



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO DE CIÊNCIAS FÍSICAS E MATEMÁTICAS  
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA  
PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA ORGÂNICA

**Damianni Sebrão**

**Preparação regioseletiva de derivados acilados da D-ribono-1,4-  
lactona empregando catálise enzimática**

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do Grau de Doutor em Química Orgânica.

Orientadora:

Profª. Dra. Maria da Graça Nascimento

Co-orientador:

Prof. Dr. Marcus Mandolesi Sá

Florianópolis

2011

Catálogo na fonte elaborada pela biblioteca da  
Universidade Federal de Santa Catarina

S443p Sebrão, Damianni

Preparação regioselectiva de derivados acilados da  
D-ribono-1,4-lactona empregando catálise enzimática [tese] /  
Damianni Sebrão ; orientadora, Maria da Graça Nascimento. -  
Florianópolis, SC, 2011.

136 p.: il., grafs., tabs.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Catarina,  
Centro de Ciências Físicas e Matemáticas. Programa de Pós-  
Graduação em Química.

Inclui referências

1. Química. 2. Acilação. 3. Lipase. 4. Lactonas. I.  
Nascimento, Maria da Graça. II. Universidade Federal de Santa  
Catarina. Programa de Pós-Graduação em Química. III. Título.

CDU 54

“Não haveria criatividade sem a curiosidade que nos move e que nos põe pacientemente impacientes diante do mundo que não fizemos, acrescentando a ele algo que fazemos.”  
(Paulo Freire)

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por ter me concedido a vida, e com ela a oportunidade de errar, acertar, errar novamente, quantas vezes forem necessárias para formar o meu caráter, e assim poder evoluir sempre.

À Gisele pela compreensão, carinho e amor em todos os momentos, e aos nossos filhos Alexandre Jr. e Gabriel pelas risadas, brincadeiras, e tudo mais que só as crianças e os jovens sabem proporcionar.

À toda minha família pelo amor e apoio que deles recebi. Em especial, ao meu pai Gilberto (*in memorian*) e minha mãe Graça pela acolhida desde o momento do nascimento, aos meus irmãos Júnior, Ricardo e Graciane, aos meus sobrinhos João Victor, Luiza e Arthur, e a minha vó Rosa (*in memorian*).

À professora Dra Maria da Graça Nascimento por sua orientação, amizade, dedicação e por ter me acolhido carinhosamente no Laboratório de Biocatálise.

Ao professor Dr. Marcus Mandolesi Sá pela competente orientação, pela dedicação e por ter me ensinado a ser ético e crítico.

Ao professor Dr. Gustavo Pozza pela amizade, pelas conversas filosófico-científicas, risadas e pelas análises de RMN realizadas com muita competência.

Aos colegas de laboratório Cristiane, Thiago, Isabel, Jaqueline, César, Geovanni, Fabíola, Daiane, Julietty, Aline, Maria Alice, Zana, Marcelo, Giselle, Camila, Alexandre, Fernanda, Patrícia... pelo companheirismo, amizade, risadas, cafés e por terem me ensinado tantas coisas boas, e em especial à Vanessa por toda a ajuda na formatação desta Tese.

A todos os amigos conquistados durante toda a minha vivência acadêmica, principalmente aos alunos dos laboratórios dos professores Marcus, Joussef, Josiel e Moacir, pelo forte vínculo conquistado e por toda a ajuda prestada ao longo desses últimos anos.

A todos os professores que contribuíram para a minha formação, em especial ao professor Reinaldo Carvalho Silva (*in memorian*) por ter me inspirado a cursar Química.

À UFSC e ao Departamento de Química da UFSC pelo suporte institucional, e em especial a Graça e ao Jadir da Secretaria de Pós-Graduação por serem sempre tão prestativos e atenciosos.

Ao CNPq, CAPES e INCT-catálise pelo apoio financeiro para a realização deste trabalho.

À Central de Análises do Departamento de Química da UFSC pelos serviços prestados.

A Novozymes Latin American e Amano Pharmaceutical CO pela doação das diversas lipases.

Enfim, a todas as pessoas que direta ou indiretamente contribuíram para que este trabalho se concretizasse.

## SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS.....	III
SUMÁRIO.....	VI
ÍNDICE DE FIGURAS.....	IX
ÍNDICE DE TABELAS.....	XII
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	XIII
RESUMO.....	XIV
ABSTRACT.....	XVI
1 – INTRODUÇÃO.....	1
1.1 – Considerações gerais.....	1
1.2 – Enzimas.....	2
1.3 – Classificação das enzimas.....	5
1.4 – Enzimas em meios não convencionais.....	8
1.4.1 – Imobilização de enzimas.....	9
1.5 – Lipases e aplicações.....	12
1.5.1 – Lipases e regiosseletividade.....	17
1.6 – Carboidratos.....	23
3 – OBJETIVOS.....	31
3.1 – Objetivo geral.....	31
3.2 – Objetivos e metas.....	31
4 – PARTE EXPERIMENTAL.....	33
4.1 – Materiais (reagentes, solventes e enzimas).....	33
4.2 – Equipamentos.....	35
4.3 – Métodos de quantificação dos derivados 5-monoacilados de <b>38</b> .....	35
4.3.1 – Quantificação dos derivados 5-monoacilados da lactona <b>38</b> por absorção no UV-Vis.....	36
4.3.1.1 – Preparação da curva de calibração de <i>p</i> -nitrofenolato.....	36
4.3.1.2 – Acilação da lactona <b>38</b> com alcenoatos de <i>p</i> -nitrofenila.....	36
4.3.2 – Quantificação dos derivados 5-monoacilados da lactona <b>38</b> por titulação volumétrica.....	37
4.3.2.1 – Preparação e padronização do titulante KOH 0,010 mol/L.....	37
4.3.2.2 – Acilação da lactona <b>38</b> com os ácidos decanóico e tetradecanóico.....	38
4.4 – Acetilação da lactona <b>38</b> catalisada por hidrolases ou micélio.....	39
4.4.1 – Avaliação de biocatalisadores na acetilação de <b>38</b> com acetato de vinila.....	39
4.4.2 – Efeito do solvente orgânico na acetilação de <b>38</b> com acetato de vinila.....	41
4.4.3 – Influência da massa da CAL-B na acetilação de <b>38</b> com acetato de vinila.....	41

4.4.4 – Influência da quantidade e tipo de doador de grupo acetila na acetilação de <b>38</b> .....	42
4.4.5 – Síntese, purificação e caracterização da 5- <i>O</i> -acetil-D-ribonolactona ( <b>54</b> ).....	43
4.5 – Acilação da lactona <b>38</b> catalisada por lipases ou micélios.....	44
4.5.1 – Efeito do doador de grupo acetila na acilação de <b>38</b> com ácidos carboxílicos e aminoácidos.....	44
4.5.2 – Avaliação de biocatalisadores na acilação de <b>38</b> com ácido dodecanóico.....	46
4.5.3 – Síntese, purificação e caracterização da 5- <i>O</i> -dodecanoil-D-ribono-1,4-lactona ( <b>55</b> ).....	46
4.5.4 – Acilação da lactona <b>38</b> com acetoacetato de etila.....	47
4.6 – Reutilização da CAL-B na acilação de <b>38</b> .....	48
4.7 – Desacetilação do derivado 2,3,5- <i>O</i> -triacetil-D-ribonolactona ( <b>61</b> ).....	48
4.7.1 – Síntese da 2,3,5- <i>O</i> -triacetil-D-ribonolactona <b>61</b> .....	48
4.7.2 – Etanolise da 2,3,5- <i>O</i> -triacetil-D-ribonolactona <b>61</b> .....	49
5 – RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	50
5.1 – Espectros de RMN- <sup>1</sup> H e <sup>13</sup> C da D-ribono-1,4-lactona <b>38</b> .....	50
5.2 – Acetilação da D-ribono-1,4-lactona <b>38</b> catalisada por hidrolases e micélios.....	52
5.2.1 – Avaliação de biocatalisadores na acetilação de <b>38</b> .....	53
5.2.1.1 – Utilização de misturas de lipases na acetilação de <b>38</b> .....	57
5.2.2 – Efeito do solvente orgânico na acetilação de <b>38</b> .....	58
5.2.3 – Influência da massa da CAL-B na acetilação de <b>38</b> .....	60
5.2.4 – Influência da quantidade e do tipo de doador de grupo acetila.....	61
5.2.5 – Síntese, purificação e caracterização da 5- <i>O</i> -acetil-D-ribonolactona ( <b>54</b> ).....	63
5.3 – Etanolise da 2,3,5- <i>O</i> -triacetil-D-ribonolactona <b>61</b> .....	67
5.4 – Determinação dos derivados acetilados da D-ribonolactona <b>38</b> por RMN- <sup>1</sup> H.....	72
5.5 – Quantificação dos derivados acetilados de <b>38</b> por RMN- <sup>1</sup> H.....	80
5.6 – Acilação regioseletiva da lactona <b>38</b> catalisada por lipases e micélios.....	81
5.6.1 – Efeito do doador de grupo acetila na acilação de <b>38</b> com ácidos carboxílicos e aminoácidos.....	82
5.6.1.1 – Acilação de <b>38</b> com ácidos carboxílicos em função do tempo.....	86
5.6.2 – Quantificação dos derivados monoacilados de <b>38</b> por RMN.....	88
5.6.3 – Avaliação de biocatalisadores na acilação de <b>38</b> com ácido dodecanóico.....	90
5.6.4 – Síntese, purificação e caracterização da 5- <i>O</i> -dodecanoil-D-ribonolactona ( <b>55</b> ).....	90
5.7 – Reutilização da CAL-B na acilação de <b>38</b> .....	93

5.8 – Acilação da lactona <b>38</b> com alcenoatos de <i>p</i> -nitrofenila.....	95
6 – CONCLUSÕES.....	102
7 – PERSPECTIVAS.....	104
8 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	105
9 – ANEXOS.....	112



## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> – Representações gráficas das estruturas (A) primária e (B) secundária de uma seqüência de sete aminoácidos; (C) terciária e (D) quaternária da insulina humana.....	3
<b>Figura 2</b> – Reação de descarboxilação do ácido l-metilrótico ( <b>1</b> ) catalisada pela enzima OMP decarboxilase.....	4
<b>Figura 3</b> – Superfície eletrostática (potencial negativo em vermelho e positivo em azul) da lipase de <i>Candida rugosa</i> (CRL) ligada ao seu inibidor hexilfosfonato de <i>R</i> -mentila (em amarelo).....	5
<b>Figura 4</b> – Representação esquemática do sítio ativo da anidrase carbônica humana (EC 4.2.1.1), código pdb 1CA2. (em rosa são os resíduos de histidinas; em cinza e esférico o co-fator zinco; e em vermelho e branco os átomos de oxigênio e hidrogênio, respectivamente, do grupo $\text{OH}^-$ ).....	7
<b>Figura 5</b> – Representações dos principais métodos de imobilização de enzimas.....	10
<b>Figura 6</b> – Representação esquemática da estrutura cristalina da CAL-B complexada ao substrato <i>N</i> -acetil-glucosamina glucosamina ( <b>A</b> ), e ampliação do seu sítio ativo ( <b>B</b> ).....	12
<b>Figura 7</b> – Transacilação regiosseletiva do octanoato de etila ( <b>3</b> ) catalisada por lipases.....	13
<b>Figura 8</b> – Síntese do produto natural <i>R</i> -rugulactona ( <b>8a</b> ) e <i>S</i> -rugulactona ( <b>8b</b> ).....	14
<b>Figura 9</b> – Mecanismo hipotético da adição de Michael catalisada pela CAL-B, destacando as espécies genéricas: composto carbonílico $\alpha,\beta$ -insaturado (eletrófilo, em azul) e amina primária ou secundária (nucleófilo, em vermelho).....	15
<b>Figura 10</b> – Mecanismo de hidrólise de éster catalisada por lipase.....	16
<b>Figura 11</b> – Hidrólises seletivas de TAG catalisadas por lipases.....	18
<b>Figura 12</b> – Acilação regiosseletiva da isoquercitrina ( <b>9</b> ) catalisada pela CAL-B.....	18
<b>Figura 13</b> – Acilação seletiva do 3- <i>O</i> -angeloilingenol ( <b>11</b> ) catalisada pela CAL-B.....	19
<b>Figura 14</b> – Acilação regiosseletiva da arbutina ( <b>13</b> ) catalisada pela CAL-B.....	20
<b>Figura 15</b> – Acilação regiosseletiva da floxuridina ( <b>18</b> ) catalisada pela LPS-C.....	20

<b>Figura 16</b> – Preparação de derivados do <i>p</i> -nitrofenil-L-arabinofuranosídeo ( <b>20</b> ) catalisada por lipases.....	22
<b>Figura 17</b> – Hidrólise do acetil-D-arabinofuranosídeo ( <b>28</b> ) catalisada por hidrolases.....	23
<b>Figura 18</b> – Rota sintética dos ligantes derivados da glicosamina ( <b>31a-g</b> ) .....	24
<b>Figura 19</b> – Rota sintética dos análogos de dideoxifluorocetopiranosídeos.....	26
<b>Figura 20</b> – Rotas sintéticas para obtenção das <i>N</i> -alquil-D-ribonamidas ( <b>46a-h</b> ) .....	27
<b>Figura 21</b> – Síntese de derivados de ribonolactonas 5- <i>O</i> -substituídos.....	28
<b>Figura 22</b> – Rota de síntese dos <i>trans</i> -THF $\delta$ -SAA <b>50-53</b> .....	30
<b>Figura 23</b> – Ampliação do espectro de RMN- <sup>1</sup> H da lactona <b>38</b> .....	51
<b>Figura 24</b> – Espectro de RMN- <sup>13</sup> C da lactona <b>38</b> .....	52
<b>Figura 25</b> – Acetilação de <b>38</b> catalisada por hidrolases ou micélios.....	53
<b>Figura 26</b> – Influência do tempo na acetilação regioselectiva de <b>38</b> em acetonitrila tratada e em acetonitrila + água (27,0 $\mu$ L; 1,50 mmol).....	60
<b>Figura 27</b> – Influência da quantidade de CAL-B na acetilação de <b>38</b> .....	61
<b>Figura 28</b> – Espectro de IV do derivado monoacetilado <b>54</b> .....	64
<b>Figura 29</b> – Espectro de RMN- <sup>1</sup> H do derivado monoacetilado <b>54</b> .....	65
<b>Figura 30</b> – Espectro de RMN- <sup>13</sup> C do derivado monoacetilado <b>54</b> .....	66
<b>Figura 31</b> – Espectro de RMN- <sup>1</sup> H do derivado triacetilado <b>61</b> .....	68
<b>Figura 32</b> – Espectros ampliados de RMN- <sup>1</sup> H de alíquotas da reação da etanólise do derivado <b>61</b> catalisada pela CAL-B.....	69
<b>Figura 33</b> – Espectro de RMN- <sup>1</sup> H do derivado diacetilado <b>63</b> .....	70
<b>Figura 34</b> – Espectro de RMN- <sup>13</sup> C do derivado monoacetilado <b>63</b> .....	71
<b>Figura 35</b> – Ampliação do espectro de RMN- <sup>1</sup> H do derivado monoacetilado <b>54</b> .....	73
<b>Figura 36</b> – Ampliação do espectro de RMN- <sup>1</sup> H do derivado triacetilado <b>61</b> .....	74
<b>Figura 37</b> – Ampliação do espectro de RMN- <sup>1</sup> H da alíquota de 24 h da acetilação de <b>38</b> catalisada por LPS-C.....	75
<b>Figura 38</b> – Ampliação do espectro de RMN- <sup>1</sup> H de alíquota de 6 h da acetilação de <b>38</b> catalisada por LPS-C.....	77
<b>Figura 39</b> – Ampliação do espectro de RMN- <sup>1</sup> H de alíquota de 6 h da etanólise de <b>61</b> catalisada pela CAL-B.....	78

<b>Figura 40</b> – Ampliação do espectro de RMN- <sup>1</sup> H do derivado diacetilado <b>63</b> .....	79
<b>Figura 41</b> – Ampliações dos espectros de RMN- <sup>1</sup> H de alíquotas da reação de acetilação de <b>38</b> com acetato de vinila catalisada pela CAL-B.....	81
<b>Figura 42</b> – Acilação regioseletiva da D-ribonolactona <b>38</b> catalisada pela CAL-B.....	82
<b>Figura 43</b> – Influência do tamanho da cadeia alquílica do ácido carboxílico na acilação regioseletiva de <b>38</b> .....	83
<b>Figura 44</b> – Estrutura da 5- <i>O</i> -oleil-D-ribonolactona ( <b>70</b> ).....	84
<b>Figura 45</b> – Estrutura da 5- <i>O</i> -acetoacetil-D-ribonolactona ( <b>62</b> ).....	85
<b>Figura 46</b> – Conversões ao derivado <b>56</b> em função do tempo e massa de CAL-B.....	86
<b>Figura 47</b> – Conversão ao derivado <b>56</b> em função do tempo e do solvente orgânico.....	87
<b>Figura 48</b> – Ampliação do espectro de RMN- <sup>1</sup> H do produto da acilação de <b>38</b> com ácido butírico catalisada pela CAL-B.....	89
<b>Figura 49</b> – Espectro de IV do derivado monoacetilado <b>55</b> .....	91
<b>Figura 50</b> – Espectro de RMN- <sup>1</sup> H do derivado monoacilado <b>55</b> .....	92
<b>Figura 51</b> – Espectro de RMN- <sup>13</sup> C do derivado monoacetilado <b>55</b> .....	93
<b>Figura 52</b> – Efeito do reuso da CAL-B na acilação de <b>38</b> com acetato de vinila (■) em 6 h de reação, e com os ácidos decanóico (●) e dodecanóico (▲) em 24 h.....	94
<b>Figura 53</b> – Acilação de <b>38</b> com alcanóatos de <i>p</i> -nitrofenila catalisada pela CAL-B.....	96
<b>Figura 54</b> – Conversão ao derivado <b>54</b> em função do tempo e quantidade de APNF.....	97
<b>Figura 55</b> – Espectro de RMN- <sup>1</sup> H da alíquota da reação de acetilação de <b>38</b> com APNF catalisada pela CAL-B em 24 h.....	98
<b>Figura 56</b> – Conversões ao derivado <b>55</b> em função do tempo.....	99
<b>Figura 57</b> – Ampliação do espectro de RMN- <sup>1</sup> H da alíquota da reação de acilação de <b>38</b> com DPNF (1,5 equiv.) catalisada pela CAL-B em 10 h.....	100

## ÍNDICE DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> - Classificação das enzimas segundo a UIBBM.....	6
<b>Tabela 2</b> – Misturas de lipases usadas na acetilação de <b>38</b> .....	40
<b>Tabela 3</b> – Doadores acetila usados na acetilação de <b>38</b> catalisada por CAL-B.....	42
<b>Tabela 4</b> – Ácidos carboxílicos e aminoácidos usados nas tentativas de acilação de <b>38</b> .....	45
<b>Tabela 5</b> – Acetilação de <b>38</b> com acetato de vinila empregando lipases e micélios.....	54
<b>Tabela 6</b> – Efeito do solvente na acetilação de <b>38</b> catalisada por CAL-B.....	58
<b>Tabela 7</b> – Influência do doador de grupo acetila na acetilação de <b>38</b> ..	62

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AK = lipase de *Pseudomonas fluorescens*  
APNF = acetato de *p*-nitrofenila  
CAL-B = lipase de *Candida antarctica* imobilizada em resina aniônica  
CDCl<sub>3</sub> = clorofôrmico deuterado  
COSY = correlação espectroscópica homonuclear do espectro de RMN-<sup>1</sup>H  
d = dubleto  
dd = duplo dubleto  
DEPT = *Distortionless Enhancement by Polarization Transfer*  
DMF = *N,N*-dimetilformamida  
DPNF = dodecanoato de *p*-nitrofenila  
F-AP15 = lipase de *Rhizopus oryzae*  
IV = infravermelho  
LAN = lipase de *Aspergillus niger*  
LCR = lipase de *Candida rugosa*  
LPS-D = lipase de *Burkholderia cepacia* imobilizada em terra diatomácea  
LPS = lipase de *Burkholderia cepacia* livre  
log *P* = logaritmo do coeficiente de partição octanol/água  
LRO = lipase de *Rhizopus oligosporus*  
m = multiplete  
pdb = sigla em inglês para o banco de dados de proteínas  
Pf. = ponto de fusão  
RM-IM = lipase de *Rhizomucor miehei*  
RMN-<sup>1</sup>H = ressonância magnética nuclear de <sup>1</sup>H  
RMN-<sup>13</sup>C = ressonância magnética nuclear de <sup>13</sup>C  
s = singleto  
t = tripleto  
TL-IM = lipase de *Thermomyces lanuginosus*  
UEA\_115 e UEA\_53 = micélios de fungos da região amazônica  
UV-Vis = Ultravioleta/Visível

## RESUMO

Neste trabalho, foram desenvolvidas metodologias para a preparação regioselectiva de derivados acilados da D-ribono-1,4-lactona **38** empregando enzimas e micélios. Os produtos foram identificados e quantificados por RMN-<sup>1</sup>H, UV-Vis ou titulação volumétrica com solução aquosa de KOH, dependendo do doador de grupo acila.

As lipases de *Candida antarctica* (CAL-B), de *Burkholderia cepacia* (LPS, LPS-C e LPS-D), de *Candida rugosa* (LCR), de *Thermomyces lanuginosus* (TL-IM), de *Pseudomonas fluorescens* (AK), de *Rhizopus oryzae* (F-AP15), de *Aspergillus niger* (LAN), de *Rhizomucor miehei* (RM-IM) e de *Rhizopus oligosporus* (LRO), além da protease de *Aspergillus oryzae* e dos micélios UEA\_53 e UEA\_115, foram avaliadas com relação à atividade e seletividade na acilação da lactona **38** com acetato de vinila e ácido dodecanóico. Empregando o micélio UEA\_115 na reação de acetilação de **38** com acetato de vinila, o derivado **54** foi obtido com 41% de conversão em 72 h. Utilizando as lipases LPS-C, LPS-D, AK e TL-IM os derivados 3-*O*-acetil-D-ribonolactona **58**, 2,5-*O*-diacetil-D-ribonolactona **59**, 3,5-*O*-diacetil-D-ribonolactona **60** e 2,3,5-*O*-triacetil-D-ribonolactona **61** foram identificados, em pequenas quantidades (5-23%), além do produto majoritário **54**.

Os melhores resultados foram obtidos com a CAL-B, obtendo-se os respectivos derivados monoacilados 5-*O*-acetil-D-ribonolactona **54** e 5-*O*-dodecanoil-D-ribonolactona **55** com boas conversões (64-99%) e excelente regioselectividade. Estes compostos foram também isolados e caracterizados utilizando análises espectroscópicas de IV, RMN-<sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C, além de análise elementar.

Nas reações de acetilação da lactona **38** catalisada pela CAL-B, foram avaliados os efeitos do solvente orgânico (acetonitrila, acetona, THF, dioxano e DMF), da quantidade de biocatalisador (0-500 mg), da quantidade (1,5 e 100 mmol) e tipo de doador de grupo acetila (acetatos de etila, vinila e de isopropenila, ácido acético e anidrido acético) e do uso simultâneo de duas lipases no meio reacional.

Foi obtida uma série de derivados 5-acil-D-ribonolactonas nas reações de acilação de **38** com ácidos carboxílicos de cadeias alquílicas lineares catalisada pela CAL-B, e as conversões variaram de 0,5 a 67%. Já os derivados 5-*O*-acetoacetil-D-ribonolactona **62** e 5-*O*-oleil-D-

ribonolactona **71** foram obtidos com conversões de 50 e 70%, respectivamente, usando acetoacetato de etila e ácido oléico.

A CAL-B foi reutilizada em cinco ciclos consecutivos em reações de acilação da lactona **38** com acetato de vinila, ácido decanóico e ácido dodecanóico. Ao usar acetato de vinila, a conversão ao produto **54** diminuiu após cada ciclo alcançando 15% depois do quinto re-uso. Contudo, ao utilizar os ácidos decanóico e dodecanóico, observou-se manutenção da atividade catalítica depois de cada ciclo, e os produtos **56** e **55** foram obtidos com conversões de 57-39% e 64-53%, respectivamente.

A reação de etanólise do derivado triacetilado **61** com a CAL-B levou ao produto majoritário 2,3-*O*-diacetil-D-ribono-1,4-lactona (**63**). Este composto foi isolado com rendimento de 60% após 6 h de reação, e caracterizado por RMN-<sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C.

Os resultados obtidos neste trabalho mostraram que o uso de biocatalisadores é uma metodologia simples e ambientalmente sustentável para a preparação regioselectiva de derivados acilados da D-ribonolactona. Diferente dos processos que envolvem várias etapas químicas, a acilação enzimática formou, na maioria dos casos, apenas o derivado 5-acilado sob condições suaves

## ABSTRACT

In this study, enzymatic methodologies for the regioselective acylation of D-ribo-1,4-lactone (**38**) were developed. The products were identified by  $^1\text{H}$  NMR, UV-Vis and quantified or volumetric titration using KOH aqueous solution, depending on the type of acyl donor employed.

Lipases from *Candida antarctica* (CAL-B), *Burkholderia cepacia* (LPS, LPS-C and LPS-D), *Candida rugosa* (LCR), *Thermomyces lanuginosus* (TL-IM), *Pseudomonas fluorescens* (AK), *Rhizopus oryzae* (F-AP15), *Aspergillus niger* (LAN), *Rhizomucor miehei* (RM-IM) and *Rhizopus oligosporus* (LRO), as well as the protease from *Aspergillus oryzae* and the mycelia UEA\_53 and UEA\_115, were evaluated as catalysts in the regioselective acylation of lactone **38** with vinyl acetate and dodecanoic acid. The acetylation reaction of **38** with vinyl acetate using the mycelium UEA\_115 furnished the derivative **54** was 41% conversion after 72 h reaction. On the other hand, the use of lipases LPS-C, LPS-D, AK and TL-IM gave rise to 3-*O*-acetyl-D-ribonolactone (**58**), 2,5-*O*-diacetyl-D-ribonolactone (**59**), 3,5-*O*-diacetyl-D-ribonolactone (**60**) and 2,3,5-*O*-triacetyl-D-ribonolactone (**61**) which were identified in small amounts (5-23%) together with the major product **54**.

The best results were achieved using CAL-B as the catalyst to give the corresponding 5-*O*-acetyl-D-ribonolactone (**54**) and 5-*O*-dodecanoil-D-ribonolactone (**55**) in good conversion degrees (64-99%). These monoacylated compounds were isolated and characterized by IR,  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR, and elemental analysis.

The effect of organic solvent (acetonitrile, acetone, THF, dioxane and DMF), amount of biocatalyst (0-500 mg), type (ethyl, vinyl and isopropenyl acetates, acetic acid and acetic anhydride) and amount (1.5 and 100 mmol) of the acetyl donor, besides the simultaneous use of two lipases in the reaction media, were evaluated in the acetylation reaction of lactone **38** catalyzed by CAL-B.

A series of 5-acyl-D-ribonolactones were obtained in the CAL-B catalyzed acylation of **38** with carboxylic acids containing linear alkyl chains, with conversion degrees of 0.5-67%. 5-*O*-Acetoacetyl-D-ribonolactone **62** and 5-*O*-oleil-D-ribonolactone **71** were obtained from ethyl acetoacetate and oleic acid in conversion degrees of 50% and 70%, respectively.



CAL-B was employed in the acylation of **38** with vinyl acetate, decanoic acid and dodecanoic acid in five subsequent cycles. The use of vinyl acetate as the acylating agent led to a decreased conversion to **54** after each reutilization, reaching a value of 15% in the fifth cycle. However, the use of decanoic and dodecanoic acid led to the maintenance of the catalytic activity after each cycle, with the conversion degrees to monoacylated derivatives **56** and **55** in the range of 57-39% and 64-53%, respectively.

In the ethanolysis reaction of triacetylated derivative **61** catalyzed by CAL-B, the main product was 2,3-*O*-diacetyl-D-ribonolactone **63**, which was isolated in 60% yield after 6 h of reaction and was characterized by  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR.

In summary, the results presented in this work highlighted that the use of biocatalysts in simple and environmentally benign methodologies for the regioselective preparation of acylated D-ribonolactones. In contrast to multistep chemical processes, the enzymatic acylation furnished, in most cases, only the 5-acylated derivative under mild conditions.



# 1 – INTRODUÇÃO

## 1.1 – Considerações gerais

A ação humana desde os tempos mais remotos, sobretudo nos últimos séculos, associada ao desenvolvimento tecnológico e ao crescimento populacional, tem gerado retrospectos ambientais preocupantes. Muitos processos químicos têm contribuído enormemente para a proliferação destes impactos negativos.<sup>1-3</sup>

Contrastando com seus efeitos deletérios, a química tem também uma grande participação nos dias atuais, gerando inúmeros produtos fundamentais à humanidade, desde os diversos combustíveis até os medicamentos mais complexos.<sup>2</sup>

Desta forma, surge no âmbito científico/tecnológico um grande dilema. Como continuar com o desenvolvimento e diminuir os danos causados ao meio ambiente? A sociedade científica atual necessita repensar suas metodologias e suas práticas. Neste contexto, ascende um novo tipo de pensamento científico, a química verde ou química sustentável, que visa responder a esta necessidade de uma conduta científica mais preocupada com os efeitos danosos ao planeta.

A prática química guiada pela preocupação com a qualidade de vida e o meio ambiente pode ser resumida em doze princípios básicos, tais como a diminuição do uso de reagentes e auxiliares, economia atômica, necessidade de reações rápidas (catálise), e a síntese de compostos atóxicos.<sup>1-3</sup>

A biocatálise corresponde à grande parte dos requisitos da química verde, sendo por esta razão enormemente explorada como uma extensão às rotas clássicas de síntese, com reduções significativas nos impactos ambientais. Por exemplo, a alta quimio-, regio- e estereosseletividade das reações biocatalisadas pode simplificar os processos industriais, aumentando o rendimento e diminuindo a geração de subprodutos.<sup>1</sup>

Pesquisas recentes associam a biocatálise a outras tecnologias emergentes não menos sustentáveis, como o uso dos líquidos iônicos, fluidos supercríticos<sup>5</sup> e micro-ondas,<sup>6</sup> buscando melhores rendimentos, facilidade na separação dos produtos, aumento da seletividade e diminuição dos efeitos poluentes, condições *sine quibus non* das práticas químicas ecologicamente corretas.

Os carboidratos são precursores de vários compostos com as mais diversas aplicações, principalmente na área médica e farmacêutica. A preparação de derivados destes compostos de maneira quimiosseletiva, ou seja, a partir da funcionalização seletiva de um grupo hidroxila quando há outras de reatividade similar na mesma molécula, constitui um processo relevante no campo da síntese orgânica. Neste aspecto, a biocatálise surge como um método alternativo aos convencionais, que utilizam etapas múltiplas de proteção/desproteção. Estas, na maioria das vezes, remetem a outras de separação e purificação, ocasionando baixos rendimentos e produção excessiva de resíduos químicos, uso de condições extremas de pH e temperatura, e alto custo devido à necessidade de reagentes mais elaborados.

A utilização de enzimas, especialmente das lipases, é uma excelente metodologia para a funcionalização com alto grau de seletividade em única etapa, além de oferecer condições experimentais mais simples e brandas.

Neste trabalho buscou-se o desenvolvimento de metodologias biocatalíticas seletivas, simples, pouco agressivas ao meio ambiente e economicamente viáveis para a síntese de derivados do carboidrato D-ribono-1,4-lactona.

## 1.2 – Enzimas

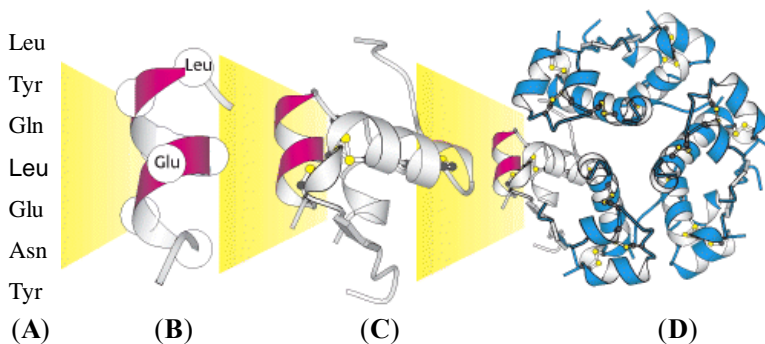
Enzimas são, em geral, proteínas com atividade catalítica.<sup>i</sup> Proteínas são estruturas macromoleculares constituídas por cadeias poliméricas de aminoácidos unidos através de ligações peptídicas. Os aminoácidos são moléculas orgânicas que contêm ligados a um átomo de carbono ( $C\alpha$ ), geralmente assimétrico, os grupamentos ácido ( $COOH$ ) e amino ( $NH_2$ ), um átomo de hidrogênio (H) e uma cadeia lateral (R) que determina o tipo de aminoácido. A reação bioquímica essencial dos aminoácidos constitui-se na sua conversão em peptídeos, polipeptídeos e proteínas.<sup>7-12</sup>

A porcentagem de aminoácidos essenciais presentes nas diferentes enzimas não varia significativamente, porém o que varia é a seqüência na qual estes aminoácidos estão distribuídos ao longo da

---

<sup>i</sup> Um pequeno grupo de moléculas de RNA também possui propriedades catalíticas.

cadeia peptídica. A seqüência exata de aminoácidos que caracteriza cada tipo específico de enzima denomina-se estrutura primária. A conformação tridimensional dessa seqüência é chamada de estrutura secundária, e a disposição espacial é denominada de estrutura terciária. A estrutura quaternária constitui-se na interação entre duas ou mais subunidades polipeptídicas (**Figura 1**).<sup>8</sup>

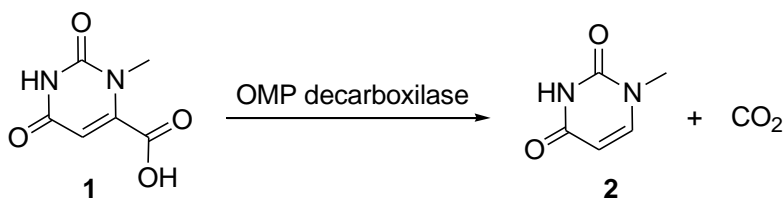


**Figura 1** – Representações gráficas das estruturas (A) primária e (B) secundária de uma seqüência de sete aminoácidos; (C) terciária e (D) quaternária da insulina humana.<sup>9</sup>

Linus Pauling e Robert Corey propuseram, através de uma série de estudos de difração de raios-X, que as estruturas secundárias das enzimas podem ocorrer de duas formas periódicas denominadas de  $\alpha$ -hélices e  $\beta$ -pregueadas. Ambas as estruturas, bem definidas, são formadas através de ligações de hidrogênio entre os grupos C=O e NH de diferentes resíduos de aminoácidos. As proteínas globulares possuem 50% de seu arcabouço formado por estas duas estruturas ( $\alpha$ -hélice e  $\beta$ -pregueada), e as demais partes são formas irregulares e menos definidas que fazem a ligação entre elas, como por exemplo, os *loopings*.<sup>8</sup>

As estruturas terciárias das enzimas se estabelecem a partir dos vários tipos de interações que ocorrem de forma simultânea ao longo da cadeia protéica, e que conseqüentemente determinam as propriedades funcionais das proteínas. As interações podem ser de diferentes tipos, como as ligações covalentes, eletrostáticas ou de hidrogênio; forças de van der Waals e por efeitos hidrofóbicos.<sup>7,8</sup>

As enzimas catalisam todas as reações que ocorrem nas células vivas. As velocidades das reações por elas catalisadas são maiores, por fatores de até  $10^{20}$  vezes do que as correspondentes não catalisadas.<sup>12</sup> Para organismos vivos, aumentos de velocidade desta ordem de grandeza são importantes, pois permitem a ocorrência de reações a velocidades razoáveis, mesmo nas condições normais que existem nas células vivas, tais como pH aproximadamente neutro e temperatura próxima a 35 °C. A orotidina-5'-fosfatodescarboxilase (OMP decarboxilase), por exemplo, diminui de 78 milhões de anos para 25 milissegundos o tempo da reação de descarboxilação do ácido 1-metilurótico (**1**) para formar o 1-metiluracil (**2**) e gás carbônico (**Figura 2**).<sup>13</sup>

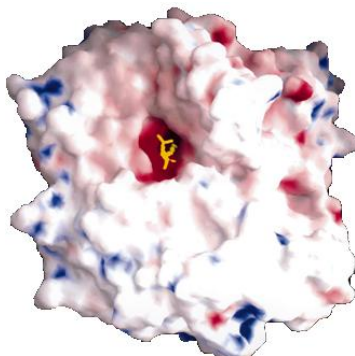


**Figura 2** – Reação de descarboxilação do ácido 1-metilurótico (**1**) catalisada pela enzima OMP decarboxilase.<sup>13</sup>

Assim como os demais catalisadores, estas macromoléculas altamente funcionalizadas diminuem a barreira energética entre reagentes e produtos, são regenerados ao final da reação e não alteram o equilíbrio químico das reações que catalisam. Entretanto, estes biocatalisadores possuem um alto grau de especificidade diante dos respectivos substratos, o que faz com que raramente formem produtos laterais ou secundários.<sup>7,8</sup>

As enzimas apresentam pequenas regiões na sua molécula nas quais estão presentes os resíduos diretamente envolvidos com a reação a qual catalisam, e outros resíduos que atuam na ligação específica dos substratos. Estas regiões denominadas de sítios ativos ocupam uma parte relativamente pequena do volume total da enzima, pertencem a partes distintas, mas tridimensionalmente próximas da seqüência linear de aminoácidos, e correspondem geralmente a uma fenda ou cavidade existente na estrutura da molécula.<sup>7,8</sup>

A **Figura 3** mostra a representação da superfície eletrostática da lipase de *Candida rugosa* (CRL) ligada ao seu inibidor hexilfosfonato de *R*-mentila, que está inserido no túnel que fornece o acesso aos resíduos do sítio ativo da lipase.<sup>14</sup>



**Figura 3** – Superfície eletrostática (potencial negativo em vermelho e positivo em azul) da lipase de *Candida rugosa* (CRL) ligada ao seu inibidor hexilfosfonato de *R*-mentila (em amarelo).<sup>14</sup>

Devido à geometria do sítio ativo, que é constituído por resíduos de L-aminoácidos, as enzimas são catalisadores altamente seletivos podendo apresentar quimio-, regio-, ou enantiosseletividade.<sup>8</sup>

A seletividade das enzimas é a propriedade essencial para sua escolha como catalisador em síntese orgânica, além do fato já mencionado de que seu uso corresponde com grande parte dos requisitos da química sustentável. Esta propriedade está mais explorada no item 1.5 que discute a seletividade das lipases, em especial com relação à regiosseletividade que é o foco principal deste trabalho.

Após esta breve introdução envolvendo a definição e algumas propriedades gerais das enzimas, no próximo item será descrita a sua classificação, de acordo com as convenções dos órgãos especializados.

### 1.3 – Classificação das enzimas

Muitas enzimas são nomeadas pela adição do sufixo “ase” ao nome do substrato ou da reação que está sendo catalisada. Por exemplo, a urease catalisa a hidrólise da uréia, e a DNA polimerase a polimerização de nucleotídeos para formar o DNA. Para outras enzimas,

como a pepsina e a tripsina, os seus nomes não têm relação com os substratos ou reações que catalisam.<sup>7,10</sup>

O *Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology*<sup>15</sup> (NC-IUBMB) classifica as enzimas em seis classes, com suas subclasses, de acordo com o tipo de reações que catalisam (**Tabela 1**).<sup>7,8</sup>

**Tabela 1** - Classificação das enzimas segundo o NC-IUBMB.<sup>7,8,16</sup>

<b>Classes</b>	<b>Tipos de reações catalisadas; exemplos</b>
EC 1. Oxidoredutases	transferência de elétrons (íons híbridos ou átomos de H); lactato desidrogenase
EC 2. Transferases	reações que envolvem transferência de pequenos grupos (CO, CN); nucleosídeo monofosfato quinase
EC 3. Hidrolases	reações de hidrólise de ésteres e de amidas, e transesterificação; quimiotripsina
EC 4. Liases	adição de grupos a ligações duplas, ou formação de ligações duplas por remoção de grupos; fumarase
EC 5. Isomerases	transferência de grupos dentro das moléculas, produzindo formas isoméricas; triose fosfato isomerase
EC 6. Ligases	formação de ligações C-O, C-S, C-N e C-C por reações de condensação acoplada à clivagem de ATP; aminoacil-tRNA sintetase

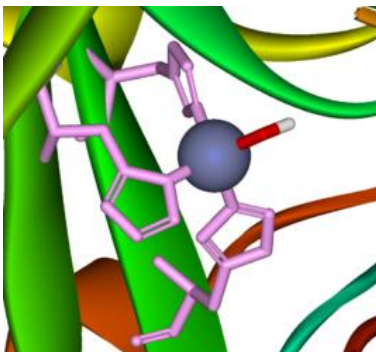
A *International Union of Pure and Applied Chemistry* (IUPAC) e a IUBMB criaram a *Joint Commission on Biochemical Nomenclature* (JCBN), que juntamente com a NC-IUBMB, visam facilitar a comunicação de informações, incentivando a padronização de terminologias.<sup>16</sup>

A nomenclatura sugerida pelas comissões classifica esses biocatalisadores com um código iniciado por EC (*Enzyme Commission*) seguido por quatro números referentes aos tipos específicos de reações de cada enzima. Desta forma, a anidrase carbônica denomina-se de EC 4.2.1.1, onde o primeiro dígito, 4, representa a classe (liase), o segundo dígito, 2, a subclasse carbono/oxigênio liase, o terceiro dígito, 1, a sub-subclasse hidro-liase, e o quarto dígito, 1, designa uma carbonato



dehidratase. Esta metaloenzima de zinco tem como principal função a hidratação do dióxido de carbono, seu substrato natural, e a desidratação do ácido carbônico.

A **Figura 4** mostra a representação esquemática do sítio ativo da anidrase carbônica humana.<sup>16</sup>



**Figura 4** – Representação esquemática do sítio ativo da anidrase carbônica humana (EC 4.2.1.1), código pdb 1CA2. (em rosa são os resíduos de histidinas; em cinza e esférico o co-fator zinco; e em vermelho e branco os átomos de oxigênio e hidrogênio, respectivamente, do grupo  $\text{OH}$ ).<sup>17</sup>

No *Protein Data Bank* (PDB), encontram-se catalogados cerca de 70.000 tipos de macromoléculas (proteínas, ácidos nucleicos, complexos proteína/ácido nucleico e outros). Nesta coleção várias enzimas têm sua seqüência de aminoácidos e estrutura tridimensional determinadas através de cristalografia de raios X, microscopia eletrônica e de ressonância magnética nuclear (RMN).<sup>16</sup>

As enzimas hidrolíticas (lipases, proteases, amilases e celulases) são as mais freqüentemente usadas em síntese orgânica, e devido às suas propriedades e vantagens na utilização, a família das lipases tem sido amplamente investigada.<sup>17</sup> Devido a sua importância no contexto científico, principalmente em síntese orgânica e na obtenção de novas metodologias, e ao fato de ser a subclasse de enzimas empregadas neste trabalho, o **item 5** será dedicado ao estudo mais minucioso destes biocatalisadores bem como de algumas de suas propriedades e aplicações.

As propriedades das enzimas, que as tornam moléculas altamente especializadas, assim como a diversidade de reações que catalisam nos organismos vivos, fazem com que sejam atrativas para os químicos em geral, que constantemente aperfeiçoam os processos para utilizá-las em reações de seu interesse. No próximo item serão elencadas as vantagens de utilizar estes biocatalisadores em meios denominados não convencionais (ou não-aquosos).

#### **1.4 – Enzimas em meios não convencionais**

Os estudos envolvendo enzimas como catalisadores de reações em laboratório são desenvolvidos tradicionalmente em meio aquoso, devido ao fato deste ser o meio natural para atuação destas macromoléculas. Entretanto, o uso apenas de água como solvente restringe o número de aplicações e processos biocatalisados, sobretudo quando se trata do emprego de substratos hidrofóbicos, ou de reações em que a água pode deslocar o equilíbrio atuando como reagente. Para minimizar esta restrição imposta às reações biocatalisadas, nos últimos anos houve o desenvolvimento de processos denominados de meios não-convencionais (solventes orgânicos, fluidos supercríticos, fases gasosas ou sólidas e líquidos iônicos), os quais são caracterizados pela reduzida quantidade de água disponível.<sup>8</sup>

Destacam-se algumas vantagens do uso de biocatalisadores em solventes orgânicos:

- solubilização de substratos e/ou produtos hidrofóbicos;
- diminuição dos possíveis efeitos inibitórios e/ou tóxicos pelos substratos e/ou produtos;
- favorecimento de reações de síntese com relação às correspondentes hidrólises em processos nos quais há reações em equilíbrio;
- diminuição do número de reações secundárias, melhorando a seletividade;
- simplificação dos processos de recuperação tanto da enzima como dos substratos e/ou produtos devido a não solubilização da enzima e/ou o baixo ponto de ebulição de alguns solventes orgânicos;
- aumento da estabilidade térmica;
- controle da estereoespecificidade das enzimas.

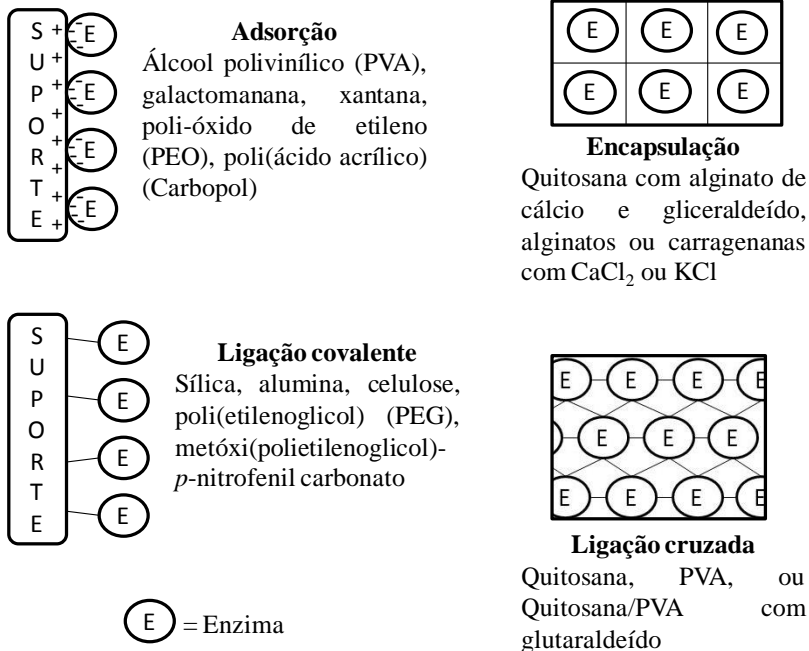
Muitas enzimas são cataliticamente ativas em ambientes hidrofóbicos, com eficiência similar àquela encontrada em solução aquosa. Porém, em geral estes catalisadores estão sujeitos à inativação em meio orgânico por fatores químicos, físicos ou biológicos. Visando protegê-los das interações com o solvente, recentemente técnicas de imobilização têm sido desenvolvidas.<sup>8,17</sup>

#### **1.4.1 – Imobilização de enzimas**

A imobilização de enzimas e microorganismos é uma das áreas importantes da biotecnologia, e vários métodos vêm sendo desenvolvidos com este fim, tais como a adsorção em materiais insolúveis, confinamento em géis poliméricos, encapsulamento em membranas, ligações cruzadas com o auxílio de reagentes bi- ou multifuncionais, e ligações em suportes insolúveis.<sup>17-20</sup>

Para muitas enzimas, a imobilização confere uma estabilidade adicional frente a várias formas de desnaturação, além de fornecer uma maneira fácil de recuperá-las e reutilizá-las, sem perda considerável da atividade.<sup>21,22</sup>

A **Figura 5** ilustra as principais técnicas de imobilização descritas na literatura com os respectivos exemplos de materiais utilizados como suportes.



**Figura 5** – Representações dos principais métodos de imobilização de enzimas. (adaptada da ref. 18)

Trabalhos mais recentes têm sido reportados tratando de imobilização de várias classes de enzimas, nos mais diversos suportes, como microesferas de poliestireno<sup>23</sup>, organogéis<sup>24</sup>, nanopartículas<sup>25</sup> e mesoporos<sup>26,27</sup> de sílica, nanopartículas de quitosana<sup>28</sup>, e nanoesponjas de ciclodextrina.<sup>29</sup>

Vikartovská<sup>30</sup> *et al.* encapsularam a glicose oxidase (GOD) em cápsulas de alginato de sódio/sulfato de celulose/poli(metileno-co-guanidina), que é um polieletrólito. A GOD imobilizada apresentou alta termoestabilidade e uma ampla faixa de pH ótimo, tornando-se estável com relação à estocagem em comparação com a enzima livre. A GOD encapsulada pode ser utilizada por 45 ciclos de biooxidação, retendo 92% de sua atividade.

Torabi<sup>31</sup> *et al.* realizaram a co-imobilização da colesterol oxidase (COD) e peroxidase de rabanete (POD) em superfície de perlite (um tipo de vidro vulcânico) usando 3-aminopropiltriethoxisilano (3-APTS) ligado covalentemente com glutaraldeído. As atividades enzimáticas foram determinadas por técnicas espectrofotométricas. A COD e a POD tiveram seus pHs ótimos diminuídos em relação às enzimas livres, evidenciando uma maior estabilidade em condições ácidas após immobilização. Estudos de aquecimento visando a inativação das enzimas mostraram o aumento da termoestabilidade da COD immobilizada por mais de dois ciclos, mas a POD immobilizada foi menos termoestável do que na sua forma livre. A constante de Michaelis-Menten ( $K_M$ ) das enzimas immobilizadas foi um pouco menor do que as determinadas para as livres. Os biocatalisadores immobilizados foram reutilizados por 20 ciclos consecutivos, retendo 65% da atividade inicial.

O caseinato de sódio (CS) é um sal derivado da caseína, que é a principal proteína existente no leite de vaca, cuja constituição é de aproximadamente 3,5% de proteínas, das quais 2,9% são caseínas e 0,6% são proteínas do soro. A caseína é definida como a proteína que precipita quando o leite desnatado é acidificado a pH 4,6, a 20 °C.<sup>32,33</sup>

Este biopolímero forma filmes insolúveis em vários solventes orgânicos e vem sendo utilizado pelo grupo de pesquisa do Laboratório de Biocatálise da UFSC para imobilizar enzimas e células inteiras, com aplicação em síntese de ésteres e redução de compostos carbonílicos, respectivamente. Este suporte constitui um exemplo de immobilização em matriz polimérica, que se caracteriza pelo confinamento do biocatalisador em um polímero insolúvel em meio orgânico ou em uma microcápsula.<sup>21</sup>

O próximo item se refere à definição, propriedades e vantagens do uso das lipases em metodologias de síntese orgânica, culminando na propriedade explorada neste trabalho, a regioselectividade.

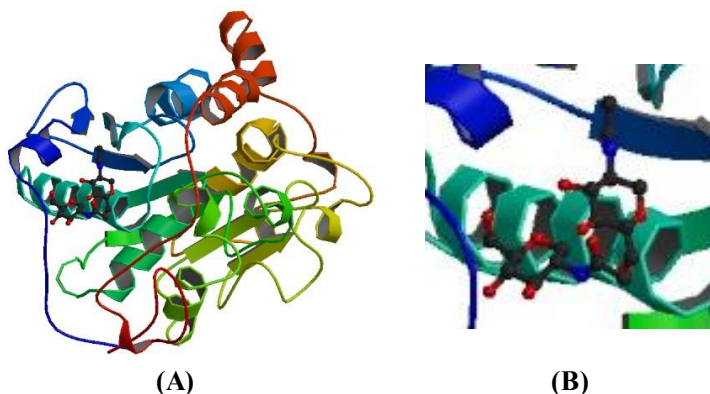
## 1.5 – Lipases e aplicações

As lipases verdadeiras (triacilglicerol acil-hidrolases EC 3.1.1.3) são hidrolases que em seu ambiente natural catalisam a hidrólise total ou parcial de triacilglicerol (TAG) formando diacilglicerol (DAG), monoacilglicerol (MAG), glicerol (G) e ácidos graxos livres. Essas enzimas apresentam uma capacidade única de agir apenas na interface óleo/água. Essa definição exclui as enzimas que atuam em ésteres solúveis em água (esterases) ou que hidrolisam outros lipídeos (acil-hidrolases, colesteroesterases, tioesterases e outras).<sup>18,19,34</sup>

As lipases encontram-se largamente distribuídas na natureza em animais, vegetais e microorganismos (fungos e bactérias). São, em sua maioria, extracelulares, favorecendo a sua extração, isolamento e purificação.<sup>18,35</sup>

As lipases apresentam massa molar entre 40-50 KDa com cerca de 300 resíduos de aminoácidos. São glicoproteínas, nas quais a parte glicosilada circunda o sítio ativo, sendo este formado pela tríade catalítica Ser-His-Asp/Glu, estando freqüentemente protegido por uma “tampa” hidrofóbica que sofre uma mudança conformacional ao interagir com interface lipídeo/água.<sup>14</sup>

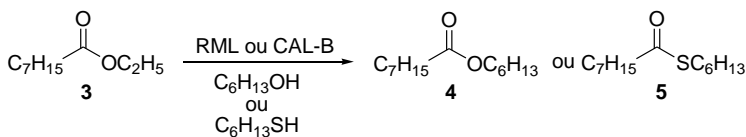
A **Figura 6** mostra a estrutura cristalina da lipase B de *Candida antarctica* (CAL-B) complexada com o ligante *N*-acetil-glucosamina.<sup>16</sup>



**Figura 6** – Representação da estrutura cristalina da CAL-B complexada ao substrato *N*-acetil-glucosamina (A), e ampliação do seu sítio ativo (B).<sup>16</sup>

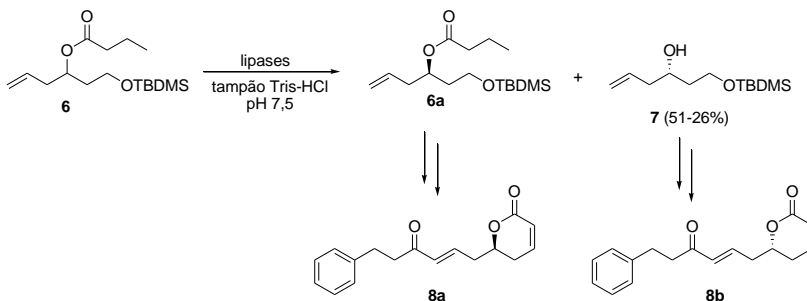
Como vantagens na utilização de lipases pode-se citar o seu baixo custo, sua versatilidade catalítica, o fato de não requererem cofatores, de atuarem em faixas de pH bastante amplas, e sobretudo de serem quimio-,<sup>36,37</sup> estereo-<sup>38-41</sup> e regioseletivas.<sup>42-47</sup>

Como exemplo de reação quimiosseletiva catalisada por esta classe de enzimas cita-se o trabalho de Hedfors<sup>37</sup> *et al.* que investigaram a quimiosseletividade das lipases de *Candida antarctica* B (CAL-B) e de *Rhizomucor miehei* (RML) na transacilação do octanoato de etila (**3**) em ciclo-hexano, empregando hexanol e hexanotiol como receptores acila. A reação catalisada por RML foi 10 vezes mais rápida em hexanol do que em hexanotiol. Empregando a CAL-B, esta razão aumentou e o octanoato de hexila (**4**) foi obtido 730 vezes mais rápido do que o octanoato de tiohexila (**5**) (**Figura 7**).



**Figura 7** – Transacilação quimiosseletiva do octanoato de etila (**3**) catalisada por lipases.<sup>37</sup>

A estereosseletividade oriunda da catálise por lipases explica o seu enorme potencial em processos químicos como catalisadores em vários ramos da indústria e da medicina. Reddipalli<sup>41</sup> *et al.* realizaram a síntese quimio-enzimática dos enantiômeros *R* e *S* da rugulactona, um potencial quimioterápico. Na primeira etapa ocorre hidrólise do butirato de 1-(*terc*-butildimetilsililo)hex-5-en-3-ila (**6**) catalisada pela lipase. Dentre as várias lipases utilizadas, os melhores resultados foram obtidos empregando a de *Candida rugosa* (LCR), cuja resolução levou à obtenção dos produtos *S*-álcool (**7**) e *R*-éster (**6a**) 3-hidróxi-protetidos com alta enantiosseletividade ( $E = 244$ ) e pureza enantiomérica ( $ee_p$ , 98-99%). Os dois enantiômeros foram utilizados na síntese dos produtos naturais *R*-rugulactona (**8a**) e *S*-rugulactona (**8b**) (**Figura 8**).

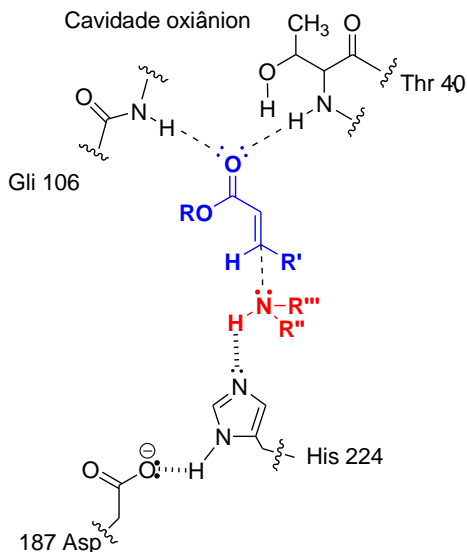


**Figura 8** – Síntese quimio-enzimática do produto natural *R*-rugulactona (**8a**) e *S*-rugulactona (**8b**).<sup>41</sup>

Conforme descrito, nos últimos anos têm sido realizados vários estudos visando a utilização de lipases em meio orgânico, visto que muitos dos substratos empregados em síntese são insolúveis em água. Líquidos iônicos e fluidos supercríticos também constituem alternativas emergentes devido às suas características menos agressivas ao meio ambiente, e facilidade de separação dos substratos, além de proverem a estas enzimas uma maior estabilidade e, em muitos casos, maiores atividade e seletividade.<sup>48-52</sup>

Alguns trabalhos recentes propõem que as lipases também catalisam reações aldólicas e de adição de Michael.<sup>53-56</sup> Estas adições ocorrem quando sistemas  $\alpha,\beta$ -insaturados são empregados como eletrófilos e aminas como nucleófilos. Algumas evidências do mecanismo desta atividade (promiscuidade enzimática) da CAL-B mostram que a cavidade oxianion (Thr40 e Gln106) do sítio ativo estabiliza a carga negativa do estado de transição, enquanto o par His224-Asp187 facilita a transferência de prótons durante a catálise (**Figura 9**).<sup>57</sup>



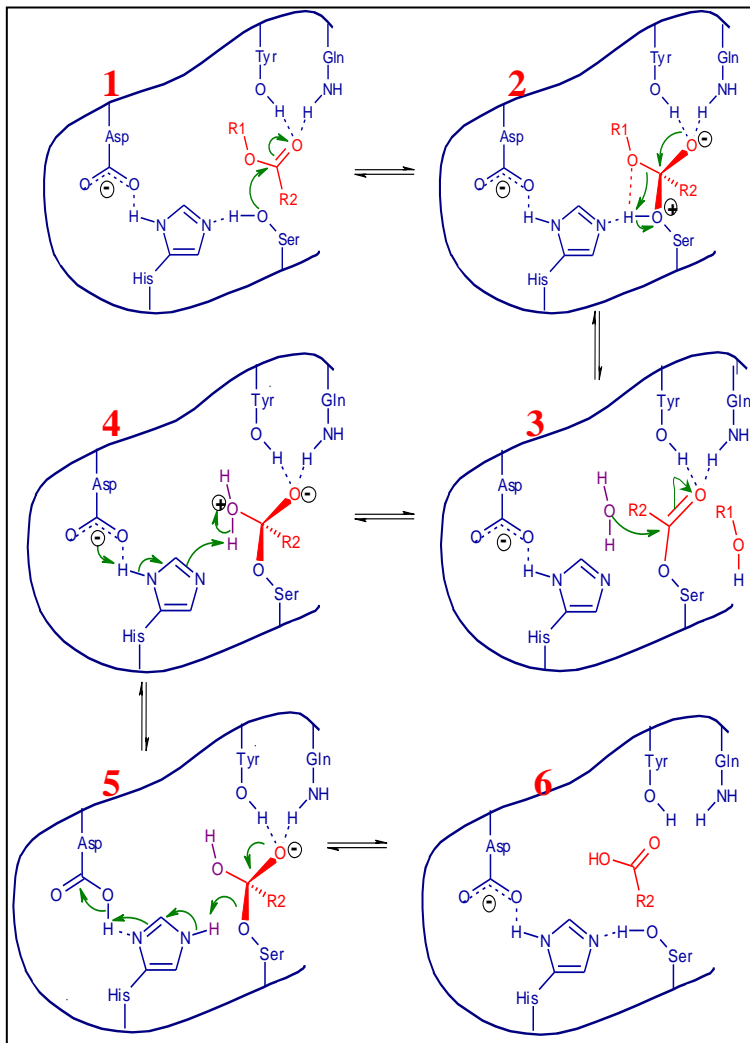


**Figura 9** – Mecanismo hipotético da adição de Michael catalisada pela CAL-B (adaptado da ref. 55), destacando as espécies genéricas: composto carbonílico  $\alpha,\beta$ -insaturado (eletrófilo, em azul) e amina primária ou secundária (nucleófilo, em vermelho).<sup>54</sup>

Na literatura está descrita uma proposta para o mecanismo de hidrólise de ésteres catalisada por lipases. A seqüência de etapas deste mecanismo é enumerada a seguir:<sup>12</sup>

- 1 - ligação do substrato éster e ataque nucleofílico do oxigênio da serina;
- 2 - formação do primeiro intermediário tetraédrico por ataque nucleofílico da serina catalítica, com oxianion estabilizado por duas ou três ligações de hidrogênio, a chamada “cavidade oxianion”;
- 3 - quebra da ligação éster com saída da porção alcoólica, e formação do intermediário acil-enzima;
- 4 - hidrólise do intermediário acil-enzima;
- 5 - formação do segundo intermediário tetraédrico;
- 6 - formação do produto e regeneração do sitio ativo.

A **Figura 10** mostra uma representação do mecanismo de hidrólise de um éster genérico catalisada por lipase, cujas etapas são numeradas de acordo com a sequência citada acima.<sup>12</sup>



**Figura 10** – Mecanismo de hidrólise de éster catalisada por lipase (adaptado da ref. 12).

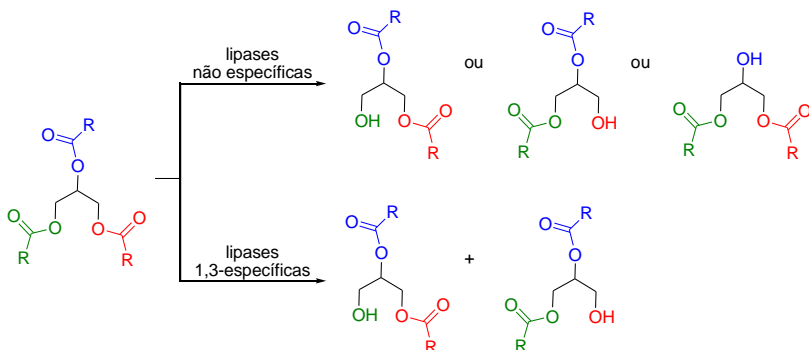
A segunda etapa na qual ocorre a formação do intermediário acil-enzima é determinante para a catálise. Na etapa 3 uma molécula de água efetua um ataque nucleofílico sobre o intermediário acil-enzima, que resultará em etapas subseqüentes na formação do produto ácido. É razoável estimar que se o nucleófilo ao invés de água for um álcool, ou uma amina, ou um tiol, ou ainda um peróxido, outras classes de produtos podem ser obtidos. Portanto, em solvente orgânico, as lipases catalisam a transferência de grupos acilas de compostos doadores para uma ampla faixa de compostos aceptores diferentes da água.<sup>12,17</sup>

Dependendo do tipo do doador ou acceptor acila, as reações catalisadas por lipases incluem esterificação, tioesterificação, amidação, transesterificação, síntese de peptídeos e formação de perácidos. Esses últimos podem ser utilizados na síntese de epóxidos<sup>58-59</sup> e oxiziridinas<sup>60</sup> a partir de compostos insaturados.

A regiosseletividade das lipases, que faz destas enzimas uma excelente alternativa sintética e metodológica quando se procura evitar o uso de reagentes protetores e de mais etapas reacionais, será discutida detalhadamente no próximo item por se tratar também da propriedade explorada neste trabalho.

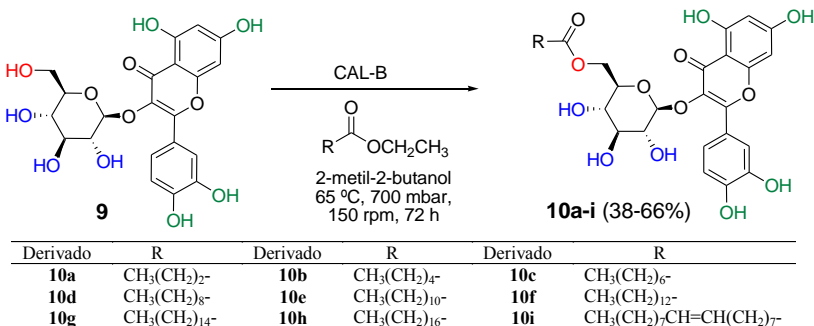
### 1.5.1 – Lipases e regiosseletividade

Com relação a sua seletividade natural frente à hidrólise de triacilgliceróis (TAG), as lipases podem ser divididas em regiosseletivas e seletivas com relação ao tamanho da cadeia carbônica e/ou ao número de insaturação do grupo acila. As regiosseletivas subdividem-se em não-específicas (hidrolisam ésteres de ácidos graxos primários ou secundários, liberando ácidos graxos na posição 1, 2 ou 3), e 1,3-específicas (hidrolisam apenas ésteres de ácidos graxos primários, isto é, na posição 1 ou 3, conforme ilustrado na **Figura 11**.<sup>61</sup>



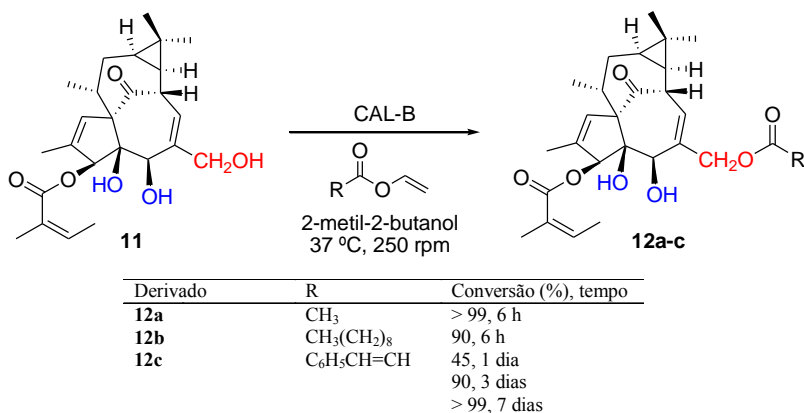
**Figura 11** – Hidrólises seletivas de TAG catalisadas por lipases.<sup>61</sup>

A regioseletividade apresentada *in vivo* pelas lipases torna estes biocatalisadores atrativos para serem utilizados em reações de síntese e/ou de hidrólise, onde há a possibilidade de formação de mais de um regioisômero.<sup>62-72</sup> Salem<sup>62</sup> *et al.* realizaram a acilação regioseletiva da isoquercitrina (**9**) utilizando ésteres de ácidos graxos com diferentes comprimentos da cadeia carbônica em 2-metil-2-butanol, e CAL-B como catalisador. Das quatro hidroxilas da isoquercitrina que potencialmente podem ser aciladas (secundárias em azul e primária em vermelho), excluindo as hidroxilas fenólicas que são pouco reativas (em verde), apenas a primária reagiu, obtendo-se os derivados monoacilados (**10a-i**) com conversões entre 66 e 38%, dependendo do doador de grupo acila empregado (**Figura 12**).



**Figura 12** – Acilação regioseletiva da isoquercitrina (**9**) catalisada pela CAL-B.<sup>62</sup>

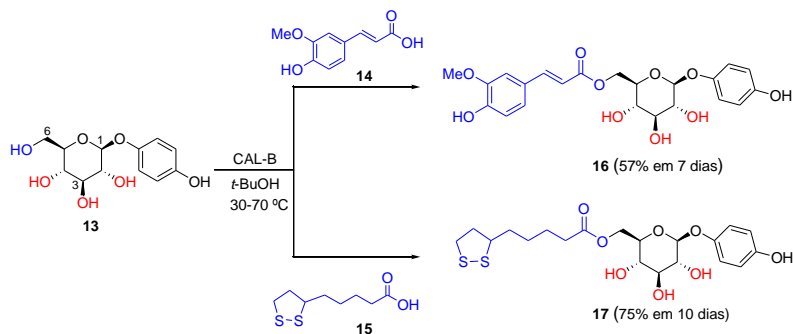
Teng<sup>63</sup> *et al.* realizaram recentemente a acilação regioselectiva do 3-*O*-angeloil ingenol (**11**) com acetato, decanoato e cinamato de vinila catalisada pela CAL-B. Apenas os produtos acetilados na hidroxila primária (em vermelho) foram detectados por espectrometria de massas e RMN-<sup>1</sup>H, obtendo-se excelentes conversões nos produtos **12a-c** em tempo relativamente curto, dependendo do doador de grupo acila empregado (**Figura 13**).



**Figura 13** – Acilação seletiva do 3-*O*-angeloil ingenol (**11**) catalisada pela CAL-B.<sup>63</sup>

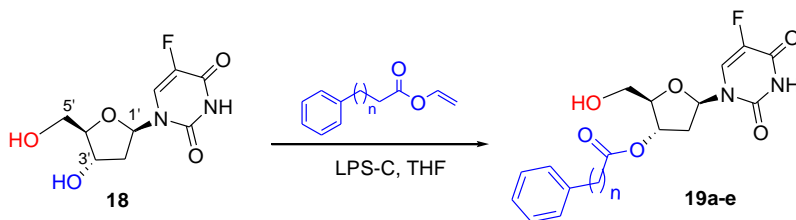
As lipases também têm sido extensivamente utilizadas para acilar seletivamente as hidroxilas primárias e secundárias de carboidratos e nucleosídeos ou ainda para hidrolizar seletivamente carboidratos/nucleosídeos previamente peracilados.<sup>64-69</sup>

Ishihara<sup>70</sup> *et al.* investigaram a regioselectividade da CAL-B na acilação do antioxidante arbutina (**13**), empregando os ácidos ferúlico (**14**) e  $\alpha$ -lipóico (**15**) como doadores acila. A arbutina foi, em ambos os casos, acilada seletivamente na hidroxila primária (C-6' do anel de glicose, em azul), obtendo-se o ferulato (**16**) e o lipolato (**17**) de arbutina com rendimentos de 57% (em 7 dias) e 75% (em 10 dias), respectivamente (**Figura 14**).



**Figura 14** – Acilação regioselectiva da arbutina (**13**) catalisada pela CAL-B.<sup>70</sup>

Li<sup>71</sup> *et al.* realizaram a síntese de ésteres 3'-arilalifáticos da floxuridina (**18**) catalisada pela lipase de *Burkholderia cepacia* imobilizada em cerâmica (LPS-C). Foram empregados como doadores acila cinco ésteres de vinila e os derivados 3'-acilados **19a-e** foram obtidos com boas conversões e excelentes regioselectividades, empregando THF como solvente (**Figura 15**).

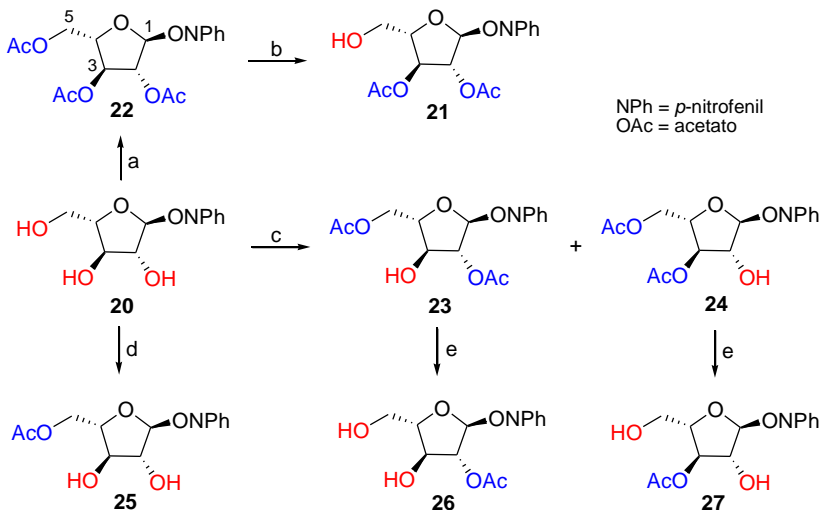


Derivado	n	Conversão (%), tempo	Regioselectividade (%)
<b>19a</b>	0	98, 82 h	85
<b>19b</b>	1	99, 7 h	90
<b>19c</b>	2	> 99, 4 h	93
<b>19d</b>	3	> 99, 2 h	99
<b>19e</b>	4	> 99, 6 h	99

**Figura 15** – Acilação regioselectiva da floxuridina (**18**) catalisada pela LPS-C.<sup>71</sup>

Mastihubová<sup>72</sup> *et al.* utilizaram lipases para preparar todos os derivados possíveis, mono e di-*O*-acetilados do *p*-nitrofenil- $\alpha$ -L-arabinofuranosídeo (**20**). O composto 2,3-di-*O*-acetato (**21**) foi obtido com 90% de rendimento por hidrólise do grupo acetil primário do per-*O*-acetilado-*p*-nitrofenil- $\alpha$ -L-arabinofuranosídeo (**22**) com as lipases de *Candida cylindracea* (LCC) ou de *Candida rugosa* (LAY). Os derivados 2,5- e 3,5-di-*O*-acetatos, (**23**) e (**24**) respectivamente, foram obtidos por acetilação de **20**, catalisada pela lipase de *Burkholderia cepacia* (LPS) em vários solventes orgânicos tais como tolueno, acetonitrila, cicloexano, álcool *terc*-butílico, THF e DMF. O 5-*O*-acetato (**25**) foi regioselectivamente preparado com 95% de rendimento através da acetilação de **20** catalisada pela lipase pancreática de porco (LPP).

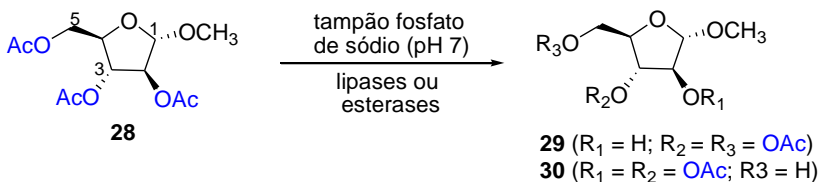
Os produtos monoacetilados nas posições 2 (**26**) e 3 (**27**) foram obtidos em duas etapas, di-*O*-acetilação de **20** catalisada por LPS, seguida por hidrólise do grupo acetil primário dos derivados diacetilados **23** e **24** por LCC ou AY. As reações de acetilação foram realizadas com acetato de vinila e as hidrólises em tampão fosfato de sódio e DMF (**Figura 16**).



**Figura 16** – Preparação de derivados do *p*-nitrofenil- $\alpha$ -L-arabinofuranosídeo (**20**) catalisada por lipases. *Reagentes e condições*: (a) anidrido acético em piridina (b) LCC ou LAY, DMF 10%, tampão fosfato de sódio 0,1 mol/L (pH 7), 37 °C; (c) LPS, acetato de vinila, solventes orgânicos, 37 °C; (d) LPP, acetato de vinila, THF, 40 °C; (e) LCC, DMF 10%, tampão fosfato de sódio 0,1 mol/L (pH 6), 37 °C.<sup>72</sup>

Jun<sup>73</sup> e seu grupo de pesquisa investigaram a regiosseletividade de lipases e esterases na hidrólise do triacetil-D-arabinofuranosídeo (**28**). As esterases de *Rhizopus oryzae* e de fígado de porco foram as mais reativas e seletivas na formação do produto 3,5-di-*O*-acetil-D-arabinofuranosídeo (**29**). O derivado diacetilado **29** também foi obtido quando a catálise foi realizada pelas lipases de *Rhizopus oryzae* (ROL) e LPP com conversões de 53 e 44%, respectivamente. Quando a lipase AY foi usada, o produto obtido majoritariamente foi o 2,3-di-*O*-acetil-D-arabinofuranosídeo (**30**) com conversão de 79%. O derivado 2,5-di-*O*-acetil-D-arabinofuranosídeo não foi obtido (**Figura 17**).





**Figura 17** – Hidrólise regioseletiva do acetil-D-arabinofuranosídeo (**28**) catalisada por hidrolases.<sup>73</sup>

Os trabalhos elencados neste subitem mostram que as lipases são potencialmente regioseletivas e que essa seletividade é dependente da fonte de enzima empregada, com destaque para a CAL-B em relação às demais lipases.

Devido à funcionalidade, os carboidratos constituem-se numa classe de compostos de extrema importância, seja na sua atividade natural em inúmeros processos vitais ou no uso como precursores para moléculas de interesse sintético. O próximo item fará uma abordagem com relação aos carboidratos, mostrando algumas aplicações em síntese orgânica e culminando com o exemplo específico da D-ribono-1,4-lactona, que foi particularmente o reagente explorado neste trabalho.

## 1.6 – Carboidratos

Os carboidratos são assim denominados pelo fato da fórmula geral de muitos deles ser C<sub>n</sub>(H<sub>2</sub>O)<sub>n</sub>, ou seja, carbono hidratado. São usualmente definidos como poli-hidroxi aldeídos e cetonas, ou substâncias cuja hidrólise produz estas estruturas. Os carboidratos simples são comumente conhecidos como açúcares ou sacarídeos (do latim *saccharum* e do grego *sakcharon*, açúcar).<sup>10, 74,75</sup>

Os açúcares possuem muitos grupos hidroxila, que podem agir tanto como doadores quanto aceptores de prótons, e possuem a capacidade de fazer ligações de hidrogênio, conferindo a esses compostos o sabor adocicado. Os denominados monossacarídeos são os carboidratos mais simples, incluindo açúcares de quatro, cinco e seis átomos de carbono. Os principais monossacarídeos responsáveis pelo sabor doce dos alimentos são a glicose, frutose e galactose. Os dissacarídeos e polissacarídeos são os carboidratos cuja hidrólise

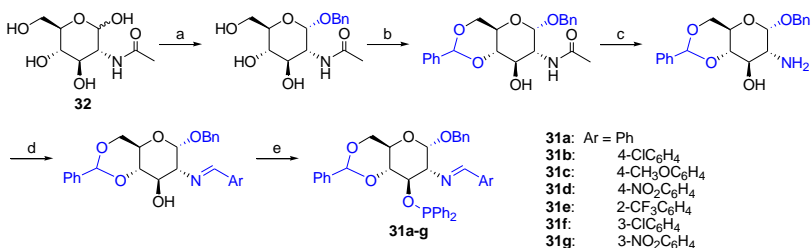
fornece dois ou mais monossacarídeos, como por exemplo a sacarose, lactose e celulose.<sup>10,74,75</sup>

Os carboidratos são constituintes essenciais de todos os organismos vivos e desempenham várias funções nas células, desde estruturais até como fonte substancial de energia metabólica.<sup>74,75</sup>

Em síntese orgânica, os carboidratos de baixa massa molar são precursores quirais importantes para a obtenção de moléculas com atividade biológica, principalmente devido ao baixo custo, pelo fato de serem obtidos com alta pureza e por sua abundância na natureza.<sup>76</sup>

Uma restrição no uso de carboidratos com fins sintéticos é a necessidade de protocolos de proteção e desproteção de grupos funcionais, devido a presença de vários grupos hidroxila com reatividade química similar nestas moléculas.<sup>77-79</sup>

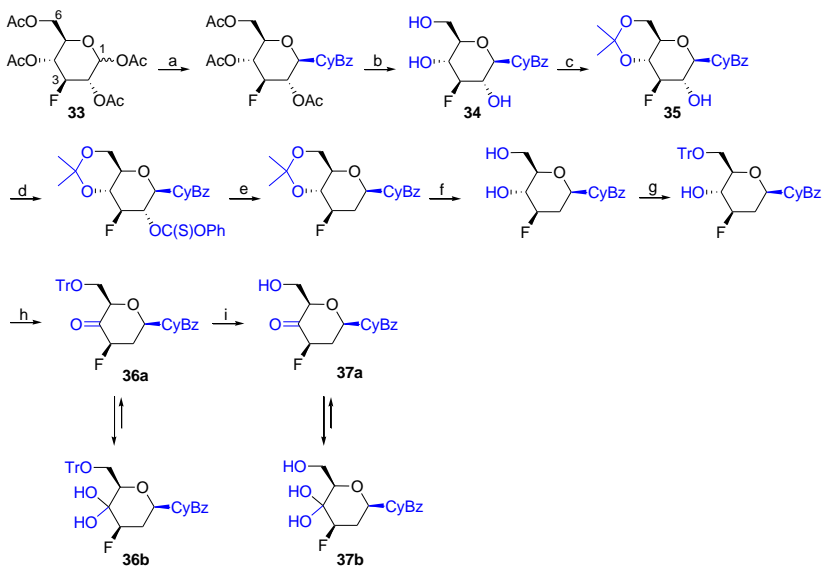
Shen<sup>80</sup> *et al.* utilizaram recentemente um procedimento padrão de síntese de uma série de ligantes derivados da glicosamina (**31a-g**), que foram posteriormente utilizados com sucesso em reações de alquilação alílica assimétrica catalisada por paládio. A rota sintética dos ligantes envolve cinco etapas a partir da *N*-acetilglucosamina (**32**), sendo que três destas incluem proteção das hidroxilas (etapas a e b) e desproteção do grupo amino (etapa c) (**Figura 18**).



**Figura 18** – Rota sintética dos ligantes derivados da glicosamina (**31a-g**). *Reagentes e condições:* (a) BnOH, H<sup>+</sup>; (b) PhCHO, ZnCl<sub>2</sub>; (c) KOH, EtOH; (d) ArCHO, CH<sub>3</sub>ONa-CH<sub>3</sub>OH, rend. 85-96%; (e) Ph<sub>2</sub>PCL, THF-Et<sub>3</sub>N, rend. 80-92%.<sup>80</sup>

Manta<sup>81</sup> *et al.* realizaram a síntese de análogos de dideoxifluorocetopiranosídeos partindo do derivado peracetilado da 3-deoxi-3-fluoro-D-glicopiranosose (**33**) e utilizando rotas sintéticas que possuem, entre outras reações, protocolos de proteção e desproteção.

A **Figura 19** mostra uma das rotas propostas pelos autores. O precursor **33** possui as quatro hidroxilas protegidas por grupos acetila. A hidroxila anomérica acetilada é substituída pela base nitrogenada citosina protegida com o grupo *N*<sup>4</sup>-benzoila (etapa a), e as outras três sofrem hidrólise básica (desproteção, etapa b). A reação do nucleosídeo desacetilado **34** com 2,2-dimetoxipropano gera o derivado isopropilideno **35**, no qual as hidroxilas 4 e 6 ficam protegidas, enquanto a hidroxila 2 está desprotegida, podendo atuar como nucleófilo na etapa d. Após a redução do carbono 2 (etapa e), o grupo isopropilideno é removido na etapa f, empregando o ácido trifluoroacético em meio de THF/H<sub>2</sub>O. Na etapa g há a proteção seletiva da hidroxila 6 primária com cloreto de trifenilmetila (tritila, Tr) e na etapa h ocorre a oxidação da hidroxila 4, cujo produto **36a** está em equilíbrio com o derivado alvo **36b**, di-hidroxilado no carbono 4. Finalmente, o produto **37a** da hidrólise do grupo protetor da hidroxila primária (etapa i) está em equilíbrio com outro derivado di-hidroxilado **37b**.



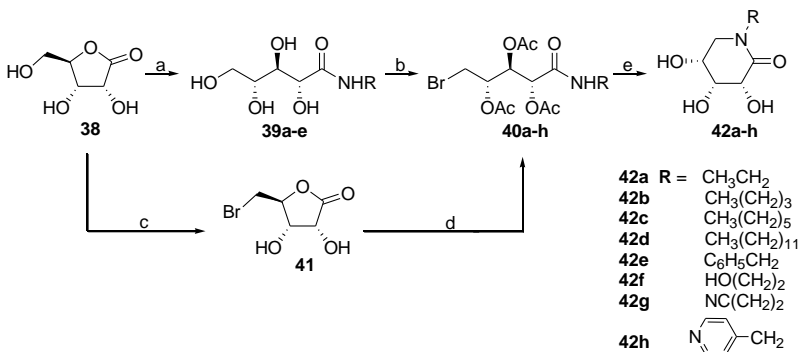
**Figura 19** – Rota sintética dos análogos de dideoxifluorocetopiranosídeos. *Reagentes e condições:* (a) citosina  $N^4$ -benzoila, hexametildisilazano (HMDS), sacarina,  $\text{CH}_3\text{CN}$ , trimetilsilil trifluorometanossulfonato (TMSOTf), rend. 68%; (b) EtOH, piridina, NaOH, resina Amberlite IR-120 ( $\text{H}^+$ ), rend. 90%; (c) 2,2-dimetoxipropano, ácido *p*-toluenossulfônico, DMF, rend. 80%; (d)  $\text{PhOC(S)Cl}$ , DMAP,  $\text{CH}_3\text{CN}$ , rend. 70%; (e)  $\text{Bu}_3\text{SnH}$ , 1,1-azobis(cicloexano-1-carbonitrila), tolueno, rend. 60%; (f) TFA,  $\text{THF}/\text{H}_2\text{O}$ , rend. 72%; (g) piridina, cloreto de trifenilmetila, DMAP, rend. 65%; (h) PDC,  $\text{Ac}_2\text{O}$ ,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , rend. 50% (mistura de **36a** e **36b**); (i) ácido fórmico / $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (1:1), rend. 52% (mistura de **37a** e **37b**).<sup>81</sup>

Salienta-se que as duas rotas sintéticas citadas acima requerem um número excessivo de reagentes, solventes e tempo, sobretudo pela necessidade de etapas de proteção e desproteção das hidroxilas. Além disso, apesar dos rendimentos bons a moderados obtidos em cada etapa há também uma queda natural e considerável nos rendimentos globais dos processos.

Reações de hidrólise, esterificação ou transesterificação catalisadas por enzimas, principalmente as lipases, são particularmente empregadas em processos que envolvem protocolos de proteção/desproteção seletivos, como descrito no item 1.5.1. Salienta-se que estas transformações biocatalisadas de carboidratos não são tão recentes, destacando os trabalhos do grupo de pesquisa de Klibanov na década de 80.<sup>82-84</sup>

A utilização de lactonas derivadas de açúcares pode também ser uma boa estratégia para transformações envolvendo carboidratos, pois estes têm seus centros anoméricos protegidos, no seu estado oxidado. A D-ribono-1,4-lactona (**38**) está disponível comercialmente, estando entre as aldonolactonas mais utilizadas em síntese orgânica.<sup>85-98</sup>

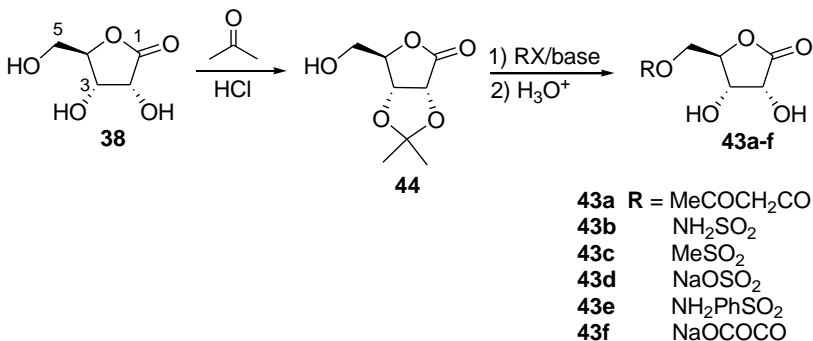
Aldonolactamas têm sido bastante exploradas por serem inibidores potentes da enzima glicosidase e apresentarem propriedades antidiabetes, anticâncer e anti-HIV. Falentin-Daudre<sup>95</sup> *et al.* relataram recentemente duas estratégias eficientes para a síntese de *N*-alquil-3,4,5-triidroxipiperidin-2-onas como novos análogos de aza-açúcares utilizando a lactona **38** como reagente de partida (**Figura 20**).



**Figura 20** – Rotas sintéticas para obtenção das *N*-alquil-D-ribonamidas (**42a-h**). *Reagentes e condições:* (a) RNH<sub>2</sub>/DMF; (b) (i) CH<sub>3</sub>COBr/Dioxano, (ii) Ac<sub>2</sub>O/piridina; (c) SOBr<sub>2</sub>/DMF (1.1 equiv)/DMF; (d) (i) RNH<sub>2</sub> (1 equiv) /DMF, (ii) Ac<sub>2</sub>O/piridina; (e) (i) NaH/DMF, (ii) MeONa/MeOH.<sup>95</sup>

Todas as reações foram realizadas à temperatura ambiente. Primeiramente reagiu-se a lactona **38** com alquilaminas em DMF obtendo-se quantitativamente as *N*-alquil-D-ribonamidas **39a-e**. A bromação das amidas **39** com os brometos de acetila apropriados seguida da acetilação das hidroxilas resultaram na formação dos derivados **40a-e** com rendimentos moderados (40-54%). Os derivados **40f-h** foram obtidos empregando outra metodologia, na qual a lactona **38** foi tratada com  $\text{SOBr}_2$  em DMF obtendo-se o derivado 5-bromo-5-deoxi-D-ribono-1,4-lactona (**41**), que em seguida foi tratado com as aminas correspondentes e os produtos obtidos foram a seguir acetilados. Finalmente, a lactamização (ciclização) dos derivados **40a-h** ocorreu *via* reação com hidreto de sódio (NaH) em DMF, seguida por desacetilação via metanólise com metóxido de sódio em metanol (MeONa/MeOH), obtendo-se as *N*-alquil-D-ribonamidas **42a-h**.

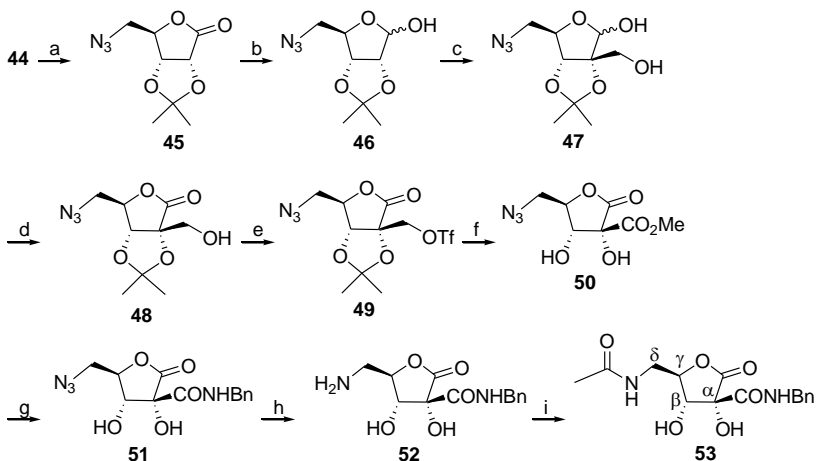
Bigham<sup>96</sup> *et al.* prepararam uma série de análogos aos substratos ou intermediários da reação catalisada pela arabinose 5-fosfato (A5P) isomerase, com o intuito de testar estes compostos como inibidores desta enzima, que é responsável pela produção de lipopolissacarídeo (componente essencial da membrana de bactérias Gram-negativas). Na síntese de derivados D-ribonolactonas 5-*O*-substituídos (**43a-f**), inicialmente foi realizada a proteção da D-ribonolactona **38** com acetona em meio ácido, formando o composto 2,3-isopropilideno-ribono-1,4-lactona (**44**). Em seguida foi feita a derivatização com vários reagentes em condições básicas (piridina ou trietilamina/ $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ), e finalmente a remoção do grupo protetor em meio ácido (**Figura 21**).



**Figura 21** – Síntese de derivados de ribonolactonas 5-*O*-substituídos.<sup>96</sup>

Aminoácidos de açúcares (*sugar aminoacids*, SAAs) constituem uma classe importante de peptidomiméticos como blocos de construção em química combinatória e como uma classe ampla de foldâmeros, devido a sua predisposição em induzir novas estruturas secundárias. Embora  $\delta$ -SAAs de piranose e oxetanose tenham sido amplamente estudados,  $\delta$ -SAAs de furanose, contendo o anel tetraidrofurano (THF) tem apresentado atividade biológica significativa. Simone<sup>97</sup> *et al.* utilizaram a 2,3-isopropilideno-D-ribonolactona **44** como precursor na preparação dos análogos de  $\delta$ -aminoácidos de açúcares de tetraidrofurano ramificados (*trans*-THF  $\delta$ -SAA) **50-53** (Figura 22).

Primeiramente, a hidroxila primária do derivado **44** foi esterificada com anidrido triflico em diclorometano na presença de piridina, seguida de tratamento com azida de sódio em acetato de etila, obtendo-se a azidolactona **45**. A redução de **45** com hidreto de diisobutilalumínio (DIBAL) em diclorometano resultou na formação do composto **46**, que foi submetida a uma eficiente condensação aldólica cruzada com formaldeído aquoso, na presença de carbonato de potássio, gerando o lactol **47**. A oxidação do lactol **47** com bromo aquoso na presença de carbonato de bário gerou a azido lactona **48**. O triflato **49** foi obtido através da esterificação da hidroxila primária do derivado **48** com anidrido triflico e piridina. A reação de **49** com cloreto de hidrogênio em metanol além de remover o grupo protetor, promoveu também a formação do azido éster **50**. A benzilamida **51** foi obtida através do tratamento do composto **50** com benzilamina, e a amina **52** a partir da sua hidrogenação em 1,4-dioxano, na presença de paládio sobre o carbono. Finalmente, a *bis* amida **53** foi obtida através da peracetilação de **52** com anidrido acético em piridina, seguida da metanólise dos grupamentos ésteres.



Bn = PhCH<sub>2</sub>; Tf = CF<sub>3</sub>SO<sub>2</sub>

**Figura 22** – Rota de síntese dos *trans*-THF δ-SAA **50-53**. *Reagentes e condições*: (a) (1) Tf<sub>2</sub>O, piridina, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>; (2) NaN<sub>3</sub>, EtOAc, rend. 77%; (b) DIBAL, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, -78 °C, rend. 93%; (c) CH<sub>2</sub>O, K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, H<sub>2</sub>O, rend. 92%; (d) Br<sub>2</sub>, BaCO<sub>3</sub>, H<sub>2</sub>O, rend. 92%; (e) Tf<sub>2</sub>O, piridina, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, rend. 100%; (f) HCl, MeOH, rend. 77%; (g) BnNH<sub>2</sub>, 120 °C, rend. 83%; (h) H<sub>2</sub>, 10% Pd/C, dioxano, rend. 91%; (i) (1) Ac<sub>2</sub>O, piridina; (2) K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, MeOH, rend. 82%.<sup>97</sup>

Os autores realizaram também a síntese dos epímeros *cis*-δ-aminoácidos tetrahidrofuranofuranoses (*cis*-THF δ-SAA), partindo da 2,3-isopropilidenolixono-1,4-lactona e empregando uma rota similar à descrita para a lactona protegida **44** como material de partida.

Baseando-se nos resultados apresentadas nos últimos ítems, observa-se que a preparação de derivados de carboidratos e nucleosídeos acilados seletivamente torna-se bastante atrativa do ponto de vista da síntese orgânica, por tratar-se de precursores para muitas outras moléculas de interesse. Para esse fim, as lipases são catalisadores que conduzem a ótimos resultados com boas conversões e excelentes regiosseletividades.

Portanto, esta tese visa à utilização de lipases de diferentes procedências para a preparação regiosseletiva de derivados acilados da γ-lactona **38**, a otimização dos parâmetros envolvidos nas reações, e o desenvolvimento de métodos de análise para a caracterização e quantificação dos diferentes produtos obtidos.



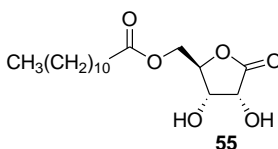
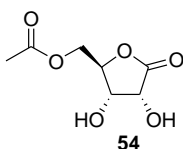
### 3 – OBJETIVOS

#### 3.1 – Objetivo geral

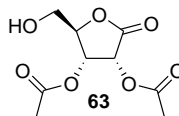
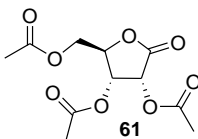
O presente trabalho teve por objetivo o desenvolvimento de metodologias ambientalmente sustentáveis de acilação regioseletiva da D-ribono-1,4-lactona (**38**) empregando lipases e micélios como biocatalisadores.

#### 3.2 – Objetivos e metas

- Preparar derivados acilados da lactona **38** empregando reações de acilação catalisadas por biocatalisadores (lipases, proteases e micélios);
- Sintetizar os derivados 5-*O*-acetil-D-ribonolactona (**54**) e 5-*O*-dodecanoil-D-ribonolactona (**55**) a partir de reações de acilação regioseletiva da lactona **38** catalisada pela CAL-B, empregando acetato de vinila e ácido dodecanóico, respectivamente, como doadores acila;



- Preparar o 2,3-*O*-diacetil-D-ribonolactona **63** *via* etanólise do derivado triacetilado 2,3,5-*O*-D-ribono-1,4-lactona (**61**) catalisada pela CAL-B;



- Avaliar a eficiência das lipases de *Candida antarctica* imobilizada em resina aniônica - CAL-B, de *Burkholderia cepacia* livre - LPS, de *Burkholderia cepacia* imobilizada em cerâmica - LPS-C, de *Burkholderia cepacia* imobilizada em terra diatomácea - LPS-D, de *Candida rugosa* - LCR, de *Thermomyces lanuginosus* - TL-IM, de *Pseudomonas fluorescens* - AK, de *Rhizopus oryzae* - F-AP15, de *Aspergillus niger* - LAN e de *Rhizopus oligosporus* - LRO, da protease de *Aspergillus oryzae* e dos micélios UEA\_53 e UEA\_115 com relação à atividade e regioselectividade nas reações de acilação da lactona **38** com acetato de vinila ou ácido dodecanóico;
- Avaliar o efeito da quantidade e do tipo de doador de grupo acila (ácidos carboxílicos, aminoácidos, ésteres e anidridos), do uso de diferentes solventes orgânicos (acetonitrila, acetona, THF, dioxano e DMF) e da quantidade de biocatalisador em reações de acilação da lactona **38**;
- Realizar estudos da reutilização da CAL-B em reações de acilação da lactona **38**, empregando acetato de vinila e os ácidos decanóico e dodecanóico como doadores acila;
- Quantificar as conversões (%) aos derivados acilados da lactona **38**, empregando técnicas de RMN-<sup>1</sup>H, titulação volumétrica ou UV-Vis;
- Identificar e caracterizar os derivados acilados da lactona **38** utilizando técnicas de RMN-<sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C; IV, CHN, raios X e ponto de fusão;
- Comparar os resultados obtidos com outros reportados na literatura recente.

## 4 – PARTE EXPERIMENTAL

### 4.1 – Materiais (reagentes, solventes e enzimas)

Todos os materiais utilizados nos procedimentos experimentais são de alto grau de pureza, sendo adquiridos de fontes comerciais (com algumas exceções). As procedências e purezas dos materiais mais importantes, assim como as atividades das enzimas utilizadas, foram as seguintes:

- ✓ **Sigma-Aldrich:** D-ribono-1,4-lactona **38** (97%); lipase de *Candida rugosa* (CRL,  $\geq 700$  u/mg sólido<sup>ii</sup>); acetato e dodecanoato de *p*-nitrofenila; *p*-nitrofenol; ácidos hexanóico, octanóico, decanóico, octadecanóico, 4-pentenóico, benzóico, ( $\pm$ )-citronélico, D,L-mandélico e linoléico; acetona grau analítico (PA); e os solventes deuterados clorofórmio (CDCl<sub>3</sub>), água (D<sub>2</sub>O) e dimetilsulfóxido (DMSO-*d*<sub>6</sub>);
- ✓ **Merck:** glicina, D,L-alanina, L-cisteína e ácido benzóico;
- ✓ **Vetec:** ácidos butanóico, dodecanóico, hexadecanóico, gálico, fenilacético e oléico; hidróxido de sódio, bicarbonato de sódio, carbonato de potássio e anidrido acético;
- ✓ **Tedia:** acetonitrila grau cromatográfico (CLAE), tratada com CaH<sub>2</sub> de acordo com o procedimento citado na literatura,<sup>98</sup>
- ✓ **Carlo Erba:** acetonitrila grau cromatográfico (CLAE, tratada com CaH<sub>2</sub>)<sup>98</sup> e *N,N*-dimetilformamida (DMF) grau espectroscópico (UV e IR);
- ✓ **F. Maia:** tetraidrofurano (THF) grau PA;
- ✓ **Vetec:** 1,4-dioxano grau PA;
- ✓ **Fluka:** ácido tetradecanóico e acetatos de etila, isopropenila e vinila;
- ✓ **Reagen:** ácido acético e ácido propiônico;
- ✓ **Amano:** lipases de *Burkholderia cepacia* (LPS livre, 30.000 u/g<sup>iii</sup>; LPS-C “Amano” I imobilizada em cerâmica, 1.638 U/g<sup>iv</sup>;

---

<sup>ii</sup> u/mg sólido é a quantidade necessária para liberar 1,0  $\mu$ mol/h de ácidos graxos de um triglicerídeo, a pH 7,2 e 37 °C.

<sup>iii</sup> u/g é a quantidade de enzima necessária para liberar 1,0  $\mu$ mol/min de ácidos graxos do óleo de oliva, a pH 7,0 e 30 °C.

<sup>iv</sup> U/g é a quantidade de lipase que produz 1,0  $\mu$ mol/min de acetato de 1-feniletila a partir da transesterificação do álcool 1-feniletílico com acetato de vinila, a 25 °C.

LPS-D “Amano” I immobilizada em terra diatomácea, 7,44 U/g<sup>c</sup>), *Candida rugosa* (LCR, 30.000 u/g<sup>b</sup>); *Pseudomonas fluorescens* (AK “Amano” 20, 26.600 U/g<sup>c</sup>) e *Rhizopus oryzae* (F-AP15, 150.000 u/g<sup>b</sup>); protease de *Aspergillus oryzae* (Protease A “Amano” 2, 20.000 u/g<sup>v</sup>);

- ✓ **Novozymes:** lipases de *Candida antarctica* immobilizada em resina aniônica (CAL-B, Novozym 435, 10.000 PLU<sup>vi</sup>), de *Thermomyces langinosus* (Lipozyme TL-IM, 250 IUN/g<sup>vii</sup>) e de *Rhizomucor miehei* (Lipozyme RM-IM, 5-6 BAUN/g<sup>viii</sup>).

As lipases de *Aspergillus niger* (LAN, 18,2 U/mL<sup>ix</sup>) e de *Rhizopus oligosporus* (LRO, 14,9 U/mL<sup>h</sup>), isoladas de um microorganismo de solo da região de Bueno Brandão (MG), foram purificadas, identificadas e gentilmente doadas pela Profa. Dra. Patrícia Carvalho da Universidade de São Francisco (USF), Bragança-SP.

Foram também usados micélios oriundos de fungos isolados de plantas amazônicas (micélios UEA\_53 e UEA\_115), que foram gentilmente fornecidos pela Profa. Dra. Sandra Patrícia Zanotto do grupo de pesquisa do Laboratório de Bioorgânica da Universidade do Estado do Amazonas (UEA), Manaus-AM.

---

<sup>v</sup> A ficha técnica desta enzima omite o ensaio de determinação da sua atividade.

<sup>vi</sup> PLU é uma unidade relacionada à síntese de ésteres, expressa em unidades de laurato de propila por grama, mas a reação utilizada para determinação de sua atividade é omitida na sua ficha técnica.

<sup>vii</sup> IUN/g é a unidade relacionada à formação de 0,01% em massa de triestearina por minuto, na interesterificação de uma mistura de óleo de soja totalmente hidrogenado com óleo de soja não hidrogenado (27/73% em massa), a 70 °C.

<sup>viii</sup> BAUN/g é a atividade baseada na acidólise de óleo de girassol rico em ácido oléico, empregando ácido decanóico. A velocidade da reação é determinada pela medida da quantidade de ácido decanóico incorporada às posições 1 e 3 dos triacilgliceróis do óleo de girassol.

<sup>ix</sup> U/mL é a quantidade de lipase que produz 1,0 μmol/min de ácidos graxos na hidrólise do óleo de oliva, a pH 6,0 e 40 °C, em 1 h.

## 4.2 – Equipamentos

As reações foram realizadas em um agitador orbital Certomat MO, ou em banho termostatizado tipo Dubnoff (Technal TE-053/TE-093).

Os espectros de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN- $^1\text{H}$ ) e de carbono (RMN- $^{13}\text{C}$ ) foram registrados a 400 e 100 MHz, respectivamente, no espectrômetro Varian 400 Mercury Plus, ou a 200 e 50 MHz, respectivamente, no espectrômetro Bruker AC, usando DMSO- $d_6$  e D $_2$ O como solventes e tetrametilsilano (TMS) como referência interna. As constantes de acoplamento (J) foram medidas em Hertz (Hz) e os sinais caracterizados como singletos (s), dubletos (d), tripletos (t), duplos dubletos (dd) e multipletos (m).

Os espectros de infravermelho (IV) foram realizados em um espectrofotômetro ABB Bomeh FTLA 2000-100 com sistema de registro computadorizado, empregando pastilhas de KBr para as amostras sólidas e filmes para as líquidas, na região de 4000 a 400  $\text{cm}^{-1}$ .

As análises elementares (CHN) foram feitas no instrumento Carlo Erba CHNS EA-1110.

As análises cristalográficas foram coletadas em um difratômetro automático Enraf-Nonius Cad-4 para monocristais, equipado com tubo de molibdênio e monocromador de grafite, e foram realizadas pelo Prof. Dr. Adailton J. Bortoluzzi do Depto. de Química da UFSC.

Os experimentos de absorção no ultravioletavísível (UV-Vis) foram efetuados em um espectrofotômetro UV-Vis Hewlett Packard 8452A, cedido pelo Prof. Dr. Josiel B. Domingos do Laboratório de Catálise Biomimética do Depto. de Química da UFSC.

A determinação do ponto de fusão dos compostos sólidos foi realizada em um aparelho da Microquímica APF301. Os pontos de fusão não foram corrigidos.

## 4.3 – Métodos de quantificação dos derivados 5-monoacilados de 38

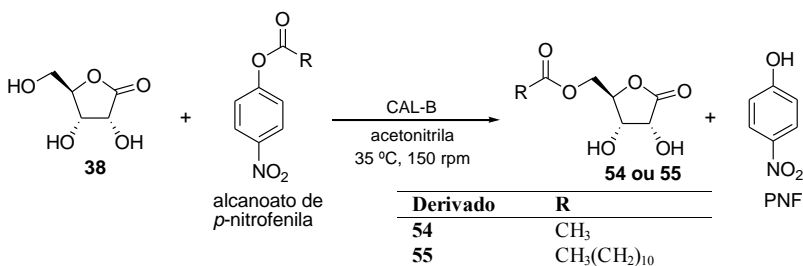
As conversões (%) aos compostos obtidos neste trabalho foram determinadas por RMN- $^1\text{H}$ , espectrometria no UV-Vis, ou titulação volumétrica. Os procedimentos experimentais que empregam análises de RMN- $^1\text{H}$  para cálculo de conversão serão abordados no **Capítulo 5 (Resultados e Discussão)**, e os demais nos próximos subitens.

### 4.3.1 – Quantificação dos derivados 5-monoacilados da lactona 38 por absorção no UV-Vis

#### 4.3.1.1 – Preparação da curva analítica de calibração de *p*-nitrofenolato

Foram preparados 100 mL de uma solução de *p*-nitrofenol (PNF, 0,010 mol/L) dissolvendo-se exatamente 139 mg (1,00 mmol) em tampão de McIlvaine (fosfato dissódico 0,20 mol/L / ácido cítrico 0,10 mol/L, pH 7,46).<sup>99</sup> Neste pH parte do *p*-nitrofenol está na forma do correspondente ânion *p*-nitrofenolato. A partir desta solução, foram efetuadas diluições variando as concentrações de  $1,00 \times 10^{-5}$  a  $1,00 \times 10^{-4}$  mol/L. As absorvâncias das soluções foram medidas no espectrofotômetro de UV-Vis a 410 nm, obedecendo a lei de Lambert-Beer, ou seja, limitando as leituras de absorvância à faixa entre 0 e 1. A curva de absorvância *versus* concentração de *p*-nitrofenolato foi obtida com excelente coeficiente de correlação ( $R = 0,998$ ), utilizando o programa Origin 7.

#### 4.3.1.2 – Acilação da lactona 38 com alcanoatos de *p*-nitrofenila



A lactona **38** (29,6 mg, 0,20 mmol) e acetato de *p*-nitrofenila (APNF, 36,2-109 mg; 0,20-0,60 mmol) ou dodecanoato de *p*-nitrofenila (DPNF, 96,4 mg, 0,30 mmol) foram adicionados a um erlenmeyer contendo 20,0 mL de acetonitrila. Após a adição de 10,0 mg de CAL-B, a reação foi agitada a 35 °C e 150 rpm. Aliquotas de 250 µL foram retiradas periodicamente (0-24 h), utilizando micropipeta de 200-1000 µL, e diluídas em balões volumétricos de 5,00, 10,0 ou 25,0 mL com tampão de McIlvaine (pH 7,46). As soluções resultantes foram

colocadas em celas de quartzo de 3,0 mL, com caminho ótico de 1,0 cm, e as absorbâncias foram medidas a 410 nm, obedecendo à lei de Lambert-Beer ( $0 < \text{Abs.} < 1$ ). As análises foram efetuadas em triplicata.

As concentrações de PNF nas alíquotas, e conseqüentemente as de alcanato de *p*-nitrofenila no meio reacional, foram determinadas multiplicando-se os valores de concentração das soluções diluídas (determinadas através da equação da reta da curva analítica de calibração) pelo fator de diluição.

As conversões (%) foram calculadas utilizando a **Equação 1**, onde  $M_1$  é a concentração inicial do APNF e  $M_2$  é a concentração do APNF no momento da retirada da alíquota. A formação somente dos derivados 5-monoacilados foi comprovada por RMN- $^1\text{H}$ , conforme descrito nos subitens 5.1.2 e 5.2.1. Foram também realizados estudos na ausência da lactona **38**, com e sem adição de peneira molecular, para avaliar a possível da hidrólise do APNF.

$$\text{Conv. (\%)} = [(M_1 - M_2)/M_1] \times 100 \quad \text{Eq. 1}$$

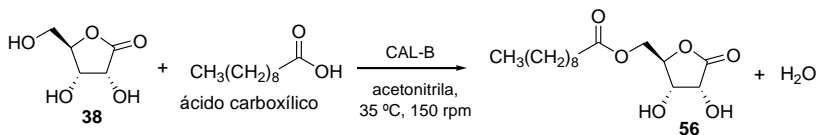
O método descrito limita-se a reações nas quais a estequiometria entre o doador de grupo acila e a lactona **38** é 1:1, e que os doadores acila tenham como grupo de saída o PNF. Os solventes devem estar isentos de água para evitar reações de hidrólise dos alcanatos de *p*-nitrofenila.

#### **4.3.2 – Quantificação dos derivados 5-monoacilados da lactona 38 por titulação volumétrica**

##### **4.3.2.1 – Preparação e padronização do titulante KOH 0,010 mol/L**

Uma solução de KOH 0,010 mol/L foi preparada dissolvendo-se 0,560 g de KOH em 1,00 L de água destilada. A solução foi padronizada por titulação com o padrão primário ftalato ácido de potássio (*o*-C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>(COOH)COOK) 0,100 mol/L, utilizando fenolftaleína como indicador.<sup>99</sup> Foram feitas curvas de calibração dos ácidos empregados (0-0,080 mol/L) *versus* volume gasto de titulante, sendo essas obtidas com excelentes coeficientes de correlação ( $1 > R > 0,994$ ).

### 4.3.2.2 – Acilação da lactona **38** com o ácido decanóico



Em um frasco reacional contendo 25,0 mL de acetonitrila, acetona, ou clorofórmio foram adicionados a lactona **38** (296 mg, 2,00 mmol) e ácido decanóico (345 mg, 2,00 mmol). A reação foi iniciada com a adição da CAL-B (25,0, 75,0 ou 100 mg). Os sistemas foram agitados à temperatura ambiente (35 °C) e 150 rpm, com ou sem adição de peneira molecular. As conversões nos respectivos ésteres, em função do tempo, foram quantificadas por titulação volumétrica.

Aliquotas de 1,00 mL foram periodicamente (0-24 h) retiradas do meio reacional, utilizando micropipeta de 500-5000  $\mu\text{L}$ . A acetonitrila foi evaporada e o resíduo remanescente foi diluído em 10,0 mL de etanol 95%, em um erlenmeyer de 25 mL. Foram adicionadas 2-3 gotas de fenolftaleína e a solução foi titulada com KOH 0,010 mol/L. Os volumes gastos de titulante (análises em triplicata) foram utilizados para calcular a concentração de ácido remanescente na solução e conseqüentemente no meio reacional. Estes cálculos foram realizados empregando a equação de reta (calculada pelo programa Origin 7.0) obtida do gráfico de concentração do ácido carboxílico a ser analisado (0-0,08 mol/L) *versus* volume gasto de KOH 0,010 mol/L.

Os cálculos de conversão (%) foram efetuados empregando a **Equação 2**, onde  $M_3$  é a concentração inicial do ácido carboxílico na reação e  $M_4$  é a concentração do ácido no momento da retirada da alíquota.

$$\text{Conv. (\%)} = [(M_3 - M_4)/M_3] \times 100 \quad \text{Eq. 2}$$

Análises de RMN- $^1\text{H}$  foram realizadas, conforme item 5.2.1, para comprovar a formação apenas dos produtos monoacilados na posição 5 do anel da lactona e justificar o uso do método de quantificação por titulação.



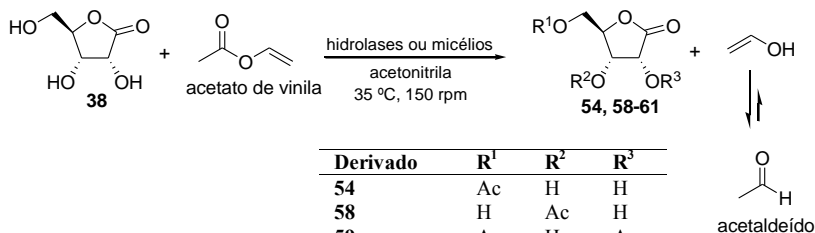
Este método limita-se ao emprego apenas de ácidos carboxílicos como doadores acila, e para as reações nas quais a estequiometria entre a lactona **38** e o ácido é 1:1.

#### 4.4 – Acetilação da lactona **38** catalisada por hidrolases ou micélios

Todas as reações de acetilação da lactona **38** foram quantificadas por RMN-<sup>1</sup>H, conforme subitem 5.1.2, exceto no procedimento do subitem 4.3.1, cujas quantificações foram realizadas por espectroscopia no UV-Vis.

Os procedimentos experimentais de acetilação de **38** serão descritos nos próximos subitens.

##### 4.4.1 – Avaliação de biocatalisadores na acetilação de **38** com acetato de vinila



Derivado	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	R <sup>3</sup>
<b>54</b>	Ac	H	H
<b>58</b>	H	Ac	H
<b>59</b>	Ac	H	Ac
<b>60</b>	Ac	Ac	H
<b>61</b>	Ac	Ac	Ac

Em uma solução contendo a lactona **38** (74,0 mg, 0,50 mmol) e acetato de vinila (0,140 mL, 1,50 mmol), dissolvidos em 10,0 mL de acetonitrila tratada, foi adicionado o biocatalisador selecionado (lipase, protease ou micélio). A reação foi incubada em um agitador orbital a 35 °C e 150 rpm. Alíquotas de 1,0 mL foram retiradas periodicamente (6, 24, 48 e 72 h), utilizando micropipeta de 500-5000 µL, a acetonitrila evaporada e as conversões (%) determinadas por RMN-<sup>1</sup>H.

Os biocatalisadores empregados foram as lipases de *Candida antarctica* imobilizada em resina aniônica - CAL-B (10,0 mg), de *Burkholderia cepacia* livre - LPS (10,0 mg), de *Burkholderia cepacia* imobilizada em cerâmica - LPS-C (10,0 e 60,0 mg), de *Burkholderia*

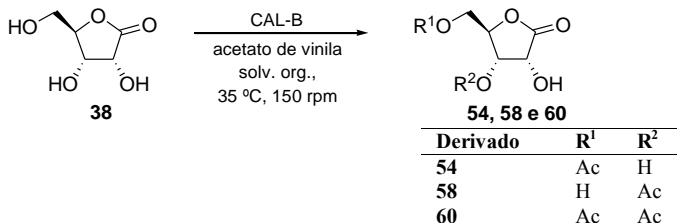
*cepacia* imobilizada em terra diatomácea - LPS-D (10,0 e 40,0 mg), de *Candida rugosa* - LCR (10,0 mg), de *Thermomyces lanuginosus* - TL-IM (10,0 mg), de *Pseudomonas fluorescens* - AK (10,0 mg), de *Rhizopus oryzae* - F-AP15 (10,0 mg), de *Aspergillus niger* - LAN (10,0 mg) e de *Rhizopus oligosporus* - LRO (10,0 mg), além da protease de *Aspergillus oryzae* (10,0 mg) e dos micélios UEA\_53 (10,0 mg) e UEA\_115 (10,0 mg).

Foram também efetuados estudos, nas mesmas condições experimentais, empregando misturas de CAL-B e LPS-C e CAL-B e AK variando a quantidade de cada enzima, conforme **Tabela 2**. O emprego simultâneo de dois ou mais biocatalisadores na mesma reação é denominado “coquetel enzimático”.<sup>21</sup>

**Tabela 2** – Misturas de lipases usadas na acetilação de **38**.

Mistura de lipases	Massa (mg)		
	CAL-B	LPS-C	AK
CAL-B + LPS-C	2,00	8,00	-
	8,00	2,00	-
	10,0	60,0	-
CAL-B + AK	10,0	-	70,0

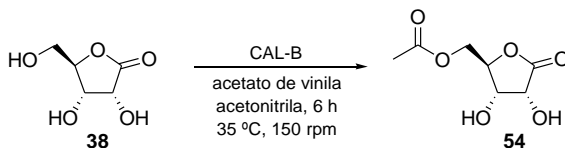
#### 4.4.2 – Efeito do solvente orgânico na acetilação de **38** com acetato de vinila



CAL-B (10,0 mg) foi adicionada a uma solução contendo a lactona **38** (74,0 mg, 0,50 mmol) e acetato de vinila (0,140 mL, 1,50 mmol) em 10,0 mL de solvente orgânico. A reação foi incubada em um agitador orbital a 35 °C e 150 rpm por 6 h, e foram retiradas alíquotas de 1,00 mL, utilizando micropipeta de 500-5000 µL, para a determinação da conversão (%). Os solventes utilizados foram acetonitrila, acetona, THF, dioxano e DMF.

Adicionalmente, a reação foi realizada nas mesmas condições citadas acima, empregando-se 10,0 mL de acetonitrila tratada como solvente, e também acetonitrila (10,0 mL) com a adição de água (27,0 µL, 1,50 mmol). Estes dois sistemas foram monitorados em função do tempo, sendo retiradas alíquotas de 1,00 mL, utilizando micropipeta de 500-5000 µL, no intervalo de 1 a 24 h para a determinação das conversões (%) por RMN-<sup>1</sup>H.

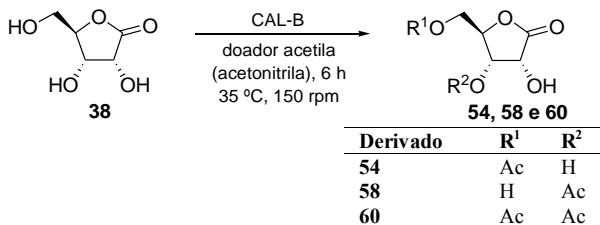
#### 4.4.3 – Influência da massa da CAL-B na acetilação de **38** com acetato de vinila



Diferentes quantidades de CAL-B (0-50 mg, 0-500 unidades) foram adicionadas a frascos reacionais contendo a lactona **38** (74,0 mg, 0,5 mmol) e acetato de vinila (0,14 mL, 1,5 mmol) dissolvidos em 10,0

mL de acetonitrila tratada. A reação foi agitada por 6 h, a 150 rpm e 35 °C. Alíquotas de 1,0 mL foram retiradas, utilizando micropipeta de 500-5000  $\mu$ L, o solvente evaporado e as conversões (%) determinadas por RMN-<sup>1</sup>H.

#### 4.4.4 – Influência da quantidade e tipo de doador de grupo acetila na acetilação de **38**



A um frasco reacional contendo 10,0 mL de acetonitrila tratada, foram adicionados a lactona **38** (74,0 mg, 0,50 mmol) e 1,50 mmol do doador de grupo acetila. A reação foi iniciada com a adição de 10,0 mg de CAL-B. O sistema foi agitado por 6 h a 35 °C e 150 rpm, e as alíquotas foram submetidas aos cálculos de conversão (%) por RMN-<sup>1</sup>H.

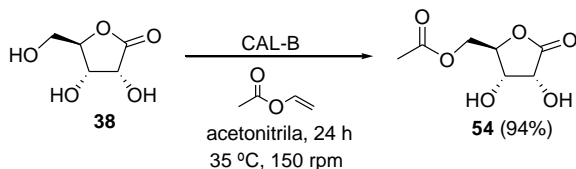
Este procedimento também foi realizado empregando 100 mmol (200 equiv.) dos doadores acetila na ausência de acetonitrila, nas mesmas condições acima.

A **Tabela 3** apresenta os doadores acetila utilizados neste estudo, com seus respectivos volumes em função das razões molares entre doador de grupo acetila e lactona **38**.

**Tabela 3** – Doadores acetila usados na acetilação de **38** catalisada por CAL-B.

Doador de grupo acetila	Volume (mL)	
	3:1	200:1
acetato de vinila	0,140	9,00
acetato de isopropenila	0,160	11,0
acetato de etila	0,150	10,0
anidrido acético	0,140	9,40
ácido acetic	0,080	6,00

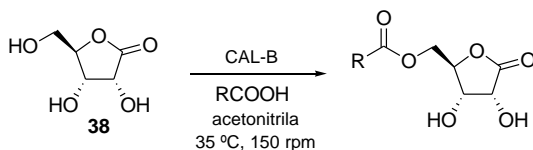
#### 4.4.5 – Síntese, purificação e caracterização da 5-*O*-acetil-D-ribonolactona (**54**)



A uma solução contendo a lactona **38** (74,0 mg, 0,50 mmol) e acetato de vinila (0,140 mL, 1,50 mmol) em 10,0 mL de acetonitrila tratada, foi adicionada a CAL-B (10,0 mg). A mistura reacional foi agitada a 150 rpm, a 35 °C durante 24 h. A CAL-B foi filtrada, o solvente foi evaporado e o sólido branco e amorfo obtido foi recristalizado em acetona. O produto recristalizado **54** foi também analisado por difração de raios X, e os dados cristalográficos estão apresentados no **Anexo 1**. Rendimento de 94%; pf. 140-143 °C (lit.<sup>100</sup> 148 °C); IV: 3490, 3302, 1755, 1750, 1472 e 1412 cm<sup>-1</sup>; RMN-<sup>1</sup>H (DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 2,03 (s, 3H), 4,10-4,17 (m, 2H), 4,24 (dd, 3,6 Hz, 12,4 Hz, 1H), 4,38-4,43 (m, 2H), 5,57 (d, 4,0 Hz, 1H, troca com D<sub>2</sub>O), 5,87 (d, 7,6 Hz, 1H, troca com D<sub>2</sub>O); RMN-<sup>13</sup>C (DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 21,1 (CH<sub>3</sub>), 63,6 (CH<sub>2</sub>), 68,9 (CH), 69,4 (CH), 82,7 (CH), 171,0 (C=O), 177,0 (C=O). Anal. CHN calc. para C<sub>7</sub>H<sub>10</sub>O<sub>6</sub> (%): C, 44,2; H, 5,3; exp. (%): C, 44,1; H, 5,3.

## 4.5 – Acilação da lactona **38** catalisada por lipases ou micélios

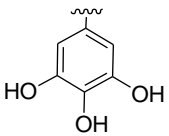
### 4.5.1 – Efeito do doador de grupo acila na acilação de **38** com ácidos carboxílicos e aminoácidos



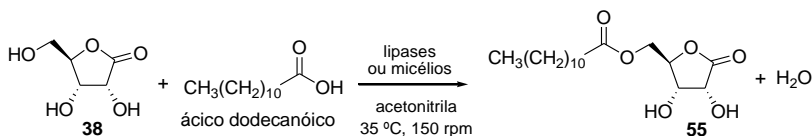
Foram adicionados 10,0 mg de CAL-B a um frasco reacional contendo 74,0 mg (0,50 mmol) da lactona **38** e 1,50 mmol de ácido carboxílico ou aminoácido dissolvidos em 10,0 mL de acetonitrila. O sistema foi agitado por 24 h a 35 °C e 150 rpm, e alíquotas de 1,00 mL (retiradas com uma micropipeta de 500-5000  $\mu$ L) foram analisadas por RMN-<sup>1</sup>H para a determinação das conversões (%) (ver item 5.2.1).

A **Tabela 4** apresenta os ácidos carboxílicos usados neste estudo em função das respectivas quantidades empregadas.

**Tabela 4** – Doadores de acila usados nas tentativas de acilação de **38**.

Doador de grupo acila (RCOOH)	R	Massa (mg)	Volume (mL)
ácido acético	CH <sub>3</sub>	-	0,080
ácido propiônico	CH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub>	-	0,110
ácido butírico	CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub>	-	0,140
ácido hexanóico	CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub>	-	0,190
ácido octanóico	CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>6</sub>	-	0,240
ácido decanóico	CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>8</sub>	258	-
ácido dodecanóico	CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>10</sub>	300	-
ácido tetradecanóico	CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>12</sub>	343	-
ácido hexadecanóico	CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>14</sub>	385	-
ácido octadecanóico	CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>16</sub>	427	-
ácido benzoico	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub>	-	0,140
ácido fenilacético	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> CH <sub>2</sub>	204	-
ácido D,L-mandélico	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> CH(OH)	-	0,180
ácido gálico		255	-
ácido 4-pentenóico	CH <sub>2</sub> =CH(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub>	-	0,150
(±)-ácido citronélico	(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> C=CH(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> CH(CH <sub>3</sub> )CH <sub>2</sub>	-	0,270
ácido oléico	CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>7</sub> CH=CH(CH <sub>2</sub> ) <sub>7</sub>	-	0,470
ácido linoléico	CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> CH=CHCH <sub>2</sub> CH=CH(CH <sub>2</sub> ) <sub>7</sub>	-	0,430
Glicina	NH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub>	-	0,100
D,L-alanina	CH <sub>3</sub> CH(NH <sub>2</sub> )	134	-
L-cisteína	HSCH <sub>2</sub> CH(NH <sub>2</sub> )	182	-

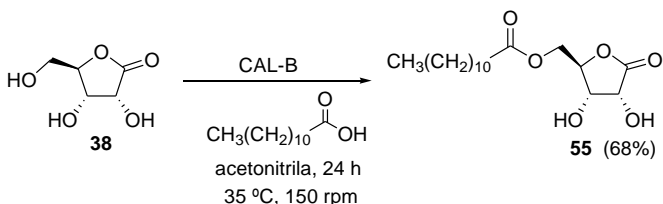
#### 4.5.2 – Avaliação de biocatalisadores na acilação de **38** com ácido dodecanóico



A lipase (10,0 mg) ou o micélio (10,0 mg) selecionados foram adicionados a uma solução contendo a lactona **38** (74,0 mg, 0,50 mmol) e ácido dodecanóico (300 mg, 1,50 mmol) dissolvidos em 10,0 mL de acetonitrila tratada. A reação foi agitada a 150 rpm e 35 °C. Foram retiradas alíquotas de 1,0 mL periodicamente (24 e 48 h), utilizando micropipeta de 500-5000  $\mu\text{L}$ , o solvente foi evaporado e as conversões (%) foram determinadas por RMN- $^1\text{H}$ , conforme descrito no subitem 5.2.1.

Foram utilizadas as lipases de *Candida antarctica* imobilizada em resina aniônica (CAL-B), de *Rhizomucor miehei* (RM-IM), de *Candida rugosa* (LCR), de *Thermomyces lanuginosus* (TL-IM), de *Pseudomonas fluorescens* (AK), de *Rhizopus oryzae* (F-AP15), de *Burkholderia cepacia* livre (LPS), de *B. cepacia* imobilizada em cerâmica (LPS-C) e de *B. cepacia* imobilizada em terra diatomácea (LPS-D), além dos micélios UEA\_115 e UEA\_53.

#### 4.5.3 – Síntese, purificação e caracterização da 5-*O*-dodecanoil-D-ribono-1,4-lactona (**55**)

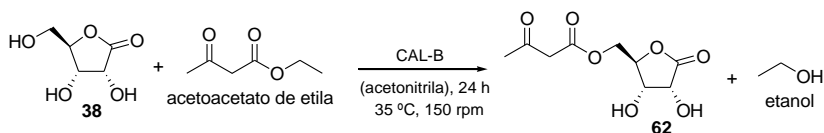


A lactona **38** (459 mg, 3,10 mmol) e o ácido dodecanóico (621 mg, 3,10 mmol) foram colocados em um frasco reacional contendo acetonitrila tratada (10,0 mL). A CAL-B (70,0 mg) foi adicionada e a mistura agitada a 150 rpm e 35 °C por 24 h. A enzima foi separada por



filtração, o solvente foi evaporado e um sólido branco e amorfo foi obtido. Este foi recristalizado em uma mistura etanol/éter etílico 1:1, fornecendo o produto 5-*O*-dodecanoil-D-ribono-1,4-lactona **55**. Rendimento de 68%; pf. 123-125 °C; IV: 3490, 3302, 2955, 2918, 2853, 1755, 1750, 1472 e 1412 cm<sup>-1</sup>; RMN-<sup>1</sup>H (DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 0,85 (m, 3H), 1,24 (m, 16H), 1,49 (m, 2H), 2,32 (t, 7,2 Hz, 2H), 4,11-4,20 (m, 2H), 4,24 (dd, 3,6 Hz, 12,0 Hz, 1H), 4,40–4,45 (m, 2H), 5,60 (d, 3,6 Hz, 1H, troca com D<sub>2</sub>O), 5,92 (d, 7,6 Hz, 1H, troca com D<sub>2</sub>O); <sup>13</sup>C-NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 14,6 (CH<sub>3</sub>), 22,8 (CH<sub>2</sub>), 25,0 (CH<sub>2</sub>), 29,1 (CH<sub>2</sub>), 29,2 (CH<sub>2</sub>), 29,4 (CH<sub>2</sub>), 29,5 (CH<sub>2</sub>), 29,6 (CH<sub>2</sub>), 29,7 (CH<sub>2</sub>), 32,0 (CH<sub>2</sub>), 33,9 (CH<sub>2</sub>), 63,6 (CH<sub>2</sub>), 69,0 (CH), 69,5 (CH), 82,6 (CH), 173,0 (C=O), 176,0 (C=O); Anal. CHN calc. para C<sub>17</sub>H<sub>30</sub>O<sub>6</sub> (%): C, 61,8; H, 9,2; exp. (%): C, 60,7; H, 9,4.

#### 4.5.4 – Acilação da lactona **38** com acetoacetato de etila



Lactona **38** (74,0 mg, 0,50 mmol) e acetoacetato de etila (0,190 mL, 1,50 mmol) foram dissolvidos em 10,0 mL de acetonitrila tratada. A reação foi iniciada com a adição de 10,0 mg de CAL-B e o sistema agitado por 24 h a 35 °C e 150 rpm. Alíquotas foram retiradas e analisadas por RMN-<sup>1</sup>H, conforme descrito no item 5.2.1 para determinação da conversão (%) ao derivado 5-*O*-acetoacetyl-D-ribonolactona **62**.

Este procedimento também foi realizado empregando 13,0 mL (100 mmol, 200 equiv.) de acetoacetato de etila na ausência de acetonitrila, nas mesmas condições acima.

#### 4.6 – Reutilização da CAL-B na acilação de 38

A uma solução contendo a lactona **38** (74,0 mg, 0,50 mmol) e acetato de vinila (0,140 mL, 1,50 mmol), ou ácido decanóico (258 mg, 1,50 mmol), ou ácido dodecanóico (300 mg, 1,50 mmol) dissolvidos em 10,0 mL de acetonitrila, adicionou-se a CAL-B (10,0 mg). A reação foi incubada a 35 °C e 150 rpm por 6 ou 24 h, empregando o acetato de vinila ou os ácidos carboxílicos, respectivamente. Aliquotas de 1,0 mL foram retiradas, utilizando micropipeta de 500-5000 µL, e submetidas aos cálculos de conversão (%) por RMN-<sup>1</sup>H, após a evaporação da acetonitrila. Este procedimento foi repetido por cinco ciclos subsequentes. Ao final de cada ciclo, a CAL-B foi retirada do meio reacional por filtração, lavada com acetonitrila para extrair o substrato e produto remanescentes, e a seguir foi reutilizada.

#### 4.7 – Desacetilação do derivado 2,3,5-*O*-triacetil-D-ribonolactona (**61**)

A desacetilação do derivado triacetilado **61** foi realizada em duas etapas, que serão descritas a seguir.

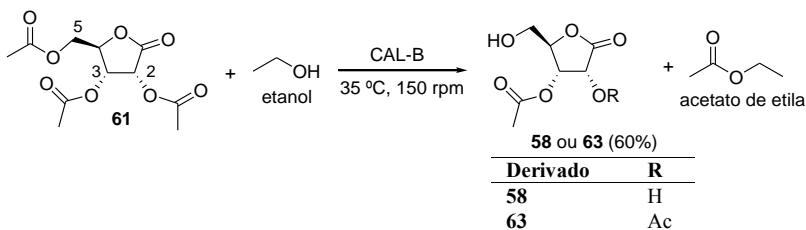
##### 4.7.1 – Síntese da 2,3,5-*O*-triacetil-D-ribonolactona **61**



A uma solução contendo 1,48 g (10,0 mmol) da D-ribonolactona **38** e 10,0 mL de piridina tratada, protegida por um tubo secante de CaCl<sub>2</sub>, foram adicionados 10,0 mL (100 mmol) de anidrido acético e deixados sob agitação à temperatura ambiente durante um período de 16 h. Em seguida, foram adicionados 25,0 mL de acetato de etila e 15,0 mL de HCl 0,100 mol/L. A fase orgânica foi separada em funil de separação e tratada sucessivamente com 2 x 20,0 mL de NaHCO<sub>3</sub> sat., 20,0 mL de H<sub>2</sub>O e 20,0 mL de solução saturada de NaCl (brine). Após secar a fase orgânica com Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, o solvente foi evaporado e o resíduo coevaporado em etanol por duas vezes. Foi obtido

um óleo amarelo e a  $\beta$ -lactona **61** caracterizada com pureza > 98%. Rendimento de 60%. RMN- $^1\text{H}$  (DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  2,07 (s, 3H), 2,10 (s, 3H), 2,11 (s, 3H), 4,36 (d, 3,6 Hz, 2H), 4,88 (t, 3,6 Hz, 1H), 5,46 (d, 6,2 Hz, 1H), 5,80 (d, 6,2 Hz, 1H);  $^{13}\text{C}$ -NMR (DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  20,3 (CH $_3$ ), 20,8 (CH $_3$ ), 60,6 (CH $_2$ ), 67,2 (CH), 70,9 (CH), 84,0 (CH), 169,4 (C=O), 170,0 (C=O), 171,7 (C=O).

#### 4.7.2 – Etanolise da 2,3,5-*O*-triacetil-D-ribonolactona **61**



A uma solução contendo a lactona triacetilada **61** (140 mg, 0,50 mmol) em 5,00 mL de etanol 95% foram adicionados 70,0 mg de CAL-B. A mistura reacional foi incubada a 35 °C e 150 rpm. Aliquotas foram periodicamente retiradas (0-6 h) para determinação das conversões (%) por RMN- $^1\text{H}$ .

Paralelamente, o composto **61** foi submetido às mesmas condições reacionais acima durante 6 h, a CAL-B filtrada e o derivado diacetilado **63** separado do meio reacional por cromatografia em coluna, empregando sílica 70-230 Mesh e acetato de etila:hexano 1:3 como eluente. Foi obtido um óleo amarelo com rendimento de 60%. RMN- $^1\text{H}$  (DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  2,09 (s, 6H), 3,71 (m, 2H), 4,68 (m, 1H), 5,42 (d, 6,0 Hz, 1H), 5,59 (t, 6,0 Hz, 1H, troca com D $_2$ O), 5,78 (d, 6,0 Hz, 1H).

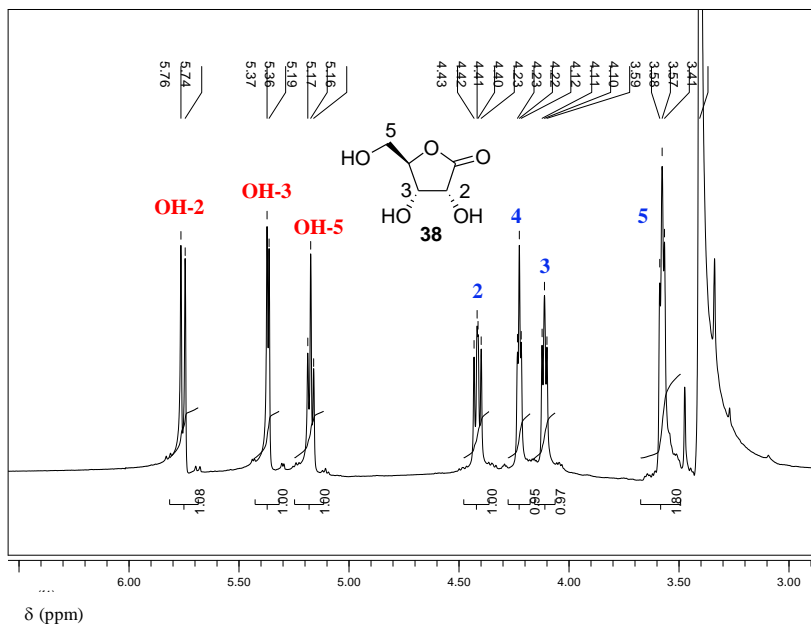
## 5 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

A D-ribono-1,4-lactona (**38**) foi submetida a reações de acilação e etanólise empregando diferentes hidrolases e micélios de fungos da região amazônica, além de diversos doadores acila e solventes orgânicos. Em geral, os derivados 5-*O*-acil-D-ribonolactonas foram os produtos obtidos majoritariamente, como por exemplo, a 5-*O*-acetil-D-ribonolactona (**54**).

### 5.1 – Espectros de RMN-<sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C da D-ribono-1,4-lactona **38**

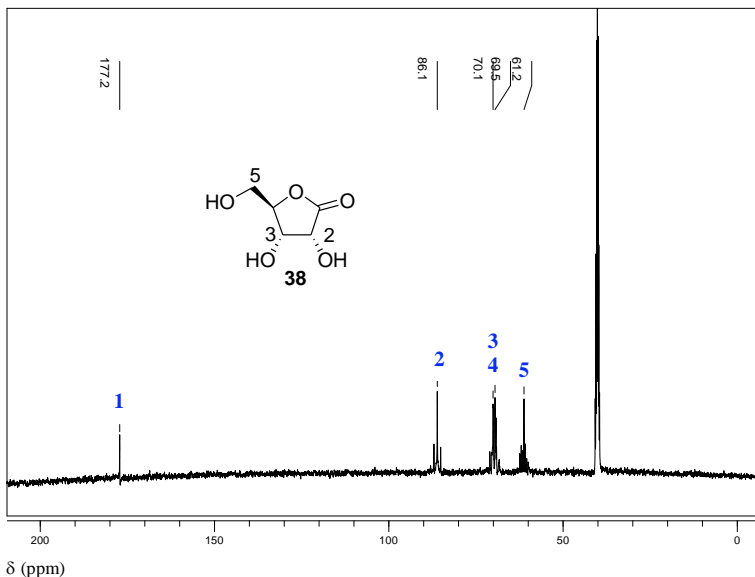
A lactona **38** encontra-se comercialmente disponível, e seus espectros de RMN-<sup>1</sup>H são comumente apresentados em D<sub>2</sub>O como solvente. Devido à sua pouca solubilidade em CDCl<sub>3</sub> e ao fato de que os espectros em D<sub>2</sub>O possuem um sinal intenso de água em 4,79 ppm, região onde estão concentrados os sinais dos derivados acilados de **38**, neste trabalho as análises de RMN-<sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C foram efetuadas em DMSO-*d*<sub>6</sub>. Outro inconveniente nas análises de RMN-<sup>1</sup>H de **38** e seus derivados acilados em D<sub>2</sub>O refere-se ao fato de que os hidrogênios hidroxílicos não são observados empregando este solvente.

A **Figura 23** mostra a ampliação (3,0-6,5 ppm) do espectro de RMN-<sup>1</sup>H da lactona **38**. Os hidrogênios ligados aos carbonos 2, 4, 3 e 5 têm os sinais centrados em 4,42 (dd, 5,6 e 7,6 Hz), 4,23 (t, 3,6 Hz), 4,11 (dd, 3,6 e 5,6 Hz) e 3,58 (m) ppm, respectivamente. Os hidrogênios hidroxílicos das posições 2, 3 e 5 têm os sinais em 5,75 (d, 7,6 Hz), 5,36 (d, 3,6 Hz) e 5,17 (t, 5,6 Hz) ppm, respectivamente. Estes últimos não são detectados quando se adiciona 1-2 gotas de D<sub>2</sub>O aos tubos de ressonância, simplificando as multiplicidades dos sinais remanescentes.



**Figura 23** – Ampliação do espectro de RMN-<sup>1</sup>H da lactona **38** [3,0-6,5 ppm, DMSO-*d*<sub>6</sub>, 400 MHz].

Na **Figura 24** está apresentado o espectro de RMN-<sup>13</sup>C da lactona **38**. O sinal em 61,2 ppm refere-se ao carbono primário da posição 5. Os sinais em 69,5 e 70,1 ppm são relativos aos carbonos 3 e 4. Os sinais dos carbonos 2 e carbonílico são observados em 86,1 e 177,2 ppm, respectivamente.

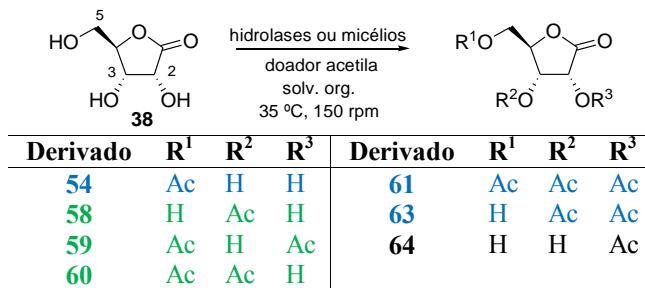


**Figura 24** – Espectro de RMN- $^{13}\text{C}$  da lactona **38** [ $\text{DMSO-}d_6$ , 100 MHz].

## 5.2 – Acetilação da D-ribono-1,4-lactona **38** catalisada por hidrolases e micélios

Em reações de acetilação da lactona **38**, sete derivados acetilados podem ser obtidos, desconsiderando os produtos provenientes da abertura do anel, com conseqüente formação de estruturas cíclicas de seis membros ou de estereoisômeros. Três destes são os compostos monoacetilados 5- (**54**), 3- (**58**) e 2-*O*-acetil-D-ribonolactona (**64**). Outros três são os diacetilados 2,5- (**59**), 3,5- (**60**) e 2,3-*O*-diacetil-D-ribonolactona (**63**). Finalmente, o derivado triacetilado 2,3,5-*O*-triacetil-D-ribonolactona (**61**) também pode ser obtido (**Figura 25**).

A **Figura 25** mostra a equação química geral da reação de acetilação de **38** catalisada por hidrolases e micélios, elencando todos os possíveis produtos acetilados.



**Figura 25** – Acetilação de **38** catalisada por hidrolases ou micélios.

A proposta dos estudos que serão discutidos nos próximos subitens é a utilização de hidrolases ou micélios para acetilar seletivamente a lactona **38**, variando-se a massa e a procedência dos biocatalisadores, solvente orgânico e a quantidade de água presente no meio, bem como os doadores acetila empregados.

### 5.2.1 – Avaliação de biocatalisadores na acetilação de **38**

Dez lipases, livres ou industrialmente imobilizadas, uma protease e dois micélios de fungos da região da Amazônia foram testados com relação à reatividade e regioselectividade da reação de acetilação da lactona **38** com acetato de vinila. Os resultados obtidos em função dos sistemas biocatalíticos empregados e que apresentaram atividade estão apresentados na **Tabela 5**.

**Tabela 5** – Acetilação de **38** com acetato de vinila empregando lipases e micélios.<sup>a</sup>

Entrada	Biocatalisador	m <sub>cat</sub> (mg)	Conversão (%) <sup>b</sup>							
			6 h				24 h			
			<b>54</b>	<b>58</b>	<b>59</b>	<b>60</b>	<b>54</b>	<b>58</b>	<b>59</b>	<b>60</b>
1	CAL-B	10,0	85	- <sup>c</sup>	-	-	> 99	- <sup>c</sup>	-	-
2	Lipozyme TL-IM	10,0	16	7	-	-	24	5	-	-
3	Lipozyme TL-IM	40,0	nd <sup>d</sup>	nd	nd	nd	85	-	-	-
4	AK	10,0	10	8	-	6	12	8	-	8
5	LPS-C	10,0	19	14	-	11	28	17	11	16
6	LPS-C <sup>e</sup>	60,0	32	14	13	14	46	-	17	23
7	LPS-D	10,0	10	7	-	-	13	15	-	-
8	LPS-D	40,0	nd	nd	nd	nd	29	23	7	11
9	Micélio UEA_115	10,0	-	-	-	-	8	-	-	-
10	Micélio UEA_115	40,0	nd	nd	nd	nd	41 <sup>f</sup>	-	-	-

<sup>a</sup>Condições reacionais: **38** (0,50 mmol), acetato de vinila (1,50 mmol), lipase ou micélio, 35 °C, 150 rpm, acetonitrila (10,0 mL); <sup>b</sup>Determinado por RMN-<sup>1</sup>H (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>); <sup>c</sup>Conversão < 1%. <sup>d</sup>Não determinada. <sup>e</sup>Produto triacetilado **61** (14%), obtido após 24 h. <sup>f</sup>Conversão (%) após 72 h.

As conversões foram dependentes da fonte de hidrolase ou micélio. Utilizando 10,0 mg das lipases LPS, F-API5, LCR, LRO e LAN, assim como a protease de *Aspergillus oryzae* e o micélio UEA\_53, não foi detectada a formação de quaisquer produtos, mesmo após 72 horas de reação.

As reações foram relativamente seletivas usando a Lipozyme TL-IM, porém as conversões aos derivados monoacetilados **54** e **58** foram baixas (16 e 24% ao **54** e 5 e 7% ao **58** em 6 e 24h, respectivamente) empregando 10,0 mg deste biocatalisador (Entrada 2). Entretanto, utilizando 40,0 mg de preparado de Lipozyme TL-IM observou-se maior seletividade (> 99%) e conversão (85%) ao produto **54** em 24 h (Entrada 3).



Wang *et al.* obtiveram resultados similares na síntese de ésteres derivados da 5-fluorouridina, na qual a Lipozyme TL-IM foi altamente seletiva na formação dos produtos 5-acilados (99% de regioseletividade) e com boas conversões (77,1-98,4%) empregando alcanoatos de vinila como doadores acila. Porém, as conversões foram relativamente baixas (26,8%) quando acetato de vinila foi usado como doador de grupo acila.<sup>65</sup>

Empregando a lipase AK (10,0 mg) houve pouca seletividade, sendo obtidos os produtos **54**, **58** e **60**, com conversões baixas ( $\leq 12\%$ ) após 24 h de reação (Entrada 4).

Na reação catalisada por 10,0 mg de LPS-C (Entrada 5) obteve-se 44% de conversão total a uma mistura de derivados acetilados. Os produtos **54**, **58** e **60** foram obtidos em 6 h com 19, 14 e 11% de conversão, respectivamente. Em 24 h houve um aumento na conversão total para 72%, sendo observada a formação dos produtos diacetilados **59** (11%), **60** (16%), além dos derivados monoacetilados **54** (28%) e **58** (17%).

Utilizando 60,0 mg de LPS-C, a lactona **38** foi totalmente consumida, sendo obtida uma mistura dos produtos **54** (46%), **59** (17%), **60** (23%) e **61** (14%), em 24 h de reação (Entrada 6). Este resultado foi extremamente importante para a caracterização dos derivados **58-61**, que foram parcialmente separados por cromatografia em coluna (sílica gel 70-230 mesh e diclorometano:hexano 1:1 como eluente) e devidamente analisados por RMN-<sup>1</sup>H. As atribuições serão minuciosamente discutidas no item 5.4.

Quando se utilizou 10,0 mg da lipase LPS-D, apenas os produtos monoacetilados **54** e **58** foram obtidos com conversões  $\leq 15\%$ , tanto em 6 como em 24 h de reação. Porém, ao utilizar-se 40,0 mg de preparado enzimático, observou-se uma diminuição na seletividade e os derivados **54**, **58**, **59** e **60** foram obtidos com conversões  $> 29\%$  (Entrada 8).

Empregando 40,0 mg do micélio UEA\_115, foi obtida uma boa conversão (41%) no produto **54** após 72 h de reação, com regioseletividade  $> 99\%$ . Este resultado é promissor e novos testes deverão ser realizados com o intuito de aperfeiçoar processos usando estes e outros sistemas biocatalíticos que estão disponíveis na floresta amazônica, contando com a colaboração do grupo de pesquisa coordenado pela Profa. Dra. Sandra P. Zanotto do Laboratório de Bioorgânica da UEA (Manaus-AM).

Os melhores resultados foram obtidos empregando a CAL-B como catalisador, sendo que as conversões ao produto monoacetilado **54** foram de 85% e > 99% em 6 e 24 h, respectivamente. Não foram detectados os outros derivados, demonstrando que a acetilação catalisada pela CAL-B foi regioseletiva.

Uppenberg *et al.* reportaram que a CAL-B possui um canal bastante estreito e profundo que conduz à cavidade do sítio ativo. A hidroxila primária (5-OH) da lactona **38**, menos impedida, pode desta forma se encaixar mais facilmente ao sítio catalítico da CAL-B e realizar o ataque nucleofílico no intermediário acil-enzima. Ao contrário, as hidroxilas secundárias (2-OH e 3-OH) estão mais impedidas para realizar esta etapa, resultando na acetilação preferencial da hidroxila primária e conseqüentemente obtendo-se maior seletividade.<sup>101</sup>

Devido a essa propriedade, a regioseletividade da CAL-B em reações de acetilação de nucleosídeos e carboidratos tem sido bem reportada na literatura. Li *et al.* observaram que a acetilação da fluxuridina (FUDR) e análogos mediada pela CAL-B ocorreu preferencialmente na hidroxila menos impedida (5-OH).<sup>102</sup>

Resultados similares foram também obtidos por Wu *et al.* na síntese de derivados de monossacarídeos e de pró-fármacos poliméricos da 5-fluorouridina, na qual a CAL-B demonstrou alta seletividade com relação às hidroxilas primárias.<sup>103</sup>

Estes dados foram também correlatos aos obtidos por Díaz-Rodríguez *et al.*, que realizaram a síntese regioseletiva de uma série de derivados *O*-crotonil-2'-deoxinucleosídeos catalisada pela CAL-B. Foram obtidas boas conversões aos produtos 5-acilados, com alta seletividade.<sup>104</sup>

Observando a **Tabela 5**, verifica-se que com o uso das lipases AK e LPS-C obtiveram-se outros derivados além do monoacetilado **54**, entre eles o 3-monoacetilado **58**, diacetilados **59** e **60** e triacetilado **61**. No intuito de aumentar a conversão (%) nos derivados di- ou triacetilados de **38**, foram realizados estudos utilizando misturas de CAL-B e LPS-C e de CAL-B e AK.

### 5.2.1.1 – Utilização de misturas de lipases na acetilação de 38

Para realizar os estudos utilizando misturas de CAL-B e LPS-C na acetilação de **38** com acetato de vinila, cinco estratégias distintas foram empregadas:

1) Reação com 10,0 mg de CAL-B por 24 h, seguida da adição de 60,0 mg de LPS-C por mais 24 h. Os derivados obtidos neste estudo foram o monoacetilado **54** (75%) e os diacetilados **59** (9%) e **60** (16%), com conversão total > 99%.

2) Reação com 60,0 mg de LPS-C por 24 h, seguida da adição de 10,0 mg de CAL-B por mais 24 h. Neste estudo a conversão total foi de 85%, sendo obtidos os derivados monoacetilados **54** (52%) e **58** (12%) e os diacetilados **59** (8%) e **60** (13%).

3) Reação com adição simultânea de 10,0 mg de CAL-B e 60,0 mg de LPS-C em 24 h. A conversão total foi > 99%, obtendo-se os derivados monoacetilados **54** (61%) e **58** (6%) e os diacetilados **59** (7%) e **60** (25%).

4) Reação com adição simultânea de 2,00 mg de CAL-B e 8,00 mg de LPS-C por 6 h. Neste estudo obteve-se apenas 17% de conversão ao derivado monoacetilado **54**.

5) Reação com adição simultânea de 8,00 mg de CAL-B e 2,00 mg de LPS-C por 6 h. Apenas o produto monoacetilado **54** foi obtido com 51% de conversão.

De maneira geral, com a utilização das misturas de CAL-B e LPS-C, observou-se a formação majoritária do derivado monoacetilado **54**. Portanto, não houve vantagem do ponto de vista da regioseletividade na utilização destas enzimas no mesmo frasco reacional.

Os mesmos procedimentos foram realizados utilizando misturas de CAL-B e lipase AK, e os resultados também não foram satisfatórios, com a obtenção majoritária (20-70 %) do derivado **54** e de pequenas quantidades (7-26%) de **58** e **60**.

Portanto, considerando os resultados apresentados nos dois últimos subitens, que evidenciam a regioseletividade da lipase B de *Candida antarctica* (CAL-B) na acetilação de **38**, esta lipase foi selecionada para a realização dos estudos subsequentes.

## 5.2.2 – Efeito do solvente orgânico na acetilação de **38**

Está bem documentado na literatura que a atividade das lipases é fortemente afetada pela escolha do solvente orgânico.<sup>105-107</sup> O logaritmo do coeficiente de partição de um solvente em um sistema padrão de duas fases octanol/água ( $\log P$ ) é o parâmetro mais utilizado para classificar os solventes em reações biocatalisadas. Empregando enzimas hidrolíticas, em geral recomenda-se o uso de solventes apolares ( $\log P > 4,0$ ) que tendem a aumentar as velocidades de reações biocatalisadas. Os solventes polares ( $\log P < 2,5$ ) não são os mais adequados, podendo retirar a microcamada aquosa que envolve a estrutura terciária da enzima, desnaturando-a.<sup>108,109</sup>

Visando avaliar o efeito do meio reacional na acetilação da lactona **38** catalisada pela CAL-B, foram empregados cinco solventes orgânicos apróticos polares, considerando que o substrato é insolúvel em solventes de baixa polaridade. Acetonitrila, acetona, THF, dioxano e DMF foram selecionados para a acetilação de **38** com acetato de vinila como doador de grupo acetila (**Tabela 6**).

**Tabela 6** – Efeito do solvente na acetilação de **38** catalisada por CAL-B.

Entrada	Solvente	$\log P^a$	Conversão (%) <sup>b</sup> - <b>54</b>
1	Acetonitrila	-0.33	72
2	THF	-0.49	68
3	Acetona	-0.23	61
4	Dioxano <sup>c</sup>	-1.1	44
5	DMF	-1.0	< 1

<sup>a</sup>Ref. 112. <sup>b</sup>Determinada por RMN-<sup>1</sup>H (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>). <sup>c</sup>Mistura de compostos: **54** (44%), **58** (9%) e **60** (6%).

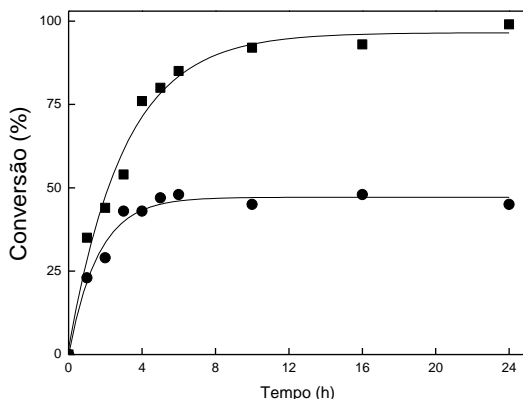
Os resultados mostraram que não houve relação direta entre  $\log P$  e as conversões ao produto. Utilizando os solventes menos polares ( $\log P \geq -0,49$ ), tais como acetona, acetonitrila e THF, o derivado 5-monoacetilado **54** foi obtido seletivamente com conversões de 61-72%

(Entradas 1-3). Empregando-se dioxano ( $\log P = -1,1$ ), observou-se tanto a diminuição na regioseletividade quanto na conversão em **54**, sendo detectada também a formação dos derivados **58** e **60** (Entrada 4). Ao usar DMF ( $\log P = -1,0$ ) não foi detectada a formação de **54** ou de outro produto mono-, di- ou triacetilado (Entrada 5).

É importante salientar que vários trabalhos na literatura mostram a utilização de solventes tóxicos, de mais alto custo ou de alto ponto de ebulição, como piridina, DMSO ou o próprio DMF, dificultando o isolamento dos produtos e incorrendo em uma prática química não sustentável. Os solventes utilizados neste trabalho, exceto DMF, são todos de baixo ponto de ebulição, o que facilita a separação dos produtos para análise ou purificação. Devido à maior conversão obtida empregando acetonitrila (Entrada 1), esse solvente foi selecionado para os estudos posteriores.

Outro parâmetro relevante, sobretudo para as reações de acilação catalisadas por lipases, é a quantidade de água presente no meio reacional. A água tem um papel importante no controle da atividade das enzimas em meio orgânico. É descrito na literatura que as lipases possuem uma monocamada de água em sua superfície, ou agregados em torno dos grupos carregados da proteína, que mantêm a conformação nativa, mesmo em solventes orgânicos. A quantidade ideal de água necessária depende de vários fatores, tais como o tipo de solvente, substrato e suporte sólido (se imobilizada), a polaridade do sítio ativo da enzima e as condições de reação.<sup>110</sup> No entanto, a presença de água no meio reacional pode diminuir a quantidade de produto acilado em reações de acilação catalisadas por lipases, deslocando o equilíbrio no sentido da hidrólise e produzindo os ácidos carboxílicos correspondentes.<sup>111</sup>

Portanto, a acetilação de **38** com acetato de vinila catalisada pela CAL-B foi estudada com a adição de 27,0  $\mu\text{L}$  (3 equiv.) de água, para verificar se a presença de uma pequena quantidade deste solvente influencia na conversão e seletividade da reação. Os dados de conversão (%) em função do tempo, na presença e ausência de água, estão apresentados na **Figura 26**.



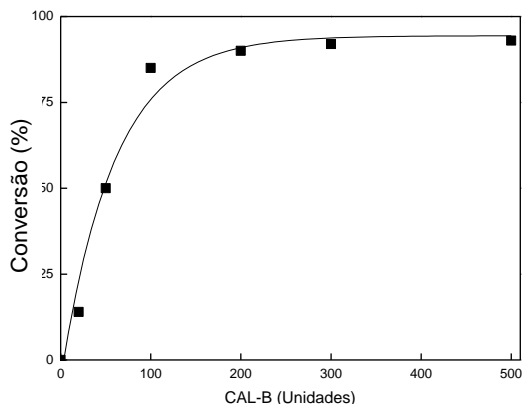
**Figura 26** – Influência do tempo na acetilação regioselectiva de **38** em acetonitrila tratada (■) e em acetonitrila + água (27,0  $\mu$ L; 1,50 mmol) (●) [**38** (0,50 mmol), acetato de vinila (1,50 mmol), CAL-B (10,0 mg, 100 Unidades), acetonitrila (10,0 mL), 35 °C, 150 rpm].

Embora a conversão ao produto **54** (~ 50% após 24 h) tenha sido inferior à obtida usando acetonitrila tratada (> 99%, 24 h), a regioselectividade do processo (> 99%) foi inteiramente mantida. Os resultados apresentados mostram também que a conversão ao derivado **54** empregando acetonitrila tratada aumentou rapidamente nas primeiras 6 h (até ~ 85%), alcançando um platô a partir desse tempo e atingindo conversão quantitativa (> 99%) após 24 h. Assim, considerando os resultados obtidos, utilizou-se a acetonitrila tratada em 6 h de reação nos estudos subsequentes.

### 5.2.3 – Influência da massa da CAL-B na acetilação de **38**

A influência da quantidade de CAL-B na acetilação regioselectiva de **38** com acetato de vinila em acetonitrila tratada foi avaliada na faixa de 0-50 mg (0-500 Unidades). Os resultados, apresentados na **Figura 27**, mostram que foi obtida boa conversão (85%) ao produto monoacetilado **54** empregando apenas 10,0 mg (100 U) de CAL-B em 6 h de reação. Portanto, para propósitos práticos não é necessário o emprego de uma quantidade maior de catalisador (200 a 500 unidades). Dessa forma, a relação substrato e catalisador utilizada

nos experimentos posteriores foi fixada em 0,50 mmol da lactona **38** e 10,0 mg de CAL-B.



**Figura 27** – Influência da quantidade de CAL-B na acetilação de **38** [**38** (0,50 mmol), acetato de vinila (1,50 mmol), CAL-B (0-50,0 mg; 0-50 Unidades), acetonitrila tratada (10,0 mL), 35 °C, 150 rpm, 6 h].

#### 5.2.4 – Influência da quantidade e do tipo de doador de grupo acetila

A metodologia empregada nos itens anteriores foi estendida para outros doadores acetila (anidrido, éster ou ácido carboxílico), na qual o tipo e a quantidade do reagente foram avaliados na acetilação regiosseletiva da lactona **38** com CAL-B como biocatalisador. Duas condições foram empregadas para a realização das biotransformações. Na primeira, a razão molar doador de grupo acetila:substrato foi de 3:1 e acetonitrila foi usada como solvente. Na segunda, um grande excesso do doador de grupo acetila (200 eq.) foi empregado na ausência de solvente. As conversões ao derivado 5-monoacetilado **54** são apresentadas na **Tabela 7**.

**Tabela 7** – Influência do doador de grupo acetila na acetilação de **38**.

Entrada	Doador de grupo acetila	Conversão (%) <sup>a</sup> - <b>54</b>	
		3:1 <sup>b,c</sup>	200:1 <sup>b,d</sup>
1	Acetato de vinila	85	> 99
2	Acetato de isopropenila	28	75
3	Acetato de etila	23	53
4	Anidrido acético	52	16 <sup>e</sup>
5	Ácido acético	< 5%	< 5%

<sup>a</sup>Determinada por <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>). <sup>b</sup>Razão molar do doador de grupo acetila:substrato **38**. <sup>c</sup>Condições reacionais: **38** (0,50 mmol), doador de grupo acetila (1,50 mmol), acetonitrila (10,0 mL), CAL-B (10,0 mg), 35 °C, 150 rpm, 6 h. <sup>d</sup>Condições reacionais: **38** (0,50 mmol), doador de grupo acetila (100 mmol), CAL-B (10,0 mg), 35 °C, 150 rpm, 6 h. <sup>e</sup>Mistura de produtos: **54** (16%), **58** (32%) e **60** (27%).

Boas conversões e regioselectividade foram obtidas empregando a maior parte dos doadores acetila (Entradas 1 a 4). A maior conversão ao derivado **54** foi obtida usando acetato de vinila em ambas as condições avaliadas (Entrada 1). Com acetato de isopropenila boas conversões foram obtidas apenas quando este doador de grupo acetila foi usado em excesso (Entrada 2).

Usando acetato de etila em excesso, foi obtida boa conversão (53%). Este resultado torna esta metodologia interessante do ponto de vista econômico, pois este solvente apresenta baixo custo. Quando acetato de etila foi usado na razão molar de 3:1 obteve-se menor conversão (23%) (Entrada 3).

Anidrido acético também foi utilizado como doador de grupo acetila, mas a sua alta reatividade (mesmo na ausência de catalisador)<sup>112</sup> dificulta o uso em grande excesso, devido à formação dos subprodutos **58** e **60** (Entrada 4). No entanto, ao utilizar anidrido acético:**38** (3:1) em acetonitrila, a regioselectividade aumentou e o derivado **54** foi obtido com conversão moderada (52%).

Como esperado, ácido acético foi pouco eficiente como doador de grupo acetila e as conversões foram < 5% sob ambas as condições experimentais (Entrada 5). Este resultado pode ser explicado pela tendência de alguns ácidos carboxílicos, tais como acético e propiônico, atuarem como inibidores potentes da atividade das lipases, pela remoção parcial da microcamada aquosa que estabiliza estas enzimas ou pela alteração do pH do sítio catalítico. Estas propriedades contribuem para a diminuição observada na atividade enzimática.<sup>113</sup>



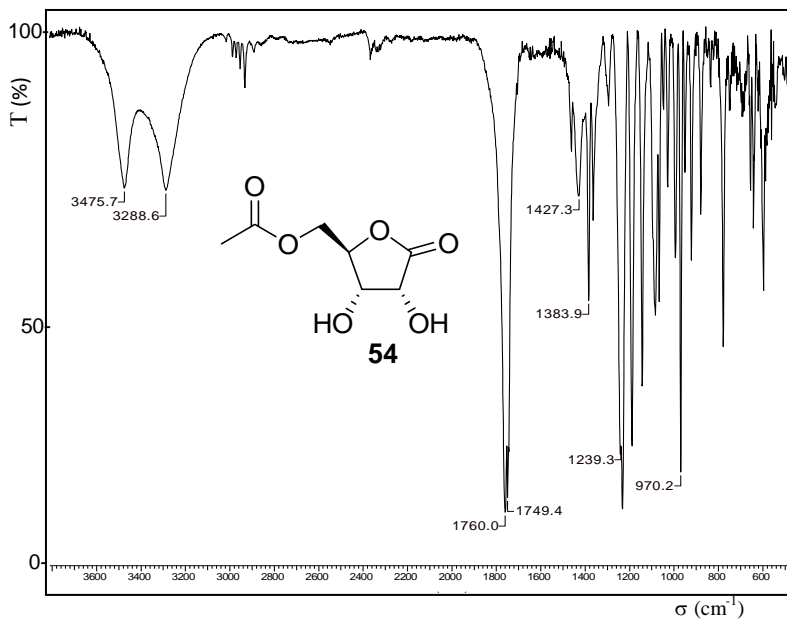
### 5.2.5 – Síntese, purificação e caracterização da 5-*O*-acetil-D-ribonolactona (**54**)

Com as condições reacionais otimizadas nos últimos itens, realizou-se a síntese, isolamento e caracterização do derivado monoacetilado **54**. Salienta-se que este composto não é inédito na literatura, sendo sintetizado por Joullié<sup>114</sup> *et al.* a partir da dissolução da lactona **38** em solução contendo 20% de brometo de hidrogênio em ácido acético, e por Sá<sup>100</sup> *et al.* empregando anidrido acético e piridina e protocolos de proteção e desproteção da lactona **38**. No entanto, a sua preparação de maneira seletiva, empregando um biocatalisador não se encontrava descrita até a realização deste trabalho. A síntese foi realizada em uma etapa empregando 0,50 mmol da lactona **38**, 3 equiv. de acetato de vinila, 10,0 mg de CAL-B e 10,0 mL de acetonitrila tratada, a 35 °C, sob agitação de 150 rpm durante 24 h.

O produto **54** foi obtido como sólido branco e amorfo com rendimento de 94%, após recristalização em acetona. Para a caracterização do produto **54**, amostras foram submetidas às análises de CHN, IV, RMN-<sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C e difração de raios X (ver item 4.4.5).

Os resultados da análise elementar do derivado **54** mostram que não houve discrepância entre os valores calculados para C (%) e H (%) da fórmula molecular C<sub>7</sub>H<sub>10</sub>O<sub>6</sub> com os obtidos experimentalmente.

O espectro de IV apresenta duas bandas bem intensas e sobrepostas (deformação axial C=O) em 1760 e 1749 cm<sup>-1</sup>, referentes as duas carbonilas dos grupos éster do produto **54**; uma é característica da lactona e a outra da carbonila do grupo acila. A diminuição da intensidade da banda larga (deformação axial O-H, com ligações de hidrogênio intermolecular), presente no espectro da lactona **38** em 3500-3000 cm<sup>-1</sup>, e a presença de duas bandas de menor intensidade em 3476 e 3289 cm<sup>-1</sup>, são fortes evidências da acetilação do reagente **38** (**Figura 28**).



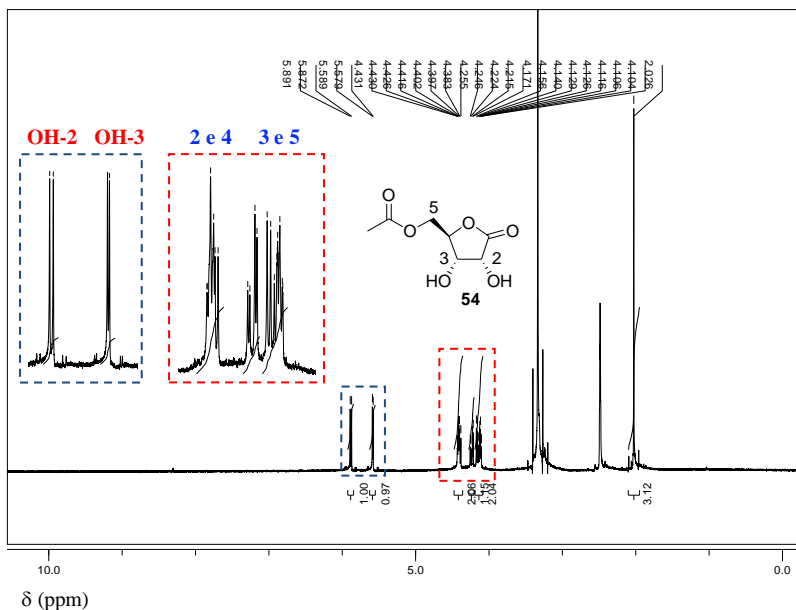
**Figura 28** – Espectro de IV do derivado monoacetilado **54** [pastilha de KBr].

A **Figura 29** mostra o espectro de RMN-<sup>1</sup>H do derivado **54** em DMSO-*d*<sub>6</sub>. Observa-se um singlete centrado em 2,03 ppm, relativo aos três hidrogênios da metila do grupo acila. Na região entre 4,0-4,5 ppm observa-se um conjunto de sinais referentes aos hidrogênios ligados aos carbonos 2, 3, 4 e 5 do anel da lactona, totalizando cinco hidrogênios. Salienta-se que a lactona de partida **38** (**Figura 23**, pag. 50) tem um multipletto centrado em 3,58 ppm, referente aos dois hidrogênios ligados ao carbono 5 do anel. No espectro do derivado **54** os mesmos hidrogênios têm seus sinais (dois duplos dubletos centrados em 4,12 e 4,23 ppm) deslocados aproximadamente 0,6 ppm. Este comportamento evidencia a acetilação na posição 5 do anel da lactona **38**.

Outros sinais que corroboram com esta afirmação são os dois dubletos centrados em 5,88 e 5,58 ppm relativos aos hidrogênios hidroxílicos das posições 2 e 3 do anel, respectivamente. No espectro da lactona **38** (**Figura 23**) estes dubletos estão centrados em 5,75 e 5,36 ppm, respectivamente. O tripleto centrado em 5,17 ppm, referente ao

hidrogênio hidroxílico da posição 5 do anel da lactona **38**, não é observado no espectro do derivado monoacetilado **54**. As ampliações referem-se aos sinais dos hidrogênios hidroxílicos e metilênicos do anel.

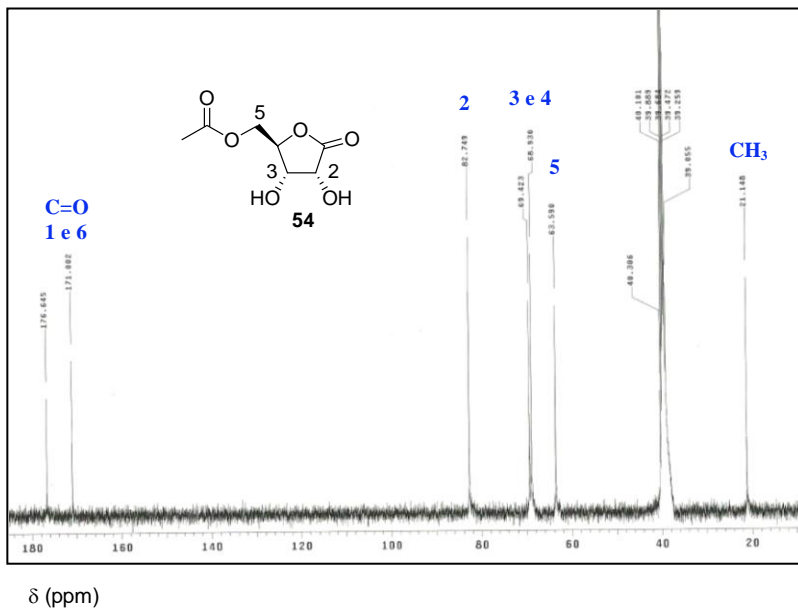
Repetindo a análise com a adição de uma pequena quantidade de D<sub>2</sub>O, os sinais dos hidrogênios hidroxílicos não foram mais observados. A análise de COSY (**Anexo 2**) auxiliou na atribuição de todos os sinais do espectro relativos aos hidrogênios do derivado **54**.



**Figura 29** – Espectro de RMN-<sup>1</sup>H do derivado monoacetilado **54** [DMSO-*d*<sub>6</sub>, 400 MHz].

No espectro de RMN-<sup>13</sup>C (**Figura 30**), em DMSO-*d*<sub>6</sub>, todos os sinais foram atribuídos aos respectivos carbonos do derivado monoacetilado **54**. O espectro foi comparado com o da lactona **38** no mesmo solvente (**Figura 23**, pag. 50). Os sinais desblindados em 176,6 e 171,0 ppm referem-se aos carbonos carbonílicos das funções lactona e éster, respectivamente. O sinal centrado em 63,6 ppm refere-se ao carbono primário da posição 5. Os sinais em 68,9 e 69,4 ppm foram atribuídos aos carbonos 3 e 4, e em 82,7 ppm ao carbono 2 do anel da

lactona. O sinal relativo ao grupo metila é observado em 21,1 ppm. A análise de DEPT (**Anexo 3**) auxiliou na atribuição dos sinais de  $^{13}\text{C}$  do derivado **54**.



**Figura 30** – Espectro de RMN- $^{13}\text{C}$  do derivado monoacetilado **54** [DMSO- $d_6$ , 100 MHz].

A análise de difração de raios X de uma amostra cristalina do derivado **54**, obtida após recristalização em acetona, também foi realizada em colaboração com o Prof. Dr. Adailton J. Bortoluzzi, certificando a acetilação regioseletiva na posição 5 do anel da lactona **38** (ORTEP, **Anexo 1**).

Os dados cristalográficos estão apresentados no **Anexo 1**. Salienta-se que a numeração atribuída aos átomos do derivado **54** no ORTEP não corresponde à ordem numérica dos átomos de carbono do anel da lactona **38** e de seus derivados acilados.

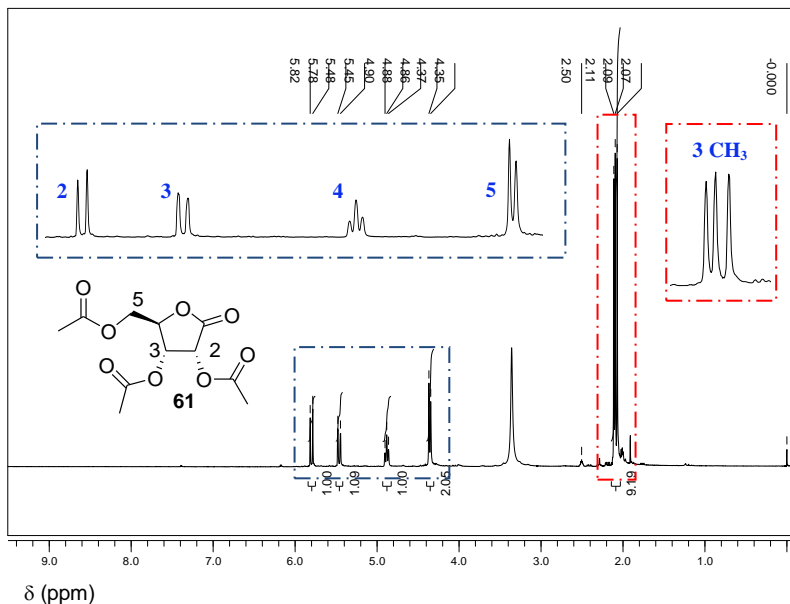
### 5.3 – Etanólise da 2,3,5-*O*-triacetil-D-ribonolactona **61**

As reações de desacetilação da lactona triacetilada **61** foram realizadas através de uma metodologia quimio-enzimática em duas etapas. Primeiramente, foi efetuada a peracetilação da D-ribonolactona **38** com anidrido acético e piridina (Py). Subsequentemente, a  $\beta$ -lactona **61** foi submetida a reações de transesterificação com etanol catalisada pela CAL-B. O produto majoritário obtido ao final das duas etapas foi a 2,3-*O*-diacetil-D-ribonolactona **63**.

A 2,3,5-*O*-triacetil-D-ribonolactona **61** foi preparada a partir da peracetilação de **38** com anidrido acético à temperatura ambiente, em agitação por 16 h<sup>114</sup> (metodologia adaptada da ref. 114 que emprega anidrido acético e solução aquosa de ácido perclórico 60%). Foi obtido um óleo amarelo com 60% de rendimento. A caracterização do produto **61** foi realizada por RMN-<sup>1</sup>H mostrando pureza > 98% (**Figura 31**).

Os singletos em 2,07, 2,09 e 2,11 ppm correspondem aos nove hidrogênios das metilas dos três grupos acetila do derivado triacetilado **61**. Os dubletos centrados em 5,80 e 5,46 ppm foram atribuídos aos hidrogênios das posições 2 e 3 do anel, respectivamente. Atribui-se ao hidrogênio ligado ao carbono 4 o tripleto em 4,88 ppm, e aos dois hidrogênios ligados ao carbono 5, o dubleto em 4,36 ppm.

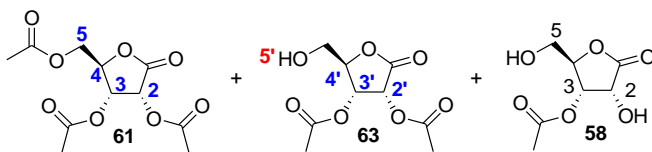
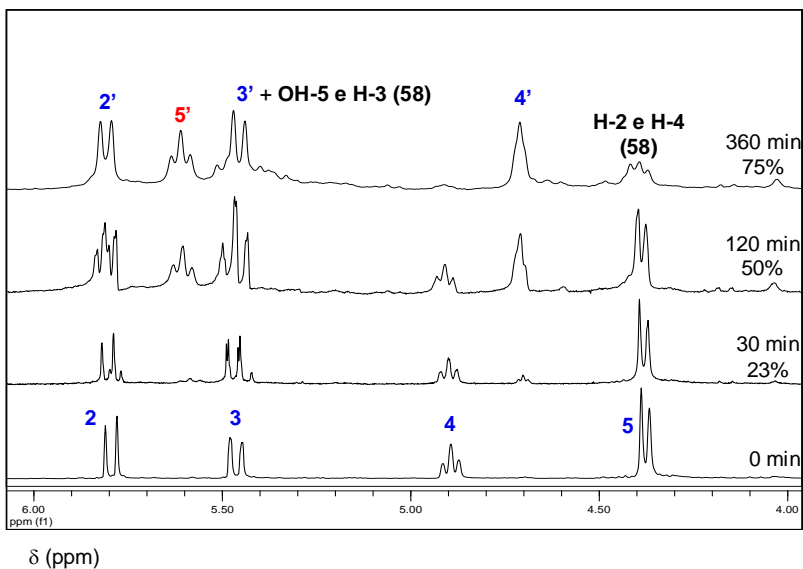
Relacionando os sinais do produto triacetilado **61** com os da lactona **38** (**Figura 23**, pag. 50), observa-se que todos os sinais referentes aos hidrogênios metilênicos deslocaram-se cerca de 1,0 ppm e os sinais dos hidrogênios hidroxílicos de **38** não são mais observados no espectro de **61**.



**Figura 311** – Espectro de RMN- $^1\text{H}$  do derivado triacetilado **61** [DMSO- $d_6$ , 200 MHz].

A subsequente solvólise da  $\gamma$ -lactona peracetilada **61** empregando 5,00 mL de etanol 95% como solvente/reagente e CAL-B a 35 °C formou a 2,3-*O*-diacetil-D-ribonolactona **63** como produto majoritário.

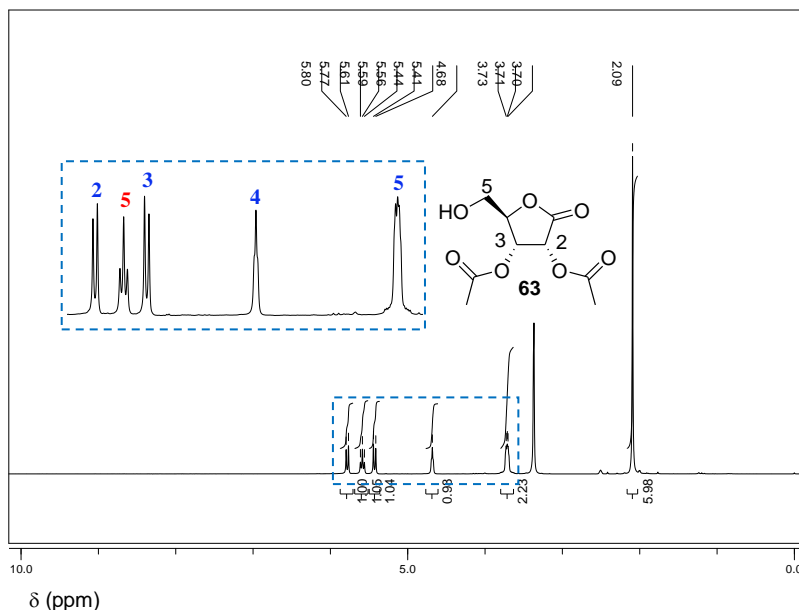
A **Figura 32** mostra a sobreposição das ampliações (4,0-6,0 ppm) dos espectros de RMN- $^1\text{H}$  de alíquotas da reação retiradas em 0, 30, 120 360 min, destacando os valores de conversão ao derivado **63** do lado direito dos espectros. O composto 3-monoacetilado **58** também foi detectado em pequenas quantidades (< 15%).



**Figura 32** – Espectros ampliados de RMN- $^1\text{H}$  de alíquotas da reação da etanolise do derivado **61** catalisada pela CAL-B [4,0-6,0 ppm, DMSO- $d_6$ , 200 MHz].

No início da reação (0 min) observam-se apenas os sinais referentes ao precursor **61**. Em 30 min os derivados **63** e **58** foram detectados com conversões de 23 e 3%, respectivamente. No tempo de 120 min os derivados **63** e **58** foram obtidos com 50 e 14% de conversão, respectivamente. Em 360 min quase todo composto **61** foi consumido, obtendo-se uma mistura de 75% do derivado **63** e 15% do derivado **58**.

O derivado **63** foi sintetizado *via* etanólise de **61** catalisada pela CAL-B em escala preparativa. Após 6 h, o biocatalisador foi filtrado e a lactona **63** separada do meio reacional por cromatografia em coluna conforme descrito no item 4.7.2. Foi obtido um óleo amarelo com rendimento de 60%. A **Figura 33** mostra o espectro de RMN-<sup>1</sup>H do derivado diacetilado **63**.

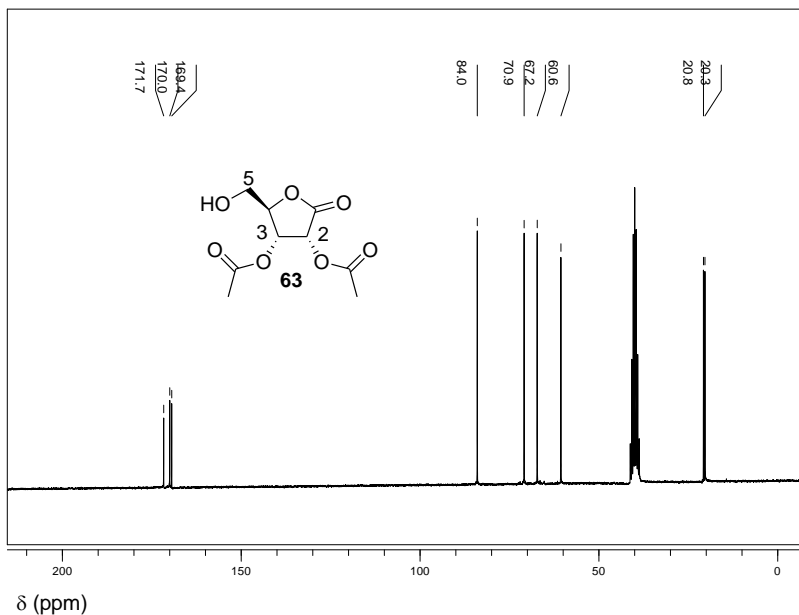


**Figura 33** – Espectro de RMN-<sup>1</sup>H do derivado diacetilado **63** [DMSO-*d*<sub>6</sub>, 200 MHz].

O singlete em 2,09 ppm refere-se aos seis hidrogênios das metilas dos dois grupos acetila. Os dubletos centrados em 5,78 e 5,43 ppm foram atribuídos aos hidrogênios ligados aos carbonos 2 e 3, e os multipletos em 4,68 e 3,71 ppm aos hidrogênios ligados aos carbonos 4 e 5, respectivamente. O triplete em 5,58 ppm foi atribuído ao hidrogênio hidroxílico **5**, não sendo mais observado após a adição de D<sub>2</sub>O.

Foi também realizada a análise de RMN-<sup>13</sup>C do derivado diacetilado **63** (**Figura 34**).





**Figura 34** – Espectro de RMN- $^{13}\text{C}$  do derivado diacetilado **63** [50 MHz, DMSO- $d_6$ ].

Os sinais referentes aos carbonos das metilas são observados em 20,3 e 20,8 ppm. Na região entre 60,6 e 84,0 ppm estão os sinais dos carbonos 2, 3, 4 e 5. Os três carbonos carbonílicos são observados em 169,4, 170,0 e 171,7 ppm.

A síntese do composto **63** ainda não foi reportada na literatura e esta metodologia simples e eficiente deverá ser aprimorada com relação à quantidade de CAL-B, o tipo de álcool e a fonte de biocatalisador.

No próximo subitem será descrito como foram identificados os derivados acetilados da lactona **38**, empregando a técnica de RMN- $^1\text{H}$ .

#### 5.4 – Determinação dos derivados acetilados da D-ribonolactona **38** por RMN-<sup>1</sup>H

O objetivo deste tópico é mostrar como foram identificados os derivados acetilados de **38** empregando RMN-<sup>1</sup>H. A apresentação dos espectros foi padronizada para facilitar a compreensão, seguindo algumas regras gerais:

1) Todas as análises foram realizadas empregando DMSO-*d*<sub>6</sub> como solvente. O sinal referente aos hidrogênios do DMSO e da água presente neste solvente estão em 2,5 e ~ 3,5 ppm, respectivamente;

2) Todas as ampliações foram feitas na região entre 3,0-6,5 ppm. Nesta região observam-se os hidrogênios ligados aos carbonos 2, 3, 4 e 5 do anel e também os hidrogênios hidroxílicos, tanto da lactona **38** como dos seus derivados acetilados. Portanto, os sinais dos hidrogênios do DMSO não são observados nesta faixa, nem os hidrogênios dos grupos metila, não menos importantes, que são observados como singlete, ou conjunto de singletos, em ~ 2 ppm;

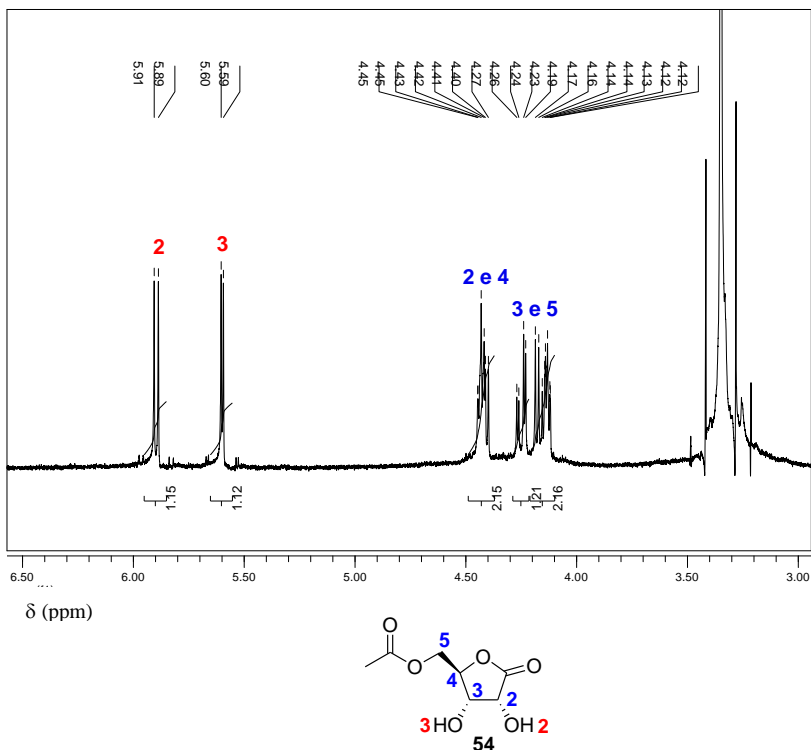
3) As atribuições dos sinais dos derivados acetilados foram realizadas por comparação com o espectro da lactona **38**, considerando os efeitos de desblindagem dos hidrogênios, decorrente da acetilação do(s) grupo(s) hidroxila;

4) Os hidrogênios metilênicos estão destacados em azul e os hidroxílicos destacados em vermelho nos espectros e nas estruturas de cada composto. Ambos estão representados por números que se referem à posição dos carbonos no anel que caracteriza o grupo ribonolactona.

A seguir serão mostradas as ampliações dos espectros de RMN-<sup>1</sup>H para os compostos identificados neste trabalho.

##### ➤ 5-*O*-acetil-D-ribo-1,4-lactona (**54**)

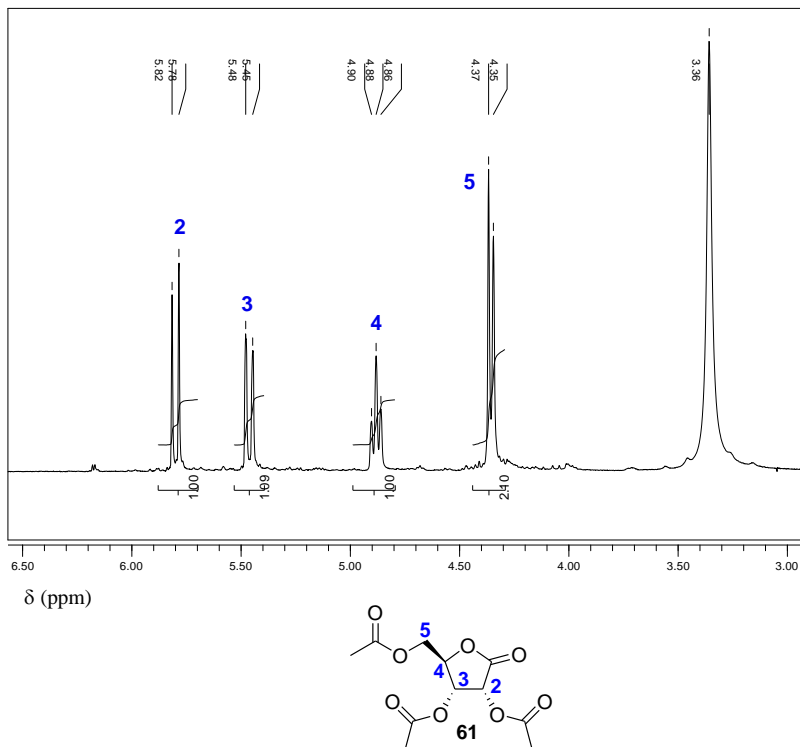
O derivado monoacetilado **54** foi sintetizado, isolado e caracterizado por RMN-<sup>1</sup>H, entre outras análises. Na ampliação do seu espectro (**Figura 35**), observam-se vários sinais relevantes para a sua caracterização, cujas atribuições aos respectivos hidrogênios metilênicos e hidroxílicos foram apresentadas no subitem 5.2.5.



**Figura 35** – Ampliação do espectro de RMN-<sup>1</sup>H do derivado monoacetilado **54** [3,0-6,5 ppm, DMSO-*d*<sub>6</sub>, 400 MHz].

### ➤ 2,3,5-*O*-triacetil-D-ribono-1,4-lactona (**61**)

O derivado triacetilado **61** foi preparado a partir da reação entre a D-ribonolactona **38** e anidrido acético, em piridina.<sup>115</sup> O produto foi tratado e caracterizado por RMN-<sup>1</sup>H, conforme descrito no item 5.3. A **Figura 36** mostra a ampliação do espectro de RMN-<sup>1</sup>H do derivado **61**.

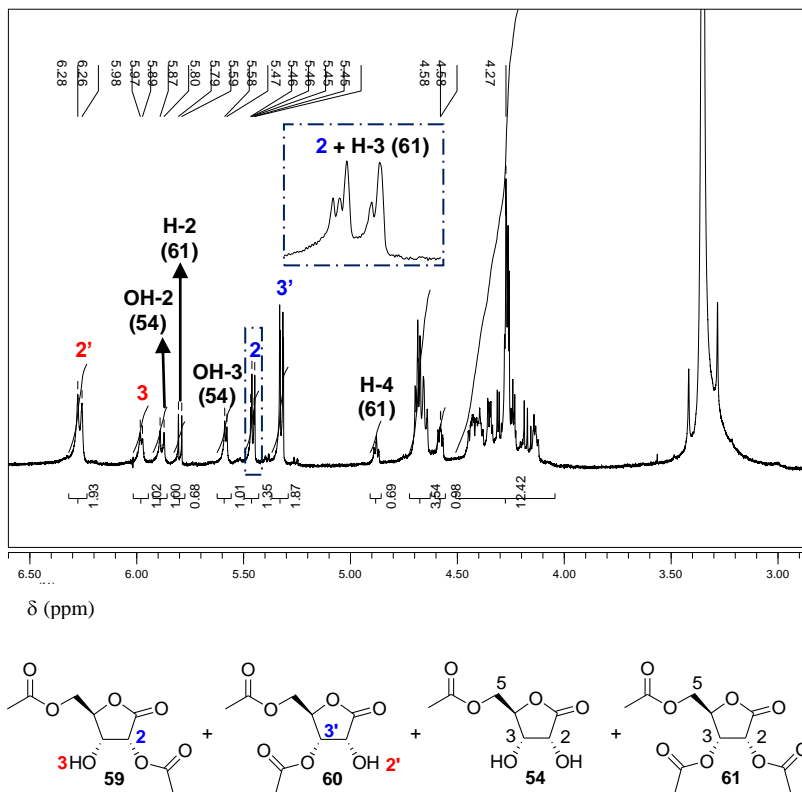


**Figura 36** – Ampliação do espectro de RMN-<sup>1</sup>H do derivado triacetilado **61** [3,0-6,5 ppm, DMSO-*d*<sub>6</sub>, 400 MHz].

➤ **2,5- (**59**) e 3,5-*O*-diacetil-D-ribono-1,4-lactona (**60**)**

Os compostos diacetilados **59** e **60** não foram isolados, mas identificados em uma mistura contendo também os derivados mono- **54** e peracetilado **61**. A mistura foi obtida na acetilação da D-ribonolactona **38** com acetato de vinila, empregando 60,0 mg de LPS-C como catalisador.

A **Figura 37** mostra a ampliação do espectro de RMN-<sup>1</sup>H de uma alíquota retirada em 24 h de reação.



**Figura 37** – Ampliação do espectro de RMN-<sup>1</sup>H da alíquota de 24 h da acetilação de **38** catalisada por LPS-C [3,0-6,5 ppm, DMSO-*d*<sub>6</sub>, 400 MHz].

A ausência de sinais na região entre 3,5-3,8 ppm descarta a formação dos derivados desacetilados na posição 5 do anel, excluindo também a presença da lactona de partida **38**, que foi toda transformada aos produtos (conversão total > 99%). Dos sete possíveis produtos de acetilação de **38** (**Figura 25**, pag. 53), restaram apenas os derivados **54**, **59**, **60** e **61**. Destes quatro, os derivados monoacetilado **54** e triacetilado **61** foram previamente isolados e atribuídos os sinais dos seus

hidrogênios no espectro de RMN-<sup>1</sup>H (**Figuras 35 e 36**). Estes sinais estão destacados no espectro da **Figura 37**.

Os dubletos centrados em 6,27 e 5,97 ppm foram atribuídos, respectivamente, aos hidrogênios hidroxílicos **3** e **2'** dos derivados **59** e **60**. Estes sinais não foram observados após a adição de D<sub>2</sub>O. A sobreposição dos sinais em 5,44 ppm foi atribuída aos hidrogênios ligados ao carbono **2** do derivado diacetilado **59** e ao carbono 3 do derivado triacetilado **61**. O duplo dubleto centrado em 5,30 ppm foi atribuído ao hidrogênio **3'** (ligado ao carbono 3) do derivado **60**.

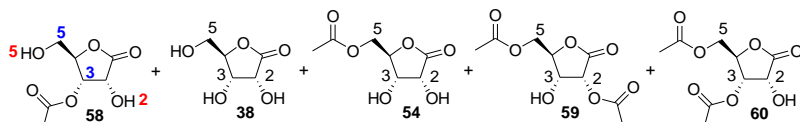
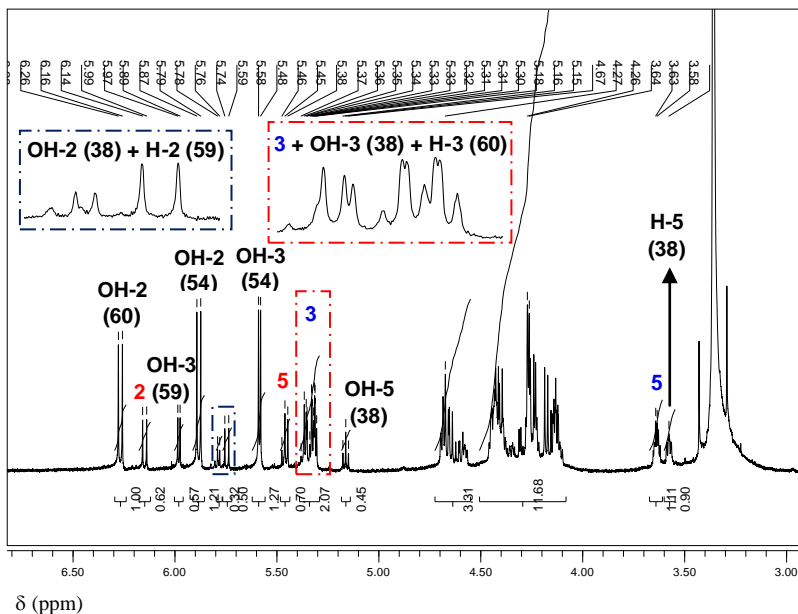
Desta mistura, foi possível por cromatografia em coluna (sílica gel 70-230 mesh), empregando diclorometano:hexano 1:1 como eluente, separar apenas o derivado triacetilado **54**. O espectro da mistura remanescente (**61+59+60**) está apresentado no **Anexo 4**. As análises de COSY desta nova mistura (**Anexo 5**) corroboram com as atribuições realizadas, mostrando correlação entre os sinais dos hidrogênios dos derivados diacetilados **59** e **60**.

### ➤ **3-O-acetil-D-ribono-1,4-lactona (58)**

O derivado monoacetilado **58** também não foi isolado, mas identificado pela análise de RMN-<sup>1</sup>H de uma alíquota da reação de acetilação da lactona **38** com acetato de vinila, catalisada pela LPS-C (**Figura 38**).

Em 6 h de reação observou-se a formação de uma mistura de produtos, os quais foram identificados como os derivados diacetilados **59** e **60** e os monoacetilados **54** e **58**. A lactona precursora **38** não foi completamente consumida, sendo identificados os sinais dos respectivos hidrogênios no espectro.

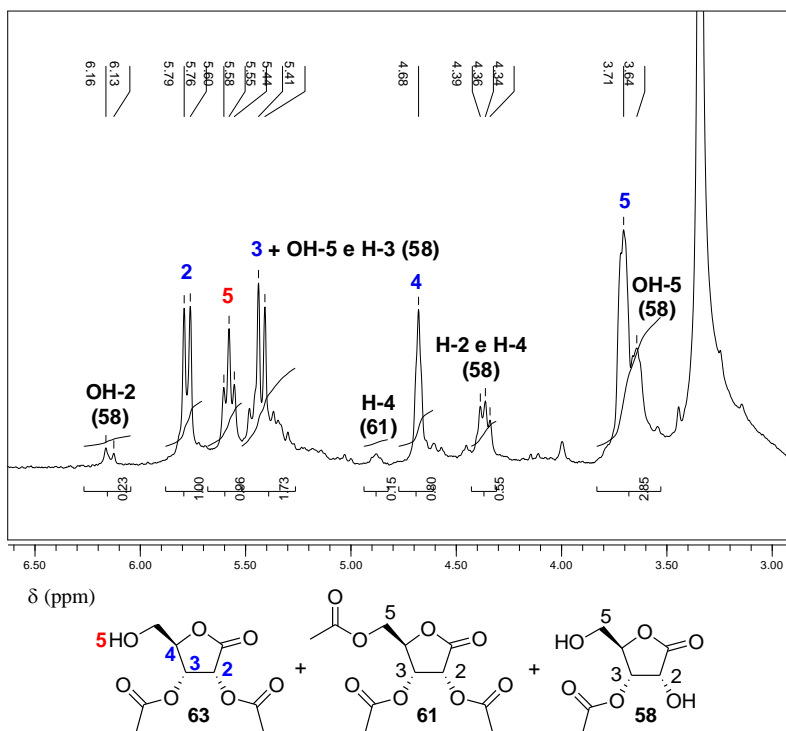
O dubleto e o tripleto centrados em 6,15 e 5,47 ppm foram atribuídos aos hidrogênios hidroxílicos **2** e **5** do derivado **58**, respectivamente. Estes sinais não foram mais observados após a adição de D<sub>2</sub>O. O sinal relativo ao hidrogênio **3** deste derivado está sobreposto aos do hidrogênio hidroxílico da posição 3 do anel de **38**, e ao metínico da posição 3 do derivado **60**, na região entre 5,30-5,38 ppm. O sinal referente ao hidrogênio **5** está centrado em 3,63 ppm.



**Figura 38** – Ampliação do espectro de RMN-<sup>1</sup>H de alíquota de 6 h de acetilação de **38** catalisada por LPS-C [3,0-6,5 ppm, DMSO-*d*<sub>6</sub>, 400 MHz].

### ➤ 2,3-*O*-diacetil-D-ribono-1,4-lactona (**63**)

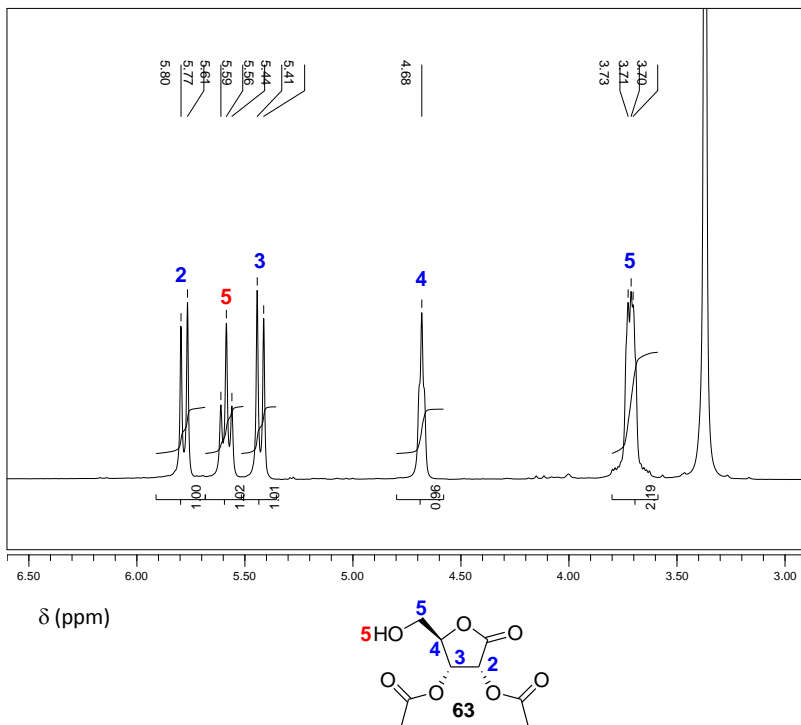
O derivado diacetilado **63** foi identificado pela análise de RMN-<sup>1</sup>H de uma alíquota retirada após 6 h de reação de etanolise do derivado triacetilado **61**, empregando CAL-B como catalisador (ver item 4.8.2). Uma mistura de produtos foi obtida e a lactona triacetilada **61** não foi totalmente consumida. Na ampliação do espectro foram atribuídos os sinais aos hidrogênios dos derivados diacetilado **63** e monoacetilado **58**, assim como um sinal correspondente ao triacetilado **61**. Os demais sinais referentes a **61** estão sobrepostos, e não puderam ser detectados (**Figura 39**).



**Figura 39** – Ampliação do espectro de RMN- $^1\text{H}$  de aliquota de 6 h da etanolíse de **61** catalisada pela CAL-B [3,0-6,5 ppm, DMSO- $d_6$ , 200 MHz].

Desta mistura, o derivado diacetilado **63** foi isolado, conforme descrito no item 5.3, e a **Figura 40** mostra a ampliação do espectro de RMN- $^1\text{H}$ .





**Figura 40** – Ampliação do espectro de RMN-<sup>1</sup>H do derivado diacetilado **63** [3,0-6,5 ppm, DMSO-*d*<sub>6</sub>, 200 MHz].

Considerando as atribuições apresentadas neste subitem, salienta-se que dos sete derivados acetilados de **38**, apenas o composto **64**, monoacetilado na posição 2 do anel, não foi detectado. Os outros derivados foram isolados, ou identificados em misturas de produtos.

Na **Figura 25** (pag. 53) estão destacados em azul os produtos que foram isolados, e em verde os que foram apenas identificados em misturas, porém não isolados. Portanto, neste trabalho foram detectados os derivados monoacetilados **54** e **58**, os diacetilados **59**, **60** e **63**, e o triacetilado **61**.

Outro aspecto relevante nos espectros apresentados é a relação entre os hidrogênios hidroxílicos com suas constantes de acoplamento (J). Os hidrogênios hidroxílicos das posições 2 do anel têm seus dubletos com J entre 7,6-8,0 Hz, enquanto os dubletos dos hidrogênios da posição 3 têm J entre 3,6-4,4 Hz. Estes valores diferentes de J são

devidos provavelmente à conformação do anel da lactona em solução, que orienta uma das hidroxilas na posição equatorial e a outra na axial, influenciando nos ângulos diedros (H-O-C-H) dos hidrogênios que acoplam entre si.<sup>116-119</sup>

### 5.5 – Quantificação dos derivados acetilados de **38** por RMN-<sup>1</sup>H

As conversões (%) aos derivados que compõem as misturas obtidas nas acetilações de **38** foram realizadas dividindo a integral média dos sinais correspondentes a determinado derivado ( $I_{md}$ ) pelo somatório das integrais médias dos outros derivados ( $\Sigma I_m$ ), conforme a **Equação 3**. Quando a lactona **38** for um dos componentes da mistura, a integral média dos seus respectivos sinais também faz parte do somatório.

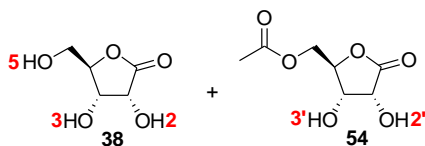
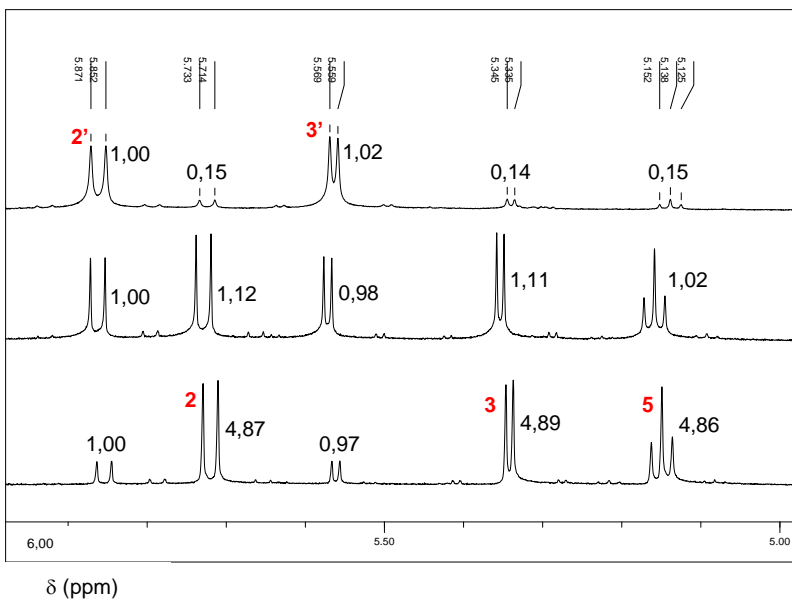
$$\text{Conv. (\%)} = [I_{m1} / (\Sigma I_m)] \times 100 \quad \text{Eq. 3}$$

Como exemplo, cita-se a determinação da conversão (%) ao derivado monoacetilado **54**. No subitem anterior observou-se que os hidrogênios hidroxílicos da lactona **38** (**Figura 23**, pag. 50), assim como do derivado **54** (**Figura 29**, pag. 64), possuem sinais bem destacados e com boa resolução no espectro de RMN-<sup>1</sup>H em DMSO-*d*<sub>6</sub>, na região compreendida entre 5 e 6 ppm.

Nesse caso, os cálculos de conversão consistem na razão entre as integrais médias ( $I_{m38}$ ) dos três sinais (dois dubletes e um triplete) dos três hidrogênios hidroxílicos (**2**, **3** e **5**) da lactona **38** e as integrais médias ( $I_{m54}$ ) dos dois dubletes referentes aos respectivos hidrogênios no produto **54** (**2'** e **3'**), conforme descrito na **Equação 4**.

$$\text{Conv. (\%)} = [I_{m38} / (I_{m38} + I_{m54})] \times 100 \quad \text{Eq. 4}$$

A **Figura 41** mostra as ampliações dos espectros de RMN-<sup>1</sup>H, entre 5 e 6 ppm, de três alíquotas da acetilação de **38** empregando acetato de vinila como doador de grupo acetila e CAL-B como catalisador. Os valores das integrais relativas estão descritas do lado direito de cada sinal. Neste exemplo, as conversões ao derivado **54** foram de 17, 47 e 87% em 1, 3 e 24 h, respectivamente.



**Figura 39** – Ampliações dos espectros de RMN-<sup>1</sup>H de alíquotas da reação de acilação de **38** com acetato de vinila catalisada pela CAL-B [5,0-6,0 ppm, DMSO-*d*<sub>6</sub>, 400 MHz ] .

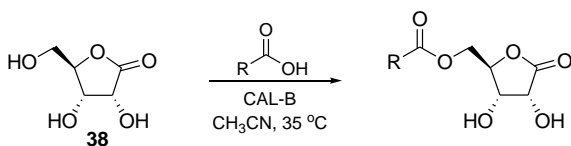
## 5.6 – Acilação regioseletiva da lactona **38** catalisada por lipases e micélios

A lactona **38** foi submetida a reações de acilação variando os doadores acila, as lipases (ou micélios) e os solventes orgânicos empregados.

Os derivados 5-*O*-acil-D-ribonolactonas foram os únicos detectados, com destaque para o produto 5-*O*-dodecanoil-D-ribonolactona **55** que foi isolado e caracterizado pelas análises de IV, RMN-<sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C e CHN.

### 5.6.1 – Efeito do doador de grupo acila na acilação de **38** com ácidos carboxílicos e aminoácidos

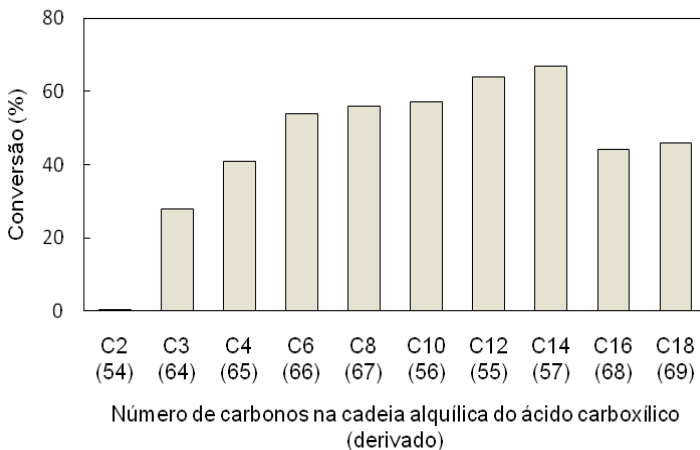
Devido à importância biológica associada a ésteres graxos de carboidratos,<sup>120,121</sup> a metodologia de acilação da D-ribonolactona **38** catalisada pela CAL-B foi primeiramente adaptada para uma série de ácidos carboxílicos saturados. A **Figura 42** mostra os ácidos empregados como doadores acila neste estudo, e os respectivos produtos acilados na posição 5 do anel.



Derivado	R	Derivado	R	Derivado	R
<b>54</b>	CH <sub>3</sub>	<b>55</b>	CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>10</sub>	<b>56</b>	CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>8</sub>
<b>57</b>	CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>12</sub>	<b>64</b>	CH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub>	<b>65</b>	CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub>
<b>66</b>	CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub>	<b>67</b>	CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>6</sub>	<b>68</b>	CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>14</sub>
<b>69</b>	CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>16</sub>				

**Figura 40** – Acilação regioseletiva da D-ribonolactona **38** catalisada pela CAL-B.

A **Figura 43** mostra as conversões aos derivados 5-*O*-acil-D-ribonolactonas em função do tamanho da cadeia alquílica dos ácidos carboxílicos usados como doadores acila.



**Figura 41** – Influência do tamanho da cadeia alquílica do ácido carboxílico na acilação regioseletiva de **38** [**38** (0,50 mmol), doador de grupo acila (1,50 mmol), acetonitrila (10,0 mL), CAL-B (10,0 mg), 35 °C, 150 rpm, 24 h].

Os resultados mostram que as acilações foram regioseletivas, obtendo-se exclusivamente os correspondentes ésteres de açúcar 5-acilados da  $\gamma$ -lactona **38**.

As conversões foram dependentes do comprimento da cadeia alquílica do doador de grupo acila empregado. Como discutido anteriormente (subitem 5.2.4), não foi observada a formação de produtos quando ácido acético foi utilizado. Quando os ácidos propiônico e butírico foram empregados os respectivos ésteres **64** e **65** foram obtidos com conversões de 28% e 38%.

Elevadas conversões foram obtidas (50-67%) utilizando os ácidos carboxílicos de cadeias alquílicas lineares com seis, oito, dez, doze e quatorze carbonos, obtendo-se os respectivos derivados 5-acilados **55-57**, **66** e **67**. No entanto, foi observada uma diminuição das conversões quando os ácidos hexadecanóico (C16) e octadecanóico (C18) foram utilizados, formando os correspondentes ésteres **68** e **69** com 41 e 46% de conversão, respectivamente. As menores conversões nestes casos podem ser devidas a efeitos estéricos, bem como a redução na solubilidade destes ácidos carboxílicos em acetonitrila. Estes resultados estão de acordo com alguns dados previamente reportados, que mostram que a CAL-B tem alta atividade empregando ácidos

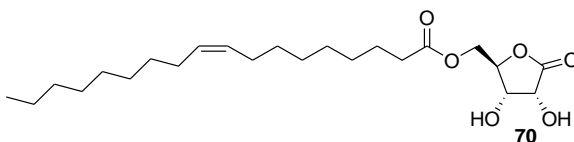
carboxílicos e ésteres de cadeia curta e média, porém baixa atividade com ácidos graxos e ésteres de cadeias longas.<sup>122-124</sup>

Portanto, a variedade de doadores acila que são compatíveis com a CAL-B faz deste biocatalisador uma ferramenta versátil para acilações regioseletivas. Além disso, o emprego de ácidos carboxílicos acarreta a geração de água como único subproduto, o que torna esta metodologia ainda mais ambientalmente correta.<sup>1-3</sup>

No entanto, as tentativas de acilar a lactona **38** empregando a CAL-B com ácidos carboxílicos funcionalizados, tais como os ácidos benzóico, fenilacético, gálico e mandélico, bem como os aminoácidos glicina, D,L-alanina e L-cisteína, nas mesmas condições experimentais acima descritas, não foram profícuas, mesmo após 72 h de reação.

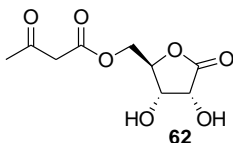
Sabe-se que a CAL-B não é um catalisador adequado para a esterificação de açúcares com ácidos insaturados ou arilalifáticos como o ácido cinâmico e seus derivados, os derivados de ácidos benzóicos, derivados fenólicos e os ácidos carboxílicos  $\alpha$ -substituídos, com algumas exceções. Uma possível razão para estes resultados é que a presença de grupos volumosos (efeito estérico) e/ou polares influencia negativamente na eficiência da reação.<sup>125</sup>

Os ácidos insaturados 4-pentenóico, citronélico, linoléico e oléico também foram empregados como doadores acila para a lactona **38** e CAL-B como catalisador. Destes quatro, não foi detectada a formação de produtos utilizando os ácidos 4-pentenóico, citronélico e linoléico. Porém, o derivado 5-*O*-oleil-D-ribonolactona (**70**) foi detectado como único produto na acilação de **38** com ácido oléico catalisada por CAL-B. A conversão foi de 70% em 48 h. O composto **70** possui uma insaturação, sendo um precursor em potencial para preparação de outros derivados, o que o torna uma molécula promissora do ponto de vista sintético (**Figura 44**).



**Figura 42** – Estrutura da 5-*O*-oleil-D-ribonolactona (**70**).

Adicionalmente, a CAL-B foi também utilizada como catalisador na acetilação de **38** (0,50 mmol) com acetoacetato de etila, obtendo-se regiosseletivamente o derivado 5-*O*-acetoacetyl-D-ribonolactona (**62**) (**Figura 45**).



**Figura 43** – Estrutura da 5-*O*-acetoacetyl-D-ribonolactona (**62**).

A reação foi realizada em uma etapa, utilizando a mesma metodologia usada para o estudo da influência dos doadores acetila (subitem 5.2.4). O produto **62** foi obtido com 28% de conversão em 24 h, empregando 3 equiv. de acetoacetato de etila. Utilizando um excesso considerável deste agente acilante (200 equiv.) a conversão foi de 50% em 24 h.

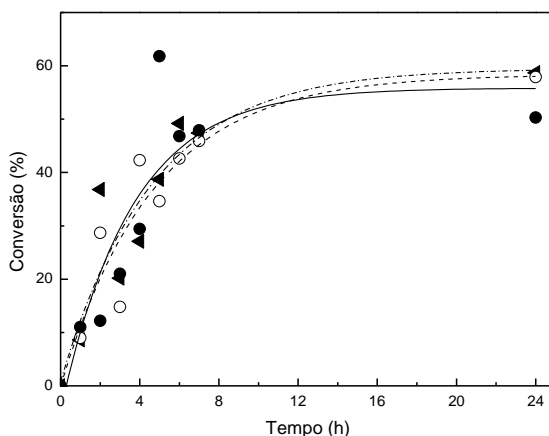
Embora as conversões para o produto **62**, empregando a CAL-B tenham sido relativamente baixas, esta metodologia é bastante simples em comparação com a desenvolvida por Bigham *et al.*, que usa reagentes tóxicos como diceteno, piridina e benzeno, 3 dias de reação e protocolos de proteção e desproteção obtendo rendimento global baixo (49% apenas na etapa de acilação). O derivado **62** pode ter aplicações úteis em química orgânica sintética como precursor de compostos biologicamente ativos, sendo testado por Bigham *et al.* como inibidor da A5P isomerase. Este é o único trabalho que reporta a obtenção deste composto.<sup>96</sup>

### 5.6.1.1 – Acilação de 38 com ácidos carboxílicos em função do tempo

Os ácidos carboxílicos reagem com bases de Arrhenius *via* reação de neutralização, formando o respectivo sal e água. O ponto de equivalência da reação pode ser acompanhado utilizando um indicador ácido-base apropriado. Em uma reação na qual um ácido carboxílico é um dos reagentes pode-se, em geral, acompanhar o seu progresso por titulação volumétrica do ácido.<sup>99</sup>

Neste estudo, efetuaram-se reações de acilação da lactona **38** com o ácido decanóico empregando CAL-B como biocatalisador. As concentrações dos ácidos foram determinadas por titulação volumétrica com solução aquosa de KOH (0,010 mol/L) e fenolftaleína como indicador.<sup>99</sup> Considerando que 1,0 equivalente da lactona **38** reage com 1,0 equivalente do ácido, as conversões (%) ao derivado 5-*O*-decanoil-D-ribonolactona (**56**) foram quantificadas através do consumo do ácido no meio reacional.

Primeiramente, o ácido decanóico (2,00 mmol) foi utilizado como doador de grupo acila para a lactona **38** (2,00 mmol), variando a massa de CAL-B (50,0, 75,0 e 100 mg) em acetonitrila. A **Figura 46** mostra as conversões ao derivado **56** em função do tempo.



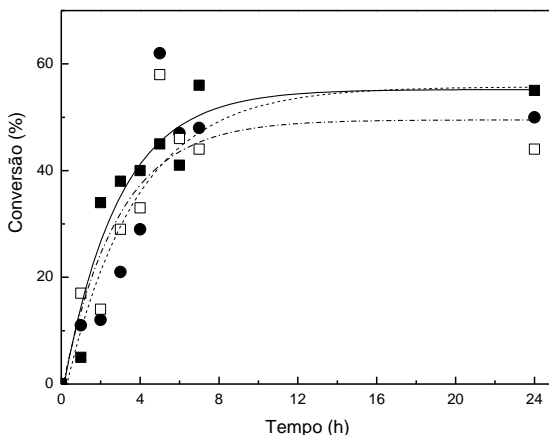
**Figura 44** – Conversões ao derivado **56** em função do tempo e massa de CAL-B [**38** (2,00 mmol), ácido decanóico (2,00 mmol), CAL-B (25,0 (◄), 75,0 (○) e 100 mg (●)), acetonitrila (25,0 mL), 35 °C, 150 rpm].



Não foi observada dependência significativa nas conversões com o acréscimo da quantidade de catalisador. A maior conversão (62%) foi obtida empregando 100 mg de CAL-B em 5 h de reação.

As análises de RMN-<sup>1</sup>H confirmaram a formação do produto 5-*O*-decil-D-ribonolactona (**56**), evidenciando a regioseletividade da CAL-B nesta reação. Após 6 h, as conversões mantiveram-se praticamente constantes (50-60%).

Para verificar o efeito do solvente, a acilação de **38** com ácido decanóico foi realizada nas mesmas condições, empregando 100 mg de CAL-B e acetona ou clorofórmio no lugar de MeCN. As conversões ao composto **56** utilizando estes solventes não variaram significativamente em comparação com as obtidas em acetonitrila. Após 7 h, as conversões permaneceram constantes empregando ambos os solventes (40-60%) (**Figura 47**).



**Figura 45** – Conversão ao derivado **56** em função do tempo e do solvente orgânico [**38** (2,00 mmol), ácido decanóico (2,00 mmol), CAL-B (100 mg) e acetonitrila (●), clorofórmio (□) ou acetona (■) (25,0 mL), 35 °C, 150 rpm].

Estes dados mostraram a viabilidade de se utilizar o método de titulação volumétrica para determinar as conversões (%) aos derivados 5-monoacilados da lactona **38**. Salienta-se que dependendo do doador de grupo acila, diferentes métodos podem ser utilizados tais como RMN-<sup>1</sup>H e medidas de absorção no UV-Vis. Este último método será discutido no item 5.7.

## 5.6.2 – Quantificação dos derivados monoacilados de **38** por RMN-<sup>1</sup>H

Em alguns dos espectros de RMN-<sup>1</sup>H dos derivados 5-monoacilados de **38** não foram detectados os sinais dos hidrogênios hidroxílicos descritos no item 5.1.2. Entretanto, as conversões nestes produtos foram obtidas pela análise de outra região do espectro, referente aos hidrogênios do anel da lactona, tanto do substrato como dos produtos (entre 3,5-4,5 ppm).

Os sinais dos dois hidrogênios ligados ao carbono 5 do anel dos derivados monoacilados sobrepõem-se aos referentes aos outros hidrogênios, tanto da lactona **38** como do próprio produto. Logo, o seguinte procedimento foi realizado para efetuar os cálculos de conversão:

1) Integração de duas regiões distintas do espectro: uma centrada em 3,56 ppm, referente aos dois hidrogênios metilênicos da lactona **38** (**5**), e a outra entre 4,0-4,5 ppm, referente ao somatório dos outros três hidrogênios do anel da lactona **38** (**2**, **3** e **4**) com os cinco hidrogênios respectivos do produto monoacilado (**2'**, **3'**, **4'** e **5'**);

2) Denominando a integral da primeira região do espectro de **I<sub>1</sub>** e a da segunda de **I<sub>2</sub>**, têm-se o seguinte sistema de equações (**Equações 5** e **6**), onde **H** e **H'** representam um hidrogênio da lactona **38** e do produto, respectivamente, e **I<sub>1</sub>** e **I<sub>2</sub>** referem-se aos valores numéricos das integrais calculadas no espectro.

$$\begin{cases} I_1 = 2H & \text{Eq. 5} \\ I_2 = 3H + 5H' & \text{Eq. 6} \end{cases}$$

3) Resolvendo o sistema de **Equações 5** e **6**, determina-se a relação entre **H** e **H'** através da **Equação 7**.

$$I_1 + I_2 = 5H + 5H' \text{ ou } H' = [(I_1 + I_2) - 5H]/5 \quad \text{Eq. 7}$$

4) Como **H** = ½ **I<sub>1</sub>**, através da **Equação 8** pode-se calcular **H'**.

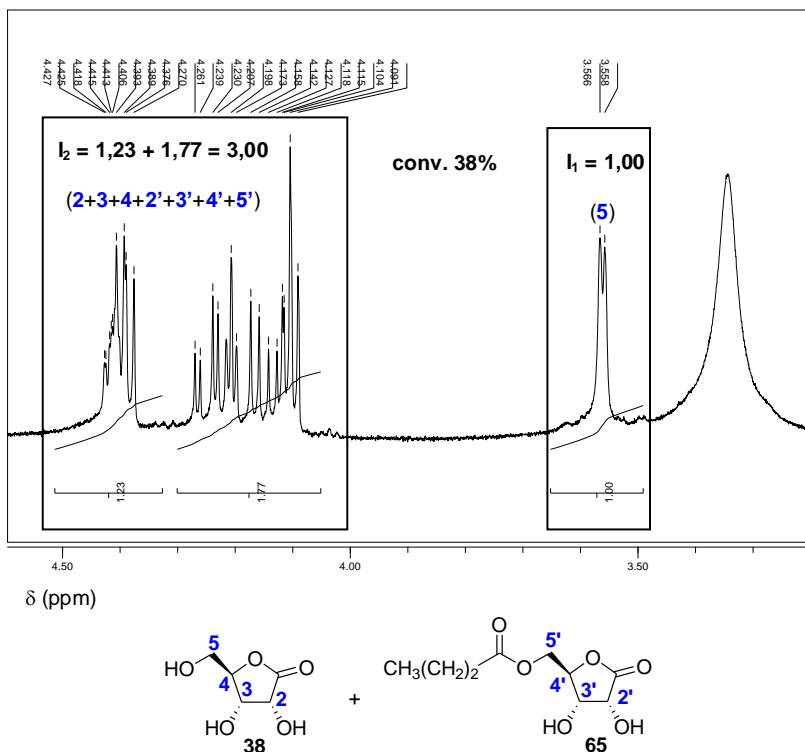
$$H' = [(I_1 + I_2) - 5(\frac{1}{2} I_1)]/5 \quad \text{Eq. 8}$$

5) Finalmente, calcula-se a conversão (%) ao produto empregando a **Equação 9**.

$$\text{Conv. (\%)} = \frac{[\text{H}']}{(\text{H} + \text{H}')} \times 100$$

Eq. 9

A **Figura 48** mostra a ampliação do espectro de RMN-<sup>1</sup>H (3,2-4,6 ppm) de uma alíquota da reação de acilação de **38** catalisada pela CAL-B, empregando o ácido butírico como doador de grupo acila. As regiões citadas acima, que correspondem a **I<sub>1</sub>** e **I<sub>2</sub>** assim como seus respectivos valores, estão destacados no espectro. Neste exemplo ilustrativo obteve-se 38% de conversão ao produto 5-*O*-butil-D-ribonolactona (**65**). Destaca-se que este método se restringe a análise de derivados acilados na posição 5 do anel da lactona **38**.



**Figura 46** – Ampliação do espectro de RMN-<sup>1</sup>H do produto da acilação de **38** com ácido butírico catalisada pela CAL-B [3,2-4,6 ppm, DMSO-*d*<sub>6</sub>, 400 MHz].

### 5.6.3 – Avaliação de biocatalisadores na acilação de **38** com ácido dodecanóico

Devido às boas conversões e à alta seletividade obtidas empregando o ácido dodecanóico, este foi selecionado como doador de grupo acila para avaliar o uso de lipases e micélios nestas reações

Nove lipases, livres ou imobilizadas industrialmente, e dois micélios oriundos de fungos da região amazônica foram avaliados com relação a sua reatividade e regiosseletividade na acetilação da lactona **38** com ácido dodecanóico.

Após 48 h de reação nenhum produto foi obtido empregando as lipases RM-IM, LPS, LPS-C, LPS-D, LCR, TL-IM, AK, F-AP15, assim como com os micélios UEA\_53 e UEA\_115.

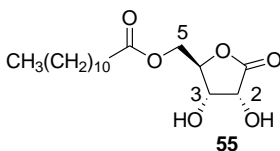
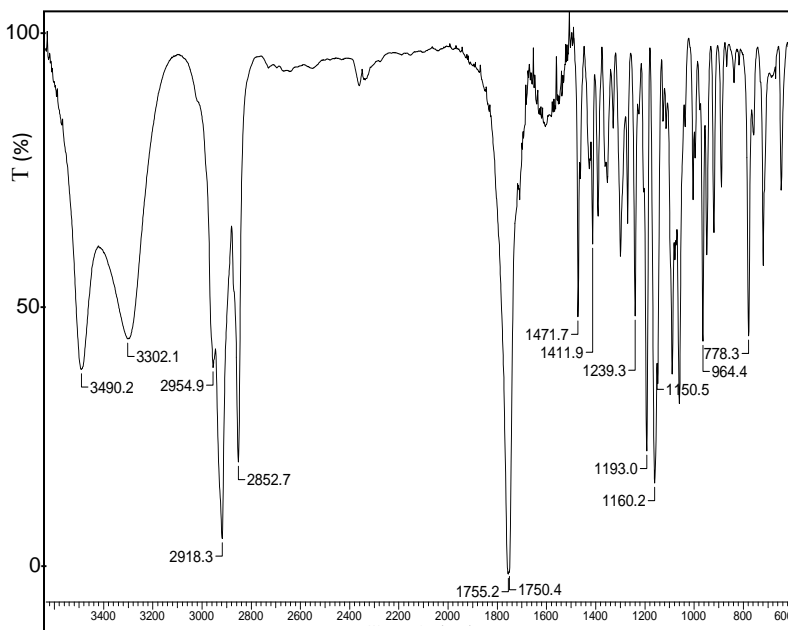
Apenas empregando a CAL-B obteve-se, como apresentado no subitem 5.5.1, a formação do derivado monoacilado **55** com 64% de conversão. A partir destes resultados, optou-se por utilizar a CAL-B nos estudos subsequentes que envolvem a síntese do derivado **55**, reutilização do biocatalisador e acilações com alcanóatos de *p*-nitrofenila.

### 5.6.4 – Síntese, purificação e caracterização da 5-O-dodecanoil-D-ribonolactona (**55**)

Devido aos bons resultados obtidos nas reações de acilação de **38** empregando o ácido dodecanóico e CAL-B, optou-se por sintetizar o derivado monoacilado **55** em maiores quantidades. A síntese foi realizada em uma etapa utilizando CAL-B como catalisador e quantidades equimolares (3,10 mmol) da  $\beta$ -lactona **38** e do ácido dodecanóico. Após 24 h de reação, e recristalização em uma mistura 1:1 de etanol/éter etílico, foi obtido um sólido branco e amorfo, com 68% de rendimento. O produto **55** foi caracterizado através das análises de IV, RMN-<sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C, e CHN.

O espectro de IV é similar ao obtido para o derivado monoacetilado **54**, com exceção das bandas referentes às várias ligações C-C e C-H da lactona **55**. As bandas de deformação axial simétrica e assimétrica C-H bem intensas, devido à cadeia linear extensa, estão presentes na região entre 2955 e 2853 cm<sup>-1</sup>. As de deformação axial O-H das ligações de hidrogênio intermolecular estão presentes em 3430 e

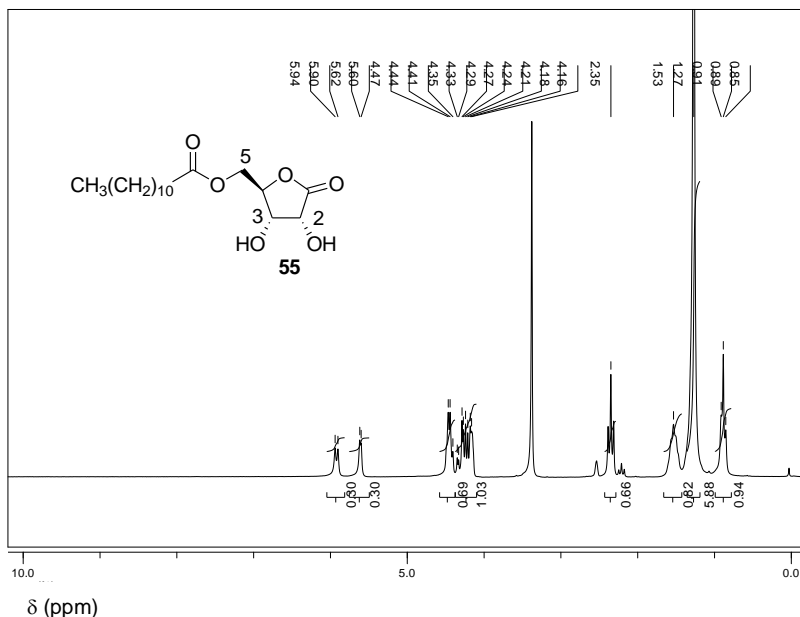
3302  $\text{cm}^{-1}$ . As bandas de deformação axial C=O são observadas em 1755 e 1750  $\text{cm}^{-1}$  (**Figura 49**).



**Figura 49** – Espectro de IV do derivado monoacetilado **55** [pastilha de KBr].

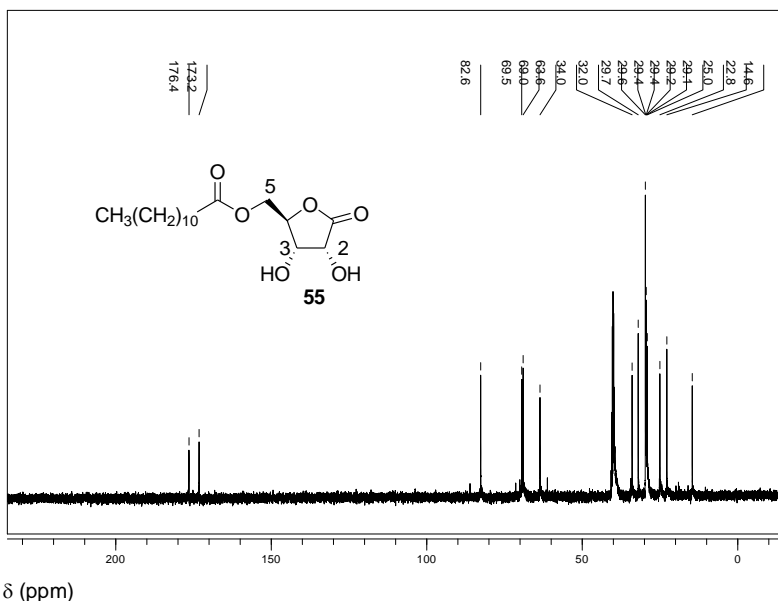
No espectro de RMN- $^1\text{H}$  do derivado **55** em DMSO- $d_6$  observam-se três multipletos centrados em 0,85, 1,24 e 1,49 ppm, além de um tripleto em 2,32 ppm, referentes aos vinte e três hidrogênios da cadeia alquílica do grupo dodecanoil. O multipletto entre 4,11-4,20 ppm refere-se aos dois hidrogênios da posição 5 do anel da lactona, estando deslocado cerca de 0,5 ppm do respectivo sinal na lactona **38**, conforme esperado. Os sinais referentes aos hidrogênios hidroxílicos das posições 3 e 2 do anel estão centrados em 5,60 e 5,91 ppm, respectivamente,

sendo trocados pela adição de uma pequena quantidade de D<sub>2</sub>O (**Figura 50**).



**Figura 47** – Espectro de RMN-<sup>1</sup>H do derivado monoacilado **55** [DMSO-*d*<sub>6</sub>, 400 MHz].

No espectro de RMN-<sup>13</sup>C em DMSO-*d*<sub>6</sub> (**Figura 51**), os sinais referentes aos onze carbonos da cadeia alquílica do grupo acil são observados na região entre 14,6 e 34,0 ppm. Os sinais relativos aos carbonos secundários do anel da lactona estão entre 69,0 e 82,6 ppm, e o referente ao carbono 5 em 63,6 ppm. Os sinais em 173,2 e 176,4 ppm referem-se aos carbonos carbonílicos das funções lactona e éster.



**Figura 48** – Espectro de RMN- $^{13}\text{C}$  do derivado monoacetilado **55** [DMSO- $d_6$ , 100 MHz].

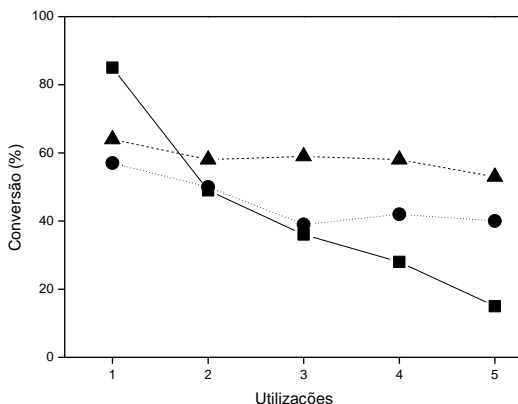
Na análise elementar do derivado **55** não se observou discrepância entre os valores obtidos experimentalmente e os calculados para C (%) e H (%) relativos à fórmula molecular  $\text{C}_{17}\text{H}_{30}\text{O}_6$  (ver subitem 4.5.3).

### 5.7 – Reutilização da CAL-B na acilação de **38**

A reutilização de enzimas imobilizadas é uma propriedade importante de alguns sistemas biocatalíticos, podendo determinar a sua viabilidade econômica. Neste estudo a CAL-B foi utilizada em cinco ciclos subsequentes na acilação de **38** empregando acetato de vinila e os ácidos decanóico e dodecanóico como doadores acila.

Ao final de cada uso, a lipase imobilizada foi removida do meio reacional por filtração e lavada com acetonitrila, para remover qualquer traço do substrato ou produto retido na superfície do catalisador. Na etapa subsequente, os substratos e o catalisador recuperado foram adicionados a um novo meio de reação e, ao final de cada reação, a

conversão determinada por análise de RMN-<sup>1</sup>H. Os resultados são apresentados na **Figura 52**.



**Figura 492** – Efeito do reuso da CAL-B na acilação de **38** com acetato de vinila (■) em 6 h de reação, e com os ácidos decanoico (●) e dodecanoico (▲) em 24 h [38 (0,50 mmol), doador de grupo acila (1,50 mmol), CAL-B (10,0 mg), acetonitrila (10,0 mL), 35 °C, 150 rpm].

Empregando acetato de vinila a conversão a **54** diminuiu após cada reutilização, atingindo um valor de 15% no quinto ciclo. Embora tenha sido demonstrado que acetato de vinila é um doador de grupo acetila adequado para a acetilação de **38**, a presença de quantidades significativas de acetaldeído (gerado como subproduto da sua transesterificação) pode diminuir a atividade catalítica ou inativar a lipase. Os grupos amino, que são essenciais para essa atividade, podem reagir por condensação formando os grupos imina (bases de Schiff), inviabilizando assim a aplicação do catalisador em ciclos consecutivos.<sup>126</sup> Outra possível causa da desativação da enzima pode estar relacionada à hidrólise do acetato de vinila, gerando ácido acético, que também pode ser prejudicial ao biocatalisador como observado e descrito no subitem 5.1.6.

Satisfatoriamente, o uso dos ácidos decanoico e dodecanoico como doadores acila conduziu a uma manutenção razoável da atividade do biocatalisador após cada reuso, viabilizando desta forma a sua reutilização por até cinco ciclos consecutivos. As conversões



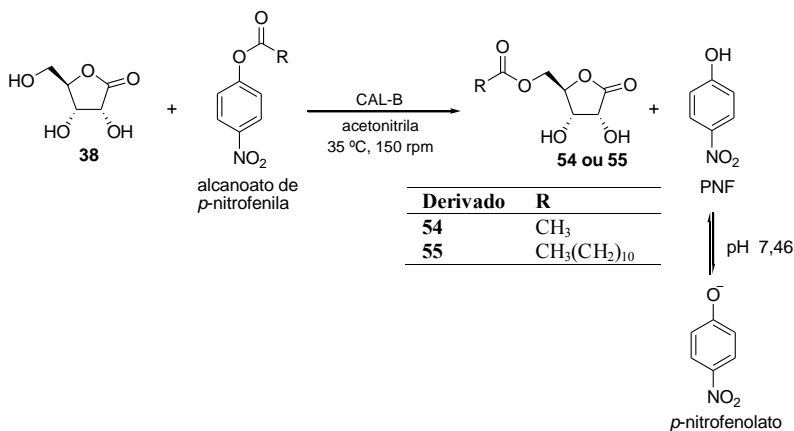
empregando o ácido decanoico foram de 57-39%. Utilizando o ácido dodecanoico as conversões ao derivado **55** foram relativamente maiores em cada uso (64-53%). Além de gerar água como subproduto, estes ácidos carboxílicos de cadeia longa não são tóxicos para as lipases e, portanto podem ser usados sem qualquer precaução adicional.

### 5.8 – Acilação da lactona **38** com alcanoatos de *p*-nitrofenila

Alcanoatos de *p*-nitrofenila quando hidrolisados ou transesterificados com compostos hidroxilados (por exemplo, álcoois ou carboidratos) liberam *p*-nitrofenol (PNF), que em meio ligeiramente básico ( $\text{pH} \geq 7,2$ ) ioniza-se parcialmente formando o ânion *p*-nitrofenolato. Esse íon, por sua vez, absorve na região de 405-410 nm (UV-Vis) do espectro eletromagnético e pode ser utilizado para quantificar as concentrações dos seus respectivos alcanoatos, através de medidas de absorbância.<sup>119</sup>

Neste estudo, efetuaram-se reações de transesterificação do acetato de *p*-nitrofenila (APNF) e do dodecanoato de *p*-nitrofenila (DPNF), empregando a lactona **38** como nucleófilo e a CAL-B como biocatalisador em acetonitrila (**Figura 53**). As conversões (%) aos produtos 5-*O*-acetil-D-ribonolactona (**54**) ou 5-*O*-dodecanoil-D-ribonolactona (**55**) foram determinadas por meio de medidas de absorção no UV-Vis (410 nm) em função do tempo.

Os coeficientes estequiométricos da reação implicam que 1,0 equivalente de lactona **38** reage com 1,0 equivalente de alcanoato de *p*-nitrofenila, formando 1,0 equivalente de produto monoacilado e 1,0 equivalente de PNF (ou *p*-nitrofenolato em  $\text{pH} 7,46$ ); o pH do meio foi controlado utilizando tampão de Mellvaine<sup>99</sup> (fosfato dissódico 0,200 mol/L / ácido cítrico 0,100 mol/L). Portanto, o aumento nos valores de absorbância é diretamente proporcional ao consumo de **38** e, conseqüentemente, à formação dos derivados monoacilados **54** ou **55**.

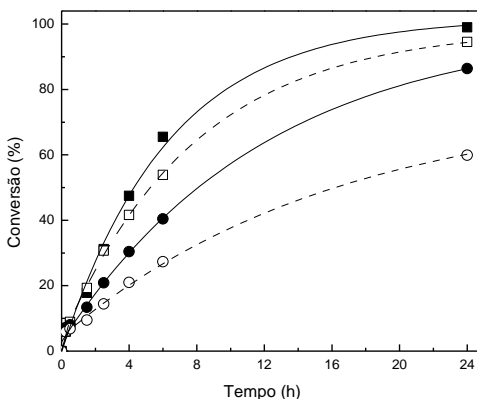


**Figura 50** – Acilação de **38** com alcenoatos de *p*-nitrofenila catalisada pela CAL-B.

Primeiramente, o doador de grupo acetila APNF foi usado variando-se as quantidades nas razões de 1:1, 1,5:1, 2:1, 3:1 em relação à lactona **38** (0,20 mmol), na presença de CAL-B (10,0 mg).

Salienta-se que nestas reações o APNF pode tanto reagir com a lactona **38**, formando o derivado monoacetilado **54**, como ser hidrolisado pela água presente na acetonitrila, liberando ácido acético (HOAc). Em ambos os casos há a formação de *p*-nitrofenol (PNF). De fato, foram realizados experimentos na ausência da lactona **38** que comprovaram a hidrólise do APNF. Por outro lado, a reação na ausência de **38** com a adição de peneira molecular mostrou a diminuição na formação de PNF oriundo da hidrólise do APNF. Para diminuir o erro experimental causado pela hidrólise competitiva do APNF, a acetonitrila foi seca em CaH<sub>2</sub> e as absorbâncias corrigidas com relação às obtidas nas reações na ausência de **38**.

A **Figura 54** mostra as conversões ao derivado **54** determinadas em função do tempo e da quantidade de APNF empregada.

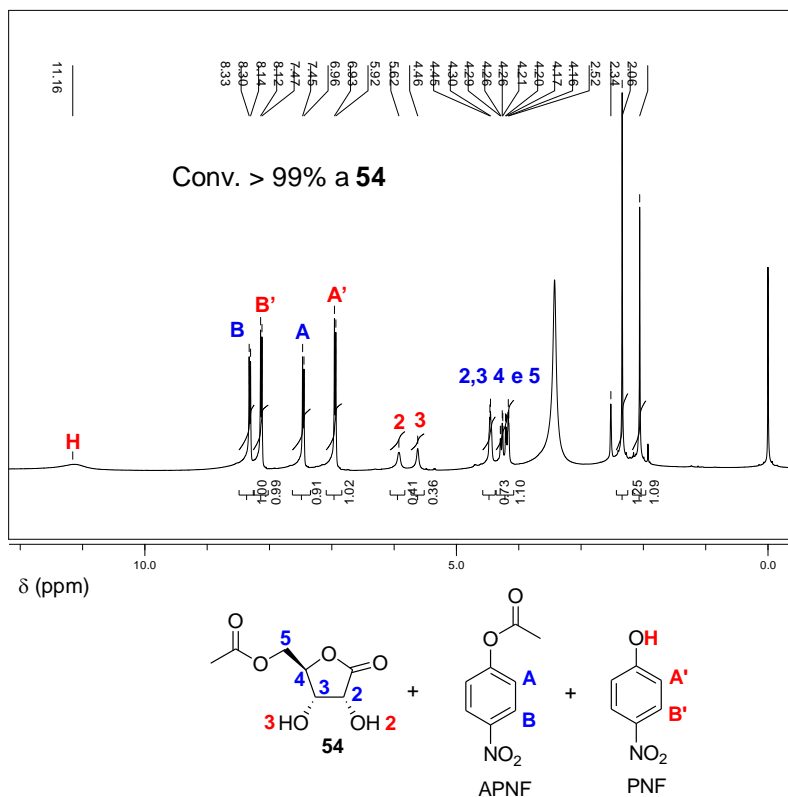


**Figura 51** – Conversão ao derivado **54** em função do tempo e quantidade de APNF [38 (0,20 mmol), APNF (1,0 equiv. (■), 1,5 equiv. (□), 2,0 equiv. (●) e 3,0 equiv. (○)), CAL-B (10,0 mg), acetonitrila (20,0 mL), 35 °C, 150 rpm].

As conversões ao PNF foram dependentes do aumento da quantidade de APNF. Em 24 h obtiveram-se conversões > 99, 94, 87 e 60% para as razões **38**:APNF de 1:1, 1:1,5, 1:2 e 1:3, respectivamente.

Em paralelo, foram realizadas análises de RMN-<sup>1</sup>H de alíquotas das reações. Apesar da hidrólise do APNF dificultar o seu uso para determinação das conversões (%) ao derivado **54** por UV-Vis, as análises de RMN-<sup>1</sup>H mostraram que a reação de acetilação empregando APNF e CAL-B foi regioselectiva.

A **Figura 55** mostra o espectro de RMN-<sup>1</sup>H da alíquota (após evaporar as substâncias voláteis) da reação de acetilação de **38** empregando 3 equiv. de APNF em 24 h.



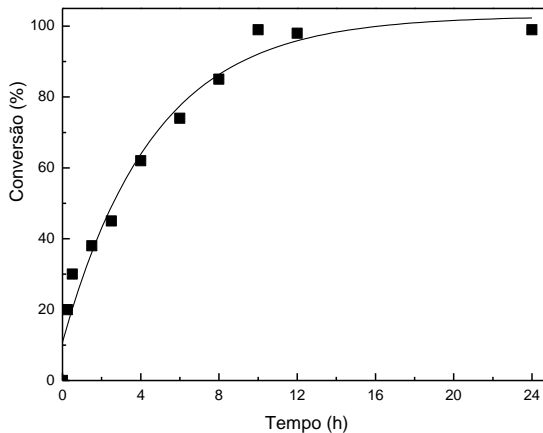
**Figura 52** – Espectro de RMN-<sup>1</sup>H da alíquota da reação de acetilação de **38** com APNF catalisada pela CAL-B em 24 h [DMSO-*d*<sub>6</sub>, 400 MHz].

A conversão ao composto **54** foi > 99%, não sendo detectados outros produtos. Os dubletos centrados em 7,46 e 8,32 ppm foram atribuídos aos hidrogênios aromáticos (**A** e **B**) do APNF, enquanto os dubletos em 6,95 e 8,13 ppm são referentes aos hidrogênios aromáticos (**A'** e **B'**) do PNF, respectivamente. O sinal referente ao hidrogênio lábil do PNF também foi detectado em 11,2 ppm (assinalado em vermelho).

As conversões (> 99%) determinadas por RMN-<sup>1</sup>H e por UV-Vis foram similares, mostrando a viabilidade do uso dos dois métodos para quantificar a formação do PNF e do derivado monoacetilado **54**.

Na sequência, o DPNF (0,30 mmol, 1,5 equiv.) foi utilizado como doador de grupo acila na reação de acilação de **38** (0,20 mmol) catalisada pela CAL-B em acetonitrila. Os experimentos na ausência da

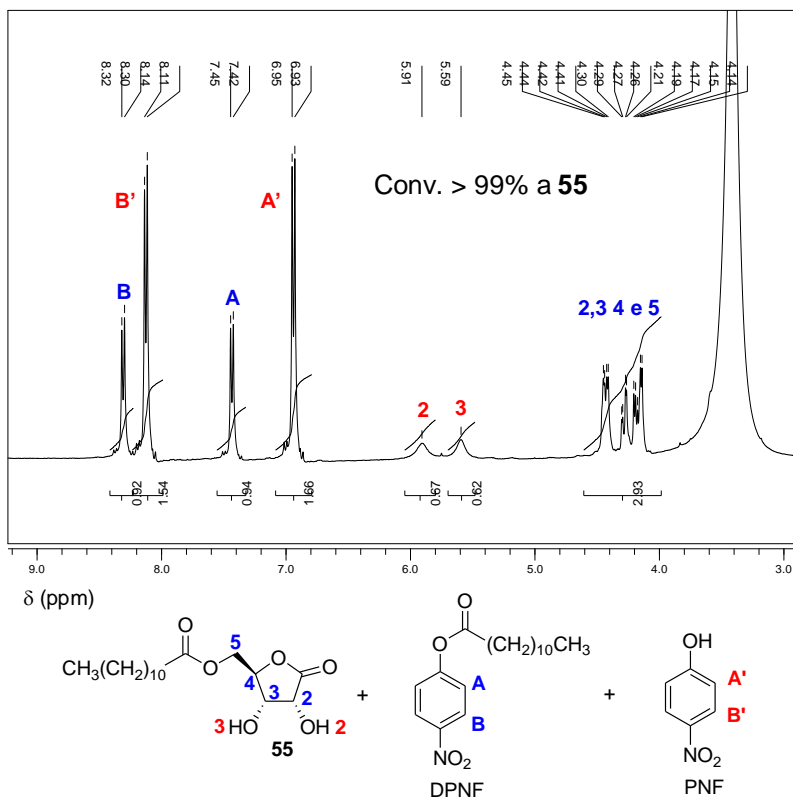
lactona **38** (branco) mostraram que o DPNF também foi hidrolisado (5-20%), sendo realizadas correções das conversões ao composto **55**. A **Figura 56** mostra os valores de conversão (%) em função do tempo.



**Figura 53** – Conversões ao derivado **55** em função do tempo [**38** (0,20 mmol), DPNF (0,30 mmol), CAL-B (10,0 mg), acetonitrila (20,0 mL), 35 °C, 150 rpm].

Foram obtidas boas conversões (> 60%) a partir de 4 h de reação, sendo estas > 98% a partir de 10 h.

As análises de RMN-<sup>1</sup>H mostraram que apenas o produto monoacilado **55** foi formado. A **Figura 57** refere-se à ampliação do espectro de RMN-<sup>1</sup>H de uma alíquota retirada após 10 h de reação. Neste tempo toda lactona **38** foi convertida ao produto monoacilado **55** (conv. > 99%). Houve correlação entre o valor obtido por análise de UV-Vis e por RMN-<sup>1</sup>H.



**Figura 54** – Ampliação do espectro de RMN- $^1\text{H}$  da alíquota da reação de acilação de **38** com DPNF (1,5 equiv.) catalisada pela CAL-B em 10 h [3,0-9,0 ppm,  $\text{DMSO-}d_6$ , 400 MHz].

Salienta-se que empregando o ácido dodecanóico como doador de grupo acila (subitem 5.2.1) a conversão ao derivado **55** foi de 64% em 24 h, enquanto com DPNF a conversão foi quantitativa em apenas 10 h, o que evidencia a alta reatividade deste composto. A regioseletividade da CAL-B foi mantida ao utilizar ambos doadores acila.

Portanto, a quantificação por medidas de absorção no UV-Vis é um método viável para a determinação das conversões (%) aos derivados 5-monoacilados da  $\gamma$ -lactona **38**, empregando alcanoatos de *p*-

nitrofenila e CAL-B. Entretanto, deve-se secar o solvente orgânico para evitar a reação competitiva de hidrólise.

## 6 – CONCLUSÕES

Os resultados obtidos no presente trabalho permitiram obter as seguintes conclusões:

Foram desenvolvidas metodologias enzimáticas para a preparação regioseletiva de derivados acilados da D-ribonolactona **38**, utilizando condições reacionais simples, reagentes de baixo custo e acessíveis, com bons rendimentos e/ou conversões;

Foram identificados seis derivados acetilados, dos sete possíveis de serem obtidos, através de reações de acetilação da lactona **38** e etanolise da lactona **38** peracetilada, catalisadas por lipases. Os derivados detectados por RMN-<sup>1</sup>H foram os monoacetilados 5- **54**, 3-*O*-acetil-D-ribolactona **58**, os diacetilados 2,5- **59**, 3,5- **60** e 2,3-*O*-diacetil-D-ribolactona **63**, bem como a 2,3,5-*O*-triacetil-D-ribolactona **61**. Apenas o derivado monoacetilado 2-*O*-acetil-D-ribolactona não foi detectado;

Na acetilação de **38** com acetato de vinila, o composto monoacetilado **54** foi obtido majoritariamente utilizando as lipases CAL-B (> 85%), Lipozyme TL-IM (16-85%), AK (10-12%), LPS-C (19-46%), LPS-D (10-29%) e o micélio UEA\_115 (8-41%);

A utilização simultânea de CAL-B e LPS-C, e CAL-B e AK, não alterou a regioseletividade na reação de acetilação de **38** com acetato de vinila, sendo observada a formação majoritária do derivado monoacetilado **54** (17-75%) e de pequenas quantidades de **58**, **59** e **60** (7-26%).

As técnicas de UV-Vis e titulação volumétrica foram eficientes para quantificar as conversões aos derivados acilados de **38**, apresentando boa correlação com as determinadas po RMN-<sup>1</sup>H;

Boas conversões (61-72%) e alta regioseletividade (> 99%), ao derivado 5-monoacetilado **54**, foram obtidas utilizando como solventes acetona, acetonitrila e THF na acetilação de **38** catalisada pela CAL-B com acetato de vinila como doador de grupo acetila;

O produto monoacetilado **54** foi seletivamente obtido com conversão de 85% empregando apenas 10,0 mg de CAL-B na acetilação regioseletiva de **38** com acetato de vinila em acetonitrila tratada;

Alta regioseletividade e boas conversões (23 a > 99%) ao derivado **54** foram obtidas empregando como doadores acetila o acetato de vinila, acetato de etila, acetato de isopropenila e anidrido acético, nas



proporções de 3:1 e 200:1, na acetilação de **38** catalisada por CAL-B em acetonitrila tratada;

Três derivados acilados de **38** foram sintetizados e devidamente caracterizados, empregando a CAL-B como biocatalisador, sendo estes:

- a 5-*O*-acetil-D-ribonolactona **54**: *via* acetilação regioseletiva com acetato de vinila, com 94% de rendimento em 24 h;

- a 2,3-*O*-diacetil-D-ribonolactona **63**: *via* etanólise regioseletiva do composto triacetilado **61**, com 60% de rendimento em 6 h;

- a 5-*O*-dodecanoil-D-ribonolactona **55**: *via* acilação regioseletiva de **38** com ácido dodecanóico, com 68% de rendimento em 24 h.

As acilações catalisadas pela CAL-B foram regioseletivas usando ácidos carboxílicos de cadeia linear (C2-C18). As conversões aos correspondentes derivados 5-acilados da  $\beta$ -lactona **38** foram dependentes do comprimento da cadeia alquílica do doador de grupo acila. As maiores conversões (50-67%) foram obtidas utilizando os ácidos carboxílicos com seis, oito, dez, doze e quatorze carbonos;

A CAL-B foi reutilizada em cinco ciclos consecutivos sem perda considerável da atividade empregando os ácidos decanóico e dodecanóico na acilação da lactona **38**;

Finalmente, salienta-se a importância do uso de biocatalisadores para a obtenção de compostos em condições brandas, boas conversões e alta regioseletividade.

## 7 – PERSPECTIVAS

A partir dos resultados obtidos tem-se como perspectiva:

- Adaptar as metodologias enzimáticas desenvolvidas neste trabalho para outros substratos tais como nucleosídeos e carboidratos;
- Realizar testes biológicos com os derivados da lactona **38** obtidos neste trabalho, em parceria com outros departamentos especializados;
- Realizar estudos computacionais de RMN-<sup>1</sup>H para calcular as constantes de acoplamento (J) dos sinais referentes aos hidrogênios hidroxílicos e metilênicos da lactona **38** e seus derivados acetilados. Os resultados deverão ser comparados com os obtidos experimentalmente, visando obter um perfil conformacional do anel destes compostos e as suas implicações nos valores de J;
- Aperfeiçoar as condições experimentais empregadas na etanólise do derivado triacetilado **61**, tais como o efeito da massa de CAL-B, o emprego de outras lipases e tipos de álcoois;
- Preparar outros derivados peracilados de **38** empregando, por exemplo, cloretos de ácido e realizar a etanólise catalisada pela CAL-B e outras lipases. Estes experimentos poderão suprir a necessidade de estender as metodologias deste trabalho para derivados contendo grupos aromáticos;
- Ampliar os estudos de utilização de micélios de fungos da região amazônica, tendo como premissa os resultados promissores obtidos com o micélio UEA\_115;
- Desenvolver um método enzimático de obtenção de derivados triacetilados da lactona **38**.

## 8 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 - Anastas, P. T.; *Tetrahedron*, 66, 1026, **2010**.
- 2 - a) Tucker, J. L.; *Org. Proc. Res. Dev.*, 10, 315, **2006**; b) Tucker, J. L.; *Org. Proc. Res. Dev.*, 14, 328, **2010**.
- 3 - a) Clark, J. H.; *Green Chem.*, 8, 17, **2006**; b) Constable, D. J. C.; Dunn, P. J.; Hayler, J. D.; Humphrey, G. R.; Leazer, J. L. Jr.; Linderman, R. J.; Lorenz, K.; Manley, J.; Pearlman, B. A.; Wells, A.; Zaksh, A.; Zhang, T. Y.; *Green Chem.*, 9, 411, **2007**.
- 4 - Durand, J.; Teuma, E.; Gómez, M.; *C. R. Chimie*, 10, 152, **2007**.
- 5 - Paljevac, M.; Primožič, M.; Habulin, M.; Novak, Z.; Knez, Z.; *J. Supercrit. Fluids*, 43, 74, **2007**.
- 6 - a) Caddick, S.; Fitzmaurice, R.; *Tetrahedron*, 65, 3325, **2009**; b) Horchani, H.; Chaâbouni, M.; Gargouri, Y.; Sayari, A.; *Carbohydr. Polym.*, 79, 466, **2010**.
- 7 - Nelson, D. L.; Cox, M. M.; Lehninger: Principles of Biochemistry, 3<sup>rd</sup> Edition, **Worth Publishers**, Caps. 3 e 6, 113-152, **2000**.
- 8 - Cabral, J. M. S.; Aires-Barros, M. R.; Gama, M.; **Engenharia Enzimática**, 1<sup>a</sup> Edição, Lidel Edições Técnicas Ltda, 2003.
- 9 - Berg, J. M.; Tymoczko, J. L.; Stryer, L.; Biochemistry, 5<sup>th</sup> Edition, **Freeman**, Cap. 3, **2002**.
- 10 - Solomons, T. W. G.; **Organic Chemistry**, 6<sup>th</sup> Edition, John Wiley & Sons Inc., Cap. 24, 1142-1183, 1996.
- 11 - Carey, F. A.; **Organic Chemistry**, 4<sup>th</sup> Edition, Mc Graw Hill, McGraw-Hill Higher Education, Cap.27, 2000.
- 12 - Campbell, M. K.; **Biochemistry**, 2<sup>nd</sup> Edition, Saunders College Publishing, Cap. 3, 4, 5 e 6, 68-172, **1995**.
- 13 - Radzicka, A.; Wolfenden, R.; *Science*, 267 (90), 5194, **1995**.
- 14 - Cygler, M.; Schrag, J. D.; *Biochim. Biophys. Acta*, 1441, 205, **1999**.
- 15 - **International Union of Biochemistry and Molecular Biology** (<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb>), acessado em 14/12/2010.
- 16 - a) Swiss Protein Data Bank Viewer (<http://www.rcsb.org/pdb/>); b) PDB Sun (<http://www.ebi.ac.uk/pdbsum>), **acessados em 14/12/2010**.
- 17 - Faber, K.; **Biotransformations in Organic Chemistry**, 3<sup>rd</sup> Edition, Springer-Verlag, New York, Cap. 1 e 2, 1-116, 1997.
- 18 - Marsaioli, A. J.; Porto, A. L. M.; **Biocatálise e Biotransformação: Fundamentos e Aplicações**, 1<sup>a</sup> Edição, Editora Schoba Ltda, 2010.
- 19 - Mateo, C.; Palomo, J. M.; Fernandez-Lorente, G.; Guisan, J. M.; Fernandez-Lafuente, R.; *Enzyme Microb. Technol.*, 40, 1451, **2007**.

- 20 - Villeneuve, P.; Muderhwa, J. M.; Graille, J. M.; Haas, J.; *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, 9, 113, **2000**.
- 21 - Sebrão, D.; Silva, V. D.; Nascimento, M. G.; Moreira, M. A.; *Quim. Nova*, 30, 1182, **2007**.
- 22 - Cui, Y.; Li, Y.; Yang, Y.; Liu, X.; Lei, L.; Zhou, L.; Pan, F.; *J. Biotechnol.*, 150, 171, **2010**.
- 23 - Li, Y.; Gao, F.; Wei, W.; Qu, J.-B.; Ma, G.-H.; Zhou, W.-Q.; *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, 66, 182, **2010**.
- 24 - Zoumpantioti, M.; Stamatis, H.; Xenakis, A.; *Biotechnol. Adv.*, 28, 395, **2010**.
- 25 - Lee, S. H.; Doan, T. T. N.; Won, K.; Ha, S. H.; Koo, Y.-M.; *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, 62, 169, **2010**.
- 26 - Kato, K.; Seelan, S.; *J. Biosci. Bioeng.*, 109, 615, **2010**.
- 27 - Zou, B.; Hu, Y.; Yu, D.; Xia, J.; Tang, S.; Liu, W.; Huang, H.; *Biochem. Eng. J.*, 53, 150, **2010**.
- 28 - Wu, Y.; Wang, Y.; Luo, G.; Dai, Y.; *Bioresour. Technol.*, 101, 841, **2010**.
- 29 - Boscolo, B.; Trotta, F.; Ghibaudi, E.; *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, 62, 155, **2010**.
- 30 - Vikartovská, A.; Bučko, M.; Mislovičová, D.; Pätoprstý, V.; Lacík, I.; Gemeiner, P.; *Enzyme Microb. Technol.*, 41, 748, **2007**.
- 31 - Torabi, S.-F.; Khajeh, K.; Ghasempur, S.; Ghaemi, N.; Siadat, S.-O. R.; *J. Biotechnol.*, 131, 111, **2007**.
- 32 - Coultate, T. P.; **Food – The Chemistry of its Components**, Royal Society of Chemistry Paperbacks, London, 1988.
- 33 - Sgarbieri, V. C.; *Proteínas em Alimentos Proteicos: Propriedades, Degradações, Modificações*, Livraria Varela Ltda, São Paulo-SP, 1996.
- 34 - Carvalho, P. O.; Campos, P. R. B.; Noffs, M. D.; *Quim. Nova*, 26, 75, **2003**.
- 35 - Sharma, R.; Chisti, Y.; Banerjee, U. C.; *Biotechnol. Adv.*, 19, 627, **2001**.
- 36 - Sharma, J.; Batovska, D.; Kuwamori, Y.; Asano, Y.; *J. Biosci. Bioeng.*, 100, 662, **2005**.
- 37 - Hedfors, C.; Hult, K.; Martinelle, M.; *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, 66, 120, **2010**.
- 38 - Thvedt, T. H. K.; Fuglseth, E.; Sundby, E.; Hoff, B. H.; *Tetrahedron*, 66, 6733, **2010**.
- 39 - Debbeche, H.; Toffano, M.; Fiaud, J.-C.; Aribi-Zouioueche, L.; *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, 66, 319, **2010**.

- 40 - Araujo, D. M. F.; Vieira, G. A. B.; Mattos, M. C.; Lemos, T. L. G.; Oliveira, M. C. F.; Melo, V. M. M.; Gonzalo, G.; Gotor-Fernández, V.; Gotor, V.; *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, 61, 279, **2009**.
- 41 - Reddipalli, G.; Venkataiah, M.; Fadnavis, N. W.; *Tetrahedron: Asymmetry*, 21, 320, **2010**.
- 42 - Oliveira, E. B.; Humeau, C.; Chebil, L.; Maia, E. R.; Dehez, F.; Maigret, B.; Ghoul, M.; Engasser, J.-M.; *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, 59, 96, **2009**.
- 43 - Quan, J.; Chen, Z.; Han, C.; Lin, X.; *Bioorg. Med. Chem.*, 15, 1741, **2007**.
- 44 - Pérez-Victoria, I.; Morales, J. C.; *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, 48, 8, **2007**.
- 45 - Palocci, C.; Falconi, M.; Alcaro, S.; Tafi, A.; Puglis, R.; Ortuso, F.; Botta, M.; Alberghina, L.; Cernia, E.; *J. Biotechnol.*, 128, 908, **2007**.
- 46 - Chen, Z. G.; Tan, R. X.; Huang, M.; *Process Biochem.*, 45, 415, **2010**.
- 47 - Li, X.-F.; Zong, M.-H.; Zhao, G.-L.; *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 20, 4125, **2010**.
- 48 - a) Pilissão, C.; Carvalho, P. O.; Nascimento, M. G.; *Process Biochem.*, 44, 1352, **2009**; b) Pilissão, C.; Carvalho, P. O.; Nascimento, M. G.; *J. Braz. Chem. Soc.*, 21, 973, **2010**.
- 49 - Lozano, P.; Diego, T.; Sauer, T.; Vaultier, M.; Gmouh, S.; Iborra, J. L.; *J. Supercrit. Fluids*, 40, 93, **2007**.
- 50 - Dijkstra, Z. J.; Merchant, R.; Keurentjes, J. T. F.; *J. Supercrit. Fluids*, 41, 102, **2007**.
- 51 - Forzato, C.; Furlan, G.; Ghelfi, F.; Nitti, P.; Pitacco, G.; Roncaglia, F.; Valentin, E.; *Tetrahedron: Asymmetry*, 18, 447, **2007**.
- 52 - Ghanem, A.; *Tetrahedron*, 63, 1721, **2007**.
- 53 - Souza, R. O. M. A.; Matos, L. M. C.; Gonçalves, K. M.; Costa, I. C. R.; Babics, I.; Leite, S. G. F.; Oestreicher, E. G.; Antunes, O. A. C.; *Tetrahedron Lett.*, 50, 2017, **2009**.
- 54 - Dhake, K. P.; Tambade, P. J.; Singhal, R. S.; Bhanage, B. M. *Tetrahedron Lett.*, 51, 4455, **2010**.
- 55 - Li, C.; Feng, X.-W.; Wang, N.; Zhou, Y.-J.; Yu, X.-Q. *Green Chem.*, 10, 616, **2008**.
- 56 - Majumder, A. B.; Ramesh, N. G.; Gupta M. N.; *Tetrahedron Lett.*, 50, 5190, **2009**.
- 57 - Priego, J.; Ortiz-Nava, C.; Carrillo-Morales, M.; López-Munguía, A.; Escalante, J.; Castillo E.; *Tetrahedron*, 65, 536, **2009**.

- 58 - a) Törnvall, U.; Orellana-Coca, C.; Hatti-Kaul, R.; Adlercreutz, D.; *Enzyme Microb. Technol.*, 40, 447, **2007**; b) Orellana-Coca, C.; Billakanti, J. M.; Mattiasson, B.; Hatti-Kaul, R.; *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, 44, 133, **2007**.
- 59 - Silva, W. S. D.; Lapis, A. A. M.; Suarez, P. A. Z., Neto, B. A. D.; *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, 68, 98, **2011**.
- 60 - Bitencourt, T. B.; Nascimento, M. G.; *Green Chem.*, 11, 209, **2009**.
- 61 - Paques, F. W.; Macedo, G. A.; *Quim. Nova*, 29, 93, **2006**.
- 62 - Salem, J. H.; Humeau, C.; Chevalot, I.; Harscoat-Schiavo, C.; Vanderesse, R.; Blanchard, F.; Fick, M.; *Process Biochem.*, 45, 382, **2010**.
- 63 - Teng, R. W.; McManus, D.; Aylward, J.; Ogbourne, S.; Johns, J.; Parsons, P.; Bacic, A.; *Fitoterapia*, 80, 233, **2009**.
- 64 - Sabaini, M. B.; Zinni, M. A.; Mohorčič, M.; Friedrich, J.; Iribarren, A. M.; Iglesias, L. E.; *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, 62, 225, **2010**.
- 65 - Wang, H.; Zong, M.-H.; Wu, H.; Lou, W.-Y.; *J. Biotechnol.*, 129, 689, **2007**.
- 66 - Kaewprapan, K.; Tuchinda, P.; Marie, E.; Durand, A.; Inprakhon, P.; *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, 47, 135, **2007**.
- 67 - Chien, T.-C.; Chern, J.-W.; *Carbohydr. Res.*, 339, 1215, **2004**.
- 68 - Waldmann, H.; Heuser, A.; Reidel, A.; *Synlett*, 65, **1994**.
- 69 - Hennen, W. J.; Sweers, H. M.; Wang, Y.-F.; Wong, C.-H.; *J. Org. Chem.*, 53, 4939, **1988**.
- 70 - Ishihara, K.; Katsube, Y.; Kumazawa, N.; Kuratani, M.; Masuoka, N.; Nakajima, N.; *J. Bioscience Bioeng.*, 109, 554, **2010**.
- 71 - Li, N.; Zeng, Q.-M.; Zong, M. H.; *J. Biotechnol.*, 142, 267, **2009**.
- 72 - Mastihubová, M.; Szemesová, J.; Biely, P.; *Bioorg. Med. Chem.*, 14, 1805, **2006**.
- 73 - Jun, S. J.; Moon, M. S.; Lee, S. H.; Cheong, C. S.; Kim, K. S.; *Tetrahedron Lett.*, 46, 5063, **2005**.
- 74 - Allinger, N. L.; **Química Orgânica**, 2<sup>a</sup> ed., Guanabara Dois, Cap. 25, 621-641, 1978.
- 75 - Bruice, P. Y.; **Organic Chemistry**, 4<sup>th</sup> Edition, Upper Saddle River: Pearson Education International, Cap. 22, 921-958, 2004.
- 76 - Hollingsworth, R. I.; Wang, G.; *Chem. Rev.*, 100, 4465, **2000**.
- 77 - Uttaro, J.-P.; Uttaro, L.; Tatibouet, A.; Rollin, P.; Mathé, C.; Périgaud, C.; *Tetrahedron Lett.*, 48, 3851, **2007**.
- 78 - Agelis, G.; Tzioumaki, N.; Botić, T.; Cencič, A.; Komiotis, D.; *Bioorg. Med. Chem.*, 15, 5448, **2007**.

- 79 - Horváth, A.; Ruttens, B.; Herdewijn, P.; *Tetrahedron Lett.*, 48, 3621, **2007**.
- 80 -Shen, C.; Xia, H.; Zheng, H.; Zhang, P.; Chen, X.; *Tetrahedron: Asymmetry*, 21, 1936, **2010**.
- 81 -a) Manta, S.; Tsoukala, E.; Tzioumaki,N.; Goropevšek, A.; Pamulapati, R. T.; Cencič, A.; Balzarini, J.; Komiotis, D.; *Eur. J. Med. Chem.*, 44, 2696, **2009**; b) Manta, S.; Agelis, G.; Botić, T.; Cencič, A.; Komiotis D.; *Eur. J. Med. Chem.*, 43, 420, **2008**; c) Manta, S.; Agelis, G.; Botić, T.; Cencič, A.; Komiotis D.; *Bioorg. Med. Chem.*, 15, 980, **2007**.
- 82 - Riva, S.; Chopineau, J.; Kieboom, A. P. G.; Klibanov, A. M.; *J. Am. Chem. Soc.*, 110, 584, **1988**.
- 83 -Therisodt, M.; Klibanov, A. M.; *J. Am. Chem. Soc.*, 109, 3977, **1987**.
- 84 - Therisodt, M.; Klibanov, A. M.; *J. Am. Chem. Soc.*, 108, 5638, **1986**.
- 85 - Silveira, G. P.; SÍNTESE E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE INIBITÓRIA FRENTE À ENZIMA GAPDH DE DERIVADOS DE CARBOIDRATOS VISANDO O DESENVOLVIMENTO DE NOVAS DROGAS ANTICHAGÁSICAS; Dissertação de Mestrado em Química, UFSC, **2002**.
- 86 - Sebrão, D.; SÍNTESE DE DERIVADOS ACILADOS DA D-RIBONO-1,4-LACTONA CATALISADA POR LIPASES; Dissertação de Mestrado em Química, UFSC, **2005**.
- 87 - Hanessian, S.; Marcotte, S.; Machaalani, R.; Huang, G.; Pierron, J.; Loiseleur, O.; *Tetrahedron*, 62, 5201, **2006**.
- 88 - Lefebvre, D. J.; Steunenber, P.; Vliegenthart, J. F. G; Kamerling, J. P.; *Tetrahedron: Asymmetry*, 16, 507, **2005**.
- 89 - Murphy, J. J.; Nomura, K.; *Chem. Commun.*, 4080, **2005**.
- 90 - Lalot, J.; Stasik, I.; Demailly, G.; Beaupère, D.; Godé, P.; *J. Colloid Interface Sci.*, 273, 604, **2004**.
- 91 - Chen, B.; Jamieson, E. R.; Tullius, T. D.; *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 12 3093, **2002**.
- 92 - Comin, M. J.; Leitofuter, J.; Rodríguez, J. B.; *Tetrahedron*, 58, 3129, **2002**.
- 93 - Bhat, K. L.; Chen, S.; Joullié, M. M.; *Heterocycles*, 23, 691, **1985**.
- 94 - Burgos, E.; Roos, A. K.; Mowbray, S. L.; Salmon, L.; *Tetrahedron Lett.*, 46, 3691, **2005**.

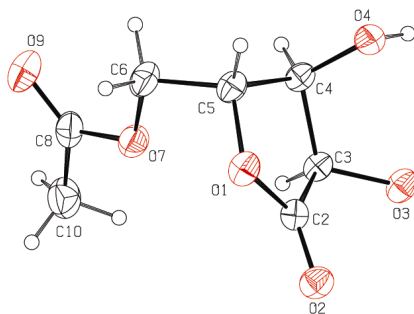
- 95 - Falentin-Daudre, C.; Beaupère, D.; Stasik-Boutbaiba, I.; *Carbohydr. Res.*, 345, 1983, **2010**.
- 96 - Bigham, E. C.; Gragg, C. E.; Hall, W. R.; Kelsey, J. E.; Mallory, W. R.; Richardson, D. C.; Benedict, C.; Ray, P. H.; *J. Med. Chem.*, 27, 717, **1984**.
- 97 - Simone, M. I.; Soengas, R.; Newton, C. R.; Watkin, D. J.; Fleet, G. W. J.; *Tetrahedron Lett.*, 46, 5761, **2005**.
- 98 - Perrin, D. D.; Armarengo, W. L. F.; **Purification of laboratory chemical**, 3<sup>rd</sup> Edition, Pergamon Presses, 68-69, 1998.
- 99 - Morita, K.; Assumpção, R. M. V.; **Manual de soluções, reagentes e solventes – padronização, preparação, purificação**, 2<sup>a</sup> ed., Editora Edgard Blücher Ltda, 69-70 e 275, 1972.
- 100 - Sá, M. M.; Silveira, G. P.; Castilho, M. S.; Pavão, F.; Oliva, G.; *ARKIVOC*, 8, 112, **2002**.
- 101 - Uppenberg, J.; Ohrner, N.; Norin, M.; Hult, K.; Kleywegt, G. J.; Patkar, S.; Waagen, V.; Anthonsen T.; Jones, T. A.; *Biochemistry*, 34, 16838, **1995**.
- 102 - Li, N.; Ma, D.; Min-hua, Z.; *J. Biotechnol.*, 133, 103, **2008**.
- 103 - Wu, Q.; Xia, A.; Lin, X.; *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, 54, 76, **2008**.
- 104 - Díaz-Rodríguez, A.; Fernández, S.; Lavandera, I.; Ferrero, M.; Gotor, V.; *Tetrahedron Lett.*, 46, 5835, **2005**.
- 105 - Ji, Q.; Xiao, S.; He, B.; Liu, X.; *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, 66, 264, **2010**.
- 106 - Liaquat, M.; *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, 68, 59, **2011**.
- 107 - Baharum, S. N.; Rahman, R. N. Z. R. A.; Basri, M.; Salleh, A. B.; *Process Biochem.*, 45, 346, **2010**.
- 108 - Klibanov, A. M.; *J. Biol. Chem.*, 409, 241, **2001**.
- 109 - Laane, C.; Boeren, S.; Vos, K.; Veeger, C.; *Biotechnol. Bioeng.*, 30, 81, **1987**.
- 110 - Chua, L. S.; Sarmidi, M. R.; *Enzyme Microb. Technol.*, 38, 551, **2006**.
- 111 - Piyatheerawong, W.; Iwasaki, Y.; Xu, X.; Yamane, T.; *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, 28, 19, **2004**.
- 112 - Wu, W.-H.; Akoh, C. C.; Phillips, R. S.; *Enzyme Microb. Technol.*, 18, 536, **1996**.
- 113 - Abbau, H.; Comeau, L.; *Enzyme Microb. Technol.*, 32, 589, **2003**.
- 114 - Chen, S. -Y.; Joullié, M. M.; *J. Org. Chem.*, 49, 2169, **1984**.
- 115 -Bock, K.; Lundt, I.; Pedersen, C.; *Acta Chem. Scand.*, B35, 155, **1981**.



- 116 - Zhang, W.; Zhao, H.; Carmichael, I.; Serianni, A. S.; *Carbohydr. Res.*, 344, 1582, **2009**.
- 117 - Casu, B.; Reggiani, M.; Gallo, G. G.; Vigevani, A.; *Tetrahedron Lett.*, 5, 2839, **1964**.
- 118 - Gillet, B.; Nicole, D.; Delpuech. J.-J.; *Org. Magn. Resson.*, 17, 28, **1981**.
- 119 - Silverstein, R. M.; Webster, F. X.; Kiemle, D. J.; **Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânicos**, 7ª Edição, LTC, 2007.
- 120 - Crompton, A. M.; Foley, L. H.; Wood, A.; Roscoe, W.; Stokoe, D.; McCormick, F.; Symons, M.; Bollag, G.; *J. Biol. Chem.*, 275, 25751, **2000**.
- 121 - Pérez-Victoria, I.; Zafra, A.; Morales, J. C.; *Carbohydr. Res.*, 342, 236, **2007**.
- 122 - Otero, C.; Arcos, J. A.; Berrendero, M. A.; Torres, C.; *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, 11, 883, **2001**.
- 123 - Pleiss, J.; Fischer, M.; Schmid, R. D.; *Chem. Phys. Lipids*, 93, 67, **1998**.
- 124 - Armesto, N.; Ferrero, M.; Fernández, S.; Gotor, V.; *J. Org. Chem.*, 67, 4978, **2002**.
- 125 - Otto, R. T.; Scheib, H.; Bornscheuer, U. T.; Pleiss, J.; Syldatk, C.; Schmid, R. D.; *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, 8, 201, **2000**.
- 126 - Weber, H. K.; Zuegg, J., Faber, K.; Pleiss, J.; *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, 3, 131, **1997**.

## 9 – ANEXOS

### Anexo 1 – Dados cristalográficos do composto 5-*O*-acetil-D-ribono-1,4-lactona (54)



**Figura 1** - ORTEP do derivado 5-*O*-acetil-D-ribono-1,4-lactona **54**.

**Tabela 1** - Dados do cristal e refinamento da estrutura para o composto 5-*O*-acetil-D-ribono-1,4-lactona (**54**).

Fórmula empírica	C <sub>7</sub> H <sub>10</sub> O <sub>6</sub>
Massa molar	190,15 g/mol
Temperatura	293(2) K
Comprimento de onda	0,71073 Å
Sistema cristalino	Monoclínico
Grupo espacial	P 21
Dimensões da célula unitária	a = 6,1409(4) Å α = 90° b = 5,1952(15)° β = 95,118(12)° c = 13,1844(18) Å γ = 90°
Å = 95,118(12)°	
Volume	418,95(14) Å <sup>3</sup>
Z	2
Densidade (calculada)	1,507 Mg/m <sup>3</sup>
Coefficiente de absorção	0,134 mm <sup>-1</sup>
F(000)	200
Tamanho dos cristais	0,50 x 0,30 x 0,13 mm <sup>3</sup>
Intervalo para coleta de dados	1,55 to 29,96°
Varição de índices	-8<=h<=8, -7<=k<=2, -
18<=l<=2	
Reflexões coletadas	2164
Reflexões independentes	1346 [R(int) = 0,0460]
Correção de absorção	Não
Método de refinamento	Mínimos-quadrados
Dados / restrições / parâmetros	Matriz-total em F <sup>2</sup> 1346 / 1 / 127
GOOF	1,072
Índice R final [I>2σ(I)]	R1 = 0,0469, wR2 =
0,1234	
Índice R (todos os dados)	R1 = 0,0741, wR2 =
0,1346	
Parâmetro estrutural absoluto	0,4(19)
Densidade eletrônica residual	0,286 and -0,182 e.Å <sup>-3</sup>

**Tabela 2** - Comprimentos (Å) e ângulos (°) das ligações para o composto 5-O-acetil-D-ribono-1,4-lactona (**54**).

---

C(2)-O(2)	1,195(3)
C(2)-O(1)	1,342(3)
C(2)-C(3)	1,521(4)
C(3)-O(3)	1,413(3)
C(3)-C(4)	1,531(4)
C(3)-H(3A)	0,9800
C(4)-O(4)	1,425(4)
C(4)-C(5)	1,528(4)
C(4)-H(4A)	0,9800
C(5)-O(1)	1,460(4)
C(5)-C(6)	1,502(4)
C(5)-H(5)	0,9800
C(6)-O(7)	1,439(4)
C(6)-H(6A)	0,9700
C(6)-H(6B)	0,9700
C(8)-O(9)	1,192(4)
C(8)-O(7)	1,353(4)
C(8)-C(10)	1,483(5)
C(10)-H(10A)	0,9600
C(10)-H(10B)	0,9600
C(10)-H(10C)	0,9600
O(3)-H(3)	0,85(5)
O(4)-H(4)	0,85(5)
O(2)-C(2)-O(1)	122,6(3)
O(2)-C(2)-C(3)	127,4(2)
O(1)-C(2)-C(3)	110,0(2)
O(3)-C(3)-C(2)	107,4(2)
O(3)-C(3)-C(4)	116,1(2)
C(2)-C(3)-C(4)	102,9(2)
O(3)-C(3)-H(3A)	110,0
C(2)-C(3)-H(3A)	110,0
C(4)-C(3)-H(3A)	110,0
O(4)-C(4)-C(5)	107,8(2)
O(4)-C(4)-C(3)	111,6(2)
C(5)-C(4)-C(3)	102,4(2)
O(4)-C(4)-H(4A)	111,5
C(5)-C(4)-H(4A)	111,5
C(3)-C(4)-H(4A)	111,5
O(1)-C(5)-C(6)	109,6(3)
O(1)-C(5)-C(4)	105,5(2)
C(6)-C(5)-C(4)	116,0(3)
O(1)-C(5)-H(5)	108,5
C(6)-C(5)-H(5)	108,5

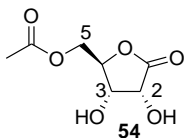
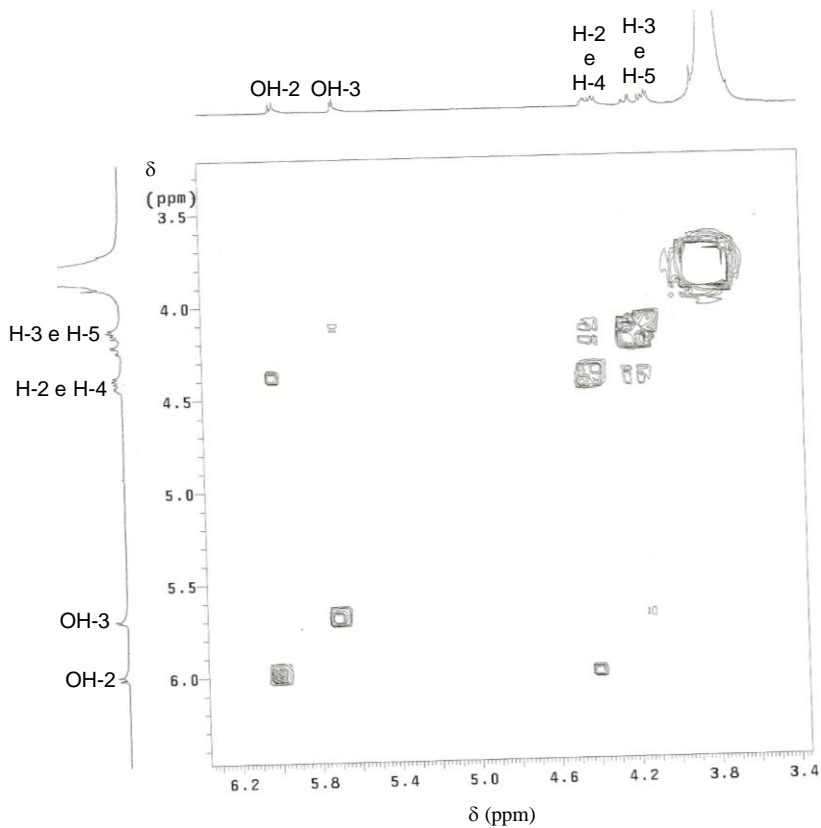
C(4)-C(5)-H(5)	108,5
O(7)-C(6)-C(5)	107,4(2)
O(7)-C(6)-H(6A)	110,2
C(5)-C(6)-H(6A)	110,2
O(7)-C(6)-H(6B)	110,2
C(5)-C(6)-H(6B)	110,2
H(6A)-C(6)-H(6B)	108,5
O(9)-C(8)-O(7)	122,9(3)
O(9)-C(8)-C(10)	126,1(3)
O(7)-C(8)-C(10)	111,0(3)
C(8)-C(10)-H(10A)	109,5
C(8)-C(10)-H(10B)	109,5
H(10A)-C(10)-H(10B)	109,5
C(8)-C(10)-H(10C)	109,5
H(10A)-C(10)-H(10C)	109,5
H(10B)-C(10)-H(10C)	109,5
C(2)-O(1)-C(5)	110,9(2)
C(3)-O(3)-H(3)	105(2)
C(4)-O(4)-H(4)	108(3)
C(8)-O(7)-C(6)	116,4(2)

**Tabela 3.** Ligações de hidrogênio [ $\text{\AA}$  e  $^\circ$ ] para o composto 5-*O*-acetil-D-ribono-1,4-lactona (**54**).

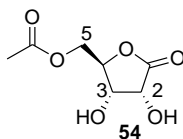
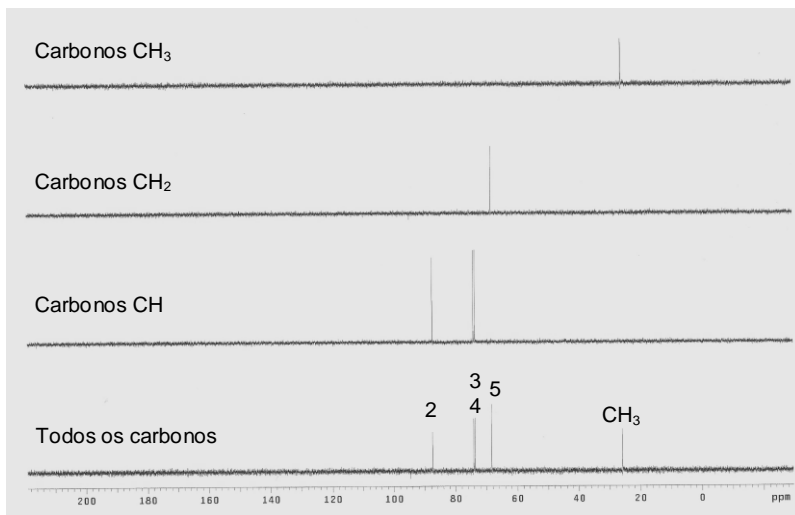
D-H...A	d(D-H)	d(H...A)	d(D...A)<(DHA)
O(3)-H(3)...O(4)#1	0,85(5)	1,95(5)	2,781(3)
O(4)-H(4)...O(2)#1	0,85(5)	2,15(5)	2,910(3)
O(4)-H(4)...O(3)#1	0,85(5)	2,41(6)	3,086(4)

Transformações simétricas para geração de átomos equivalentes: #1 -x+1,y+1/2,-z+1

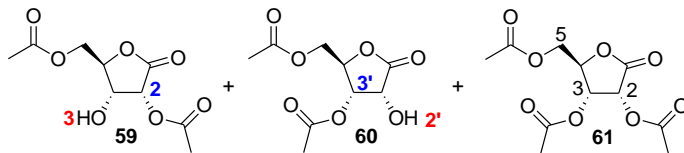
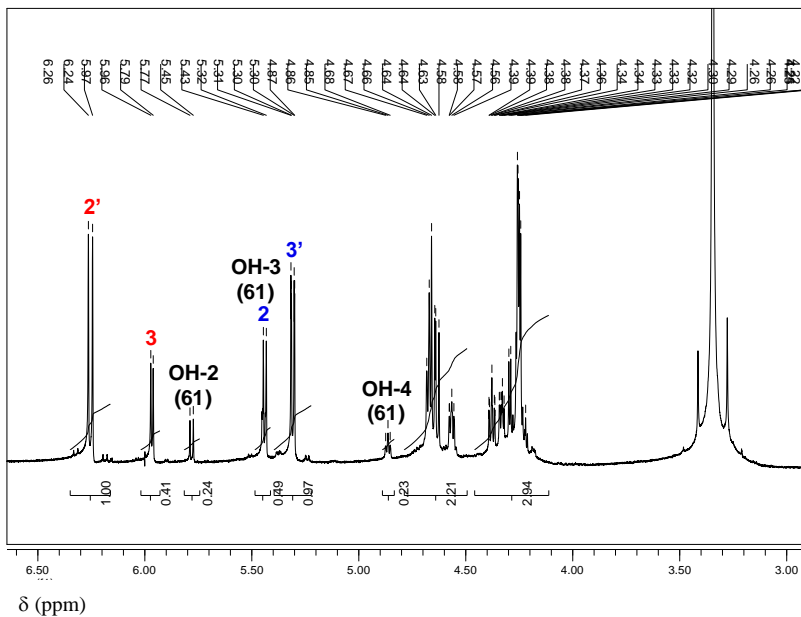
**Anexo 2** – COSY na região entre 3,4 e 6,4 ppm para o composto 5-*O*-acetil-D-ribono-1,4-lactona (**54**) [DMSO-*d*<sub>6</sub>, 400 MHz].



**Anexo 3** – DEPT 45, 90 e 135 para o composto 5-*O*-acetil-D-ribono-1,4-lactona (**54**) [DMSO-*d*<sub>6</sub>, 100 MHz].



**Anexo 4** – Ampliação do espectro de RMN-<sup>1</sup>H para a alíquota de 24 h da reação de acetilação de **38** catalisada por LPS-C, após isolamento do derivado triacetilado **61** [3,0-6,5 ppm, DMSO-*d*<sub>6</sub>, 400 MHz].





**Anexo 5** – COSY na região entre 3,0 e 6,5 ppm para a alíquota de 24 h da reação de acetilação de **38** catalisada por LPS-C, após isolamento do derivado triacetilado **61** [DMSO-*d*<sub>6</sub>, 400 MHz].

