Universidade de São Paulo

Instituto de Química

Programa de pós-graduação em química

Patrícia Bulegon Brondani

**Investigação da seletividade de mono-oxigenases
frente a substratos orgânicos de boro ou de selênio**

Versão corrigida da tese defendida

São Paulo

Data do depósito na SPG:

10/06/2012

Patrícia Bulegon Brondani

Investigação da seletividade de mono-oxigenases frente a
substratos orgânicos de boro ou de selênio

*Tese apresentada ao Instituto de Química da
Universidade de São Paulo para obtenção do título de
Doutor em Ciências (Programa Química)*

Orientador: Prof. Dr. Leandro Helgueira de Andrade

São Paulo

2012

Ficha Catalográfica
Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

Brondani, Patrícia Bulegon
B869i Investigação da seletividade de mono-oxigenases frente a
substratos orgânicos de boro ou de selênio / Patrícia Bulegon
Brondani. -- São Paulo, 2012.
195p.

Tese (doutorado) – Instituto de Química da Universidade
de São Paulo. Departamento de Química Fundamental.
Orientador: Andrade, Leandro Helgueira de

1. Síntese : Química orgânica 2. Reações catalisadas por
enzimas I. T. II. Andrade, Leandro Helgueira de, orientador.

547.2 CDD

“Investigação da seletividade de mono-oxigenases frente a substratos orgânicos de boro ou de selênio”

Patrícia Bulegon Brondani

Tese de Doutorado submetida ao Instituto de Química da Universidade de São Paulo como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Doutor em Ciências – Programa: Química.

Aprovada por:

Prof. Dr. Leandro Helgueira de Andrade
Orientador e Presidente

Prof. Dr. Luiz Fernando da Silva Junior
IQ-USP

Prof. Dr. Cassius Vinícius Stevani
IQ-USP

Profa. Dra. Andrea Maria Aguillar
UNIFESP-Diadema

Prof. Dr. Luiz Sidney Longo Junior
UNIFESP-Diadema

Aos meus pais, Cláudio e Marineusa, que nunca mediram esforços para me proporcionarem as melhores condições de estudo e, sempre me apoiaram em todas as fases de minha vida. Ao meu irmão pelo apoio e carinho.

*Ao meu namorado, Bernardo Almeida
Iglesias, pela paciência, carinho e incentivo a
mim dedicados ao longo dos anos.*

Agradecimentos

Um agradecimento especial ao Prof. Dr. Leandro Helgueira de Andrade pela oportunidade de realizar meu doutoramento em seu laboratório. Mais que isto, gostaria de agradecer pela dedicação e excelente orientação que me foi oferecida.

Ao Prof. Dr. Marco Fraaije (Universidade de Groningen – Holanda) gostaria de agradecer por me receber em seu grupo de pesquisa e me auxiliar no desenvolvimento de meu projeto.

Aos colegas e amigos do laboratório e do instituto de química, que conheci neste período, dedico minha sincera gratidão. Não somente pelo convívio em si, mas pela troca de experiências que foram muito importantes tanto na minha vida pessoal como na minha formação profissional. Meu agradecimento a: Joel, Dayvson, Lidiane, Edna, Thiago, Piovan, Thais, Priscila, Caterina, Juliana, Nathalie, Felipe, Thalita, Carolina, Camila, Renan (Polaco), Rogério (Tico), Márcio, Artur e Fabiano.

Gostaria ainda de agradecer a Ana Dionéia que tem participado da minha vida desde a graduação, sendo colega e amiga.

Por fim, gostaria de agradecer as agências de fomento, CAPES, CNPQ e FAPESP, pelo suporte financeiro concedido ao longo de todo o projeto.

Resumo

Brondani, P. B. **Investigação da seletividade de mono-oxigenases frente a substratos orgânicos de boro ou de selênio.** 2012. 195p Tese (Doutorado)-Programa de Pós-graduação em Química. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Neste trabalho foi avaliada a seletividade (químico ou enantiosseletividade) de quatro enzimas Baeyer-Villiger mono-oxigenases (BVMOs: PAMO, PAMO M446G, HAPMO e CHMO) frente a substratos contendo boro ou selênio.

Inicialmente uma série de boro-acetofenonas foram submetidas à bio-oxidação catalisada por estas BVMOs. A enzima CHMO mostrou quimiosseletividade para transformação da ligação C-B em detrimento da reação de Baeyer-Villiger. Enquanto PAMO e PAMO M446G catalisaram a oxidação de ambas as funções em substratos 4-substituídos e a seletiva transformação de C-B no caso de substratos 3-substituídos. A enzima HAPMO levou a reação de Baeyer-Villiger e a transformação da ligação C-B em todos os casos.

Quando alquenos contendo boro foram utilizados como substratos, somente aqueles que continham uma porção fenila em sua estrutura foram oxidados por BVMOs. Em nenhum dos casos foi observada reação de epoxidação e todas as enzimas levaram a transformação da ligação C-B em C-O.

Compostos quirais contendo boro foram submetidos a reações com as BVMOs na tentativa de transformação enantiosseletiva. PAMO e PAMO M446G foram as melhores enzimas levando, na maioria dos casos, a satisfatória oxidação

dos substratos. Entretanto, somente um composto pôde ser oxidado com boa enantiosseletividade (e.e 82-91%).

Compostos quirais contendo o átomo de selênio também foram alvos de estudo com BVMOs. Novamente a enzima PAMO se mostrou a melhor opção dentre as enzimas testadas e somente quando R^2 e $\text{R}^1 = \text{Ph}$ houve boa enantiosseletividade na oxidação (e.e 97 %).

Palavras Chave: Baeyer-Villiger mono-oxigenases, boro, selênio, oxidação, enantiosseletividade, quimiosseletividade.

Abstract

Brondani, P. B. **Investigation on selectivity of mono-oxygenases in the presence of boron-containing or seleniun-containing organic compounds.** 2012. 195p
PhD Thesis- Post-graduate Program in Chemistry. Chemistry Institute, University of São Paulo, São Paulo.

In this work we evaluated the selectivity (chemo or enantioselectivity) of four Baeyer-Villiger mono-oxygenases (BVMOS: PAMO, M446G PAMO, HAPMO and CHMO) in the presence of boron-containing or selenium-containing compounds.

Initially, a series of boron-acetophenones were submitted to oxidation reactions mediated by BVMOs. The enzyme CHMO was chemoselective leading only to C-B bond transformation instead Baeyer-Villiger reaction. However, PAMO and PAMO M446G mediated both oxidations in 4-substituted substrates, and only the C-B transformation in 3-substituted substrates. The enzyme HAPMO leading to Baeyer-Villiger reaction and C-B transformation in all cases.

When boron-containing alkenes were the substrates, only compounds with phenyl moiety in the structure were oxidized by BVMOs. It was observed only the C-B transformation and none of the epoxidation reaction.

Chiral boron compounds were submitted to BVMOS mediated reactions in an attempt of enantioselective transformation. PAMO and M446G PAMO showed the best results leading, in most cases, to a satisfactory oxidation. However, only one compound was oxidized with great enantioselectivity (82-91% ee).

Selenium-containing chiral compounds were also tested in reactions mediated by BVMOs. Again, PAMO showed the best results among BVMOs tested, but only when R^2 e $\text{R}^1 = \text{Ph}$ the reaction occurred with great enantioselectivity (97 % ee).

Keywords: Baeyer-Villiger monooxygenases, boron, selenium, oxidation, enantioselectivity, chemoselectivity.

Lista de abreviaturas e siglas

[α]_D rotação específica

Bn grupo benzila

Bpin grupo éster borônico formado a partir do pinacol

BV Baeyer-Villiger

BVMO Baeyer-Villiger mono-oxigenases

CAL-B lipase *Candida Antarctica* (fração B)

CCD cromatografia em camada delgada

CG cromatografia gasosa

CHMO cicloexanona mono-oxigenase

CLAE cromatografia líquida de alta eficiência

DIBAL-H hidreto de diisobutil alumínio

DMAP 4-dimetilaminopiridina

DMF *N,N*-dimetilformamida

DMSO dimetilsulfóxido

E razão enantiomérica

e.e excesso enantiomérico

FAD flavina adenina dinucleotídeo

FMN flavina mononucleotídeo

HAPMO 4-hidroxiacetofenona mono-oxigenase

***i*-Pr** grupo isopropila

IV espectroscopia de infravermelho

LDA diisopropil amideto de lítio

***m*-CPBA** ácido meta-cloro-perbenzóico

NADH dinucleotídeo de nicotinamida e adenina reduzido

NADPH fosfato de dinucleotídeo de nicotinamida e adenina

***n*-Bu** grupo *n*-butila

***n*-Hex** grupo *n*-hexila

PAMO fenilacetona mono-oxigenase

PAMO M446G enzima mutante obtida a partir de modificações no sítio ativo de PAMO

PF ponto de fusão

Ph grupo fenila

ppm partes por milhão

PTDH fosfato desidrogenase

RMN de ^{13}C ressonância magnética nuclear de carbono 13

RMN de ^1H ressonância magnética nuclear de hidrogênio

rpm rotações por minuto

t.a temperatura ambiente

THF tetraidrofurano

TMS tetrametilsilano

UIBMB União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular

Sumário

1. Introdução	17
1.1. Reações biocatalisadas e o avanço na utilização de oxigenações mediadas por enzimas	17
1.1.1. Enzimas Oxidativas	19
1.1.1.1. Mono-oxigenases	22
1.1.1.1.1. Baeyer-Villiger mono-oxigenases	27
1.2. Compostos orgânicos contendo boro: propriedades e aplicações	31
1.3. Compostos orgânicos contendo selênio: propriedades e aplicações	35
2. Objetivos	40
3. Avaliação da quimiosseletividade de BVMOs	43
3.1. Reações de Baeyer-Villiger	44
3.2. Clivagem oxidativa da ligação C-B	49
3.3. Reações de epoxidação	53
3.4. Resultados e discussão	57
3.4.1. Síntese das boro-acetofenonas 1-5	57
3.4.2. Síntese de derivados alquênil borônicos 6-11	59
3.4.3. Reações de oxidação de boro-acetofenonas (1-5) mediada por BVMOs	67
3.4.4. Reações de oxidação de compostos alquênil borônicos (6-11) mediada por BVMOs	75
4. Resolução Cinética Mediada por BVMOs	82
4.1. Reações mediadas por enzimas: estereosseletividade	83
4.2. Avaliação da enantioseletividade de BVMOs na oxidação de heteroátomos	85
4.3. Síntese de compostos em que o boro está ligado a carbono quiral	89
4.4. Síntese de compostos em que o selênio está ligado a carbono quiral	91
4.5. Resultados e discussão	94
4.5.1. Síntese de compostos contendo boro ligado a carbono quiral.....	94

4.5.2. Síntese de compostos contendo selênio ligado a carbono quiral.....	104
4.5.3. Avaliação da enantiosseletividade de BVMOs na oxidação de compostos quirais contendo boro	109
4.5.4. Avaliação da enantiosseletividade de BVMOs na oxidação de compostos quirais contendo selênio	114
4.5.5. Determinação da configuração absoluta	120
5. Conclusão	124
6. Parte experimental	126
6.1. Materiais e Instrumentação Analítica	126
6.2. Procedimentos experimentais	129
6.2.1. Obtenção dos ácidos 3 e 4-acetilfenilborônicos (1 e 2)	129
6.2.2. Procedimento geral para a síntese dos ésteres 3 ou 4-acetilfenilborônicos (3 e 4)	129
6.2.3. Procedimento para a síntese do trifluorboronato de potássio (5)	130
6.2.4. Procedimento geral para a síntese dos ésteres alquenilborônicos 6 e 7	131
6.2.5. Procedimento para a síntese do éster alquenilborônico 8	133
6.2.6. Procedimento para a síntese do éster alquenilborônico 9	135
6.2.7. Procedimento para a síntese do éster vinilborônico 10	136
6.2.8. Obtenção do éster vinilborônico 11	137
6.2.9.- Procedimento geral para síntese dos boronatos quirais 32 e 33	138
6.2.10.- Procedimento para síntese do boronato quiral 34	139
6.2.11.- Procedimento para síntese do boronato quiral 35	141
6.2.12.- Procedimento geral para síntese dos ésteres ciclopropil borônicos 41-43	142
6.2.13.- Procedimento geral para síntese dos selenetos quirais 31-33	144
6.2.14.- Procedimento geral para síntese dos selenetos quirais 44-46	146
6.2.15.- Procedimento geral para reações de bio-oxidação	

mediadas por BVMOs	150
6.2.16.- Procedimento geral para reações de bio-oxidação mediadas por CAL-B	150
6.2.17.- Procedimento geral para reações de bio-oxidação mediadas por fungo	151
6.2.18- Procedimento geral para resolução cinética enzimática de alcoóis catalisada por CAL-B	152
7. Espectros e Cromatogramas	154

1. Introdução

1.1. Reações biocatalisadas e o avanço na utilização de oxigenações mediadas por enzimas

Como catalisadores naturais, as enzimas possuem especificidade, reatividade e propriedades físico-químicas, catalíticas e biológicas diversificadas. Estas características são atrativas para a aplicação industrial, médica e/ou orgânica sintética. Hoje em dia, as enzimas são sistematicamente utilizadas e desenvolvidas como biocatalisadores economicamente viáveis e ambientalmente aceitáveis, acompanhando o desenvolvimento e a expansão da biotecnologia moderna.¹ O número de processos em que biocatalisadores estão envolvidos está constantemente crescendo. Agregado a este aumento na implementação, ocorre também o aumento do número de biocatalisadores disponíveis no mercado.²

Estes biocatalisadores são classificados pela União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular (UIBMB) de acordo com o tipo de reação que catalisam. Esta classificação resulta em seis classes:³ **Oxidoredutases**: catalisam reações de oxidação-redução; **Transferases**: catalisam reações de transferência de grupos funcionais;

¹ (a) Jaeger, K. E. *Curr. Opin. Biotechnol.* **2004**, 15, 269-271. (b) Schmid, A.; Dordick, J. S.; Hauer, B.; Kiener, A.; Wubbolts, M.; Witholt, B. *Nature* **2001**, 409, 258-268. (c) Kirk, O.; Borchert, T. V.; Fulgsang, C. *Curr. Opin. Biotechnol.* **2002**, 13, 345-351. (d) Burk, M. J. *Adv. Synth. Catal.* **2003**, 345, 647-648. (e) Xu, F. *Ind. Biotechnol.* **2005**, 1, 38-50 e referências citadas.

² Torres Pazmiño, D. E.; Snajdrova, R.; Rial, D. V.; Mihovilovic, M. D.; Fraaije, M. W. *Adv. Synth. Catal.* **2007**, 349, 1361-1368.

³ *Biotransformation in Organic Synthesis*; Faber, K., 5 ed; Springer-Verlag: Berlin, **2004**.

Hidrolases: catalisam reações de formação e hidrólise de ésteres, amidas, lactonas, lactamas, epóxidos e anidridos; **Liases:** catalisam reações de eliminação de grupos funcionais levando a formação de ligação dupla e, a adição de grupos a ligações duplas; **Isomerases:** catalisam reações de isomerização (racemização, epimerização e rearranjos) e **Ligases:** catalisam formação ou clivagem de ligações C-O, C-S, C-N, C-C.

A aplicação de enzimas que catalisam reações de oxidação, as oxidorreduções, encontra cada vez mais espaço em química orgânica sintética. Isto por que a oxidação quimio, régio e estereosseletiva de moléculas orgânicas é uma transformação chave, com importância não somente na química, mas também em alguns processos biológicos.⁴

O desenvolvimento da oxidação biocatalisada começou tardiamente, pode-se dizer que nas últimas duas décadas, e este está atrelado a sua utilização em química sintética. Há vários motivos para esta demora. Em alguns aspectos as oxidorreduções são mais difíceis de manusear do que, por exemplo, as hidrolases. Outro motivo pode ser a sua ocorrência em vias metabólicas específicas levando algumas vezes a um escopo limitado. E, finalmente, a dependência de cofatores que, por um longo período, foi listada como o maior impedimento para a aplicação destas enzimas em síntese orgânica. Uma solução para a necessidade de utilização de cofatores pode ser o emprego de células inteiras, o que para muitos químicos orgânicos é um problema. No entanto, a utilização destas enzimas na forma isolada sofreu um grande

⁴ Gelalcha, F. G. *Chem. Rev.* **2007**, 107, 3338-3361.

desenvolvimento durante as duas últimas décadas, minimizando os custos do processo total.⁵

Nos dias atuais, existem várias técnicas (clonagem, mutação, fusão com outras enzimas,...), que resolveram os problemas da disponibilidade enzimática, da utilização de cofatores, de estabilidade e de reciclagem dessas enzimas.

1.1.1. Enzimas Oxidativas

Reações biocatalisadas em que elétrons são transferidos de uma molécula a outra são mediadas por uma variedade de enzimas denominadas oxidorredutases ou enzimas redox.⁶ Para realizar estas reações, as enzimas geralmente utilizam cofatores (orgânicos ou inorgânicos). Porém, reações redox também podem ser catalisadas por enzimas que não necessitam de cofatores. Estas enzimas independentes de cofator apresentam, na maioria dos casos, alguns resíduos contendo grupos aromáticos no seu sítio ativo.⁷

A maioria das oxidorredutases necessita de cofatores, como flavinas ou íons metálicos, hemes e pirroloquinolina quinona, para desempenhar sua atividade catalítica (Figura 1).^{1e} Normalmente, a ligação destes cofatores à enzima é forte (na ordem de

⁵ Hollmann, F.; Arends, I. W. C. E.; Buehler, K. Schallmeyer, A.; Buhler, B. *Green. Chem.* **2011**, 13, 226-265.

⁶ *Enzymes*, Dixon, M.; Webb, E. C., 3 ed, Academic Press, New York **1979**.

⁷ (a) Littlechild, J. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **1999**, 3, 28-34. (b) Fetzner, S. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2002**, 60, 243-257.

nM) e, algumas enzimas apresentam até mesmo ligações covalentes com o cofator.⁸ Quando o cofator está fortemente ou covalentemente ligado à enzima, ele pode ser considerado um grupo prostético constituindo uma parte permanente da estrutura enzimática. Por outro lado, cofatores ligados com baixa afinidade podem ser chamados de co-enzimas ou co-substratos, sendo que o mesmo tipo de co-substrato pode ser utilizado por diferentes enzimas.

Figura 1 – Exemplos de cofatores utilizados pelas oxidorredutases.

⁸ Huang, C. H.; Lai, W. L.; Lee, M. H.; Chen, C. J. Vasella, A.; Tsai, Y. C. ; Liaw, S. H. *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 38831-38838.

Baseado no tipo de reação redox catalisada, as oxidorreduções podem ser divididas em 22 diferentes subclasses, porém uma classificação mais geral^{1e} divide estas enzimas em 4 subgrupos: **desidrogenases**, **oxigenases**, **oxidases** e **peroxidases** (Figura 2).

Desidrogenases

Oxigenases

Oxidases

Peroxidases

Figura 2 – Reações de oxidação mediada por enzimas.^{adaptado de 3}

Reações em que substratos orgânicos são oxigenados são muito utilizadas em síntese orgânica. No entanto, a oxifuncionalização seletiva de substratos orgânicos pode ser um problema, uma vez que os oxidantes mais utilizados em síntese apresentam baixa seletividade.⁹ Uma solução é a utilização de enzimas para a realização desta transformação.

As enzimas que catalisam a inserção de oxigênio em um substrato orgânico, utilizando para isso o oxigênio molecular como doador, são as oxigenases. Este subgrupo ainda pode ser dividido em **mono-oxigenases**, que catalisam a inserção de um único átomo de oxigênio, e **di-oxigenases**, que catalisam a inserção de dois átomos de oxigênio.

1.1.1.1. Mono-oxigenases

Como já mencionado, mono-oxigenases catalisam a inserção de um átomo de oxigênio em um substrato orgânico. Para realizar tal transformação essas enzimas necessitam ativar o oxigênio molecular, caso contrário nenhuma reação ocorre devido ao estado de spin do O₂. Esta ativação ocorre por doação de elétrons do cofator ou diretamente da enzima ao oxigênio molecular, gerando um intermediário reativo. A natureza deste intermediário depende do tipo de cofator utilizado, quando cofatores são necessários. As mono-oxigenases internas não necessitam de cofatores para prover estes elétrons, enquanto as mono-oxigenases externas necessitam.

⁹ Loughlin, W. A. *Biores. Technol.* **2000**, 74, 49-62.

Um tipo de mono-oxigenases externa bastante abundante são as mono-oxigenases dependentes de flavina¹⁰. As flavinas utilizadas por essas enzimas podem ser FMN (flavina mononucleotídeo) ou FAD (flavina adenina dinucleotídeo) (Figura 1) e podem estar presentes como grupo prostético (ligadas fortemente à enzima) ou como co-substrato (ligada transitoriamente a enzima).¹¹ Somente algumas mono-oxigenases internas dependentes de flavinas foram identificadas. Em contrapartida, muitas mono-oxigenases externas foram descritas, apresentando na maioria dos casos a flavina como grupo prostético e requerendo NAD(P)H como co-substrato auxiliar.¹¹

As mono-oxigenases dependentes de flavina podem catalisar uma série de reações como epoxidação, reação de Baeyer-Villiger e até mesmo halogenação. Para realizar tais reações, elas geram um intermediário reativo por formação de ligação covalente entre o oxigênio molecular e C4a da flavina.¹² Dependendo do estado de protonação, o intermediário realiza oxigenação nucleofílica ou eletrofílica. Apesar deste intermediário ser bem estabilizado pela enzima,¹³ na ausência de substrato orgânico apropriado, ele é transformado em flavina oxidada e leva a formação de peróxido de hidrogênio como produto no meio reacional. O intermediário C4a-hidroperoxiflavina é formado pela redução da flavina por NAD(P)H e subsequente reação com oxigênio

¹⁰ Fraaije, M. W.; Wu, J.; Heuts, D. P. H. M.; van Hellemond, E. W.; Spelberg, J. H. L.; Janssen, D. B. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2005**, 66, 393-400.

¹¹ van Berkel, W. J. H. Kamerbeek, N. M.; Fraaije, M. W. *J. Biotechnol.* **2006**, 124, 670-689.

¹² (a) Feng, L.; Wang, W.; Cheng, J.; Ren, Y.; Zhao, G.; Gao, C.; Tang, Y.; Liu, X.; Han, W.; Peng, X.; Liu, R.; Wang, L. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2007**, 104, 5602-5607. (b) Ghisla, S.; Massey, V. *Eur. J. Biochem.* **1989**, 181, 1-17.

¹³ Entsch, B.; van Berkel, W. J. H. *FASEB*, **1995**, 9, 476-483.

molecular. Após a mono-oxigenação do substrato, o intermediário C4a-hidroxi flavina formado transforma-se em flavina oxidada pela liberação de água como subproduto (Figura 3).¹⁴

Figura 3 – Ciclo catalítico proposto para mono-oxigenases dependentes de flavina.¹¹

Como podemos perceber (Figura 3), é necessário um equivalente de NAD(P)H para a bio-oxidação de cada equivalente do substrato. Isto tem um impacto negativo sobre estas reações, devido ao alto custo destes cofatores.¹⁵ Felizmente, muitas estratégias são conhecidas para evitar a utilização estequiométrica de nicotinamidas. As principais estratégias se concentram na regeneração destas biomoléculas.

¹⁴ Massey, V. J. *Biol. Chem.* **1994**, 269, 22459-22462.

¹⁵ Preços cotados em agosto de 2011 (Sigma-Aldrich): NADH R\$ 1458,00. g^{-1} e NADPH R\$ 1788,00. g^{-1} .

Dentre as técnicas desenvolvidas para a regeneração de cofator, a mais utilizada e estudada é a regeneração enzimática. Esta alternativa utiliza uma segunda enzima para realizar a redução de NAD(P)^+ para NAD(P)H , simultaneamente a oxidação de um substrato de sacrifício (Figura 4). Esta reação é catalisada principalmente por desidrogenases dependentes de NAD(P)^+ (Tabela 1).

Figura 4 – Esquema simplificado da utilização de enzima para regeneração de cofator.

Tabela 1 - Exemplos de desidrogenases dependentes de NAD(P)^+ que podem ser aplicadas para regeneração de cofatores.¹⁶

Enzima	Organismo	Vantagens/ Desvantagens
Álcool desidrogenase	<i>Thermoanaerobium brockii</i>	+ termoestável + comercialmente disponível - somente seletiva para NADP^+ - equilíbrio termodinâmico desfavorável - requer muito substrato
Formato desidrogenase	<i>Candida boidinii</i>	+ substrato de sacrifício barato + equilíbrio termodinâmico favorável + termoestável + seletiva para NAD(P)^+ - baixa atividade
Glicose desidrogenase	<i>Bacillus cereus</i>	+ disponível comercialmente + substrato de sacrifício barato + termoestável + seletiva para NAD(P)^+ - produto pode complicar o <i>workup</i>
Glicose-6-P desidrogenase	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	+ comercialmente disponível + atividade altamente específica + seletiva para NAD(P)^+ - substrato de sacrifício caro - produto pode complicar o <i>workup</i>
Fosfite desidrogenase	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	+ substrato de sacrifício barato + equilíbrio termodinâmico favorável + termoestável + seletiva para NAD(P)^+ - baixa atividade

¹⁶ Pazmiño, D. E. T.; *Tese de doutorado*, Universidade de Groningen- Holanda, **2008**.

Dentre as mono-oxigenases, as Baeyer-Villiger mono-oxigenases (BVMOs) tem sido citadas como uma classe versátil de enzimas que podem realizar reações de oxigenação de maneira quimio, regio e enantiosseletiva.¹⁷ Estas enzimas não catalisam somente reações de Baeyer-Villiger, mas também reações de epoxidação e oxidação de heteroátomos (S, Se, P, N, B).¹⁸

1.1.1.1.1. Baeyer-Villiger mono-oxigenases

Em 1899, Adolf Baeyer e Victor Villiger descobriram uma reação de oxidação em que compostos carbonílicos são convertidos ao correspondente éster. Esta reação foi denominada reação de Baeyer-Villiger e hoje em dia é freqüentemente utilizada em química orgânica sintética.¹⁹ Geralmente, são utilizados perácidos como oxidantes para a realização destas transformações. Em 1948, Criegee propôs que o mecanismo reacional envolvia um intermediário tetraédrico (intermediário de Criegee) formado a partir do ataque do perácido à cetona (Esquema 1).²⁰

¹⁷ (a) Miholovic, M. D. *Curr. Org. Chem.* **2006**, *10*, 1265-1287. (b) Pazmiño, T. D. E.; Fraaije, M. W. *Future Directions in Biocatalysis*, Ed. T. Matsuda, Elsevier Science, Dordrecht, **2007**, 107-128.

¹⁸ (a) Brink, G. J.; Arends, I. W. C. E.; Sheldon, R. A. *Chem. Rev.* **2004**, *104*, 4105-4124. (b) Mihovilovic, M. D.; Rudroff, F.; Grötzl, B. *Curr. Org. Chem.* **2001**, *8*, 1057-1069.

¹⁹ Pazmiño, D. E. T.; Dudek, H. M.; Fraaije, M. W. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2010**, *14*, 138-144.

²⁰ Criegee, R.; *Justus Liebigs Ann. Chem.* **1948**, 560, 127-135.

Esquema 1 – Mecanismo simplificado para reação de oxidação de Baeyer-Villiger através da formação do intermediário de Criegee.

Aproximadamente na mesma época da proposição de Criegee, foi identificado que também existiam enzimas que catalisavam tais reações.²¹ Esta descoberta foi consequência da observação da biotransformação de esteroides por fungos e, após isto, levou duas décadas para que a primeira BVMO fosse isolada e caracterizada.²²

A primeira BVMO a ter seu potencial sintético mostrado foi a ciclohexanona mono-oxigenase (CHMO). Esta enzima é produzida pela bactéria *Acinetobacter* e catalisa a primeira etapa da degradação da ciclohexanona.²³ Posteriormente foi mostrado que esta enzima aceita um variado número de substratos, geralmente catalisando a transformação com alta régio e/ou enantiosseletividade.²⁴ Então, surgiram trabalhos com outras BVMOs, mostrando que vários tipos de oxidações podem ser catalisadas por estas enzimas.

²¹ Turfitt, G. E. *Biochem. J.* **1948**, 42, 376-383.

²² (a) Conrad, H. E.; Dubus, R.; Namtvedt, M. J.; Gunsalus, I. C. *J. Biol. Chem.* **1965**, 240, 495-503. (b) Forney, F. W.; Markovetz, A. J. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1969**, 37, 31-38.

²³ Donoghue, N. A.; Norris, D. B.; Trudgill, P. W. *Eur. J. Biochem.* **1976**, 63, 175-192.

²⁴ (a) Stewart, J. D. *Curr. Org. Chem.* **1998**, 2, 195-216. (b) Mihovilovic, M. D.; Müller, B.; Stanetty, P. *Eur. J. Org. Chem.* **2002**, 22, 3711-37-30.

Os estudos em cima da descoberta e caracterização de BVMOs se intensificaram levando a elucidação da primeira estrutura cristalina de uma BVMO. A enzima que teve sua estrutura cristalina analisada foi a fenilacetona mono-oxigenase (PAMO), que é isolada a partir da *Thermobifida fusca*.²⁵ Esta estrutura revelou a presença de dois domínios, onde estão ligados FAD e NADPH e, que o sítio ativo está localizado em uma fenda na interface desses domínios. Ainda foi observado que o sítio ativo contém um resíduo de arginina que parece ter papel importante na estabilização do intermediário de Criegee. Infelizmente, como a estrutura cristalina foi obtida sem que a PAMO estivesse com um substrato em seu sítio ativo, apenas observações estruturais foram feitas. Mais recentemente, duas estruturas cristalinas de CHMO complexada com NADP⁺ foram elucidadas e, revelaram a presença de dois estados conformacionais diferentes.²⁶ Esta descoberta confirma uma dinâmica estrutural presente ao longo da catálise.

Apesar dos avanços nos estudos envolvendo as BVMOs, restam ainda muitas dúvidas sobre o mecanismo catalítico. Dúvidas como, por exemplo, o papel de alguns resíduos no mecanismo reacional ou como é estabilizada a peroxiflavina formada durante este processo, entre outras. Porém, todos os estudos mecanísticos das reações de Baeyer-Villiger biocatalisadas suportam a hipótese de que a reação convencional e a enzimática são muito parecidas (com R³ = flavina no Esquema 1).

²⁵ Malito, E.; Alfieri, A.; Fraaije, M. W.; Mattevi, A. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2004**, *101*, 13157-13162.

²⁶ Mirza, I. A.; Yachnin, B. J.; Wang, S.; Grosse, S.; Bergeron, H.; Imura, A.; Iwaki, H.; Hasegawa, Y.; Lau, P. C. K.; Berghuis, A. M. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 8848-8854.

Até o momento, todas as BVMOs caracterizadas contêm flavina (na maioria das vezes FAD) como cofator crucial para a catálise e necessitam ainda de NAD(P)H como doador de elétrons.

Além disso, ao longo dos anos foi realizado um inventário sobre a aceitação de substratos por estas enzimas, revelando a preferência por certa classe de compostos. Elas podem ser grosseiramente classificadas por aceitarem substratos de certos tamanhos e tipos. Por exemplo, PAMO está geralmente envolvida na conversão de compostos aromáticos e, raramente de substratos alifáticos.¹⁰ CHMO parece aceitar uma variedade de ciclos estericamente impedidos e cetonas alifáticas, mas geralmente não catalisa reações com compostos aromáticos ou alifáticos simples.^{24b} A 4-hidroxiacetofenona mono-oxigenase (HAPMO), isolada a partir de *Pseudomonas fluorescens*, prefere acetofenonas e benzaldeídos com grupos doadores de elétrons na posição *para* do anel aromático, mas também pode ser utilizada com uma variedade de cetonas e aldeídos, incluindo compostos alifáticos.²⁷ Porém, esta restrição a aceitação de substratos ainda não é entendida.

²⁷ Gonzalo, G.; Pazmiño, D. E. T.; Ottolina, G.; Fraaije, M. W.; Carrea, G. *Tetrahedron Asymm.* **2006**, 17, 130-135.

1.2. Compostos orgânicos contendo boro: propriedades e aplicações

O primeiro composto de boro preparado e isolado foi relatado por Frankland em 1860.²⁸ Com o passar do tempo os compostos contendo boro tiveram sua utilidade posta em prova e foram de compostos negligenciados a interessantes intermediários sintéticos.²⁹

Hoje em dia, os compostos contendo boro são, geralmente, utilizados na forma de ácidos borônicos, seus derivados ésteres borônicos ou mesmo organotrifluorboratos de potássio (Figura 5). Em ácidos e ésteres borônicos, compostos em que o boro é trivalente, este apresenta seus substituintes dispostos em uma geometria trigonal planar. Possuindo apenas seis elétrons na camada de valência, o boro possui uma deficiência de dois elétrons e, quando hibridizado sp^2 possui um orbital p vazio. Portanto, compostos orgânicos de boro são ácidos de Lewis com propriedades únicas, possuindo um amplo espectro de reatividade.³⁰ Estes compostos também são estáveis, de fácil manuseio, pouco tóxicos e seu produto de degradação é o ácido bórico que pode ser considerado um composto ambientalmente não agressivo.³¹ Estas características fazem com que compostos contendo boro sejam intermediários sintéticos muito atrativos e, devido a isto, uma área de crescente interesse.^{30, 29}

²⁸ Frankland, E.; Duppa, B. F. I. *Justus Liebigs Ann. Chem.* **1860**, 115, 319-322.

²⁹ (a) Pelter, A.; Smith, K.; Brown, H. C. *Borane Reagents*, Academic press, London, **1988**. (b) Brown, H. C. *Organic Synthesis via boranes*, Wiley, New York, **1975**.

³⁰ *Boronic Acids: preparation, application in organic synthesis and medicine*. Editado por Dennis G. Hall, **2005**, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA Ed., Weinheim, pg. 1-2.

³¹ Molander, G. A.; Felix, L. A. *J. Org. Chem.* **2005**, 70, 3950-3956, e referências citadas.

Figura 5– Compostos orgânicos de boro.

Esta aplicabilidade está relacionada à labilidade da ligação C-B. A ligação C-B pode ser convertida em várias outras funcionalidades como álcool, aldeído, cetona, haleto e amina (Figura 6).³² Esta ligação, na presença de um oxidante forte, é clivada levando ao álcool correspondente. Em sistemas vinílicos esta oxidação é conhecida por levar ao correspondente composto carbonílico. Esta metodologia é uma ótima maneira de transformar uma olefina terminal pouco reativa no composto carbonílico correspondente. Apesar de a oxidação ser a reação mais comum de organoboranas em síntese orgânica, esta é somente um exemplo de reação em que um nucleófilo ataca o átomo de boro usando seu orbital vazio. Se, por exemplo, o nitrogênio for o nucleófilo a reação que ocorre é a aminação; se for um halogênio, ocorre halogenação. Todas estas reações com nucleófilos ocorrem com retenção de configuração.

³² Morrill, C.; Funk, T. W.; Grubbs, R. H. *Tetrahedron Lett.* **2004**, 45, 7733-7736.

Além disto, compostos orgânicos contendo boro são muito utilizados na construção de ligações C-C, através das reações de acoplamento catalisadas por metais de transição (Figura 6).³³ Ácidos e seus derivados são os principais componentes da reação de acoplamento Suzuki-Miyaura.³⁴ Esta reação, desenvolvida no final da década de 1970, é atualmente uma das mais importantes metodologias empregadas na formação de ligações C-C.³⁰

Figura 6 – Exemplos de transformações da ligação C-B.

Como consequência desta versatilidade, tanto compostos quirais quanto aquirais contendo boro são muito utilizados como blocos sintéticos em síntese orgânica,

³³ Bellina, F.; Carpita, A.; Rossi, R. *Synthesis* **2004**, 15, 2419-2440.

³⁴ Miyaura, N.; Suzuki, A. *Chem. Rev.*, **1995**, 95, 2457-2483.

incluindo síntese de produtos naturais.³⁵ Quando se trata de compostos quirais contendo boro, estes ainda podem ser utilizados como catalisadores em catálise assimétrica levando a produtos com altos excessos enantioméricos (Esquema 2).³⁶

Esquema 2- Reação de Diels-Alder catalisada por alquildicloroborana quiral.

Apesar da grande reatividade frente a oxidantes fortes, a clivagem oxidativa da ligação C-B com água ou oxigênio é um processo cineticamente lento e, portanto estes compostos podem ser manipulados em contato com o ar.

Somado a isto, as propriedades químicas do átomo de boro presentes em ácidos e ésteres borônicos fazem com que muitos destes compostos possuam atividade biológica.³⁰ Esta atividade pode ser exemplificada pelo agente anti-câncer Bortezomib[®], o primeiro medicamento contendo ácido borônico a ser comercializado (Figura 7).

³⁵ (a) Paptchikhine, A.; Cheruku, P.; Engman, M.; Andersson, P. G. *Chem. Commun.* **2009**, 5996-5998. (b) Shirakawa, K.; Arase, A.; Hoshi, M. *Synthesis* **2004**, 11, 1814-1820.

³⁶ (a) Hawkins, J. M.; Loren, S. *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, 113, 7794-7795. (b) Hawkins, J. M.; Loren, S.; Nambu, M. *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, 116, 1657-1660.

Figura 7 - Estrutura do Bortezomib®.

1.3. Compostos orgânicos contendo selênio: propriedades e aplicações

Compostos orgânicos contendo selênio são conhecidos desde 1847, quando Wöhler e Siemens relataram a síntese do etil selenol.³⁷ Em 1973 foi descoberto um aminoácido essencial contendo selênio, a selenocisteína, no sítio ativo da glutathione peroxidase.³⁸ Nesta mesma época, os químicos orgânicos começaram a perceber o potencial sintético de compostos de selênio. Isto se tornou claro por causa da eliminação *syn* de selenóxidos, que é um ótimo método para geração de duplas ligações C-C (Esquema 3).³⁹ Os selenóxidos requeridos para este tipo de reação são facilmente obtidos a partir dos correspondentes selenetos. Estes por sua vez, podem ser obtidos a partir de um substrato orgânico utilizando tanto espécies de selênio nucleofílicas quanto eletrofílicas.⁴⁰

³⁷ Wöhler, F.; Siemens, C. *Ann. Chem.* **1847**, 61, 360-362.

³⁸ Flohé, L.; Gunzer, W.A.; Schock, H. H. *FEBS Lett.* **1973**, 32, 132-134.

³⁹ Sharpless, K. B.; Lauer, R. F. *J. Am. Chem. Soc.* **1973**, 95, 2697-2699.

⁴⁰ Wirth, T. *Cardiff University, Cardiff, UK.* **2007**, Elsevier, 457-499.

Esquema 3 – Oxidação de seleneto à selenóxido seguido de eliminação para formação de dupla ligação C-C.

Desde aquela época muitos outros reagentes contendo selênio, e também reações baseadas nestes reagentes, foram descobertas e, muitas delas estão presentes no repertório dos químicos orgânicos sintéticos.⁴⁰

As estruturas de compostos contendo selênio estão relacionadas com seus análogos contendo enxofre, porém suas propriedades são diferentes. A ligação C-Se é uma ligação mais fraca do que a ligação C-S e, por isto, as reações que envolvem a quebra destas ligações são mais rápidas e ocorrem em condições mais brandas em compostos de selênio do que em seus análogos sulfurados.⁴⁰

Outra importante reação de compostos contendo selênio é a adição estereoespecífica de compostos eletrofílicos de selênio a alquenos. Esta reação é uma importante ferramenta para a construção de moléculas mais complexas. A adição do eletrófilo ao alceno ocorre estereoespecificamente *anti* e envolve a formação inicial de um íon cíclico contendo selênio. Este intermediário é imediatamente aberto na presença de nucleófilos, levando a formação de um produto de adição. A adição a alquenos não simétricos ocorre seguindo a regra de Markovnikov (Esquema 4).

Esquema 4 – Adição de eletrófilos de selênio a duplas ligações.

Existem várias maneiras de sintetizar espécies eletrofílicas de selênio e algumas destas espécies estão disponíveis comercialmente. Os eletrófilos mais utilizados são os do tipo PhSeX (com $X = \text{Cl}$ ou Br) e estes podem ser obtidos comercialmente ou podem ser gerados a partir do difenil disseleneto e cloro ou bromo elementares. Disselenetos, aliás, são precursores versáteis para a síntese de eletrófilos de selênio.⁴⁰

Porém, o selênio também pode ser utilizado como nucleófilo, e um grande número de moléculas contendo selênio podem ser acessadas por estes reagentes. A nucleofilicidade de selenoatos (RSe^-) é significativamente maior que a dos correspondentes tiolatos (RS^-). Na verdade, em geral, estes nucleófilos de selênio são espécies altamente reativas e não podem ser isoladas. Vários agentes redutores, metais alcalinos (Li , Na , K) ou hidretos de metais alcalinos, podem ser utilizados para gerar selenoatos a partir de disselenetos ou selenocianatos. Disselenetos aromáticos são mais facilmente reduzidos, até o selenoato correspondente, que outros

disselenetos e selenocianatos. Os selenoatos também podem ser obtidos a partir de selênio elementar por reação com organolítio ou reagentes de Grignard (Esquema 5).

A reação mais comum destes nucleófilos é a reação de substituição eletrofílica a haletos de alquila. Porém, estes reagentes podem também ser adicionados a outros eletrófilos como cloretos de ácidos, cloroformatos e epóxidos (Esquema 5).⁴⁰

Esquema 5 - Reação de espécie nucleofílica de selênio com uma série de eletrófilos.

Além da utilização de nucleófilos e eletrófilos de selênio em síntese, o selênio tem outras vantagens. Ele pode estabilizar carbânions e carbocátions adjacentes ou levar a formação de radicais livres pela clivagem da ligação C-Se.⁴⁰

Adicionalmente, compostos orgânicos contendo selênio já foram relatados por sua atividade antioxidante, antiinflamatória, antitumoral e antiviral.⁴¹ Um exemplo é o Ebselen, um interessante composto orgânico contendo selênio, que possui atividade antiinflamatória e antioxidante (Esquema 6). Este composto ainda não teve todas as suas propriedades estudadas e por isto não é comercial.

Esquema 6 - Estrutura do Ebselen.

⁴¹ Nogueira, C. W.; Zeni, G.; Rocha, J. B. T. *Chem. Rev.*, **2004**, *104*, 6255-6286.

2. Objetivos

Com base no potencial sintético de mono-oxigenases (especialmente BVMOs) e na importância sintética de compostos orgânicos contendo boro ou selênio, o objetivo principal deste trabalho foi sintetizar alguns destes compostos e investigar a reatividade de Baeyer-Villiger mono-oxigenases (BVMOs) frente a eles. Avaliando também a quimio e enantiosseletividade quando possível e, a compatibilidade dos sistemas enzimáticos frente aos substratos idealizados.

Para alcançar tal objetivo foram traçadas as seguintes metas:

2.1. Síntese de organoboro-acetofenonas e avaliação da quimiosseletividade de BVMOs frente a estes substratos (Esquema 7).

Esquema 7- Oxidação de organoboro-acetofenonas catalisada por BVMOs.

2.2. Síntese de ésteres alquenilborônicos e avaliação da quimiosseletividade de BVMOs frente a estes substratos (Esquema 8).

Esquema 8- Reação de oxidação de substratos vinílicos de boro catalisada por BVMOs.

2.3. Síntese de ésteres borônicos quirais e sua resolução cinética enzimática catalisada por BVMOs (Esquema 9).

Esquema 9 - Resolução cinética enzimática de compostos de boro mediada por BVMOs.

2.4. Síntese de organosselenetos quirais e resolução cinética enzimática catalisada BVMOs (Esquema 10).

Esquema 10 - Resolução cinética enzimática de selenetos quirais mediada por BVMOs.

3. Avaliação da quimiosseletividade de BVMOs

Embora a espécie intermediária de flavina em BVMOS reaja como nucleófilo com cetonas, boro e outros eletrófilos; é possível a oxidação de heteroátomos como S, Se, N e P em que a flavina intermediária age como eletrófilo.^{18a,42} Portanto, as BVMOs podem oxidar uma série de substratos e, exceto pela promiscuidade catalítica algumas vezes observada, estas reações ocorrem com alta seletividade (Figura 8).

Figura 8- Oxidações mediadas por BVMOs.⁴³

⁴² Branchaud, B. P.; Walsh, C. T. *J. Am. Chem. Soc.* **1985**, 107, 2153-2161.

⁴³ Kamerbeek, N. M.; Janssen, D. B.; van Berkel, W. J. H.; Fraaije, M. W. *Adv. Synth. Catal.* **2003**, 345, 667-678.

3.1. Reações de Baeyer-Villiger

A reação de transformação de cetonas em seus correspondentes ésteres, pela ação de perácidos, é chamada de reação de Baeyer-Villiger (BV). Esta reação é uma das mais conhecidas e aplicadas em síntese orgânica. Este sucesso está relacionado com sua versatilidade, pois pode ser utilizada com uma grande variedade de compostos carbonílicos, um grande número de grupos funcionais é tolerado, a regioquímica é previsível, é geralmente estereosseletiva e um grande número de oxidantes podem ser empregados.^{18a}

Na primeira etapa desta reação o composto carbonílico é protonado, fato que aumenta sua reatividade, então o perácido se adiciona formando o intermediário de Criegee. Após ocorre a protonação do oxigênio proveniente da carbonila do perácido, a eliminação de ácido carboxílico, através da quebra da ligação O-O do oxidante, e a migração de um dos grupos alquila para o oxigênio. Estas últimas etapas ocorrem em um passo concertado formando um estado de transição com uma carga parcial positiva no grupo alquila que migra. Portanto, ocorre a migração preferencial do grupo alquila que melhor estabiliza esta carga positiva e, quando a diferença na estabilização não é muito grande, misturas podem ser obtidas (Esquema 11).⁴⁴

⁴⁴ *Strategic Applications of Named Reactions in Organic Synthesis*, Kurti, L.; Czakó, B.; **2005**, Elsevier Inc., San Diego, Califórnia-USA, 28-29.

Esquema 11 - Mecanismo da reação de Baeyer-Villiger.

Embora a reação de BV tenha sido descoberta a mais de um século, esta metodologia está longe de ver o fim de seu desenvolvimento. O protocolo para preparação de ésteres, citado até então, faz uso de perácidos orgânicos como agente oxidante. Este protocolo tem a desvantagem da formação de um equivalente de ácido carboxílico como subproduto. Além disto, perácidos orgânicos são caros e muitas vezes perigosos (por causa da sensibilidade ao choque). Estas desvantagens acabam limitando a aplicação da reação de BV utilizando perácidos.^{18a}

Algumas alternativas à utilização de perácidos são a utilização de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) na presença de catalisadores químicos ou enzimas. A utilização de peróxido de hidrogênio possui algumas vantagens como o fato de ser um reagente barato e seguro, ser ambientalmente aceitável e obter ao final como subproduto água. Porém, algumas desvantagens também são observadas, como o fato de H_2O_2 ser um dos mais fracos oxidantes dentre perácidos e peróxidos e necessitar de um catalisador

(que pode ser quiral) para ser ativado; o fato de que alguns catalisadores não são seletivos levando a formação de radicais durante a reação, o que diminui a seletividade da reação; e a incompatibilidade de alguns reagentes com o meio aquoso.^{18a}

Outra alternativa é o emprego de enzimas oxidantes como, por exemplo, BVMOs. Estas enzimas geralmente levam a formação do produto de BV com alta quimio, régio e enantiosseletividade.^{18a} Uma desvantagem da utilização de BVMOs, e enzimas em geral, é a solubilidade limitada de alguns substratos em água, que na maioria das vezes é o melhor solvente para reações biocatalisadas. Porém, algumas destas enzimas mantêm sua atividade em solvente orgânico, aumentando sua aplicabilidade.⁴⁵

Devido a estas interessantes propriedades as BVMOs estão sendo muito exploradas para a realização de reações de BV. Por exemplo, a CHMO já teve sua quimiosseletividade avaliada em reações partindo de cetonas heterocíclicas. Observou-se uma alta quimiosseletividade em favor da reação de BV em detrimento da oxidação do heteroátomo (Esquema 12).⁴⁶

⁴⁵ Gonzalo, G.; Ottolina, G.; Zambianchi, F.; Fraaije, M. W.; Carrea, G. *J. Molec. Catal. B: Enzym.* **2006**, 39, 91-97.

⁴⁶ Mihovilovic, M. D.; Muller, B.; Kayser, M. M.; Stewart, J. D.; Frohlich, J. Stannetty, P.; Spreitzer, H. J. *Mol. Catal B: Ezym.* **2001**, 11, 349-353.

Esquema 12 – Oxidação de BV em derivados heterocíclicos.

Em alguns casos a enzima (célula inteira *A. calcoaceticus* NCIMB 9871) tem uma preferência por um diastereoisômero, mas ainda converte o outro diastereoisômero e leva a regioisômeros diferentes (Esquema 13).⁴⁷

Esquema 13 – Oxidação de diastereoisômeros com diferente regioseletividade.

Um grande número de resoluções cinéticas mediadas por BVMOs foram relatadas.^{17a} Por exemplo, a resolução de uma ciclopentanona α -substituída, em que

⁴⁷ (a) Pchelka, B. K.; Gelo-Pujic, M.; Guibe-Jampel, E. *J. Chem. Soc., Perkin Trans.* **1998**, 1, 2625-2627.
 (b) Alphand, V.; Furstoss, R. *Tetrahedron Asymm.* **1992**, 3, 379-382.

3. Avaliação da quimiosseletividade de BVMOs

um dos enantiômeros foi convertido à lactona enantiopura e o outro se manteve intacto. Este deu origem ao outro enantiomero da lactona por oxidação química. As lactonas enantiomericamente enriquecidas que foram obtidas são componentes do feromônio da *Vespa orientalis* (Esquema 14).⁴⁸

Esquema 14 – Resolução cinética da α -undeciclopentanona.

As BVMOs também foram utilizadas para a realização de resolução dinâmica através da reação de BV levando a excessos enantioméricos altos (Esquema 15).⁴⁹

Esquema 15- Resolução dinâmica oxidativa mediada por BVMO.

⁴⁸ Alphanth, V.; Archelas, A.; Furstoss, R. *J. Org. Chem.* **1990**, *55*, 347-350.

⁴⁹ Gutiérrez, M. C.; Furstoss, R.; Alphanth, V. *Adv. Synth. Catal.* **2005**, *347*, 1051-1059.

Para evitar a necessidade de utilização de enzimas para regeneração de cofatores, BVMOs auto-suficientes (obtidas por fusão entre BVMOs e desidrogenases) foram desenvolvidas para serem aplicadas na obtenção de lactonas. PAMO e CHMO foram fundidas com desidrogenases, como PTDH e utilizadas em reações de dessimetralização nas quais foram obtidas algumas lactonas de maneira estereosseletiva (Esquema 16).⁵⁰

Esquema 16 – Alguns tipos de lactonas obtidas a partir da oxidação mediada por BVMOs auto-suficientes.

Com base no exposto acima podemos observar que, a utilização de biocatálise como mediadora de reações de BV, especialmente no que diz respeito a BVMOS, experimentou um grande avanço nos últimos anos, aumentando a aplicabilidade sintética destas enzimas.

3.2. Clivagem oxidativa da ligação C-B

A relativa facilidade na clivagem oxidativa da ligação C-B é decorrente da grande diferença de energia de ligação entre as ligações B-O e B-C (519 e 323 kJ.mol⁻¹

⁵⁰ Pazmiño, D. E. T.; Snajdrova, R.; Baas, B. J.; Ghobrial, M.; Mihovilovic, M. D.; Fraaije, M. W. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, 47, 2275-2278.

respectivamente). Apesar disto, como mencionado anteriormente, compostos como ácidos borônicos e seus derivados são estáveis podendo ser manipulados ao ar.³⁰

Esta labilidade da ligação C-B pode ser uma ferramenta muito útil em síntese orgânica. A simples adição de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) em meio alcalino pode transformar uma ligação C-B em uma ligação C-O. Esta oxidação ocorre através de ataque nucleofílico do íon hidroperóxido ao orbital p vazio do átomo de boro, seguido da migração de um grupo alquila do boro para o oxigênio, com eliminação de hidróxido pela quebra da ligação O-O do oxidante. Finalmente, o hidróxido liberado ataca o átomo de boro e cliva a ligação B-OR levando a formação de um álcool e de uma nova ligação B-O no subproduto. Este subproduto reage com H_2O_2 do meio para formar $\text{B}(\text{OH})_3$, que é muito estável pois possui três átomos de oxigênio doando elétrons para o orbital p vazio do átomo de boro. Como a etapa de migração do grupo alquila e clivagem da ligação O-O ocorre de maneira concertada, a transformação da ligação C-B em C-O ocorre com retenção de configuração, a exemplo da reação de BV. O que difere é a ordem de facilidade para a migração dos grupos alquila, uma vez que uma carga parcial negativa impera no estado de transição da clivagem oxidativa da ligação C-B, ao contrário do estado de transição da reação de BV (Esquema 17).⁵¹

⁵¹ *Organic Chemistry*, Clayden, J.; Greeves, N.; Warren, S.; Wothers, P.; **2001**, Oxford University Press Inc., United States, 505-507 e 1278-1279.

Esquema 17 – Mecanismo reacional da clivagem oxidativa da ligação C-B.

Contrastando com a grande versatilidade sintética de compostos orgânicos contendo boro, existem poucos trabalhos que relatam a oxidação da ligação C-B mediada por enzimas.

O primeiro trabalho publicado envolvendo a oxidação de compostos contendo boro apresentou a oxidação de apenas dois substratos, um aromático e um alifático. Estas reações foram mediadas por CHMO, e esta enzima apresentou boa eficiência catalítica ($k_{\text{cat}}/k_m = 3,8 \times 10^6 \text{ mol.L}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$) para a transformação da ligação C-B em C-O (Esquema 18).⁵²

Esquema 18 – Bio-oxidação de compostos contendo boro.

⁵² Branchaude, B. P.; Walsh, C. J. *Am. Chem. Soc.* **1985**, 107, 2153-2161.

3. Avaliação da quimiosseletividade de BVMOs

Com intuito de provar que a oxidação catalisada por BVMOs ocorre também com retenção de configuração, o mesmo grupo realizou dois testes simples. Primeiramente realizaram a bio-oxidação de um cicloexano racêmico substituído com éster borônico e um grupo alquila. Após mostrar que a BVMO catalisou a oxidação de maneira satisfatória, eles oxidaram o enantiômero (*S,S*) levando ao correspondente álcool com retenção de configuração ($k_{cat}/k_m = 7,2 \times 10^6 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{dm}^3 \cdot \text{min}^{-1}$) (Esquema 19).⁵³

Esquema 19 – Clivagem oxidativa da ligação C-B mediada por CHMO.

Mais recentemente, outra BVMOs foi testada frente ao ácido fenilborônico. Este foi oxidado em reação catalisada por PAMO levando ao correspondente fenol (Esquema 20).⁵⁴

⁵³ Lathan, J. A.; Walsh, C. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1986**, 7, 527-528.

⁵⁴ Gonzalo, G.; Pazmiño, D. E. T.; Ottolina, G.; Fraaije, M. W.; Carrea, G. *Tetrahedron: Asymm.* **2005**, 16, 3077-3083.

Esquema 20 – Oxidação de ácido borônico aromático catalisada por PAMO.

Como poucos trabalhos envolvendo a oxidação de compostos orgânicos contendo boro mediada por enzimas foram publicados até o momento, há um vasto campo a ser explorado para aplicação sintética. Começando por testes que tem por objetivo a investigação da aceitação de substratos, até a avaliação de quimio e estereosseletividade destas enzimas.

3.3. Reações de epoxidação

Epóxidos são intermediários sintéticos interessantes, pois podem reagir com uma variedade de nucleófilos dando origem, por exemplo, a α -aminoálcoois, dióis ou haloálcoois dentre outros. A abertura de epóxidos por um nucleófilo é estereoespecífica e leva a inversão de configuração do carbono atacado (Esquema 21).⁵¹

Esquema 21 – Mecanismo para abertura de epóxido em meio básico ou ácido.

Estes intermediários cíclicos podem ser sintetizados por reação de olefinas com reagentes oxidantes contendo oxigênio eletrofílico. Os oxidantes mais utilizados são os perácidos. Como a ligação O-O nestes oxidantes é fraca, estes podem ser atacados por um nucleófilo, neste caso a dupla ligação C-C, levando a clivagem da ligação O-O e a eliminação do íon carboxilato, que é um bom grupo de partida. Como as novas ligações C-O são formadas na mesma face da dupla ligação C-C, a geometria do alqueno é mantida (Esquema 22).⁵¹

Esquema 22 - Mecanismo da reação de epoxidação envolvendo perácidos.

Devido a versatilidade sintética de epóxidos, vários métodos para a síntese enantiosseletiva destes compostos foram desenvolvidos. Algumas metodologias que podem ser citadas são a utilização de oxidantes quirais⁵⁵, a utilização de lipases na presença de oxidantes⁵⁶ e também a utilização de mono-oxigenases.⁵⁷⁻⁵⁹

Dentre as mono-oxigenases a estireno mono-oxigenase (isolada a partir de *Pseudomonas Sp.* VLB120) é conhecida por realizar reações de epoxidação de maneira satisfatória. Estirenos foram transformados em S- epóxidos em reações

⁵⁵ (a) Zhang, W.; Basak, A.; Kosugi, Y.; Hoshino, Y.; Yamamoto, H. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 4389-4391. (b) Jacobsen, E. N.; Zhang, W.; Muci, A. R.; Ecker, J. R.; Deng, L. *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 7063-7064.

⁵⁶ Moreira, A. M.; Nascimento, M. G. *Catal. Commun.* **2007**, *8*, 2043-2047.

mediadas por esta enzima. Estas reações mostraram tolerância a diferentes substituintes e ótima enantiosseletividade (Esquema 23).⁵⁷

Esquema 23 - Epoxidação de duplas ligações mediada por estireno mono-oxigenase.

A *Shingonomas Sp.* HXN-200 é uma bactéria que degrada alquenos, esta bactéria foi identificada como fonte de enzimas oxidantes. Uma alqueno mono-oxigenase isolada a partir deste microorganismo foi utilizada para a epoxidação de alguns heterociclos e posterior abertura para formação dos correspondentes dióis (Esquema 24).⁵⁸

Esquema 24 – Epoxidação de heterociclos mediada por mono-oxigenases.

⁵⁷ Schmid, A.; Hofstetter, K.; Feiten, H. J.; Hollmann, H.; Witholt, B. *Adv. Synth. Catal.* **2001**, 343, 732-737.

⁵⁸ Chang, D.; Heringa, M. F.; Witholt, B.; Li, Z. *J. Org. Chem.* **2003**, 68, 8599-8606.

A síntese de epóxidos enantiomericamente enriquecidos, seguida da abertura destes com nucleófilos de nitrogênio levando a diversos aminoalcoois também foi relatada. A etapa de epoxidação foi realizada pela utilização de células inteiras contendo mono-oxigenases (*E. coli* JM109 pTAB19) e levou aos epóxidos com altos excessos enantioméricos (Esquema 25).⁵⁹

Esquema 25 - Epoxidação mediada por mono-oxigenase seguida de abertura de epóxido.

Sabendo que mono-oxigenases são capazes de realizar reações de epoxidação e que os epóxidos gerados são ótimos intermediários sintéticos, há um crescente interesse na aplicação destas reações.

⁵⁹ Sello, G.; Orsini, F.; Bernasconi, S.; Di Gennaro, P. *Tetrahedron Asymm.* **2006**, 17, 372-376.

3.4. Resultados e discussão

3.4.1. Síntese das boro-acetofenonas 1-5

Figura 9 - Boro-acetofenonas 1-5.

Enquanto os ácidos 3 ou 4-acetil borônicos (**1** e **2**) foram obtidos comercialmente, os derivados ésteres borônicos **3** e **4** e o organotrifluorborato de potássio **5** foram obtidos a partir destes ácidos.

Os compostos **3** e **4** foram sintetizados por reação de **1** ou **2** com pinacol. O respectivo ácido borônico foi dissolvido em THF anidro, em seguida foi adicionado pinacol e o solvente foi evaporado sob vácuo a 40 °C. O procedimento foi repetido até completa conversão do material de partida, após procedeu-se a extração e purificação em coluna cromatográfica (Esquema 26).⁶⁰

⁶⁰ Andrade, L. H.; Barcellos, T. *Org. Lett.* **2009**, 11, 3052-3055.

Esquema 26 - Reação de transformação de ácidos borônicos (**1** ou **2**) em ésteres borônicos (**3** ou **4**).

Ésteres borônicos são menos polares e mais facilmente manipuláveis que seus precursores ácidos borônicos, pois não há mais a presença de hidroxilas passíveis de formação de ligações de hidrogênio. A troca de grupamentos hidroxilas por grupamentos alcóxilas também pode ser considerado como uma proteção por mascarar a reatividade da ligação C-B levando a um maior impedimento, deixando os compostos mais estáveis.³⁰

O organotrifluoroborato **5** foi igualmente obtido a partir do ácido borônico correspondente (**2**). O ácido borônico foi dissolvido em metanol e então, solução de KHF₂ foi adicionada. Após 1 h de reação o produto foi precipitado a 0 °C e purificado por recristalização (Esquema 27).⁶¹

Esquema 27 - Reação de transformação de ácido borônico (**2**) em organotrifluoroborato (**5**).

⁶¹ Molander, G. A.; Petrillo, D. E. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, 128, 9634-9635.

A vantagem em transformar ácidos borônicos em organotrifluoroboratos é a formação da forte ligação boro-flúor que torna o composto mais estável e diminui a reatividade do boro frente a oxidantes.³⁰

Os ácidos borônicos são facilmente convertidos em seus derivados ésteres borônicos e organotrifluoroboratos. Como diferentes substituintes ligados no átomo de boro levam a características diferentes, estas transformações são uma boa alternativa para emprego em metodologias variadas.³⁰

3.4.2. Síntese de derivados alquênil borônicos 6-11

Figura 10 - Estrutura dos derivados alquênil borônicos 6-11.

Ésteres borônicos vinílicos são comumente sintetizados utilizando a hidroboração de alquinos. A estereosseletividade *syn* desta reação leva ao produto *E* com alta pureza regioisomérica. O boro se adiciona no carbono menos substituído para

gerar um intermediário mais estável, já que a ligação carbono-boro se forma antes da ligação carbono-hidrogênio, gerando uma carga parcial positiva no carbono adjacente. Por isto, em alquinos terminais a adição de boro ocorre no carbono acetilênico terminal e, a formação da carga parcial positiva ocorre no carbono mais substituído (Esquema 28).⁵¹

Esquema 28 - Reação de hidroboração de alcino terminal.

Portanto, a hidroboração direta de alquinos terminais foi realizada para a obtenção dos compostos *E*-vinílicos contendo boro (**6** e **7**). O pinacol foi dissolvido em diclorometano e foi adicionado $\text{BH}_3\cdot\text{SMe}_2$ a mistura, para a formação da pinacolborana. Após 2 h, adicionou-se o alcino terminal e, após 7h a reação foi interrompida e o produto foi extraído e purificado por coluna cromatográfica (Esquema 29).⁶²

⁶² Tucker, C. E.; Davidson, J.; Knochel, P. *J. Org. Chem.* **1992**, 57, 3482-3485.

Esquema 29 - Hidroboração de alcino terminal, síntese dos compostos **6** e **7**.

Infelizmente, métodos de preparo de ésteres borônicos *Z*-vinílicos não são numerosos e frequentemente apresentam problemas associados com estereosseletividade e tolerância a grupos funcionais. A primeira metodologia testada para a síntese dos compostos **8** e **9** foi a hidroboração/protodesboronação⁶³ de pinacol boronatos alquinílicos. O primeiro passo foi a síntese da borana de dicitclohexila. Esta borana é um sólido branco sensível ao ar e que, portanto deve ser armazenada e manipulada sob atmosfera inerte. Após, foi sintetizado o pinacolboronato alquinílico (**12** ou **13**)⁶⁴, e finalmente foi realizada a hidroboração/protodesboronação (Esquema 30).

⁶³ Molander, G. A.; Ellis, N. M. *J. Org. Chem.* **2008**, 73, 6841-6844.

⁶⁴ Buttner, M. W.; Natscher, B. J.; Burschka, C.; Tacke, R. *Organometallics*. **2007**, 26, 4835-4838.

Esquema 30 - Síntese de borato Z-vinílico (**8** ou **9**) via hidroboração/protodesboronação.

Neste caso o rendimento reacional da última etapa se mostrou insatisfatório, provavelmente ocasionado pela instabilidade e dificuldade de manipulação da borana utilizada (Cy_2BH).

Devido ao baixo rendimento obtido, outra metodologia foi testada. A nova metodologia propunha a transformação do éster borônico *E*-vinílico em um brometo *Z*-vinílico seguido de acoplamento catalisado por paládio.⁶⁵ Então, foi realizada a reação de transformação do éster borônico em um haleto, porém observou-se pelo RMN ^1H a mistura de produtos *E* e *Z* (**14** e **15**) em uma proporção de aproximadamente 1:1 (Esquema 31). Portanto, não foi realizada a etapa de acoplamento, pois esta levaria a mistura de isômeros (compostos **7** e **9**).

⁶⁵ Takahashi, K.; Takagi, J.; Ishiyama, T.; Miyaura, N. *Chem. Lett.* **2000**, 126-127.

Esquema 31 - Metodologia de síntese de boronatos Z-vinílicos.

Uma terceira metodologia foi testada, esta envolvia telureto vinílico como intermediário e a reação de troca telúrio/lítio. Os teluretos Z-vinílicos não são susceptíveis a isomerização e após a troca geram um intermediário Z metalado com retenção de configuração.⁶⁶ Para a síntese dos teluretos vinílicos foram empregadas dois métodos diferentes, dependendo do substituinte da dupla ligação que se desejava. Para obter-se o grupamento fenila ligado a dupla ligação foi realizada a simples hidroteluração do fenil acetileno resultando no composto desejado (**16**) (Esquema 32).

Esquema 32 - Reação de hidroteluração do fenilacetileno.

⁶⁶ Mirzayans, P. M. Pouwer, R. H.; Willians, C. M.; Bernhardt, P. V. *Tetrahedron*. **2009**, 65, 8297-8305.

3. Avaliação da quimiosseletividade de BVMOs

Porém, para obter-se o grupamento *n*-hexila ligado a dupla ligação, foram necessárias duas etapas sintéticas, uma vez que a hidroteluração direta do *n*-octino leva a mistura de regioisômeros. Primeiramente, foi realizada a síntese do teluroacetileno (**17**) e, após a redução deste com DIBAL-H levando ao composto **18** (Esquema 33).⁶⁷

Esquema 33 - Reação de formação da ligação Csp-Te seguida de redução, síntese do composto **18**.

Os teluretos vinílicos (**16** ou **18**) foram purificados por coluna cromatográfica e, os rendimentos expressos são dos produtos isolados. Após a obtenção dos teluretos *Z*-vinílicos foi realizada a troca telúrio/lítio seguida de reação com 2-isopropoxi-4,4,5,5-tetrametila-1,3,2-dioxaborana levando aos compostos **8** e **9** (Esquema 34).

Esquema 34 - Síntese de pinacolboranas *Z*-vinílicas (**8** e **9**).

⁶⁷ Dabdoub, M. J.; Cassol, T. M. *Tetrahedron*. **1995**, 51, 12971-12982.

A adição de iodeto de metila (Mel) como último passo desta reação, previne uma possível reação radicalar por captura de espécies radiculares após a formação da ligação C-B, o que poderia levar a uma mistura de produtos de geometria *E* e *Z* (Esquema 35).⁶⁷

Esquema 35 - (a) Hipótese de reação radicalar na ausência de Mel; (b) Reação na presença de Mel, sem competição da reação radicalar.⁶⁷

No que diz respeito aos compostos vinilborônicos (**10** e **11**), o composto **11** foi encontrado disponível comercialmente. Para a síntese do composto **10**, primeiramente sintetizou-se um haleto geminal intermediário (**19**). O haleto foi sintetizado por reação do acetileno terminal (*n*-octino) com cloro trimetilsilano, iodeto de sódio e água em

acetonitrila (Esquema 36).⁶⁸ Nesta reação, ocorre a formação de HI *in situ* o que leva a hidro-iodinação.

Esquema 36 - Síntese do iodeto geminal.

O iodeto vinílico **19** foi reagido por acoplamento com B_2Pin_2 na presença de $\text{PdCl}_2(\text{PPh}_3)_2$ e PhOK em tolueno a fim de realizar síntese do composto **10** (Esquema 37).⁶⁹ O composto foi purificado por coluna cromatográfica, e o rendimento obtido diz respeito ao produto isolado.

Esquema 37 - Síntese do éster vinilborônico **10** via acoplamento catalisado por paládio.

Devido ao grande número de metodologias para a síntese de ésteres alquenilborônicos, foi possível a síntese destes compostos em diferentes geometrias.

⁶⁸ Kamiya, N.; Chikami, Y.; Ishii, Y. *Synlett*. **1990**, 675.

⁶⁹ Takagi, J; Takahashi, K.; Ishiyama, T.; Miyaura, N. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, 124, 8001-8006.

3.4.3. Reações de oxidação de boro-acetofenonas (1-5) mediada por BVMOs

Os compostos **1-5** foram submetidos a reações de oxidação mediada por mono-oxigenases. Estes compostos permitiram a avaliação da reatividade das mono-oxigenases frente a diferentes espécies de boro (ácido borônico, éster borônico e organotrifluoroborato) além da avaliação da quimiosseletividade.

Primeiramente foram realizadas reações de 24 h utilizando como catalisadores as enzimas BVMOs: PAMO (fenilacetona mono-oxigenase), PAMO mutante M446G, HAPMO (4-hidroxiacetofenona mono-oxigenase) e CHMO (cicloexanona mono-oxigenase) (Esquema 38, Tabela 2). Para tal, utilizou-se NADPH como cofator, um sistema de regeneração de cofator (enzima PTDH – fosfito desidrogenase- e fosfito de sódio) e como solvente solução aquosa tamponada (tris-HCl) pH 9 (Esquema 38). Para PAMO e PAMO M446G foi utilizado temperatura de 30 °C, pois são enzimas termo-estáveis e podem ser utilizadas até em temperaturas maiores. Já com HAPMO e CHMO, que não são termo-estáveis, a temperatura máxima a ser utilizada é 25 °C.

Apesar de algumas BVMOS tolerarem solventes orgânicos no meio reacional, a maior atividade destas enzimas, e de enzimas em geral, é em meio aquoso. Portanto, preferiu-se realizar os experimentos em meio aquoso tamponado utilizando apenas 1% de DMSO para garantir solubilização total dos substratos.

As reações foram extraídas com acetato de etila e analisadas em CG e CG-MS para obtenção da conversão e análise dos produtos obtidos. Para confirmação da estrutura dos produtos foram analisados também os produtos **20-25** de origem

3. Avaliação da quimiosseletividade de BVMOs

comercial ou sintética. Ainda, foram realizadas reações de 24h com meio tamponado sem as enzimas (reação controle), para avaliar se a reação observada foi proporcionada pela catálise enzimática.

Reações enzimáticas com 3 e 4-hidróxi-acetofenona foram também realizadas como controle para confirmação do comportamento enzimático. O teste foi realizado por que após a clivagem da ligação C-B ocorre a formação de uma hidróxi-acetofenona no meio reacional, porém um subproduto de boro $[B(OH)_3$ ou $(OH)BPin]$ também está presente e este poderia causar a inibição da enzima.

Esquema 38- Reação de oxidação dos compostos 1-5 mediada por mono-oxigenase.

3. Avaliação da quimiosseletividade de BVMOs

Tabela 2 - Reações de oxidação de **1-5** catalisadas por mono-oxigenases. ^a

Entrada	Substrato	PAMO Prod. /Conv.(%) ^b	HAPMO Prod. /Conv.(%) ^b	PAMO M446G Prod. /Conv.(%) ^b	CHMO Prod. /Conv.(%) ^b
1	1	20 100	24 100	20 100	20 100
2	2	23 100	25 100	21 23 (1:4) ^d /100	21 100
3	3	20 100	24 100	20 100	(-) ^c
4	4	23 100	25 74	21 23 (5:4) ^d /100	21 43
5	5	23 100	25 100	21 23 (1:2) ^d /100	21 100

3. Avaliação da quimiosseletividade de BVMOs

Tabela 2 - Reações de oxidação de **1-5** catalisadas por mono-oxigenases (continuação). ^a

Entrada	Substrato	PAMO Prod. /Conv.(%) ^b	HAPMO Prod. /Conv.(%) ^b	PAMO M446G Prod. /Conv.(%) ^b	CHMO Prod. /Conv.(%) ^b
6	20	(-) ^c	24 100	(-) ^c	(-) ^c
7	21	23 100	25 100	21 23 25 (5,2:2,7:2,0) ^d / 100	(-) ^c

^aCondições gerais: Substrato (10 mmol.L⁻¹, DMSO (1%), tris-HCl pH 9 (440 µL), fosfito (20 mmol.L⁻¹), NADPH (0,2 mmol.L⁻¹), PTDH (1 µmol.L⁻¹), enzima (4 µmol.L⁻¹), 30 °C ou 24 °C, 200 rpm, 24 h. ^b Calculou-se por curva de calibração obtida por CG e os produtos foram analisados através de CG-MS. ^c Nenhuma reação foi observada. ^d Calculado através curva de calibração obtida em CG.

Com a finalidade de analisar os intermediários formados foram realizadas reações de 1-8 h para os substratos **2** e **4** com as três melhores enzimas (PAMO, PAMO mutante M446G e HAPMO) (Tabela 3).

3. Avaliação da quimiosseletividade de BVMOs

Tabela 3 - Acompanhamento das reações de 1-8 h para **1-5** mediada por mono-oxigenases.

Entrada	Tempo (h)	Enzima	Composto 2 Prod. /Conv.(%) ^a	Composto 4 Prod. /Conv.(%) ^a
1	1	PAMO	21 100	21 66
2		PAMO M446G	21 100	21 64
3		HAPMO	23 100	23 22
4	4	PAMO	21 23 (7:3) ^b /100	21 23 (1:1) ^b /91
5		PAMO M446G	21 23 (8.5:1.5) ^b /100	21 23 (8:1) ^b /95
6		HAPMO	25 100	23 66

3. Avaliação da quimiosseletividade de BVMOs

Tabela 3 - Acompanhamento das reações de 1-8 h para **1-5** mediada por mono-oxigenases (continuação).

Entrada	Tempo (h)	Enzima	Composto 2 Prod. /Conv.(%) ^a	Composto 4 Prod. /Conv.(%) ^a
7		PAMO	<p>23</p> <p>25</p> <p>(3:7)^b/100</p>	<p>21</p> <p>25</p> <p>(4:3)^b/78</p>
8	8	PAMO M446G	<p>23</p> <p>25</p> <p>(1:1)^b/100</p>	<p>21</p> <p>23</p> <p>(7:3)^b/96</p>
9		HAPMO	<p>23</p> <p>100</p>	<p>23</p> <p>25</p> <p>(1:4)^b/66</p>

^a Calculou-se por curva de calibração obtida por CG e os produtos foram analisados através de CG-MS . ^b

Calculado através curva de calibração obtida em CG.

Os resultados obtidos após os testes de 1-24 h utilizando PAMO como biocatalisador podem ser resumidos no Esquema 39.

Esquema 39 - Reações de oxidação dos compostos 1-5 utilizando PAMO.

A enzima PAMO realizou a oxidação do boro para todos os substratos, porém a reação de BV foi observada somente quando o substituinte estava na posição 4 do anel aromático (Tabela 2, entradas 2, 4 e 5). Este comportamento também foi observado para as hidróxi-acetofenonas testadas (Tabela 2, entradas 6 e 7). Como podemos ver no Esquema 40, a presença da hidroxila na posição 4 do anel aromático, que ocorre após a clivagem da ligação C-B, facilita a reação de Baeyer-Villiger. Isto ocorre porque um intermediário com carga positiva no anel aromático é formado e, este

é estabilizado por grupos doadores de elétrons nas posições 4 e 2 do anel. Como sabemos pelo postulado de Hammond, o estado de transição se assemelha ao intermediário sendo, portanto, também estabilizado. Ao contrário do que ocorre com os compostos 4-substituídos, para os compostos 3-substituídos a hidroxila não consegue estabilizar esta carga, pois a conjugação com a carga positiva não ocorre. Ao que tudo indica para realizar a reação de Baeyer-Villiger nestes substratos a enzima PAMO precisa da presença de grupos ativadores para esta reação.

Esquema 40 - Intermediário da reação de Baeyer-Villiger.

A enzima PAMO M446G mostrou comportamento similar a enzima PAMO, porém a reação de BV em substratos 4 substituídos ocorreu mais lentamente (Tabela 2, entradas 2, 4 e 5). Em todas as reações com a HAPMO observou-se a transformação da ligação C-B em C-O e a reação de BV simultaneamente (produtos **22** e **23**). Além disso, após 24h os produtos de hidrólise dos ésteres foram obtidos (**24** e **25**). A enzima CHMO, apesar de altamente quimiosseletiva (somente catalisou a transformação da ligação C-B), mostrou baixa ou nenhuma atividade nas reações com os ésteres borônicos (**3** e **4**) em até 24 h (Tabela 2, entradas 3 e 4).

Com a intenção de avaliar melhor os resultados obtidos com a oxidação das boro-acetofenonas, foram realizados também alguns estudos cinéticos. Estes experimentos foram realizados somente com a enzima PAMO M446G e os substratos **1** e **3**. Esta enzima foi escolhida devido à alta atividade e quimiosseletividade demonstrada em favor da transformação da ligação C-B nestes substratos. Os resultados revelaram que a velocidade de oxidação observada ($k_{\text{cat}} = 2,6 \text{ s}^{-1}$ e $1,1 \text{ s}^{-1}$ para **1** e **3**, respectivamente)⁷⁰ é similar a observada para os melhores substratos já relatados desta enzima.⁷¹ Através da medida de k_M , que é uma medida da afinidade pelo substrato, foi observado que os compostos **1** e **3** são bem reconhecidos pela enzima ($k_M = 1,4 \text{ mmol.L}^{-1}$ e $0,4 \text{ mmol.L}^{-1}$ para **1** e **3**, respectivamente).

3.4.4. Reações de oxidação de compostos alquênil borônicos (6-11) mediada por BVMOs

Embora a oxidação do boro seja mais rápida que a oxidação de uma dupla ligação C-C, foi avaliado se as BVMOs levam à oxidação do boro de maneira rápida sem competição com a reação de epoxidação. Os substratos escolhidos têm o boro diretamente ligado à dupla ligação, conseqüentemente após a clivagem oxidativa da ligação C-B se forma um enol que, rapidamente, se transforma na cetona

⁷⁰ k_{cat} pode ser interpretado como o número de moléculas do produto produzidos por uma enzima em um segundo, ou seja, taxa de ciclagem.

⁷¹ Fraaije, W. M.; Wu, J.; Heuts, D. P. H. M.; van Hellemond, E. W.; Spelberg, J. H. L.; Janssen, D. B. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2005**, 66, 393-400.

3. Avaliação da quimiosseletividade de BVMOs

correspondente. Portanto, após a transformação da ligação C-B não há mais chances de haver a reação de epoxidação, pois não há mais dupla ligação C-C na estrutura (Esquema 41).

Esquema 41 - Reação de oxidação de substratos vinílicos de boro catalisada por BVMOs.

Para isto, os compostos **6-11** foram submetidos a reações de oxidação mediada por BVMOs (PAMO, PAMO M446G, HAPMO e CHMO). Estes compostos permitiram a avaliação da reatividade das mono-oxigenases frente a compostos vinílicos com diferentes geometrias e substituição, além da avaliação de quimiosseletividade. As reações foram realizadas seguindo a mesma metodologia descrita anteriormente, ou seja, os compostos foram submetidos a reações mediadas pelas BVMOs num sistema contendo cofator (NADPH), regeneração de cofator (PTDH e fosfito) e tampão tris-HCl pH 9 em 24h.

Não houve conversão para os substratos **6**, **8** e **10** (onde R=*n*-Hex) com nenhuma das enzimas empregadas em até 24h. Entretanto, para os compostos **7**, **9** e **11** as reações mediadas por BVMOs foram possíveis (Esquema 42, Tabela 4).

3. Avaliação da quimiosseletividade de BVMOs

Esquema 42 - Reação de oxidação dos substratos **7**, **9** e **11** com BVMOs.

Tabela 4 - Reações enzimáticas de 24 h de **7**, **9** e **11** mediadas por mono-oxigenases.^a

Entrada	Substrato	PAMO Prod. /Conv.(%) ^b	HAPMO Prod. /Conv.(%) ^b	PAMO M446G Prod. /Conv.(%) ^b	CHMO Prod. /Conv.(%) ^b
1		 100	 (2:3) ^c /100	 100	 (4:1) ^c /100
2		 100	 (3:7) ^c /100	 100	 100
3		 100	 (1:2.3) ^c /68	 100	 100

^aCondições gerais: Substrato (10 mmol.L⁻¹), DMSO (1%), tris-HCl pH 9 (440 µL), fosfite (20 mmol.L⁻¹), NADPH (0,2 mmol.L⁻¹), PTDH (1 µmol.L⁻¹), enzima (4 µmol.L⁻¹). 30 °C ou 24 °C, 200 rpm, 24 h. ^b Calculou-se por curva de calibração obtida por CG e os produtos foram analisados através de CG-MS. ^c Calculado através curva de calibração obtida em CG.

3. Avaliação da quimiosseletividade de BVMOs

Foram ainda realizados testes de 1-4 h para os substratos citados acima (Tabela 5), desta maneira foi possível a observação de produtos formados intermediariamente.

Tabela 5 - Acompanhamento das reações de 1-4 h para **7**, **9** e **11** mediada por BVMOs.

Entrada	Tempo (h)	Enzima	Composto 7 Prod. /Conv.(%) ^a	Composto 9 Prod. /Conv.(%) ^a	Composto 11 Prod. /Conv.(%) ^a
1	1	PAMO	(-) ^b	 30 13	 29 14
2		PAMO M446G	(-) ^b	 30 14	 29 13
3		HAPMO	(-) ^b	 30 15	 29 9
4		CHMO	(-) ^b	 28 30 (1:1)/ 20	 29 18

3. Avaliação da quimiosseletividade de BVMOs

Tabela 5 - Acompanhamento das reações de 1-4 h para **7**, **9** e **11** mediada por BVMOs (continuação).

Entrada	Tempo (h)	Enzima	Composto 7 Prod. /Conv.(%) ^a	Composto 9 Prod. /Conv.(%) ^a	Composto 11 Prod. /Conv.(%) ^a
5		PAMO	27	27	29
			30	30	46
			31 (3,9:1,1:2) ^c / 72	31 (5:1,5:3) ^c / 95	
6	4	PAMO M446G	27	27	29
			30	30	32
			31 (2,4:1,8:2) ^c / 63	31 (1,6:4:3,2) ^c / 90	
7		HAPMO	30	30	29
			31 (3:3,4) ^c / 64	20	54
8		CHMO	28	28	29
			30 (1:1,4) ^c / 58	30 (6:1) ^c / 80	67

^a Calculou-se por curva de calibração obtida por CG e os produtos foram analisados através de CG-MS. ^b Nenhuma reação foi observada. ^c Calculado através curva de calibração obtida em CG.

3. Avaliação da quimiosseletividade de BVMOs

Os resultados obtidos nas reações mediadas por PAMO com os compostos vinílicos (**7**, **9** e **11**) estão resumidos no Esquema 43.

A reação de epoxidação não foi observada para nenhum dos substratos. Entretanto, em todos os compostos aromáticos foi observada a clivagem da ligação carbono-boro levando aos produtos **29** ou **30**. O produto **30** sofreu oxidação de BV e o éster formado (**31**) foi hidrolisado ao composto **27** (Tabela 4, entradas 1 e 2). Em contrapartida, o produto **29** não sofreu reação de BV sendo obtido ao final de 24 h (Tabela 4, entrada 3). Esta diferença observada entre os compostos **29** e **30** é devido a maior reatividade de aldeídos frente a oxidantes e nucleófilos em geral. Além disto, foi

observado anteriormente que a enzima PAMO precisa de uma ativação para realizar a oxidação de BV em cetonas diretamente ligadas ao anel aromático.

A enzima PAMO M446G apresentou comportamento similar à PAMO. As reações dos substratos **7** e **9** com HAPMO e CHMO levaram ao aldeído **30**, mas também ao produto de sua redução (álcool fenetílico, **28**) (Tabela 4, entradas 1 e 2). A enzima CHMO catalisou a oxidação de **11** levando a cetona correspondente (**29**) após 24 h (Tabela 4, entrada 3). E, por fim, a reação de **11** mediada por HAPMO levou a uma mistura de **29** e **26** ao final das 24h reacionais (Tabela 4, entrada 3). Estes produtos são provenientes da transformação da ligação C-B seguido de BV e, posterior hidrólise do éster formado.

Para investigar como ocorre a formação do álcool **28**, realizou-se reação do aldeído comercial **30** com HAPMO e CHMO juntamente com o cofator, o sistema de regeneração de cofator e tampão. Também foi realizada reação do mesmo aldeído faltando somente as BVMOs. Foi observado que ocorre a redução do aldeído somente na presença das enzimas HAPMO e CHMO. Isso se deve, provavelmente, pela presença de alguma enzima redutora que restou mesmo após a etapa de purificação das enzimas HAPMO e CHMO.

4. Resolução Cinética Mediada por BVMOs

A quiralidade é um elemento importante na natureza e também exerce um papel fundamental em ciência e tecnologia. Uma grande variedade de processos biológicos são realizados através do reconhecimento perfeito de um substrato. Com base nisto, funções metabólicas e respostas biológicas ocorrem porque enzimas, receptores celulares e outros sítios de ligação naturais reconhecem os substratos com estereoespecificidade.⁷² O desenvolvimento químico de produtos farmacêuticos, pesticidas e aditivos da indústria alimentícia também depende da quiralidade para diminuir os efeitos indesejados. Por exemplo, no caso de moléculas com atividade biológica o efeito desejado está quase sempre presente em um dos enantiômeros, o outro enantiômero não contribui com a atividade desejada e pode levar a efeitos colaterais graves (Figura 11).⁷³

Bloqueador β -Adrenérgico utilizado como anti-hipertensivo e 98 vezes mais ativo que o enantiômero (*R*).

Auxiliar no tratamento da doença de Parkinson. O enantiômero (*R*) não é metabolizado no organismo, seu acúmulo pode ser prejudicial.

Figura 11 - Exemplo de fármacos com enantiômeros que apresentam efeitos diferentes no organismo.

⁷² *Asymmetric Catalysis in Organic Synthesis*, Noyori, R., John Wiley & Sons Inc., New York, 1 ed., 1.

Portanto, nas últimas décadas a obtenção de produtos enantiomericamente puros é um alvo constante, o que gera uma demanda por métodos com esta finalidade.⁷³

4.1. Reações mediadas por enzimas: estereosseletividade

Enzimas são proteínas capazes de catalisar reações químicas geralmente com alta estereosseletividade. Esta seletividade ocorre tanto na ligação do substrato quiral à enzima quanto na catálise de suas reações. A estereosseletividade é uma característica deste processo, uma vez que as enzimas possuem uma quiralidade inerente, por serem formadas apenas de *L*-aminoácidos, formando um sítio ativo assimétrico.

Em uma resolução cinética enzimática de uma mistura de dois estereoisômeros, para que a reação biocatalisada seja altamente estereosseletiva, há a necessidade de um correto posicionamento do substrato no sítio ativo assimétrico da enzima em questão. Toda a estereosseletividade observada em reações mediadas por enzimas vem da diferença de energia ($\Delta\Delta G_S^*$) para a ligação de diferentes estereoisômeros no sítio ativo de uma enzima, o que leva a diferentes velocidades de reação (Figura 12).³

⁷³ *Green Chemistry and Catalysis*, Sheldon, R.; Arends, I.; Hanefeld, U., Wiley-VCH, Weinheim, Germany, **2007**, 35.

Em uma reação de uma enzima (**E**) com os enantiômeros (*R*) e (*S*) de um substrato (**S**), são formados os complexos enzima-substratos diastereoisoméricos [**ES**_(*R*)] e [**ES**_(*S*)]. Os estados de transição que dão origem a estes complexos possuem diferentes energias livres de ativação ($\Delta G^\ddagger$). Como consequência, um dos estereoisômeros será transformado mais rapidamente que o outro. A diferença da energia livre entre os dois estados de transição ($\Delta\Delta G^\ddagger$) é uma medida direta da estereosseletividade do processo, pois quanto maior esta diferença maior será a diferença de velocidade de transformação dos dois enantiômeros e, maior a estereosseletividade do processo.

Figura 12 - Perfil energético para reação hipotética de uma enzima (**E**) com dois enantiômeros diferentes (**S**_(*R*) e **S**_(*S*)).⁷⁴

⁷⁴ Barcellos, T.; *Tese de doutorado*, Universidade de São Paulo- Brasil, **2011**.

4.2. Avaliação da enantiosseletividade de BVMOs na oxidação de heteroátomos

Quando comparada com a oxidação de grupamentos orgânicos como alquenos, alcoóis, cetonas entre outros, a oxidação de heteroátomos mediada por enzimas tem um número bem menor de trabalhos publicados.⁷⁵ Quando falamos de oxidações mediadas por BVMOs este número é ainda menor. Se considerarmos transformações a partir de um substrato quiral ou pró-quiral e que visam a estereosseletividade, estes trabalhos se restringem quase somente a obtenção de sulfóxidos quirais.

Realmente, dentre os trabalhos de oxidação de heteroátomos, a oxidação de enxofre é a mais realizada. Este tipo de oxidação é escolhido muitas vezes para caracterizar e otimizar os parâmetros de utilização de enzimas com heteroátomos.⁷⁵

Uma variedade de sulfetos simples foram oxidados por BVMOs. A enzima CHMO é a mais estudada e foi utilizada, por exemplo, para oxidação de uma série de sulfetos levando a ótimas conversões e excessos enantioméricos de sulfóxidos (Esquema 44).⁷⁶

Esquema 44 – Oxidação de sulfetos mediada por CHMO.

⁷⁵ Hollmann, F.; Arends, I. W. C. E.; Buechler, K.; Schallmeyer, A.; Bühler, B. *Green. Chem.* **2011**, 13, 226-265.

⁷⁶ Colonna, S.; Gaggero, N.; Carrea, G.; Pasta, P. *Chem. Commun.* **1997**, 439-440.

A enzima PAMO também foi utilizada como biocatalisador para a síntese de sulfóxidos quirais. Neste trabalho foram oxidados uma série de sulfetos aromáticos levando aos sulfóxidos correspondentes, geralmente, em bons excessos enantioméricos e com boa conversão (Esquema 45).⁷⁷

n = 0

R = Me e R¹ = H, Conv. = 94%, e.e = 44%

R = Et e R¹ = H, Conv. = 79%, e.e = 33%

R = Me e R¹ = *p*-Me, Conv. = 68%, e.e = 10%

R = Me e R¹ = *p*-NO₂, Conv. = 27%, e.e = 76%

n = 1

R = Me e R¹ = H, Conv. = 29%, e.e = 94%

R = Et e R¹ = H, Conv. = 36%, e.e = 98%

Esquema 45 - Oxidação de sulfetos aromáticos mediada por PAMO.

Adicionalmente, outras BVMOS, como HAPMO, foram testadas para a oxidação de sulfetos aromáticos com bons resultados.⁷⁸

A oxidação de sulfetos utilizando um co-solvente orgânico também foi testada. Co-solventes como alcoóis, acetona, glicerol, acetonitrila, clorofórmio, tolueno e *n*-hexano foram testados e comparados com a reação somente em meio aquoso utilizando PAMO e HAPMO. Na maioria das vezes houve uma queda na conversão,

⁷⁷ Gonzalo, G.; Pazmiño, D. E.T.; Ottolina, G.; Fraaije, M. W.; Carrea, G. *Tetrahedron: Asymm.* **2005**, 16, 3077-3083.

⁷⁸ Gonzalo, G.; Pazmiño, D. E. T.; Ottolina, G.; Fraaije, M. W.; Carrea, G. *Tetrahedron: Asymm.* **2006**, 17, 130-135.

porém em alguns casos houve melhora na enantiosseletividade da reação (Esquema 46).⁷⁹

Esquema 46 - Oxidação mediada por BVMO utilizando co-solvente orgânico.

Embora mais escassa, a oxidação assimétrica de aminas terciárias também foi relatada. A reação biocatalisada por CHMO levou aos produtos *N*-óxidos com boas conversões, mas baixos excessos enantioméricos (Esquema 47).⁸⁰

Esquema 47 – Oxidação de aminas terciárias mediada por CHMO.

A oxidação de selênio e sua utilização em uma resolução cinética enzimática, através de rearranjo (2,3)-sigmatrópico, foi relatada utilizando CHMO como

⁷⁹ Gonzalo, G.; Ottolina, G.; Zambianchi, F.; Fraaije, M. W.; Carrea, G. *J. Molec. Catal. B.: Enzym.* **2006**, 39, 91-97.

⁸⁰ Ottolina, G.; Bianchi, S.; Belloni, B.; Carrea, G.; Daniel, B. *Tetrahedron Lett.* **1999**, 40, 8483-8486.

biocatalisador. Os autores observaram a formação do produto desejado, porém racêmico. Isto pode ser resultado de uma oxidação não seletiva do átomo de selênio ou da já conhecida racemização do selenóxido em meio aquoso (Esquema 48).⁸¹

Esquema 48 - Oxidação de seleneto a selenóxido mediada por CHMO.

Esta falta de relatos a respeito da oxidação assimétrica ou resolução cinética através da oxidação de heteroátomos mediada por enzimas é antagônica, uma vez que estruturas quirais contendo heteroátomos, oxidados ou não, são conhecidos como auxiliares quirais e blocos sintéticos em síntese orgânica.⁸²

Falando mais especificamente da oxidação de boro⁵²⁻⁵⁴ e selênio^{52,83}, apenas poucos exemplos de bio-oxidação são relatados, com substratos não quirais. Como mostrado anteriormente, somente um exemplo de tentativa de resolução cinética

⁸¹ Latham, J. A.; Branchaud, B. P.; Chen, Y. C. J.; Walsh, C. J. *Chem. Soc., Chem. Commun.* **1986**, 528-530.

⁸² (a) Carreño, M. C.; Hernandez-Torres, G.; Ribagorda, M.; Urbano, A. *Chem. Commun.* **2009**, 6129-6144. (b) Wojaezyska, E.; Wojaezynski, J. *Chem. Rev.* **2010**, 110, 4303-4356.

⁸³ (a) Chen, G. P.; Ziegler, D. M. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **1994**, 312, 566-572. (b) Da Costa, C. E.; Comasseto, J. V. C.; Crusius, I. H. S.; Andrade, L. H.; Porto, A. L. M. *J. Molec. Catal. B.: Enzym.* **2007**, 45, 135-139. (c) Andrade, L. H.; Pedrozo, E. C.; Leite, H. G.; Brondani, P. B. *J. Molec. Catal. B.: Enzym.* **2011**, 73, 63-66.

envolvendo oxidação de selênio é conhecido e, nenhum exemplo de avaliação de substratos quirais de boro como substratos de reações biocatalisadas foi relatado. Também, com base nesta informação podemos perceber que a bio-oxidação de heteroátomos é ainda uma área em pleno desenvolvimento merecendo atenção.

4.3. Síntese de compostos em que o boro está ligado a carbono quiral

Boranas quirais são blocos sintéticos muito úteis em síntese orgânica, pois adicionalmente a labilidade da ligação C-B, as transformações ocorrem com retenção da configuração, mantendo a pureza ótica.⁸⁴ Compostos quirais contendo boro também podem ser utilizados como catalisadores ou auxiliares quirais em reações enantiosseletivas como alilações, reduções e ciclopropanações.³⁰

Frequentemente boranas quirais, enantiomericamente enriquecidas ou não, são sintetizadas através da hidroboração de olefinas utilizando quantidades estequiométricas de agentes borilantes (a)quirais.^{84,85} Utilizando esta metodologia, alquenos terminais podem levar a boranas primárias sem mistura de produtos enquanto, alquenos 1,2-dissubstituídos não simétricos geralmente levam a misturas de regioisômeros. Somente estirenos levam a satisfatória regioseletiva hidroboração, levando a boranas secundárias. Outra alternativa é a utilização de alquenos simétricos

⁸⁴ a) Kabalka, G. W. *J. Organomet. Chem.* **1984**, 274, 1-29. b) Kabalka, G. W.; Marks, R. C. *J. Organomet. Chem.* **1993**, 457, 25-40. c) Moran, W. J.; Morken J. P. *Org. Lett.* **2006**, 8, 2413-2415.

⁸⁵ a) Brown, H. C.; Ramachandran, P. V. *Pure Appl. Chem.* **1991**, 63, 307-316. b) Brown, H. C.; Ramachandran, P. V. *J. Organomet. Chem.* **1995**, 500, 1-19. c) Aggarwal, V. K., Fang, G. Y.; Schmidt, A. T. *J. Am. Chem. Soc.*, **2005**, 127, 1642-1643. d) Carrol, A. M.; O'Sullivan, T. P.; Guiry, P. J. *Adv. Synth. Catal.*, **2005**, 347, 609-631.

em que a inserção de boro em qualquer carbono leva ao mesmo produto (Esquema 49).

Esquema 49 - Hidroboração de alquenos utilizando borana quiral.

A reação de hidroboração de estireno catalisada por Rh na presença de ligante (a)quiral, ocorre de maneira régio e/ou enantiosseletiva (Esquema 50).⁸⁶

Esquema 50 – Hidroboração de estireno catalisada por Rh.

A hidrogenação de boronatos alquênlicos é outra forma muito utilizada para obtenção de boranas quirais. Estas reações são catalisadas por metais de transição

⁸⁶ a) Chen, A.; Ren, L.; Crudden, C. M. *J. Org. Chem.* **1999**, 64, 9704-9710. b) Crudden, C. M.; Hleba, Y. B.; Chen, A. C. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, 126, 9200-9201.

como Pd/C⁸⁷, Rh/C⁸⁸ ou Ir⁸⁹, podendo utilizar ou não ligantes quirais no meio reacional (Esquema 51).

Esquema 51 – Hidrogenação de boronatos alquênílicos catalisada por Ir.

4.4. Síntese de compostos em que o selênio está ligado a carbono quiral

Somada a versatilidade de selenetos orgânicos como intermediários sintéticos, organoselenetos ou disselenetos orgânicos quirais podem ser utilizados como ligantes quirais ou catalisadores em reações como hidrosilação assimétrica de cetonas e enaminas, adição enantiosseletiva de diorganozinco em aldeídos e adição conjugada enantiosseletiva de organometálicos à enonas.⁹⁰

Devido a utilidade destes compostos existe uma variedade de métodos para a preparação de selenetos orgânicos quirais na sua forma enantiopura ou racêmica.

A utilização de haletos orgânicos na presença de disselenetos orgânicos é muito relatada. Desta forma, partindo-se de um haleto quiral pode-se obter o

⁸⁷ Hupe, E.; Marek, I.; Knochel, P. *Org. Lett.* **2002**, *4*, 2861-2863.

⁸⁸ Ueda, M.; Saitoh, A.; Miyaura, N. *J. Organomet. Chem.* **2002**, *642*, 145-147.

⁸⁹ Paptchikhine, A.; Cheruku, P.; Engman, M.; Andersson, P. G. *Chem. Comm.* **2009**, 5996-5998.

⁹⁰ Godoi, M.; Paixão, M. W.; Braga, A.L. *Dalton Trans.* **2011**, *40*, 11347-11355.

correspondente seleneto ligado a carbono quiral, utilizando metal como catalisador ou em presença de hidreto de sódio ou potássio (Esquema 52).⁹¹

Esquema 52 - Obtenção de seleneto quiral a partir de disseleneto e haleto na presença de metal.

A obtenção destes compostos utilizando como material de partida os correspondentes alcoóis também é muito descrita. Esta síntese pode ser realizada utilizando-se como fonte de selênio o selenol sob catálise ácida,⁹² selenocianatos aromáticos na presença de tributílfosfina⁹³ ou ainda disseleneto na presença de um agente redutor ou sob catálise de iodo e iodeto de cobre⁹⁴ (Esquema 53).

⁹¹ a) Munbunjong, W.; Lee, E. H.; Ngermaneerat, P.; Kim, S. J.; Singh, G.; Chavasiri, W.; Jang, D. O. *Tetrahedron* **2009**, 65, 2467-2471. b) Krief, A.; Trabelsi, M.; Dumont, W. *Synlett* **1992**, 638-639. c) Santi, C.; Santoro, S.; Testaferri, L.; Tiecco, M. *Synlett* **2008**, 10, 1471-1474.

⁹² Clarembreau, M.; Krief, A. *Tetrahedron Lett.* **1984**, 25, 3625-3628.

⁹³ Clive, D. L. J.; Chittattu, G. J.; Farina, V.; Kiel, W. A.; Menchen, S. M.; Russel, C. G.; Singh, A.; Wong, K. C.; Curtis, N. J. *J. Am. Chem. Soc.* **1980**, 102, 4438-4447.

⁹⁴ a) Wirth, T.; Cox, M. *Phosphorus, Sulfur, and Silicon* **2007**, 180, 659-666. b) Nishino, T.; Nishiyama, Y.; Sonoda, N. *Chem. Lett.* **2003**, 32, 918-919.

Esquema 53 – Síntese de seleneto quiral a partir do correspondente álcool em meio ácido.

A reação de selenoacetais com organolítio seguido de reação com eletrófilo também é relatada, podendo até mesmo ser utilizado um ligante quiral para obtenção de seleneto enantiopuro em bons excessos enantioméricos (Esquema 54).⁹⁵

Esquema 54 - Síntese de selenetos quirais a partir de selenoacetais e organolítio na presença de ligante quiral.

A α-selenilação de compostos carbonílicos é uma boa maneira para a obtenção de selenetos quirais α-carbonílicos. É possível o emprego de catalisadores quirais para a obtenção deste tipo de selenetos de maneira enantiosseletiva (Esquema 55).⁹⁶

⁹⁵ Nakamura, S.; Aoki, T.; Ogura, T.; Wang, L. Toru, T. *J. Org. Chem.* **2004**, 69, 8916-8923.

⁹⁶ Tiecco, M.; Carlone, A.; Sternativo, S.; Marini, F.; Bartoli, G.; Melchiorre, P. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, 46, 6882-6885.

Esquema 55 - α -Selenilação como método de obtenção de selenetos quirais.

4.5. Resultados e discussão

4.5.1. Síntese de compostos contendo boro ligado a carbono quiral

Inicialmente foram sintetizados quatro compostos quirais contendo boro na forma de éster borônico (Figura 13).

Figura 13 – Compostos quirais contendo boro (**32-35**).

Os compostos **32** e **33** foram sintetizados a partir dos correspondentes ésteres vinilborônicos **10** e **11**, por redução ou hidrogenação mediada por metal de transição^{89,97}. Primeiramente foi realizada reação de redução destes compostos

⁹⁷ Moran W. J.; Morken, J. P. *Org. Lett.* **2006**, 8, 2413-2415.

utilizando Pd sob carvão, H₂ e tolueno anidro. Porém, a reação se mostrou demorada e observou-se a formação de alguns subprodutos. Então, testou-se a reação de hidrogenação mediada por Rh sob carvão e, após 4h, somente o produto puro foi observado (Esquema 56). Com intenção de diminuir o tempo reacional testou-se a troca do solvente, de tolueno para acetato de etila, porém não foram obtidos resultados melhores.

Esquema 56 – Síntese de compostos quirais contendo boro (**32** e **33**).

O próximo substrato a ser sintetizado foi o composto **34**, contendo o grupamento metoxila ligado ao anel aromático.

A metodologia selecionada para tal fim envolvia a transformação da acetofenona em um fosfonato vinílico (**36**) e, após a sua transformação em um iodeto geminal (**37**)⁹⁸. Por sua vez, o iodeto **37**, após acoplamento⁶⁹ e posterior hidrogenação^{89,97}, daria origem ao composto desejado (**34**) (Esquema 57).

⁹⁸ a) Hammond, G. B.; Calogeropou, T.; Wiemer, D. F. *Tetrahedron Lett.* **1986**, 27, 4265-4268. b) Calogeropou, T.; Hammond, G. B.; Wiemer, D. F. *J. Org. Chem.* **1987**, 52, 4185-4190. c) Lee, K.; Wiemer, D. F. *Tetrahedron Lett.* **1993**, 34, 2433-2436.

Para a síntese do fosfonato vinílico **36**, inicialmente gerou-se *in situ* LDA. Então, a 4-metóxi-acetofenona foi adicionada a -78°C , gerando o correspondente enolato. Após, o reagente de fósforo (fosforocloridrato de dietila) foi adicionado à mistura levando ao produto desejado. O composto **36** foi purificado por coluna cromatográfica para ser utilizado na próxima etapa (Esquema 58).

Esquema 58 - Síntese do fosfonado vinílico **36**, intermediário para a síntese de **34**.

Tendo em mãos o intermediário sintético desejado testou-se a preparação do iodeto geminal (**37**). Baseado na literatura^{98c}, o composto fosfonado (**36**) foi submetido

à reação com NaI, TMSCl em CH₃CN (Esquema 59), o que gera *in situ* TMSI. Testou-se diversos excessos da combinação NaI-TMSCl (1:1), porém o produto desejado não foi isolado. Ao longo da reação observava-se por CCD uma mancha que poderia ser referente ao produto, porém considerável quantidade do material de partida ainda restava intacto. Ao final da etapa extração-evaporação não se observou mais a mancha em CCD atribuída ao produto.

Sabendo que muitos iodetos vinílicos são consideravelmente voláteis e, conseqüentemente tornam-se difíceis de separar da acetonitrila utilizada^{98c}, fez-se a troca do solvente. O diclorometano, um solvente com ponto de ebulição menor, foi testado com o intuito de isolar-se o produto observado para ser caracterizado. Porém, desta vez somente o material de partida foi observado.

Esquema 59 – Metodologia com NaI e TMSCl para síntese de iodetos geminais.

Em nova busca na literatura, observou-se que alguns trabalhos obtiveram melhora na reprodutividade desta reação por simples adição de alguns equivalentes de água ao meio reacional. Apesar do mecanismo reacional não ser completamente elucidado, os autores observaram que a presença de HI, gerado *in situ* por TMSCl/NaI/H₂O, no meio reacional parecia ser crucial para a formação do produto

desejado. Ainda foi observado, que a prolongada exposição do produto formado ao meio reacional levava ao produto de proto-deiodação, portanto a exposição deveria ser de no máximo 20 minutos.⁹⁹

A metodologia foi então testada, utilizando-se diversos excessos de TMSCl, NaI e H₂O e tempos reacionais de 5 a 20 minutos em CH₂Cl₂. A melhor condição testada foi a utilização de 3 equivalentes de TMSCl, NaI e H₂O em 5 minutos de reação levando ao iodeto geminal **37** (Esquema 60).

Esquema 60 - Síntese de iodeto geminal **37**.

Após algumas tentativas de purificação do iodeto **37**, observou-se que este composto não era estável fora de solução por muito tempo. De fato, a instabilidade inerente destes compostos já foi relatada.^{98,99} Portanto, decidiu-se utilizá-lo diretamente, sem prévia purificação, na etapa de acoplamento⁶⁹, gerando o composto vinilborônico **38**. Após, este último foi submetido à hidrogenação^{89,97} mediada por Rh e obteve-se o produto desejado com 27 % a partir da 4-metóxi-acetofenona (4 etapas reacionais) (Esquema 61).

⁹⁹ Wang, X.; Zhang, L.; Xu, Y.; Krishnamurthy, D.; Varsolona, R.; Nummy, L.; Shen, S.; Frutos, R. P.; Byrne, D.; Chung, J. C.; Farina, V.; Senanayake, C. H. *Tetrahedron Lett.* **2005**, *46*, 273-276.

Esquema 61 – Síntese de composto quiral contendo boro (34).

Com base na metodologia para a síntese do composto **34**, sintetizou-se o fosfonato intermediário com R = F na posição 4 do anel aromático, para realizar a síntese do composto **35** pela mesma rota sintética. A próxima etapa seria a síntese do iodeto geminal intermediário. Porém, utilizando a mesma metodologia estabelecida anteriormente não foi possível a síntese deste intermediário sintético (**40**), nem mesmo ampliando os tempos reacionais (Esquema 62)

Esquema 62 – Tentativa de síntese do iodeto geminal 40.

Como descrito anteriormente (3.4.2), a geração do iodeto intermediário também pode ser realizada por reação direta com o correspondente acetileno terminal.⁶⁸ Portanto o 1-etinil-4-fluorobenzeno foi reagido com TMSCl na presença e NaI e água, o que levou ao correspondente iodeto geminal. O produto foi utilizado sem

prévia purificação na etapa de acoplamento utilizando B_2Pin_2 ⁶⁹ e subsequente redução da dupla ligação^{89,97}, como comentado anteriormente (Esquema 63).

Esquema 63 – Rota sintética utilizada para a síntese do composto **35**.

A próxima parte sintética do projeto foi a obtenção dos ésteres ciclopropilborônicos (**41-43**, Figura 14). Somada a grande versatilidade da ligação C-B, os ciclopropanos são blocos sintéticos interessantes que estão presentes na estrutura de produtos naturais biologicamente ativos.¹⁰⁰ Estes blocos também veem sendo altamente incorporados em compostos lançados pela indústria farmacêutica devido a sua estrutura tridimensional bem definida.¹⁰¹

Figura 14 - Ésteres ciclopropilborônicos (**41-43**).

¹⁰⁰ Pietruszka, J.; Solguga, G. *Eur. J. Org. Chem.* **2009**, 5998-6008.

¹⁰¹ Luithle, J. E. A.; Pietruszka, J. *J. Org. Chem.* **1999**, 64, 8287-8297.

Os ésteres ciclopropilborônicos podem ser obtidos a partir dos ésteres vinilborônicos sintetizados anteriormente. Algumas metodologias para a transformação de alquenos em ciclopropanos estão disponíveis. Inicialmente, testou-se a metodologia de ciclopropanação de Simmons-Smith.¹⁰² Esta metodologia faz uso de Et_2Zn , e CH_2I_2 para realizar a transformação que passa por um estado de transição do tipo borboleta, mantendo a geometria do alqueno utilizado como material de partida (Esquema 64).

Esquema 64– Ciclopropanação de Simmons-Smith.

Com base nisto, o composto vinilborônico **7** foi submetido a esta metodologia. Inicialmente, o diiodometano foi dissolvido em diclorometano e a mistura foi resfriada a -78 °C, após foi adicionado o dietilzinco e por último o éster vinilborônico (**7**) e, a reação foi agitada a temperatura ambiente. Foram testados alguns excessos de dietilzinco e diiodometano e também tempos reacionais de até 24h foram observados. Porém, somente o material de partida foi isolado ao final de cada teste (Esquema 65).

¹⁰² Furukawa, J.; Kawabata, M.; Nishimura, J. *Tetrahedron Lett.* **1966**, 28, 3353-3354.

Esquema 65 – Reação de ciclopropanação de Simmons-Smith.

Também foi testada a alteração na ordem de adição dos reagentes utilizados.¹⁰³ Primeiro adicionou-se o éster vinilborônico (**7**), Et₂Zn e CH₂Cl₂ a 0 °C e agitou-se por 30 minutos. Em um segundo balão, o Et₂Zn foi adicionado com CH₂Cl₂ e CH₂I₂ e agitado também por 30 minutos a 0 °C. O conteúdo do primeiro balão foi adicionado ao segundo e a reação foi agitada a temperatura ambiente. Observou-se a reação até 24 h e novamente o material de partida permaneceu intacto.

Nova metodologia de ciclopropanação foi testada. Esta envolvia a ciclopropanação promovida por Samário (II).¹⁰⁴ Primeiro o samário foi solubilizado em THF e a mistura foi resfriada a -78 °C. Após, a olefina dissolvida em THF foi adicionada e, em seguida adicionou-se CH₂I₂. Então, a reação foi agitada a temperatura ambiente e acompanhada por CCD durante 24 h, constatando-se dessa maneira, que não houve transformação. Foi testada também a adição do samário a temperatura ambiente e agitação da mistura Sm/THF por 30 minutos e após a adição dos demais reagentes. Novamente nenhuma reação foi observada.

É também conhecida a metodologia de ciclopropanação que utiliza diazometano e Pd(OAc)₂ como catalisador.^{101,103} O alqueno contendo boro (**7**) foi então

¹⁰³ Pitruszka, J.; Rieche, A. C. M.; Wilhelm, T.; Witt, A. *Adv. Synth. Catal.* **2003**, 345, 1272-1286.

¹⁰⁴ Molander, G. A.; Etter, J. B. *J. Org. Chem.* **1987**, 52, 3942-3944.

dissolvido em éter dietílico anidro seguido da adição de $\text{Pd}(\text{OAc})_2$. A suspensão foi sonicada durante 2 minutos e após resfriada a 0 °C. Uma solução de diazometano (largo excesso) foi lentamente adicionada à mistura reacional. A mistura foi agitada a 0 °C durante 30 minutos e, a temperatura ambiente por mais 30 minutos. O excesso de diazometano foi eliminado por vigorosa agitação com o balão reacional aberto. Embora parecesse haver um consumo do material de partida, por análise de RMN ^1H observou-se que o produto obtido não era o produto esperado e parecia não conter pinacol.

Por fim, encontrou-se na literatura metodologia de ciclopropanação de Simmons-Smith, já testada anteriormente, porém com algumas modificações.¹⁰⁵ Inicialmente, realizou-se a formação do reagente de ciclopropanação, por adição de CH_2I_2 em CH_2Cl_2 anidro sob atmosfera inerte, seguido da adição lenta de Et_2Zn a 0 °C. Esta mistura foi agitada por 10 minutos e, adicionou-se o éster borônico. A reação foi agitada a temperatura ambiente por 6 h levando ao produto desejado (**41**) em bom rendimento (Esquema 66).

Esquema 66 - Ciclopropanação de Simmons-Smith para obtenção do composto **41**.

Através desta metodologia foi possível a síntese dos demais ésteres ciclopropilborônicos (**42** e **43**) com 75-84% de rendimento (Esquema 67).

¹⁰⁵ Pietruszka, J.; Witt, A.; *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **2000**, 4293-4300.

Esquema 67 – Síntese dos ésteres ciclopropilborônicos **42** e **43**.

4.5.2. Síntese de compostos contendo selênio ligado a carbono quiral

Em um primeiro momento sintetizou-se três compostos contendo selênio ligado a carbono quiral e ao grupo fenila (**44-46**, Figura 15).

Figura 15 – Substratos quirais contendo selênio (**44-46**).

Para a síntese destes compostos se fez necessário a preparação do selenocianato de fenila (**47**). Este foi sintetizado a partir de disseleneto de difenila na presença de cloreto de sulfurila, sililcianato de trimetila e CH_2Cl_2 (Esquema 68).¹⁰⁶

¹⁰⁶ Clive, D. I. J.; Chittattu, G. J.; Farina, V.; Kiel, W. A.; Menchen, S. M.; Russel C. G.; Singh, A.; Wong, C. K.; Curtis, N. J. *J. Am. Chem. Soc.* **1980**, 102, 4438-4447.

Esquema 68 - Síntese do selenocianato de fenila.

De posse do selenocianato de fenila (**47**), este foi reagido com 1-feniletanóis substituídos, na presença de tributilfosfina em tolueno, levando aos compostos desejados (**44-46**) com rendimentos de 79-87% (Esquema 69).¹⁰⁶

Esquema 69 – Síntese dos compostos **44-46** contendo selênio ligado a carbono quiral.

Em seguida idealizou-se a síntese de mais três compostos, agora com o átomo de selênio ligado ao grupo benzila (**48-50**, Figura 16). Esta síntese foi idealizada com base em experiência prévia onde observou-se uma maior resistência à oxidação do átomo de selênio ligado diretamente ao anel aromático em reações mediadas por BVMOs.^{83c}

Figura 16 - Substratos quirais contendo selênio (**48-50**).

Para obtenção destes compostos foi testado metodologia empregando o correspondente haleto, para formação *in situ* do disseleneto derivado, utilizando EtOH como solvente. Após foi adicionado NaBH_4 , para gerar o selenolato e por fim adicionou-se brometo de benzila (Esquema 70). Porém, apesar da observação da formação de disseleneto no meio reacional, não foi obtido o produto desejado (**48**).

Esquema 70 – Tentativa de síntese do composto **48**.

Nova tentativa foi realizada substituindo o solvente (EtOH) por EtOH/DMF. O DMF é conhecido por solubilizar o ânion selenolato formado no meio reacional, caso

contrário este ânion é conhecido por permanecer na forma de complexo de boro o que diminui a sua reatividade.¹⁰⁷

Inicialmente foi realizada a síntese do disseleneto por refluxo do correspondente cloreto e de selênio elementar em EtOH na presença de NaBH₄. Após 4 h a reação foi resfriada a temperatura ambiente e foi adicionado DMF e quantidade extra de NaBH₄. A mistura foi agitada a temperatura ambiente por 3 h e então foi adicionado brometo de benzila dissolvido em DMF. Após 2 h adicionais o produto desejado foi obtido em bom rendimento (Esquema 71).

Esquema 71 – Síntese do composto **48** através de disseleneto gerado *in situ*.

Por esta metodologia foi possível a obtenção dos demais compostos (**49** e **50**, Figura 17), com rendimentos de 45-50%.

¹⁰⁷ Bhasin, K. K.; Singh, N.; Kumar, R.; Deepali, D. G.; Mehta, S. K.; Klapoetke, T. M.; Crawford, M. J. *Journal of organometallic Chemistry* **2004**, 689, 3327-3334.

Figura 17 – Compostos quirais contendo selênio (**49** e **50**).

Na tentativa de melhorar os rendimentos para obtenção dos compostos **48-50**, outra metodologia foi testada.^{94a} Para tal transformou-se o correspondente álcool no derivado mesilato (**51-53**), por reação com cloreto de mesila e DMAP. Em outro balão o brometo de benzila foi transformado em disseleneto de dibenzila e posteriormente reagido com NaBH₄ para produção do ânion selenolato. O mesilato foi, então, adicionado sobre o ânion levando a formação dos produtos desejados (Esquema 72).

Esquema 72 - Síntese dos selenetos quirais **48-50**.

Novamente a presença de DMF foi fundamental, tanto na formação do disseleneto de dibenzila quanto na geração do ânion.

Com esta nova metodologia houve um pequeno aumento nos rendimentos das reações de síntese dos selenetos **48-50**.

4.5.3. Avaliação da enantiosseletividade de BVMOs na oxidação de compostos quirais contendo boro

Os compostos **32-35** foram submetidos a resolução cinética oxidativa mediada por BVMOs utilizando tampão tris-HCl (pH 9 ou 7,5) e sistema de regeneração de cofator (PTDH como enzima auxiliar e fosfite de sódio como substrato de sacrifício). Além disto, foi adicionado o cofator (NADPH) necessário para a atividade enzimática. Novamente, para PAMO e PAMO M446G foram utilizadas com temperatura de 30 °C (enzimas termo-estáveis) e, HAPMO e CHMO (que não são termo-estáveis) com temperatura de 25 °C.

Inicialmente foram feitos alguns testes utilizando como substratos os compostos **32** e **33**, um contendo um grupamento alifático (*n*-hexila) ligado ao carbono quiral e o outro aromático (fenila) (Esquema 73).

Esquema 73 – Resolução cinética de **32** e **33** mediada por BVMOs.

Apesar da experiência anterior, em que compostos sem a presença de parte aromática em sua estrutura não reagiram com as enzimas testadas, foram realizados testes de 24 h com o substrato **32** frente a todas as enzimas disponíveis. Novamente, nenhuma conversão foi observada e o material de partida foi recuperado.

Também, por conta da experiência anterior em que observou-se a rapidez na transformação da ligação C-B, o substrato **33** foi reagido com PAMO em reações de 1-5 h (Tabela 6).

Tabela 6 - Resolução cinética enzimática do composto **33** através da transformação da ligação C-B mediada por BVMO.^{a, 108}

Entrada	Enzima	pH	Tempo (h)	Conv. (%) ^b	e.e (S)-55 (%) ^c	e.e (R)-33 (%) ^c
1	PAMO	9	1	22	23	20
2	PAMO		3	48	77	70
3	PAMO		5	53	82	77
4	PAMO	7,5	5	49	91	85
5	M446G	7,5	4	50	82	70

^a Condição Reacional: Solução (10 mmol.L⁻¹), DMSO (1%), tampão tris-HCl pH 9 ou 7,5 (440 µL), fosfito (20 mmol.L⁻¹), NADPH (0,2 mmol.L⁻¹), PTDH (1 µmol.L⁻¹), enzima (4 µmol.L⁻¹). 30°C, 200 rpm, 1-5 h. ^b Conversão calculada através de CG. ^c Excesso enantiomérico medido por CLAE equipado com fase estacionária quiral. ^d O E das reações de 5h foram calculados pela fórmula: $E = \ln[(1-e.es)/(1+e.es/e.ep)] / \ln[(1+e.es)/(1+e.es/e.ep)]$. Para pH 9 **E= 23** e para pH 7,5 **E= 33**.

¹⁰⁸ Para comparação: o substrato **33** (0,1 mmol) é oxidado completamente utilizando H₂O₂ 30% (3 mmol) e solução 2M de NaOH (1 mmol) em 3 h a temperatura ambiente.

Como pode ser observado o melhor resultado em pH 9 foi repetido em pH 7,5 (Tabela 6, entrada 4) levando a um acréscimo da enantiosseletividade.

Além disto, outras enzimas foram testadas em até 5 h reacionais também em pH 7,5 (PAMO M446G, HAPMO e CHMO). Enquanto HAPMO e CHMO parecem levar a decomposição do material de partida fornecendo inúmeros subprodutos não identificados, PAMO M446G em 4 h reacionais levou a conversão de 50% com boa enantiosseletividade ($E = 10$) (Tabela 6, entrada 5).

A adição de 10% de MeOH ao meio reacional também foi realizada para avaliar o efeito deste solvente na seletividade da reação.⁷⁹ Porém, novamente, inúmeros subprodutos não identificados foram obtidos.

Como as melhores enzimas para a resolução do boronato **33** foram PAMO e PAMO M446G as reações dos demais boronatos quirais (**34** e **35**) mediadas por BVMOS foram realizadas somente com estas enzimas. Os resultados destas reações estão expressos na Tabela 7.

4. Resolução Cinética Mediada por BVMOs

Tabela 7 - Resolução cinética enzimática dos boronatos **34** e **35** mediada por BVMO.

Entrada	Substrato	Enzima	Tempo (h)	Conv. (%) ^a	e.e (S)-56/57 (%) ^b	e.e (R)-34/35 (%) ^b
1	34	PAMO	24	(-) ^c	(-) ^d	(-) ^d
2	34	M446G	7	52	50	47
3	35	PAMO	24	(-) ^c	(-) ^d	(-) ^d
4	35	M446G	24	(-) ^c	(-) ^d	(-) ^d

^a Conversão calculada através de curva de calibração obtida por CG ou CLAE. ^b Excesso enantiomérico medido por CLAE equipado com fase estacionária quiral. ^c Nenhuma reação foi observada. ^d Não foi observado excesso enantiomérico.

Parece que de alguma forma grupos substituintes ligados no anel aromático influenciam negativamente na reatividade de PAMO e PAMO M446G. A enzima PAMO não foi capaz de realizar a oxidação de ambos os substratos **34** e **35** (Tabela 7, entradas 1 e 3). Enquanto a enzima PAMO M446G realizou somente a oxidação do boronato **34**, com R = OMe, porém com baixa enantiosseletividade (E = 3) (Tabela 7, entrada 2).

Em seguida, os ésteres ciclopropilborônicos (**41-43**) foram testados na presença de BVMOS. A metodologia utilizada foi idêntica a já detalhada anteriormente. Os resultados estão detalhados na Tabela 8.

Tabela 8 - Resolução cinética enzimática de ésteres ciclopropilborônicos (**41-43**) mediada por BVMO.

Entrada	Substrato	Enzima	Tempo (h)	Conv.(%) ^a	e.e 58-60 (%) ^b	e.e 41-43 (%) ^b
1	41	PAMO	24	45	(-) ^d	(-) ^d
2	41	M446G	16	49	(-) ^d	(-) ^d
3	41	HAPMO	24	50	(-) ^d	(-) ^d
4	41	CHMO	24	(-) ^c	(-) ^d	(-) ^d
5	42	PAMO	24	51	(-) ^d	(-) ^d
6	42	M446G	16	46	(-) ^d	(-) ^d
7	42	HAPMO	24	55	(-) ^d	(-) ^d
8	42	CHMO	24	(-) ^c	(-) ^d	(-) ^d
9	43	PAMO	24	50	(-) ^d	(-) ^d
10	43	M446G	16	51	(-) ^d	(-) ^d
11	43	HAPMO	24	56	(-) ^d	(-) ^d
12	43	CHMO	24	(-) ^c	(-) ^d	(-) ^d

^a Conversão calculada através de curva de calibração em CLAE. ^b Excesso enantiomérico medido por CLAE equipado com fase estacionária quiral. ^c Nenhuma reação foi observada. ^d Não foi observado excesso enantiomérico.

Embora tivessem sido utilizados ésteres ciclopropilborônicos com geometrias diferentes, a enzima CHMO não foi capaz de catalisar a oxidação de nenhum deles (Tabela 8, entrada 4, 8 e 12). Por outro lado, as enzimas PAMO, PAMO M446G e HAPMO foram capazes de catalisar a oxidação de todos os ésteres borônicos (**41-43**). Contudo, estas reações aconteceram sem nenhuma enantiosseletividade, mesmo quando o grupamento fenila se encontra mais próximo ao éster borônico, caso do composto **43**.

Fechando os estudos realizados sobre a oxidação biocatalisada de compostos contendo boro, foram realizados alguns testes com o melhor substrato (**33**) utilizando células inteiras de fungos conhecidos por apresentarem oxidoredutases.¹⁰⁹ Foram utilizados os fungos *Aspergillus terreus* URM 3571 e CCT 3320. As reações foram incubadas a 32 °C e 160 rpm e mantidas por 5, 15 ou 25 h utilizando tampão tris-HCl (pH 7,5) e o correspondente fungo. As reações foram sempre acompanhadas por uma reação controle sem a presença do fungo no meio.

Contudo, após 25 h de reação o material de partida foi recuperado intacto. Isto poderia ser explicado pela possível ligação do boro a alguma organela presente na célula o que impediria a ligação do substrato ao sítio ativo da enzima, fazendo com que não ocorra reação de oxidação.

4.5.4. Avaliação da enantiosseletividade de BVMOs na oxidação de compostos quirais contendo selênio

Expandindo os testes de resolução cinética mediada por BVMOs, compostos quirais contendo selênio foram empregados como substratos. Estes compostos foram escolhidos por conter diferentes grupos ligados diretamente ao átomo de selênio (fenila e benzila, respectivamente).

¹⁰⁹ Da Costa, C. E.; Comasseto, J. V.; Crusius, I. H. S.; Andrade, L. H.; Porto, A. L. M. *J. Molec. Catal. B.: Enzymatic* **2007**, *45*, 135-139.

Primeiramente realizaram-se reações utilizando os compostos **44** e **48** (sem substituinte ligado ao anel aromático do carbono quiral) mediadas por PAMO, utilizando a mesma metodologia detalhada anteriormente (4 μ M de enzima) (Tabela 9, entradas 1 e 7). Porém, em até 24 h de reação o material de partida foi recuperado intacto. Então com base em experiências prévias do nosso grupo,^{83c} onde uma quantidade maior de BVMOs foi utilizada para a oxidação do átomo de selênio, resolvemos aumentar a quantidade de enzima utilizada. Aumentando a quantidade de enzima na reação (8 μ M), foi observada a oxidação do substrato com grande enantiosseletividade (Tabela 9, entrada 2). Após os primeiros testes, foi aumentada também a quantidade de fosfito de sódio (substrato de sacrifício), este aumento levou a um acréscimo na enantiosseletividade da reação (Tabela 9, entrada 3).

Sabendo que peróxido de hidrogênio pode ser produzido por BVMOs no meio reacional e que esta produção pode levar a diminuição na enantiosseletividade do processo, testou-se também a adição de catalase na reação. A catalase é uma enzima que degrada o peróxido de hidrogênio formado em oxigênio e água. No entanto, esta adição levou a muitos sub-produtos mesmo na ausência de PAMO no meio reacional. Isto pode ser resultado da baixa pureza da catalase comercial empregada, que pode conter pequenas quantidades de outras enzimas oxidorreduções.

Também foram testadas outras BVMOs (PAMO M446G, CHMO e HAPMO). Quando PAMO M446G foi empregada como biocatalisador, boa conversão, porém baixa seletividade foi observada (Tabela 9, entradas 4 e 10). Infelizmente, quando

4. Resolução Cinética Mediada por BVMOs

CHMO ou HAPMO foram utilizadas não foi observada reação e o material de partida foi isolado ao final de 24 h (Tabela 9, entradas 5, 6, 11 e 12).

Tabela 9 – Resolução cinética enzimática de selenetos quirais (**44** e **48**) mediada por BVMOs.^{a, 110}

Entrada	Substrato	Enzima/Conc. (μM)	Fosfito (mM)	Tempo(h)	Conv. (%) ^b	e.e (S)-44/48 (%) ^c
1	44	PAMO (4)	20	24	(-) ^d	(-) ^e
2	44	PAMO (8)	20	5	52	83,5
3	44	PAMO (8)	50	5	49	97,7
4	44	M446G (8)	50	5	45	10
5	44	HAPMO (8)	50	24	(-) ^d	(-) ^e
6	44	CHMO (8)	50	24	(-) ^b	(-) ^e
7	48	PAMO (4)	20	24	(-) ^d	(-) ^e
8	48	PAMO (8)	20	5	53	(-) ^e
9	48	PAMO (8)	50	5	56	14
10	48	M446G (8)	50	5	51	9,7
11	48	HAPMO (8)	50	24	(-) ^d	(-) ^e
12	48	CHMO (8)	50	24	(-) ^d	(-) ^e

^a Condição Reacional: Solução (10 mmol.L⁻¹), DMSO (1%), tampão tris-HCl pH 7,5 (440 μL), fosfito (20 ou 50 $\mu mol.L^{-1}$), NADPH (0,2 mmol.L⁻¹), PTDH (1 $\mu mol.L^{-1}$), enzima (4 ou 8 $\mu mol.L^{-1}$). 30 °C, 200 rpm, 5-24 h.

^b Conversão calculada através de curva de calibração por CLAE. ^c Excesso enantiomérico medido por CLAE equipado com fase estacionária quiral. ^d nenhuma reação observada. ^e nenhum excesso enantiomérico observado.

¹¹⁰ Para comparação: o substrato **44** (0,1 mmol) é oxidado completamente em metanol (0,5 mL) e NaIO₄ (0,2 mmol) ou em THF (0,5 mL) e *m*-CPBA (0,2 mmol) ambos em 3h a temperatura ambiente. Porém, no mesmo tempo reacional e temperatura não ocorre oxidação completa utilizando H₂O₂ 30% (3 mmol) e solução 2M de NaOH (1 mmol), mas nas mesmas condições na presença de *n*-hexano ocorre conversão quase total do material de partida.

No decorrer da reação, quando esta ocorre, observou-se a oxidação do (*R*)-seleneto levando a β -eliminação resultando em PhSeOH e estireno (detectado por CLAE), deixando o (*S*)-seleneto intacto (ver item 4.5.5 para determinação da configuração absoluta).

Com a melhor condição em mãos, foram realizadas reações de oxidação dos demais compostos quirais contendo selênio (**45**, **46**, **49** e **50**), utilizando PAMO, a melhor enzima nos testes prévios, como biocatalisador (Tabela 10).

Tabela 10 – Resolução cinética de selenetos quirais (**45**, **46**, **49** e **50**).

Entrada	Substrato	Tempo (h)	Conv. (%) ^a	e.e. (<i>S</i>)- 45 , 46 , 49 ou 50 (%) ^b
1	45	8	51	8,6
2	46	8	54	(-) ^c
3	49	5	49	(-) ^c
4	50	5	47	49,15

^a Conversão calculada através de curva de calibração por CLAE. ^b Excesso enantiomérico medido por CLAE equipado com fase estacionária quiral. ^c nenhum excesso enantiomérico observado.

A enzima PAMO foi capaz de oxidar os substratos (**45**, **46**, **49** e **50**), porém esta transformação ocorreu com baixa enantiosseletividade (Tabela 10). Novamente a

presença de substituintes no anel aromático ligado ao carbono quiral parece afetar negativamente o desempenho da enzima BVMO utilizada (neste caso PAMO).

Dando continuidade aos estudos de oxidações biocatalisadas de substratos quirais contendo selênio, foram realizadas ainda reações utilizando fungos contendo oxidoredutases. Estas reações foram baseadas em experiência prévia de oxidação do átomo de selênio utilizando fungos contendo oxidoredutases.¹⁰⁹ Para tal foram testados os fungos *Aspergillus terreus* URM 3571 e CCT 3320 para oxidação do substrato **44**, que foi o melhor substrato contendo selênio. Foram realizadas reações utilizando tampão tris-HCl (pH 7,5), substrato e o fungo, incubadas a 32 °C e 160 rpm em tempos reacionais de 1, 3 ou 5 dias. Todas as reações foram acompanhadas de reação controle sem a presença de fungo no meio.

Mesmo em até 5 dias o material de partida (**44**) permaneceu racêmico e observou-se baixa concentração de estireno. Portanto, não houve uma oxidação significativa do átomo de selênio. De certa forma, os resultados obtidos vão de encontro com aqueles previamente descritos. Em tal experimento observou-se que quando havia certo impedimento estérico ao redor do átomo de selênio, a eficiente oxidação era demorada (em torno de 10 dias) ou não ocorria. Como o substrato escolhido (**44**) tem duas fenilas próximas ao átomo de selênio a ser oxidado, este volume pode estar dificultando a oxidação mediada por fungo.

Finalizando os testes de oxidação do átomo de selênio mediada por enzimas, foram realizadas reações utilizando lipase (CAL-B) na presença de oxidante (2 ou 3

equivalentes em relação ao substrato). Estas reações foram idealizadas com base na dificuldade encontrada para a oxidação do selênio e, idealizando uma possível ligação do oxidante à CAL-B o que levaria a uma oxidação enantiosseletiva.⁵⁶ Portanto, a CAL-B funcionaria como um auxiliar quiral nestas reações. As reações foram agitadas por 3 a 15 h, a 0 °C ou a temperatura ambiente, em solvente orgânico e foram acompanhadas por reação controle na ausência de enzima (Tabela 11).

Tabela 11 – Reações de resolução cinética enzimática de **44** mediada por CAL-B.^a

Entrada	Oxidante/ Qtde (equiv.)	Solvente	Temperatura (°C)	Tempo (h)	Conv. (%) ^b	e.e (S)- 44 (%) ^c
1	H ₂ O ₂ / 3	Hexano	0	2	90	(-) ^e
2	H ₂ O ₂ / 2	Hexano	25	0,5	100	(-) ^e
3	NaIO ₄ / 3	Hexano	0	2	(-) ^d	(-) ^e
4	NaIO ₄ / 3	Hexano/ MeOH 9:1	25	2	5	7
5	NaIO ₄ / 3	Hexano/ MeOH 1:1	25	2	3	(-) ^e
6	NaIO ₄ / 3	Hexano/ AcOEt 9:1	25	2	(-) ^d	(-) ^e
7	NaIO ₄ / 3	Hexano/ MeOH 9:1	25	15	52	7
8	<i>m</i> -CPBA/ 3	Hexano	25	2	46	45
9	<i>m</i> -CPBA/ 3	Hexano/ MeOH 9:1	25	2	100	(-) ^e
10	<i>m</i> -CPBA/ 3	Hexano/ AcOEt 9:1	25	2	90	5
11	<i>m</i> -CPBA/ 3	Tolueno	25	2	100	(-) ^e

^a Condição Reacional: Substrato (0,25 mmol.L⁻¹), solvente (1 mL), CAL-B (20 mg), Oxidante 2 ou 3 equiv.), 0 ou 25 °C, 3-15 h. ^b Conversão calculada através de curva de calibração por CLAE. ^c Excesso enantiomérico medido por CLAE equipado com fase estacionária quiral. ^d Nenhuma reação observada. ^e nenhum excesso enantiomérico observado. ^e Reações controle: seleneto **44** racêmico.

Na maioria dos casos não houve enantiosseletividade no processo (Tabela 11, entradas 1, 2, 5, 9, 11) ou não houve reação (Tabela 11, entradas 3 e 6). Como podemos notar, o melhor sistema utilizado foi *m*-CPBA em *n*-hexano a temperatura ambiente (Tabela 11, entrada 8). Porém, este resultado foi inferior ao obtido quando o biocatalisador utilizado foi PAMO.

4.5.5. Determinação da configuração absoluta

A configuração absoluta dos alcoóis (**55** e **56**) obtidos na oxidação de boronatos quirais mediada por BVMOS, foi determinada a partir da comparação com cromatogramas de CLAE disponíveis na literatura.¹¹¹

Para a determinação da configuração absoluta dos compostos contendo boro (**33** e **34**) foi realizada a oxidação química dos mesmos na forma enantiomericamente enriquecida, o que originou os correspondentes álcoois e estes foram comparados com a literatura (Esquema 74).¹¹¹

Esquema 74 – Determinação da configuração absoluta dos compostos **33** e **34**.

¹¹¹ (a) Patti, A.; Pedotti, S.; Sanfilippo, C. *Chirality* **2007**, 19, 344-351. (b) Belmessieri, D.; Joannesse, C.; Woods, P. A.; MacGregor, C.; Jones, C.; Campbell, C. D.; Johnston, C. P.; Duguet, N.; Concellón, C.; Bragg, R. A.; Smith, A. D. *Org. Biomol. Chem.* **2011**, 9, 559-570.

Para determinação da configuração absoluta dos selenetos (**44-46** e **48-50**), primeiramente foi realizada a resolução cinética enzimática dos correspondentes alcoóis para obtenção dos mesmos na forma enantiomericamente enriquecida (Esquema 75).¹¹²

De posse dos alcoóis enantiomericamente enriquecidos, realizou-se a síntese dos selenetos quirais a partir deles. A síntese dos selenetos quirais **44-46** ocorre com inversão de configuração a partir do correspondente álcool (Esquema 76).¹⁰⁶

¹¹² Cheng, Y.; Xu, G.; Wu, J.; Zhang, C.; Yang, L. *Tetrahedron Lett.* **2010**, 51, 2366-2369 e referências citadas.

Com base neste mecanismo de reação onde, por exemplo, um álcool de configuração (*S*) leva ao correspondente (*R*)-seleneto, os compostos **44-46** foram analisados através de CLAE munido de coluna quiral. Para exemplificar, os cromatogramas obtidos por CLAE do produto racêmico **44** e do (*R*)-**44** estão expostos a seguir (Figura 18).

Figura 18 – Cromatograma obtido por CLAE do composto **44** racêmico e do (*R*)-**44**, respectivamente.

Portanto, para os compostos **44-46**, o primeiro sinal corresponde ao enantiômero (*S*) e o segundo, ao enantiômero (*R*).

A preparação dos selenetos **48-50** também ocorre com inversão de configuração a partir do correspondente álcool (Esquema 77).

Esquema 77 – Mecanismo para obtenção de **48-50** a partir do correspondente álcool.

Portanto, um álcool de configuração (*S*) leva ao correspondente (*R*)-seleneto. Desta maneira os compostos **48-50** foram analisados através de CLAE equipado com coluna quiral e os cromatogramas do produto racêmico **48** e do (*R*)-**48** estão expostos a seguir (Figura 19).

Figura 19 - Cromatograma do composto **48** racêmico e do (*R*)-**48**, respectivamente.

Novamente, podemos notar que, para os compostos **48-50**, o primeiro sinal corresponde ao enantiômero (*S*) e o segundo, ao enantiômero (*R*).

5. Conclusão

Os estudos mostrados neste trabalho tiveram como foco principal a avaliação da reatividade e da seletividade de quatro enzimas Baeyer-Villiger mono-oxigenases (PAMO, PAMO M446G, HAPMO e CHMO) frente a substratos contendo boro ou selênio.

Percebemos que quando boro-acetofenonas foram utilizadas como substratos, a transformação da ligação C-B foi mais rápida que a reação de Baeyer-Villiger. Além disto, CHMO foi quimiosseletiva para oxidação da ligação C-B em todos os casos e, PAMO e PAMO M446G somente levaram a oxidação de BV em substratos 4-substituídos, mostrando a influência de grupos doadores de elétrons conjugados à carbonila na ocorrência desta reação (Tabelas 2 e 3).

Quando ésteres alquenilborônicos foram utilizados, houve a necessidade da presença de uma fenila na estrutura do substrato para que a oxidação ocorresse. Nestes casos, a transformação da ligação C-B em C-O ocorreu de maneira satisfatória e nunca foi observada reação de epoxidação da dupla ligação (Tabelas 4 e 5).

No que diz respeito à enantiosseletividade na oxidação de compostos contendo boro, PAMO foi capaz de oxidar com boa enantiosseletividade o 1-feniletilboronato (**33**) (ee 91%, Tabela 6, entrada 4), porém quando há substituinte no anel aromático ou o substrato não possui porção aromática, a oxidação não ocorre (Tabela 7, entradas 1 e 3). PAMO também oxidou os ésteres ciclopropilborônicos, mas sem nenhuma enantiosseletividade (Tabela 8). A enzima PAMO M446G, mostrou uma aceitação similar aos substratos, porém com menor enantiosseletividade (Tabelas 6, 7

e 8). Quando HAPMO foi o biocatalisador, houve somente a oxidação não seletiva dos ésteres ciclopropilborônicos (Tabela 8) e CHMO não promoveu a oxidação de nenhum dos substratos quirais contendo boro.

Avaliando os substratos quirais centrados na ligação C-Se percebemos que a enzima PAMO, novamente, mostrou os melhores resultados. Ela foi capaz de oxidar com grande enantiosseletividade o seleneto **44** derivado do 1-feniletanol contendo uma fenila ligada diretamente ao átomo de selênio (ee 97,7%, Tabela 9, entrada 3). A presença de substituintes ligados ao anel aromático interferiu negativamente na oxidação (Tabela 10). Enquanto PAMO M446G, mostrou outra vez uma aceitação similar e enantiosseletividade inferior, HAPMO e CHMO não promoveram a bio-oxidação de nenhum dos substratos de selênio testados (Tabelas 8 e 9).

Quando testou-se Cal-B na presença de oxidantes químicos, na esperança de promover a oxidação seletiva do átomo de selênio no composto **44**, o melhor resultado foi observado para o sistema Cal-B/*m*-CPBA (ee 45%, Tabela 11, entrada 8). Porém este resultado foi inferior ao obtido anteriormente com PAMO. A tentativa de utilização de células contendo oxiredutases (*Aspergillus terreus*) para realizar a oxidação dos compostos orgânicos de boro ou selênio (**33** ou **44**, respectivamente) não foi bem sucedida, não sendo observada oxidação em ambos os casos.

Por fim, podemos notar que foi realizado um extensivo estudo de bio-oxidação mediada por BVMOs utilizando substratos orgânicos contendo boro e selênio. Além de uma avaliação da quimiosseletividade destas enzimas, o estudo da enantiosseletividade para oxidação das ligações C-B e C-Se, foi realizado pela primeira vez.

6. Parte experimental

6.1. Materiais e Instrumentação Analítica

Os reagentes obtidos comercialmente foram utilizados sem prévia purificação e as enzimas mantidas a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Os solventes THF e tolueno foram utilizados após tratamento com fios de sódio sob refluxo e atmosfera inerte, utilizando benzofenona como indicador de ausência de água e oxigênio. O diclorometano anidro foi obtido pelo tratamento com CaH_2 e o N,N-dimetilformamida e etanol anidros, pelo tratamento com MgSO_4 e, foram mantidos sob peneira molecular (4A).¹¹³

As análises cromatográficas em camada delgada foram realizadas empregando-se cromatofolhas de sílica gel 60 F₂₅₄ da Merck®, as quais foram reveladas sob luz ultravioleta ($\lambda = 254$) ou solução de vanilina em uma mistura de ácido sulfúrico/etanol (6% vanilina m/V, 4% ácido sulfúrico e 10% água, V/V). As purificações por cromatografia em coluna foram realizadas utilizando sílica gel tipo da Acros Organics® (0,035-0,070 mm).

Os espectros de Ressonância Magnética Nuclear de ^1H e ^{13}C foram obtidos em um espectrômetro Varian Gemini 200 (^1H , 200 MHz e ^{13}C , 50 MHz) ou Bruker DPX 200 (^1H , 200 MHz e ^{13}C , 50 MHz), pertencente ao Instituto de química da Universidade de São Paulo (USP). Os espectros foram obtidos em CDCl_3 ou DMSO-d_6 , utilizando tetrametilsilano (TMS) como padrão interno para os espectros de RMN de ^1H . Para os espectros de RMN de ^{13}C foram utilizados como padrão o pico central do tripleto do

¹¹³ Armarego, W. L. F.; Chai, C. L. L. *Purification of Laboratory chemicals*; 6 Ed.; Elsevier: Burlington, 2009.

CDCl_3 ou o pico central do septeto do DMSO-d_6 , ajustados para 77,00 ppm ou 39,43 ppm respectivamente. Os deslocamentos químicos (δ) estão expressos em partes por milhão (ppm) e as constantes de acoplamento (J) em Hertz (Hz). As multiplicidades dos sinais observados estão indicadas pelas seguintes abreviaturas: s = singleto, d = dubleto, dd = duplo dubleto, t = tripleto, qua = quadrupletto, qui = quintupletto, sex = sextupletto e m = multipletto.

Para os espectros de RMN ^{13}C de compostos contendo a ligação C-B, não é observado o carbono diretamente ligado ao boro devido a natureza quadrupolar deste átomo o que resulta em um alargamento do sinal além do limite de detecção.

Os espectros de absorção no infravermelho foram obtidos em um intervalo de 4000-600 cm^{-1} , na forma de filme líquido, pastilha de KBr ou solução, utilizando um espectrofotômetro da Bomen Michelson-101, com transformada de Fourier e calibração interna, pertencente a Central analítica do Instituto de Química da Universidade de São Paulo (USP).

Os espectros de massas de baixa resolução (EM) foram obtidos a partir de um cromatógrafo gasoso acoplada a um espectômetro de massas (HP GC system HP 6890 series) equipado com detector de massa HP 5973 e Coluna HP1 (Dimethylpolysiloxane, 25m x 0,25 mm x 0,25 μm) ou HP5 (5% phenyl) Methylpolysiloxane, 25m x 0,25 mm x 0,25 μm) utilizando método 60-230 $^{\circ}\text{C}$, 10 graus/min, 30min.

Os valores de rotação específica foram medidos em um polarímetro Perkin Elmer – 343. Os valores descritos são referentes a linha de Na ($\lambda = 589 \text{ nm}$) a 20 $^{\circ}\text{C}$, utilizando cubeta de 1 dm, sendo que a concentração (c) foi estabelecida em g/100 mL.

As análises de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) para medida dos excessos enantioméricos foram realizadas em cromatógrafo líquido Shimadzu equipado com detector SPD-M10A, auto injetor SIL-10AD e forno para colunas CTO-10A (40 °C) ou equipado com detector LC-20AD, auto injetor SIL-20A, forno para colunas CTO-20A (40 °C) e degaseificador DGU-20A3. As colunas utilizadas foram Chiralcel® OD, Chiralcel® OD-H, Chiralcel® OB-H, Chiralcel® OJ-H, Chiralpak® AS-H or Chiralpak® AD-H e, a eluição foi realizada utilizando misturas de *iso*-propanol e *n*-heptano ou *n*-hexano.

As análises de cromatografia gasosa (CG) para análise da conversão das reações foram realizadas em cromatógrafo HP GC system HP 6890 series, equipado com coluna CP Cyclodextrin-β-2,3,6-m-19 (chromopack nr. 7501, 50 m x 0,25 mm x 0,25 μm) e detector FID.

6.2. Procedimentos experimentais

6.2.1. Obtenção dos ácidos 3 e 4-acetilfenilborônicos (**1** e **2**)

Os compostos **1** e **2** foram obtidos comercialmente.

6.2.2. Procedimento geral para a síntese dos ésteres 3 ou 4-acetilfenilborônicos (**3** e **4**)⁶⁰

Em um balão de 100 mL contendo THF anidro (30 mL) foi adicionado ácido 3 ou 4-acetilfenil borônico (**1** ou **2**) (6 mmol, 0,98 g) e pinacol (6 mmol, 0,77 g). A solução resultante foi evaporada sob pressão reduzida a 40 °C. Este procedimento foi repetido 3 vezes ou até a análise por TLC indicar completa conversão. O produto foi purificado através de coluna cromatográfica em sílica gel (hexano/EtOAc 4:1) (98-99%).

1-(3-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)fenil)etanona (3)⁶⁰

Sólido branco (98%), PF= 50,7 – 52,5 °C. RMN ¹H (200 MHz, CHCl₃): δ 1,36 (s, 12H); 2,63 (s, 3H); 7,47 (t, *J* = 7.4Hz, 1H); 7,97-8,09 (m, 2H); 8,36 (s, 1H). RMN ¹³C (50 MHz, CDCl₃): δ 25,07; 26,92; 84,34; 130,94; 134,99; 136,72; 139,58; 142,62; 198,56. CG-EM [m/z (%): 246 (M⁺, 15), 231(100), 203(42), 185(14), 160(4), 147(55), 131(12), 85(7), 77(4). FT-IV (KBr, cm⁻¹) *v*_{max}: 2967, 1685, 1596, 1357, 1322, 1250, 1149, 959, 862, 702, 593.

1-(4-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)fenil)etanona (4)⁶⁰

Sólido branco (99%), PF= 66,3 - 67,7°C. RMN ¹H (200 MHz, CDCl₃): δ 1,36 (s, 12H); 2,61 (s, 3H); 7,92 (s, 4H). RMN ¹³C (50 MHz, CDCl₃): δ 24,81; 26,69; 84,16; 127,22; 134,87; 138,95; 198,37. CG-EM [m/z (%): 246 (M⁺, 2), 231(15), 160(16), 147(48), 131(17), 85(16), 77(15), 42(100). FT-IR (KBr, cm⁻¹) *v*_{max}: 2986, 1661, 1509, 1398, 1358, 1267, 1142, 1092, 959, 857, 830, 654.

6.2.3. Procedimento para a síntese do trifluorboronato de potássio (5)⁶¹

Em um balão de 50 mL, o ácido borônico (2) (3 mmol, 0,49 g) foi dissolvido em MeOH (2 mL) e solução aquosa 4,5 M de KHF₂ (9 mmol, 2 mL) foi adicionada. A reação foi agitada por 1h a temperatura ambiente. Após, a reação foi resfriada a 0 °C, o

precipitado foi filtrado e lavado com MeOH. O produto puro foi obtido por recristalização com o mínimo de acetona a quente (85%).

4-(trifluoroborato)feniletanona (**5**)⁶¹

Sólido branco (85%), PF = 205 - 208 °C. RMN ¹H (200 MHz, DMSO): δ 2,49 (s, 3H); 7,44 (d, J = 8,0 Hz, 2H); 7,70 (d, J = 7,4 Hz, 2H). RMN ¹³C (50 MHz, DMSO): δ 26,41; 125,93; 126,18; 134,16; 198,07. FT-IV (KBr, cm⁻¹) $\nu_{\max}$: 3081, 3044, 2375, 1677.

6.2.4. Procedimento geral para a síntese dos ésteres alquêniborônicos **6** e **7**⁶²

Em um balão de 50 mL e duas bocas, pinacol foi dissolvido (10 mmol, 1,18 g) em CH₂Cl₂ anidro (5 mL) sob atmosfera inerte e, a solução foi resfriada a 0°C. Em seguida, uma solução de BH₃.SMe₂ (10 mmol, 2M em THF, 5mL) foi adicionada gota a gota. A mistura foi agitada durante 1h a 0°C e durante 1h a temperatura ambiente. Novamente, a mistura foi resfriada a 0 °C e o correspondente alcino terminal (5 mmol) foi adicionado lentamente. A reação foi agitada a temperatura ambiente durante 7h. Somente então, éter dietílico e NH₄Cl foram adicionados. A fase orgânica foi separada e a fase aquosa foi extraída com éter dietílico (3 x 30 mL). A fase orgânica foi seca com MgSO₄, filtrada

e concentrada. O produto puro foi obtido por purificação em coluna cromatográfica em sílica gel (2% de éter dietílico em hexano) (65-70%).

(E)-4,4,5,5-tetrametil-2-(oct-1-en-1-il)-1,2,3-dioxaborolana (6)⁶²

Óleo claro (65%), RMN ¹H (200MHz, CDCl₃): δ 0,87 (t, *J* = 6 Hz, 3H); 1,26-1,40 (m, 20H); 2,12 -2,15 (m, 2H); 5,42 (d, *J* = 18 Hz, 1H); 6,63 (dt, *J*=18 e 6 Hz, 1Hz). RMN¹³C (50MHz, CDCl₃): δ 14,06; 22,57; 24,76; 28,18; 28,90; 31,70; 35,82; 82,94; 154,86. CG-EM [m/z (%): 238(M⁺, 4), 223(56), 153(100), 139(63), 110(34), 101(22), 95(25), 85(40), 68(29), 55(31). FT-IV (filme, cm⁻¹) *v*_{max}: 2932; 2859; 1641; 1400; 1367; 1323; 1148.

(E)-4,4,5,5-tetrametil-2-estiril-1,3,2-dioxaborolane (7)⁶²

Óleo claro (70%), RMN ¹H (200MHz, CDCl₃): δ 1,29 (s, 12H); 6,15 (d, *J* = 18 Hz, 1H); 7,28-7,50 (m, 6H). RMN ¹³C (50MHz, CDCl₃): δ 24,66; 83,18; 126, 90; 128,41; 128,72; 149,36. CG-EM [m/z (%): 230 (M⁺, 57), 215(27), 157(11), 144(72), 130(100), 118(16), 105(27), 77(17). FT-IV (filme, cm⁻¹) *v*_{max}: 2980; 2934; 1625; 1577; 1495; 1451; 1388; 1354; 1327; 1273; 1212; 1146; 1000; 971; 852.

6.2.5. Procedimento para a síntese do éster alquenilborônico **8**^{66, 67}

Em um balão de 50 mL e duas bocas e sob atmosfera inerte, *n*-octino (10 mmol, 1,10 g) foi solubilizado em THF anidro (30 mL). A mistura foi resfriada a -78 °C e *n*-BuLi (11 mmol, 2M, 6,5 mL) foi adicionado gota a gota. A mistura foi agitada por 30 minutos a uma temperatura de -78 a -20 °C e, em seguida, telúrio metálico (10 mmol, 1,26 g) foi adicionado rapidamente a -20 °C. Após o aumento lento da temperatura, a reação foi refluxada por 1h e, em seguida, foi resfriada a -20 °C novamente e bromobutano (10mmol, 1,07 mL) foi adicionado. A reação foi agitada durante 2h a temperatura ambiente. O produto puro (telureto alquinílico, **17**) foi obtido por purificação com coluna cromatográfica em sílica gel (*n*-hexano) (82%)

Em um balão de duas bocas, o telureto **17** puro (3 mmol, 0,882 g) foi dissolvido em hexano anidro sob atmosfera inerte e DIBAL-H (solução 1,5 M em tolueno, 3 mmol, 2 mL) foi adicionado. A mistura foi refluxada por 2 h e, foi então, resfriada a temperatura ambiente. Foi adicionado água e o produto foi extraído com *n*-hexano (1 x 5 mL) e depois acetato de etila (1 x 5 mL). A fase orgânica foi seca com MgSO₄, filtrada e evaporada sob pressão reduzida. A purificação foi realizada através de coluna cromatográfica em sílica gel (*n*-hexano) (40% de rendimento do telureto vinílico, **18**).

Em um balão de duas bocas sob atmosfera inerte, o telureto **18** (3 mmol, 0,86 g) foi dissolvido em éter dietílico anidro (40 mL) e a mistura foi resfriada a -78°C . Somente então, foi adicionado gota a gota *n*-BuLi (3,3 mmol, 2M, 1,75 mL) e a mistura foi agitada por 15 minutos a -78°C . Uma solução de 2-isopropoxi-4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolana (6 mmol, 1,18 g em 15 mL de éter dietílico) foi adicionada e a mistura foi agitada durante 30 minutos a -78°C . A temperatura foi elevada a temperatura ambiente e a reação foi agitada por mais 2h. A reação foi protegida da luz e colocada sob banho de gelo, em seguida lodo metano foi adicionado (18 mmol, 1,11 mL) lentamente. O banho de gelo foi removido após a adição e a reação foi agitada por 30 minutos a temperatura ambiente. A mistura foi diluída em éter dietílico e foi filtrada em celite sob vácuo. O solvente foi evaporado sob pressão reduzida e o produto foi purificado por coluna cromatográfica com sílica gel (30:1 de éter de petróleo e éter dietílico) (60%).

(Z)-4,4,5,5-tetrametil-2-(oct-1-en-1-il)-1,3,2-dioxaborolane (8)⁶⁷

Óleo claro (20%), RMN ^1H (200MHz, CDCl_3): δ 0,87 (t, $J = 5,6$ Hz, 3H); 1,25-1,27 (m, 20H); 2,33-2,43 (m, 2H); 5,32 (d, $J = 13,6$ Hz, 1H); 6,35-6,50 (m, 1H). RMN ^{13}C (50MHz, CDCl_3): δ 14,07; 22,58; 24,80; 28,69; 29,40; 31,62; 32,16; 82,74; 155,24. CG-EM [m/z (%): 238(M^+ , 8), 223(64), 194(17), 181(27), 168(15), 153(95), 138(56), 123(26), 110(60), 101(100), 95(50), 85(80), 67(62), 55(53). FT-IV (filme, cm^{-1}) ν_{max} : 2931; 2860; 1458; 1424; 1379; 1152.

6.2.6. Procedimento para a síntese do éster alquenilborônico **9**⁶⁷

Em um balão de duas bocas, telúrio (5 mmol, 0,630 g) foi suspenso em THF anidro a temperatura ambiente e sob atmosfera inerte. Após, foi adicionado *n*-BuLi (5 mmol, 2M, 2,5 mL) lentamente. A mistura foi agitada por 10 minutos e então, fenilacetileno (6 mmol, 0,610 g) foi adicionado. Após 5 minutos etanol deaerado (50 mL) foi adicionado. A mistura foi refluxada durante 4h. Após este período acetato de etila foi adicionado e a mistura foi lavada com solução saturada de NaCl. A fase orgânica foi separada, seca com MgSO₄, filtrada e concentrada. O composto hidrotelurado puro (**16**) foi obtido por purificação com coluna cromatográfica em sílica (*n*-hexano) (75%).

Com o telureto vinílico (**16**) em mãos foi realizado procedimento similar a última etapa do item 6.2.5 para obter o produto desejado em 57% nesta etapa.

(Z)-4,4,5,5-tetrametil-2-estiril-1,3,2-dioxaborolane (9)⁶⁷

Óleo claro (42%), RMN ¹H (200MHz, CDCl₃): δ 1,26 (s, 12H); 5,56 (d, *J* = 14,8 Hz, 1H); 7,22-7,53 (m, 6H). RMN ¹³C (50MHz, CDCl₃): δ 24,80; 83,50; 127,90; 128,60; 138,50; 148,11. CG-EM [*m/z* (%): 230(M⁺,50), 215(24), 157(16), 144(79), 129(100), 114(37), 105(36), 91(12), 85(13), 77(25), 57(12). FT-IV (filme, cm⁻¹) *v*_{max}: 2979; 2928; 1624; 1577; 1496; 1451; 1387; 1352; 1326; 1274; 1211; 1145; 999; 971;852.

6.2.7. Procedimento para a síntese do éster vinilborônico **10**^{68,69}

Foram adicionados a um balão de 100 mL, NaI (24 mmol, 3,6 g), CH₃CN (40 mL), TMSCl (24 mmol, 3 mL) e H₂O (12 mmol, 0,22 mL). A mistura foi agitada por 10 minutos e em seguida o *n*-octino (20 mmol, 2,95 mL) foi adicionado lentamente. A reação foi agitada durante 1,5 h. Após este período o produto foi extraído com *n*-hexano (1 x 30 mL) e a fase orgânica foi lavada com água e solução saturada de tiosulfato de sódio. A fase aquosa foi extraída com *n*-hexano (2 x 30 mL) e a fase orgânica foi seca com MgSO₄, filtrada e concentrada. A purificação foi realizada através de coluna cromatográfica em sílica gel (*n*-hexano) (62%).

Em um balão previamente flambado, sob atmosfera inerte adicionou-se o catalisador de paládio, Pd(PPh₃)₂Cl₂ (0,03 mmol, 0,021 g), PPh₃ (0,06 mmol, 0,016 g), bispinacolborana (pin₂B₂) (1,1 mmol, 0,279 g), PhOK (1,5 mmol, 0,20 g) e tolueno anidro (10 mL). Em seguida, foi adicionado o iodeto obtido anteriormente (1 mmol, 0,24 g) dissolvido em 5 mL de tolueno. A reação foi agitada a 50 °C por 6 h. Somente então 5 mL de água e de tolueno foram adicionados. A fase orgânica foi lavada com solução saturada de NaCl e a fase aquosa foi extraída com tolueno (2 x 5 mL). Depois a fase orgânica foi seca com MgSO₄, filtrada e concentrada. A purificação foi realizada através de coluna cromatográfica em sílica gel (*n*-hexano) (55%).

4,4,5,5-tetrametil-2-(oct-1-en-2-il)-1,3,2-dioxaborolane (10) ³²

Óleo claro (34%), RMN ¹H (200MHz, CDCl₃): δ 0,86 (t, *J* = 6Hz, 3H); 1,25-1,27 (m, 20H), 2,13 (t, *J* = 7Hz, 2H); 5,58 (s, 1H); 5,74 (d, *J* = 3,4, 1H). RMN ¹³C (50MHz, CDCl₃): δ 14,08; 22,61; 24,72; 28,94; 29,17; 31,78; 35,30; 83,24; 128,7. CG-EM [*m/z* (%)]: 238(M⁺, 10), 223(33), 181(34), 153(68), 137(15), 125(20), 110 (80), 101(40), 95(24), 84(100), 69(38), 55(41). FT-IV (filme, cm⁻¹) *v*_{max}: 2934; 2860; 1721; 1618; 1147.

6.2.8. Obtenção do éster vinilborônico 11

O composto **11** foi obtido comercialmente.

6.2.9.- Procedimento geral para síntese dos boronatos quirais **32** e **33**^{89,97}

A um balão de 50 mL foi adicionada o compostos **10** ou **11** (1 mmol), tolueno anidro (1 mL) e, foi adicionado Rh sob carvão (1 mol %). Após foi borbulhado H₂ durante 4 h, então, a mistura foi filtrada em celite, sob vácuo, e o solvente foi evaporado. Não houve necessidade de purificação.

4,4,5,5-tetrametil-2-(octan-2-il)-1,3,2-dioxaborolana (32)^{89,97}

Óleo amarelo (70%). RMN ¹H (200MHz, CDCl₃): δ 0,86 (t, *J* = 6,6 Hz, 3H); 0,95 (s, 3H); 1,22 -1,29 (m, 23H). RMN ¹³C (50MHz, CDCl₃): δ 14,05; 15,48; 22,61; 24,67; 28,91; 29,51; 31,85; 33,23; 82,69. CG-EM [m/z (%): 240(M⁺,1); 225(33); 198(4); 154(29); 83(60); 69(46); 57(100); 43(52). FT-IV (filme, cm⁻¹) *v*_{max}: 2933; 2859; 1469; 1389; 1319; 1149.

4,4,5,5-tetrametil-2-(1-feniletil)-1,3,2-dioxaborolana (33)^{89,97}

Óleo amarelo (80%). RMN ¹H (200MHz, CDCl₃): δ 1,20-1,34 (m, 15H); 2,34-2,45 (m, 1H); 7,21-7,26 (m, 5H). RMN ¹³C (50MHz, CDCl₃): δ 16,99; 24,54; 24,58; 83,26; 125,02; 127,74; 128,24; 144,92. CG-EM [m/z (%): 232 (M⁺, 60); 217(28); 174(14), 146(22),132(74); 117(30), 105(100), 91(14), 83(64), 77(15), 59(10). FT-IV (filme, cm⁻¹) *v*_{max}: 3065; 3029; 2981; 1459; 1351; 1146.

Condição da separação dos enantiômeros do correspondente álcool **55** (álcool obtido por oxidação do composto **33**) por CLAE: Coluna Chiracel® OD, mistura *n*-heptano/ *iso*-propanol 95:5, fluxo 1, 254 nm, tempos de retenção: 5,00 min (*R*) e 5,92 min (*S*).

6.2.10.- Procedimento para síntese do boronato quiral **34**^{69, 89, 97, 99}

Em um balão de 50 mL e duas bocas, sob atmosfera inerte, foi adicionado diisopropilamina (5,6 mmol, 079 mL) e THF anidro (10 mL). A mistura foi resfriada a -78 °C e foi adicionado *n*-BuLi (1,26 M em hexano, 5,6 mmol, 4,44 mL). A mistura foi aquecida a 0 °C e agitada durante 1 h. A mistura foi novamente resfriada a -78 °C e foi adicionado a correspondente acetofenona (5 mmol) dissolvida em THF (2 mL). A reação foi agitada a esta temperatura por 30 minutos e então, foi adicionado fosforocloridrato de dietila (5,5 mmol, 0,8 mL). A reação foi aquecida a temperatura ambiente e mantida sob agitação durante 1,5 h. Em seguida, a reação foi lavada com solução saturada de NH₄Cl (10 mL) e a fase aquosa extraída com éter dietílico (2 x 10 mL). A fase orgânica foi tratada com MgSO₄, filtrada e concentrada sob vácuo. O produto foi purificado em coluna cromatográfica em sílica gel (20% acetato de etila/ hexano, 30% acetato de etila/hexano) levando ao fosfonato vinílico puro (**36**) em 75%.

Em um balão de 50 mL foi adicionado o fosfato **36** sintetizado anteriormente (4 mmol), diclorometano (15 mL) e água (120 µL). Em seguida, foi adicionado TMSCl (3 equiv., 12 mmol, 1,6 mL) e NaI (3 equiv., 12 mmol, 1,8 g). A reação foi agitada durante 5 minutos. Em seguida a reação foi lavada com solução saturada de NaHCO₃ (10 mL) e Na₂S₂O₃ (10 mL) e a fase aquosa extraída com diclorometano (2 x 10 mL). A fase orgânica foi tratada com MgSO₄, filtrada e concentrada sob vácuo. O produto (iodeto geminal, **37**) foi utilizado sem prévia purificação.

De posse do iodeto **37** foi realizada reação de acoplamento seguida de redução catalisada por Rh como descrito anteriormente nos itens 6.2.7 e 6.2.8 levando ao boronato quiral **34** (27 % a partir da acetofenona).

2-(1-(4-metóxfenil)etil)-4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolana (34**).**^{89,97}

Óleo amarelo (27%). RMN ¹H (200MHz, CDCl₃): δ 1,12 (s, 12H); 1,24 (s, 3H); 2,28 (q, *J* = 7,8 Hz, 1H); 3,70 (s, 3 H); 6,7-7,16 (m, 4H). RMN ¹³C (50MHz, CDCl₃): δ 17,33; 24,57; 55,16; 83,18; 113,74; 128,58; 136,99; 157,22. CG-EM [*m/z* (%): 286 (M⁺, 4), 206 (5), 178 (4), 151(3), 136 (18), 135 (100), 134 (20), 121 (12), 119 (12), 105 (9), 103 (8), 91 (20), 77 (16), 65 (8). FT-IV (filme, cm⁻¹) *v*_{max}: 3004, 2919, 1661, 1437, 1407, 1316, 1021.

Condição da separação dos enantiômeros do correspondente álcool **56** (álcool obtido por oxidação do composto **34**) por CLAE: Coluna Chiracel® OD-H, mistura *n*-heptano/*iso*-propanol 97:3, fluxo 0.8, 227 nm, tempos de retenção: 40,54 min (*S*) e 41,93 min (*R*).

6.2.11.- Procedimento para síntese do boronato quiral **35**^{68, 69, 89, 97}

Para a síntese do composto **35** foi utilizada reação para gerar iodeto geminal (**40**) idêntica ao procedimento descrito no item 6.2.7 e após foi realizada reação de acoplamento seguida de redução catalisada por Rh como descrito anteriormente nos itens 6.2.7 e 6.2.8 levando ao boronato quiral (**35**) (54% a partir do acetileno).

2-(1-(4-fluorofenil)etil)-4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolana (35**)**^{89,97}

Óleo amarelo (54%). RMN ¹H (200MHz, CDCl₃): δ 1,24 (s, 12H); 1,30 (s, 3 H); 1,61-1,81 (m, 1H); 6,94-7,47 (m, 4H). RMN ¹³C (50MHz, CDCl₃): δ 14,13; 24,79; 83,88; 112,11; 114,72; 128,62; 130,51; 156,51 (d, J = 233,5 Hz). CG-EM [m/z (%): 248 (M⁺, 54), 247 (27), 232 (26), 205 (30), 204 (31), 191 (36), 174 (25), 162 (45), 149 (44), 148 (100), 147 (90), 123 (35), 77 (34), 58 (31), 50 (18). FT-IV (filme, cm⁻¹) ν_{max}: 2957, 2918, 2850, 1736, 1635, 1380, 1233, 1181, 835.

Condição da separação dos enantiômeros do correspondente álcool **57** (obtido por oxidação do composto **35**) por CLAE: Coluna Chiralpak® AS-H, mistura *n*-heptano/ *iso*-propanol 98,5:1,5, fluxo 0,5, 254 nm, tempos de retenção: 20,11 min (S) e 21,51 min (R).

6.2.12.- Procedimento geral para síntese dos ésteres ciclopropil borônicos **41-43**¹⁰⁵

Em uma balão de duas bocas, sob atmosfera inerte, foi adicionado CH_2I_2 (2,5 mmol, 0,225 mL) e CH_2Cl_2 (5 mL). A mistura foi resfriada a 0°C e foi adicionado Et_2Zn (1,25 mmol, 1M em Hexano, 1,25 mL) lentamente. A reação foi agitada durante 10 minutos e, então, foi adicionado o éster vinilborônico (**7**, **9** ou **11**) (0,5 mmol, 0,115 g). Após 6h sob agitação a temperatura ambiente, a mistura foi lavada com solução saturada de NH_4Cl (3 mL) e a fase aquosa foi extraída com CH_2Cl_2 (2 x 5 mL). A fase orgânica foi tratada com MgSO_4 , filtrada e concentrada sob vácuo. O produto foi purificado em coluna cromatográfica em sílica gel (10% acetato de etila/hexano).

4,4,5,5-tetrametil-2-(2-fenilciclopropil)-1,3,2-dioxaborolana (41)¹⁰⁵

Óleo incolor (82%). RMN ^1H (200MHz, CDCl_3): δ 0,25-0,33 (m, 1H); 0,86-1,03 (m, 2H); 1,29 (s, 12H); 2,04-2,10 (m, 1H); 7,03-7,22 (m, 5H). RMN ^{13}C (50MHz, CDCl_3): δ 15,05; 21,86; 24,78; 83,31; 125,57; 127,01; 128,19; 128,52; 143,31. CG-EM [m/z (%): 245 (13), 244 (M^+ , 80), 243 (17), 186 (16), 145 (100), 144 (49), 143 (45), 126 (50), 117 (90), 116 (55), 115 (52), 101 (30), 91 (29), 85 (25), 83 (27). FT-IV (filme, cm^{-1}) ν_{max} : 3081, 3061, 3026, 2978, 2930, 1624, 1449, 1419, 1353, 1323, 1212, 1144, 969, 852, 750, 697.

4,4,5,5-tetrametil-2-(2-fenilciclopropil)-1,3,2-dioxaborolana (42)¹⁰⁵

Óleo incolor (84%). RMN ¹H (200MHz, CDCl₃): δ 0,28-0,41 (m, 1H); 0,78 (s, 6 H); 0,91 (s, 6H); 0,95-1,06 (m 1H); 1,14-1,22 (m, 2H); 7,00-7,20 (m, 5H). RMN ¹³C (50MHz, CDCl₃): δ 1,02; 8,86; 21,72; 24,35; 24,74; 82,88; 125,67; 127,62; 128,76; 140,70.

CG-EM [m/z (%): 245 (15), 244 (M⁺, 95), 243 (20), 229 (13), 186 (20), 185 (18), 145 (100), 144 (45), 143 (40), 128 (30), 126 (45), 117 (87), 116 (70), 115 (65), 101 (30), 91 (28), 83(25). FT-IV (filme, cm⁻¹) v_{max}: 3083, 3060, 3026, 2978, 2927, 1603, 1409, 1322, 1223, 1144, 1028, 859, 699.

4,4,5,5-tetrametil-2-(1-fenilciclopropil)-1,3,2-dioxaborolana (43)

Óleo incolor (75%). RMN ¹H (200MHz, CDCl₃): δ 0,87-0,92 (m, 2H); 1,07-1,12 (m, 2H); 1,20 (s, 12H); 7,2-7,51 (m, 5H). RMN ¹³C (50MHz, CDCl₃): δ -4,02; 13,31; 24,57; 83,29; 125,19; 127,14; 127,93; 128,89; 144,79. CG-EM [m/z (%): 245 (15), 244 (M⁺, 90), 243 (17), 229 (16), 187 (55), 171(18), 145 (97), 144 (77), 143 (75), 129 (29), 117 (100), 116 (65), 115 (59), 105 (50), 101 (60), 85 (42), 83 (44). FT-IV (filme, cm⁻¹) v_{max}: 3081, 3059, 2978, 2932, 2867, 1685, 1391, 1318, 1145, 849, 699.

Condição da separação dos enantiômeros de **41-43** por CLAE: Coluna Chiralpak® AD-H, *n*-heptano, fluxo 0,25, 220 nm, não foi possível determinar a configuração absoluta destes compostos.

6.2.13.- Procedimento geral para síntese dos selenetos quirais **44-46**¹⁰⁶

Em um balão de 50 mL e duas bocas, sob atmosfera inerte, foi adicionado diseleneto de difenila (1 mmol, 0,312 g) e diclorometano anidro (2 mL). Cloreto de sulfurila (2 mmol, 0,270 g) foi dissolvido em diclorometano (1 mL) e adicionado lentamente a temperatura ambiente, tornando a mistura avermelhada. A mistura foi agitada durante 10 minutos. Em seguida, foi adicionado lentamente sililcianato de trimetila (4,8 mmol, 640 μ L) dissolvido em diclorometano (0,5 mL). A reação foi agitada durante 30 minutos, o solvente foi evaporado e o produto bruto foi purificado diretamente em coluna cromatografia em sílica gel (5% acetato de etila/hexano). O selenocianato de fenila (**47**) puro foi obtido em 70% de rendimento.

Em um balão de 50 mL e duas bocas, sob atmosfera inerte foi adicionado o feniletanol correspondente (1 mmol) e tolueno anidro (1,5 mL). Após foi adicionado selenocianato de fenila dissolvido em tolueno (1,5 mL). A mistura foi resfriada a 0 °C e fosfina de tributílica (1,2 mmol, 0,3 mL) foi adicionada. A reação foi agitada a temperatura ambiente durante 20 h e após foi diretamente purificada por coluna cromatográfica em sílica gel (10 % acetato de etila/hexano).

Fenil-(1-feniletil)selane (44)¹⁰⁶

Óleo amarelo (82%). RMN ¹H (200MHz, CDCl₃): δ 1,73 (d, *J* = 7 Hz, 3H); 4,43 (qua, *J* = 7 Hz); 7,2-7,6 (m, 10 H). RMN¹³C (50MHz, CDCl₃): δ 21,14; 42,45; 127,18; 127,68; 128,27; 128,76; 129,15; 131,45; 135,41; 141,65; 143,52. CG-EM [m/z (%): 262 (M⁺, 5), 156 (8), 105 (100), 79 (10), 78 (9), 77 (14), 51 (7). FT-IV (filme, cm⁻¹) *v*_{max}: 3057, 3027, 2961, 2918, 2863, 1576, 1474, 1436, 1021, 762, 736, 691.

Condição da separação dos enantiômeros de **44** por CLAE: Coluna Chiracel® OJ-H, mistura *n*-heptano/ *iso*-propanol 99:1, fluxo 0.5, 254 nm, tempos de retenção: 21,55 min (*S*) e 31,88 min (*R*).

Rotação específica: (*S*)-**44**, e.e > 99%, [α]_D = - 70 (c = 1,0; CH₂Cl₂)

(*R*)-**44**, e.e > 99%, [α]_D = + 87 (c = 1,0; CH₂Cl₂)

Fenil-(1-4-toluiletil)selane (45)¹¹⁴

Óleo amarelo (87%). RMN ¹H (200MHz, CDCl₃): δ 1,73 (d, *J* = 7,2 Hz, 3H); 2,30 (s, 3H); 4,44 (qua, *J* = 7 Hz, 1 H); 7,04-7,63 (m, 9 H). RMN ¹³C (50MHz, CDCl₃): δ 21,09; 22,31; 42,25; 127,04; 127,68; 129,15; 131,45; 135,23; 136,56; 140,46. CG-EM [m/z (%): 276 (M⁺, 4), 156 (6), 119 (100), 91 (20), 77 (12), 65 (5), 51 (4). FT-IV (filme, cm⁻¹) *v*_{max}: 3069, 3054, 3019, 2961, 2919, 1576, 1511, 1474, 1437, 1020, 816, 736, 689.

Condição da separação dos enantiômeros de **45** por CLAE: Coluna Chiracel® OJ-H, *n*-heptano, fluxo 0.5, 220 nm, tempos de retenção: 37,74 min (*S*) e 41,54 min (*R*).

¹¹⁴ Clarembeau, M.; Cravador, A.; Dumont, W.; Hevesi, L; Krief, A. *Tetrahedron* **1985** , 41, 4793–4812.

Rotação específica: (*S*)-**45**, e.e > 99%, $[\alpha]_D = -151$ ($c = 1,0$; CH_2Cl_2)

(*R*)-**45**, e.e > 99%, $[\alpha]_D = +130$ ($c = 1,0$; CH_2Cl_2)

1-(4-fluorofenil)etil-fenilselane (**46**)

Óleo amarelo (79%). RMN ^1H (200MHz, CDCl_3): δ 1,72 (d, $J = 7.2$ Hz, 3 H); 4,43 (qua, $J = 7,2$ Hz, 1H); 6,80-6,96 (m, 2H); 7,14-7,28 (m, 5 H); 7,38-7,43 (m, 2H). RMN ^{13}C (50MHz, CDCl_3): δ 22,24; 41,56; 114,82; 115,24; 127,92; 128,61; 128,77; 128,82; 135,5; 161,61 (d, $J = 244$ Hz). CG-EM [m/z (%): 280 (M^+ , 6), 262 (4), 105 (100), 91 (41), 77 (9), 65 (7), 51 (4). FT-IV (filme, cm^{-1}) ν_{max} : 3070, 3056, 2965, 2920, 2864, 1602, 1508, 1223, 1156, 834, 741, 692.

Condição da separação dos enantiômeros de **46** por CLAE: Coluna Chiracel® OJ-H, *n*-heptano, fluxo 0.5, 254 nm, tempos de retenção: 27,88 min (*S*) e 32,61 min (*R*).

Rotação específica: (*S*)-**46**, e.e > 99%, $[\alpha]_D = -180$ ($c = 1,0$; CH_2Cl_2)

(*R*)-**46**, e.e > 99%, $[\alpha]_D = +168$ ($c = 1,0$; CH_2Cl_2)

6.2.14.- Procedimento geral para síntese dos selenetos quirais **48-50**^{94a, 107}

Método A: Em um balão de 50 mL foi adicionado SOCl_2 (50 mmol, 3,64 mL) e CH_2Cl_2 (5 mL). O feniletanol correspondente (10 mmol) foi adicionado lentamente dissolvido em CH_2Cl_2 (2 mL). A reação foi agitada durante 16 h a temperatura ambiente, após foi adicionada solução saturada de NaHCO_3 (1 x 10 mL) e a fase aquosa foi extraída com CH_2Cl_2 (2 x 10 mL). A fase orgânica foi tratada com MgSO_4 , filtrada e concentrada sob vácuo. O produto foi purificado por coluna cromatografia em sílica gel (hexano, 10% acetato de etila/hexano) levando aos derivados de 1-cloroetilbenzeno puro em 60-65% de rendimento.

Em um balão de 50 mL e duas bocas, sob atmosfera inerte e equipado com condensador de refluxo, foi adicionado selênio elementar (1 mmol, 0,080 g) e EtOH (3 mL). A mistura foi resfriada a 0 °C e NaBH_4 (1 mmol, 0,037 g) foi adicionado. A mistura foi agitada durante 30 minutos e, então foi adicionado o correspondente derivado de 1-cloroetilbenzeno (1 mmol). A reação foi refluxada durante 4 h. Após este período a reação foi resfriada a temperatura ambiente e foi adicionado DMF (1 mL) e NaBH_4 (2 mmol, 0,074 g). A reação foi agitada por 3 h a temperatura ambiente. Então, brometo de benzila (2 mol, 0,238 mL) dissolvido em DMF (1 mL) foi adicionado. A reação foi agitada por mais 2h. Após este período o etanol foi evaporado, foi adicionada H_2O (5 mL) e a fase aquosa foi extraída com CH_2Cl_2 (2 x 5 mL). A fase orgânica foi tratada com MgSO_4 , filtrada e concentrada sob vácuo. O produto foi purificado por coluna cromatografia em sílica gel (pentano) levando ao seleneto puro (45-68%).

Método B: Em um balão de 50 mL (balão I) foi adicionado o correspondente álcool (1 mmol), CH_2Cl_2 (50 mL) e DMAP (2 mmol, 0,244 g). Após 15 minutos agitando a temperatura ambiente, MsCl (1,5 mmol, 0,12 mL) foi adicionado lentamente. A mistura

foi agitada por 16 h a temperatura ambiente. Em um segundo balão de 50 mL (balão II), foi adicionado selênio (1 mmol, 0,080 g), EtOH (3 mL), DMF (2 mL) e NaBH₄ (1 mmol, 0,037 g). A mistura foi agitada durante 15 minutos e, então foi adicionado BnBr (1 mmol, 0,119 mL). Após agitar 3 h a temperatura ambiente, uma quantidade adicional de NaBH₄ (1,5 mmol, 0,055 g) foi adicionada. A reação foi agitada por mais 20 minutos. Após o conteúdo do balão I foi adicionado lentamente ao balão II e a nova mistura foi agitada 3 h a temperatura ambiente. Após este período o etanol foi evaporado, foi adicionada H₂O (5 mL) e a fase aquosa foi extraída com Et₂O (2 x 5 mL). A fase orgânica foi tratada com MgSO₄, filtrada e concentrada sob vácuo. O produto foi purificado por coluna cromatografia em sílica gel (n-pentano) levando ao seleneto puro (50-75%).

Benzil-(1-feniletil)selane (48)

Óleo amarelo (75%). RMN ¹H (200MHz, CDCl₃): δ 1,68 (d, *J* = 6,8 Hz, 3H); 3,70 (s, 2H); 4,07 (qua, *J* = 8,2 Hz, 1H); 7,19-7,28 (m, 10H). RMN ¹³C (50MHz, CDCl₃): δ 22,46; 37,72; 52,98; 126,57; 127,31; 128,35; 128,84; 139,03; 144,15. CG-EM [*m/z* (%): 276 (*M*⁺, 6), 262 (4), 105 (100), 91 (41), 77 (9), 65 (7), 51 (4). FT-IV (filme, cm⁻¹) *v*_{max}: 3082, 3060, 3026, 2961, 2920, 1600, 1493, 1452, 1177, 760, 695.

Condição da separação dos enantiômeros de **48** por CLAE: Coluna Chiracel® OJ-H, mistura *n*-heptano/ *iso*-propanol 99:1, fluxo 0.8, 254 nm, tempos de retenção: 22,75 min (*S*) e 26,88 min (*R*).

Rotação específica: (*S*)-**48**, e.e > 99%, [*α*]_D = + 30 (*c* = 1,0; CH₂Cl₂)

(*R*)-**48**, e.e > 99%, [*α*]_D = - 45 (*c* = 1,0; CH₂Cl₂)

Benzil(1-*p*-toluiletil)selane (49)

Óleo amarelo (61%). RMN ^1H (200MHz, CDCl_3): δ 1,69 (d, $J = 7$ Hz, 3H); 2,31 (s, 3H); 3,80 (s, 2H); 3,99 (qua, $J = 7,2$ Hz, 1H); 7,12-7,25 (m, 9H). RMN ^{13}C (50MHz, CDCl_3): δ 21,12; 32,51; 41,07; 52,92; 127,14; 128,35; 128,92; 128,94; 136,97; 139,09; 139,97; 144,82. CG-EM [m/z (%)]: 290 (M^+ , 3), 207 (4), 182 (3), 120 (12), 119 (100), 118 (13), 117 (14), 91 (55), 77 (8), 65 (10), 51 (6). FT-IV (filme, cm^{-1}) ν_{max} : 3082, 3059, 3024, 2917, 1655, 1510, 1440, 1029, 816, 757, 695.

Condição da separação dos enantiômeros de **49** por CLAE: Coluna Chiracel® OJ-H, *n*-heptano, fluxo 0.5, 220 nm, tempos de retenção: 50,65 min (*S*) e 54,90 min (*R*).

Rotação específica: (*S*)-**49**, e.e > 99%, $[\alpha]_{\text{D}} = + 63$ ($c = 1,0$; CH_2Cl_2)

(*R*)-**49**, e.e > 99%, $[\alpha]_{\text{D}} = - 76$ ($c = 1,0$; CH_2Cl_2)

Benzil(1-(4-fluorofenil)etil)selane (50)

Óleo amarelo (50%). RMN ^1H (200MHz, CDCl_3): δ 1,64 (d, $J = 7,2$ Hz, 3H); 3,69 (s, 2H); 3,80 (qua, $J = 7,2$ Hz, 1H); 6,9-7,2 (m, 9H). RMN ^{13}C (50MHz, CDCl_3): δ 22,90; 37,62; 52,87; 114,93; 115,32; 115,35; 128,38; 128,41; 128,55; 128,71; 161,43 (d, $J = 243$ Hz). CG-EM [m/z (%)]: 294 (M^+ , 4), 124 (7), 123 (100), 122 (7), 103 (20), 91 (22), 77 (5), 65 (6), 51 (3). FT-IV (filme, cm^{-1}) ν_{max} : 3066, 2965, 2919, 2864, 1655, 1603, 1508, 1222, 1156, 1028, 834. 697.

Condição da separação dos enantiômeros de **50** por CLAE: Coluna Chiracel® OJ-H, mistura *n*-heptano/ *iso*-propanol 99:1, fluxo 0.5, 220 nm, tempos de retenção: 27,28 min (*S*) e 31,62 min (*R*).

Rotação específica: (*S*)-**50**, e.e > 99%, $[\alpha]_D = + 84$ ($c = 1,0$; CH_2Cl_2)

(*R*)-**50**, e.e > 99%, $[\alpha]_D = - 100$ ($c = 1,0$; CH_2Cl_2)

6.2.15.- Procedimento geral para reações de bio-oxidação mediadas por BVMOs

Em um tubo de microcentrífuga foi adicionada solução 1M do substrato em DMSO (5 μL), tampão tris-HCl pH 9 ou 7,5 (440 μL), fosfito 500 mmol.L^{-1} (20 ou 50 μL), NADPH 100 mmol.L^{-1} (10 μL), PTDH 100 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ (5 μL) e enzima 100 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ (20 ou 40 μL). A reação foi incubada com 200 rpm, 30 °C para PAMO e PAMO Mutante M446G, e 25 °C para HAPMO e CHMO e foram agitadas por um período de 1 h a 24 h dependendo do substrato utilizado. Após período determinado anteriormente foi adicionado hexano (2 x 500 μL), a fase orgânica foi tratada com MgSO_4 , centrifugada e transferida.

6.2.16.- Procedimento geral para reações de bio-oxidação mediadas por CAL-B

Em um frasco de agitador orbital pesou-se o seleneto (0,25 mmol, 65 mg), adicionou-se o solvente (1 mL) e CAL-B (20 mg). A seguir, adicionou-se o oxidante (2 ou 3 equiv, 0,5 ou 0,75 mmol). As reações foram agitadas de 30 minutos a 15h, a temperatura ambiente ou 0 °C. Após este período as reações foram lavadas com água destilada (1 mL) e a fase aquosa foi extraída com *n*-hexano (2 x 1 mL), concentrada e analisadas em CLAE munido de coluna quiral.

6.2.17.- Procedimento geral para reações de bio-oxidação mediadas por fungo

Crescimento dos fungos:

Para o cultivo dos fungos duas etapas foram necessárias: a *pré-incubação* para reativar o fungo e a *incubação* para crescimento da biomassa.

I) Em um erlenmeyer de 250 mL foi adicionado 100 mL de meio de cultura (extrato de malte, 20 g.L⁻¹). O meio foi autoclavado por 40 minutos a 120 °C. Sob condições assépticas e em capela de fluxo laminar o meio foi inoculado (células do fungo foram transferidas do meio de cultura sólido para o meio de cultura líquido com auxílio de uma alça de platina). As culturas foram incubadas em um agitador orbital a 32 °C e 160 rpm durante 5 dias.

II) Em um erlenmeyer de 3 L foi adicionado 1 L de meio de cultura (extrato de malte, 20 g.L⁻¹). O meio foi autoclavado por 40 minutos a 120 °C. Sob condições assépticas e em capela de fluxo laminar o meio foi inoculado pela adição do conteúdo do primeiro frasco. O conteúdo foi novamente incubado em agitado em agitador orbital (160 rpm) a 32 °C por 5 dias.

Biotransformação: A biotransformação foi realizada com a ressuspensão das células (1 g) em tampão tris-HCl (50 mmol.L⁻¹, pH 7,5, 50 mL) e adicionando o substrato (0,1 mmol.L⁻¹) a este meio. As reações foram agitadas em agitador orbital (160 rpm) a 32 °C por um período de 5 h a 5 dias dependendo do substrato utilizado. Após este período as reações foram filtradas e a fase aquosa foi extraída com acetato de etila (2 x 20 mL), concentradas e analisadas em CLAE munido de coluna quiral.

6.2.18.- Procedimento geral para a resolução cinética enzimática de alcoóis catalisada por CAL-B

Em um frasco de Erlenmeyer de 250 mL, foi adicionado o álcool (3 mmol), hexano (15 mL), CAL-B (240 mg) e por fim acetato de vinila (1,2 mL). A mistura reacional foi selada com uma tampa de borracha e agitada em um agitador orbital (32 °C, 160 rpm). Após 24 h a mistura reacional foi filtrada e a CAL-B lavada com acetato de etila (3 x 10 mL). O solvente foi evaporado sob pressão reduzida e os compostos acetilados foram separados dos alcoóis por coluna cromatográfica em sílica gel (hexano e hexano/acetato de etila 8:2). Os produtos acetilados foram obtidos com 47-48% de rendimento e os alcoóis foram recuperados com 46-47% de rendimento.

A transformação do produto acetilado em álcool foi feita através de adição de solução 1M de NaOH (2 mL) e metanol (3 mL) ao correspondente composto acetilado. A mistura foi agitada durante 1 h a temperatura ambiente e o metanol foi evaporado sob pressão reduzida. A fase aquosa remanescente foi extraída com diclorometano (3 x 5 mL), o solvente foi removido sob pressão reduzida levando ao corresponde álcool em rendimento quantitativo.

Condição da separação dos enantiômeros dos alcoóis por CG: Coluna Chirasil-Dex CB, temperatura do injetor 220 °C, temperatura do detector 220 °C e;

1-feniletanol (55): isoterma 117 °C, tempos de retenção: 5,68 min (*R*) e 6,07 min (*S*).

1-*p*-toluiletanol: isoterma 113 °C, tempos de retenção: 9,45 min (*R*) e 10,84 min (*S*).

1-(4-fluorofenil)etanol (57): rampa de aquecimento 100-140 °C, 3 °C/min, tempos de retenção: 5,67 min (*R*) e 6,13 min (*S*).

Condições para separação dos alcoóis **55** e **57** por CLAE equipado com coluna quiral são encontrados nos itens **6.2.9** e **6.2.11**, respectivamente.

7. Espectros e Cromatogramas

Figura 20 - Espectro de RMN ¹H (200 MHz) e ¹³C (50 MHz) do composto 3 (CDCl₃).

Figura 21- Espectro de RMN ¹H (200 MHz) e ¹³C (50 MHz) do composto 4 (CDCl₃).

Figura 22- Espectro de RMN ^1H (200 MHz) e ^{13}C (50 MHz) do composto **5** (DMSO- d_6).

Figura 23- Espectro de RMN ¹H (200 MHz) e ¹³C (50 MHz) do composto **6** (CDCl₃).

Figura 24 - Espectro de RMN ^1H (200 MHz) e ^{13}C (50 MHz) do composto 7 (CDCl_3).

Figura 25 - Espectro de RMN ¹H (200 MHz) e ¹³C (50 MHz) do composto **8** (CDCl₃).

Figura 26 - Espectro de RMN ^1H (200 MHz) e ^{13}C (50 MHz) do composto **9** (CDCl_3).

Figura 27 - Espectro de RMN ^1H (200 MHz) e ^{13}C (50 MHz) do composto **10** (CDCl_3).

Figura 28 - Espectro de RMN ^1H (200 MHz) e ^{13}C (50 MHz) do composto **32** (CDCl_3).

Figura 29 - Espectro de RMN ^1H (200 MHz) e ^{13}C (50 MHz) do composto **33** (CDCl_3).

Figura 30 - Espectro de RMN ¹H (200 MHz) e ¹³C (50 MHz) do composto **34** (CDCl₃).

Figura 31 - Espectro de RMN ^1H (200 MHz) e ^{13}C (50 MHz) do composto **35** (CDCl_3).

Figura 32 - Espectro de RMN ¹H (200 MHz) e ¹³C (50 MHz) do composto **41** (CDCl₃).

Figura 33 - Espectro de RMN ¹H (200 MHz) e ¹³C (50 MHz) do composto **42** (CDCl₃).

Figura 34 - Espectro de RMN ^1H (200 MHz) e ^{13}C (50 MHz) do composto **43** (CDCl_3).

Figura 35 - Espectro de RMN ¹H (200 MHz) e ¹³C (50 MHz) do composto **44** (CDCl₃).

Figura 36 - Espectro de RMN ¹H (200 MHz) e ¹³C (50 MHz) do composto **45** (CDCl₃).

Figura 37 - Espectro de RMN ¹H (200 MHz) e ¹³C (50 MHz) do composto **46** (CDCl₃).

Figura 38 - Espectro de RMN ^1H (200 MHz) e ^{13}C (50 MHz) do composto **48** (CDCl_3).

Figura 39 - Espectro de RMN ¹H (200 MHz) e ¹³C (50 MHz) do composto **49** (CDCl₃).

Figura 40 - Espectro de RMN ^1H (200 MHz) e ^{13}C (50 MHz) do composto **50** (CDCl_3).

Figura 41 – Reação de 24 h do composto **3** com PAMO.

Figura 42– Reação de 24 h do composto **4** com PAMO.

Figura 43– Reação de 24 h do composto **3** com PAMO mutante M446G.

Figura 44 – Reação de 24 h do composto **4** com PAMO mutante M446G.

Figura 45 – Reação de 24 h do composto 3 com HAPMO.

Figura 46 – Reação de 24 h do composto 4 com HAPMO.

Figura 47– Reação de 24 h do composto **7** com PAMO.

Figura 48 – Reação de 24 h do composto **9** com PAMO.

Figura 49 – Reação de 24 h do composto 11 com PAMO.

Figura 50 – Reação de 24 h do composto 7 com PAMO mutante M446G.

Figura 51– Reação de 24 h do composto **9** com PAMO mutante M446G.

Figura 52– Reação de 24 h do composto **11** com PAMO mutante M446G.

Figura 53– Reação de 24 h do composto 7 com HAPMO.

Figura 54– Reação de 24 h do composto **9** com HAPMO.

Figura 55 – Reação de 24 h do composto 11 com HAPMO.

Figura 56 – Reação de 24 h do composto 7 com CHMO.

Figura 57 – Reação de 24 h do composto **9** com CHMO.

Figura 58 – Reação de 24 h do composto **11** com CHMO.

1: 207 nm, 8 nm					
Pk #	Name	Retention Time	Area	Area Percent	
1	?	3.168	5495198	100.00	
Totals			5495198	100.00	

Figura 59 – Cromatograma obtido por CLAE do composto **33**.

1: 207 nm, 8 nm					
Pk #	Name	Retention Time	Area	Area Percent	
1		5.001	1340320	50.01	
2		5.925	1339872	49.99	
Totals			2680192	100.00	

Figura 60 – Cromatograma obtido por CLAE do 1-feniletanol (**55**).

1: 207 nm, 8 nm				
Pk #	Name	Retention Time	Area	Area Percent
1	1	4.651	50593	4.63
2	2	5.803	1043063	95.37
Totals			1093656	100.00

Figura 61- Cromatograma obtido por CLAE da reação de 5 h do composto **33** com PAMO em pH=7.5.

1: 207 nm, 8 nm				
Pk #	Name	Retention Time	Area	Area Percent
1	1	5.067	781244	92.46
2	2	5.835	63709	7.54
Totals			844953	100.00

Figura 62 - Cromatograma obtido por CLAE da oxidação química do composto **33** após 5h de reação com PAMO em pH=7.5.

Figura 63 – Cromatograma obtido por CLAE do composto **34**.

Figura 64 – Cromatograma obtido por CLAE do 1-(4-metóxi-fenil)-etanol (**56**).

Figura 65 - Cromatograma obtido por CLAE da reação de 7 h do composto **34** com PAMO M446G em pH=7.5.

Figura 66- Cromatograma obtido por CLAE da oxidação química do composto **34** após 7h de reação com PAMO M446G em pH=7.5.

Figura 67 – Cromatograma obtido por CLAE do composto **44**.

Figura 68 – Cromatograma obtido por CLAE do estireno.

Figura 69– Cromatograma obtido por CLAE da reação de 5 h do composto **44** com PAMO.

Figura 70 – Cromatograma obtido por CLAE do composto 48.

Figura 71 – Cromatograma obtido por CLAE da reação de 5 h do composto 48 com PAMO.

Figura 72 – Cromatograma obtido por CLAE do composto 50.

Figura 73 – Cromatograma obtido por CLAE da reação de 5h do composto 50 com PAMO.