

Maria Manuel da Cruz Silva

TRANSFORMAÇÕES QUÍMIO-ENZIMÁTICAS
EM ESTERÓIDES

Faculdade de Farmácia
Universidade de Coimbra

2005

**Dissertação apresentada à Faculdade de Farmácia da
Universidade de Coimbra para obtenção do grau de
Doutor em Farmácia, na especialidade de Química
Farmacêutica**

Trabalho desenvolvido sob orientação científica da Professora Doutora Maria Luisa Sá e Melo, no Laboratório de Química Farmacêutica da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, em colaboração com o Doutor Sergio Riva, no Istituto di Chimica del Riconoscimento Molecolare, CNR, Milão, Itália

À Constança e ao Nuno

Aos meus Pais e à minha Irmã

AGRADECIMENTOS

À Professora Doutora Maria Luisa Sá e Melo expresso aqui o meu reconhecimento pela confiança que depositou em mim e pela orientação científica da presente dissertação. A disponibilidade e o empenho que sempre demonstrou foram determinantes para o desenvolvimento deste trabalho. Agradeço, ainda, as sugestões e a revisão crítica do presente texto.

Ao Doutor Sergio Riva desejo manifestar a minha profunda gratidão pelos seus ensinamentos e pela generosidade com que me acolheu no seu grupo, possibilitando a concretização de parte do trabalho aqui apresentado. Agradeço, especialmente, o privilégio da sua Amizade.

Aos docentes e funcionários do Laboratório de Química Farmacêutica que, de diferentes formas, tanto me apoiaram ao longo deste trabalho, deixo aqui expressa a minha gratidão.

À Fundação Calouste Gulbenkian agradeço o apoio financeiro que possibilitou as deslocações ao Istituto di Chimica del Riconoscimento Molecolare, em Milão.

ÍNDICE GERAL

Abreviaturas	I
Índice de figuras	III
Índice de tabelas	V
Resumo	VII
Abstract	IX
Plano geral da tese	XI
CAPÍTULO 1	1
1. Introdução Geral	3
1.1. Catálise enzimática: princípios e aplicações	3
1.1.1. Enzimas como catalisadores de reacções: vantagens e desvantagens.....	5
1.1.2. Classes de enzimas	7
1.1.3. Mecanismo catalítico e aplicações sintéticas das hidrolases	10
1.1.3.1. Mecanismo catalítico das serina-hidrolases	11
1.1.3.2. Dadores de acilo e nucleófilos aceites pelas hidrolases.....	13
1.1.3.3. Selectividade das reacções mediadas pelas hidrolases	16
1.1.4. Oxinitrilases	21
1.1.4.1. Mecanismo catalítico das oxinitrilases.....	24
1.1.4.2. Aplicações sintéticas das oxinitrilases.....	26
1.1.5. Preparações enzimáticas	29
1.1.6. Biocatálise em meios não convencionais.....	32
1.1.6.1. Enzimas em solventes orgânicos.....	32
1.1.6.2. Enzimas noutros meios não convencionais.....	38
1.1.7. Biocatálise no contexto da Química Verde.....	41
1.1.8. Aplicação dos processos biocatalíticos na indústria farmacêutica.....	43
1.1.9. Desenvolvimentos recentes e perspectivas futuras	46

1.2. Biocatálise em substratos esteróides	49
1.2.1. Os esteróides como substratos em transformações selectivas	49
1.2.2. Biotransformações de substratos esteróides usando células inteiras.....	51
1.2.3. Oxido-redutases específicas de esteróides	52
1.2.4. Aplicação de hidrolases em transformações selectivas de esteróides	56
1.3. Objectivos do trabalho	61
CAPÍTULO 2	63
2. Síntese estereo-selectiva de cianidrinhas na cadeia lateral de pregnanos	65
2.1. Resumo	65
2.2. Introdução	66
2.2.1. Esteróides naturais com cadeias laterais funcionalizadas	66
2.2.2. Síntese química, não selectiva, de cianidrinhas.....	68
2.2.3. Processos de preparação de cianidrinhas opticamente activas	70
2.2.3.1. Hidrocianação ou sililcianação de compostos carbonílicos quirais	71
2.2.3.2. Síntese química estereo-selectiva de cianidrinhas.....	72
2.2.3.3. Síntese estereo-selectiva de cianidrinhas mediada por um dipeptídeo	
cíclico	73
2.2.3.4. Síntese estereo-selectiva de cianidrinhas mediada por oxinitrilases .	73
2.2.3.5. Resolução cinética enzimática de cianidrinhas mediada por	
hidrolases.....	74
2.2.4. Versatilidade sintética das cianidrinhas	76
2.3. Resultados e Discussão	79
2.3.1. Síntese de cianidrinhas na cadeia lateral de esteróides catalisada por	
oxinitrilases	79
2.3.2. Resolução cinética de cianidrinhas na cadeia lateral de esteróides	
catalisada por hidrolases.....	82
2.3.3. Síntese química diastereo-selectiva de cianidrinhas de 20-ceto pregnanos	
.....	89
2.4. Conclusões	98
2.5. Parte experimental	99
2.5.1. Instrumentação	99

2.5.2. Cromatografia.....	100
2.5.3. Reagentes e solventes.....	100
2.5.4. Síntese química das cianidrinas epiméricas 22-hidroxi-3-oxo-pregna-4-eno-22-carbonitrilo, 2.2a e 2.2b.	102
2.5.5. Separação das misturas epiméricas das cianidrinas e seus derivados acilados em colunas quirais por HPLC	103
2.5.6. Síntese de cianidrinas de 2.1 mediada por oxinitrilases.....	104
2.5.7. Acilação química dos compostos 2.2a,b	106
2.5.8. <i>Trans</i> -esterificação catalisada pela subtilisina CLEC de 2.2a,b.....	107
2.5.9. Síntese de 5 α -pregnano-20-ona	108
2.5.10. Procedimento representativo para a adição de TMSCN	108
2.5.11. Hidrólise da cianidrina sililada 2.11a,b	112
CAPÍTULO 3	113
3. Discriminação estereo-selectiva de 5,6-epóxidos de esteróides catalisada por lipases.....	115
3.1. Resumo	115
3.2. Introdução	116
3.2.1. Importância biológica e sintética dos 5,6-epóxidos de esteróides.....	116
3.2.2. Métodos de síntese selectiva de 5,6-epóxidos de esteróides.....	117
3.3. Resultados e Discussão	123
3.3.1 Síntese química dos epóxidos.....	123
3.3.2. <i>Trans</i> -esterificação enzimática estereo-selectiva de misturas de 3 β -hidroxi-5,6-epoxi-esteróides: síntese de α -epóxidos diastereomericamente puros	125
3.3.3. Alcoólise enzimática estereo-selectiva de 3 β -acetoxi-5,6-epoxi-esteróides: síntese de β -epóxidos diastereomericamente puros.....	129
3.3.4. Hidrólise enzimática suave, não selectiva, de misturas de 3 β -acetoxi-5,6-epoxi-esteróides.....	131
3.4. Conclusões	135
3.5. Parte experimental	136

3.5.1. Instrumentação	136
3.5.2. Cromatografia.....	136
3.5.3. Reagentes e solventes.....	136
3.5.4. Síntese química de 5 α ,6 α - e 5 β ,6 β -epoxi-esteróides	137
3.5.4.1 Método geral para a epoxidação de 3 β -hidroxi-esteróides Δ^5 insaturados com MMPP.....	137
3.5.4.2. Método geral para a epoxidação de 3 β -acetoxi-esteróides Δ^5 - insaturados com KMnO ₄ / sais inorgânicos.....	138
3.5.5. Acilação enzimática de 3 β -hidroxi-5,6-epoxi-esteróides	140
3.5.6. Desacilação enzimática de 3 β -acetoxi-5 α ,6 α - e 5 β ,6 β -epoxi-esteróides.....	142
3.5.7. Hidrólise total de 3 β -acetoxi-5 α ,6 α - e 5 β ,6 β -epoxi-esteróides.....	144
CAPÍTULO 4	145
4. Acilação enzimática regio-selectiva de dióis vicinais de esteróides.....	147
4.1. Resumo	147
4.2. Introdução	148
4.2.1. Compostos esteróides com um diol vicinal no anel A.....	148
4.2.2. Transformações enzimáticas regio-selectivas de compostos poli- hidroxilados.....	150
4.3. Resultados e discussão.....	152
4.3.1. Síntese dos dióis vicinais	152
4.3.2. Rastreio de enzimas	157
4.3.3. Síntese enzimática e isolamento dos derivados monoacilados.....	159
4.4. Conclusões	165
4.5 Parte experimental	166
4.5.1. Instrumentação	166
4.5.2. Cromatografia.....	166
4.5.3. Reagentes e solventes.....	166
4.5.4. Síntese química dos dióis.....	166
4.5.4.1. Síntese de colestano-2 β ,3 β -diol (4.1)	166
4.5.4.2. Síntese de colestano-2 α ,3 α -diol (4.2).....	169

4.5.4.3. Síntese de colestano-2 α ,3 β -diol (4.3).....	170
4.5.4.4. Síntese de colestano-2 β ,3 α -diol (4.4).....	172
4.5.4.5. Síntese de androstano-3 β ,4 β ,17 β -triol (4.5).....	174
4.5.4.6. Síntese de androstano-3 α ,4 α ,17 β -triol (4.6).....	175
4.5.4.7. Síntese de androstano-3 β ,4 α ,17 β -triol (4.7).....	176
4.5.4.8. Síntese de androstano-3 α ,4 β ,17 β -triol (4.8).....	177
4.5.4.9. Síntese de colestano-3 β ,4 α -diol (4.9).....	178
4.5.5. Acilação enzimática de dióis vicinais 2,3 e 3,4.....	178
4.5.5.1. Síntese de acetato de 2 β -hidroxicolestano-3 β -ilo (4.1a).	179
4.5.5.2. Síntese de acetato de 2 α -hidroxicolestano-3 α -ilo (4.2a).....	180
4.5.5.3. Síntese de acetato de 2 α -hidroxicolestano-3 β -ilo (4.3a).....	181
4.5.5.4. Síntese de acetato de 2 β -hidroxicolestano-3 α -ilo (4.4a).....	182
4.5.5.5. Síntese de acetato de 3 α -hidroxicolestano-2 β -ilo (4.4b).....	183
4.5.5.6. Síntese de acetato de 4 β ,17 β -di-hidroxi-androstano-3 β -ilo (4.5a). 184	
4.5.5.7. Síntese de acetato de 3 α ,17 β -di-hidroxi-androstano-4 α -ilo (4.6a) 185	
4.5.5.8. Síntese de acetato de 4 α ,17 β -di-hidroxi-androstano-3 β -ilo (4.7a) 186	
4.5.5.9. Síntese de acetato de 4 α -hidroxicolestano-3 β -ilo (4.9a).....	187
Conclusões Gerais.....	189
Bibliografia.....	195

Abreviaturas

ADN	ácido desoxi-ribonucleico
ADP	adenosina difosfato
ATP	adenosina trifosfato
a_w	do inglês “water activity”
CCF	cromatografia em camada fina
CLEA	do inglês “cross-linked enzyme aggregates”
CLEC	do inglês “cross-linked enzyme crystals”
d	dubleto
DEPT	transferência de polarização por aumento de distorção
DIBAL	hidreto de di-isobutil-alumínio
4-DMAP	4-dimetilaminopiridina
DMF	dimetilformamida
DMSO	dimetilsulfóxido
E	razão enantiomérica
EC	do inglês “Enzyme Commission”
ee	excesso enantiomérico
eq	equivalente
Et ₃ N	triethylamina
FADH	flavina-adenina dinucleótido
GC	do inglês “Gas Chromatography”
IV	infra-vermelho
HbHNL	hidroxinitrilo liase de <i>Hevea brasiliensis</i>
HCN	ácido cianídrico
HPLC	cromatografia líquida de alta pressão
HSDH	do inglês “hydroxysteroid dehydrogenase”
J	constante de acoplamento
LiOEt	etóxido de lítio
M	ião molecular na espectrometria de massa
m	múltiplo
mCPBA	ácido <i>m</i> -cloroperoxibenzóico
MMPP	monoperoxifitalato de magnésio
NaCN	cianeto de sódio
NADH	nicotinamida-adenina dinucleótido

NAD(P)H	fosfato de nicotinamida-adenina dinucleótido
PaHNL	hidroxinitrilo liase de <i>Prunus amygdalus</i>
pf	ponto de fusão
ppm	partes por milhão
PQQ	pirroloquinolinoquinona
q	quarteto
RMN ¹³ C	ressonância magnética nuclear de carbono 13
RMN ¹ H	ressonância magnética nuclear de prótons
rpm	rotações por minuto
s	singuleto
t	triplete
THF	tetra-hidrofurano
TMS	trimetilsililo
TMSCN	cianeto de trimetilsililo
Yb(OTf) ₃	triflato de itérbio

Estrutura do colestano e numeração dos respectivos carbonos

Índice de figuras

Esquema 1.1. Mecanismo catalítico das serina-hidrolases.....	12
Esquema 1.2. Regra de Kazlauskas para álcoois secundários (a) e primários (b).....	18
Esquema 1.3. Mecanismo de libertação de HCN catalisada por PaHNL e por HbHNL	21
Esquema 1.4. Formação reversível de cianidrinas catalisada por oxinitrilases.....	22
Esquema 1.5. Mecanismos catalíticos propostos para a HbHNL.....	25
Esquema 1.6. <i>Trans</i> -hidrocianação de um aldeído e de uma cianidrina racémica de uma cetona, catalisada por PaHNL.	27
Esquema 1.7. Hidrólise estereo-selectiva de um substrato pró-quiral catalisada pela lipase de <i>Pseudomonas cepacia</i>	36
Esquema 1.8. Exemplos de processos industriais de resoluções cinéticas catalisadas por hidrolases.....	45
Esquema 1.9. Interconversão regio- e estereo-selectiva do ácido cólico catalisada por oxido-redutases específicas de esteróides.....	53
Esquema 1.10. Interconversão regio- e estereo-selectiva do ácido desidrocólico catalisada por oxido-redutases específicas de esteróides.	54
Esquema 2.1. Exemplos de esteróides naturais bioactivos com cadeias laterais oxigenadas.....	67
Esquema 2.2. Métodos de síntese não selectiva de cianidrinas.....	69
Esquema 2.3. Resolução cinética enzimática dinâmica de cianidrinas racémicas.	75
Esquema 2.4. Alguns exemplos de possíveis transformações sintéticas das cianidrinas	77
Esquema 2.5. Síntese química, não selectiva, de 22-cianidrinas e respectivos ésteres. .	80
Esquema 2.6. Resolução cinética da mistura de 22-cianidrinas mediada pela protease subtilisina Carlsberg	84

Esquema 2.7. Diastereómero aceite pela subtilisina (a, b), modelo de previsão da enantio-selectividade da subtilisina (c).....	88
Esquema 2.8. Adição estereo-selectiva de TMSCN, catalisada por LiOEt, a 20-ceto pregnanos.....	90
Esquema 2.9. Diagrama Ortep do acetato de (R)-20-ciano-20-trimetilsilaniloxi-pregna-5-eno-3 β -ilo.....	93
Esquema 2.10. Adição de TMSCN ao 20 β -carbaldeído catalisada por ZnI ₂ ou por LiOEt.....	94
Esquema 2.11. Adição de TMSCN ao acetato de 20-oxo-pregna-5,16-dieno 3 β -ilo catalisada por LiOEt ou por ZnI ₂	96
Esquema 3.1. Síntese diastereo-selectiva de 5,6-epóxidos de esteróides.....	124
Esquema 3.2. Acetilação estereo-selectiva de 3 β -hidroxi-5 α ,6 α -epoxi-esteróides catalisada pela Novozym 435.....	128
Esquema 3.3. Alcoólise estereo-selectiva de 3 β -acetoxi-5 α ,6 α -epoxi-esteróides catalisada pela lipase AY.....	130
Esquema 3.4. Desacilação suave do 3 β -acetoxi-5,6-epoxi-esteróides catalisada pela lipase de <i>Candida rugosa</i> em éter di-isopropílico pré-saturado com água.....	133
Esquema 3.5. Acetilação estereo-selectiva do 5 α ,6 α -epoxicolestano-3 β -ol catalisada pela lipase AY.....	134
Esquema 4.1. Alguns exemplos de esteróides bioactivos com um diol vicinal, ou derivado, no anel A.....	149
Esquema 4.2. Séries completas de 2,3- e 3,4-dióis vicinais no anel A de esteróides...	152
Esquema 4.3. Síntese de todos os estereoisómeros do colestano-2,3-diol.....	155
Esquema 4.4. Síntese de todos os estereoisómeros do androstano-3,4,17-triol.....	156
Esquema 4.5. Mono-acilação regio-selectiva do colestano-2 β ,3 β -diol.....	160
Esquema 4.6. Acilação enzimática regio-selectiva de 2,3- e 3,4- <i>cis</i> -dióis.....	161
Esquema 4.7. Acilação enzimática regio-selectiva de 2,3- e 3,4- <i>trans</i> -dióis.....	163

Índice de tabelas

Tabela 2.1. Optimização das condições de reacção para a resolução cinética enzimática de uma mistura epimérica de 2.2a,b, por <i>trans</i> -esterificação irreversível.....	86
Tabela 2.2. Adição de TMSCN ao acetato de pregnenolona.....	92
Tabela 3.1. Alguns exemplos de métodos de epoxidação selectiva de esteróides 5,6-insaturados.....	119
Tabela 3.2. Acetilação de 3.2a (α) e de 3.2b (β) catalisada por lipases.....	127
Tabela 4.1. Monoacilação de dióis vicinais catalisada por lipases.....	158

Resumo

A utilização de enzimas como catalisadores selectivos e eficientes na transformação de moléculas constitui uma tecnologia válida em síntese orgânica.

As propriedades biológicas e farmacológicas dos esteróides e o elevado custo que a sua síntese comporta justificam a grande relevância que é dada aos processos de transformação selectiva destes compostos.

Com este trabalho pretende-se explorar a estereo- e regio-selectividade de um conjunto de enzimas comerciais como catalisadores usando esteróides como substratos.

Assim, numa primeira fase, a síntese diastereo-selectiva de cianidrinhas na cadeia lateral de esteróides foi estudada por métodos enzimáticos. As oxinitrilases PaHNL e HbHNL não se mostraram capazes de catalisar a adição estereo-selectiva de HCN a grupos carbonilo na cadeia lateral. A síntese de uma mistura racémica de cianidrinhas obtida a partir do 3-oxo-pregna-4-eno-20 β -carbaldeído, seguida de acilação selectiva catalisada pela protease subtilisina permitiu o isolamento do éster correspondente com elevado excesso diastereomérico.

Em alternativa aos processos enzimáticos, foi estudada a síntese de cianidrinhas sililadas através da adição de TMSCN a diferentes grupos carbonilo na cadeia lateral de pregnanos, explorando a influência estereoquímica da estrutura esteróide. Dependendo da natureza do grupo carbonilo, diferentes resultados foram observados. A adição a 20-ceto pregnanos saturados foi totalmente estereo-selectiva, gerando cianidrinhas sililadas epimericamente puras, cuja configuração absoluta foi determinada por análise cristalográfica de raios X.

A diastereo-selectividade das hidrolases face a substratos esteróides foi ainda estudada na separação de misturas de 5,6-epóxidos. Os 5,6-epoxi-esteróides estereoisomericamente puros foram preparados combinando métodos químicos selectivos de α - e β -epoxidação com a esterificação ou alcoólise enzimática do grupo 3β -hidroxilo ou -alcoxilo. A hidrólise enzimática suave do grupo 3β -acetoxilo na presença do grupo funcional epóxido foi também efectuada com sucesso.

Para além destas transformações diastereo-selectivas, foram estudadas transformações regio-selectivas em esteróides poli-hidroxilados.

Os esteróides poli-hidroxilados bioactivos contendo um diol vicinal no anel A são encontrados em diversas fontes naturais. A acilação enzimática deste tipo de compostos é um desafio interessante em termos de estudo da regio-selectividade das enzimas face a compostos esteróides complexos, com aplicação na síntese de análogos com actividade biológica. Assim, séries completas de dióis vicinais estereoisoméricos nas posições 2,3 e 3,4 foram submetidas à acção de um conjunto de lipases, as quais se mostraram capazes de distinguir grupos hidroxilo vicinais no anel A de esteróides, sendo sensíveis à configuração dos diferentes dióis e permitindo a obtenção dos respectivos monoésteres com elevada regio-selectividade e bons rendimentos.

Em conclusão, os resultados apresentados nesta dissertação evidenciam as potencialidades da catálise enzimática na transformação estereo- e regio-selectiva de substratos esteróides e contribuem para o desenvolvimento de metodologias sintéticas com utilidade no campo dos esteróides.

Abstract

The use of enzymes as selective and efficient catalysts in the transformation of molecules is a valuable technology in organic synthesis.

The biological and pharmacological properties of steroids and the high cost inherent to its synthesis justify the great relevance given to the selective transformation of these compounds.

This work aims to exploit the stereo- and regioselectivity of an array of commercial enzymes as catalysts using steroids as substrates.

Therefore, in a first phase, the diastereoselective synthesis of cyanohydrins at the steroid side-chain was studied by means of enzymatic methods. The oxinitrilases PaHNL and HbHNL were not able to catalyse the stereoselective addition of HCN to carbonyl groups at the side-chain. The synthesis of a racemic mixture of cyanohydrins, starting from 3-oxo-pregn-4-en-20 β -carbaldehyde, followed by selective acylation catalyzed by the protease subtilisin allowed the isolation of the corresponding ester with high diastereomeric excess.

In alternative to the enzymatic processes, the synthesis of silylated cyanohydrins through the addition of TMS-CN to different carbonyl groups at the pregnane side-chain, exploring the stereochemical influence of the steroid structure, was also studied. Depending on the nature of the carbonyl group, different results were observed. The addition to saturated 20-keto pregnanes was totally stereoselective, rendering silylated cyanohydrins epimerically pure and its absolute configuration was determined by X-ray crystallographic analysis.

The diastereoselectivity of the hydrolases towards steroidal substrates was studied in the separation of 5,6-epoxides mixtures. The 5,6-epoxysteroids stereoisomerically pure were prepared by combining selective chemical methods of α - and β -epoxidation with the enzymatic esterification or alcoholysis at the 3β -hydroxy or -alcoxy groups. The mild enzymatic hydrolysis of the 3β -acetoxy group in the presence of the epoxide was also carried out successfully.

Beyond these stereoselective transformations, regioselective transformations were explored in polyhydroxylated steroids using commercial hydrolases as catalysts.

Bioactive polyhydroxylated steroids bearing a vicinal diol at the A-ring are found in diverse natural sources. The enzymatic acylation of this type of compounds is an interesting challenge in terms of regioselectivity of enzymes towards complex steroidal compounds. Moreover it has potential application in the synthesis of related compounds with bioactivity. Therefore, the complete series of stereoisomeric vicinal diols at the 2,3- and 3,4-positions were prepared by different chemical strategies and tested as substrates of a set of lipases. The enzymes were able to distinguish the vicinal hydroxy groups in the A-ring of the steroid structure, being sensitive to the configuration of the different diols and allowing the isolation of the monoacyl derivatives with high regioselectivity and good yields.

In summary, the results obtained throughout this work highlight the potential of the enzymatic catalysis in the stereo- and regio-selective transformation of steroidal substrates, thus contributing to the development of specific synthetic methodologies which can be useful in the steroid field.

Plano geral da tese

A presente dissertação é composta de quatro capítulos, sendo o primeiro uma introdução geral seguida de três capítulos de trabalho experimental, resultados e discussão.

A introdução da tese procura dar uma perspectiva actual das potencialidades do uso de enzimas isoladas em síntese orgânica, relevando, sobretudo, as enzimas usadas neste trabalho, ou seja, hidrolases e oxinitrilases. A aplicação dos processos biocatalíticos em substratos esteróides é revista na segunda parte da introdução.

O segundo capítulo refere-se à síntese de cianidrinas em pregnanos como uma estratégia potencialmente útil para a elaboração da cadeia lateral de esteróides.

O terceiro capítulo versa sobre a discriminação enzimática de misturas epiméricas de 5,6-epóxidos de esteróides 3β -substituídos, através da acilação ou alcoólise do grupo 3β -hidroxilo ou -acetoxilo.

No quarto capítulo é estudada a acilação enzimática regio-selectiva de dióis vicinais no anel A de esteróides, com vista à obtenção de derivados monoacilados.

Os capítulos 2, 3 e 4 estão organizados nos seguintes itens: “Resumo”, “Introdução”, “Resultados e Discussão”, “Conclusões” e “Parte Experimental”. A Bibliografia encontra-se referenciada no final da tese.

CAPÍTULO 1

Introdução Geral

1. Introdução Geral

1.1. Catálise enzimática: princípios e aplicações

As enzimas são proteínas com funções catalíticas indispensáveis à manutenção da vida. Na Natureza, as enzimas promovem a interconversão de um vasto número de espécies químicas, gerando o material e a energia necessários à sobrevivência e ao crescimento das células. Assim, as enzimas actuam como catalisadores altamente selectivos, de tal forma que conseguem catalisar reacções específicas em substratos específicos.

Nos últimos anos, a biocatálise, que se pode definir como a utilização de catalisadores biológicos, células ou enzimas isoladas, para promover a transformação de moléculas, tem encontrado um campo de aplicação cada vez mais vasto. De facto, as enzimas ocupam já uma posição única em química orgânica sintética por serem catalisadores selectivos e eficientes sob condições reaccionais suaves (Bommarius e Riebel, 2004a; Hari Krishna, 2002).

A biocatálise é uma área científica interdisciplinar, que resulta da intersecção da química, da biologia e da engenharia, com grande aplicação em síntese na indústria química, farmacêutica e agroquímica, na biorremediação e na medicina, ao nível de análise e diagnóstico (Bommarius e Riebel, 2004a).

A cada vez maior disponibilidade de enzimas, devido a tecnologias que permitem a produção de novas enzimas em grandes quantidades e, por outro lado, a percepção de que muitas enzimas são capazes de transformar um largo espectro de substratos não naturais levaram a um crescente interesse dos químicos orgânicos pela utilização de enzimas como catalisadores de reacções (García-Junceda *et al.*, 2004).

1.1.1. Enzimas como catalisadores de reacções: vantagens e desvantagens

Qualquer catalisador deve obedecer a critérios de actividade, estabilidade e selectividade. Os catalisadores biológicos cumprem estes critérios e, além disso, oferecem vantagens notáveis em síntese orgânica. Com efeito, estes catalisadores promovem reacções com elevada químio-, regio- e estereo-selectividade, possibilitando a síntese de compostos complexos e/ou opticamente activos, sendo, portanto, vantajosos na síntese de moléculas com diversos grupos funcionais semelhantes ou com estereocentros. Diversos exemplos mostram a capacidade dos biocatalisadores para promover reacções difíceis ou impossíveis pelas vias sintéticas clássicas (Hari Krishna, 2002; Bommarius e Riebel, 2004b; Koeller e Wong, 2001).

Além disso, as enzimas são catalisadores eficientes do ponto de vista energético, dado operarem a temperaturas e pressões moderadas. Em muitos casos, o meio reaccional é a água e o pH do meio situa-se numa gama moderada, oferecendo condições reaccionais suaves.

Adicionalmente, os biocatalisadores são naturais e, portanto, com um impacto ecológico menor que os catalisadores sintéticos, os quais são, por vezes, obtidos por vias sintéticas complexas e poluentes.

Assim, as bioconversões são capazes de gerar novos intermediários quirais e, em muitos casos, de encurtar notavelmente uma sequência sintética, com vantagens do ponto de vista económico e ambiental (Bommarius e Riebel, 2004a,b).

A utilização de células inteiras como biocatalisadores apresenta vantagens e desvantagens face às enzimas isoladas, devendo a escolha do biocatalisador ser ponderada caso a caso.

Assim, as células inteiras possibilitam transformações que envolvem vários passos, não requerem a adição e regeneração de cofactores, sendo catalisadores de baixo custo.

Porém, as células inteiras comportam, muitas vezes, um maior número de produtos secundários uma vez que outros sistemas enzimáticos presentes na célula podem catalisar transformações indesejáveis no substrato ou nos produtos da reacção. O uso de solventes orgânicos é limitado, dado que estes podem danificar a membrana celular e inactivar o sistema catalítico. Além disso, a toxicidade do substrato para a célula e a capacidade de penetração do substrato na célula podem ser obstáculos à utilização de células inteiras como biocatalisadores. Outros factores a considerar são o volume da reacção, em geral muito grande, e a recuperação do produto final, que pode ser complexa.

As enzimas isoladas têm como principais vantagens a maior selectividade das reacções catalisadas, o facto de o equipamento necessário ser bastante simples, assim como a recuperação do produto no final da reacção e a possibilidade de usar co-solventes, ou mesmo, solventes orgânicos.

No entanto, o elevado custo, a baixa estabilidade de algumas enzimas e a necessidade de regeneração do cofactor (em enzimas dependentes de cofactores) constituem obstáculos ao uso de algumas enzimas isoladas em síntese orgânica.

Por outro lado, muitos catalisadores enzimáticos existentes nas células não podem ser isolados por não resistirem aos processos de isolamento e purificação, nomeadamente, por sofrerem o ataque de proteases celulares (Roberts *et al.*, 1995; Bommarius e Riebel, 2004a).

1.1.2. Classes de enzimas

As enzimas são classificadas em seis classes com base no tipo de reacções catalisadas, de acordo com a *Enzyme Commission*, da *International Union of Biochemistry and Molecular Biology*. As classes principais de enzimas são, ainda, divididas em sub-classes e sub-grupos. As enzimas são individualmente classificadas de forma sistemática com base no nome químico do substrato natural e no mecanismo de reacção (Boyce e Tipton, 2001; Hari Krishna, 2002).

As **oxido-redutases** catalisam reacções de oxidação/redução, transferindo hidrogénio, oxigénio e/ou electrões entre moléculas. As desidrogenases (enzimas que catalisam a transferência de hidrogénio), as oxidases (enzimas que transferem oxigénio molecular), as oxigenases (enzimas que catalisam a transferência de oxigénio a partir de oxigénio molecular) e as peroxidases (enzimas que transferem electrões para peróxidos) pertencem a esta classe de enzimas.

As oxido-redutases são dependentes de cofactores, os quais fornecem ou aceitam o(s) equivalente(s) de oxidação ou de redução. Os cofactores mais comuns são NADH/NAD⁺, NADPH/NADP⁺, FADH/FAD⁺, ATP/ADP e PQQ. Devido ao elevado

custo dos cofactores, a sua regeneração eficiente é essencial para a implementação de processos industriais usando oxido-redutases isoladas como catalisadores. Assim, o acoplamento de uma segunda enzima que use o mesmo cofactor ou a adição de um segundo substrato, são estratégias comuns para a utilização eficiente de oxido-redutases.

As **transferases** catalisam a transferência de grupos químicos, por exemplo acilo, fosforilo, glicosilo ou amino, de um dador para um aceitador adequado. Algumas destas enzimas exibem elevada regio- e estereo-selectividade.

As **hidrolases** catalisam a clivagem hidrolítica de ligações C-O, C-N, C-C, P-O, entre outras. Assim, as esterases catalisam a hidrólise de ésteres, as proteases catalisam a hidrólise de peptídeos e as lipases catalisam a hidrólise de acilgliceróis. Uma grande parte das enzimas comercialmente disponíveis pertence a esta classe. Posteriormente, na Secção 1.1.3, esta classe de enzimas será discutida com maior detalhe.

As **liases** catalisam a clivagem não hidrolítica de ligações C-C, C-N, C-O, por reacções de eliminação dando produtos com dupla ligação. Na reacção inversa, estas enzimas catalisam a adição de grupos à dupla ligação do substrato. São exemplos a fumarase, a aspartase, as descarboxilases, as desidratases, as aldolases e as oxinitrilases. As liases ganharam importância ao nível industrial devido ao facto de as reacções de ruptura de ligações (liase) poderem ser revertidas no sentido da formação de novas ligações (sintetase), em condições não naturais, ou seja, com elevadas concentrações de reagentes, levando à formação de novos produtos, por vezes de forma estereo-selectiva.

Dentro desta classe de enzimas, os oxinitrilases serão discutidas com maior detalhe (Secção 1.1.4), uma vez que são objecto de estudo na parte experimental deste trabalho (Capítulo 2).

As **isomerases** catalisam reacções de isomerização dentro da mesma molécula. Nesta classe de enzimas encontram-se epimerases, racemases, *cis-trans* isomerases, tautomerases e mutases, dependendo do tipo de reacção que catalisam. O exemplo mais conhecido é a enzima glucose isomerase, usada industrialmente na produção de fructose.

As **ligases** catalisam a formação de uma ligação covalente C-O, C-S, C-N ou C-C entre duas moléculas, concomitante com a hidrólise de uma ligação pirofosfato no ATP ou num trifosfato semelhante.

As hidrolases e as oxinitrilases são as enzimas usadas neste trabalho, concretamente, um conjunto de lipases, uma protease e duas oxinitrilases de selectividade oposta. Assim, passamos a rever as características e potencialidades sintéticas destas enzimas em particular.

1.1.3. Mecanismo catalítico e aplicações sintéticas das hidrolases

As hidrolases catalisam a clivagem hidrolítica de ligações C-O, C-N, C-C e P-O. As hidrolases são as enzimas mais comuns em processos industriais, inclusivamente ao nível da química fina. De facto, cerca de 80 % das enzimas usadas ao nível industrial são hidrolases (Hari Krishna, 2002).

As hidrolases não requerem cofactores e, além de aceitarem uma grande diversidade de substratos não naturais, exibem elevada químio-, regio- e enantio-selectividade (Carrea e Riva, 2000; Cais e Theil, 2002).

As aplicações das hidrolases são muito diversas, incluindo esterificação de ácidos gordos e de hidratos de carbono na indústria alimentar (Benjamin e Pandey, 1998), síntese industrial de compostos químicos, incluindo fármacos (Roberts, 2001; Ghanem e Aboul-Enein., 2004), formulações de detergentes (Benjamin e Pandey, 1998; Maurer, 2004) e produção de cosméticos (Benjamin e Pandey, 1998; Veit, 2004).

As lipases, ou triacilglicerol acil hidrolases, catalisam *in vivo* a hidrólise de triacilgliceróis, estando amplamente distribuídas em microrganismos, plantas e animais. O rápido crescimento celular dos microrganismos torna as lipases microbianas mais disponíveis do que as lipases de origem animal ou vegetal. Um grande número de leveduras, fungos e bactérias produzem lipases acessíveis comercialmente. Assim, devido à sua disponibilidade, selectividade e capacidade de operar em meios reaccionais não naturais, estas enzimas são actualmente as mais usadas em biocatálise (Schmid e Verger, 1998; Benjamin e Pandey, 1998; García-Junceda *et al.*, 2004).

1.1.3.1. Mecanismo catalítico das serina-hidrolases

Embora as hidrolases evidenciem diferentes selectividades, a maioria são serina-hidrolases, sendo o mecanismo catalítico das serina-proteases (como a subtilisina) semelhante ao mecanismo catalítico das lipases. Apesar de a maioria das lipases necessitarem de activação interfacial para expor o centro activo, a arquitectura da tríade catalítica é semelhante. Esta tríade catalítica, constituída por serina, histidina e aspartato (ou glutamato), actua como um sistema de *charge relay* (Brady *et al.*, 1990; Cais e Theil, 2002; Bommarius e Riebel, 2004c).

Assim, no primeiro passo, o carboxilato do resíduo de ácido aspártico estabelece uma ponte de hidrogénio com a histidina e, por sua vez, o azoto da histidina liga-se ao álcool da serina também por uma ponte de hidrogénio. O oxianião da serina, resultante deste sistema de cedência de carga, ataca o carbono carbonílico do primeiro substrato, R_1COOR_2 , levando à formação do intermediário tetraédrico, à acil-enzima e à libertação do primeiro produto, R_2OH (Esquema 1.1).

No segundo passo, o grupo acilo é transferido para o nucleófilo, ou segundo substrato, R_3OH , para formar o segundo produto, R_1COOR_3 , regenerando a enzima livre. A estabilização dos intermediários oxianião por ligações de hidrogénio a grupos amina de outros aminoácidos (*oxyanion hole*) é crucial para a função catalítica da enzima (Brady *et al.*, 1990; Muralidhar *et al.*, 2002; Bommarius e Riebel, 2004c).

Durante ambos os passos, qualquer quiralidade presente no dador de acilo ou no nucleófilo pode ser reconhecida, determinando a estereo-selectividade da reacção enzimática.

Esquema 1.1. Mecanismo catalítico das serina-hidrolases

1.1.3.2. Dadores de acilo e nucleófilos aceites pelas hidrolases

A estrutura do primeiro substrato a ser aceite pela hidrolase (Esquema 1.1), ou seja, o dador de acilo, tem merecido intensa investigação com vista à obtenção de melhores rendimentos e selectividades nas reacções catalisadas por hidrolases (Hanefeld, 2003).

Assim, em reacções de acilação enzimática, os ácidos carboxílicos podem ser usados como dadores de acilo, uma vez que reagem com a enzima para formar a acil-enzima. No entanto, a água que é libertada neste passo, tratando-se de enzimas num meio orgânico, acaba por se colocar na interface enzima / solvente. Deste fenómeno pode resultar o impedimento do acesso do substrato ao centro activo da enzima, alterações na selectividade da enzima e, além disso, a própria água pode funcionar como nucleófilo (Carrea e Riva, 2000; Hanefeld, 2003).

A reversibilidade da reacção de acilação é determinada pelo carácter nucleófilo relativo do *leaving group* R_2OH e do substrato R_3OH (Esquema 1.1). Assim, se o carácter nucleófilo do R_2OH for diminuído pela introdução de grupos electro-atractivos, a reacção é deslocada no sentido da formação do produto. Este conceito foi verificado com a introdução de ésteres activados, como tioésteres, ésteres 2-haloetílicos, cianometílicos e ésteres de oximas (Ghogare e Kumar, 1989 e 1990; Mischitz *et al.*, 1991), sendo os ésteres trifluoroetílicos os mais usados (Faber e Riva, 1992).

Um exemplo recente do uso de ésteres de oximas como agentes acilantes diz respeito à síntese à escala piloto de um pró-fármaco de ribavirina, por acilação regio-selectiva mediada pela Chirazyme L-2 (Tamarez *et al.*, 2003).

Em 1988, Wong e colaboradores (Wang *et al.*, 1988) propuseram o uso de ésteres enólicos, o acetato de vinilo ou o acetato de isoprenilo, como dadores de acilo em reacções de *trans*-esterificação irreversível. Após a formação da acil-enzima, o álcool vinílico ou isoprenílico libertado sofre tautomerização ceto-enólica resultando na formação do composto carbonílico, acetaldeído ou acetona, respectivamente, tornando a reacção irreversível (Faber e Riva, 1992).

O metoxiacetato de etilo foi usado com sucesso na resolução enzimática de aminas racémicas (Balkenhohl *et al.*, 1997). Com este agente acilante, a velocidade inicial da reacção foi 100 vezes superior à verificada na presença de acetato de butilo. Neste caso, o carácter electronegativo do α -substituente torna o grupo carbonilo mais susceptível de sofrer ataque nucleófilo da Ser-OH. Por outro lado as aminas têm um carácter mais nucleófilo do que o etanol libertado no primeiro passo da reacção. Este é um processo usado ao nível industrial na resolução de aminas desde 1993 (Schmid *et al.*, 2001).

Adicionalmente, diversos estudos demonstram a influência da estrutura do grupo alcoxilo na enantio-selectividade das lipases, quer em reacções de hidrólise (Bellezza *et al.*, 2000), quer em reacções de *trans*-esterificação (Ema *et al.*, 1996).

Como nucleófilos, as hidrolases aceitam, para além de água em reacções de hidrólise, uma enorme variedade de compostos (Carrea e Riva, 2000; Roberts, 2001; Cais e Theil, 2002; Ghanem e Aboul-Enein, 2004). Assim, no segundo passo da reacção, a acil-enzima transfere o grupo acilo para álcoois primários (Morgan *et al.*, 1997; Ferraboschi *et al.*, 1998; Nordin *et al.*, 2000), álcoois secundários (Santaniello *et al.*, 2000; Ghanem e Schurig, 2001), álcoois terciários (Hari Krishna *et al.*, 2002), dióis

vicinais (Danieli *et al.*, 1992; Danieli *et al.*, 1997), amins primárias (Öhrner *et al.*, 1996; Balkenhohl *et al.*, 1997; van Rantwijk e Sheldon, 2004), amins secundárias (Morgan *et al.*, 2000), amónia (Slotema *et al.*, 2003; Gotor, 2002; Alfonso e Gotor, 2004), hidrazina (Hacking *et al.*, 2000; Yadav *et al.*, 2005), hidroxilamina (Hacking *et al.*, 2001), tióis (Weber *et al.*, 2004) e H₂O₂ (Klaas e Warwel, 1997; Klaas *et al.*, 2002), possibilitando, portanto, a formação de ésteres, amidas, hidrazidas, tioésteres e peroxiácidos.

1.1.3.3. Selectividade das reacções mediadas pelas hidrolases

A elevada estereo- e regio-selectividade das hidrolases tem encontrado extensa aplicação tanto na resolução de misturas epiméricas como na modificação regio-específica de um grupo funcional em moléculas complexas (Cais e Theil, 2002).

Nas últimas décadas, a síntese de compostos enantiomericamente puros emergiu como um dos campos mais importantes em Química Orgânica e a Biocatálise tem provado ser eficaz na síntese de moléculas quirais, exibindo elevada estereo-selectividade sob condições reaccionais suaves (Breuer *et al.*, 2004). As lipases são os biocatalisadores mais usados na síntese de fármacos opticamente activos, não só por se encontrarem comercialmente disponíveis mas também por operarem em diversos meios reaccionais, como água, solventes orgânicos miscíveis e imiscíveis com água, fluidos supercríticos e líquidos iónicos, o que lhes confere grande versatilidade e aplicabilidade (Muralidhar *et al.*, 2002; Ghanem e Aboul-Enein, 2004; García-Junceda *et al.*, 2004; Cais e Theil, 2002).

As hidrolases têm sido extensamente aplicadas quer em resoluções cinéticas de racematos (Ghanem e Aboul-Enein, 2004), quer em dessimetizações de substratos *meso* e pró-quirais (García-Urdiales *et al.*, 2005).

Um estudo recente estabelece uma comparação entre a síntese assimétrica, a resolução química e a resolução enzimática para a preparação de intermediários quirais na síntese de epitilonas. Neste caso concreto, os autores demonstram que a resolução cinética enzimática de um éster racémico constitui a via mais eficiente, devido à elevada

enantio-selectividade de algumas das lipases testadas, permitindo um menor número de passos do que a síntese assimétrica ou a resolução química (Scheid *et al.*, 2004).

No entanto, quando apenas um dos enantiómeros é necessário, a resolução enzimática dos substratos racémicos tem a limitação de o rendimento ser apenas de 50 %. Esta limitação pode ser ultrapassada usando substratos pró-quirais ou compostos *meso* (García-Urdiales *et al.*, 2005), efectuando a estereo-inversão do enantiómero que não reagiu (Vänttinen e Kanerva, 1995; Oshida *et al.*, 1999) ou através da resolução cinética dinâmica. Neste caso, o isómero que reage mais lentamente com a enzima é isomerizado, em contínuo, durante o processo de resolução. Nos primeiros processos de resolução cinética dinâmica envolvendo hidrolases, a racemização do substrato remanescente era espontânea, ou catalisada por bases ou por ácidos (Stecher e Faber, 1997).

Bäckvall e colaboradores desenvolveram sistemas eficientes de resolução cinética dinâmica de álcoois secundários combinando o biocatalisador (lipase) com um catalisador metálico (de ruténio). Assim, a lipase, na presença de um dador de acilo adequado, catalisa a acilação estereo-selectiva de um dos enantiómeros enquanto o catalisador metálico promove a racemização contínua do álcool secundário remanescente (Persson *et al.*, 1999; Pàmies e Bäckvall, 2001). Esta metodologia pode ser aplicada a uma grande variedade de álcoois secundários. Dependendo do substrato, o rendimento do processo é, geralmente, elevado e o excesso enantiomérico superior a 99 % (Huerta *et al.*, 2001; Pàmies e Bäckvall, 2003 e 2004).

O perfil de estereo-selectividade das lipases e esterases foi estudado de forma sistemática por Kazlauskas, que propôs uma regra empírica simples com o objectivo de prever o reconhecimento quiral destas enzimas. Este investigador estudou a afinidade de três hidrolases (duas lipases e uma esterase) face a um grande número de álcoois secundários e propôs que o local activo destas enzimas contém duas zonas de diferente tamanho. Assim, quando um álcool secundário racémico é sujeito a uma resolução cinética, a estereo-preferência das hidrolases para cada um dos enantiómeros é explicada assumindo que o enantiómero que reage mais rapidamente com a enzima é aquele que consegue acomodar o maior substituinte do estereocentro na zona maior do local activo da enzima e o substituinte médio na zona mais pequena do local activo (Esquema 1.2a). Esta regra funciona bem para álcoois secundários e prevê a enantiopreferência para um dos isómeros, embora não possa prever o grau de enantio-selectividade (Kazlauskas *et al.*, 1991). No que respeita a álcoois primários, Kazlauskas propôs, mais tarde, um modelo semelhante para a lipase de *Pseudomonas cepacia* (Esquema 1.2b) (Weissfloch e Kazlauskas, 1995).

Esquema 1.2. Regra de Kazlauskas para álcoois secundários (a) e primários (b)

(Kazlauskas *et al.*, 1991; Weissfloch e Kazlauskas, 1995).

A enantio-selectividade da protease subtilisina foi, igualmente, estudada seguindo uma aproximação idêntica. Diversos autores verificaram que a selectividade da subtilisina é previsível segundo uma regra empírica semelhante à proposta para lipases e esterases mas possui enantio-selectividade oposta (Fitzpatrick e Klibanov, 1991; Noritomi *et al.*, 1996; Kazlauskas e Weissfloch, 1997; Ema *et al.*, 1999).

A enantio-complementaridade da subtilisina relativamente a diversas lipases e esterases tem sido explorada com vista à obtenção de isómeros de configuração oposta. Por exemplo, a resolução cinética de um álcool secundário, usado como auxiliar quiral, catalisada pela subtilisina ou pela esterase do colesterol permitiu a obtenção de ambos os isómeros com elevado excesso enantiomérico (Mugford *et al.*, 2004). Noutro estudo, a resolução cinética dinâmica de álcoois secundários catalisada, paralelamente, pela subtilisina e pela lipase de *Pseudomonas* sp., na presença de um catalisador metálico, produziu os enantiómeros opostos com elevados rendimentos e excessos enantioméricos (Kim *et al.*, 2004).

A avaliação da eficiência de um processo de resolução de uma mistura racémica é feita através do cálculo da razão enantiomérica, E , a partir da equação:

$$E = \frac{\ln[1 - c(1 + ee_p)]}{\ln[1 - c(1 - ee_p)]} = \frac{\ln[(1 - c)(1 - ee_s)]}{\ln[(1 - c)(1 + ee_s)]}$$

Este parâmetro relaciona o excesso enantiomérico do substrato (ee_s) ou do produto (ee_p) com a percentagem de conversão (c) do substrato em produto, sendo uma constante de selectividade da reacção (Chen *et al.*, 1982 e 1987).

Para além das transformações estereo-selectivas, a capacidade das hidrolases de modificar apenas um grupo funcional na presença de outras funcionalidades, ou seja, de catalisar transformações químio- e regio-selectivas, encontra-se amplamente exemplificada por inúmeros trabalhos. Os compostos naturais polifuncionalizados, como flavonóides, saponinas e outros oligo-sacáridos, com diversos grupos hidroxilo na mesma molécula, têm sido usados como substratos em transformações regio-selectivas catalisadas por hidrolases (Riva, 2001 e 2002).

Por exemplo, a síntese de derivados do paclitaxel foi efectuada por acilação altamente regio-selectiva mediada pela protease termolisina, complementada por uma alcoólise regio-selectiva catalisada pela lipase de *Candida antarctica* (Khmelnitsky *et al.*, 1997). A estrutura complexa da doxorrubicina foi também selectivamente transformada por acilação regio-selectiva recorrendo a diferentes preparações de subtilisina e a uma lipase (Altreuter *et al.*, 2002).

Além disso, as hidrolases são catalisadores muito convenientes na introdução e remoção de grupos protectores, com grande importância na síntese orgânica de moléculas complexas, como peptídeos, compostos beta-lactâmicos, mono- e oligo-sacáridos, nucleótidos, entre outros (Kadereit e Waldmann, 2001).

1.1.4. Oxinitrilases

A revisão do mecanismo e aplicações sintéticas das oxinitrilases incide, sobretudo, na (*R*)-oxinitrilase isolada de amêndoas (oxinitrilase de *Prunus amygdalus*, PaHNL) e na (*S*)-oxinitrilase isolada de *Hevea brasiliensis* (HbHNL), já que estas enzimas são usadas no Capítulo 2 deste trabalho.

A libertação de ácido cianídrico (HCN), cianogénese, é um mecanismo de defesa muito comum nas plantas superiores. O HCN é armazenado sob a forma de cianidrinas, as quais são estabilizadas por ligações *O*- β -glicosídicas a açúcares. Durante a cianogénese, dá-se a libertação da cianidrina por uma β -glicosidase específica e, no passo seguinte, a oxinitrilase decompõe a cianidrina, formando-se ácido cianídrico e o composto carbonílico (Esquema 1.3) (Gregory, 1999; Effenberger, 1999).

Esquema 1.3. Mecanismo de libertação de HCN catalisada por PaHNL e por HbHNL

Assim, as oxinitrilases, ou hidroxinitrilo liases (HNL), são liases capazes de catalisar a formação reversível de cianidrinhas, a partir de HCN e aldeídos e cetonas (Esquema 1.4) (Fechter e Griengl, 2004).

Esquema 1.4. Formação reversível de cianidrinhas catalisada por oxinitrilases

A PaHNL tem sido extensamente estudada. O substrato natural desta enzima é o (*R*)-mandelonitrilo, o qual é convertido em benzaldeído (Esquema 1.3). No entanto, a enzima é capaz de catalisar a reacção inversa, tendo sido intensamente investigada nos últimos anos para a síntese de (*R*)-cianidrinhas, por ser facilmente obtida e pelo largo espectro de substratos que aceita, como é discutido na Secção 1.1.4.2. deste capítulo.

Effenberger deu um contributo decisivo para a utilização de oxinitrilases na síntese de cianidrinhas com elevados rendimentos ópticos e químicos, ao verificar que, em solventes orgânicos imiscíveis com água, a actividade catalítica da PaHNL é mantida ao mesmo tempo que a estabilidade da cianidrina formada aumenta, e a

adição química, não selectiva, de HCN ao substrato aldeído, é suprimida, (Effenberger *et al.*, 1987).

A síntese de (*R*)-cianidrinas mediada pela PaHNL foi descrita com diferentes tipos de preparações enzimáticas, concretamente, um extracto de amêndoa designado *almond meal* (Brussee *et al.*, 1988 e 1990a; Kiljunen e Kanerva, 1997), a enzima isolada (Ognyanov *et al.*, 1991) ou ainda, a enzima imobilizada (Effenberger *et al.*, 1987; Wehtje *et al.*, 1990), quer usando HCN (Effenberger *et al.*, 1987; Kiljunen e Kanerva, 1997), quer cianidrina da acetona (Ognyanov *et al.*, 1991) como dadores de ciano.

Para além desta (*R*)-oxinitrilase, nos últimos anos foram isoladas diversas oxinitrilases, de diferentes famílias de plantas, com enantio-selectividades opostas, abrindo vias eficientes para a síntese enzimática de (*R*)- e de (*S*)-cianidrinas a partir de diversos tipos de substratos (Solís *et al.*, 2004; Lin *et al.*, 1999; Gregory, 1999; Johnson *et al.*, 2000).

A HbHNL foi isolada das folhas da planta da borracha *Hevea brasiliensis* e inicialmente estudada pelo grupo de Griengl (Griengl *et al.*, 1997). O substrato natural da enzima é a cianidrina da acetona como o Esquema 1.3 ilustra, no entanto, esta enzima aceita uma gama vasta de substratos (Secção 1.1.4.2).

A HbHNL foi clonada e produzida por diversos organismos, como *Escherichia coli*, *Saccharomyces cerevisiae* e *Pichia pastoris*, tornando possível a sua produção em larga escala e com menores custos e, conseqüentemente, a aplicação em processos biocatalíticos industriais (Hasslacher *et al.*, 1997; Griengl *et al.*, 1997; Schulze e Wubbolts, 1999).

1.1.4.1. Mecanismo catalítico das oxinitrilases

O conhecimento da estrutura cristalina da HbHNL e os estudos de cinética e inibição enzimática permitiram esclarecer o mecanismo catalítico desta enzima. Os Esquemas 1.5-A e -B representam os mecanismos propostos para a reacção de síntese de cianidrinas catalisada pela HbHNL. O local activo da enzima é constituído por uma tríade catalítica de serina, histidina e aspartato.

Segundo Wagner *et al.* (1996), a reacção inicia-se com o ataque nucleofílico ao carbono carbonílico do substrato pela Ser80, conduzindo à formação de um intermediário tetraédrico hemiacetal ou acetal. A carga negativa gerada é estabilizada por pontes de hidrogénio aos grupos amina dos aminoácidos do local designado *oxyanion hole*. O ataque nucleofílico do ião cianeto e a protonação da Ser80 pela tríade catalítica dão lugar à formação da cianidrina (Esquema 1.5-A).

Posteriormente foi proposto outro mecanismo (Esquema 1.5-B), segundo o qual há participação da Lys236 e a tríade catalítica actua como um sistema de ácido-base, e não como nucleófilo (Zuegg *et al.*, 1999; Gruber *et al.*, 2004).

Embora a (*R*)-oxinitrilase PaHNL tenha sido cristalizada em 1994 (Lauble *et al.*, 1994), a estrutura cristalina tridimensional completa foi resolvida mais tarde e o mecanismo foi proposto com base em estudos de *molecular modeling* (Dreveny *et al.*, 2001 e 2002), não estando, ainda totalmente esclarecido. A estrutura das (*S*)-oxinitrilases de *Manihot esculenta* (Lauble *et al.*, 2001) e *Sorghum bicolor* (Lauble *et al.*, 2002) foram igualmente resolvidas por análise de raios-X.

Esquema 1.5. Mecanismos catalíticos propostos para a HbHNL

1.1.4.2. Aplicações sintéticas das oxinitrilases

O desenvolvimento de metodologias para a síntese enantiopura de cianidrininas é uma área que merece actualmente intensa investigação (North, 2003) como será discutido no Capítulo 2.

As oxinitrilases PaHNL e a HbHNL estão comercialmente disponíveis e têm-se revelado activas e altamente selectivas face a uma gama muito vasta de substratos (Effenberger, 1994; Fechter e Griengl, 2004).

Para além do benzaldeído, a PaHNL aceita outros aldeídos aromáticos (Brussee *et al.*, 1988 e 1990a; Ognyanov *et al.*, 1991; Lin *et al.*, 1999) e alifáticos (Brussee *et al.*, 1988; Ognyanov *et al.*, 1991; Menéndez *et al.*, 1995; Huuhtanen e Kanerva, 1992), assim como cetonas alifáticas (Effenberger e Heid, 1995; Kiljunen e Kanerva, 1997) e, segundo estudos mais recentes, cetonas alicíclicas α - e β -substituídas (Effenberger *et al.*, 2002; Kobler *et al.*, 2004).

Usando quer HCN quer cianidrina da acetona como dadores de ciano, a HbHNL aceita como substratos uma grande variedade de compostos carbonílicos, desde aldeídos alifáticos, a aldeídos aromáticos, cetonas alifáticas, aromáticas e alicíclicas, com bons rendimentos e excessos enantioméricos elevados (Kemplier e Griengl, 1993; Kemplier *et al.*, 1995; Griengl *et al.*, 1997 e 1998).

O grupo do Doutor Sergio Riva estudou a afinidade e selectividade da PaHNL e da HbHNL face a um largo conjunto de aldeídos α - e β -substituídos, focando a atenção na influência de um estereocentro pré-existente na selectividade destas enzimas. Estes autores verificaram que as enzimas PaHNL e HbHNL não conseguem discriminar

substratos racémicos, ficando a sua selectividade afectada apenas quando o estereocentro se encontra adjacente ao grupo aldeído (Danieli *et al.*, 1996 e 1998; Roda *et al.*, 1999 e 2002; Bianchi *et al.*, 2001).

Uma aplicação interessante das oxinitrilases na síntese enantio-selectiva de cianidrinhas foi desenvolvida pelo grupo de Gotor (Menéndez *et al.*, 1995) e, mais tarde, também explorada por outros autores (Kiljunen e Kanerva, 1997).

Esquema 1.6. *Trans*-hidrocianação de um aldeído e de uma cianidrina racémica de uma cetona, catalisada por PaHNL (Menéndez *et al.*, 1995).

Como o Esquema 1.6 ilustra, a *trans*-hidrocianação enzimática mediada pela PaHNL usando uma cianidrina racémica de uma cetona como dador de ciano e um aldeído como segundo substrato da reacção, permite a obtenção da (*R*)-cianidrina do aldeído e da (*S*)-cianidrina da cetona, resultante do consumo estereo-selectivo do isómero (*R*) da cianidrina inicial (Menéndez *et al.*, 1995). Com este processo torna-se possível obter, na mesma reacção, dois compostos enantiomericamente enriquecidos.

Na sequência deste trabalho, os autores desenvolveram uma via químico-enzimática para a obtenção de importantes intermediários alcalóides, concretamente, (*S*)-*N*-benzil-2-cianopiperidinas, envolvendo a síntese de (*R*)-cianidrinas como um dos passos chave da sequência (Nazabadioko *et al.*, 1998).

A síntese químico-enzimática de 2-aminoálcoois quirais, concretamente de (*R*)-terbutalina e de (*R*)-salbutamol, constitui um exemplo da utilidade da PaHNL na obtenção de compostos com interesse farmacêutico (Effenberger e Jäger, 1997).

A síntese à escala industrial do ácido (*R*)-2-cloromandélico, um intermediário da síntese do anticoagulante clopidogrel, tem sido investigada, recorrendo quer a uma PaHNL recombinante (Glieder *et al.*, 2003), quer à *almond meal* em condições reaccionais optimizadas (van Langen *et al.*, 2003a), como catalisadores assimétricos da síntese de (*R*)-2-cloro-mandelonitrilo.

O desenvolvimento de processos enzimáticos (à escala de várias toneladas) para a adição estereo-selectiva de ácido cianídrico a aldeídos ou cetonas (Effenberger *et al.*, 2002) mediada por oxinitrilases (HNLs) é um dos mais importantes sucessos da biocatálise nos últimos anos (Gregory, 1999; Griengl *et al.*, 2000; North, 2003).

1.1.5. Preparações enzimáticas

As enzimas podem ser comercialmente disponíveis ou isoladas em laboratório. As mais acessíveis economicamente são as preparações “crude”, mas são, eventualmente, menos específicas e selectivas. As enzimas podem ainda ser usadas na forma livre ou imobilizada. Em meio orgânico (Secção 1.1.6.1), as enzimas podem ser usadas como enzimas nativas, na forma de pó em suspensão, liofilizadas ou imobilizadas.

A imobilização tem como principal vantagem conferir maior estabilidade à preparação enzimática, prevenindo, adicionalmente, a contaminação do produto com proteína. Além disso, a imobilização permite a modulação das propriedades catalíticas das enzimas. Algumas vantagens da imobilização são comuns à catálise heterogénea, como maior facilidade de remoção do biocatalisador do meio, facilitando o isolamento do produto e possibilitando a reciclagem e reutilização do biocatalisador. Além disso, a imobilização das enzimas é importante na aplicação ao nível industrial em reactores em contínuo (Carrea e Riva, 2000; Lalonde e Margolin, 2002; Bornscheuer, 2003).

As técnicas de imobilização mais frequentes podem ser divididas em quatro categorias: adsorção não covalente a um suporte sólido inerte, ligação covalente a um suporte sólido, inclusão num gel polimérico, membrana ou cápsula e, por fim, *cross-linking* da enzima (Lalonde e Margolin, 2002).

A imobilização por adsorção a um suporte sólido, como celite, vidro, resinas de troca iónica ou polipropileno, envolve interacções entre a enzima e o suporte que vão desde ligações iónicas, pontes de hidrogénio, forças de van der Waals, a interacções hidrofóbicas. Este tipo de imobilização tem as vantagens de ser simples e de baixo

custo. Por exemplo, a Novozym 435, provavelmente a lipase mais usada em biocatálise, é a lipase B de *Candida antarctica* produzida por um microrganismo geneticamente modificado de *Aspergillus* e adsorvida numa resina sintética macroporosa. A Novozym 435 é um catalisador altamente versátil, com afinidade para uma grande variedade de diferentes substratos, termostável e activo em diversos solventes orgânicos.

A imobilização por ligação covalente a um suporte sólido envolve a formação de ligações covalentes entre aminoácidos de cadeias laterais da proteína e grupos funcionais reactivos do suporte, podendo envolver o uso de activadores ou *linkers*. Este tipo de imobilização confere maior estabilidade à enzima e previne a libertação da enzima no meio reaccional (Lalonde e Margolin, 2002).

A imobilização por inclusão num gel polimérico, em membranas ou em lipossomas não envolve a modificação química da enzima. Por exemplo, a inclusão de lipases num sol-gel hidrofóbico de sílica, permitiu a obtenção de biocatalisadores recicláveis com actividade catalítica aumentada (Reetz *et al.*, 1995 e 2003). A (S)-oxinitrilase HbHNL foi, recentemente, imobilizada numa matriz sol-gel, proporcionando uma preparação enzimática activa, estável em meio orgânico e reciclável (Veum *et al.*, 2004).

Os *cross-linked enzyme crystals*, CLEC, consistem em cristais de enzima com ligações cruzadas a um reagente bifuncional, geralmente, glutaraldeído. Os CLEC, não só mantêm a actividade catalítica, como evidenciam um elevado grau de pureza, o que confere maior selectividade comparativamente às preparações crude. Além disso, os CLEC exibem maior estabilidade do que as enzimas solúveis face a condições reaccionais desfavoráveis em termos de temperatura, pH e presença de solventes orgânicos (St. Clair e Navia, 1992; Lalonde *et al.*, 1995; Wang *et al.*, 1997). Outras

vantagens notáveis dos CLEC são a elevada actividade catalítica, a facilidade de recuperação do catalisador, a manutenção da actividade catalítica em posteriores utilizações e a elevada produtividade (Margolin, 1996; Margolin e Navia, 2001; Roy e Abraham, 2004). Esta tecnologia foi aplicada a diversas hidrolases, como subtilisina, termolisina, penicilina acilase, lipases de *Candida rugosa* e de *Pseudomonas cepacia* (Roy e Abraham, 2004) e, inclusivamente, a desidrogenases, sendo, neste caso, a cristalização da enzima efectuada na presença do cofactor (St. Clair *et al.*, 2000).

Uma vez que a cristalização de proteínas é uma operação complexa, os *cross-linked enzyme aggregates*, CLEA, isto é, agregados de enzima com ligações cruzadas ao glutaraldeído, podem constituir uma boa alternativa aos CLEC. Estas preparações enzimáticas oferecem as vantagens dos CLEC mas são simples de preparar. Diversas lipases (Lopez-Serrano *et al.*, 2002), a (*R*)-oxinitrilase PaHNL (van Langen *et al.*, 2005) e a penicilina acilase (van Langen *et al.*, 2003b) foram imobilizadas na forma de CLEA, apresentando actividade catalítica aumentada.

1.1.6. Biocatálise em meios não convencionais

O meio de reacção natural para a maioria das enzimas é a água. No entanto, a transformação enzimática de compostos orgânicos pouco polares, dependendo da enzima envolvida, requer uma de três aproximações. A primeira consiste em usar um meio aquoso com concentrações variáveis de solventes miscíveis com água. A segunda consiste em usar um sistema bifásico composto por água e um solvente imiscível com água. Finalmente, a terceira aproximação consiste em usar um solvente orgânico com uma quantidade mínima necessária de água.

1.1.6.1. Enzimas em solventes orgânicos

A utilização de enzimas em solventes orgânicos constitui um dos grandes avanços no campo da biocatálise. Embora durante décadas se pensasse que as enzimas eram apenas activas em meio aquoso, Klibanov demonstrou na década de 80 que algumas enzimas são activas em meio orgânico anidro.

As moléculas de água são necessárias para manter a conformação cataliticamente activa da enzima. Assim, a questão colocada por Klibanov foi “qual a quantidade necessária de água”. Com efeito, este investigador demonstrou que, desde que a camada de hidratação da enzima necessária à actividade catalítica seja mantida, a água restante pode ser substituída por um solvente orgânico (Zaks e Klibanov, 1984; Klibanov, 1986).

De facto, estas observações não são surpreendentes já que na Natureza muitas enzimas não são activas em água mas sim integradas em membranas, portanto num ambiente hidrofóbico. Neste tipo de ambiente, a capacidade para ligar fortemente a água essencial é uma característica destas enzimas (Klibanov, 1986).

No entanto, diversos autores demonstram que, em meio orgânico, as enzimas são menos activas do que em meio aquoso. Este fenómeno foi muito estudado e um dos factores responsáveis por esta perda de actividade é o processo de liofilização da enzima (Klibanov, 1997; Secundo e Carrea, 2002). De facto, a adição de compostos lioprotectores, como açúcares, polietilenoglicol, KCl ou éteres coroa à solução de enzima, antes da liofilização, aumenta significativamente a actividade enzimática (Dabulis e Klibanov, 1993; Khmelnitsky *et al.*, 1994; Secundo e Carrea, 2002). Adicionalmente, em sistemas quase anidros, a manutenção do pH num intervalo óptimo é crítica para a actividade da enzima. A liofilização da enzima a partir de uma solução tamponada em condições óptimas de pH é importante para uma boa actividade catalítica (Zaks e Klibanov, 1985; Klibanov, 1997; Adamczak e Hari Krishna, 2004).

Outra razão para a diminuição da actividade catalítica em solventes orgânicos é a polaridade do solvente orgânico e, portanto, a sua maior ou menor capacidade para interferir com a camada de hidratação da enzima. Com efeito, Klibanov observou que as enzimas são mais activas em solventes hidrofóbicos como tolueno ou ciclo-hexano do que em solventes miscíveis com água, como acetona. Aparentemente, isto deve-se à localização de uma quantidade mínima de água na interface enzima / solvente orgânico, sendo essa água crítica para a actividade da enzima (Zaks e Klibanov, 1988a,b). Assim, a escolha do solvente orgânico é importante para manter a quantidade necessária de

água residual à superfície da enzima. Ou seja, a quantidade de água no meio reaccional necessária para a actividade máxima da enzima depende do tipo de solvente. Um parâmetro a ter em conta na escolha do solvente é o $\log P$, em que P é o coeficiente de partilha do solvente num sistema bifásico de octanol / água. O $\log P$ de um solvente caracteriza, portanto, a sua hidrofobicidade. Os valores de $\log P$ superiores a 3 ou 4 estão relacionados com elevada retenção da actividade catalítica, enquanto solventes mais hidrofílicos, com $\log P$ inferior a 2 (como DMF, DMSO ou etanol) levam, frequentemente, à desactivação da enzima. Estas observações são consistentes com a capacidade dos solventes hidrofílicos de remover a água essencial à conformação catalítica da enzima. Os resultados usando solventes com valores intermediários de $\log P$ são muito variáveis. A influência do $\log P$ de um solvente orgânico na actividade da enzima é previsível, mas no que respeita à selectividade, os resultados são muito variáveis (Laane *et al.*, 1987; Bommarius e Riebel, 2004d).

Os efeitos dos solventes não podem ser generalizados. Por exemplo, a lipase pancreática de porco é activa em piridina anidra, o que sugere que a enzima consegue reter a água ligada à sua superfície, mesmo num solvente miscível com água. Em contraste, a lipase de *Candida rugosa* é quase inactiva em piridina (Zaks and Klibanov, 1985).

As interacções enzima - solvente - substrato podem influenciar a velocidade e a selectividade da reacção, sendo dificilmente previsíveis com base nos parâmetros físico-químicos dos solventes. Assim, a escolha do solvente, embora se possa basear nalgum conhecimento prévio acerca da enzima e das características de solubilidade do substrato, requer um ensaio de rastreio de solventes (Klibanov, 2001; Bommarius e Riebel,

2004d). Por outro lado, o controlo da actividade termodinâmica da água, a_w , parece ser crucial para a optimização da reacção enzimática, já que existe uma correlação entre a actividade catalítica e a hidratação da enzima, a qual não depende da quantidade total de água no meio (Halling, 1994; Anthonsen e Sjursnes, 2000; Bommarius e Riebel, 2004d).

Diversos estudos demonstram que a estabilidade das enzimas é superior em solventes orgânicos, comparativamente às reacções em meio aquoso. Por exemplo, a lipase de pâncreas de porco mantém-se estável a 100 °C durante mais de 12 horas em meio não aquoso (Zaks and Klibanov, 1984). De facto, em meio aquoso, as enzimas sofrem desnaturação a altas temperaturas devido a alterações conformacionais e a alterações covalentes na estrutura primária, como hidrólise de ligações peptídicas, sendo a água necessária a estes dois processos (Klibanov, 2001).

Além disso, a selectividade de algumas enzimas é variável com o solvente usado na reacção, tanto em acilações ou desacilações regio-selectivas (Rubio *et al.*, 1991; MacManus e Vulfson, 1997), como em transformações estereo-selectivas (Sakurai *et al.*, 1988; Fitzpatrick e Klibanov, 1991; Secundo *et al.*, 1992).

Um exemplo interessante é o da dessimetização de um substrato pró-quiral através da hidrólise de um dos grupos éster, catalisada pela lipase de *Pseudomonas cepacia* (Hirose *et al.*, 1992). Como o Esquema 1.7 ilustra, a enzima mostra estereo-selectividade oposta em ciclo-hexano e em éter di-isopropílico.

Esquema 1.7. Hidrólise estereo-selectiva de um substrato pró-quiral catalisada pela lipase de *Pseudomonas cepacia*. Em ciclo-hexano a enzima é selectiva para o isómero (*R*), enquanto em éter di-isopropílico é selectiva para o isómero (*S*) (Hirose *et al.*, 1992).

Uma das grandes vantagens da biocatálise em meio orgânico, para além da solubilização de compostos hidrófobos, reside no facto de as hidrolases aceitarem outros nucleófilos que não a água. Assim, reduzindo ao mínimo a quantidade de água no meio, a acil-enzima aceita como segundo substrato um álcool, ou outro nucleófilo como foi discutido (Secção 1.1.3.2), passando a catalisar a reacção inversa, ou seja, reacções de síntese de ésteres ou amidas, entre outros, exibindo, muitas vezes, novas características de selectividade (Zaks e Klivanov, 1984).

Outra vantagem do uso de enzimas em meio orgânico reside no facto de as enzimas, mesmo na forma livre (não imobilizadas), se encontrarem em suspensão no meio reaccional, sendo facilmente removidas após a reacção por filtração. Consegue-se, portanto, uma simplificação da recuperação do produto e do biocatalisador.

As reacções indesejáveis envolvendo água, como a hidrólise de grupos lábeis, migração de grupos acilo, racemização e decomposição, são suprimidas. Além disso, a contaminação microbiana do meio reaccional que resultaria na libertação de proteases e na inactivação do biocatalisador, é também suprimida em meio orgânico (Klibanov, 1986). Por fim, outro aspecto importante da biocatálise em meio não aquoso é a possibilidade de uma melhor integração dos passos biocatalíticos com passos de síntese química.

1.1.6.2. Enzimas noutros meios não convencionais

A volatilidade, inflamabilidade, toxicidade e nocividade ambiental dos solventes orgânicos têm motivado um esforço significativo no sentido de os substituir ao nível industrial por alternativas mais benignas (Sherman *et al.*, 1998). Assim, no que respeita à biocatálise, nos últimos anos tem sido investigada a actividade das enzimas noutros meios reaccionais, com vista a uma melhor aplicação industrial deste tipo de catálise.

As reacções em que se utiliza um biocatalisador sólido e uma fase gasosa, para substratos que possam formar uma fase gasosa sob determinadas condições de pressão e temperatura, apresentam vantagens ao nível da recuperação do biocatalisador e do isolamento do produto no final da reacção, dispensando o uso de solventes orgânicos (Lamare *et al.*, 2004).

Os fluidos supercríticos e os líquidos iónicos como meios reaccionais em síntese química são estratégias que se inserem na crescente procura de tecnologias mais limpas (Krieger *et al.*, 2004; Jain *et al.*, 2005).

Neste contexto, os processos biocatalíticos na presença de fluidos supercríticos, nomeadamente, CO₂, etileno, etano e propano, têm merecido grande atenção nos últimos anos (Matsuda *et al.*, 2004). Diversos estudos acerca da actividade e selectividade de hidrolases, como a Novozym 435 (Almeida *et al.*, 1998), a subtilisina (Borges de Carvalho *et al.*, 1996; Fontes *et al.*, 2001) e a cutinase (Fontes *et al.*, 1998), esclarecem os efeitos de diversos parâmetros (solvente supercrítico, actividade da água, pressão e temperatura) na actividade catalítica e na selectividade das enzimas. O fluido supercrítico mais utilizado é o CO₂ devido à temperatura e pressão moderadas que

requer para passar ao estado supercrítico, ao seu carácter não tóxico e não inflamável e, ainda, ao seu baixo custo. Estes sistemas têm a vantagem de solubilizar substratos hidrófobos e de, em reacções mediadas por hidrolases, deslocar o equilíbrio químico no sentido da síntese e não da hidrólise. A maior vantagem da biocatálise em fluidos supercríticos reside na facilidade de remoção do biocatalisador e de isolamento do produto final. Estes sistemas apresentam desvantagens ao nível da complexidade do equipamento requerido e dos gastos energéticos que comportam (Krieger *et al.*, 2004).

Os líquidos iónicos são um meio reaccional muito investigado em síntese química devido às características específicas que apresentam. Os líquidos iónicos são sais de baixo ponto de fusão, líquidos à temperatura ambiente, que, para além de uma grande capacidade de dissolver uma variedade de compostos orgânicos, organometálicos e inorgânicos, têm as vantagens de serem não-voláteis e fáceis de reciclar, o que os torna eventualmente menos agressivos para o ambiente do que os solventes orgânicos (Jain *et al.*, 2005; Sheldon, 2005). Estudos com a lipase de *Candida antarctica* demonstram que a enzima é activa em líquidos iónicos catalisando reacções de alcoólise, amoniólise e per-hidrólise (Madeira Lau *et al.*, 2000).

A substituição de solventes orgânicos por líquidos iónicos pode levar a alterações notáveis na reactividade, selectividade e estabilidade da enzima (Madeira Lau *et al.*, 2000; Lozano *et al.*, 2001; Sheldon *et al.*, 2002). Estudos em processos de resolução cinética de um racemato, por *trans*-esterificação do álcool secundário, demonstraram que a conversão e a enantio-selectividade das enzimas aumentam em líquidos iónicos comparando com solventes orgânicos (Schöfer *et al.*, 2001; Kim *et al.*, 2001). Além disso, também a regio-selectividade da lipase B de *Candida antarctica* como catalisador

da acilação da glucose, aumenta em líquidos iónicos comparando com solventes orgânicos (Park e Kazlauskas, 2001).

A resolução cinética dinâmica de álcoois secundários catalisada por hidrolases provou ser vantajosa em líquidos iónicos, uma vez que estes favorecem a racemização por um catalisador metálico do enantiómero não acilado, tornando o processo mais eficiente (Kim *et al.*, 2004).

Para além de hidrolases, outras enzimas têm mostrado ser activas em líquidos iónicos. Recentemente, foram descritas reacções de sulfoxidação estereo-selectiva catalisada por um sistema peroxidase-oxidase (Okrasa *et al.*, 2003) e reacções de hidrocianação catalisadas por oxinitrilases (Gaisberger *et al.*, 2004), usando líquidos iónicos como meio reaccional.

A combinação do uso de líquidos iónicos como meio reaccional, onde se encontra o catalisador enzimático, com um fluido supercrítico capaz de transportar o substrato para o meio reaccional e remover o produto formado, tem a vantagem de evitar o uso de solventes orgânicos para recuperar o produto do meio reaccional (líquido iónico) e de constituir um processo integrado de biocatálise e separação em contínuo, com interesse no âmbito da Química Verde (Reetz *et al.*, 2002; Garcia *et al.*, 2004).

1.1.7. Biocatálise no contexto da Química Verde

O impacto ambiental da indústria química e farmacêutica ao nível mundial e o consumo crescente de produtos que derivam destas indústrias, sobretudo por países que até aqui não os consumiam, levaram ao desenvolvimento de uma nova área de investigação designada Química Verde (Anastas e Kirchhoff, 2002; Collins, 2003).

A Química Verde, ou química sustentável, é transversal a todas as áreas da investigação em química e engenharia química. A Química Verde está postulada em 12 princípios, e visa, em linhas gerais, a prevenção do desperdício, o uso de processos catalíticos em detrimento de processos estequiométricos, a redução do uso de solventes orgânicos, o uso de processos e reagentes menos agressivos ou tóxicos, o desenvolvimento de processos que impliquem um consumo mínimo de energia, o uso de matérias-primas renováveis, como os açúcares, o uso de processos com conversões e selectividades próximas de 100 % e, assim, a redução da formação de produtos secundários. O objectivo último da Química Verde é o desenvolvimento sustentável (Sheldon, 2000; Anastas e Kirchhoff, 2002; Bommarius e Riebel, 2004a).

Neste âmbito, a biocatálise oferece não só condições reaccionais suaves como, sobretudo, elevada selectividade. Assim, a transformação químio-, regio- e enantio-selectiva de compostos complexos ou quirais resulta numa redução dos produtos secundários ou de isómeros indesejáveis, concomitante com uma redução da quantidade inicial de reagentes necessária para obter determinada quantidade de produto, ou seja, economia do átomo, que constitui um dos conceitos centrais no âmbito da Química Verde (Trost, 1995; Sheldon, 2000).

Por outro lado, os processos biocatalíticos são, em geral, heterogéneos. De facto, em reacções em meio aquoso, as enzimas são, muitas vezes usadas na forma imobilizada. Quando o meio reaccional é um solvente orgânico, as enzimas, livres ou imobilizadas, encontram-se em suspensão, podendo ser removidas por filtração e, se possível, reutilizadas. Além disso, os biocatalisadores são materiais renováveis, ao contrário de muitos catalisadores químicos (Bommarius e Riebel, 2004a). Por fim, a utilização de enzimas em meios reaccionais alternativos, como os líquidos iónicos e os fluidos supercríticos, já discutida na Secção 1.1.6.2., pode ser vantajosa no sentido de desenvolver metodologias sintéticas selectivas em meios ambientalmente mais benignos (Sheldon, 2005; Garcia *et al.*, 2004).

1.1.8. Aplicação dos processos biocatalíticos na indústria farmacêutica

A selectividade das enzimas face a substratos complexos, a diversidade de substratos não naturais que aceitam, assim como os desenvolvimentos tecnológicos ao nível da produção de enzimas, contribuem para a crescente aplicação industrial da biocatálise em síntese orgânica (Schoemaker *et al.*, 2003; Gotor, 2002; Schmid *et al.*, 2001).

A maioria dos processos biocatalíticos na indústria envolve alvos quirais. A quiralidade tem um papel crucial na Natureza e é o factor chave na eficácia de muitas moléculas bioactivas. Assim, devido ao crescente conhecimento das propriedades de cada um dos isómeros de uma determinada molécula activa, a um maior conhecimento dos alvos biológicos desses compostos quirais e às crescentes exigências regulamentares, nos últimos anos, as indústrias farmacêutica, alimentar e agroquímica fizeram um esforço ímpar no sentido de implementar vias sintéticas selectivas para obtenção de compostos enantiomericamente puros (Breuer *et al.*, 2004). Este interesse da indústria por processos estereo-selectivos tem servido de motor ao desenvolvimento da biocatálise. De facto, na síntese de moléculas enantiomericamente puras, as enzimas podem ser alternativas viáveis aos catalisadores químicos quirais, os quais são muitas vezes compostos complexos e caros, e às separações cromatográficas, que dão, frequentemente, rendimentos baixos (Patel, 2001 e 2004; Ghanem e Aboul-Enein, 2004; Yazbeck *et al.*, 2004).

Com efeito, um grande número de indústrias químicas e farmacêuticas tem vindo a interessar-se pela biocatálise, quer envolvendo células inteiras, quer enzimas isoladas (Zaks, 2001; Panke *et al.*, 2004) e cerca de 300 processos biocatalíticos foram implementados ao nível industrial (Hari Krishna, 2002; Schulze e Wubbolts, 1999).

Os exemplos da aplicação de enzimas são muito numerosos e envolvem diversos tipos de compostos bioactivos, como fármacos antitumorais, anti-hipertensivos, antivirais, agonistas dos receptores β_2 , agonistas do receptor da melatonina, entre outros (Benjamin e Pandey, 1998; Schmid e Verger, 1998; Patel, 2001; Zaks, 2001; Gotor, 2002).

Por exemplo, a resolução cinética mediada por lipases é actualmente aplicada na produção industrial, pela BASF, de aminas e álcoois quirais, intermediários na síntese de fármacos e pesticidas (Balkenhohl *et al.*, 1997; Schmid *et al.*, 2001; Hari Krishna, 2002). O Esquema 1.8-A exemplifica um processo industrial de produção de (*R*)- e (*S*)-1-feniletilamina por resolução cinética enzimática, usando metoxiacetato de etilo como dador de acilo (Yazbeck *et al.*, 2004). O Esquema 1.8-B exemplifica uma resolução cinética de um diéster racémico por hidrólise catalisada pela subtilisina. O enantiómero (*R*) obtido é um intermediário da síntese de inibidores da collagenase (Liese, 2002).

Esquema 1.8. Exemplos de processos industriais de resoluções cinéticas catalisadas por hidrolases.

A possibilidade de efectuar transformações regio-selectivas catalisadas por enzimas foi também explorada ao nível industrial. Por exemplo, a síntese de pró-fármacos de ribavirina (Tamarez *et al.*, 2003) e de paclitaxel (Khmelnitsky *et al.*, 1997) foi efectuada recorrendo a hidrolases como catalisadores de reacções de acilação regio-selectiva.

De notar ainda que, a maioria das enzimas usadas na indústria farmacêutica são hidrolases. Para o sucesso das hidrolases na síntese industrial de compostos orgânicos muito contribuiu o facto de estas enzimas serem comercialmente disponíveis, altamente estáveis e activas em meio orgânico, cofactor-independentes e capazes de aceitar uma vasta gama de substratos não naturais (Hari Krishna, 2002; Liese, 2002).

1.1.9. Desenvolvimentos recentes e perspectivas futuras

Os principais avanços tecnológicos que poderão ter motivado a indústria a adoptar biotransformações enzimáticas foram a biocatálise em meio orgânico, o desenvolvimento no campo da imobilização de enzimas, o desenvolvimento de métodos de rastreio (*screening*) de novos biocatalisadores e as tecnologias de ADN recombinante possibilitando a expressão de enzimas noutros hospedeiros e, portanto, a sua produção com menor custo (Hari Krishna, 2002; Adamczak e Hari Krishna, 2004; Koeller e Wong, 2001).

O desenvolvimento da tecnologia de ADN recombinante permite a obtenção de novos biocatalisadores, através da engenharia metabólica, da engenharia de proteínas e da evolução dirigida.

A identificação da estrutura - função de algumas enzimas permitiu desenvolver técnicas de mutagénese dirigida, com vista ao *design* racional das enzimas (engenharia de proteínas). Por exemplo, a enantio-selectividade da lipase de *Candida antarctica* na resolução de uma mistura racémica de 1-cloro-2-octanol foi aumentada de E=14 para E=28, através da troca de um único aminoácido, de acordo com o que havia sido previsto por *molecular modeling* (Rotticci *et al.*, 2001).

A evolução dirigida baseia-se em processos de recombinação do património genético por mutagénese aleatória, gerando um grande número de mutantes que são submetidos a um rastreio ou selecção para a propriedade pretendida, por processos automatizados. A evolução dirigida permite a alteração de diversas propriedades enzimáticas, como a termostabilidade, enantio-selectividade, actividade catalítica, entre

outras (Zha *et al.*, 2001), e constitui, actualmente, uma área de intensa investigação, contribuindo de forma decisiva para o desenvolvimento da biocatálise (Jaeger e Eggert, 2004).

O rastreio por processos automatizados de novos biocatalisadores a partir de um elevado número microrganismos constitui também uma abordagem actual na procura de soluções que envolvam a biocatálise para resolver problemas sintéticos específicos (Bornscheuer, 2004; Lorenz e Eck, 2004).

O isolamento e caracterização de microrganismos extremófilos, capazes de suportar meios agressivos em termos de temperatura, pH e presença de solventes orgânicos, constitui uma área promissora em biocatálise, dado que os catalisadores obtidos, quer células inteiras, quer enzimas isoladas, são particularmente robustos para utilização em síntese orgânica (Sardessai e Bhosle, 2004; Gomes e Steiner, 2004).

Num outro âmbito, a catálise enzimática constitui uma estratégia válida para aumentar a diversidade molecular e contribuir para a descoberta de novos fármacos. Com efeito, a biocatálise combinatorial envolve o uso de um conjunto de actividades enzimáticas para a síntese iterativa de compostos orgânicos, permitindo a obtenção de bibliotecas de compostos a partir de um único substrato (Krstenansky e Khmelnsky, 1999). Por exemplo, a síntese de uma biblioteca de flavonóides acilados foi possível através do uso de lipases e proteases em meio não aquoso (Rich *et al.*, 2002). Um outro exemplo diz respeito à síntese de uma biblioteca de 39 derivados de ácidos biliares, a

partir de um único substrato, combinando reacções de oxidação regio- e enantio-selectiva catalisadas por oxido-redutases específicas de esteróides, com reacções regio-selectivas de acilação mediadas por uma lipase, introduzindo uma variedade de grupos acilo (Secundo *et al.*, 2003).

As expectativas quanto à aplicação de biocatalisadores são grandes em áreas muito actuais, como a descontaminação ambiental (Benjamin e Pandey, 1998; Parales e Haddock, 2004), uso de fontes renováveis de matérias-primas (Held *et al.*, 2000), preparação de nutrientes funcionais, ou nutracêuticos (Osório *et al.*, 2001; King *et al.*, 2001; Halldorsson *et al.*, 2003; Vu *et al.*, 2004), novos tratamentos médicos (Margolin e Navia, 2001) e implementação de novos processos industriais.

Numa perspectiva mais geral, verifica-se que as ciências da vida se encontram em rápido progresso e, no âmbito da biocatálise, permitirão, a breve prazo, dispor de enzimas com melhores características e passíveis de serem usadas em harmonia com outras tecnologias (Koeller e Wong, 2001; Arnold e Glieder, 2003; Adamczak e Hari Krishna, 2004).

1.2. Biocatálise em substratos esteróides

1.2.1. Os esteróides como substratos em transformações selectivas

Os esteróides constituem uma importante classe de compostos naturais que podem actuar como reguladores fisiológicos (Schroepfer, 2000; Harrold, 2002) hormonas (Brueggemeier *et al.*, 2002), provitaminas (Zavod, 2002), entre outros.

De facto, muitos esteróides sintéticos são usados na terapêutica de diversas patologias. Por exemplo, no tratamento endócrino do cancro da mama, são usados esteróides inibidores da aromatase (Brodie e Njar, 2000), antiestrogénios e progestinas (Lønning e Lien, 1995). O tratamento endócrino do cancro da próstata envolve o uso de esteróides com actividade antiandrogénica (Brueggemeier *et al.*, 2002; Tammela, 2004).

Adicionalmente, diversas progestinas (Wiegratz e Kuhl, 2004; Sitruk-Ware, 2004), antiprogestinas (Hess-Stumpp *et al.*, 2002) e estrogénios são usados em terapêuticas hormonais variadas (Curran e Wagstaff, 2004). Outros esteróides com ampla utilização terapêutica são os corticosteróides (Miller *et al.*, 2002), os neurosteróides (Lambert *et al.*, 1995; Gasior *et al.*, 1999) e os esteróides anabolizantes (Orr e Singh, 2004; Shahidi, 2001). Finalmente, os ácidos biliares são usados no tratamento de doenças hepáticas, cálculos biliares, evidenciando, ainda, propriedades antivirais e antifúngicas, entre outras, que poderão ser exploradas em novas aplicações terapêuticas (Virtanen e Kolehmainen, 2004).

Para além do esforço no sentido de desenhar e sintetisar derivados mais activos dentro destas classes de esteróides, observa-se um grande interesse no isolamento e identificação de compostos esteróides naturais com novas bioactividades (Wang *et al.*, 2004, Blunt *et al.*, 2003).

Assim, as propriedades biológicas e farmacológicas dos esteróides e o elevado custo que a sua síntese comporta, justificam a grande relevância que é dada aos processos de transformação selectiva destes compostos.

A estrutura anelar dos compostos esteróides é estericamente condicionada, com diversos centros quirais, o que permite que reacções químicas relativamente simples conduzam, por vezes, à obtenção de produtos isomericamente enriquecidos. No entanto, o reforço da diastereo-selectividade nas transformações de esteróides continua a merecer intensa investigação.

Por outro lado, dada a complexidade das moléculas esteróides, as transformações regio-selectivas, ao possibilitar a modificação de um grupo funcional sem necessidade de protecção / desprotecção de outros grupos funcionais equivalentes, têm grande impacto na síntese de esteróides.

Neste contexto, a transformação biocatalítica de esteróides tem merecido grande atenção por parte de alguns grupos de investigadores, quer usando células inteiras (Fernandes *et al.*, 2003), quer usando enzimas isoladas (Riva, 1991) como biocatalisadores.

1.2.2. Biotransformações de substratos esteróides usando células inteiras

As biotransformações mediadas por células inteiras como sistemas catalíticos têm sido aplicadas com êxito na transformação de substratos esteróides (Fernandes *et al.*, 2003; Holland, 1999; Bortolini *et al.*, 1997).

A degradação da cadeia lateral do colesterol e de fitosteróis facilmente disponíveis, como sitosterol, campesterol ou estigmasterol, catalisada por *Mycobacterium* sp., para obtenção de esteróides da classe androstano e pregnano, os quais servem de materiais de partida para a síntese de diversos fármacos e hormonas, constitui uma importante aplicação industrial da biocatálise (Schmid *et al.*, 2001; Fernandes *et al.*, 2003).

Este processo de biotransformação tem sido muito estudado no que respeita à imobilização das células e ao uso de solventes orgânicos, de forma a aumentar a produtividade da bioconversão dos esteróides, os quais são pouco solúveis em meio aquoso (Cabral *et al.*, 1997; Staebler *et al.*, 2004; Cruz *et al.*, 2004).

A introdução regio- e enantio-selectiva de grupos hidroxilo em carbonos não funcionalizados constitui outra transformação eficazmente catalisada por estes sistemas (Holland, 1999; Pellissier e Santelli, 2001; Fernandes *et al.*, 2003), com grande aplicação na produção industrial de corticosteróides.

1.2.3. Oxido-redutases específicas de esteróides

As desidrogenases de esteróides (HSDH) são oxido-redutases dependentes de cofactores, NAD(H) ou NADP(H), específicas de substratos esteróides, capazes de catalisar a interconversão de grupos hidroxilo-cetona nas posições C-3, C-7, C-12 e C-20 (Riva *et al.*, 1986; Carrea *et al.*, 1988; Riva *et al.*, 1988; Bovara *et al.*, 1993; Carrea *et al.*, 1996).

A imobilização das desidrogenases de esteróides, o desenvolvimento de métodos de regeneração do cofactor e o uso de meios de reacção bifásicos aumentaram o campo de aplicação destas enzimas.

Os Esquemas 1.9 e 1.10 exemplificam a elevada regio- e estereo-selectividade das desidrogenases de esteróides na oxidação ou redução reversível de substratos esteróides complexos. Assim, o ácido cólico foi selectivamente oxidado em meio aquoso pelas oxido-redutases específicas de cada um dos 3 grupos hidroxilo presentes na molécula, dando as correspondentes cetonas (Esquema 1.9). Complementarmente, o ácido desidrocólico foi selectivamente reduzido pelas oxido-redutases específicas de cada uma das cetonas (Esquema 1.10). Em ambos os casos, a regeneração do cofactor foi feita *in situ*, acoplado uma segunda reacção enzimática dependente do mesmo cofactor (Riva *et al.*, 1986).

Esquema 1.9. Interconversão regio- e estereo-selectiva do ácido cólico catalisada por oxido-redutases específicas de esteróides (Riva *et al.*, 1986)

Esquema 1.10. Interconversão regio- e estereo-selectiva do ácido desidrocólico catalisada por oxido-redutases específicas de esteróides (Riva *et al.*, 1986)

A inversão enzimática α/β do grupo hidroxilo em C-3 de ácidos biliares foi efectuada combinando dois passos sequenciais de oxidação e redução por meio de 3α - e 3β -desidrogenases de esteróides (Riva *et al.*, 1988). A mesma estratégia foi utilizada para a inversão enzimática do grupo hidroxilo em C-7 (Bovara *et al.*, 1993). Além disso, a síntese regio- e estereo-específica de derivados deuterados de ácidos biliares (Riva *et al.*, 1989a) e a síntese do ácido 12-oxo-ursodesoxicólico (Bovara *et al.*, 1996) são exemplos de aplicações sintéticas destas enzimas.

Dada a sua natureza anfífilica, os ácidos biliares podem ser transformados por estas oxido-redutases em meio aquoso. Porém, tal não é possível com a maioria dos compostos esteróides. Assim, o uso de oxido-redutases em meio bifásico, constituído por água e um solvente imiscível com água, permitiu a aplicação destas enzimas na oxidação ou redução selectiva de esteróides mais hidrófobos, como o estradiol, a progesterona, o androstanodiol ou, ainda, a androstanodiona (Carrea *et al.*, 1988).

1.2.4. Aplicação de hidrolases em transformações selectivas de esteróides

O uso de hidrolases na desacilação de substratos esteróides foi inicialmente estudado em meio aquoso contendo um solvente miscível com a água. Assim, a α -amilase foi usada em água / metanol para catalisar reacções de hidrólise de grupos acetato em diversas posições da estrutura esteróide. A enzima mostrou regio-selectividade para as posições C-16, C-17, C-20 e C-21, não hidrolisando ésteres nas posições C-11, C-15 e C-19 (Noguchi *et al.*, 1960). Dando continuidade a este estudo, o diacetato de 17-oxo-androsta-5-eno-3 β ,16 β -di-ilo na presença de uma α -amilase em meio aquoso contendo propilenoglicol, foi convertido no respectivo diol após 9 dias de reacção à temperatura ambiente (Wynne e Renwick, 1972).

Como foi discutido na Secção 1.1.6.1, o uso de hidrolases em meio orgânico abriu um vasto leque de aplicações destas enzimas, não só em reacções de hidrólise de ésteres mas, sobretudo, em reacções de *trans*-esterificação. Em particular no campo dos esteróides, dada a sua baixa solubilidade em meio aquoso, esta tecnologia é vantajosa e tem permitido explorar a afinidade e selectividade das hidrolases para estes substratos não naturais.

Njar e Caspi (1987) estudaram a desacilação de diferentes esteróides catalisada pela lipase de *Candida rugosa* em meio orgânico (éter di-isopropílico ou acetonitrilo contendo 5 % de água) usando 1-octanol como nucleófilo. Estes autores verificaram que a lipase de *Candida rugosa* tem afinidade para as posições C-3, C-17, C-21 e C-26, não

aceitando o acetato em C-19. Além disso, na alcoólise de misturas de $3\alpha/3\beta$ - e $17\alpha/17\beta$ -acetatos a enzima mostrou-se estereo-selectiva, aceitando preferencialmente os isómeros 3β e 17α .

A alcoólise de 3β -acetoxi-esteróides foi também investigada por Baldessari e colaboradores (1995). Nesse estudo, a selecção das melhores condições de reacção indicou as lipases de *Candida rugosa* e de *Candida antarctica* como as enzimas mais activas neste tipo de substratos, acetonitrilo, éter di-isopropílico, tolueno e *n*-hexano como os melhores solventes e 1-octanol como o nucleófilo mais adequado.

Os mesmos autores estudaram a desacilação regio-selectiva de esteróides polifuncionalizados, tendo verificado que a lipase de *Candida rugosa* tem preferência pelo grupo 3β -acetato enquanto a lipase de *Candida antarctica* tem maior afinidade para substituintes no anel D (Baldessari *et al.*, 1996; Bruttomesso e Baldessari, 2004).

Por outro lado, a síntese enzimática de ésteres de substratos esteróides foi intensamente investigada pelo Doutor Sergio Riva.

Estudos visando a *trans*-esterificação de esteróides polifuncionalizados mostraram que as hidrolases têm acesso aos substituintes nos anéis A ou D e/ou na cadeia lateral do esqueleto esteróide.

Num primeiro estudo, duas enzimas comerciais, a lipase de *Chromobacterium viscosum* e a protease subtilisina Carlsberg, mostraram regio-selectividade oposta usando o 5α -androstano- $3\beta,17\beta$ -diol como modelo inicial. Assim, enquanto que a lipase catalisa apenas a acilação do grupo 3β -hidroxilo, a protease é selectiva para a posição C-17 (Riva e Klivanov, 1988).

Esta preferência para o grupo hidroxilo em C-3 em detrimento de C-17 foi também observada com a lipase de *Candida rugosa* (Riva *et al.*, 1989b, Ottolina *et al.*, 1991) e com a Novozym 435 (Bertinotti *et al.*, 1994).

A presença de dupla ligação nas posições 4,5 ou 5,6 assim como a estereoquímica da junção dos anéis A e B são factores determinantes na afinidade das lipases para a posição 3 da estrutura esteróide (Riva e Klivanov, 1988; Riva *et al.*, 1989b; Bertinotti *et al.*, 1994). Por exemplo, a lipase de *Chromobacterium viscosum* catalisa a acilação de 3 β -hidroxi-esteróides com junção dos anéis *trans* ou com ligação dupla 5,6 mas não aceita 3 β -hidroxi-esteróides com junção dos anéis *cis* ou com ligação dupla 4,5 (Riva e Klivanov, 1988).

A síntese de uma variedade de derivados acilo de 3 β -hidroxi-androsta-5-eno-17-ona foi estudada, usando diversas enzimas como catalisadores e ésteres ou ácidos carboxílicos como dadores de acilo. A lipase de *Candida rugosa* revelou-se a mais activa nessas condições, permitindo a preparação dos ésteres com elevados rendimentos (Bruttomesso *et al.*, 2004).

A síntese de derivados 3 β -acilados do sitosterol e do colesterol tem grande importância ao nível da indústria alimentar, devido às propriedades anti-colesterolémicas de alguns desses ésteres. Dois estudos recentes ilustram a utilidade das lipases ao promover a síntese destes nutracêuticos, sem recurso a reagentes agressivos ou tóxicos (King *et al.*, 2001; Vu *et al.*, 2004).

Além disso, a capacidade para discriminar diferentes grupos hidroxilo localizados no anel A foi demonstrada na esterificação regio-selectiva de ecdisteróides catalisada pela Novozym 435, a qual permitiu o isolamento de derivados 2 β -monoacilados com bom rendimento, deixando inalterados os grupos hidroxilo secundários localizados em C-3, C-11 e C-22 (Danieli *et al.*, 1997).

A selectividade das lipases para 3-hidroxi-esteróides foi recentemente aplicada à síntese de metabolitos farmacologicamente relevantes da tibolona. Neste estudo, usando Novozym 435, foi possível resolver com elevada diastereo-selectividade as misturas epiméricas de 3 α - e 3 β -álcoois por *trans*-esterificação ou os correspondentes acetatos por alcoólise (Ferraboschi *et al.*, 2002). Por outro lado, a regio-selectividade desta enzima foi aplicada à síntese químio-enzimática do esteróide anabolizante oxandrolona. A Novozym 435 mostrou-se capaz de catalisar a monoacilação do diol resultante da abertura do anel A do esteróide ou, complementarmente, a alcoólise de um dos dois grupos acetato correspondentes, abrindo uma via sintética selectiva para a síntese deste esteróide (Ferraboschi *et al.*, 2003).

Ao nível da cadeia lateral dos esteróides, a resolução de uma mistura de epímeros em C-20 foi efectuada por *trans*-esterificação estereo-selectiva do álcool primário localizado em C-22, catalisada pela lipase de *Pseudomonas cepacia* (Ferraboschi *et al.*, 1996). Num estudo semelhante, com um 3 β ,26-di-hidroxi-esteróide, esta enzima foi eficiente na resolução da mistura epimérica em C-25, ao esterificar o álcool primário em C-26 (Ferraboschi *et al.*, 1998), sem converter o álcool secundário em C-3. Em ambos

os casos, a enzima foi selectiva para o isómero (*S*), acilando o álcool primário do carbono adjacente.

Os mesmos autores verificaram ainda que, em reacções de *trans*-esterificação de um álcool secundário (em C-25) numa mistura epimérica de 27-*nor*-(25*R,S*)-25-hidroxicolesterol, a lipase de *Pseudomonas cepacia* aceita como substrato o isómero (*R*), o que está de acordo com a regra de Kazlauskas, discutida na Secção 1.1.3.3 (Ferraboschi *et al.*, 1999; Santaniello *et al.*, 2000).

O 1 α ,24(*R*)-di-hidroxicolesterol, um análogo da vitamina D₃, foi preparado com elevado rendimento a partir de uma mistura epimérica, combinando a *trans*-esterificação enzimática estereo-selectiva do isómero (*R*) do álcool secundário em C-24, com a inversão da configuração do diastereómero 24(*S*) não aceite pela enzima (Oshida *et al.*, 1999).

1.3. Objectivos do trabalho

A actualidade da biocatálise no contexto das transformações selectivas de moléculas complexas, abrindo vias de síntese mais eficientes e limpas e, por outro lado, o elevado interesse associado à modificação selectiva dos esteróides, motivaram o presente trabalho.

Dando continuidade à investigação no campo dos esteróides, há muito iniciada no Laboratório de Química Farmacêutica, visando o estudo de processos mais eficientes de transformação desses compostos e, paralelamente, a síntese de novos derivados bioactivos, propusemo-nos explorar a aplicação da biocatálise em substratos esteróides.

Assim, o objectivo principal deste trabalho consiste em desenvolver novas metodologias biocatalíticas, com enzimas isoladas, para a transformação estereo- e regio-selectiva destes compostos.

Neste âmbito, a relevância sintética das cianidrininas como intermediários quirais altamente versáteis, com potencial aplicação na elaboração estereo-selectiva da cadeia lateral de esteróides leva-nos a estudar a síntese estereo-selectiva de cianidrininas em substratos pregnanos.

Além disso, dada a importância da função 5,6-epóxido no campo dos esteróides, propomo-nos investigar a discriminação enzimática dos epímeros 5 α ,6 α - e 5 β ,6 β -

através de reacções estereo-selectivas na posição 3 da estrutura esteróide, visando a obtenção de $5\alpha,6\alpha$ - e $5\beta,6\beta$ -epóxidos diastereomericamente puros.

A existência de dióis vicinais no anel A em esteróides naturais bioactivos motiva o estudo de reacções regio-selectivas catalisadas por hidrolases, com o objectivo de obter derivados mono-acilados e de estudar a afinidade das lipases para este tipo de substratos.

CAPÍTULO 2

Síntese estereo-selectiva de cianidrinas

na cadeia lateral de pregnanos

M. Manuel Cruz Silva, M. Luisa Sá e Melo, Marco Parolin, Davide Tessaro, Sergio Riva and Bruno Danieli. **“The biocatalyzed stereoselective preparation of polycyclic cyanohydrins”**, *Tetrahedron-Asymmetry* (2004), 15 (1): 21-27.

M. Manuel Cruz Silva, M. Lurdes Andrade, José A. Paixão, M. José de Almeida and M. Luisa Sá e Melo. **“Cyanosilylation at pregnane side-chains. Selective synthesis and crystal structure of 20(R)-silylated cyanohydrins”**, *Steroids* (2005), 70 (3): 145-151.

2. Síntese estereo-selectiva de cianidrinas na cadeia lateral de pregnanos

2.1. Resumo

A síntese diastereo-selectiva de cianidrinas na cadeia lateral de esteróides foi estudada por métodos enzimáticos e químicos. As oxinitrilases PaHNL e HbHNL não se mostraram capazes de catalisar a adição estereo-selectiva de HCN a grupos carbonilo na cadeia lateral. A síntese de uma mistura racémica de cianidrinas a partir do 3-oxo-pregna-4-eno-20 β -carbaldeído, seguida de acilação diastereo-selectiva catalisada pela subtilisina provou ser a metodologia mais versátil para este substrato. Com efeito, a correspondente cianidrina na posição 22 foi isolada com um excesso diastereomérico de 89 %.

Em alternativa aos processos enzimáticos, foi estudada a síntese de cianidrinas sililadas através da adição de TMSCN a diferentes grupos carbonilo na cadeia lateral de pregnanos, promovida por catalisadores não quirais facilmente disponíveis, explorando a influência estereoquímica da estrutura esteróide. Dependendo da natureza do grupo carbonilo, diferentes resultados foram observados. Na presença de um catalisador adequado, a adição a 20-ceto pregnanos saturados foi totalmente estereo-selectiva, gerando cianidrinas sililadas epimericamente puras, cuja configuração absoluta foi determinada por análise cristalográfica de raios X.

2.2. Introdução

2.2.1. Esteróides naturais com cadeias laterais funcionalizadas

A elaboração estereo-selectiva da cadeia lateral de esteróides, através da introdução de novas funcionalidades oxigenadas tem sido amplamente investigada devido à constatação de que diversos esteróides com cadeias laterais modificadas são biologicamente relevantes (Piatak e Wicha, 1978).

Assim, as hormonas de insectos ecdisonas (Kametani *et al.*, 1985; Yamamoto *et al.*, 1991, Dinan, 2001), os brassinolidos, promotores do crescimento das plantas (Thompson *et al.*, 1982; Peng *et al.*, 2003), os agentes antitumorais naturais vitanolidos (Gamoh *et al.*, 1984), o esterol de origem marinha, depresosterol (Nakamura e Kuwajima, 1985), o metabolito antiviral de origem marinha ortosterol B (Giner e Faraldos, 2002), a petuniasterona D, com actividade insecticida (Faraldos e Giner, 2002), o activador do receptor nuclear órfão 20,22-di-hidroxicolesterol (Ruan *et al.*, 1999) e os agosteróis, moduladores da multi-resistência a fármacos (Aoki *et al.*, 1998 e 1999; Murakami *et al.*, 2001) são exemplos de importantes esteróides bioactivos com cadeias laterais quirais oxigenadas (Esquema 2.1).

Esquema 2.1. Exemplos de esteróides naturais bioativos com cadeias laterais oxigenadas

A extensão estereo-selectiva da cadeia lateral de esteróides tipo androstano e pregnano tem merecido atenção considerável, com vista à síntese de brassinolidos, ecdisonas ou derivados do colesterol (Redpath e Zeelen, 1983; Nakamura e Kuwajima, 1985; Yamamoto *et al.*, 1991; Nitta *et al.*, 1985).

Neste contexto, a síntese de cianidrinas de pregnanos constitui uma estratégia válida para a elaboração e funcionalização da cadeia lateral de esteróides.

De facto, a formação da nova ligação carbono-carbono, a introdução de um centro estereogénico e a elevada versatilidade sintética do grupo ciano, tornam esta reacção extremamente interessante como uma estratégia para aceder a importantes classes de compostos quirais (Gregory, 1999; Effenberger, 1999; North, 2003).

2.2.2. Síntese química, não selectiva, de cianidrinas

Os processos de adição nucleófila de cianeto a compostos carbonílicos, na ausência de controlo quiral, são relativamente simples (Esquema 2.2).

Nas reacções em que se usa, como fonte de cianeto, ácido cianídrico (HCN), este pode ser formado *in situ* por adição de uma solução aquosa de um sal de cianeto a uma solução do substrato em ácido acético. O uso de cianidrina da acetona em reacções de *trans*-hidrocianação é outro método muito usado. A reacção é catalisada por bases que promovem a decomposição da cianidrina da acetona em ácido cianídrico e acetona. Estas reacções têm sido amplamente aplicadas a aldeídos e a cetonas saturadas

(Gregory, 1999), inclusivamente, compostos esteróides nas posições C-3, C-17 e C-20 (Gardi e Ercoli, 1972).

Esquema 2.2. Métodos de síntese não selectiva de cianidrinas

Outro método muito comum consiste no uso de cianetos trialquilsilílicos que, ao reagir com compostos carbonílicos, dão lugar a derivados *O*-sililados de cianidrinas, os quais são facilmente hidrolisados em meio ácido originando cianidrinas livres. Estas reacções necessitam, em geral, da presença de um catalisador adequado. No entanto, a adição de TMSCN a aldeídos na ausência de qualquer catalisador foi descrita usando acetonitrilo como solvente e temperaturas elevadas para alguns substratos (Manju e Trehan, 1995). Como catalisadores desta reacção foram usados primeiramente ZnI_2 (Evans *et al.*, 1974) e, mais tarde, outros catalisadores, como $Yb(CN)_3$ (Matsubara *et*

al., 1991), TiCl_4 (Gerus *et al.*, 1999), $\text{Yb}(\text{OTf})_3$ (Yang e Wang, 1997), LiOEt (Wilkinson *et al.*, 2001), Et_3N (Kobayashi *et al.*, 1991; Kruchok *et al.*, 2000), 4-DMAP (Gerus *et al.*, 1999), I_2 (Yadav *et al.*, 2002), InBr_3 (Bandini *et al.*, 2001 e 2002), bases sólidas como hidroxiapatite, CaO e MgO (Higuchi *et al.*, 1991), entre outros. A adição de TMSCN, na presença de catalisador adequado, permite a síntese de cianidrinas a partir de uma grande diversidade de substratos carbonílicos, não só aldeídos e cetonas saturadas, como também cetonas estericamente impedidas, compostos α,β -insaturados e α -hidroxicetonas.

2.2.3. Processos de preparação de cianidrinas opticamente activas

As cianidrinas enantiomericamente ou diastereomericamente puras (ou enriquecidas) são importantes intermediários sintéticos que podem ser obtidos por protocolos químicos ou enzimáticos (Gregory, 1999; North, 1993 e 2003).

Assim, os complexos de metais de transição, os dipeptídeos cíclicos e as oxinitrilases catalisam a adição nucleófila estereo-selectiva de ciano a aldeídos e, com maior dificuldade, a cetonas. Além disso, a resolução cinética de misturas racémicas mediada por hidrolases permite, igualmente, a obtenção de cianidrinas opticamente enriquecidas.

2.2.3.1. Hidrocianação ou sililcianação de compostos carbonílicos quirais

Diversos trabalhos descrevem a cianação diastereo-selectiva de compostos carbonílicos com centros estereogénicos pré-existentes. Nestes casos, a selectividade da adição pode ser, pelo menos em parte, controlada pelo substrato.

Assim, exemplos de controlo diastereo-selectivo do substrato foram descritos em cetonas cíclicas quirais e cetonas aromáticas ou alifáticas α -substituídas, as quais, ao reagir com TMSCN, na ausência de um catalisador quiral, foram convertidas nas respectivas cianidrinas sililadas com excessos diastereoméricos moderados a excelentes (Brunet *et al.*, 1991; Matsubara *et al.*, 1991; Bandini *et al.*, 2002; Wilkinson *et al.*, 2001).

A síntese de cianidrinas na posição 17 do esqueleto esteróide foi estudada por diversos grupos com vista à posterior elaboração para obtenção de corticosteróides. O impedimento estereoquímico da estrutura esteróide permite que a adição de TMSCN ao grupo carbonilo em C-17 seja estereo-selectiva, obtendo-se 17α -cianidrinas (Mauvais *et al.*, 1993). Por outro lado, a síntese de 17β -cianidrinas foi descrita por vários autores através da adição reversível de HCN formado *in situ* (Gasc e Nédélec, 1971; Schambel *et al.*, 1987; Livingston *et al.*, 1990; Carruthers *et al.*, 1992). Nestes estudos foi demonstrado que, embora se formem ambos os isómeros, as 17β -cianidrinas têm tendência a cristalizar no meio reaccional usado favorecendo o equilíbrio no sentido da sua formação.

2.2.3.2. Síntese química estereo-selectiva de cianidrinas

A adição assimétrica de TMSCN a compostos carbonílicos tem sido intensamente estudada, tendo sido propostos diversos tipos de catalisadores químicos quirais.

A síntese enantio-selectiva de cianidrinas a partir de aldeídos (Tararov *et al.*, 1998; Belokon *et al.*, 1999a) e cetonas (Belokon *et al.*, 1999b; Belokon *et al.*, 2001) foi estudada por North e Belokon usando complexos quirais de titânio como catalisadores da adição de TMSCN. Os rendimentos e os excessos enantioméricos obtidos nestes trabalhos foram bastante variáveis dependendo do catalisador e do substrato usados.

Shibasaki desenvolveu catalisadores quirais contendo não só um ácido de Lewis capaz de activar o grupo carbonilo do substrato, mas também uma base de Lewis capaz de activar o reagente de cianação. Estes catalisadores bifuncionais mostraram-se capazes de promover eficazmente a ciano-sililação enantio-selectiva de cetonas aromáticas e alifáticas (Hamashima *et al.*, 2000 e 2001a), assim como de aldeídos (Hamashima *et al.*, 2001b).

Mais recentemente, foi descrita a adição assimétrica de TMSCN a aldeídos recorrendo à catálise heterogénea, concretamente, complexos de vanádio com ligandos do tipo salen immobilizados em suportes sólidos (Baleizão *et al.*, 2004).

2.2.3.3. Síntese estereo-selectiva de cianidrininas mediada por um dipeptídeo cíclico

A síntese assimétrica de cianidrininas mediada por um peptídeo sintético foi descrita em 1979 por Inoue e colaboradores, usando um dipeptídeo cíclico de (*S*)-alanina e (*S*)-histidina para catalisar a adição estereo-selectiva de HCN ao benzaldeído. O excesso enantiomérico do (*R*)-mandelonitrilo obtido nessa reacção foi baixo (Oku *et al.*, 1979) mas, desde então, diversos dipeptídeos análogos foram sintetizados, tendo-se conseguido não só aumentar significativamente a selectividade da reacção (Oku e Inoue, 1981), como obter a estereo-selectividade inversa com o dipeptídeo não natural de (*R*)-fenilalanina e (*R*)-histidina (Tanaka *et al.*, 1990). Actualmente a investigação no âmbito destes catalisadores tem sido progressivamente abandonada em face do progresso conseguido com catalisadores químicos e enzimáticos.

2.2.3.4. Síntese estereo-selectiva de cianidrininas mediada por oxinitrilases

Como foi discutido no Capítulo 1 (Secção 1.1.4.), as oxinitrilases ou hidroxinitrilo-liases (HNL) catalisam a adição estereo-selectiva, reversível, de HCN a compostos carbonílicos e têm sido isoladas de diversas plantas (Johnson *et al.*, 2000; Fechter e Griengl, 2004).

2.2.3.5. Resolução cinética enzimática de cianidrinas mediada por hidrolases

As cianidrinas são álcoois secundários ou terciários e, portanto, potenciais substratos em reacções de *trans*-esterificação mediadas por hidrolases. De facto, a resolução catalisada por lipases tem sido aplicada tanto a cianidrinas livres como aos seus ésteres. O uso de solventes orgânicos como meio reaccional para as hidrolases favorece estas reacções ao aumentar a estabilidade das cianidrinas e ao prevenir a sua racemização em meio aquoso.

A conhecida versatilidade das lipases para diferentes substratos foi explorada na resolução cinética de ésteres de cianidrinas racémicas (por hidrólise ou alcoólise enantio-selectiva) ou de cianidrinas racémicas (por acilação enantio-selectiva) (Carrea e Riva, 2000; Gröger, 2001; North, 2003).

Um exemplo interessante diz respeito à alcoólise selectiva de ésteres de (*R*)-cianidrinas pela lipase de *Candida rugosa*, obtendo-se as (*R*)-cianidrinas livres com elevados excessos enantioméricos, enquanto a lipase de *Pseudomonas cepacia* catalisa selectivamente a acilação de (*S*)-cianidrinas (Kanerva *et al.*, 1993).

A alcoólise de ésteres de (*S*)-cianidrinas foi também descrita usando diferentes preparações de lipase de *Pseudomonas cepacia* (Roos *et al.*, 1998; Fishman e Zviely, 1998) e de lipase B de *Candida antarctica* (Hanefeld *et al.*, 2000).

A maior limitação das resoluções cinéticas é que o rendimento máximo de cada enantiómero é apenas de 50 %. A transformação de uma mistura racémica num só

produto, com um rendimento teórico de 100 %, requer uma resolução cinética dinâmica.

Um dos primeiros processos de resolução cinética enzimática dinâmica descritos usava cianidrinas como substratos. Oda e colaboradores desenvolveram um processo *one-pot* de síntese enzimática, mediada pela lipase de *Pseudomonas cepacia*, de acetatos de (*S*)-cianidrinas a partir de cianidrinas racémicas obtidas dos respectivos aldeídos por *trans*-hidrocianação *in situ* com cianidrina da acetona. No mesmo meio reaccional, uma resina aniónica promove a racemização da cianidrina livre, ou seja, do isómero (*R*) não aceite pela lipase (Esquema 2.3). Estes autores obtiveram excessos enantioméricos e rendimentos elevados, embora com tempos de reacção muito longos (Inagaki *et al.*, 1991 e 1992).

Esquema 2.3. Resolução cinética enzimática dinâmica de cianidrinas racémicas

(Inagaki *et al.*, 1991).

Este processo foi reinvestigado com lipase B de *Candida antarctica*, a qual se revelou selectiva para (*S*)-cianidrinas (Li *et al.*, 2002; Veum e Hanefeld, 2004) e com lipase A de *Candida antarctica*, a qual se mostrou muito activa e selectiva para (*R*)-cianidrinas (Paizs *et al.*, 2003 e 2004).

Outro processo de resolução cinética de cianidrinas combina a acilação ou desacilação catalisada por lipases com a inversão da cianidrina livre por esterificação de Mitsunobu (Vänttinen e Kanerva, 1995).

Hanefeld e colaboradores (2001) desenvolveram estudos no sentido de acoplar a síntese de (*S*)-cianidrinas catalisada pela oxinitrilase HbHNL com a conversão estereoselectiva em acetatos de (*S*)-cianidrinas catalisada pela lipase B de *Candida antarctica*, tendo por objectivos conseguir converter, no mesmo meio reaccional, a cianidrina formada num derivado mais estável e deslocar o equilíbrio da reacção de formação da cianidrina, melhorando os excessos enantioméricos (uma vez que o processo envolve duas etapas estereoselectivas) e diminuindo a quantidade necessária de dador de ciano (cianidrina da acetona).

2.2.4. Versatilidade sintética das cianidrinas

A síntese assimétrica de cianidrinas a partir de compostos carbonílicos tem um potencial sintético considerável em química orgânica, possibilitando tanto modificações no grupo ciano como no grupo hidroxilo (Esquema 2.4).

Assim, a hidrólise ou a solvólise ácida destes intermediários quirais oferece uma via para a obtenção de, respectivamente, ácidos carboxílicos α -hidroxilados (Esquema 2.4, produto **1**) ou α -hidroxiésteres (**2**) com retenção da configuração (Tanaka *et al.*, 1990; Effenberger *et al.*, 1990 e 1991). Com efeito, os ácidos carboxílicos α -hidroxilados são importantes intermediários quirais da síntese de fármacos e a sua preparação estereo-selectiva é objecto de intensa investigação (Gröger, 2001).

Esquema 2.4. Alguns exemplos de possíveis transformações sintéticas das cianidrinas

A redução parcial do grupo ciano com hidreto de di-isobutil alumínio (DIBAL), seguida de hidrólise ácida suave conduz à obtenção de α -hidroxialdeídos (**3**) (Hayashi *et al.*, 1994; Marcus *et al.*, 2000). Por outro lado, a redução das cianidrinhas livres ou *O*-sililadas com hidreto de lítio e alumínio (LiAlH₄) ou com BH₃-THF permite a obtenção de β -aminoálcoois (**4**) e seus derivados (Brown *et al.*, 1993 e 1994; Tanaka *et al.*, 1990).

A adição nucleófila de reagentes de Grignard ao grupo ciano, seguida de redução ou hidrólise ácida do intermediário imina abre vias de obtenção de β -aminoálcoois β -substituídos (**5**) (Krepiski *et al.*, 1986; Brussee *et al.*, 1990b; Effenberger *et al.*, 1995) ou α -hidroxicetonas (**6**) (Krepiski *et al.*, 1983 e 1986), respectivamente.

O potencial sintético das cianidrinhas pode ser explorado convertendo o grupo hidroxilo num bom *leaving group* (sulfonilo ou tosilo), o qual pode sofrer substituição nucleófila com inversão da configuração. Assim, diversos trabalhos descrevem a conversão de cianidrinhas quirais nos respectivos α -acetoxinitrilos (**7**) ou α -azido nitrilos (**8**) com configuração oposta (Effenberger e Stelzer; 1991; Effenberger *et al.*, 1996). Por outro lado, a síntese de α -fluoronitrilos (**9**) com configuração oposta pode ser, directamente, efectuada a partir das cianidrinhas livres ou *O*-sililadas (Stelzer e Effenberger, 1993). A reacção de Mitsunobu foi também aplicada a cianidrinhas com o objectivo de inverter a configuração (Warmerdam *et al.*, 1993; Vanttinen e Kanerva, 1995).

2.3. Resultados e Discussão

A síntese diastereo-selectiva de cianidrinas na cadeia lateral de esteróides foi estudada por métodos enzimáticos e químicos, explorando não só a versatilidade e selectividade das oxinitrilases e das hidrolases, como a própria indução assimétrica dos esteróides na adição química de TMSCN.

2.3.1. Síntese de cianidrinas na cadeia lateral de esteróides catalisada por oxinitrilases

O 3-oxo-pregna-4-eno-20 β -carbaldeído (**2.1**) foi escolhido como substrato para iniciar o estudo da afinidade das oxinitrilases para a cadeia lateral de esteróides, com vista à síntese estereo-selectiva de cianidrinas introduzindo um novo estereocentro em C-22.

Assim, começou-se por sintetisar quimicamente a mistura racémica de cianidrinas **2.2a** ou **2.2b** fazendo reagir o substrato **2.1** com cianidrina da acetona ou com ácido cianídrico formado *in situ* (Esquema 2.5). A identificação das cianidrinas epiméricas obtidas foi feita por análise dos espectros de ressonância magnética de protão (RMN ^1H) e de carbono (RMN ^{13}C) e, ainda, por infravermelho (IV). Concretamente, no espectro de protão observa-se o desaparecimento do protão do aldeído e o aparecimento do sinal correspondente ao H-22 da cianidrina, dois dubletos a 4,59 e

4,57 ppm. O espectro de carbono mostra claramente o desaparecimento do sinal correspondente a um carbono de um aldeído e o aparecimento dos sinais correspondentes ao grupo ciano a 118,52 e 120,04 ppm.

Os diastereoisómeros **2.2a** e **2.2b** obtidos não podem ser separados por cromatografia em sílica gel, mas o espectro de RMN ^1H da mistura mostra dois sinais separados na linha de base devidos ao próton H-22 (dois dubletos a 4,59 e 4,57 ppm) e ao metilo CH_3 -18 (dois singuletos a 0,76 e 0,75 ppm).

Esquema 2.5. Síntese química, não selectiva, de 22-cianidrinas e respectivos ésteres.

Adicionalmente, **2.2a** e **2.2b** podem ser facilmente separados por uma coluna de HPLC quiral, assegurando dois métodos analíticos independentes (RMN ^1H e HPLC) para a avaliação do excesso diastereomérico dos produtos obtidos por catálise por oxinitrilases.

A síntese enzimática da (*R*)-cianidrina **2.2a** e da (*S*)-cianidrina **2.2b** mediada pela (*R*)-oxinitrilase PaHNL e pela (*S*)-oxinitrilase HbHNL foi explorada usando um protocolo otimizado no grupo do Doutor Sergio Riva (Danieli *et al.*, 1996 e 1998; Roda *et al.*, 1999 e 2002; Bianchi *et al.*, 2001).

Assim, observou-se que usando, quer cianidrina da acetona, quer HCN como dadores de ciano, ocorre reacção de cianação do aldeído **2.1** na presença das oxinitrilases PaHNL ou HbHNL. Além disso, os ensaios em branco, na ausência de enzima, mostram que, quando se usa HCN ocorre cianação espontânea do aldeído. Porém, quando o dador de ciano é a cianidrina da acetona, o aldeído **2.1** mantém-se inalterado na ausência de enzima. Assim, pode-se concluir que as oxinitrilases PaHNL e HbHNL aceitam o aldeído **2.1** como substrato, catalisando a síntese das respectivas cianidrinas.

Todavia, os tempos de reacção foram muito longos e não foi observada estereoselectividade, uma vez que o produto obtido era, com ambas as oxinitrilases, uma mistura equimolar de **2.2a** e **2.2b**.

Assim, embora estas enzimas já tenham provado ser activas e selectivas com uma grande variedade de substratos (Secção 1.1.4.2.), os resultados obtidos com o aldeído **2.1** não foram satisfatórios. De facto, estudos efectuados paralelamente noutros

substratos volumosos, demonstram que as oxinitrilases PaHNL e HbHNL aceitam substratos bicíclicos, catalisando a síntese assimétrica das respectivas cianidrinhas. Porém, com substratos tricíclicos aromáticos não se observou qualquer reacção (Cruz Silva *et al.*, 2004a).

2.3.2. Resolução cinética de cianidrinhas na cadeia lateral de esteróides catalisada por hidrolases

Uma vez que a cianação enzimática do aldeído **2.1** foi mal sucedida, optou-se por estudar a resolução cinética catalisada por hidrolases do racemato obtido quimicamente **2.2a,b**.

Como foi discutido no Capítulo 1 (Secção 1.2.4), a acilação ou desacilação enzimática de esteróides tem sido muito investigada. Regra geral, observa-se que as lipases actuam nos grupos hidroxilo localizados no anel A dos esteróides, enquanto que a protease subtilisina prefere os grupos hidroxilo do anel D. No que respeita à acilação de grupos OH na cadeia lateral há trabalhos que descrevem o uso de lipases de *Candida rugosa* (Njar e Caspi, 1987), *Candida antarctica* (Bertinotti *et al.*, 1994) e *Pseudomonas cepacia* (Ferraboschi *et al.*, 1996, 1998 e 1999) e, ainda, o uso da protease subtilisina (Riva e Klibanov, 1988).

A tentativa de esterificação das cianidrinhas **2.2a,b** por catálise com um conjunto de lipases foi mal sucedida e os substratos foram recuperados inalterados.

Os estudos anteriores usando lipases como catalisadores de reacções de esterificação na cadeia lateral de esteróides envolvem grupos hidroxilo primários na cadeia lateral (Bertinotti *et al.*, 1994; Ferraboschi *et al.*, 1996 e 1998) com duas excepções descrevendo a esterificação diastereo-selectiva de derivados colestano 25-hidroxilados (Ferraboschi *et al.*, 1999) e 24-hidroxilados (Oshida *et al.*, 1999) estando, no entanto, estes grupos hidroxilo relativamente afastados do núcleo esteróide. Todos os substratos esteróides estudados nesses trabalhos são estericamente menos impedidos do que **2.2a,b** e esta pode ser a razão para a incapacidade de as lipases testadas modificarem os substratos em estudo.

Perante estes resultados, foi estudada a afinidade e selectividade da subtilisina para os substratos **2.2a,b**.

A subtilisina é uma serina-protease isolada de *Bacillus licheniformis* e tem sido muito usada quer em transformações regio-selectivas de compostos polifuncionalizados (Margolin *et al.*, 1990; Wang *et al.*, 1997; Riva, 2002), inclusivamente esteróides (Riva e Klivanov, 1988), quer em resoluções cinéticas (Wang *et al.*, 1997; Kim *et al.*, 2004).

Esquema 2.6. Resolução cinética da mistura de 22-cianidrinas mediada pela protease subtilisina Carlsberg

Numa primeira abordagem, usando subtilisina Carlsberg liofilizada e acetato de vinilo em THF (Esquema 2.6), verificou-se que a enzima aceita estes substratos, catalisando a acilação com selectividade, de acordo com a monitorização das reacções efectuada por HPLC.

De seguida, foram testadas diferentes preparações de subtilisina e os melhores resultados foram obtidos com subtilisina CLEC. Este tipo de preparação enzimática apresenta diversas vantagens, já discutidas no Capítulo 1 (Secção 1.1.5), destacando-se uma maior estabilidade, actividade e selectividade (Wang *et al.*, 1997; Margolin e Navia, 2001).

Usando subtilisina CLEC, foi efectuada uma optimização das condições de reacção, de modo a melhorar a conversão e os excessos diastereoméricos do produto e

do substrato. Tal como se mostra na Tabela 2.1, a acetona proporcionou melhores resultados do que o THF, como solvente da reacção. Quanto ao dador de acilo, o butanoato de vinilo permitiu obter melhores conversões e selectividades do que o acetato de vinilo.

A estrutura do agente acilante e o solvente têm impacto na *performance* catalítica das hidrolases, de acordo com o que tem sido observado em muitos trabalhos (Faber *et al.*, 1993; Zaks e Klivanov, 1988). Por exemplo, a acilação regio-selectiva do lobucavir na presença de subtilisina CLEC como catalisador foi estudada com o objectivo de desenvolver pró-fármacos deste agente antiviral. A subtilisina CLEC mostrou-se sensível ao agente acilante e ao solvente usado, sendo uma mistura de acetona / DMF o meio reaccional que possibilita melhores rendimentos e selectividade (Hanson *et al.*, 2000).

Tabela 2.1. Optimização das condições de reacção para a resolução cinética enzimática de uma mistura epimérica de 2.2a,b, por *trans*-esterificação irreversível.

Subtilisina CLEC	Solvente	Agente acilante	Tempo de reacção	conv (%)	e.d. (S) ^(a) (%)	e.d. (P) ^(b) (%)	E ^(c)
Chiro-CLEC	THF	acetato de vinilo	9 dias	3,2	0,31	65,0	4,8
Pepti-CLEC	THF	acetato de vinilo	8 dias	4,4	0,74	75,6	7,5
Chiro-CLEC	acetona	acetato de vinilo	7 dias	13,4	10,2	81,6	11,2
Pepti-CLEC	acetona	acetato de vinilo	7 dias	19	15,7	81,3	11,7
Chiro-CLEC	acetona	butanoato de vinilo	10 dias	30,7	35,1	89,0	25,3
Pepti-CLEC	acetona	butanoato de vinilo	14 dias	47,1	67,9	89,5	44

^(a) excesso diastereomérico do substrato

^(b) excesso diastereomérico do produto

^(c) os valores de *E* foram calculados a partir do excesso diastereomérico do produto (Chen *et al.*, 1982).

Sob as melhores condições reaccionais indicadas na Tabela 2.1, a reacção foi repetida com maiores quantidades e os derivados butanoato **2.4a,b** foram isolados com um excesso diastereomérico de 89,5 %, de acordo com os resultados obtidos por HPLC quiral.

A análise do espectro de RMN ^1H do produto acilado, usando CDCl_3 como solvente, mostrou a formação preferencial do composto com o sinal de H-22 como um dubleto a 5,40 ppm, com uma constante de acoplamento de 2,14 Hz (o sinal de H-22 do epímero apareceu como um dubleto menos intenso a 5,43 com uma constante de acoplamento de 3,78 Hz). Com o objectivo de obter a configuração absoluta do C-22 do produto, as estruturas dos compostos **2.2a-2.4a** e **2.2b-2.4b** foram submetidas a análise por modelização molecular, no grupo do Doutor Sergio Riva (Cruz Silva *et al.*, 2004a). As estruturas minimizadas usadas para avaliar as respectivas constantes de acoplamento entre H-20 e H-22 estão em concordância com os valores experimentais de J e, portanto, sugerem que a subtilisina tem uma estereopreferência pela cianidrina com o valor de J_{20-22} mais baixo, ou seja, pelo epímero (*S*) C-22, **2.2b**.

O perfil de enantio-selectividade da subtilisina foi estudado de forma sistemática, tal como se discute no Capítulo 1 (Secção 1.1.3.3) e diversos autores propuseram uma regra empírica baseada no tamanho dos substituintes do estereocentro, ou seja, um grupo volumoso, um grupo de tamanho médio e o hidrogénio (Kazlauskas e Weissfloch, 1997). No presente estudo, verifica-se que a preferência da enzima pelo diastereómero **2.2b** não está de acordo com a regra empírica proposta (Esquema 2.7). De facto, esta regra consegue prever a discriminação quiral de álcoois secundários enantioméricos e a maioria dos exemplos diz respeito a compostos em que o grupo de tamanho médio é um grupo metilo. Os resultados obtidos podem ser justificados com base no facto de o substrato **2.2b** ser um diastereómero com diversos estereocentros, sendo o grupo de tamanho médio um grupo ciano, com capacidade de estabelecer

pontes de hidrogénio, o que pode influenciar o posicionamento do substrato no centro activo da enzima (Kazlauskas e Weissfloch, 1997).

Esquema 2.7. Diastereómero aceite pela subtilisina (a, b), modelo de previsão da enantio-selectividade da subtilisina (c).

As cianidrinas **2.2a** e **2.2b** foram sintetizadas recentemente por um processo não selectivo de adição de HCN formado *in situ*. Embora a maioria dos dados espectroscópicos sejam coincidentes com os obtidos por nós, estes autores não observaram diferenças nas constantes de acoplamento entre H-20 e H-22 para os dois diastereoisómeros. A mistura epimérica foi separada por HPLC preparativa usando uma coluna quiral. Os diastereoisómeros assim separados foram analisados por métodos espectroscópicos e por cristalografia de raios-X (Cox *et al.*, 2004), a qual permitiu, então, identificar a configuração absoluta dos epímeros.

A estereo-selectividade enzimática observada neste trabalho tem interesse em aplicações sintéticas, uma vez que diversos derivados esteróides naturais, como α -

ecdisona (Yamamoto *et al.*, 1991), depresosterol (Nakamura e Kuwajima, 1985) ou os metabolitos recentemente isolados ortosterol B (Giner e Faraldos, 2002) e petuniasterone D (Faraldos e Giner, 2002) possuem um hidroxilo secundário com a mesma configuração em C-22 (formalmente são (*R*)-OH devido às regras de prioridade de Cahn - Ingold - Prelog). A transformação química ou enzimática do grupo nitrilo da cianidrina **2.2b** (ou do seu derivado éster **2.4b**) pode, portanto, abrir novas vias de síntese estereo-selectiva da cadeia lateral de esteróides.

2.3.3. Síntese química diastereo-selectiva de cianidrinas de 20-ceto pregnanos

No que respeita a substratos do tipo 20-metilcetona, um ensaio exploratório inicial mostrou que as oxinitrilases PaHNL e HbHNL não aceitam estes substratos, o que seria de esperar, tendo em conta os resultados negativos obtidos com o aldeído **2.1** (Secção 2.3.1).

Além disso, é conhecida a dificuldade das hidrolases em aceitar álcoois terciários (Pogorevc e Faber, 2000) neste caso, cianidrinas de metil-cetonas, como substratos em reacções de *trans*-esterificação. Assim, excluímos a possibilidade de investigar a resolução cinética enzimática de 20-cianidrinas de pregnanos.

Neste contexto e tendo em consideração o que foi discutido na Secção 2.2.3.1, propusemo-nos investigar a capacidade de indução assimétrica dos esteróides como substratos na adição nucleófila de TMSCN.

O TMSCN foi seleccionado como agente de cianação (Croutas, 1999) de diferentes grupos carbonilo na cadeia lateral de pregnanos. Comparando com outros dadores de ciano, como cianidrina da acetona ou HCN, o TMSCN tem a vantagem de catalisar a adição irreversível do ciano ao grupo carbonilo electrófilo (Evans *et al.*, 1974). Além disso, o grupo trimetilsililo, sendo relativamente volumoso, poderá facultar algum impedimento estereoquímico, o qual pode ser útil para favorecer a estereopreferência por um dos dois diastereómeros possíveis (Fleming *et al.*, 1997).

A síntese de cianidrinas de pregnanos foi, inicialmente, explorada em metilcetonas saturadas, como mostra o Esquema 2.8.

Esquema 2.8. Adição estereo-selectiva de TMSCN, catalisada por LiOEt, a 20-ceto pregnanos.

Os catalisadores não quirais, facilmente disponíveis, usados na adição de TMSCN ao acetato de pregnenolona (**2.5**), isto é, ZnI_2 (Evans *et al.*, 1974), $TiCl_4$ (Gerus *et al.*, 1999), $Yb(OTf)_3$ (Yang e Wang *et al.*, 1997), $LiOEt$ (Wilkinson *et al.*, 2001), Et_3N (Kobayashi *et al.*, 1991) e 4-DMAP (Gerus *et al.*, 1999), encontram-se descritos na literatura como capazes de promover reacções de síntese de cianidrinas sililadas.

Tal como a Tabela 2.2 indica, os ácidos de Lewis, ZnI_2 e $TiCl_4$, promovem a conversão completa das metilcetonas nas cianidrinas correspondentes. Na presença de $TiCl_4$, a cianidrina livre foi obtida devido à elevada acidez deste catalisador (Gundersen *et al.*, 1999) hidrolisando, portanto, a ligação O-Si. Por outro lado, com outros ácidos de Lewis, como o $Yb(OTf)_3$, observaram-se apenas rendimentos moderados. Sob catálise neutra na presença de $LiOEt$, as reacções foram quantitativas. Por último, os catalisadores básicos Et_3N e 4-DMAP não foram capazes de promover as reacções de síntese de cianidrinas sililadas.

A identificação das cianidrinas formadas foi efectuada por análise dos espectros de RMN 1H e de RMN ^{13}C e comparação com os espectros dos substratos (Szendi *et al.*, 1995).

As reacções do TMSCN com o acetato de pregnenolona **2.5** levaram à obtenção de apenas um dos dois diastereómeros possíveis, tal como se observou por RMN 1H .

Tabela 2.2. Adição de TMS-CN ao acetato de pregnenolona (2.5)

Catalisador (<i>mol %</i>)	Solvente	Tempo	Rendimento ^(a)
ZnI ₂ (5)	CH ₂ Cl ₂	6 h	92 %
TiCl ₄ (5)	CH ₂ Cl ₂	15 h	90 % ^(b)
Yb(OTf) ₃ (5)	CH ₂ Cl ₂	48 h	34 %
LiOEt (5)	THF	1 h	93 %
Et ₃ N (5)	CH ₂ Cl ₂	48 h	-
Et ₃ N (10)	CH ₂ Cl ₂	48 h	-
4-DMAP (5)	CH ₂ Cl ₂	48 h	-
4-DMAP (10)	CH ₂ Cl ₂	48 h	-

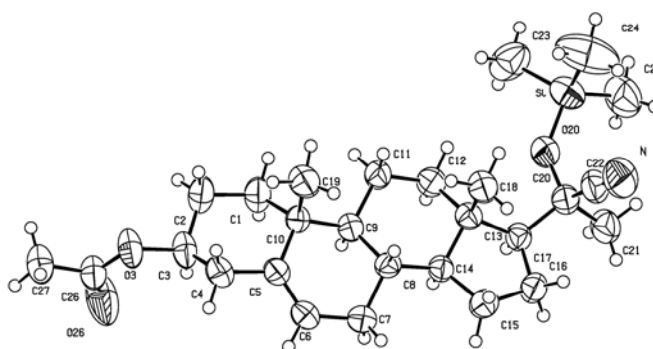
^(a)Rendimentos isolados

^(b)Obteve-se a cianidrina não sililada

A reacção foi repetida, usando LiOEt como catalisador, noutros 20-ceto esteróides saturados **2.7** e **2.9** (Esquema 2.8). Em analogia com os resultados obtidos com o substrato **2.5**, as reacções foram diastereo-selectivas e quantitativas.

A análise cristalográfica de raios X da cianidrina sililada **2.6** foi, então, explorada para assinalar a configuração absoluta do diastereómero obtido, tendo-se verificado que o novo estereocentro tem configuração (*R*) (Esquema 2.9). Esta observação está de acordo com resultados de outros autores acerca da adição nucleófila estereo-selectiva a 20-ceto esteróides (Letourneux *et al.*, 1975; Morisaki *et al.*, 1977; Drew *et al.*, 1987), a

qual obedece à regra de Cram (Cram e Elhafez, 1952). É interessante verificar que a configuração do estereocentro em C-20 é a mesma de outros esteróides relevantes, como (20*R*,22*R*)-colesta-5-eno-3 β ,20,22-triol (Ruan *et al.*, 1999), 20-hidroxiecdisona (Kametani *et al.*, 1985) e agosterol D₂ (Aoki *et al.*, 1998 e 1999).



Esquema 2.9. Diagrama Ortep do acetato de (*R*)-20-ciano-20-trimetilsilaniloxi-pregna-5-eno-3 β -ilo, 2.6.

Apesar de a síntese de cianidrinas de pregnanos ter sido descrita no passado usando cianidrina da acetona como dador de ciano, tais condições de reacção levam à obtenção de uma mistura 1 : 1 de diastereómeros, requerem grandes quantidades de cianidrina da acetona e os rendimentos são moderados, dado que a adição de ciano é reversível (Byon e Gut, 1976; Shimizu *et al.*, 1962).

De seguida, procurou-se verificar se a estereo-selectividade da adição de TMSCN é mantida noutros grupos carbonilo em substratos pregnano.

O 3-oxo-pregna-4-eno-20 β -carbaldeído, **2.1**, já estudado na Secção 2.3.1 como substrato de oxinitrilases, reagiu com TMSCN muito rapidamente na posição 22, tanto na presença de ZnI₂ como de LiOEt como catalisadores. Não ocorreu qualquer transformação na enona localizada no anel A, mostrando químio-selectividade para o aldeído. No entanto, a análise do espectro de RMN ¹H revela que esta reacção produziu uma mistura racémica de cianidrinas sililadas em C-22, **2.11a** e **2.11b** (Esquema 2.10).

Esquema 2.10. Adição de TMSCN ao 20 β -carbaldeído catalisada por ZnI₂ ou por LiOEt.

Por outro lado, a adição de TMSCN a uma cetona α,β -insaturada, concretamente, acetato de 16-desidropregnenolona, **2.12**, (Esquema 2.11), mostrou-se dependente do catalisador usado. A adição de TMSCN catalisada por ZnI₂ produziu uma mistura de produtos, os quais foram separados por cromatografia *flash* e, então, identificados como cianidrinas epiméricas sililadas (**2.13**, rendimento 25 %) e não sililadas (**2.14**,

rendimento 27 %), assim como acetato de 16 α -ciano pregnenolona (**2.15**, rendimento 34 %). Esta ausência de químio-selectividade na adição de TMSCN catalisada por ZnI₂ não foi surpreendente. De facto, apesar de ter sido descrita a adição 1,2 a enonas conjugadas na presença de ZnI₂ (Evans *et al.*, 1974), a adição 1,4 foi também observada (Utimoto *et al.*, 1983). O composto **2.15** (acetato de 16 α -ciano-pregna-5-eno-3 β -ilo) isolado nesta reacção foi sintetizado no passado (Romo *et al.*, 1964) e o seu derivado desacilado descrito como um potente esteróide catatóxico (Selye, 1971), actuando através da indução da expressão do citocromo P-450-3A1 (Elshourbagy e Guzelian, 1980) e da activação do receptor X de pregnano (PXR.1) (Kliewer *et al.*, 1998). A identificação deste produto secundário foi possível por análise dos seus espectros e comparação com dados da literatura (Romo *et al.*, 1964; Abernethy e Wall, 1969). Mais especificamente, a configuração 16- α do grupo ciano foi determinada com base num efeito de protecção anisotrópica deste grupo funcional relativamente ao 18-CH₃, observada no espectro de RMN ¹H, o qual aparece como um pico singuleto a 0,579 ppm, em contraste com 0,918 ppm no composto de partida **2.12** (Szendi *et al.*, 1995). Tal efeito sugere que o grupo metilo está posicionado na área cónica do grupo ciano. De acordo com esta observação, a constante de acoplamento do dubleto devido ao 17 α -H é relativamente elevada, $J = 8,7$ Hz, sugerindo um acoplamento *trans* vicinal com o protão 16 β .

Um resultado diferente foi obtido na presença de LiOEt. Este catalisador promoveu a formação exclusiva de cianidrinas sililadas epiméricas (**2.13**). De facto, o LiOEt foi recentemente usado como catalisador selectivo na adição 1,2 de TMSCN a enonas,

assim como na adição estereo-selectiva a cetonas cíclicas estericamente impedidas (Wilkinson *et al.*, 2001). No entanto, com o substrato **2.12**, a reacção não foi estereo-selectiva, uma vez que se obteve uma mistura de diastereómeros. De facto, no espectro de RMN ^1H do produto **2.13a,b** observam-se dois singuletos a 1,74 e 1,75 devidos ao grupo metilo em C-21, assim como dois multipletos a 5,87 e 5,89 ppm devidos ao próton em C-16. A integração destes multipletos dá uma proporção de 7 : 3.

Esquema 2.11. Adição de TMSCN ao acetato de 20-oxo-pregna-5,16-dieno 3 β -ilo catalisada por LiOEt ou por ZnI₂.

Os resultados obtidos mostram uma elevada dependência da estereo-selectividade da adição de TMSCN com o tipo de substrato usado. A mistura racémica obtida com o aldeído **2.1** era previsível já que o grupo carbonilo se encontra mais distante do esqueleto esteróide do que nos pregnanos **2.5**, **2.7** e **2.9**.

No que respeita à cetona α,β -insaturada (**2.12**), embora o LiOEt catalise a formação exclusiva de cianidrinias sililadas, verifica-se que este substrato não é capaz de induzir diastereo-selectividade. Os diferentes resultados observados com 20-cetonas saturadas e com esta cetona insaturada estão, provavelmente, relacionados com a estereoquímica das respectivas cadeias laterais. Comparando com a 17 β -metil cetona de pregnanos saturados (substratos **2.5**, **2.7** e **2.9**), a função enona (substrato **2.12**) torna o anel D mais planar, e, por isso, menos impedido pelo grupo metilo em C-18, permitindo a aproximação do reagente por ambos os lados da molécula esteróide.

2.4. Conclusões

A preparação enzimática de cianidrinas epimericamente enriquecidas por cianação directa do aldeído ou por acilação selectiva das cianidrinas racémicas correspondentes foi investigada num substrato esteróide 20 β -carbaldeído. A síntese de cianidrinas catalisada por oxinitrilases deu resultados pouco satisfatórios, enquanto que a resolução por acilação diastereo-selectiva catalisada pela protease subtilisina provou ser uma metodologia mais versátil, permitindo a obtenção de cianidrinas na posição 22 da cadeia lateral de pregnanos com elevado excesso diastereomérico (Cruz Silva *et al.*, 2004a).

Diferentes grupos carbonilo na cadeia lateral de esteróides reagem facilmente com o TMSCN na presença de um catalisador conveniente, porém, a químio- e estereoselectividade da adição é dependente do tipo de grupo carbonilo presente. Os substratos 20-ceto-pregnanos saturados são convertidos, exclusivamente, nas correspondentes (*R*)-cianidrinas sem necessidade de um catalisador quiral devido à capacidade de indução assimétrica do substrato (Cruz Silva *et al.*, 2005a).

Assim, neste estudo apresentamos uma metodologia enzimática para a obtenção de cianidrinas em C-22 de pregnanos com elevado excesso diastereomérico e uma metodologia química estereoespecífica baseada na adição de TMSCN a 20-ceto-pregnanos saturados. Estes resultados são potencialmente úteis para a construção estereo-selectiva da cadeia lateral de esteróides.

2.5. Parte experimental

2.5.1. Instrumentação

Os espectros de ressonância magnética nuclear de protões, RMN ^1H , foram obtidos num espectrómetro Varian Unity 500, a 500 MHz, e num espectrómetro Bruker-AC 300, a 300 MHz. Os espectros de ressonância magnética nuclear de carbono 13, RMN ^{13}C , foram obtidos num espectrómetro Bruker-AC 300, a 75,47 MHz. A caracterização dos carbonos metílicos, metilénicos, metínicos e quaternários foi efectuada por DEPT. Os desvios químicos são dados na escala δ (ppm) e são relativos ao tetrametilsilano como padrão interno. Os espectros de infravermelho (IV) foram obtidos num espectrómetro Jasco FT/R-420. As rotações ópticas foram determinadas num polarímetro Jasco P-1020. Os espectros de massa (MS) foram obtidos num espectrómetro GCT Micromass. Os pontos de fusão (pf) foram determinados num aparelho Büchi B-540 e não foram corrigidos. Os estudos de difractividade de Raios-X foram efectuados num difractivómetro Enraf-Nonius MACH3.

As reacções usando hidrolases foram efectuadas num agitador orbital New Brunswick Scientific, C24 Incubator Shaker, a 45 °C e 250 rpm.

2.5.2. Cromatografia

As análises de HPLC foram efectuadas usando colunas Chiralcel OD (OD) e Chiralcel OJ (OJ), da DIACEL, num cromatógrafo Jasco 880/PU equipado com detector Jasco 875 UV/VIS (as leituras foram feitas a 254 nm).

A cromatografia em camada fina foi feita em placas de vidro e de alumínio de sílica gel 60 F₂₅₄ Merk usando tolueno / éter dietílico (7 : 3) como eluente ou éter de petróleo / acetato de etilo (2 : 1) e detectada por pulverização com H₂SO₄ / etanol 95% e aquecimento a 100 °C, ou por imersão numa solução de *p*-anisaldeído em metanol e ácido clorídrico, seguida de aquecimento a 100 °C (método de Komarosky) (MacDonald, 1977). A cromatografia *flash* foi efectuada em sílica gel (230-400 Mesh) da Merck usando misturas de éter de petróleo / acetato de etilo como eluentes.

2.5.3. Reagentes e solventes

Todos compostos comercialmente disponíveis foram usados como fornecidos pelos fabricantes. Esteróides, trietilamina (Et₃N), 4-dimetil-aminopiridina (4-DMAP) e cianeto de trimetilsililo foram obtidos da Sigma. Iodeto de zinco (ZnI₂), triflato de itérbio (Yb(OTf)₃), tetracloreto de titânio (TiCl₄), etóxido de lítio (LiOEt), cianidrina da acetona e o pó de zinco (325 Mesh) foram obtidos da Aldrich. A Celite[®] R-630 foi adquirida à Fluka.

As lipases (EC 3.1.1.3) de pâncreas de porco e de *Candida rugosa* (crude) foram fornecidas pela Sigma Chemical Co. A Novozym 435 (lipase B de *Candida antarctica* imobilizada) e a Lypozyme IM 20 (lipase de *Mucor miehei* imobilizada) foram obtidas da Novo Nordisk. A lipase PS (de *Pseudomonas cepacia*), AK (de *Pseudomonas fluorescens*), CE (de *Humicola lanuginosa*) e AY (de *Candida rugosa*) foram compradas à Amano. A lipase de *Pseudomonas cepacia* foi adsorvida em celite (Cruz Silva *et al.*, 2004a). A lipase de *Chromobacterium viscosum* foi fornecida pela Finnsugar.

A subtilisina Carlsberg (protease alcalina de *Bacillus licheniformis*, EC 3.4.21.62) foi adquirida à Sigma e liofilizada de uma solução em tampão fosfato (20 mM, pH 7,8). As preparações de subtilisina-CLEC[®] foram oferecidas pela Altus Biologics, Inc, Cambridge, MA, EUA.

A oxinitrilase de *Prunus amygdalus*, PaHNL (EC 4.1.2.10), foi isolada de amêndoas (Chiari *et al.*, 1997). A oxinitrilase de *Hevea brasiliensis*, HbHNL (EC 4.1.2.39), foi obtida da Roche Diagnostics.

O diclorometano usado nas reacções com TMSCN foi seco por refluxo e destilação sobre CaH₂ e armazenado com Molecular Sieves 4 Å. O THF usado nas mesmas reacções foi tratado com KOH, aquecido a refluxo e destilado sobre CaH₂ tendo sido armazenado com fio de sódio. A trietilamina foi destilada e armazenada sobre pastilhas de KOH.

2.5.4. Síntese química das cianidrinas epiméricas 22-hidroxi-3-oxo-pregna-4-eno-22-carbonitrilo, 2.2a e 2.2b.

a) Usando cianidrina da acetona como reagente de cianação

A uma solução de 3-oxo-pregna-4-eno-20 β -carbaldeído (**2.1**, 328 mg, 1 mmol) em etanol (1 ml), adicionou-se cianidrina da acetona (642 μ l, 7 equivalentes) e Et₃N (50 μ l). O frasco foi fechado com uma tampa de borracha e a suspensão foi agitada à temperatura ambiente. Após 3 horas, o controlo por CCF indicava o desaparecimento do material de partida. A mistura foi vertida em água (20 ml), gelo (20 g) e ácido acético (1 ml) sob agitação magnética. O precipitado foi filtrado, seco numa estufa de vácuo e o pó branco obtido (320 mg, rendimento 90%) foi caracterizado como uma mistura epimérica de **2.2a** e **2.2b**.

b) Usando HCN como reagente de cianação

A uma solução de **2.1** (200 mg; 0,61 mmol) em AcOEt – THF - AcOH 80 % (5 ml, 2 : 1 : 2), adicionou-se uma solução de NaCN (90 mg; 1,8 mmol) em 0,8 ml H₂O. O frasco foi fechado com uma tampa de borracha e a suspensão foi agitada à temperatura ambiente. Após 5 horas, o controlo por CCF indicava o desaparecimento do material de partida. O solvente foi evaporado e o resíduo foi purificado por cromatografia *flash* (eluente CHCl₃ / MeOH 97 : 3) obtendo-se um pó branco (193 mg, rendimento 94 %) caracterizado como uma mistura de **2.2a** e **2.2b**.

22-Ciano-22-hidroxi-pregna-4-eno-3-ona (2.2a,b)

pf 185,2-190,8 °C; HPLC: as áreas dos dois picos a 17,6 e 19,6 minutos apresentaram uma relação de 48,5 / 51,5 %; RMN ¹H (CDCl₃) δ: 0,75 e 0,76 (3H, dois s, CH₃-18); 1,17-1,26 (6H, dois d e um s, CH₃-21 e CH₃-19); 4,57 e 4,59 (1H total, d cada, *J* = 3,88 e *J* = 2,17 Hz, respectivamente, H-22); 5,74 (1H, s, H-4). A integração dos dois sinais (singuletos) devidos ao metilo C-18 deu uma relação 43,5 / 56,5 % para os dois isómeros. A integração dos dois sinais (dubletos) devidos ao próton C-22 deu uma relação 47,9 / 52,1 % para os dois isómeros. RMN ¹³C (CDCl₃)δ: (75,47 MHz) 64,79 e 65,09 (C-22); 118,52 e 120,04 (CN); 123,73 e 123,79 (C-4); 171,72 e 171,88 (C-5); 200,01 e 200,11 (C-3). IV (ATR): ν_{\max} 3229,2; 2935; 2858,9; 1654,6; 1609,3; 1432,8; 1064,5 cm⁻¹. FD-MS *m/z* = 355,2463 (100 %, M⁺); 356,2534 (46,3 %, M⁺ + 1).

2.5.5. Separação das misturas epiméricas das cianidrininas e seus derivados acilados em colunas quirais por HPLC

2.2a,b: coluna OD; eluente: éter de petróleo / isopropanol 85 : 15; fluxo 0,7 ml/min; λ =241 nm; tempo de retenção (min): **2.2a**, 17,6; **2.2b**, 19,6.

2.3a,b: coluna OD; eluente: éter de petróleo / isopropanol 85 : 15; fluxo 0,7 ml/min; λ =241 nm; tempo de retenção (min): **2.3a**, 21,5; **2.3b**, 25,3,

2.4a,b: coluna OJ; eluente: éter de petróleo / isopropanol 95 : 5; fluxo 1,0 ml/min; $\lambda=241$ nm; tempo de retenção (min): **2.4a**, 23,7; **2.4b**, 29,1.

2.5.6. Síntese de cianidrinas de 2.1 mediada por oxinitrilases

1) Usando HCN como dador de ciano

Uma solução ~ 0,6 M HCN em éter isopropílico foi preparada de acordo com Brussee (Zandbergen *et al.*, 1991). O éter isopropílico usado nas cianações enzimáticas foi pré-saturado com tampão citrato 0,1 M, pH 5,5.

A) A PaHNL (~ 150 unidades), dissolvida em 50 μ l de tampão citrato 0,1 M pH 5,5 foi adicionada gota-a-gota, homogeneamente, à celite (150 mg). O catalisador foi adicionado a 1,5 ml de éter di-isopropílico / DMF (4 : 1) contendo 41 mg de **2.1** e 2 eq. de HCN, e a reacção foi agitada à temperatura ambiente a 150 rpm durante 2 dias. Um ensaio em branco, na presença de celite sem a enzima, mostrou uma percentagem significativa de cianação espontânea. No final da reacção, a mistura foi filtrada, a celite foi lavada com éter di-isopropílico e as fases orgânicas foram evaporadas. As cianidrinas foram purificadas por cromatografia *flash* (eluente CHCl_3 / MeOH 97 : 3) obtendo-se 25 mg de **2.2a,b** (0,07 mmol, rendimento 58 %). A análise por HPLC mostrou uma relação equimolar dos picos devidos a **2.2a** e **2.2b**.

B) A HbHNL (~ 150 unidades), dissolvida em 50 µl de tampão citrato 0,1 M pH 5,5 foi adicionada gota-a-gota, homogeneamente, à celite (150 mg). O catalisador foi adicionado a 1,5 ml de éter di-isopropílico / DMF (4 : 1) contendo 41 mg de **2.1** e 2 eq. de HCN, e a reacção foi agitada à temperatura ambiente a 150 rpm durante 2 dias. Um ensaio em branco, na presença de celite sem a enzima, mostrou uma percentagem significativa de cianação espontânea. No final da reacção, a mistura foi filtrada, a celite foi lavada com éter isopropílico e as fases orgânicas foram evaporadas. As cianidrinas foram purificadas por cromatografia *flash* (eluente CHCl₃ / MeOH 97 : 3) obtendo-se 30 mg de **2a,b** (0,084 mmol, rendimento 70 %). A análise por HPLC quiral mostrou uma relação equimolar dos picos devidos a **2.2a** e a **2.2b**.

2) Usando cianidrina da acetona como dador de ciano

A uma solução de 50 mg de **2.1** em 2,5 ml de éter di-isopropílico / DMF (4 : 1) contendo 4 eq. de cianidrina da acetona, a enzima PaHNL ou HbHNL (150 unidades adsorvidas em 150 mg de celite), foi adicionada e o sistema bifásico foi agitado à temperatura ambiente durante 3 dias. Um ensaio em branco, na presença de celite sem a enzima, não mostrou a cianação espontânea do substrato. No final, a reacção foi tratada como anteriormente descrito. A cromatografia *flash* permitiu a purificação dos produtos **2a,b** (40 mg, rendimento 84 %, usando PaHNL; 46 mg, rendimento 87 %, usando HbHNL). A análise por HPLC quiral mostrou uma relação equimolar dos picos devidos a **2.2a** e **2.2b**.

2.5.7. Acilação química dos compostos 2.2a,b

As cianidrinas **2.2a,b** (177,8 mg; 0,5 mmol) foram dissolvidas em piridina (4 ml) e anidrido acético (118 μ l; 2,5 equivalentes) ou anidrido butírico (205 μ l; 2,5 eq). A reacção foi deixada durante a noite à temperatura ambiente. Então, adicionou-se HCl 2 N e a mistura foi agitada e extraída com acetato de etilo. As fases orgânicas combinadas foram lavadas com solução saturada de NaHCO₃ e com solução saturada de NaCl, secas em sulfato de sódio e finalmente evaporadas. Os produtos obtidos foram caracterizados como **2.3a,b** (sólido branco) e **2.4a,b** (óleo), respectivamente.

Acetato de 22-ciano-3-oxo-pregna-4-eno-22-ilo (**2.3a,b**)

RMN ¹H (CDCl₃), δ : 0,74 (3H, s, CH₃-18); 1,18 (3H, s, CH₃-19); 1,19 e 1,25 (3H, d cada, J 4,68 e 6,83 Hz, respectivamente, CH₃-21); 5,38 e 5,41 (1H total, d cada, J =2,19 e J =3,78 Hz, respectivamente, H-22); 5,73 (1H, s, H-4). A integração dos dubletos devidos ao H-22 deu uma relação epimérica de 45,3 / 54,7 %. RMN ¹³C (CDCl₃): δ : 64,79 e 65,09 (C-22); 115,4 e 116,9 (CN); 123,8 (C-4); 169,1 e 169,4 (C-5); 171,1 (CH₃C=O); 199,5 (C-3).

Butanoato de 22-ciano-3-oxo-pregna-4-eno-22-ilo (2.4a,b)

RMN ^1H (CDCl_3), δ : 0,75 (3H, s, CH_3 -18); 0,97 (3H, t, $J = 7,4$ Hz, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO}$); 1,17 – 1,26 (6H, dois d e um s, CH_3 -21 e CH_3 -19); 2,38 (2H, m, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO}$); 5,40 e 5,43 (1H total, d cada, $J = 2,14$ e $J = 3,78$ Hz, respectivamente, H-22); 5,74 (1H, s, H-4). A integração dos dois dubletos devidos ao H-22 deu uma relação epimérica de 49,5 / 50,5. RMN ^{13}C (CDCl_3): δ 64,53 e 65,06 (C-22); 115,54 e 116,97 (CN); 123,83 (C-4); 171,21; 171,24; 171,73 e 171,99 (C-5 e $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO}$); 199,61 e 199,64 (C-3). IV (ATR): ν_{max} 2931,3; 2870; 1746; 1661; 1610 cm^{-1} .

2.5.8. Trans-esterificação catalisada pela subtilisina CLEC de 2.2a,b

Numa reacção em maior escala, a cianidrina racémica **2.2a,b** (125 mg; 0,35 mmol) foi dissolvida em acetona (9,5 ml) e, de seguida, foram adicionados o butanoato de vinilo (2,5 ml; 19,2 mmol) e a subtilisina CLEC (10 mg). A reacção decorreu num agitador termostaticado a 45 °C e foi seguida por CCF e por HPLC. Após 7 dias, outros 10 mg de PeptiCLEC-subtilisina foram adicionados e a reacção decorreu por mais 7 dias. De seguida, a enzima foi filtrada, o filtrado foi concentrado sob pressão reduzida e o butanoato **2.4a,b** foi separado da cianidrina que não tinha reagido por cromatografia *flash* (tolueno / éter dietílico 85 : 15) obtendo-se um sólido branco (**2.4b**; 36 mg; rendimento 24,1 %) com um excesso diastereomérico de 89,5 %.

(HPLC). A cianidrina **2.2a** que não reagiu (57 mg) apresentava um excesso diastereomérico de 67,9 % determinado por HPLC quiral.

2.5.9. Síntese de 5 α -pregnano-20-ona

De acordo com o procedimento de Salvador *et al.*, 1993a, a mistura de 5 α -pregnano-3,20-diona (1 mmol, 316 mg), ácido acético glacial (20 ml) e zinco em pó (3,5 g) foi agitada à temperatura ambiente. Após o desaparecimento do material de partida (5 h), adicionou-se éter dietílico e a suspensão foi filtrada por um filtro de celite. O filtrado foi evaporado sob pressão reduzida, dissolvido em éter dietílico e lavado com água, solução saturada de NaHCO₃ e solução saturada de NaCl. Após secagem com MgSO₄, a fase orgânica foi evaporada, obtendo-se o 5 α -pregnano-20-ona, **2.9** (255 mg, rendimento 85 %).

2.5.10. Procedimento representativo para a adição de TMSCN

A uma solução de esteróide (0,5 mmol) em diclorometano seco (10 ml), sob argon, o catalisador e TMSCN (1,1 eq.) foram adicionados e a mistura reaccional foi agitada à temperatura ambiente. Quando o LiOEt foi usado como catalisador, seguiu-se o procedimento descrito por Wilkinson *et al.* (2001), isto é, o LiOEt foi adicionado ao TMSCN antes da adição da solução de substrato em THF seco. Após o

desaparecimento do material de partida (controlo por CCF), adicionou-se acetato de etilo e a solução foi lavada com HCl 5%, solução saturada de NaHCO₃, água e solução saturada de NaCl, seca com MgSO₄ e evaporada à secura, obtendo-se o produto crude.

No caso do substrato **2.12**, a mistura de produtos obtidos sob catálise com ZnI₂ foi separada por cromatografia *flash*, usando éter de petróleo / éter dietílico 8 : 2, como eluente.

Acetato de (20R)-20-ciano-20-trimetilsilaniloxipregna-5-en-3β-ilo (2.6)

Agulhas incolores (etanol), pf 181 - 183 °C, $[\alpha]_D^{26} - 26,5$ (c 1, CHCl₃). RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃) δ: 0,249 (9H, s, Si(CH₃)₃); 0,96 (3H, s, CH₃-18); 1,03 (3H, s, CH₃-19); 1,59 (3H, s, CH₃-21); 2,03 (3H, s, CH₃CO); 4,61 (1H, m, H-3); 5,37 (1H, d, J=4,5 Hz; H-6). RMN ¹³C (CDCl₃) δ: 60,24 (C-21); 72,38 (C-20); 73,89 (C-3); 122,14 (CN); 122,32 (C-6); 139,73 (C-5); 170,58 (3-AcO). IV (ATR): ν_{\max} 836,9; 980,6; 1033,7; 1145,5; 1239; 1722,1; 2951,5 cm⁻¹. FD-MS $m/z = 397,2150$ (100 %, M⁺ - HOAc); 398,2209 (31 %, M⁺ + 1 - HOAc); 73,0356 [2 %, (CH₃)₃Si]; 61,0235 (2 %, HOAc + 1).

Os cristais usados nos estudos de difracção de raios-X foram obtidos por evaporação lenta de uma solução de **2.6** em etanol.

(20R)-3β-Hidroxi-20-trimetilsilaniloxipregnano-20-carbonitrilo (2.8)

Pó amorfo (rendimento 92%), RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃ e CD₃OD) δ: 0,25 (9H, s, Si(CH₃)₃); 0,79 (3H, s, CH₃-19); 0,93 (3H, s, CH₃-18); 1,54 (3H, s, CH₃-21); 3,51 (1H, m, H-3). IV (ATR): ν_{max} 1035,6; 1140,7; 1399,1; 2854,1; 2927,4; 3271,6 cm⁻¹.

(20R)-20-Trimetilsilaniloxipregnano-20-carbonitrilo (2.10)

Pó amorfo (rendimento 89%), RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ: 0,25 (9H, s, Si(CH₃)₃); 0,79 (3H, s, CH₃-19); 0,93 (3H, s, CH₃-18); 1,58 (3H, s, CH₃-21). IV (ATR): ν_{max} 839,8; 1033,7; 1144,6; 1249,7; 1445,4; 2850,3; 2919,7 cm⁻¹.

3-Oxo-22-trimetilsilanilxipregna-4-eno-22-carbonitrilo (2.11a,b)

Pó amorfo (rendimento 94%), pf 118 - 121 °C. RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ: 0,21 (9H, s, Si(CH₃)₃); 0,73 e 0,74 (3H, dois s, CH₃-18); 1,13 – 1,19 (6H, dois d e um s, CH₃-21 e CH₃-19); 4,45 e 4,47 (1H, dois d, *J* = 3,876 e *J* = 1,812 Hz, respectivamente, H-22); 5,73 (1H, s, H-4). Ambos os dubletos devidos ao H-22 e o singuleto devido ao CH₃-18 não se encontram separados na linha de base. Assim, a relação diastereomérica foi calculada a partir do espectro de RMN ¹H da cianidrina não sililada **2.2a,b** (ver Secção 2.5.11). RMN ¹³C (CDCl₃) δ: 64,99 e 65,33 (C-22); 118,58 (CN); 123,86 (C-4); 171,3 (C-5); 199,7 (C-3). IV (ATR): ν_{max} 841,8; 1105; 1248,7; 1411,6; 1662,3; 2937 cm⁻¹. FD-MS *m/z* = 427,2920 (100 %, M⁺); 428,2964 (34 %, M⁺ + 1); 73,0485 [2 %, (CH₃)₃Si].

Acetato de 20-ciano-20-trimetilsilaniloxipregna-5,16-dieno-3 β -ilo (2.13a,b)

Pó amorfo (25% de rendimento sob catálise com ZnI₂, 91% de rendimento sob catálise com LiOEt), pf 131 - 135 °C. RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃) δ : 0,25 (9H, s, Si(CH₃)₃); 1,03 (3H, s, CH₃-18); 1,06 (3H, s, CH₃-19); 1,74 e 1,75 (3H, dois s, CH₃-21); 2,04 (3H, s, CH₃CO); 4,60 (1H, m, H-3); 5,39 (1H, d, *J*=5,035 Hz, H-6); 5,87 e 5,89 (1H, dois m, H-16). A integração dos dois multipletos devidos ao H-16 deu uma relação diastereomérica de 71 : 29. RMN ¹³C (CDCl₃) δ : 68,53 e 69,30 (C-20); 73,76 (C-3); 121,47 (CN); 122,11 (C-6); 127,68 e 127,93 (C-16); 139,88 (C-5); 154,03 (C-17); 170,43 (3-AcO). IV (ATR): ν_{\max} 839,9; 993,2; 1033,7; 1146,5; 1246,8; 1367,3; 1731,8; 2937,1 cm⁻¹. FD-MS *m/z* = 323,2212 [100%, M⁺ + 1 – HOAc – (CH₃)₃Si]; 61,0340 (2%, HOAc + 1).

Acetato de 20-ciano-20-hidroxipregna-5,16-dieno-3 β -ilo (2.14a,b)

Pó amorfo (rendimento 27%), pf 83 - 87 °C. RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ : 1,06 e 1,07 (6H, dois s, CH₃-18 e CH₃-19); 1,77 e 1,78 (3H, dois s, CH₃-21); 2,04 (3H, s, CH₃CO); 4,61 (1H, m, H-3); 5,39 (1H, d, *J* 5,157 Hz, H-6); 6,00 e 6,03 (1H, dois m, H-16). A integração dos dois multipletos devidos ao H-16 deu uma relação diastereomérica de 77 : 23. RMN ¹³C (CDCl₃) δ : 68,23 (C-20); 73,83 (C-3); 121,66 (CN); 122,08 (C-6); 129,36 (C-16); 140,01 (C-5); 153,53 (C-17); 170,59 (3-AcO). IV (ATR): ν_{\max} 1030,8; 1242,9; 1373,1; 1728,9; 2936,1; 3391,2 cm⁻¹.

Acetato de 16 α -ciano-20-oxopregn-5-en-3 β -ilo (2.15)

Pó amorfo (rendimento 34%), pf 178 - 180 °C. RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) δ : 0,58 (3H, s, CH_3 -18); 1,00 (3H, s, CH_3 -19); 2,04 (3H, s, CH_3CO); 2,21 (3H, s, CH_3 -21); 2,90 (1H, d, J 8,721 Hz, H-17); 3,57 (1H, m, H-16); 4,61 (1H, m, H-3); 5,38 (1H, d, J = 5,139 Hz, H-6). RMN ^{13}C (CDCl_3) δ : 73,59 (C-3); 121,68 (C-6); 123,29 (CN); 139,72 (C-5); 170,50 (3-AcO); 204,70 (C-20). IV (ATR): ν_{max} 1026,9; 1236,2; 1358,6; 1699; 1730,8; 2235,1; 2960,2 cm^{-1} . Os dados espectroscópicos obtidos estão de acordo com os dados publicados por outros autores (Romo *et al.*, 1964; Abernethy e Wall, 1969).

2.5.11. Hidrólise da cianidrina sililada 2.11a,b

A cianidrina sililada **2.11a,b** foi dissolvida em HCl 2% em etanol, à temperatura ambiente, obtendo-se a cianidrina não sililada **2.2a,b** quantitativamente. Os dados espectrais e o pf correspondem ao descrito na Secção 2.5.4. O espectro de RMN ^1H mostra dois singuletos separados na linha de base devidos ao CH_3 -18. A integração dos dois sinais deu uma relação diastereomérica de 44 : 56.

CAPÍTULO 3

Discriminação estereo-selectiva

de 5,6-epóxidos de esteróides catalisada por lipases

M. Manuel Cruz Silva, Sergio Riva and M. Luisa Sá e Melo. "**Highly selective lipase-mediated discrimination of diastereomeric 5,6-epoxysteroids**", *Tetrahedron-Asymmetry* (2004), 15 (7): 1173-1179.

3. Discriminação estereo-selectiva de 5,6-epóxidos de esteróides catalisada por lipases

3.1. Resumo

A síntese estereo-selectiva de 5,6-epoxi-esteróides tem sido intensamente estudada devido às propriedades biológicas de alguns esteróides com esta funcionalidade e à importância sintética dos epóxidos como intermediários. Porém, a maioria dos processos de epoxidação não proporciona a obtenção de diastereómeros puros.

Neste trabalho, os 5,6-epoxi-3 β -hidroxi-esteróides estereoisomericamente puros foram preparados combinando métodos químicos selectivos para α - e β -epoxidação de esteróides Δ^5 -insaturados com a esterificação enzimática estereo-selectiva do grupo 3 β -hidroxilo. Os 5 β ,6 β -epoxi-3 β -hidroxi-esteróides foram eficientemente acilados pela Novozym 435 e pela lipase AK, enquanto que os 5 α ,6 α -epoxi-3 β -hidroxi-esteróides mostraram ser bons substratos para a *Candida rugosa* lipase. A hidrólise enzimática suave do grupo 3 β -acetoxilo na presença da funcionalidade epóxido foi também conseguida através da *Candida rugosa* lipase.

3.2. Introdução

3.2.1. Importância biológica e sintética dos 5,6-epóxidos de esteróides

Os epóxidos de esteróides são um importante grupo de oxiesteróis que regulam diversas funções biológicas, como a proliferação celular e a homeostase do colesterol (Guardiola *et al.*, 1996, Smith, 1996). Por exemplo, os epóxidos α e β do colesterol são produtos da sua auto-oxidação com actividade biológica (Guardiola *et al.*, 1996; Smith, 1996; Hwang, 1991), sendo ambos citotóxicos (O'Callaghan *et al.*, 2001; O'Sullivan *et al.*, 2003) e mutagénicos (Raaphorst *et al.*, 1987; Sevanian e Peterson, 1984; Blackburn *et al.*, 1979; Schroepfer, 2000).

A funcionalidade 5 β ,6 β -epóxido está presente em diversos esteróides naturais com actividade antitumoral, como os vitanolidos (Kupchan *et al.*, 1969; Habtemariam, 1997; Habtemariam *et al.*, 2000; Jayaprakasam *et al.*, 2003). Além disso, esta funcionalidade foi estudada em correlações estrutura-actividade de androstanos inibidores da aromatase (Numazawa e Tachibana, 1997a e 1997b; Numazawa e Yamada, 1999).

Por outro lado, os epóxidos são intermediários sintéticos de grande importância, uma vez que a sua abertura permite a introdução de diversas funcionalidades de uma forma estereo-específica, originando compostos 1,2-difuncionais (Smith, 1984). Diversos estudos demonstram que a configuração do 5,6-epóxido influencia a selectividade de reacções de abertura estereo-específica (Ehrenstein, 1941; Srivastava

et al., 2001) ou reacções de eliminação catalisadas por bases (Holland e Jahangir, 1983).

3.2.2. Métodos de síntese selectiva de 5,6-epóxidos de esteróides

A epoxidação de esteróides continua a ser intensamente estudada com vista à obtenção estereo-selectiva de 5 α ,6 α -epóxidos e de 5 β ,6 β -epóxidos, como ilustra a Tabela 3.1.

A epoxidação de Δ^5 -esteróides 3 β -substituídos com peroxiácidos (Kirk e Hartshorn, 1968; Akhtar e Barton, 1964; Matthews e Hassner, 1972) produz, predominantemente, α -epóxidos. O ataque preferencial do peroxiácido pela face alfa do esqueleto esteróide deve-se ao impedimento estereoquímico imposto pelos grupos metilo em C-10 e C-13. No entanto, a velocidade e a estereo-selectividade da epoxidação dependem da natureza do substituinte na posição C-3, do solvente usado e da estrutura do peroxiácido. Por exemplo, a epoxidação de esteróides 5,6-insaturados com o ácido monoperoxiftálico conduziu à obtenção de uma mistura de epóxidos com uma relação α/β de 70 : 30 (Małunowicz e Mironowicz, 1968), enquanto o ácido *m*-cloroperoxibenzóico (*m*-CPBA) originou uma proporção de 71 : 29, o monoperoxiftalato de magnésio (MMPP) deu uma proporção de 85 : 15 (Brougham *et al.*, 1987), conforme pode observar-se na Tabela 3.1, linhas 1 a 3.

Por outro lado, a síntese de β -epóxidos tem sido intensamente investigada e diversos métodos têm sido propostos.

As primeiras tentativas de preparação de $5\beta,6\beta$ -epóxidos incluem o uso de halo-hidrininas como intermediários (Akhtar e Barton, 1964; Kocór *et al.*, 1966) e de substituintes 3α -halogenados que bloqueiam a entrada de reagentes pela face alfa (Shiota *et al.*, 1961; Hanson e Truneh, 1988).

O diacetato de cromilo (Galagovsky *et al.*, 1989; Galagovsky e Gros, 1993) foi também proposto como um oxidante capaz de promover a β -epoxidação de Δ^5 -esteróides com elevada selectividade.

Os dioxiranos conduzem à formação de misturas de α - e β -epóxidos, embora a estereo-selectividade dependa da estrutura do dioxirano usado. Assim, como se indica na Tabela 3.1 (linha 4), o dimetildioxirano converteu o acetato de 16-desidropregnenolona numa mistura de $5\alpha,6\alpha$ - e $5\beta,6\beta$ -epóxidos numa relação de 40 : 60, com elevado rendimento (Bovicelli *et al.*, 1992). Mais recentemente, Yang e Jiao (2000) mostraram que determinadas cetonas quirais na presença de oxone (KHSO_5 ; KHSO_4 ; K_2SO_4) são convertidas em dioxiranos altamente diastereo-selectivos, capazes de promover a epoxidação de esteróides 5,6-insaturados com relações isoméricas α/β de 1 : 8,5 a 1 : 99, consoante os substratos esteróides usados (Tabela 3.1, linhas 5 e 6).

Tabela 3.1. Alguns exemplos de métodos de epoxidação selectiva de esteróides 5,6-insaturados

	Substrato	Sistema oxidante	Relação α / β	Referência
1	Acetato de colesterilo	Ácido monoperoxiftálico	70 : 30	Małunowicz e Mironowicz, 1968
2	Colesterol	<i>m</i> -CPBA	71 : 29	Brougham <i>et al.</i> , 1987
3	Colesterol	MMPP	85 : 15	Brougham <i>et al.</i> , 1987
4	Acetato de 16-desidropregnenolona	Dimetildioxirano	40 : 60	Bovicelli <i>et al.</i> , 1992
5	Colesterol	Cetonas quirais / oxone	1 : 15,1	Yang e Jiao, 2000
6	3,3-etilenodioxo-colesta-5-eno	//	1 : 99	Yang e Jiao, 2000
7	Benzoato de colesterilo	O ₂ / aldeído / complexo de Mn(II)	18 : 82	Yamada <i>et al.</i> , 1992
8	Colesterol	O ₂ / aldeído / porfirinas de Ni(II)	37 : 63	Ramasseul <i>et al.</i> , 1992
9	Acetato de colesterilo	O ₂ / aldeído / porfirinas de Ni(II)	18 : 82	Ramasseul <i>et al.</i> , 1992
10	Colesterol	O ₂ / aldeído / acetato de Co(II) em sílica	25 : 75	Silvestre <i>et al.</i> , 2004
11	Acetato de colesterilo	O ₂ / porfirinas de ruténio	1 : 99	Marchon e Ramasseul, 1989
12	Acetato de colesterilo	KMnO ₄ / CuSO ₄	7 : 93	Syamala <i>et al.</i> , 1992
13	Acetato de colesterilo	KMnO ₄ / Fe ₂ (SO ₄) ₃	12 : 88	Salvador <i>et al.</i> , 1996

Diversos autores têm estudado a oxidação de esteróides 5,6-insaturados nas condições de Mukaiyama. Assim, usando O₂ como oxidante, na presença de um aldeído e um complexo metálico de transição como catalisador homogéneo (Yamada *et al.*, 1992; Ramasseul *et al.*, 1992) ou heterogéneo (Silvestre *et al.*, 2004) obtiveram-se os respectivos 5,6-epóxidos com elevada selectividade para a formação do isómero β (Tabela 3.1, linhas 7 a 10).

As porfirinas de ruténio, na presença de O₂ (Marchon e Ramasseul, 1989) ou de 2,6-dicloropiridina-N-óxido (Zhang e Che, 2002) como oxidantes, permitiram a obtenção de β-epóxidos com selectividades muito elevadas (Tabela 3.1, linha 11).

Finalmente, os sistemas bifásicos de permanganato de potássio em suportes sólidos (sais inorgânicos) são igualmente capazes de converter esteróides 5,6-insaturados nos respectivos β-epóxidos (Tabela 3.1, linhas 12 e 13), com a vantagem de se tratar de sistemas oxidantes heterogéneos, facilmente acessíveis, baratos e ambientalmente benignos (Syamala *et al.*, 1992; Salvador *et al.*, 1996; Singh e Lee, 2001).

No entanto, a maioria dos métodos de epoxidação não proporciona α- ou β-epóxidos diastereomericamente puros e, portanto, a investigação em processos mais selectivos continua a ter grande actualidade.

Adicionalmente, a presença e a estereoquímica de outros substituintes no esqueleto esteróide, concretamente, um grupo hidroxilo em C-19, respectivos ésteres e amidas (Mousseron-Canet *et al.*, 1968 ; Kočovský e Starý, 1990), um 2,3-epóxido (Hanson *et*

al., 1999), outros substituintes nas posições 4 ou 6 (Tavarès *et al.*, 1992; Hanson *et al.*, 1998), podem alterar a estereo-selectividade do método de epoxidação.

Para além disso, a maioria dos métodos de preparação de β -epóxidos requer a protecção adequada dos grupos hidroxilo presentes na molécula. A desprotecção química, geralmente do grupo éster, pode ser condicionada pela sensibilidade do grupo oxirano face às condições hidrolíticas usuais. Consequentemente, a síntese de $5\beta,6\beta$ -epoxi- 3β -hidroxi-esteróides é, por vezes, difícil.

Como foi discutido no Capítulo 1, a Biocatálise, sendo muitas vezes complementar aos métodos químicos convencionais, tornou-se um instrumento efectivo para conseguir transformações suaves e selectivas (Carrea e Riva, 2000; Koeller e Wong, 2001).

Estudos acerca da esterificação enzimática regio-selectiva dos grupos hidroxilo localizados em diferentes posições do esqueleto do esteróide (Secção 1.2.4) mostram a preferência das lipases pelo hidroxilo localizado em C-3 (Riva e Klivanov, 1988; Ottolina *et al.*, 1991).

Adicionalmente, noutros estudos de reacções de esterificação na posição C-3 foi também demonstrada a elevada sensibilidade das lipases ao tipo de junção dos anéis A/B (*cis* ou *trans*) e à presença de Δ^4 - ou Δ^5 -insaturações (Riva *et al.*, 1989b; Bertinotti *et al.*, 1994).

Por outro lado, diversos estudos descrevem a capacidade das lipases de discriminar estereoisómeros com centros quirais relativamente afastados do grupo hidroxilo ou acetoxilo aceites como substratos, conseguindo, assim, efectuar resoluções de um estero-centro remoto (Angoli *et al.*, 2003; Hedenström *et al.*, 2002).

Com o objectivo de desenvolver um método de preparação de 5 α ,6 α - e 5 β ,6 β -epóxidos diastereomericamente puros recorrendo à selectividade das lipases face a substratos esteróides, propusemo-nos investigar a capacidade das lipases de discriminar estes epóxidos através da acilação ou desacilação do grupo 3 β -hidroxilo.

Adicionalmente, as vantagens da catálise enzimática no que respeita à suavidade das reacções, levam-nos a explorar a hidrólise de ésteres 3 β -acetoxilo na presença da função epóxido.

3.3. Resultados e Discussão

3.3.1 Síntese química dos epóxidos

Os 5 α ,6 α - e 5 β ,6 β -epóxidos de esteróides foram sintetizados por metodologias químicas selectivas, facilmente disponíveis e de baixo custo.

A epoxidação α -selectiva de esteróides 3 β -hidroxi- e 3 β -acetoxi- Δ^5 -insaturados foi efectuada com MMPP (Esquema 3.1 – A) o qual proporciona maior segurança e maior facilidade de remoção do que os perácidos comuns como o *m*-CPBA (Brougham *et al.*, 1987; Heaney, 1993) devido à sua insolubilidade em meio orgânico.

Por outro lado, a epoxidação β -selectiva de esteróides 3 β -acetoxi- Δ^5 -insaturados foi levada a efeito através da oxidação com o sistema permanganato de potássio / sais inorgânicos (Esquema 3.1 – B) desenvolvido no nosso grupo (Salvador *et al.*, 1996).

Assim, os substratos para as reacções enzimáticas posteriores foram obtidos usando sistemas oxidantes sólidos e insolúveis no meio reaccional, tendo sido facilmente removidos por filtração no final das reacções.

A elucidação estrutural dos epóxidos obtidos foi feita por espectrofotometria de IV, onde se pode observar a ausência de sinais correspondentes às frequências de alongação do –CH insaturado e do C=C, por RMN ^1H , onde se verifica o desaparecimento do multiplete correspondente ao protão olefínico 6-H e o aparecimento dos multipletos a cerca de 2,9 e 3,1 ppm correspondentes ao protão 6 β -H

e 6 α -H, respectivamente. Além disso, os espectros de RMN ^{13}C mostram o desaparecimento do C(6) olefínico e o aparecimento dos sinais correspondentes a C(5) e C(6) com valores típicos de uma ligação C-O.

Esquema 3.1. Síntese diastereo-selectiva de 5,6-epóxidos de esteróides

A relação α/β dos epóxidos obtidos foi determinada pela integração dos sinais dos prótons isoméricos em C-6 nos espectros de RMN ^1H , os quais aparecem como um dubleto a cerca de 2,9 ppm ($J = 4$ Hz) no caso do isómero α e como um dubleto a

cerca de 3,1 ppm ($J = 2$ Hz) no caso do isómero β (Cross, 1962; Marchon e Ramasseul, 1989). Tal como se esperava, os excessos diastereoméricos dos epóxidos obtidos, quer na presença de MMPP, quer na presença de KMnO_4 , situam-se entre 70 e 80 %.

3.3.2. *Trans*-esterificação enzimática estereo-selectiva de misturas de 3 β -hidroxi-5,6-epoxi-esteróides: síntese de α -epóxidos diastereomericamente puros

A esterificação de 3 β -hidroxi-5,6-epoxi-esteróides foi primeiramente investigada com um conjunto de 14 hidrolases comerciais como catalisadores. Os substratos usados neste teste inicial foram o 5,6-epoxicolestano-3 β -ol (**3.2**, relação α/β 83 : 17) e o 5,6-epoxi-3 β -hidroxipregnano-20-ona (**3.4**, relação α/β 90 : 10) (Esquema 3.2). Em condições de *trans*-esterificação irreversível (Wang *et al.*, 1988), usando acetato de vinilo como dador de acilo e tolueno como solvente, a monitorização das reacções por CCF permitiu a identificação de um grupo de lipases capazes de aceitar substratos do tipo 3 β -hidroxi-5,6-epoxi-esteróides, independentemente do tipo de cadeia lateral em C-17.

Com a lipase de *Candida rugosa* observou-se uma conversão quase total do substrato **3.2**, sugerindo uma boa actividade desta enzima na conversão do isómero α , uma vez que este é o isómero predominante na mistura epimérica em estudo. Adicionalmente, observou-se uma conversão muito baixa com outras enzimas,

concretamente, Novozym 435, lipase de *Chromobacterium viscosum*, lipase AK e lipase de *Pseudomonas cepacia*, sugerindo uma baixa afinidade destas enzimas para 3 β -hidroxi-5 α ,6 α -epoxi-esteróides.

A estereo-selectividade deste grupo de enzimas foi mais rigorosamente avaliada monitorizando, por cromatografia gasosa, a acilação do epóxido α , **3.2a**, e do epóxido β do colesterol, **3.2b**, isomericamente puros, obtidos como se descreve na Secção 3.3.4.

Como se observa na Tabela 3.2, a estereo-preferência da lipase isolada da *Candida antarctica*, Novozym 435, para a acilação do grupo 3 β -OH do epóxido β (**3.2b**) é muito elevada, enquanto que com duas preparações comerciais diferentes da lipase de *Candida rugosa* confirma-se a preferência significativa pelo epóxido α (**3.2a**).

Tabela 3.2. Acetilação de 3.2a (α) e de 3.2b (β) catalisada por lipases

	Substrato ^(b)	Conversão (%) ^(a)			
		90 min	3 horas	6 horas	24 horas
<i>Candida rugosa</i> lipase	α	62,3	84,8	86,5	96,4
(Sigma) 3 mg	β	3,9	6,5	9,8	12,7
Lipase AY	α	80,8	90,5	92	96,3
(Amano) 1,5 mg	β	2,5	6,3	7,8	9,8
Novozym 435	α	0	0	0	1
10 mg	β	14,3	26,4	47,9	82,3
Lipase PS	α	10,2	23,7	33	71,4
(Amano) 5 mg	β	13,7	27,9	50	88,2
Lipase AK	α	1,7	2,4	4,3	11,9
(Amano) 3 mg	β	15,2	29,6	53,1	90,6
<i>Chromobacterium viscosum</i>	α	0	0	0	4,6
lipase (Finnsugar) 30 mg	β	4,5	9,6	16,7	41,7

^{a)} Avaliada por GC.

^{b)} 10 mM 5 α ,6 α - ou 5 β , 6 β -epoxicolestano-3 β -ol (**3.2a** ou **3.2b**, 4 mg/ml) em tolueno com 10 % v/v acetato de vinilo.

Explorando estes resultados, a Novozym 435 foi usada em reacções em escala preparativa para remover o isómero minoritário β em misturas enriquecidas do isómero α de 3 β -hidroxi-5,6-epoxi-esteróides, preparados por meio de perácidos (Esquema 3.2). Em todos os casos, os substratos remanescentes (epóxidos α : **3.2a**, **3.4a** e **3.6a**) foram isolados com bons rendimentos (67 a 72 %) e excessos diastereoméricos de 100 %, de acordo com a análise dos espectros de RMN ^1H .

Esquema 3.2. Acetilação estereo-selectiva de 3 β -hidroxi-5 α ,6 α -epoxi-esteróides catalisada pela Novozym 435

3.3.3. Alcoólise enzimática estereo-selectiva de 3 β -acetoxi-5,6-epoxi-esteróides: síntese de β -epóxidos diastereomericamente puros

O passo seguinte foi procurar uma metodologia adequada para a obtenção de β -epóxidos diastereomericamente puros a partir de misturas enriquecidas de 3 β -acetoxi-5,6-epoxi-esteróides (**3.8**, **3.10** e **3.12**) preparados com o sistema permanganato / sais inorgânicos (Salvador *et al.*, 1996).

Inicialmente, a desacetilação estereo-selectiva das misturas epiméricas de 3 β -acetoxi-5,6-epoxi-esteróides foi investigada usando 1-octanol como aceitador de acilo em reacções de alcoólise (Esquema 3.3).

Explorando a estereo-preferência da lipase de *Candida rugosa* em relação a epóxidos α (linhas 1-2, Tabela 3.2), efectuaram-se reacções em escala preparativa na presença da lipase AY com o objectivo de remover o isómero α minoritário nas misturas **3.8**, **3.10** e **3.12**. Tal como seria de esperar, os epímeros β (3-*O*-acetoxi β -epóxidos **3.8b**, **3.10b** e **3.12b**) não foram convertidos pela enzima, tendo sido isolados com bons rendimentos (62 a 75 %) e excessos diastereoméricos de 100 %, de acordo com a análise dos espectros de RMN ^1H .

Esquema 3.3. Alcoólise estereo-selectiva de 3 β -acetoxi-5 α ,6 α -epoxi-esteróides catalisada pela lipase AY

Numa abordagem semelhante, a alcoólise do grupo 3 β -acetoxilo foi investigada com vista à remoção de epóxidos β minoritários em misturas de 3 β -acetoxi-5,6-epoxi esteróides preparadas com perácidos (MMPP), com o objectivo de obter 3 β -acetoxi-5 α ,6 α -epoxi-esteróides puros. Porém, ao contrário do que seria de prever, nem a Novozym 435 nem qualquer outra enzima testada se revelou capaz de catalisar a alcoólise desses substratos.

3.3.4. Hidrólise enzimática suave, não selectiva, de misturas de 3 β -acetoxi-5,6-epoxi-esteróides

A hidrólise ácida ou alcalina de grupos éster na presença de uma função epóxido pode levar, pelo menos parcialmente, à degradação do epóxido. Assim, tirando partido das condições suaves proporcionadas pela catálise enzimática, procedeu-se ao estudo das enzimas e meio reaccional adequados à remoção enzimática do grupo 3 β -acetoxilo em 5,6-epoxi-esteróides. Com efeito, um método de desacetilação suave tem interesse do ponto de vista sintético uma vez que a maioria dos processos para preparar 5 β ,6 β -epóxidos são apenas aplicáveis a substratos 3-*O*-acilados.

Os resultados acima descritos (Secção 3.3.3) indicam que os 3 β -acetoxi-5 α ,6 α -epoxi-esteróides podem ser selectivamente desacilados na presença da lipase de *Candida rugosa*, enquanto que os 3 β -acetoxi-5 β ,6 β -epoxi-esteróides não são selectivamente desacilados por nenhuma das lipases estudadas.

Assim, procuraram-se as condições adequadas à hidrólise não selectiva do grupo acetato nesses substratos, ou seja, converter **3.8**, **3.10** e **3.12** nos respectivos derivados desacilados independentemente da estereoquímica do 5,6-epóxido (Esquema 3.4).

A baixa selectividade evidenciada pela lipase de *Pseudomonas cepacia* nas reacções de acilação de 3 β -hidroxi-5,6-epoxi-esteróides, aliada à sua razoável afinidade para estes substratos (Tabela 3.2) sugerem que esta enzima poderá catalisar reacções de desacetilação dos ésteres correspondentes.

Assim, estudou-se a desacilação de 3 β -acetoxi-5,6-epoxi-esteróides catalisada pela lipase de *Pseudomonas cepacia*, quer em condições de alcoólise, usando um álcool como nucleófilo, quer em condições de hidrólise enzimática, usando água como nucleófilo. Porém, esta enzima, ao contrário do que aconteceu nas reacções de *trans*-esterificação de 3 β -hidroxi-epoxi-esteróides, não aceitou os derivados 3 β -acetoxi como substratos. De facto, num estudo de desacilação enzimática de 3 β -acetoxi-esteróides, os autores referem que a lipase de *Pseudomonas cepacia* não se mostrou activa nesses substratos, ao contrário das lipases de *Candida antarctica* e de *Candida rugosa* (Bruttomesso e Baldessari, 2004).

As capacidades já evidenciadas pela lipase de *Candida rugosa*, tendo em conta que esta enzima mostrou alguma actividade na presença de epóxidos β (Tabela 3.2), levaram-nos a explorar as condições reaccionais necessárias para a completa desacetilação dos substratos.

A optimização cuidadosa das condições de reacção indicou que a lipase de *Candida rugosa* (crude) em éter di-isopropilo pré-saturado com água constitui o melhor sistema para a pretendida desacilação na presença de epóxidos 5 α ,6 α e 5 β ,6 β .

Comparando com os resultados obtidos no estudo da alcoólise estereo-selectiva (Secção 3.3.3) em que a lipase de *Candida rugosa* catalisa a alcoólise de 3 β -acetoxi-5 α ,6 α -epóxidos deixando inalterados os 3 β -acetoxi-5 β ,6 β -epóxidos, verifica-se que em éter di-isopropílico / água esta enzima perde selectividade, catalisando a hidrólise do grupo 3 β -acetoxilo independentemente da configuração do epóxido em 5,6.

Assim, efectuaram-se reacções em escala preparativa, procedendo-se à hidrólise enzimática total do grupo 3β -acetato das misturas epiméricas **3.8**, **3.10** e **3.12** sem afectar a função epóxido, obtendo-se os álcoois correspondentes **3.13**, **3.14** e **3.15** (Esquema 3.4).

Esquema 3.4. Desacilação suave do 3β -acetoxi-5,6-epoxi-esteróides catalisada pela lipase de *Candida rugosa* em éter di-isopropílico pré-saturado com água.

A mistura β -enriquecida de 5,6-epóxidos do colesterol (**3.13**) assim obtida foi sujeita a uma reacção enzimática de *trans*-esterificação catalisada pela lipase AY, para remover selectivamente o α -epóxido minoritário, obtendo-se o $5\beta,6\beta$ -epoxicolestano- 3β -ol diastereomericamente puro (**3.2b**) (Esquema 3.5). Este composto foi usado para estudar a estereo-selectividade, por GC, das lipases na conversão dos epímeros **3.2a** e **3.2b** (Tabela 3.2).

**Esquema 3.5. Acetilação estereo-selectiva do $5\alpha,6\alpha$ -epoxicolestano- 3β -ol (3.13)
catalisada pela lipase AY**

3.4. Conclusões

Os 5 α ,6 α -epóxidos diastereomericamente puros podem ser obtidos explorando a elevada selectividade da Novozym 435 para os 5 β ,6 β -epóxidos minoritários presentes nas misturas epiméricas.

O estudo de um conjunto de lipases comerciais permitiu verificar que as lipases de *Candida rugosa* têm uma selectividade oposta à Novozym 435, possibilitando o isolamento de β -epóxidos diastereomericamente puros por meio da alcoólise enzimática dos α -epóxidos minoritários.

Por fim, a desacetilação do grupo 3 β -acetoxilo em 5,6-epoxi-esteróides foi conseguida através da lipase de *Candida rugosa* como catalisador e água como nucleófilo, permitindo a remoção suave do grupo acilo em C-3 sem afectar o grupo funcional epóxido (Cruz Silva *et al.*, 2004b).

O presente trabalho exemplifica a utilidade das lipases na modificação selectiva dos esteróides. Estas biotransformações não só confirmam a selectividade das lipases, como são também um exemplo notável de controlo estereo-selectivo por meio de um estereocentro remoto.

3.5. Parte experimental

3.5.1. Instrumentação

Ver Secção 2.5.1.

3.5.2. Cromatografia

Ver Secção 2.5.2

A CCF foi efectuada em tolueno / éter dietílico (85 : 15) como eluente e a detecção foi feita com o reagente de Komarowsky (MacDonald, 1977).

A conversão dos substratos em produtos foi determinada por cromatografia gasosa, usando um cromatógrafo Hewlett Packard 5890 série II e uma coluna HP-1 Crosslinked Methyl Silicone Gum (25 m, 0.32 mm ID, Hewlett Packard), e temperaturas compreendidas 236 a 290 °C, usando H₂ como gás de transporte.

3.5.3. Reagentes e solventes

Ver Secção 2.5.3

O monoperoxifalato de magnésio (MMPP) e o permanganato de potássio foram adquiridos à Aldrich.

3.5.4. Síntese química de 5 α ,6 α - e 5 β ,6 β -epoxi-esteróides

3.5.4.1 Método geral para a epoxidação de 3 β -hidroxi-esteróides Δ^5 insaturados com MMPP

A uma solução do esteróide (1 mmol) em CH₂Cl₂ (10 ml) e etanol (2 ml), adicionou-se MMPP (990 mg, 2 mmol) e a suspensão resultante foi agitada à temperatura ambiente durante 24 horas. Após este tempo, a reacção estava completa (controlo por CCF). Então, adicionou-se NaCl e éter dietílico e a suspensão foi filtrada num filtro de celite. O filtrado foi lavado com HCl 5%, solução saturada de NaHCO₃, água e solução saturada de NaCl, seco com MgSO₄ e evaporado à secura, obtendo-se misturas epiméricas enriquecidas dos epóxidos como os únicos produtos.

5,6-Epoxi-colestano-3 β -ol, 3.2

RMN ¹H (300 MHz) δ : 0,61 (3H, s, CH₃-18); 1,06 (3H, s, CH₃-19); 2,91 e 3,07 (1H, d cada, $J = 4,362$ e $2,190$ Hz, respectivamente, H-6); 3,90 (1H, m, H-3). A integração dos dois sinais (picos dubletos) devido ao protão H-6 deu uma relação α/β de 83 : 17. RMN ¹³C δ : 59,33 (C-3); 65,77 (C-5); 68,70 (C-6). IV (ATR): ν_{\max} 1038,48; 1366,3; 1465,6; 2864,7; 2931,3 cm⁻¹.

5,6-Epoxi-3 β -hidroxipregnano-20-ona, 3.4

RMN ^1H (300 MHz) δ : 0,56 (3H, s, CH₃-18); 1,00 (3H, s, CH₃-19); 2,03 (3H, s, CH₃-21); 2,92 e 3,08 (1H, d cada, $J = 4,359$ e $2,352$ Hz, respectivamente, H-6); 3,90 (1H, m, H-3). A integração dos dois sinais (doubletos) devido to the H-6 protão deu uma relação α/β de 90 : 10. RMN ^{13}C δ : 59,06 (C-3); 63,33 (C-17); 65,67 (C-5); 68,58 (C-6); 209,52 (C-20). IV (ATR): ν_{max} 1049,1; 1355; 1684; 1700,9; 2930,3 cm^{-1} .

5,6-Epoxi-3 β -hidroxi-androstano-17-ona, 3.6

RMN ^1H (300 MHz) δ : 0,82 (3H, s, CH₃-18); 1,09 (3H, s, CH₃-19); 2,95 e 3,13 (1H, d cada, $J = 4,329$ e $2,532$ Hz, respectivamente, H-6); 3,90 (1H, m, H-3). A integração dos dois sinais (doubletos) devidos ao protão H-6 deu uma relação α/β de 90 : 10. RMN ^{13}C δ : 58,75 (C-3); 65,72 (C-5); 68,49 (C-6); 220,68 (C-17). IV (ATR): ν_{max} 1027,9; 1725,0; 2944,8 cm^{-1} .

3.5.4.2. Método geral para a epoxidação de 3 β -acetoxi-esteróides Δ^5 -insaturados com KMnO_4 / sais inorgânicos

A uma solução do esteróide (1 mmol) em CH_2Cl_2 (5 ml), adicionou-se uma mistura de KMnO_4 (350 mg) e $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3 \cdot n\text{H}_2\text{O}$ (175 mg) devidamente pulverizados. De seguida, adicionou-se água (75 μl) e álcool *t*-butílico e a mistura reaccional foi deixada

durante a noite à temperatura ambiente sob agitação magnética. Após este tempo, a reacção estava completa (controlo por CCF). Então, adicionou-se NaCl e éter dietílico e a suspensão foi filtrada num filtro de celite. O filtrado foi evaporado à secura, obtendo-se a mistura epimérica enriquecida dos epóxidos β como os únicos produtos.

Acetato de 5,6-epoxicolestano-3 β -ilo, 3.8

RMN ^1H (300 MHz) δ : 0,64 (3H, s, CH₃-18); 1,00 (3H, s, CH₃-19); 2,03 (3H, s, CH₃CO); 2,90 e 3,08 (1H, d cada, $J = 4,371$ e $1,941$ Hz, respectivamente, H-6); 4,77 (1H, m, H-3). A integração dos dois sinais (picos dubletos) devido ao protão H-6 deu uma relação α/β de 11 : 89. RMN ^{13}C δ : 59,14 (C-6); 65,15 (C-5); 71,36 (C-3); 170,21 (CH₃CO). IV (ATR): ν_{max} 1030,8; 1243,9; 1363,4; 1465,6; 1731,8; 2866,7; 2933,2 cm^{-1} .

Acetato de 5,6-epoxi-20-oxo-pregnano-3 β -ilo, 3.10

RMN ^1H (300 MHz) δ : 0,59 (3H, s, CH₃-18); 1,01 (3H, s, CH₃-19); 2,03 (3H, s, CH₃CO); 2,11 (3H, s, CH₃-21); 2,91 e 3,09 (1H, d cada, $J = 4,347$ e $2,163$ Hz, respectivamente, H-6); 4,77 (1H, m, H-3). A integração dos dois sinais (picos dubletos) devidos ao protão H-6 deu uma relação α/β de 13 : 87. RMN ^{13}C δ : 62,42 (C-5); 63,35 (C-17); 63,60 (C-6); 71,19 (C-3); 170,55 (CH₃CO); 209,37 (C-20). IV (ATR): ν_{max} 1029,8; 1243,9; 1356,7; 1698,9; 1735; 2930 cm^{-1} .

Acetato de 5,6-epoxi-17-oxo-androstano-3 β -ilo, **3.12**

RMN ¹H (300 MHz) δ : 0,85 (3H, s, CH₃-18); 1,04 (3H, s, CH₃-19); 2,04 (3H, s, CH₃CO); 2,94 e 3,15 (1H, d cada, $J = 4,341$ e $2,493$ Hz, respectivamente, H-6); 4,77 (1H, m, H-3). A integração dos dois sinais (picos dubletos) devidos ao próton H-6 deu uma relação α/β de 9 : 91. RMN ¹³C δ : 62,56 (C-5); 63,17 (C-6); 71,10 (C-3); 170,53 (CH₃CO); 220,77 (C-17). IV (ATR): ν_{\max} 1029,8; 1240,0; 1727,9; 2946,7 cm⁻¹.

3.5.5. Acilação enzimática de 3 β -hidroxi-5,6-epoxi-esteróides

Num ensaio de rastreio representativo, uma solução de 3 β -hidroxi-5 α ,6 α -epoxi- ou 3 β -hidroxi-5 β ,6 β -epoxi-esteróide (10 mg) em tolueno (0,9 ml) e acetato de vinilo (0,1 ml) foi adicionada à enzima (50 mg de enzimas crude, 10 mg de Lipozyme IM 20 ou 10 mg of Novozym 435) em frascos de 3 ml. Os frascos foram fechados e as suspensões foram agitadas a 45 °C. As reacções foram monitorizadas por CCF e por GC (Tabela 3.2).

5 α ,6 α -Epoxicolestano-3 β -ol (**3.2a**)

A uma solução de 5,6-epoxicolestano-3 β -ol (**3.2**, 150 mg, α/β 83 : 17) em tolueno (8,5 ml) e acetato de vinilo (1,5 ml), adicionou-se Novozym 435 (75 mg) e a reacção foi agitada a 45 °C. Após 24 horas, a enzima foi filtrada e o solvente foi evaporado. O

5 α ,6 α -epoxicolestano-3 β -ol (**3.2a**, 100 mg, rendimento 67 %) foi isolado por cromatografia *flash* (éter de petróleo / acetato de etilo 1 : 1) como um único diastereómero {[α]_D²¹ = - 44,5; *c* 0,5; CHCl₃ (lit.^(Houminer, 1975) [α]_D= - 47), pf 141,5 – 142,7 °C (lit.^(Houminer, 1975) 141 – 142 °C)} tal como indica o RMN ¹H.

5 α ,6 α -Epoxi-3 β -hidroxipregnano-20-ona (**3.4a**)

A uma solução de 5,6-epoxi-20-oxo-pregnano-3 β -ol (**3.4**, 150 mg, α/β 91 : 9) em tolueno (8,5 ml) e acetato de vinilo (1,5 ml), Novozym 435 (75 mg) foi adicionado e a reacção foi agitada a 45 °C. Após 24 horas, a enzima foi filtrada e o solvente foi evaporado. O 5 α ,6 α -epoxi-3 β -hidroxipregnano-20-ona (**3.4a**, 108 mg, rendimento 72 %) foi isolado por cromatografia *flash* (éter de petróleo / acetato de etilo 1 : 1) como um único diastereómero {[α]_D²¹ = + 6,35; *c* 0,84; CHCl₃ (lit.^(Ellis e Petrow, 1956) [α]_D= +1), pf = 179,2 – 182,0 °C (lit.^(Ellis e Petrow, 1956) 190 - 191 °C)}, tal como indica o RMN ¹H.

5 α ,6 α -Epoxi-3 β -hidroxiandrostando-17-ona (**3.6a**)

A uma solução de 5,6-epoxi-17-oxo-androstando-3 β -ol (**3.6**, 150 mg, relação α/β 90 : 10) em tolueno (8,5 ml) e acetato de vinilo (1,5 ml), Novozym 435 (75 mg) foi adicionado e a reacção foi agitada at 45 °C. Após 24 horas, a enzima foi filtrada e o solvente foi evaporado. O 5 α ,6 α -epoxi-3 β -hidroxi-androstando-17-ona (**3.6a**, 103 mg, rendimento 69 %) foi isolado por cromatografia *flash* (éter de petróleo / acetato de etilo 1 : 1,5) como um único diastereómero ([α]_D²¹ = - 4,3 , *c* 0,5, CHCl₃), pf 225 - 228 °C (lit.^(Hanson e Truneh, 1988) 227 – 230 °C)}, tal como indica o espectro de RMN ¹H.

3.5.6. Desacilação enzimática de 3 β -acetoxi-5 α ,6 α - e 5 β ,6 β -epoxi-esteróides

Num ensaio de rastreio representativo, o 3 β -acetoxi-5 α ,6 α -epoxi- ou o 3 β -acetoxi-5 β ,6 β -epoxi-esteróide (10 mg) dissolvido em tolueno (0,9 ml) e octanol (0,1 ml) foi adicionado à enzima (50 mg de enzimas crude, 10 mg de Lipozyme IM 20 ou 10 mg de Novozym 435) em frascos de 3 ml. Os frascos foram fechados e as suspensões foram agitadas a 250 rpm a 45 °C. As reacções foram monitorizadas por CCF durante 3 dias.

Acetato de 5 β ,6 β -epoxicolestano-3 β -ilo, **3.8b**

A uma solução de acetato de 5,6-epoxicolestano-3 β -ilo (**3.8**, 180 mg, relação α/β de 11 : 89) em tolueno (8 ml) e octanol (2 ml), a lipase AY (200 mg) foi adicionada e a suspensão foi agitada a 45 °C. Após 3 dias, a enzima foi filtrada e o solvente foi evaporado. O acetato de 5 β ,6 β -epoxicolestano-3 β -ilo (**3.8b**, 112 mg, rendimento 62 %) foi isolado por cromatografia *flash* (éter de petróleo / acetato de etilo, 2 : 1) como um único diastereómero {[α]_D²¹ = - 0,57, *c* 1,09, CHCl₃ (lit.^(Plattner *et al.*, 1944) [α]_D = - 0,2), pf 109-111 °C (lit.^(Plattner *et al.*, 1944) 112 – 113 °C)}, tal como indica o espectro de RMN ¹H.

Acetato de 5 β ,6 β -epoxi-20-oxo-pregnano-3 β -ilo, **3.10b**

A uma solução de acetato de 5,6-epoxi-20-oxo-pregnano-3 β -ilo (**3.10**, 180 mg, relação α/β de 13 : 87) em tolueno (8 ml) e octanol (2 ml), a lipase AY (200 mg) foi adicionada e a suspensão foi agitada a 45 °C. Após 3 dias, a enzima foi filtrada e o solvente foi evaporado. O acetato de 5 β ,6 β -epoxi-20-oxo-pregnano-3 β -ilo (**3.10b**, 126 mg, rendimento 70 %) foi isolado por cromatografia *flash* (éter de petróleo / acetato de etilo, 2 : 1) como um único diastereómero $\{[\alpha]_D^{21} = + 50,56; c 1,18; \text{CHCl}_3 \text{ (lit.}^{(\text{Akhtar e Barton, 1964})} [\alpha]_D = + 50), \text{ pf } 132 - 134 \text{ }^\circ\text{C (lit.}^{(\text{Akhtar e Barton, 1964})} 132 - 136 \text{ }^\circ\text{C)}\}$, tal como indica o espectro de RMN ^1H .

Acetato de-5 β ,6 β -epoxi-17-oxo-androstano-3 β -ilo, **3.12b**

A uma solução de acetato de 5,6-epoxi-17-oxo-androstano-3 β -ilo (**3.12**, 180 mg, relação α/β de 10 : 90) em tolueno (8 ml) e octanol (2 ml), a lipase AY (200 mg) foi adicionada e a suspensão foi agitada a 45 °C. Após 3 dias, a enzima foi filtrada e o solvente foi evaporado. O acetato de 5 β ,6 β -epoxi-17-oxo-androstano-3 β -ilo (**3.12b**, 135 mg, rendimento 75 %) foi isolado por cromatografia *flash* (éter de petróleo / acetato de etilo, 1 : 1) como um único diastereómero $\{[\alpha]_D^{21} = + 43,0; c 1,4; \text{CHCl}_3 \text{ (lit.}^{(\text{Cubberley e Marples, 1974})} [\alpha]_D = + 40,5), \text{ pf } 186,7-188 \text{ }^\circ\text{C (lit.}^{(\text{Cubberley e Marples, 1974})} 185-187 \text{ }^\circ\text{C)}\}$, tal como indica o espectro de RMN ^1H .

3.5.7. Hidrólise total de 3 β -acetoxi-5 α ,6 α - e 5 β ,6 β -epoxi-esteróides

Num ensaio típico, o 3 β -acetoxi-5,6-epoxi-esteróide (150 mg) obtido por epoxidação com KMnO₄ foi dissolvido em éter di-isopropílico (35 ml) pré-saturado com água e a lipase de *Candida rugosa* (1,8 g) foi adicionada. A mistura foi agitada a 250 rpm e 45 °C e após 3 dias as reacções estavam completas. Os produtos foram isolados e as relações α/β quantificadas por RMN ¹H: 5,6-epoxi-colestano-3 β -ol (**3.13**, 136 mg, α/β 11 : 89), 5,6-epoxi-3 β -hidroxipregnano-20-ona (**3.14**, 130 mg, α/β 13 : 87) e 5,6-epoxi-3 β -hidroxi-androstano-17-ona (**3.15**, 135 mg, α/β 10 : 90).

5 β ,6 β -Epoxicolestano-3 β -ol, **3.2b**

A uma solução de 5,6-epoxicolestano-3 β -ol (**3.13**, 136 mg, α/β 10 : 90) em tolueno (6 ml) e acetato de vinilo (1 ml), adicionou-se a Lipase AY (100 mg) e a suspensão foi agitada a 45 °C. Após 3 dias, a enzima foi filtrada e o solvente foi evaporado. O 5 β ,6 β -epoxicolestano-3 β -ol (**3.2b**, 100,5 mg, 74 % rendimento) foi isolado por cromatografia *flash* (éter de petróleo / acetato de etilo, 1 : 1) como um único diastereómero {[α]_D²¹ = + 8,0; *c* 0,5; CHCl₃, (lit.^(Cubberley e Marples., 1974) [α]_D = + 7,8), pf 127-129 °C (lit.^(Cubberley e Marples., 1974) 128 – 131 °C)}, tal como indica o espectro de RMN ¹H.

CAPÍTULO 4

Acilação enzimática regio-selectiva

de dióis vicinais de esteróides

M. Manuel Cruz Silva, Sergio Riva and M. Luisa Sá e Melo. **“Regioselective enzymatic acylation of vicinal diols of steroids”**, *Tetrahedron* (2005), 61 (12): 3065 - 3073.

4. Acilação enzimática regio-selectiva de dióis vicinais de esteróides

4.1. Resumo

Os esteróides poli-hidroxiados bioactivos contendo um diol vicinal no anel A são encontrados em diversas fontes naturais, alguns sob a forma de derivados mono-acilados, -glicosilados ou -sulfatados.

A acilação enzimática deste tipo de compostos é um desafio interessante em termos de estudo da regio-selectividade das enzimas face a compostos esteróides complexos e pode permitir a síntese de análogos com actividade biológica.

Assim, as séries completas de dióis vicinais estereo-isoméricos nas posições 2,3 e 3,4 do anel A da estrutura esteróide foram sintetizadas por métodos químicos adequados. Os isómeros obtidos foram, então, submetidos à acção de um conjunto de lipases em meio orgânico, usando acetato de vinilo como agente acilante.

Os resultados obtidos mostram que as lipases são capazes de diferenciar grupos hidroxilo vicinais localizados no anel A de esteróides, sendo sensíveis à configuração dos diferentes dióis e permitindo a obtenção dos respectivos monoésteres com elevada regio-selectividade e bons rendimentos.

4.2. Introdução

4.2.1. Compostos esteróides com um diol vicinal no anel A

Os esteróides poli-hidroxiados contendo um diol vicinal no anel A são frequentemente encontrados em diversas fontes naturais e alguns deles demonstram propriedades biológicas relevantes (Esquema 4.1).

Por exemplo, dióis $2\beta,3\alpha$ -*trans*-diaxiais e derivados estão presentes em esteróis naturais sulfatados com propriedades antivirais (Rudi *et al.*, 2001; Garrido Santos *et al.*, 2003; Roccatagliata *et al.*, 1998) ou anti-angiogénicas, como o lembesterol B representado no Esquema 4.1 (Aoki *et al.*, 2002). Além disso, $2\beta,3\alpha$ - é a configuração de um derivado 2β -etoxilo com actividade anestésica, minaxolona (Gasior *et al.*, 1999; McNeill *et al.*, 1979), representada no Esquema 4.1.

Saponinas com a funcionalidade $2\alpha,3\beta$ -diol *trans*-diequatorial são muito frequentes como derivados da gitogenina (Esquema 4.1), alguns com propriedades antitumorais (Mimaki *et al.*, 1998 e 1999; Candra *et al.*, 2002), enquanto dióis $2\alpha,3\alpha$ isolados de fontes marinhas possuem actividade citotóxica (Higa *et al.*, 1981; Rao *et al.*, 1988), como o hipuristanol (Esquema 4.1).

Por outro lado, dióis com a configuração $3\beta,4\beta$ estão presentes numa variedade de esteróides como os derivados acetilados agosteróis, que induzem reversão da multi-resistência a fármacos (Aoki *et al.*, 1998) e inibição do proteassoma (Tsukamoto *et al.*,

2003), assim como em volkendusinas, que são agentes antitumorais potentes (Rogers *et al.*, 1998).

Finalmente, dióis vicinais com configuração $3\alpha,4\beta$ foram identificados em metabolitos do formestano (Esquema 4.1) (Lønning *et al.*, 2001), no contignasterol, um esteróide natural anti-inflamatório (Burgoyne *et al.*, 1992; Bramley *et al.*, 1995) e, recentemente num esteróide com actividade de químio-atracção (Yoshida *et al.*, 2002).

Esquema 4.1. Alguns exemplos de esteróides bioactivos com um diol vicinal, ou derivado, no anel A

4.2.2. Transformações enzimáticas regio-selectivas de compostos poli-hidroxilados

A regio-selectividade das hidrolases em reacções de hidrólise, alcoólise ou *trans*-esterificação tem sido amplamente demonstrada (Riva, 2001 e 2002). A acilação enzimática do alcalóide castanospermina constitui um bom exemplo do controlo regio-selectivo que as hidrolases permitem. Neste substrato com quatro grupos hidroxilo secundários, a subtilisina catalisa a introdução de diversos grupos acilo em apenas uma das posições (Margolin *et al.*, 1990). Outros estudos descrevem a acilação enzimática altamente regio-selectiva de moléculas mais complexas, como os gingenósidos ou a digitonina, constituídas por uma aglicona triterpenóide e uma ou mais cadeias de açúcar (Danieli *et al.*, 1995 e 1999).

Especificamente no campo dos esteróides, a catálise enzimática promove a interconversão suave e selectiva dos grupos funcionais através de transformações regio-selectivas, como foi discutido no Capítulo 1 (Secção 1.2). Por exemplo, a capacidade das hidrolases para discriminar diferentes grupos hidroxilo no anel A foi demonstrada na acilação enzimática de ecdiesteróides (Danieli *et al.*, 1997). Usando a Novozym 435 como catalisador foi possível isolar derivados 2 β -monoacilados com bons rendimentos, deixando inalterados os grupos hidroxilo secundários localizados em C-3, C-11 e C-22.

Assim, com o intuito de explorar as transformações enzimáticas regio-selectivas de esteróides, propusemo-nos levar a efeito um estudo sistemático da afinidade e

selectividade de um conjunto de enzimas comerciais usando como substratos as séries completas de dióis vicinais estereo-isoméricos nas posições 2,3 e 3,4 do anel A da estrutura esteróide.

Com este estudo pretende-se, não só aprofundar o conhecimento da afinidade das enzimas para os substratos esteróides, como desenvolver uma ferramenta para a transformação selectiva de esteróides com dióis vicinais e compostos naturais relacionados.

4.3. Resultados e discussão

4.3.1. Síntese dos dióis vicinais

O estudo sistemático da afinidade e selectividade das lipases para dióis vicinais no anel A de esteróides foi precedido pela síntese de todos os dióis vicinais estereoisoméricos nas posições 2,3- e 3,4- do anel A do esqueleto esteróide, uma vez que não são comercialmente disponíveis (Esquema 4.2).

Esquema 4.2. Séries completas de 2,3- e 3,4-dióis vicinais no anel A de esteróides

Para a preparação do colestano-2 β ,3 β -diol e do androstano-3 β ,4 β ,17 β -triol foi seleccionado o método de *cis*-di-hidroxilação de Woodward, o qual consiste em fazer reagir uma olefina com I₂ e Cu(OAc)₂ em ácido acético, seguido de desacilação do α -acetoxi-álcool obtido (Horiuchi e Satoh, 1988). No anel A de 5 α -esteróides este método é selectivo para a face β , mais impedida (Woodward e Brutcher, 1958; Horiuchi e Satoh, 1988). Assim, partindo dos precursores insaturados Δ^2 (**4.11**) ou Δ^3 (**4.17**) obtiveram-se os *cis*- β dióis **4.1** e **4.5** como produtos maioritários, os quais foram isolados por cromatografia *flash* (Esquemas 4.3 e 4.4).

Complementarmente, o colestano-2 α ,3 α -diol e o androstano-3 α ,4 α ,17 α -triol, ou seja, os *cis*- α dióis **4.2** e **4.6**, foram obtidos através da di-hidroxilação mediada por tetróxido de ósmio das mesmas olefinas (Henbest e Smith, 1957; Davey *et al.*, 1968). Estudos anteriores mostravam que o tetróxido de ósmio tem preferência pela face α do anel A de 5 α -esteróides devido ao impedimento estereoquímico do grupo 10 β -metilo.

Os dióis *trans*-diequatoriais **4.3** e **4.7** foram obtidos por dois processos diferentes. Partindo de colestano-3-ona (**4.12**), a α -acetoxilação com tetracetato de chumbo (Boul *et al.*, 1971; Shoppee *et al.*, 1957), resulta na formação do acetato de 3-oxo-colestano-2 α -ilo (**4.13**). A redução estereo-selectiva da 3-cetona com NaBH₄ / CeCl₃ (Luche *et al.*, 1978) resulta na formação do álcool equatorial 3 β -OH (**4.14**). Por fim, a hidrólise do 2 α -acetato **4.14** produziu o diol **4.3** (Esquema 4.3).

Por outro lado, o diol 3 β ,4 α , **4.7**, foi directamente obtido por hidroboração do precursor Δ^4 -3-cetona **4.18** (Esquema 4.4). Este processo de síntese de 3 β ,4 α -dióis foi

proposto por diversos autores (Nakata, 1965; Hanson *et al.*, 1995), tendo sido usado no nosso grupo (Campos Neves *et al.*, 1999).

Por último, a abertura em meio ácido dos 2,3- e 3,4-epóxidos (**4.15** e **4.19**) obtidos a partir das respectivas olefinas permitiu a obtenção dos dióis *trans*-diaxiais **4.4** e **4.8** (Esquemas 4.3 e 4.4). Esta via sintética foi usada por outros autores na síntese do diol **4.4** (Garrido Santos *et al.*, 2003).

Esquema 4.3. Síntese de todos os estereoisómeros do colestano-2,3-diol.

Esquema 4.4. Síntese de todos os estereoisómeros do androstano-3,4,17-triol.

Como os Esquemas 4.3 e 4.4 mostram, os 2,3-dióis foram preparados por modificação do esqueleto colestano, enquanto que as dificuldades encontradas na separação dos epímeros 5 α - e 5 β - do Δ^3 -colestano por cristalizações sequenciais (Esquema 4.4) levou-nos a preparar o conjunto de 3,4-dióis na série androstano. O derivado colestano **4.9** (Esquema 4.7) foi sintetizado por hidroboração do precursor Δ^4 -3-ona para confirmar que a selectividade das lipases relativamente aos grupos hidroxilos localizados no anel A não é afectada pelos diferentes substituintes no anel D da estrutura esteróide.

4.3.2. Rastreo de enzimas

As *performances* de um painel de 9 lipases comerciais foram avaliadas na esterificação dos dióis vicinais preparados, usando acetato de vinilo como dador de acilo e tolueno ou acetona / THF como solventes para substratos da série colestano ou androstano, respectivamente.

O controlo por CCF permitiu a identificação, para cada substrato, da(s) lipase(s) capazes de promover a monoacilação de cada um dos substratos. Como a Tabela 4.1 mostra, todos os dióis vicinais estereoisoméricos foram aceites como substratos por algumas das enzimas testadas com a excepção do composto **4.8**.

Tabela 4.1. Monoacilação de dióis vicinais catalisada por lipases^(a)

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Diol	Novozym 435	Lipase <i>C.</i> <i>rugosa</i>	Lipase AY	Lipase PS	Lipase AK	Lipase <i>C.</i> <i>viscosum</i>	Lipase pâncreas porco	Lipozyme IM 20	Lipase CE
2β,3β (4.1)	-	++	+	+	+	+	-	-	-
2α,3α (4.2)	++	-	-	-	-	-	-	-	-
2α,3β (4.3)	-	+	+	++	+	+	-	-	-
2β,3α (4.4)	++	+ ^(b)	+ ^(b)	++	-	-	-	-	-
3β,4β (4.5)	+	++	++	+	+	+	-	-	-
3α,4α (4.6)	-	+	-	++	+	+	-	-	-
3β,4α (4.7)	+	+	+	+	+	++	-	-	-
3α,4β (4.8)	-	-	-	-	-	-	-	-	-

^(a)A conversão e a formação de produto(s) foi avaliada por CCF.

^(b)A formação de dois produtos foi observada por CCF.

Neste estudo verifica-se que as lipases testadas de diferentes origens (*Candida antarctica*, coluna 2; *Candida rugosa*, colunas 3 e 4; estirpes de *Pseudomonas*, colunas 5 e 6; *Chromobacterium viscosum*, coluna 7), mostraram-se capazes de acilar os compostos alvo. Em geral, o mesmo substrato foi aceite por mais do que uma lipase, com a excepção notável do composto **4.2** ($2\alpha,3\alpha$ -diol), acilado apenas pela Novozym 435.

As acilações enzimáticas foram altamente regio-selectivas, mostrando a formação de apenas um produto por CCF, com a excepção da lipase da *Candida rugosa* (colunas 3 e 4) actuando no composto **4.4**. De realçar que a lipase de *Pseudomonas cepacia* e a Novozym 435 mostraram regio-selectividade oposta relativamente ao substrato **4.4** (Esquema 4.7).

4.3.3. Síntese enzimática e isolamento dos derivados monoacilados

Para cada substrato, a lipase com melhores resultados, de acordo com a análise qualitativa por CCF (Tabela 4.1), foi seleccionada para reacções em maior escala, permitindo o isolamento do monoéster correspondente com bons rendimentos, como o Esquema 4.5 exemplifica. A identificação dos produtos foi facilmente feita por análise de RMN ^1H , nomeadamente através do desvio químico dos sinais devidos ao protão ligado ao carbono ao qual se liga o hidroxilo acilado e, quando possível, por comparação com dados da literatura.

Esquema 4.5. Mono-acilação regio-selectiva do colestano-2 β ,3 β -diol.

A conhecida preferência das lipases pelo grupo hidroxilo em C-3 (discutida no Capítulo 1, Secção 1.2.4.) foi igualmente observada nestes ensaios com a maioria dos substratos (Esquema 4.6 e 4.7).

Especificamente, os dióis vicinais diequatoriais **4.3** e **4.7** foram convertidos no correspondente 3 β -acetato (Esquema 4.7), mostrando a preferência das diferentes lipases relativamente ao 3 β -OH em posição equatorial na presença do hidroxilo 2 α -equatorial (substrato **4.3**) ou do hidroxilo 4 α -equatorial (substrato **4.7**).

No que respeita aos dióis *trans*-diaxiais 2 β ,3 α e 3 α ,4 β (substratos **4.4** e **4.8**), foram obtidos diferentes resultados (Esquema 4.7).

O diol diaxial 2 β ,3 α , **4.4**, foi diferentemente aceite pelas lipases testadas. Enquanto a Novozym 435 converte este diol, exclusivamente, no 3 α -acetato **4.4a**, a lipase de *Pseudomonas cepacia* mostra selectividade oposta, obtendo-se o derivado 2 β -acilado **4.4b** como o único produto. Estes derivados monoacilados foram sintetizados quimicamente por outros autores (Garrido Santos *et al.*, 2003) e separados por cromatografia em coluna, num estudo que visava a preparação de esteróides com actividade antiviral.

Adicionalmente, as acilações catalisadas pelas lipases de *Candida rugosa* não foram regio-selectivas com o diol *trans*-di axial **4.4**, tendo-se observado em CCF a formação de duas manchas correspondentes aos produtos **4.4a** e **4.4b**.

Por outro lado, o diol *trans*-di axial $3\alpha,4\beta$ (**4.8**) não foi aceite por nenhuma das enzimas testadas.

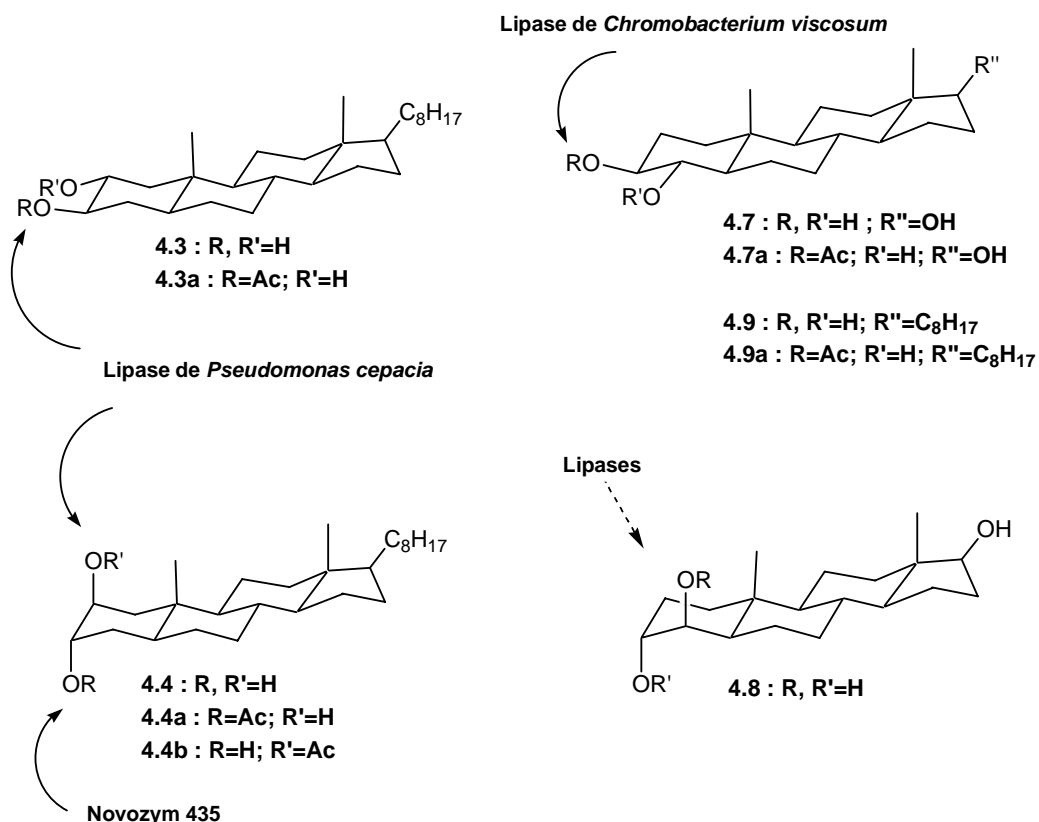
Esquema 4.6. Acilação enzimática regio-selectiva de 2,3- e 3,4-*cis*-dióis.

Por último, o diol equatorial / axial $2\alpha,3\alpha$ (**4.2**), apenas aceite pela Novozym 435, foi acilado na posição axial 3α , enquanto que o esteróide di-hidroxilado em $3\alpha,4\alpha$

(**4.6**) com configuração axial / equatorial foi acilado por diferentes lipases na posição equatorial 4 α .

A capacidade da Novozym 435 para aceitar o grupo 3 α -OH axial como nucleófilo foi já descrita (Bertinotti *et al.*, 1994). Neste trabalho, verificou-se que a Novozym 435 catalisa a acilação do 3 α -OH mesmo quando um segundo grupo hidroxilo está localizado em C-2 (substratos **4.2** e **4.4**), enquanto que a enzima é inactiva quando o outro grupo hidroxilo está em C-4 (substratos **4.6** e **4.8**) (Esquemas 4.6 e 4.7).

No que respeita à lipase de *Pseudomonas cepacia*, a capacidade desta enzima para esterificar esteróides 3-hidroxilados foi também observada com os derivados 3 β -hidroxi-5,6-epóxido estudados no Capítulo 3. Neste trabalho, a lipase de *Pseudomonas cepacia* mostrou-se capaz de acilar a maioria dos substratos (Tabela 4.1, coluna 5), catalisando a sua modificação regio-selectiva, não só no 3-OH equatorial (produto **4.3a**), mas também no 2-OH axial (produto **4.4b**) (Esquema 4.7) e no 4-OH equatorial (produto **4.6a**) (Esquema 4.6). De notar que, no painel de enzimas testadas, a lipase de *Pseudomonas cepacia* foi a única capaz de acilar os grupos hidroxilo localizados nestas posições.



Esquema 4.7. Acilação enzimática regio-selectiva de 2,3- e 3,4-*trans*-dióis.

A lipase de *Candida rugosa* aceitou a maioria dos substratos. Especificamente, esta enzima catalisou a acetilação dos substratos **4.1**, **4.3**, **4.5** e **4.7** na posição 3 β -OH, como era de esperar dos resultados obtidos noutros estudos (Riva *et al.*, 1989b; Ottolina *et al.*, 1991). No entanto, como a Tabela 4.1 mostra, o 3 α ,4 α -diol **4.6** foi também acilado pela lipase de *Candida rugosa* na posição C-4 OH, e o 2 β ,3 α -diol **4.4** foi acilado em ambos os grupos hidroxilo, mostrando que esta enzima tem um perfil de afinidade e selectividade muito variável.

A lipase de *Chromobacterium viscosum* que, em estudos anteriores, mostrou uma selectividade muito restrita para o 3 β -hidroxilo de 5 α -esteróides (Riva e Klibanov, 1988), evidencia aqui a esperada preferência por dióis com este grupo hidroxilo equatorial (substratos **4.1**, **4.3**, **4.5** e **4.7**). No entanto, foi também observada a acilação do substrato **4.6**, um 3 α ,4 α -diol, mas na posição 4 α -OH.

Além disso, em concordância com observações anteriores, as lipases testadas não catalisam qualquer acilação na posição 17 β -OH (substratos **4.5**, **4.6**, **4.7**, **4.8**), uma vez que este grupo hidroxilo se encontrava inalterado em cada um dos produtos isolados.

Por último, o substrato **4.9**, um colestano com configuração 3 β ,4 α -diequatorial, foi convertido tanto pela lipase de *Chromobacterium viscosum* como pela lipase de *Pseudomonas cepacia*, no 3 β -monoacetato **4.9a**, um resultado que confirma que as diferenças na cadeia lateral dos esteróides não influenciam a selectividade das lipases ao nível do anel A.

4.4. Conclusões

Os resultados apresentados mostram claramente que as lipases são capazes de diferenciar grupos hidroxilo vicinais localizados no anel A de esteróides, sendo sensíveis à configuração dos diferentes dióis e permitindo a obtenção dos respectivos monoésteres com elevada regio-selectividade e bons rendimentos (Cruz Silva *et al.*, 2005b).

Assim, considerando a presença de dióis vicinais de esteróides na Natureza, alguns dos quais mono-acilados (Higa *et al.*, 1981; Rao *et al.*, 1988; Tsukamoto *et al.*, 2003), -glicosilados (Mimaki *et al.*, 1998 e 1999; Candra *et al.*, 2002) ou -sulfatados (Rudi *et al.*, 2001; Garrido Santos *et al.* 2003; Roccatagliata *et al.*, 1998; Yoshida *et al.*, 2002), estes resultados podem oferecer uma metodologia útil para a preparação destes compostos.

4.5 Parte experimental

4.5.1. Instrumentação

Ver Secção 2.5.1

4.5.2. Cromatografia

Ver Secção 2.5.2

4.5.3. Reagentes e solventes

Ver Secção 2.5.3

Tricloreto de cério, tetra-acetato de chumbo, tetróxido de ósmio, metano-sulfonamida e ácido *m*-cloroperoxibenzóico foram adquiridos à Aldrich. O boro-hidreto de sódio foi obtido da BDH Chemicals, Lda.

4.5.4. Síntese química dos dióis

4.5.4.1. Síntese de colestano-2 β ,3 β -diol (4.1)

De acordo com o procedimento descrito por D'Onofrio e Scettri (1985), a uma solução de ácido *p*-tolueno-sulfónico (3 g) em acetona (20 ml) foi adicionada sílica gel (70-230 Mesh, 100 g). A mistura foi agitada, evaporada sob pressão reduzida e

colocada numa estufa de vácuo durante dois dias. A uma solução de 5 α -colestano-3 β -ol (**4.10**; 1,17 g; 3 mmol) em tolueno anidro (200 ml), adicionou-se ácido *p*-tolueno-sulfônico / sílica (15 g) e a mistura foi agitada sob refluxo, até ao consumo total do material de partida (24 h). Após o arrefecimento, foi adicionado éter dietílico e a sílica foi removida por filtração. A solução orgânica foi lavada com água, solução saturada de NaHCO₃ e solução saturada de NaCl. Após evaporação, o colestano-2-eno (**4.11**, 1,0 g, rendimento 90 %) foi recuperado como um único produto.

Colesta-2-eno, **4.11**

RMN ¹H (CDCl₃) δ : 0,66 (3H, s, CH₃-18); 0,75 (3H, s, CH₃-19); 0,86 (6H, dois d, *J*= 6,6 Hz, CH₃-26 e CH₃-27); 0,90 (3H, d, *J*=6,5 Hz, CH₃-21); 5,59 (2H, m, H-2 e H-3). RMN ¹³C δ : 125,96; 125,85; 56,49; 56,27; 54,07; 42,47; 41,45; 40,03; 39,78; 39,51; 36,17; 35,79; 35,61; 34,69; 31,82; 30,31; 28,77; 28,22; 28,00; 24,20; 23,82; 22,82; 22,56; 20,90; 18,68; 11,98; 11,67.

De acordo com o procedimento de Horiuchi e Satoh (1988), a uma solução de colestano-2-eno (**4.11**, 420 mg, 1,15 mmol) em ácido acético glacial (35 ml), I₂ (600 mg) e Cu(OAc)₂ (500 mg) foram adicionados e a mistura reaccional foi aquecida a refluxo sob agitação magnética. Após 6 h verificou-se que a reacção estava completa (controlo por CCF). Então, foram adicionados tolueno e NaCl e os sais insolúveis foram filtrados. Ao filtrado foi adicionado éter dietílico e a fase orgânica foi lavada com água

e solução saturada de NaHCO₃ e seca com MgSO₄. A evaporação dos solventes sob pressão reduzida conduziu à obtenção do produto crude.

Para a hidrólise alcalina do α -hidroxi-acetato assim obtido, o produto crude foi dissolvido em etanol / clorofórmio (4 : 1) (20 ml), e tratado com solução aquosa de NaOH 16 % (1 ml) durante 2 h. Após adição de clorofórmio, as fases orgânicas combinadas foram lavadas com água, HCl 5% e solução saturada de NaCl e, por último, evaporadas à secura. O resíduo foi purificado por cromatografia *flash* (éter de petróleo / acetato de etilo 4 : 1), obtendo-se colestano-2 β ,3 β -diol puro (**4.1**, 270 mg, rendimento 58 %).

Colestano-2 β ,3 β -diol, 4.1

pf 173 - 175 °C, cristalizado de *n*-hexano (lit. 174 - 177^(Henbest e Smith, 1957) e 175 - 176^(Glotter e Schwartz, 1976) °C). RMN ¹H (CDCl₃) δ : 0,65 (3H, s, CH₃-18); 0,86 (6H, dois d, $J=6,6$ Hz, CH₃-26 e CH₃-27); 0,89 (3H, d, $J=6,5$ Hz, CH₃-21); 1,00 (3H, s, CH₃-19); 3,63 (1H, dt, $J= 4,6; 10,8$ Hz, H-3 α); 4,02 (1H, brq, H-2 α). RMN ¹³C δ : 72,42; 70,22; 56,41; 56,26; 55,24; 45,33; 43,17; 42,62; 40,03; 39,50; 36,16; 35,78; 35,23; 34,83; 32,54; 31,96; 28,34; 28,22; 27,99; 24,17; 23,81; 22,80; 22,55; 21,29; 18,64; 14,56; 12,09. IV (ATR): ν_{\max} 1049,1; 2850,3 - 2931,3; 3311,2 cm⁻¹.

4.5.4.2. Síntese de colestano-2 α ,3 α -diol (4.2)

A solução de $K_3Fe(CN)_6$ (1 g), Et_3N (7 μ l), K_2CO_3 (420 mg) e metanossulfonamida (96 mg) em 20 ml de *t*-BuOH / H_2O (3 : 2) foi preparada. O colestano-2-eno (**4.11**, 370 mg, 1 mmol), (secção 4.5.4.1) foi dissolvido em 30 ml THF / *t*-BuOH / H_2O (10 : 3 : 2) e adicionado à solução anterior. Então, adicionou-se 30 μ l da solução de OsO_4 (0,1 mg / μ l em CH_3CN) e a reacção foi agitada à temperatura ambiente até ao consumo total do material de partida (48 h). O sulfito de sódio a 5% foi adicionado e a mistura foi agitada por 5 h. Após a adição de éter dietílico, a fase orgânica foi lavada com HCl 5%, solução saturada de $NaHCO_3$ e solução saturada de NaCl, e finalmente, evaporada. O resíduo foi purificado por cromatografia *flash* (éter de petróleo / acetato de etilo 4 : 1), obtendo-se o colestano-2 α ,3 α -diol (**4.2**, 242 mg).

Colestano-2 α ,3 α -diol, **4.2**

pf 217 - 218 °C, cristalizado de *n*-hexano, (lit.^(Shoppee *et al.*, 1957) 216 - 219 °C). RMN 1H ($CDCl_3$) δ : 0,65 (3H, s, CH_3 -18); 0,80 (3H, s, CH_3 -19); 0,86 (6H, dois d, $J=6,6$ Hz, CH_3 -26 e CH_3 -27); 0,90 (3H, d, $J=6,6$ Hz, CH_3 -21); 3,77 (1H, br d, $J=11,0$ Hz 2 β -H); 3,96 (1H, br s, 3 β -H). RMN ^{13}C δ : 69,27; 69,12; 56,35; 56,16; 54,16; 42,55; 40,93; 39,90; 39,49; 38,14; 36,90; 36,13; 35,78; 34,76; 34,22; 31,82; 28,22; 28,00; 27,65; 24,17; 23,80; 22,81; 22,55; 20,90; 18,65; 12,40; 12,06. IV (ATR): ν_{max} 1048,7; 2852,2 - 2930,0; 3315,0 cm^{-1} .

4.5.4.3. Síntese de colestano-2 α ,3 β -diol (4.3)

O 5 α -colestano-3-ona (**4.12**; 769 mg, 2 mmol) foi adicionado a ácido acético glacial (60 ml) previamente aquecido a refluxo com anidrido acético (5 ml) durante 10 min. De seguida, adicionou-se, lentamente, tetracetato de chumbo (1,5 g; 3,4 mmol). A reacção foi aquecida a refluxo, com agitação magnética, até ao consumo do material de partida (24 h). Após o arrefecimento da mistura reaccional, adicionou-se éter dietílico e a fase orgânica foi lavada com HCl 5%, solução saturada de NaHCO₃ e solução saturada de NaCl. O produto crude foi purificado por cromatografia *flash* (éter de petróleo / acetato de etilo 5 : 1) obtendo-se o acetato de 3-oxocolestano-2 α -ilo puro (**4.13**; 710 mg, rendimento 80 %), como um pó branco amorfo.

Acetato de 3-oxocolestano-2 α -ilo, 4.13

pf 120 - 122 °C (lit.^(Williamson e Johnson, 1961) 124,7-125,2 °C). RMN ¹H δ : 0,67 (3H, s, CH₃-18); 0,85 – 0,91 (9H, CH₃-21, CH₃-26 e CH₃-27); 1,12 (3H, s, CH₃-19); 2,15 (3H, s, CH₃CO); 5,29 (1H, dd, *J*=6,6 e 12,9 Hz, H-2 β). RMN ¹³C δ : 204,3; 170,15; 74,46; 56,16; 56,06; 53,78; 47,84; 44,82; 43,57; 42,56; 39,71; 39,47; 37,18; 36,10; 35,74; 34,67; 31,56; 28,38; 28,20; 27,99; 24,16; 23,78; 22,80; 22,54; 21,60; 20,79; 18,63; 12,75; 12,04. IV (ATR): ν_{\max} 1222,7; 1727,9; 1750,1 cm⁻¹.

A uma solução de acetato de 3-oxo-colestano-2 α -ilo (**4.13**; 700 mg, 1,6 mmol) em THF / metanol 2 : 1, adicionou-se CeCl₃.7H₂O (745 mg, 2 mmol) e a mistura foi agitada durante 10 min à temperatura ambiente. De seguida, o NaBH₄ (120 mg, 3,2 mmol, 8 eq.) foi adicionado progressivamente ao meio reaccional. Após 30 min, a reacção estava completa (controlo por CCF) e adicionou-se HCl 5% gota-a-gota. A mistura foi vertida em água e extraída com éter dietílico. A solução orgânica foi lavada com HCl 5%, solução saturada de NaHCO₃ e solução saturada de NaCl, e, por fim, evaporada à secura, obtendo-se o acetato de 3 β -hidroxicolestano-2 α -ilo (**4.14**; 641 mg, rendimento 91 %), como um pó branco.

Acetato de 3 β -hidroxicolestano-2 α -ilo, **4.14**

pf 73 - 75 °C. RMN ¹H (CDCl₃) δ : 0,64 (3H, s, CH₃-18); 0,84 – 0,90 (12H, CH₃-19, CH₃-21, CH₃-26, CH₃-27); 2,08 (3H, s, CH₃CO); 3,59 (1H, ddd, J = 5,4; 9,5 e 11,1 Hz, H-3 α); 4,82 (1H, ddd, J = 4,8; 9,4 e 11,6 Hz, H-2 β). RMN ¹³C δ : 171,59; 76,49; 73,53; 56,28; 56,17; 54,17; 44,43; 42,52; 42,12; 39,81; 39,47; 37,27; 36,11; 35,89; 35,73; 34,70; 31,79; 28,19; 27,97; 27,77; 24,15; 23,77; 22,79; 22,53; 21,38; 18,63; 13,09; 12,02.

O acetato de 3 β -hidroxicolestano-2 α -ilo (**4.14**; 500 mg, 1,12 mmol) foi tratado com NaOH como se descreve na secção 4.5.4.1. O produto crude foi purificado por cromatografia *flash* (éter de petróleo / acetato de etilo 4 : 1), obtendo-se colestano-2 α ,3 β -diol (**4.3**, 370 mg, rendimento 82 %).

Colestano-2 α ,3 β -diol, 4.3

pf 196,0 - 197,5 °C, cristalizado de metanol (lit.^(Shoppee *et al.*, 1957) 204 °C) RMN ¹H (CDCl₃) δ : 0,64 (3H, s, CH₃-18); 0,84 – 0,91 (12H, CH₃-19, CH₃-21, CH₃-26, CH₃-27); 3,40 (1H, ddd, J = 5,1, 8,9 e 10,9 Hz, H-3 α); 3,59 (1H, ddd, J = 4,7; 9,0 e 11,5 Hz, H-2 β). RMN ¹³C δ : 73,11; 72,3; 56,30; 56,20; 54,26; 45,03; 44,83; 39,89; 39,48; 38,14; 37,46; 36,13; 35,77; 35,57; 34,73; 31,88; 28,23; 28,00; 27,91; 24,17; 23,80; 22,81; 22,55; 21,36; 18,64; 13,50; 12,04. IV (ATR): ν_{\max} 1051,0; 2850,1 - 2930,3; 3312,9 cm⁻¹.

4.5.4.4. Síntese de colestano-2 β ,3 α -diol (4.4)

A mistura de colestano-2-eno (**4.11**; 400 mg; 1,1 mmol), CHCl₃ (15 ml) e *m*-CPBA (400 mg; 2,3 mmol) foi agitada à temperatura ambiente. Após o desaparecimento do material de partida (24 h), a mistura reaccional foi vertida em água e extraída com CH₂Cl₂. A fase orgânica foi lavada com sulfito de sódio 5%, água e solução saturada de NaCl, seca com MgSO₄ e evaporada a pressão reduzida, obtendo-se 2 α ,3 α -epoxicolestano (**4.15**; 395 mg, rendimento 93 %).

2 α ,3 α -Epoxicolestano, 4.15

RMN ¹H (CDCl₃) δ : 0,64 (3H, s, CH₃-18); 0,75 (3H, s, CH₃-19); 0,86 (6H, dois d, J =6,6 Hz, CH₃-26 e CH₃-27); 0,90 (3H, d, J =6,5 Hz, CH₃-21); 3,14 (2H, m, H-2 β e H-3 β).

A abertura do epóxido em meio ácido foi efectuada de acordo com um procedimento conhecido (Rowland e Nace, 1960; Fieser e Rajagopalan, 1949). A uma solução de 2 α ,3 α -epoxicolestano (**4.15**; 374 mg; 0,9 mmol) em acetona (30 ml), foi adicionado ácido periódico (350 mg) em acetona / água (1 : 1,5 ml) e a mistura foi aquecida a refluxo durante 5 min, concentrada até 1/3 do volume inicial e deixada à temperatura ambiente durante 30 min. Esta mistura foi novamente aquecida a refluxo enquanto se adicionou água gota-a-gota (2 ml) durante 30 min. Finalmente, a mistura foi arrefecida, concentrada sob vácuo e purificada por cromatografia *flash* (éter de petróleo / acetato de etilo 4 : 1), obtendo-se colestano-2 β ,3 α -diol (**4.4**, 309 mg, rendimento 85 %).

Colestano-2 β ,3 α -diol, 4.4

pf 183 - 185 °C, cristalizado de metanol (lit. 178 – 180^(Roccatagliata *et al.*, 1998) e 197 – 200^(Henbest e Smith, 1957) °C). RMN ¹H (CDCl₃) δ : 0,65 (3H, s, CH₃-18); 0,86 (6H, dois d, $J=6,6$ Hz, CH₃-26 e CH₃-27); 0,90 (3H, d, $J=6,5$ Hz, CH₃-21); 0,99 (3H, s, CH₃-19); 3,87 (2H, m, H-2 α e H-3 β). RMN ¹³C δ : 71,82; 70,61; 56,41; 56,19; 55,10; 42,60; 40,54; 40,01; 39,49; 38,93; 36,14; 35,78; 35,73; 34,88; 31,90; 31,71; 28,20; 28,01; 24,13; 23,80; 22,82; 22,55; 20,86; 18,64; 14,59; 12,10. IV (ATR): ν_{\max} 1047,9; 2843,2 - 2930,9, 3310,1 cm⁻¹.

4.5.4.5. Síntese de androstano-3 β ,4 β ,17 β -triol (4.5)

De acordo com o procedimento de Salvador *et al.* (1993b), a mistura de acetato de testosterona (**4.16**; 660 mg, 2 mmol), ácido acético glacial (30 ml) e zinco em pó (5 g) foi agitada à temperatura ambiente. Após o desaparecimento do material de partida (5 h), adicionou-se éter dietílico e a suspensão foi filtrada por um filtro de celite. O filtrado foi parcialmente evaporado sob pressão reduzida, para remover o ácido acético e, de seguida, dissolvido em éter dietílico e lavado com água, solução saturada de NaHCO₃ e solução saturada de NaCl. Após secagem com MgSO₄, a fase orgânica foi evaporada, obtendo-se uma mistura epimérica de acetato de 5 α - e 5 β -androsta-3-eno-17 β -ilo (595 mg, rendimento 94 %).

Acetato de 5 α - e 5 β -androsta-3-eno-17 β -ilo

RMN ¹H (CDCl₃) δ : 0,78 (3H, s, 18-CH₃), 0,80 e 0,96 (3H, dois s, 19-CH₃), 2,03 (3H, s, CH₃CO), 4,56 (1H, m, H-17 α), 5,29 (1H, dq, H-4), 5,54 e 5,66 (1H, dois m, H-3). A relação epimérica 5 α - e 5 β -, foi avaliada por RMN ¹H, concretamente, pela integração dos multipletos devidos a H-3 (Salvador *et al.*, 1993b) observando-se uma relação α/β de 0,8 : 1. Após 3 cristalizações sequenciais de *n*-hexano, obteve-se o acetato de 5 α -androsta-3-eno-17 β -ilo epimericamente puro (**4.17**).

O acetato de 5 α -androsta-3-eno-17 β -ilo (**4.17**; 200 mg, 0,63 mmol) reagiu com I₂/Cu(OAc)₂, o produto obtido foi tratado com NaOH (secção 4.5.4.1) e purificado por

cromatografia *flash* (éter de petróleo / acetato de etilo 1 : 2), obtendo-se androstano-3 β ,4 β ,17 β -triol (**4.5**, 95 mg), como um pó branco amorfo.

Androstano-3 β ,4 β ,17 β -triol, **4.5**

pf 257 - 260 °C (lit.^(Tömörkény *et al.*, 1975) 263 - 265 °C). RMN ¹H (CDCl₃ / CD₃OD) δ : 0,72 (3H, s, CH₃-18); 1,04 (3H, s, CH₃-19); 3,50 (1H, m, H-3 α); 3,57 (1H, t, $J=8,6$ Hz, H-17 α); 3,68 (1H, br t, $J=2,30$ Hz, H-4 α). RMN ¹³C δ : 81,89; 75,12; 72,67; 56,03; 51,64; 43,42; 37,66; 37,17; 36,12; 36,05; 32,54; 30,09; 26,34; 25,80; 23,79; 20,69; 14,98; 11,42. IV (ATR): ν_{\max} 1064,6; 2845,5 - 2934,2; 3308,3 cm⁻¹.

4.5.4.6. Síntese de androstano-3 α ,4 α ,17 β -triol (4.6)

O acetato de 5 α -androsta-3-eno-17 β -ilo (**4.17**; 200 mg; 0,63 mmol) (Secção 4.5.4.5) foi oxidado com OsO₄ (secção 4.5.4.3). O produto foi tratado com NaOH (secção 4.5.4.1) e purificado por cromatografia *flash* (éter de petróleo / acetato de etilo 1 : 2), obtendo-se o androstano-3 α ,4 α ,17 β -triol (**4.6**; 110,6 mg; rendimento 57 %).

Androstano-3 α ,4 α ,17 β -triol, **4.6**

RMN ¹H (CDCl₃/CD₃OD) δ : 0,72 (3H, s, CH₃-18); 0,85 (3H, s, CH₃-19); 3,45 (1H, d, $J=10,2$ Hz, H-4 β); 3,6 (1H, t, $J=8,5$ Hz, H-17 α); 3,97 (1H, s, H-3 β). RMN ¹³C δ : 82,40; 73,56; 70,14; 54,19; 50,76; 42,52; 37,50; 37,11; 36,89; 34,90; 31,76; 31,10;

23,47; 22,58; 21,20; 20,30; 12,70; 11,49. IV (ATR): v_{\max} 1065,0; 2846,1 - 2933,3; 3307,8 cm^{-1} .

4.5.4.7. Síntese de androstano-3 β ,4 α ,17 β -triol (4.7)

A testosterona (**4.18**; 288,4 mg; 1 mmol) foi dissolvida em THF (10 ml) e arrefecida a 0 °C. Então, uma solução de BH_3 em THF (1,0 M; 5 ml) foi adicionada lentamente. A mistura foi agitada durante 3 h, voltando, ao longo de 2,5 h, à temperatura ambiente. De seguida, a reacção foi terminada com a adição de uma solução aquosa de NaOH 10 N (2 ml), seguida de adição lenta de H_2O_2 30 % (2 ml). Esta mistura foi agitada durante a noite, vertida em água e extraída com éter dietílico. As fases orgânicas combinadas foram lavadas com HCl 5%, solução saturada de NaHCO_3 e solução saturada de NaCl. Após secagem com MgSO_4 , o solvente foi evaporado a pressão reduzida e o resíduo purificado por cromatografia *flash* (éter de petróleo / acetato de etilo 1 : 2), obtendo-se androstano-3 β ,4 α ,17 β -triol (**4.7**, 246 mg, rendimento 80 %).

Androstano-3 β ,4 α ,17 β -triol, 4.7

pf 253,3-255,8 °C, cristalizado de metanol (lit. 248-250^(Nakata, 1965) e 258-259^(Tömörkény *et al.*, 1975) °C). RMN ^1H ($\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$) δ : 0,72 (3H, s, CH_3 -18); 0,85 (3H, s, CH_3 -19); 3,20 (1H, t, $J=8,7$ Hz, H-4 β); 3,29 (1H, m, H-3 α); 3,59 (1H, t, $J=8,5$ Hz, H-17 α). RMN ^{13}C δ : 81,87; 76,52; 75,53; 55,24; 51,53; 51,48; 43,38; 37,75;

37,23; 36,85; 35,68; 31,76; 30,13; 28,78; 23,77; 23,10; 21,10; 13,89; 11,47. IV (ATR): ν_{\max} 1066,0; 2847,5 - 2932,0; 3309,1 cm^{-1} .

4.5.4.8. Síntese de androstano-3 α ,4 β ,17 β -triol (4.8)

O acetato de 5 α -androsta-3-eno-17 β -ilo (4.17; 290 mg; 0,92 mmol) obtido como se descreve acima reagiu com o *m*-CPBA. O produto obtido (4.19) foi tratado com ácido periódico, desacetilado com NaOH (Secção 4.5.4.1) e purificado por cromatografia *flash* (éter de petróleo / acetato de etilo 1 : 2), obtendo-se androstano-3 α ,4 β ,17 β -triol (4.8, 142 mg).

Androstano-3 α ,4 β ,17 β -triol, 4.8

pf 263-264,3 °C, cristalizado de metanol. RMN ^1H (CDCl_3 / CD_3OD) δ : 0,71 (3H, s, CH_3 -18); 1,03 (3H, s, CH_3 -19); 3,49 (1H, br s, H-4 α); 3,55 (1H, t, $J=8,6$ Hz, H-17 α); 3,75 (1H, br q, $J=2,6$ Hz, H-3 β). RMN ^{13}C δ : 82,54; 76,56; 71,24; 56,94; 52,51; 45,24; 44,08; 37,99; 37,09; 36,96; 33,32; 33,21; 30,61; 26,60; 25,11; 24,31; 20,97; 14,85; 11,67. IV (ATR): ν_{\max} 1064,9; 2849,8 - 2935,1; 3309,5 cm^{-1} . FD-MS m/z = 308,2386 (100 %, M^+); 309,2424 (27 %, $\text{M}^+ + 1$); 290,2237 (17 %, $\text{M}^+ - \text{H}_2\text{O}$).

4.5.4.9. Síntese de colestano-3 β ,4 α -diol (4.9)

A hidroboração do colestano-4-eno-3-ona (384 mg, 1 mmol), seguida de tratamento com H₂O₂ / NaOH nas condições descritas anteriormente (Secção 4.5.4.1) conduziu à obtenção do colestano-3 β ,4 α -diol (4.9, 352 mg, rendimento 87 %).

Colestano-3 β ,4 α -diol, 4.9

pf 235-237 °C, cristalizado de *n*-hexano (lit.^(Fieser e Stevenson, 1954) 237 °C). RMN ¹H (CDCl₃) δ : 0,616 (3H, s, CH₃-18); 0,79 – 0,87 (12H, CH₃-19, CH₃-21, CH₃-26, CH₃-27); 3,18 (1H, t, *J*=10,2 Hz, H-4 β); 3,29 (1H, m, H-3 α). RMN ¹³C δ : 76,24; 75,25; 56,54; 56,37; 54,6; 50,86; 42,63; 40,08; 39,62; 37,28; 36,36; 36,27; 35,92; 35,16; 31,74; 28,37; 28,26; 28,11; 24,28; 23,93; 22,83; 22,78; 22,58; 21,08; 18,70; 13,58; 12,11. IV (ATR): ν_{\max} 1047,1; 2851,2 – 2930,2; 3315,0 cm⁻¹.

4.5.5. Acilação enzimática de dióis vicinais 2,3 e 3,4

Num ensaio de rastreio típico, a solução de substrato (2 mg), em 0,9 ml de solvente (tolueno para os dióis da série colestano ou acetona / THF para os dióis da série androstano) e acetato de vinilo (0,1 ml) foi preparada. Esta solução foi adicionada à enzima (30 mg de enzimas crude, 10 mg de Lipozyme IM 20 ou 5 mg de Novozym 435) em frascos de 3 ml, os quais foram fechados e colocados num agitador orbital a 250 rpm e 45 °C. A evolução das reacções foi seguida por CCF.

4.5.5.1. Síntese de acetato de 2β-hidroxicolestano-3β-ilo (4.1a).

A uma solução de colestano-2β,3β-diol (**4.1**; 25 mg; 0,062 mmol) em tolueno (8 ml) e acetato de vinilo (2 ml), a lipase de *Candida rugosa* (100 mg) foi adicionada e a reacção foi agitada a 250 rpm, a 45 °C. Após 24 h, a reacção estava completa. A enzima foi filtrada e o solvente evaporado. Por fim, o resíduo foi purificado por cromatografia *flash* (éter de petróleo / acetato de etilo 5 : 1) obtendo-se o acetato de 2β-hidroxicolestano-3β-ilo (**4.1a**, 22 mg, rendimento 80 %).

Acetato de 2β-hidroxicolestano-3β-ilo, **4.1a**

pf 147-148 °C, cristalizado de metanol (lit.^(Glotter e Schwartz, 1976) 154 °C). RMN ¹H (CDCl₃) δ: 0,65 (3H, s, CH₃-18); 0,86 (6H, dois d, *J*=6,5 Hz, CH₃-26 e CH₃-27); 0,89 (3H, d, *J*=6,5 Hz, CH₃-21); 1,03 (3H, s, CH₃-19); 2,08 (3H, s, CH₃CO); 4,09 (1H, br q, *J*= 2,6 Hz, H-2α); 4,78 (1 H, ddd, *J*= 3,34, 4,71, 11,75 Hz, H-3α). RMN ¹³C δ: 170,13; 75,58; 68,72; 56,30; 56,19; 55,15; 45,40; 42,90; 42,59; 39,95; 39,47; 36,12; 35,76; 35,30; 34,77; 31,86; 28,58; 28,20; 28,13; 27,98; 24,13; 23,79; 22,80; 22,54; 21,34; 21,22; 18,62; 14,51; 12,07. IV (ATR): ν_{max} 1025,1; 1259,3; 1721,8; 2858,0 - 2950,2; 3510,8 cm⁻¹. FD-MS *m/z* = 386,3462 (100 %, M⁺ - CH₃COOH); 447,3828 (83 %, M⁺ + 1); 404,3776 (67 %, M⁺ + 1 - CH₃CO); 448,3870 (25 %, M⁺ + 2); 61,0324 (8 %, CH₃COOH + 1).

4.5.5.2. Síntese de acetato de 2 α -hidroxicolestano-3 α -ilo (4.2a)

A uma solução de colestano-2 α ,3 α -diol (**4.2**; 40 mg; 0,1 mmol) em tolueno (8 ml) e acetato de vinilo (1 ml), adicionou-se Novozym 435 (80 mg) e a mistura reaccional foi agitada durante 2 dias, nas condições descritas acima. No final, a reacção foi tratada como se descreve acima e o produto foi purificado por cromatografia *flash*, obtendo-se acetato de 2 α -hidroxicolestano-3 α -ilo (**4.2a**, 33 mg, rendimento 75 %).

Acetato de 2 α -hidroxicolestano-3 α -ilo, 4.2a

pf 163-164 °C, cristalizado de metanol. RMN ¹H (CDCl₃) δ : 0,65 (3H, s, CH₃-18); 0,82 (3H, s, CH₃-19); 0,87 (6H, dois d, $J=6,5$ Hz, CH₃-26 e CH₃-27); 0,90 (3H, d, $J=6,5$ Hz, CH₃-21); 2,12 (3H, s, CH₃CO); 3,84 (1H, dt, $J= 4,2$ e 11,4 Hz, H-2 β); 5,12 (1H, br q, $J= 2,6$ Hz, H-3 β). RMN ¹³C δ : 171,58; 73,03; 68,11; 56,33; 56,23; 54,14; 42,57; 41,70; 39,88; 39,47; 39,29; 36,74; 36,13; 35,78; 34,71; 32,21; 31,77; 28,23; 27,99; 27,45; 24,16; 23,83; 22,81; 22,54; 21,38; 20,89; 18,63; 12,55; 12,04. IV (ATR): ν_{\max} 1027,4; 1259,8; 1714,7; 2859,0 - 2952,5; 3516,3 cm⁻¹. FI-MS m/z = 446,3828 (100 %, M⁺); 386,3293 (91 %, M⁺ - CH₃COOH); 447,3842 (29 %, M⁺ + 1); 387,3349 (23 %, M⁺ + 1 - CH₃COOH).

4.5.5.3. Síntese de acetato de 2 α -hidroxicolestano-3 β -ilo (4.3a)

A uma solução de colestano-2 α ,3 β -diol (**4.3**; 50 mg; 0,124 mmol) em tolueno (8 ml) e acetato de vinilo (1 ml), adicionou-se a lipase de *Pseudomonas cepacia* (100 mg) e a mistura reaccional foi agitada durante 24 h, nas condições descritas acima. No final, a reacção foi tratada como se descreve acima e o produto foi purificado por cromatografia *flash*, obtendo-se acetato de 2 α -hidroxicolestano-3 β -ilo (**4.3a**, 48 mg, 87 %) como um pó branco. Os factores de retenção em CCF do produto **4.3a** e do acetato de 3 β -hidroxicolestano-2 α -ilo **4.14** (obtido na Secção 4.5.4.3) usando éter de petróleo / acetato de etilo (2 : 1) como eluentes foram 0,47 e 0,39 respectivamente. Os pontos de fusão dos dois compostos são igualmente diferentes.

2 α -Hidroxicolestano-3 β -ilo, 4.3a

pf 157-159 °C. RMN ¹H (CDCl₃) δ : 0,65 (3H, s, CH₃-18); 0,84 – 0,90 (12H, CH₃-19, CH₃-21, CH₃-26, CH₃-27); 2,08 (3H, s, CH₃CO); 3,77 (1H, ddd, J = 4,8, 9,5 e 11,5 Hz, H-2 β); 4,59 (1H, ddd, J = 5,4, 9,5 e 10,9 Hz, H-3 α). RMN ¹³C δ : 171,37; 78,99; 69,85; 56,13; 56,09; 54,03; 45,28; 44,34; 42,46; 39,75; 39,39; 36,81; 36,03; 35,68; 34,62; 32,53; 31,69; 30,82; 28,13; 27,90; 27,63; 24,08; 23,70; 22,70; 22,44; 21,25; 18,54; 13,17; 11,94. IV (ATR): ν_{\max} 1025,9; 1259,8; 1718,8; 2857,0 – 2951,3; 3512,1 cm⁻¹. FI-MS m/z = 386,3553 (100 %, M⁺ - CH₃COOH); 446,3842 (54 %, M⁺); 387,3591 (35 %, M⁺ + 1 - CH₃COOH); 447,3853 (33 %, M⁺ + 1); 61,0251 (1 %, CH₃COOH + 1).

4.5.5.4. Síntese de acetato de 2β-hidroxicolestano-3α-ilo (4.4a)

A uma solução de colestano-2β,3α-diol (**4.4**; 50 mg; 0,124 mmol) em tolueno (10 ml) e acetato de vinilo (1 ml), adicionou-se e Novozym 435 (80 mg) e a mistura reaccional foi agitada durante 3 dias, nas condições descritas. No final, a reacção foi tratada como se descreve acima e o produto foi purificado por cromatografia *flash*, obtendo-se acetato de 2β-hidroxicolestano-3α-ilo puro (**4.4a**; 47,6 mg; rendimento 86 %).

Acetato de 2β-hidroxicolestano-3α-ilo, 4.4a

pf 110-111 °C (lit. ^(Garrido Santos *et al.*, 2003) 106-107 °C). RMN ¹H (CDCl₃) δ: 0,65 (3H, s, CH₃-18); 0,86 (6H, dois d, *J*=6,6 Hz, CH₃-26 e CH₃-27); 0,90 (3H, d, *J*=6,5 Hz, CH₃-21); 0,99 (3H, s, CH₃-19); 2,07 (3H, s, CH₃CO); 3,88 (1H, br s, H-2α); 4,82 (1H, br s, H-3β). RMN ¹³C δ: 170,52; 72,92; 68,65; 56,43; 56,25; 54,97; 42,58; 40,46; 39,99; 39,89; 39,46; 36,13; 35,77; 35,34; 34,81; 31,85; 28,66; 28,21; 27,97; 24,11; 23,83; 22,80; 22,53; 21,40; 20,81; 18,62; 14,18; 12,06. IV (ATR): ν_{max} 1033,1; 1261,2; 1714,2; 2860,1 – 2953,8; 3500,3 cm⁻¹.

4.5.5.5. Síntese de acetato de 3 α -hidroxicolestano-2 β -ilo (4.4b)

A uma solução de colestano-2 β ,3 α -diol (**4.4**; 50 mg; 0,124 mmol) em tolueno (9 ml) e acetato de vinilo (1 ml), adicionou-se a lipase de *Pseudomonas cepacia* (200 mg) e a mistura reaccional foi agitada durante 3 dias, nas condições já descritas. No final, a reacção foi tratada como se descreve acima e o produto foi purificado por cromatografia *flash* obtendo-se o acetato de 3 α -hidroxicolestano-2 β -ilo como um único produto (**4.4b**, 37 mg, rendimento 67 %),

Acetato de 3 α -hidroxicolestano-2 β -ilo, **4.4b**

pf 115,7-116,2 °C (lit. 85-86^(Garrido Santos *et al.*, 2003) e 113^(Williamson e Johnson, 1961) °C).
 RMN ¹H (CDCl₃) δ : 0,64 (3H, s, CH₃-18); 0,86 (6H, dois d, $J=6,6$ Hz, CH₃-26 e CH₃-27); 0,89 (3H, d, $J=5,3$ Hz, CH₃-21); 0,90 (3H, s, CH₃-19); 2,04 (3H, s, CH₃CO); 3,84 (1H, br q, $J=2,3$ Hz, H-3 β); 4,87 (1H, br q, H-2 α). RMN ¹³C δ : 170,30; 73,15; 67,59; 56,35; 56,17; 54,85; 42,55; 39,92; 39,48; 38,52; 37,10; 36,12; 35,77; 35,56; 34,94; 31,84; 31,74; 28,19; 28,11; 27,99; 24,12; 23,81; 22,80; 22,54; 21,44; 20,20; 18,63; 13,64; 12,06. IV (ATR): ν_{\max} 1034,5; 1263,2; 1716,4; 2862,8 – 2928,4; 3481,8 cm⁻¹.

4.5.5.6. Síntese de acetato de 4 β ,17 β -di-hidroxi-androstano-3 β -ilo (4.5a)

A uma solução de androstano-3 β ,4 β ,17 β -triol (**4.5**; 35 mg; 0,114 mmol) em tolueno (5 ml), THF (5 ml) e acetato de vinilo (1 ml), adicionou-se a lipase de *Candida rugosa* (100 mg) e a mistura reaccional foi agitada durante 3 dias, nas condições descritas. No final, a reacção foi tratada e o produto foi purificado por cromatografia *flash* (éter de petróleo / acetato de etilo, 2 : 1) obtendo-se o acetato de 4 β ,17 β -di-hidroxi-androstano-3 β -ilo (**4.5a**; 29,3 mg; rendimento 74 %).

Acetato de 4 β ,17 β -di-hidroxi-androstano-3 β -ilo, 4.5a

RMN ^1H (CDCl_3) δ : 0,73 (3H, s, CH_3 -18); 1,06 (3H, s, CH_3 -19); 2,09 (3H, s, CH_3CO); 3,63 (1H, t, $J=8,7$ Hz, H-17 α); 3,83 (1H, br t, H-4 α); 4,72 (1H, ddd, $J=3,2, 4,8$ e $8,0$ Hz, H-3 α). RMN ^{13}C δ : 170,27; 81,87; 75,53; 72,88; 55,29; 50,98; 48,71; 42,93; 36,85; 36,54; 35,61; 35,44; 31,82; 30,45; 25,55; 23,34; 22,13; 21,34; 20,11; 14,71; 11,11. IV (ATR): ν_{max} 1041,5; 1258,2; 1709,3; 2840,9 – 2943,0; 3442,0 e 3530,1 cm^{-1} . FD-MS m/z = 351,2470 (100 %, $\text{M}^+ + 1$); 290,2104 (78 %, $\text{M}^+ - \text{CH}_3\text{COOH}$); 350,2468 (37 %, M^+).

4.5.5.7. Síntese de acetato de 3 α ,17 β -di-hidroxi-androstano-4 α -ilo (4.6a)

A uma solução de androstano-3 α ,4 α ,17 β -triol (**4.6**; 118 mg; 0,38 mmol) em acetona (18 ml), THF (4 ml) e acetato de vinilo (2 ml), adicionou-se a lipase de *Pseudomonas cepacia* (500 mg) e a mistura reaccional foi agitada durante 4 dias, nas condições descritas. No final, a reacção foi tratada e o produto foi purificado por cromatografia *flash*, obtendo-se o acetato de 3 α ,17 β -di-hidroxi-androstano-4 α -ilo (**4.6a**; 102,3 mg; rendimento 76 %) como um pó branco.

Acetato de 3 α ,17 β -di-hidroxi-androstano-4 α -ilo, **4.6a**

RMN ^1H (CDCl_3) δ : 0,72 (3H, s, CH_3 -18); 0,87 (3H, s, CH_3 -19); 2,09 (3H, s, CH_3CO); 3,64 (1H, t, $J=8,5$ Hz, H-17 α); 4,01 (1H, q, $J=2,9$ e 2,7 Hz, H-3 β); 4,85 (1H, dd, $J=11,8$ e 2,9 Hz, H-4 β). RMN ^{13}C δ : 171,24; 82,76; 75,20; 67,58; 54,11; 50,67; 42,83; 42,48; 37,68; 36,80; 34,79; 31,14; 30,84; 27,48; 26,75; 23,41; 22,42; 21,13; 20,27; 12,82; 11,51. IV (ATR): ν_{max} 1039,2; 1265,1; 1710,7; 2841,6; 3445,7 e 3528,1 cm^{-1} . FI-MS m/z = 308,2328 (100 %, $\text{M}^+ + 1 - \text{CH}_3\text{CO}$); 290,2052 (71 %, $\text{M}^+ - \text{CH}_3\text{COOH}$); 350,2441 (62 %, M^+); 332,2306 (26 %, $\text{M}^+ - \text{H}_2\text{O}$); 351,2468 (12 %, $\text{M}^+ + 1$).

4.5.5.8. Síntese de acetato de 4 α ,17 β -di-hidroxi-androstano-3 β -ilo (4.7a)

A uma solução de androstano-3 β ,4 α ,17 β -triol (**4.7**; 30 mg; 0,1 mmol) em acetona (6 ml), THF (3 ml) e acetato de vinilo (1 ml), adicionou-se a lipase de *Chromobacterium viscosum* (200 mg) e a mistura reaccional foi agitada durante 3 dias, nas condições descritas. No final, a reacção foi tratada e o produto foi purificado por cromatografia *flash*, obtendo-se o acetato de 4 α ,17 β -dihidroxi-androstano-3 β -ilo (**4.7a**; 20,2 mg; rendimento 60 %).

Acetato de 4 α ,17 β -di-hidroxi-androstano-3 β -ilo, 4.7a

pf 182-184 °C, cristalizado de metanol. RMN ¹H (CDCl₃) δ : 0,73 (3H, s, CH₃-18); 0,86 (3H, s, CH₃-19); 2,09 (3H, s, CH₃CO); 3,46 (1H, t, $J=9,5$ Hz, H-4 β); 3,64 (1H, t, $J=8,5$ Hz, H-17 α); 4,58 (1H, ddd, $J=5,4, 9,2$ e $11,6$ Hz, H-3 α). RMN ¹³C δ : 171,51; 81,85; 79,23; 72,48; 54,32; 51,29; 50,83; 42,88; 36,58; 36,01; 35,05; 31,00; 30,50; 25,62; 23,32; 22,48; 21,37; 20,54; 15,26; 13,51; 11,11. IV (ATR): ν_{\max} 1035,6; 1262,2; 1707,7; 2841,6 - 2940,9; 3443,3 e 3522,3 cm⁻¹. FI-MS m/z = 290,2061 (100 %, M⁺ - CH₃COOH); 350,2541 (39 %, M⁺); 291,2042 (12 %, M⁺ + 1 - CH₃COOH).

4.5.5.9. Síntese de acetato de 4 α -hidroxicolestano-3 β -ilo (4.9a)

A uma solução de colestano-3 β ,4 α -diol (**4.9**; 50 mg; 0,124 mmol) em acetona (9 ml) e acetato de vinilo (1 ml), adicionou-se a lipase de *Chromobacterium viscosum* (500 mg) e a mistura reaccional foi agitada nas condições descritas acima durante 6 dias. No final, o produto foi isolado e purificado por cromatografia *flash*, obtendo-se acetato de 4 α -hidroxicolestano-3 β -ilo (**4.9a**; 42,3 mg; rendimento 76 %).

Acetato de 4 α -hidroxicolestano-3 β -ilo, **4.9a**

pf 169-170 °C. RMN ^1H (CDCl_3) δ : 0,65 (3H, s, CH_3 -18); 0,84 – 0,91 (12H, CH_3 -19, CH_3 -21, CH_3 -26, CH_3 -27); 2,08 (3H, s, CH_3CO); 3,45 (1H, t, $J=9,7$ Hz, H-4 β); 4,57 (1H, ddd, $J=5,3, 9,1$ e $11,5$ Hz, H-3 α). RMN ^{13}C δ : 171,49; 79,24; 72,47; 56,30; 56,18; 54,21; 51,23; 42,45; 39,85; 39,46; 36,83; 36,10; 35,96; 35,76; 34,97; 31,44; 28,22; 27,97; 25,65; 24,12; 23,80; 22,79; 22,60; 21,53; 21,36; 20,94; 18,61; 13,46; 12,01. IV (ATR): ν_{max} 1036,6; 1263,2; 1715,4; 2860,9 - 2930,2; 3549,3 cm^{-1} . FI-MS m/z = 386,3400 (100 %, M^+ - CH_3COOH); 446,3787 (33 %, M^+); 387,3417 (27 %, M^+ + 1 - CH_3COOH); 447,3893 (13 %, M^+ + 1).

Conclusões Gerais

Conclusões Gerais

Nos estudos desenvolvidos, foi possível efectuar transformações enzimáticas estereo-selectivas e regio-selectivas em cianidrinas, em 5,6-epoxi-esteróides 3 β -substituídos e em dióis vicinais como substratos com potencial interesse na síntese de esteróides bioactivos.

A versatilidade sintética das cianidrinas e a sua potencial aplicação na extensão e funcionalização estereo-selectiva da cadeia lateral de esteróides motivou o estudo, por metodologias enzimáticas e químicas, da síntese selectiva de cianidrinas nas posições 20 e 22 de derivados de pregnanos.

A síntese assimétrica enzimática de cianidrinas, através do uso de oxinitrilases como catalisadores, deu resultados pouco satisfatórios. A resolução cinética enzimática de uma mistura racémica obtida da hidrocianação química de um derivado 20 β -carbaldeído provou ser uma boa alternativa à primeira abordagem, permitindo a obtenção de cianidrinas epimericamente enriquecidas por acilação diastereo-selectiva catalisada pela protease subtilisina.

A síntese química, diastereo-selectiva, de cianidrinas na cadeia lateral de pregnanos foi investigada como complemento aos resultados obtidos com os processos enzimáticos. Diferentes grupos carbonilo na cadeia lateral de esteróides reagiram facilmente com o TMSCN na presença de um catalisador conveniente. No entanto, a químio- e estereo-selectividade da adição mostrou-se dependente do tipo de grupo carbonilo presente. Os substratos do tipo 20-ceto-pregnanos saturados foram

convertidos exclusivamente nas correspondentes (*R*)-cianidrinas sem necessidade de um catalisador quiral devido à capacidade de indução assimétrica do substrato. Assim, neste estudo apresentámos uma metodologia estereo-específica para a construção da cadeia lateral de esteróides baseada na adição de TMSCN a 20-ceto-pregnanos saturados.

Além disso, a importância do grupo funcional 5,6-epóxido levou-nos a investigar a discriminação enzimática dos epímeros 5 α ,6 α - e 5 β ,6 β - através de reacções estereo-selectivas na posição 3 da estrutura esteróide.

Especificamente, demonstrámos que os 5 α ,6 α -epóxidos diastereomericamente puros podem ser obtidos explorando a elevada selectividade da lipase isolada da *Candida antarctica*, Novozym 435, para os 5 β ,6 β -epóxidos minoritários presentes nas misturas epiméricas. O estudo de um conjunto de lipases comerciais indicou que as lipases de *Candida rugosa* têm uma selectividade oposta à Novozym 435, permitindo o isolamento de β -epóxidos diastereomericamente puros por meio da alcoólise enzimática dos α -epóxidos minoritários. Considerando a dificuldade de obtenção de 5,6-epoxi-esteróides diastereomericamente puros, esta metodologia biocatalítica constitui um bom complemento aos processos químicos de epoxidação de esteróides.

Além disso, a desacetilação suave do grupo 3 β -acetoxilo em 5,6-epoxi-esteróides foi conseguida através da lipase de *Candida rugosa* como catalisador e água como nucleófilo.

Finalmente, o estudo da afinidade e selectividade de lipases comerciais para dióis vicinais no anel A de esteróides mostrou que a *trans*-esterificação enzimática permite o isolamento de derivados monoacilados com elevada regio-selectividade. Os resultados

obtidos com séries completas de 2,3- e 3,4-dióis mostram claramente que as lipases são capazes de diferenciar grupos hidroxilo vicinais localizados no anel A, sendo sensíveis à configuração dos diferentes dióis e permitindo a obtenção dos respectivos monoésteres com elevada regio-selectividade e bons rendimentos. Assim, considerando a presença de dióis vicinais de esteróides na Natureza, alguns dos quais mono-acilados, -glicosilados ou -sulfatados, estes resultados podem oferecer uma metodologia útil para a preparação destes compostos e, além disso, contribuem para um melhor conhecimento da afinidade das lipases para esteróides poli-hidroxilados.

Em conclusão, os resultados apresentados neste trabalho evidenciam as potencialidades da catálise enzimática na transformação estereo- e regio-selectiva de substratos esteróides e contribuem para o desenvolvimento de metodologias sintéticas concretas com utilidade no campo dos esteróides.

Bibliografia

Bibliografia

- Abernethy, G. S.; Wall, M. E. The effect of C-12 substitution on the reactivity of Δ^{16} -20-keto steroids toward 1,4-nucleophilic addition. *J. Org. Chem.*, **1969**, 34 (6), 1606-1614.
- Adamczak, M.; Hari Krishna, S. Strategies for improving enzymes for efficient biocatalysis, *Food Technol. Biotechnol.*, **2004**, 42 (4), 251-264.
- Akhtar, M.; Barton, D. H. R. Reactions at position 19 in the steroid nucleus. A convenient synthesis of 19-norsteroids. *J. Am. Chem. Soc.*, **1964**, 86, 1528-1536.
- Alfonso, I.; Gotor, V. Biocatalytic and biomimetic aminolysis reactions: useful tools for selective transformations on polyfunctional substrates. *Chem. Soc. Rev.*, **2004**, 33, 201-209.
- Almeida, M. C.; Ruivo, R.; Maia, C.; Freire, L.; Sampaio, T. C.; Barreiros, S. Novozym 435 activity in compressed gases. Water activity and temperature effects. *Enzyme Microb. Technol.*, **1998**, 22 (6), 494-499.
- Altreuter, D. H.; Dordick, J.; Clark, D. S. Nonaqueous biocatalytic synthesis of new cytotoxic doxorubicin derivatives: exploiting unexpected differences in the regioselectivity of salt-activated and solubilized subtilisin. *J. Am. Chem. Soc.*, **2002**, 124 (9), 1871-1876.
- Anastas, P. T.; Kirchoff, M. M. Origins, current status, and future challenges of green chemistry. *Acc. Chem. Res.*, **2002**, 35 (9), 686-694.
- Angoli, M.; Barilli, A.; Lesma, G.; Passarella, D.; Riva, S.; Silvani, A.; Danieli, B. Remote stereocenter discrimination in the enzymatic resolution of piperidine-2-ethanol. Short enantioselective synthesis of sedamine and allosedamine. *J. Org. Chem.*, **2003**, 68 (24), 9525-9527.
- Anthonsen, T.; Sjørnsnes, B. J. Importance of water activity for enzyme catalysis in non-aqueous organic systems. Methods and Tools in Biosciences and Medicine. In *Methods in non-aqueous enzymology*, **2000**, Ed. M. N. Gupta, Birkhauser Verlag Basel, Switzerland, pp. 14-35.
- Aoki, S.; Yoshioka, Y.; Miyamoto, Y.; Higuchi, K.; Setiawan, A.; Murakami, N.; Chen, Z-S.; Sumizawa, T.; Akiyama, S-i.; Kobayashi, M. Agosterol A, a novel polyhydroxylated sterol acetate reversing multidrug resistance from a marine sponge of *Spongia* sp. *Tetrahedron Lett.*, **1998**, 39, 6303-6306.
- Aoki, S.; Setiawan, A.; Yoshioka, Y.; Higuchi, K.; Fudetani, R.; Chen, Z. S.; Sumizawa, T.; Akiyama, S.; Kobayashi, M. Reversal of multidrug resistance in human carcinoma cell line by agosterols, marine spongean sterols. *Tetrahedron*, **1999**, 55, 13965-13972.
- Aoki, S.; Naka, Y.; Itoh, T.; Furukawa, T.; Rachmat, R.; Akiyama, S.-I.; Kobayashi, M. Lembehsterols A and B, novel sulfated sterols inhibiting thymidine phosphorylase, from the marine sponge *Petrosia strongylata*. *Chem. Pharm. Bull.*, **2002**, 50 (6), 827-830.

- Arnold, F. H.; Glieder, A. Chemistry and biotechnology: a productive union meets new challenges. *Curr. Op. Biotech.*, **2003**, 14, 567-569.
- Baldessari, A.; Maier, M. S.; Gros, E. G. Enzymatic deacetylation of steroids bearing labile functions. *Tetrahedron Lett.*, **1995**, 36 (25), 4349-4352.
- Baldessari, A.; Brutomesso, A. C.; Gros, E. G. Lipase-catalysed regioselective deacetylation of androstane derivatives. *Helv. Chim. Acta*, **1996**, 79, 999-1004.
- Baleizão, C.; Gigante, B.; García, H.; Corma, A. Chiral vanadyl salen complex anchored on supports as recoverable catalysts for the enantioselective cyanosilylation of aldehydes. Comparison among silica, single wall carbon nanotube, activated carbon and imidazolium ion as support. *Tetrahedron*, **2004**, 60, 10461-10468.
- Balkenhohl, F.; Ditrich, K.; Hauer, B.; Ladner, W. Optisch aktive amine durch lipase-katalysierte methoxyacetylierung. *J. Prakt. Chem. Chemiker-Zeitung*, **1997**, 339 (1), 381-384.
- Bandini, M.; Cozzi, P. G.; Melchiorre, P.; Umani-Ronchi, A. Indium tribromide: a highly effective catalyst for the addition of trimethylsilyl cyanide to α -hetero-substituted ketones. *Tetrahedron Lett.*, **2001**, 42, 3041-3043.
- Bandini, M.; Cozzi, P. G.; Garelli, A.; Melchiorre, P.; Umani-Ronchi, A. A convenient catalytic procedure for the addition of trimethylsilyl cyanide to functionalised ketones, mediated by InBr_3 – Insight into the reaction mechanism. *Eur. J. Org. Chem.*, **2002**, 3243-3249.
- Baskaran, S.; Das, J.; Chandrasekaran, S. Heterogeneous permanganate oxidations: an improved procedure for the direct conversion of olefins to α -diketones/ α -hydroxy ketones. *J. Org. Chem.*, **1989**, 54 (21), 5182-5184.
- Bellezza, F.; Cipiciani, A.; Cruciani, G.; Fringuelli, F. The importance of ester and alkoxy type functionalities for the chemo- and enantio-recognition of substrates by hydrolysis with *Candida rugosa* lipase. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1*, **2000**, 4439-4444.
- Belokon, Y. N.; Caveda-Cepas, S.; Green, B.; Ikonnikov, N. S.; Khrustalev, V. N.; Larichev, V. S.; Moscalenko, M. A.; North, M.; Orizu, C.; Tararov, V. I.; Tasinazzo, M.; Timofeeva, G. I.; Yashkina, L. V. The asymmetric addition of trimethylsilyl cyanide to aldehydes catalyzed by chiral (salen) titanium complexes. *J. Am. Chem. Soc.*, **1999a**, 121 (16), 3968-3973.
- Belokon, Y. N.; Green, B.; Ikonnikov, N. S.; North, M.; Tararov, V. I. The asymmetric addition of trimethylsilyl cyanide to ketones catalyzed by a bimetallic chiral (salen) titanium complexes. *Tetrahedron Lett.*, **1999b**, 40, 8147-8150.
- Belokon, Y. N.; Green, B.; Ikonnikov, N. S.; North, M.; Parsons, T.; Tararov, V. I. Optimized catalysts for the asymmetric addition of trimethylsilyl cyanide to aldehydes and ketones. *Tetrahedron*, **2001**, 57, 771-779.

- Benjamin, S.; Pandey, A. *Candida rugosa* lipases: molecular biology and versatility in biotechnology. *Yeast*, **1998**, 14, 1069-1087.
- Bertinotti, A.; Carrea, G.; Ottolina, G.; Riva, S. Regioselective esterification of polyhydroxylated steroids by *Candida antarctica* lipase B. *Tetrahedron*, **1994**, 50 (46), 13165-13172.
- Bianchi, P.; Roda, G.; Riva, S.; Danieli, B.; Mackova, A. Z.; Griengl, H. On the selectivity of oxynitrilases towards α -oxygenated aldehydes. *Tetrahedron*, **2001**, 57, 2213-2220.
- Bingham, K. D.; Blaiklock, T. M.; Coleman, R. C. B.; Meakins, G. D. Hydroxy-steroids. Part XV. A quantitative study of the epoxidation of 3-substituted cholest-5-enes. *J. Chem. Soc. (C)*, **1970**, 2330-2332.
- Blackburn, G. M.; Rashid, A.; Thompson, M. H. Interaction of 5 α ,6 α -cholesterol oxide with DNA and other nucleophiles. *J. Chem. Soc. Chem. Comm.*, **1979**, 420-421.
- Blunt, J. W.; Copp, B. R.; Munro, M. H. G.; Northcote, P. T.; Prinsep, M. R. Marine natural products. *Nat. Prod. Rep.*, **2003**, 20, 1-48.
- Bommarius, A. S. and Riebel, B. R. Introduction to biocatalysis. In *Biocatalysis. Fundamentals and Applications.*, **2004a**, Wiley-VCH, pp: 1-18.
- Bommarius, A. S. and Riebel, B. R. Application of enzymes as catalysts: basic chemicals, fine chemicals, food, crop protection, bulk pharmaceuticals. In *Biocatalysis. Fundamentals and Applications.*, **2004b**, Wiley-VCH, pp: 159-208.
- Bommarius, A. S. and Riebel, B. R. Nucleophilic catalysis. In *Biocatalysis. Fundamentals and Applications.*, **2004c**, Wiley-VCH, pp: 261-268.
- Bommarius, A. S. and Riebel, B. R. Biocatalysis in non-conventional media. In *Biocatalysis. Fundamentals and Applications.*, **2004d**, Wiley-VCH, pp: 339-372.
- Borges de Carvalho, I. B.; Sampaio, T. C.; Barreiros, S. Solvent effects on the catalytic activity of subtilisin suspended in compressed gases. *Biotechnol. Bioeng.*, **1996**, 49 (4), 399-404.
- Bornscheuer, U. T. Immobilizing enzymes: How to create more suitable biocatalysts. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2003**, 42 (29), 3336-3337.
- Bornscheuer, U. T. High-throughput-screening systems for hydrolases. *Eng. Life Sci.*, **2004**, 4 (6), 539-542.
- Bortolini, O.; Medici, A.; Poli, S. Biotransformations on steroid nucleus of bile acids. *Steroids*, **1997**, 62, 564-577.
- Boul, A. D.; Fairweather, P. M.; Hall, J. M.; Meakins, G. D. Hydroxy-steroids. Part XVI. The preparation of 2,3-acetoxy-ketones and 2,3-diols from lupan-3-one. *J. Chem. Soc. (C)*, **1971**, 1199-1202.

- Bovara, R.; Canzi, E.; Carrea, G.; Pilotti, A.; Riva, S. Enzymatic α/β inversion of the C-7 hydroxyl of steroids. *J. Org. Chem.*, **1993**, 58 (2), 499-501.
- Bovara, R.; Carrea, G.; Riva, S.; Secundo, F. A new enzymatic route to the synthesis of 12-ketoursodeoxycholic acid. *Biotech. Lett.*, **1996**, 18 (3), 305-308.
- Bovicelli, P.; Lupattelli, P.; Mincione, E.; Prencipe, T.; Curci, R. Oxidation of natural targets by dioxiranes. Oxyfunctionalization of steroids. *J. Org. Chem.*, **1992**, 57 (7), 2182-2184.
- Boyce, S.; Tipton, K. F. Enzyme classification and nomenclature. *Encyclopedia Life Sciences*, **2001**, 1-11.
- Brady, L.; Brzozowski, A. M.; Derewenda, Z. S.; Dodson, E.; Dodson, G.; Tolley, S.; Turkenburg, J. P.; Christiansen, L.; Højbjerg, B.; Nørskov, L.; Thim, L.; Menge, U. A serine protease triad forms the catalytic center of a triacylglycerol lipase. *Nature*, **1990**, 343 (6260), 767-770.
- Bramley, A. M.; Langlands, J. M.; Jones, A. K.; Burgoyne, D. L.; Li, Y.; Andersen, R. J.; Salari, H. Effects of izp-94005 (Contignasterol) on antigen-induced bronchial responsiveness in ovalbumin-sensitized guinea-pigs. *Br. J. Pharmacol.*, **1995**, 115 (8), 1433-1438.
- Breuer, M.; Ditrich, K.; Habicher, T.; Hauer, B.; Kebeler, M.; Stürmer, R.; Zelinski, T. Industrial methods for the production of optically active intermediates. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2004**, 43, 788-824.
- Brodie, A. M. H.; Njar, V. C. O. Aromatase inhibitors and their application in breast cancer treatment. *Steroids*, **2000**, 65, 171-179.
- Brougham, P.; Cooper, M. S.; Cummerson, D. A.; Heaney, H.; Thompson, N. Oxidation reactions using magnesium monopero-phthalate: a comparison with *m*-chloroperoxybenzoic acid. *Chem. Comm.*, **1987**, 1015-1017.
- Brown, R. F. C.; Jackson, W.R.; McCarthy, T. D. The synthesis of homochiral naturally occurring hydroxy amides. *Tetrahedron: Asymm.*, **1993**, 4 (2), 205-206.
- Brown, R. F. C.; Donohue, A. C.; Jackson, W. R.; McCarthy, T. D. Synthetic applications of optically active cyanohydrins. Enantioselective syntheses of the hydroxyamides tembamide and aegeline, the cardiac drug denopamine, and some analogues of the bronchodilator salbutamol. *Tetrahedron*, **1994**, 50 (48), 13739-13752.
- Brueggemeier, R. W.; Miller, D. D.; Dalton, J. T. Estrogen, progestins and androgens. In *Foye's Principles of Medicinal Chemistry*. **2002**, 5th Edition, Eds: D. A. Williams and T. L. Lemke, Lippincott Williams & Wilkins, pp 685-717.
- Brunet, E.; Batra, M. S.; Aguilar, F. J.; Ruano, J. L.G. Highly diastereoselective addition of cyanide to β -hydroxyketones. *Tetrahedron Lett.*, **1991**, 32 (39), 5423-5424.
- Brussee, J.; Roos, E. C.; van der Gen, A. Bio-organic synthesis of optically active cyanohydrins and acyloins. *Tetrahedron Lett.*, **1988**, 29 (35), 4485-4488.

- Brussee, J.; Loos, W. T.; Kruse, C. G.; van der Gen, A. Synthesis of optically active silyl protected cyanohydrins. *Tetrahedron*, **1990a**, 46 (3), 979-986.
- Brussee, J.; Dofferhoff, F.; Kruse, C. G.; van der Gen, A. Synthesis of optically active ethanolamines. *Tetrahedron*, **1990b**, 46 (5), 1653-1658.
- Bruttomesso, A. C.; Baldessari, A. Lipase-catalysed deacetylation of androstane and pregnane derivatives: influence of ring D substitution. *J. Mol. Catal. B: Enzymatic*, **2004**, 149-153.
- Bruttomesso, A. C.; Tiscornia, A.; Baldessari, A. Lipase-catalysed preparation of biologically active esters of dehydroepiandrosterone. *Biocat. Biotrans.*, **2004**, 22 (3), 215-220.
- Burgoyne, D. L.; Andersen, R. J.; Allen, T. M. Contignasterol, a highly oxygenated steroid with unnatural 14-beta, configuration from the marine sponge *Petrosia contignata* thiele 1899. *M. J. Org. Chem.*, **1992**, 57 (2), 525-528.
- Byon, C. Y.; Gut, M.; Stereospecific synthesis of the four 20,22-epoxycholesterols and of (Z)-20(22)-dehydrocholesterol. *J. Org. Chem.*, **1976**, 41 (23), 3716-3722.
- Cabral, J. M. S.; Aires-Barros, M. R.; Pinheiro, H.; Prazeres, D. M. F. Biotransformation in organic media by enzymes and whole cells. *J. Biotech.*, **1997**, 59, 133-143.
- Cais, H. J.; Theil, F. Hydrolysis and formation of C-O bonds. In *Enzyme Catalysis in Organic Synthesis.*, **2002**, Eds. K. Drauz and H. Waldmann, Wiley-VCH, pp. 335-578.
- Campos Neves, A. S.; Sá e Melo, M. L.; Moreno, M. J. S. M.; Tavares da Silva, E. J.; Salvador, J. A. R.; Costa, S. P.; Martins, R. M. L. M. Improved syntheses of aromatase inhibitors and neuroactive steroids efficient oxidations and reductions at key positions for bioactivity. *Tetrahedron*, **1999**, 55, 3255-3264.
- Candra, E.; Matsunaga, K.; Fujiwara, H.; Mimaki, Y.; Kuroda, M.; Sashida, Y.; Ohizumi, Y. Potent apoptotic effects of saponins from liliaceae plants in L1210 cells. *J. Pharmacy Pharmacol.*, **2002**, 54, 257-262.
- Carrea, G.; Riva, S.; Bovara, R.; Pasta, P. Enzymatic oxidoreduction of steroids in two-phase systems: effects of organic solvents on enzyme kinetics and evaluation of the performance of different reactors. *Enzyme Microb. Technol.*, **1988**, 10, 333-340.
- Carrea, G.; Ottolina, G.; Pasta, P.; Riva, S. Synthetic applications of NAD(P)(H)-dependent enzymes. *Annals N. York Acad. Sciences*, **1996**, 799, 642 – 649.
- Carrea, G.; Riva, S. Properties and synthetic applications of enzymes in organic solvents. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2000**, 39, 2226-2254.
- Carruthers, N. I.; Garshasb, S.; McPhail, A. T. Synthesis of corticoids from 9 α -hydroxyandrost-4-ene-3,17-dione. *J. Org. Chem.*, **1992**, 57 (3), 961-965.

- Chakravorty, P. N.; Levin, R. H. Studies on cholesteryl oxides. *J. Am. Chem. Soc.*, **1942**, 64, 2317-2322.
- Chen, C. S.; Fujimoto, Y.; Girdaukas, G.; Sih, C. J. Quantitative analyses of biochemical kinetic resolutions of enantiomers. *J. Am. Chem. Soc.*, **1982**, 104 (25), 7294-7299.
- Chen, C.-S.; Wu, S.-H.; Girdaukas, G.; Sih, C. J. Quantitative analyses of biochemical kinetic resolution of enantiomers. 2. enzyme-catalyzed esterifications in water-organic solvent biphasic systems. *J. Am. Chem. Soc.*, **1987**, 109 (9), 2812-2817.
- Chiari, M.; Gelain, A.; Riva, S.; Tura, D. Analysis of mandelonitrile lyase and β -glucosidase from sweet almonds by combined electrophoretic techniques. *Electrophoresis*, **1997**, 18, 2050-2054.
- Collins, T. The importance of sustainability ethics, toxicity and ecotoxicity in chemical education and research. *Green Chem.*, **2003**, G51-G52.
- Colombo, G.; Riva, S.; Danieli, B. Remote control of enzyme selectivity: the case of stevioside and steviolbioside. *Tetrahedron*, **2004**, 60, 741-746.
- Cox, P. J.; Nahar, L.; Sarker, S. D.; Turner, A. B. Synthesis and X-ray crystal structure of 3-oxo-23, 24-dinorchol-4-ene-22-cyanohydrin. *J. Chem. Res.-S*, **2004**, 3, 192-193.
- Cram, D. J.; Elhafez, F. A. A. Studies in stereochemistry X. The rule of "steric control of asymmetric induction" in the syntheses of acyclic systems. *J. Am. Chem. Soc.*, **1952**, 74, 5828-5835.
- Cross, A. D. Steroids. CC spectra and stereochemistry, part III. Steroidal 5,6-epoxides. *J. Am. Chem. Soc.* **1962**, 84 (16), 3206-3207.
- Croutas W. C. Cyanotrimethylsilane. in Reagents, Auxiliaries and Catalysts for C-C Bonds, *Handbook of Reagents for Organic Synthesis*, **1999**, Ed. Coates and Denmark, John Wiley & Sons, Sussex, pp. 236-239.
- Cruz, A.; Angelova, B.; Fernandes, P.; Cabral, J. M. S.; Pinheiro, H. M. Study of key operational parameters for the side-chain cleavage of sitosterol by free mycobacterial cells in bis-(2-ethylhexyl) phthalate. *Biocat. Biotrans.*, **2004**, 22 (3), 189-194.
- Cruz Silva, M. M.; Sá e Melo, M. L.; Parolin, M.; Tessaro, D.; Riva, S.; Danieli, B. The biocatalyzed stereoselective preparation of polycyclic cyanohydrins. *Tetrahedron-Asymm.*, **2004a**, 15 (1), 21-27.
- Cruz Silva, M. M.; Riva, S.; Sá e Melo, M. L. Highly selective lipase-mediated discrimination of diastereomeric 5,6-epoxysteroids. *Tetrahedron-Asymm.*, **2004b**, 15 (7), 1173-1179.
- Cruz Silva, M. M.; Andrade, M. L.; Paixão, J. A.; Almeida, M. J.; Sá e Melo, M. L. Cyanosilylation at pregnane side-chains. Selective synthesis and crystal structure of 20(R)-silylated cyanohydrins. *Steroids*, **2005a**, 70 (3), 145-151.

- Cruz Silva, M. M.; Riva, S.; Sá e Melo, M. L. Regioselective enzymatic acylation of vicinal diols of steroids. *Tetrahedron*, **2005b**, 61 (12), 3065-3073.
- Cubberley, B. W.; Marples, B. A. Steroids. Part XVIII. Spontaneous decomposition of 5 α -bromo-6 β -hidroxy-steroids. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I*, **1974**, 9-13.
- Curran, M. P.; Wagstaff, A. J. Ethinylestradiol/chlormadinone acetate. *Drugs*, **2004**, 64 (7), 751-760.
- Dabulis, K.; Klibanov, A. M. Dramatic enhancement of enzymatic activity in organic solvents by lyoprotectants. *Biotech. Bioeng.*, **1993**, 41 (5), 566-571.
- Danieli, B.; De Bellis, P.; Barzaghi, L.; Carrea, G.; Ottolina, G.; Riva, S. Studies on the enzymatic acylation of quinic acid, shikimic acid, and their derivatives in organic-solvents. *Helv. Chim. Acta*, **1992**, 75 (4), 1297-1304.
- Danieli, B.; Luisetti, M.; Riva, S.; Bertinotti, A.; Ragg, E.; Scaglioni, L.; Bombardelli, E. Regioselective enzyme-mediated acylation of polyhydroxy natural compounds. A remarkable, highly efficient preparation of 6'-O-acetyl and 6'-O-carboxyacetyl gingenoside Rg1. *J. Org. Chem.*, **1995**, 60 (12), 3637-3642.
- Danieli, B.; Barra, C.; Carrea, G.; Riva, S. Oxynitrilase-catalyzed transformation of substituted aldehydes: the case of (\pm)-2-phenylpropionaldehyde and of (\pm)-3-phenyl-butylaldehyde. *Tetrahedron: Asymm.*, **1996**, 7 (6), 1675-1682.
- Danieli, B.; Lesma, G.; Luisetti, M. *Candida antarctica* lipase B catalyzes the regioselective esterification of ecdysteroids at the C-2 OH. *Tetrahedron*, **1997**, 53 (16), 5855-5862.
- Danieli, B.; Frattini, S.; Roda, G.; Carrea, G.; Riva, S. Almond oxynitrilase-catalyzed transformation of substituted aldehydes. Part 2, *J. Mol. Cat. B: Enzymatic*, **1998**, 5, 223-228.
- Danieli, B.; Luisetti, M.; Steurer, S.; Michelitsch, A.; Likussar, W.; Riva, S.; Reiner, J.; Schubert-Zsilavec, M. Application of lipase-catalyzed regioselective esterification in the preparation of digitonin derivatives. *J. Nat. Prod.*, **1999**, 62, 670-673.
- Davey, C. W.; McGinnis, E. L. ; McKeown, J. M.; Meakins, G. D.; Pemberton, M. W.; Young, R. N. Hydroxy-steroids. Part XI. The preparation and infrared spectra of vicinal cholestanediols. *J. Chem. Soc. (C)*, **1968**, 2674-2682.
- Dinan, L. Phytoecdysteroids: biological aspects. *Phytochemistry*, **2001**, 57, 325-339.
- D'Onofrio, F.; Scettri, A. *p*-toluenesulfonic acid adsorbed on silica gel: an efficient dehydrating agent alcohols. *Synthesis*, **1985**, 1159-1161.
- Dreveny, I.; Gruber, K.; Glieder, A.; Thompson, A.; Kratky, C. The hydroxynitrile lyase from almond: a lyase that looks like an oxidoreductase. *Structure*, **2001**, 9 (9), 803-815.

- Dreveny, I.; Kratky, C.; Gruber, K. The active site of hydroxynitrile lyase from *Prunus amygdalus*: Modeling studies provide new insights into the mechanism of cyanogenesis. *Protein Science*, **2002**, 11, 292-300.
- Drew, J.; Letellier, M.; Morand, P.; Szabo, A. G. Synthesis from pregnenolone of fluorescent cholesterol analogue probes with conjugated unsaturation in the side-chain. *J. Org. Chem.*, **1987**, 52 (18), 4047-4052.
- Effenberger, F.; Ziegler, T.; Forster, S. Enzyme-catalyzed cyanohydrin synthesis in organic solvents. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **1987**, 26 (5), 458-460.
- Effenberger, F.; Horsch, B.; Forster, S.; Ziegler, T. Enzyme-catalysed synthesis of (*S*)-cyanohydrins and subsequent hydrolysis to (*S*)- α -hydroxy-carboxylic acids. *Tetrahedron Lett.*, **1990**, 31 (9), 1249-1252.
- Effenberger, F.; Stelzer, U. Enzyme-catalyzed reactions.11. Synthesis and stereoselective reactions of (*R*)- α -sulfonyloxynitriles. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **1991**, 30 (7), 873-874.
- Effenberger, F.; Horsch, B.; Weingart, F.; Ziegler, T.; Kuhner, S. Enzyme-catalysed synthesis of (*R*)-ketone-cyanohydrins and their hydrolysis to (*R*)- α -hydroxy- α -methyl-carboxylic acids. *Tetrahedron Lett.*, **1991**, 32 (23), 2605-2608.
- Effenberger, F. Synthesis and reactions of optically active cyanohydrins. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **1994**, 33, 1555-1564.
- Effenberger, F.; Heid, S. (*R*)-Oxinitrilase catalyzed synthesis of (*R*)-ketone cyanohydrins. *Tetrahedron: Asymm.*, **1995**, 6 (12), 2945-2952.
- Effenberger, F.; Gutterer, B.; Syed, J. Stereoselective synthesis of (1*R*,2*S*)-2-amino-1,3-diols from (*R*)-cyanohydrins. *Tetrahedron: Asymm.*, **1995**, 6 (12), 2933-2943.
- Effenberger, F.; Kremser, A.; Stelzer, U. A convenient synthesis of (*S*)-2-azidonitriles, (*S*)-2-aminonitriles and (*S*)-1,2-diamines. *Tetrahedron: Asymm.*, **1996**, 7 (2), 607-618.
- Effenberger, F.; Jäger, J. Synthesis of the adrenergic bronchodilators (*R*)-terbutaline and (*R*)-salbutamol from (*R*)-cyanohydrins. *J. Org. Chem.*, **1997**, 62 (12), 3867-3873.
- Effenberger, F. Enzyme-catalyzed preparation and synthetic applications of optically active cyanohydrins. *Chimia*, **1999**, 53 (1-2), 3-10.
- Effenberger, F.; Roos, J.; Kobler, C. *cis-trans* Selectivity of enzyme-catalyzed additions to 4-substituted cyclohexanones-correlation with the Prelog / Ingold model of enzymatic hydrogenation. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2002**, 41 (11), 1876-1879.
- Ehrenstein, M. Investigations on steroids. V. Acetolysis of the stereoisomeric 5,6-oxides and preparation of the acetates of 4-androstene-3,17-dione-6 (α) - ol and 6 (α) - hydroxy-11-desoxy-corticosterone. *J. Org. Chem.*, **1941**, 626-647.

- Ellis, B.; Petrow, V. Some 5α : 6α - epoxy-3-oxo-steroids. *J. Chem. Soc.*, **1956**, 4417-4419.
- Elshourbagy, N. A.; Guzelian, P. S. Separation, purification, and characterization of a novel form of hepatic cytochrome-P-450 from rats treated with pregnenolone-16 α -carbonitrile. *J. Biol. Chem.*, **1980**, 255, 1279-1285.
- Ema, T.; Maeno, S.; Takaya, Y.; Sakai, T.; Utaka, M. Significant effect of acyl groups on enantioselectivity in lipase-catalyzed transesterifications. *Tetrahedron: Asymm.*, **1996**, 7 (3), 625-628.
- Ema, T.; Okada, R.; Fukumoto, M.; Jittani, M.; Ishida, M.; Furuie, K.; Yamaguchi, K.; Sakai, T.; Utaka, M. Transition-state model for subtilisin-catalyzed transesterifications of secondary alcohols. *Tetrahedron Lett.*, **1999**, 40 (23), 4367-4370.
- Evans, D. A.; Carroll, G. L.; Truesdale, L. K. Synthetic applications of trimethylsilyl cyanide. An efficient synthesis of β -aminomethyl alcohols. *J. Org. Chem.*, **1974**, 39 (7), 914-917.
- Faber, K.; Riva, S. Enzyme-catalysed irreversible acyl transfer. *Synthesis*, **1992**, 895-910.
- Faber, K.; Ottolina, G.; Riva, S. Selectivity-enhancement of hydrolase reactions. *Biocatalysis*, **1993**, 8, 91-132.
- Faraldos, J. A.; Giner, J. L. Biomimetic synthesis of petuniasterone D via the epoxy ester-ortho ester rearrangement. *J. Org. Chem.*, **2002**, 67, 4659-4666.
- Fechter, M. H.; Griengl, H. Hydroxynitrile lyases: Biological sources and application as biocatalysts. *Food Technol. Biotechnol.*, **2004**, 42 (4), 287-294.
- Fernandes, P.; Cruz, A.; Angelova, B.; Pinheiro, H. M.; Cabral, J. M. S. Microbial conversion of steroid compounds: recent developments. *Enzyme Microb. Technol.*, **2003**, 32, 688-705.
- Ferraboschi, P.; Molatore, A.; Verza, E.; Santaniello, E. The first example of lipase-catalyzed resolution of a stereogenic center in steroid side chains by transesterification in organic solvent. *Tetrahedron: Asymm.*, **1996**, 7 (6), 1551- 1554.
- Ferraboschi, P.; Rezaelahi, S.; Verza, E.; Santaniello, E. Lipase-catalyzed resolution of stereogenic centers in steroid side chains by transesterification in organic solvents: the case of a 26-hydroxycholesterol. *Tetrahedron: Asymm.*, **1998**, 9, 2193-2196.
- Ferraboschi, P.; Pecora, F.; Reza-Elahi, S.; Santaniello, E. Chemoenzymatic synthesis of (25R)- and (25S)- 25-hydroxy-27-nor-cholesterol, a steroid bearing a secondary hydroxyl group in the side chain. *Tetrahedron: Asymm.*, **1999**, 10, 2497-2500.
- Ferraboschi, P.; Colombo, D.; Reza-Elahi, S. A practical chemoenzymatic approach to the synthesis of 3-hydroxy metabolites of tibolone. *Tetrahedron: Asymm.*, **2002**, 13, 2583-2586.

- Ferraboschi, P.; Colombo, D.; Prestileo, P. A convenient synthesis of oxandrolone through a regioselective *Candida antarctica* lipase-catalyzed transformation. *Tetrahedron: Asymm.*, **2003**, 14, 2781-2785.
- Fieser, L. F.; Rajagopalan, S. Selective oxidation with N-bromosuccinimide. II Cholestane-3 β ,5 α ,6 β -triol. *J. Am. Chem. Soc.*, **1949**, 71, 3938-3941.
- Fieser, L. F.; Stevenson, R. Cholesterol and companions. IX. Oxidation of Δ^5 -cholestene-3-one with lead tetraacetate. *J. Am. Chem. Soc.*, **1954**, 76, 1728-1733.
- Fishman, A.; Zviely, M. Chemo-enzymatic synthesis of (S)- α -cyano-3-phenoxybenzyl alcohol. *Tetrahedron: Asymm.*, **1998**, 9, 107-118.
- Fitzpatrick, P. A.; Klivanov, A. M. How can the solvent affect enzyme enantioselectivity? *J. Am. Chem. Soc.*, **1991**, 113 (8): 3166-3171.
- Fleming, I.; Barbero, A.; Walter, D. Stereochemical control in organic synthesis using silicon-containing compounds. *Chem. Rev.*, **1997**, 97, 2063-2192.
- Fontes, N.; Almeida, M. C.; Peres, C.; Garcia, S.; Grave, J.; Aires-Barros, M. R.; Soares, C. M.; Cabral, J. M. S.; Maycock, C. D.; Barreiros, S. Cutinase activity and enantioselectivity in supercritical fluids. *Ind. Eng. Chem. Res.*, **1998**, 37 (8), 3189-3194.
- Fontes, N.; Almeida, M. C.; Garcia, S.; Peres, C.; Partridge, J.; Halling, P. J.; Barreiros, S. Supercritical fluids are superior media for catalysis by cross-linked enzyme microcrystals of subtilisin Carlsberg. *Biotechnol. Progress*, **2001**, 17 (2), 355-358.
- Gaisberger, R. P.; Fechter, M. H.; Griengl, H. The first hydroxynitrile lyase catalysed cyanohydrin formation in ionic liquids. *Tetrahedron: Asymm.*, **2004**, 15, 2559-2963.
- Galagovsky, L. R.; Burton, G.; Gros, E. G. 5 β ,6 β -epoxidation of 3 β -cholesteryl acetate and its analogues. *Z. Naturforsch.*, **1989**, 44b, 806-810.
- Galagovsky, L. R.; Gros, E. G. The use of chromyl diacetate as an epoxidation reagent. *J. Chem. Research (S)*, **1993**, 137.
- Gamoh, K.; Hirayama, M.; Ikekawa, N. Stereocontrolled synthesis of withanolide D and related compounds. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I*, **1984**, 449-454.
- Garcia, S.; Lourenço, N. M. T.; Sousa, D.; Sequeira, A. F.; Mimoso, P.; Cabral, J. M. S.; Alfonso, C. A. M.; Barreiros, S. A comparative study of biocatalysis in non-conventional solvents: ionic liquids, supercritical fluids and organic media. *Green Chem.*, **2004**, 6, 466-470.
- García-Junceda, E.; García-García, J. F.; Bastida, A.; Fernández-Mayoralas, A. Enzymes in the synthesis of bioactive compounds: the prodigious decades. *Bioorg. Med. Chem.*, **2004**, 12, 1817-1834.

- García-Urdiales, E.; Alfonso, I.; Gotor, V. Enantioselective enzymatic desymmetrizations in organic synthesis. *Chem. Rev.*, **2005**, 105 (1), 313-354.
- Gardi, R.; Ercoli, A. Protection of carbonyl and hydroxyl groups. In *Organic Reactions in Steroid Chemistry*, **1972**, Eds. J. Fried and J. A. Edwards, van Nostrand Reinhold Company, pp. 375-413.
- Garrido Santos, G. A.; Murray, A. P.; Pujol, C. A.; Damonte, E. B.; Maier, M. Synthesis and antiviral activity of sulfated and acetylated derivatives of 2 β ,3 α -dihydroxy-5 α -cholestane. *Steroids*, **2003**, 68, 125-132.
- Gasc, J. C.; Nédélec, L. A new approach to corticoid total synthesis. *Tetrahedron Lett.*, **1971**, 22, 2005-2008.
- Gasior, M.; Carter, R. B.; Witkin, J. M. Neuroactive steroids: potential therapeutic use in neurological and psychiatric disorders. *Trends In Pharm. Sciences*, **1999**, 20, 107-112.
- Gerus, I. I.; Kruchok, I. S.; Kukhar, V. P. Regioselective addition of trimethylsilyl cyanide to *E*-1,1,1-trifluoro-4-ethoxybut-3-en-2-one. *Tetrahedron. Lett.* **1999**, 40, 5923-5926.
- Ghanem, A.; Schurig, V. Lipase-catalyzed irreversible transesterification of 1-(2-furyl) ethanol using isopropenyl acetate. *Chirality*, **2001**, 13, 118-123.
- Ghanem, A.; Aboul-Enein, H. Y. Lipase-mediated chiral resolution of racemates in organic solvents. *Tetrahedron: Asymm.*, **2004**, 15, 3331- 3351.
- Ghogare, A.; Kumar, G. S. Oxime esters as novel irreversible acyl transfer agents for lipase catalysis in organic media. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, **1989**, 1533-1535.
- Ghogare, A.; Kumar, G. S. Novel route to chiral polymers involving biocatalytic transesterification of *O*-acryloyl oximes. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, **1990**, 134-135.
- Giner, J. L.; Faraldos, J. A. A biomimetic approach to the synthesis of an antiviral marine steroidal orthoester. *J. Org. Chem.*, **2002**, 67, 2717-2720.
- Glieder, A.; Weis, R.; Skranc, W.; Poechlauer, P.; Dreveny, I.; Majer, S.; Wubbolts, M.; Schwab, H.; Gruber, K. Comprehensive step-by-step engineering of an (*R*)-hydroxynitrile lyase for large-scale asymmetric synthesis. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2003**, 42 (39), 4815-4818.
- Glotter, E.; Schwartz, A. *cis*-Hydroxylation of steroidal olefins with thallium triacetate. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I*, **1976**, 1660-1662.
- Gomes, J.; Steiner, W. The biocatalytic potential of extremophiles and extremozymes. *Food Technol. Biotechnol.*, **2004**, 42 (4), 223-235.
- Gotor, V. Biocatalysis applied to the preparation of pharmaceuticals. *Org. Proc. Res. Dev.*, **2002**, 6 (4), 420-426.

- Gregory, R. J. H. Cyanohydrins in nature and the laboratory: Biology, preparations, and synthetic applications. *Chem. Rev.*, **1999**, 99 (12), 3649-3682.
- Griengl, H.; Hickel, A.; Johnson, D. V.; Kratky, C.; Schmidt, M.; Schwab, H. Enzymatic cleavage and formation of cyanohydrins: a reaction of biological and synthetic relevance. *Chem. Commun.*, **1997**, 1933-1940.
- Griengl, H.; Klempier, N.; Pochlauer, P.; Schmid, M.; Shi, N.; Zabelinskaja-Mackova, A. A. Enzyme catalysed formation of (S)-Cyanohydrins derived from aldehydes and ketones in a biphasic solvent system. *Tetrahedron*, **1998**, 54, 14447-14486.
- Griengl, H.; Schwab, H.; Fetcher, M. The synthesis of chiral cyanohydrins by oxynitrilases. *Trends In Biotechnol.*, **2000**, 18, 252-256.
- Gröger, H. Enzymatic routes to enantiomerically pure aromatic alpha-hydroxy carboxylic acids: A further example for the diversity of biocatalysis. *Adv. Synth. Catal.*, **2001**, 343 (6-7), 547-558.
- Gruber, K.; Gartler, G.; Krammer, B.; Schwab, H.; Kratky, C. Reaction mechanism of hydroxynitrile lyases of the - hydrolase superfamily. The three-dimensional structure of the transient enzyme-substrate complex certifies the crucial role of Lys²³⁶. *J. Biol. Chem.*, **2004**, 279 (19), 20501-20510.
- Guardiola, F.; Codony, R.; Addis, P. B.; Rafecas, M.; Boatella, J. Biological effects of oxysterols: Current status. *Food Chem. Toxic.*, **1996**, 34 (2), 193-211.
- Gundersen L-L, Rise F, Undheim, K. Acidic and Basic Reagents, *Hanbook of Reagents for Organic Synthesis*, **1999**, Ed. Reich and Rigby, John Wiley & Sons, Sussex, pp. 392-398.
- Habtemariam, S. Cytotoxicity and immunosuppressive activity of withanolides from *Discopodium penninervium*. *Planta Med.*, **1997**, 63, 15-17.
- Habtemariam, S.; Skelton, B. W.; Waterman, P. G.; White, A. H. 17-Epiacnistin-A, a further withanolide from the leaves of *Discopodium penninervium*. *J. Nat. Prod.*, **2000**, 63, 512-513.
- Hacking, M. A. P. J.; van Rantwijk, F.; Sheldon, R. A. Lipase catalysed synthesis of diacyl hydrazines: an indirect method for kinetic resolution of chiral acids. *J. Mol. Cat. B: Enzymatic*, **2000**, 9, 183-191.
- Hacking, M. A. P. J.; van Rantwijk, F.; Sheldon, R. A. Lipase catalysed acylation of hydroxylamine and hydrazine derivatives. *J. Mol. Cat. B: Enzymatic*, **2001**, 11, 315-321.
- Halldorsson, A.; Magnusson, C. D.; Haraldsson, G. G. Chemoenzymatic synthesis of structured triacylglycerols by highly regioselective acylation. *Tetrahedron*, **2003**, 59, 9101-9109.
- Halling, P. J. Thermodynamic predictions for biocatalysis in nonconventional media: Theory, tests, and recommendations for experimental design and analysis. *Enz. Microb. Technol.*, **1994**, 16, 178-206.
- Hamashima, Y.; Kanai, M.; Shibasaki, M. Catalytic enantioselective cyanosilylation of ketones. *J. Am. Chem. Soc.*, **2000**, 122, 7412-7413.

- Hamashima, Y.; Kanai, M.; Shibasaki, M. Catalytic enantioselective cyanosilylation of ketones: improvement of enantioselectivity and catalyst turn-over by ligand tuning. *Tetrahedron Lett.*, **2001a**, 42, 691-694.
- Hamashima, Y.; Sawada, D.; Nogami, H.; Kanai, M.; Shibasaki, M. Highly enantioselective cyanosilylation of aldehydes catalyzed by a Lewis acid-Lewis base bifunctional catalyst. *Tetrahedron*, **2001b**, 57, 805-814.
- Hanefeld, U.; Li, Y.; Sheldon, R. A. Maschmeyer, T. CAL-B catalyzed enantioselective synthesis of cyanohydrins - A facile route to versatile building blocks. *Synlett*, **2000**, 12, 1775-1776.
- Hanefeld, U.; Straathof, A. J. J.; Heijnen, J. J. Enzymatic formation and esterification of (*S*) - mandelonitrile. *J. Mol. Cat. B: Enzymatic*, **2001**, 11, 213-218.
- Hanefeld, U. Reagents for (ir)reversible enzymatic acylations. *Org. Biomol. Chem.*, **2003**, 1, 2405-2415.
- Hanson, J. R.; Truneh, A. Preparation of steroidal 5 β ,6 β -epoxides and their oxidation by chromium trioxide. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I*, **1988**, 2001-2003.
- Hanson, J. R.; Hitchcock, P. B.; Liman, M. D.; Nagaratnam, S. Facial selectivity in the hydroboration of androst-4-enes. *J. Chem. Soc. Perkin Trans I*, **1995**, 2183-2187.
- Hanson, J. R.; Terry, N.; Uyanik, C. The stereochemistry of epoxidation of Δ^5 -steroids with sodium perborate and potassium permanganate. *J. Chem. Research (S)*, **1998**, 50-51.
- Hanson, J. R.; Hitchcock, P. B.; Kiran, I. The transannular effect of one androstane epoxide on the stereochemistry of a second epoxidation. *J. Chem. Research (S)*, **1999**, 538-539.
- Hanson, R. L.; Shi, Z.; Brzozowski, D. B.; Banerjee, A.; Kissick, T. P.; Singh, J.; Pullockaran, A. J.; North, J. T.; Fan, J.; Howell, J.; Durand, S. C.; Montana, M. A.; Kronenthal, D. R.; Mueller, R. H.; Patel, R. N. Regioselective enzymatic aminoacylation of lobucavir to give an intermediate for lobucavir produg. *Bioorg. Med. Chem.*, **2000**, 8, 2681-2687.
- Hari Krishna, S. Developments and trends in enzyme catalysis in nonconventional media. *Biotech. Adv.*, **2002**, 20, 239-267.
- Hari Krishna, S.; Persson, M.; Bornscheuer, U. T. Enantioselective transesterification of a tertiary alcohol by lipase A from *Candida antarctica*. *Tetrahedron: Asymm.*, **2002**, 13, 2693-2696.
- Harrold, M. Antihyperlipoproteinemics and inhibitors of cholesterol biosynthesis. In *Foye's Principles of Medicinal Chemistry*. **2002**, 5th Edition, Eds: D. A. Williams and T. L. Lemke, Lippincott Williams & Wilkins, pp 580-600.
- Hasslacher, M.; Schall, M.; Hayn, M.; Bona, R.; Rumbold, K.; Luckl, J.; Griengl, H.; Kohlwein, S. D.; Schwab, H. High-level intracellular expression of hydroxynitrile lyase from the tropical rubber tree *Hevea brasiliensis* in microbial hosts. *Protein Express. Purif.*, **1997**, 11, 61-71.

- Hayashi, M.; Yoshiga, T.; Nakatani, K.; Ono, K.; Oguni, N. Reduction of α -trialkylsiloxy nitriles with diisobutylaluminium hydride (DIBAH): a facile preparation of α -trialkylsiloxy aldehydes and their derivatives. *Tetrahedron*, **1994**, 50 (9), 2821-2830.
- Heaney, H. Monoperoxyphthalic acid. *Aldrichimica Acta* **1993**, 26, 35-45.
- Hedenström, E.; Nguyen, B. V.; Silks, L. A. Do enzymes recognise remotely located stereocentres? Highly enantioselective *Candida rugosa* lipase-catalysed esterification of the 2- to 8-methyldecanoic acids. *Tetrahedron: Asymm.*, **2002**, 13 (8), 835-844.
- Held, M.; Schmid, A.; Beilen, J. B.; Witholt, B. Biocatalysis. Biological systems for the production of chemicals. *Pure Appl. Chem.*, **2000**, 72 (7), 1337-1343.
- Henbest, H. B.; Smith, M. The cholestane-2 : 3-diols. *J. Chem. Soc.*, **1957**, 926-927.
- Hess-Stumpp, H.; Hoffmann, J; Fuhrmann, U. Progesterone receptor antagonists (antiproggestins). *Drugs Fut.*, **2002**, 27 (11), 1113-1123.
- Higa, T.; Tanaka, J.; Tsukitani, Y.; Kikuchi, H. Hippuristanols, cytotoxic polyoxygenated steroids from the gorgonian *Isis hippuris*. *Chem. Lett.*, **1981**, 11, 1647-1650.
- Higuchi, K.; Onaka, M.; Izumi, Y. Efficient and regioselective cyanosilylation of cyclohex-2-enone and other unsaturated ketones over solid acid and base catalysts. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, **1991**, 1035-1036.
- Hirose, Y.; Kariya, K.; Sasaki, I.; Kurono, Y.; Ebiike, H.; Achiwa, K. Drastic solvent effect on lipase-catalyzed enantioselective hydrolysis of prochiral 1,4-dihydropyridines. *Tetrahedron Lett.*, **1992**, 7157-7160.
- Holland, H. L.; Jahangir. Reactions of steroidal 4,5-and 5,6-epoxides with strong bases. *Can. J. Chem.*, **1983**, 61, 2165-2170.
- Holland, H. L. Recent advances in applied and mechanistic aspects of the enzymatic hydroxylation of steroids by whole-cell biocatalysts. *Steroids*, **1999**, 64, 178-186.
- Horiuchi, C. A.; Satoh, J. Y. A new synthesis of *cis*-diol from olefin using iodine-copper (II). *Chem. Lett.*, **1988**, 1209-1210.
- Houminer, Y. Intramolecular catalysis. Part II. Electrophilic anchimeric assistance by a hydroxy-group in the opening of steroidal epoxides by azide anions. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I*, **1975**, 1663-1669.
- Huerta, F. F.; Minidis, A. B. E.; Backvall, J. E. Racemisation in asymmetric synthesis. Dynamic kinetic resolution and related processes in enzyme and metal catalysis. *Chem. Soc. Rev.*, **2001**, 30 (6), 321-331.

- Huuhtanen, T. T.; Kanerva, L. T. Enzyme-catalysed synthesis of optically active aliphatic cyanohydrins. *Tetrahedron: Asymm.*, **1992**, 3 (10), 1223-1226.
- Hwang, P. L. Biological-activities of oxygenated sterols - physiological and pathological implications. *BioEssays* **1991**, 13, 583-589.
- Inagaki, M.; Hiratake, J.; Nishioka, T.; Oda, J. Lipase-catalyzed kinetic resolution with in situ racemization: one pot synthesis of optically active cyanohydrin acetates from aldehydes. *J. Am. Chem. Soc.*, **1991**, 113, 9360-9361.
- Inagaki, M.; Hiratake, J.; Nishioka, T.; Oda, J. One-pot synthesis of optically active cyanohydrin acetates from aldehydes via lipase-catalyzed kinetic resolution coupled with in situ formation and racemization of cyanohydrins. *J. Am. Chem. Soc.*, **1992**, 57, 5643-5649.
- Jaeger, K.-E.; Eggert, T. Enantioselective biocatalysis optimized by directed evolution. *Curr. Op. Biotech.*, **2004**, 15, 305-313.
- Jain, N.; Kumar, A.; Chauhan, S.; Chauhan, S. M. S. Chemical and biochemical transformations in ionic liquids. *Tetrahedron*, **2005**, 61, 1015-1060.
- Jayaprakasam, B.; Zhang, Y.; Seeram, N. P.; Nair, M. G. Growth inhibitor of human tumor cell lines by withanolides from *Withania somnifera* leaves. *Life Sciences*, **2003**, 74, 125-132.
- Johnson, D. V.; Zabelinskaja-Machova, A. A.; Griengl, H. Oxynitrilases for asymmetric C-C bond formation. *Curr. Op. Chem. Biol.*, **2000**, 4, 103-109.
- Kadereit, D.; Waldmann, H. Enzymatic protecting group techniques. *Chem. Rev.*, **2001**, 101 (11), 3367-3396.
- Kametani, T.; Tsubuki, M.; Furuyama, H.; Honda, T. Stereoselective synthesis of the 20-hydroxyecdysone side chain. *J. Chem. Soc. Perkin Trans I*, **1985**, 557-560.
- Kanerva, L. T.; Kosonen, M.; Vanttinen, E.; Huuhtanen, T. T.; Dahlqvist, M. Studies on the chemo- and enantio-selectivity of the enzymatic monoacylations of amino alcohols. *Acta Chem. Scand.*, **1992**, 46, 1101-1105.
- Kanerva, L. T.; Kiljunen, E.; Huuhtanen, T. T. Enzymatic resolution of optically active aliphatic cyanohydrins, *Tetrahedron: Asymm.*, **1993**, 4 (11), 2355-2361.
- Kazlauskas, R. J.; Weissfloch, A. N. E.; Rappaport, A. T.; Cuccia, L. A. A rule to predict which enantiomer of a secondary alcohol reacts faster in reactions catalyzed by cholesterol esterase, lipase from *Pseudomonas cepacia*, and lipase from *Candida rugosa*. *J. Org. Chem.*, **1991**, 56 (8), 2656-2665.
- Kazlauskas, R. J.; Weissfloch, A. N. E. A structure-based rationalization of the enantiopreference of subtilisin toward secondary alcohols and isosteric primary amines. *J. Mol. Cat. B: Enzymatic*, **1997**, 3, 65-72.

- Khmelnitsky, Y. L.; Welch, S. H.; Clark, D. S.; Dordick, J. S. Salts dramatically enhance activity of enzymes suspended in organic solvents. *J. Am. Chem. Soc.*, **1994**, 116 (6), 2647-2648.
- Khmelnitsky, Y. L.; Budde, C.; Arnold, J. M.; Usyatinsky, A.; Clark, D. S.; Dordick, J. S. Synthesis of water-soluble paclitaxel derivatives by enzymatic acylation. *J. Am. Chem. Soc.*, **1997**, 119 (47), 11554-11555.
- Kiljunen, E.; Kanerva, L. T. Approach to (*R*)- and (*S*)-ketone cyanohydrins using almond and apple meal as the source of (*R*)-oxynitrilase. *Tetrahedron: Asymm.*, **1997**, 8 (10), 1551-1557.
- Kim, K.-W.; Song, B.; Choi, M.-Y.; Kim, M.-J. Biocatalysis in ionic liquids: markedly enhanced enantioselectivity of lipase. *Org. Lett.*, **2001**, 3 (10), 1507-1509.
- Kim, M.-J.; Kim, H. M.; Kim, D.; Ahn, Y.; Park, J. Dynamic kinetic resolution of secondary alcohols by enzyme-metal combinations in ionic liquids. *Green Chem.*, **2004**, 6, 471-474.
- King, J. W.; Snyder, J. M.; Frykman, H.; Neese, A. Sterol ester production using lipase-catalyzed reactions in supercritical carbon dioxide. *Eur. Food Res. Technol.*, **2001**, 212, 566-569.
- Kirk, D. N.; Hartshorn, M. P. In *Steroid Reaction Mechanism*; **1968**, Eds. C. Eabrom, N. B. Chapman, Elsevier: London, pp. 69.
- Klaas, M. R.; Warwel, S. Lipase-catalyzed preparation of peroxy acids and their use for epoxidation. *J. Mol. Cat. A: Chemical*, **1997**, 117, 311-319.
- Klaas, M. R.; Steffens, K.; Patett, N. Biocatalytic peroxy acid formation for disinfection. *J. Mol. Cat. B: Enzymatic*, **2002**, 19 (20), 499-505.
- Klempier, N.; Griengl, H. Aliphatic (*S*)-cyanohydrins by enzyme catalyzed synthesis. *Tetrahedron Lett.*, **1993**, 34 (30), 4769-4772.
- Klempier, N.; Pichler, U.; Griengl, H. Synthesis of α,β -unsaturated (*S*)-cyanohydrins using the oxynitrilase from *Hevea brasiliensis*. *Tetrahedron: Asymm.*, **1995**, 6 (4), 845-848.
- Klibanov, A. M. Enzymes that work in organic solvents. *ChemTech*, **1986**, 354-359.
- Klibanov, A. M. Asymmetric transformations catalyzed by enzymes in organic solvents. *Acc. Chem. Res.*, **1990**, 23 (4), 114-120.
- Klibanov, A. M. Why are enzymes less active in organic solvents than in water? *Trends In Biotech*, **1997**, 15, 97-101.
- Klibanov, A. M. Improving enzymes by using them in organic solvents. *Nature*, **2001**, 409, 241-246.
- Kliwer, S. A.; Moore, J. T.; Wade, L.; Staudinger, J. L.; Watson, M. A.; Jones, S. A.; McKee, D. D.; Oliver, B. B.; Willson, T. M.; Zetterström, R. H.; Perlmann, T.; Lehmann, J. M. An orphan nuclear receptor activated by pregnanes defines a novel steroid signaling pathway. *Cell*, **1998**, 92, 73-82.

- Kobayashi, S.; Tsuchiya, Y.; Mukaiyama, T. A facile synthesis of cyanohydrin trimethylsilyl ethers by the addition reaction of trimethylsilyl cyanide with aldehydes under basic condition. *Chem. Lett.*, **1991**, 537-540.
- Kobler, C.; Bohrer, A.; Effenberger, F. Hydroxynitrile lyase-catalyzed addition of HCN to 2- and 3-substituted cyclohexanones. *Tetrahedron*, **2004**, 60, 10397-10410.
- Kocór, M.; Lenkowski, P.; Mironowicz, A.; Nowak, L. A new method for preparing steroid $5\alpha,6\beta$ -halogenohydrins and $5,6\beta$ -epoxides. *Bull. Acad. Polonaise Sciences*, **1966**, XIV (2), 79-84.
- Kocovský, P.; Starý, I. Steric control of epoxidation by carbamate and amide groups. Evidence for the carbonyl-directed epoxidation. *J. Org. Chem.*, **1990**, 55 (10), 3236-3243.
- Koeller, K.; Wong, C.-H. Enzymes for chemical synthesis. *Nature*, **2001**, 409, 232-239.
- Krepeski, L. R.; Heilmann, S. M.; Rasmussen, J. K. Addition of Grignard reagents to O-trimethylsilylated cyanohydrins: synthesis of acyloins. *Tetrahedron Lett.*, **1983**, 24 (38), 4075-4078.
- Krepeski, L. R.; Jensen, K. M.; Heilmann, S. M.; Rasmussen, J. K. A new synthesis of 2-aminoalcohols from O-trimethylsilylated cyanohydrins. *Synthesis*, **1986**, 301-303.
- Krieger, N.; Bhatnagar, T.; Baratti, J. C.; Baron, A. M.; Lima, V. M.; Mitchell, D. Non-aqueous biocatalysis in heterogeneous solvent systems. *Food Technol. Biotechnol.*, **2004**, 42 (4), 279-286.
- Krstenansky, J. L.; Khmelnsky, Y. Biocatalytic combinatorial synthesis. *Bioorg. Med. Chem.*, **1999**, 7, 2157-2162.
- Kruchok, I. S.; Gerus, I. I.; Kukhar, V. P. Regioselective addition of trimethylsilyl cyanide to β -alkoxyvinyl alkyl ketones. *Tetrahedron*, **2000**, 56, 6533-6539.
- Kupchan, S. M.; Anderson, W. K.; Bollinger, P.; Doskotch, R. W.; Smith, R. M.; Renauld, J. A. S.; Schnoes, H. K.; Burlingame, A. L.; Smith, D. H. Tumor inhibitors. XXXIX. Active principles of *Acnistus arborescens*. Isolation and structural and spectral studies of withaferin A and withacnistin. *J. Org. Chem.*, **1969**, 34 (12), 3858-3866.
- Laane, C.; Boeren, S.; Vos, K.; Veeger, C. Rules for optimization of biocatalysis in organic solvents. *Biotechnol. Bioeng.*, **1987**, 30, 81-87.
- Lalonde, J. J.; Govardhan, C.; Khalaf, N.; Martinez, A. G.; Visuri, K.; Margolin, A. L. Cross-linked crystals of *Candida rugosa* lipase - highly efficient catalysts for the resolution of chiral esters. *J. Am. Chem. Soc.*, **1995**, 117 (26), 6845-6852.
- Lalonde, J.; Margolin, A. Immobilization of enzymes. In *Enzyme Catalysis on Organic Synthesis*. Eds K. Drauz e H. Waldmann, **2002**, Wiley-VCH, pp 163-184.
- Lamare, S.; Legoy, M. D.; Graber, M. Solid/gas bioreactors: powerful tools for fundamental research and efficient technology for industrial applications. *Green Chem.*, **2004**, 6 (9), 445-458.

- Lambert, J. J.; Belelli, D.; Hill-Venning, C.; Peters, J. A. Neurosteroids and GABA_A receptor function. *Trends InPharm. Sci.*, **1995**, 16, 295-303.
- Lauble, H.; Muller, K.; Schindelin, H.; Forster, S.; Effenberger, F. Crystallization and preliminary-x-ray diffraction studies of mandelonitrile lyase from almonds. *Proteins-Struc. Function Genetics*, **1994**, 19 (4), 343-347.
- Lauble, H.; Miehllich, B.; Forster, S.; Wajant, H.; Effenberger, F. Mechanistic aspects of cyanogenesis from active-site mutant Ser80Ala of hydroxynitrile lyase from *Manihot esculenta* in complex with acetone cyanohydrin. *Protein Sci.*, **2001**, 10, 1015-1022.
- Lauble, H.; Miehllich, B.; Forster, S.; Wajant, H.; Effenberger, F. Crystal structure of hydroxynitrile lyase from *Sorghum bicolor* in complex with the inhibitor benzoic acid: A novel cyanogenic enzyme. *Biochemistry*, **2002**, 41, 12043-12050.
- Letourneux, Y.; Lo, M. M. L.; Chaudhuri, N.; Gut, M. Acid-catalyzed rearrangement of 20-vinylpregn-5-ene-3- β ,20-diol 3-acetate. *J. Org. Chem.*, **1975**, 40 (4), 516-518.
- Li, Y-X; Straathof, A. J. J.; Hanefeld, U. Enantioselective formation of mandelonitrile acetate-investigation of a dynamic kinetic resolution. *Tetrahedron: Asymm.*, **2002**, 13, 739-743.
- Liese, A. Replacing chemical steps by biotransformations: industrial applications and processes using biocatalysts. In *Enzyme Catalysis in Organic Synthesis*. **2002** Eds: K. Drauz e H. Waldmann. Wiley-VCH, pp: 1419-1459.
- Lin, G.; Han, S.; Li, Z. Enzymatic synthesis of (*R*)-cyanohydrins by three (*R*)-oxynitrilase sources in micro-aqueous organic medium. *Tetrahedron*, **1999**, 55, 3531-3540.
- Livingston, D. A.; Petre, J. E.; Bergh, C. L. Intramolecular cyanohydrin elaboration. Construction of corticosteroids from 17-ketostetoids. *J. Am. Chem. Soc.*, **1990**, 112, 6449-6450.
- Lønning, P. E.; Lien, E. A. Mechanisms of action of endocrine treatment in breast cancer. *Critical Rev. Oncology/Hematology*, **1995**, 21, 158-193.
- Lønning, P. E.; Geisler, J.; Johannessen, D. C.; Gschwind, H.-P.; Waldmeier, F.; Schneider, W.; Galli, B.; Winkler, T.; Blum, W.; Kriemler, H.-P.; Miller, W. R.; Faigle, J. W. Pharmacokinetics and metabolism of formestane in breast cancer patients. *J. Steroid Biochem. Molec. Biol.*, **2001**, 77, 39-47.
- Lopez-Serrano, P.; Cao, L.; van Rantwijk, F.; Sheldon, R. A. Cross-linked enzyme aggregates with enhanced activity: application to lipases. *Biotechnol. Lett.*, **2002**, 24 (16), 1379-1383.
- Lorenz, P.; Eck, J. Screening for novel industrial biocatalysts. *Eng. Lif. Sci.*, **2004**, 4 (6), 501-504.
- Lozano, P.; Diego, T.; Guegan, J. P.; Vaultier, M.; Iborra, J. L. Stabilization of alpha-chymotrypsin by ionic liquids in transesterification reactions. *Biotechnol. Bioeng.*, **2001**, 75 (5), 563-569.

- Luche, J. L.; Hahn, L. R.; Crabbé, P. Reduction of natural enones in the presence of Cerium Trichloride. *J. Chem. Soc. Chem Comm.*, **1978**, 601-602.
- MacDonald, I. A. Detection of bile-salts with Komarowskys reagent and group-specific dehydrogenases. *J. Chromatogr.*, **1977**, 136(2), 348-352.
- MacManus, D. A.; Vulfson, E. N. Reversal of regioselectivity in the enzymatic acylation of secondary hydroxyl groups mediated by organic solvents. *Enzyme Microb. Technol.*, **1997**, 20 (3), 225-228.
- Madeira Lau, R. M.; van Rantwijk, F.; Seddon, K. R.; Sheldon, R. A. Lipase-catalyzed reactions in ionic liquids. *Org. Lett.*, **2000**, 2 (26), 4189-4191.
- Malunowicz, I.; Mironowicz, A. Epoxidation of some 3 β -acetoxy-and 3 β -keto- Δ^5 -steroids with monophrthalic acid. *Bull. Acad. Polonaise Sciences*, **1968**, XVI (11-12), 579-584.
- Manju, K.; Trehan, S. Uncatalysed trimethylsilyl cyanide addition to aldehydes. *J. Chem. Soc. Perkin Tans. I*, **1995**, 2383-2384.
- Marchon, J. C.; Ramasseul, R. A convenient synthesis of 5,6 β -epoxides of some cholesteryl esters and Δ^5 -ketosteroid derivatives by catalytic β -stereo-selective epoxidation. *Chem. Comm.*, **1989**, 389-391.
- Marcus, J.; Meurs, P. J.; Nieuwendijk, A. M. C. H.; Porchet, P.; Brussee, J.; Gen, A. Synthesis of γ -hydroxy- α,β -unsaturated esters and nitriles from chiral cyanohydrins. *Tetrahedron*, **2000**, 56, 2491-2495.
- Margolin, A. L.; Delinck, D. L.; Whalon, M. R. Enzyme-catalyzed regioselective acylation of castanospermine. *J. Am. Chem. Soc.*, **1990**, 112 (8), 2849-2854.
- Margolin, A. L. Novel crystalline catalysts. *Trends In Biotechnol.*, **1996**, 14 (7), 223-230.
- Margolin, A. L.; Navia, M. A. Protein crystals as novel catalytic materials. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2001**, 40, 2204-2222.
- Matsubara, S.; Takai, T.; Utimoto, K. Ytterbium tricyanide, a highly efficient catalyst for the addition of cyanotrimethylsilane to carbonyl compounds. *Chem. Lett*, **1991**, 1447-1450.
- Matsuda, T.; Harada, T.; Nakamura, K. Organic synthesis using enzymes in supercritical carbon dioxide. *Green Chem.*, **2004**, 6, 440-444.
- Matthews, G. J.; Hassner, A. Synthesis of oxiranes, aziridines and episulfides. In *Organic Reactions in Steroid Chemistry*, **1972**, Eds. J. Fried, J. A. Edwards, Van Nostrand Reinhold Company: New York, vol. 2, pp. 1-52.
- Maurer, K.-H. Detergent proteases. *Curr. Op. Biotech.*, **2004**, 15, 330-334.

- Mauvais, A.; Hetru, C.; Luu, B. 21,24-Dinorchol-5en-22-yne-3 β ,17,20-triol: Stereoselective synthesis of the four diastereomers as inhibitors of ecdysone biosynthesis. *Tetrahedron Lett.*, **1993**, 34 (27), 4337-4340.
- McNeill, H. G.; Clarke, R. S. J.; Dundee, J. W. Minaxolone – new water-soluble steroid anesthetic, *Lancet* 2, **1979**, 73-74.
- Menéndez, E.; Brieva, R.; Rebolledo, F.; Gotor, V. Optically active (*S*)-ketone- and (*R*)-aldehyde-cyanohydrins *via* an (*R*)-oxynitrilase-catalysed transcyanation. Chemoenzymatic syntheses of 2-cyanotetrahydrofuran and 2-cyanotetrahydropyran. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, **1995**, 989-990.
- Miller, D. D. Brueggemeier, R. W.; Dalton, J. T. Adrenocorticoids. In *Foye's Principles of Medicinal Chemistry*. **2002**, 5th Edition, Eds: D. A. Williams and T. L. Lemke, Lippincott Williams & Wilkins, pp 653-684.
- Mimaki, Y.; Kuroda, M.; Kameyama, A.; Yokosuka, A.; Sashida, Y. Steroidal saponins from the rhizomes of *host A sieboldii* and their cytostatic activity on HL-60 cells. *Phytochemistry*, **1998**, 48 (8), 1361-1369.
- Mimaki, Y.; Kuroda, M.; Fukasawa, T.; Sashida, Y. Steroidal saponins from the bulbs of *Allium karataviense*. *Chem. Pharm. Bull.*, **1999**, 47 (6), 738-743.
- Mischitz, M.; Poschl, U.; Faber, K. Limitations of enzymatic acylation using oxime esters-cosubstrate inhibition and the reversibility of the reaction. *Biotech. Lett.*, **1991**, 13 (9), 653-656.
- Morgan, B.; Dodds, D. R.; Zaks, A.; Andrews, D. R.; Klesse, R. Enzymatic desymmetrization of prochiral 2-substituted-1,3-propanediols: a practical chemoenzymatic synthesis of a key precursor of SCH51048, a broad-spectrum orally active antifungal agent. *J. Org. Chem.*, **1997**, 62 (22), 7736-7743.
- Morgan, B.; Zaks, A.; Dodds, D. R.; Liu, J.; Jain, R.; Megati, S.; Njoroge, F. G.; Girijavallabhan, V. M. Enzymatic kinetic resolution of piperidine atropisomers: synthesis of a key intermediate of the farnesyl protein transferase inhibitor, SCH66336. *J. Org. Chem.*, **2000**, 65 (18), 5451-5459.
- Morisaki, M.; Sato, S.; Ikekawa, N. Studies on steroids. XLV. Synthesis of the four stereoisomers of 20,22-dihydroxycholesterol. *Chem. Pharm. Bull.*, **1977**, 25 (10), 2576-2583.
- Mousseron-Canet, M.; Guilleux, J. C. Orientation stérique de l'époxydation en série stérolique. I.- Réactivité de l'épicholestérol et de l'épiandrosténolone. *Bull. Soc. Chim. France*, **1966**, 3853-3858.
- Mousseron-Canet, M.; Labeeuw, B.; Lanet, J. C. Orientation stérique de l'époxydation en série stérolique. Réactivité de l'hydroxy-19 cholestène-5 et de l'hydroxy-19 androstène-5. *Bull. Soc. Chim. France*, **1968**, 2125-2130.

- Mugford, P. F.; Lait, S. M.; Keay, B. A.; Kazlauskas, R. J. Enantiocomplementary enzymatic resolution of the chiral auxiliary: *cis,cis*-6-(2,2-dimethylpropanamido) spiro [4.4]nonan-1-ol and the molecular basis for the high enantioselectivity of subtilisin Carlsberg. *ChemBioChem*, **2004**, 5, 980-987.
- Murakami, N.; Sugimoto, M.; Morita, M.; Kobayashi, M. Total synthesis of agosterol A: an MDR-modulator from a marine sponge. *Chem. Eur. J.*, **2001**, 7 (12), 2663-2670.
- Muralidhar, R. V.; Chirumamilla, R. R.; Marchant, R.; Ramachandran, V. N.; Ward, O. P.; Nigam, P. Understanding lipase stereoselectivity. *World J. Microbiol. Biotech.*, **2002**, 18, 81-97.
- Nakamura, E.; Kuwajima, I. Stereocontrolled construction of oxygenated steroidal side chains. Synthesis and stereochemistry of despresosterol. *J. Am. Chem. Soc.*, **1985**, 107 (7), 2138-2141.
- Nakata, H. The preparation of 5 α -androstane-3 β ,4 α ,17 β -triol through a hydroboration reaction. *Bull. Chem. Soc. Japan*, **1965**, 38 (3), 378-380.
- Nazabadioko, S.; Pérez, R. J.; Brieva, R.; Gotor, V. Chemoenzymatic synthesis of (*S*)-2-cyanopiperidine, a key intermediate in the route to (*S*)-pipercolic acid and 2-substituted piperidine alkaloids. *Tetrahedron: Asymm.*, **1998**, 9 (9), 1597-1604.
- Nitta, I.; Fujimori, S.; Ueno, H. The syntheses of the corticoid side-chain .1. An improved method for the preparation of 17- α -hydroxyprogesterone from androst-4-ene-3,17-dione. *Bull. Chem. Soc. Japan*, **1985**, 58, 978-980.
- Njar, V. C. O.; Caspi, E. Enzymatic transesterification of steroid esters in organic solvents. *Tetrahedron Lett.*, **1987**, 28 (52), 6549-6552.
- Noguchi, S.; Morita, K.; Nishikawa, M. Enzymatic hydrolysis of steroidal esters and its application to synthesis of steroids. *Chem. Pharm. Bull.*, **1960**, 8 (6), 563-565.
- Nordin, O.; Vu Nguyen, B.; Vörde, C.; Hedenström, E.; Högberg, H. E. Kinetic resolution of primary 2-methyl – substituted alcohols via *Pseudomonas cepacia* lipase-catalysed enantioselective acylation. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I*, **2000**, 1, 367-376.
- Noritomi, H.; Almarsson, O.; Barletta, G. L.; Klibanov, A. M. The influence of the mode of enzyme preparation on enzymatic enantioselectivity in organic solvents and its temperature dependence. *Biotech. Bioeng.* **1996**, 51 (1), 95-99.
- North, M. Catalytic asymmetric cyanohydrin synthesis. *Synlett*, **1993**, 807-820.
- North, M. Synthesis and applications of non-racemic cyanohydrins. *Tetrahedron: Asymm.*, **2003**, 14, 147-176.
- Numazawa, M.; Tachibana, M. Aromatase inactivation by a suicide substrate, androst-5-ene-4,7,17-trione: The 5 β ,6 β -epoxy-19-oxo derivative, as a possible reactive electrophile irreversibly binding to the active site. *Biol. Pharm. Bull.*, **1997a**, 20 (5), 490-495.

- Numazawa, M.; Tachibana, M. Studies directed toward a mechanistic evaluation of aromatase inhibition by androst-5-ene-7,17-dione. *Steroids*, **1997b**, 62, 516-522.
- Numazawa, M.; Yamada, K. Studies of the time-dependent inactivation of aromatase by 4 β ,5 β -epoxy-6-one and 5 β ,6 β -epoxy-4-one steroids under various conditions. *Biol. Pharm. Bull.*, **1999**, 22 (11), 1207-1211.
- O'Callaghan, Y. C.; Woods, J. A.; Brien, N. M. Comparative study of the cytotoxicity and apoptosis-inducing potential of commonly occurring oxysterols. *Cell Biology Toxicol.*, **2001**, 17, 127-137.
- Ognyanov, V. I.; Datcheva, V. K.; Kyler, K. S. Preparation of chiral cyanohydrins by an oxynitrilase-mediated transcyanation. *J. Am. Chem. Soc.*, **1991**, 113, 6992-6996.
- Öhrner, N.; Orrenius, C.; Mattson, A. Norin, T.; Hult, K. Kinetic resolutions of amine and thiol analogues of secondary alcohols catalyzed by the *Candida antarctica* lipase B. *Enzyme Microb. Technol.*, **1996**, 19, 328-331.
- Okrasa, K.; Guibé-Jampel, E.; Therisod, M. Ionic liquids as a new reaction medium for oxidase-peroxidase-catalyzed sulfoxidation. *Tetrahedron: Asymm.*, **2003**, 14, 2487-2490.
- Oku, J.; Ito, N.; Inoue, S. Asymmetric cyanohydrin synthesis catalyzed by synthetic dipeptides.1. *Macromolec. Chem.Phys.*, **1979**, 180 (4), 1089-1091.
- Oku, J.; Inoue, S. Asymmetric cyanohydrin synthesis catalyzed by a synthetic cyclic dipeptide. *J. Chem. Soc. Chem. Comm.*, **1981**, 5, 229-230.
- Orr, R.; Singh, M. F. The anabolic androgenic steroid oxandrolone in the treatment of wasting and catabolic disorders. *Drugs*, **2004**, 64 (7), 725-750.
- O'Sullivan, A. J.; O'Callaghan, Y. C.; Woods, J. A.; O'Brien, N. M. Toxicity of cholesterol oxidation products to Caco-2 and HepG2 cells: Modulatory effects of alpha- and gamma-tocopherol. *J. Appl. Toxicol.* **2003**, 23 (3), 191-197.
- Oshida, J.; Okamoto, M.; Azuma, S. Chemoenzymatic synthesis of 1 α ,24(R)-dihydroxycholesterol. *Tetrahedron: Asymm.*, **1999**, 10, 2337-2342.
- Osório, N. M.; Ferreira-Dias, S.; Gusmão, J. H.; Fonseca, M. M. R. Response surface modelling of the production of ω 3 polyunsaturated fatty acids-enriched fats by a commercial immobilized lipase. *J. Mol. Cat. B: Enzymatic*, **2001**, 11, 677-686.
- Ottolina, G.; Carrea, G.; Riva, S. Regioselective enzymatic preparation of hemisuccinates of polyhydroxylated steroids. *Biocatalysis*, **1991**, 5, 131-136.
- Paizs, C.; Tosa, M.; Majdik, C.; Tähtinen, P.; Irimie, F. D.; Kanerva, L. T. *Candida antarctica* lipase A in the dynamic resolution of novel furylbenzotiazol-based cyanohydrin acetates. *Tetrahedron: Asymm.*, **2003**, 14, 619-627.

- Paizs, C.; Tähtinen, P.; Tosa, M.; Majdik, C.; Irimie, F. D.; Kanerva, L. T. Biocatalytic enantioselective preparation of phenothiazine-based cyanohydrin acetates: kinetic and dynamic kinetic resolution. *Tetrahedron*, **2004**, 60, 10533-10540.
- Pàmies, O.; Bäckvall, J. E. Dynamic kinetic resolution of β -azido alcohols. An efficient route to chiral aziridines and β -amino alcohols. *J. Org. Chem.*, **2001**, 66 (11), 4022-4025.
- Pàmies, O.; Bäckvall, J.E. Combination of enzymes and metal catalysts. A powerful approach in asymmetric catalysis. *Chem. Rev.*, **2003**, 103 (8), 3247-3261.
- Pàmies, O.; Bäckvall, J.-E. Chemoenzymatic dynamic kinetic resolution. *Trends In Biotech.*, **2004**, 22 (3), 130-135.
- Panke, S.; Held, M.; Wubbolts, M. Trends and innovations in industrial biocatalysis for the production of fine chemicals. *Curr. Op. Biotech.*, **2004**, 15, 272-279.
- Parales, R. E.; Haddock, J. D. Biocatalytic degradation of pollutants. *Curr. Op. Biotech.*, **2004**, 15, 374-379.
- Park, S.; Kazlauskas, R. J. Improved preparation and use of room-temperature ionic liquids in lipase-catalyzed enantio- and regioselective. *J. Org. Chem.*, **2001**, 66, 8395-8401.
- Patel, R. N. Enzymatic synthesis of chiral intermediates for drug development. *Adv. Synth. Catal.*, **2001**, 343 (6-7), 527-546.
- Patel, R. N. Biocatalytic synthesis of chiral pharmaceutical intermediates. *Food Technol. Biotechnol.*, **2004**, 42 (4), 305-325.
- Pellissier, H. L.; Santelli, M. Chemical and biochemical hydroxylations of steroids. A review. *Org. Prep. Proc. Int.*, **2001**, 33 (1), 1-58.
- Peng, L.; Li, Y.; Li, W. Z. A concise and stereoselective synthesis of the brassinolide and related compound's side chains. *Tetrahedron Lett.*, **2003**, 44, 3991-3993.
- Persson, B. A.; Larsson, A. L. E.; Ray, M.; Bäckvall, J.-E. Ruthenium- and enzyme-catalyzed dynamic kinetic resolution of secondary alcohols. *J. Am. Chem. Soc.*, **1999**, 121, 1645-1650.
- Piatak, D. M.; Wicha, J. Various approaches to the construction of aliphatic side chains of steroids and related compounds. *Chem. Rev.*, **1978**, 78 (3), 199-241.
- Plattner, P. A.; Petrzilka, T.; Lang, W. *Helv. Chim. Acta*, **1944**, 27, 513-524.
- Pogorevc, M.; Faber, K. Biocatalytic resolution of sterically hindered alcohols, carboxylic acids and esters containing fully substituted chiral centers by hydrolytic enzymes. *J. Mol. Cat. B. Enzymatic*, **2000**, 10, 357-376.
- Raaphorst, G. P.; Azzam, E. I.; Langlois, R.; van Lier, J. E. Effect of cholesterol α and β epoxides on cell killing and transformation. *Biochem. Pharmacol.*, **1987**, 36 (14), 2369-2372.

Bibliografia

- Ramasseul, R.; Tavarès, M.; Marchon, J. C. Efficient epoxidation of cholesterol and cholesteryl acetate by dioxygen in the presence of isobutyraldehyde. Metalloporphyrin-enhanced β -diastereofacial selectivity of epoxidation. *J. Chem. Research (S)*, **1992**, 104-105.
- Rao, C. B.; Ramana, K. V.; Rao, D. V.; Fahy, E.; Faulkner, D. J. Metabolites of the gorgonian *Isis hippuris* from India. *J. Nat. Prod.*, **1988**, 51 (5), 954-958.
- Redpath J; Zeelen, F. J. Stereoselective synthesis of steroid side-chains. *Chem. Soc. Rev.*, **1983**, 12, 75-98.
- Reetz, M. T.; Zonta, A.; Simpelkamp, J. Efficient heterogeneous biocatalysts by entrapment of lipases in hydrophobic sol-gel materials. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **1995**, 34 (3), 301-303.
- Reetz, M. T.; Wiesenhofer, W.; Francio, G.; Leitner, W. Biocatalysis in ionic liquids: batchwise and continuous flow processes using supercritical carbon dioxide as the mobile phase. *Chem. Commun.*, **2002**, 992-993.
- Reetz, M. T.; Tielmann, P.; Wiesenhöfer, W.; Könen, W.; Zonta, A. Second generation sol-gel encapsulated lipases: Robust heterogeneous biocatalysts. *Adv. Synth. Catal.*, **2003**, 345 (6-7), 717-728.
- Rich, J. O.; Michels, P. C.; Khmel'nitsky, Y. L. Combinatorial biocatalysis. *Curr. Op. Chem. Biol.*, **2002**, 6 (2), 161-167.
- Riva, S.; Bovara, R.; Pasta, P.; Carrea, G. Preparative-scale region- and stereospecific oxidoreduction of cholic acid and dehydrocholic acid catalyzed by hydroxysteroid dehydrogenases. *J. Org. Chem.*, **1986**, 51, 2902-2906.
- Riva, S.; Bovara, R.; Zetta, L.; Pasta, P.; Ottolina, G.; Carrea, G. Enzymatic α/β inversion of C-3 hydroxyl of bile acids study of the effects of organic solvents on reaction rates. *J. Org. Chem.*, **1988**, 53 (1), 88-92.
- Riva, S.; Klivanov, A. M. Enzymochemical regioselective oxidation of steroids without oxidoreductases. *J. Am. Chem. Soc.*, **1988**, 110, 3291-3295.
- Riva, S.; Ottolina, G.; Carrea, G.; Danieli, B. Efficient preparative-scale enzymatic synthesis of specifically deuteriated bile acids. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I*, **1989a**, 2073-2074.
- Riva, S.; Bovara, R.; Ottolina, G.; Secundo, F.; Carrea, G. Regioselective acylation of bile acid derivatives with *Candida cylindracea* lipase in anhydrous benzene. *J. Org. Chem.*, **1989b**, 54 (13), 3161-3164.
- Riva, S. Enzymatic modification of steroids. In *Applied Biocatalysis*, **1991**, Vol. 1, Eds H. W. Blanch e D. S. Clark, Marcel Dekker, Inc, pp. 179-220.
- Riva, S. Biocatalytic modification of natural products. *Curr. Op. Chem. Biol.*, **2001**, 5, 106-111.

- Riva, S. Enzymatic modification of the sugar moieties of natural glycosides. *J. Mol. Cat. B: Enzymatic*, **2002**, 19-20, 43-54.
- Roberts, S. M.; Turner, N. J.; Willetts, A. J.; Turner, M. K. *Introduction to Biocatalysis using Enzymes and Micro-organisms*, **1995**, Cambridge University Press, pp. 34-79.
- Roberts, S. M. Preparative biotransformations. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, **2001**, 1475-1499.
- Roccatagliata, A. J.; Maier, M. S.; Seldes, A. M. New sulfated polyhydroxysteroids from the antarctic ophiuroid *Astrotoma agassizii*. *J. Nat. Prod.*, **1998**, 61 (3), 370-374.
- Roda, G.; Riva, S.; Danieli, B. Almond oxynitrilase-catalyzed transformation of aldehydes is strongly influenced by naphthyl and alkoxy substituents. *Tetrahedron: Asymm.*, **1999**, 10, 3939-3949.
- Roda, G.; Riva, S.; Danieli, B.; Griengl, H.; Rinner, U.; Schmidt, M.; Zabelinskaja, A. M. Selectivity of the (*S*)-oxynitrilase from *Hevea brasiliensis* towards α - and β -substituted aldehydes. *Tetrahedron*, **2002**, 58, 2979-2983.
- Rogers, L. L.; Zeng, L.; McLaughlin, J. L. New bioactive steroids from *Melia volkensii*. *J. Org. Chem.*, **1998**, 63 (11), 3781-3785.
- Romo, J.; Rodriguez-Hahn, L.; Joseph-Nathan, P.; Martinez, M.; Crabbé, P. Étude des composés d'hydrolyse du groupe cyano en C-16 dans les séries de l'androstane, du pregnane et du 17-isopregnane. *Bull. Soc. Chim. France*, **1964**, 6, 1276-1287.
- Roos, J.; Stelzer, U.; Effenberger, F. Synthesis of (1*R*, *cis*, α ,*S*)-cypermethrin via lipase catalyzed kinetic resolution of racemic *m*-phenoxybenzaldehyde cyanohydrin acetate. *Tetrahedron: Asymm.*, **1998**, 9, 1043-1049.
- Rotticci, D.; Rotticci-Mulder, J. C.; Denman, S.; Norin, T.; Hult, K. Improved enantioselectivity of a lipase by rational protein engineering. *ChemBiochem*. **2001**, 2, 766-770.
- Roy, J. J.; Abraham, T. E. Strategies in making cross-linked enzyme crystals. *Chem. Rev.*, **2004**, 104 (9), 3705-3721.
- Rowland, A. T.; Nace, H. R. Synthesis of 5 β ,6 β -oxidosteroids from 5 α ,6 β -diol diacetates. *J. Am. Chem. Soc.*, **1960**, 82, 2833-2836.
- Ruan, B.; Wilson, W. K.; Schroepfer Jr., G. J. An improved synthesis of (20*R*,22*R*)-cholest-5-ene-3 β ,20,22-triol, an intermediate in steroid hormone formation and an activator of nuclear orphan receptor LXR α . *Steroids*, **1999**, 64, 385-395.
- Rubio, E.; Fernandez-Mayorales, A.; Klibanov, A. M. Effect of the solvent on enzyme regioselectivity. *J. Am. Chem. Soc.*, **1991**, 113 (2): 695-696.
- Rudi, A.; Yosief, T.; Loya, S.; Hizi, A.; Schleyer, M.; Kashman, Y. Clathsterol, a novel anti-HIV-1 RT sulfated sterol from the sponge *Clathria* species. *J. Nat. Prod.*, **2001**, 64, 1451-1453.

- Ruzicka, L.; Muhr, A. C. Steroide und sexualhormone. Über die hydrierung der beiden oxyde von trans-dehydroandrosteron-acetat. *Helv. Chim. Acta*, **1944a**, 27, 503-513.
- Ruzicka, L.; Muhr, A. C. Über steroide und sexualhormone. Einführung einer hydroxyl-gruppe in stellung 5 des sterinskeletts durch hydrierung von 5,6 – bzw. 4,5-oxido-verbindungen. *Helv. Chim. Acta*, **1944b**, 27, 513-524.
- Sakurai, T.; Margolin, A. L. Russell, A. J.; Klibanov, A. M. Control of enzyme enantioselectivity by the reaction medium. *J. Am. Chem. Soc.*, **1988**, 110, 7236-7237.
- Salvador, J. A. R.; Sá e Melo, M. L.; Campos Neves, A. S. Ultrasound assisted zinc reactions in synthesis 2. A new Clemmensen-type reduction. *Tetrahedron Lett.*, **1993a**, 34, 361-362.
- Salvador, J. A. R.; Sá e Melo, M. L.; Campos Neves, A. S. Ultrasound assisted zinc reactions in synthesis.1. Efficient reduction of enones. *Tetrahedron Lett.*, **1993b**, 34, 357-360.
- Salvador, J. A. R.; Sá e Melo, M. L.; Campos Neves, A. S. Oxidations with potassium permanganate-metal sulphates and nitrates. β -selective epoxidation of Δ^5 -unsaturated steroids. *Tetrahedron Lett.*, **1996**, 37 (5), 687-690.
- Santaniello, E.; Ferraboschi, P.; Reza-Elahi, S. Lipase-catalyzed regio- and stereoselective acylation of hydroxy groups in steroid side chains. *Monatsh. Chem.*, **2000**, 131, 617-622.
- Sardesai, Y. N.; Bhosle, S. Industrial potential of organic solvent tolerant bacteria. *Biotechn. Progr.*, **2004**, 20 (3), 655-660.
- Schambel, P.; Viger, A.; Marquet, A. Synthèse d'une nouvelle lactone en série stéroïde: une hydrolyse de nitrile en milieu neutre. *Tetrahedron Lett.*, **1987**, 28 (36), 4161-4162.
- Scheid, G.; Ruijter, E.; Bessler, M. K.; Bornscheuer, U. T. Wessjohann, L. A. Synthesis and resolution of a key building block for epothilones: a comparison of asymmetric synthesis, chemical and enzymatic resolution. *Tetrahedron: Asymm.*, **2004**, 15, 2861-2869.
- Schmid, A.; Dordick, J. S.; Hauer, B.; Kiener, A.; Wubbolts, M.; Witholt, B. Industrial biocatalysis today and tomorrow. *Nature*, **2001**, 409, 258-268.
- Schmid, R. D.; Verger, R. Lipases: Interfacial enzymes with attractive applications. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **1998**, 37 (12), 1608-1633.
- Schoemaker, H. E.; Mink, D.; Wubbolts, M. G. Dispelling the myths – biocatalysis in industrial synthesis, *Science*, **2003**, 299, 1694-1697.
- Schöfer, S. H.; Kaftzik, N.; Wasserscheid, P.; Kragl, U. Enzyme catalysis in ionic liquids: lipase catalysed kinetic resolution of 1-phenylethanol with improved enantioselectivity. *Chem. Comm.*, **2001** (5), 425-426.

- Schroepfer, G. J. Oxysterols: modulators of cholesterol metabolism and other processes. *Physiol. Rev.*, **2000**, 80 (1), 361-554.
- Schulze, B.; Wubbolts, M. G. Biocatalysis for industrial production of fine chemicals. *Curr. Op. Biotech.*, **1999**, 10, 609-615.
- Secundo, F.; Riva, S.; Carrea, G. Effects of medium and reaction conditions on the enantioselectivity of lipase in organic solvents and possible rationales. *Tetrahedron: Asymm.*, **1992**, 3 (2), 267-280.
- Secundo, F.; Carrea, G. Lipase activity and conformation in neat organic solvents. *J. Mol. Cat. B: Enzymatic*, **2002**, 19-20, 93-102.
- Secundo, F.; Carrea, G.; De Amici, M.; Joppolo di Ventimiglia, S.; Dordick, J. S. A combinatorial biocatalysis approach to an array of cholic acid derivatives. *Biotechnol. Bioeng.*, **2003**, 81 (4), 391-396.
- Selye, H. Hormones and resistance. *J. Pharm. Sci.*, **1971**, 60, 1-28.
- Sevastian, A.; Peterson, A. R. Cholesterol epoxide is a direct-acting mutagen. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1984**, 81, 4198-4202.
- Shahidi, N. T. A review of the chemistry, biological action, and clinical applications of anabolic-androgenic steroids. *Clinical Therapeutics*, **2001**, 23 (9), 1355-1390.
- Sheldon, R. A. Atom efficiency and catalysis in organic synthesis. *Pure Appl. Chem.*, **2000**, 72 (7), 1233-1246.
- Sheldon, R. A.; Madeira Lau, R.; Sorgedrager, M. J.; van Rantwijk, F.; Seddon, K. R. Biocatalysis in ionic liquids. *Green Chem.*, **2002**, 4, 147-151.
- Sheldon, R. A. Green Solvents for sustainable organic synthesis: state of the art. *Green Chem.*, **2005**, 7, *in press*.
- Sherman, J.; Chin, B.; Huibers, P. D. T.; Garcia-Valls, R.; Hatton, T. A. Solvent replacement for green processing. *Environ. Health Perspect.*, **1998**, 106, 253-271.
- Shimizu, K.; Gut, M.; Dorfman, R. I. 20α , 22ξ -Dihydroxycholesterol, an intermediate in biosynthesis of pregnenolone (3β -hydroxypregn-5-en-20-one) from cholesterol. *J. Biol. Chem.*, **1962**, 237 (3), 699-702.
- Shiota, M.; Ogihara, T.; Watanabe, Y. The formation and the reactions of 3α -chloro-5, 6β -epoxy- 5β -cholestane. *Bull. Chem. Soc. Japan*, **1961**, 34 (1), 40-42.
- Shoppee, C. W.; Jones, D. N.; Summers, G. H. R. Steroids and walden inversion. Part XXXVII. The epimeric cholestane-2 : 3-diols. *J. Chem. Soc.*, **1957**, 3100-3107.

- Silvestre, S. M.; Salvador, J. A. R.; Clark, J. H. β -Selective epoxidation of Δ^5 -steroids by O_2 using surface functionalised silica supported cobalt catalysts. *J. Mol. Cat. A: Chemical*, **2004**, 219, 143-147.
- Singh, N.; Lee, D. G. Permanganate: a green and versatile industrial oxidant. *Org. Proc. Res. Dev.*, **2001**, 5, 599-603.
- Sitruk-Ware, R. New progestogens. A review of their effects in perimenopausal and postmenopausal women. *Drugs Aging*, **2004**, 21 (13), 865-883.
- Slotema, W. F.; Sandoval, G.; Guieysse, D.; Straathof, A. J. J.; Marty, A. Economically pertinent continuous amide formation by direct lipase-catalyzed amidation with ammonia. *Biotech. Bioeng.*, **2003**, 82 (6), 664-669.
- Smith, J. G.; Synthetically useful reactions of epoxides. *Synthesis*, **1984**, 629-656.
- Smith, L.L. Review of progress in sterol oxidations: 1987-1995. *Lipids*, **1996**, 31, 453-487.
- Solis, A.; Luna, H.; Manjarrez, N.; Perez, H. I. Study on the (*R*)-oxynitrilase activity of *Pouteria sapota*. *Tetrahedron*, **2004**, 60 (46), 10427-10431.
- Srivastava, B. K.; Kumar, A.; Dwivedy, I.; Ray, S. Temperature controlled stereospecific epoxidation of 5-androsten-3 β ,17 β -diol diacetate. Preparation of 6 α - and 6 β -substituted androstane derivatives. *Ind. J. Chem.*, **2001**, 40B (5), 410-413.
- St. Clair, N. L.; Navia M. A. Cross-linked enzyme crystals as robust biocatalysts. *J. Am. Chem. Soc.*, **1992**, 114 (18), 7314-7316.
- St. Clair, N. L.; Wang, Y. F.; Margolin, A. L. Cofactor-bound cross-linked enzyme crystals (CLEC) of alcohol dehydrogenase. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2000**, 39 (2), 380-383.
- Staebler, A.; Cruz, A.; van der Goot, W.; Pinheiro, H. M.; Cabral, J. M. S.; Fernandes, P. Optimization of androstenedione production in an organic-aqueous two-liquid phase system. *J. Mol. Cat. B: Enzymatic*, **2004**, 29, 19-23.
- Stecher, H.; Faber, K. Biocatalytic deracemization techniques: Dynamic resolutions and stereoinversions. *Synthesis*, **1997**, (1), 1-16.
- Stelzer, U.; Effenberger, F. Preparation of (*S*)-fluoronitriles. *Tetrahedron: Asymm.*, **1993**, 4 (2), 161-164.
- Szendi, Z.; Forgó, P.; Sweet, F. Complete 1H and ^{13}C NMR spectra of pregnenolone. *Steroids*, **1995**, 60, 442-446.
- Syamala, M. S.; Das, J.; Baskaran, S.; Chandrasekaran, S. A novel and highly β -selective epoxidation of Δ^5 -unsaturated steroids with permanganate ion. *J. Org. Chem.*, **1992**, 57 (6), 1928-1930.

- Tamarez, M.; Morgan, B.; Wong, G. S. K.; Tong, W.; Bennett, F.; Lovey, R.; McCormick, J. L.; Zaks, A. Pilot-scale lipase-catalyzed regioselective acylation of ribavirin in anhydrous media in the synthesis of a novel produg intermediate. *Org. Proc. Res. Dev.*, **2003**, 7 (6), 951-953.
- Tammela, T. Endocrine treatment of prostate cancer. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, **2004**, 92 (4): 287-295.
- Tanaka, K.; Mori, A.; Inoue, S. The cyclic dipeptide *cyclo*[(*S*)-phenylalanyl-(*S*)-histidyl] as a catalyst for asymmetric addition of hydrogen cyanide to aldehydes. *J. Org. Chem.*, **1990**, 55, 181-185.
- Tararov, V. I.; Hibbs, D. E.; Hursthouse, M. B.; Ikonnikov, N. S.; Malik, K. M. A.; North, M.; Orizu, C.; Belokon, Y. N. First structurally defined catalyst for the asymmetric addition of trimethylsilyl cyanide to benzaldehyde. *Chem. Commun.*, **1998**, 387-388.
- Tavarès, M.; Ramasseul, R.; Marchon, J. C.; Bachet, B.; Brassy, C.; Mornon, J. P. Catalytic β -stereospecific epoxidation of unsaturated steroids by *trans*-dioxoruthenium (VI) tetramesitylporphyrin. Stereochemical grounds for the β -diastereofacial selection. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2*, **1992**, 1321-1329.
- Thompson, M. J.; Meudt, W. J.; Mandava, N. B.; Dutky, S. R.; Lusby, W. R.; Spaulding, D. W. Synthesis of brassinosteroids and relationship of structure to plant growth-promoting effects. *Steroids*, **1982**, 39 (1), 89-105.
- Tömörkény, E.; Tóth, G.; Horváth, G.; Büki, K. G. Microbial transformation of steroidal 3-oxo-4-hydroxy-4-enes. *Acta Chim. Acad. Sci. Hung.*, **1975**, 87 (4), 409-418.
- Trost, B. M. Atom economy – a challenge for organic-synthesis – homogeneous catalysis leads the way. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **1995**, 34 (3), 259-281.
- Tsukamoto, S.; Tatsuno, M.; van Soest, R. W. M.; Yokosawa, H.; Ohta, T. New polyhydroxy sterols: proteasome inhibitors from a marine sponge *Acanthodendrilla* sp. *J. Nat. Prod.*, **2003**, 66 (9), 1181-1185.
- Utimoto, K.; Wakabayashi, Y.; Horie, T.; Inoue, M.; Shishiyama, Y.; Obayashi, M.; Nozaki, H. Cyanotrimethylsilane as a versatile reagent for introducing cyanide functionality. *Tetrahedron*, **1983**, 39 (6), 967-973.
- van Langen, L. M.; van Rantwijk, F.; Sheldon, R. A. Enzymatic hydrocyanation of a sterically hindered aldehyde. Optimization of a chemoenzymatic procedure for (R)-2-chloromandelic acid. *Org. Proc. Res. Dev.*, **2003a**, 7 (6), 828-831.
- van Langen, L. M.; Oosthoek, N. H. P.; van Rantwijk, F.; Sheldon, R. A. Penicillin acylase catalysed synthesis of ampicillin in hydrophilic organic solvents. *Adv. Synth. Catal.*, **2003b**, 345 (6-7), 797-801.

- van Langen, L. M.; Selassa, R. P.; van Rantwijk, F.; Sheldon, R. A. Cross-linked aggregates of (R)-oxynitrilase: A stable, recyclable biocatalyst for enantioselective hydrocyanation. *Org. Lett.*, **2005**, 7 (2), 327-329.
- van Rantwijk, F.; Sheldon, R. A. Enantioselective acylation of chiral amines catalysed by serine hydrolases. *Tetrahedron*, **2004**, 60, 501-519.
- Vänttinen, E.; Kanerva, L. T. Combination of the lipase-catalysed resolution with the Mitsunobu esterification in one pot. *Tetrahedron: Asymm.*, **1995**, 6 (7), 1779-1786.
- Veit, T. Biocatalysis for the production of cosmetic ingredients. *Eng. Life Sci.*, **2004**, 4 (6), 508-511.
- Veum, L.; Hanefeld, U. Enantioselective formation of mandelonitrile acetate: investigation of a dynamic kinetic resolution II. *Tetrahedron: Asymm.*, **2004**, 15, 3707-3709.
- Veum, L.; Hanefeld, U.; Pierre, A. The first encapsulation of hydroxynitrile lyase from *Hevea brasiliensis* in a sol-gel matrix. *Tetrahedron*, **2004**, 60, 10419-10425.
- Virtanen, E.; Kolehmainen, E. Use of bile acids in pharmacological and supramolecular applications. *Eur. J. Org. Chem.*, **2004**, 3385-3399.
- Vu, P.-L.; Shin, J.-A.; Lim, C.-H.; Lee, K.-T. Lipase-catalyzed production of phytosteryl esters and their crystallization behavior in corn oil. *Food Res. Int.*, **2004**, 37, 175-180.
- Wagner, U. C.; Hasslacher, M.; Griengl, H.; Schwab, H.; Kratky, C. Mechanism of cyanogenesis: the crystal structure of hydroxynitrile lyase from *Hevea brasiliensis*. *Structure*, **1996**, 4 (7), 811-822.
- Wang, Y.-F.; Lalonde, J. J.; Momongan, M.; Bergbreiter, D. E.; Wong, C.-H. Lipase-catalyzed irreversible transesterifications using enol esters as acylating reagents: preparative enantio- and regioselective syntheses of alcohols, glycerol derivatives, sugars, and organometallics. *J. Am. Chem. Soc.*, **1988**, 110 (21), 7200-7205.
- Wang, Y.-F.; Yakovlevsky, K.; Zhang, B.; Margolin, A. Cross-linked crystals of subtilisin: versatile catalyst for organic synthesis. *J. Org. Chem.*, **1997**, 62, 3488-3495.
- Wang, W.; Jang, H.; Hong, J.; Lee, C.-O.; Im, K. S.; Bae, S. -J.; Jung, J. H. Additional cytotoxic sterols and saponins from the starfish *Certonardoa semiregularis*. *J. Nat. Prod.*, **2004**, 67, 1654-1660.
- Warmerdam, E. G. J. C.; Brussee, J.; Kruse, C. G.; van der Gen, A. Inversion of the configuration of cyanohydrins by a Mitsunobu esterification reaction. *Tetrahedron*, **1993**, 49 (5), 1063-1070.
- Weber, N.; Klein, E.; Vossman, K.; Mukherjee, K. D. Mono-thioesters and di-thioesters by lipase-catalyzed reactions of α,ω -alkanedithiols with palmitic acid or its methyl ester. *Appl. Microbial Biotechnol.*, **2004**, 64, 800-805.
- Wehtje, E.; Adlercreutz, P.; Mattiasson, B.; Formation of C-C bonds by mandelonitrile lyase in organic solvents. *Biotech. Bioeng.*, **1990**, 36, 39-46.

- Weissfloch, A. N. E.; Kazlauskas, R. J. Enantioference of lipase from *Pseudomonas cepacia* toward primary alcohols. *J. Org. Chem.*, **1995**, 60 (21), 6959-6969.
- Wiegratz, I.; Kuhl, H. Progestogen therapies: differences in clinical effects? *Trends In Endocrinol. Metab.*, **2004**, 15 (6), 277-285.
- Wilkinson, H. S.; Grover, P. T.; Vandebossche, C. P.; Bakale, R. P.; Bhongle, N. N.; Wald, S. A.; Senanayake, C. H. A new lithium alkoxide accelerated diastereoselective cyanation of ketones. *Org. Lett.*, **2001**, 3 (4), 553-556.
- Williamson, K. L.; Johnson, W. S. Ring-A α -acetoxy ketones in the cholestane series. *J. Org. Chem.*, **1961**, 26, 4563-4569.
- Woodward, R. B.; Brucher, F. V. *cis*-Hydroxylation of synthetic steroid intermediate with iodine, silver acetate and wet acetic acid. *J. Am. Chem. Soc.*, **1958**, 80, 209-211.
- Wynne, K. N.; Renwick, A. G. C. The preparation of 16 β -hydroxydehydroepiandrosterone. *Steroids*, **1972**, 293-300.
- Yadav, J. S.; Reddy, B. V. S.; Reddy, M. S.; Prasad, A. R. Iodine as novel reagent for the 1,2-addition of trimethylsilyl cyanide to ketones including α,β -unsaturated ketones. *Tetrahedron Lett.*, **2002**, 43, 9703-9706.
- Yadav, G. D.; Joshi, S. S.; Lathi, P. S. Enzymatic synthesis of isoniazid in non-aqueous medium. *Enzyme Microb. Technol.*, **2005**, 36, 217-222.
- Yamada, T.; Imagawa, K.; Mukaiyama, T. β -Selective epoxidation of cholesterol derivatives with molecular oxygen and aldehyde catalyzed by manganese (II) complex. *Chem. Lett.*, **1992**, 2109-2112.
- Yamamoto, Y.; Abe, H.; Nishii, S.; Yamada, J. Enantiodivergent synthesis of steroidal side-chains - stereocontrol via $sn1$ -type vs $sn2$ -type cleavage of acetal templates. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I*, **1991**, 3253-3257.
- Yang, Y.; Wang, D. The addition of trimethylsilyl cyanide to carbonyl compounds using $Yb(OTf)_3$ as Lewis acid catalyst. *Synlett*, **1997**, 1379-1380.
- Yang, D.; Jiao, G. S. Highly β -selective epoxidation of Δ^5 -unsaturated steroids catalyzed by ketones. *Chem. Eur. J.*, **2000**, 6 (19), 3517-3521.
- Yang, L.; Dordick, J. S.; Garde, S. Hydration of enzyme in nonaqueous media is consistent with solvent dependence of its activity. *Biophysical J.*, **2004**, 87 (2): 812-821.
- Yazbeck, D. R.; Martinez, C. A.; Hu, S. Tao, J. Challenges in the development of an efficient enzymatic process in the pharmaceutical industry. *Tetrahedron: Asymm.*, **2004**, 15, 2757-2763.

Bibliografia

- Yoshida, M.; Murata, M.; Inaba, K.; Morisawa, M. A chemoattractant for ascidian spermatozoa is a sulfated steroid. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **2002**, 99 (23), 14831-14836.
- Zaks, A.; Klibanov, A. M. Enzymatic catalysis in organic media at 100° C. *Science*, **1984**, 224, 1249-1251.
- Zaks, A.; Klibanov, A. M. Enzyme-catalyzed processes in organic solvents. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1985**, 82, 3192-3196.
- Zaks, A.; Klibanov, A. M. Enzymatic catalysis in nonaqueous solvents. *J. Biol. Chem.*, **1988a**, 263 (7), 3194-3201.
- Zaks, A.; Klibanov, A. M. The effect of water on enzyme action in organic media. *J. Biol. Chem.*, **1988b**, 263 (17), 8017-8021.
- Zaks, A. Industrial Biocatalysis. *Curr. Op. Chem. Biol.*, **2001**, 5, 130-136.
- Zandbergen, P.; van der Linden, J.; Brussee, J.; van der Gen, A. Synthesis of optically-active cyanohydrins using almond meal. *Synth. Commun.*, **1991**, 21, 1387-1395.
- Zavod, R. M. Calcium homeostasis. In *Foye's Principles of Medicinal Chemistry*. **2002**, 5th Edition, Eds: D. A. Williams and T. L. Lemke, Lippincott Williams & Wilkins, pp 739-750.
- Zha, D. X.; Wilensek, S.; Hermes, M.; Jaeger, K. E.; Reetz, M. T. Complete reversal of enantioselectivity of an enzyme-catalyzed reaction by directed evolution. *Chem. Comm.*, **2001**, 2664-2665.
- Zhang, J. L.; Che, C. M. Soluble polymer-supported ruthenium porphyrin catalysts for epoxidation, cyclopropanation, and aziridination of alkenes. *Org. Lett.*, **2002**, 4 (11), 1911-1914.
- Zuegg, J.; Gruber, K.; Gugganig, M.; Wagner, U. G.; Kratky, C. Three-dimensional structures of enzyme-substrate complexes of the hydroxynitrile lyase from *Hevea brasiliensis*. *Protein Sci.*, **1999**, 8 (10), 1990-2000.