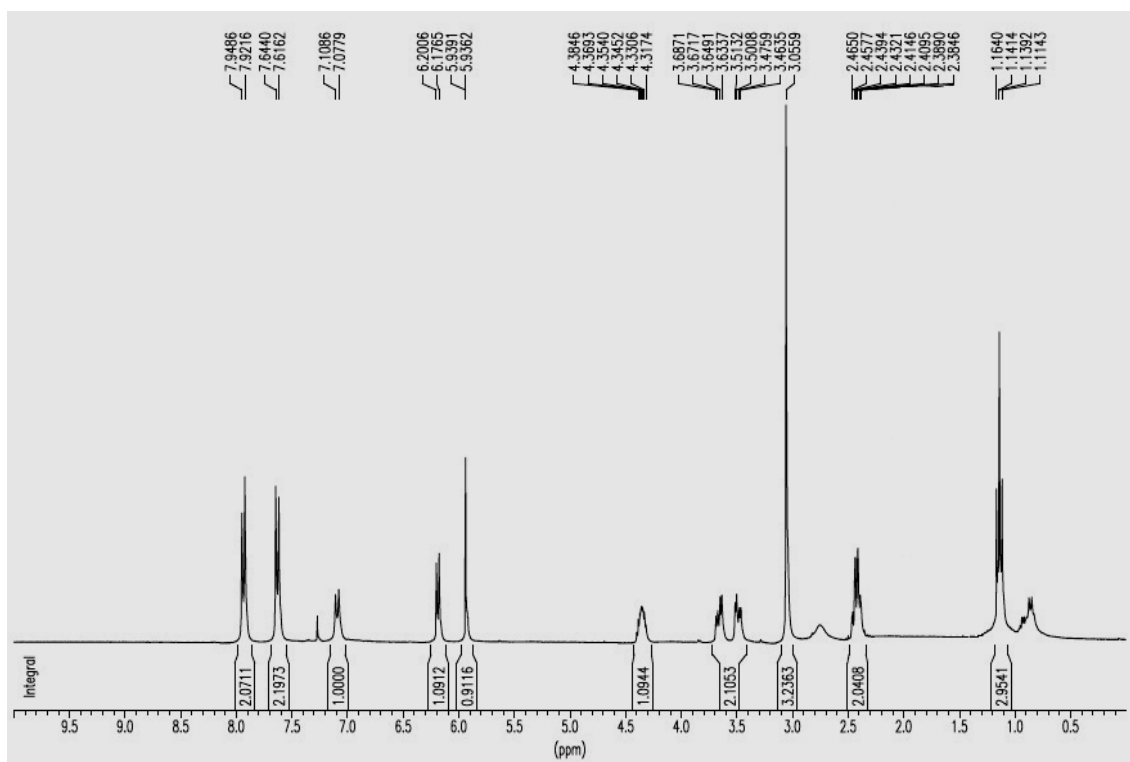




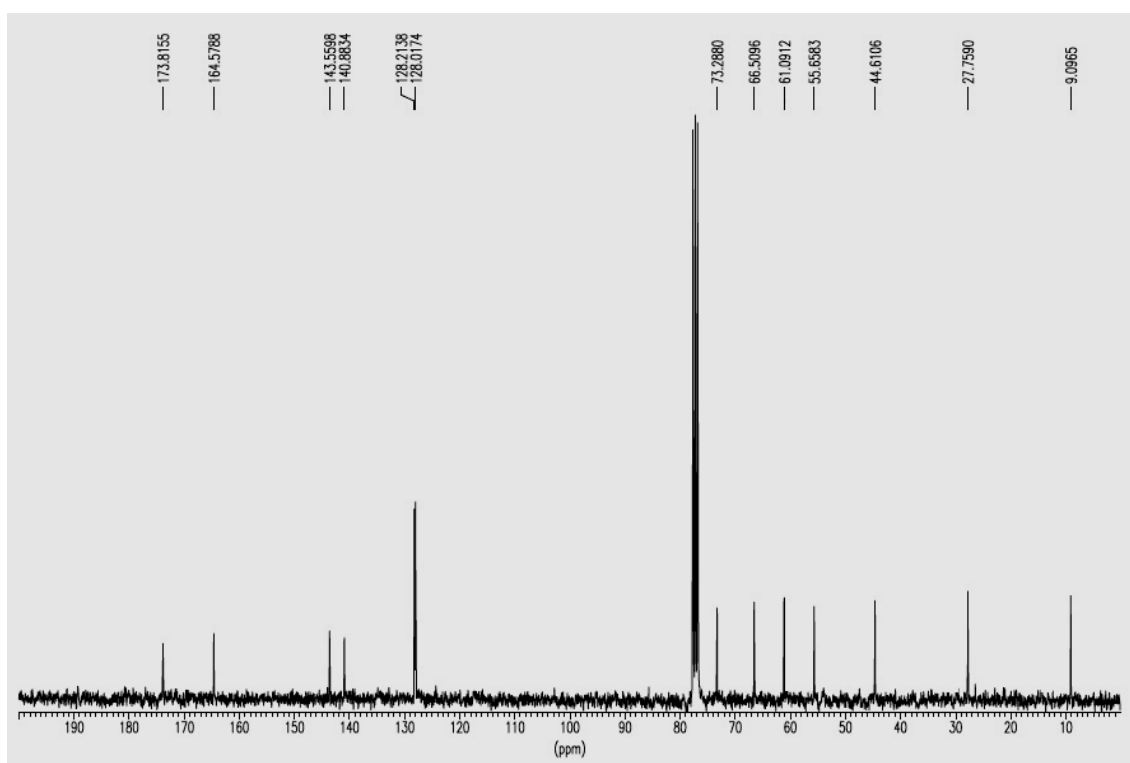
Anexo 59 – Espectro de IV de **4b**, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>.



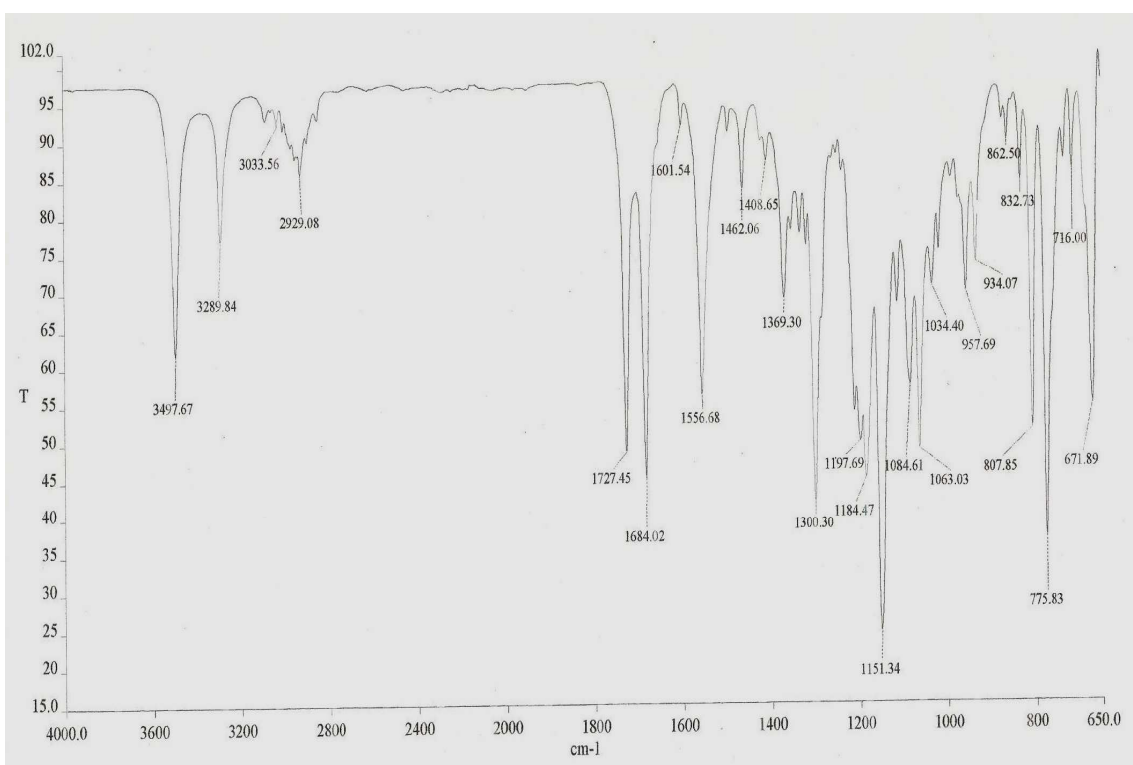
Anexo 60 – Espectro de massa exata de **4b**.



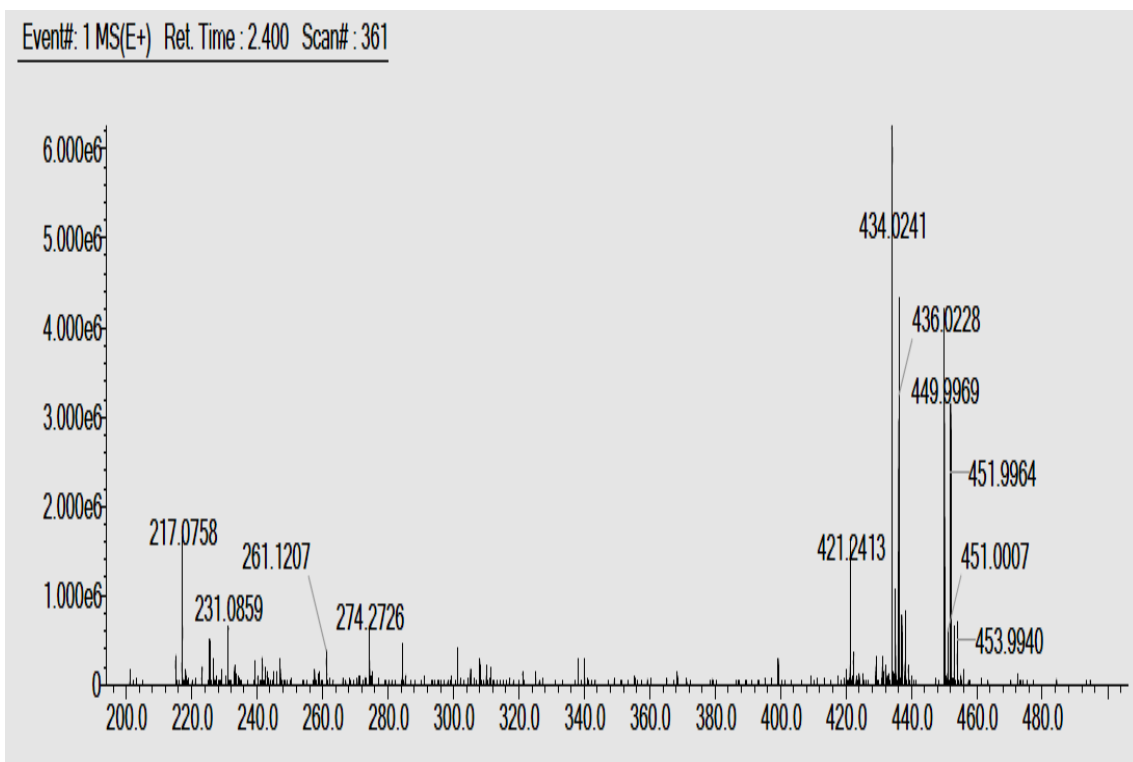
Anexo 61 – Espectro de RMN  $^1\text{H}$  de **5b**,  $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz



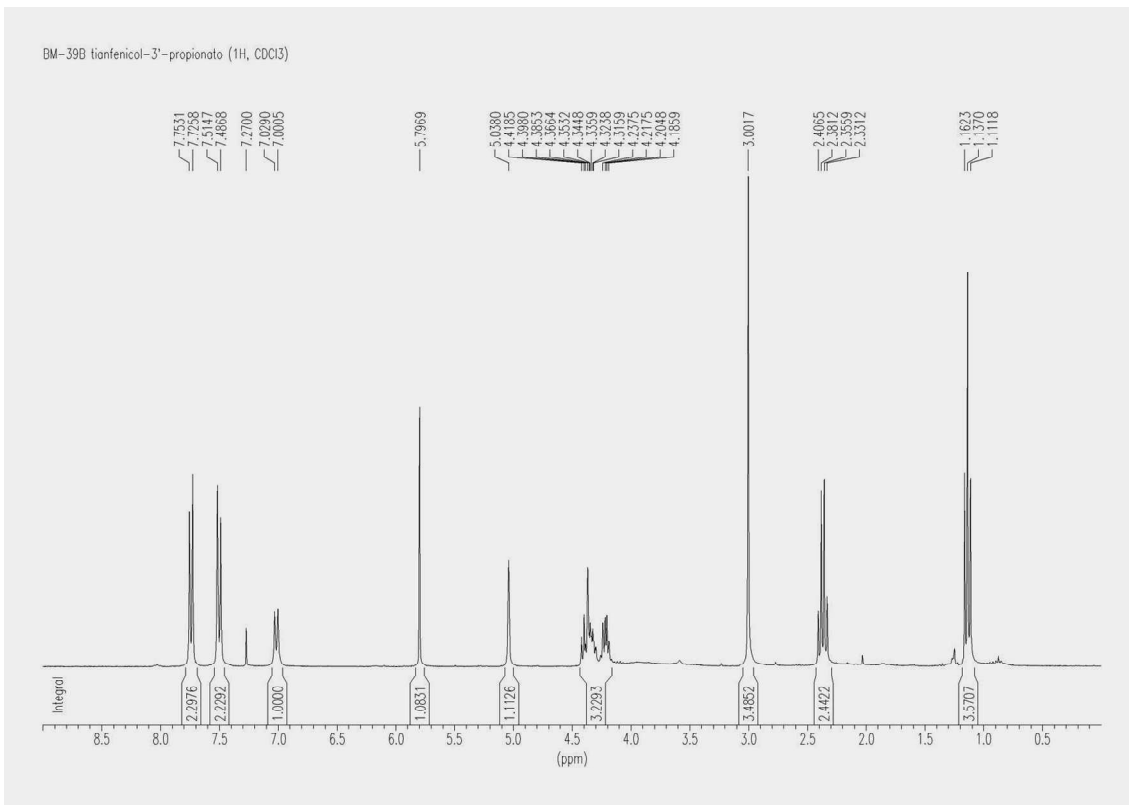
Anexo 62 - Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$ -BB de **5b**,  $\text{CDCl}_3$ , 75 MHz



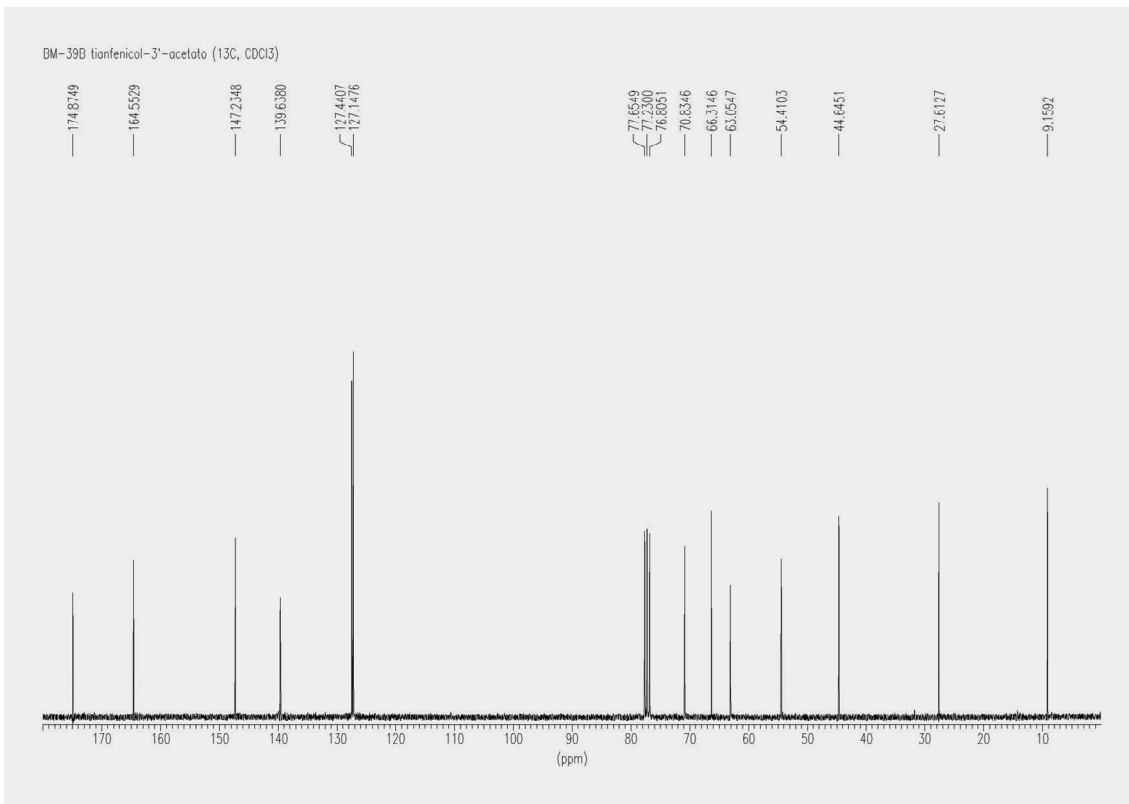
Anexo 63 – Espectro de IV de **5b**,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$



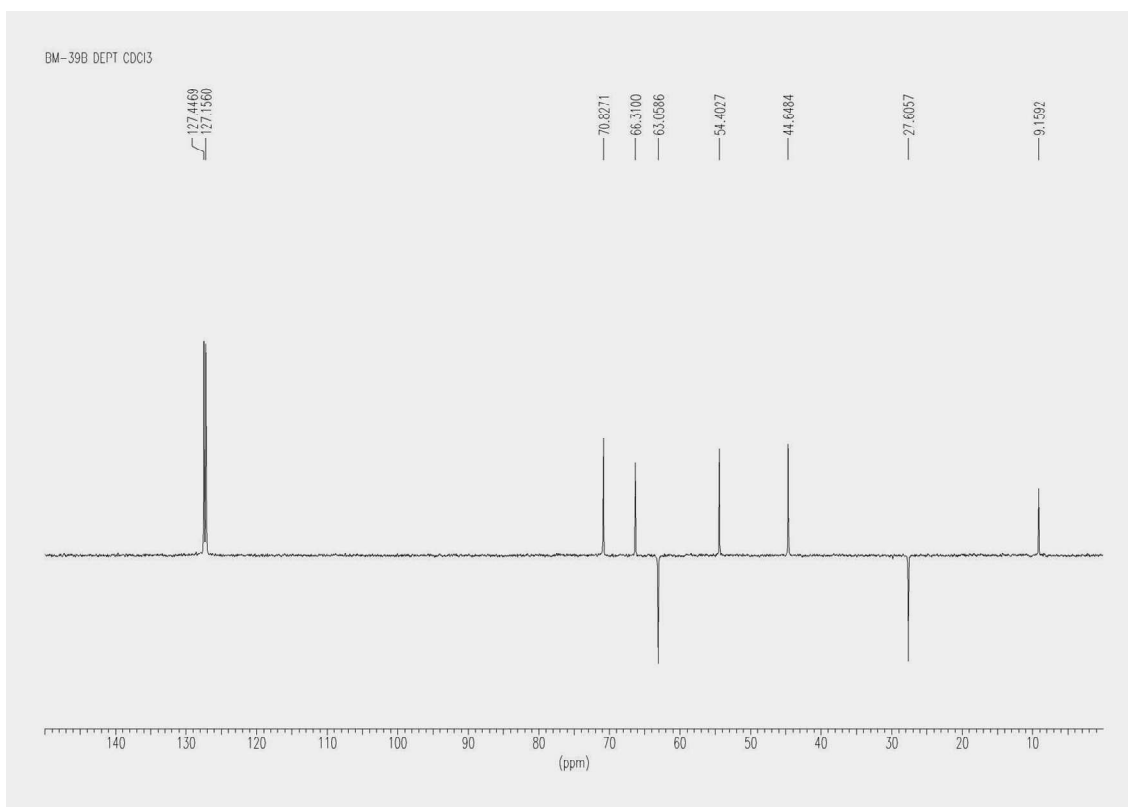
Anexo 64 – Espectro de EM de **5b**



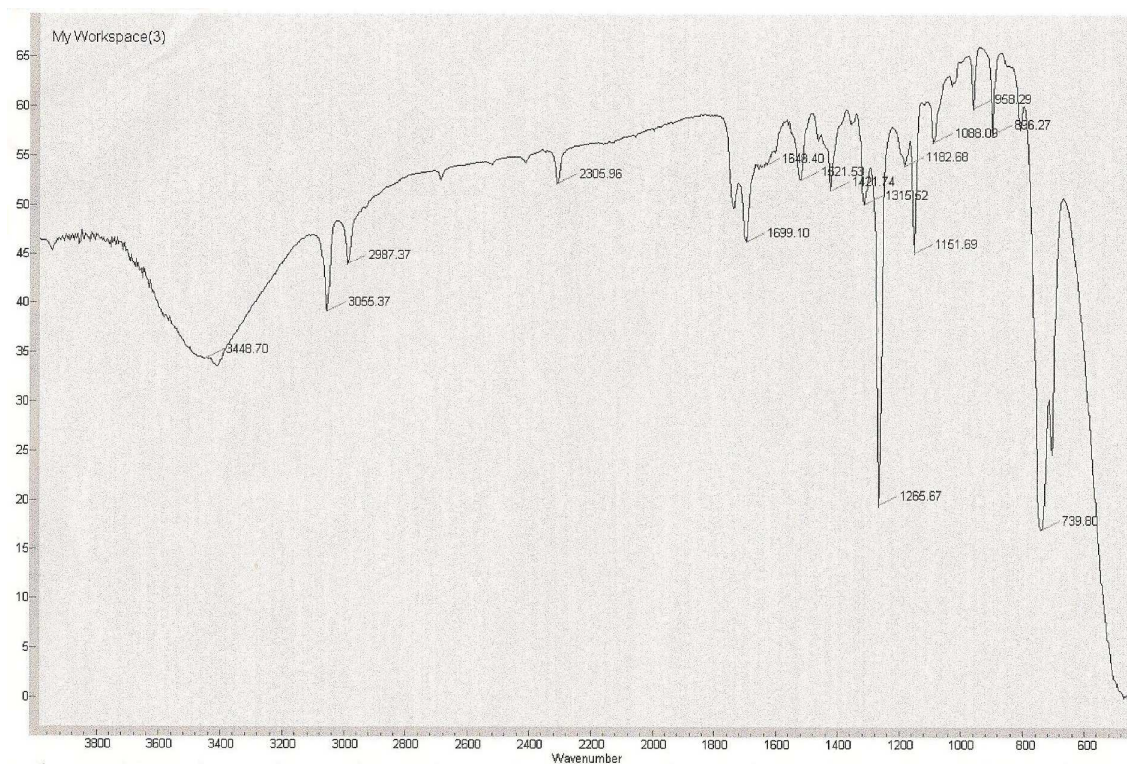
Anexo 65 – Espectro de RMN  $^1\text{H}$  de **6b**,  $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz



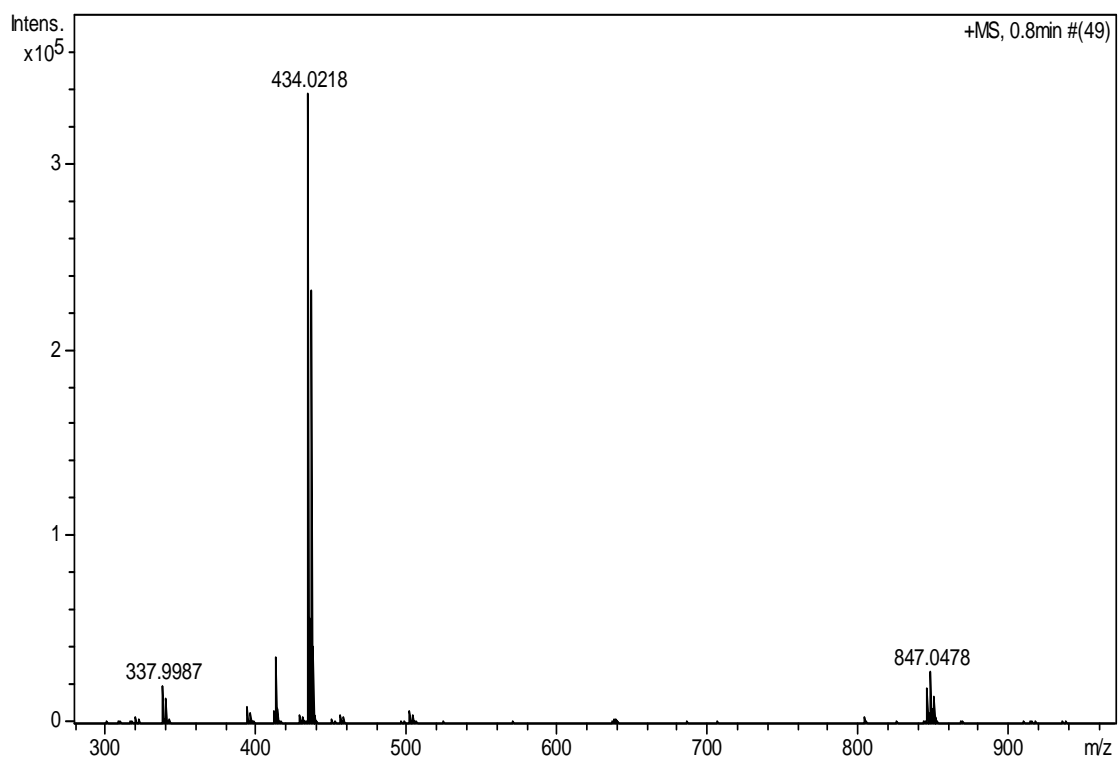
Anexo 66 – Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$ -BB de **6b**,  $\text{CDCl}_3$ , 75 MHz



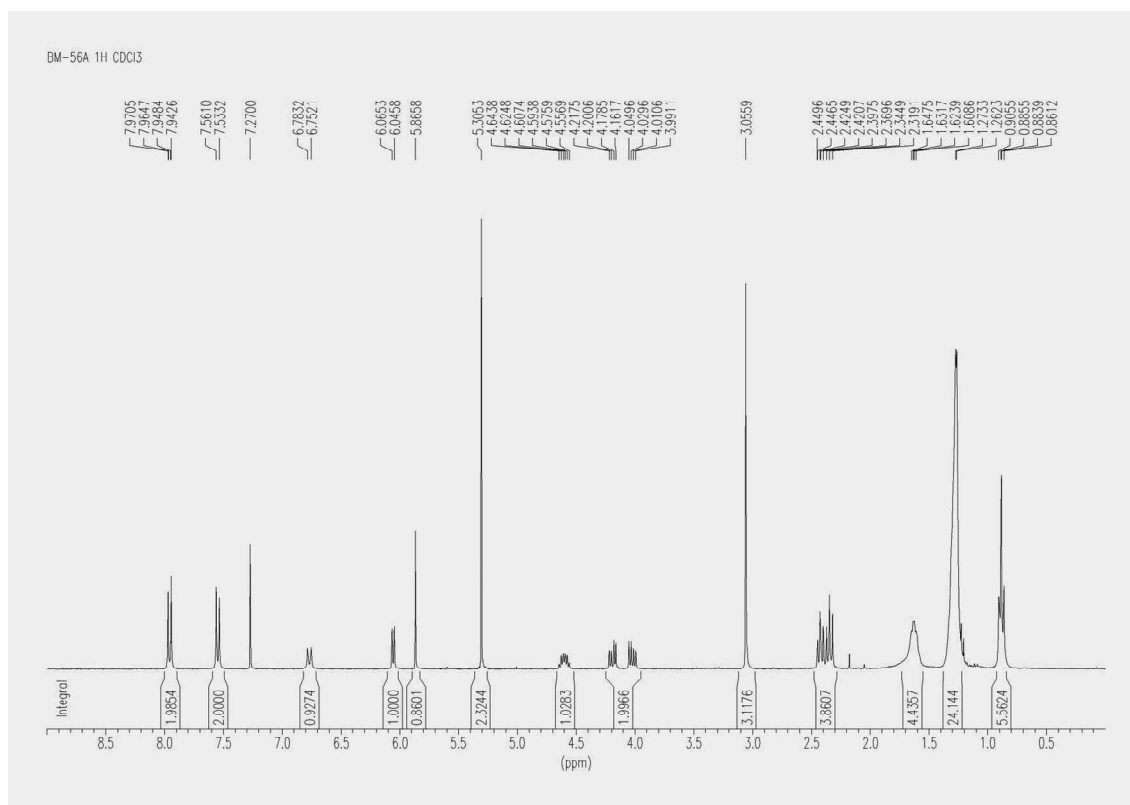
Anexo 67 – Espectro de RMN <sup>13</sup>C-DEPT de **6b**, CDCl<sub>3</sub>, 75 MHz



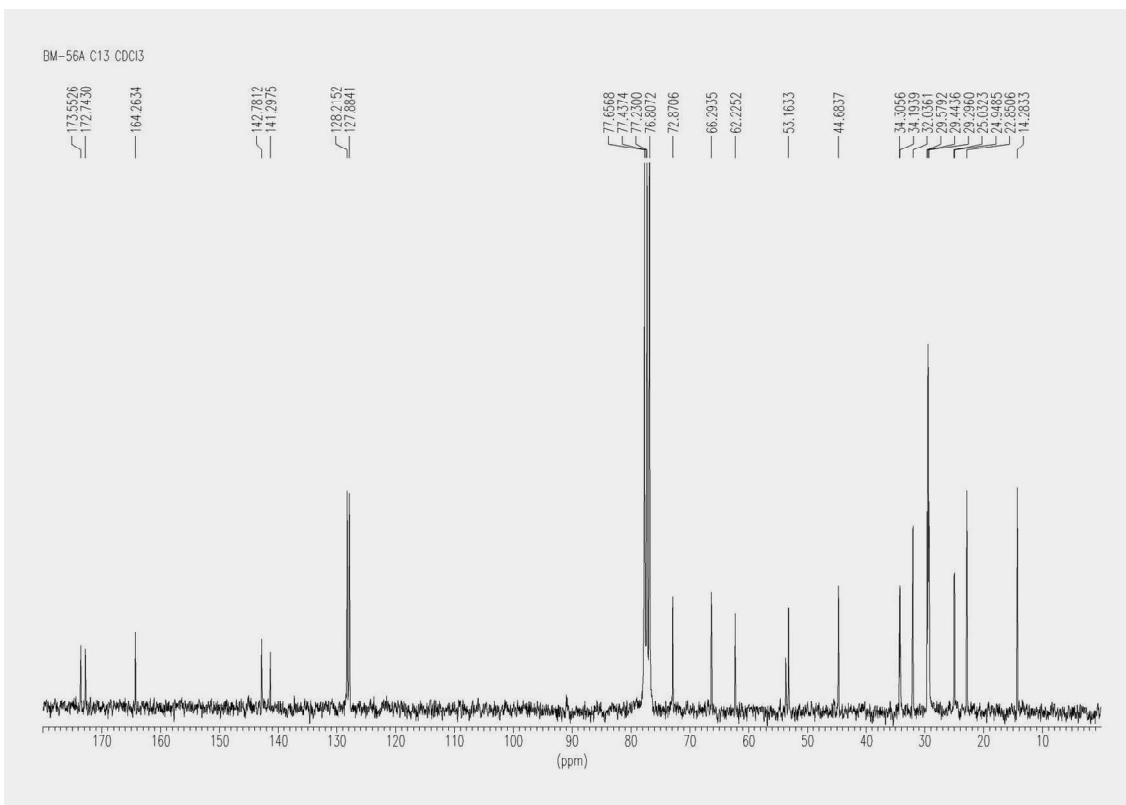
Anexo 68 – Espectro de IV de **6b**, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>.



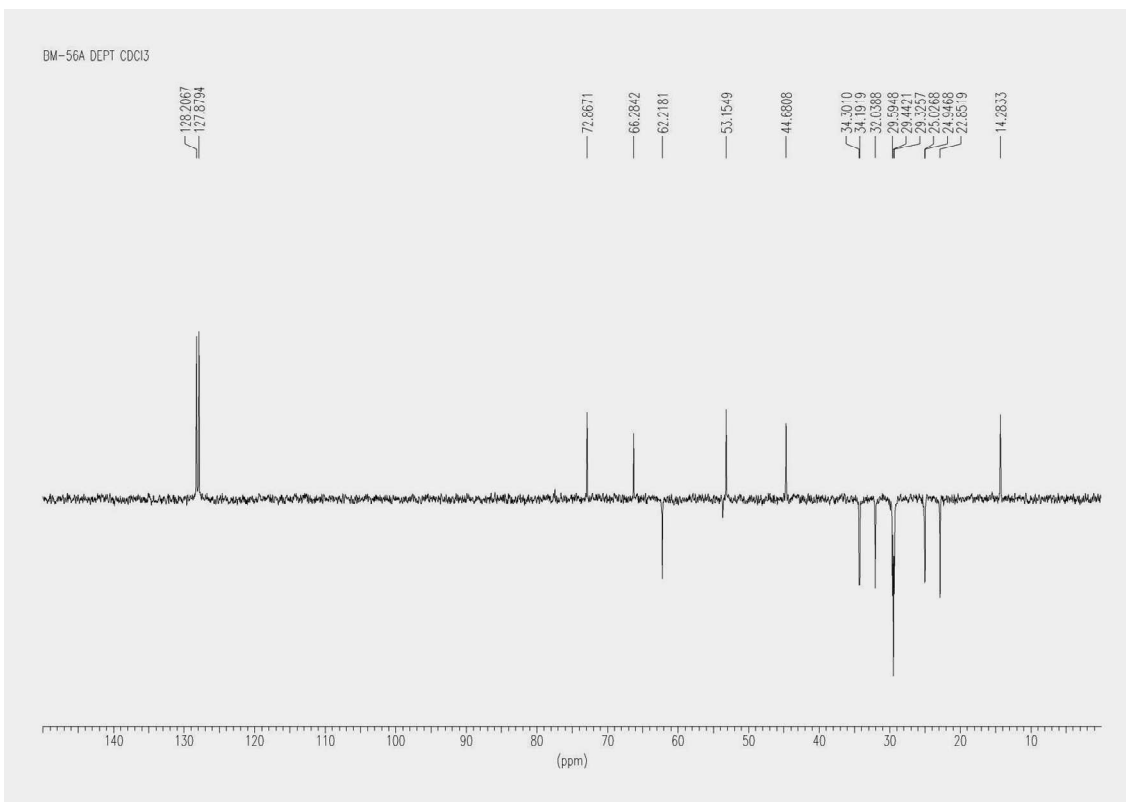
Anexo 69 – Espectro de massa exata de **6b**.



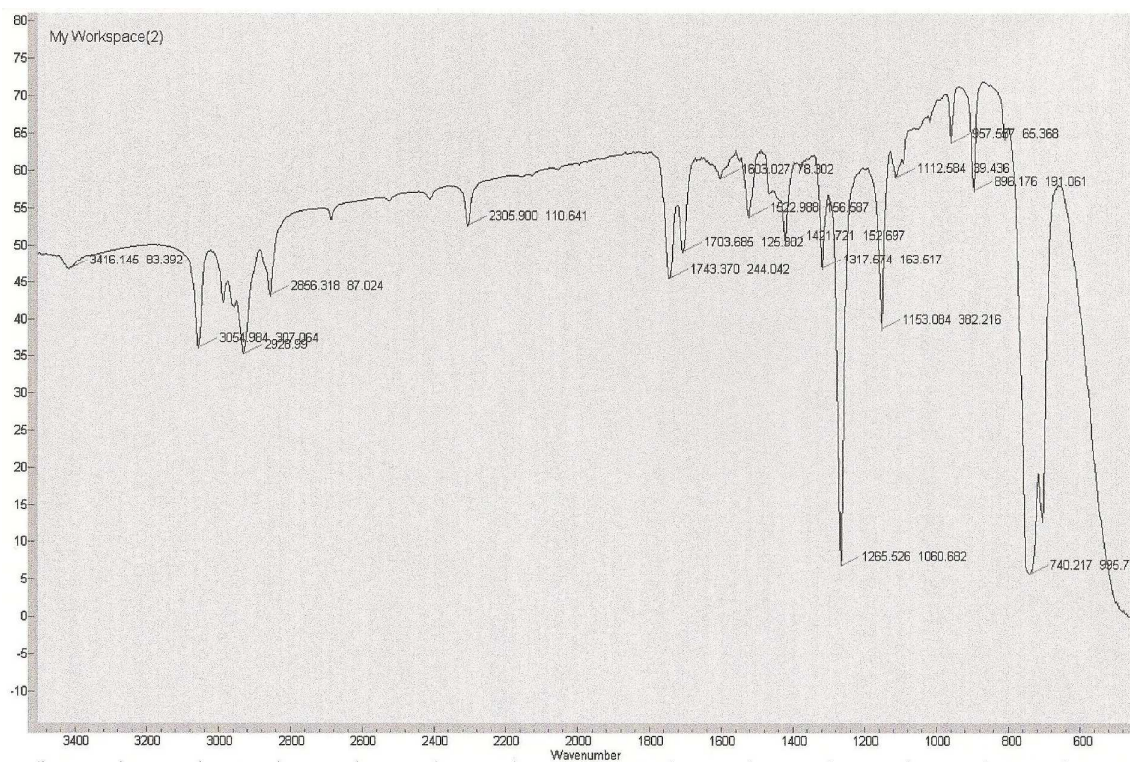
Anexo 70 – Espectro de RMN <sup>1</sup>H de **4c**, CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz



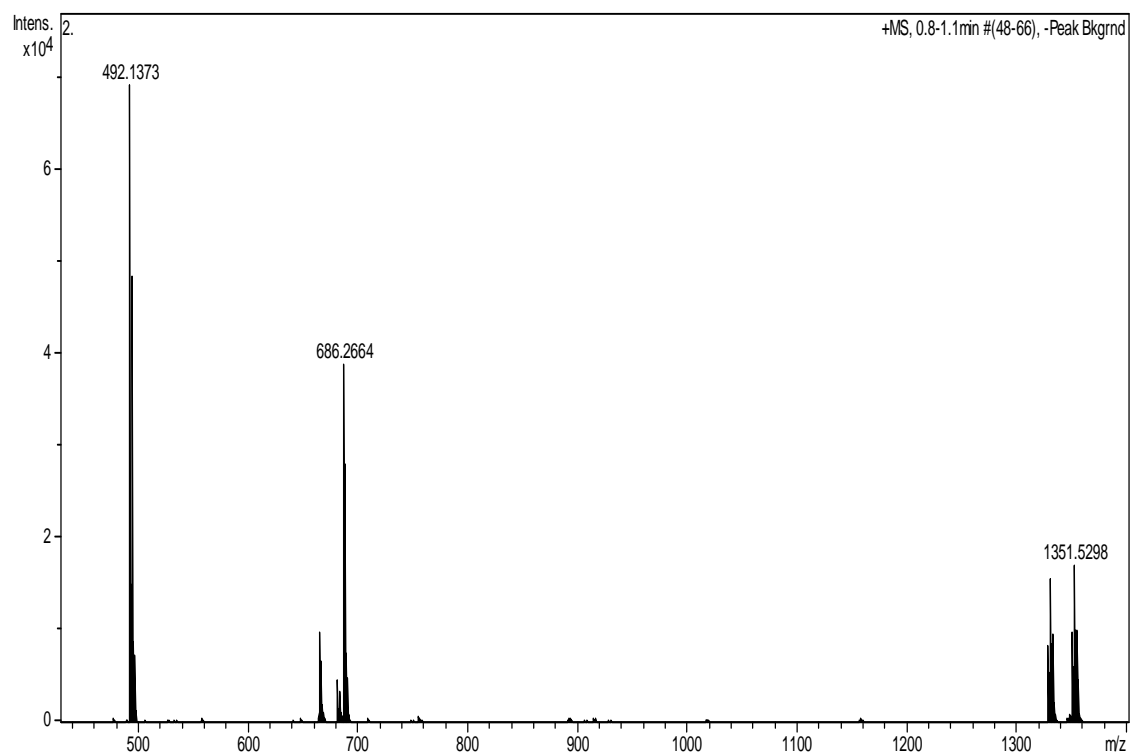
Anexo 71 – Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  –BB de **4c**,  $\text{CDCl}_3$ , 75 MHz



Anexo 72 – Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$ -DEPT de **4c**,  $\text{CDCl}_3$ , 75 MHz.

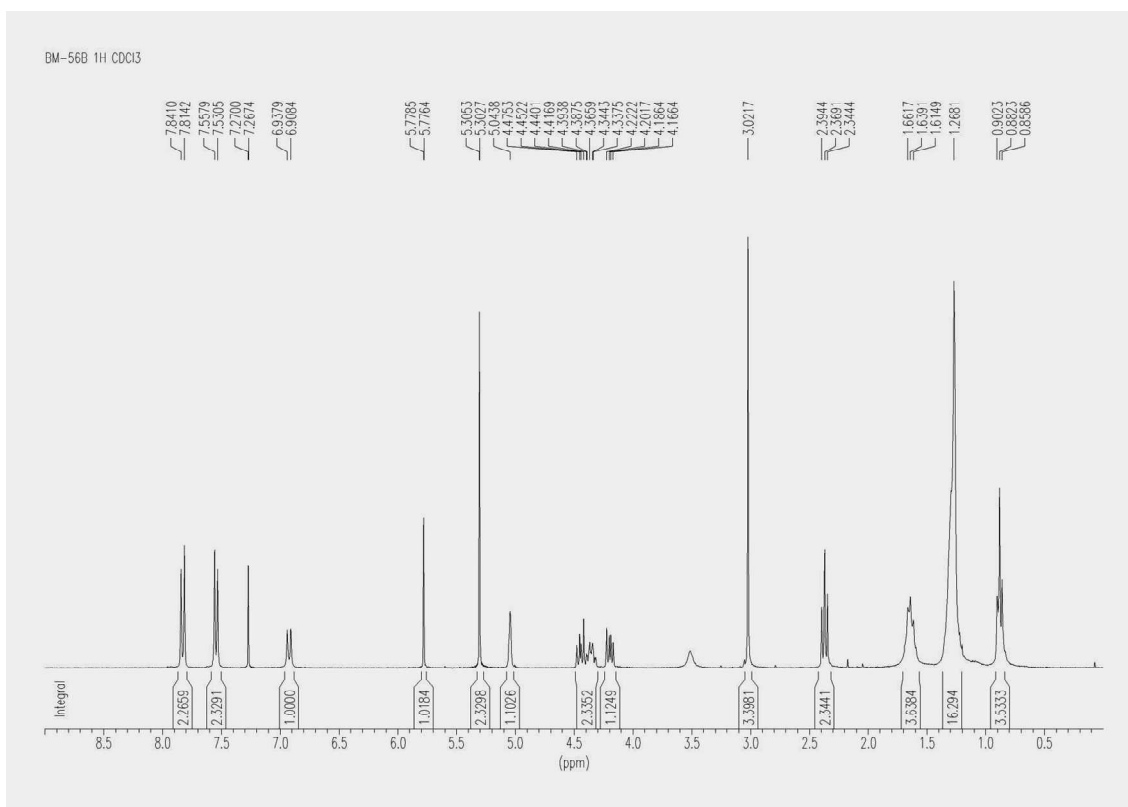


Anexo 73 – Espectro de IV de **4c**, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>.

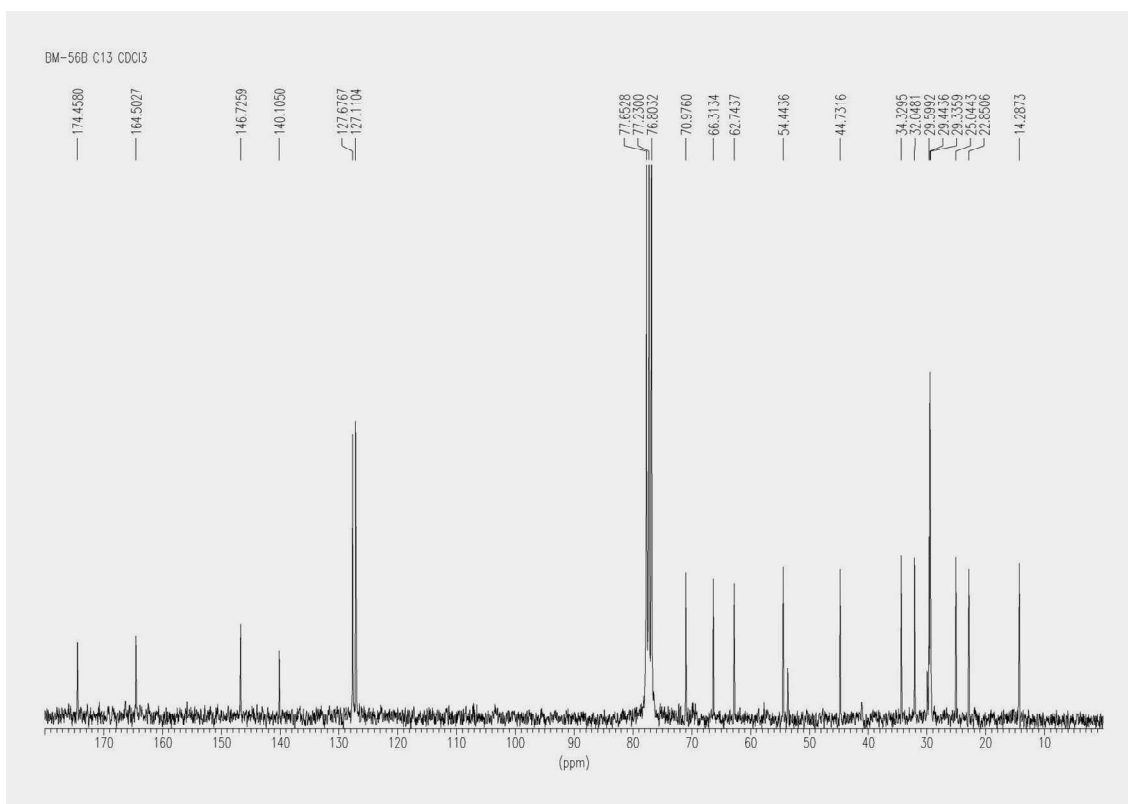


Anexo 74 – Espectro de massa exata de **4c**.

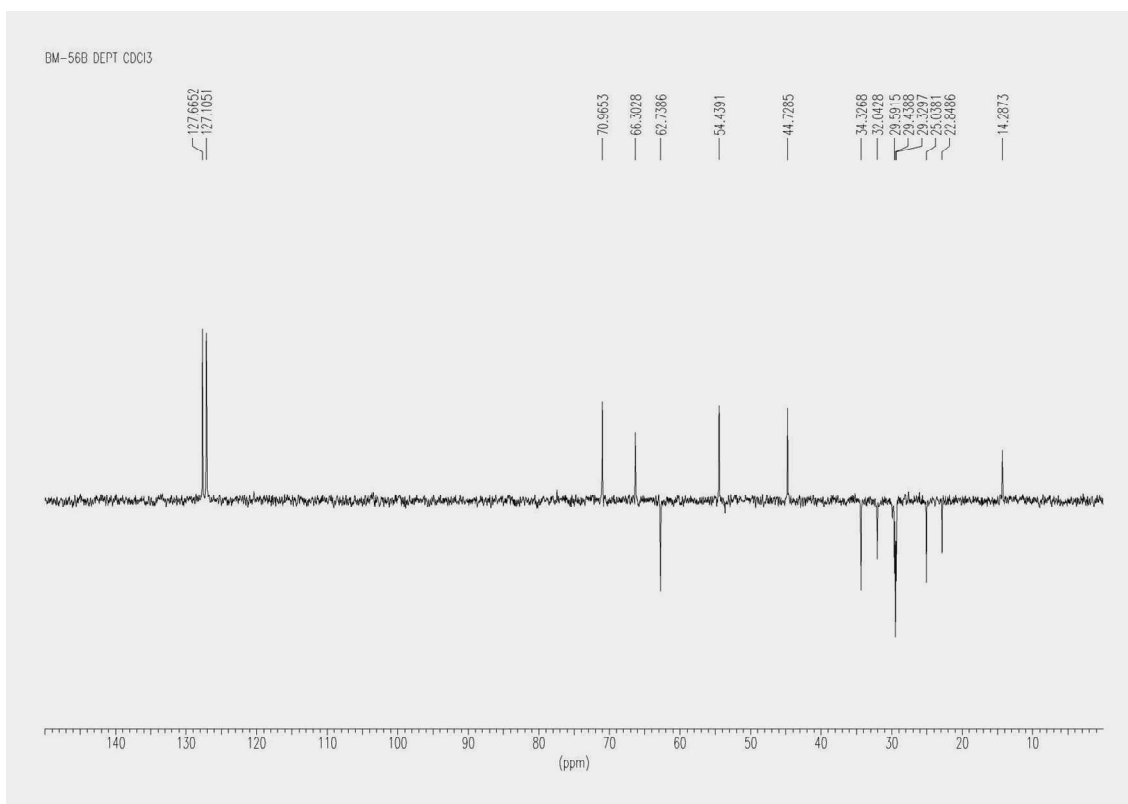




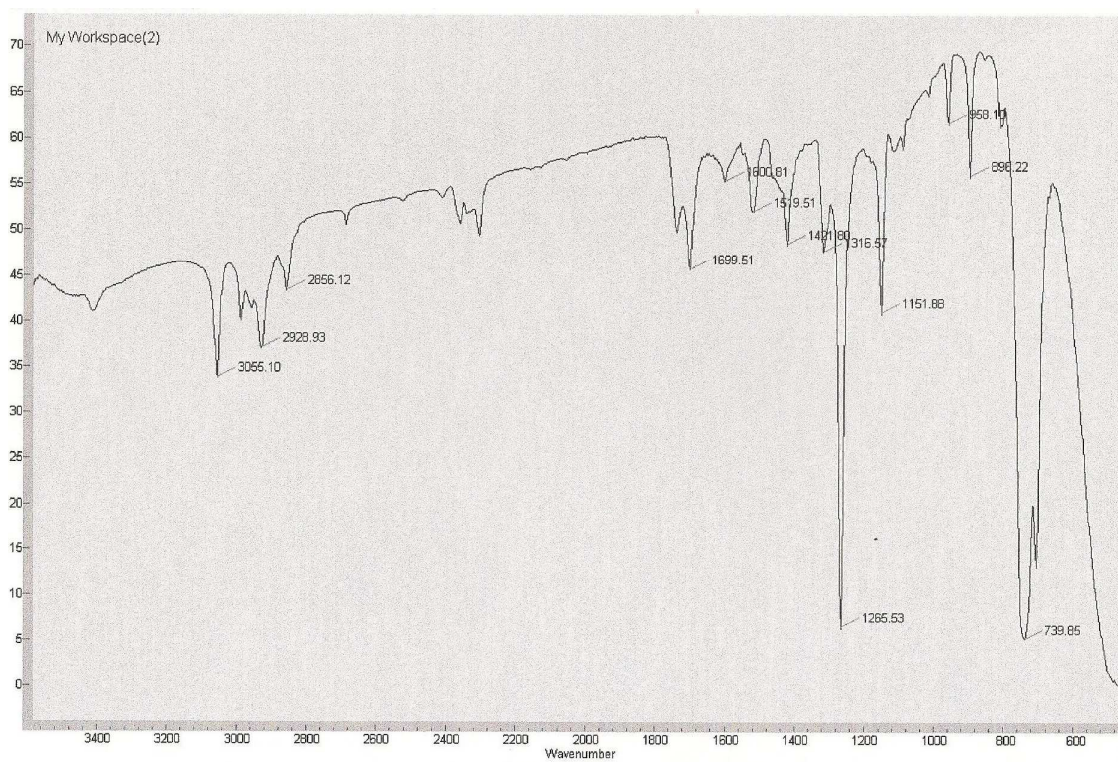
Anexo 75 – Espectro de RMN  $^1\text{H}$  de **6c**,  $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz



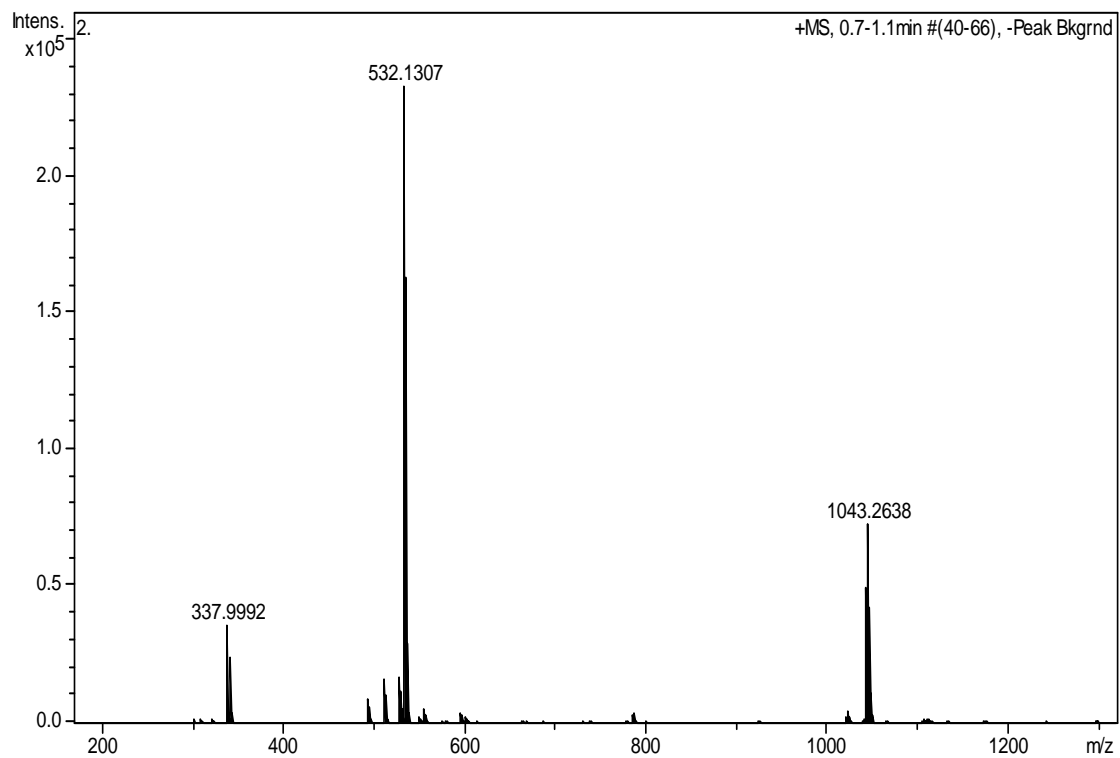
Anexo 76 – Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$ -BB de **6c**,  $\text{CDCl}_3$ , 75 MHz



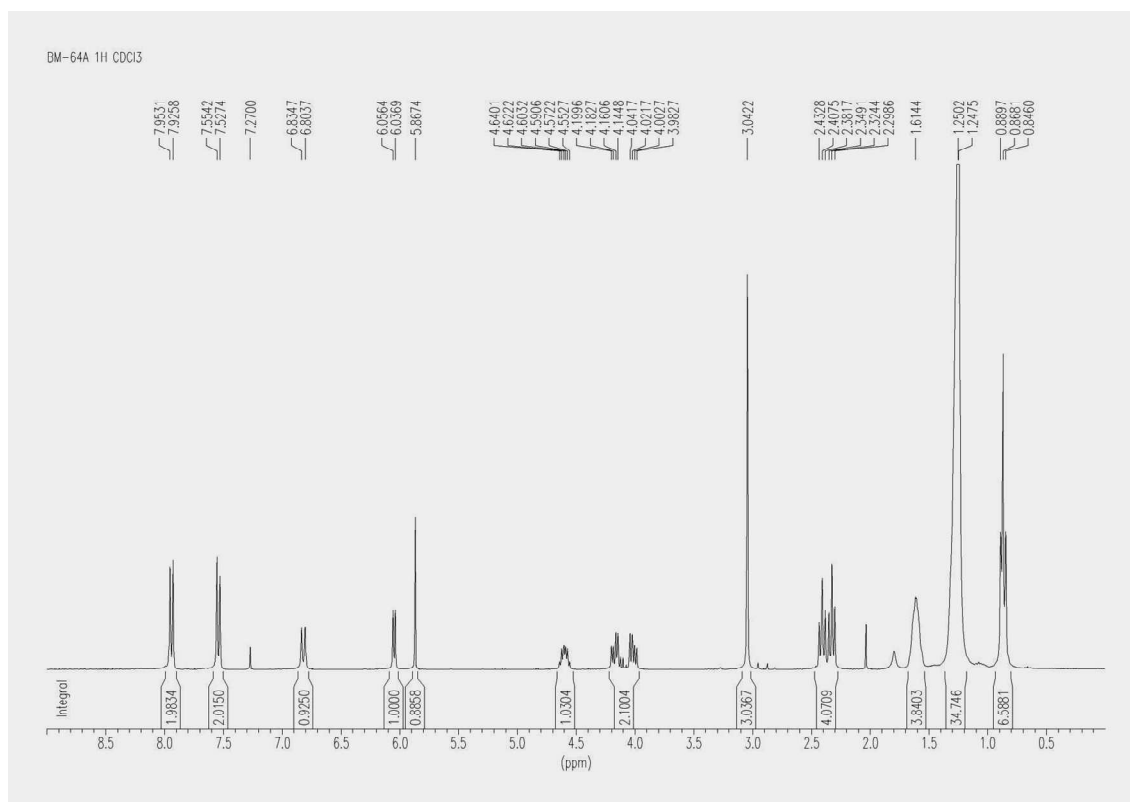
Anexo 77 – Espectro de RMN <sup>13</sup>C-DEPT de **6c**, CDCl<sub>3</sub>, 75 MHz



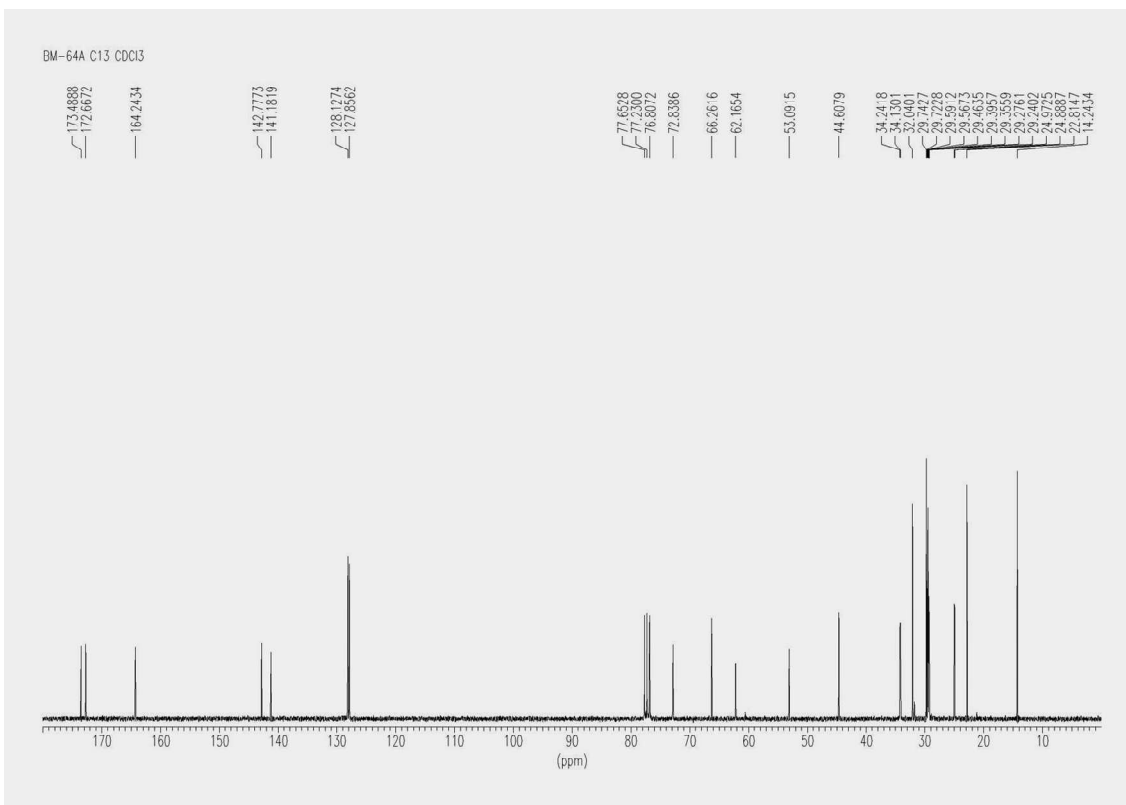
Anexo 78 – Espectro de IV de **6c**, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>.



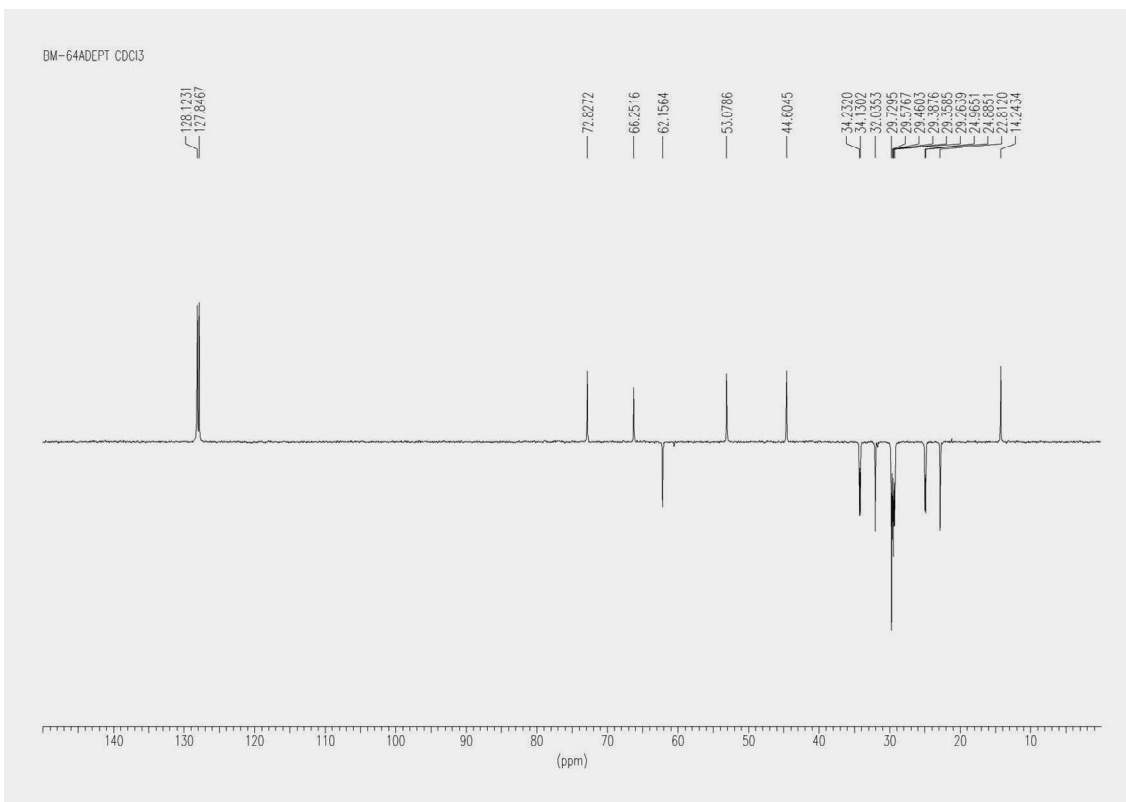
Anexo 79 – Espectro de massa exata de **6c**.



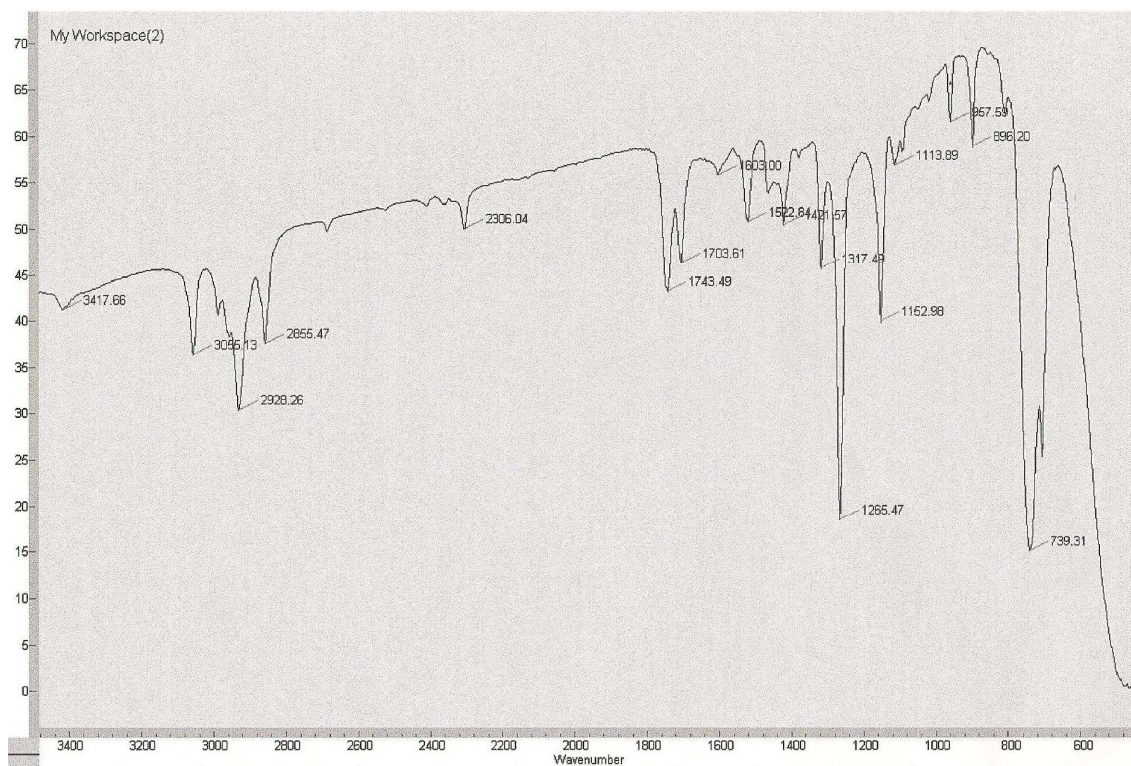
Anexo 80 – Espectro de RMN <sup>1</sup>H de **4d**, CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz



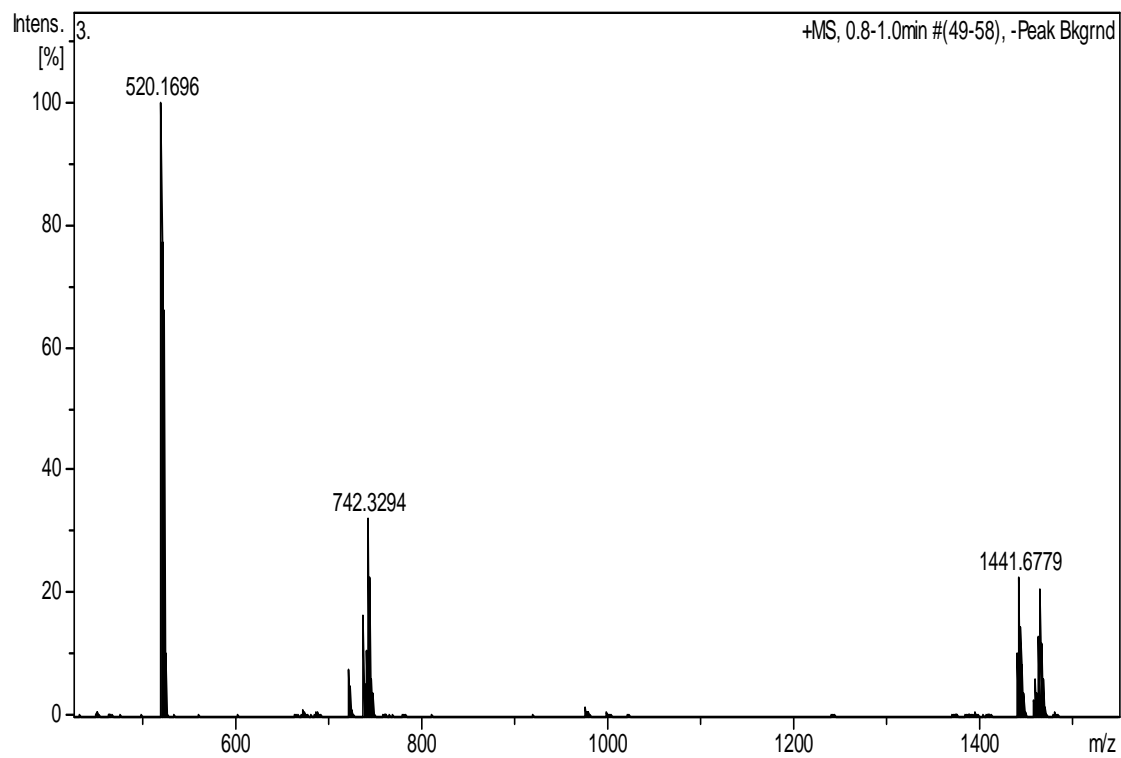
Anexo 81 – Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$ -BB de **4d**,  $\text{CDCl}_3$ , 75 MHz



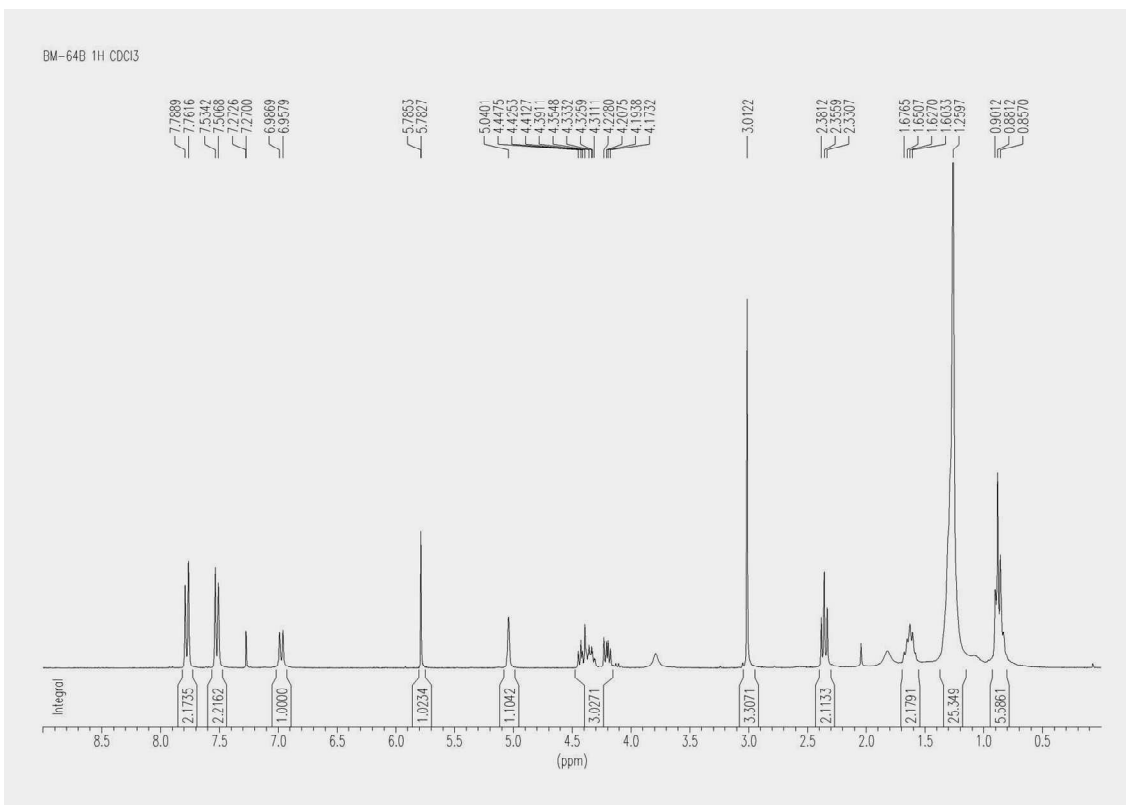
Anexo 82 – Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$ -DEPT de **4d**,  $\text{CDCl}_3$ , 75 MHz.



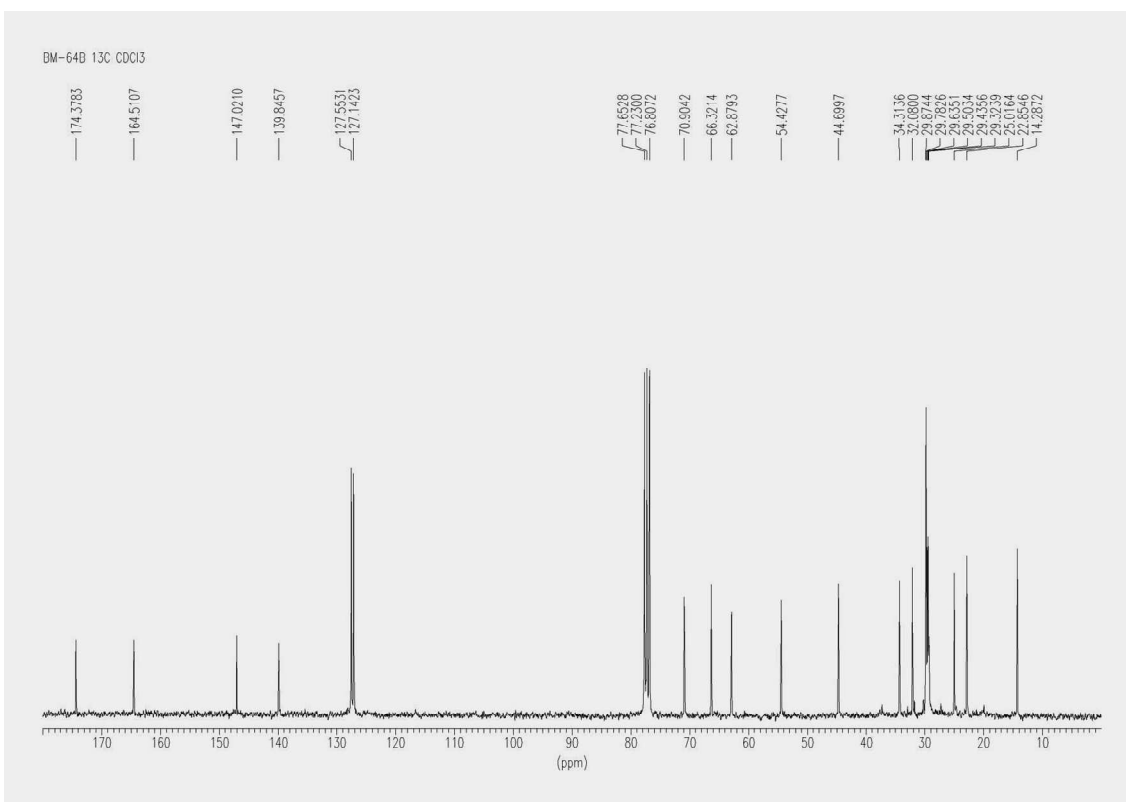
Anexo 83 – Espectro de IV de **4d**, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>.



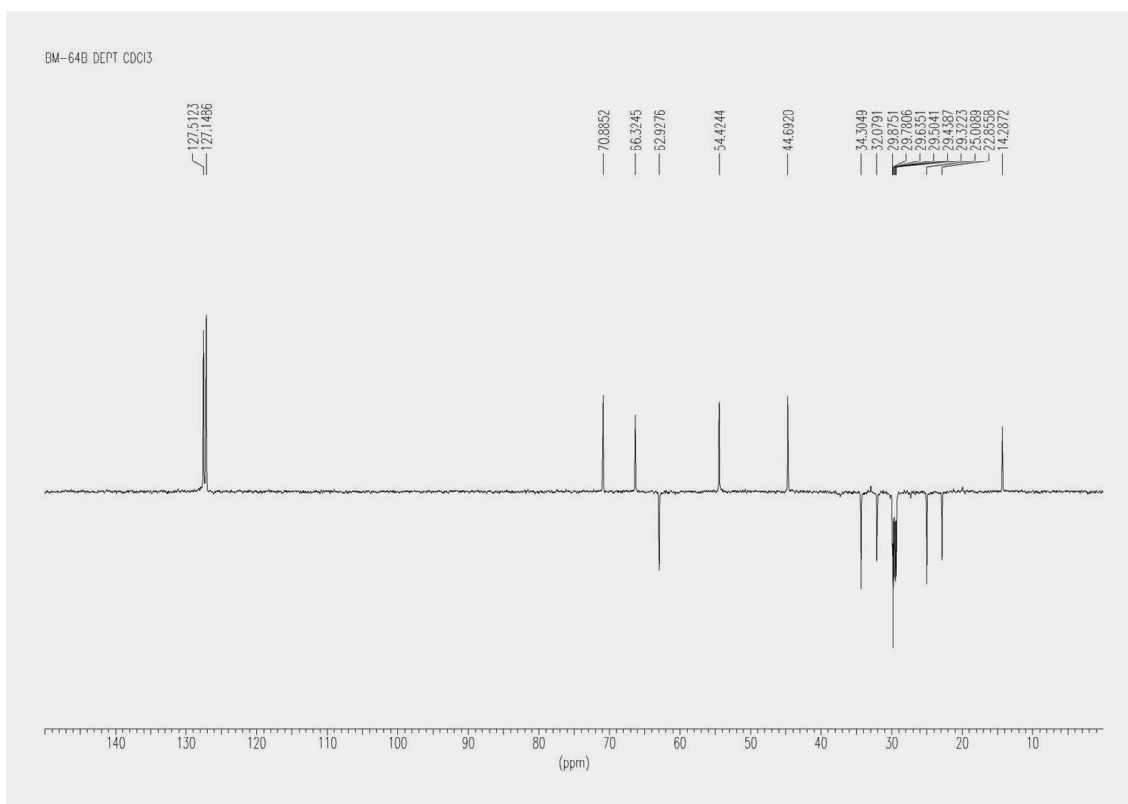
Anexo 84 – Espectro de massa exata de **4d**.



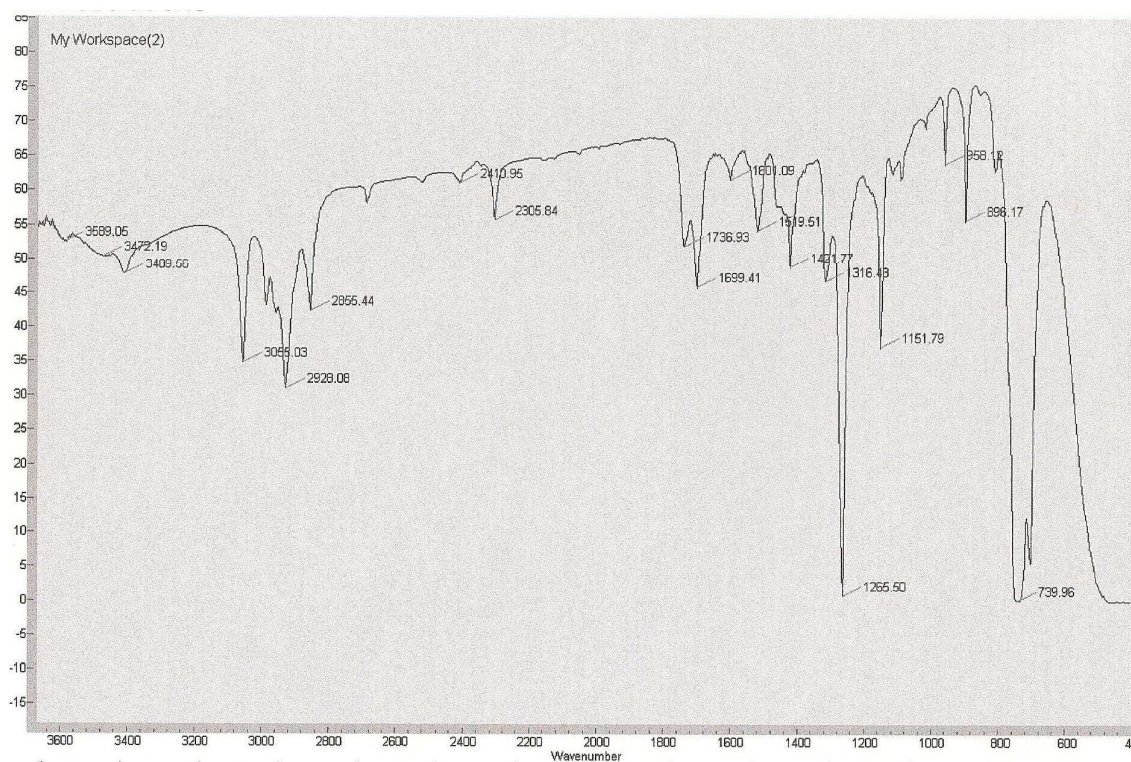
Anexo 85 – Espectro de RMN  $^1\text{H}$  de **6d**,  $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz



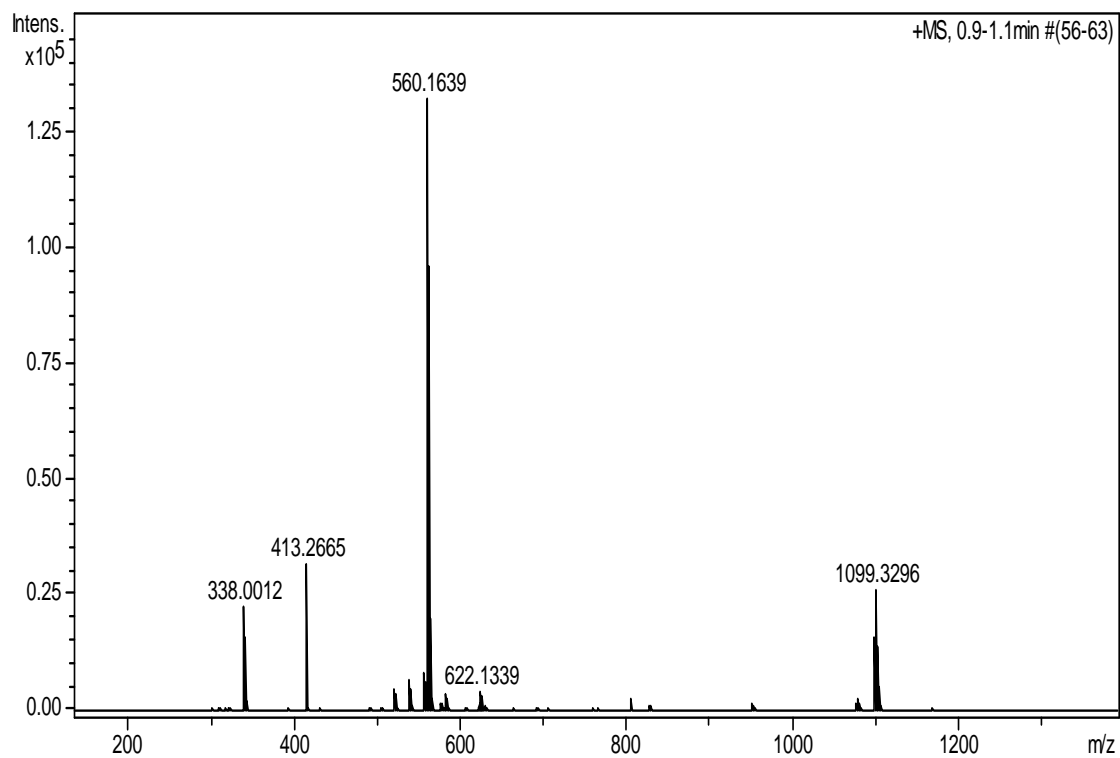
Anexo 86 – Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$ -BB de **6d**,  $\text{CDCl}_3$ , 75 MHz



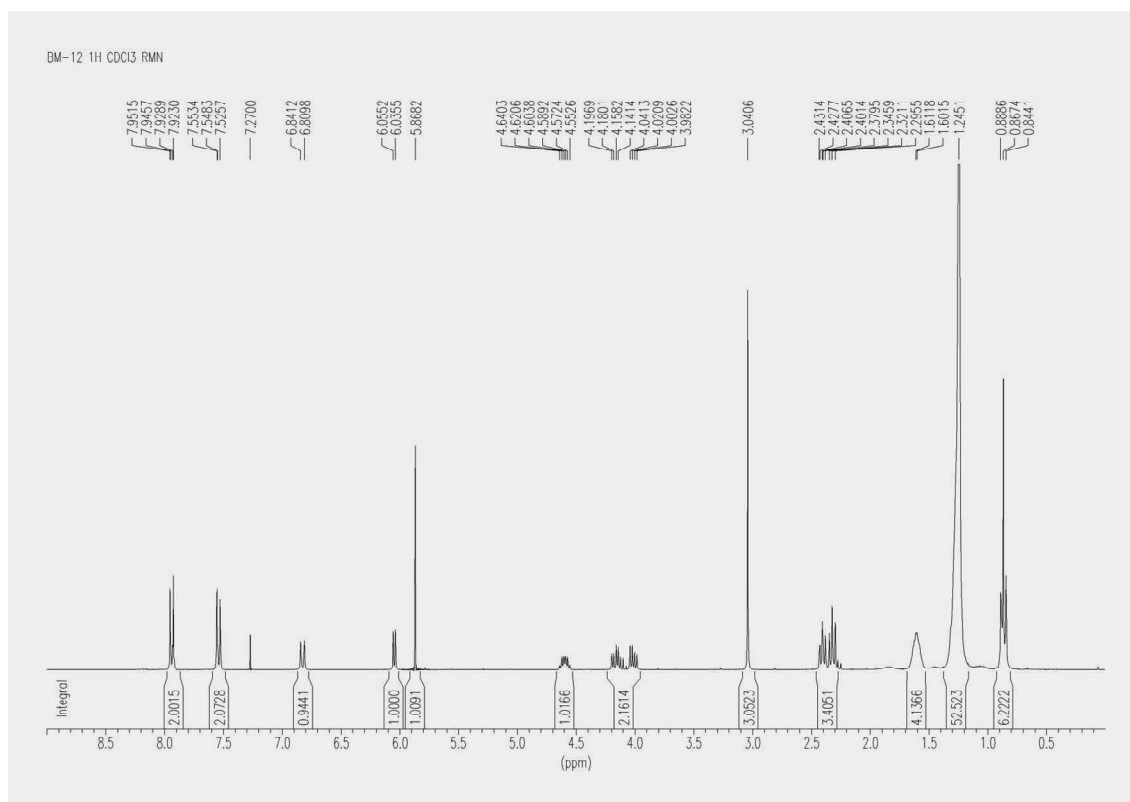
Anexo 87 – Espectro de RMN <sup>13</sup>C-DEPT de **6d**, CDCl<sub>3</sub>, 75 MHz



Anexo 88 – Espectro de IV de **6d**, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>.

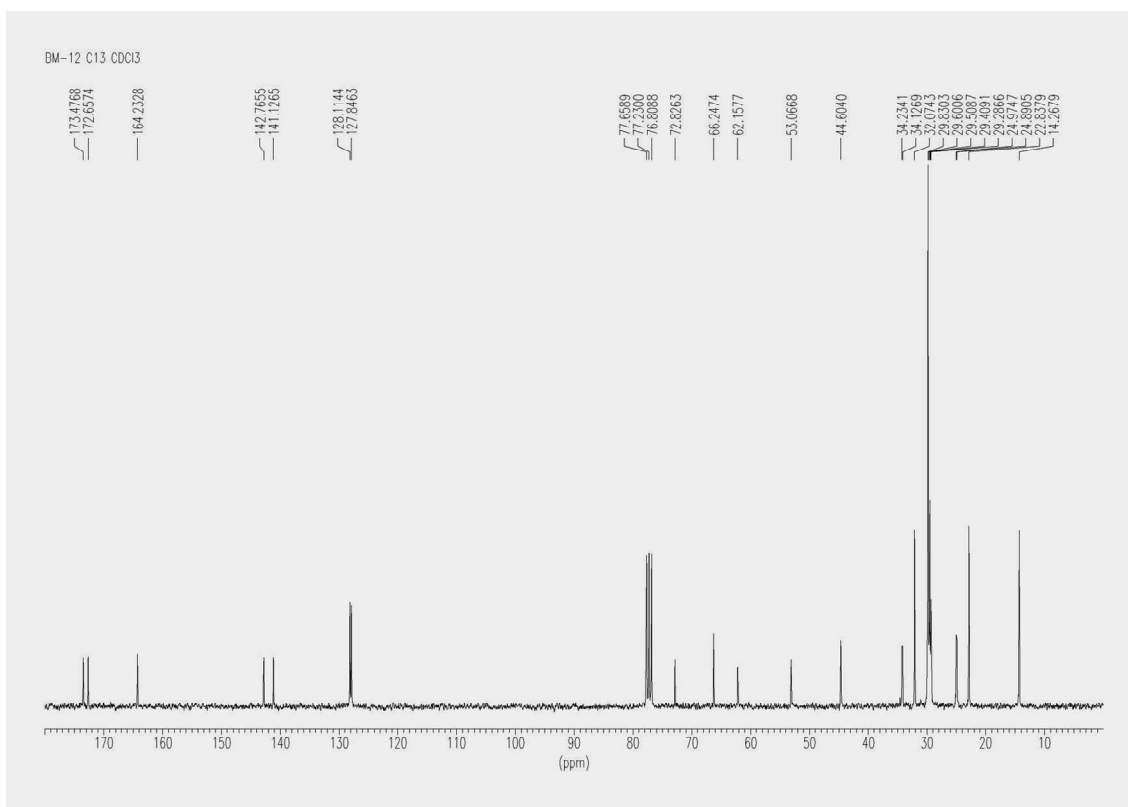


Anexo 89 – Espectro de massa exata de **6d**.

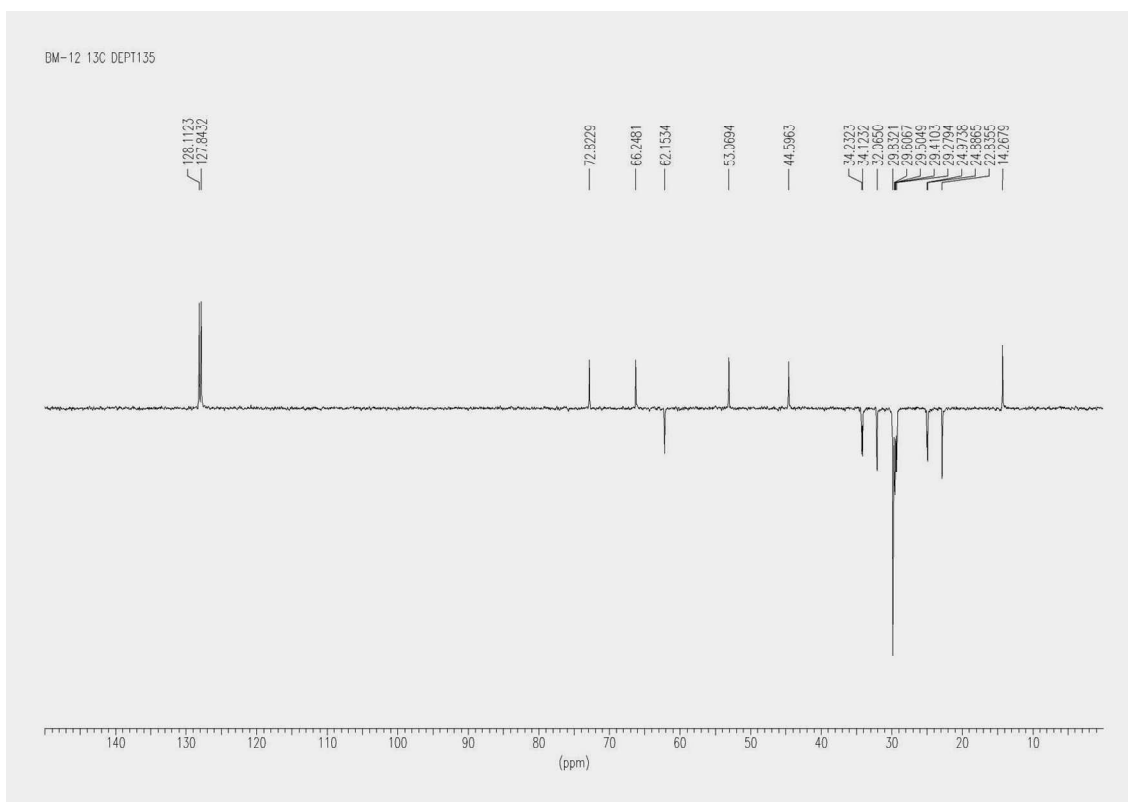


Anexo 90 – Espectro de RMN <sup>1</sup>H de **4e**, CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz

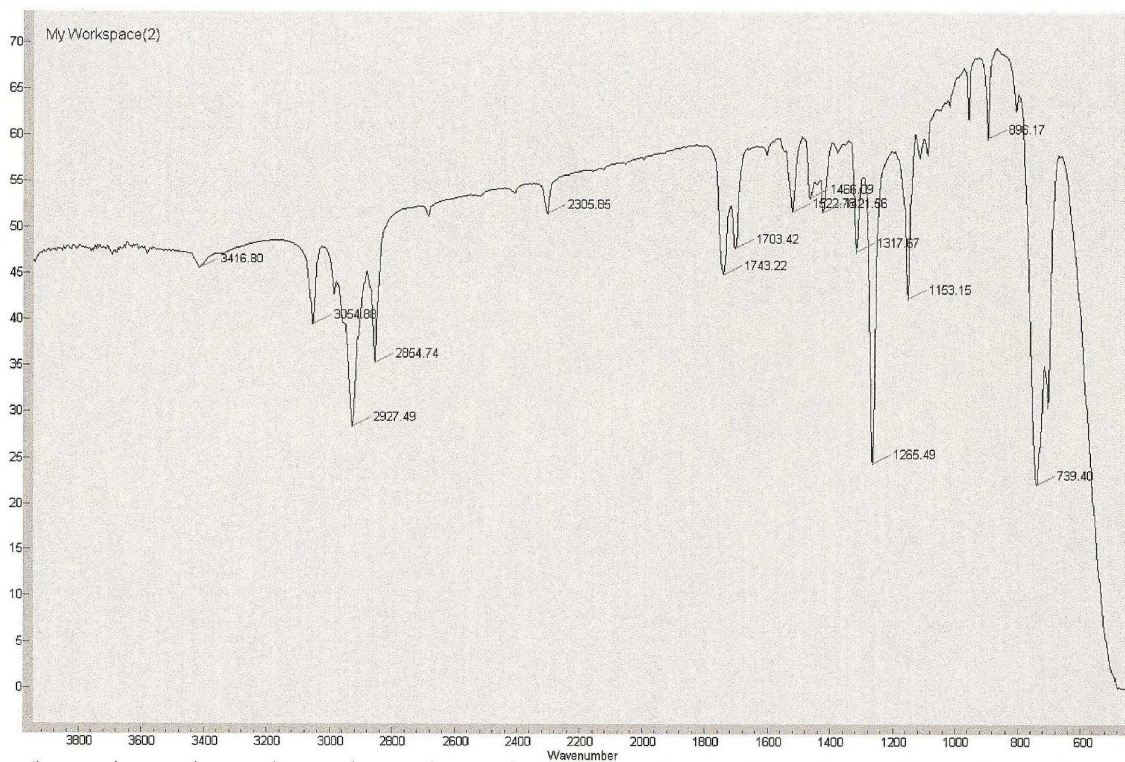




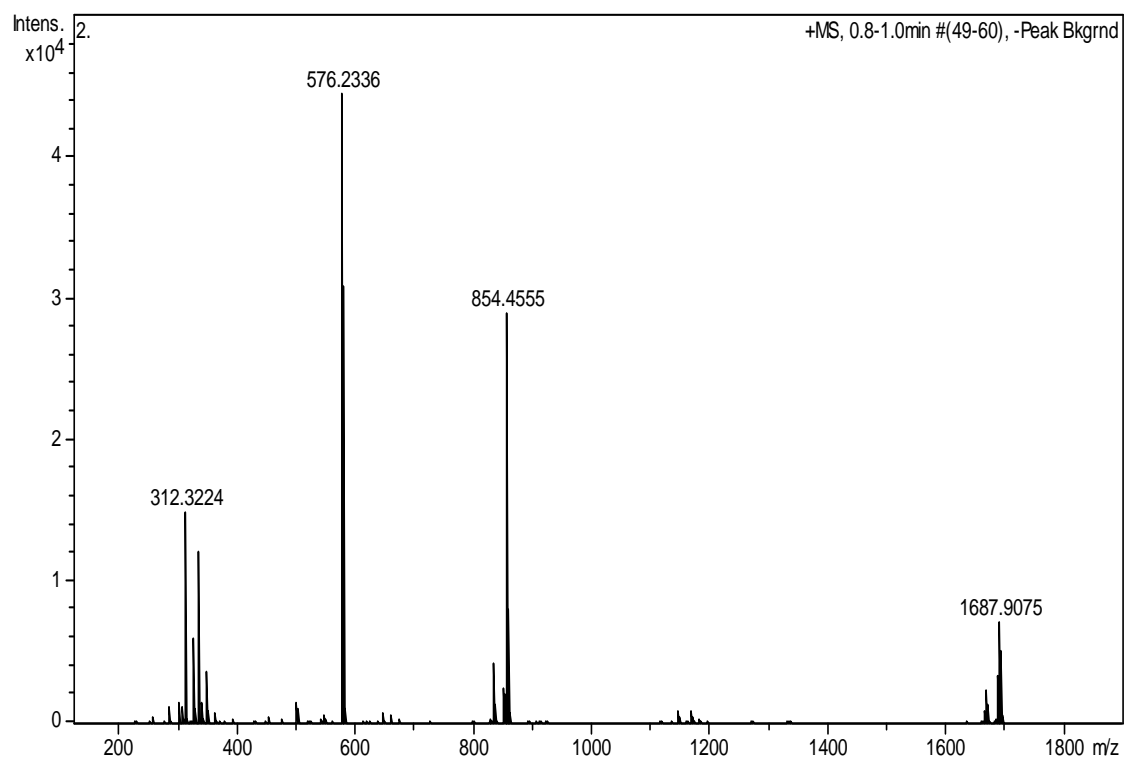
Anexo 91 – Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$ -BB de **4e**,  $\text{CDCl}_3$ , 75 MHz



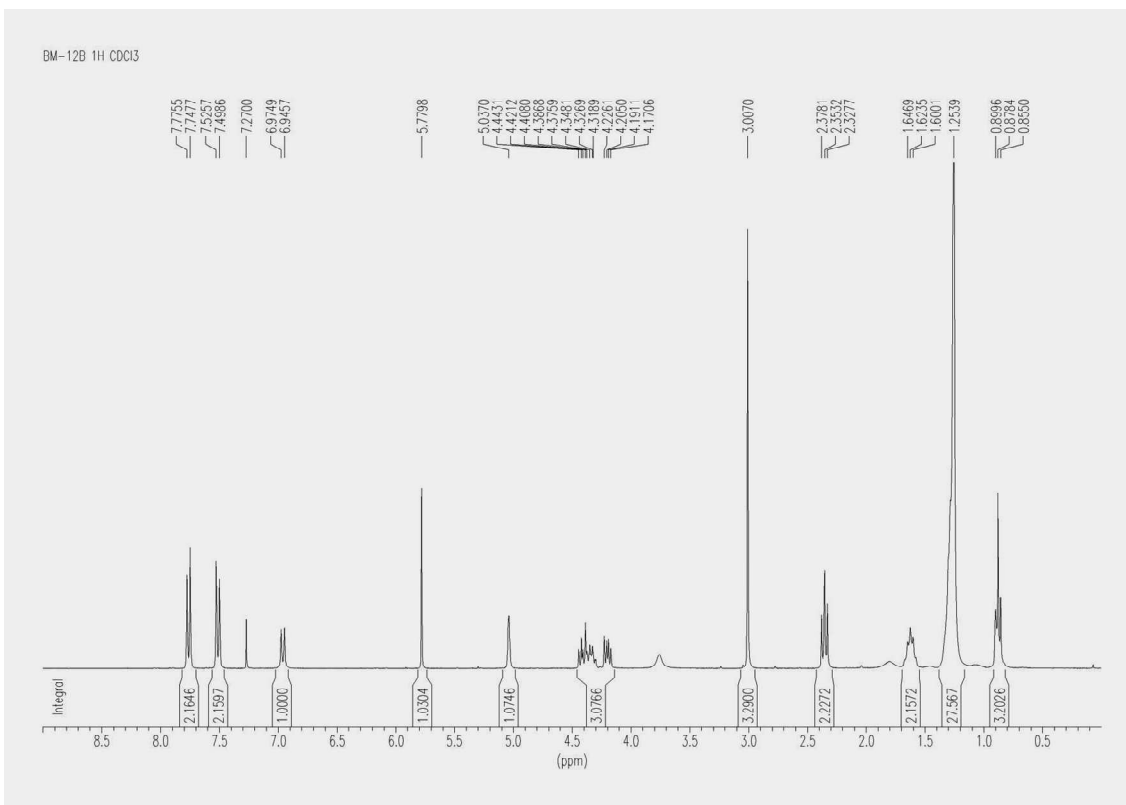
Anexo 92 – Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$ -DEPT de **6d**,  $\text{CDCl}_3$ , 75 MHz



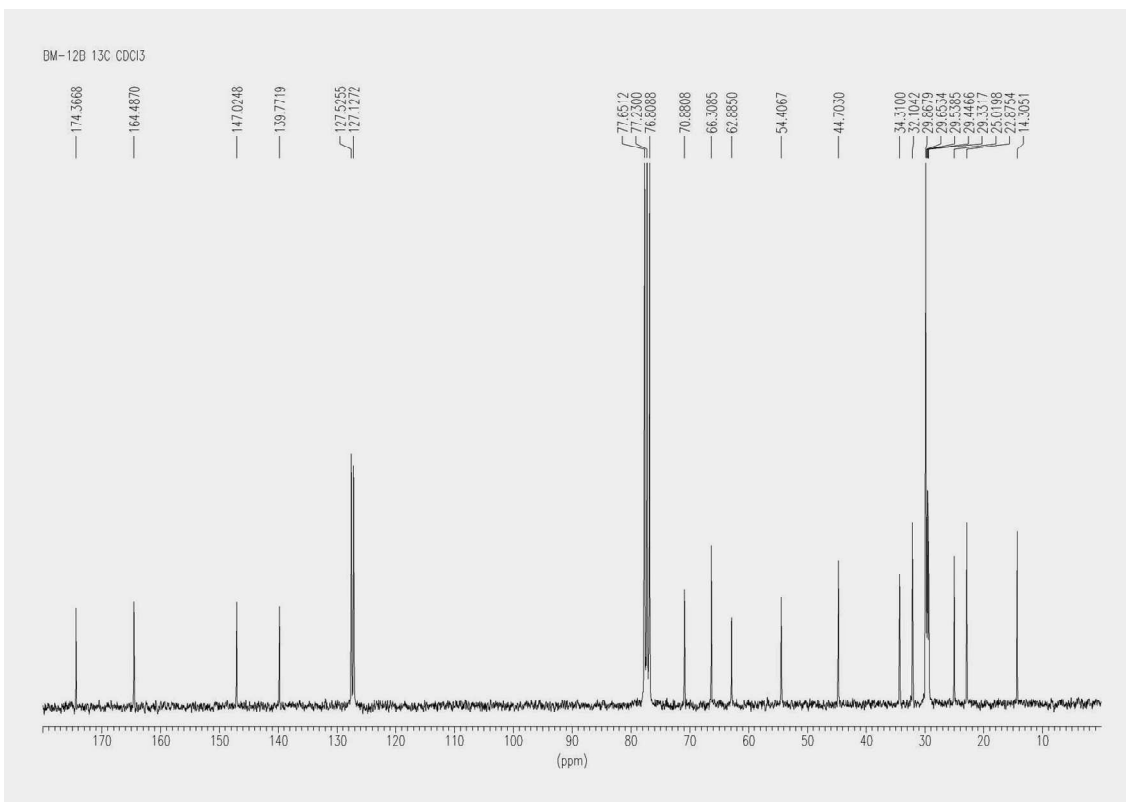
Anexo 93 – Espectro de IV de **4e**, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>.



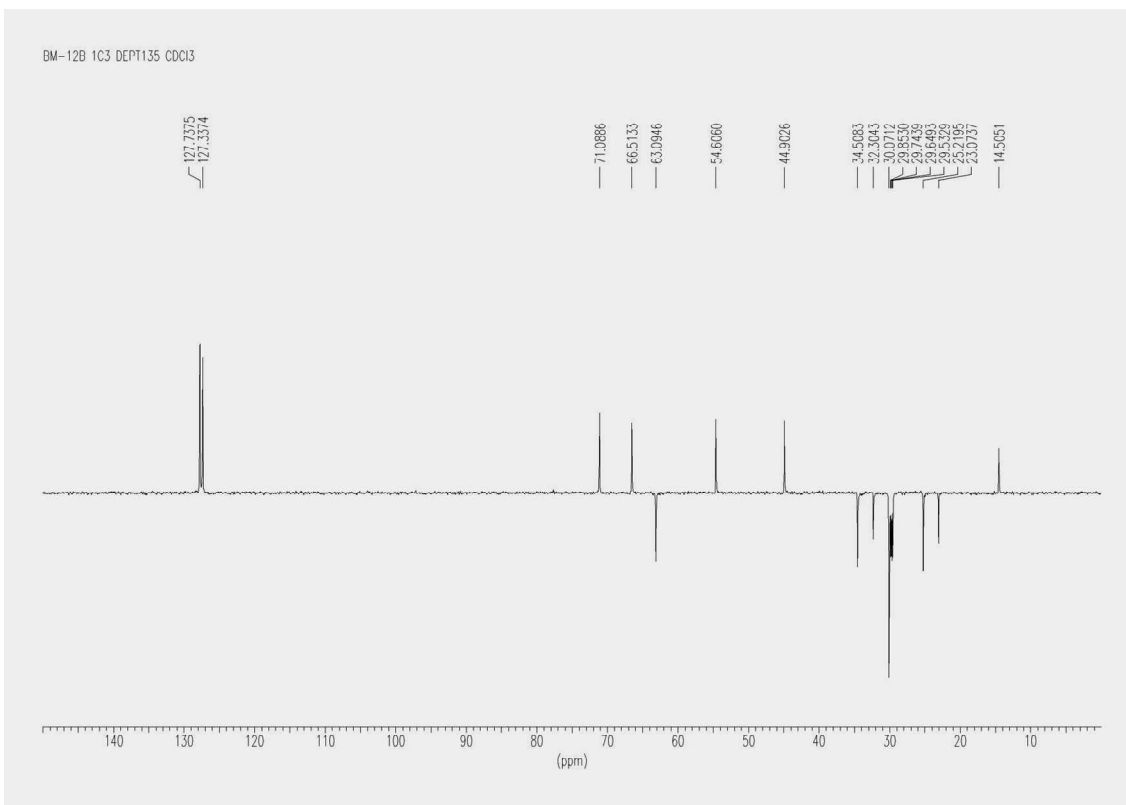
Anexo 94 Espectro de massa exata de **4e**.



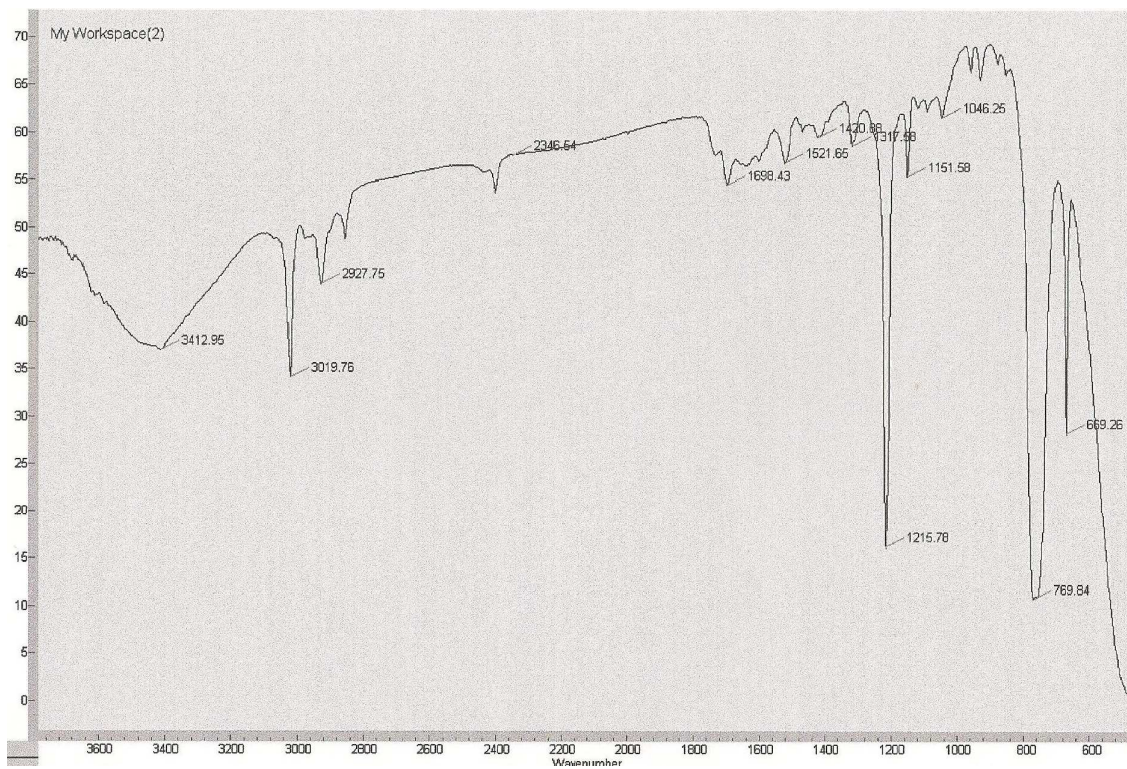
Anexo 95 – Espectro de RMN  $^1\text{H}$  de **6e**,  $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz



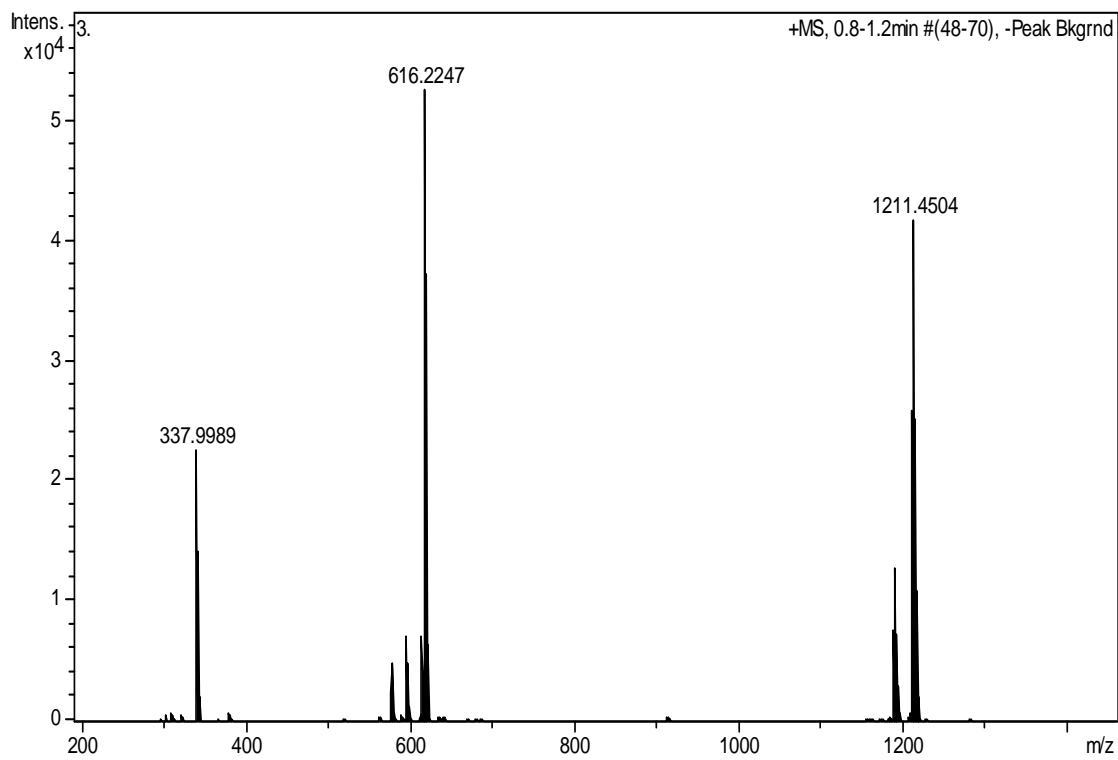
Anexo 96 – Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$ -BB de **6e**,  $\text{CDCl}_3$ , 75 MHz



Anexo 97 – Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$ -DEPT de **6e**,  $\text{CDCl}_3$ , 75 MHz



Anexo 98 – Espectro de IV de **6e**,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ .



Anexo 99 – Espectro de massa exata de **6e**.

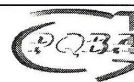


FMQ-07  
Emissão: GGQ

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS**

CENTRO PLURIDISCIPLINAR DE PESQUISAS  
QUÍMICAS, BIOLÓGICAS E AGRÍCOLAS

**RELATÓRIO TÉCNICO**



CENTRO PLURIDISCIPLINAR DE PESQUISAS  
QUÍMICAS, BIOLÓGICAS E AGRÍCOLAS

Edição/Revisão: 2/4

NÚMERO PROCESSO: CPQBA 007-10 DRM	PÁGINA: 1 de 6
-----------------------------------	----------------

**1 – DADOS CADASTRAIS DA EMPRESA SOLICITANTE**

RAZÃO SOCIAL: CAPES/Maria da Conceição Ferreira de Oliveira		
ENDEREÇO: UFC – Campus do PICI – Cx Postal 6044		
CIDADE: Fortaleza	UF: CE	CEP: 60455-970
CNPJ/CPF: 977714307/91	INSCRIÇÃO ESTADUAL: UFC	

**2 – DADOS DAS AMOSTRAS**

IDENTIFICAÇÃO DO PRODUTO: 05 amostras de fungos filamentosos crescidos em meio de cultivo.	No.CPS: 176/09
TOTAL DE AMOSTRAS: 05	LOCAL DE PRODUÇÃO:
LOTE:	VALIDADE:

**3 – ENSAIOS**

ENSAIOS REALIZADOS: Identificação de Fungo por Taxonomia Molecular.		
NÚMERO DOS PROCEDIMENTOS (E/R)		
PTMDRM-05 (0201)		

**4 – EXECUÇÃO DOS ENSAIOS**

DIVISÃO DE RECURSOS MICROBIANOS	
CPQBA – UNICAMP	
AV. Alexandre Cazellatto, 999 - Vila Betel – Paulínia – SP - CEP: 13140-000	
RESPONSÁVEL PELO ENSAIO: Lara Durães Sette	
DATA DO RECEBIMENTO DA AMOSTRA 11/01/2010	
PERÍODO REALIZAÇÃO DOS ENSAIOS	DE: 11/01/2010 A 05/03/2010
DATA DE EMISSÃO DO RELATÓRIO 09/03/2010	

CPQBA - UNICAMP, 09/03/2010

Lara Durães Sette	Valéria Maia Merzél	Ivo Milton Raimundo Jr.
RESPONSÁVEL PELO ENSAIO	COORDENADOR DA DIVISÃO	DIRETOR DO CPQBA

Os resultados e conclusões deste relatório se restringem exclusivamente às condições de ensaio e produtos analisados, sendo vetado sua utilização parcial para qualquer fim. O conteúdo e as conclusões aqui apresentados são de responsabilidade exclusiva do(s) autor(es) e não representam opinião da Universidade Estadual de Campinas nem a comprometem. O nome do CPQBA/UNICAMP não pode ser utilizado para divulgação ou publicidade do produto ou empresa sob qualquer forma.

FONE: (19) 2139 2850

FAX: (19) 2139 2852

e-mail: cenpesq@cpqba.unicamp.br

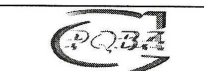


UNICAMP  
FMQ-07  
Emissão: GGQ

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

CENTRO PLURIDISCIPLINAR DE PESQUISAS  
QUÍMICAS, BIOLÓGICAS E AGRÍCOLAS

RELATÓRIO TÉCNICO



CENTRO PLURIDISCIPLINAR DE PESQUISAS  
QUÍMICAS, BIOLÓGICAS E AGRÍCOLAS

Edição/Revisão: 2/4

NÚMERO PROCESSO: CPQBA 007-10 DRM

PÁGINA: 2 de 6

**Identificação de micro-organismos por taxonomia molecular**

**Objetivos**

Identificação de 05 linhagens de fungos filamentosos utilizando seqüenciamento e análise filogenética de fragmentos de genes do *operon* ribossomal.

**Amostras analisadas**

Serviço No.	Descrição da Amostra:
CPQBA 007-10 DRM 01	Uma placa contendo fungo crescido em meio de cultura (EV 07)
CPQBA 007-10 DRM 02	Uma placa contendo fungo crescido em meio de cultura (EV 09)
CPQBA 007-10 DRM 03	Uma placa contendo fungo crescido em meio de cultura (EV 10)
CPQBA 007-10 DRM 04	Uma placa contendo fungo crescido em meio de cultura (EV 11)
CPQBA 007-10 DRM 05	Uma placa contendo fungo crescido em meio de cultura (PM 7)

**Metodologia utilizada**

- **Extração de DNA genômico.** O DNA genômico da amostra foi extraído de acordo com o protocolo descrito por de Hoog et al. (2003).
- **Amplificação da região ITS1-5.8S-ITS2.** A metodologia consistiu na amplificação das regiões ITS (*Internal Transcribed Space*) pela metodologia de PCR, utilizando como molde o DNA genômico extraído diretamente da amostra. Os *primers* (oligonucleotídeos sintéticos) utilizados para a reação de PCR foram ITS-1 e ITS-4 homólogos às extremidades da região ITS.
- **Seqüenciamento.** Os fragmentos amplificados foram a seguir purificados e submetidos diretamente ao seqüenciamento em seqüenciador automático MegaBACE 1000 (GE Healthcare). Os *primers* utilizados para o seqüenciamento foram o ITS-1 e ITS-4.
- **Análise filogenética.** As seqüências parciais das regiões ITS obtidas com os diferentes *primers* foram montadas em um *contig* (seqüência única combinando os diferentes fragmentos obtidos) e comparada com as seqüências de organismos representados nas bases de dados do Genbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) e CBS (<http://www.cbs.knaw.nl/>). As seqüências foram alinhadas utilizando o programa CLUSTAL X (Thompson et al., 1994) e as análises filogenéticas foram conduzidas utilizando o programa MEGA versão 3.0 (Kumar et al., 2004). As matrizes de distância evolutiva foram calculadas com o modelo de Kimura (1980) e a construção da árvore filogenética a partir das distâncias evolutivas foi feita pelo

Os resultados e conclusões deste relatório se restringem exclusivamente às condições de ensaio e produtos analisados, sendo vetado sua utilização parcial para qualquer fim. O conteúdo e as conclusões aqui apresentados são de responsabilidade exclusiva do(s) autor(es) e não representam opinião da Universidade Estadual de Campinas nem a comprometem. O nome do CPQBA/UNICAMP não pode ser utilizado para divulgação ou publicidade do produto ou empresa sob qualquer forma.

FONE: (19) 2139 2850

FAX: (19) 2139 2852

e-mail: cenpesq@cpqba.unicamp.br



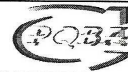
UNICAMP

FMQ-07  
Emissão: GGO

## UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

CENTRO PLURIDISCIPLINAR DE PESQUISAS  
QUÍMICAS, BIOLÓGICAS E AGRÍCOLAS

## RELATÓRIO TÉCNICO

CENTRO PLURIDISCIPLINAR DE PESQUISAS  
QUÍMICAS, BIOLÓGICAS E AGRÍCOLAS

Edição/Revisão: 2/4

NÚMERO PROCESSO: CPQBA 007-10 DRM

PÁGINA: 3 de 6

método de *Neighbor-Joining* (Saitou & Nei, 1987), com valores de *bootstrap* calculados a partir de 1.000 re-amostragens, utilizando o software de rotina incluído no programa MEGA 3.0.

**Resultados e Discussão**

- Fragmentos da região ITS das amostras **CPQBA 007-10 DRM 01, DRM 02, DRM 03, DRM 04 e DRM 05** foram amplificados com sucesso a partir do DNA genômico extraídos das amostras. O material foi purificado em coluna (*GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit*, GE Healthcare) e submetido ao seqüenciamento automático no sistema MegaBACE.
- As seqüências de DNA da região ITS obtidas para as amostras **CPQBA 007-10 DRM 01, DRM 02, DRM 03, DRM 04 e DRM 05** estão apresentadas no Anexo I. Estas seqüências foram analisadas usando a rotina BLAST do GenBank e o banco de dados do CBS (*Centraalbureau voor Schimmelcultures, Fungal Biodiversity Centre*). A árvore filogenética construída a partir das seqüências recuperadas no GenBank está apresentada na **Figura 1**.
- Os resultados das análises comparativas das seqüências obtidas para as amostras **CPQBA 007-10 DRM 01 a DRM 05** com as seqüências depositadas nas bases de dados GenBank e CBS estão apresentados a seguir na **Tabela 1**.

**Tabela 1.** Similaridade de seqüências da região ITS1-5.8S-ITS2 baseada nas análises de BLAST

Amostra	Taxa	% similaridade BLAST
CPQBA 007-10 DRM 01	<i>Aspergillus sydowii</i>	99
CPQBA 007-10 DRM 02	<i>Aspergillus flocculosus</i>	99
CPQBA 007-10 DRM 03	<i>Aspergillus flocculosus</i>	96
CPQBA 007-10 DRM 04	<i>Aspergillus flocculosus</i>	99
CPQBA 007-10 DRM 05	<i>Paecilomyces variotii</i>	100

- Na árvore filogenética apresentada na Figura 1, a amostra **CPQBA 007-10 DRM 01** formou um agrupamento suportado por um valor de 100% de *bootstrap* com os fungos *Aspergillus*

Os resultados e conclusões deste relatório se restringem exclusivamente às condições de ensaio e produtos analisados, sendo vetado sua utilização parcial para qualquer fim. O conteúdo e as conclusões aqui apresentados são de responsabilidade exclusiva do(s) autor(es) e não representam opinião da Universidade Estadual de Campinas nem a comprometem. O nome do CPQBA/UNICAMP não pode ser utilizado para divulgação ou publicidade do produto ou empresa sob qualquer forma.

FONE: (19) 2139 2850

FAX: (19) 2139 2852

e-mail: cenpesq@cpqba.unicamp.br





FMQ-07  
Emissão: GGQ

# UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

CENTRO PLURIDISCIPLINAR DE PESQUISAS  
QUÍMICAS, BIOLÓGICAS E AGRÍCOLAS

## RELATÓRIO TÉCNICO



CENTRO PLURIDISCIPLINAR DE PESQUISAS  
QUÍMICAS, BIOLÓGICAS E AGRÍCOLAS

Edição/Revisão: 2/4

NÚMERO PROCESSO: CPQBA 007-10 DRM

PÁGINA: 4 de 6

*sydowii* e *A. versicolor*. Entretanto, as análises macro e micromorfológicas confirmaram a identificação deste isolado como *A. sydowii*.

- Os fungos **CPQBA 007-10 DRM 02, DRM 03 e DRM 04** apresentaram sequências da região ITS similares e formaram um agrupamento na árvore filogenética suportado por um valor de 100% de bootstrap (Figura 1) com *Aspergillus flocculosus* e *Aspergillus ochraceopetaliformis*. Estas duas espécies são consideradas sinonímias (Peterson, 2008). Apesar destes três isolados apresentarem entre si características macroscópicas distintas em meio CYA e G25N, as análises morfológicas confirmaram a identificação dos mesmos como *Aspergillus flocculosus*.
- A amostra **CPQBA 007-10 DRM 05** formou um grupo conciso (100% bootstrap) com um representante do gênero *Byssochlamys*, com diferentes isolados de *Paecilomyces variotii* e com um isolado de *Talaromyces spectabilis*. Entretanto, as análises morfológicas do isolado representante da amostra **CPQBA 007-10 DRM 05** apresentaram alta similaridade com o fungo *Paecilomyces variotii*.
- As análises baseadas em dados moleculares e convencionais (análises macro e microscópicas) utilizadas para a identificação taxonômica das amostras de fungos filamentosos **CPQBA 007-10 DRM 01, DRM 02, DRM 03, DRM 04 e DRM 05** permitiram a identificação destes fungos como *Aspergillus sydowii*, *Aspergillus flocculosus* e *Paecilomyces variotii*

### Referências Bibliográficas

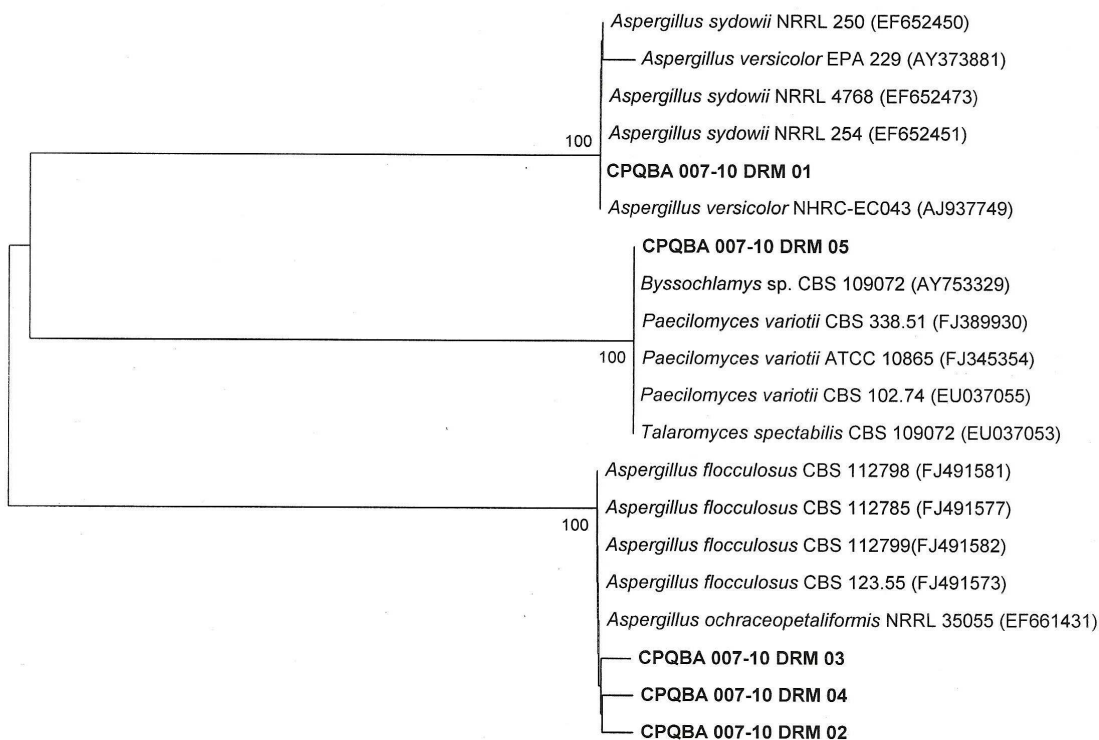
- Hoog, G.S., Vicente, V., Caligiorme, R. B., Kantarcioglu, S., Tintelnot, K., Gerrits Van Den Ende, A. H. G., Haase, G. Species diversity and polymorphism in the *Exophiala spinifera* clade containing opportunistic black yeast-like fungi. *Journal of Clinical Microbiology*, v.41, p. 4767-78, 2003.
- Kimura, M. A simple model for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution* 16: 111-120, 1980
- Kumar, S., Tamura, K., Nei, M. MEGA3: Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment. *Briefings in Bioinformatics* 5, 150-153, 2004
- Peterson SW. Phylogenetic analyses of *Aspergillus* species using DNA sequences from four loci. *Mycologia* 100: 205-226, 2008.
- Saitou, N. & Nei, M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* 4:406-425, 1987.
- Thompson, J.D. Higgins, D.G. Gibson, T.J. Clustal, W. Improving the sensitivity of progressive multiple alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research* 22, 4673-4680, 1994.


Os resultados e conclusões deste relatório se restringem exclusivamente às condições de ensaio e produtos analisados, sendo vetado sua utilização parcial para qualquer fim. O conteúdo e as conclusões aqui apresentados são de responsabilidade exclusiva do(s) autor(es) e não representam opinião da Universidade Estadual de Campinas nem a comprometem. O nome do CPQBA/UNICAMP não pode ser utilizado para divulgação ou publicidade do produto ou empresa sob qualquer forma.

FONE: (19) 2139 2850

FAX: (19) 2139 2852

e-mail: cenpesq@cpqba.unicamp.br




0.01

**Figura 1.** Árvore filogenética demonstrando a relação evolutiva entre as amostras **CPQBA 007-10 DRM 01, DRM 02, DRM 03, DRM 04, DRM 05** e linhagens de microrganismos relacionados com base em seqüências da região ITS1-5.8S-ITS2.

Os resultados e conclusões deste relatório se restringem exclusivamente às condições de ensaio e produtos analisados, sendo vetado sua utilização parcial para qualquer fim. O conteúdo e as conclusões aqui apresentados são de responsabilidade exclusiva do(s) autor(es) e não representam opinião da Universidade Estadual de Campinas nem a comprometem. O nome do CPQBA/UNICAMP não pode ser utilizado para divulgação ou publicidade do produto ou empresa sob qualquer forma.

FONE: (19) 2139 2850

FAX: (19) 2139 2852

e-mail: cenpesq@cpqba.unicamp.br



NÚMERO PROCESSO: CPQBA 007-10 DRM

PÁGINA: 6 de 6

Anexo I. Sequência parcial da região ITS das amostras analisadas.

>CPQBA 007-10 DRM 01  
GAAGAAAAATGGTTGGAGACGTCCGGCTGGCGCCCGCCGGCCCTAGTCGA  
GCCGGTGACAAAGCCCATACGCTCGAGGACCGGACACCGGTCGCCCGCT  
GCCTTTCGGGGCCGTCGCCGGGGGGGACGACGCCAACACACAAGCCG  
GGCTTGATGGGACGCAATGACGCTCGGACAGGCATGCCCCCGGAATGCC  
AGGGGGCGCAATGTGCGTTCAAAGACTCGATGATTCAGTGAATCTGCAA  
TTCACATTACTTATCGCAGTTCGCTGCGTTCTTCATCGATGCCGAACCA  
AGAGATCCATTGTTGAAAGTTTGAAGTATTTATATTCAGACTCAGACT  
GCATCACTCTCAGGCATGAAGTTCAGTAGTCCCGGGCGGCTCGCCCGGA  
GGGGTTCCCGCCGAAGCAACAGTGTAGGTATTCACGGGTGGGAGTTG  
GGCC

>CPQBA 007-10 DRM 02  
TGGTTGCTTTTCAGCGTCGGCCAGCGCCGGCCGGCCCTACGAGAGCGGTG  
TGACAAAGCCCCATACGCTCGAGGACCGGACCGGTCGCCCGCTGCCTT  
TCGGGCCGCTCCCGGGGGGACGAGGCCAACACACAAGCCGGCTT  
GAGGGCAGCAATGACGCTCGGACAGGCATACCCCGGAATACGAGGGG  
TGCAATGTGCGTTCAAAGACTCGATGATTCAGTGAATCTGCAATTCACA  
TTAATTATCCCATTTTCGCTGCGTTCTTCATCGATGCCGAACCAAGAGA  
TCCATTGTTGAAAGTTTAACTGATTGCGATACAATCGAACTCAGACGAC  
AAAACTTCAGACAGTGTTCAGTTGGGGTCTCCGGCGGGCGCTCGCCCGG  
GGGAGGGGTTCCCGCC

>CPQBA 007-10 DRM 03  
AACNANCCTCCTCAAGCGAGCCATAGAAATATGGTTGTTTCAGCGTCGGT  
CAGCGCAGGCGGGCTACGAGAGCGGTGTGACAAAGCCATAACTCGAGGA  
CGGACGCGGTCCCGCGCTGNCCTTTCGGGCCGCTCCCGGGGGGACGAGG  
ACCCAACACACAAGCCGGCTTGAAGGACGCAATGACGCTCGGACAGGCA  
TACCCCGGAATACGAGGGGTGCAATGTGCGTTCAAAGACTCGATGAT  
TCAGTGAATTCGCAATTCACATTAATATCGCATTTTCGCTGCGTTCTTC  
ATCGATGCCGAACCAAGAGATCCATTGTTGAAAGTTTAACTGATTGCG  
ATACAATCGAACTCAGACGACAAACTTCAGACAGTGTTCAGTTGGGGT  
CTCCGGCGGGCGCTCGCCCGGGGGGAGGGGTTCCCGCCCGGCGGACGCGC  
GAACCGGGGCCGCTCGAAGCCACTTGGTACAGTATACAAGGGTCCGAGG  
TTGGGCCCGAAGAACCTCACTCAGTAAATGATCCTCCCGAGGTTTCAC  
CTACGAAACTTGTTCAGACTTA

>CPQBA 007-10 DRM 04  
CCGCGTTCGCGCGGCCCGCCGGGGGGAACCCCTCCCGGGCGGAGCGCC  
CGCCGGAGACCCCAACGTGAACACTGTCTGAAGTTTGTGCTGAGTTTC  
GATTGTATCGCAATCAGTTAAACTTTCAACAATGGATCTCTTGGTTCCG  
GCATCGATGAAGAACGACGCAATGCGATAATTAATGTGAATTCAGAA  
TTCAGTGAATCATCGATCTTTGAACGACATTCGAACCCCTGGTATTCC  
GGGGGTATGCTGTCGAGCGTCATTGCTGCCCTCAAGCCCGGCTTGTG  
TGTGGGTCCTCGTCCCGGGGGGACGGGCCGAAAGGACGCGCGCGC  
ACCGCTCCGGTCTCGAGCGTATGGG

>CPQBA 007-10 DRM 05  
GTCCCTCGGGGCCAACCTCCATCCGTTGTCTGACACCTGTTGCTT  
CGCCGGCCCGCGTGGTTACGCCCCGCGCCGGGGGGTTACGCCCC  
CGGGCCCGCCCGCCGAGACCCCTGGAAGCTGCTGGAAGTTGCGG  
TCTGAGTATACAATCAATCAATTAACCTTCAACAACGGATCTCTTGGT  
TCCGGCATCGATGAAGACGACGCAATGCGATAAGTAATGTGAATTCG  
AGAATTCGTTGAATCATCGAATCTTTGAACGACATTCGCGCCCTGGCA  
TTCGGGGGGCATGCTGCTCCGAGCGTCATTGCTAACCTCCAGCCCGG  
TGGTGTGTTGGGCGCGCTCCCGCTCCCGGGGGACGGGCCGAAAGG  
AGCGCGCGGCTCGCTCCGCTCTCGAGCGTATGGGCTCTGTACACGC  
TTCAGT

Os resultados e conclusões deste relatório se restringem exclusivamente às condições de ensaio e produtos analisados, sendo vetado sua utilização parcial para qualquer fim. O conteúdo e as conclusões aqui apresentados são de responsabilidade exclusiva do(s) autor(es) e não representam opinião da Universidade Estadual de Campinas nem a comprometem. O nome do CPQBA/UNICAMP não pode ser utilizado para divulgação ou publicidade do produto ou empresa sob qualquer forma.



## Enzymatic regioselective production of chloramphenicol esters

Ayla M.C. Bizerra<sup>a,b</sup>, Tasso G.C. Montenegro<sup>a,b</sup>, Telma L.G. Lemos<sup>b,\*</sup>, Maria C.F. de Oliveira<sup>b</sup>, Marcos C. de Mattos<sup>b</sup>, Iván Lavandera<sup>a</sup>, Vicente Gotor-Fernández<sup>a</sup>, Gonzalo de Gonzalo<sup>a</sup>, Vicente Gotor<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Departamento de Química Orgánica e Inorgánica, Instituto Universitario de Biocatalización de Asturias, Universidad de Oviedo, c/Julian Clavería 8, 33006 Oviedo, Spain

<sup>b</sup> Departamento de Química Orgánica e Inorgánica, Universidade Federal do Ceará, 60451-970 Fortaleza, Ceará, Brazil

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 19 January 2011

Received in revised form 21 February 2011

Accepted 22 February 2011

Available online 1 March 2011

#### Keywords:

Biocatalysis

Chloramphenicol

Lipases

Regioselective processes

Medium engineering

### ABSTRACT

An enzymatic study has been performed in the search for synthetic routes to produce chloramphenicol derivatives through regioselective processes using lipases. Complementary transesterification and hydrolytic reactions have been carried to synthesize chloramphenicol regioisomers. Reaction parameters, such as biocatalyst, solvent, acyl donor, and temperature have been optimised in order to obtain chloramphenicol esters with high yields through acylation processes. Scale-up of the enzymatic reactions (1 g-scale at 0.25 M) and catalyst recycling (up to 10 cycles) have been successfully achieved. Furthermore, monoacylated derivatives at the more hindered secondary position could also be obtained employing hydrolysis processes.

© 2011 Elsevier Ltd. All rights reserved.

### 1. Introduction

The selective modification of one alcohol group in a polyhydroxylated compound is an important issue for organic chemists since usually it requires time-consuming protection and deprotection steps that enhance costs and by-products lowering the final yields. In this sense, biocatalytic transformations have become standard procedures applied to the regioselective acylation of polyfunctionalised derivatives maximising the efficiency of these processes.<sup>1</sup> Furthermore, in many cases the acylated derivatives obtained present better biological or availability properties than the parent substrates.<sup>1,2</sup>

This is also the case of chloramphenicol, (1*R*,2*R*)-2-dichloroacetamido-1-*p*-nitrophenyl-1,3-propanediol (**1**, Fig. 1),<sup>3</sup> a bacteriostatic antimicrobial, which acts as an effective agent against a broad spectra of *gram*-positive and *gram*-negative bacteria. It was introduced for clinical treatment in human and animals around the mid 20th century, and its first indication was in the treatment of typhoid. Furthermore, its efficiency in the treatment of tetracycline-resistant cholera, staphylococcal brain abscesses, meningitis, influenza, pneumonia, and several infections has effectively been demonstrated over the years.<sup>4</sup> Unfortunately, it can also produce

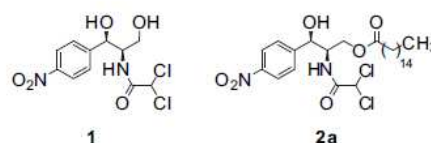


Fig. 1. Structures of chloramphenicol (**1**) and chloramphenicol palmitate ester (**2a**).

adverse effects, such as aplastic anaemia, bone marrow suppression, childhood leukaemia, and grey baby syndrome, so this compound requires medical prescription. Therefore, for the administration of this drug there are currently several ways, for instance capsules, oily or liquid form, but the bitter taste of the pharmaceutical has led to the production of different alternatives, such as chloramphenicol succinate or chloramphenicol palmitate (**2a**, Fig. 1) esters by selective modification of the primary hydroxyl group.

Originally, chloramphenicol was isolated from the bacterium *Streptomyces venezulae*,<sup>5</sup> but the production of this drug and its derivatives have attracted very much attention by means of regio- or stereoselective chemical<sup>6</sup> and enzymatic<sup>7</sup> methods. Among all biocatalytic processes, the use of lipases presents many advantages in comparison with other synthetic transformations due to the mild reaction conditions and the high level of selectivity displayed by this type of catalysts. In this manner, Ottolina et al. reported the lipase-mediated regioselective esterification of chloramphenicol for the synthesis of several derivatives in anhydrous acetone

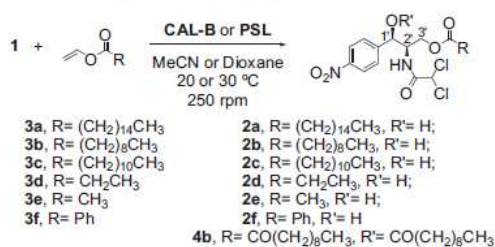
\* Corresponding authors. Tel./fax: +34 985 103448 (V.G.); tel.: +55 85 33669366; fax: +55 85 33669782 (T.L.G.L.); e-mail addresses: [tlemos@ufc.br](mailto:tlemos@ufc.br) (T.L.G. Lemos), [vgs@fq.uniovi.es](mailto:vgs@fq.uniovi.es) (V. Gotor).

exploring the influence of different trifluoroethyl esters, *Chromobacterium viscosum* lipase (CVL) or lipase G were the best biocatalytic agents, obtaining the corresponding esters after 24–72 h of reaction at 45 °C in moderate to excellent yields.<sup>8</sup> Later, Lin et al. demonstrated the versatility of hydrolases, such as Lipozyme or the protease from *Bacillus subtilis* in the synthesis of chloramphenicol vinyl esters.<sup>9</sup>

Herein we develop the synthesis of a wide set of chloramphenicol esters by using complementary synthetic approaches, such as acylation and hydrolysis processes. We have especially focused on the optimisation of the reaction conditions including the scaling-up and the enzyme recycling outcome.

## 2. Results and discussion

First of all, different commercially available lipases were tested<sup>10</sup> in order to find the highest activity in the esterification of chloramphenicol with a half-size chain activated ester, such as vinyl decanoate (**3b**). From previous studies developed in our research group, 1,4-dioxane was selected as a suitable solvent using 5 equiv of the acyl donor (Scheme 1, Table 1).



**Scheme 1.** Lipase-mediated esterification of chloramphenicol (**1**) using vinyl esters **3a–f** in organic solvents.

**Table 1**  
Lipase-mediated reaction of **1** with 5 equiv of vinyl decanoate (**3b**) in 1,4-dioxane at 30 °C after 48 h

Entry	Enzyme	<b>2b</b> <sup>a</sup> (%)	<b>4b</b> <sup>a</sup> (%)
1	CAL-A	22	11
2	CAL-B	72	5
3	PSL-C Amano	87	—
4	PSL-C I	94	—

<sup>a</sup> Percentage of compounds determined by HPLC.

After 48 h at 30 °C and 250 rpm, *Candida antarctica* lipase A (CAL-A, entry 1) gave low conversion and poor selectivity, affording the formation of the 3'-acylated compound (**2b**) and the 1,3'-diacylated product (**4b**). *C. antarctica* lipase B (CAL-B) catalysed the acylation reaction with good selectivity and reaction rate, yielding 72% of the desired 3'-monoacylated derivative (entry 2). Meanwhile, as shown in entries 3 and 4, two different preparations of *Pseudomonas cepacia* lipase from Amano (PSL-C Amano, also known as *Burkholderia cepacia* lipase) and type I from Aldrich (PSL-C I), produced with complete selectivity the monoester **2b** in 87% and 94% conversion, respectively, as the sole product. These achievements were ideal starting points for further optimisation of the reaction conditions.

Due to the results obtained for these two biocatalysts, a search for a suitable solvent was carried out taking CAL-B and PSL as catalysts applied to the regioselective esterification of chloramphenicol. Reactions were performed for 24 and 48 h (Table 2). The

**Table 2**  
Lipase-mediated reaction of **1** with 5 equiv of vinyl decanoate (**3b**) in different organic solvents at 30 °C

Entry	Enzyme	Solvent	t (h)	<b>2b</b> <sup>a</sup> (%)
1	CAL-B	THF	24	31
2	CAL-B	THF	48	37
3	CAL-B	MeCN	24	74
4	CAL-B	MeCN	48	80
5	CAL-B	TBME	24	27
6	CAL-B	TBME	48	29
7	PSL-C Amano	THF	24	15
8	PSL-C Amano	THF	48	21
9	PSL-C Amano	MeCN	24	51
10	PSL-C Amano	MeCN	48	62
11	PSL-C Amano	TBME	24	42
12	PSL-C Amano	TBME	48	51
13	PSL-C I	THF	24	12
14	PSL-C I	THF	48	17
15	PSL-C I	MeCN	24	33
16	PSL-C I	MeCN	48	50
17	PSL-C I	TBME	24	38
18	PSL-C I	TBME	48	43

<sup>a</sup> Percentage of monoester **2b** determined by HPLC.

influence of tetrahydrofuran (THF), acetonitrile (MeCN), and *tert*-butyl methyl ether (TBME) was initially examined with CAL-B (entries 1–6), where the highest conversions were with MeCN (entry 4), which allowed the formation of **2b** in 80% yield after 48 h. It should be noted that the diacylated compound **4b** was not detected in any case. Different results were attained when using PSL as a biocatalyst (entries 7–18). None of the three solvents improved the high performance obtained in 1,4-dioxane (87 and 94% in entries 3 and 4 of Table 1, respectively) although with acetonitrile higher conversions than THF and TBME were achieved.

The effect of the temperature was analysed when employing the best conditions previously found: (a) CAL-B and MeCN; or (b) PSL-C I and 1,4-dioxane (Table 3).<sup>11</sup> Surprisingly, CAL-B led to a higher conversion into **2b** at 20 °C rather than at 30 °C (entries 1 and 2), although this enzyme usually presents an optimum temperature between 30 and 40 °C.<sup>12</sup> When using PSL-C I, a remarkable decrease of the conversion occurred when going from 30 to 40 °C (entries 4 and 5), maybe caused by deactivation of the biocatalyst, meanwhile the reaction at 20 °C (entry 3) led to a similar value than the one obtained at 40 °C.

**Table 3**  
Temperature effect in the lipase-catalysed acylation of **1** with 5 equiv of vinyl decanoate (**3b**) after 48 h

Entry	Enzyme	Solvent	T (°C)	<b>2b</b> <sup>a</sup> (%)
1	CAL-B	MeCN	20	94
2	CAL-B	MeCN	30	80
3	PSL-C I	1,4-Dioxane	20	61
4	PSL-C I	1,4-Dioxane	30	94
5	PSL-C I	1,4-Dioxane	40	58

<sup>a</sup> Percentage of compounds determined by HPLC.

After optimisation of the experimental conditions for the acylation reaction, we explored the possibilities to regioselectively produce several chloramphenicol ester derivatives of different length chain using CAL-B or both preparations of PSL-C as biocatalysts in MeCN or 1,4-dioxane as solvent, respectively. The best results have been summarised in Table 4. Chloramphenicol palmitate ester (**2a**) was selected as the first candidate due to its therapeutic uses<sup>13</sup> and results were in accordance with the ones obtained when using vinyl decanoate as acyl donor. Both CAL-B and PSL-C I led to nearly complete conversions after 24 h of reaction (entries 1 and 2).

**Table 4**  
Enzymatic acylation of **1** with 5 equiv of the vinyl ester **3a–f** at different temperatures in a 15 mM substrate concentration

Entry	Enzyme	T (°C)	Solvent	Final product	t (h)	Conv <sup>a</sup> (%)
1	CAL-B	20	MeCN	<b>2a</b>	24	>99
2	PSL-C I	30	1,4-Dioxane	<b>2a</b>	24	95
3	CAL-B	20	MeCN	<b>2c</b>	24	>99
4	PSL-C I	30	1,4-Dioxane	<b>2c</b>	24	91
5	CAL-B	20	MeCN	<b>2d</b>	24	>99
6	PSL-C Amano	30	1,4-Dioxane	<b>2d</b>	24	99
7	PSL-C I	30	1,4-Dioxane	<b>2d</b>	24	95
8	CAL-B	20	MeCN	<b>2e</b>	40	>99
9	PSL-C Amano	30	1,4-Dioxane	<b>2e</b>	40	97
10	CAL-B	20	MeCN	<b>2f</b>	40	4
11	PSL-C Amano	30	1,4-Dioxane	<b>2f</b>	40	17

<sup>a</sup> Percentage of compounds determined by HPLC.

Next, vinyl laurate (**3c**) was reacted with **1** also observing an excellent reactivity (entries 3 and 4), especially in the case of CAL-B, which led to quantitative conversion of the monoester **2c**. This trend was also observed when the chain length of the vinyl ester decreased, obtaining excellent results when vinyl propanoate (**3d**) was employed as acyl donor with all the biocatalysts tested (entries 5–7). Surprisingly, longer reaction times were needed to reach high conversion values using vinyl acetate (**3e**, entries 8 and 9). Vinyl benzoate (**3f**) led to the lowest conversion values (entries 10 and 11) due to the poorer reactivity of this acyl donor. These results present lipases as ideal catalysts for the regioselective acylation of chloramphenicol, showing an excellent selectivity towards the acylation of the primary alcohol. It is important to remark that in no case was the secondary hydroxyl group acylated to form the corresponding 1'-monoester or 1',3'-diester derivatives, even after longer reaction times (data not shown).

From a preparative point of view, both higher substrate concentrations and recycling of the catalyst lead to more economical and green processes.<sup>14</sup> Therefore, after testing the solubility of all products involved in these processes, the reactions to achieve **2a–f** were carried out at a higher concentration of chloramphenicol (0.15 M), as summarised in Table 5.

**Table 5**  
Lipase-mediated reaction of **1** with 5 equiv of the vinyl ester **3a–f** at different temperatures and 250 rpm at 0.15 M substrate concentration

Entry	Enzyme	T (°C)	Solvent	Final product	t (h)	Conv <sup>a</sup> (%)	Isolated yield <sup>b</sup> (%)
1	CAL-B	20	MeCN	<b>2a</b>	3	>99	91
2	PSL-C I	30	1,4-Dioxane	<b>2a</b>	3	>99	75
3	PSL-C Amano	30	1,4-Dioxane	<b>2a</b>	48	79	78
4	CAL-B	20	MeCN	<b>2b</b>	3	>99	92
5	PSL-C I	30	1,4-Dioxane	<b>2b</b>	4	>99	84
6	PSL-C Amano	30	1,4-Dioxane	<b>2b</b>	22	>99	91
7	CAL-B	20	MeCN	<b>2c</b>	4	>99	91
8	PSL-C I	30	1,4-Dioxane	<b>2c</b>	7	>99	88
9	PSL-C Amano	30	1,4-Dioxane	<b>2c</b>	10	>99	88
10	CAL-B	20	MeCN	<b>2d</b>	3	>99	89
11	PSL-C I	30	1,4-Dioxane	<b>2d</b>	6	98	90
12	PSL-C Amano	30	1,4-Dioxane	<b>2d</b>	9	>99	82
13	CAL-B	20	MeCN	<b>2e</b>	3	>99	90
14	PSL-C I	30	1,4-Dioxane	<b>2e</b>	6	99	90
15	PSL-C Amano	30	1,4-Dioxane	<b>2e</b>	9	98	79
16	CAL-B	20	MeCN	<b>2f</b>	48	31	25
17	PSL-C I	30	1,4-Dioxane	<b>2f</b>	48	53	45
18	PSL-C Amano	30	1,4-Dioxane	<b>2f</b>	48	13	8

<sup>a</sup> Percentage of compounds determined by HPLC.

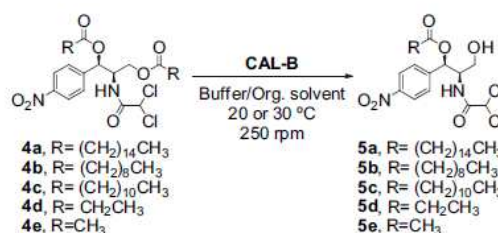
<sup>b</sup> Isolated yields after purification by flash chromatography.

In all cases the reaction times diminished in comparison with the more diluted one (see Table 4), finding that for CAL-B only 3 or 4 h were enough to afford total conversions into the corresponding monoesters **2a–e**. Among all the enzymatic processes carried out with PSL, PSL-C I showed better reaction rates than PSL-C Amano. Finally, the biotransformations with vinyl benzoate (entries 16–18) led also to higher conversions at 150 mM concentration rather than 15 mM, obtaining 45% isolated yield of monoester **2f** with PSL-C I (entry 17).

The next step was to study the recycling of the enzyme by performing the acylation at 0.15 M concentration of **1** and vinyl palmitate with CAL-B in MeCN at 20 °C. The biocatalyst performed the regioselective synthesis of **2a** with total conversion after 3 h during 10 cycles of reutilisation.

After having found excellent conversion in the biocatalysed regioselective acylation of diol **1**, we set up a preparative experiment at 1 g-scale. For that, the biocatalytic processes to obtain derivatives **2a–e** were performed using the best conditions previously found for the acylation at 0.15 M concentration of **1**: CAL-B as biocatalyst, 5 equiv of the corresponding ester and MeCN as solvent at 20 °C. All the reactions proceeded until complete conversion to isolate **2a,b,d–e** in 3 h, requiring 4 h for the laurate ester **2c**. Additionally, the palmitate derivative **2a** was obtained in 98% conversion when the reaction was repeated at 0.25 M concentration of chloramphenicol. Further increase of substrate concentration led to solubility problems.

Previous experiments have demonstrated that the acylated derivatives of chloramphenicol at the primary alcohol can be obtained with high yields, but we were also interested in the obtaining of analogues acylated at the more hindered secondary position. The chemical modification of a secondary alcohol in the presence of a primary one is a complicated feature, which has scarcely been observed.<sup>15</sup> Herein, taking advantage of the chemical complementarity shown by lipases in stereo- and regioselective processes,<sup>16</sup> we focused on the preparation of monoesters **5a–e** by firstly synthesising the diacylated derivatives **4a–e**, and later performing the regioselective lipase-catalysed hydrolysis at the primary position (Scheme 2).



**Scheme 2.** Lipase-catalysed hydrolysis of diacylated chloramphenicol derivatives **4a–e** in aqueous media.

Enzymatic hydrolyses were initially performed with the diacylated compound **4e** by employing a mixture of phosphate buffer 100 mM pH 7.0 and an organic co-solvent (80:20 v/v<sup>-1</sup>), such as MeCN, 1,4-dioxane or THF with the previous lipases, but only CAL-B showed activity (Table 6). Using this biocatalyst the 3'-acylated derivative **2e** was not observed in any case and the desired product **5e** was mainly achieved in MeCN at 20 °C with high conversion (78%), giving substrate **4e** and chloramphenicol **1** as minor compounds (entry 3). Percentage of MeCN in the reaction medium (5–80%) and the pH of the reaction (range 5.5–8.5) were also studied (see Supplementary data for more information), but no further improvement of the conversion value was achieved.

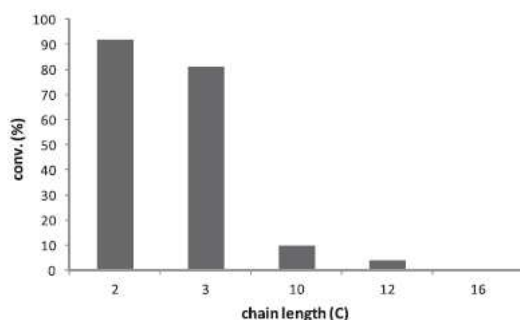
**Table 6**

Lipase-mediated hydrolysis of **4e** with CAL-B in a buffer/organic solvent system (80:20 v v<sup>-1</sup>) at different temperatures and 250 rpm at 0.15 M concentration (*t* = 24 h)

Entry	<i>T</i> (°C)	Solvent	<b>1<sup>a</sup></b> (%)	<b>4e<sup>a</sup></b> (%)	<b>5e<sup>a</sup></b> (%)
1	20	1,4-Dioxane	23	63	14
2	30	1,4-Dioxane	18	73	9
3	20	MeCN	14	8	78
4	30	MeCN	8	18	74
5	20	THF	12	21	67
6	30	THF	16	54	30

<sup>a</sup> Percentage of compounds determined by HPLC and <sup>1</sup>H NMR.

The hydrolyses of diacylated derivatives **4a–d** were then carried out under the optimal conditions depicted in entry 3 of Table 6, observing a correlation between the chain length of the ester moiety and the enzymatic conversion (Fig. 2). Thus, when longer ester moieties were employed, lower conversions were reached. While the dipropionate compound **4d** afforded 74% of **5d**,<sup>17</sup> didecanoate **4b** provided only a 10% of **5b**, dilaurate **4c** a 4% of **5c** and dipalmitate **4a** did not react. This effect can be explained because bulkier diacylated products could not correctly fit in the active site of the enzyme.



**Fig. 2.** Effect of the chain length in the CAL-B-catalysed hydrolysis of diacylated chloramphenicol derivatives.

### 3. Conclusions

In summary, we have successfully demonstrated the versatility of lipases, especially CAL-B, applied to the regioselective production of chloramphenicol esters, acylating or hydrolysing the primary position in short reaction times. Industrial application of the transesterification reaction has been considered showing the possibility to carry out the experiments at high substrate concentrations (0.25 M) and recycling the enzyme for a large number of cycles (up to 10), thus obtaining interesting compounds, such as the palmitate derivative with excellent yields. Furthermore, monoacylated compounds on the secondary alcohol group, difficult to achieve by conventional methodologies, were obtained with good to moderate yields through biocatalysed regioselective hydrolytic processes.

## 4. Experimental section

### 4.1. General

Immobilised *C. antarctica* lipase type B (CAL-B, Novozym 435, 7300 PLU/g) was a gift from Novo Nordisk Co. Immobilised *P. cepacia* lipases PSL-C Amano (1019 U/g) and PSL-C 1 (1638 U/g) were acquired from Amano Pharmaceutical Co. and Sigma–Aldrich,

respectively. *C. antarctica* lipase A (CAL-A) was purchased from Codexis (2.6 U/mg of solid). All other reagents were purchased from different commercial sources and used without further purification. Solvents were distilled over an adequate desiccant under nitrogen. Flash chromatographies were performed using silica gel 60 (230–240 mesh).

### 4.2. General procedure for the esterification reaction of (–)-chloramphenicol at 0.25 M substrate concentration using vinyl palmitate

To a suspension of (–)-chloramphenicol (1 g, 3.1 mmol) and CAL-B (1 g) in dry MeCN (12.5 mL) under nitrogen atmosphere, vinyl palmitate (**3a**, 4.26 g, 15.0 mmol) was added, and the reaction was shaken at 20 °C and 250 rpm. Aliquots were regularly analysed by HPLC and the reaction was stopped after complete consumption of the starting material after 1 h. Finally the enzyme was filtered off and washed with EtOAc (3 × 10 mL). The solvent was evaporated under reduced pressure. The reaction crude was purified by flash chromatography on silica gel (30% EtOAc/hexane) affording the corresponding ester **2a** (87% isolated yield). Characterizations of monoester **2a** and all novel compounds are given in the Supplementary data file.

### Acknowledgements

The authors thank to the Brazilian and Spanish agencies CAPES-DGU (Process: 149/07), CNPq, FUNCAP, PRONEX, Ministerio de Ciencia e Innovación (MICINN, Project CTQ 2007-61126) for fellowships and financial support. I.L. and V.G.-F. (Ramón y Cajal program) thank MICINN for personal grants.

### Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found in online version at doi:10.1016/j.tet.2011.02.070. These data include MOL files and InChIKeys of the most important compounds described in this article.

### References and notes

- (a) Danielli, B.; Riva, S. *Pure Appl. Chem.* **1994**, *66*, 2215–2218; (b) Ferrero, M.; Gotor, V. *Chem. Rev.* **2000**, *100*, 4319–4347; (c) Riva, S. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2002**, *19–20*, 43–54; (d) Stolz, T.; Gu, J.; Wilk, B.; Olsen, E. *Tetrahedron Lett.* **2010**, *51*, 5511–5515; (e) Magrone, P.; Cavallo, F.; Panzeri, W.; Passarella, D.; Riva, S. *Org. Biomol. Chem.* **2010**, *8*, 5583–5590.
- A nice example is the regioselective enzymatic acylation of rapamycin. See, for instance: Gu, J.; Ruppen, M. E.; Cal, P. *Org. Lett.* **2005**, *7*, 3945–3948.
- Rebstock, M. C.; Crooks, H. M., Jr.; Controullis, J.; Bartz, Q. R. *J. Am. Chem. Soc.* **1949**, *71*, 2458–2462.
- El-Wahed, M. G. A.; Refat, M. S.; El-Megharbel, S. M. *J. Mol. Struct.* **2008**, *892*, 402–413.
- Größ, F.; Lewis, E. A.; Pirae, M.; van Pée, K.-H.; Vining, L. C.; White, R. L. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2002**, *12*, 283–286.
- (a) Controullis, J.; Rebstock, M. C.; Crooks, H. M., Jr. *J. Am. Chem. Soc.* **1949**, *71*, 2463–2468; (b) Long, L. M.; Troutman, H. D. *J. Am. Chem. Soc.* **1949**, *71*, 2469–2475; (c) Veeresa, G.; Datta, A. *Tetrahedron Lett.* **1998**, *39*, 8503–8504; (d) Daugs, E. D. *Org. Process Res. Dev.* **2000**, *4*, 301–304; (e) Bhaskar, G.; Kumar, V. S.; Rao, B. V. *Tetrahedron: Asymmetry* **2004**, *15*, 1279–1283; (f) Boruwa, J.; Borah, J. C.; Gogoi, S.; Barua, N. C. *Tetrahedron Lett.* **2005**, *46*, 1743–1746; (g) Hajra, S.; Karmakar, A.; Maji, T.; Medda, A. K. *Tetrahedron* **2006**, *62*, 8959–8965; (h) George, S.; Narina, S. V.; Sudalai, A. *Tetrahedron* **2006**, *62*, 10202–10207; (i) Shimizu, M.; Sodeoka, M. *Heterocycles* **2008**, *76*, 1301–1312.
- (a) Shaw, W. V. *J. Biol. Chem.* **1967**, *242*, 687–693; (b) El-Kersh, T. A.; Plourde, J. R. *J. Antibiot.* **1976**, *29*, 292–302; (c) Okahata, Y.; Mori, T. *Trends Biotechnol.* **1997**, *15*, 50–54; (d) Berkel, E.; Mehnert, W.; Froemming, K.-H. *Pharmazie* **1998**, *53*, 323–326; (e) Chênevert, R.; Thiboutot, S. *Synthese* **1989**, 444–446; (f) Luckarift, H. R.; Nadeau, L. J.; Spain, J. C. *Chem. Commun.* **2005**, 383–384.
- Ottolina, G.; Carrea, G.; Riva, S. *J. Org. Chem.* **1990**, *55*, 2366–2369.
- lv, D.-S.; Xue, X.-T.; Wang, N.; Wu, Q.; Lin, X.-F. *Prep. Biochem. Biotechnol.* **2004**, *34*, 97–107.
- The amount of enzyme employed with regards to the substrate (1:1 w w<sup>-1</sup>) was selected due to our previous experience in similar lipase-catalysed acylation

- processes. See, for instance: Ríos-Lombardía, N.; Busto, E.; Gotor-Fernández, V.; Gotor, V.; Porcar, R.; García-Verdugo, E.; Luis, S. V.; Alfonso, I.; García-Granda, S.; Menéndez-Velázquez, A. *Chem. Eur. J.* **2010**, *16*, 836–847.
11. A similar temperature trend was observed for PSL-C Amano.
  12. Gotor-Fernández, V.; Busto, E.; Gotor, V. *Adv. Synth. Catal.* **2006**, *348*, 797–812.
  13. (a) Csakurda-Harmathy, Z.; Thege, I. K. *J. Therm. Anal. Calorim.* **1997**, *50*, 867–871; (b) Gamberini, M. C.; Baraldi, C.; Tinti, A.; Ferioli, V.; Gamberini, G. *J. Mol. Struct.* **2006**, *785*, 216–224.
  14. Woodley, J. M. *Trends Biotechnol.* **2008**, *26*, 321–327.
  15. (a) Ricci, A.; Roelens, S.; Vannucchi, A. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1985**, 1457–1458; (b) Pautard, A. M.; Evans, S. A., Jr. *J. Org. Chem.* **1988**, *53*, 2300–2303; (c) Morís, F.; Gotor, V. *J. Org. Chem.* **1993**, *58*, 653–660; (d) Guibourdenche, C.; Podlech, J.; Seebach, D. *Liebigs Ann.* **1996**, 1121–1129; (e) García, J.; Fernández, S.; Ferrero, M.; Sanghvi, Y. S.; Gotor, V. *Tetrahedron Lett.* **2004**, *45*, 1709–1712; (f) Díaz-Rodríguez, A.; Fernández, S.; Lavandera, I.; Ferrero, M.; Gotor, V. *Tetrahedron Lett.* **2005**, *46*, 5835–5838; (g) Lavandera, I.; Fernández, S.; Magdalena, J.; Ferrero, M.; Grewal, H.; Savile, C. K.; Kazlauskas, R. J.; Gotor, V. *ChemBioChem* **2006**, *7*, 693–698.
  16. Gotor-Fernández, V.; Gotor, V. In *Asymmetric Organic Synthesis with Enzymes*; Gotor, V., Alfonso, I., García-Urdiales, E., Eds.; Wiley-VCH: Weinheim, Germany, 2008; pp 171–228.
  17. 3'-Acylated compound **3d** (3%) and chloramphenicol (4%) were also detected.