

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

INSTITUTO DE QUÍMICA

Programa de Pós-Graduação em Química

JOEL SAVI DOS REIS

**Estudo de aplicação de lipases e transaminases
como catalisadores na síntese de compostos
organoborônicos quirais.**

Orientador: Prof. Dr. Leandro Helgueira de Andrade

Versão original da tese defendida

São Paulo

Data do Depósito na SPG:
07/11/2013

JOEL SAVI DOS REIS

**Estudo de aplicação de lipases e transaminases
como catalisadores na síntese de compostos
organoborônicos quirais.**

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

Orientador: Prof. Dr. Leandro Helgueira de Andrade

São Paulo
2013

*Aos meus pais, Elio e Marinelva, e minhas irmãs,
Keila e Marina, pelo apoio, reconhecimento,
carinho, palavras e empurrões.*

À minha noiva, Eloisa, fonte inesgotável de amor e carinho.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Leandro Andrade, pela oportunidade, confiança, espaço, empenho e excelente orientação tanto em assuntos científicos quanto questões que iam além da porta do laboratório.

Ao pessoal atual e “os que já se foram” do Laboratório de Química Fina e Biocatálise: Edna, Dayvson, Lidiane, Rodrigo, Camila, Hiléia, Thalita Silva, Wagner, Marcio, Felipe, Piovan, Thiago, Priscila, Thaís, Patrícia, Juliana, Thalita Gonçalves, Nathalie, Carolina e Caterina. Foi um prazer conviver com vocês neste tempo todo. Todos deixaram grandes contribuições para a minha formação e meu crescimento pessoal e profissional.

Um agradecimento especial aos amigos Thiago, Piovan e Dayvson pelas risadas e conversas intermináveis e ao meu aluno de iniciação científica, Felipe, pela parceria formada.

Ao Prof. Wolfgang Kroutil e ao Dr. Robert C. Simon pela orientação e paciência, juntamente com todo o grupo de pesquisa (Elk Crew) da Universidade de Graz, Áustria, que me receberam e acolheram da melhor forma possível, viabilizando o desenvolvimento de boa parte do meu doutorado e proporcionando uma experiência de vida singular.

Aos professores e funcionários do IQ-USP que contribuíram na minha formação.

Aos amigos do Instituto de Química e da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, os quais prefiro não elencar para evitar o esquecimento de alguém.

Ao Instituto de Química, e de maneira mais abrangente, à Universidade de São Paulo pelas excelentes condições oferecidas.

A FAPESP, não apenas pela bolsa concedida, mas também pelo amplo suporte financeiro concedido ao laboratório possibilitando o desenvolvimento da pesquisa científica. Igualmente, agradeço a CNPq e CAPES.

Aos meus sogros, José e Josefa. Talvez, muitos não fizessem para um filho o que vocês fizeram e estão fazendo por mim. Minha eterna e mais profunda gratidão.

Aos amigos feitos nos tempos de química em Santa Maria (RS), e hoje espalhados pelo mundo.

Aos amigos de infância, da minha terra-mãe (Marau-RS). Quanto mais o tempo passa, mais certeza tenho destas amizades. A vocês, fica o pensamento: *“As curumigências sipiripopéticas que se vem a vilomarnos que te pitórios dos indivíduos mortais”*.

A minha psicóloga, Andreza Buzaid, e minha dermatologista, Deise lamada, que foram fundamentais para eu chegar ao fim do doutorado lúcido e inteiro.

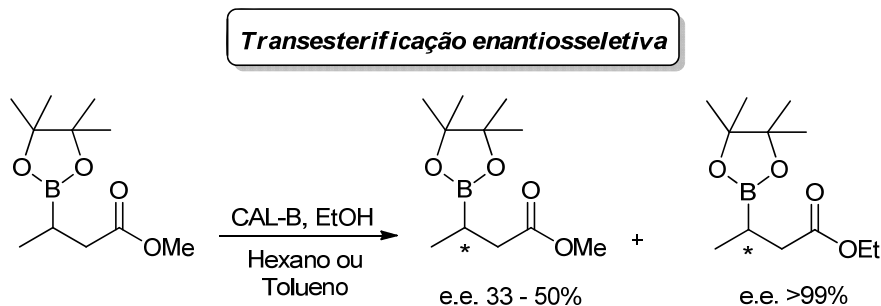
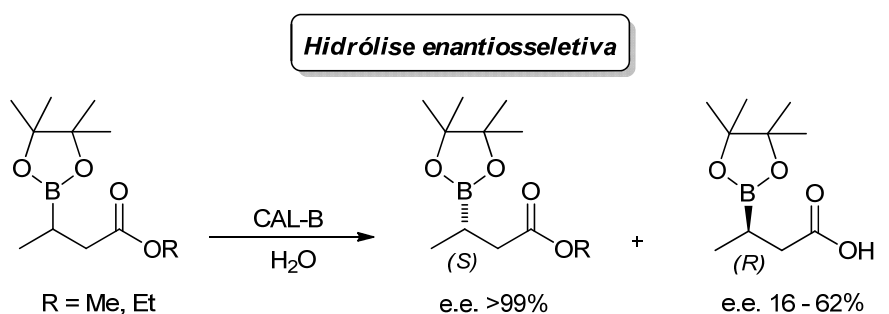
A tudo e todos que contribuíram de alguma forma na minha formação.

Enfim, talvez fosse capaz de escrever páginas e páginas de agradecimentos e mais outras tantas de “causos” da pós-graduação, entretanto prefiro parar por aqui, deixando apenas meu sincero muito obrigado.

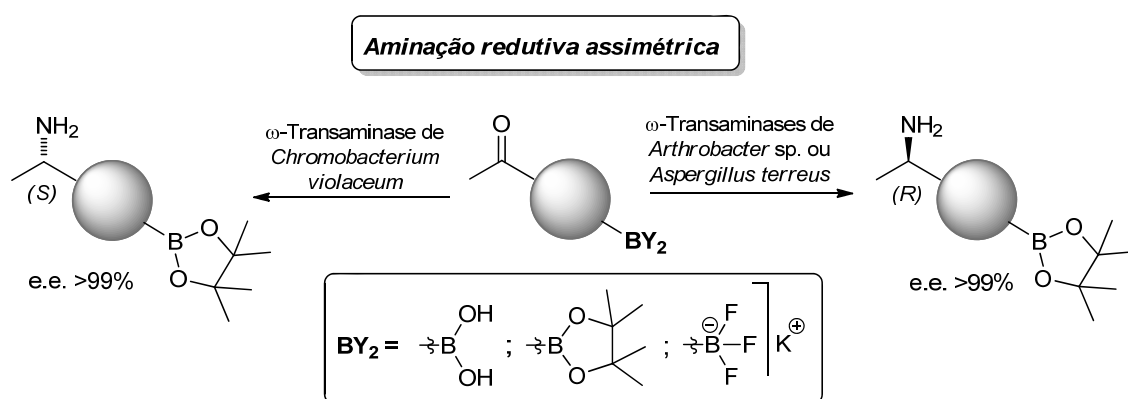
RESUMO

Reis, J. S. **Estudo de aplicação de lipases e transaminases como catalisadores na síntese de compostos organoborônicos quirais**. 2013. 150p. Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Química. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Neste trabalho, foi avaliada a resolução cinética de ésteres carboxílicos β -borilados, catalisada por lipases, através de hidrólise e transesterificação. Foram sintetizados ésteres contendo diferentes cadeias carbônicas. A hidrólise enantiosseletiva catalisada por CAL-B forneceu o correspondente ácido carboxílico β -borilado com excesso enantiomérico moderado (e.e. 62%), enquanto os ésteres β -borilados metílico e etílico foram recuperados com excelente pureza enantiomérica (e.e.>99%). A reação de transesterificação enantiosseletiva entre ésteres carboxílicos β -borilados e álcoois, catalisada por CAL-B, demonstrou uma alta seletividade somente quando etanol e (β -pinacolilboronato)-butanoato de metila foram usados como substratos, levando a formação de (β -pinacolilboronato)-butanoato de etila enantioenriquecido (e.e.>99%). Entretanto, ésteres contendo longas cadeias carbônicas ligadas à carboxila não sofreram as reações desejadas, mesmo em temperaturas mais elevadas.



Adicionalmente, foi investigada a reação de aminação redutiva assimétrica, catalisada por ω -transaminases, de cetonas pró-quirais contendo grupos borônicos (ácido, éster ou trifluoroborato de potássio). Após as sínteses de cetonas aromáticas e alifáticas, os melhores resultados para a biotransformação foram obtidos com ω -transaminases (*R*)-seletivas de *Arthrobacter* sp. e *Aspergillus terreus* e (*S*)-seletiva de *Chromobacterium violaceum*. Sob as condições otimizadas, foram obtidas altas conversões (94%) com perfeitas enantiosseletividades (e.e.>99%), proporcionando assim uma nova via de acesso a aminas (*R*) ou (*S*) contendo boro em condições reacionais suaves.

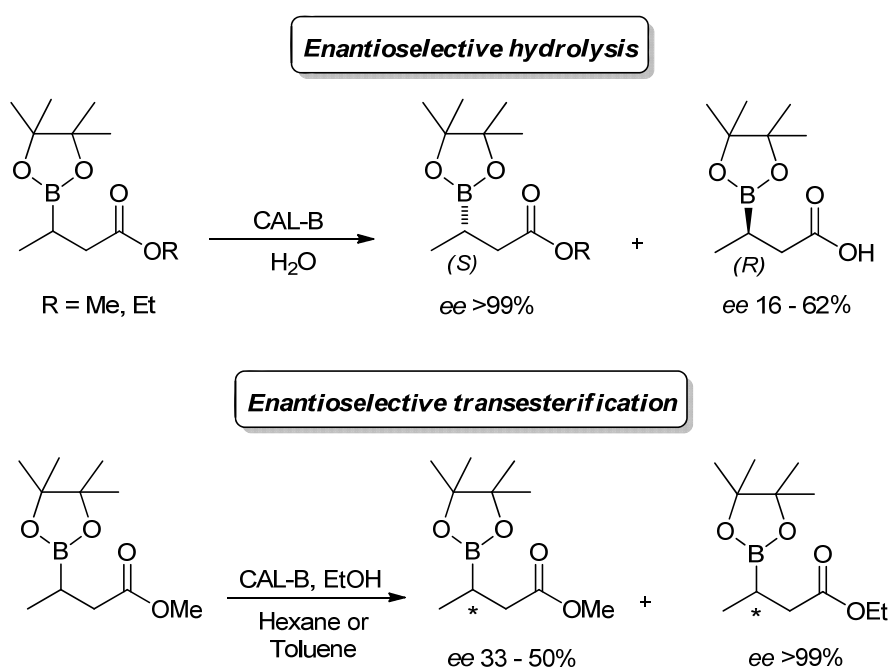


Palavras-chave: organoboro, lipase, transaminase, hidrólise, éster, amina.

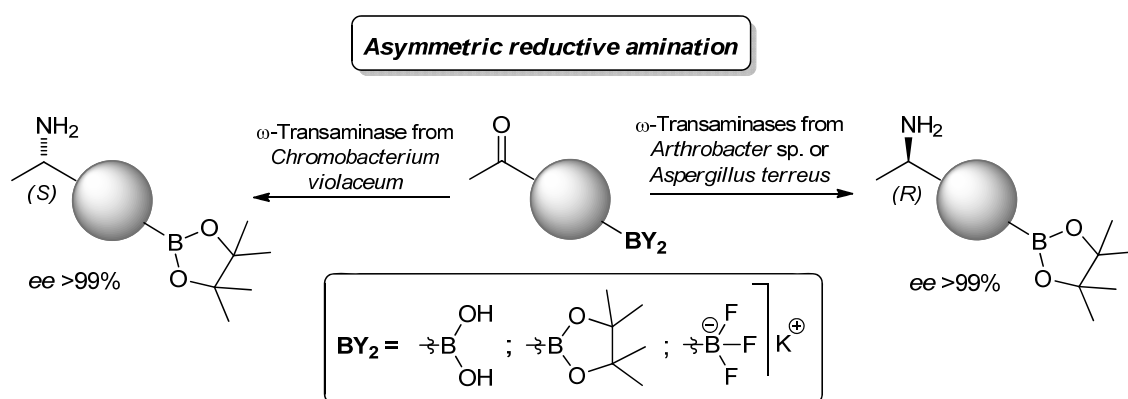
ABSTRACT

Reis, J. S. **Study of application of lipases and transaminases as catalysts in the synthesis of chiral organoboron compounds.** 2013. 150p. PhD Thesis - Graduate Program in Chemistry. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

In this work, the kinetic resolution of β -borylated carboxylic esters via lipase-catalyzed hydrolysis and transesterification reactions was evaluated. Esteres with different carbon chains were synthesized. The enantioselective hydrolysis catalyzed by CAL-B furnished the corresponding β -borylated carboxylic acid with reasonable enantiomeric excess (*ee* 62%), while both methyl and ethyl β -borylated carboxylic esters were recovered with excellent enantiomeric purity (*ee* >99%). The enantioselective transesterification reaction of β -borylated carboxylic esters and several alcohols, catalyzed by CAL-B, only indicated a high selectivity when ethanol and methyl-(β -pinacolylboronate)-butanoate were used as substrates, which gave the enantioenriched ethyl-(β -pinacolylboronate)-butanoate (*ee* >99%). However, esters with longer carbon chains or steric hindrance at the carboxyl group did not undergo the desired reactions, even at high temperatures.



Additionally, the asymmetric reductive amination ω -transaminase-catalyzed of boron-containing (acid, ester or potassium trifluoroborate) prochiral ketones was investigated. After the syntheses of aromatic and aliphatic ketones, the best results of biotransformation were obtained with (*R*)-selective ω -transaminases from *Arthrobacter* sp. and *Aspergillus terreus* and (*S*)-selective one from *Chromobacterium violaceum*. Under the optimized conditions, high conversions (94%) with perfect enantioselectivities (*ee* >99%) were found, providing a new access to (*R*) or (*S*) boron-containing amines under mild reaction conditions.



Keywords: organoboron, lipase, transaminase, hydrolysis, ester, amine.

Lista de Siglas e Abreviaturas

$[\alpha]_D$	rotação específica
AlaDH	alanina desidrogenase
ANL	lipase de <i>Aspergillus niger</i>
Asp	aspartato
BCL	lipase de <i>Burkholderia cepacia</i>
BINAP	[2,2'-bis(difenilfosfino)-1,1'-binaftil]
°C	graus Celsius
CAL-B	lipase de <i>Candida antarctica</i> (fração B)
CAN	nitrato de cério e amônio
CCD	cromatografia de camada delgada
CCL	lipase de <i>Candida cylindracea</i>
CG	cromatografia gasosa
CG-EM	cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa
CLAE	cromatografia líquida de alta eficiência
Cp	ciclopentadienila
CRL	lipase de <i>Candida rugosa</i>
d	dubleto
δ	deslocamento químico
DCM	diclorometano
dd	duplo dubleto
DME	dimetoxietano
DMF	dimetilformamida
DMSO	dimetilsulfóxido
DPEphos	(oxidi-2,1-fenileno)bis(difenilfosfina)
dt	duplo tripleto
e.e.	excesso enantiomérico
EMAR	espectroscopia de massas de alta resolução
ESI	ionização por elétron-spray
FDH	formato desidrogenase

GDH	glucose desidrogenase
Gln	glutamina
GRE	grupo retirador de elétrons
h	horas
His	histidina
IV-TF	espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier
<i>J</i>	constante de acoplamento
kPa	Pascal x 10 ³
LDH	lactato desidrogenase
Lys	lisina
m	multipeto
<i>m/z</i>	relação massa/carga
M ⁺	íon molecular
MHz	Hertz x 10 ⁶
min	minutos
MJL	lipase de <i>Mucor javanicus</i>
mM	mol x 10 ⁻³ por litro
MML	lipase de <i>Mucor miehei</i>
NADH	dinucleotídeo de nicotinamida e adenina
NBS	<i>N</i> -bromossuccinimida
nm	nanômetro
PCL	lipase de <i>Pseudomonas cepacia</i>
p.f.	ponto de fusão
PFL	lipase de <i>Pseudomonas fluorescens</i>
pin	pinacol
PLE	esterase de pâncreas suíno
PLP	piridoxal-5'-fosfato
PMP	piridoxamina fosfato
PPL	lipase de pâncreas suíno
ppm	partes por milhão
PSC-II	lipase de <i>Pseudomonas cepacia</i> (imobilizada em cerâmica)

PSD-I	lipase de <i>Pseudomonas cepacia</i> (imobilizada em diatomita)
Py	piridina
q	quarteto
<i>rac</i>	racêmico
RCD	resolução cinética dinâmica
RCE	resolução cinética enzimática
RMN ¹³ C	ressonância magnética nuclear de carbono treze
RMN ¹ H	ressonância magnética nuclear de hidrogênio
rpm	rotações por minuto
s	singleto
Ser	serina
t	triplete
t.a.	temperatura ambiente
TBD	1,5,7-triazabicyclo[4.4.0]dec-5-eno
TBME	terbutilmetiléter
TEA	triethylamina
THF	tetraidrofurano
Thr	treonina
TMS	trimetilsilila
<i>t_R</i>	tempo de retenção
UV	ultravioleta

Sumário

1- INTRODUÇÃO.....	16
1.1 - Enzimas e a catálise enzimática.....	16
1.2 - Compostos de boro.....	21
2- OBJETIVOS.....	28
3- RESOLUÇÃO CINÉTICA DE ÉSTERES CARBOXÍLICOS β-BORILADOS...	30
3.1 - Lipases.....	30
3.2 - Resultados e Discussão.....	40
3.2.1 - Síntese dos ésteres carboxílicos β -borilados.....	40
3.2.2 - Análises de separação enantiomérica.....	45
3.2.3 - Reações de hidrólise enantiosseletiva mediadas por lipase...	49
3.2.4 - Reações de transesterificação enantiosseletiva mediadas por lipase.....	60
4- AMINAÇÃO REDUTIVA ASSIMÉTRICA DE CETONAS CONTENDO BORO CATALISADA POR ω-TRANSAMINASES.....	65
4.1 - Transaminases.....	65
4.2 - Resultados e Discussão.....	78
4.2.1 - Preparação de cetonas aromáticas contendo grupos borônicos.....	78
4.2.2 - Preparação de cetonas alifáticas contendo éster borônico.....	80
4.2.3 - Reações de aminação redutiva catalisada por ω -transaminase.....	85
5- CONCLUSÃO.....	100
6- PARTE EXPERIMENTAL.....	102
6.1 - Materiais e métodos.....	102
6.2 - Procedimentos experimentais.....	106
6.3 - Dados analíticos.....	116
7- ESPECTROS SELECIONADOS.....	125
8- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	139

1. INTRODUÇÃO

1.1 – Enzimas e a catálise enzimática

As enzimas são proteínas presentes no ambiente interno e externo das células. Estas macromoléculas são responsáveis pela catálise das mais diversas reações químicas que acontecem nos organismos vivos. Dentre os processos vitais onde a atuação das enzimas é fundamental está o ciclo do ácido cítrico ou ciclo de Krebs, onde uma série de reações químicas são promovidas graças a presença destes catalisadores naturais, promovendo o metabolismo celular.¹

Há milhares de anos enzimas são utilizadas na transformação e obtenção de produtos de interesse, sobretudo alimentos como pães e queijos e bebidas alcoólicas. Naturalmente, nestas épocas mais distantes do nosso contemporâneo, o conhecimento sobre tais processos era essencialmente empírico. Já nos séculos XVIII e XIX, a biocatálise receberia uma base mais científica, devido a estudos de cientistas como Jöns Jacob Berzelius, Theodor Schwann, Justus von Liebig, Louis Pasteur e Emil Fischer.² Somente a partir do século XX pesquisadores atentaram para questões de enantiosseletividade e empregos de meios orgânicos para a realização de reações enzimáticas.³

Tais biocatalisadores podem ser obtidos de células de fungos, bactérias, leveduras, plantas e animais e, de acordo com a transformação que são capazes de realizar, são classificados em seis diferentes classes pela União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular (Tabela 1.1.1).

¹ Nelson, D. L.; Cox, M. M. *Lehninger Principles of Biochemistry*, 3rd Ed., Worth Publishers, New York, USA, **2000**.

² Ghanem, A. *Tetrahedron* **2007**, 62, 1721-1754.

³ (a) Dakin, H. D. *Proc. Chem. Soc., London* **1903**, 161; (b) Dakin, H. D. *J. Physiol.* **1904**, 30, 253-263; (c) Sym, E. A. *Biochem. J.* **1936**, 30, 609-617.

Tabela 1.1.1 – Classificação das enzimas

Classe	Tipo de Reação Catalisada	Exemplos
Oxidoredutases (E.C. 1)	Reações de redução e oxidação por transferência de hidrogênio, oxigênio e/ou elétrons entre moléculas	Desidrogenases, oxidases, oxigenases, peroxidases
Transferases (E.C. 2)	Transferência de determinados grupos orgânicos, tais como amino, acetil, fosforil, glicosil, de determinado doador a um aceptor	Aminoácido transaminases
Hidrolases (E.C. 3)	Clivagem hidrolítica de ligações C-O, C-N, C-C.	Lipases, acilases, nitrilases, amidases, proteases
Liasas (E.C. 4)	Clivagem por eliminação (formação de dupla ligação) ou adição a duplas ligações	Aldolases, oxinitrilases, hidroxinitrila liases
Isomerases (E.C. 5)	Catalisam reações de isomerização e racemização	Sintetases, glicina ligase
Ligases (E.C. 6)	Catalisam a junção covalente de duas moléculas à custa de ATP	Racemases, glicose isomerase

Do ponto de vista catalítico, as enzimas fornecem um caminho reacional diferente, de menor energia, aumentando assim a velocidade das reações. (Figura 1.1.1). Grande parte do poder catalítico das enzimas ocorre por elas promoverem, através da formação de um complexo enzima-substrato, a aproximação dos substratos em orientações favoráveis a transformações específicas.⁴

Enzimas podem ser usadas como catalisadores em reações químicas tanto na forma isolada quanto fazendo parte de microorganismos vivos. As razões pelas quais as enzimas são amplamente usadas em síntese estereosseletiva são inúmeras. Elas são catalisadores muito eficientes,

⁴ (a) Silverman R. B. *The Organic Chemistry of Enzyme-Catalyzed Reactions*, Academic Press: San Diego, **2002**; (b) Bommarius, A. S.; Riebel, B. R. *Biocatalysis*, WILEY-VHC: Wienhein, **2004**; (c) Faber, K. *Biotransformations in Organic Chemistry*, Springer-Verlag, Berlin, 5th Ed., **2004**; (d) Aledo, J. C.; Lobo, C.; Valle, A. E. D. *Biochem. Mol. Biol. Educ.* **2003**, 31, 234-236;

podendo ser empregadas em concentrações de porcentagem molar menores quando comparadas com catalisadores químicos, além disso, as enzimas são biodegradáveis e, em alguns casos as transformações podem ocorrer em meio aquoso, evitando o uso de solventes poluentes. Outro fator favorável às enzimas são as brandas condições em que elas atuam; pH entre 5 e 8 – tipicamente 7 – e temperaturas entre 20 e 40 °C. Por fim, a tolerância enzimática a substratos não-naturais faz com que o processo enzimático seja aplicado às mais diversas classes de compostos químicos. Esta última característica é conhecida como promiscuidade catalítica.

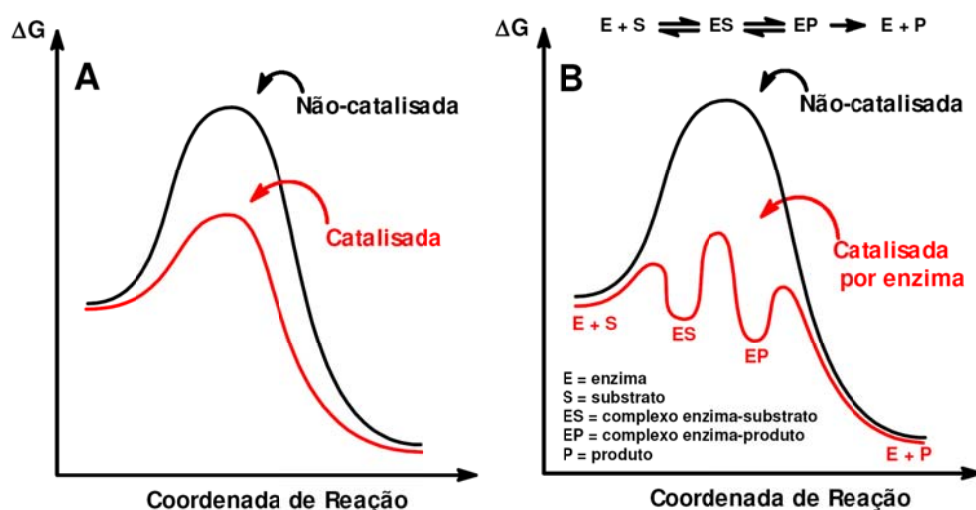


Figura 1.1.1 – Efeito de um catalisador químico (A) e de uma enzima (B) na energia de ativação.^{4a}

No que tange a seletividade, as enzimas possuem um importante papel, podendo ser quimiosseletivas, regiosseletivas, e/ou enantiosseletivas, ou seja, possuem a habilidade de diferenciar grupos funcionais, diferenciar grupos funcionais iguais presentes na mesma estrutura molecular e reconhecer enantiômeros. Como a enzima é quiral, para que um processo biocatalítico seja altamente estereosseletivo, o substrato precisa estar adequadamente

posicionado no sítio ativo da enzima. Assim sendo, ao reagir com um racemato, as barreiras potenciais terão diferentes magnitudes para cada isômero óptico. Em outros termos, este reconhecimento enantiomérico da enzima é originado da diferença de energia ($\Delta\Delta G$) entre os estados de transição diastereoisoméricos que originarão os complexos enzima-substrato.^{4c} Em uma reação com uma enzima **E** e um substrato racêmico **S** podem ser formados dois complexos enzima-substrato: um deles referente ao enantiômero (*S*), de energia ΔG_S e outro com o enantiômero (*R*), de energia ΔG_R . A diferença de energia ($\Delta\Delta G$) entre os dois complexos é diretamente proporcional a enantiosseletividade da biotransformação, ou seja, quanto maior for esta diferença energética, maior será a diferença na velocidade de formação dos produtos **P** provenientes dos enantiômeros (*S*) ou (*R*). A figura 1.1.2 ilustra uma situação onde o enantiômero (*S*) de um composto reage com a enzima preferencialmente ao enantiômero (*R*).

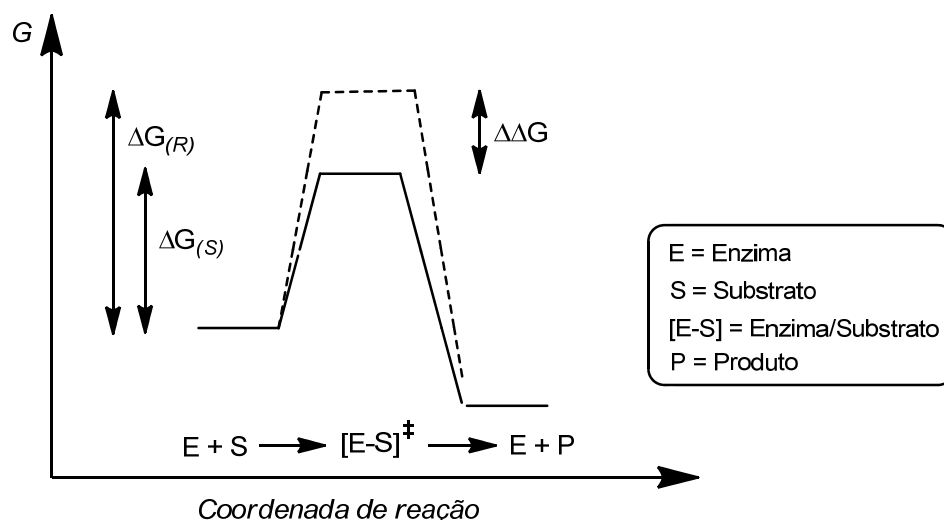


Figura 1.1.2 – Perfil energético de uma reação mostrando a enantiosseletividade enzimática. $\Delta G_{(S)}$ e $\Delta G_{(R)}$ correspondem à energia de formação do complexo enzima-substrato com os enantiômeros (*S*) e (*R*), respectivamente

As enzimas podem ser usadas em meio aquoso ou orgânico, porém, em termos de química orgânica sintética, geralmente tem-se a preferência pelo uso

de solventes orgânicos. Como razões para esta preferência, temos: a maioria dos solventes orgânicos possui um ponto de ebulição menor do que a água, isto facilita a sua remoção do meio reacional e evita reações paralelas indesejadas; substratos apolares podem ser submetidos a catálise enzimática; a imobilização da enzima se torna opcional, uma vez que ela pode ser separada do meio orgânico por simples filtração; a denaturação das enzimas é minimizada; o equilíbrio termodinâmico está deslocado no sentido da síntese, e não de uma eventual hidrólise. Ainda tem-se que a maioria dos substratos usados em química orgânica sintética são amplamente solúveis em solventes orgânicos. Assim sendo, o emprego de enzimas na química sintética colaborou muito no desenvolvimento de novas metodologias e na obtenção de moléculas opticamente ativas. Sistemas menos agressivos a natureza bem como condições reacionais mais brandas também puderam ser implantados valendo-se de rotas enzimáticas.⁵

A obtenção de substâncias enantiomericamente puros ou enriquecidos representa um desafio para a comunidade científica, e é justamente neste cenário que a biocatálise tem se destacado nos últimos anos tanto na academia quanto na indústria.⁶ Como a atividade biológica de uma substância está frequentemente relacionada com sua pureza óptica, há um grande interesse – sobretudo na indústria farmacêutica – em substituir drogas em sua forma racêmica por seus derivados enantiopuros.⁷

⁵ (a) Wohlgemuth, R. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **2007**, 82, 1055-1062; (b) Aehle, W. *Enzymes in Industry: Production and Applications*, Wiley-VCH Verlag GmbH: Weinheim, **2007**.

⁶ (a) Pollard, D. J.; Woodley, J. M. *Trends Biotechnol.* **2006**, 25, 66-73; (b) Schmid, A.; Dordick, J. S.; Hauer, B.; Kiener, A.; Wubbolts, M.; Witholt, B. *Nature*, **2001**, 409, 258-268;

⁷ (a) Stinson, S. C. *Chem. Eng. News* **2001**, 79, 79-97. (b) Breuer, M.; Ditrich, K.; Habicher, T.; Hauer, B.; Kesseler, M.; Stürmer, R.; Zelinski, T. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, 43, 788-824; (c) Carey, J. S.; Laffan, D.; Thomson, C.; Williams, M. T. *Org. Biomol. Chem.* **2006**, 4, 2337-2347; (d) Para excelente revisão, ver volume especial de enzimas em síntese: *Chem. Rev.* **2011**, 111, 3995-4404.

1.2 – Compostos de boro

Compostos contendo átomos de boro vem recebendo uma grande atenção da comunidade científica devido a versatilidade destas moléculas na obtenção de intermediários sintéticos. Tais compostos podem ser empregados em diferentes tipos de reações químicas e, geralmente, são utilizados na forma de ácidos, ésteres borônicos ou ainda como organotrifluoroboratos de potássio.⁸ Além disso, as propriedades químicas do boro fazem com que moléculas contendo este átomo possam apresentar atividade biológica. O boro possui uma hibridização sp^2 com disposição de um orbital p vazio, assim, compostos de boro são ácidos de Lewis com propriedades únicas, possuindo um amplo espectro de reatividade. Estes compostos são estáveis, de fácil manuseio, pouco tóxicos e seu produto de degradação é o ácido bórico, o qual pode ser considerado um composto ambientalmente não agressivo.⁹

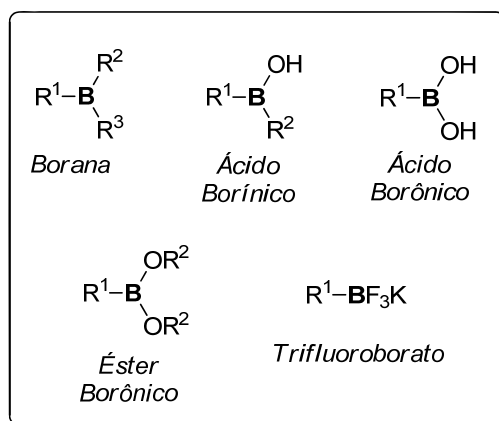


Figura 1.2.1 – Compostos orgânicos de boro.

⁸ (a) Hall, D. G. *Boronic Acids: Preparation, Applications in Organic Synthesis and Medicine*; Wiley-VCH: Weinheim, Germany, **2005**; (b) Stefani, H. A.; Cella, R.; Vieira, A. S. *Tetrahedron* **2007**, 63, 3623-3658; (c) Darses, S.; Genet, J. P. *Chem. Rev.* **2008**, 108, 288-325; (d) Molander, G. A.; Figueroa, R. *Adrichim. Acta* **2005**, 38, 49-56.

⁹ Molander, G. A.; Felix, L. A. *J. Org. Chem.* **2005**, 70, 3950-3956 e referências citadas;

A síntese do primeiro composto orgânico de boro, o ácido etilborônico, é datada de 1860¹⁰, entretanto, somente após um período de mais de um século esta classe de compostos despertaria um interesse na comunidade científica. A reação de hidroboração desenvolvida por Herbert C. Brown e Subba Rao¹¹ trouxe grande contribuição para a química orgânica sintética representando uma das principais metodologias na obtenção de compostos de boro.¹² A hidroboração de olefinas terminais ocorre de maneira anti-Markovnikov e, após oxidação, leva a formação do correspondente álcool. Agindo de maneira similar, a hidroboração de alcinos terminais origina compostos vinilborônicos de configuração (*E*) com alta estereosseletividade. No caso de alcinos internos, a reação leva à formação de mistura de regioisômeros. Para realizar a hidroboração pode-se utilizar uma diversidade de boranas como pinacolborana, catecolborana, dicianoborana, entre outras (Esquema 1.2.1).¹³

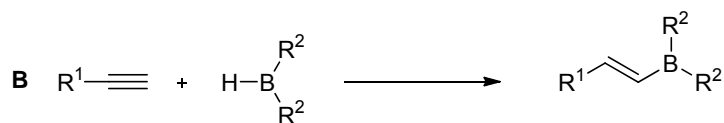
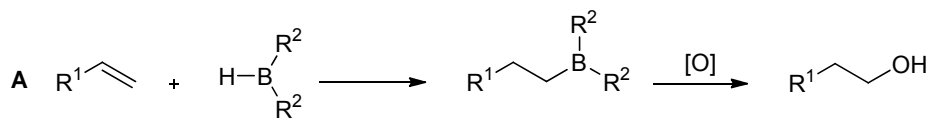
Ácidos arilborônicos e vinilborônicos podem ser preparados a partir dos correspondentes reagentes de organolítio ou de Grignard. A reação entre os reagentes organometálicos e trialkylboratos, com subsequente hidrólise do éster formado leva a formação dos ácidos borônicos de maneira relativamente simples (Esquema 1.2.2). Em paralelo, a esterificação de ácidos borônicos com dióis é de fácil realização. A síntese do éster borônico é favorecida pela remoção da água formada, sendo este processo realizado através de uma destilação azeotrópica ou através do uso de agentes desidratantes como MgSO₄. A formação do éster borônico também implica na prevenção do processo de trimerização do ácido borônico, evitando a geração de boroxinas.

¹⁰ Frankland, E.; Duppa, B. F. *Justus Liebigs Ann. Chem.* **1860**, 115, 319-322.

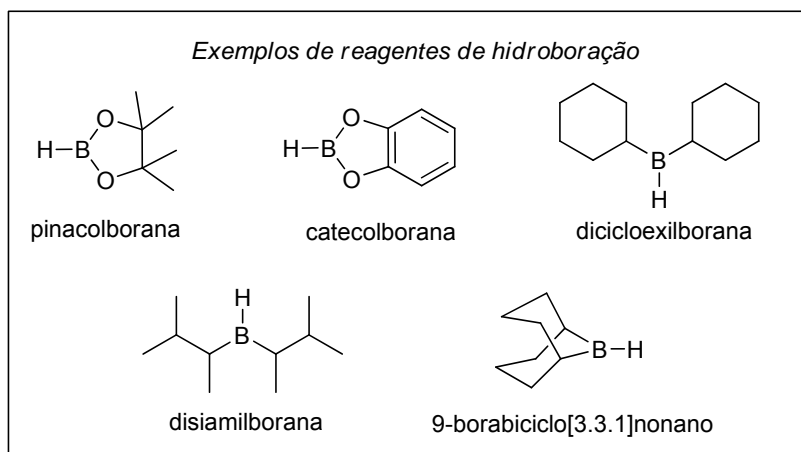
¹¹ Brown, H. C.; Rao, B. C. S. *J. Am. Chem. Soc.* **1956**, 78, 5694-5695.

¹² Ramachandran, P. V. *Aldrichim. Acta* **2002**, 35, 23-35.

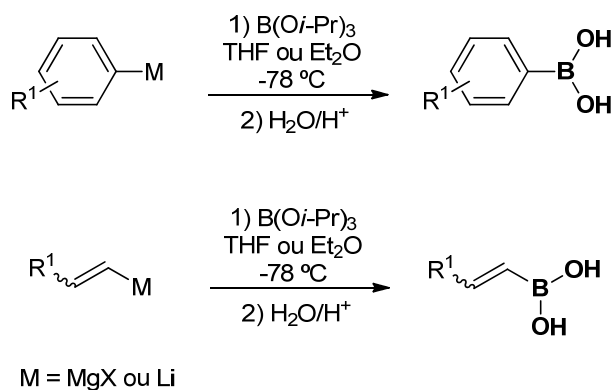
¹³ (a) Brown, H. C. *Tetrahedron* **1961**, 12, 117-138; (b) Brown, H. C.; Lane, C. F. *J. Am. Chem. Soc.* **1970**, 92, 6660-6661; (c) Allred, E. L.; Sonnenberg, J.; Winstein, S. *J. Org. Chem.* **1960**, 25, 26-29; (d) Dhillon, R. S. *Hydroboration and Organic Synthesis*, Springer-Verlag, Berlin, Germany, **2007**.



R^1 = alquila ou arila



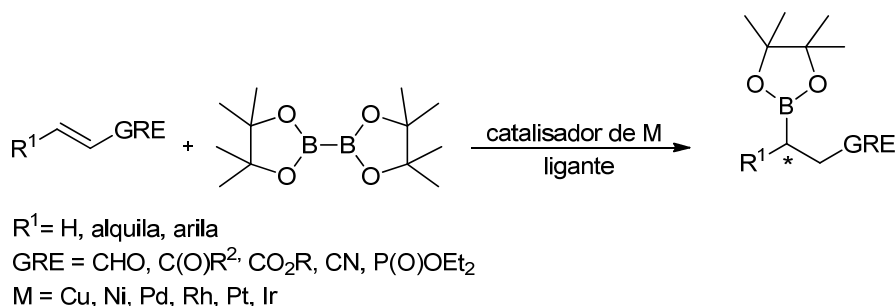
Esquema 1.2.1 – Esquema geral de reação de hidroboração de alcenos (**A**) e alcinos (**B**).



Esquema 1.2.2 – Metodologia para preparo de ácidos aril e vinilborônicos.

Outro método empregado para a obtenção de ésteres arilborônicos é a borilação de Miyaura, a qual consiste no acoplamento entre a bis(pinacolato)diborana (B_2pin_2) e haletos ou triflatos arílicos catalisado por

paládio.¹⁴ No que se refere a borilação de substratos alquílicos, nos últimos anos tem destacado-se a adição do tipo Michael de grupo borônico a sistemas α,β -insaturados. A metodologia trata-se de uma catálise metálica na geração de uma espécie nucleofílica de boro e, dependendo do ligante utilizado, pode ser realizada de maneira estereosseletiva (Esquema 1.2.3).¹⁵



Esquema 1.2.3 – Adição conjugada de grupo borônico.

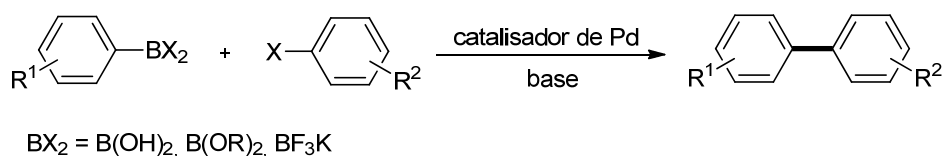
Do ponto de vista sintético, o emprego de compostos orgânicos de boro já se encontra bem estabelecido. Esses compostos são principalmente utilizados em reações de acoplamento do tipo Suzuki-Miyaura,¹⁶ onde são empregados na forma de ácidos organoborônicos e seus análogos ésteres, e mais recentemente organotrifluoroboratos, na formação de novas ligações carbono-carbono. A reação é catalisada por complexos de paládio mediando o acoplamento entre as espécies organoborônicas e uma variedade de reagentes contendo centro eletrofílico (Esquema 1.2.4). Devido à versatilidade desta

¹⁴ (a) Ishiyama, T.; Murata, M.; Miyaura, N. *J. Org. Chem.* **1995**, *60*, 7508-7510; (b) Ishiyama, T.; Itoh, Y.; Kitano, T.; Miyaura, N. *Tetrahedron Lett.* **1997**, *38*, 3447-3450.

¹⁵ (a) Mun, S.; Lee, J.-E.; Yun, J. *Org. Lett.* **2006**, *8*, 4887-4889; (b) Lee, J.-E.; Yun, J. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 145-147; (c) Lillo, V.; Geier, M. J.; Westcott, S. A.; Fernández, E. *Org. Biomol. Chem.* **2009**, *7*, 4674-4676; (d) Fleming, W. J.; Müller-Bunz, H.; Lillo, V.; Fernández, E.; Guiry, P. J. *Org. Biomol. Chem.* **2009**, *7*, 2520-2524; (e) Lillo, V.; Prieto, A.; Bonet, A.; Díaz-Requejo, M. M.; Ramírez, J.; Pérez, P. J.; Fernández, E. *Organometallics* **2009**, *28*, 659-662; (f) Chen, I.-H.; Yin, L.; Itano, W.; Kanai, M.; Shibasaki, M. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 11664-11665; (g) Chen, I.-H.; Kanai, M.; Shibasaki, M. *Org. Lett.* **2010**, *12*, 4098-4101.

¹⁶ (a) Martin, R.; Buchwald, S. L. *Acc. Chem. Rev.* **2008**, *41*, 1461-1473; (b) Molander, G. A.; Ellis, N. *Acc. Chem. Rev.* **2007**, *40*, 275-286; (c) Miyaura, N.; Suzuki, A. *Chem. Rev.* **1995**, *95*, 2457-2483; (d) Bellina, F.; Carpita, A.; Rossi, R. *Synthesis* **2004**, *15*, 2419-2440; (e) Kotha, S.; Lahiri, K.; Kashinath, D. *Tetrahedron* **2002**, *58*, 9633-9695.

reação e sua aplicabilidade inclusive no âmbito industrial, Akira Suzuki foi laureado com o prêmio Nobel de química no ano de 2010. Os pesquisadores Richard Heck e Ei-ichi Negishi compartilharam o Nobel do mesmo ano por suas contribuições em reações de acoplamento catalisadas por paládio.¹⁷



Esquema 1.2.4 – Reação de acoplamento do tipo Suzuki-Miyaura.

Compostos orgânicos de boro podem ser utilizados para síntese de aminoácidos não-naturais,¹⁸ reações de Diels-Alder,¹⁹ homologação de cadeia carbônica,²⁰ redução enantiosseletiva de cetonas e aldeídos.²¹ Devido a labilidade da ligação C-B, substratos borilados podem ser transformados em álcoois, cetonas, aldeídos, haletos e aminas.²² Estas transformações ocorrem com retenção de configuração (Esquema 1.2.5)

¹⁷ (a) Seechurn, C. C. C. J.; Kitching, M. O.; Colacot, T. J.; Snieckus, V. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, 51, 5062-5085 e referências citadas; (b) Negishi, E. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, 50, 6738-6764; (c) Suzuki, A. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, 50, 6722-6737.

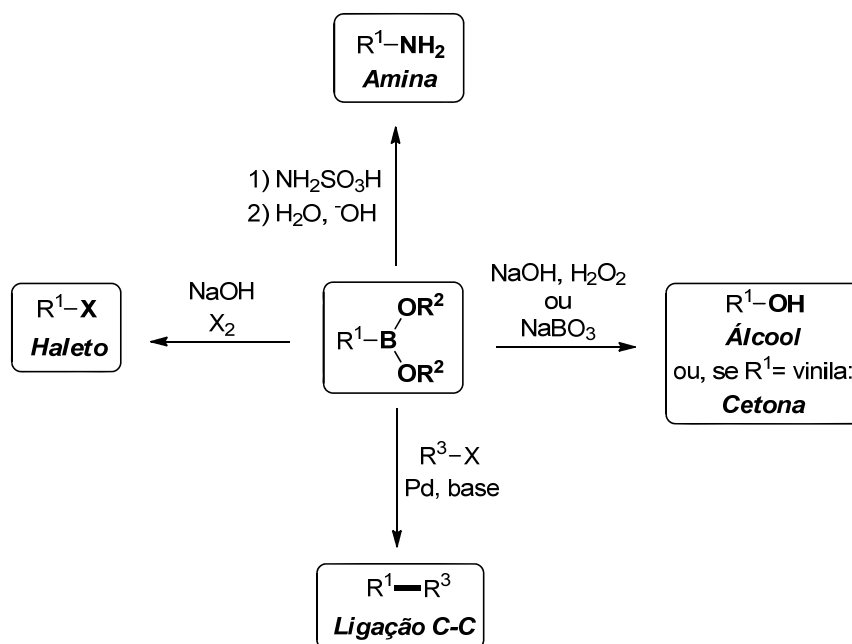
¹⁸ Petasis, N. A.; Zavialov, I. A. *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, 119, 445-446.

¹⁹ Ishihara, K.; Yamamoto, H. *Eur. J. Org. Chem.* 1999, 119, 527-538.

²⁰ Matteson, D. S. *J. Org. Chem.* **2013**, 78, 10009-10023.

²¹ Yu, H.; Wang, B. *Synth. Commun.* **2001**, 31, 2719-2725.

²² Morrill, C.; Funk, T. W.; Grubbs, R. H. *Tetrahedron Lett.* **2004**, 45, 7733-7736.



Esquema 1.2.5 – Transformações na ligação C-B.

Nos últimos anos, nosso grupo de pesquisa vem contribuindo com estudos acerca da obtenção de compostos quirais contendo boro valendo-se de rotas enzimáticas.²³ Dentre as metodologias empregadas destaca-se a resolução cinética enzimática de álcoois e aminas contendo boro, mediada por lipase, a biorredução de cetonas contendo boro e a oxidação de substratos organoborônicos catalisada por Baeyer-Villiger monooxigenases.

Paralelamente, compostos de boro vêm sendo estudados como potenciais agentes farmacológicos. O primeiro fármaco comercial contendo a função ácido borônico em sua estrutura é o bortezomibe (Velcade®), um agente anticâncer, inibidor do proteassomo 20S (Figura 1.2.2).²⁴

²³ (a) Andrade, L. H.; Barcellos, T. *Org. Lett.* **2009**, 14, 3052-3055; (b) Andrade, L. H.; Barcellos, T.; Santiago, C. G. *Tetrahedron: Asymmetry* **2010**, 21, 2419-2424; (c) Barcellos, T.; Andrade, L. H.; Tauber, K.; Kroutil, W. *Tetrahedron: Asymmetry* **2011**, 22, 1772-1777; (d) Brondani, P. B.; de Gonzalo, G.; Fraaije, M. W.; Andrade, L. H. *Adv. Synth. Catal.* **2011**, 353, 2169-2173; (e) Brondani, P. B.; Dudek, H.; Reis, J. S.; Fraaije, M. W.; Andrade, L. H. *Tetrahedron: Asymmetry* **2012**, 23, 703-708.

²⁴ (a) Teicher, B. A.; Ara, G.; Herbst, R.; Palombella, V. J.; Adams, J. *Clin. Cancer Res.* **1999**, 5, 2638-2645; (b) Myung, J.; Bokim, K.; Crews, C. M. *Med. Res. Rev.* **2001**, 21, 245-273; (c) Nalepa, G.; Rolfe, M.; Harper, J. W. *Nat. Rev. Drug. Discov.* **2006**, 5, 596-613.

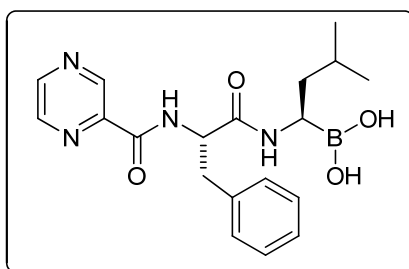


Figura 1.2.2 – Estrutura do Bortezomibe (Velcade®).

Ainda dentro deste contexto, vale citar a empresa americana *Anacor Pharmaceuticals*, que nos últimos anos vem atuando na pesquisa e desenvolvimento de compostos contendo boro de potencial atividade biológica, principalmente antifúngicas e anti-inflamatórias.²⁵ Alguns exemplos de compostos desenvolvidos pela empresa e suas aplicações estão mostrados na figura 1.2.3.

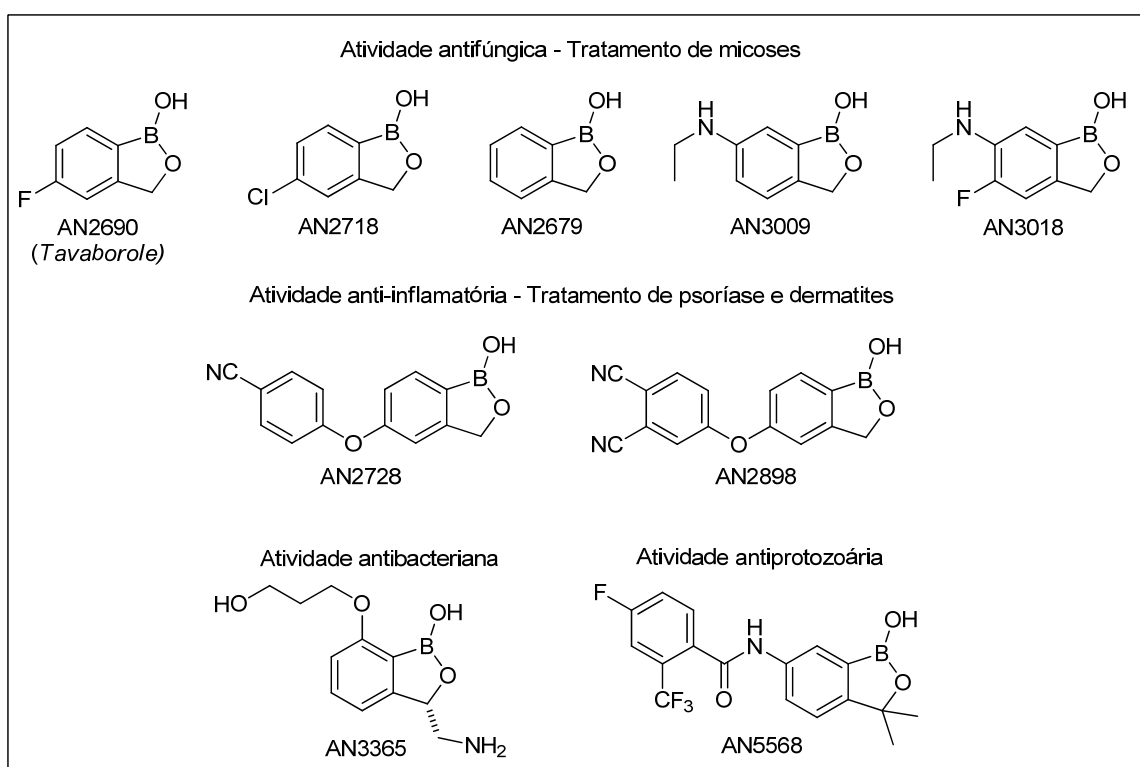


Figura 1.2.3 – Compostos contendo boro que exibem atividade biológica.

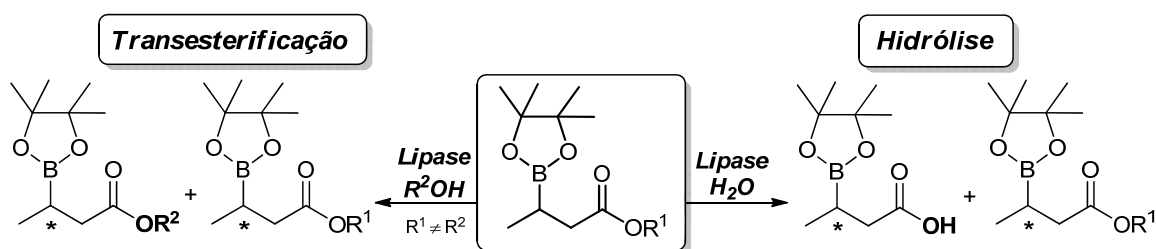
²⁵ Anacor Pharmaceuticals (www.anacor.com) acessado em 09 de outubro de 2013.

2. OBJETIVOS

Conforme já mencionado, compostos orgânicos de boro se apresentam como interessantes intermediários sintéticos devido a reatividade do átomo de boro. Nos últimos anos, estudos envolvendo transformações quirais ou enantiosseletivas em moléculas contendo boro figuram como alvo da comunidade científica, ainda que compostos de boro venham sendo pesquisados já há algumas décadas.

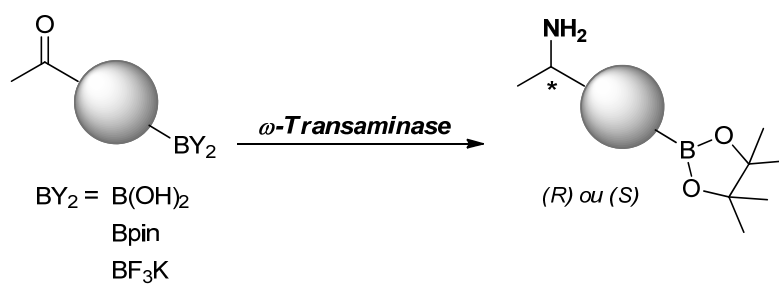
Dessa forma, o principal objetivo do estudo realizado durante o doutorado, e apresentado na tese, foi estudar a aplicação de reações químicas catalisadas por enzimas na transformação de compostos contendo o átomo de boro em sua estrutura, ampliando assim o emprego da biocatálise na busca de substratos enantiomericamente puros ou enriquecidos.

Para isso, foi proposta a síntese de ésteres carboxílicos contendo o grupamento borônico na posição beta para posterior avaliação de reações de hidrólise e transesterificação catalisada por lipases. Em outros termos, nesta parte do trabalho almejou-se o desenvolvimento de uma resolução cinética enzimática de ésteres β -borilados através de uma hidrólise ou transesterificação enantiosseletiva.



Esquema 2.1 – RCE de ésteres carboxílicos β -borilados via hidrólise ou transesterificação catalisada por lipase.

Paralelamente, foi proposta a síntese de cetonas pró-quirais contendo boro para serem avaliadas como substratos em reações de aminação reductiva assimétrica catalisadas por transaminases.



Esquema 2.2 – Aminoação reductiva assimétrica de cetonas pró-quirais contendo boro catalisada por *ω*-transaminases.

3. RESOLUÇÃO CINÉTICA ENZIMÁTICA DE ÉSTERES CARBOXÍLICOS β -BORILADOS

3.1. Lipases

Lipases são as enzimas mais utilizadas em biocatálise sendo um dos mais vantajosos e versáteis métodos biocatalíticos em síntese assimétrica.²⁶ Estas enzimas possuem a habilidade de converter com alta regio e enantiosseletividade uma ampla variedade de substratos.^{4c,27} Na maioria dos casos, as lipases atuam na obtenção de álcoois opticamente puros, ou enriquecidos, a partir de suas misturas racêmicas se valendo de reações de transesterificação em solventes orgânicos. Em outros termos, de maneira geral as lipases permitem a resolução de substratos orgânicos com eficiência e seletividade.²⁸ Além disso, as lipases não requerem o uso de co-fatores, podem ser recicladas e podem ser usadas nas formas livre ou imobilizada. Soma-se a estas características o fato de serem enzimas biodegradáveis, respeitando assim o conceito de “química verde”. Estes atributos supracitados fazem com que tais biocatalisadores tornem-se atrativos para as indústrias farmacêutica e agroquímica, onde é constante a busca por compostos enantiomericamente puros.²⁹

²⁶ (a) Schmid, R. D.; Verger, R. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, 37, 1608-1633; (b) Theil, F. *Chem. Rev.* **1995**, 95, 2203-2227; (c) Koeller, K. M.; Wong, C. H. *Nature* **2001**, 409, 232-240; (d) Carrea, G.; Riva, S. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, 39, 2226-2254; (e) Ghanem, A.; Aboul-Enein, H. Y. *Chirality* **2005**, 17, 1-15; (f) Yang, H.; Henke, E.; Bornscheuer, U. T. *J. Org. Chem.* **1999**, 64, 1709-1712.

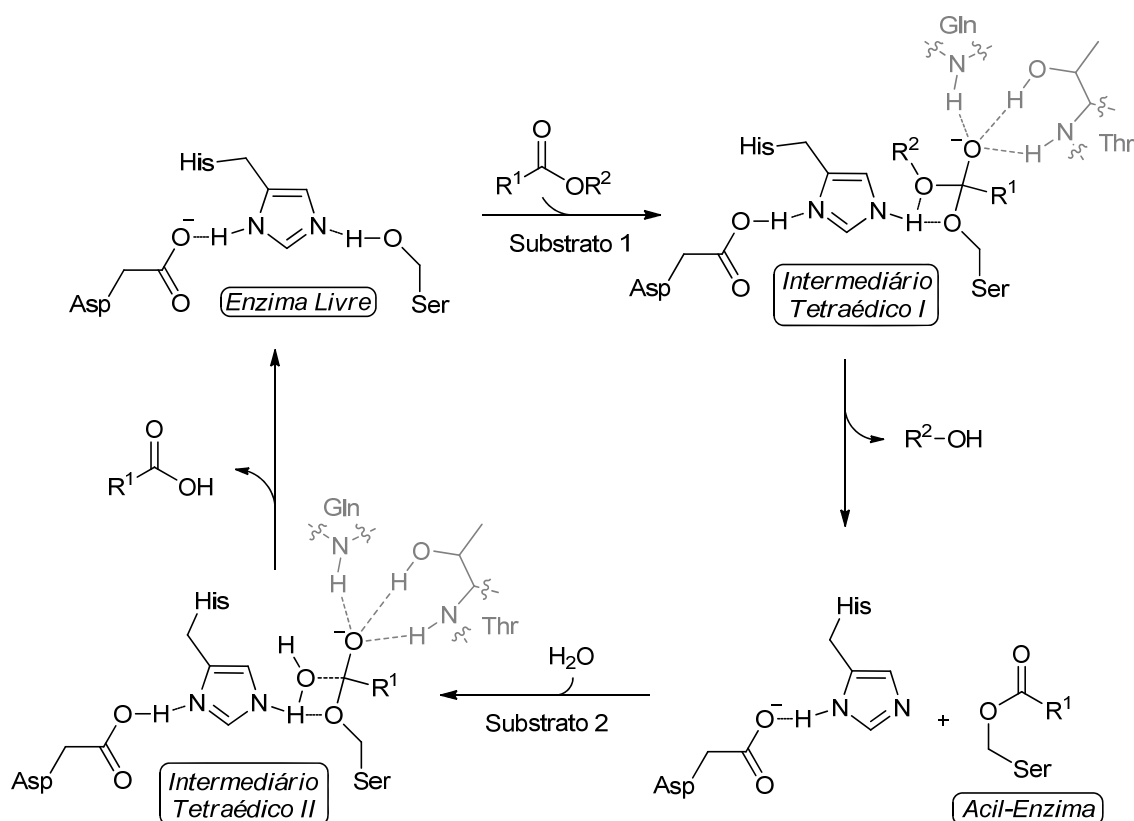
²⁷ (a) Bornscheuer, U. T.; Kazlauskas, R. J. *Hydrolases in Organic Synthesis*, Wiley-VHC, Weinheim, 2nd Ed., **2006**. (b) Jurček, O.; Wimmerová, M.; Wimmer, Z. *Coord. Chem. Rev.* **2008**, 252, 767-781.

²⁸ (a) Milner, S. E.; Brossat, M.; Moody, T. S.; Elcoate, C. J.; Lawrence, S. E.; Maguire, A. R. *Tetrahedron: Asymmetry* **2010**, 21, 1011-1016; (b) Brossat, M.; Moody, T. S.; de Nanteuil, F.; Taylor, S. J. C.; Vaughan, F. *Org. Proc. Res. Dev.* **2009**, 13, 706-709.

²⁹ (a) Wolfenden, R.; Snider, M. J. *Acc. Chem. Res.* **2001**, 34, 938-945; (b) Brossat, M.; Moody, T. S.; Taylor, S. J. C.; Wiffen, J. W. *Tetrahedron: Asymmetry* **2009**, 20, 2112-2116.

No que se refere ao mecanismo de ação das lipases, é fundamental citar a tríade catalítica formada por três resíduos de aminoácidos: aspartato, histidina e serina. Estes três resíduos de aminoácidos encontra-se em uma estrutura tridimensional próximos uns dos outros, acarretando em uma diminuição do pKa da hidroxila da serina. Assim, é possibilitado o ataque nucleofílico do átomo de oxigênio do resíduo de serina ao carbono carbonílico do substrato 1, no caso um éster carboxílico. Após este ataque, tem-se a formação do primeiro intermediário tetraédrico estabilizado por resíduos de glutamina e treonina. A próxima etapa consiste na liberação do complexo acil-enzima que por sua vez, sofre o ataque de um nucleófilo (substrato 2), no caso a água, originando o segundo intermediário tetraédrico. Por fim, ocorre a liberação do produto da reação, um ácido carboxílico, e a regeneração da enzima livre.^{4b,c} A figura 3.1.1 mostra o ciclo catalítico em questão representando a hidrólise de um éster carboxílico. Vale lembrar que as lipases tem por função principal a hidrólise de triacilgliceróis através do mecanismo descrito, entretanto, na química sintética o seu principal emprego está contido na resolução de racematos promovendo uma acilação enantiosseletiva de álcoois e aminas. Neste caso, geralmente utiliza-se um doador de acila como substrato 1 e o álcool ou amina como substrato 2, contudo, este processo de transesterificação respeita a mesma sequência catalítica enzimática.

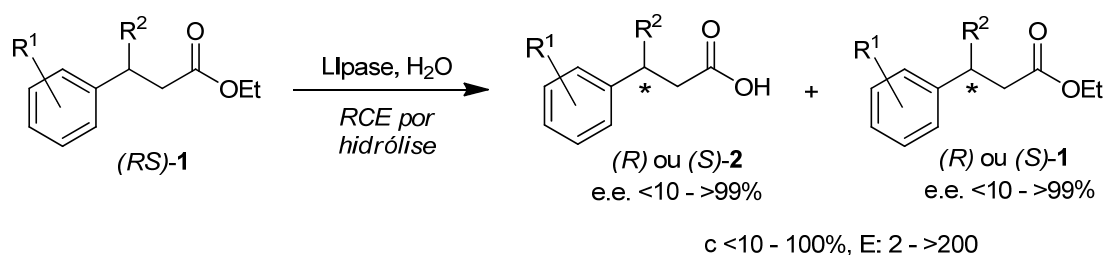
Figura 3.1.1: Mecanismo de ação das lipases



As lipases exibem um bom desempenho tanto em reações de acilação como em reações de hidrólises e, valendo-se de suas estruturas tridimensionais, estas transformações podem ser feitas de maneira enantiosseletiva ou até mesmo enantioespecífica. No caso das reações de hidrólise, é possível a síntese enzimática de ácidos carboxílicos opticamente puros, os quais são valiosos intermediários sintéticos para a obtenção de vários compostos de interesse biológico. A fim de exemplificar o uso de lipases na obtenção de compostos quirais através de hidrólise, a seguir estão apresentados alguns relatos da literatura que se valem de tal metodologia.

A resolução via hidrólise de ésteres 2-aryl- e 2-arylóxi-propionícos levando a formação dos correspondentes ácidos é descrita, sendo estes últimos anti-inflamatórios não-esteroidais e uma importante classe de herbicidas,

respectivamente.³⁰ Ainda dentro do contexto de hidrólise enzimática na obtenção de ácidos carboxílicos enantioenriquecidos, pode-se citar a preparação de ácidos β -aril-carboxílicos. Dentre estes, destaca-se o ácido 3-fenilbutanóico, empregado como intermediário na síntese de substâncias bioativas como a (-)-Malyngolida, um agente antibacteriano de origem natural.³¹ Recentemente, Maguire e colaboradores realizaram um amplo estudo para desenvolver uma metodologia de hidrólise enzimática de éster a fim de obter ácidos 3-aril-carboxílicos (**2**) enantiomericamente puros.³² Neste estudo, a hidrólise do enantiômero (*R*) ou (*S*) era dependente do grupo R^2 ligado na posição β do éster (Esquema 3.1.1).



Esquema 3.1.1 – Estudos de hidrólise enzimática enantiosseletiva realizado por Maguire e col..

Adicionalmente, Gotor e col. valendo-se de uma resolução cinética, através de hidrólise enzimática, preparam a (*S*)- β -fenilalanina (**4**) com e.e. na faixa de 96 a 98%.³³ Este aminoácido foi utilizado como intermediário na síntese da (*S*)-dapoxetina (**5**), que é uma substância empregada no tratamento

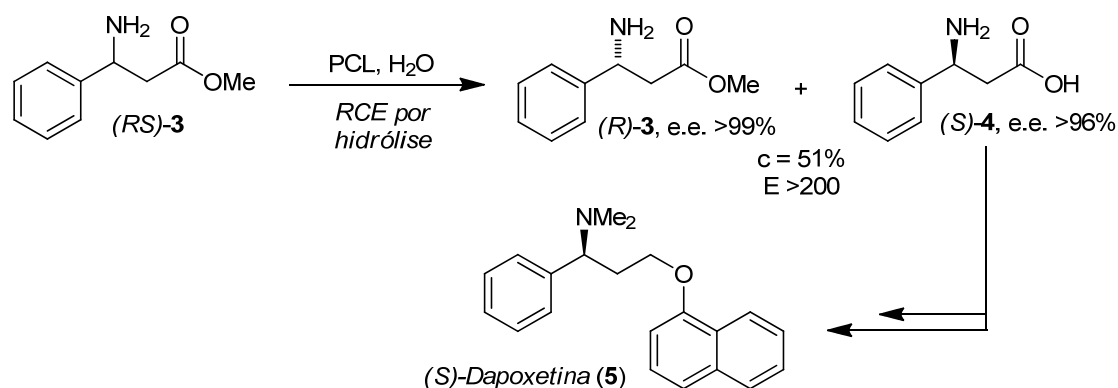
³⁰ (a) Ammazalorso, A.; Amoroso, R.; Bettoni, G.; De Filippis, B.; Fantacuzzi, M.; Giampietro, L.; MacCallini, C.; Tricca, M. L. *Chirality* **2008**, 20, 115-118; (b) Moreno, J. M.; Sinisterra, J. V. *J. Mol. Catal. A: Chem.* **1995**, 98, 171-184.

³¹ Kogure, T.; Eliel, E. L. *J. Org. Chem.* **1984**, 49, 576-578.

³² Deasy, R. E.; Brossat, M.; Moody, T. S.; Maguire, A. R. *Tetrahedron: Asymmetry* **2011**, 22, 47-61.

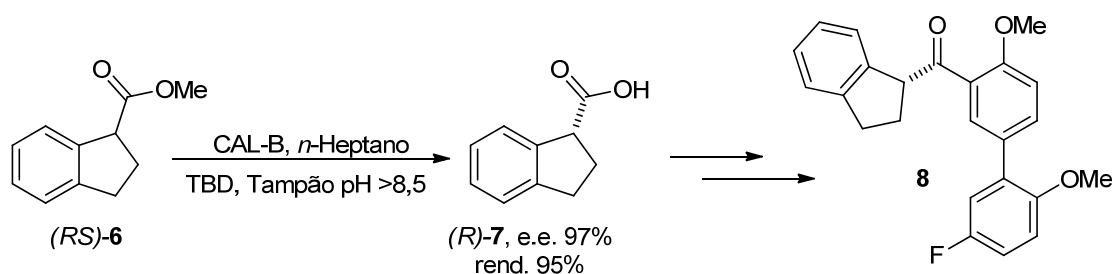
³³ Rodríguez-Mata, M.; García-Urdiales, E.; Gotor-Fernández, V.; Gotor, V. *Adv. Synth. Catal.* **2010**, 352, 395-406.

de depressão, bulimia, ansiedade (composto com N livre) e ejaculação precoce (composto na forma de cloridrato) (Esquema 3.1.2).



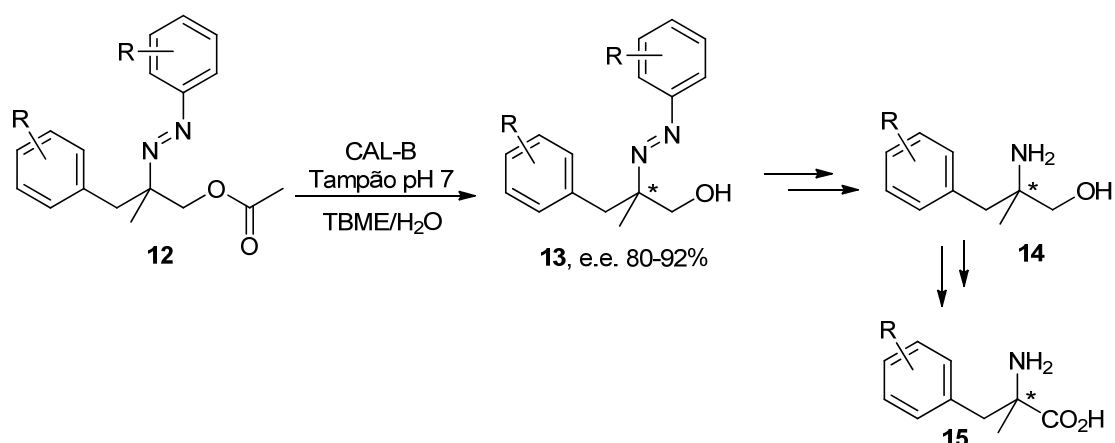
Esquema 3.1.2 – RCE via hidrólise de β-aminoéster e uso na síntese da (S)-Dapoxetina (5).

Pietruszka e col. desenvolveram uma resolução cinética dinâmica enzimática, ou seja, um processo de desracemização, via hidrólise em ésteres derivados de indeno. Os respectivos ácidos foram obtidos com e.e. maiores que 90% e rendimentos acima de 80%. No mesmo trabalho, os autores desenvolveram uma via de síntese para cetona indan-1-il biarílica (8), um potencial inibidor reversível de uma enzima humana da família das peptidil-propil-cis/trans-isomerases.³⁴ (Esquema 3.1.3)



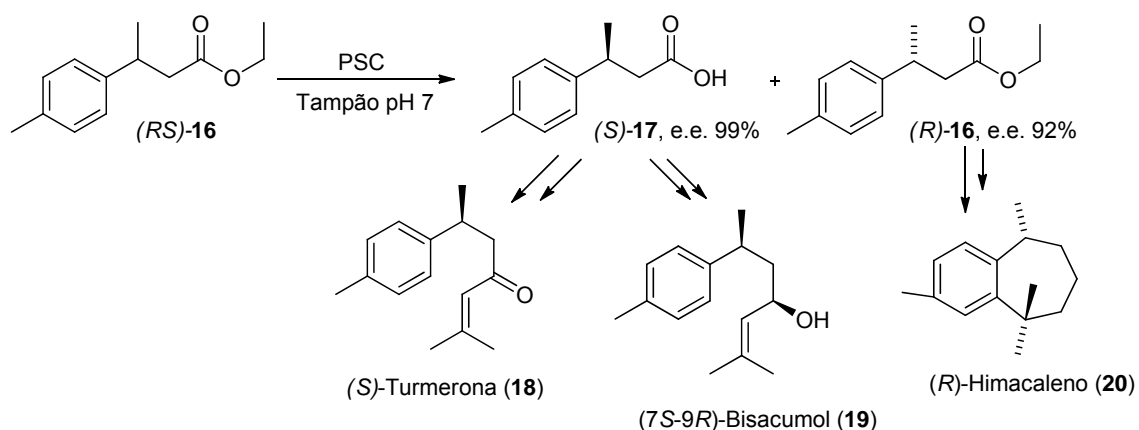
Esquema 3.1.3 – RCD enzimática via hidrólise de éster derivado de indeno.

³⁴ Pietruszka, J.; Simon, R. C.; Kruska, F.; Braun, M. *Eur. J. Org. Chem.* **2009**, 35, 6217-6224.



Esquema 3.1.5 – Hidrólise enzimática enantiosseletiva de azo-ésteres.

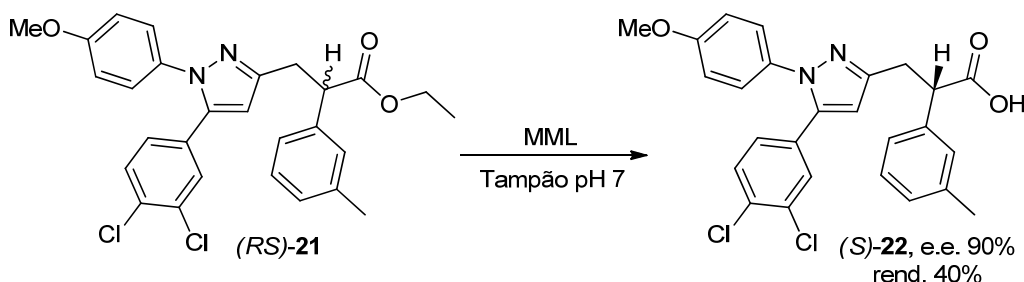
Através da hidrólise enzimática do 3-toluilbutanoato de etila (**16**), Kamal e col.³⁷ desenvolveram uma via de obtenção para um intermediário sintético do (*R*)-himacaleno (**20**), feromônio sexual masculino do besouro *Aphthona flava*, além de vias de síntese para a (*S*)-(+)-turmerona (**18**) e (7*S*,9*R*)-bisacumol (**19**), produtos naturais que exibem atividade citotóxica e anti-inflamatória (Esquema 3.1.6).



Esquema 3.1.6 – Síntese de produtos naturais contando com etapa de hidrólise enzimática.

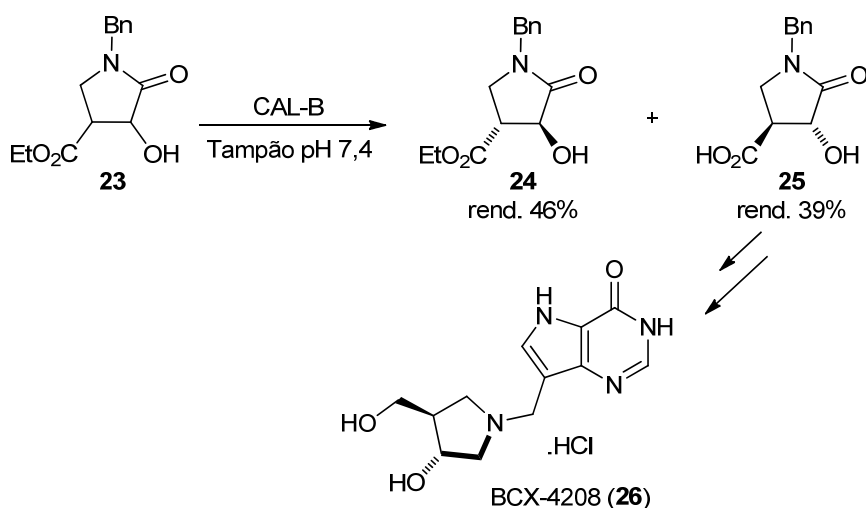
³⁷ Kamal, A.; Malik, M. S.; Azeeda, S.; Bajee, S.; Shaik, A. A. *Tetrahedron: Asymmetry* **2009**, 20, 1267-1271.

No âmbito industrial as hidrólises enzimáticas também ocupam espaço. Pesquisadores da *Johnson & Johnson*[®] desenvolveram uma rota sintética para um potencial fármaco contra doenças gastrointestinais e pancreáticas na qual empregam uma hidrólise enzimática como etapa chave na construção do centro quiral da molécula **22** (Esquema 3.1.7).³⁸



Esquema 3.1.7 – Etapa de hidrólise enzimática desenvolvida pela *Johnson & Johnson*[®].

A síntese do imunossupressivo BCX-4208 (**26**), desenvolvida pela empresa BioCryst Pharmaceuticals, conta com o processo de desracemização do hidroxiéster heterocíclico **23** através de hidrólise enantiosseletiva catalisada por lipase (Esquema 3.1.8).³⁹

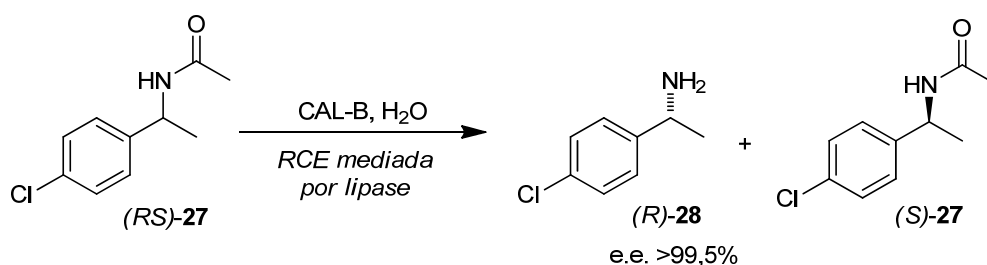


Esquema 3.1.8 – Desracemização de hidroxiéster via hidrólise na síntese do BCX-4208.

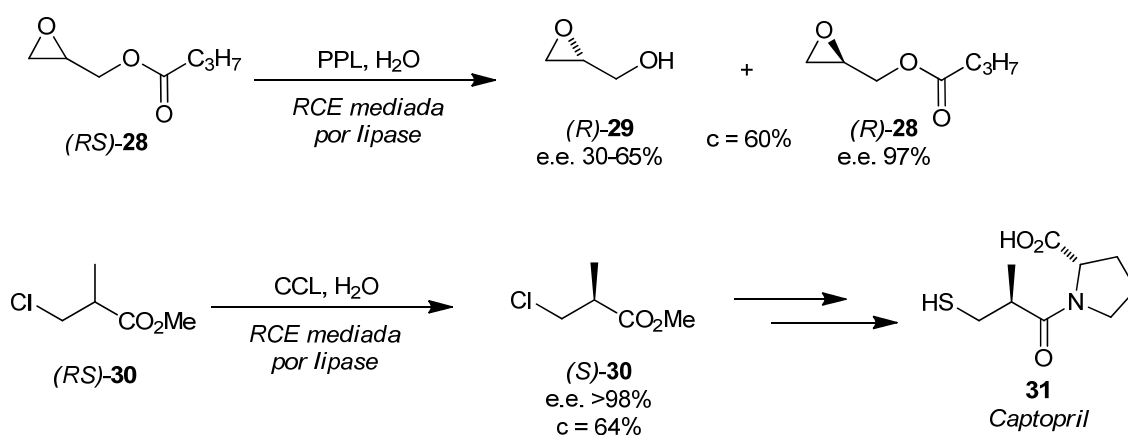
³⁸ Liang, J. T.; Mani, N. S.; Jones, T. K. *J. Org. Chem.* **2007**, 72, 8243-8250.

³⁹ Kamath, V. P.; Juarez-Brambila, J. J.; Morris, C. B.; Winslow, C. D.; Morris, P. E. *Org. Proc. Res. Dev.* **2009**, 13, 928-932.

A hidrólise mediada por lipase de *N*-[1-(4-clorofenil)etil]acetamida (**27**) é uma estratégia desenvolvida na Bayer AG para a resolução cinética do composto em questão,² com a obtenção da amina livre (**28**) com e.e. > 99,5% (Esquema 3.1.9). Paralelamente, a empresa DSM Andeno através de hidrólises enzimáticas enantiosseletivas desenvolveu um processo para a obtenção do (*R*)-glicidol (**29**) em escala de toneladas, bem como a resolução do 3-cloro-2-metilpropionato de metila (**30**), sendo este um intermediário sintético na obtenção do captopril (**31**), o qual atua no tratamento de hipertensão arterial (Esquema 3.1.10).⁴⁰



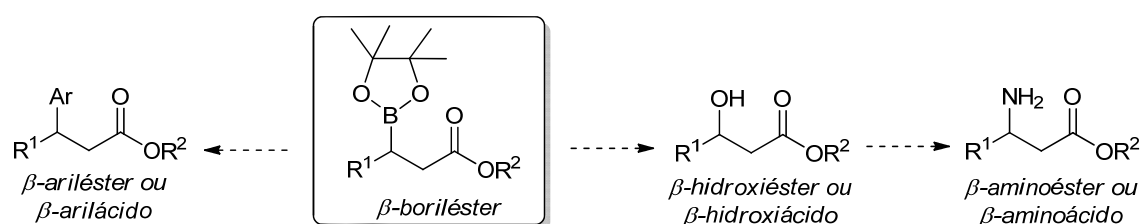
Esquema 3.1.9 – Estratégia da Bayer AG para resolução da amida **27**.



Esquema 3.1.10 – Hidrólises enzimáticas desenvolvidas na DSM Andeno.

⁴⁰ Ladner, W. E.; Whitesides, G. M. *J. Am. Chem. Soc.* **1984**, *106*, 7250-7251.

Feito os relatos acima, temos que as lipases podem catalisar uma hidrólise enantiosseletiva na classe de compostos que escolhemos estudar, os ésteres carboxílicos β -borilados. De maneira complementar, tais ésteres contendo o átomo de boro em suas estruturas representam intermediários sintéticos para a preparação de moléculas com maior grau de funcionalização.



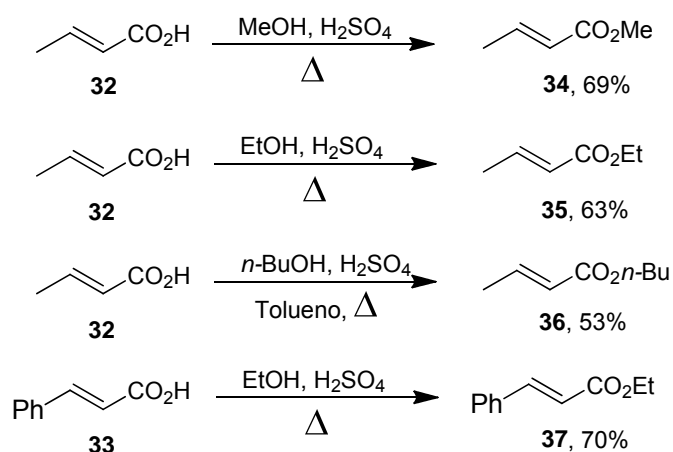
Esquema 3.1.11 – Versatilidade dos ésteres β -borilados

3.2. Resultados e Discussão

Inicialmente foram sintetizados ésteres α,β -insaturados via reação de esterificação de ácido carboxílico. Alguns ésteres sintetizados são disponíveis comercialmente, entretanto, optou-se pela síntese dos mesmos devido ao fato de se tratar de um processo químico relativamente simples e contar com a disponibilidade em nosso laboratório de grande quantidade de material de partida, os correspondentes ácidos carboxílicos. Posteriormente, trabalhou-se na funcionalização da posição β dos ésteres, adicionando o grupo –Bpin. Para isto, utilizou-se uma metodologia já conhecida na literatura. De posse das espécies boriladas, realizou-se análises de CG ou CLAE visando obter uma separação enantiomérica destes compostos. Finalmente, desenvolveram-se os testes de hidrólise e transesterificação enzimática enantiosseletiva. Parâmetros reacionais como lipases, meios reacionais e temperaturas foram avaliados a fim de obter a biotransformação desejada.

3.2.1 – Síntese dos ésteres carboxílicos β -borilados

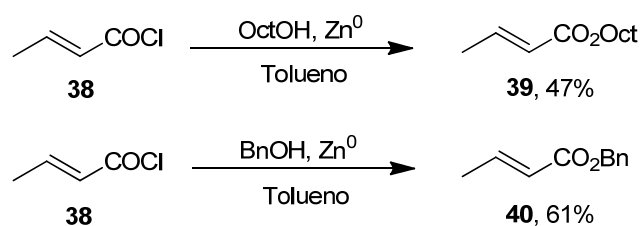
Utilizando como matéria-prima os ácidos crotônico (**32**) e cinâmico (**33**), os compostos **34-37** foram sintetizados através de esterificação química (Esquema 3.2.1.1).



Esquema 3.2.1.1 – Esterificações dos ácidos crotonico **32** e cinâmico **33**.

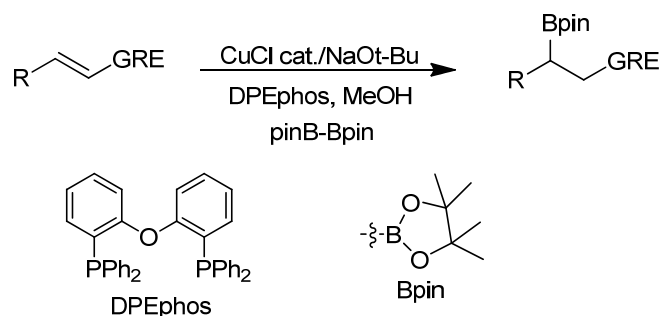
A fim de aumentar a gama de substratos disponíveis para os testes enzimáticos, idealizaram-se estruturas contando com um grupo hidrofóbico relativamente grande ligado a carboxila do éster. Sendo claro que em uma reação de hidrólise ou transesterificação enzimática o sítio reativo da molécula frente a lipase é a carboxila, poderia ocorrer que contando com uma cavidade hidrofóbica (do inglês, *hydrophobic pocket*) na estrutura enzimática, uma cadeia carbônica mais longa, portanto mais hidrofóbica, pudesse favorecer o progresso da reação. Desse modo, optou-se pela síntese de um substrato contendo uma cadeia octila e outro contando com uma benzila. Para tanto, utilizou-se o cloreto de crotonila (**38**) para promover uma esterificação química com octanol e benzol. Foi empregada uma metodologia já existente na literatura,⁴¹ que conta com o uso de zinco metálico no intuito de obter os ésteres crotonato de octila (**39**) e crotonato de benzila (**40**) (Esquema 3.2.1.2).

⁴¹ Yadav, J. S.; Reddy, G. S.; Srinivas, D.; Himabindu, K. *Synth. Comm.* **1998**, 28, 2337-2342.



Esquema 3.2.1.2 – Sínteses dos ésteres α,β -insaturados **39** e **40**.

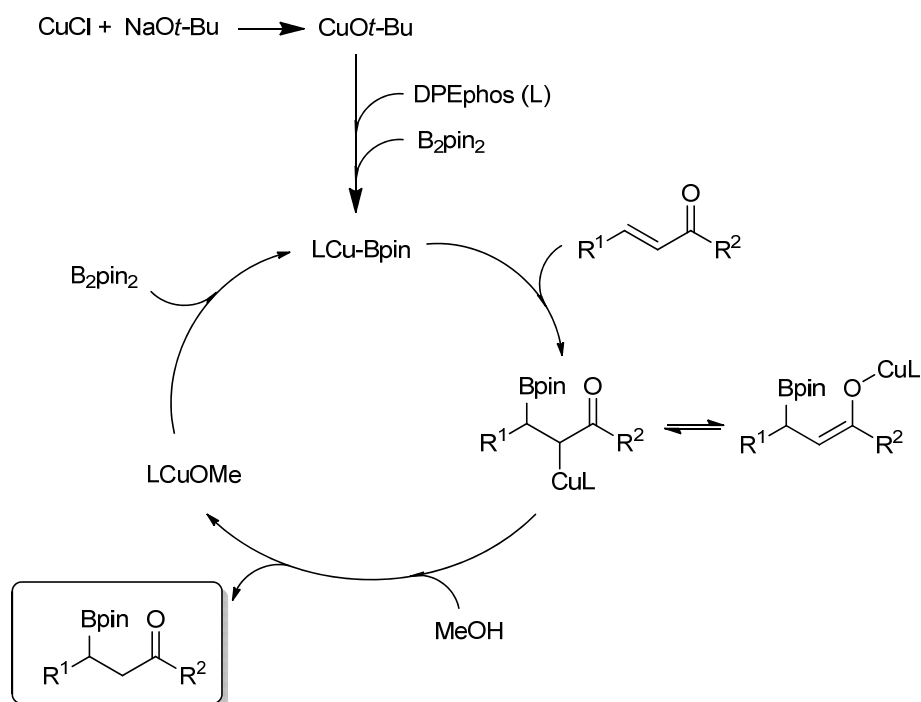
O próxima etapa consistiu na β -borilação dos ésteres α,β -insaturados, o qual empregou-se uma catálise de cobre segundo metodologia desenvolvida por Yun e colaboradores (Esquema 3.2.1.4).^{15a}



Esquema 3.2.1.4 – Reação de β -borilação catalisada por cobre.

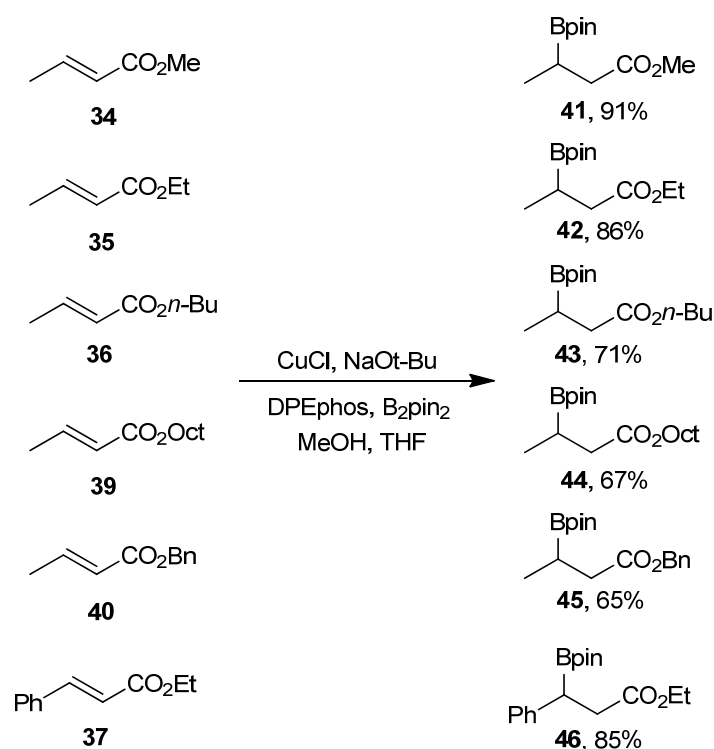
Como mecanismo proposto para esta reação, que é semelhante ao mecanismo de adição de Michael, acredita-se num ciclo catalítico onde inicialmente há a formação de $CuOt-Bu$, e que esta espécie de cobre se coordena com o ligante DPEphos (L), que posteriormente, reagindo com a diborana B_2pin_2 levará a formação da espécie ativa para a adição, $LCu-Bpin$. Valendo-se da sua eletronegatividade, ligeiramente superior ao cobre, o boro se comporta como um nucleófilo, adicionando-se de maneira-1,4. Ocorre um equilíbrio, onde ora o átomo de cobre se encontra na posição alfa de um composto carbonílico, ora se encontra junto ao oxigênio, como em um enolato.

A próxima etapa é a protonação da posição α -carbonílica, promovida pelo metanol, formando a espécie β -borilada e gerando um novo complexo de Cu (LCuOMe), o qual reagirá com outra molécula de diborana, realizando outro ciclo de adição (Esquema 3.2.1.5).



Esquema 3.2.1.5 – Ciclo catalítico proposto para as reações de β -borilação.

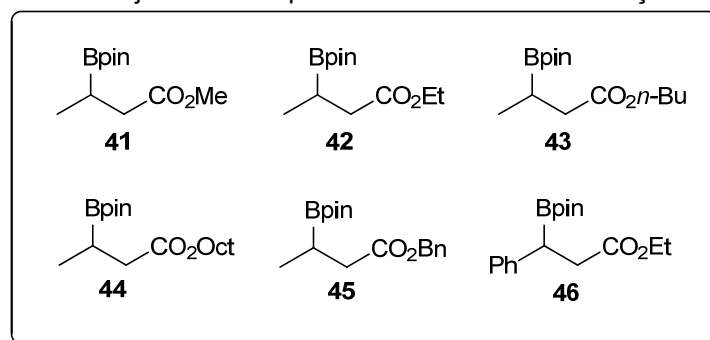
Desse modo, os ésteres **34-37** e **39-40** foram borilados na posição β , obtendo-se os produtos desejados em bons rendimentos. Uma característica importante de ser frisada é a estabilidade destes produtos, os quais podem permanecer sem qualquer tipo de refrigeração, até mesmo em contato com oxigênio durante semanas, sem que uma degradação possa ser observada. O esquema 3.2.1.6 mostra a síntese das moléculas boriladas **41-46**.



Esquema 3.2.1.6 – Etapa de β -borilação de éster carboxílico.

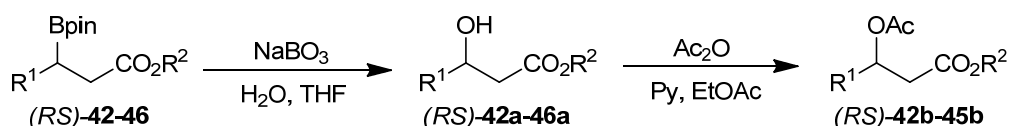
Assim, com a síntese dos compostos **41-46** obteve-se um conjunto representativo de ésteres carboxílicos β -borilados que deveriam ser submetidos a reações enzimáticas. Porém, antes de voltar total atenção aos ensaios enzimáticos, havia a necessidade de otimizar uma separação enantiomérica via análise de cromatografia gasosa ou líquida dos respectivos racematos. Abaixo está apresentado o conjunto de substratos borônicos sintetizados.

Figura 3.2.1.1 – Conjunto de compostos a ser utilizado nas reações enzimáticas.



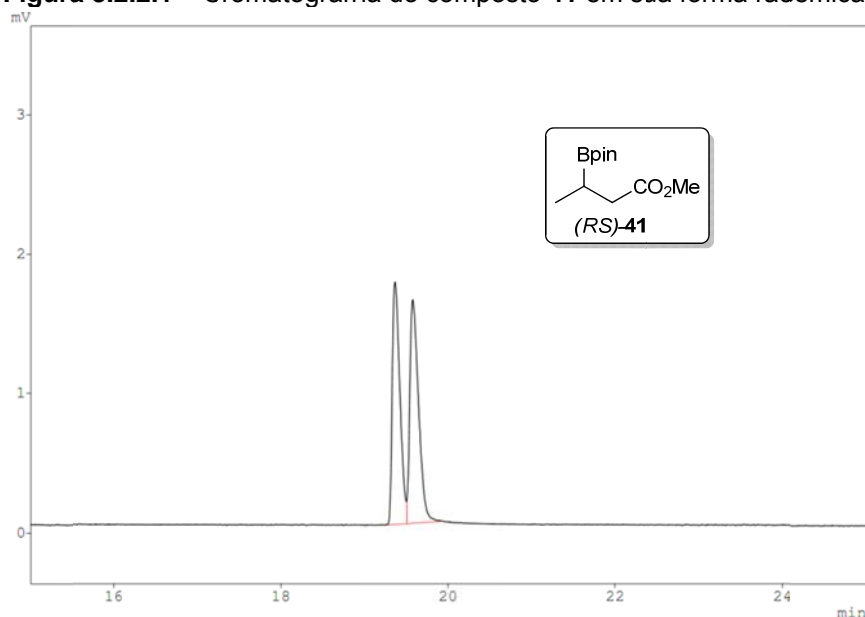
3.2.2 – Análises de separação enantiomérica

Para o substrato **41**, foi possível a separação de enantiômeros após análises de CG equipado com coluna de fase estacionária quiral. Entretanto, para os compostos **42-46** não obteve-se nenhuma separação enantiomérica, seja em análises de CG ou CLAE. Desse modo, reações de derivatização empregando NaBO₃ foram realizadas, e os produtos destas reações analisados via CG ou CLAE. Vale mencionar que esta derivatização implica na reação de oxidação do grupo borônico levando a formação dos correspondentes álcoois **42a-46a**. Esta reação de oxidação ocorre com retenção de configuração, o que seria crucial para a avaliação das reações enzimáticas. No caso dos compostos **42-45**, além da reação de oxidação, foi necessário realizar uma acetilação dos álcoois e os derivados acetilados **42b-45b**, por sua vez, forneceram uma boa separação enantiomérica através de análises de CG. Já para o composto **46**, após a derivatização, foi possível a separação enantiomérica do álcool **46a** através de análise de CLAE. O esquema 3.2.2.1 mostra as derivatizações necessárias para as análises. A seguir estão apresentados os cromatogramas de separação enantiomérica dos padrões racêmicos referentes ao conjunto de compostos mostrados na figura 3.2.1.1.



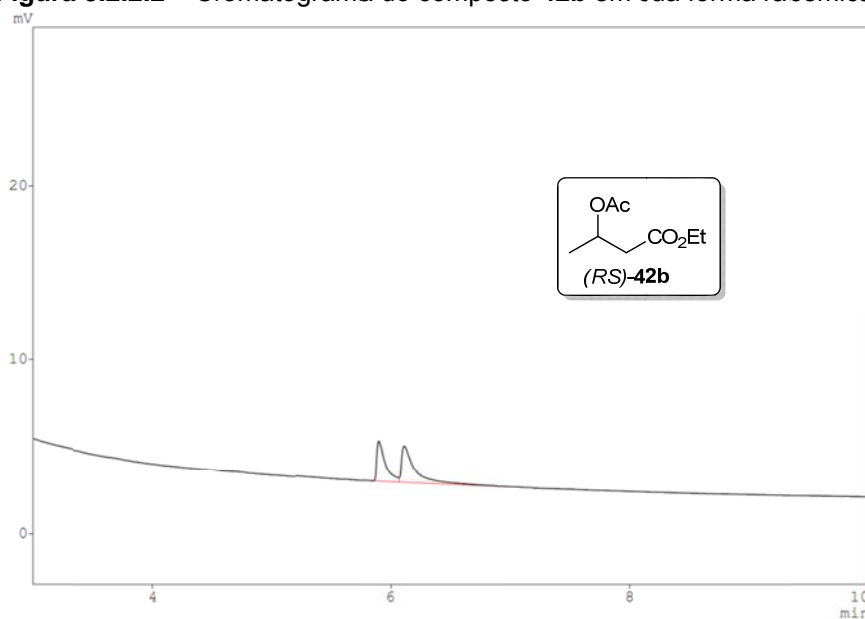
Esquema 3.2.2.1 – Esquema geral das derivatizações para análise de CG ou CLAE.

Figura 3.2.2.1 – Cromatograma do composto **41** em sua forma racêmica.



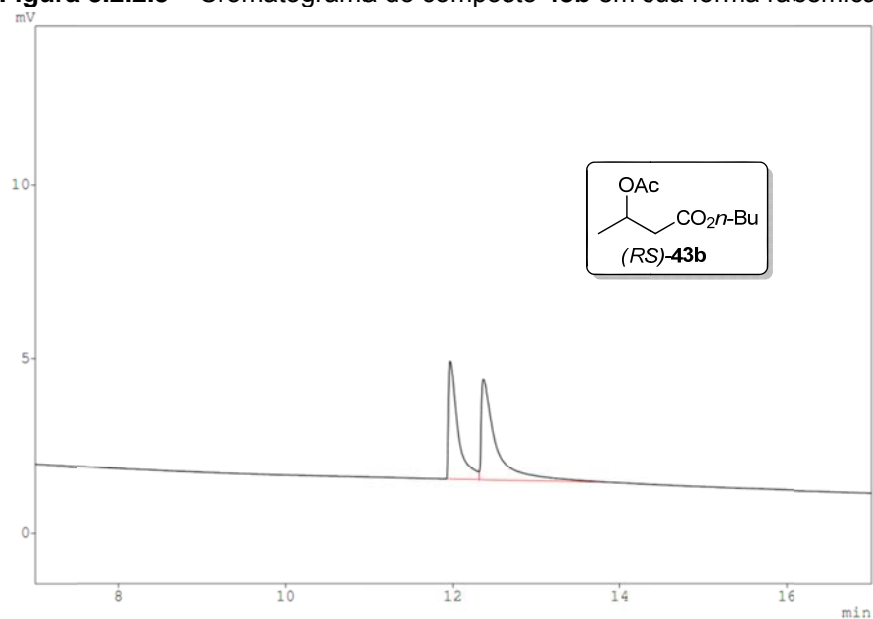
Coluna quiral β -ciclodextrina, 25 m x 0,25 mm x 0,25 μ m; 80 °C a 130 °C a uma taxa de aquecimento de 1,5 °C/min. H₂ como gás de arraste, a 60 kPa. Injetor e detector a 220 °C.

Figura 3.2.2.2 – Cromatograma do composto **42b** em sua forma racêmica.



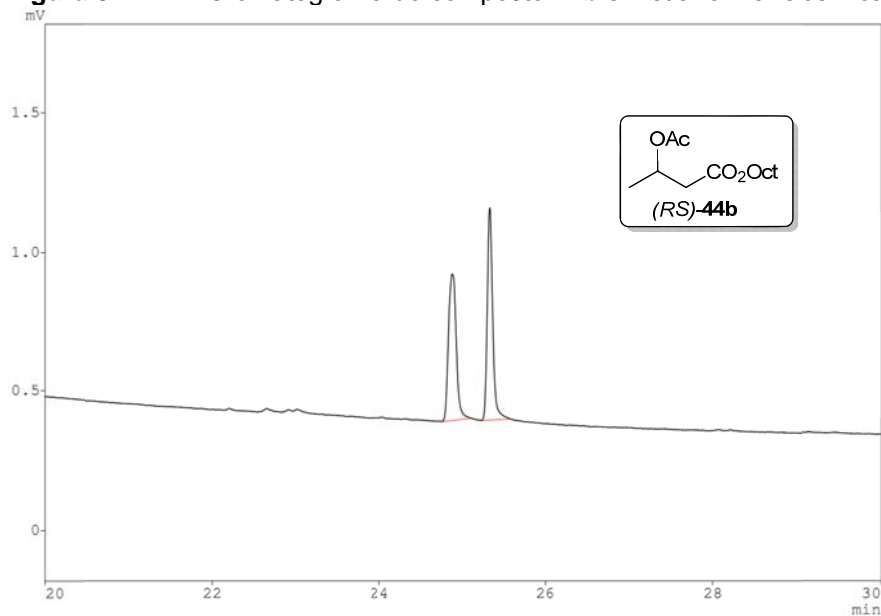
Coluna quiral β -ciclodextrina, 25 m x 0,25 mm x 0,25 μ m; 85 °C por 1 minuto, aquecimento até 110 °C a uma taxa de 2,5 °C/min. Manutenção dos 110 °C por 10 minutos e após, aquecimento até 180 °C a uma taxa de 10 °C/min. H₂ como gás de arraste, a 80 kPa. Injetor e detector a 220 °C.

Figura 3.2.2.3 – Cromatograma do composto **43b** em sua forma racêmica.



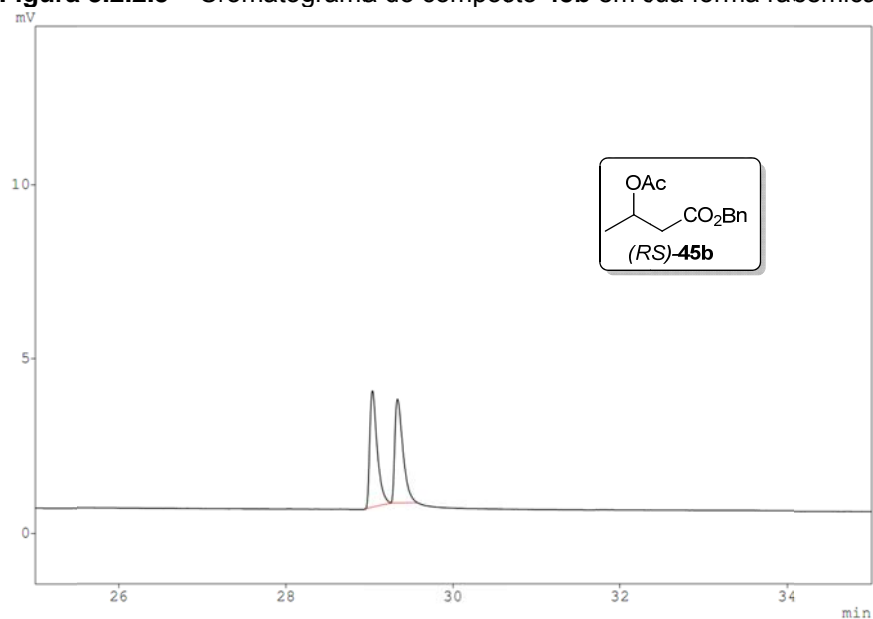
Coluna quiral β -ciclodextrina, 25 m x 0,25 mm x 0,25 μ m; 85 °C por 1 minuto, aquecimento até 110 °C a uma taxa de 2,5 °C/min. Manutenção dos 110 °C por 10 minutos e após, aquecimento até 180 °C a uma taxa de 10 °C/min. H₂ como gás de arraste, a 80 kPa. Injetor e detector a 220 °C.

Figura 3.2.2.4 – Cromatograma do composto **44b** em sua forma racêmica.



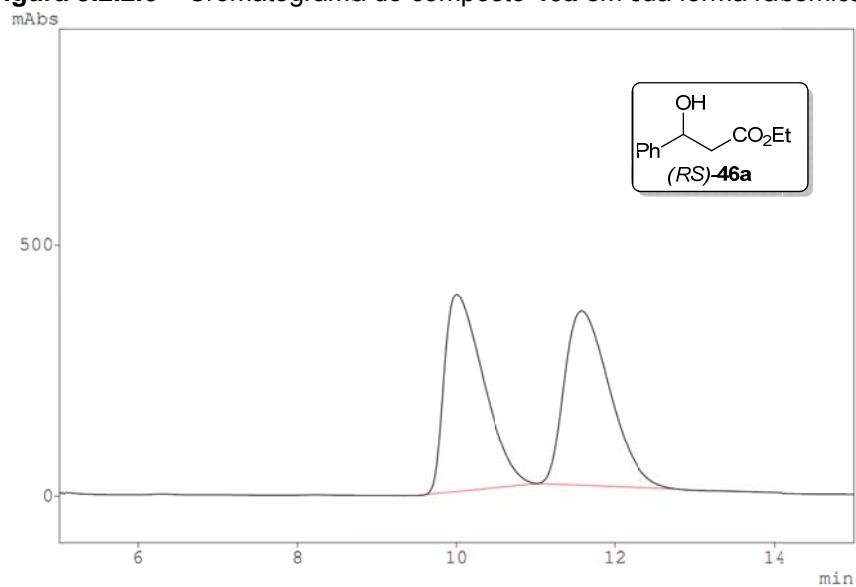
Coluna quiral β -ciclodextrina, 25 m x 0,25 mm x 0,25 μ m; 85 °C por 1 minuto, aquecimento até 180 °C a taxa de 2,5 °C/min. H₂ como gás de arraste, a 80 kPa. Injetor e detector a 220 °C.

Figura 3.2.2.5 – Cromatograma do composto **45b** em sua forma racêmica.



Coluna quiral β -ciclodextrina, 25 m x 0,25 mm x 0,25 μ m; 85 °C por 1 minuto, aquecimento até 180 °C a taxa de 2,5 °C/minuto. H₂ como gás de arraste, a 80 kPa. Injetor e detector a 220 °C.

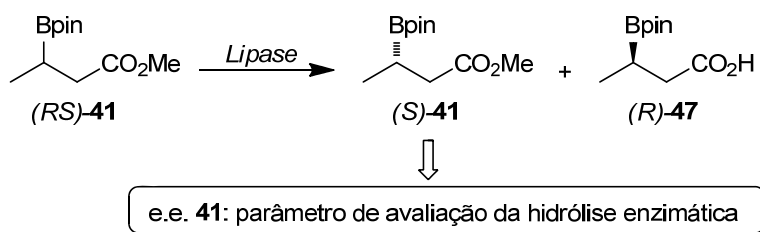
Figura 3.2.2.6 – Cromatograma do composto **46a** em sua forma racêmica.



CLAE - Coluna OB (Chiralcel[®] 0,46 cm ϕ x 25 cm) utilizando como eluente uma mistura de hexano:isopropanol (95:5), em um fluxo de 1 mL por minuto. Detector λ = 220 nm.

3.2.3 – Reações de hidrólise enantiosseletiva mediadas por lipases

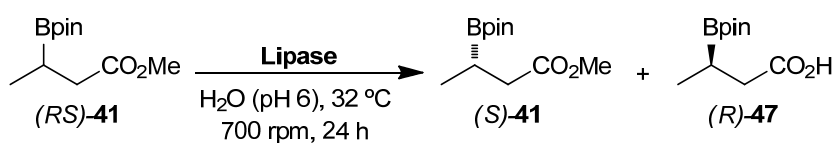
Antes de apresentar os resultados obtidos nas reações enzimáticas, vale ressaltar o objetivo deste trabalho, o qual se ampara no reconhecimento e diferenciação de enantiômeros, por parte de uma lipase, em uma reação de hidrólise de um éster carboxílico funcionalizado na posição β com um grupo borônico. Sendo assim, empregando o substrato **41** como composto modelo, os produtos obtidos após a reação de biocatálise seriam o próprio substrato e o correspondente ácido carboxílico **47**, ambos enantiomericamente enriquecidos. Como o ácido **47** não teve sua detecção otimizada (CG ou CLAE), a eficiência da reação enzimática foi mensurada através dos valores de excesso enantiomérico obtidos para a espécie **41**.



Esquema 3.2.3.1 – Observação do e.e. de **41** para avaliação das reações enzimáticas.

Posto isso, partimos para os primeiros ensaios de hidrólise, optando por avaliar inicialmente um conjunto de lipases. Empregou-se o composto **41**, água como solvente e uma lipase de fonte comercial. Neste ponto é imprescindível comentar que o tempo reacional mostrado na tabela 3.2.3.1 é de 24 horas, porém, avaliou-se também o valor de e.e. para **41** em 48 horas. Os resultados obtidos foram bastante semelhantes, destacando o e.e. de 81% para (S)-**41** quando utilizada CAL-B, fazendo com que o tempo reacional selecionado para a realização dos demais testes fosse de 24 horas.

Tabela 3.2.3.1 – Variação de lipases para a promoção da hidrólise enantiosseletiva.^a



Entrada	Lipase	e.e. 41 (%) ^b
1	BCL	<i>rac.</i>
2	PSD-I	<10
3	PSC-II	<10
4	CAL-B	78
5	ANL	<i>rac.</i>
6	CRL	<i>rac.</i>
7	CCL	<i>rac.</i>
8	MML	<i>rac.</i>
9	PFL	<i>rac.</i>

^a Condições: H₂O (1 mL), lipase (10 mg), substrato **41** (0,05 mmol).

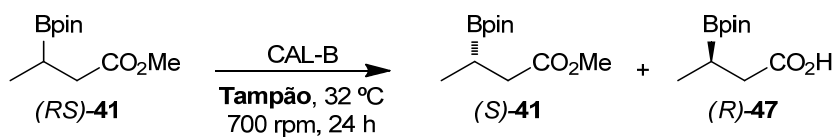
^b Determinado por CG equipado com coluna quiral.

A escolha deste conjunto de lipases ampara-se em relatos na literatura,^{33,42} nos quais há a utilização das mesmas para uma finalidade semelhante. Após a realização de nove testes, verificou-se que apenas a CAL-B forneceu um e.e. satisfatório (entrada 4), enquanto as demais enzimas foram ineficazes para o propósito, sendo constatado na maioria das reações uma mistura racêmica do substrato de partida após o referido tempo reacional.

Sob suspeita de que o ácido formado na reação pudesse atrapalhar o desempenho da enzima, inativando-a, foram realizados três testes empregando solução tampão de diferentes pH, ao invés da água usada anteriormente (Tabela 3.2.3.2).

⁴² (a) Kamal, A.; Malik, M. S.; Shaik, A. A.; Azeeza, S. *Tetrahedron: Asymmetry* **2007**, 18, 2547-2553; (b) Paál, T. A.; Forró, E.; Fülöp, F.; Liljeblad, A.; Kanerva, L. T. *Tetrahedron: Asymmetry* **2008**, 19, 2784-2788; (c) Varma, R.; Kasture, S. M.; Nene, S.; Kalkote, U. R. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **2008**, 24, 577-579.

Tabela 3.2.3.2 – Reações desenvolvidas em soluções tampão.^a

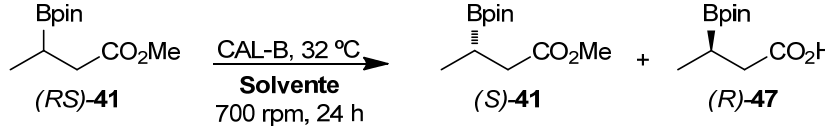
		
Entrada	pH Tampão	e.e. 41 (%) ^b
1	5,0	54
2	7,3	71
3	9,2	48

^a Condições: tampão fosfato (100 mM, 1 mL), CAL-B (10 mg), **41** (0,05 mmol).

^b Determinado por CG equipado com coluna quiral.

Conforme apresentado na tabela 3.2.3.2, o emprego de soluções tampão não melhorou o desempenho da reação, ainda que o tampão de pH 7,3 tenha fornecido um resultado semelhante a condição que se utilizara água. Visando avaliar o efeito da solubilidade do composto **41**, e de solventes orgânicos no meio reacional, decidiu-se empregar uma mistura de solventes, sendo que um deles seria a água e o outro um solvente orgânico. Esta escolha está embasada no fato de que a maioria das reações químicas empregando lipases, e particularmente a CAL-B, são desenvolvidas em solventes orgânicos.^{4c,27a} Outro aspecto observado foi a miscibilidade dos solventes, sendo que foram empregados três solventes miscíveis (THF, DMF e dioxano) e três imiscíveis em água (hexano, tolueno e TBME). No âmbito das proporções de cada solvente, optou-se por aplicar um excesso, ora de água, ora de solvente orgânico, verificando o comportamento da reação. Os resultados estão apresentados na tabela 3.2.3.3.

Tabela 3.2.3.3 – Avaliação do efeito da solubilidade do éster **41** na reação enzimática.^a

			
Entrada	Mistura de solventes	Proporção	e.e. 41 (%) ^b
1	H ₂ O : Hexano	9 : 1	29
2	H ₂ O : Tolueno	9 : 1	22
3	H ₂ O : TBME	9 : 1	34
4	H ₂ O : THF	9 : 1	26
5	H ₂ O : DMF	9 : 1	26
6	H ₂ O : Dioxano	9 : 1	43
7	H ₂ O : Hexano	1 : 9	19
8	H ₂ O : Tolueno	1 : 9	12
9	H ₂ O : TBME	1 : 9	17
10	H ₂ O : THF	1 : 9	10
11	H ₂ O : DMF	1 : 9	16
12	H ₂ O : Dioxano	1 : 9	13

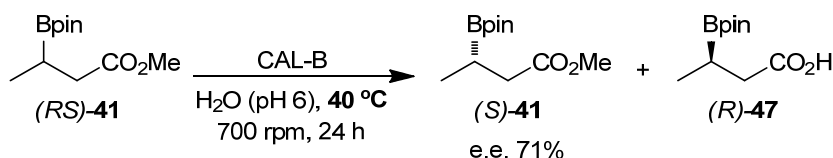
^a Condições: Solvente (1 mL), CAL-B (10 mg), substrato **41** (0,05 mmol).

^b Determinado por CG equipado com coluna quiral.

Analisando a tabela 3.2.3.3 pode-se afirmar que o emprego de um solvente orgânico combinado com a água não melhorou o desempenho da reação, seja este solvente miscível ou imiscível a água. Observando a coluna de proporção de solventes e comparando-se com os e.e. de **41**, outra informação pode ser apurada; fica notória a dependência da presença de uma quantidade relativamente grande de água para a reação. Em outros termos, é a comprovação de que a água é o melhor solvente e que quanto mais água houver na reação, mais eficaz ela se torna.

Adicionalmente, a reação de hidrólise enzimática foi testada contando com uma elevação de temperatura, a 40 °C (Esquema 3.2.3.2). Vale lembrar que todos os testes mencionados anteriormente foram realizados a 32 °C. Esta elevação na temperatura fez com que o composto (S)-**41** fosse obtido com um

e.e. de 71%, sendo este resultado semelhante ao obtido quando a reação foi realizada a 32 °C (e.e. (*S*)-**41** = 78%), porém inferior.



Esquema 3.2.3.2 – Reação enzimática realizada a 40 °C.

A seqüência dos estudos de hidrólise enantiosseletiva de ésteres carboxílicos β -borilados deu-se com a extensão da melhor condição determinada anteriormente para os demais compostos sintetizados (**42-46**). Os resultados estão apresentados na tabela 3.2.3.4.

Tabela 3.2.3.4 – Hidrólise enzimática dos ésteres **41-46**.^a

$\text{R}^1\text{-Bpin-CH}_2\text{-CO}_2\text{R}^2 \xrightarrow[\text{700 rpm, 32 }^\circ\text{C, 24 h}]{\text{CAL-B, H}_2\text{O}} \text{R}^1\text{-Bpin-CH}_2\text{-CO}_2\text{R}^2 + \text{R}^1\text{-Bpin-CH}_2\text{-CO}_2\text{H}$ <p style="text-align: center;"> (RS)-41-46 (S)-41-45 (R)-46 $\text{R}^1 = \text{Me, (R)-47}$ $\text{R}^1 = \text{Ph, (S)-48}$ </p>				
Entrada	Substrato	R ¹	R ²	e.e. 47-48 (%) ^b
1	(<i>RS</i>)- 41	Me	Me	78
2	(<i>RS</i>)- 42	Me	Et	74
3	(<i>RS</i>)- 43	Me	<i>n</i> -Bu	<10
4	(<i>RS</i>)- 44	Me	Oct	N.o.
5	(<i>RS</i>)- 45	Me	Bn	N.o.
6	(<i>RS</i>)- 46	Ph	Et	N.o.

^a Condições: H₂O (1 mL), CAL-B (10 mg), substrato **41-46** (0,05 mmol).

^b Determinado por CG ou CLAE equipados com coluna quiral. Medido após oxidação (e acetilação, se necessário). N.o. = não observado.

Analisando a tabela acima e comparando com a reação do composto modelo (**41**) (entrada 1), temos que o composto **42** forneceu um resultado muito similar, como era esperado dada a diferença estérica entre os grupamentos metila e etila (entrada 2). Entretanto, com o aumento da cadeia

carbônica ligada a carboxila houve um decréscimo substancial no valor de e.e. observado para o composto **43** (entrada 3). No caso dos substratos **44-46**, após o tempo reacional estipulado, detectou-se a presença dos ésteres nas suas formas racêmicas (entradas 4 a 6). Estes resultados demonstraram um comportamento contrário do esperado, uma vez que, em havendo uma cavidade hidrofóbica no sítio ativo da lipase, quanto mais longa a cadeia carbônica ligada a carboxila, melhor seria o “encaixe” da cadeia a cavidade da enzima e tanto melhor seria o progresso da reação de hidrólise. Por outro lado, acreditamos que estes substratos contando com uma cadeia carbônica longa dificultem a aproximação do nucleófilo enzimático (resíduo de serina) até a carbonila do éster, impossibilitando assim o desencadeamento do processo de hidrólise.

Com o objetivo de melhorar os resultados encontrados, optamos por refazer as reações apresentadas na tabela 3.2.3.4, porém a uma temperatura maior; de 32 °C para 70 °C. Em um primeiro momento, esta escolha pode parecer um tanto quanto infundada, uma vez que no esquema 3.2.3.2 foi apresentada uma reação de hidrólise enzimática a 40 °C, do substrato **41**, onde o valor de e.e. para o éster remanescente ((S)-**41**) foi de 71% e quando a mesma reação foi realizada a 32 °C este e.e. foi de 78% (Tabela 3.2.3.4, entrada 1). Porém, na próxima seção, onde serão apresentados os estudos sobre a transesterificação enzimática, será apresentada a razão da realização das reações de hidrólise em uma temperatura mais elevada. Os resultados estão apresentados na tabela 3.2.3.5.

Tabela 3.2.3.5 – Hidrólise enzimática dos ésteres **41-46 a 70 °C.^a**

Entrada	Substrato	R ¹	R ²	e.e. 47-48 (%) ^b
1 ^c	(<i>RS</i>)- 41	Me	Me	>99
2	(<i>RS</i>)- 42	Me	Et	>99
3	(<i>RS</i>)- 43	Me	<i>n</i> -Bu	34
4	(<i>RS</i>)- 44	Me	Oct	<10
5	(<i>RS</i>)- 45	Me	Bn	N.o.
6	(<i>RS</i>)- 46	Ph	Et	N.o.
7 ^d	(<i>RS</i>)- 46	Ph	Et	N.o.

^a Condições: H₂O (1 mL), CAL-B (10 mg), substrato **41-46** (0,05 mmol).

^b Determinado por CG ou CLAE equipados com coluna quiral. Medido após oxidação (e acetilação, se necessário). N.o. = não observado.

^c Reação em 3 horas.

^d EtOH (2%) usado como co-solvente.

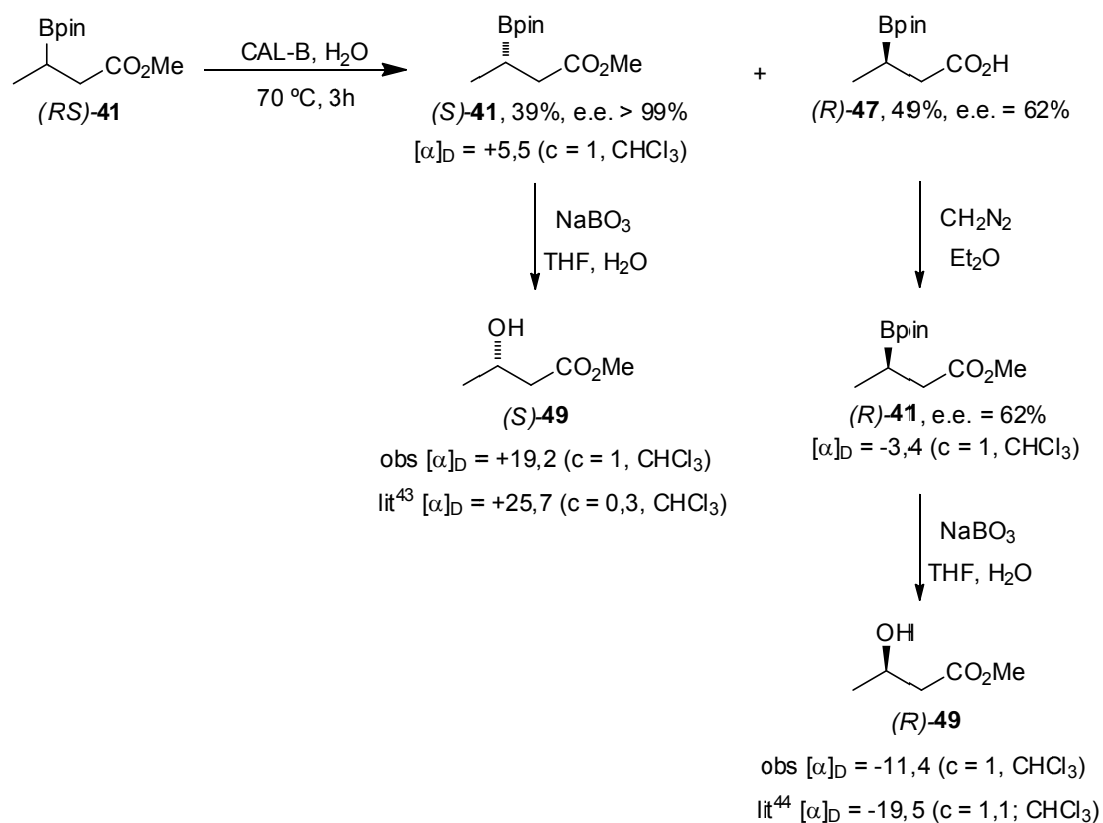
O aumento de temperatura nas reações de hidrólise enzimática propiciou uma elevação nos valores de e.e.. Quando os ésteres **41-42** foram submetidos a esta condição de hidrólise, foi possível a obtenção das formas enantiomericamente puras dos ésteres remanescentes ((*S*)-**41-42**), sendo que para o composto **41**, este e.e. foi observado após 3 horas de reação (entradas 1 e 2). Porém, para os ésteres de cadeia mais longa (**43-45**), um comportamento análogo ao observado anteriormente foi detectado; decréscimo no valor do e.e. dos ésteres recuperados ou mesmo a detecção da forma racêmica após o tempo reacional (entradas 3 a 5). Para o éster **46**, foram realizadas duas reações, sendo uma delas somente utilizando água como solvente (entrada 6) e outra empregando 2 % de etanol como co-solvente (entrada 7). A adição do etanol como co-solvente teve como objetivo a solubilização do substrato, que é sólido, no meio reacional aquoso. Porém, nestes dois últimos testes não foram detectadas a hidrólise enantiosseletiva desejada.

Como parte final desta etapa do trabalho, foi realizada uma reação em maior escala utilizando os compostos **41-42** a fim de isolar os produtos da hidrólise; o éster e o ácido carboxílico enantiomericamente enriquecidos. Após o isolamento dos produtos, o objetivo era determinar o valor do e.e. para o respectivo ácido carboxílico formado bem como os rendimentos e configurações absolutas. O isolamento dos produtos pôde ser realizado ou através de cromatografia de camada delgada em escala preparativa ou em uma pequena coluna cromatográfica de silicagel. Para o substrato **41**, o éster (*S*)-**41** foi recuperado com um e.e. maior que 99% e com um rendimento de 39%. O correspondente ácido carboxílico (*R*)-**47**, proveniente desta hidrólise, foi isolado em um rendimento de 49%. Visto que a análise de (*R*)-**47** via CG não é possível, este composto foi derivatizado através de uma reação de esterificação empregando diazometano, levando a formação do éster (*R*)-**41**. Através deste processo de derivatização, foi possível medir a pureza enantiomérica do ácido (*R*)-**47**, revelando um e.e. de 62 %. A configuração absoluta foi determinada após oxidação com NaBO₃ e os valores de rotação óptica dos β-hidroxiésteres foram comparados com a literatura. Neste ponto é imprescindível comentar que a reação de oxidação ocorre com retenção de configuração. O β-hidroxiéster **49** obtido a partir do éster (*S*)-**41** revelou uma rotação óptica de +19,2, representando assim o enantiômero (*S*) ((*S*)-**49**), de acordo com a literatura.⁴³ O β-hidroxiéster **49** obtido a partir do ácido (*R*)-**47** apresentou uma rotação óptica de -11,4, tratando-se portanto do enantiômero (*R*) ((*R*)-**49**), de acordo com a literatura.⁴⁴ O esquema 3.2.3.3 ilustra esta

⁴³ Denmark, S. E.; Ahmad, M. *J. Org. Chem.* **2007**, 72, 9630-9634.

⁴⁴ Kato, N. *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, 112, 254-257.

reação em maior escala e a determinação da configuração absoluta. As figuras 3.2.3.1 a 3.2.3.3 apresentam os cromatogramas obtidos nesta etapa.



Esquema 3.2.3.3 – Transformações do éster **(RS)-41**.

Figura 3.2.3.1 – Cromatograma do composto **41** em sua forma racêmica.

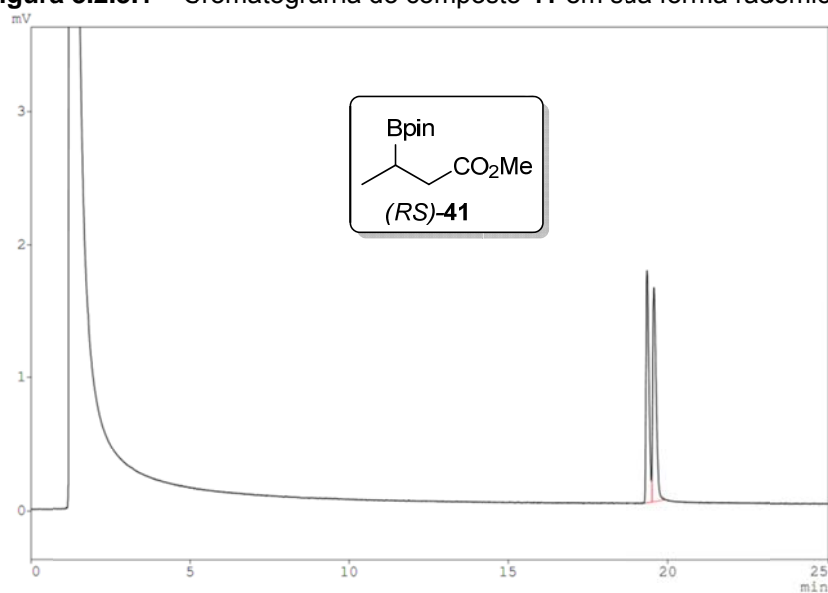


Figura 3.2.3.2– Cromatograma de (S)-41 recuperado após hidrólise enzimática.

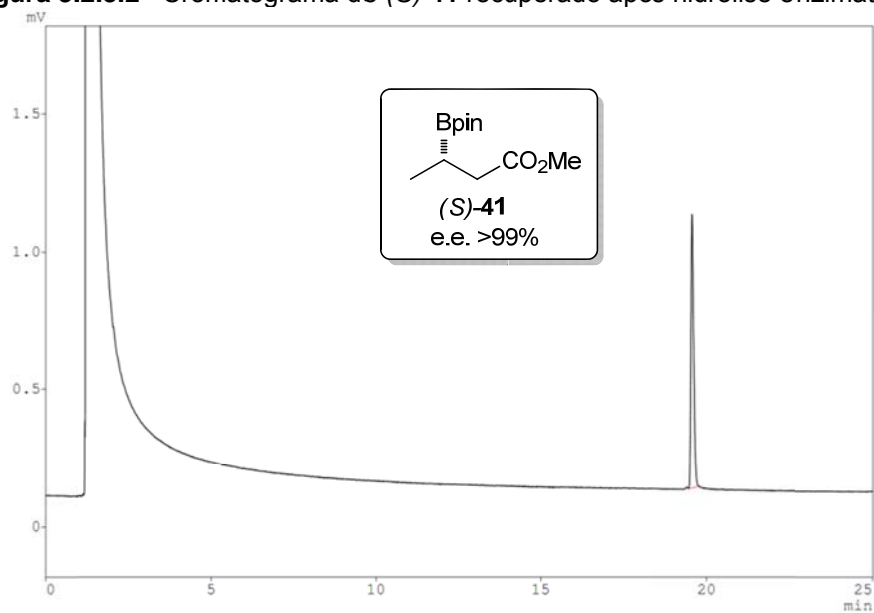
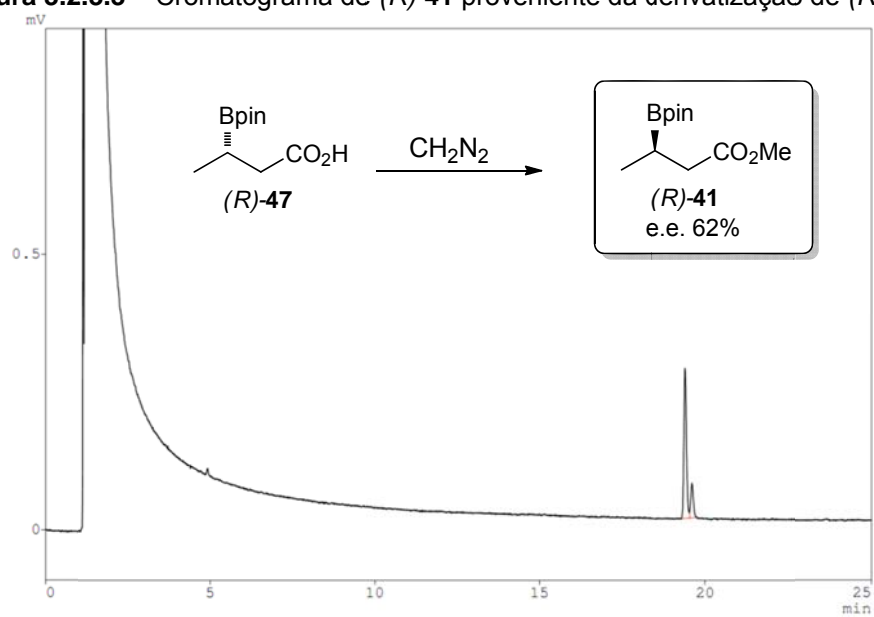
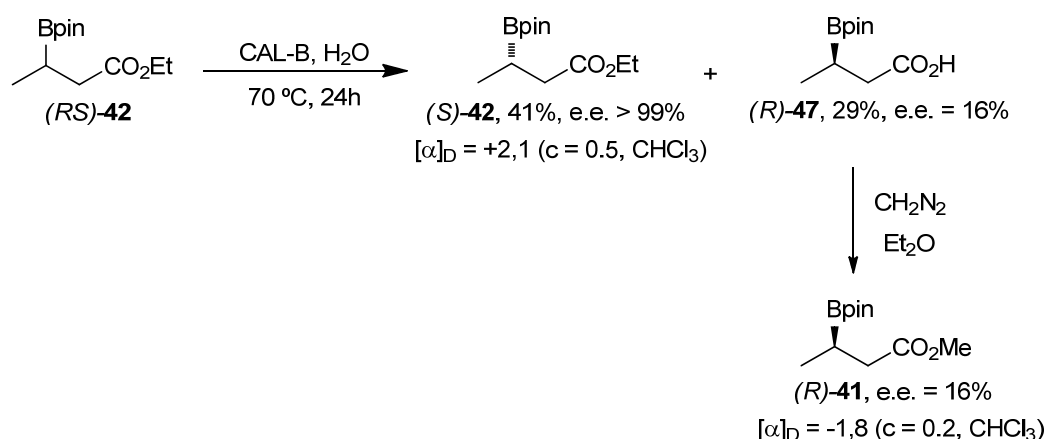


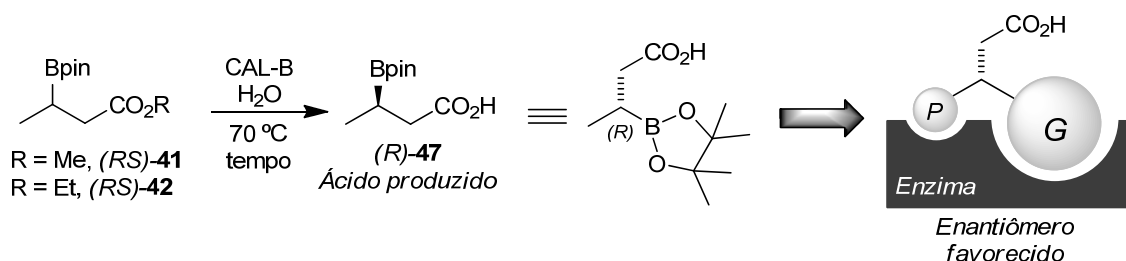
Figura 3.2.3.3 – Cromatograma de (R)-41 proveniente da derivatização de (R)-47.



De maneira similar, o éster enantioenriquecido (*S*)-**42** foi isolado com um rendimento de 41 % e um e.e. maior que 99%, enquanto o ácido (*R*)-**47**, proveniente da hidrólise de **42**, foi isolado com 29% de rendimento e, depois da derivatização com diazometano, revelou um e.e. de 16% (Esquema 3.2.3.4). Os dados de rotação óptica demonstram que o enantiômero (*S*) é recuperado na forma de éster, enquanto o enantiômero (*R*) sofre preferencialmente o processo de hidrólise. Em outros termos, na hidrólise enzimática enantiosseletiva dos ésteres **41** e **42**, a CAL-B exibe uma seletividade pró-(*R*). Além disso, considerando o tamanho dos grupos ligados ao centro quiral, pode-se inferir que o protocolo de hidrólise está de acordo com a regra de Kazlauskas^{32,45} (Esquema 3.2.3.5).



Esquema 3.2.3.4 – Transformações do éster (*RS*)-**42**.



Esquema 3.2.3.5 – Regra de Kazlauskas para a hidrólise dos ésteres **41** e **42**..

⁴⁵ (a) Gotor-Fernández, V.; Brieva, R.; Gotor, V. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2006**, *40*, 111-120; (b) Kazlauskas, R. J.; Weissfloch, A. N. E.; Rappaport, A. T.; Cuccia, L. A. *J. Org. Chem.* **1991**, *56*, 2656-2665.

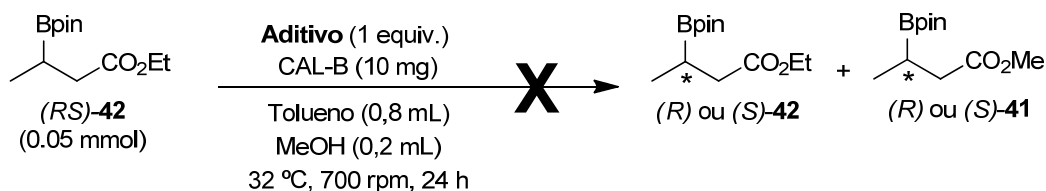
3.2.4 – Reações de transesterificação enantiosseletiva mediadas por lipases

Alternativamente a reação de hidrólise, decidimos avaliar a transesterificação enzimática a fim de obter os ésteres **41-45** enantiomericamente enriquecidos. Os testes de transesterificação foram iniciados com os substratos **41-43**, empregando diferentes solventes orgânicos e nucleófilos (álcoois). Neste ponto, vale mencionar que já eram conhecidos, e diferentes entre si, os tempos de retenção dos compostos **41-45** através de análise de CG com coluna de fase estacionária aquiral. Assim sendo, as reações de transesterificação foram analisadas através da injeção em cromatógrafo a gás de alíquotas removidas da reação. Havendo a formação do produto de interesse, e em uma conversão aceitável (>15%), esses produtos eram derivatizados para medida dos seus excessos enantioméricos. Nos primeiros testes de transesterificação não foi observada a formação dos produtos desejados, ou seja, após o tempo reacional a análise de CG (coluna de fase estacionária aquiral) revelava apenas a presença do éster utilizado como material de partida. Estes testes estão apresentados na tabela 3.2.4.1. Em um segundo momento, avaliou-se a transesterificação do composto **42** com metanol, desta vez empregando um aditivo (ácido de Lewis) no intuito de ativar a carbonila do éster através de uma complexação do oxigênio com este ácido de Lewis. Uma série de cloretos metálicos foram testados frente à reação em questão, porém mais uma vez não houve a formação do produto de transesterificação, o composto **41** enantioenriquecido (Esquema 3.2.4.1). Também utilizando o éster **42** e metanol, foram realizados testes de transesterificação variando-se a lipase, onde, mais uma vez, não foi observada a formação do composto **41** (Esquema 3.2.4.2).

Tabela 3.2.4.1 – Transesterificação enzimática dos ésteres **41-43**.^a

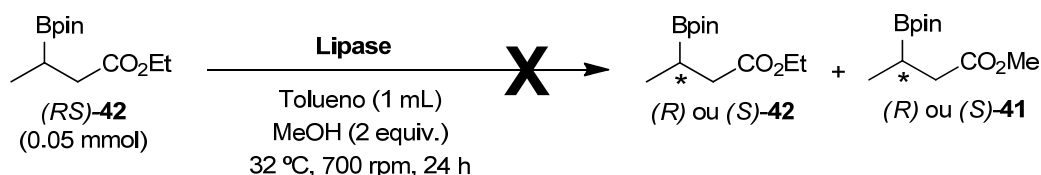
Entrada	R ¹	R ²	Solvente
1	Me	Et	Hexano
2	Me	Et	Tolueno
3	Me	Et	THF
4	Me	Et	Dioxano
5	Me	-	EtOH
6	Et	Me	Hexano
7	Et	Me	Tolueno
8	Et	Me	THF
9	Et	Me	Dioxano
10	Et	-	MeOH
11	Et	<i>n</i> -Bu	Hexano
12	Et	<i>n</i> -Bu	Tolueno
13	Et	<i>n</i> -Bu	THF
14	Et	<i>n</i> -Bu	Dioxano
15	Et	-	<i>n</i> -BuOH
16	<i>n</i> -Bu	Me	Hexano
17	<i>n</i> -Bu	Me	Tolueno
18	<i>n</i> -Bu	Me	THF
19	<i>n</i> -Bu	Me	Dioxano
20	<i>n</i> -Bu	-	MeOH

^a Condições: **41-43** (0,05 mmol), CAL-B (10 mg), solvente (1 mL), R²OH (0,1 mmol)



Aditivo - CaCl₂, ZnCl₂, CoCl₂, CuCl₂, NiCl₂, LiCl, MnCl₂, FeCl₃, AlCl₃, MgCl₂

Esquema 3.2.4.1 – Teste de transesterificação enzimática empregando aditivo.



Lipase - PSC-II, MJL, CRL, MML, PFL, PSD-I, CCL, BCL, PPL

Esquema 3.2.4.2 – Variação de lipases na transesterificação enzimática.

Prestes a darmos por encerrado os testes de transesterificação enzimática, decidimos realizar mais um teste empregando um acréscimo na temperatura da reação; de 32 °C utilizados anteriormente para 70 °C nesta avaliação (Tabela 3.2.4.2). Nesta situação, iniciaram-se os testes empregando o composto **41**, nucleófilos mais volumosos (*n*-BuOH, OctOH e BnOH) e tolueno como solvente. Ao empregar *n*-BuOH como nucleófilo, foi possível observar a formação do produto de transesterificação (**43**), entretanto, devido à baixa conversão (<10%) o valor de e.e. não foi determinado. Quando OctOH e BnOH foram utilizados, não houve a formação dos produtos desejados (entradas 1-3). Com o uso de EtOH, foi observada a formação do produto de transesterificação (**42**) (forma **B**) enantiomericamente puro, enquanto que para o éster remanescente (**41**) (forma **A**) foram observados valores moderados de e.e.. Realizando esta mesma reação em um sistema mais concentrado, observou-se uma elevação tanto na conversão quanto no e.e de (**41**) (entradas 4-5). A continuação dos estudos implicou na substituição do tolueno pelo hexano. Apesar de não ser esperada grande mudança no comportamento da reação, esta troca tinha como principal objetivo facilitar as subsequentes reações de derivatização dos ésteres (oxidação e acetilação), onde era necessária a evaporação do solvente antes de realizar tais derivatizações. De fato, as entradas 6 e 7 demonstram que não houveram mudanças significativas

nos resultados obtidos em decorrência desta troca de solventes; produto **42 (B)** enantiomericamente puro e substrato **41 (A)** com e.e. moderado e conversões de 20-22%. A manutenção da reação por 48 horas propiciou um aumento no e.e. do substrato **41 (A)**, porém detectou-se que o produto **42 (B)** já iniciara um decréscimo de e.e., assim, consideramos este tempo inadequado (entrada 8). O emprego apenas de EtOH para atuar como solvente e nucleófilo não foi eficaz (entrada 9). Mantendo o hexano como solvente e utilizando MeOH ou EtOH como nucleófilos, foi avaliada a extensão da metodologia para os substratos **42-45**, sendo que nestas reações não foram observadas a formação dos produtos de transesterificação (**B**) (entradas 10-16).

Tabela 3.2.4.2 – Transesterificação enzimática de 41-45 a 70 °C.^a

Ent.	Substrato	R ¹	R ² OH (mL)	Conv. ^b	Solvente (mL)	e.e. A ^c	e.e. B ^c
1	41	Me	<i>n</i> -BuOH (0,1)	<10	Tolueno (0,9)	-	-
2	41	Me	OctOH (0,1)	N.o.	Tolueno (0,9)	-	-
3	41	Me	BnOH (0,1)	N.o.	Tolueno (0,9)	-	-
4	41	Me	EtOH (0,1)	16%	Tolueno (0,9)	33%	>99%
5	41	Me	EtOH (0,05)	27%	Tolueno (0,45)	50%	>99%
6	41	Me	EtOH (0,1)	22%	Hexano (0,9)	44%	>99%
7	41	Me	EtOH (0,05)	20%	Hexano (0,45)	43%	>99%
8 ^d	41	Me	EtOH (0,1)	32%	Hexano (0,9)	60%	96%
9	41	Me	-	N.o.	EtOH (1)	-	-
10	42	Et	MeOH (0,1)	N.o.	Hexano (0,9)	-	-
11	43	<i>n</i> -Bu	MeOH (0,1)	N.o.	Hexano (0,9)	-	-
12	44	Oct	MeOH (0,1)	N.o.	Hexano (0,9)	-	-
13	45	Bn	MeOH (0,1)	N.o.	Hexano (0,9)	-	-
14	43	<i>n</i> -Bu	EtOH (0,1)	N.o.	Hexano (0,9)	-	-
15	44	Oct	EtOH (0,1)	N.o.	Hexano (0,9)	-	-
16	45	Bn	EtOH (0,1)	N.o.	Hexano (0,9)	-	-

^a Condições: substrato **41-45** (0,05 mmol), CAL-B (10 mg)

^b Determinado por análise aquiral de CG. N.o. = não observado

^c Determinado por CG equipado com coluna quiral.

^d 48 horas.

A este ponto fica mais clara a razão do aumento da temperatura das reações de hidrólise enzimática, apresentado anteriormente na tabela 3.2.3.5. A obtenção de compostos enantiomericamente puros através da reação enzimática de transesterificação a 70 °C revelou a possibilidade de um comportamento melhor nas reações de hidrólise, caso tivesse a sua temperatura aumentada. Desse modo, os estudos de hidrólise foram retomados e com a repetição das reações.

4. AMINAÇÃO REDUTIVA ASSIMÉTRICA DE CETONAS CONTENDO BORO CATALISADA POR ω -TRANSAMINASES

4.1. Transaminases

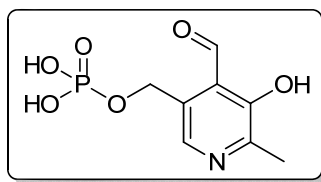
Biologicamente, as transaminases são importantes na produção de vários aminoácidos e na geração de energia no ciclo de Krebs. Várias transaminações acontecem nos tecidos do organismo humano, sendo elas específicas por um par amino/cetoácido. Esta reação é reversível, portanto, determinada pela espécie que está em excesso. Estas enzimas atuam também na excreção de compostos nitrogenados, como amônio, uréia e ácido úrico. Medindo suas concentrações no sangue podem ser diagnosticadas várias doenças, entre elas a indicação de lesões hepáticas.^{1,46}

As transaminases, também conhecidas como aminotransferases (EC 2.6.1.X), pertencem a classe das transferases e catalisam a transferência reversível de um grupo amino ligado a um aminoácido, resultando na formação de um α -cetoácido. Esta transferência é auxiliada pelo grupo prostético piridoxal-5'-fosfato (PLP). Todas as transaminases catalisam o mesmo tipo de reação, porém, apresentam diferentes especificidades.⁴⁷ As ω -transaminases (EC 2.6.1.18), por exemplo, transferem grupos amino que estão separados da carboxila por pelo menos um metileno.

⁴⁶ Voet D.; Voet, J. G.; Pratt, C. W. *Fundamentals of Biochemistry*, John Wiley & Sons, New York, 3rd Ed. **1999**.

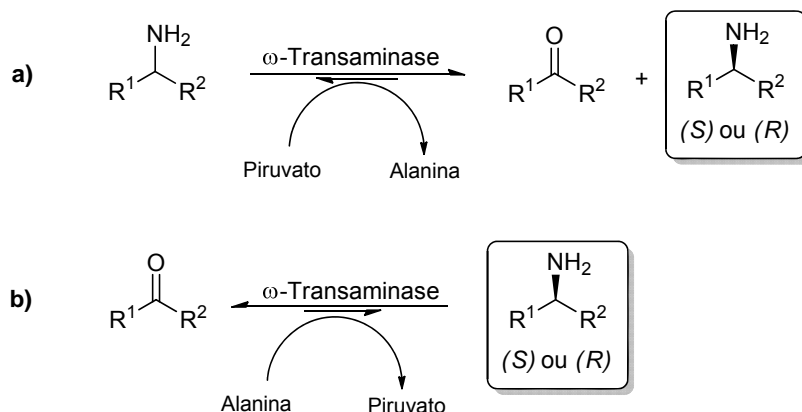
⁴⁷ (a) Koszelewski, D.; Tauber, K.; Faber, K.; Kroutil, W. *Trends in Biotechnology* **2010**, 28, 324-332; (b) Mehta, P. K.; Hale, T. I.; Christen, P. *Eur. J. Biochem.* **1993**, 214, 549-561; (c) Svedendahl, M. Tese de doutorado, **2010**, Royal Institute of Technology, Stockholm, Sweden; (d) Koszelewski, D.; Lavandera, I.; Clay, D.; Rozzell, D.; Kroutil, W. *Adv. Synth. Catal.* **2008**, 350, 2761-2766; (e) Truppo, M. D.; Rozzell, J. D.; Turner, N. J. *Org. Process Res. Dev.* **2010**, 14, 234-237; (f) Tufvesson, P.; Lima-Ramos, J.; Jensen, J. S.; Al-Haque, N.; Neto, W.; Woodley, J. M. *Biotechnol. Bioeng.* **2011**, 108, 1479-1493; (g) Mutti, F. G.; Sattler, J.; Tauber, K.; Kroutil, W. *ChemCatChem* **2011**, 3, 109-111; (h) Mutti, F. G.; Fuchs, C. S.; Pressnitz, D.; Sattler, J. H.; Kroutil, W. *Adv. Synth. Catal.* **2011**, 353, 3227-3233; (i) Koszelewski, D.; Clay, D.; Rozzell, D.; Kroutil, W. *Eur. J. Org. Chem.* **2009**, 2289-2292; (j) Schätzle, S.; Steffen-Munsberg, F.; Thontowi, A.; Höhne, M.; Robins, K.; Bornscheuer, U. T. *Adv. Synth. Catal.* **2011**, 353, 2439-2445; (k) Truppo, M.; Turner, N. J. *Org. Biomol. Chem.* **2010**, 8, 1280-1283; (l) Andrade, L. H.; Silva, A. V.; Milani, P.; Koszelewski, D.; Kroutil, W. *Org. Biomol. Chem.* **2010**, 8, 2043-2051; (m) Clay, D.; Koszelewski, D.; Grischek, B.; Gross, J.; Lavandera, I.; Kroutil, W. *Tetrahedron: Asymmetry* **2010**, 21, 2005-2009.

Figura 4.1.1 – Piridoxal-5'-fosfato (PLP) em sua forma livre

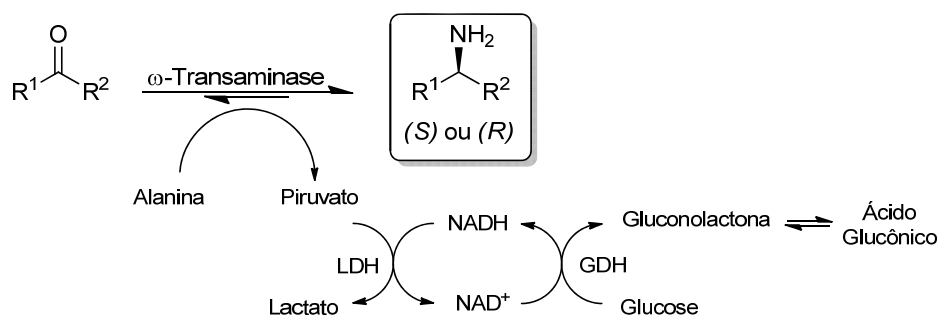


Transaminases podem ser utilizadas na resolução cinética de aminas racêmicas via oxidação enantiosseletiva para obtenção de aminas opticamente puras (Esquema 4.1.1a). Nessa reação é utilizado um composto carbonílico, piruvato, que receberá o grupo amino proveniente da oxidação de um enantiômero da amina racêmica. Tais biocatalisadores também podem ser utilizadas na síntese assimétrica de aminas partindo de cetonas e um doador de grupo amino, por exemplo, a alanina (Esquema 4.1.1b).⁴⁷ Essa reação pode fornecer teoricamente 100% de rendimento da amina desejada, entretanto, ela é uma reação que está em equilíbrio, e este deslocado no sentido da cetona. Uma alternativa eficiente para deslocar o equilíbrio no sentido da formação da amina, é o uso da alanina como doador do grupo amino, pois o co-produto, piruvato, pode ser removido por redução com a enzima lactato desidrogenase (LDH). Para a regeneração do co-fator NADH, utiliza-se um sistema contendo glucose e glucose desidrogenase (GDH) (Esquema 4.1.2). Outra opção para o consumo do piruvato gerado na reação, e assim deslocando o equilíbrio, baseia-se no emprego da alanina desidrogenase (AlaDH). Esta última enzima promove uma aminação redutiva no piruvato, passando por um intermediário imínio, gerando novamente alanina; esta transformação é auxiliada por resíduos ácidos e básicos da estrutura da enzima. Desse modo, o doador do grupo amino está sempre em excesso, deslocando o equilíbrio para o sentido de formação da amina desejada. Nesse caso, o sistema de regeneração do co-fator NADH implica no uso de formato de amônio e a enzima formato

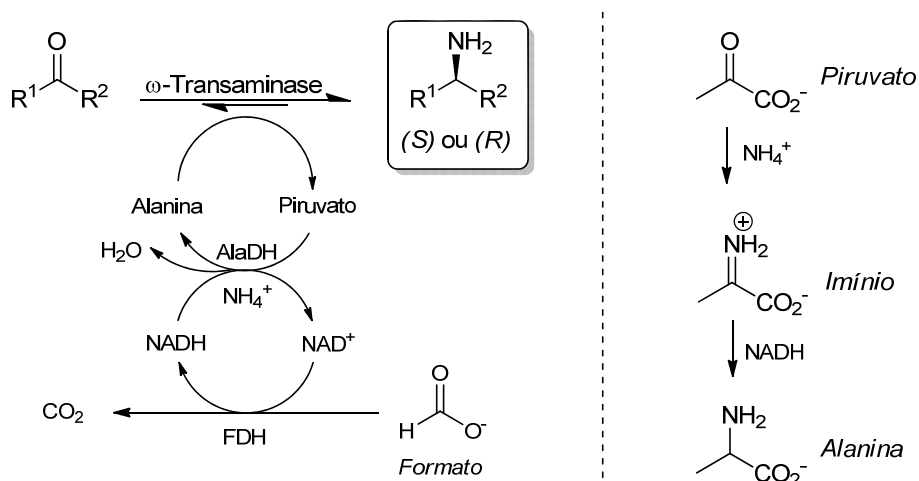
desidrogenase (Esquema 4.1.3).⁴⁸ A regeneração de NADH é efetuada por ser requerido em quantidades estequiométricas, e por tratar-se de um reagente um tanto quanto oneroso.



Esquema 4.1.1 – Síntese de aminas opticamente ativas catalisada por transaminases.



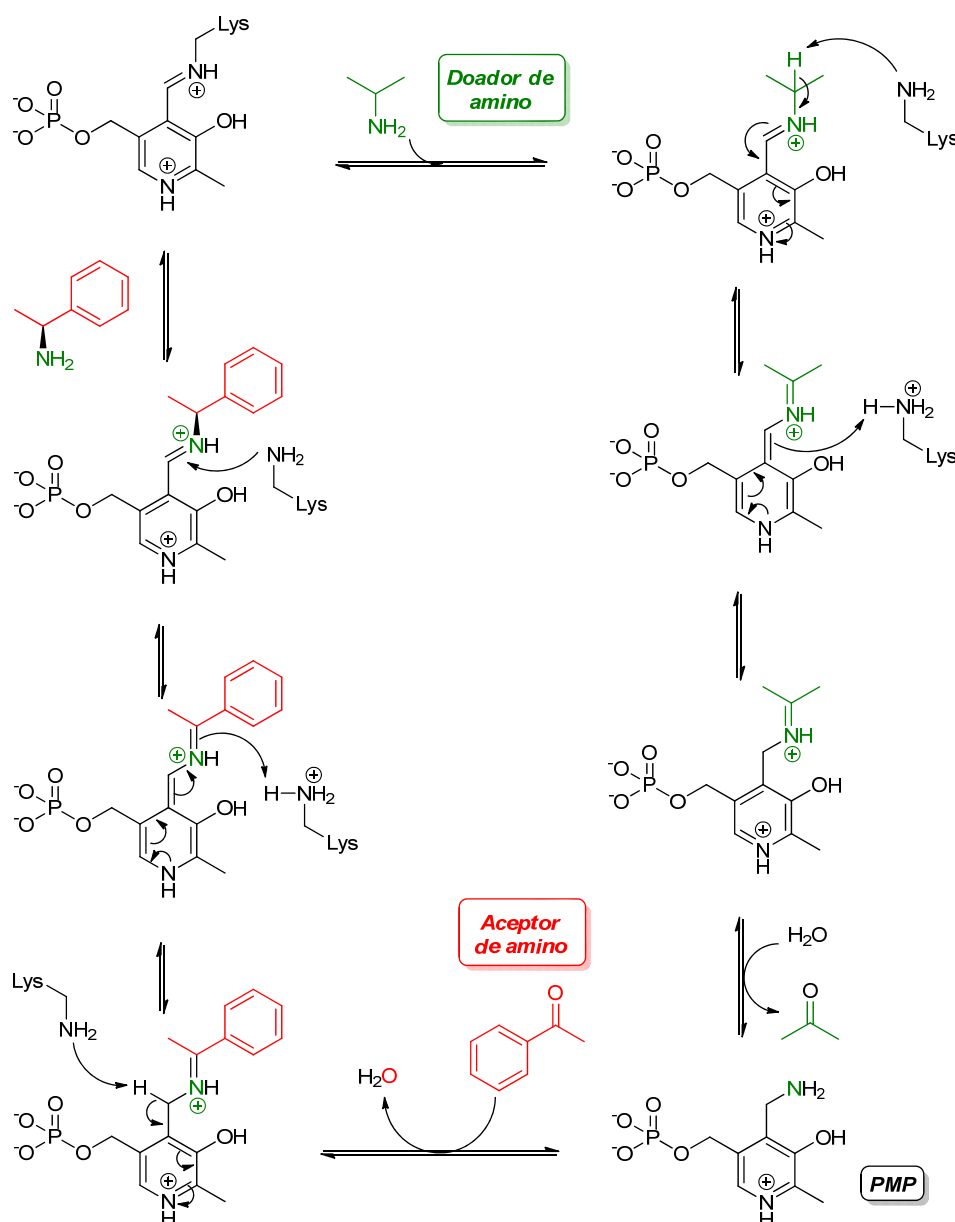
Esquema 4.1.2 – Síntese enzimática de amina quiral. Remoção do piruvato via sistema LDH. Sistema GDH de regeneração do cofator.



Esquema 4.1.3 – Síntese enzimática de amina quiral. Remoção do piruvato via sistema AlaDH. Sistema FDH de regeneração do cofator.

⁴⁸ Koszelewski, D.; Lavandera, I.; Clay, D.; Guebitz, G. M.; Rozzell, D.; Kroutil, W. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, 47, 9337-9340.

As transaminases atuam através de um mecanismo do tipo *ping pong*, sendo que este ocorre em duas etapas. Na primeira etapa o doador de amino reage com o PLP gerando o intermediário piridoxamina fosfato (PMP). Em seguida, o grupo amino é transferido do PMP para um aceptor de amino.^{47,49} O esquema 4.1.4 mostra o mecanismo de ação das transaminases, empregando a isopropilamina como doador de amino e acetofenona como aceptor de amino.



Esquema 4.1.4 – Mecanismo de ação das transaminases.

⁴⁹ (a) Silverman, R. B. *The Organic Chemistry of Enzyme-Catalyzed Reactions*, Academic Press, San Diego, **2000**. (b) Oshima, T.; Tamiya, N. *Biochem J.* **1961**, 78, 116-119.

Aminas quirais são importantes compostos orgânicos devido à sua aplicação na preparação de produtos industriais de relevante interesse. Estima-se que aproximadamente 20% dos fármacos contém um grupo amino ligado a um centro quiral.⁵⁰ Sendo assim, há uma variedade de métodos para a síntese de aminas opticamente ativas, que incluem a manipulação de álcoois e aminoácidos opticamente ativos,⁵¹ uso de auxiliares quirais para indução de assimetria,⁵² e sínteses assimétricas usando bio- ou quimio-catalisadores.⁵³ Com algumas exceções, a síntese assimétrica catalítica de aminas com alta pureza óptica tem sido raramente bem sucedida em uma escala de produção industrial.⁵⁴ Métodos de preparação de aminas quirais são motivos de constante pesquisa na comunidade científica, sobretudo pelo fato destes compostos frequentemente serem utilizados como agentes farmacológicos. A figura 4.1.2 mostra alguns exemplos de fármacos e seus empregos.

⁵⁰ Blacker, A. J.; Stirling, M. J.; Page, M. I. *Org. Process Res. Dev.* **2007**, *11*, 642-648.

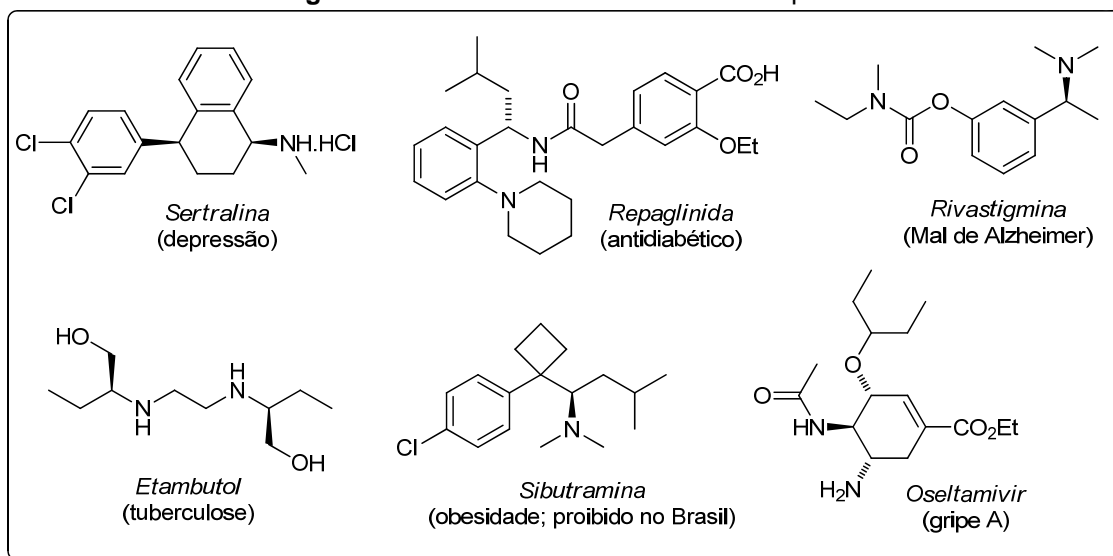
⁵¹ (a) Nugent, T. *Chiral amine synthesis*, Wiley-VHC, Weinheim, **2010**; (b) Coppola, G. M.; Schuster, H. F. *Asymmetric Synthesis, Construction of Chiral Molecules using Amino Acids*; Wiley Interscience; New York **1987**.

⁵² Procter, G. *Asymmetric Synthesis*, Oxford University Press: Oxford **1996**.

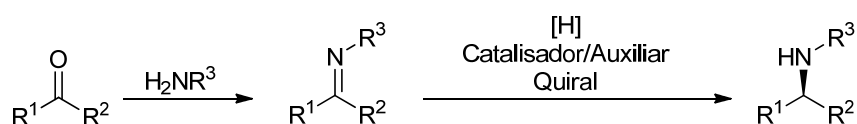
⁵³ Jacobsen, E. N., Pfaltz, A., Yamamoto, H., *Comprehensive Asymmetric Catalysis*; Springer: London **1999**.

⁵⁴ Blaser, H. U.; Schmidt, E. D. *Asymmetric Catalysis on Industrial Scale: Challenges, Approaches and Solutions*; Wiley-VCH: Weinheim **2004**.

Figura 4.1.2 – Fármacos contendo amina quiral.



Dentre os métodos químicos para a síntese de aminas quirais a maioria emprega um auxiliar ou catalisador quiral, sendo que este último pode conter metais de transição. A aminação redutiva enantiosseletiva de cetonas pró-quirais aparece como um dos métodos mais empregados para este fim (Esquema 4.1.5).

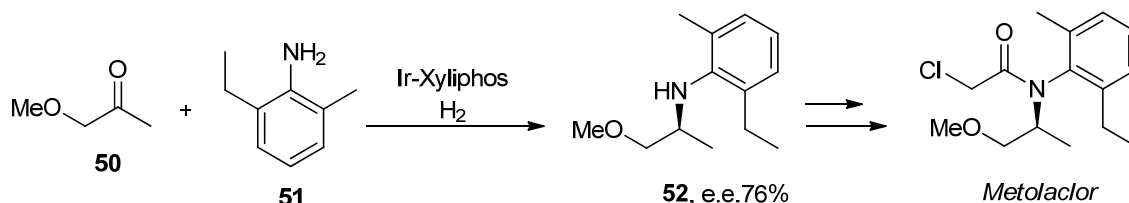


Esquema 4.1.5 – Esquema geral de aminação redutiva enantiosseletiva.

A primeira aminação redutiva assimétrica foi realizada por Blaser e col.⁵⁵ durante o processo industrial de obtenção do herbicida Metolaclor. Na oportunidade foram empregadas a metoxiacetona (**50**) com a 2-metil-5-

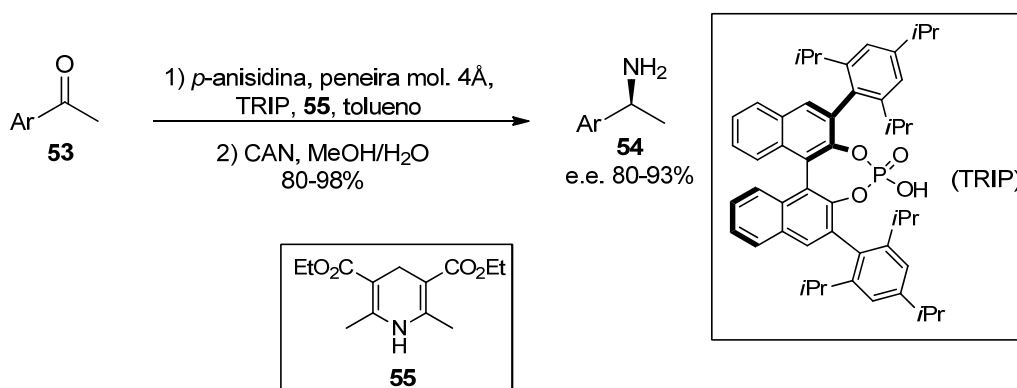
⁵⁵ Blaser, H. U.; Buser, H. P.; Jalett, H. P.; Pugin, B.; Spindler, F. *Synlett* **1999**, 867-868.

etilanilina (**51**) contando com catálise de irídio e uso de auxiliar quiral e obtendo a correspondente amina quiral **52** com e.e. de 76% (Esquema 4.1.6).



Esquema 4.1.6 – Aminação reductiva enantiosseletiva na síntese do Metolaclor.

Em 2005, List e col.⁵⁶ desenvolveram um método de aminação enantiosseletiva empregando catalisador quiral de ácido fosfórico (TRIP) e o éster de Hantzsch (**55**) como fonte de hidrogênio. Este processo foi aplicado a cetonas acrílicas utilizando-se *p*-anisidina como doador de amino e, após a desproteção do nitrogênio com nitrato de cério e amônio (CAN), pôde-se obter as respectivas aminas primárias quirais com alta seletividade (Esquema 4.1.7).

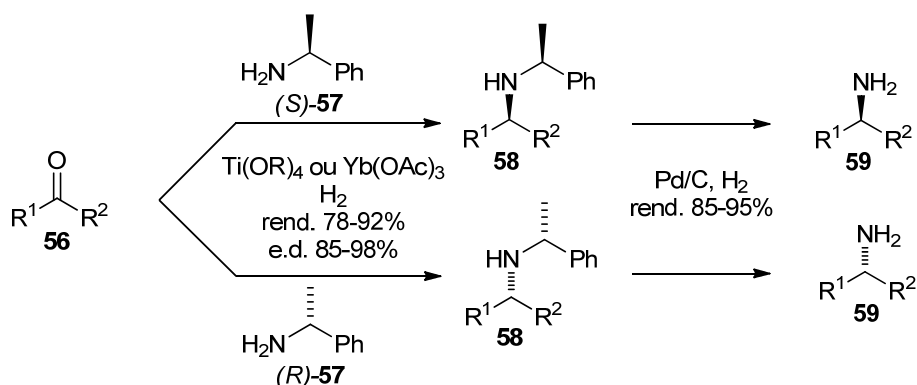


Esquema 4.1.7 – Aminação reductiva assimétrica com doador de H.

Dentro do contexto, a geração de iminas a partir de cetonas pró-quirais (**56**) e uma amina quiral representa uma importante ferramenta sintética. Para este fim, a α -metilbenzilamina (**57**) enantiomericamente pura pode ser

⁵⁶ Hoffmann, S.; Seayad, A. M.; List, B. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 7424-7427.

empregada para a geração de uma imina quiral que por sua vez, sofre o processo de redução com hidrogênio e catalisador metálico (Ti ou Yb, por exemplo) pela face menos protegida, gerando a amina quiral **58** com excelente pureza diastereoisomérica. Por fim, um processo de hidrogenação com Pd/C fornece a correspondente amina quiral livre **59** (Esquema 4.1.8).⁵⁷

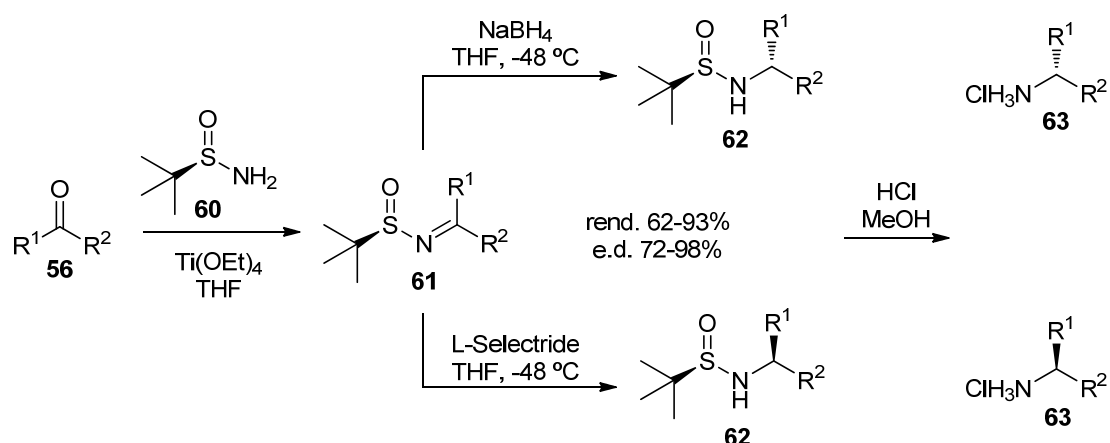


Esquema 4.1.8 – Uso de α -metilbenzilamina como auxiliar quiral para a aminação redutiva.

Utilizando o mesmo conceito de derivados diastereoisoméricos de amina, uma outra opção empregada com sucesso são as sulfinamidas de Ellman. Utilizando a *t*-butilsulfinamida (**60**) como auxiliar quiral e uma cetona (**56**) tem-se a formação da *N*-sulfinilimina (**61**) com uma das faces protegidas pelo grupo *t*-butila que posteriormente é reduzida com $NaBH_4$ ou L-Selectride® (tri-sec-butilboroidreto de lítio) gerando a respectiva *N*-sulfinilamina (**62**) quiral. A correspondente amina primária (forma de cloridrato, **63**) é obtida através da hidrólise do grupo sulfinil, geralmente realizada com HCl em metanol ou dioxano (Esquema 4.1.9).⁵⁸

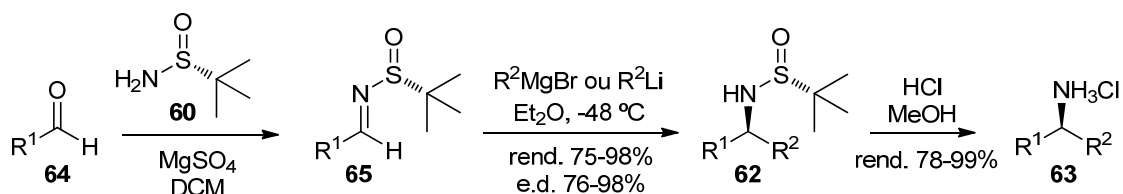
⁵⁷ (a) Nugent, T. C.; El-Shazly, M.; Wakchaure, V. N. *J. Org. Chem.* **2008**, *73*, 1297-1305; (b) Nugent, T. C.; Ghosh, A. K.; Wakchaure, V. N.; Mohanty, R. R. *Adv. Synth. Catal.* **2006**, *348*, 1289-1299; (c) Nugent, T. C.; Wakchaure, V. N.; Ghosh, A. K.; Mohanty, R. R. *Org. Lett.* **2005**, *7*, 4967-4970.

⁵⁸ (a) Tanuwidjaja, J.; Peltier, H. M.; Ellman, J. A. *J. Org. Chem.* **2007**, *72*, 626-629. (b) Borg, G.; Cogan, D. A.; Ellman, J. A. *Tetrahedron Lett.* **1999**, *40*, 6709-6712.



Esquema 4.1.9 – Sulfinamidas de Ellman na preparação de aminas quirais.

Valendo-se do princípio das sulfinamidas de Ellman, pode-se optar pelo uso de aldeídos ao invés de cetonas. Assim, após a geração da *N*-sulfinilimina, pode-se promover a adição de um nucleófilo como reagentes de Grignard de maneira enantiosseletiva. Contando com uma hidrólise na etapa final de reação obtém-se as aminas primárias com altos e.e. (Esquema 4.1.10).⁵⁹

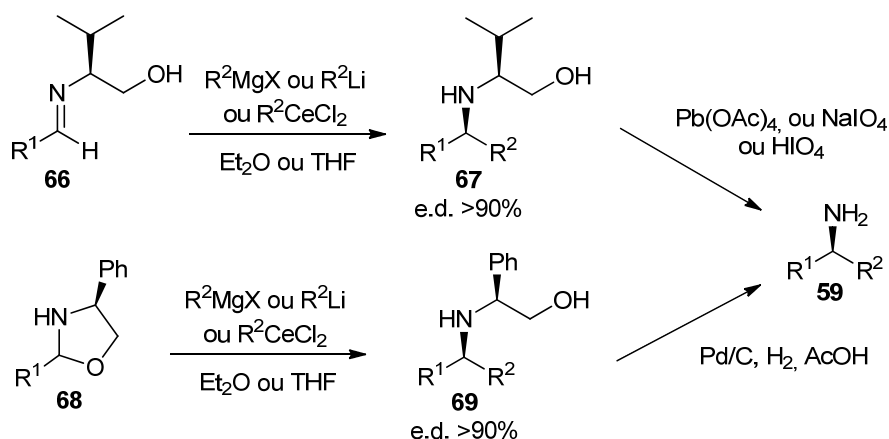


Esquema 4.1.10 – Adição diasterosseletiva a *N*-sulfiniliminas derivadas de aldeídos.

A organocatálise também figura como opção para a preparação de aminas quirais. Um exemplo disto é o protocolo de Takahashi, que emprega valinol ou fenilglicinol como auxiliares quirais e um reagente organometálico como nucleófilo gerando as aminas com alta diasterosseletividade. Posteriores

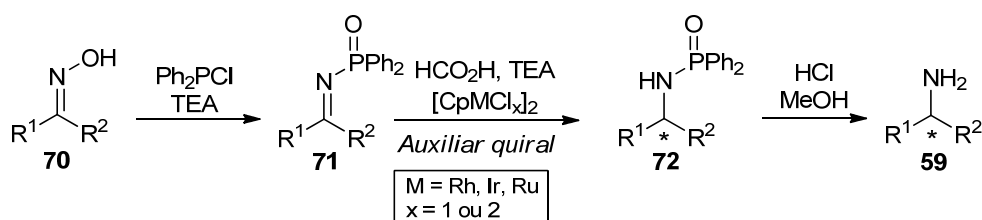
⁵⁹ (a) Cogan, D. A.; Liu, G.; Ellman, J. *Tetrahedron* **1999**, 55, 8883-8904; (b) Liu, G.; Cogan, D. A.; Ellman, J. J. *Am. Chem. Soc.* **1997**, 119, 9913-9914.

transformações como oxidação no caso do valinol e redução no caso do fenilglicinol fornecem a correspondente amina quiral (Esquema 4.1.11).⁶⁰



Esquema 4.1.11 – Valinol e fenilglicinol como auxiliares quirais.

De maneira análoga, a utilização de reagentes de fósforo é uma opção para a preparação de aminas quirais a partir de oximas (**70**). Nesta metodologia, em um primeiro momento ocorre a formação de uma *N*-fosfinoilimina (**71**) que é reduzida de maneira enantiosseletiva com o uso de metais de transição (Rh, Ir, Ru) juntamente com auxiliar quiral. Nesta reação, a fonte de hidrogênio é o ácido fórmico. Posterior hidrólise do grupo fosfinoil leva a geração da amina quiral (Esquema 4.1.12).⁶¹

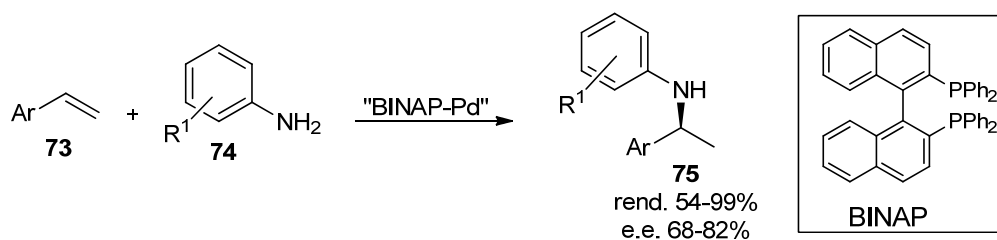


Esquema 4.1.12 – Emprego de grupo fosfinoil na síntese de aminas quirais.

⁶⁰ (a) Takahashi, H.; Chida, Y.; Higashiyama, K.; Onishi, H. *Chem. Pharm. Bull.* **1985**, 33, 4662-4670; (b) Muralidharan, K. R.; Mokhallalati, M. K.; Pridgen, L. N. *Tetrahedron Lett.* **1994**, 35, 7489-7492.

⁶¹ (a) Jennings, W. B.; Lovely, C. J. *Tetrahedron* **1991**, 47, 5561-5568; (b) Wipf, P.; Stephenson, C. R. J. *Org. Lett.* **2003**, 5, 2449-2452.

Auxiliares quirais como o BINAP, em conjunto com espécies de Pd podem ser empregados em reação de hidroaminação via adição de Markovnikov. Através desta metodologia, Hartwig e Hii realizaram a adição de anilinas a alcenos de maneira enantiosseletiva (Esquema 4.1.13).⁶²



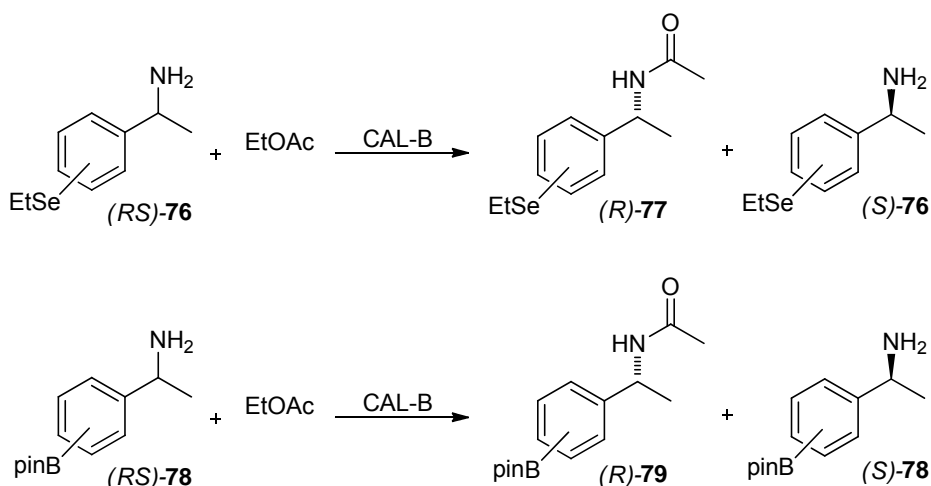
Esquema 4.1.13 – Reação de hidroaminação assimétrica.

Do ponto de vista biocatalítico, além das transaminases, as lipases também desempenham um importante papel na obtenção de aminas quirais.⁶³ Além das resoluções cinéticas através da hidrólise de amida (conforme exemplo mostrado no esquema 3.1.9), tem-se o processo de acilação enantiosseletiva de aminas racêmicas. Como exemplo, podemos citar trabalhos desenvolvidos por nosso grupo de pesquisa que se valeram de lipases na resolução cinética de aminas contendo selênio⁶⁴ ou boro^{23b} (Esquema 4.1.14).

⁶² (a) Kawatsura, M.; Hartwig, J. F. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, 122, 9546-9547; (b) Li, K.; Horton, P. N.; Hursthouse, M. B.; Hii, K. K. *J. Organomet. Chem.* **2003**, 665, 250-257.

⁶³ Höhne, M.; Bornscheuer, U. T. *ChemCatChem* **2009**, 1, 42-51.

⁶⁴ Andrade, L. H.; Silva, A. V. *Tetrahedron: Asymmetry* **2008**, 19, 1175-1181.

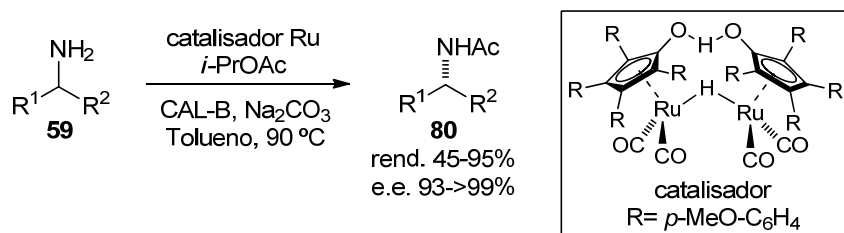


Esquema 4.1.14 – Resoluções cinéticas enzimáticas de amins contendo selênio ou boro desenvolvidas pelo nosso grupo de pesquisa.

A resolução cinética dinâmica é uma alternativa para a síntese de amins quirais, o qual envolve a combinação de uma transformação enantiosseletiva com um processo de racemização *in situ*, fornecendo compostos enantiomericamente puros, com rendimentos de até 100%. A metodologia mais comum envolve uma lipase como biocatalisador e um complexo metal-orgânico como catalisador químico responsável pela racemização do substrato. Alguns exemplos da aplicação deste processo na produção de amins quirais foram descritos por Bäckvall e col.⁶⁵ com o uso de catalizadores de rutênio para o processo de racemização de amins quirais (Esquema 4.1.15). Um outro tipo de catalisador foi pesquisado por Jacobs e col.⁶⁶ no qual paládio em suporte de sais alcalino terrosos, entre eles o Pd/BaSO₄ (5% Pd), apresentou ótimos resultados (e.e. >99%), utilizando H₂.

⁶⁵ (a) Pàmies, O.; Éll, A. H.; Samec, J. S. M.; Hermanns, N.; Bäckvall, J. E. *Tetrahedron Lett.* **2002**, 43, 4699-4702; (b) Paetzold J.; Bäckvall, J. E. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, 127, 17620-17621.

⁶⁶ Parvulescu, A.; Jacobs, P.; De Vos, D. *Chem. Eur. J.* **2007**, 13, 2034-2043.



Esquema 4.1.15 – Resolução cinética dinâmica de aminas desenvolvido por Bäckvall.

Dada a importância que aminas quirais possuem no cenário da química sintética e farmacológica e, atrelado a versatilidade da química de boro, optamos por sintetizar um conjunto de cetonas pró-quirais contendo boro e submeter estes compostos à aminação redutiva assimétrica catalisada por ω -transaminases.

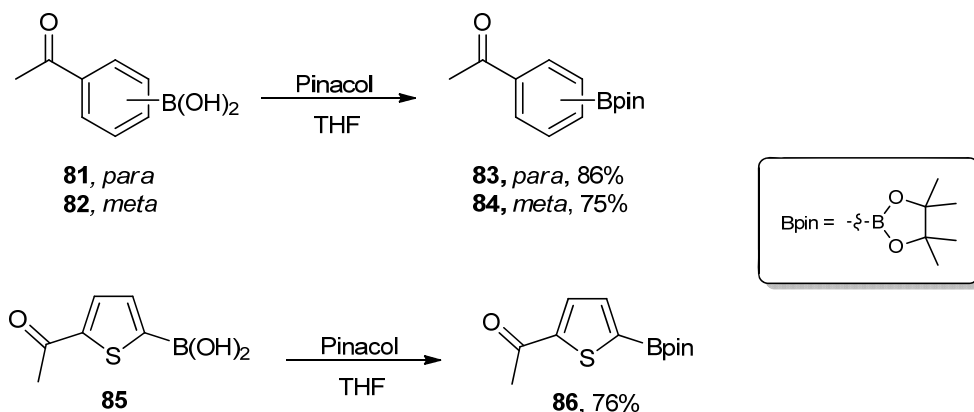
4.2. Resultados e Discussão

Em um primeiro momento, concentrou-se o trabalho na preparação de ésteres borônicos arílicos e heteroarílicos que possuísem o grupo cetona. Esta escolha se deve ao fato de que os correspondentes ácidos borônicos poderiam ser facilmente adquiridos de fontes comerciais. Foram sintetizados ésteres borônicos contendo o grupo pinacol, dada a boa estabilidade deste grupo frente a reações paralelas indesejadas. Em seguida, trabalhou-se na síntese de cetonas contendo o grupo trifluoroborato de potássio.e, simultaneamente na síntese de cetonas alifáticas contendo o éster borônico. Finalmente, desenvolveram-se as reações de aminação redutiva assimétrica, catalisada por ω -transaminases, de cetonas contendo boro. Esta etapa enzimática foi desenvolvida em colaboração com o Prof. Wolfgang Kroutil, na Universidade de Graz, Áustria.

4.2.1. Preparação de cetonas aromáticas contendo grupos borônicos

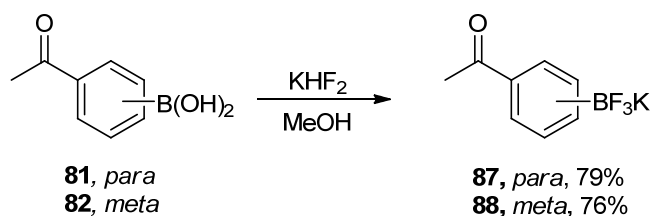
Empregando os derivados *meta* e *para* substituídos do ácido acetilfenilborônico (**81-82**) e pinacol foi possível realizar as esterificações desejadas, obtendo assim os ésteres borônicos **83** e **84**. Geralmente esta transformação é realizada empregando $MgSO_4$ como agente secante, absorvendo a água formada na reação de esterificação, entretanto o solvente da reação (THF) forma um azeótropo com a água e, assim sendo, a simples evaporação do solvente já implica na formação do éster borônico. Vale mencionar também que a entropia do sistema também favorece a reação de esterificação. Utilizando a mesma metodologia, sintetizou-se um éster borônico

derivado de um heterociclo aromático (tiofeno). As sínteses estão mostradas no esquema 4.2.1.1.



Esquema 4.2.1.1 – Esterificação de ácidos borônicos arílicos.

No intuito de variar a função borônica presente nas cetonas, optou-se por sintetizar dois exemplares de organotrifluoroboratos de potássio (Esquema 4.2.1.2). Além da estabilidade conferida ao átomo de boro, o grupo BF_3K aumenta substancialmente a solubilidade do composto em meio aquoso. Este fato poderia vir a ser conveniente uma vez que as reações enzimáticas serão desenvolvidas em meio aquoso, além disso, caso seja conveniente, o grupo BF_3K pode ser convertido novamente em ácido ou éster borônico após o término da reação.



Esquema 4.2.1.2 – Síntese dos organotrifluoroboratos de potássio **87** e **88**.

A razão principal que derivados na posição *orto* não foram sintetizados é a possibilidade de interação dos átomos de boro e oxigênio ou nitrogênio. Interações semelhantes são reportadas na literatura⁶⁷ e este fato poderia influenciar negativamente uma reação de transaminação enzimática.

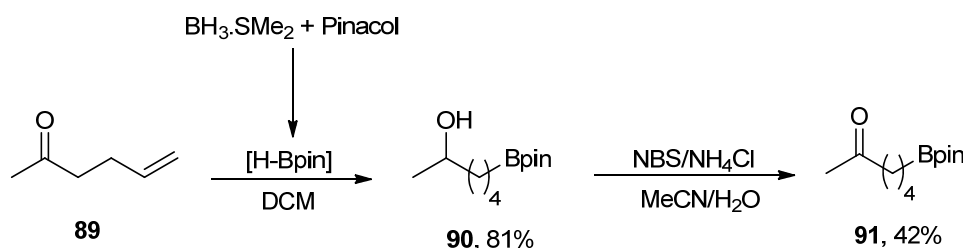
4.2.2. Preparação de cetonas alifáticas contendo éster borônico

De posse das cetonas contendo boro derivadas de sistemas aromáticos, iniciou-se a síntese de derivados alifáticos. Para isto, empregou-se a 5-hexen-2-ona (**89**) e reagiu-se com a pinacolborana gerada *in situ*. Utilizando uma razão de 2,5 equivalentes de borana, em relação a cetona **89**, promoveu-se a redução da carbonila simultaneamente com a reação desejada de hidroboração da ligação dupla. Infelizmente, não foi possível direcionar a reação apenas para a hidroboração. Quando realizamos a proteção da cetona **89** com etilenoglicol e posterior hidroboração observou-se a formação de vários produtos no meio reacional, entre eles o álcool **90**, inferindo-se assim que a condição de hidroboração promove também a desproteção da cetona. O álcool resultante **90** foi submetido a uma oxidação, originando a cetona alifática **91** contendo o éster borônico em sua cadeia (Esquema 4.2.2.1). Vale mencionar que embora o rendimento desta oxidação tenha sido um tanto quanto modesto, empregando o sistema com NBS/NH₄Cl obteve-se mais do que o dobro de rendimento quando comparado com metodologia já existente^{23c}, além de evitar o uso de oxidantes derivados de crômio. Esta metodologia de oxidação já é descrito na literatura⁶⁸ e tem como proposição mecanística uma geração inicial de HCl que reagirá com a NBS. O produto desta reação fará com que cloreto

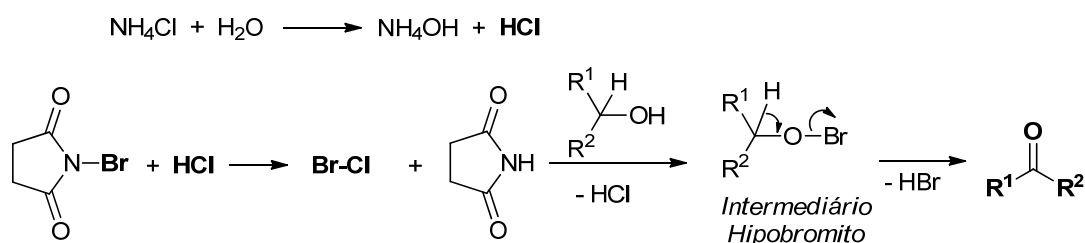
⁶⁷ Xiao, B.; Li, Y.-M.; Liu, Z.-J.; Yang, H.-Y.; Fu, Y. *Chem. Commun.* **2012**, 48, 4854-4856.

⁶⁸ Jain, S. L.; Sain, B. *Synth. Commun.* **2006**, 36, 1459-1462.

de bromo (BrCl) seja gerado *in situ*; este último interage com o álcool formando um intermediário hipobromito, que após a eliminação de HBr gera a correspondente cetona (Esquema 4.2.2.2).



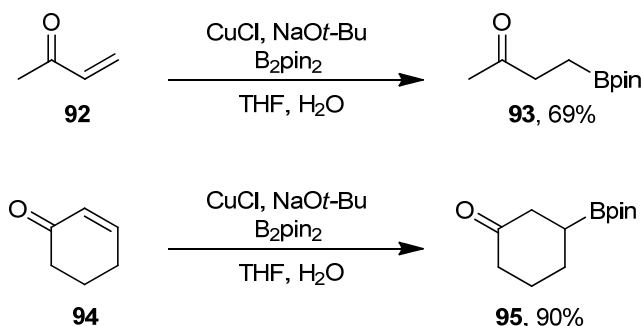
Esquema 4.2.2.1 – Síntese da cetona alifática contendo boro **91**.



Esquema 4.2.2.2 – Mecanismo proposto para oxidação de álcool mediada por NBS/NH₄Cl.

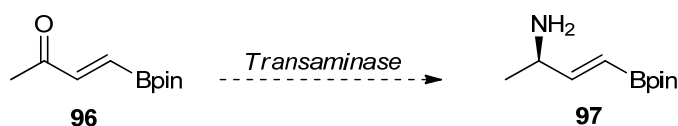
Visando aumentar o conjunto de compostos a serem testados frente a transaminases, foram sintetizados mais dois ésteres borônicos empregando uma catálise de cobre. Esta reação se vale da geração de um nucleófilo de boro seguida de uma adição 1,4 (do tipo Michael) a uma cetona α,β -insaturada (Esquema 4.2.2.3). O protocolo para adição de nucleófilo de boro em compostos carbonílicos já foi discutido anteriormente (Esquema 3.2.1.5), sendo que o empregamos para a síntese de ésteres carboxílicos β -borilados. Desta vez, encontramos na literatura uma modificação no sistema reacional em que não há a utilização de ligante (DPEphos) para complexação do cobre, emprega

água (ao invés de MeOH) como fonte de próton e os tempos reacionais são muito menores.⁶⁹



Esquema 4.2.2.3 – Síntese das cetonas contendo boro **93** e **95** via catálise de cobre.

Uma atenção especial foi dada no intuito de obter a cetona α,β -insaturada contendo boro **96**. Isto se deve ao fato de que, em realizando uma síntese assimétrica de amina catalisada por transaminase, seria obtida uma amina quiral contendo uma ligação dupla de configuração definida (*E*) e ainda ligada ao grupo borônico, o qual pode ser transformado em outras funções orgânicas ou sofrer reação de formação de nova ligação carbono-carbono. Desse modo, a amina **97** representa um interessante intermediário sintético.

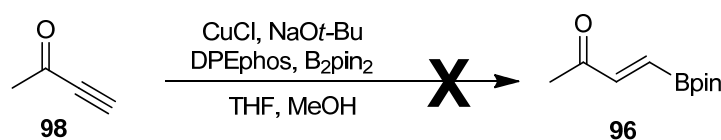


Esquema 4.2.2.4 – Biotransformação da cetona **96**.

Inicialmente, optamos pela metodologia que emprega o uso de ligante (DPEphos) para a adição do nucleófilo de boro em uma alquinona (**98**), e dessa forma sintetizar a cetona **96** (Esquema 4.2.2.5). Após repetir a referida reação

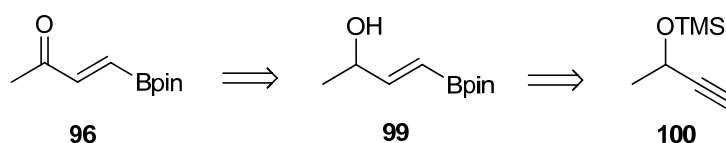
⁶⁹ Chea, H.; Sim, H.-S.; Yun, J. *Bull. Korean Chem. Soc.* **2010**, 31, 551-552.

três vezes e obter apenas traços do produto desejado, resolvemos abandonar esta rota sintética. Coincidentemente, dias depois Yun e col. publicaram um artigo onde atestam que alquinoatos e alquinonas não são substratos adequados para a reação de β -borilação catalisada por cobre.⁷⁰

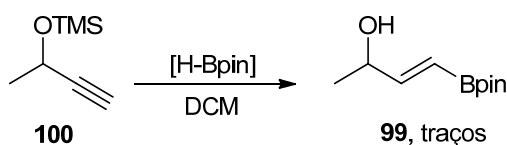


Esquema 4.2.2.5 – Tentativa de β -borilação da alquinona **98**.

A fim de contornar tal contratempo, optamos por uma via sintética mais longa, onde a cetona **96** pudesse ser obtida através de uma oxidação de álcool, que por sua vez seria proveniente da reação de hidroboração de um álcool propargílico protegido com grupo silano (Esquema 4.2.2.6). Quando esta metodologia foi colocada em prática, já na etapa de formação do álcool **99** observou-se apenas traços do produto desejado, inviabilizando assim a síntese da cetona **96** (Esquema 4.2.2.7).



Esquema 4.2.2.6 – Análise retrossintética da cetona **96**.

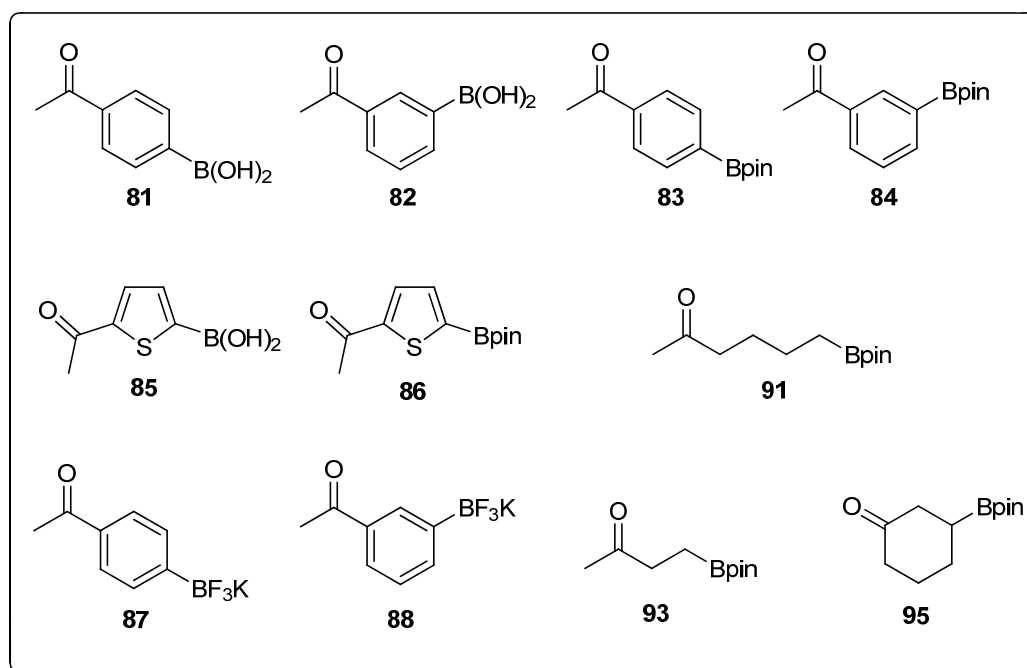


Esquema 4.2.2.7 – Reação de hidroboração do álcool protegido **100**.

⁷⁰ Jung, H.-Y.; Feng, X.; Kim, H.; Yun, J. *Tetrahedron* **2012**, *68*, 3444-3449.

Com as sínteses mostradas acima, e juntamente com os ácidos borônicos comerciais, pôde-se montar um conjunto de cetonas pró-quirais contendo boro a fim de avaliar o emprego dos mesmos em reações catalisadas por transaminases.

Figura 4.2.2.1 - Conjunto de compostos a serem avaliados frente a transaminases.



4.2.3. Reações de aminação redutiva catalisada por ω -transaminases

Inicialmente, avaliou-se um conjunto de ω -transaminases empregando o composto **83** como substrato modelo a fim de encontrar os melhores biocatalisadores para desenvolver a aminação redutiva enzimática. Foram testadas ω -transaminases (*R*)-seletivas de *Arthrobacter* sp., *Aspergillus terreus*, *Hyphomonas neptunium*, bem como (*S*)-seletivas de *Chromobacterium violaceum*, *Bacillus megaterium*, *Pseudomonas fluorescens*, *Paracoccus denitrificans*, *Ralstonia eutropha*, *Pseudomonas putida*, *Arthrobacter citreus* e *Vibrio fluvialis*. As reações foram realizadas em duplicata e, dentre as enzimas avaliadas, somente *Arthrobacter* sp., *Aspergillus terreus*, *Chromobacterium violaceum*, *Pseudomonas fluorescens* e *Arthrobacter citreus* forneceram a amina **101** em conversões baixas a moderadas (21 a 80%). Nesta etapa, a pureza enantiomérica da amina formada não foi medida uma vez que o objetivo era apenas avaliar qual enzima seria eficiente para o propósito. Convém mencionar que, para esta avaliação, foi empregado o sistema AlaDH de remoção do piruvato formado durante a biotransformação juntamente com o sistema FDH de regeneração do cofator (NADH) (Tabela 4.2.3.1).

Visando um acréscimo nas conversões das aminações redutivas, optou-se por uma redução na concentração da cetona **83** (de 50 para 25 mM) e, ao mesmo tempo, avaliamos o uso de diferentes solventes orgânicos como co-solventes. A presença de um solvente orgânico miscível em água contribui para a solubilidade do substrato orgânico (cetona) em solução tampão. Os resultados estão apresentados na tabela 4.2.3.2.

Tabela 4.2.3.1 – Avaliação das ω -transaminases^a

Entrada	ω -transaminase	conversão (%) ^b
1	<i>Arthrobacter</i> sp.	73
2	<i>Aspergillus terreus</i>	80
3	<i>Hyphomonas neptunium</i>	n.o.
4	<i>Chromobacterium violaceum</i>	40
5	<i>Bacillus megaterium</i>	n.o.
6	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	25
7	<i>Paracoccus denitrificans</i>	n.o.
8	<i>Ralstonia eutropha</i>	n.o.
9	<i>Pseudomonas putida</i>	n.o.
10	<i>Arthrobacter citreus</i>	21
11	<i>Vibrio fluvialis</i>	n.o.

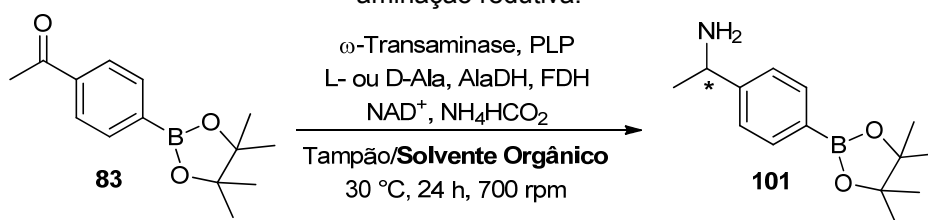
^a Condições: Células liofilizadas de *E. coli* contendo a ω -transaminase superexpressada (20 mg), substrato **83** (50 mM), PLP (1.0 mM), D- ou L-alanina (500 mM), NAD⁺ (1.0 mM), AlaDH (12 U), FDH (11 U), NH₄HCO₂ (150 mM), DMSO (10 vol%), tampão fosfato (100 mM, pH 7), 30 °C, 24 h em Eppendorf Thermomixer® (700 rpm). ^b Determinado por análise aquiral de CG; n.o. = não observada.

Empregando DME como co-solvente, as ω -transaminases (*R*)-seletivas (*Arthrobacter* sp. e *Aspergillus terreus*) mostraram altos valores de conversão enquanto que as enzimas (*S*)-seletivas (*Chromobacterium violaceum*, *Pseudomonas fluorescens* e *Arthrobacter citreus*) forneceram a amina **101** em conversões moderadas ou baixas (entradas 1-5). Quando DMF ou MeOH (entradas 6-15) foram utilizados, conversões similares foram obtidas em comparação com o uso de DME. Além disso, as reações desenvolvidas contando com DMF ou MeOH como co-solvente apresentaram uma pureza óptica > 99% da amina formada. A aminação redutiva assimétrica da cetona **83** usando DMSO como co-solvente também foi avaliada (entradas 16-20). Neste caso, conversões levemente superiores foram obtidas e e.e. >99% da amina

101 foram mantidos. Desse modo, assumimos que, dentre os solventes orgânicos avaliados, o DMSO apresentou-se como melhor opção, bem como a concentração de 25 mM do substrato (cetona) é a mais adequada para a transaminação das cetonas contendo boro. Adicionalmente, a porcentagem de DMSO no meio reacional foi avaliada. Nestes testes, apenas as ω -transaminases que forneceram as melhores conversões foram submetidas aos testes. Embora os e.e. >99% apresentados para a amina formada, o acréscimo para 20% ou 40% de DMSO implicou num decréscimo nos valores de conversão, possivelmente devido à baixa eficiência das ω -transaminases em meio orgânico (entradas 21-26). Deve ser mencionado que nestes últimos testes de porcentagem de solvente orgânico (DMSO) foi empregada a concentração de 250 mM do doador de grupo amino (alanina), entretanto, um estudo de concentração de alanina (Tabela 4.2.3.5) revelou valores de conversões muito similares. Seda assim, pode-se afirmar que esta diferença de concentração não contribui para as baixas conversões obtidas com 20% ou 40% de DMSO.

Ensaio enzimático contando com um aumento de temperatura, a 40 °C, foram realizados, entretanto foram obtidas conversões menores comparando-se com as reações realizadas a 30 °C (Tabela 4.2.3.3). Acredita-se que este aumento de temperatura provoque uma inativação parcial da enzima. Todavia, a enantiosseletividade permaneceu intacta, obtendo a amina **101** com e.e. maiores que 99%.

Tabela 4.2.3.2 – Estudos de diferentes solventes orgânicos e porcentagem empregada na aminação reductiva.^a



Entrada	ω -Transaminase	Solvente Orgânico	Conv. (%) ^b	e.e. 101 (%) ^c
1	<i>Arthrobacter</i> sp.		83	96 (R)
2	<i>Aspergillus terreus</i>		92	>99 (R)
3	<i>Chromobacterium violaceum</i>	DME	59	98 (S)
4	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	(10%)	42	>99 (S)
5	<i>Arthrobacter citreus</i>		2	>99 (S)
6	<i>Arthrobacter</i> sp.		72	>99 (R)
7	<i>Aspergillus terreus</i>		79	>99 (R)
8	<i>Chromobacterium violaceum</i>	DMF	38	>99 (S)
9	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	(10%)	13	>99 (S)
10	<i>Arthrobacter citreus</i>		21	>99 (S)
11	<i>Arthrobacter</i> sp.		74	>99 (R)
12	<i>Aspergillus terreus</i>		82	>99 (R)
13	<i>Chromobacterium violaceum</i>	MeOH	51	>99 (S)
14	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	(10%)	21	>99 (S)
15	<i>Arthrobacter citreus</i>		27	>99 (S)
16	<i>Arthrobacter</i> sp.		89	>99 (R)
17	<i>Aspergillus terreus</i>		92	>99 (R)
18	<i>Chromobacterium violaceum</i>	DMSO	74	>99 (S)
19	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	(10%)	33	>99 (S)
20	<i>Arthrobacter citreus</i>		27	>99 (S)
21	<i>Arthrobacter</i> sp.	DMSO	63	>99 (R)
22	<i>Aspergillus terreus</i>	(20%) ^d	66	>99 (R)
23	<i>Chromobacterium violaceum</i>		35	>99 (S)
24	<i>Arthrobacter</i> sp.	DMSO	22	>99 (R)
25	<i>Aspergillus terreus</i>	(40%) ^d	n.o.	-
26	<i>Chromobacterium violaceum</i>		9	>99 (S)

^a Condições: ω -transaminase (20 mg), substrato **83** (25 mM), L- ou D-alanina (500 mM), PLP (1 mM), NAD^+ (1 mM), AlaDH (12 U), FDH (11 U), NH_4HCO_2 (150 mM), tampão fosfato (pH 7, 100 mM).

^b Determinado por análise aquiral de CG; n.o.= não observada.

^c Determinado por análise quiral de CG após derivatização com $\text{Ac}_2\text{O/Py}$.

^d L- ou D-alanina (250 mM).

Tabela 4.2.3.3 – Reação de transaminação realizada a 40 °C.^a

Entrada	ω -Transaminase	Conv. (%) ^b	e.e. 101 (%) ^c
1	<i>Arthrobacter</i> sp.	75	>99 (R)
2	<i>Aspergillus terreus</i>	73	>99 (R)
3	<i>Chromobacterium violaceum</i>	50	>99 (S)
4	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	33	>99 (S)
5	<i>Arthrobacter citreus</i>	20	>99 (S)

^a Condições: ω -transaminase (20 mg), substrato **83** (25 mM), L- ou D-alanina (500 mM), PLP (1 mM), NAD^+ (1 mM), AlaDH (12 U), FDH (11 U), NH_4HCO_2 (150 mM), tampão fosfato (pH 7, 100 mM).

^b Determinado por análise aquiral de CG.

^c Determinado por análise quiral de CG após derivatização com $\text{Ac}_2\text{O/Py}$.

Conforme já mencionado, há duas principais vias para remoção do piruvato formado no meio reacional: os sistemas AlaDH e LDH. Em nosso estudo, o sistema LDH revelou resultados menos satisfatórios. Na maioria das reações realizadas foi possível detectar uma brusca diminuição nos valores de conversão quando o sistema LDH foi utilizado como alternativa para a aminação redutiva da cetona **83** (Tabela 4.2.3.4).

Tabela 4.2.3.4 – Estudo da remoção de piruvato através do sistema LDH.^a

Entrada	ω -Transaminase	Conv. (%) ^b	e.e. 101 (%) ^c
1	<i>Arthrobacter</i> sp.	58	>99 (R)
2	<i>Aspergillus terreus</i>	81	>99 (R)
3	<i>Chromobacterium violaceum</i>	52	98 (S)
4	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	11	n.d.
5	<i>Arthrobacter citreus</i>	4	n.d.

^a Condições: ω -transaminase (20 mg), substrato **83** (25 mM), L- ou D-alanina (500 mM), PLP (1 mM), NAD^+ (1 mM), LDH (90 U), GDH (15 U), glucose (150 mM), tampão fosfato (pH 7, 100 mM).

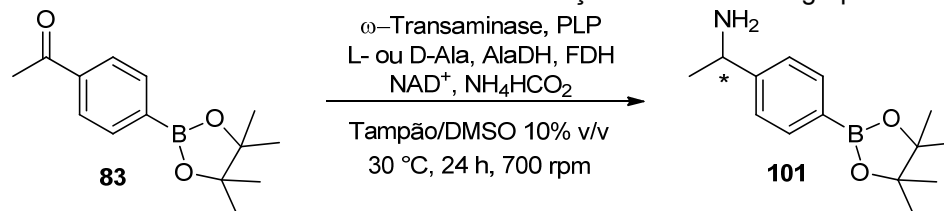
^b Determinado por análise aquiral de CG.

^c Determinado por análise quiral de CG após derivatização com $\text{Ac}_2\text{O/Py}$; n.d.= não determinado

Devido às baixas conversões (menores que 40%) obtidas quando as ω -transaminases de *Pseudomonas fluorescens* e *Arthrobacter citreus* foram aplicadas à reação de aminação redutiva da cetona contendo boro **83**, decidimos por não continuar com o uso destas enzimas para a sequência do estudo. Dentre os parâmetros da reação, a concentração do doador de grupo amino, L- ou D-alanina também foi avaliada. O doador de amino foi testado nas concentrações de 500, 250 e 125 mM, ou seja, 20, 10 e 5 equivalentes, respectivamente, a cetona **83** (Tabela 4.2.3.5). É conveniente lembrar que a D-alanina deve ser usada juntamente com ω -transaminases (*R*)-seletivas enquanto que, ω -transaminases (*S*)-seletivas requerem o uso de L-alanina. Fazendo o uso de concentrações de 500 e 250 mM de alanina nas reações com enzimas (*R*)-seletivas pôde-se observar uma similaridade nos valores obtidos para as conversões (entradas 1-2, 4-5). Já nas reações desenvolvidas com a ω -transaminases de *Chromobacterium violaceum*, foi possível perceber um aumento na conversão quando 10 equivalentes de alanina foram empregados (entradas 3 e 6). Em contrapartida, quando as reações foram realizadas empregando 5 equivalentes do doados de grupo amino, observou-se um decréscimo nas conversões (entradas 7-9). Contudo, independentemente da concentração de alanina utilizada, em todos os casos a amina **101** foi obtida de maneira enantiopura (e.e.>99%). Um estudo análogo de concentração foi realizado com o co-catalisador piridoxal-5'-fosfato (PLP) (Tabela 4.2.3.6). Esta avaliação revelou que tanto a concentração de 0,5 mM bem como 0,1 mM podem ser empregadas ao invés de 1 mM. Embora conversões bastante similares foram obtidas quando 0,5 e 0,1 mM de PLP foram utilizados, optou-se pelo emprego da concentração de 0,5 mM devido a maior facilidade de

manuseio do reagente. Mais uma vez, a amina **101** foi obtida com excelente enantiosseletividade (>99%) independentemente da concentração de PLP.

Tabela 4.2.3.5 – Estudo de diferentes concentrações do doador de grupo amino.^a



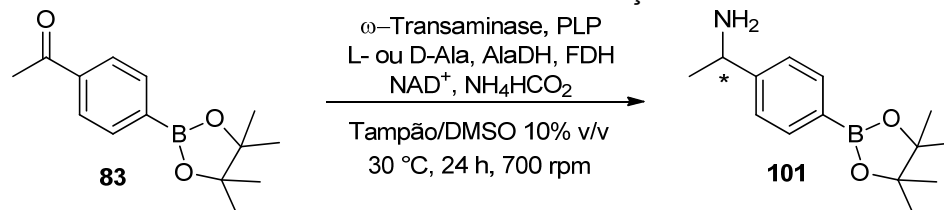
Entrada	ω -Transaminase	[alanina] (mM)	Conv. (%) ^b	e.e. 101 (%) ^c
1	<i>Arthrobacter</i> sp.	500	90	>99 (R)
2	<i>Aspergillus terreus</i>	500	82	>99 (R)
3	<i>Chromobacterium violaceum</i>	500	43	>99 (S)
4	<i>Arthrobacter</i> sp.	250	86	>99 (R)
5	<i>Aspergillus terreus</i>	250	77	>99 (R)
6	<i>Chromobacterium violaceum</i>	250	60	>99 (S)
7	<i>Arthrobacter</i> sp.	125	65	>99 (R)
8	<i>Aspergillus terreus</i>	125	68	>99 (R)
9	<i>Chromobacterium violaceum</i>	125	48	>99 (S)

^a Condições: ω -transaminase (20 mg), substrato **83** (25 mM), L- ou D-alanina, PLP (1 mM), NAD⁺ (1 mM), AlaDH (12 U), FDH (11 U), NH₄HCO₂ (150 mM), tampão fosfato (pH 7, 100 mM).

^b Determinado por análise aquiral de CG.

^c Determinado por análise quiral de CG após derivatização com Ac₂O/Py.

Tabela 4.2.3.6 – Estudo da concentração de PLP.^a



Entrada	ω -Transaminase	[PLP] (mM)	Conv. (%) ^b	e.e. 101 (%) ^c
1	<i>Arthrobacter</i> sp.	1	70	>99 (R)
2	<i>Aspergillus terreus</i>	1	77	>99 (R)
3	<i>Chromobacterium violaceum</i>	1	46	>99 (S)
4	<i>Arthrobacter</i> sp.	0,5	79	>99 (R)
5	<i>Aspergillus terreus</i>	0,5	86	>99 (R)
6	<i>Chromobacterium violaceum</i>	0,5	46	>99 (S)
7	<i>Arthrobacter</i> sp.	0,1	81	>99 (R)
8	<i>Aspergillus terreus</i>	0,1	84	>99 (R)
9	<i>Chromobacterium violaceum</i>	0,1	42	>99 (S)

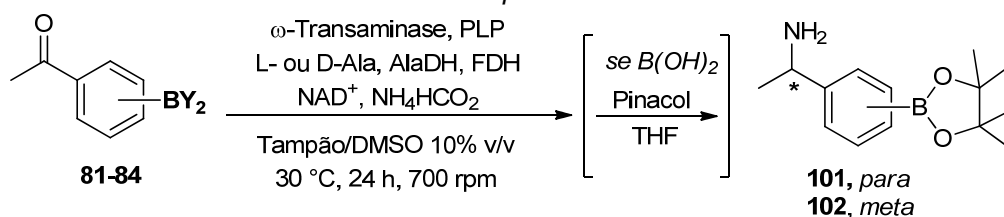
^a Condições: ω -transaminase (20 mg), substrato **83** (25 mM), L- ou D-alanina (250 mM), PLP, NAD⁺ (1 mM), AlaDH (12 U), FDH (11 U), NH₄HCO₂ (150 mM), tampão fosfato (pH 7, 100 mM).

^b Determinado por análise aquiral de CG.

^c Determinado por análise quiral de CG após derivatização com Ac₂O/Py.

Tendo estabelecido um protocolo para a aminação redutiva enzimática, voltou-se a atenção para a aplicação da metodologia para as diferentes cetonas contendo boro. Inicialmente, os derivados *para* e *meta* das cetonas aromáticas contendo ou o grupo ácido borônico (**81-82**) ou o grupo éster borônico (**83-84**) foram submetidos à aminação redutiva assimétrica catalisada por ω -transaminases (Tabela 4.2.3.7). No caso do uso dos derivados de ácidos borônicos **81-82**, após a reação enzimática, foi realizada uma esterificação com pinacol e THF. Desse modo, os valores de conversão foram medidos por análises de CG, considerando as concentrações do correspondente éster borônico.

Tabela 4.2.3.7 – Reação de transaminação para as cetonas aromáticas contendo o grupo borônico em *para* ou *meta*.^a



Entrada	ω -Transaminase	Isômero	-BY ₂	Conv. (%) ^b	e.e.101-102 (%) ^c
1	<i>Arthrobacter</i> sp.	<i>para</i>	-Bpin	94	>99 (R)
2	<i>Aspergillus terreus</i>	<i>para</i>	-Bpin	94	>99 (R)
3	<i>C. violaceum</i>	<i>para</i>	-Bpin	65	>99 (S)
4	<i>Arthrobacter</i> sp.	<i>para</i>	-B(OH) ₂	56	>99 (R)
5	<i>Aspergillus terreus</i>	<i>para</i>	-B(OH) ₂	94	>99 (R)
6	<i>C. violaceum</i>	<i>para</i>	-B(OH) ₂	68	>99 (S)
7	<i>Arthrobacter</i> sp.	<i>meta</i>	-Bpin	62	>99 (R)
8	<i>Aspergillus terreus</i>	<i>meta</i>	-Bpin	5	n.d.
9	<i>C. violaceum</i>	<i>meta</i>	-Bpin	51	98 (S)
10	<i>Arthrobacter</i> sp.	<i>meta</i>	-B(OH) ₂	54	>99 (R)
11	<i>Aspergillus terreus</i>	<i>meta</i>	-B(OH) ₂	4	n.d.
12	<i>C. violaceum</i>	<i>meta</i>	-B(OH) ₂	30	98 (S)

^a Condições: ω -transaminase (20 mg), substrato (25 mM), L- ou D-alanina (250 mM), PLP (0,5 mM), NAD⁺ (1 mM), AlaDH (12 U), FDH (11 U), NH₄HCO₂ (150 mM), tampão fosfato (pH 7, 100 mM).

^b Determinado por análise aquiral de CG.

^c Determinado por análise quiral de CG após derivatização com Ac₂O/Py; n.d.= não determinado

Quando a cetona **83**, contendo o grupo éster borônico na posição *para*, foi submetida ao protocolo de aminação redutiva assimétrica, altas conversões foram obtidas (94%) quando empregadas ω -transaminases (*R*)-seletivas, enquanto que, o uso da enzima (*S*)-seletiva proveniente de *Chromobacterium violaceum* forneceu a amina desejada **101** em uma conversão moderada de 65% (entradas 1-3). Paralelamente, a reação de transaminação revelou resultados similares quando o ácido borônico *para*-substituído **81** foi submetido ao protocolo. Embora a reação catalisada pela ω -transaminase de *Arthrobacter* sp. demonstrou um grande decréscimo na conversão, os outros dois biocatalisadores empregados forneceram aproximadamente as mesmas conversões se comparado ao uso do correspondente éster **83** (entradas 4-6). Nestas reações empregando derivados *para*-substituídos, tanto o grupo éster quanto o grupo ácido borônico, foi possível obter a respectiva amina **101** em excelentes enantiosseletividades (e.e. >99%). Igualmente, ensaios enzimáticos foram realizados com a função borônica na posição *meta*. O ácido borônico **82** bem como o correspondente éster **84** foram submetidos à aminação redutiva, gerando a amina **102**. Ambas as cetonas **82** e **84** revelaram valores de conversões menores comparando-se com os substratos *para*-substituídos (entradas 7-12) No caso do uso de ω -transaminases de *Arthrobacter* sp. e *Chromobacterium violaceum*, foram obtidas apenas conversões moderadas. Além disso, com o uso da enzima de *Chromobacterium violaceum* observou-se um leve decréscimo no valor de e.e. para a amina **102**. A mesma amina **102**, obtida através das reações catalisadas pela ω -transaminase de *Arthrobacter* sp., demonstrou um e.e. >99%. A enzima proveniente de *Aspergillus terreus* forneceu a amina desejada em conversões extremamente baixas. É possível

que o efeito estérico das cetonas *meta*-substituídas contribua negativamente no processo reacional fazendo com que menores valores de conversões sejam observados quando comparado com o caso de substratos *para*-substituídos.

A metodologia de transaminação enzimática também foi aplicada a cetonas contendo o grupo trifluoroborato de potássio em suas estruturas (Tabela 4.2.3.8). A fim de avaliar as conversões através de análises de CG, após a reação enzimática aplicou-se a metodologia desenvolvida por Molander e col.⁷¹ que emprega sílica e pinacol a fim de converter a porção trifluoroborato em éster borônico (Bpin). Assim, as cetonas aromáticas contendo o trifluoroborato nas posições *para* (**87**) e *meta* (**88**) foram submetidas a aminação redutiva enzimática. É importante salientar que nestas reações com o sal borônico não foram utilizados solventes orgânicos como co-solventes, uma vez que os substratos exibiram uma boa solubilidade em meio aquoso (tampão). Para as reações com o substrato **87**, observou-se que as ω-transaminases (*R*)-seletivas forneceram a amina **101** conversões moderadas, enquanto que o catalisador (*S*)-seletivo demonstrou uma conversão muito baixa. Nos três casos a amina **101** foi obtida de maneira enantiopura (entradas 1-3). Por outro lado, quando a cetona **88** foi utilizada como substrato, não foram observadas conversões na amina **102** empregando as três diferentes ω-transaminases (entradas 4-6).

⁷¹ Molander, G. A.; Cavalcanti, L. N.; Canturk, B.; Pan, P.- S.; Kennedy, L. E. *J. Org. Chem.* **2009**, *74*, 7364-7369.

Tabela 2.2.3.8 – Reação de transaminação dos organotrifluoroboratos **87** e **88**.^a

ω -Transaminase, PLP
 L- ou D-Ala, ALDH, FDH
 NAD⁺, NH₄HCO₂
 Tampão
 30 °C, 24 h, 700 rpm

Pinacol
 Sílica
 H₂O

Entrada	ω -Transaminase	-BF ₃ K	Conv. (%) ^b	e.e.101-102 (%) ^c
1	<i>Arthrobacter</i> sp.	<i>para</i>	70	>99 (<i>R</i>)
2	<i>Aspergillus terreus</i>	<i>para</i>	81	>99 (<i>R</i>)
3	<i>Chromobacterium violaceum</i>	<i>para</i>	11	>99 (<i>S</i>)
4	<i>Arthrobacter</i> sp.	<i>meta</i>	n.o.	-
5	<i>Aspergillus terreus</i>	<i>meta</i>	n.o.	-
6	<i>Chromobacterium violaceum</i>	<i>meta</i>	n.o.	-

^a Condições: ω -transaminase (20 mg), substrato (25 mM) L- ou D-alanina (250 mM), PLP (0.5 mM), NAD⁺ (1 mM), ALDH (12 U), FDH (11 U), NH₄HCO₂ (150 mM), tampão fosfato (pH 7, 100 mM).

^b Determinado por análise aquiral de CG; n.o.= não observada

^c Determinado por análise quiral de CG após derivatização com Ac₂O/Py.

A cetona alifática **91** foi submetida as condições de transaminação enzimática (Tabela 4.2.3.9). As ω -transaminases (*R*)-seletivas de *Arthrobacter* sp. e *Aspergillus terreus* forneceram a respectiva amina **103** em altas conversões; 98 e >99%, respectivamente (entradas 1-2). Contudo, quando enzimas de *Chromobacterium violaceum* ou de *Bacillus megaterium* foram empregadas, pôde-se observar apenas conversões baixas (entradas 3-4). Infelizmente, não foi possível determinar os e.e. para a amina **103**. Cabe salientar que o uso da ω -transaminase de *Bacillus megaterium* baseou-se em altas conversões obtidas quando cetonas alifáticas foram submetidas a esta reação, de acordo com a literatura.⁷²

⁷² (a) Koszelewski, D.; Göritzer, M.; Clay, D.; Seisser, B.; Kroutil, W. *ChemCatChem* **2009**, 2, 73-77; (b) Koszelewski, D.; Pressnitz, D.; Clay, D.; Kroutil, W. *Org. Lett.* **2009**, 11, 4810-4812; (c) Hanson, R. L.; Davis, B. L.; Chen, Y.; Goldberg, S. L.; Parker, W. L.; Tully, T. P.; Montana, M. A.; Patel, R. N. *Adv. Synth. Catal.* **2008**, 350, 1367-1375.

Tabela 4.2.3.9 – Transaminação enzimática da cetona alifática **91.^a**

$ \begin{array}{ccc} \text{O} & \omega\text{-Transaminase, PLP} & \text{NH}_2 \\ \parallel & \text{L- ou D-Ala, AlaDH, FDH} & \\ \text{CH}_3\text{---CH}_2\text{---CH}_2\text{---CH}_2\text{---CH}_2\text{---B} & \xrightarrow{\text{NAD}^+, \text{NH}_4\text{HCO}_2} & \text{CH}_3\text{---CH}^*\text{---CH}_2\text{---CH}_2\text{---CH}_2\text{---B} \\ & & \\ \text{O} & & \text{O} \\ \text{91} & & \text{103} \end{array} $		
<p>Tampão/DMSO 10% v/v 30 °C, 24 h, 700 rpm</p>		
Entrada	ω -Transaminase	Conversão (%) ^b
1	<i>Arthrobacter</i> sp.	98
2	<i>Aspergillus terreus</i>	>99
3	<i>Chromobacterium violaceum</i>	27
4	<i>Bacillus megaterium</i>	36

^a Condições: ω -transaminase (20 mg), substrato **91** (25 mM) L- ou D-alanina (250 mM), PLP (0.5 mM), NAD⁺ (1 mM), AlaDH (12 U), FDH (11 U), NH₄HCO₂ (150 mM), tampão fosfato (pH 7, 100 mM).

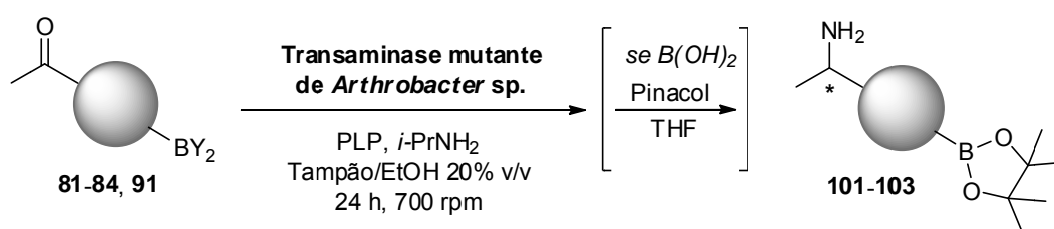
^b Determinado por análise aquiral de CG.

Uma transaminase mutante (*R*)-seletiva de *Arthrobacter* sp. também foi avaliada como alternativa para a aminação redutiva assimétrica de cetonas contendo boro. Esta enzima foi desenvolvida para a transformação de cetonas mais impedidas estericamente.⁷³ Adicionalmente, esta transaminase pode ser usada em temperaturas mais altas (45 °C, por exemplo), não requer o uso de cofator, aceita isopropilamina como doador de grupo amino e tolera uma maior porcentagem de solvente orgânico. Assim sendo, esta enzima modificada foi empregada visando converter as cetonas contendo boro **81-84** e **91** nas suas aminas correspondentes (Tabela 4.2.3.10). Estas reações foram realizadas a 30 e 45 °C, bem como duas diferentes concentrações de substrato (25 e 50 mM) foram avaliadas. Quando utilizada uma concentração de 25 mM de cetona aromática, as reações realizadas a 30 °C forneceram a amina desejada em conversões moderadas a baixas e, aumentando-se a temperatura das reações enzimáticas para 45 °C, observou-se uma forte queda nos valores de conversão. Entretanto, nos casos em que os e.e. foram determinados podê-se

⁷³ Savile, C. K.; Janey, J. M.; Mundorff, E. C.; Moore, J. C.; Tam, S.; Jarvis, W. R.; Colbeck, J. C.; Krebber, A.; Fleitz, F. J.; Brands, J.; Devine, P. N.; Huismann, G. W.; Hughes, G. J. *Science* **2010**, 329, 305-309.

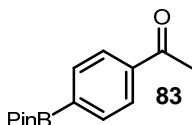
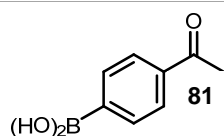
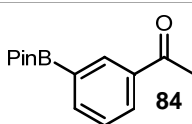
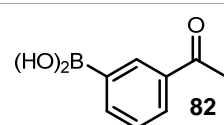
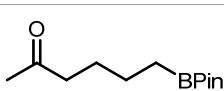
detectar a amina formada com e.e. >99% (entradas 1-8). Curiosamente, para a cetona alifática **91**, a variação de temperatura revelou o efeito contrário, ou seja, obteve-se uma conversão maior na temperatura de 45 °C (entradas 9-10). Empregando os substratos aromáticos em uma concentração de 50 mM, conversões extremamente baixas foram detectadas tanto a temperatura de 30 °C quanto 45 °C (entradas 11-18). Novamente, a cetona alifática **91** revelou resultados superiores em reação com a enzima mutante, embora aquém dos obtidos quando utilizada a concentração de 25 mM (entradas 19-20).

Tabela 4.2.3.10 – Reação catalisada por transaminase mutante de *Arthrobacter* sp..^a



Entrada	Substrato (25 mM)	T (°C)	Conv. (%) ^b	e.e. amina (%) ^c
1		30	23	>99 (<i>R</i>)
2		45	11	n.d.
3		30	45	>99 (<i>R</i>)
4		45	2	n.d.
5		30	18	>99 (<i>R</i>)
6		45	6	n.d.
7		30	19	>99 (<i>R</i>)
8		45	1	n.d.
9		30	25	n.d.
10		45	57	n.d.

Tabela 4.2.3.10 (continuação)

Entrada	Substrate (50 mM)	T (°C)	Conv. (%) ^b	e.e. amina (%) ^c
11	 83	30	4	n.d.
12		45	6	n.d.
13	 81	30	4	n.d.
14		45	1	n.d.
15	 84	30	4	n.d.
16		45	8	n.d.
17	 82	30	6	n.d.
18		45	1	n.d.
19	 91	30	12	n.d.
20		45	44	n.d.

^a Condições : transaminase (20 mg), PLP (0.5 mM), *i*-PrNH₂ (0.5 M), tampão fosfato (pH 8, 100 mM).

^b Determinado por análise aquiral de CG.

^c Determinado por análise quiral de CG após derivatização com Ac₂O/Py; n.d.= não determinado

As conversões das cetonas contendo boro nas correspondentes aminas quirais foram medidas através de cromatografia gasosa equipada com coluna de fase estacionária aquiral. As aminas quirais contendo boro foram acetiladas para determinação do e.e.. Para fins ilustrativos, as figuras abaixo apresentam os cromatogramas comparativos das formas racêmica, (*R*) e (*S*) das aminas **101** e **102** nas suas formas acetiladas (**101**-Ac e **102**-Ac). Utilizou-se a coluna quiral Hydrodex-β-TBDAC (50 m x 0,25 mm x 0,25 μm; Marcerey-Nagel). Para o derivado **101**-Ac: 200 °C por 10 min.; aquecimento até 230 °C a taxa de 1 °C/min; *t_R* (*R*)-**101**-Ac: 35,9 min.; *t_R* (*S*)-**101**-Ac: 36,3 min.. Para o derivado **102**-Ac: 190 °C por 10 min.; aquecimento até 230 °C a taxa de 1 °C/min; *t_R* (*R*)-**102**-Ac: 39,3 min.; *t_R* (*S*)-**102**-Ac: 39,7 min..

Figura 4.2.3.1 – Cromatograma da amina **101 acetilada em suas formas racêmica, (*R*) e (*S*).**

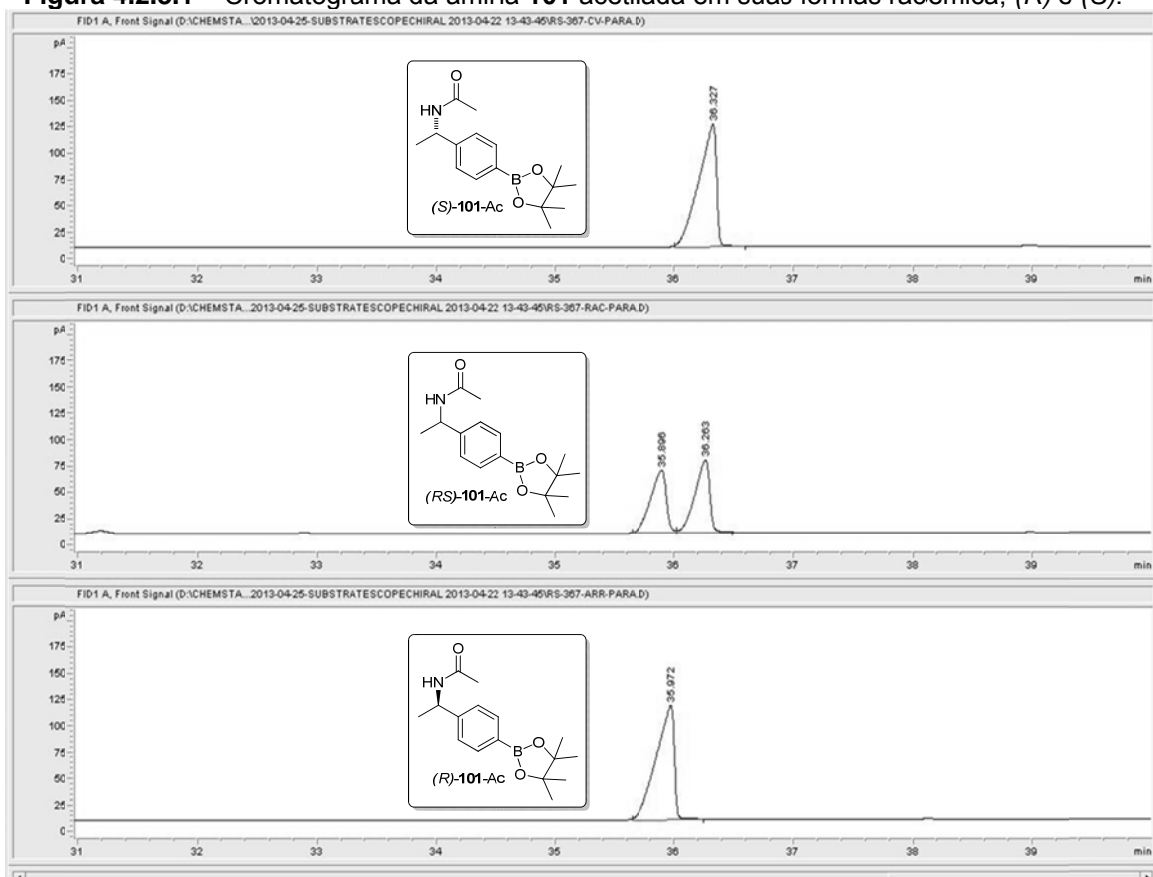
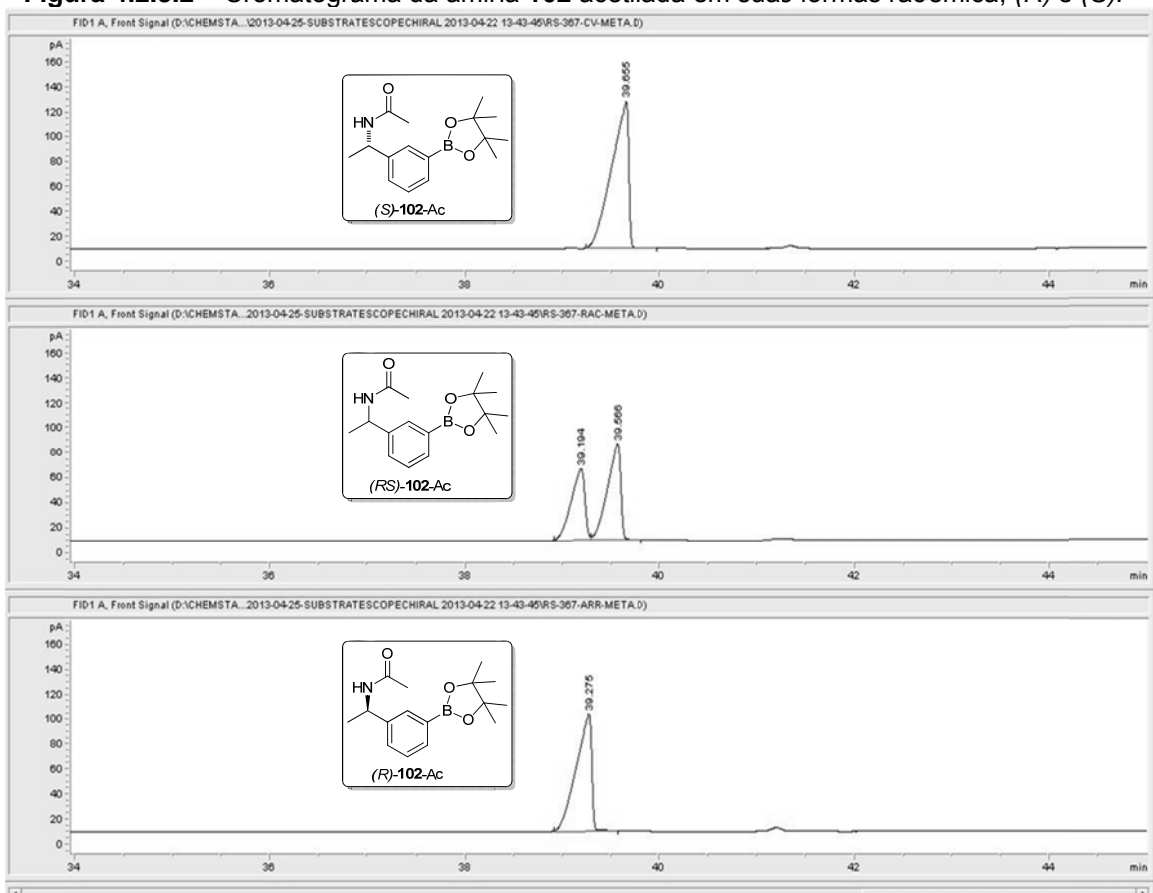


Figura 4.2.3.2 – Cromatograma da amina **102 acetilada em suas formas racêmica, (*R*) e (*S*).**



5. CONCLUSÃO

Os estudos mostrados neste trabalho tiveram como foco principal a preparação de compostos de boro opticamente ativos valendo-se de reações enzimáticas com lipases e ω -transaminases.

Na primeira parte, os estudos com lipases revelaram a possibilidade de desenvolver uma hidrólise enantiosseletiva em ésteres carboxílicos β -borilados realizando assim uma resolução cinética enzimática. Percebemos que grupos volumosos presentes nas estruturas dos ésteres carboxílicos influenciam de maneira negativa o processo da hidrólise enantiosseletiva. Por outro lado, a substituição da carboxila com grupos menores (Me e Et) revelou uma compatibilidade com o sistema reacional desenvolvido. Desse modo, os ésteres substituídos com grupos menos impedidos puderam ser recuperados de maneiras enantiopuras (e.e. >99%) após a hidrólise enzimática, enquanto que os respectivos ácidos carboxílicos, produtos da hidrólise, foram obtidos com e.e. de até 62%. Salienta-se também o desenvolvimento de uma reação de grande valia para a química orgânica sintética utilizando, juntamente com o composto de boro e a lipase, somente água. Alternativamente, avaliou-se também a via de transesterificação enzimática de ésteres β -borilados. Os estudos revelaram que, apesar de se tratar de um processo mais lento, a metodologia representa uma opção para o enriquecimento enantiomérico de em ésteres carboxílicos β -borilados.

Em um segundo momento, cetonas pró-quirais contendo grupos borônicos foram submetidos a aminação redutiva assimétrica catalisada por ω -transaminases. Este estudo revelou que tanto quanto cetonas contendo o grupo éster borônico bem como o grupo ácido borônico ou trifluoroborato de

potássio representam substratos tolerados pela ω -transaminase, sendo assim uma nova via para a obtenção de aminas contendo boro, de configuração (*R*) ou (*S*), enantiomericamente puras. Dentre as enzimas testadas, as ω -transaminases (*R*)-seletivas de *Arthrobacter* sp. e *Aspergillus terreus* forneceram as aminas quirais contendo boro com conversões de até 94% e com um perfeito stereocontrole (e.e. >99%). Os análogos enantiômeros (*S*), fornecidos através da ω -transaminase de *Chromobacterium violaceum*, foram obtidos com conversões menores, porém suas purezas ópticas mantiveram-se intactas (e.e. >99%).

Por fim, estes estudos reforçam o fato de que compostos contendo boro em suas estruturas podem ser substratos adequados a reações enzimáticas. A biotransformação representa uma importante e interessante ferramenta sintética para o preparo de substâncias quirais de boro, os quais podem ser utilizados como blocos de construção de moléculas mais complexas.

6. PARTE EXPERIMENTAL

6.1. Materiais e métodos.

6.1.1 – Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear

Os espectros de RMN ^1H e RMN ^{13}C foram obtidos em espectrômetros Varian Gemini ou Bruker AC, pertencente a Central Analítica do Instituto de Química da USP, operando nas frequências de 200 MHz (para ^1H) e 50 MHz (para ^{13}C). Os deslocamentos químicos (δ) estão apresentados em partes por milhão (ppm) em relação ao tetrametilsilano (TMS utilizado como padrão interno para espectros de RMN ^1H), CDCl_3 ou $\text{DMSO}-d_6$ (para os espectros de RMN ^{13}C), colocando entre parênteses a multiplicidade (s = singleto, d = dubleto, t = tripleto, m = multipletto, q = quarteto, dd = duplo dubleto, dt = duplo tripleto, dq = duplo quarteto), a constante de acoplamento (J) expressa em Hertz (Hz) e o número de hidrogênios deduzidos da integral relativa. Devido a natureza quadrupolar dos isótopos de boro, o átomo de carbono ligado diretamente a este elemento frequentemente não é detectado no espectro de ^{13}C .⁷⁴

6.1.2 – Espectrometria de Massas

Os espectros de massa de baixa resolução foram obtidos em aparelho Shimadzu CGMS-QP5050A equipado com coluna capilar DB-5 (JW Scientific 30 m x 0,25 mm x 0,25 μm) ou em aparelho Agilent 7890A, equipado com coluna capilar HP-5 MS (30 m x 0.25 mm x 0.25 μm), utilizando hélio como gás de arraste. Os espectros de massa de alta resolução foram obtidos em um equipamento LC-MS Bruker Daltonics MicroTOF (Central Analítica – IQUSP).

⁷⁴ Wrackmeyer, B. *Prog. In NMR Spectroscopy* **1979**, 12, 227-259.

6.1.3 – Espectrofotometria no Infravermelho

Os espectros de infra-vermelho foram obtidos em um equipamento FTIR-8300 Shimadzu com faixa de operação entre 350 e 4000 cm^{-1} , utilizando um filme para a análise.

6.1.4 – Cromatografia Gasosa

Para as análises de cromatografia gasosa utilizou-se um cromatógrafo Shimadzu CG-17A, equipado com colunas de fase estacionária aquiral J&W Scientific DB-5 (30 m x 0,25 mm x 0,25 μm) ou fase estacionária quiral Alpha DEXTM 120 α -ciclodextrina (25 m x 0,25 mm x 0,25 μm); Chirasil-DEX CB β -ciclodextrina (25 m x 0,25 mm x 0,25 μm); Gamma DEXTM 120 γ -ciclodextrina (25 m x 0,25 mm x 0,25 μm). Utilizou-se hidrogênio como gás de arraste em uma determinada pressão. Para os estudos desenvolvidos na Universidade de Graz, Áustria, foram utilizados dois cromatógrafos Agilent Technologies modelo 7890A, acoplados a auto-injetores da mesma marca, modelo 7693 e equipados com colunas de fase estacionária aquiral Agilent J&W, DB1701 (30 m x 0,25 mm x 0,25 μm) ou fase estacionária quiral Hydrodex β -TBDAC (50 m x 0,25 mm x 0,25 μm).

6.1.5 – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

Para as análises de cromatografia líquida utilizou-se um cromatógrafo Shimadzu, modelo LC-10AD, equipado com detector de UV. Foram utilizadas colunas com fase estacionária quiral, Chiralcel OJ-H, Chiralcel OD, Chiralcel OD-H, Chiralcel AS-H e Chiralcel AD-H, da marca Daicel[®].

6.1.6 – Agitação Orbital

Utilizou-se agitador orbital Eppendorf Thermomixer Comfort[®].

6.1.7 – Balanças

Utilizou-se duas balanças de alta precisão Mettler Toledo, modelos AG204 e AL204.

6.1.8 – Rota-evaporadores

Para remoção dos solventes orgânicos utilizou-se dois rota-evaporadores Büchi, modelo R-205, sendo cada um acoplado a uma bomba de vácuo de mesma marca, modelo V-513.

6.1.9 – Forno de Destilação Horizontal

Utilizou-se um forno de vidro marca Büchi modelo B-580.

6.1.10 – Bombas de Vácuo

Utilizou-se uma bomba de vácuo Tecnal TE-058 e uma bomba de alto vácuo Edwards modelo RV3.

6.1.11 – pHmetro

Utilizou-se um pHmetro da marca Quimis, modelo Q400A.

6.1.12 – Centrífuga

Utilizou-se centrífuga da marca Genevac, modelo EZ-2 plus, para evaporação de amostras.

6.1.13 – Polarimetria

Os valores de rotação específica foram medidos em um polarímetro Perkin-Elmer 343 utilizando cubeta de 1 dm, sendo que a concentração (c) foi estabelecida em g/100 mL.

6.1.14 – Ponto de Fusão

Os valores de ponto de fusão foram determinados em um aparelho da marca Buchi[®], modelo B-545 não aferido.

6.1.15 – Solventes e Reagentes

Os reagentes e solventes, quando necessário, foram secos e purificados conforme procedimentos descritos na literatura⁷⁵. Os demais reagentes foram obtidos de fontes comerciais e utilizados sem prévia purificação. O THF foi destilado sob sódio e benzofenona, sob atmosfera de nitrogênio.

As colunas cromatográficas foram realizadas utilizando-se sílica gel da marca Acros (0,035 mm - 0,070 mm; diâmetro do poro 6 nm) e cromatofolhas de sílica gel 60 F₂₅₄ para cromatografia em camada delgada, da marca Merck®, que foram observadas em uma câmara com luz UV (254 nm) e reveladas em câmara de iodo e com solução alcoólica de vanilina ou solução de permanganato de potássio.

As células liofilizadas de *E. coli* contendo as ω -transaminases superexpressadas, bem como a L-alanina desidrogenase (AlaDH) foram preparadas e purificadas de acordo com procedimento descrito na literatura.^{71a,76} L-lactato desidrogenase de músculo de coelho (LDH, liofilizada; 136 U/mg de proteína, onde 1 U reduz 1 μ mol de piruvato a L-lactato por minuto em pH 7 e 25 °C) foi adquirida da Sigma-Aldrich (catálogo nº 61309). Glucose desidrogenase (GDH, liofilizada; 25 U/mg de proteína, onde 1 U oxida 1 μ mol de β -D-glucose a D-glucono- δ -lactona por minuto em pH 8 e 37 °C) foi adquirida da X-zyme (catálogo nº B-4). Formato desidrogenase de *Candida boidinii* (solução aquosa tamponada com glicerol, 215 U/mL, onde 1U oxida 1 μ mol de formato a CO₂ por minuto pH 7,6 e 37 °C) foi adquirida da Codexis (catálogo nº FDH 002).

⁷⁵ Armarego, W. L. F.; Chai, C. L. L., *Purification of Laboratory Chemicals*. 5ª ed.; Butterworth-Heinemann: Bodmin, Cornwall, **2003**.

⁷⁶ Mutti, F. G.; Fuchs, C. S.; Pressnitz, D.; Turrini, N. G.; Sattler, J. H.; Lerchner, A.; Skerra, A.; Kroutil, W. *Eur. J. Org. Chem.* **2012**, 2012, 1003-1007.

6.2. Procedimentos Experimentais

6.2.1 – Síntese do éster **34**

Em um balão de 100 mL, de uma boca, munido de condensador de refluxo, adicionou-se o ácido crotônico **32** (56 mmol, 4,81g), metanol (15 mL) e H₂SO₄ concentrado (0,5 mL). Manteve-se a reação sob agitação e refluxo durante 16 horas. Após procedeu-se a extração com solução aquosa 10% de NaHCO₃ (15 mL) e éter etílico (15 mL). Lavou-se a fase orgânica com água (2 x 15 mL), secou-se com MgSO₄, filtrou-se e evaporou-se o solvente. Após secagem sob alto vácuo, obteve-se o produto com pureza suficiente para a próxima etapa reacional. Rendimento: **34**, 3,86 g, 69%; óleo amarelado.

6.2.2 - Síntese dos ésteres **35** e **37**

Em um balão de 100 mL, de uma boca, munido de condensador de refluxo, adicionou-se o ácido carboxílico **32** ou **33** (56 mmol), etanol (15 mL) e H₂SO₄ concentrado (0,5 mL). Manteve-se a reação sob agitação e refluxo durante 16 horas. Após procedeu-se a extração com solução aquosa 10% de NaHCO₃ (15 mL) e éter etílico (15 mL). Lavou-se a fase orgânica com água (2 x 15 mL), secou-se com MgSO₄, filtrou-se e evaporou-se o solvente. Após secagem sob alto vácuo, obteve-se o produto com pureza suficiente para a próxima etapa reacional. Rendimentos: **35**, 4,02 g, 63%; **37**, 6,90 g, 70%; óleos amarelados.

6.2.3 – Síntese do éster **36**

Em um balão de 125 mL, de uma boca, munido de condensador de refluxo, adicionou-se o ácido crotônico **32** (50 mmol, 4,30g), 1-butanol (50 mmol, 3,70 g), H₂SO₄ concentrado (1 mL) e o tolueno (30 mL). Manteve-se a reação sob agitação e refluxo durante 24 horas. Após procedeu-se a extração com solução aquosa 10% de NaHCO₃ (20 mL), solução saturada de NaCl (20 mL) e acetato de etila (30 mL). Lavou-se a fase orgânica com água (2 x 30 mL), secou-se com MgSO₄, filtrou-se e evaporou-se o solvente. Destilou-se o resíduo para remover o excesso de tolueno e purificou-se o produto por coluna cromatográfica utilizando como eluente solução 10% de acetato de etila em hexano. Rendimento: **36**, 3,76 g, 53%; óleo amarelado.

6.2.4 – Síntese do cloreto de ácido **38**

Em um balão de duas bocas, de 50 mL, equipado com condensador de refluxo, sob atmosfera de N₂, adicionou-se o ácido crotônico **32** (50 mmol, 4,30 g) e SOCl₂ (50 mmol, 3,65 mL). Manteve-se a reação sob agitação e refluxo por 15 horas. Destilou-se o resíduo em forno de destilação horizontal sob alto vácuo. Rendimento: **38**, 4,75 g, 91%; líquido incolor.

6.2.5 – Síntese dos ésteres **39** e **40**

Em um balão de duas bocas, de 100 mL, seco e sob atmosfera de N₂, adicionou-se o cloreto de crotonila (**38**) (10 mmol, 1,04g), tolueno (20 mL) e zinco em pó ativado (10 mmol, 0,654 g) e aguardou-se 10 minutos sob agitação e t.a.. Após, adicionou-se uma solução de álcool (10 mmol) octílico ou benzílico em tolueno (20 mL) aguardando-se mais 10 minutos de reação. Em seguida,

procedeu-se a extração da reação adicionando-se solução aquosa saturada de NaHCO_3 (50 mL) e éter etílico (20 mL). Após a separação das fases, lavou-se a fase orgânica com água (50 mL), secou-se com MgSO_4 , e após a filtração, evaporou-se o solvente em rotaevaporador. Purificou-se o resíduo em coluna cromatográfica de gel de sílica, utilizando como eluente uma mistura de hexano e acetato de etila na proporção 9:1. Rendimentos: **39**, 0,93 g, 47%; **40**, 1,07 g, 61%. Óleos amarelos.

6.2.6 – Síntese dos ésteres borônicos **41** a **46**

Em um balão de duas bocas, de 25 mL, seco e sob atmosfera de N_2 , adicionou-se o CuCl (0,09 mmol, 9 mg) recentemente tratado, NaOt-Bu (0,27 mmol, 26 mg), DPEphos (0,09 mmol, 49 mg) e THF (3 mL). Agitou-se a mistura a t.a. por 30 minutos e em seguida adicionou-se o B_2pin_2 (3.3 mmol, 0,838 g) e THF (2 mL). Aguardou-se 10 minutos de agitação a t.a. e adicionou-se o correspondente éster α,β -insaturado (3 mmol) gota a gota, e metanol (12 mmol, 240 μL). Lavou-se a parede do frasco reacional com THF (3 mL) e manteve-se a reação sob agitação a t.a. durante 24 horas. Filtrou-se o conteúdo reacional em funil de placa sinterizada carregado com Celite[®], lavando o leito de Celite[®] com THF (5 x 5 mL). Evaporou-se o solvente e purificou-se o resíduo por coluna cromatográfica utilizando como eluente uma solução 5% de acetato de etila em hexano. Rendimentos: **41**, 0,623 g, 91%; **42**, 0,625 g, 86%; **43**, 0,575 g, 71%; **44**, 0,594 g, 67%; **45**, 0,528 g, 65%; **46**, 0,769 g, 85%. **41-45**, óleos amarelados; **46**, sólido branco, pf = 51-52 °C.

6.2.7 – Oxidação e acetilação dos ésteres **41-46** para determinação de excesso enantiomérico e/ou rotação óptica

Em um balão de 25 mL adicionou-se o éster β -borilado apropriado (0,5 mmol), THF (2,5 mL), água destilada (2,5 mL) e $\text{NaBO}_3 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (2,5 mmol, 0,385 g). Agitou-se vigorosamente a mistura reacional a t.a. por 1 hora e então procedeu-se a extração com acetato de etila (2 x 5 mL). Lavou-se a fase orgânica com solução saturada de NaCl (10 mL) e secou-se com MgSO_4 . Após a evaporação do solvente, tratou-se a mistura com piridina (1 mL) e anidrido acético (0,7 mL) e manteve-se a reação sob agitação a t.a. durante 12 horas. Após, diluiu-se o conteúdo com acetato de etila (10 mL) lavou-se a fase orgânica com solução saturada de CuSO_4 (2 x 10 mL), com solução saturada de NaCl (10 mL) e secou-se com MgSO_4 .

6.2.8 – Hidrólises enzimáticas catalisadas por CAL-B.

Escala analítica: em um tubo de vidro de 10 mL, adicionou-se o éster β -borilado apropriado (0,05 mmol), água ultrapurificada (1 mL) e CAL-B (10 mg). Selou-se o tubo e manteve-se a reação em agitador orbital, a 700 rpm, na temperatura escolhida, por 24 horas. Após este período, retirou-se uma alíquota de 20 μL da reação e diluiu-se esta alíquota em 600 μL de TBME. Utilizou-se 3 μL desta solução para as análises de CG. Nos casos em que houve a necessidade de derivatização para realizar as análises de CG (**42-46**), filtrou-se a CAL-B e na solução resultante adicionou-se 2 mL de THF e NaBO_3 (0,25 g) agitando durante 1h. Procedeu-se a extração com acetato de etila (3 x 5 mL), secou-se a fase orgânica com MgSO_4 e evaporou-se o solvente. Em seguida, ao óleo resultante adicionou-se acetato de etila (1 mL), piridina (0,1

mL) e Ac_2O (0,1 mL) e manteve-se a reação sob agitação durante 12 horas. Utilizou-se o conteúdo destas reações para determinação dos e.e. via análise de CG.

Escala preparativa: Em um tubo de vidro de 100 mL, adicionou-se o éster **41** ou **42** (1 mmol), CAL-B (200 mg) e água ultrapurificada (20 mL). Selou-se o tubo e manteve-se a reação sob agitação magnética, a 70 °C (banho de óleo) durante o período de tempo adequado. Após, decantou-se a lipase lavando-a com TBME (2 x 10 mL) e extraiu-se a solução aquosa com TBME (3 x 10 mL). Separou-se as fases, secou-se a fase orgânica com MgSO_4 e após a evaporação do solvente purificou-se o resíduo por coluna cromatográfica ou CCD preparativa usando como eluente uma mistura de hexano e acetato de etila (8:2). Para determinação do e.e. do ácido **47**, adicionou-se ao balão carregado com o ácido carboxílico (**47**), éter etílico (5 mL) e diazometano (0,5 mL). Manteve-se a reação sob agitação magnética durante 12 horas e após procedeu-se a análise de CG.

6.2.9 – Transesterificações enzimáticas catalisadas por CAL-B.

Em um tubo de vidro de 10 mL, adicionou-se o apropriado éster β -borilado (0,05 mmol), hexano (0,9 mL), CAL-B (10 mg) e o escolhido álcool (0,1 mL). Selou-se o tubo e manteve-se a reação em agitador orbital, a 700 rpm, a temperatura de 70 °C, por 24 horas. Após este período, decantou-se a enzima, lavando-a com THF (2 x 2 mL), evaporou-se o solvente e ao resíduo adicionou-se 2 mL de THF e NaBO_3 (0,25 g) agitando durante 1 hora. Procedeu-se a extração com acetato de etila (3 x 5 mL), secou-se a fase orgânica com MgSO_4 e evaporou-se o solvente. Em seguida, ao óleo resultante adicionou-se acetato

de etila (1 mL), piridina (0,1 mL) e Ac_2O (0,1 mL) e manteve-se a reação sob agitação durante 12 horas. Utilizou-se o conteúdo destas reações para determinação dos e.e. via análise de CG.

6.2.10 – Síntese dos ésteres borônicos **83**, **84** e **86**

Em um balão de uma boca, de 100 mL, contendo o ácido borônico adequado (5 mmol) e pinacol (5 mmol, 0,59 g) adicionou-se THF anidro (25 mL) e, após a solubilização de todos os reagentes, evaporou-se o solvente sob pressão reduzida (rotaevaporador). Repetiu-se a adição e evaporação da mesma quantidade de THF mais duas vezes. Em seguida, purificou-se o bruto reacional em uma rápida coluna cromatográfica de gel de sílica, utilizando como eluente uma mistura de hexano e acetato de etila na proporção 4:1. Rendimentos: **83**, 0,92 g, 75%; **84**, 1,05 g, 86%; **86**, 0,95 g, 76%. **83**, sólido branco, p.f.: 66-68 °C; **84**, sólido branco, p.f.: 50-52 °C.

6.2.11 – Síntese dos organotrifluoroboratos de potássio **87** e **88**

Em um balão de uma boca, de 50 mL, contendo o ácido borônico adequado (6,1 mmol, 1,0 g) adicionou-se MeOH (10 mL) e resfriou-se o sistema a 0 °C. Em seguida, adicionou-se uma solução de KHF_2 (31 mmol, 2,41 g) em água (7 mL). Agitou-se a mistura reacional por 2 horas, a 0 °C, e evaporou-se (rotaevaporador) a reação até a secura. A este sólido bruto, adicionou-se acetona quente (3 x 20 mL) e filtrou-se a solução para remover os sais inorgânicos. Através de evaporação em chapa de aquecimento, reduziu-se o volume da solução a metade. Adicionou-se éter etílico (10 gotas) e manteve-se o conteúdo em um béquer acomodado em banho de gelo. Após a

precipitação do sólido branco, filtrou-se o mesmo com auxílio de funil de Büchner. Secou-se o sólido em bomba de alto vácuo. Rendimentos: **87**, 1,04 g, 76%; **88**, 1,09 g, 79%.

6.2.12 – Síntese do álcool alifático **90**

Em um balão de 100 mL, de 2 bocas, seco, sob atmosfera de N₂, adicionou-se pinacol (15 mmol, 1,77 g) e DCM anidro (10 mL). Resfriou-se o sistema a 0 °C, adicionou-se lentamente uma solução de BH₃.SMe₂ (5 M, 15 mmol, 3 mL) e manteve-se a reação por 3 horas a 0 °C. Em seguida, adicionou-se a 5-hexen-2-ona (**89**) (5 mmol, 0,49 g) gota a gota e manteve-se a reação por 24 horas a t.a.. Após, transferiu-se o conteúdo reacional para um funil de extração e adicionou-se solução aquosa saturada de NH₄Cl (40 mL) e éter etílico (20 mL). Separou-se as fases, lavou-se a fase orgânica com solução aquosa saturada de NaCl (40 mL) e secou-se a fase orgânica com MgSO₄. Após a evaporação do solvente, purificou-se o resíduo em coluna cromatográfica de gel de sílica utilizando como eluente uma mistura de hexano e acetato de etila na proporção 4:1. Rendimento: **90**, 0,92 g, 81%.

6.2.13 – Síntese da cetona contendo boro **91**

Em um balão de 100 mL adicionou-se o álcool **90** (5 mmol, 1,14 g), NH₄Cl (9 mmol, 0,48 g), 25 mL de uma mistura de MeCN e água destilada na proporção de 7:3, respectivamente, e por fim NBS (7,5 mmol, 1,33 g) recentemente recristalizada. Após 30 minutos de reação, verificou-se (CCD) a ausência do álcool e então procedeu-se a extração com DCM (2 x 20 mL) e solução aquosa saturada de NaHCO₃ (20 mL). Após a evaporação do solvente,

purificou-se o resíduo em coluna cromatográfica de gel de sílica utilizando como eluente uma mistura de hexano e acetato de etila na proporção 9:1. Rendimento: **91**, 0,47 g, 42%.

6.2.14 – Síntese das cetonas contendo boro **93** e **95**

Em um balão de 50 mL, de 2 bocas, seco, sob atmosfera de N₂, adicionou-se CuCl (0,15 mmol, 15 mg) recentemente tratado, NaOt-Bu (0,15 mmol, 14,4 mg), THF anidro (2,4 mL) e manteve-se a reação sob agitação, a t.a., por 10 minutos. Após, adicionou-se B₂pin₂ (3,3 mmol, 0,838 g) e THF anidro (1,8 mL). Aguardou-se mais 10 minutos de reação e adicionou-se a cetona α,β -insaturada adequada (3 mmol), THF anidro (1,8 mL) e água destilada (2,9 mL). Após 1 hora de reação, procedeu-se a extração com solução aquosa saturada de NaCl (10 mL) e acetato de etila (2 x 10 mL). Separou-se as fases, secou-se a fase orgânica com MgSO₄. e purificou-se o resíduo em coluna cromatográfica de gel de sílica utilizando como eluente uma mistura de hexano e acetato de etila na proporção 4:1. Rendimentos: **93**, 0,4 g, 69%; **95**, 0,6 g, 90%.

6.2.15 – Aminoação redutiva assimétrica de cetonas contendo boro catalisada por ω -transaminase

Em um microtubo de 2 mL, células liofilizadas de *E. coli* contendo a correspondente ω -transaminase superexpressada (20 mg) foram reidratadas em tampão de fosfato de potássio (pH 7, 100 mM) contendo PLP (0,5 mM), NAD⁺ (1,0 mM), formato de amônio (150 mM), FDH (11U), AlaDH (12U) e D- ou L-alanina (250 mM) a t.a. por 30 minutos. Adicionou-se o substrato (25 mM,

dissolvido em 100 μL de DMSO), selou-se o tubo e manteve-se a aminação redutiva a 30 $^{\circ}\text{C}$, em agitação orbital (700 rpm) por 24 horas. Após, adicionou-se solução aquosa saturada de Na_2CO_3 (200 μL) e procedeu-se a extração com acetato de etila (2 x 500 μL). Secou-se as fases orgânicas combinadas com Na_2SO_4 e utilizou-se alíquota deste conteúdo para análises de CG.

6.2.16 – Conversão das aminas contendo a função ácido borônico nos respectivos ésteres borônicos **101-102** após reação enzimática

As reações enzimáticas foram realizadas conforme descrito no item 6.2.15. Após a reação, evaporou-se a água através de centrifugação sob vácuo e aquecimento por 90 minutos. Lavou-se o sólido resultante com THF (4 x 500 μL) filtrando-se o conteúdo em Celite. Adicionou-se pinacol (1,05 equiv.) e evaporou-se o THF através de centrifugação sob vácuo e aquecimento. Repetiu-se a adição (1,5 mL) e evaporação de THF mais duas vezes. Diluiu-se conteúdo final em acetato de etila para posteriores análises de CG.

6.2.17 – Conversão das aminas contendo a função trifluoroboratos nos respectivos ésteres borônicos **102-102** após reação enzimática

As reações enzimáticas foram realizadas de acordo com item 6.2.15, utilizando-se adicionais 100 μL de tampão ao invés de DMSO. Após o tempo reacional, centrifugou-se a mistura bruta e transferiu-se o sobrenadante para um balão de 20 mL, sob atmosfera de argônio, carregado com pinacol (1,05 equiv.) e sílica (1,3 equiv.). Após 2 horas de agitação magnética procedeu-se a extração com acetato de etila (2 x 2 mL). Secou-se as fases orgânicas

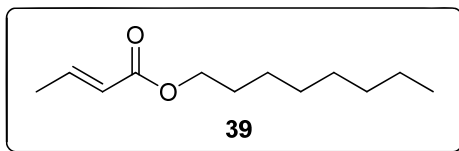
combinadas com Na_2SO_4 e utilizou-se alíquota deste conteúdo para análises posteriores de CG.

6.2.18 – Acetilação das aminas contendo boro **101-102**

Em um microtubo de 2 mL contendo o éster aminoborônico **101-102**, proveniente da biotransformação, dissolvido em acetato de etila adicionou-se piridina (50 μL) e anidrido acético (50 μL). Manteve-se a reação de acetilação em agitação orbital (700 rpm), a 30 °C, durante 12 horas. Após, adicionou-se solução aquosa saturada de NH_4Cl (500 μL) e separou-se as fases orgânica e aquosa. Secou-se a fase orgânica com Na_2SO_4 e utilizou-se alíquota deste conteúdo para determinação de e.e. através de análises de CG.

6.3. Dados analíticos

6.3.1 – (*E*)-but-2-enoato de octila (**39**)



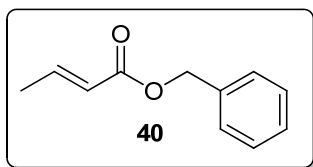
RMN ¹H (200 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 6,96 (dq, *J* = 15,6 e 6,8 Hz, 1H), 5,84 (dq, *J* = 15,6 e 1,6 Hz, 1H), 4,03 (m, 2H), 1,88 (dd, *J* = 6,8 Hz e 1,6 Hz, 3H), 1,34-1,20 (m, 8H), 1,05-0,85 (m, 7H).

RMN ¹³C (50 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 166,7; 144,2; 122,8; 66,5; 38,7; 30,4; 28,9; 23,8; 22,9; 17,9; 14,0; 10,9.

IV-TF (filme) ν_{max} = 3052, 2960, 1723, 1660, 1265, 1181, 969 cm⁻¹.

CG-EM [*m/z* (%)] = 199(1) [*M*⁺ + 1], 183(1), 112(54), 85(21), 84(31), 69(100), 57(41).

6.3.2 – (*E*)-but-2-enoato de benzila (**40**)



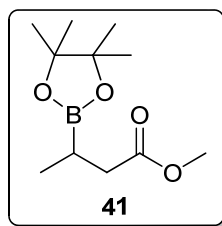
RMN ¹H (200 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 7,42-7,30 (m, 5H), 7,02 (dq, *J* = 15,6 e 7 Hz, 1H), 5,89 (dq, *J* = 15,6 e 1,8 Hz, 1H), 5,17 (s, 2H), 1,88 (dd, *J* = 7 e 1,8 Hz, 1H).

RMN ¹³C (50 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 166,2; 145,1; 136,1; 128,4; 128,1; 128,1; 122,4; 65,9; 18,0.

IV-TF (filme) ν_{max} = 3033, 2946, 1721, 1658, 1264, 1174, 1014, 969, 697 cm⁻¹.

CG-EM [*m/z* (%)] = 176(10) [*M*⁺], 131(32), 107(13), 91(74), 77(15), 69(100), 51(13), 41(31).

6.3.3 – 3-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)butanoato de metila (**41**)



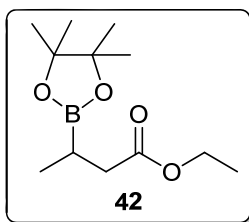
RMN ^1H (200 MHz, CDCl_3): δ (ppm) 3,65 (s, 3H); 2,45 (dd, $J = 16,4$ e $7,8$ Hz, 1H); 2,36 (dd, $J = 16,4$ e $6,6$ Hz, 1H) 1,40-1,30 (m, 1H); 1,24 (s, 12H); 1,00 (d, $J = 7,2$ Hz, 3H).

RMN ^{13}C (50 MHz, CDCl_3): δ (ppm) 174, 2; 83,1; 51,3; 37,4; 24,6; 24, 6; 15, 0.

IV-TF (filme) $\nu_{\text{max}} = 2978, 1738, 1371, 1320, 1204, 1144, 1012, 859, 670 \text{ cm}^{-1}$.

CG-EM [m/z (%)] = 228(1) [M^+], 213(21), 170(89), 128(74), 127 (64), 112(61), 101(12), 83(84), 59(100), 41(93).

6.3.4 – 3-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)butanoato de etila (**42**)



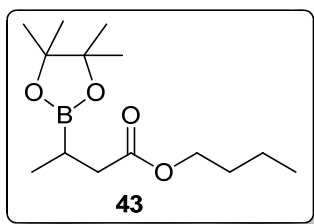
RMN ^1H (200 MHz, CDCl_3): δ (ppm) 4,12 (q, $J = 7,2$ Hz, 2H); 2,44 (dd, $J = 16,4$ e $7,8$ Hz, 1H); 2,34 (dd, $J = 16,4$ e $7,8$ Hz, 1H) 1,42-1,30 (m, 1H); 1,29-1,20 (m, 15H); 1,00 (d, $J = 7,4$ Hz, 3H).

RMN ^{13}C (50 MHz, CDCl_3): δ (ppm) 173,8; 83,0; 60,1; 37,6; 24,6; 24,6; 15,0; 14,2.

IV-TF (filme) $\nu_{\text{max}} = 2978, 1735, 1370, 1319, 1144, 1032, 857, 670 \text{ cm}^{-1}$.

CG-EM [m/z (%)] = 242(1) [M^+], 227(12), 184(70), 141(50), 127(12), 113(50), 101(12), 83(100), 59(39), 41(88).

6.3.5 – 3-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)butanoato de butila (**43**)



RMN ^1H (200 MHz, CDCl_3): δ (ppm) 4,06 (t, $J = 6,5$ Hz, 2H); 2,43 (dd, $J = 16,4$ e 7,6 Hz, 1H); 2,34 (dd, $J = 16,4$ e 6,8 Hz, 1H), 1,68-1,52 (m, 2H); 1,42-1,28 (m, 3H); 1,24 (s, 12H); 1,00 (d, $J = 7,4$ Hz, 3H); 0,92 (t, $J = 7,2$ Hz, 3H).

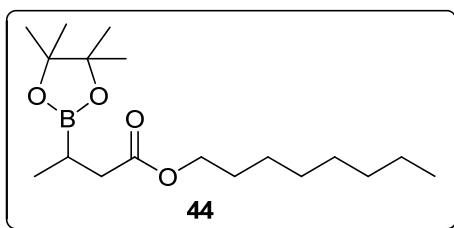
RMN ^{13}C (50 MHz, CDCl_3): δ (ppm) 173,9; 83,1; 64,0; 37,6; 30,7; 24,6; 24,6; 19,1; 15,0; 13,6.

IV-TF (filme) $\nu_{\text{max}} = 2961, 1734, 1371, 1319, 1144, 1010, 859, 670 \text{ cm}^{-1}$.

CG-EM [m/z (%)] = 270(1) [M^+], 255(5), 212(36), 197(22), 155(69), 115(26), 101(27), 83(100), 57(53), 41(97).

EMAR [(ESI (+))]: Calculado para $\text{C}_{14}\text{H}_{27}\text{BO}_4\text{Na}$ [$\text{M} + \text{Na}$] $^+ = 293,1900$; encontrado: 293,1893.

6.3.6 – 3-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)butanoato de octila (**44**)



RMN ^1H (200 MHz, CDCl_3): δ (ppm) 3,95 (m, 2H); 2,45 (dd, $J = 16,4$ e 7,6 Hz, 1H), 2,34 (dd, $J = 16,4$ e 6,8 Hz, 1H); 1,50-1,25 (m, 10H); 1,24 (s, 12H); 1,00 (d, $J = 7,4$ Hz, 3H); 0,95-0,80 (m, 6H).

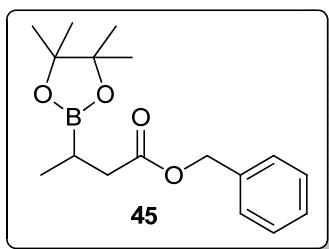
RMN ^{13}C (50 MHz, CDCl_3): δ (ppm) 174,1; 83,1; 66,5; 38,7; 37,5; 30,3; 28,8; 24,7; 24,6; 23,6; 22,9; 15,0; 14,0; 10,9.

IV-TF (filme) ν_{max} = 2961, 1734, 1464, 1387, 1370, 1319, 1144, 1009, 859, 670 cm^{-1} .

CG-EM [m/z (%)]: 281 (1) [$\text{M}^+ - 3 \times \text{Me}$], 268 (3), 197 (15), 155 (21), 129 (2), 113 (23), 101 (46), 83 (82), 57 (90), 41 (100).

EMAR [ESI (+)]: Calculado para $\text{C}_{18}\text{H}_{35}\text{BO}_4\text{Na}$ [$\text{M} + \text{Na}$] $^+$ = 349,2526; encontrado: 349,2525.

6.3.7 – 3-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)butanoato de benzila (**45**)



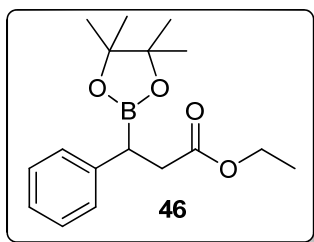
RMN ^1H (200 MHz, CDCl_3): δ (ppm) 7,34 (s, 5H); 5,11 (s, 2H); 2,51 (dd, J = 16,4 e 7,8 Hz, 1H), 2,41 (dd, J = 16,4 e 6,6 Hz, 1H); 1,50-1,30 (m, 1H); 1,21 (s, 12H); 1,01 (d, J = 7,6 Hz, 3H).

RMN ^{13}C (50 MHz, CDCl_3): δ (ppm) 173,6; 136,1; 128,4; 128,0; 128,0; 83,1; 65,9; 37,6; 24,6; 24,6; 15,0.

IV-TF (filme) ν_{max} = 2977, 1735, 1370, 1319, 1142, 1007, 859, 747, 697 cm^{-1} .

CG-EM [m/z (%)]: 304 (1) [M^+], 289 (2), 204 (15), 155 (29), 113 (19), 101 (5), 91 (100), 83 (60), 69 (19), 43 (45).

6.3.8 – 3-fenil-3-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)propanoato de etila
(46)



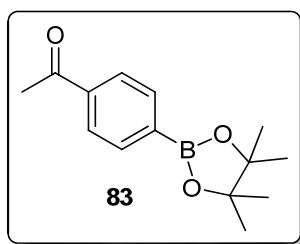
RMN ^1H (200 MHz, CDCl_3): δ (ppm) 7,30-7,10 (m, 5H); 4,10 (q, $J = 7$ Hz, 2H); 2,89 (dd, $J = 13,6$ e $8,2$ Hz, 1H); 2,75 (m, 1H), 2,64 (dd, $J = 13,4$ e $5,2$ Hz, 1H); 1,22 (t, $J = 7$ Hz, 3H); 1,23-1,16 (m, 12H).

RMN ^{13}C (50 MHz, CDCl_3): δ (ppm) 173,3; 141,3; 128,4; 128,1; 125,6; 83,5; 60,3; 37,3; 24,5; 24,4; 14,2.

IV-TF (filme) $\nu_{\text{max}} = 2982, 1730, 1371, 1139, 1022, 848, 770, 707, 535 \text{ cm}^{-1}$.

CG-EM [m/z (%): 304(21) [M^+], 289(1), 233(26), 177(3), 131(33), 117(18), 104(100), 91(10), 83(57), 77(10), 55(19).

6.3.9 – 1-(4-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)fenil)etanona (83).



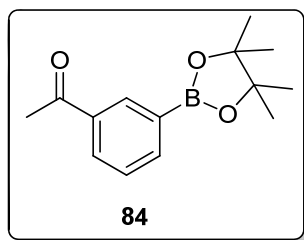
RMN ^1H (200 MHz, CDCl_3): δ (ppm) 7,91 (m, 4H); 2,62 (s, 3H); 1,36 (s, 12H).

RMN ^{13}C (50 MHz, CDCl_3): δ (ppm) 198,4; 139,0; 134,9; 127,2; 84,2; 26,7; 24,8.

IV-TF (KBr) $\nu_{\text{max}} = 2988, 1680, 1359, 1093, 1016, 857, 832, 654, 599 \text{ cm}^{-1}$.

CG-EM [m/z (%): 246(6) [M^+]; 231(30); 160(12); 147(22); 77(5); 43(100).

6.3.10 – 1-(3-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)fenil)etanona (**84**).



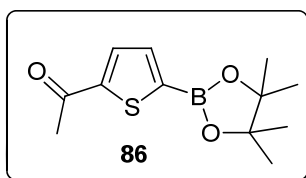
RMN ^1H (200 MHz, CDCl_3): δ (ppm) 8,36 (s, 1H); 8,06 (dt, $J = 7,8$ e $1,6$ Hz, 1H); 7,99 (dt, $J = 7,4$ e $1,2$ Hz, 1H); 7,47 (t, $J = 7,8$ Hz, 1H); 2,64 (s, 3H); 1,36 (s, 12H).

RMN ^{13}C (50 MHz, CDCl_3): δ (ppm) 198,3; 139,3; 136,5; 134,7; 130,7; 128,0; 84,1; 26,7; 24,8.

IV-TF (KBr) $\nu_{\text{max}} = 2978, 1712, 1384, 1144, 979, 851, 668 \text{ cm}^{-1}$.

CG-EM [m/z (%): 246(2) [M^+]; 231(22); 203(11); 147(21); 77(7), 57(10); 43(100).

6.3.11 – 1-(5-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)tiofen-2-il)etanona (**86**).



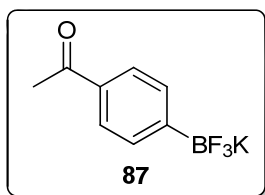
RMN ^1H (200 MHz, CDCl_3): δ (ppm) 7,73 (d, $J = 3,8$ Hz, 1H), 7,58 (d, $J = 3,8$ Hz, 1H); 2,57 (s, 3H); 1,35 (s, 12H).

RMN ^{13}C (50 MHz, CDCl_3): δ (ppm) 190,6; 149,4; 137,2; 132,6; 84,6; 27,4; 24,7.

IV-TF (KBr) $\nu_{\text{max}} = 2987, 1663, 1522, 1135, 1020, 929, 853, 824, 666 \text{ cm}^{-1}$.

CG-EM [m/z (%): 252(10) [M^+]; 237(15); 166(10); 153(15); 137(15); 85(9); 43(100).

6.3.12 – (4-acetilfenil)trifluoroborato de potássio (**87**).

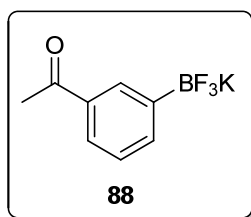


RMN ¹H (200 MHz, DMSO-*d*₆): δ (ppm) 7,71 (d, *J* = 7,8 Hz, 2H); 7,45 (d, *J* = 7,8 Hz, 2H); 2,51 (s, 3H).

RMN ¹³C (50 MHz, DMSO-*d*₆): δ (ppm) 198,0; 134,1; 131,3 (d, *J* = 1,6 Hz); 126,2; 26,4.

IV-TF (KBr) ν_{max} = 2944, 1655, 1398, 1285, 1206, 974, 824, 758, 650, 602, 484 cm^{-1} .

6.3.13 – (3-acetilfenil)trifluoroborato de potássio (**88**).

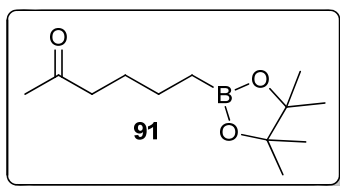


RMN ¹H (200 MHz, DMSO-*d*₆): δ (ppm) 7,93 (s, 1H); 7,66 (m, 1H); 7,58 (m, 1H); 7,24 (m, 1H); 2,52 (s, 3H).

RMN ¹³C (50 MHz, DMSO-*d*₆): δ (ppm) 198,7; 136,3 (d, *J* = 1,6 Hz); 135,0; 131,1 (d, *J* = 1,7 Hz); 126,4; 124,9; 26,5.

IV-TF (KBr) ν_{max} = 2930, 1680, 1578, 1359, 1086, 901, 806, 701, 627, 609, 595 cm^{-1} .

6.3.14 – 6-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)hexan-2-ona (**91**).



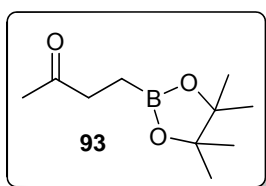
RMN ^1H (200 MHz, CDCl_3): δ (ppm) 2,42 (t, $J = 7$ Hz, 2H); 2,12 (s, 3H); 1,65-1,35 (m, 4H); 1,24 (s, 12H); 0,78 (t, $J = 7,2$ Hz, 2H).

RMN ^{13}C (50 MHz, CDCl_3): δ (ppm) 209,3; 82,9; 43,6; 29,7; 26,4; 24,8; 23,6.

IV-TF (filme) $\nu_{\text{max}} = 2978, 1715, 1379, 1146, 1110, 968, 846 \text{ cm}^{-1}$.

CG-EM [m/z (%): 211(1) [$\text{M}^+ - 15$]; 168(8); 127(4); 111(9); 83(17); 69(10); 55(24); 43(100).

6.3.15 – 4-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)butan-2-ona (**93**).



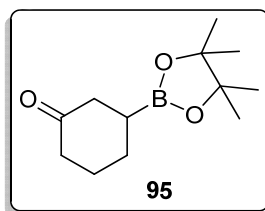
RMN ^1H (200 MHz, CDCl_3): δ (ppm) 2,59 (t, $J = 7$ Hz, 2H); 2,13 (s, 3H); 1,24 (s, 12H); 0,90 (t, $J = 7$ Hz, 2H).

RMN ^{13}C (50 MHz, CDCl_3): δ (ppm) 209,2; 83,0; 38,4; 29,3; 24,7.

IV-TF (filme) $\nu_{\text{max}} = 2978, 1715, 1379, 1145, 1007, 968, 849 \text{ cm}^{-1}$.

CG-EM [m/z (%): 197(1) [$\text{M}^+ - 1$]; 183(3); 140(48); 112(35); 99(24); 83(36); 55(66); 43(100).

6.3.16 – 3-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)ciclohexanona (**95**).



RMN ¹H (200 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 2,40-2,25 (m, 4H); 2,20-1,40 (m, 5H); 1,23 (s, 12H).

RMN ¹³C (50 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 212,2; 83,4; 42,5; 41,8; 28,3; 26,4; 24,7; 24,6.

IV-TF (filme) ν_{max} = 2978, 1712, 1384, 1271, 1144, 979, 851, 668 cm⁻¹.

CG-EM [*m/z* (%)]: 224(10) [M⁺]; 209(5); 166(16); 110(14); 83(17); 59(21); 41(100).

7. ESPECTROS SELECIONADOS

Figura 7.1 – Espectro de RMN ^1H do composto **41** em CDCl_3 a 200 MHz.

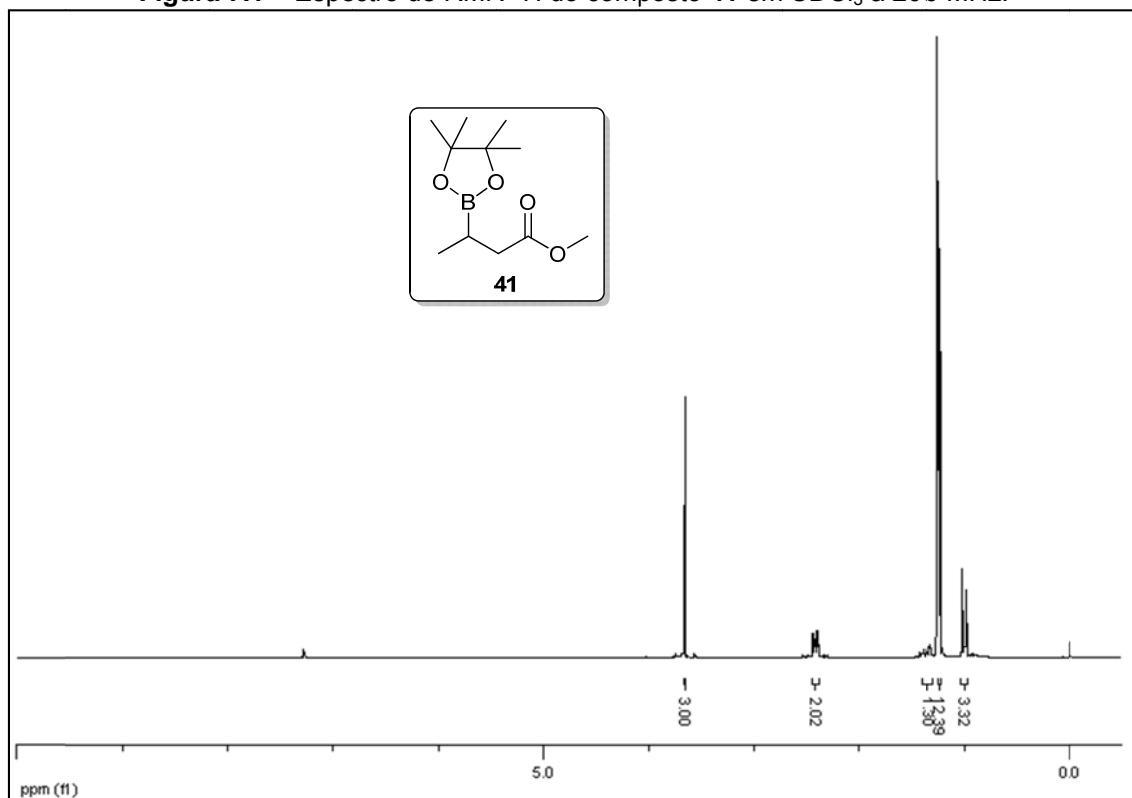


Figura 7.2 – Espectro de RMN ^{13}C do composto **41** em CDCl_3 a 50 MHz.

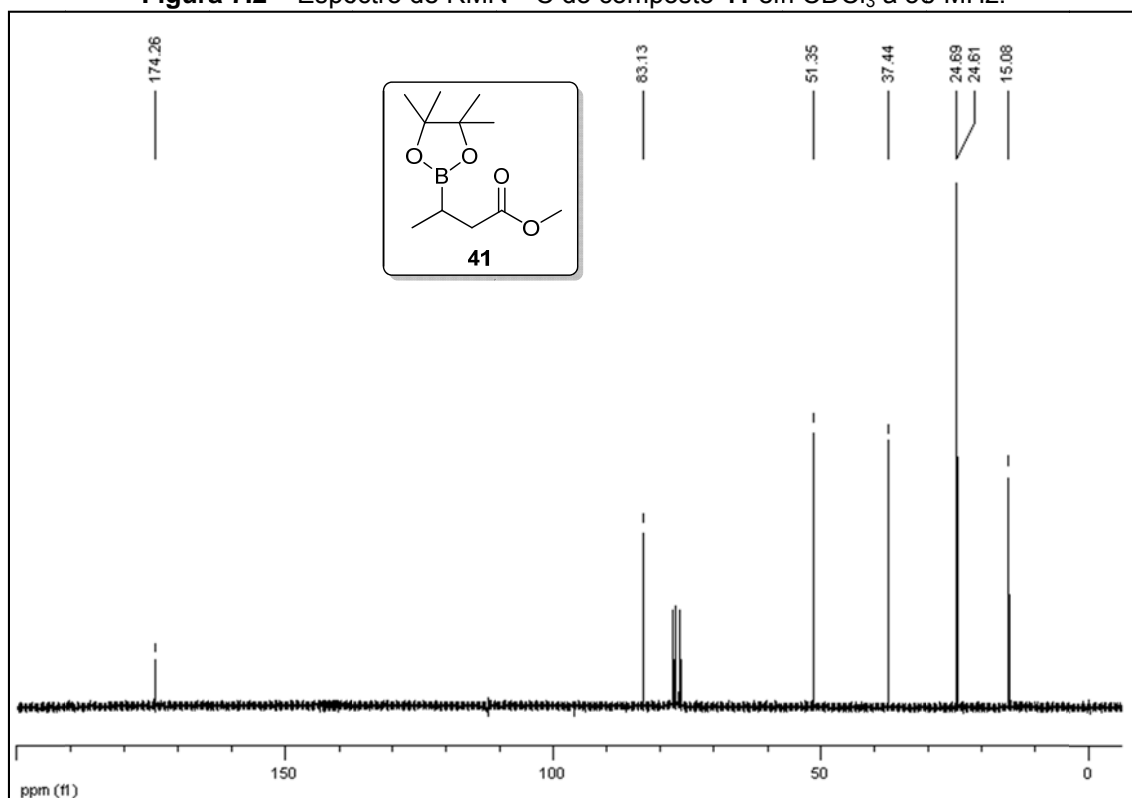


Figura 7.3 – Espectro de RMN ^1H do composto **42** em CDCl_3 a 200 MHz.

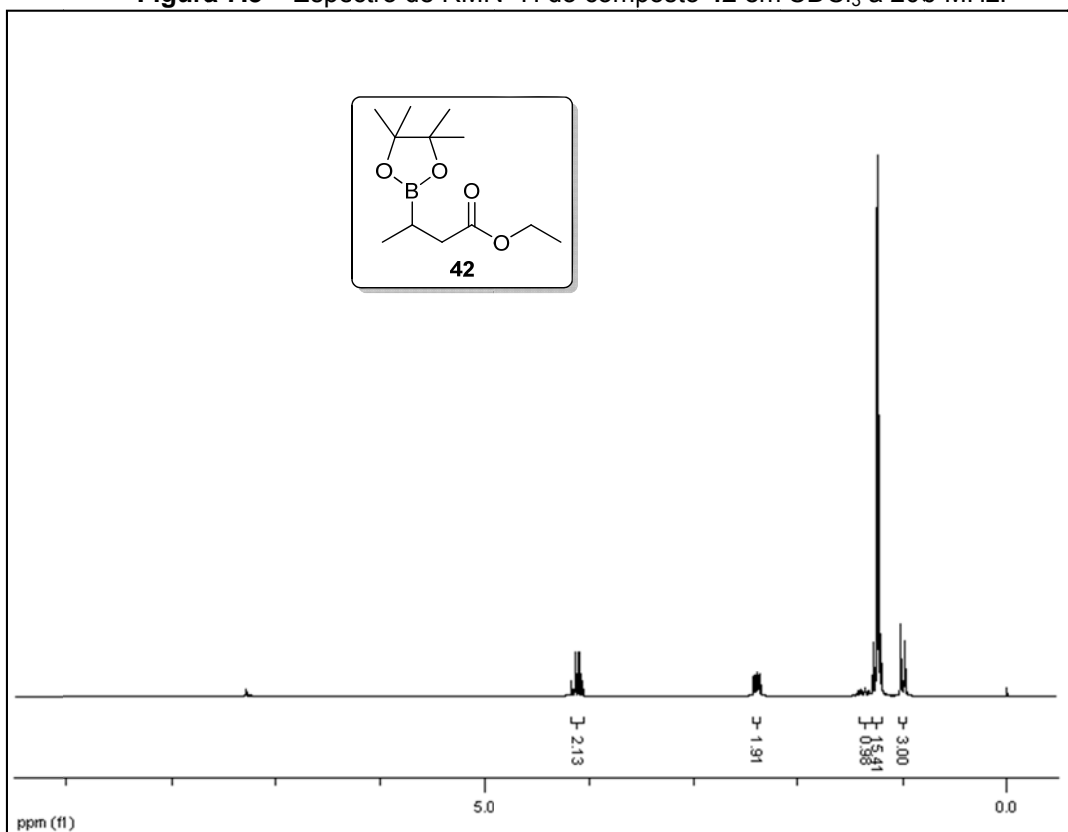


Figura 7.4 – Espectro de RMN ^{13}C do composto **42** em CDCl_3 a 50 MHz.

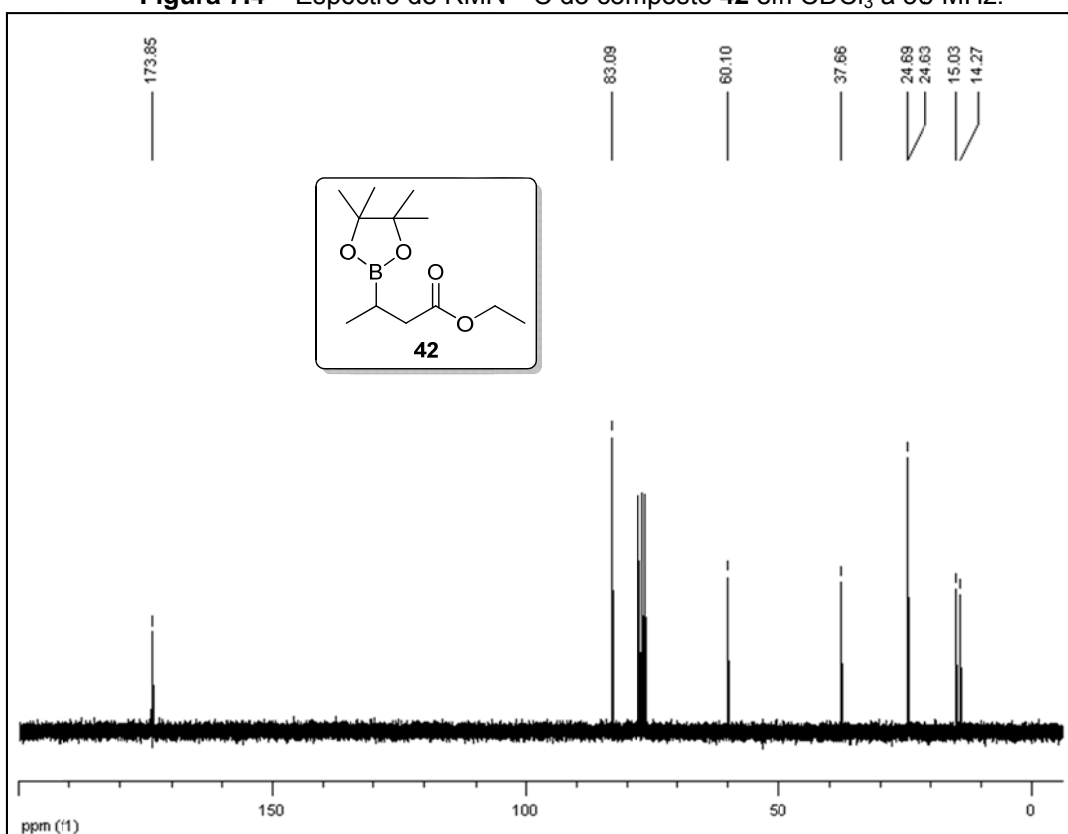


Figura 7.5 – Espectro de RMN ^1H do composto **43** em CDCl_3 a 200 MHz.

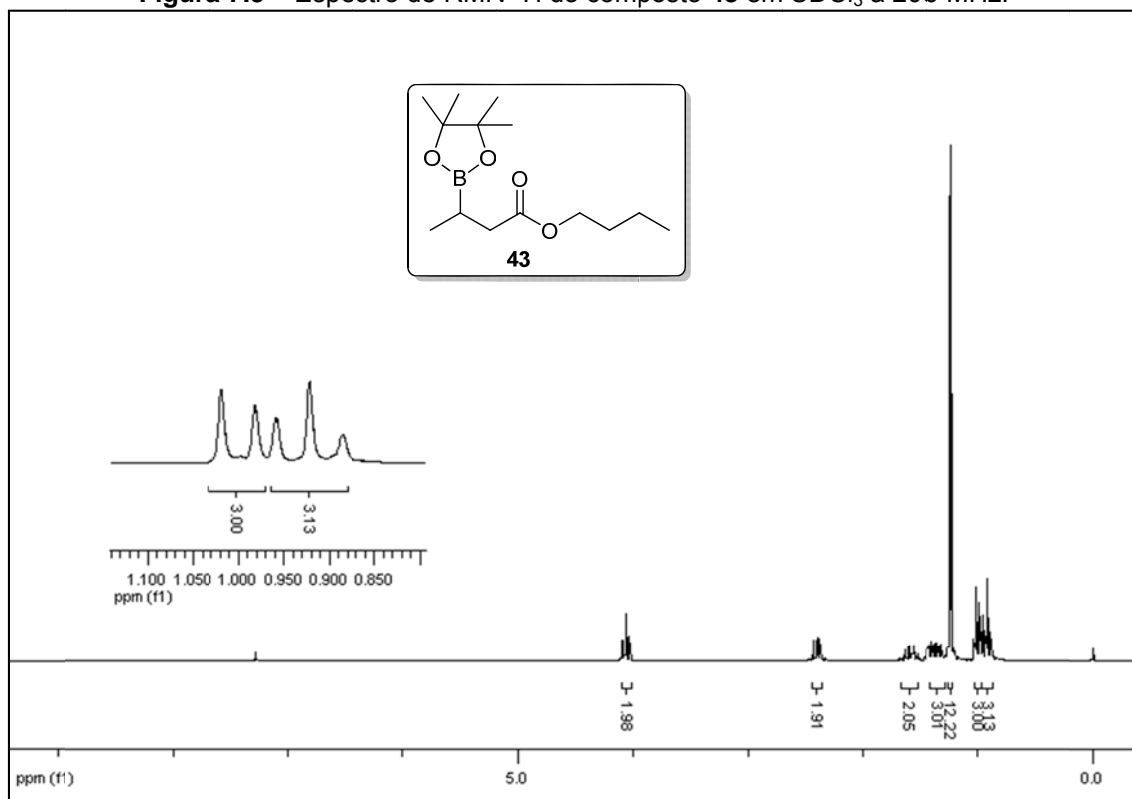


Figura 7.6 – Espectro de RMN ^{13}C do composto **43** em CDCl_3 a 50 MHz.

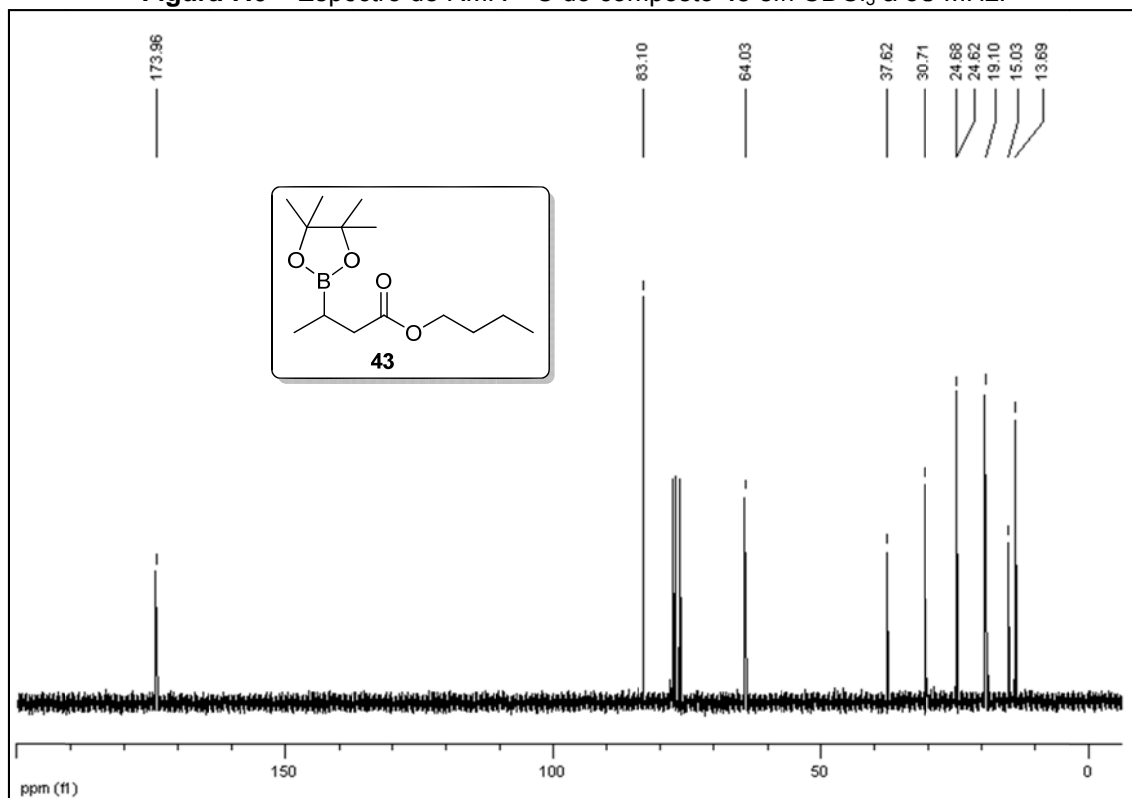


Figura 7.7 – Espectro de RMN ^1H do composto **44** em CDCl_3 a 200 MHz.

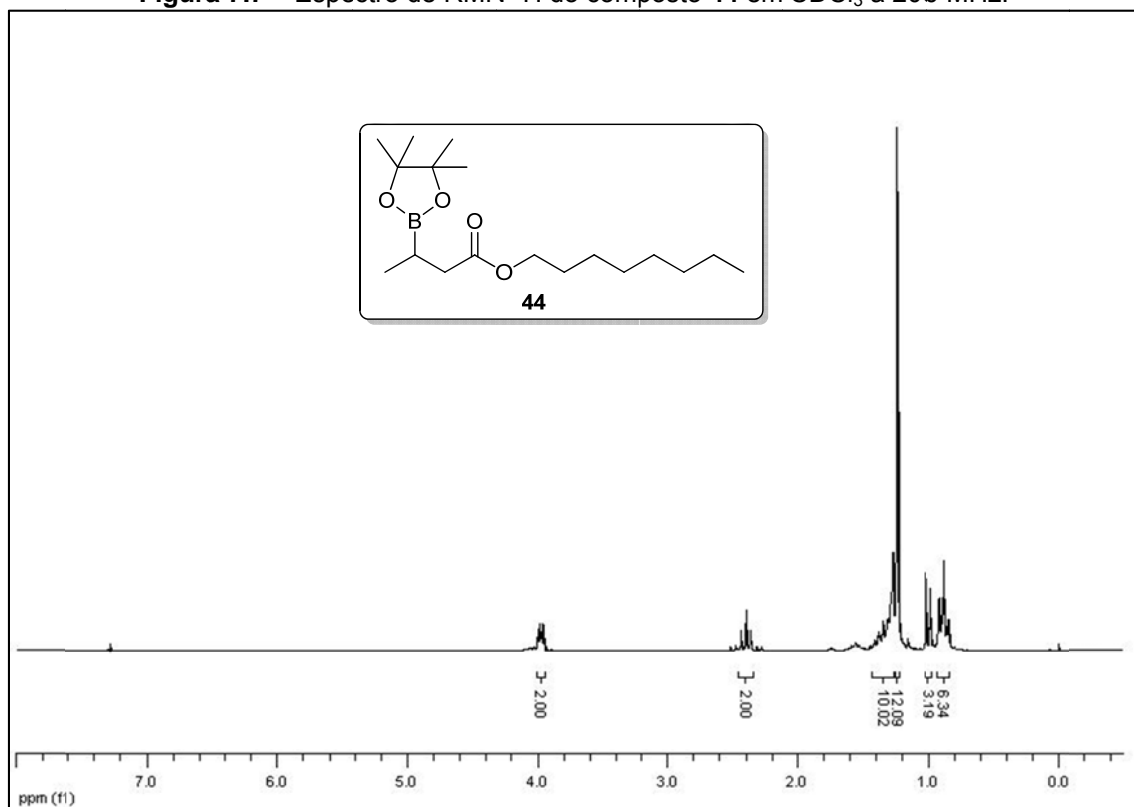


Figura 7.8 – Espectro de RMN ^{13}C do composto **44** em CDCl_3 a 50 MHz.

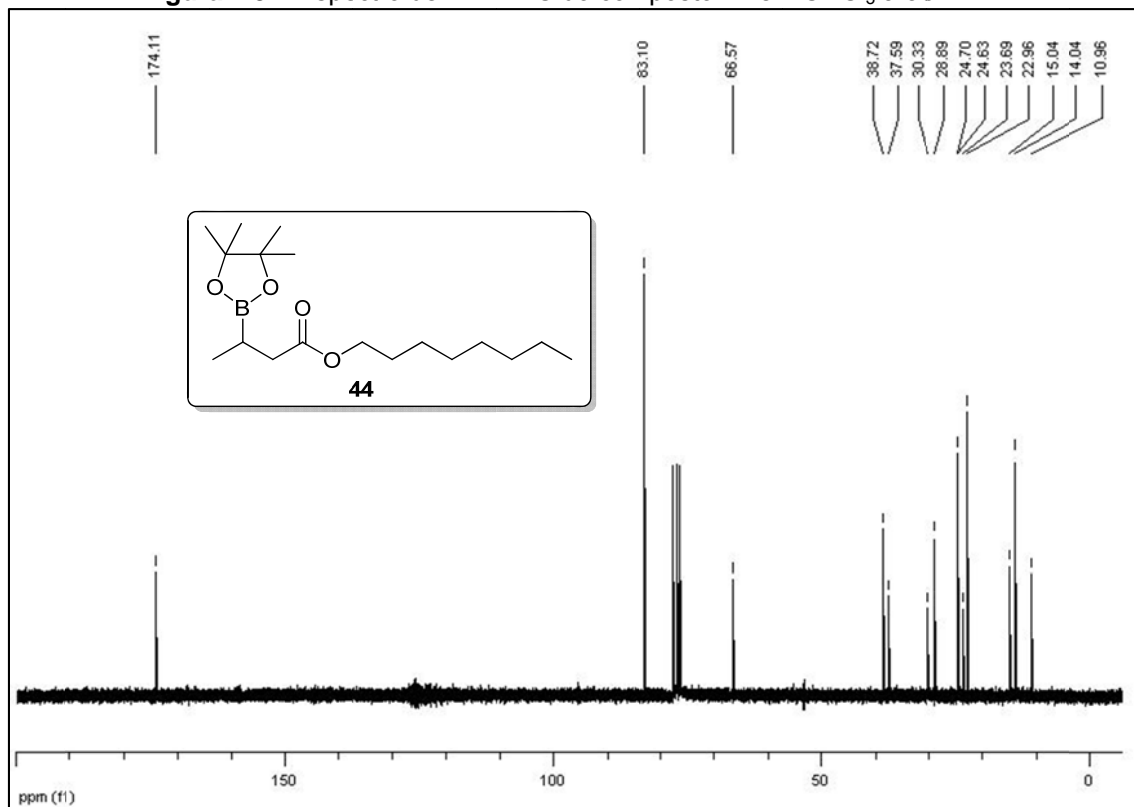


Figura 7.9 – Espectro de RMN ^1H do composto **45** em CDCl_3 a 200 MHz.

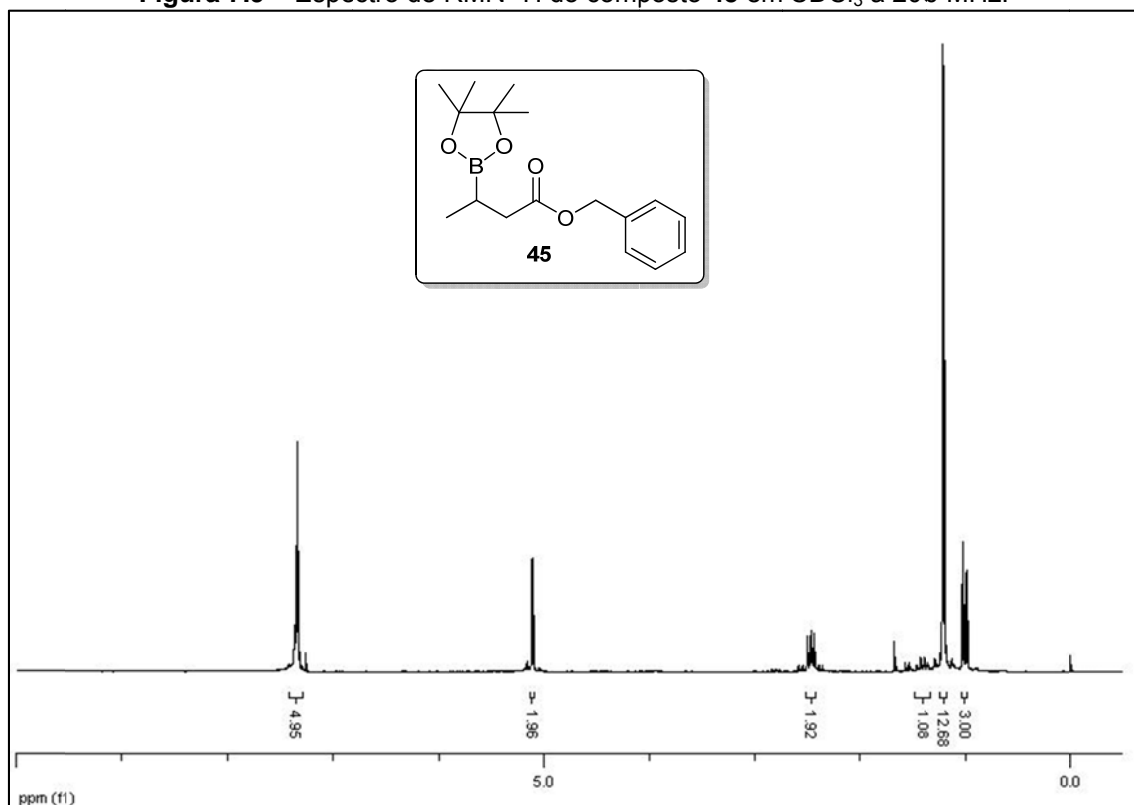


Figura 7.10 – Espectro de RMN ^{13}C do composto **45** em CDCl_3 a 50 MHz.

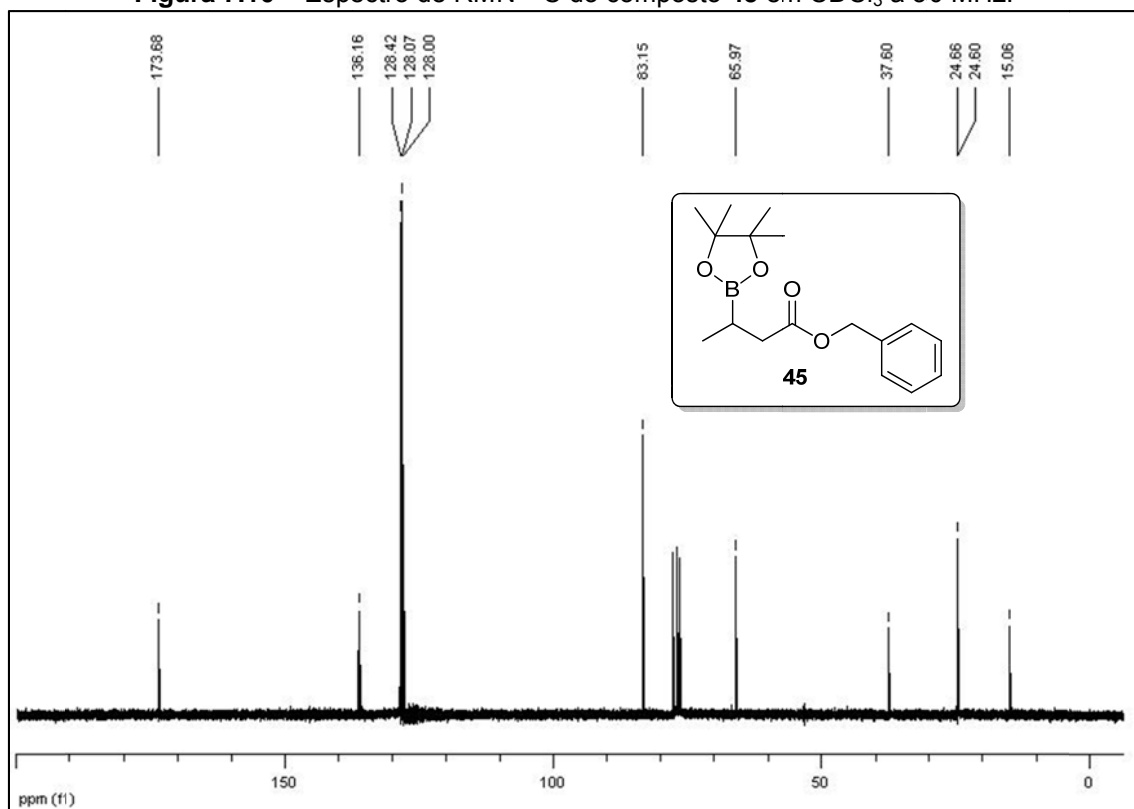


Figura 7.11 – Espectro de RMN ^1H do composto **46** em CDCl_3 a 200 MHz.

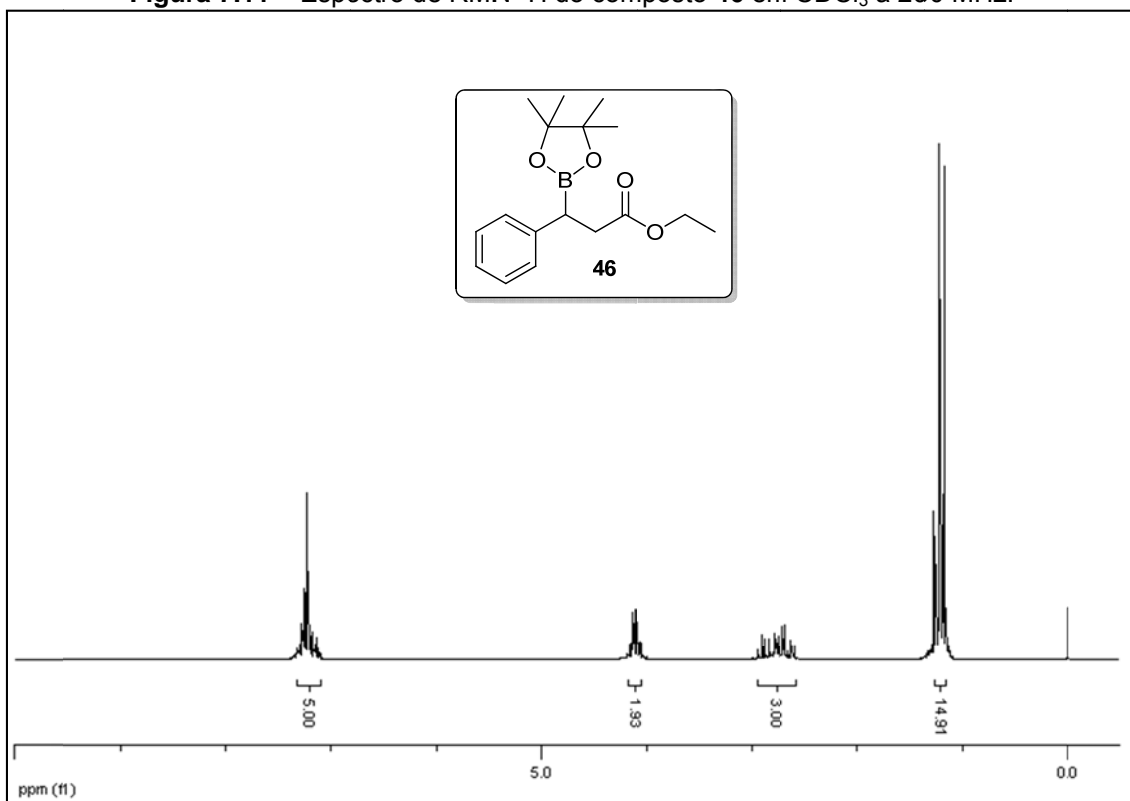


Figura 7.12 – Espectro de RMN ^{13}C do composto **46** em CDCl_3 a 50 MHz.

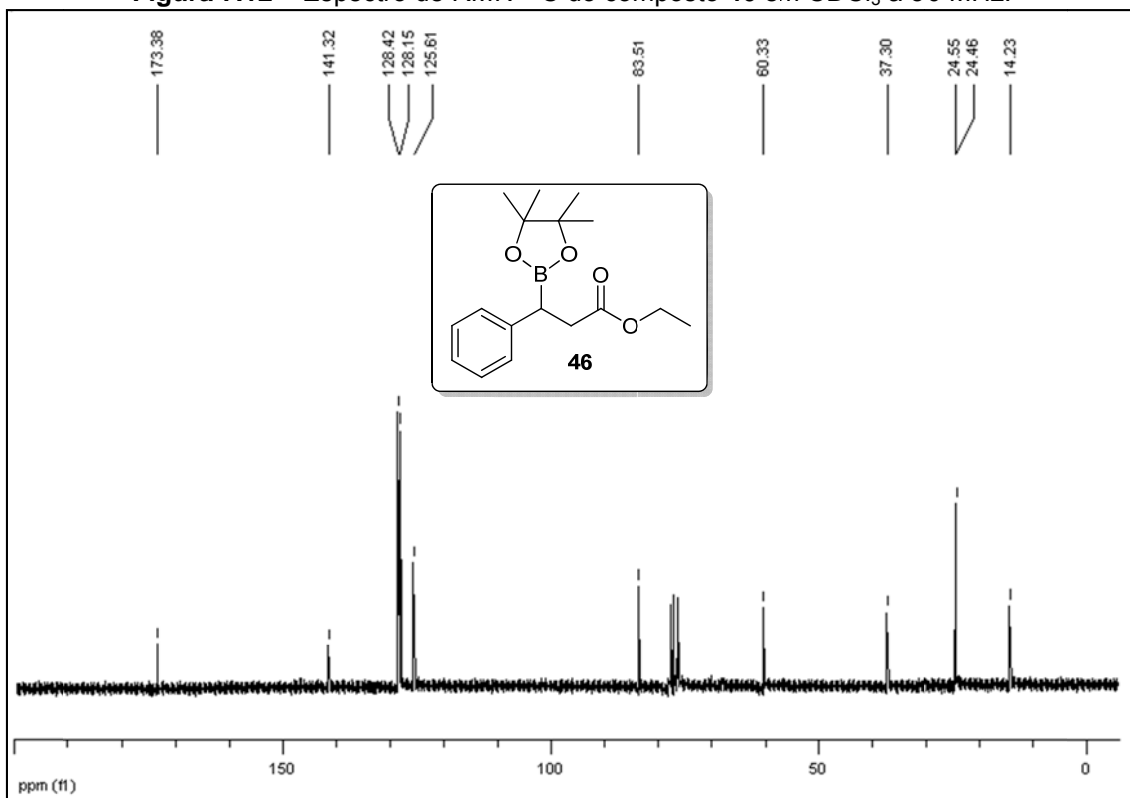


Figura 7.13 – Espectro de RMN ^1H do composto **83** em CDCl_3 a 200 MHz.

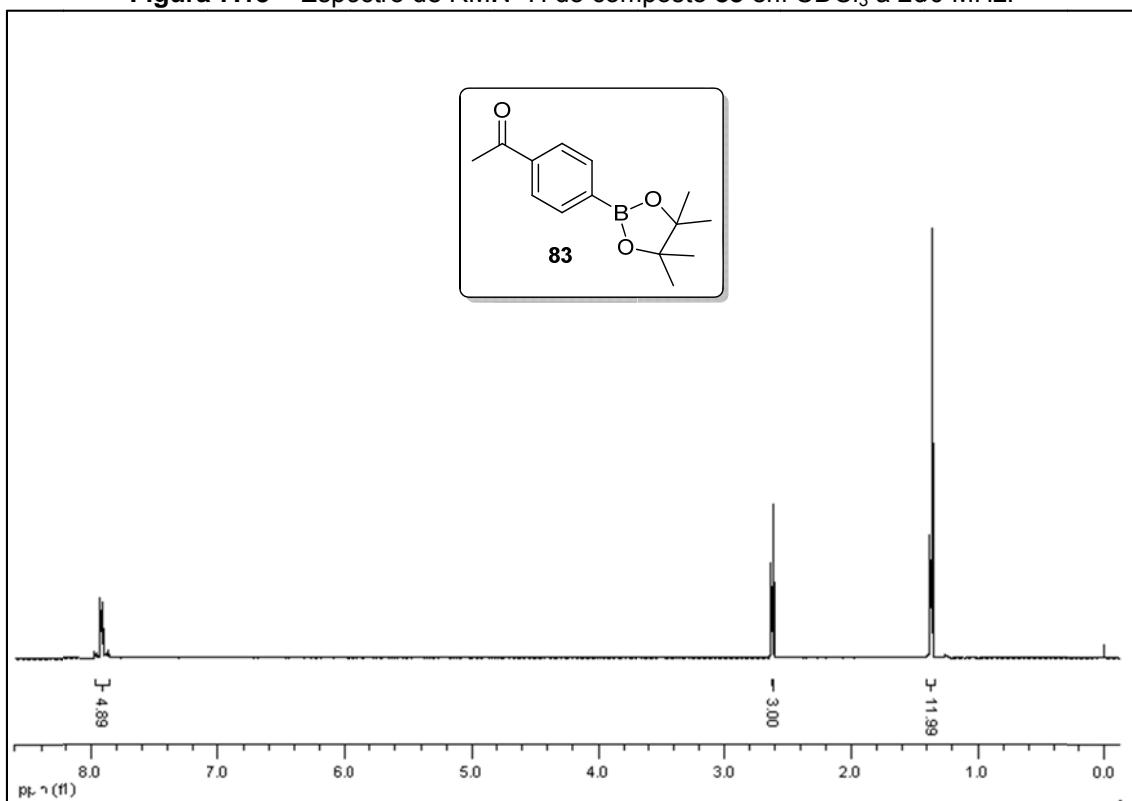


Figura 7.14 – Espectro de RMN ^{13}C do composto **83** em CDCl_3 a 50 MHz.

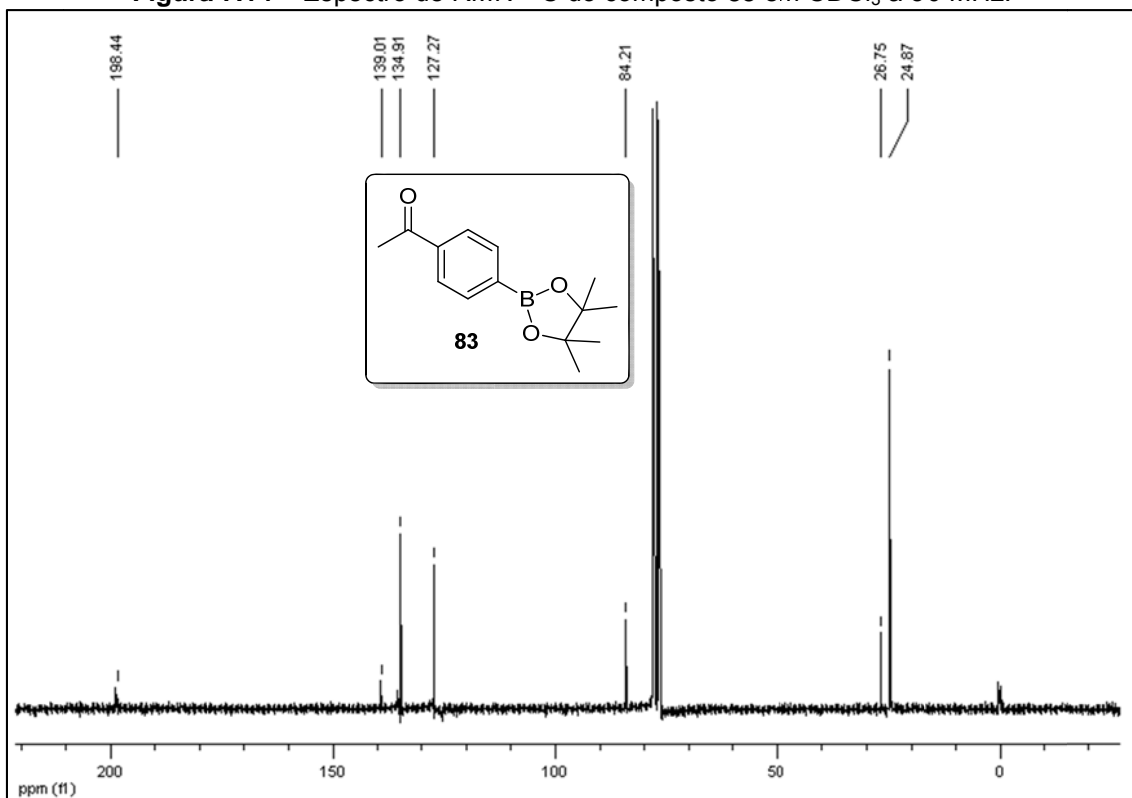


Figura 7.15 – Espectro de RMN ^1H do composto **84** em CDCl_3 a 200 MHz.

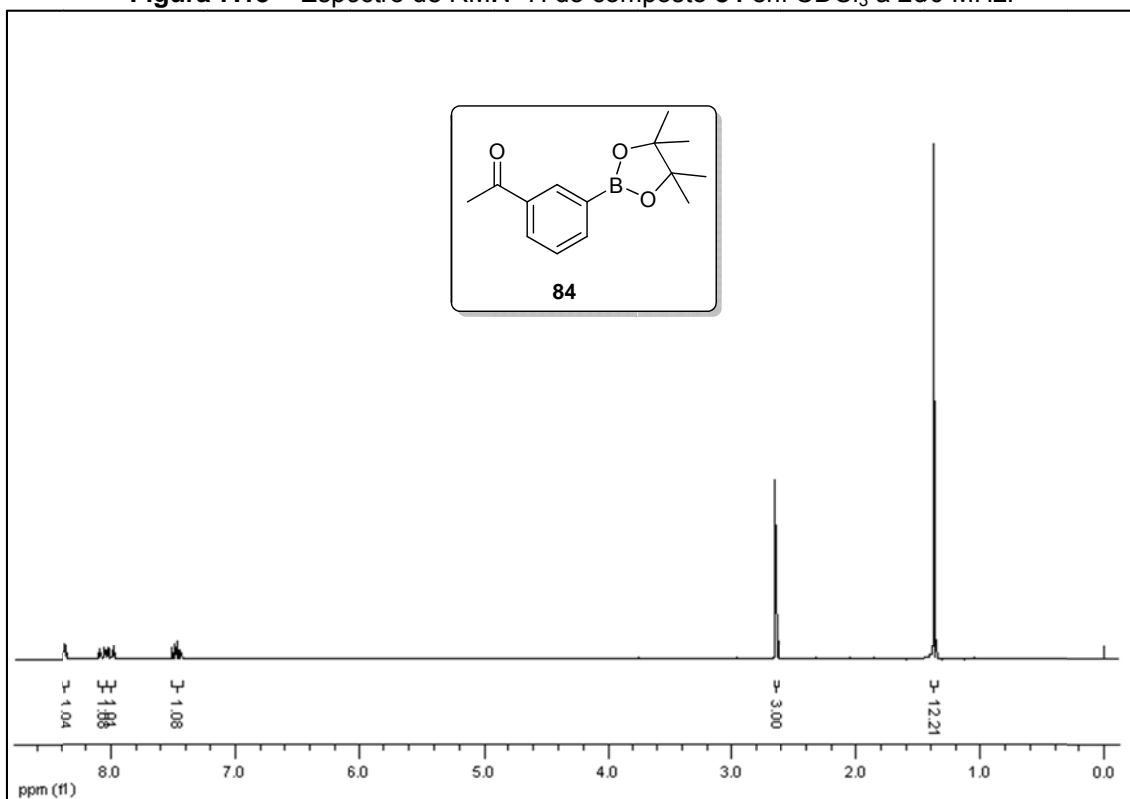


Figura 7.16 – Espectro de RMN ^{13}C do composto **84** em CDCl_3 a 50 MHz.

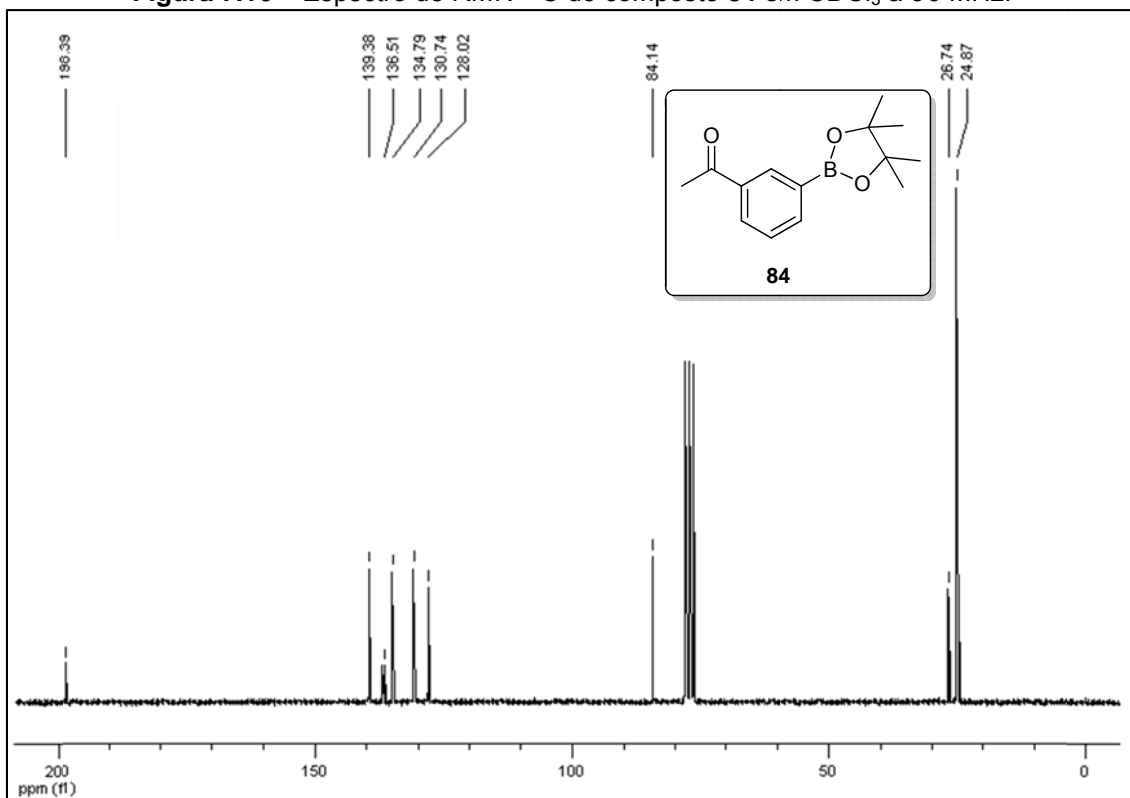


Figura 7.17 – Espectro de RMN ^1H do composto **86** em CDCl_3 a 200 MHz.

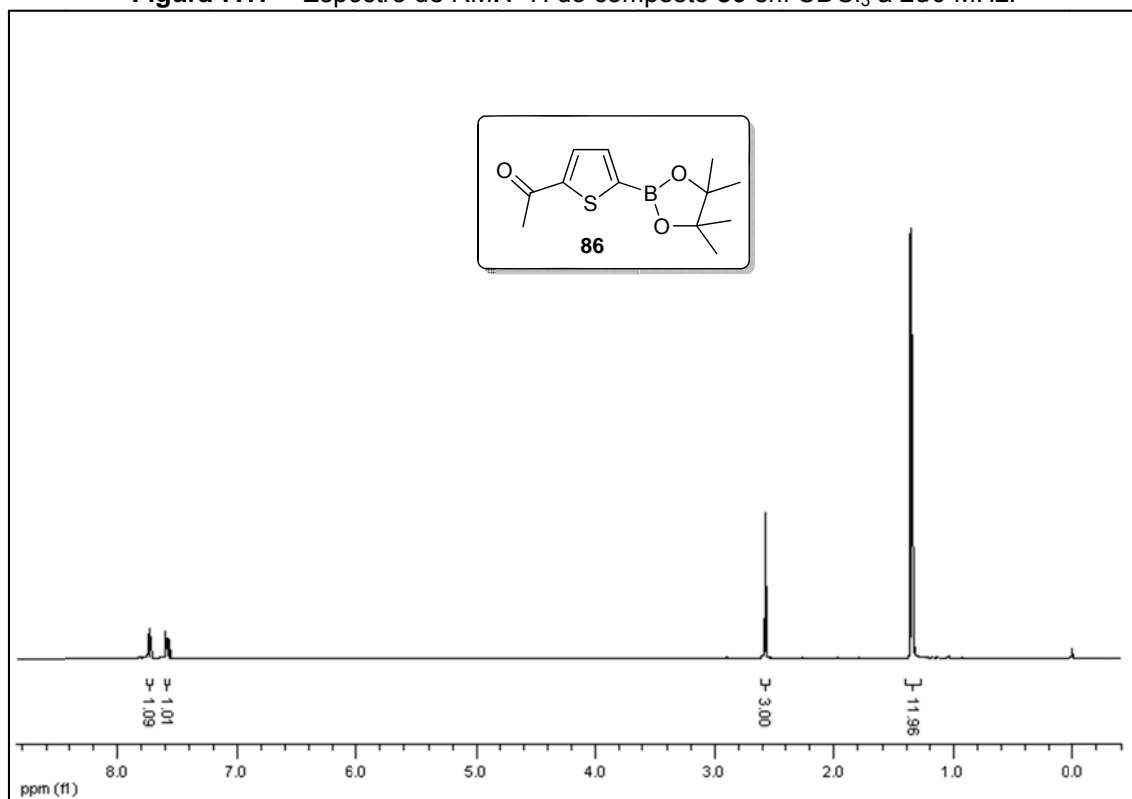


Figura 7.18 – Espectro de RMN ^{13}C do composto **86** em CDCl_3 a 50 MHz.

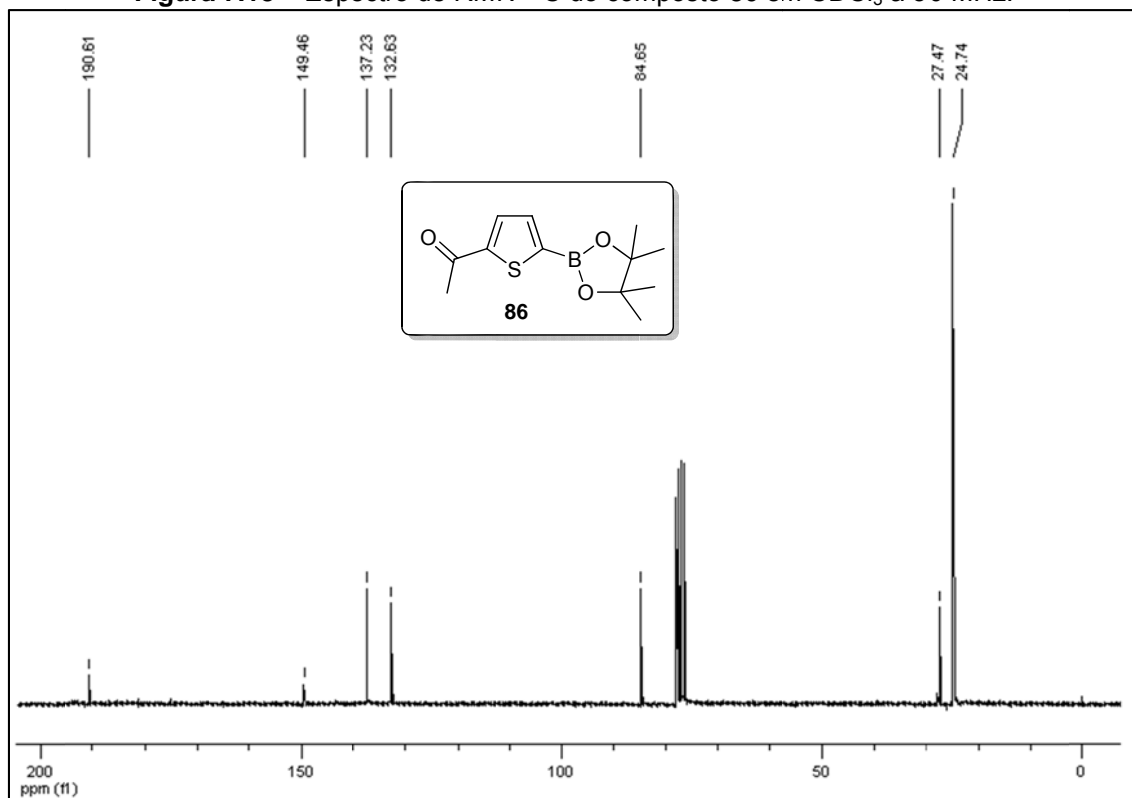


Figura 7.19 – Espectro de RMN ^1H do composto **87** em $\text{DMSO}-d_6$ a 200 MHz.

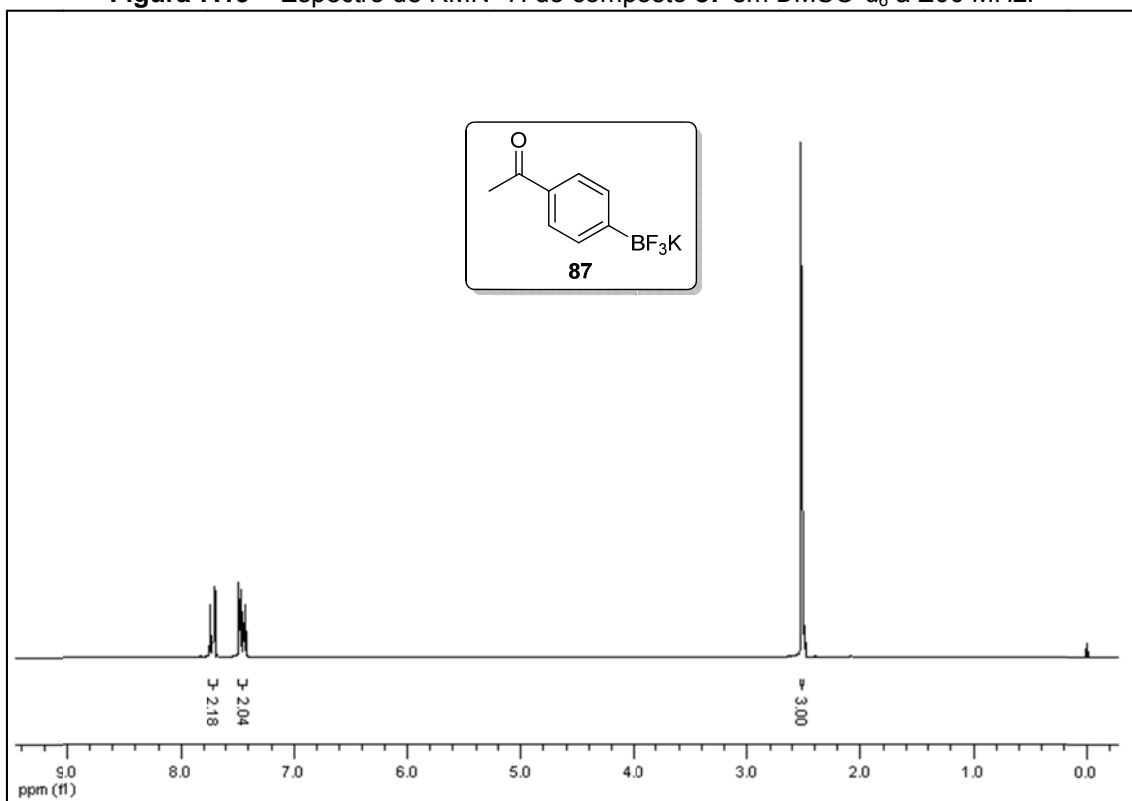


Figura 7.20 – Espectro de RMN ^{13}C do composto **87** em $\text{DMSO}-d_6$ a 50 MHz.

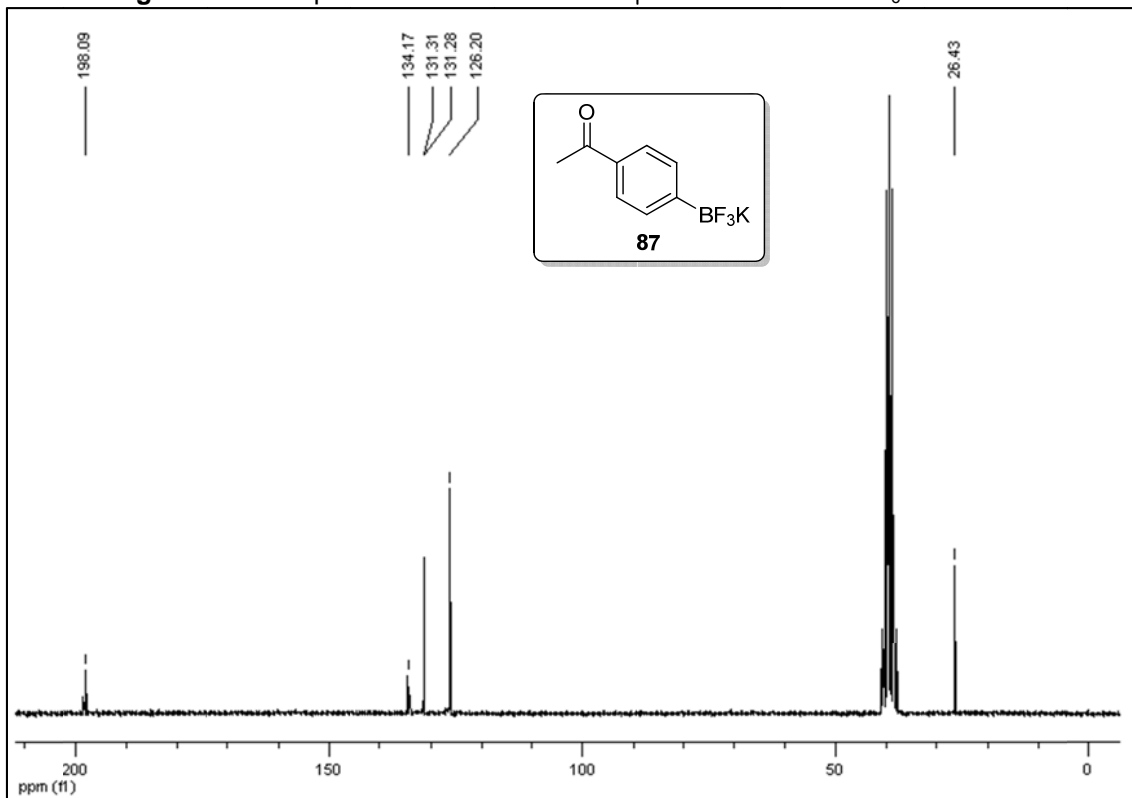


Figura 7.21 – Espectro de RMN ^1H do composto **88** em $\text{DMSO}-d_6$ a 200 MHz.

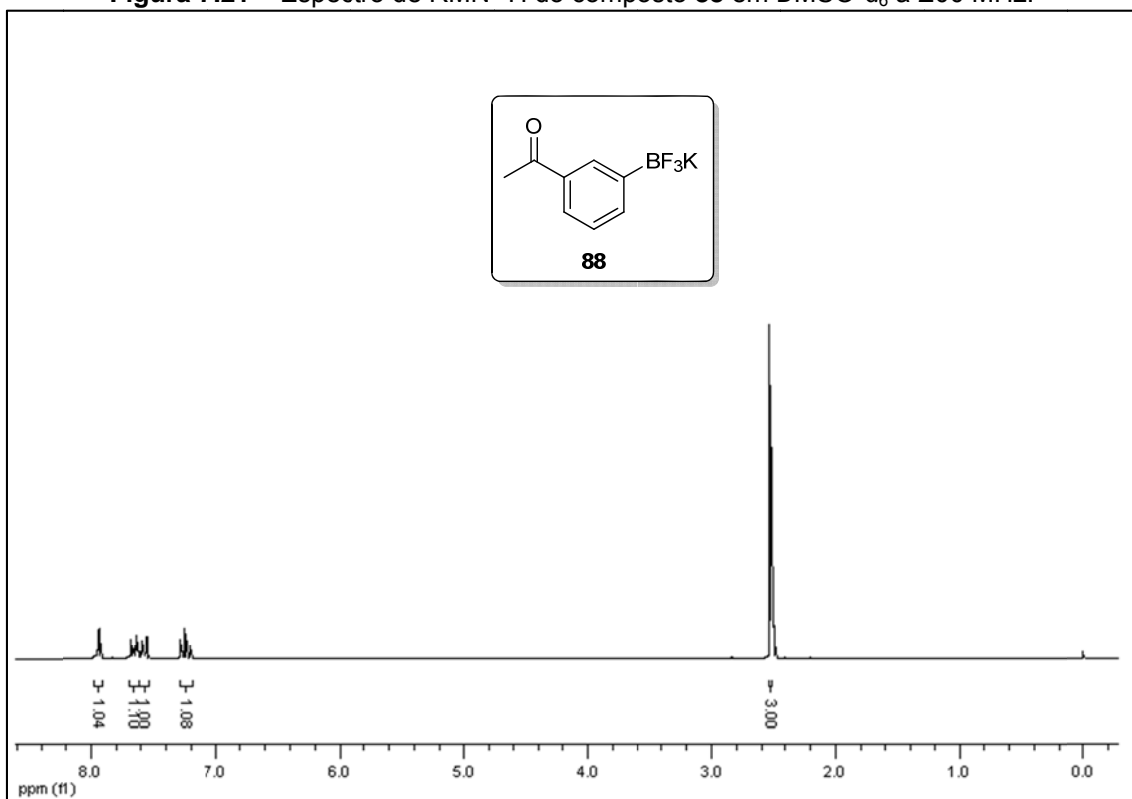


Figura 7.22 – Espectro de RMN ^{13}C do composto **88** em $\text{DMSO}-d_6$ a 50 MHz.

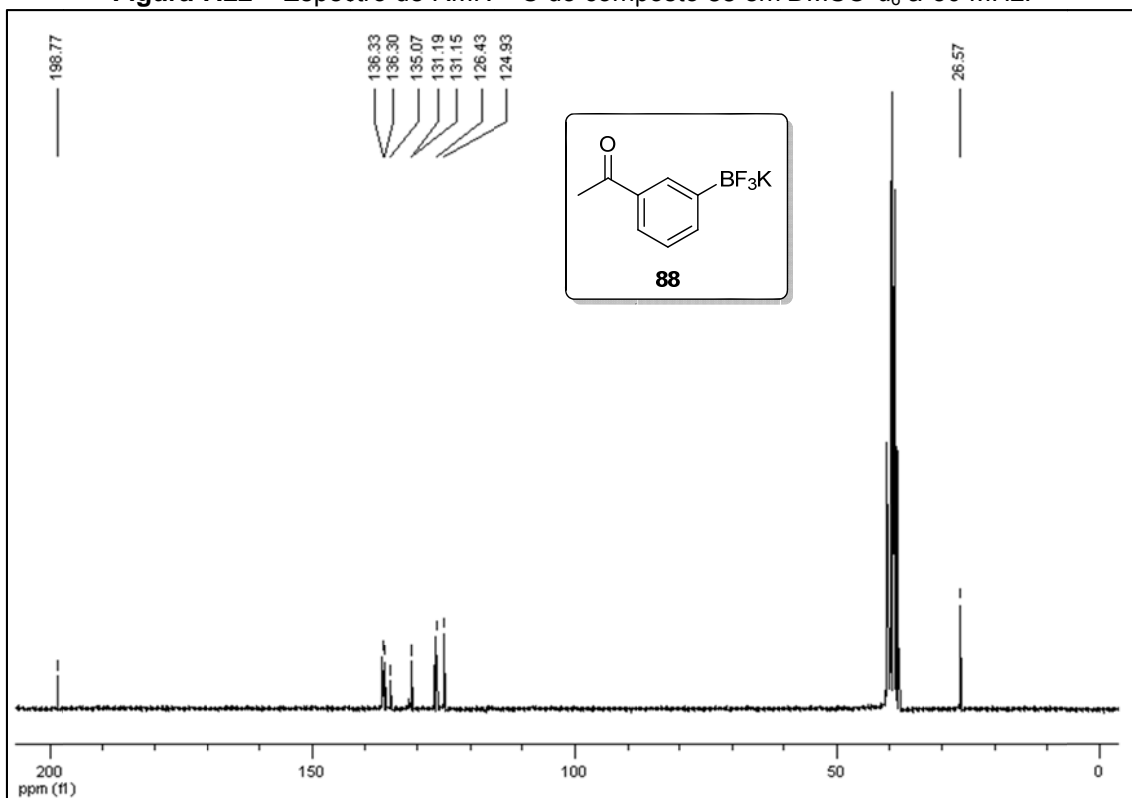


Figura 7.23 – Espectro de RMN ^1H do composto **91** em CDCl_3 a 200 MHz.

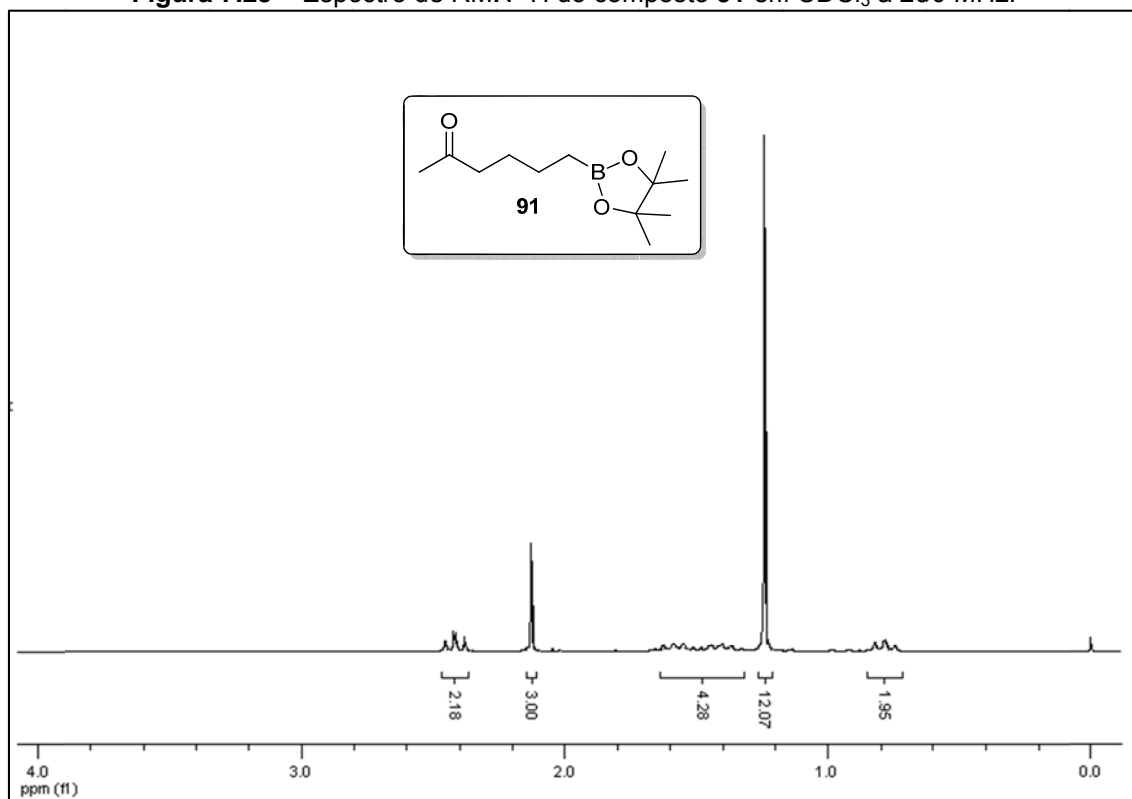


Figura 7.24 – Espectro de RMN ^{13}C do composto **91** em CDCl_3 a 50 MHz.

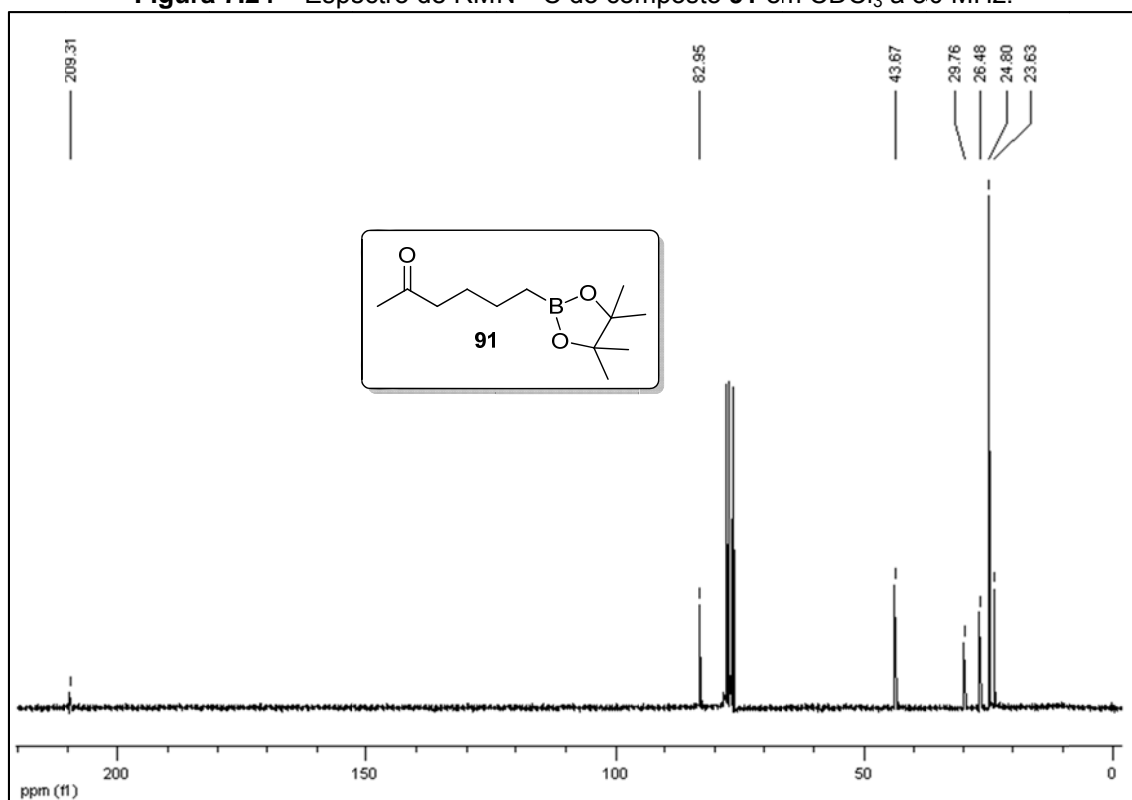


Figura 7.25 – Espectro de RMN ^1H do composto **93** em CDCl_3 a 200 MHz.

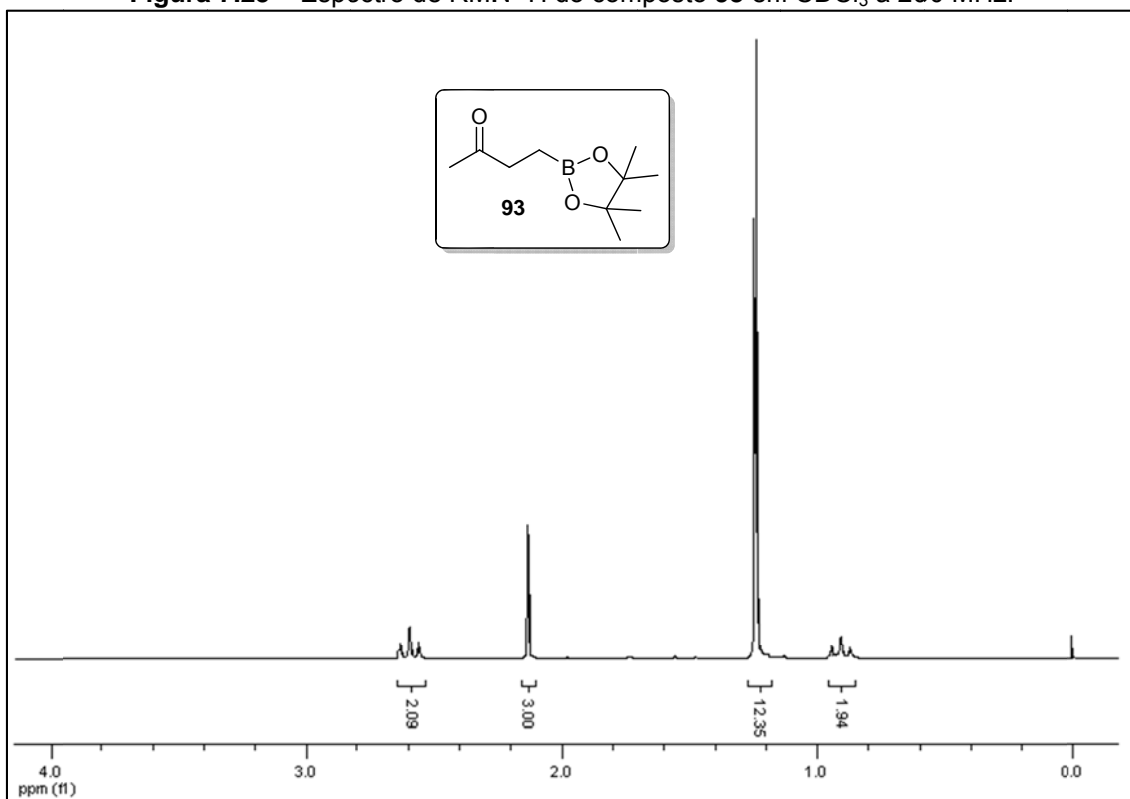


Figura 7.26 – Espectro de RMN ^{13}C do composto **93** em CDCl_3 a 50 MHz.

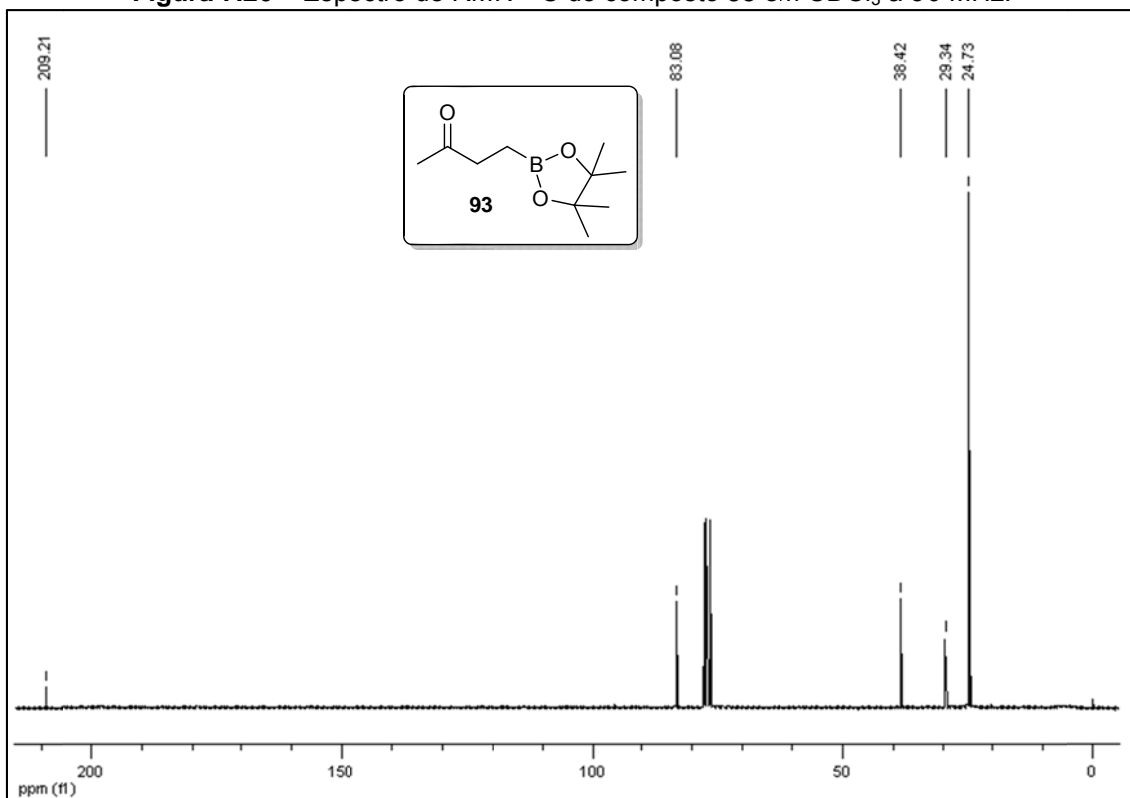


Figura 7.27 – Espectro de RMN ^1H do composto **95** em CDCl_3 a 200 MHz.

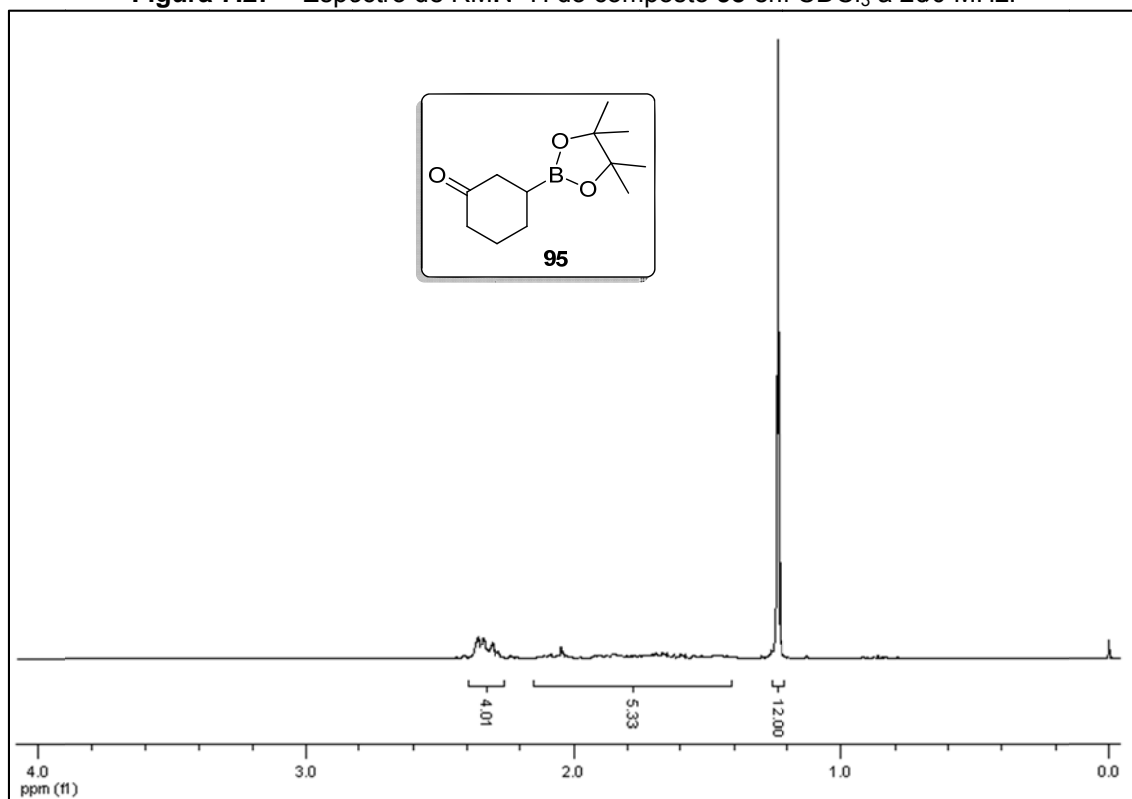
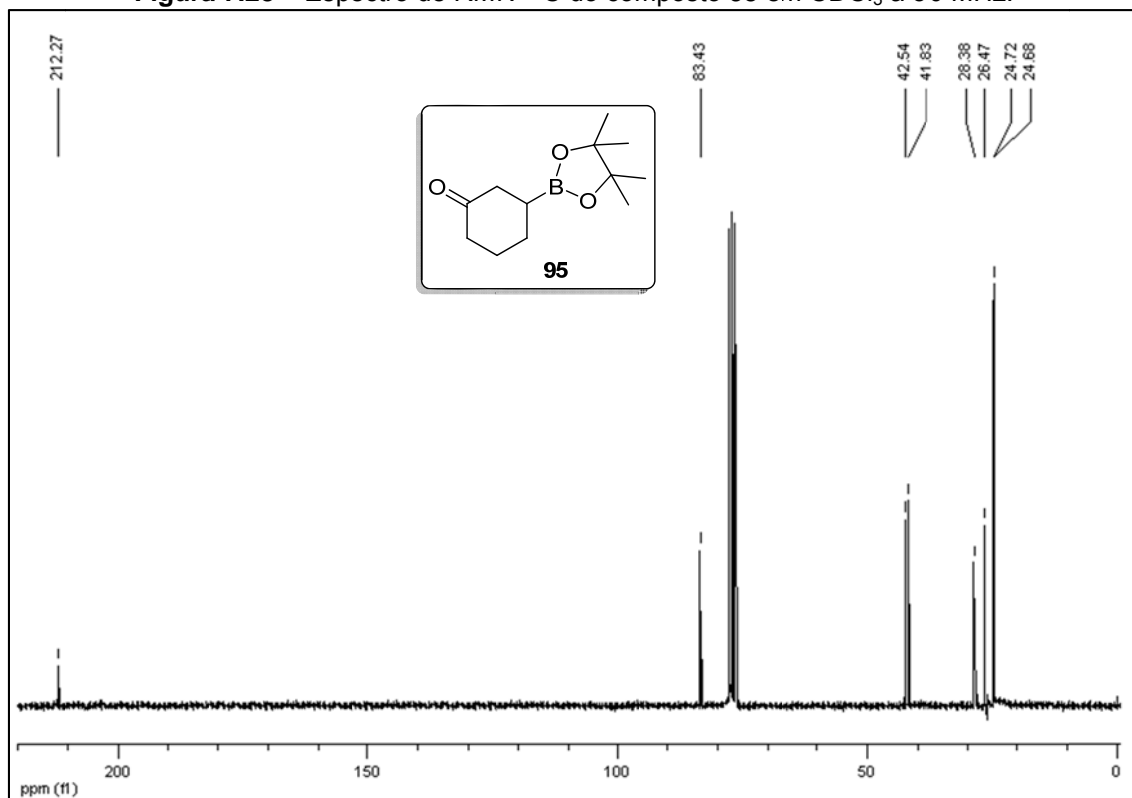


Figura 7.28 – Espectro de RMN ^{13}C do composto **95** em CDCl_3 a 50 MHz.



8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 Nelson, D. L.; Cox, M. M. *Lehninger Principles of Biochemistry*, 3rd Ed., Worth Publishers, New York, USA, **2000**.
- 2 Ghanem, A. Trends in lipase-catalyzed asymmetric access to enantiomerically pure/enriched compounds, *Tetrahedron* **2007**, 62, 1721-1754.
- 3 (a) Dakin, H. D. The hydrolysis of ethyl mandelate by lipase, *Proc. Chem. Soc., London* **1903**, 161;
(b) Dakin, H. D. The hydrolysis of optically inactive esters by means of enzymes, *J. Physiol.* **1904**, 30, 253-263;
(c) Sym, E. A. Action of esterase in the presence of organic solvents, *Biochem. J.* **1936**, 30, 609-617.
- 4 (a) Silverman R. B. *The Organic Chemistry of Enzyme-Catalyzed Reactions*, Academic Press: San Diego, **2002**;
(b) Bommarius, A. S.; Riebel, B. R. *Biocatalysis*, Wiley-VHC: Weinheim, **2004**;
(c) Faber, K. *Biotransformations in Organic Chemistry*, Springer-Verlag, Berlin, 5th Ed., **2004**;
(d) Aledo, J. C.; Lobo, C.; Valle, A. E. D. Energy diagrams for enzyme-catalyzed reactions: concepts and misconcepts, *Biochem. Mol. Biol. Educ.* **2003**, 31, 234-236.
- 5 (a) Wohlgemuth, R. Interfacing biocatalysis and organic synthesis, *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **2007**, 82, 1055-1062;
(b) Aehle, W. *Enzymes in Industry: Production and Applications*, Wiley-VCH Verlag GmbH: Weinheim, **2007**.
- 6 (a) Pollard, D. J.; Woodley, J. M. Biocatalysis for pharmaceutical intermediates: the future is now, *Trends Biotechnol.* **2006**, 25, 66-73;
(b) Schmid, A.; Dordick, J. S.; Hauer, B.; Kiener, A.; Wubbolts, M.; Witholt, B. Industrial biocatalysis today and tomorrow, *Nature*, **2001**, 409, 258-268.
- 7 (a) Stinson, S. C. Chiral Pharmaceuticals *Chem. Eng. News* **2001**, 79, 79-97;
(b) Breuer, M.; Ditrich, K.; Habicher, T.; Hauer, B.; Kessler, M.; Stürmer, R.; Zelinski, T. Industrial methods for the production of optically active intermediates, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, 43, 788-824;
(c) Carey, J. S.; Laffan, D.; Thomson, C.; Williams, M. T. Analysis of the reactions used for the preparation of drug candidate molecules, *Org. Biomol. Chem.* **2006**, 4, 2337-2347;
(d) Volume especial de enzimas em síntese: *Chem. Rev.* **2011**, 111, 3995-4404.

- 8 (a) Hall, D. G. *Boronic Acids: Preparation, Applications in Organic Synthesis and Medicine*; Wiley-VCH: Weinheim, Germany, **2005**;
(b) Stefani, H. A.; Cella, R.; Vieira, A. S. Recent advances in organotrifluoroborates chemistry, *Tetrahedron* **2007**, *63*, 3623-3658;
(c) Darses, S.; Genet, J. P. Potassium organotrifluoroborates: new perspectives in organic synthesis, *Chem. Rev.* **2008**, *108*, 288-325;
(d) Molander, G. A.; Figueroa, R. Organotrifluoroborates: expanding organoboron chemistry, *Aldrichim. Acta* **2005**, *38*, 49-56.
- 9 Molander, G. A.; Felix, L. A. Stereoselective Suzuki–Miyaura cross-coupling reactions of potassium alkenyltrifluoroborates with alkenyl bromides, *J. Org. Chem.* **2005**, *70*, 3950-3956 e referências citadas;
- 10 Frankland, E.; Duppa, B. F. Vorläufige Notiz über Boräthyl, *Justus Liebigs Ann. Chem.* **1860**, *115*, 319-322.
- 11 Brown, H. C.; Rao, B. C. S. A new technique for the conversion of olefins into organoboranes and related alcohols, *J. Am. Chem. Soc.* **1956**, *78*, 5694-5695
- 12 Ramachandran, P. V. Pinane-based versatile allyl boranes, *Aldrichim. Acta* **2002**, *35*, 23-35.
- 13 (a) Brown, H. C. Hydroboration – a powerful synthetic tool, *Tetrahedron* **1961**, *12*, 117-138;
(b) Brown, H. C.; Lane, C. F. The base-induced reaction of organoboranes with bromine. A convenient procedure for the anti-Markovnikov hydrobromination of terminal olefins via hydroboration-bromination, *J. Am. Chem. Soc.* **1970**, *92*, 6660-6661;
(c) Allred, E. L.; Sonnenberg, J.; Winstein, S. Preparation of homobenzyl and homoallyl alcohols by the hydroboration method, *J. Org. Chem.* **1960**, *25*, 26-29;
(d) Dhillon, R. S. *Hydroboration and Organic Synthesis*, Springer-Verlag, Berlin, Germany, **2007**.
- 14 (a) Ishiyama, T.; Murata, M.; Miyaura, N. Palladium(0)-catalyzed cross-coupling reaction of alkoxydiboron with haloarenes: a direct procedure of arylboronic esters, *J. Org. Chem.* **1995**, *60*, 7508-7510;
(b) Ishiyama, T.; Itoh, Y.; Kitano, T.; Miyaura, N. Synthesis of arylboronates via the palladium(0)-catalyzed cross-coupling reaction of tetra(alcoxo)diborons with aryl triflates, *Tetrahedron Lett.* **1997**, *38*, 3447-3450.
- 15 (a) Mun, S.; Lee, J.-E.; Yun, J. Copper-catalyzed β -boration of α,β -unsaturated carbonyl compounds: rate acceleration by alcohol additives, *Org. Lett.* **2006**, *8*, 4887-4889;

- (b) Lee, J.-E.; Yun, J. Catalytic asymmetric boration of acyclic α,β -unsaturated esters and nitriles, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 145-147;
- (c) Lillo, V.; Geier, M. J.; Westcott, S. A.; Fernández, E. Ni and Pd mediate asymmetric organoboron synthesis with ester functionality at the β -position, *Org. Biomol. Chem.* **2009**, *7*, 4674-4676;
- (d) Fleming, W. J.; Müller-Bunz, H.; Lillo, V.; Fernández, E.; Guiry, P. J. Axially chiral P-N ligands for the copper catalyzed β -borylation of α,β -unsaturated esters, *Org. Biomol. Chem.* **2009**, *7*, 2520-2524;
- (e) Lillo, V.; Prieto, A.; Bonet, A.; Díaz-Requejo, M. M.; Ramírez, J.; Pérez, P. J.; Fernández, E. Asymmetric β -boration of α,β -unsaturated esters with chiral (NHC)Cu catalysts, *Organometallics* **2009**, *28*, 659-662;
- (f) Chen, I.-H.; Yin, L.; Itano, W.; Kanai, M.; Shibasaki, M. Catalytic asymmetric synthesis of chiral tertiary organoboronic esters through conjugate boration of β -substituted cyclic enones, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 11664-11665;
- (g) Chen, I.-H.; Kanai, M.; Shibasaki, M. Copper(I)-secondary diamine complex-catalyzed enantioselective conjugate boration of linear α,β -disubstituted enones, *Org. Lett.* **2010**, *12*, 4098-4101.

- 16 (a) Martin, R.; Buchwald, S. L. Palladium-catalyzed Suzuki-Miyaura cross-coupling reactions employing dialkylbiaryl phosphine ligands, *Acc. Chem. Rev.* **2008**, *41*, 1461-1473;
- (b) Molander, G. A.; Ellis, N. Organotrifluoroborates: protected boronic acids that expand the versatility of Suzuki coupling reaction, *Acc. Chem. Rev.* **2007**, *40*, 275-286;
- (c) Miyaura, N.; Suzuki, A. Palladium-catalyzed cross-coupling reactions of organoboron compounds, *Chem. Rev.* **1995**, *95*, 2457-2483;
- (d) Bellina, F.; Carpita, A.; Rossi, R. Palladium catalysts for the Suzuki cross-coupling reaction: an overview of recent advances, *Synthesis* **2004**, *15*, 2419-2440;
- (e) Kotha, S.; Lahiri, K.; Kashinath, D. Recent applications of the Suzuki-Miyaura cross-coupling reaction in organic synthesis, *Tetrahedron* **2002**, *58*, 9633-9695.

- 17 (a) Seechurn, C. C. C. J.; Kitching, M. O.; Colacot, T. J.; Snieckus, V. Palladium-catalyzed cross-coupling: a historical contextual perspective to the 2010 Nobel Prize, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 5062-5085 e referências citadas;
- (b) Negishi, E. Magical power of transition metals: past, present, and future (Nobel Lecture), *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 6738-6764;
- (c) Suzuki, A. Cross-coupling reactions of organoboranes: an easy way to construct C-C bonds (Nobel Lecture), *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 6722-6737.

- 18 Petasis, N. A.; Zavialov, I. A. A new and practical synthesis of α -amino acids from alkenyl boronic acids, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 445-446.

19 Ishihara, K.; Yamamoto, H. Arylboron compounds as acid catalysts in organic synthetic transformations, *Eur. J. Org. Chem.* **1999**, 119, 527-538.

20 Matteson, D. S. Boronic esters in asymmetric synthesis, *J. Org. Chem.* **2013**, 78, 10009-10023.

21 Yu, H.; Wang, B. Arylboronic acid-facilitated selective reduction of aldehydes by tributyltin hydride, *Synth. Commun.* **2001**, 31, 2719-2725.

22 Morrill, C.; Funk, T. W.; Grubbs, R. H. Synthesis of tri-substituted vinyl boronates via ruthenium-catalyzed olefin cross-metathesis, *Tetrahedron Lett.* **2004**, 45, 7733-7736.

23 (a) Andrade, L. H.; Barcellos, T. Lipase-catalyzed highly enantioselective kinetic resolution of boron-containing chiral alcohols, *Org. Lett.* **2009**, 14, 3052-3055;

(b) Andrade, L. H.; Barcellos, T.; Santiago, C. G. Chemoenzymatic synthesis of boron-containing chiral amines and amides, *Tetrahedron: Asymmetry* **2010**, 21, 2419-2424;

(c) Barcellos, T.; Andrade, L. H.; Tauber, K.; Kroutil, W. Stereocomplementary asymmetric bioreduction of boron-containing ketones mediated by alcohol dehydrogenases, *Tetrahedron: Asymmetry* **2011**, 22, 1772-1777;

(d) Brondani, P. B.; de Gonzalo, G.; Fraaije, M. W.; Andrade, L. H. Selective oxidations of organoboron compounds catalyzed by Baeyer–Villiger monooxygenases, *Adv. Synth. Catal.* **2011**, 353, 2169-2173;

(e) Brondani, P. B.; Dudek, H.; Reis, J. S.; Fraaije, M. W.; Andrade, L. H. Exploiting the enantioselectivity of Baeyer–Villiger monooxygenases via boron oxidation, *Tetrahedron: Asymmetry* **2012**, 23, 703-708.

24 (a) Teicher, B. A.; Ara, G.; Herbst, R.; Palombella, V. J.; Adams, J. The proteasome inhibitor PS-341 in cancer therapy, *Clin. Cancer Res.* **1999**, 5, 2638-2645;

(b) Myung, J.; Bokim, K.; Crews, C. M. The ubiquitin-proteasome pathway and proteasome inhibitors, *Med. Res. Rev.* **2001**, 21, 245-273;

(c) Nalepa, G.; Rolfe, M.; Harper, J. W. Drug discovery in the ubiquitin-proteasome system, *Nat. Rev. Drug. Discov.* **2006**, 5, 596-613.

25 Anacor Pharmaceuticals (www.anacor.com) acessado em 09 de outubro de 2013.

26 (a) Schmid, R. D.; Verger, R. Lipases: interfacial enzymes with attractive applications, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, 37, 1608-1633;

(b) Theil, F. Lipase-supported synthesis of biologically active compounds, *Chem. Rev.* **1995**, 95, 2203-2227;

(c) Koeller, K. M.; Wong, C. H. Enzymes for chemical synthesis, *Nature* **2001**, 409, 232-240;

- (d) Carrea, G.; Riva, S. Properties and synthetic applications of enzymes in organic solvents, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, 39, 2226-2254;
- (e) Ghanem, A.; Aboul-Enein, H. Y. Application of lipases in kinetic resolution of racemates, *Chirality* **2005**, 17, 1-15;
- (f) Yang, H.; Henke, E.; Bornscheuer, U. T. The use of vinyl esters significantly enhanced enantioselectivities and reaction rates in lipase-catalyzed resolutions of arylaliphatic carboxylic acids, *J. Org. Chem.* **1999**, 64, 1709-1712.
- 27 (a) Bornscheuer, U. T.; Kazlauskas, R. J. *Hydrolases in Organic Synthesis*, Wiley-VHC, Weinheim, 2nd Ed., **2006**.
- (b) Jurček, O.; Wimmerová, M.; Wimmer, Z. Selected chiral alcohols: enzymic resolution and reduction of convenient substrates, *Coord. Chem. Rev.* **2008**, 252, 767-781.
- 28 (a) Milner, S. E.; Brossat, M.; Moody, T. S.; Elcoate, C. J.; Lawrence, S. E.; Maguire, A. R. Efficient kinetic bioresolution of 2-nitrocyclohexanol, *Tetrahedron: Asymmetry* **2010**, 21, 1011-1016;
- (b) Brossat, M.; Moody, T. S.; de Nanteuil, F.; Taylor, S. J. C.; Vaughan, F. Development of an acid-washable tag for the separation of enantiomers from bioresolutions, *Org. Proc. Res. Dev.* **2009**, 13, 706-709.
- 29 (a) Wolfenden, R.; Snider, M. J. The depth of chemical time and the power of enzymes as catalysts, *Acc. Chem. Res.* **2001**, 34, 938-945;
- (b) Brossat, M.; Moody, T. S.; Taylor, S. J. C.; Wiffen, J. W. Simple one-pot process for the bioresolution of tertiary amino ester protic ionic liquids using subtilisin, *Tetrahedron: Asymmetry* **2009**, 20, 2112-2116.
- 30 (a) Ammazalorso, A.; Amoroso, R.; Bettoni, G.; De Filippis, B.; Fantacuzzi, M.; Giampietro, L.; MacCallini, C.; Tricca, M. L. *Candida rugosa* lipase-catalysed kinetic resolution of 2-substituted-aryloxyacetic esters with dimethylsulfoxide and isopropanol as additives, *Chirality* **2008**, 20, 115-118;
- (b) Moreno, J. M.; Sinisterra, J. V. A systematic analysis of the variables that control a highly stereoselective resolution of racemic non-steroidal antiinflammatory drugs using immobilized lipase from *Candida cylindracea* *J. Mol. Catal. A: Chem.* **1995**, 98, 171-184.
- 31 Kogure, T.; Eliel, E. L. A convergent asymmetric synthesis of (-)-malyngolide and its three stereoisomers, *J. Org. Chem.* **1984**, 49, 576-578.
- 32 Deasy, R. E.; Brossat, M.; Moody, T. S.; Maguire, A. R. Lipase catalysed kinetic resolutions of 3-aryl alkanolic acids, *Tetrahedron: Asymmetry* **2011**, 22, 47-61.

- 33 Rodríguez-Mata, M.; García-Urdiales, E.; Gotor-Fernández, V.; Gotor, V. Stereoselective chemoenzymatic preparation of β -Amino esters: molecular modelling considerations in lipase-mediated processes and application to the synthesis of (S)-Dapoxetine, *Adv. Synth. Catal.* **2010**, 352, 395-406.
- 34 Pietruszka, J.; Simon, R. C.; Kruska, F.; Braun, M. Dynamic enzymatic kinetic resolution of methyl 2,3-dihydro-1*H*-indene-1-carboxylate, *Eur. J. Org. Chem.* **2009**, 35, 6217-6224.
- 35 Brem, J.; Paizs, C.; Toşa, M. I.; Vass, E.; Irimie, F. D. Enzyme-catalyzed synthesis of (*R*)- and (*S*)-3-heteroaryl-3-hydroxy-propanoic acids and their derivatives; *Tetrahedron: Asymmetry* **2009**, 20, 489-496.
- 36 Dietz, F. R.; Prechter, A.; Gröger, H.; Heinrich, M. R. Chiral azo compounds: enantioselective synthesis and transformations into β -amino alcohols and α -amino acids with a quaternary stereocenter, *Tetrahedron Lett.* **2011**, 52, 655-657.
- 37 Kamal, A.; Malik, M. S.; Azeeza, S.; Bajee, S.; Shaik, A. A. Total synthesis of (*R*)- and (*S*)-turmerone and (7*S*,9*R*)-bisacumol by an efficient chemoenzymatic approach, *Tetrahedron: Asymmetry* **2009**, 20, 1267-1271.
- 38 Liang, J. T.; Mani, N. S.; Jones, T. K. Design of concise, scalable route to a cholecystokinin 1 (CCK 1) receptor antagonist, *J. Org. Chem.* **2007**, 72, 8243-8250.
- 39 Kamath, V. P.; Juarez-Brambila, J. J.; Morris, C. B.; Winslow, C. D.; Morris, P. E. Development of a practical synthesis of a purine nucleoside phosphorylase inhibitor: BCX-4208, *Org. Proc. Res. Dev.* **2009**, 13, 928-932.
- 40 Ladner, W. E.; Whitesides, G. M. Lipase-catalyzed hydrolysis as a route to esters of chiral epoxy alcohols, *J. Am. Chem. Soc.* **1984**, 106, 7250-7251.
- 41 Yadav, J. S.; Reddy, G. S.; Srinivas, D.; Himabindu, K. Zinc promoted mild and efficient method for the esterification of acid chlorides with alcohols, *Synth. Comm.* **1998**, 28, 2337-2342.
- 42 (a) Kamal, A.; Malik, M. S.; Shaik, A. A.; Azeeza, S. Enantioselective synthesis of (*R*)- and (*S*)-curcumene and curcuphenol: an efficient chemoenzymatic route, *Tetrahedron: Asymmetry* **2007**, 18, 2547-2553;
(b) Paál, T. A.; Forró, E.; Fülöp, F.; Liljeblad, A.; Kanerva, L. T. Lipase-catalyzed kinetic resolution of 1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline-1-acetic acid esters, *Tetrahedron: Asymmetry* **2008**, 19, 2784-2788;

(c) Varma, R.; Kasture, S. M.; Nene, S.; Kalkote, U. R. Lipases catalyzed enantioselective hydrolysis of (*R,S*)-methyl 1,4-benzodioxan-2-carboxylate intermediate for (*S*)-doxazosin mesylate, *World J. Microbiol. Biotechnol.* **2008**, *24*, 577-579.

43 Denmark, S. E.; Ahmad, M. Carbonylative ring opening of terminal epoxides at atmospheric pressure, *J. Org. Chem.* **2007**, *72*, 9630-9634.

44 Kato, N. Direct chirality determination of secondary carbinol by chirality recognition ability of C₂ symmetry 1,1'-binaphthyl-2,2'-diyl phosphoryl chloride, *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 254-257.

45 (a) Gotor-Fernández, V.; Brieva, R.; Gotor, V. Lipases: useful biocatalysts for the preparation of pharmaceuticals, *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2006**, *40*, 111-120;

(b) Kazlauskas, R. J.; Weissfloch, A. N. E.; Rappaport, A. T.; Cuccia, L. A. A rule to predict which enantiomer of a secondary alcohol reacts faster in reactions catalyzed by cholesterol esterase, lipase from *Pseudomonas cepacia*, and lipase from *Candida rugosa*, *J. Org. Chem.* **1991**, *56*, 2656-2665.

46 Voet D.; Voet, J. G.; Pratt, C. W. *Fundamentals of Biochemistry*, John Wiley & Sons, New York, 3rd Ed. **1999**.

47 (a) Koszelewski, D.; Tauber, K.; Faber, K.; Kroutil, W. ω -Transaminases for the synthesis of non-racemic α -chiral primary amines, *Trends Biotechnol.* **2010**, *28*, 324-332;

(b) Mehta, P. K.; Hale, T. I.; Christen, P. Aminotransferases: demonstration of homology and division into evolutionary subgroups, *Eur. J. Biochem.* **1993**, *214*, 549-561;

(c) Svedendahl, M. Lipase and ω -Transaminase – Biocatalytic Investigations, Tese de doutorado, **2010**, Royal Institute of Technology, Stockholm, Sweden;

(d) Koszelewski, D.; Lavandera, I.; Clay, D.; Rozzell, D.; Kroutil, W. Asymmetric synthesis of optically pure pharmacologically relevant amines employing ω -transaminases, *Adv. Synth. Catal.* **2008**, *350*, 2761-2766;

(e) Truppo, M. D.; Rozzell, J. D.; Turner, N. J. Efficient production of enantiomerically pure chiral amines at concentrations of 50 g/L using transaminases, *Org. Process Res. Dev.* **2010**, *14*, 234-237;

(f) Tufvesson, P.; Lima-Ramos, J.; Jensen, J. S.; Al-Haque, N.; Neto, W.; Woodley, J. M. Process considerations for the asymmetric synthesis of chiral amines using transaminases, *Biotechnol. Bioeng.* **2011**, *108*, 1479-1493;

(g) Mutti, F. G.; Sattler, J.; Tauber, K.; Kroutil, W. Creating a biocatalyst for the production of an optically pure sterically hindered amine, *ChemCatChem* **2011**, *3*, 109-111;

- (h) Mutti, F. G.; Fuchs, C. S.; Pressnitz, D.; Sattler, J. H.; Kroutil, W. Stereoselectivity of four (*R*)-selective transaminases for the asymmetric amination of ketones, *Adv. Synth. Catal.* **2011**, 353, 3227-3233;
- (i) Koszelewski, D.; Clay, D.; Rozzell, D.; Kroutil, W. Deracemisation of α -chiral primary amines by a one-pot, two-step cascade reaction catalysed by ω -transaminases, *Eur. J. Org. Chem.* **2009**, 2289-2292;
- (j) Schätzle, S.; Steffen-Munsberg, F.; Thontowi, A.; Höhne, M.; Robins, K.; Bornscheuer, U. T. Enzymatic asymmetric synthesis of enantiomerically pure aliphatic, aromatic and arylaliphatic amines with (*R*)-selective amine transaminases, *Adv. Synth. Catal.* **2011**, 353, 2439-2445;
- (k) Truppo, M.; Turner, N. J. Micro-scale process development of transaminase catalysed reactions, *Org. Biomol. Chem.* **2010**, 8, 1280-1283;
- (l) Andrade, L. H.; Silva, A. V.; Milani, P.; Koszelewski, D.; Kroutil, W. ω -Transaminases as efficient biocatalysts to obtain novel chiral selenium-amine ligands for Pd-catalysis, *Org. Biomol. Chem.* **2010**, 8, 2043-2051;
- (m) Clay, D.; Koszelewski, D.; Grischek, B.; Gross, J.; Lavandera, I.; Kroutil, W. Testing of microorganisms for ω -transaminase activity, *Tetrahedron: Asymmetry* **2010**, 21, 2005-2009.
- 48 Koszelewski, D.; Lavandera, I.; Clay, D.; Guebitz, G. M.; Rozzell, D.; Kroutil, W. Formal asymmetric biocatalytic reductive amination, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, 47, 9337-9340.
- 49 (a) Silverman, R. B. *The Organic Chemistry of Enzyme-Catalyzed Reactions*, Academic Press, San Diego, **2000**.
- (b) Oshima, T.; Tamiya, N. Mechanism of transaminase action, *Biochem J.* **1961**, 78, 116-119.
- 50 Blacker, A. J.; Stirling, M. J.; Page, M. I. Catalytic racemisation of chiral amines and application in dynamic kinetic resolution, *Org. Process Res. Dev.* **2007**, 11, 642-648.
- 51 (a) Nugent, T. *Chiral amine synthesis*, Wiley-VHC, Weinheim, **2010**;
- (b) Coppola, G. M.; Schuster, H. F. *Asymmetric Synthesis, Construction of Chiral Molecules using Amino Acids*; Wiley Interscience; New York **1987**.
- 52 Procter, G. *Asymmetric Synthesis*, Oxford University Press: Oxford **1996**.
- 53 Höhne, M.; Bornscheuer, U. T. Biocatalytic routes to optically active amines, *ChemCatChem* **2009**, 1, 42-51.
- 54 Jacobsen, E. N., Pfaltz, A., Yamamoto, H., *Comprehensive Asymmetric Catalysis*; Springer: London **1999**.

55 Blaser, H. U.; Schmidt, E. D. *Asymmetric Catalysis on Industrial Scale: Challenges, Approaches and Solutions*; Wiley-VCH: Weinheim **2004**.

56 Blaser, H. U.; Buser, H. P.; Jalett, H. P.; Pugin, B.; Spindler, F. Iridium ferrocenyl diphosphine catalyzed enantioselective reductive alkylation of a hindered aniline, *Synlett* **1999**, 867-868.

57 Hoffmann, S.; Seayad, A. M.; List, B. A powerful Brønsted acid catalyst for the organocatalytic asymmetric transfer hydrogenation of imines, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 7424-7427.

58 (a) Nugent, T. C.; El-Shazly, M.; Wakchaure, V. N. Ytterbium acetate promoted asymmetric reductive amination: significantly enhanced stereoselectivity, *J. Org. Chem.* **2008**, *73*, 1297-1305;

(b) Nugent, T. C.; Ghosh, A. K.; Wakchaure, V. N.; Mohanty, R. R. Asymmetric reductive amination: convenient access to enantioenriched alkyl-alkyl or aryl-alkyl substituted α -chiral primary amines, *Adv. Synth. Catal.* **2006**, *348*, 1289-1299;

(c) Nugent, T. C.; Wakchaure, V. N.; Ghosh, A. K.; Mohanty, R. R. Evolution of titanium(IV) alkoxides and Raney Nickel for asymmetric reductive amination of prochiral aliphatic ketones, *Org. Lett.* **2005**, *7*, 4967-4970.

59 (a) Tanuwidjaja, J.; Peltier, H. M.; Ellman, J. A. One-pot asymmetric synthesis of either diastereomer of *tert*-butanesulfinyl-protected amines from ketones, *J. Org. Chem.* **2007**, *72*, 626-629;

(b) Borg, G.; Cogan, D. A.; Ellman, J. A. One-pot asymmetric synthesis of *tert*-butanesulfinyl-protected amines from ketones by the in situ reduction of *tert*-butanesulfinyl ketimines *Tetrahedron Lett.* **1999**, *40*, 6709-6712.

60 (a) Cogan, D. A.; Liu, G.; Ellman, J. Asymmetric synthesis of chiral amines by highly diastereoselective 1,2-additions of organometallic reagents to *N-tert*-butanesulfinyl imines, *Tetrahedron* **1999**, *55*, 8883-8904;

(b) Liu, G.; Cogan, D. A.; Ellman, J. Catalytic asymmetric synthesis of *tert*-butanesulfinamide. Application to the asymmetric synthesis of amines, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 9913-9914.

61 (a) Takahashi, H.; Chida, Y.; Higashiyama, K.; Onishi, H. Asymmetric α -substituted phenethylamines. Synthesis of chiral 1-alkyl-2-phenylethylamines via Grignard reaction of 4-phenyl-1,3-oxazolidines, *Chem. Pharm. Bull.* **1985**, *33*, 4662-4670;

(b) Muralidharan, K. R.; Mokhallatl, M. K.; Pridgen, L. N. Enantioselective synthesis of α -amino acetals (aldehydes) via nucleophilic 1,2-addition to chiral 1,3-oxazolidines, *Tetrahedron Lett.* **1994**, *35*, 7489-7492.

- 62 (a) Jennings, W. B.; Lovely, C. J. The titanium tetrachloride induced synthesis of *N*-phosphinoylimines and *N*-sulphonylimines directly from aromatic aldehydes, *Tetrahedron* **1991**, *47*, 5561-5568;
(b) Wipf, P.; Stephenson, C. R. J. Dimethylzinc-mediated addition of alkenylzirconocenes to α -keto and α -imino esters, *Org. Lett.* **2003**, *5*, 2449-2452.
- 63 (a) Kawatsura, M.; Hartwig, J. F. Palladium-catalyzed intermolecular hydroamination of vinylarenes using arylamines, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 9546-9547;
(b) Li, K.; Horton, P. N.; Hursthouse, M. B.; Hii, K. K. Air- and moisture-stable cationic (diphosphine)palladium(II) complexes as hydroamination catalysts X-ray crystal structures of two [(diphosphine)Pd(NCMe)(OH₂)]²⁺[OTf]₂⁻ complexes, *J. Organomet. Chem.* **2003**, *665*, 250-257.
- 64 Andrade, L. H.; Silva, A. V. First chemoenzymatic synthesis of organoselenium amines and amides, *Tetrahedron: Asymmetry* **2008**, *19*, 1175-1181.
- 65 (a) Pàmies, O.; Éll, A. H.; Samec, J. S. M.; Hermanns, N.; Bäckvall, J. E. An efficient and mild ruthenium-catalyzed racemization of amines: application to the synthesis of enantiomerically pure amines, *Tetrahedron Lett.* **2002**, *43*, 4699-4702;
(b) Paetzold J.; Bäckvall, J. E. Chemoenzymatic dynamic kinetic resolution of primary amines, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 17620-17621.
- 66 Parvulescu, A.; Jacobs, P.; De Vos, D. Palladium catalysts on alkaline-earth supports for racemization and dynamic kinetic resolution of benzylic amines, *Chem. Eur. J.* **2007**, *13*, 2034-2043.
- 67 Xiao, B.; Li, Y.-M.; Liu, Z.-J.; Yang, H.-Y.; Fu, Y. Palladium-catalyzed monoselective C-H borylation of acetanilides under acidic conditions, *Chem. Commun.* **2012**, *48*, 4854-4856.
- 68 Jain, S. L.; Sain, B. Efficient transition-metal-free oxidation of benzylic and secondary alcohols to the carbonyl compounds using an *N*-bromosuccinimide/NH₄Cl system, *Synth. Commun.* **2006**, *36*, 1459-1462.
- 69 Chea, H.; Sim, H.-S.; Yun, J. Ligandless copper-catalyzed β -boration of α,β -unsaturated compounds in aqueous solution, *Bull. Korean Chem. Soc.* **2010**, *31*, 551-552.
- 70 Jung, H.-Y.; Feng, X.; Kim, H.; Yun, J. Copper-catalyzed boration of activated alkynes. Chiral boranes via a one-pot copper-catalyzed boration and reduction protocol, *Tetrahedron* **2012**, *68*, 3444-3449.

71 Molander, G. A.; Cavalcanti, L. N.; Canturk, B.; Pan, P.-S.; Kennedy, L. E. Efficient hydrolysis of organotrifluoroborates via silica gel and water, *J. Org. Chem.* **2009**, *74*, 7364-7369.

72 (a) Koszelewski, D.; Göritzer, M.; Clay, D.; Seisser, B.; Kroutil, W. Synthesis of optically active amines employing recombinant ω -transaminases in *E. coli* cells, *ChemCatChem* **2010**, *2*, 73-77;

(b) Koszelewski, D.; Pressnitz, D.; Clay, D.; Kroutil, W. Deracemization of Mexiletine biocatalyzed by ω -transaminases, *Org. Lett.* **2009**, *11*, 4810-4812;

(c) Hanson, R. L.; Davis, B. L.; Chen, Y.; Goldberg, S. L.; Parker, W. L.; Tully, T. P.; Montana, M. A.; Patel, R. N. Preparation of (*R*)-amines from racemic amines with an (*S*)-amine transaminase from *Bacillus megaterium*, *Adv. Synth. Catal.* **2008**, *350*, 1367-1375.

73 Savile, C. K.; Janey, J. M.; Mundorff, E. C.; Moore, J. C.; Tam, S.; Jarvis, W. R.; Colbeck, J. C.; Krebber, A.; Fleitz, F. J.; Brands, J.; Devine, P. N.; Huisman, G. W.; Hughes, G. J. Biocatalytic asymmetric synthesis of chiral amines from ketones applied to Sitagliptin manufacture, *Science* **2010**, *329*, 305-309.

74 Wrackmeyer, B. Carbon-13 NMR spectroscopy of boron compounds, *Prog. Nucl. Mag. Reson. Spectrosc.* **1979**, *12*, 227-259.

75 Armarego, W. L. F.; Chai, C. L. L., *Purification of Laboratory Chemicals*. 5^a ed.; Butterworth-Heinemann: Bodmin, Cornwall, **2003**.

76 Mutti, F. G.; Fuchs, C. S.; Pressnitz, D.; Turrini, N. G.; Sattler, J. H.; Lerchner, A.; Skerra, A.; Kroutil, W. Amination of ketones by employing two new (*S*)-selective ω -Transaminases and the His-tagged ω -TA from *Vibrio fluvialis*, *Eur. J. Org. Chem.* **2012**, *2012*, 1003-1007.

