

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Biorredução de compostos carbonílicos α,β -insaturados visando à
síntese de substâncias opticamente ativas

Rafaela Marcucci Silva

Ribeirão Preto

2015

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Biorredução de compostos carbonílicos α,β -insaturados visando à
síntese de substâncias opticamente ativas

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Ciências
Farmacêuticas para obtenção do Título de
Mestre em Ciências

Área de Concentração: Produtos Naturais e
Sintéticos

Orientada: Rafaela Marcucci Silva

Orientador: Prof. Dr. Giuliano Cesar Clososki

Versão corrigida da Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas no dia 27/04/2015. A versão original encontra-se disponível na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP.

Ribeirão Preto

2015

FICHA CATALOGRÁFICA

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Silva, Rafaela Marcucci

Biorredução de compostos carbonílicos α,β -insaturados visando à síntese de substâncias opticamente ativas. Ribeirão Preto, 2015.

162 p.; 30cm.

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Produtos Naturais e Sintéticos.

Orientador: Clososki, Giuliano Cesar.

1. Biorredução. 2. Compostos carbonílicos α,β -insaturados. 3. Micro-organismo. 4. *Saccharomyces cerevisiae*.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Rafaela Marcucci Silva

Título do trabalho: Biorredução de compostos carbonílicos α,β -insaturados visando à síntese de substâncias opticamente ativas

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas para obtenção do Título de Mestre em Ciências

Área de Concentração: Produtos Naturais e Sintéticos.

Orientador: Prof. Dr. Giuliano Cesar Clososki

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Aos meus pais Neusa e Sergio e à minha irmã Patrícia por serem minha estrutura e por todo amor, carinho, paciência e apoio incondicional. Sem vocês, eu não teria conseguido.

Essa conquista também é de vocês.

Muito obrigada!

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, a Deus por sempre me guiar e proteger.

Ao Prof. Dr. Giuliano, meu orientador desde a iniciação científica, pela amizade, ensinamentos, paciência, dedicação, confiança e incentivo.

Aos professores do Núcleo de Pesquisa em Produtos Naturais e Sintéticos (NPPNS), Prof. Dr. Noberto Peporine Lopes, Prof. Dr. João Callegari, Profa. Dra. Dionéia Camilo, Profa. Dra. Hosana Debonsi, por todos os conhecimentos transmitidos e conselhos.

A todos os meus companheiros de laboratório pelo amadurecimento, aprendizado, superações e alegrias que compartilhamos durante esse período. Em especial, Simone (Sica), Evelyn, João, Samuel, Shirley, Fernanda e Leandro (Ceará) pela agradável convivência, amizade e por todo o apoio.

A todos os colegas do NPPNS.

Aos técnicos, tanto os responsáveis pela organização do laboratório, Felipe e Dani, como aqueles responsáveis pelas análises instrumentais, Tomaz, Vinícius e Júnior, por toda dedicação e por terem contribuído, direta ou indiretamente, no desenvolvimento deste trabalho. Em especial, à técnica Isabel Cristina (Cris) por toda compreensão, amizade e por estar sempre disposta a ajudar.

À Profa. Dra. Laura Tieme Okano pela colaboração com as análises de dicroísmo circular.

Ao Prof. Dr. José Augusto Rosário Rodrigues por ter cedido gentilmente a linhagem de *Pichia kluyveri*.

A todos os meus amigos que, mesmo de longe, acompanharam todas as minhas fases, por todo carinho, compreensão e pelo poucos, porém, valiosos, momentos de descontração.

À CAPES pela bolsa concedida e à CNPq e FAPESP pelo apoio financeiro.

Ao meu namorado Walter que estava sempre ao meu lado nos momentos de ansiedade, nervosismo, tristeza e felicidade. Com todo amor, carinho e cumplicidade me incentivou ao longo desse caminho.

À minha irmã Patrícia, por estar sempre torcendo por mim e por todo amor, amizade, paciência e apoio. Era confortante saber que ela estava sempre ali para tudo o que eu precisasse.

Aos meus pais, que são meu alicerce e meu exemplo de luta, força, honestidade e por sempre terem acreditado em mim, até quando nem eu mesma acreditava. Por todo amor, carinho, atenção, amparo e incentivo que foram essenciais para a realização deste trabalho e,

principalmente, aquele abraço no momento que eu mais precisei. Por compartilharem minhas angústias e anseios. Vocês são a minha inspiração para seguir em frente, enfrentar as dificuldades e conquistar meus objetivos.

Expresso aqui meus inestimáveis agradecimentos. De uma maneira singular e fundamental, cada um de vocês colaboraram para o desenvolvimento e conclusão desta dissertação.

"Por vezes sentimos que aquilo que fazemos é senão uma gota de água no mar. Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota"

Madre Tereza de Calcutá

RESUMO

SILVA, R. M. **Biorredução de compostos carbonílicos α,β -insaturados visando à síntese de substâncias opticamente ativas.** 2015. 162f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2015.

Nos últimos anos, a preparação de substâncias enantiomericamente puras tornou-se uma preocupação constante e um desafio para a indústria. Tal fato é consequência da relação tênue entre a estrutura espacial das substâncias e os diferentes sabores, odores, processos farmacocinéticos e farmacodinâmicos e toxicidade que elas desempenham no organismo. Nesse contexto, a síntese assimétrica de compostos carbonílicos α -alquil substituídos opticamente ativos tem recebido grande atenção já que estes são importantes blocos de construção na síntese de fármacos quirais e produtos naturais. Assim, o presente trabalho buscou o desenvolvimento de metodologias que permitissem a preparação desses compostos enantiomericamente puros através do controle na formação de centros estereogênicos usando a biocatálise. Para isso, foram preparadas diversas olefinas ativadas por grupos retiradores de elétrons (carbonila) utilizando dois procedimentos, a saber, reações de condensação aldólica e esterificação. Esses compostos carbonílicos α,β -insaturados foram obtidos com bons rendimentos (48-94%) e foram submetidos à reduções biocatalíticas mediadas por células íntegras de micro-organismos. Inicialmente, utilizou-se a olefina (*E*)-4-fenil-3-metil-3-buten-2-ona (**51a**) como substrato modelo para a otimização das condições experimentais e determinação daquela que fornecesse o produto biorreduzido com a melhor conversão e pureza enantiomérica. Nesses testes, avaliaram-se diversos parâmetros reacionais, tais como, composição do meio reacional (aquoso, bifásico e tamponante), presença de aditivos (glicose e catalisador de transferência de fase), diferentes micro-organismos e efeito do uso de resina adsorvente Amberlite XAD-7. Dessa forma, a biorredução em meio aquoso, sem aditivos, mediada pela levedura LSC-II e com a utilização da resina Amberlite XAD-7 foi a condição reacional que apresentou o melhor excesso enantiomérico (81%) e foi a selecionada para um estudo metodológico que avaliou os efeitos estérico e eletrônico dos substituintes. Observou-se que a posição do substituinte no β -aril, o alongamento do α -substituinte e a adição de um grupamento éster apresentaram um importante papel na estereosseletividade da reação. Por fim, avaliou-se a aplicação da metodologia na síntese enantiosseletiva da muguesia, uma fragrância floral. Os resultados obtidos revelaram o grande potencial da metodologia na biorredução quimiosseletiva de compostos carbonílicos α,β -insaturados e preparação de substâncias opticamente ativas.

Palavras-chave: Biorredução, compostos carbonílicos α,β -insaturados, micro-organismo, *Saccharomyces cerevisiae*.

ABSTRACT

SILVA, R. M. **Bioreduction of α,β -unsaturated carbonyl compounds toward the synthesis of optically active substances**. 2015. 162f. Dissertation (Master). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2015.

In recent years, the preparation of enantiomerically pure compounds has become a concern and a challenge to the industry. This fact is a consequence of the tenuous relationship between the spatial structure of substances and the different flavors, odors, pharmacokinetic and pharmacodynamic processes and toxicity that they play in the body. In this context, the asymmetric synthesis of α -alkyl substituted optically active carbonyl compounds has received great attention because they are important building blocks in the synthesis of chiral drugs and natural products. Thus, this study aimed to develop methodologies that allow the preparation of this enantiomerically pure compounds by controlling the formation of stereogenic centers using biocatalysis. To this end, various activated olefins substituted with electron withdrawing groups (carbonyl) were synthesized using two procedures, aldol condensation and esterification reactions. These α,β -unsaturated carbonyl compounds were obtained in good yields (48-94%) and subjected to the biocatalytic reduction mediated by whole cells of microorganisms. Initially, we used the olefin (*E*)-3-methyl-4-phenyl-3-buten-2-one (**51a**) as a model substrate for the optimization of the experimental conditions and determine which one provide the product with better conversion and enantiomeric purity. In these tests, we evaluated various reaction parameters such as the composition of the reaction medium (aqueous, biphasic and buffer), the presence of additives (glucose and phase transfer catalyst), different microorganisms and adsorbing effect of using Amberlite XAD-7. Thus, the bioreduction in aqueous medium, without additives, mediated by LSC-II yeast and with the application of Amberlite XAD-7 was the reaction condition that presented the best enantiomeric excess (81%) and was selected for a methodological study that evaluated the steric and electronic effects of the substituents. It was observed that the substituent in the β -position of the aryl group, the size increase of the α -substituent and the presence of an ester group had an important role in the stereoselectivity of the reaction. Finally, application of the methodology on muguesia enantioselective synthesis, a floral fragrance, was evaluated. The results obtained showed the high potential of the methodology in chemoselective bioreduction of α,β -unsaturated carbonyl compounds and preparation of optically active substances.

Keywords: Bioreduction, α,β -unsaturated carbonyl compounds, micro-organism, *Saccharomyces cerevisiae*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Distribuição anual de fármacos aprovados pelo FDA de 1992 a 2008.....	03
Figura 2. Fármacos aprovados pelo FDA em 2012.....	03
Figura 3. Exemplos do efeito da quiralidade na atividade biológica de fármacos.....	04
Figura 4. Exemplos do efeito da quiralidade nas propriedades organolépticas de alguns compostos.....	04
Figura 5. Diagrama de energia comparando uma reação catalisada enzimaticamente com uma não catalisada.....	11
Figura 6. Diagrama de energia de uma reação enantiosseletiva catalisada por enzima comparando a ΔG dos estados de transição dos enantiômeros.....	12
Figura 7. Representação esquemática da teoria dos três pontos.....	13
Figura 8. Estrutura química da resina adsorvente XAD-7.....	29
Figura 9. Espectro obtido no CG-EM do composto 51a	36
Figura 10. Espectro de RMN de ^1H do composto 51a (400 MHz, CDCl_3).....	38
Figura 11. Espectros de diferença de NOE do composto 51a (500 MHz, CDCl_3).....	39
Figura 12. Possíveis configurações da ligação dupla para a olefina 51a	39
Figura 13. Cromatograma de CG-FID-quiral dos enantiômeros obtidos nas biorreduções do substrato 51a	40
Figura 14. Sobreposição dos cromatogramas de CG-FID-quiral dos enantiômeros (<i>S</i>)- e (<i>R</i>)- 53a obtidos nas biorreduções (preto) e o padrão racêmico <i>rac</i> - 53a (vermelho).....	41
Figura 15. Levedura <i>Pichia kluyveri</i> em meio YMA.....	47
Figura 16. Gráfico da biorredução de 51a em meio aquoso com diferentes quantidades de resina mediada pela LSC-II.....	49
Figura 17. Arranjo dos grupos catalíticos na ene redutase.....	52
Figura 18. Espectro obtido no CG-EM do composto 53a	56
Figura 19. Espectro de RMN de ^1H do produto isolado 53a (400 MHz, CDCl_3).....	57
Figura 20. Compostos utilizados nas análises de UV-visível e DC.....	59
Figura 21. Espectros de absorção de luz UV-visível na região de 190 a 400 nm dos compostos 53a , 53c , 53g , 53h , 53i em acetonitrila.....	59
Figura 22. Ampliação do espectro de absorção de luz UV-visível na região de 240 a	60

360 nm dos compostos 53a , 53c , 53g , 53h , 53i em acetonitrila.....	
Figura 23. Espectros de dicroísmo circular (θ) dos compostos 53a , 53c , 53g , 53h , 53i na região de 240 a 360 nm em acetonitrila.....	61
Figura 24. Estereoisômeros da muguesia obtidos utilizando redução química (preto) e biocatalítica (vermelho).....	64

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Classificação das enzimas.....	07
Tabela 2. Exemplos de compostos químicos sintetizados por meio de biorredução catalisada por células íntegras de micro-organismos.....	15
Tabela 3. Biorredução do citral mediado por micro-organismos.....	18
Tabela 4. Biorredução das cetonas α,β -insaturadas mediada por <i>Rhodotorula rubra</i>	19
Tabela 5. Biorredução das cetonas α,β -insaturadas mediada por <i>Mortierella isabellina</i> (Mi) e <i>Geotrichum candidum</i> (Gc).....	20
Tabela 6. Redução assimétrica de enonas 21 com fermento de pão.....	22
Tabela 7. Biorredução de α -alquil- β -aril enonas mediada por OYE1-3.....	23
Tabela 8. Proporção de dessorção e adsorção do substrato e do produto.....	27
Tabela 9. Características e efeito da resina na redução de 6-metil-hept-5-en-2-ona.....	30
Tabela 10. Influência do meio reacional e da adição de aditivos na biorredução do substrato 51a mediada pela LSC-II.....	42
Tabela 11. Biorredução de 51a em meio aquoso monofásico com diferentes linhagens de leveduras de <i>S. cerevisiae</i>	46
Tabela 12. Influência do uso de diferentes meios reacionais na biorredução de 51a com <i>Pichia kluyveri</i>	48
Tabela 13. Proporção de dessorção do substrato da resina para a fase aquosa e de adsorção do produto da fase aquosa para a resina.....	50
Tabela 14. Redução assimétrica de 51 em meio aquoso com a LSC-II e 0,5 g de resina.....	52
Tabela 15. Dados de comprimento de onda de absorção máximo ($\lambda_{\text{máx.}}$) e absortividade molar (ϵ), dos produtos 53a , 53c , 53g , 53h , 53i em acetonitrila.....	59

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1. Representação geral das reações de redução catalisadas por álcool desidrogenase e ene redutase.....	17
Esquema 2. Possível caminho reacional da biorredução de cetonas α,β -insaturadas.....	21
Esquema 3. Biorredução de enonas mediada por <i>S. cerevisiae</i>	23
Esquema 4. Biorredução do acetoacetato de etila.....	26
Esquema 5. Biorredução composto carbonílico α,β -insaturado.....	26
Esquema 6. Biorredução da cetona 2-etil-1-fenil-prop-2-en-1-ona.....	27
Esquema 7. Biorredução do 4-cloro-3-oxobutanoato de etila.....	27
Esquema 8. Biorredução da α -metil cetona.....	29
Esquema 9. Biorredução do 2-etil-1-fenil-prop-2-en-1-ona.....	29
Esquema 10. Redução assimétrica de cetonas com <i>G. candidum</i>	31
Esquema 11. Preparação dos substratos 51a-j	35
Esquema 12. Preparação do substrato 51k	36
Esquema 13. Propostas de fragmentação do composto 51a após ionização por impacto de elétrons (70 eV).....	37
Esquema 14. Esquema geral da biorredução do substrato 51a	40
Esquema 15. Esquema geral da redução química das olefinas ativadas.....	41
Esquema 16. Biorredução do composto 4-fenil-3-metil-3-buten-2-ona.....	51
Esquema 17. Mecanismo catalítico da redução assimétrica pela ene redutase.....	53
Esquema 18. Propostas de fragmentação do composto 53a após ionização por impacto de elétrons (70 eV).....	56
Esquema 19. Diastereoisômeros da muguesia produzidos preferencialmente na biorredução do substrato 51a mediado por LSC-II seguida de redução da carbonila.....	63
Esquema 20. Preparação dos diastereoisômeros da muguesia utilizando redução química.....	63

LISTA DE EQUAÇÕES

Equação 1. Diferença de absorção da luz polarizada leve e dextrorrotatória	58
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADH	Álcool desidrogenase
CCD	Cromatografia em camada delgada
CCDP	Cromatografia em camada delgada preparativa
CG-EM	Cromatógrafo à gás acoplado à espectrometria de massas
CG-FID-quiral	Cromatógrafo à gás equipado com fase estacionária quirál
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
conv.	Conversão
CTF	Catalisador de transferência de fase
d	Dupleto
dl	Dupleto largo
DC	Dicroísmo circular
dd	Duplo dupleto
ddd	Duplo duplo dupleto
dt	Duplo tripleto
E	Enzima
<i>ed</i>	Excesso diastereoisomérico
<i>ee</i>	Excesso enantiomérico
Ea	Energia de ativação
ER	Ene redutase
Et	Etila
FDA	Food and Drug Administration
FMN	Mononucleotídeo de flavina
FP	Fermento de pão
g	Gramas
GRE	Grupo retirador de elétron
H	Hidrogênio
h	Hora
Hz	Hertz
IFF	International Flavors & Fragrances
IV	Espectrofotometria no infravermelho
L	Litro
LSC-II	Levedura de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> Tipo II- Sigma Aldrich®
m	multipleto
Me	Metila
min	Minutos
mL	Mililitro
MTBE	Éter <i>terc</i> -butil metílico
NAD	Nicotinamida adenina dinucleotídeo
NADH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzido
NADP	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato

NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzido
NOE	Efeito nuclear <i>Overhauser</i>
NOEDIFF	Espectroscopia diferencial de efeito nuclear <i>Overhauser</i>
OYE	<i>Old Yellow Enzyme</i>
P	Produto
Pd/C	Paládio em carbono
p.f.	Ponto de fusão
Ph	Fenil
ppm	Parte por milhão
q	Quarteto
q ap.	Quarteto aparente
RMN de ^1H	Ressonância magnética nuclear de hidrogênio
RMN de ^{13}C	Ressonância magnética nuclear de carbono 13
rpm	Rotação por minuto
s	Simpleto
S	Substrato
sl	Simpleto largo
t	Tripleto
ta	Temperatura ambiente
td	Tripló duplete
TMS	Tetrametilsilano
UV-vis	Espectrofotometria no ultravioleta-visível
YMA	Meio nutriente para levedura

LISTA DE SÍMBOLOS

λ	Comprimento de onda
δ	Deslocamento químico
$[\alpha]_D^T$	Rotação óptica
$^{\circ}\text{C}$	Graus Celsius
ΔG	Energia livre
A_R	Absorbância dextrorrotatória
A_L	Absorbância levorrotatória
c	Concentração molar
ϵ_D	Absortividade molar dextrorrotatória
ϵ_L	Absortividade molar levorrotatória
[ES]	Complexo enzima-substrato
[ES] [‡]	Estado de transição do complexo enzima-substrato
J	Constante de acoplamento
K_m	Constante de Michaelis Menten
l	Comprimento da cela de amostra
m/z	Coeficiente entre massa e carga

SUMÁRIO

Resumo	i
Abstract	ii
Lista de figuras	iii
Lista de tabelas	v
Lista de esquemas	vi
Lista de equações	vii
Lista de abreviaturas e siglas	viii
Lista de símbolos	x
1. INTRODUÇÃO	01
1.1. A quiralidade e sua importância.....	02
1.2. Procedimentos para obtenção de moléculas enantiomericamente enriquecidas.....	05
1.3. Enzimas.....	06
1.3.1. A catálise enzimática.....	11
1.4. Biocatálise.....	13
1.4.1. Biorredução dos compostos carbonílicos α,β -insaturados mediada por micro-organismos.....	16
1.4.2. Resina adsorvente Amberlite.....	24
2. OBJETIVOS	32
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	34
3.1. Preparação dos compostos carbonílicos α,β -insaturados.....	35
3.2. Otimização das condições reacionais na redução do composto (<i>E</i>)-4-fenil-3-metil-3-buten-2-ona (51a).....	39
3.2.1. Preparação dos padrões por meio de redução química.....	41
3.2.2 Efeitos do meio reacional e de aditivos.....	42
3.2.3. Efeito do uso de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> de diferentes origens.....	46
3.2.4. Efeito do uso de diferentes leveduras.....	47
3.2.5. Efeito do uso de resina adsorvente.....	48
3.2.5.1. Determinação do comportamento de dessorção do substrato da resina para a fase aquosa e de adsorção do produto da fase aquosa para a resina.....	50
3.2.6. Efeito estérico e eletrônico dos substituintes.....	51
3.3. Determinação da configuração absoluta dos composto 53g , 53h e 53i	57
3.4. Aplicação sintética.....	62
4. CONCLUSÕES	65
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	67
6. PARTE EXPERIMENTAL	80
6.1. Materiais e Métodos.....	81
6.1.1. Reagente e solventes.....	81
6.1.2. Cromatografia em camada delgada, em coluna e em camada delgada preparativa.....	81

6.1.3. Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas.....	82
6.1.4. Cromatografia gasosa com detector por ionização de chama equipada com coluna quiral.....	83
6.1.5. Cromatografia em fase gasosa com detector por ionização de chama.....	83
6.1.6. Espectroscopia de ressonância magnética nuclear.....	84
6.1.7. Espectrometria de massas de alta resolução.....	84
6.1.8. Rotação óptica.....	84
6.1.9. Espectrofotometria no infravermelho.....	85
6.1.10. Espectrofotometria no ultravioleta-visível.....	85
6.1.11. Dicroísmo circular.....	85
6.1.12. Ponto de fusão.....	85
6.1.13. Outros.....	86
6.2. Procedimentos Experimentais.....	86
6.2.1. Preparação dos substratos.....	86
6.2.1.1. Preparação compostos carbonílicos α,β -insaturados 51a , 51c-i	86
6.2.1.2. Preparação compostos carbonílicos α,β -insaturados 51b e 51j	90
6.2.1.3. Preparação da olefina ativada 51k	92
6.2.2. Preparação dos padrões racêmicos.....	93
6.2.2.1. Procedimento geral para hidrogenação catalítica.....	93
6.2.2.2. Procedimento para redução do composto <i>rac</i> - 53a com NaBH ₄	93
6.2.3. Reações com os micro-organismos.....	94
6.2.3.1. Condições gerais para otimização dos parâmetros reacionais.....	94
6.2.3.2. Protocolo geral para o cultivo, crescimento e biorredução com a levedura <i>Pichia kluyveri</i>	94
6.2.3.3. Biorredução com LSC-II e resina Amberlite XAD-7.....	95
6.2.4. Teste de dessorção e adsorção.....	101
6.2.5. Preparação da muguesia.....	101
7. ANEXOS	103
7.1. Espectros de RMN de ¹ H, ¹³ C e DEPT-135.....	104
7.2. Espectros de diferença de NOE.....	137

1. Introdução

1. INTRODUÇÃO

1.1. A quiralidade e sua importância

O desenvolvimento de técnicas de síntese assimétrica para a preparação de compostos enantiomericamente enriquecidos destaca-se como uma das vertentes da síntese orgânica que mais despertaram interesse nos últimos anos (BLASER; SPINDLER; STUDER, 2001; LOHRAY, 2001; NOYORI, 2003; PINHEIRO; FERREIRA, 1998). Sabendo da importância dos centros quirais na atividade biológica de muitas substâncias, as indústrias farmacêutica (BLASER; SPINDLER; STUDER, 2001; HAWKINS; WATSON, 2004; POLLARD, WOODLEY, 2007; SOLANO et al., 2012), agroquímica (LIU et al., 2005), alimentícia e de fragrância (SERRA; FUGANTI; BRENNAN, 2005) estão cada vez mais empenhadas no controle estereoquímico e na síntese de compostos opticamente puros (BARREIRO; FERREIRA; COSTA, 1997; CROSBY, 1991; MANNSCHRECK; KIESSWETTER, 2007; SMITH, 2009; ZHENG; XU, 2011).

O estudo da quiralidade e simetria é bastante amplo e envolve áreas de química, física e biologia. No início do século XIX, as primeiras contribuições sobre o assunto foram feitas por Arago e Biot quando demonstraram o efeito que pedaços de cristais exerciam frente ao plano de luz polarizada, ou seja, diferentes cristais desviavam a luz para a direita ou para a esquerda. Em 1848, Louis Pasteur, cientista francês, aprofundou os estudos sobre a quiralidade. A separação feita por ele de cristais do sal de tartarato de amônio e sódio e a observação do diferente efeito rotacional dos cristais, o levou a ser considerado o descobridor do fenômeno da quiralidade e o fundador da base para o desenvolvimento da estereoquímica (BLASER; SPINDLER; STUDER, 2001; COELHO, 2001; SMITH, 2009; SOLOMONS; FRYHLE, 2001).

Nos últimos anos, esta área tem se tornando cada vez mais atrativa e diversos avanços tecnológicos vêm possibilitando o seu desenvolvimento. Em 2001, os pesquisadores William S. Knowles e K. Barry Sharpless nos Estados Unidos e Ryoji Noyori no Japão foram homenageados com o prêmio Nobel de Química por suas importantes contribuições no aperfeiçoamento e ampliação de técnicas de síntese assimétrica usando catalisadores quirais na produção de fármacos ou produtos químicos de maneira enantiosseletiva (LOHRAY, 2001; NOYORI, 2003; NGUYEN; HE; PHAM-HUY, 2006).

Dados referentes aos fármacos aprovados pelo FDA (Food and Drug Administration) de 1992 a 2008 (Figura 1) refletem o aumento de interesse na produção de substâncias

enantiopuras tanto pela comunidade científica quanto pela indústria farmacêutica. Enquanto em 1992 cerca de 21% dos fármacos eram aprovados em sua forma racêmica, em 2008 esse número reduziu-se para 5%. Por outro lado, no mesmo período, a aprovação de fármacos quirais opticamente puros aumentou de 44% em 1992 para 63% em 2008 (LIN; YOU; CHENG, 2011; MURAKAMI, 2007).

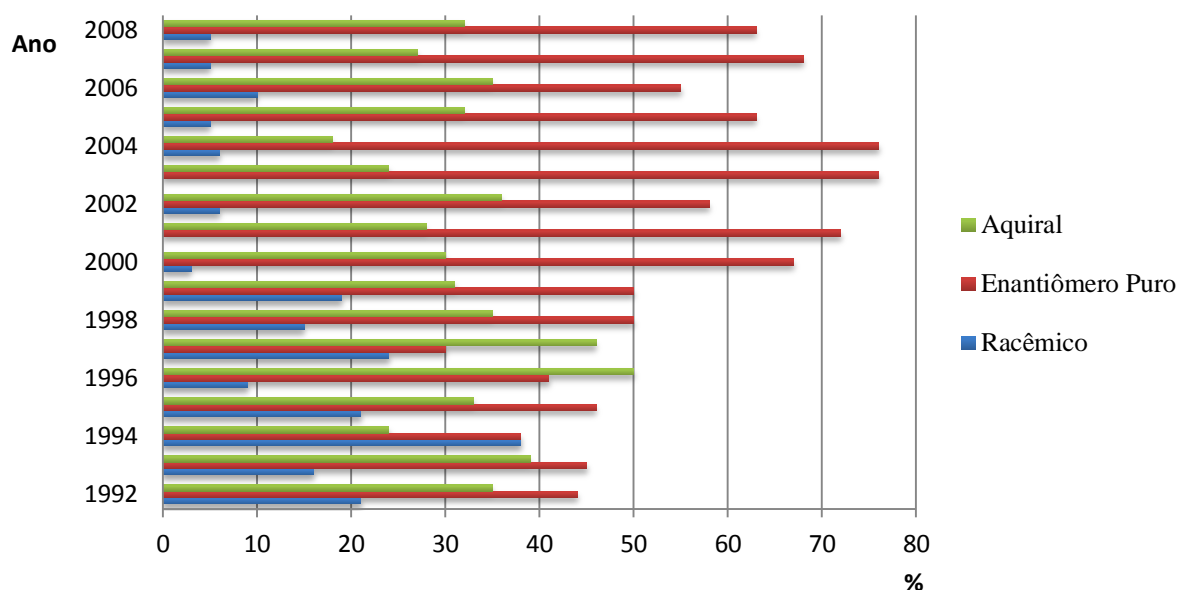


Figura 1. Distribuição anual de fármacos aprovados pelo FDA de 1992 a 2008. Fonte: LIN; YOU; CHENG, 2011.

Nesse sentido, informações publicadas recentemente por Bronson et al. (2013) confirmam o empenho na produção de compostos opticamente ativos. Pode-se observar que cerca de 57% dos fármacos aprovados pelo FDA em 2012 foram enantiômeros puros e apenas 3% na forma de racemato (Figura 2).

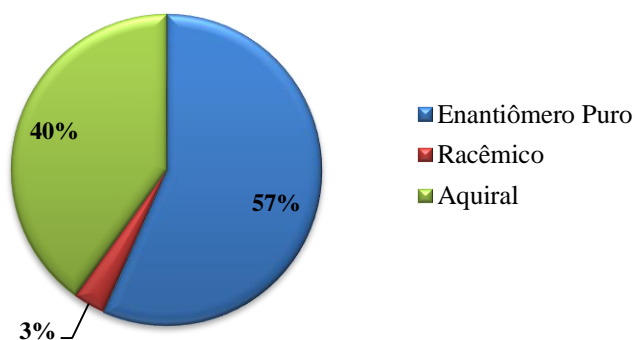


Figura 2. Fármacos aprovados pelo FDA em 2012. Fonte: BRONSON et al., 2013.

A Figura 3 abaixo ilustra uma comparação entre a atividade biológica e a configuração absoluta de três compostos quirais. O enantiômero *S*-(-) do β -bloqueador propranolol, utilizado, principalmente, como anti-hipertensivo, se liga mais efetivamente aos receptores β -adrenérgicos do que a sua forma *R*-(+), sendo assim, é o enantiômero terapeuticamente útil (CROSBY, 1991; TRIGGLE, 1997). De modo semelhante, o enantiômero *R,R*-(-) do cloranfenicol é indicado para o tratamento antibacteriano, em contrapartida, o enantiômero *S,S*-(+) é inativo (CROSBY, 1991). Outro exemplo é o fármaco quiral etambutol, sua forma *S,S*-(+) é a responsável pela atividade tuberculástica e o enantiômero *R,R*-(-) causa cegueira (CROSBY, 1991, MANNSCHRECK; KIESSWETTER, 2007). Dessa forma, pares enantioméricos podem interagir de uma maneira diferenciada no organismo, ou seja, enquanto um enantiômero pode apresentar ação benéfica, o outro pode ser inócuo ou prejudicial e causar efeitos teratogênicos ou toxicidade.

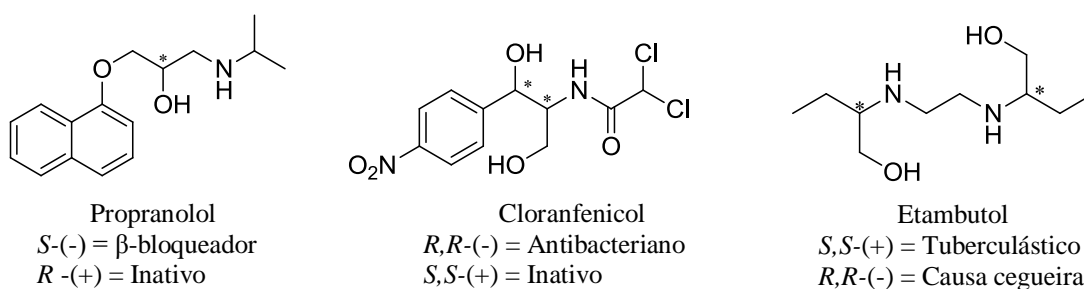


Figura 3. Exemplos do efeito da quiralidade na atividade biológica de fármacos.

É relevante citar que as propriedades organolépticas das substâncias também são influenciadas pela sua orientação espacial. A Figura 4 ilustra alguns exemplos de compostos que apresentam diferentes sabores e odores em função da sua configuração absoluta. Dessa forma, a produção de moléculas enantiomericamente puras não é só uma preocupação da indústria farmacêutica, ela também se estende aos demais campos industriais (CLAYDEN; GREEVES; WARREN, 2012; CROSBY, 1991).

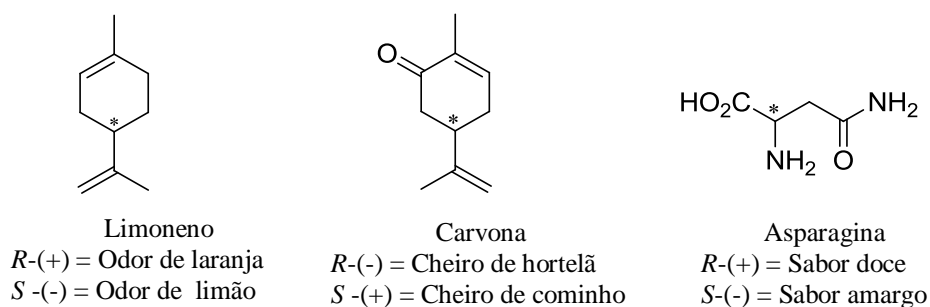


Figura 4. Exemplos do efeito da quiralidade nas propriedades organolépticas de alguns compostos.

As divergências comportamentais dos enantiômeros de uma mistura racêmica no organismo são consequência do reconhecimento enantioespecífico dos pares enantioméricos pelas enzimas e receptores, os quais possuem afinidades heterogêneas por cada um dos enantiômeros. Sendo assim, são capazes de discriminá-los e por meio de interações estereosseletivas produzirem respostas biológicas distintas. Dessa forma, o enantiômero bioativo mais potente é denominado eutômero e aquele que possui menor atividade ou é inativo ou até tóxico é conhecido por distômero (CALDWELL, 1995; EICHELBAUM; GROSS, 1996; FABER, 2011; LIMA, 1997; NGUYEN; HE; PHAM-HUY, 2006; SMITH, 2009).

1.2. Procedimentos para obtenção de moléculas enantiomericamente enriquecidas

Nos últimos anos, buscando a síntese de fármacos e produtos naturais quirais, houve um acentuado desenvolvimento e avanço das técnicas de síntese enantiosseletiva. Os principais métodos para a obtenção de compostos opticamente ativos são (BARREIRO; FERREIRA; COSTA, 1997; BLASER; PUGIN; SPINDLER, 2005; BLASER, SPINDLER; STUDER, 2001; CLAYDEN; GREEVES; WARREN, 2012; CONSTANTINO, 2012; CROSBY, 1991; NGUYEN; HE; PHAM-HUY, 2006; PINHEIRO; FERREIRA, 1998; STRAATHOF; PANKE; SCHMID, 2002):

- *Chiral pool*- É uma técnica relativamente econômica, pois utiliza blocos de construção quirais provenientes de produtos naturais, tais como aminoácidos, carboidratos, terpenos e alcalóides, para a construção do produto final. Esses são incorporados na estrutura da moléculas alvo e são realizadas as modificações necessárias para alcançar as características quirais desejadas. Muitas vezes esse método é selecionado para as fases iniciais de desenvolvimento de fármacos. Dependendo da disponibilidade comercial do substrato, pode também ser utilizado em larga escala. Através de reações químicas, pode ocorrer a formação de novos centros quirais ou apenas a manutenção da estereoquímica daqueles existentes bem como a inversão das suas configurações absolutas. Frequentemente, esses materiais de partida já apresentam naturalmente alta pureza enantiomérica, dessa forma, não é necessário etapas adicionais para o enriquecimento enantiomérico.
- Separação de enantiômeros- Esse processo pode ser feito por meio da interação de um racemato com um composto com configuração absoluta definida, também conhecido por agente de resolução, que não é consumido na reação. Ocorre a formação de pares

diastereoisoméricos, os quais possuem propriedades químicas e físicas diferentes. Sendo assim, torna-se possível sua separação, a qual pode ser feita por meio de cristalização, filtração, cromatografia e destilação. A resolução cinética (química ou enzimática), que está relacionada com as diferentes velocidades de reação dos enantiômeros, também é utilizada para separação de misturas racêmicas. Nessas técnicas, geralmente, o enantiômero almejado é isolado com alta pureza enantiomérica. Todavia, ao longo desses processos, pelo menos 50% do material com a configuração absoluta não desejada são reciclados por meio de racemização ou descartados.

- Síntese assimétrica- Nesse caso, a aquisição dos compostos enantiomericamente puros ocorre por meio de transformações no substrato pró-quiral auxiliado por métodos sintéticos, tal como, substratos quirais, auxiliares quirais, reagentes quirais e metais e ligantes quirais (catalisadores químicos convencionais) ou de origem natural (biocatalisadores), por exemplo, enzimas isoladas ou contidas em micro-organismos. Pode ser chamada também de síntese enantiosseletiva, pois os enantiômeros dos produtos são obtidos desproporcionalmente no final, ou seja, a produção de um dos enantiômeros é superior ao outro.

Entre esses métodos a utilização de enzimas isoladas ou contidas em micro-organismos para a produção de substâncias opticamente puras vem se destacando e tornando-se uma eficiente ferramenta para as indústrias (SOLANO et al., 2012; STRAATHOF; PANKE; SCHMID, 2002).

1.3. Enzimas

Quase todas as enzimas são proteínas e capazes de catalisar reações químicas com alta especificidade. Elas são formadas por resíduos de aminoácidos que se unem por ligações peptídicas e, algumas vezes, ligações dissulfeto, formando uma cadeia polipeptídica (CAMPBELL, 2000; NELSON; COX, 2011). Apresentam grupos hidrofílicos polares, tais como, $-\text{COO}^-$, $-\text{OH}$, $-\text{NH}_3^+$, $-\text{SH}$ e $-\text{CONH}_2$, que devido ao ambiente natural aquoso, são localizados, principalmente, na sua superfície externa para mantê-las hidratadas. Já os resíduos hidrofóbicos, como cadeias alquílicas e arilas, permanecem no interior da proteína. Dessa forma, a superfície de uma enzima é recoberta fortemente por uma camada de água e um arranjo de ligação de hidrogênio, altamente estruturados, formando a camada de solvatação. Estas ligações de hidrogênio na superfície da enzima são fundamentais para a

manutenção do seu arranjo tridimensional e da sua atividade catalítica (FABER, 2011; NELSON; COX, 2011).

Em torno de 3700 enzimas já são reconhecidas e catalogadas pela União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular (IUBMB) (FABER, 2011). Elas são classificadas em seis classes (Tabela 1), de acordo com o tipo de transformação que catalisam (FABER, 2011; NELSON; COX, 2011; SANTANIELLO et al., 1992):

Tabela 1. Classificação das enzimas. Fonte: Adaptada de FABER, 2011; NELSON; COX, 2011 e SANTANIELLO et al., 1992

Nº da classe e nome das enzimas	Tipo de reação catalisada
1. Oxidorredutases	Reações de oxidação-redução, ou seja, oxidação de C-H, C-C, C=C, ou remoção ou adição de hidrogênios.
2. Transferases	Reações de transferência de grupos, como aldeído, cetona, acila, açúcar, fosforil, metil e NH ₃ . A-(B) + C = A-C + (B)
3. Hidrolases	Hidratação, condensação, formação e hidrólise de ésteres, amidas, lactonas, lactamas, epóxidos, nitrilas, anidridos, glicosídeos.
4. Liases	Adição de grupos a ligações duplas, ou formação de ligações duplas por remoção de grupos como C=C, C=N e C=O.
5. Isomerases	Transferência de grupo dentro de uma mesma molécula através de racemização, epimerização e rearranjo, produzindo formas isoméricas.
6. Ligases	Formação por condensação e clivagem de ligações C-O, C-S, C-N e C-C acopladas à hidrólise de trifosfato (ATP).

Algumas classes de enzimas não são dependentes de outros componentes, apenas os aminoácidos, já presentes em sua estrutura, são suficientes para sua ação catalítica. Em contrapartida, outras, como as oxidorredutases, requerem a presença de um grupo químico adicional, o qual é conhecido como cofator. Os cofatores são substâncias não protéicas e são divididos em duas classes: íons metálicos como Fe²⁺, Zn²⁺, Mg²⁺, Mn²⁺, Cu²⁺, Ca²⁺, K⁺ ou uma molécula orgânica, denominada de coenzima. A maioria das coenzimas são vitaminas ou produtos derivados do seu metabolismo, tais como, NADH, NADPH, coenzima A, biotina, ATP e FMN (CAMPBELL, 2000; FABER, 2011; NELSON; COX, 2011; SILVERMAN, 1992). A enzima e o cofator se unem para realizarem suas funções. Em uma reação de redução, por exemplo, primeiramente, o substrato e o cofator ligam-se à enzima, ocorre uma redução do substrato e uma oxidação do cofator e por fim, o cofator e o produto se dissociam da enzima (MATSUDA; YAMANAKA; NAKAMURA, 2009).

Existem ainda coenzimas que se ligam fortemente a uma enzima, muitas vezes por ligações covalentes, e não se dissociam após a reação. Essas são chamadas de grupos prostéticos e podem ser flavinas ou íons metálicos, por exemplo (MATSUDA; YAMANAKA; NAKAMURA, 2009; NELSON; COX, 2011). Alguns cofatores são muito sensíveis e são destruídos ao longo da reação devido às reações secundárias. No entanto, seu alto custo impossibilita seu uso em quantidades estequiométricas (FABER, 2011; MATSUDA; YAMANAKA; NAKAMURA, 2009; UPPADA; BHADURI; NORONHA, 2014). Dessa forma, métodos para reciclagem do cofator são essenciais para que o processo seja econômico e industrialmente viável. Além disso, a ausência de um sistema que traga o cofator pra seu estado original acarreta a perda da eficiência catalítica da enzima e a reação pode não alcançar seu máximo rendimento (UPPADA; BHADURI; NORONHA, 2014).

Em comparação com as reações não catalisadas, as enzimas apresentam um alto potencial catalítico e são capazes de aumentar a velocidade da reação por um fator da ordem de $10^8 - 10^{14}$. Em algumas condições, pode exceder o fator de 10^{17} . Já os catalisadores sintéticos aceleram a reação por um fator de $10^2 - 10^4$. Além disso, a quantidade requerida destes catalisadores é maior, geralmente, são empregados em concentrações de 0,1 a 1 mol%, enquanto que a maioria das reações enzimáticas são eficientes com uma quantidade de 10^{-3} a 10^{-4} mol% do biocatalisador (CAMPBELL, 2000; FABER, 2011; SILVERMAN, 2002).

Pode-se dizer também que as reações enzimáticas são menos agressivas ao meio ambiente, pois, por exemplo, há uma substituição dos reagentes de hidreto e metais pesados potencialmente perigosos utilizados em sínteses assimétricas clássicas. Além disso, frequentemente, as reações são realizadas em água e, nesses casos, tanto as enzimas como os resíduos são degradados pelo meio ambiente e não apresentam alta toxicidade como aqueles produzidos em reações utilizando catalisadores sintéticos. Assim, os procedimentos mediados por enzimas são adequados e muito atrativos para os processos industriais, pois provocam menores prejuízos ambientais, sendo uma das ações mais importantes para o desenvolvimento e expansão de uma metodologia química sustentável e mais verde (DUNN, 2012; FABER, 2011; ROZZELL, 1999; UPPADA; BHADURI; NORONHA, 2014; WOODLEY, 2008).

Além disso, as condições reacionais empregadas em reações enzimáticas são suaves: as enzimas efetuam catálise na faixa de pH 5 - 8, em temperaturas no intervalo de 20 °C a 40 °C e sob pressão atmosférica. Assim, há uma redução considerável da formação de subprodutos resultantes de reações laterais indesejáveis, como, isomerização, racemização, decomposição e rearranjos (FABER, 2011; YAMADA; SHIMIZU, 1988).

Outra qualidade das enzimas é a sua versatilidade, ou seja, elas não se restringem apenas aos seus substratos naturais, são altamente tolerantes, capazes de aceitar uma grande diversidade de substratos que não são naturais e exibirem especificidades tão elevada para estes quanto para os seus equivalentes naturais (FABER, 2011; YAMADA; SHIMIZU, 1988). Além disso, caso seja benéfico para o procedimento, o meio aquoso pode ser substituído, por exemplo, por um solvente orgânico, líquido iônico ou fluído supercrítico (FABER, 2011).

Todas essas propriedades apresentadas já fazem das enzimas catalisadores peculiares, entretanto, a precisão química apresentada por elas, provavelmente, é a vantagem mais importante. Nesse sentido, produtos secundários e múltiplos isômeros, que, são comuns em reações com catalisadores químicos, são minimizados nas transformações com catalisadores biológicos, facilitando o procedimento de purificação. Geralmente, não são necessárias etapas de proteção e desproteção que muitas vezes são exigidas na catálise clássica. Portanto, é possível a obtenção do produto desejado com alta seletividade e economia significativa nos custos energéticos (ROZZELL, 1999; UPPADA; BHADURI; NORONHA, 2014; WOODLEY, 2008).

As enzimas apresentam quimiosseletividade, isto é, atuam seletivamente em um único grupamento funcional, preservando outros grupos funcionais quimicamente sensíveis e até mesmo mais reativos, que certamente reagiriam sob a catálise tradicional (FABER, 2011; ROZZELL, 1999; UPPADA; BHADURI; NORONHA, 2014). Além disso, as enzimas são altamente regioseletivas, visto que são formadas por uma complexa estrutura tridimensional, elas são capazes de reconhecer e discriminar grupamentos com as mesmas funcionalizações químicas e reatividade similares que estão localizados em regiões diferentes no mesmo compostos (FABER, 2011; ROZZELL, 1999).

A estereosseletividade é outra característica fundamental das enzimas, assim, possuem uma capacidade intrínseca de agir com alta seletividade em um único enantiômero ou diastereoisômero. Em outras palavras, toda enzima é quiral e qualquer elemento de assimetria encontrado no substrato influencia na formação do complexo enzima-substrato [ES]. Dessa maneira, um material de partida pró-quiral pode ser transformado em um produto enantiomericamente enriquecido e um par enantiomérico de um racemato pode ser separado por meio de uma resolução cinética, na qual os enantiômeros reagem com velocidades diferentes (FABER, 2011; ROZZELL, 1999).

As seletividades, em conjunto, representam as características e capacidades mais importantes das enzimas para a exploração da síntese assimétrica e tornam-nas potentes catalisadores de compostos opticamente ativos, o que é de grande interesse das indústrias

tanto para a produção de intermediários quanto dos produtos finais (FABER, 2011; SOLANO et al., 2012; UPPADA; BHADURI; NORONHA, 2014).

No entanto, uma das desvantagens das enzimas é a não disponibilidade na natureza do seu par enantiomérico, ou seja, elas existem em apenas uma forma enantiomérica, assim, não é possível inverter a indução de um centro estereogênico em uma catálise enzimática apenas selecionando o enantiômero da enzima com a estereoquímica oposta. Para a obtenção do outro enantiômero do produto, deve-se buscar um catalisador biológico com a estereosseletividade contrária (FABER, 2011).

Muitas enzimas também estão sujeitas a fenômenos de inibição pelo substrato e pelo produto. A alta concentração de ambos é um fator que prejudica a eficiência do processo. Uma alternativa é controlar a concentração do substrato através da adição contínua e remover gradualmente o produto *in situ* (FABER, 2011).

Outro inconveniente em relação ao uso de enzimas é que, apesar delas serem bastante flexíveis e aceitarem uma diversidade de substratos não naturais, aquelas que necessitam de cofatores se ligam apenas aos seus cofatores naturais. Dessa forma, já que estes não podem ser substituídos por equivalentes sintéticos menos dispendiosos, em muitos casos, é necessário um eficiente sistema de regeneração (FABER, 2011).

A vantagem da utilização de condições suaves citada anteriormente, pode tornar-se um problema quando a velocidade da reação enzimática é baixa. Nesses casos, são necessários ajustes nos parâmetros operacionais de pH e temperatura, porém elevadas temperaturas e pH extremos podem levar a desativação da enzima. A estreita faixa de temperatura e pH para a atividade enzimática impede algumas mudanças bruscas nas condições experimentais e, conseqüentemente, pode limitar algumas reações (FABER, 2011).

Além de ser o solvente mais recomendável em relação ao meio ambiente, as enzimas apresentam sua atividade catalítica mais potente em água. No entanto, devido ao seu elevado calor de vaporização e ponto de ebulição, o meio aquoso é o menos adequado para a maioria das reações orgânicas. Adicionalmente, muitos compostos orgânicos são pouco solúveis ou insolúveis em água. Assim, seria interessante que as transformações com catalisadores biológicos ocorressem em meio orgânico, porém a presença do solvente orgânico pode provocar a perda da atividade da enzima e comprometer o processo (FABER, 2011).

Com a evolução das pesquisas, houve a criação e o desenvolvimento de novos procedimentos para as transformações utilizando enzimas como catalisadores, como também o aprimoramento daqueles já existentes e conseqüentemente, essas possíveis desvantagens

têm sido atenuadas. Muitas vezes, pequenas alterações nas condições reacionais são capazes de melhorar significativamente os resultados.

1.3.1. A catálise enzimática

As enzimas (E) são catalisadores biológicos e, de um modo geral, aumentam a velocidade da reação por meio da diminuição da barreira de energia (energia de ativação- E_a) entre o substrato (S) e o produto (P). A função da enzima é acelerar a reação de conversão do S no P. A catálise de uma reação sempre inicia-se pela formação do [ES] em uma cavidade ou bolsão na superfície da enzima denominado de sítio ativo, o qual é constituído por aminoácidos que se ligam ao substrato, catalisam sua transformação e liberam o produto. A formação do [ES] específico é essencial para a atividade enzimática e é o que efetivamente diferencia as enzimas de outros catalisadores químicos tradicionais (CAMPBELL, 2000; FABER, 2011; NELSON; COX, 2011; SILVERMAN, 2002).

Como pode-se observar na Figura 5, os processos catalisados por enzimas apresentam uma barreira energética menor do que aqueles na ausência do catalisador, sendo assim, a velocidade de uma reação catalisada é mais elevada. Pode-se dizer que as mesmas forças que estabilizam a estrutura conformacional das proteínas assistem à interação entre o substrato e a enzima no [ES]. São elas: ligações de hidrogênio, interações hidrofóbicas, interações iônicas e interações de van der Waals. Com menor frequência, ligações covalentes transitórias também podem ocorrer. Concomitantemente à formação de cada interação no [ES], uma quantidade pequena de energia livre é liberada estabilizando a interação (ALEDO; LOBO; VALLE, 2003; FABER, 2011; NELSON; COX, 2011; SILVERMAN, 2002).

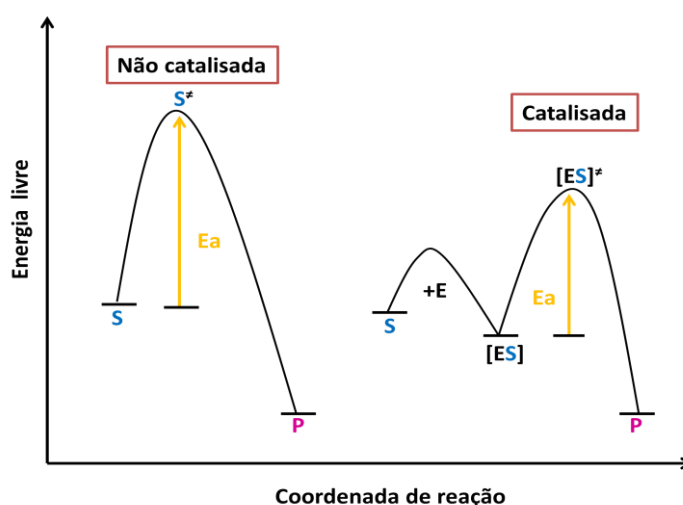


Figura 5. Diagrama de energia comparando uma reação catalisada enzimaticamente com uma não catalisada. Fonte: Adaptada de FABER, 2011.

De um modo geral, a estereosseletividade das enzimas está relacionada com a sua especificidade e baseia-se na diferença de energia dos complexos enzima-substrato no estado de transição $[ES]^\ddagger$. Em uma reação enantiosseletiva ambos os substratos enantioméricos S_1 e S_2 de um mistura racêmica, por exemplo, competem pelo sítio ativo da enzima. Como este fornece um ambiente quiral, a estereoquímica da reação será determinada pela quiralidade da enzima, e assim, são formados dois complexos diastereoisoméricos enzima-substrato $[ES_1]$ e $[ES_2]$, os quais apresentam valores distintos de energia livre (ΔG) para os seus estados de transição $[ES_1]^\ddagger$ e $[ES_2]^\ddagger$, respectivamente (Figura 6). A energia de ativação é diferente para os enantiômeros S_1 e S_2 e, por conseguinte, um enantiômero, nesse caso o S_1 , reagirá com maior velocidade do que o outro. Portanto, o ΔG^\ddagger está diretamente relacionado com a seletividade, ou seja, quanto maior for a sua medida, maior será o excesso enantiomérico (*ee*) do produto. Esse processo é denominado de reconhecimento quiral (FABER, 2011; SILVERMAN, 2002).

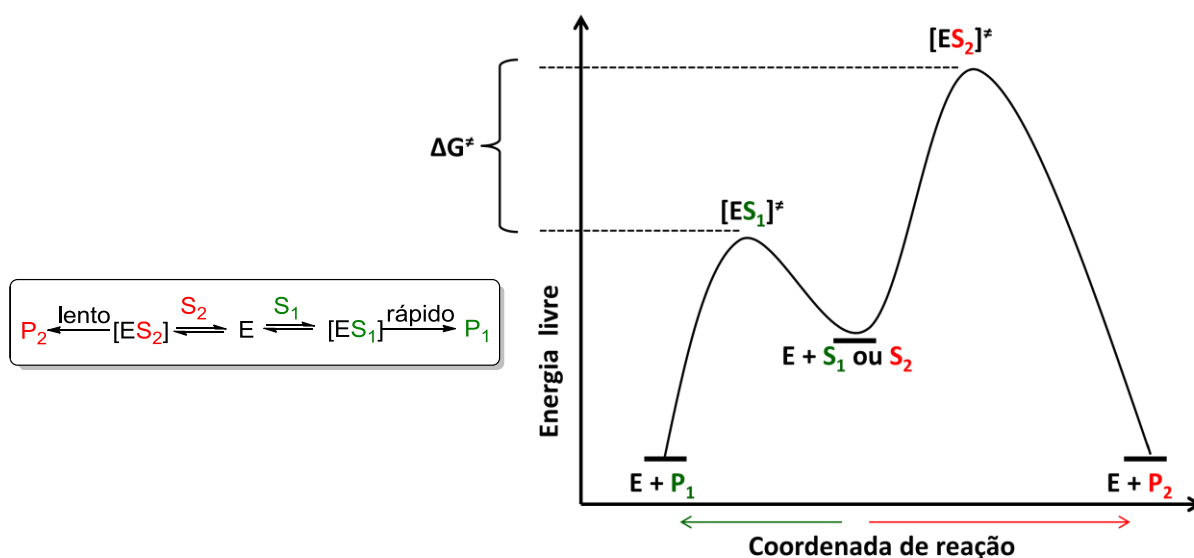


Figura 6. Diagrama de energia de uma reação enantiosseletiva catalisada por enzima comparando a ΔG dos estados de transição dos enantiômeros. Fonte: Adaptada de FABER, 2011.

Nesse sentido, para explicar a enantiosseletividade das reações enzimáticas, foi proposta a "teoria dos três pontos". Segundo esta, um substrato deve estar posicionado firmemente em três dimensões dentro da enzima para assegurar o reconhecimento estérico, alcançar um alto grau de enantiodiferenciação e a efetiva formação do $[ES]$. Como pode-se observar na Figura 7, são necessários pelo menos três pontos de ligação do substrato com o sítio ativo, assim, o enantiômero S que tem maior afinidade com a enzima, se ajusta melhor e é o mais ativo, já o enantiômero R é incapaz de se ligar efetivamente à enzima, o que pode

provocar diminuição ou alteração na sua atividade (FABER, 2011; MANNSCHRECK; KIESSWETTER, 2007; OGSTON, 1948, NGUYEN; HE; PHAM-HUY, 2006).¹

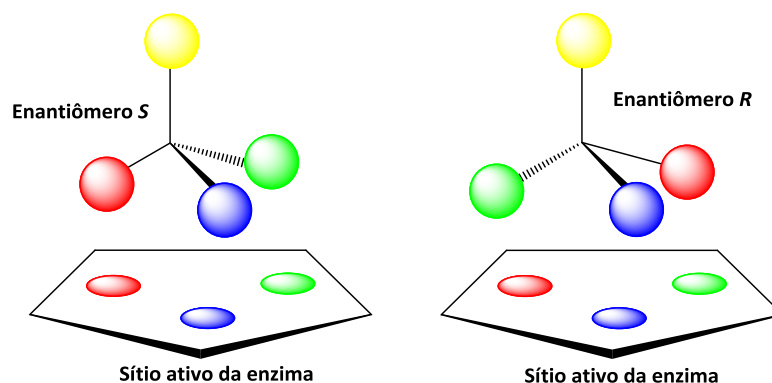


Figura 7. Representação esquemática da teoria dos três pontos. Fonte: Adaptada de MANNSCHRECK; KIESSWETTER, 2007 e OGSTON, 1948 .

Dessa forma, o arranjo estereoquímico é importante para a discriminação dos enantiômeros, a formação do [ES] e a catálise, ou seja, quanto maior a quantidade de interações e quanto melhor for o encaixe do substrato no sítio ativo da enzima, mais efetiva é sua ação.

1.4. Biocatálise

A busca por metodologias eficientes e economicamente viáveis, que permitissem a preparação de substâncias com um elevado grau de pureza enantiomérica e que favorecessem a substituição dos processos químicos convencionais por outros, menos agressivos ao meio ambiente, resultou em um grande desenvolvimento dos estudos e investimentos na área da biocatálise (PATEL, 2008; SCHMID et al. 2001; SCHOEMAKER et al., 1997; WANDREY; LIESE; KIHUMBU, 2000; ZAKS, 2001). A biocatálise é a aplicação de enzimas isoladas ou contidas em células íntegras de micro-organismos (TORRELO; HANEFELD; HOLLMAN, 2015; UPPADA; BHADURI; NORONHA, 2014), plantas e animais. Estas podem ser usadas em sua forma livre (ISHIGE.; HONDA; SHIMIZU, 2001; NAKAMURA, 2003) ou imobilizadas (SHELDON, 2013), abrangendo todos os processos em que os sistemas enzimáticos são os responsáveis pelas transformações químicas de uma maneira mais simples, seletiva e sustentável (DUNN, 2012; WOODLEY, 2008).

A biocatálise já vem sendo utilizada há séculos, principalmente, para a produção de alimentos e bebidas, tais como vinhos, queijos e cervejas (ROBERTS, 2004). De acordo com Wackett e Hershberger (2001), biocatálise e biotransformação são termos equivalentes,

entretanto, biotransformação é um termo mais abrangente, utilizado para qualquer transformação biológica nos substratos. Já a biocatálise é normalmente relacionada a processos realizados com o propósito de sintetizar um produto de utilidade sintética, como fármacos e intermediários. Dessa forma, em síntese orgânica, a biocatálise é frequentemente relacionada à substituição de um reagente químico por uma enzima.

Entre as possíveis fontes de biocatalisadores, os micro-organismos são de grande importância e apresentam algumas particularidades, tais como, curto período de crescimento; há uma grande diversidade da microbiota existente na natureza, a qual é composta por espécies detentoras de características e atividades distintas e peculiares e o grande arsenal enzimático que eles possuem e que os tornam capazes de catalisar diversos tipos de reações (CONTI; RODRIGUES; MORAN, 2001; ISHIGE.; HONDA; SHIMIZU, 2001)

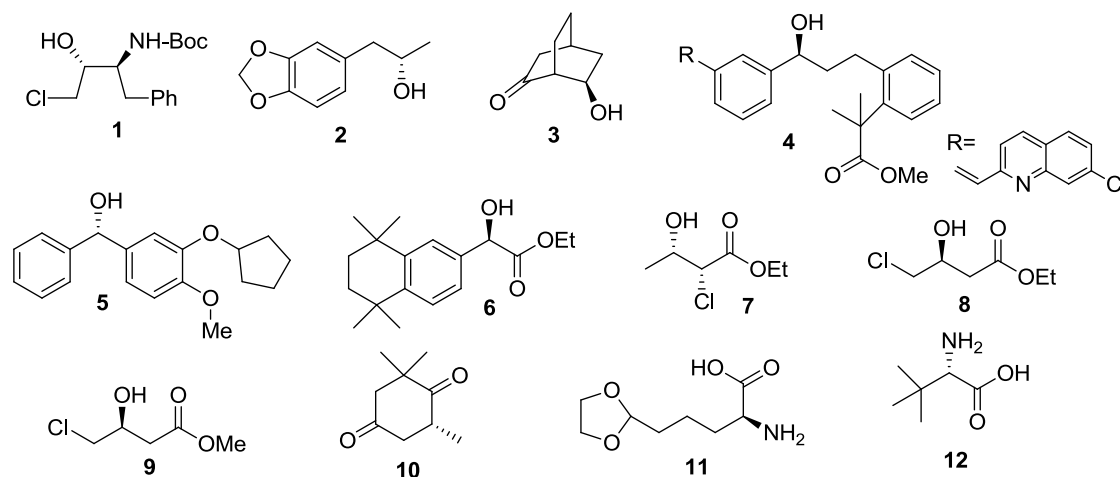
Além disso, com a utilização de células íntegras não é necessário a adição de cofatores exógenos de alto custo (NAD(P)H e NAD(P)⁺) (MONTI et al., 2011; SILVA; STAMBUK; NASCIMENTO, 2012), bem como de um sistema para sua regeneração *in situ*, pois elas já possuem seus cofatores e um sistema de reciclagem próprio e eficiente através de suas vias metabólicas (FABER, 2011; HOLLMANN, ARENDS, HOLTSMANN, 2011; HOUNG et al., 2003; WANG; ZONG; LOU, 2009; ZHANG; PIONNIER, 2003).

No entanto, como os cofatores estão presentes em quantidades catalíticas nos micro-organismos, fontes de carbono não dispendiosas como carboidratos, especialmente sacarose e glicose, assim como outras moléculas orgânicas, como o etanol, podem ser usadas como substratos auxiliares para a reciclagem dos cofatores (ZHANG; PIONNIER, 2003). Na ausência de substratos auxiliares, as células íntegras podem usar os elétrons doadores armazenados em suas próprias células, como também a água, que, nesse caso, é a principal fonte de hidrogênio para a reciclagem do cofator (CHU et al., 2006; ZHANG et al., 2001; ZHANG; PIONNIER, 2003). Adicionalmente, a utilização de células íntegras evita os processos de isolamento e purificação da enzima, os quais podem ter um alto custo e como as enzimas dentro das células estão protegidas do ambiente externo, na maioria das vezes, são mais estáveis a longo prazo do que quando isoladas (CARBALLEIRA et al., 2009; HOUNG et al., 2003; ISHIGE; HONDA; SHIMIZU, 2001). A biotransformação, então, pode ser realizada com a adição do substrato ao meio biocatalítico, o qual fornecerá as enzimas, os cofatores e o sistema de regeneração necessários para a formação do produto.

As maiores aplicações da biocatálise concentram-se na síntese assimétrica, na qual os catalisadores químicos clássicos vêm sendo substituídos pelas enzimas para preparação de compostos quirais (PANKE; HELD; WUBBOLTS, 2004; SOLANO et al., 2012;

WOODLEY, 2008). Recentemente, Solano e colaboradores (2012) relataram processos de biocatálise usados em escala industrial ou preparativa para a síntese de blocos de construção biologicamente ativos. Na Tabela 2, por exemplo, pode-se observar a síntese de precursores quirais biorreduzidos utilizando células íntegras de micro-organismo.

Tabela 2. Exemplos de compostos químicos sintetizados por meio de biorredução catalisada por células íntegras de micro-organismos. Fonte: Adaptada de SOLANO et al., 2012



Produto	Biocatalisador	Produtor	Fármaco
(2S,3R)-1	<i>Rhodococcus erythropolis</i>	Bristol-Myers Squibb	Atazanavir (inibidor da HIV endopeptidase)
(S)-2	<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>	Eli-Lilly and Company	Talampanel™ (benzodiazepínicos)
(R)-3	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Johanson y cols.	Derivados do anti-tumoral taxano
(S)-4	<i>Microbacterium campoquemadoensis</i>	Merck & Co. Inc.	Montelukast (anti-asmático)
(S)-5	<i>Rhodotorula pilimanae</i>	Merck & Co. Inc.	Inibidor da fosfodiesterase (tratamento da asma)
(R)-6	<i>Aureobasidium pullulans</i> SC 13849	Bristol-Myers Squibb	Moduladores dos receptores do ácido retinóico
(2R,3S)-7	Rec. <i>E. coli</i> expressando enzima de <i>P.finlandica</i>	Lonza	Fármacos para o tratamento do colesterol
(S)-8	<i>Escherichia coli</i>	Kaneka Co	Atorvastatina (cadeia lateral)
(S)-9	<i>Geotrichum candidum</i> SC 5469	Bristol-Myers Squibb	Atorvastatina (cadeia lateral)
(R)-10	Rec. <i>E. coli</i> expressando enzima de <i>C. macedoniensi</i>	Hoffmann-LaRoche	Carotenóides e vitaminas
(S)-11	Rec. <i>E. coli</i> expressando enzima de <i>Sporosarcina</i> sp.	Bristol-Myers Squibb	Omapatrilat (anti-hipertensivo)
(S)-12	Rec. <i>E. coli</i> expressando enzima de <i>T. intermedius</i>	Degussa AG	Agentes anti-tumorais e inibidores da HIV endopeptidase

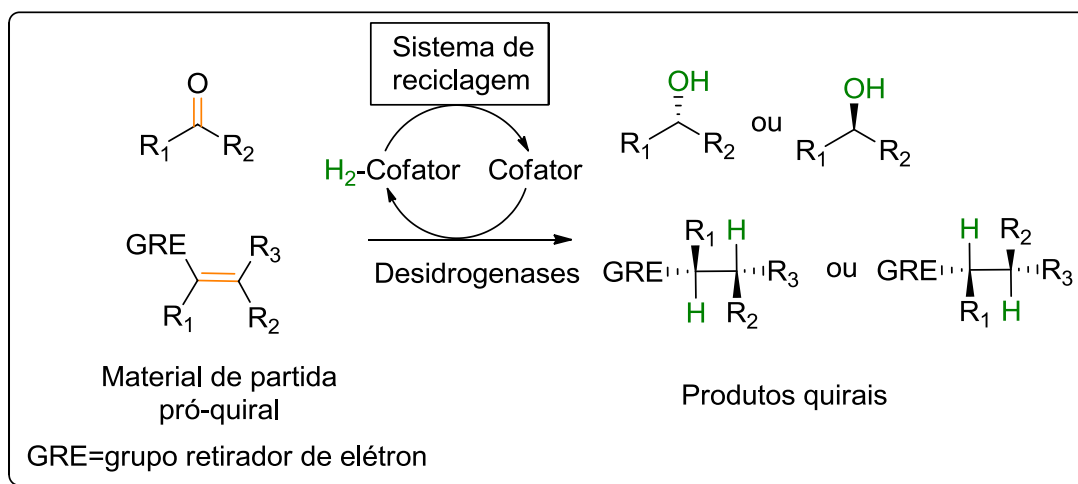
É relevante citar que nos últimos anos, elevou-se a utilização da levedura *Saccharomyces cerevisiae*, também conhecida como fermento de pão (FP), como biocatalisador para a preparação de compostos opticamente ativos (CLOSOSKI et al., 2007; LUO; WANG; GONG, 2010; PEREIRA, 1995a; RODRIGUES; MORAN, 2001; RODRIGUES et al. 2004; SCHAEFER et al., 2013; SERVI, 1990). Muitas são as vantagens na utilização desse micro-organismo, tais como versatilidade; baixo custo; alta enantiosseletividade; rendimentos químicos satisfatórios; grande disponibilidade, facilitando sua aquisição; não é patogênico e tóxico; fácil manipulação, não exigindo, assim, o conhecimento e aplicação de técnicas bioquímicas e microbiológicas complexas (PEREIRA, 1995a; RODRIGUES; MORAN, 2001; SERVI, 1990).

Além disso, o *Saccharomyces cerevisiae* é capaz de catalisar diversas reações de síntese assimétrica, tais como, redução, ciclização, condensação e resolução cinética (FABER, 2011; PEREIRA, 1995a; SERVI, 1990).

1.4.1. Biorredução dos compostos carbonílicos α,β -insaturados mediada por micro-organismos

As enzimas empregadas em reações redox são conhecidas como oxidorreduções e de um modo geral, são classificadas em três categorias: desidrogenases, oxigenases e oxidases (FABER, 2011). Podem ser encontradas isoladas (MONTI et al., 2011) ou contidas em células íntegras de micro-organismos (BRENNAN et al., 2012; CARBALLEIRA et al., 2009; FABER, 2011; HALL; BOMMARIUS, 2011; WINKLER et al., 2012). Entre elas, as desidrogenases destacam-se pelo seu amplo uso em reações de biorredução de substratos pró-quirais para a produção de compostos opticamente ativos (Esquema 1) (CARBALLEIRA et al., 2009; FABER, 2011; HALL; BOMMARIUS, 2011). A álcool desidrogenase (ADH), também conhecida por carbonila redutase, tem sido comumente utilizada para a preparação de álcoois enriquecidos enantiomericamente por meio da redução de grupos carbonilas (CARBALLEIRA et al., 2009; FABER, 2011; MILAGRE et al., 2009; MONTI et al., 2011; NAKAMURA et al., 2003). Já a ene redutase (ER) tem sido bastante empregada e demonstrado grande eficiência na redução de ligações C=C de moléculas α,β -insaturadas cujas ligações duplas são ativadas por conjugação com grupos retiradores de elétrons (GRE), como carbonila (BRENNAN et al., 2012; CARBALLEIRA et al., 2009; HALL et al., 2006; HUANG; ZHANG; GONG, 2005; KAWAI, et al., 1996, KAWAI; HAYASHI; TOKITOH, 2001; TORRELO; HANEFELD; HOLLMAN, 2015) e nitro (KAWAI et al., 2001), os quais

aumentam a susceptibilidade a um ataque nucleofílico por um hidreto, assim, alcenos isolados não reagem (FABER, 2011; WINKLER et al., 2012).



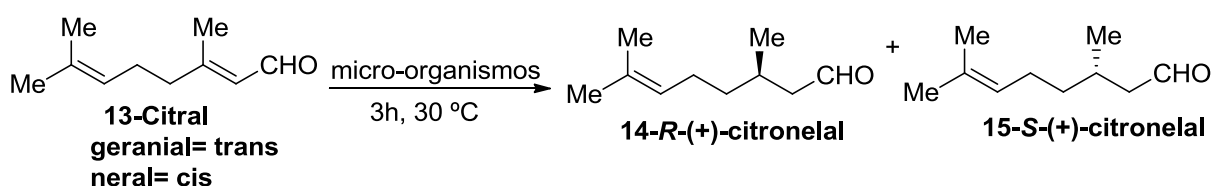
Esquema 1. Representação geral das reações de redução catalisadas por álcool desidrogenase e ene redutase. Fonte: Adaptado de FABER, 2011.

A redução assimétrica de ligações duplas C=C é uma das estratégias mais utilizadas para a obtenção de compostos quirais. As enzimas ene redutases, responsáveis por essa redução biocatalítica, contém o mononucleotídeo de flavina (FMN), são dependentes do NAD(P)H e são membros da família das *Old Yellow Enzyme* (OYE). A primeira ene redutase foi descoberta na década de 30, sendo estas amplamente distribuídas em micro-organismos e plantas (FABER, 2011; SHIMODA; KUBOTA; HAMADA, 2004; STUERMER et al. 2007; TOOGOOD; GARDINER; SCRUTTON, 2010; TOOGOOD; SCRUTTON, 2014; WINKLER et al., 2012). A ER pode ser aplicada na biorredução assimétrica de alcenos para a obtenção de compostos carbonílicos α -alquil substituídos opticamente ativos, os quais são importantes blocos de construção na síntese de fármacos quirais (BACH et al. 1998; COLOMBO et al., 1991; SHIN et al., 2007; SMITH; FREEZE, 2008) e produtos naturais, especialmente, feromônios (MORI; MASUDA; SUGURO, 1981; RILEY; SILVERSTEIN; MOSER, 1974; SINHA; KEINAN, 1995) e fragrâncias (ABATE et al., 2005; WINKLER et al., 2012).

Muller, Hauer e Rosche (2006) investigaram a biorredução assimétrica do citral para a obtenção do citronelal mediado por células íntegras de fungos e bactérias. Eles descobriram que diferentes micro-organismos podem apresentar atividades biocatalíticas com estereoespecificidades opostas para redução do citral em seus produtos *R*- ou *S*-citronelal (Tabela 3). As bactérias produziram preferencialmente o enantiômero *S*, já os fungos geraram

o enantiômero *R*. Assim, para futuros processos de bioconversão, é possível a preparação de ambos seletivamente por meio da escolha do micro-organismo adequado. Observou-se também que, como esperado, a ligação dupla isolada e não ativada permaneceu inalterada durante as reações de biorredução.

Tabela 3. Biorredução do citral mediado por micro-organismos. Fonte: Adaptada MULLER; HAUER; ROSCHE, 2006.



Micro-organismo	Configuração	ee(%)
<i>Zymomonas mobilis</i>	<i>S</i>	>99
<i>Citrobacter freundii</i>	<i>S</i>	75
<i>Candida rugosa</i>	<i>R</i>	>98
<i>Saccharomyces bayanus</i>	<i>R</i>	>97
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>R</i>	>96
<i>Kluyveromyces marxianus</i>	<i>R</i>	>95
<i>Candida utilis</i>	<i>R</i>	>94
<i>Issatchenkia orientalis</i>	<i>R</i>	64
<i>Rhizopus javanicus</i>	<i>R</i>	>94

Entre os diversos micro-organismos que apresentam a ene redutase e, conseqüentemente, a capacidade de reduzir assimetricamente a ligação dupla (MULLER; HAUER; ROSCHE, 2006; WINKLER et al., 2012), o *Saccharomyces cerevisiae* ocupa um lugar especial, pois historicamente, ele foi o primeiro biocatalisador adotado para sínteses assimétricas e gerou compostos quirais com alto *ee* (BRENNAN et al., 2012; SERVI, 1990). Além disso, a maioria das reduções biocatalíticas assimétricas têm sido mediadas por células íntegras de micro-organismos, principalmente, de *Saccharomyces cerevisiae*, a fim de evitar a adição de um sistema de reciclagem do cofator externo e os dispendiosos e complicados processos de isolamento da enzima (HALL et al., 2006; SERVI, 1990; STUERMER et al., 2007).

Embora as estereosseletividades das biorreduções mediadas por células íntegras muitas vezes sejam excelentes, a quimiosseletividade é frequentemente insatisfatória devido à presença de competitivas desidrogenases (HALL et al., 2006). A taxa relativa da redução C=C *versus* C=O depende das enzimas e dos compostos envolvidos (KERGOMARD; RENARD;

VESCHAMBRE, 1982; STUERMER et al., 2007). Por exemplo, a competitiva redução da carbonila em olefinas ativadas é menor em cetonas do que em aldeídos e a distribuição do produto está relacionada com a quantidade e velocidade relativa de redução de cada uma dessas enzimas presentes nos micro-organismos (FABER, 2011; STUERMER et al., 2007; WINKLER et al., 2012).

Nesse sentido, Zagozda e Plenkiewicz (2006) empregaram três micro-organismos, *Mortierella isabellina*, *Geotrichum candidum* e *Rhodotorula rubra*, para a redução do composto 4-fenil-3-metil-3-buten-2-ona e dos seus derivados com substituintes no anel aromático. Eles observaram que enquanto a linhagem de *Rhodotorula rubra* converteu os compostos nas cetonas opticamente ativas **17** com moderadas enantiosseletividades e com apenas traços dos correspondentes álcoois insaturados **18** e saturados **19** (Tabela 4), as linhagens de *Mortierella isabellina* e *Geotrichum candidum* reduziram as cetonas α,β -insaturadas no correspondente álcool secundário **20** com elevado *ee* (Tabela 5). Dessa maneira, uma cuidadosa seleção do micro-organismo poderá direcionar a reação no sentido da redução de um centro quiral ou de outro e na obtenção do produto almejado.

Tabela 4. Biorredução das cetonas α,β -insaturadas mediada por *Rhodotorula rubra*. Fonte: Adaptado de ZAGOZDA; PLENKIEWICZ, 2006.

Reaction scheme: $\text{Ar}-\text{CH}=\text{C}(\text{Me})-\text{C}(=\text{O})\text{Me} \xrightarrow[30\text{ }^\circ\text{C}, 140\text{ rpm}]{R. rubra} \text{Ar}-\text{CH}_2-\text{C}(\text{Me})-\text{C}(=\text{O})\text{Me} + \text{Ar}-\text{CH}=\text{C}(\text{Me})-\text{C}(\text{OH})\text{Me} + \text{Ar}-\text{CH}_2-\text{C}(\text{Me})-\text{C}(\text{OH})\text{Me}$

Products: **16a-e** (starting material), **S(+)-17a-d** (saturated ketone), **18a-d** (unsaturated alcohol), **19a-d** (saturated alcohol).

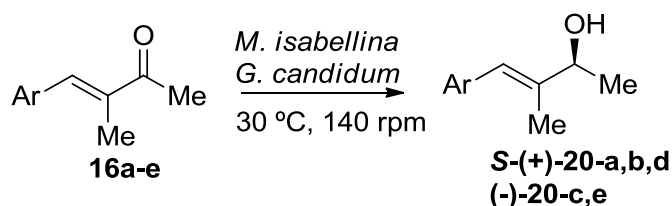
Produto	Ar	Tempo(h)	Conversão ^a /Rendimento ^b (%)	<i>ee</i> (%) ^c
17a	H-Ph	22	64/44	46
17b	<i>m</i> -OMe-Ph	23	66/49	71
17c	<i>p</i> -OMe-Ph	24	55/32	38
17d	<i>m</i> -Me-Ph	24	61/41	65
17e	<i>p</i> -NMe ₂	120	-	-

^a Conversão da cetona saturada foi determinada por análise no CG.

^b Rendimento isolado.

^c Determinado por CLAE usando a coluna Chiracel OD-H.

Tabela 5. Biorredução das cetonas α,β -insaturadas mediada por *Mortierella isabellina* (Mi) e *Geotrichum candidum* (Gc). Fonte: Adaptada de ZAGOZDA; PLENKIEWICZ, 2006.



Produto	Ar	Micro-organismo	Tempo (h)	Conversão ^a / Rendimento ^b (%)	ee(%) ^c
20a	H-Ph	Mi	6	81/65	97
20b	<i>m</i> -OMe-Ph	Mi	24	59/35	94
20c	<i>p</i> -OMe-Ph	Mi	24	51/23	77
20d	<i>m</i> -Me-Ph	Mi	24	56/31	94
20e	<i>p</i> -NMe ₂	Mi	48	65/12	43
20a	H-Ph	Gc	2	47/24	98
20b	<i>m</i> -OMe-Ph	Gc	3	18/16	99
20c	<i>p</i> -OMe-Ph	Gc	48	-	-
20d	<i>m</i> -Me-Ph	Gc	3	25/19	98
20e	<i>p</i> -NMe ₂	Gc	48	-	-

^a Conversão da cetona saturada foi determinada por análise no CG.

^b Rendimento isolado.

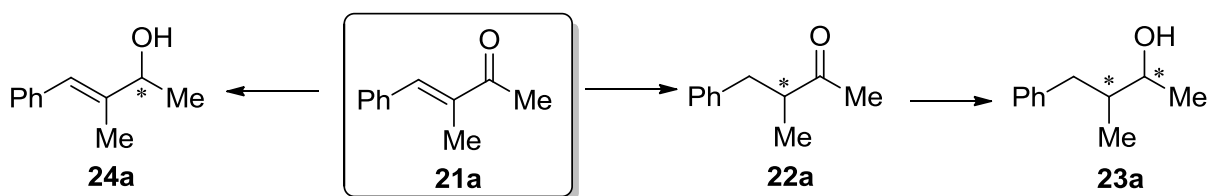
^c Determinado por CLAE usando a coluna Chiracel OD-H.

A existência de dois caminhos diferentes na biorredução de enonas já havia sido reportada por van Deursen e colaboradores em 2004. De acordo com esses pesquisadores, a existência de duas classes de oxidoredutases pode direcionar a biotransformação para caminhos distintos. Por um lado, a ADH exclusivamente reduz o grupamento cetona e mantém a ligação C=C inalterada. Por outro lado, a ene redutase apresenta quimiosseletividade e, frequentemente, boa estereosseletividade na biorredução da ligação C=C e mantém a função carbonila intacta. O caminho a ser seguido está relacionado tanto com os micro-organismos quanto com os substratos empregados.

Dessa forma, como a ligação C=C não ativada por GRE não é reativa (FABER, 2011; MULLER; HAUER; ROSCHE, 2006; WINKLER et al., 2012), provavelmente, a redução da ligação do grupo carbonila pela desidrogenase ocorre como um segundo plano (ZAGOZDA; PLENKIEWICZ, 2006). O FP, por exemplo, primeiramente reduz a ligação C=C de enonas,

por meio da ação da ene redutase, gerando cetonas saturadas, as quais podem ser reduzidas à álcoois saturados em um processo lento através da ADH (van Deursen et al., 2004)

Kawai e colaboradores (1996) buscaram a elucidação do caminho reacional na biorredução do composto carbonílico α -alquil- α,β -insaturado **21a** mediada por FP, pois em seus experimentos eles detectaram 3% do álcool insaturado **24a** e 9% do álcool saturado **23a** quando submeteram a cetona **21a** às reações de biorredução. Para isso, prepararam uma cetona racêmica saturada **22a** e um álcool alílico racêmico **24a** e submeteram-nos ao sistema biocatalítico. A cetona saturada **22a** gerou o álcool saturado **23a** lentamente enquanto o álcool alílico **24a** foi recuperado inalterado (Esquema 2).

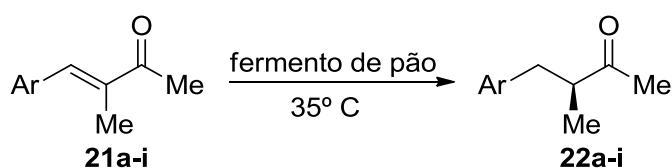


Esquema 2. Possível caminho reacional da biorredução de cetonas α,β -insaturadas. Fonte: Adaptado de KAWAI et al, 1996.

Tais resultados sugerem que o álcool saturado **23a** é produzido através da cetona saturada **22a** depois de um prolongado tempo reacional ou sob drásticas condições reacionais, já o composto **24a** possivelmente é um produto final formado através de um segundo caminho a partir da cetona **21a**. Dessa forma, eles concluíram que a redução da ligação C=C é predominante em olefinas ativadas e que seus resultados eram semelhantes àqueles já relatados por Sakai et al. (1991).

Dando continuidade aos estudos, Kawai e colaboradores (1996), visando melhorar a enantiosseletividade na redução assimétrica de cetonas α,β -insaturadas, avaliaram o efeito dos substituintes (Tabela 6). Eles observaram que a estereosseletividade da redução é fortemente influenciada pelos substituintes no anel aromático assim como pela suas posições (*orto*, *meta* e *para*). A presença dos substituintes em *orto* **22b** e *meta* **22c**, por exemplo, melhoraram drasticamente a estereosseletividade da reação.

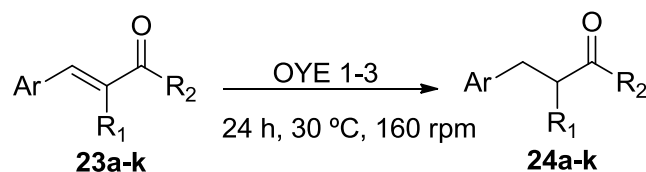
Tabela 6. Redução assimétrica de enonas **21** com fermento de pão. Fonte: Adaptada de KAWAI et al, 1996.



Produto	Ar	Tempo(h)	Rendimento(%)	ee(%)
22a	Ph	30	42	71
22b	2-MeO-Ph	48	13	>95
22c	3-MeO-Ph	48	72	>95
22d	4-MeO-Ph	20	73	61
22e	3,4- <i>di</i> -MeO-Ph	60	59	>95
22f	4-OH-Ph	76	20	58
22g	3-Cl-Ph	24	91	96
22h	3-NO ₂ -Ph	48	49	>95
22i	2-Py	50	59	65

Recentemente, Brenna et al. (2013) também estudaram os efeitos estéricos e eletrônicos na biorredução de α,β -insaturada- α -alquil- β -aril cetonas (Tabela 7). Sabendo da possibilidade de competição entre enzimas com diferentes quimiosseletividades existentes em células íntegras e buscando evitar qualquer inconveniente que pudesse impedir a alta seletividade e rendimento das biotransformações, esses pesquisadores optaram pela utilização de enzimas isoladas OYE1-3. Os resultados indicaram que a conversão é maior quando os substituintes na posição α e adjacentes à carbonila são pequenos. Em decorrência do aumento do efeito estérico na presença de substituintes mais volumosos, há uma diminuição da conversão e, às vezes, como pode-se verificar com os substratos **23f**, **23i** e **23k**, a reação não ocorre. Similarmente a Kawai e colaboradores (1996), eles verificaram que os substituintes no anel aromático na posição *orto* **23b** e *meta* **23c** geraram produtos com maiores enantiosseletividades do que aqueles na posição *para* **23d**. Além disso, as ene redutases OYE1-3 demonstraram comportamentos enantiodivergentes e permitiram o acesso a ambos enantiômeros (*R* ou *S*) dos produtos por meio do emprego de diferentes biocatalisadores.

Tabela 7. Biorredução de α -alquil- β -aril enonas mediada por OYE1-3. Fonte: Adaptada de BRENNAN et al., 2013.

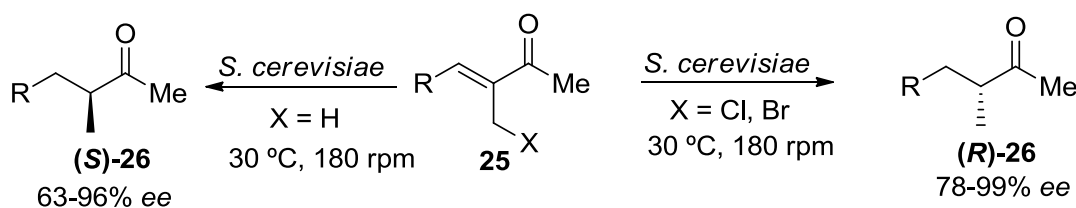


Substrato	R ₁	R ₂	Ar	OYE1		OYE2		OYE3	
				Conv. ^a (%)	ee ^b (%)	Conv. ^a (%)	ee ^b (%)	Conv. ^a (%)	ee ^b (%)
23									
a	Me	Me	Ph	>99	56(<i>S</i>)	>99	61(<i>S</i>)	>99	98(<i>S</i>)
b	Me	Me	2-MeO-Ph	>99	97(<i>S</i>)	61	95(<i>S</i>)	46	96(<i>S</i>)
c	Me	Me	3-MeO-Ph	>99	95(<i>S</i>)	>99	97(<i>S</i>)	>99	99(<i>S</i>)
d	Me	Me	4-MeO-Ph	92	42(<i>S</i>)	64	59(<i>S</i>)	45	97(<i>S</i>)
e	Me	Et	Ph	67	59(<i>R</i>)	9	76(<i>R</i>)	14	89(<i>S</i>)
f	Me	Et	2-MeO-Ph	3	n.d.	<1	n.d.	<1	n.d.
g	Me	Et	3-MeO-Ph	53	20(<i>R</i>)	11	42(<i>R</i>)	8	95(<i>S</i>)
h	Me	Et	4-MeO-Ph	41	60(<i>R</i>)	26	69(<i>R</i>)	7	81(<i>S</i>)
i	Me	<i>i</i> -Pr	Ph	<1	n.d.	<1	n.d.	<1	n.d.
j	Et	Me	Ph	>99	99(<i>S</i>)	52	99(<i>S</i>)	>99	99(<i>S</i>)
k	<i>n</i> -Bu	Me	Ph	16	98(<i>S</i>)	3	n.d.	6	n.d.

^a Conversão foi determinada por análise no CG-EM.

^b Determinada por CG acoplado com coluna quiral.

Paula e colaboradores (2013) também observaram a enantiodivergência na redução de α -metil e α -halometil enonas mediada por *S. cerevisiae* (Esquema 3). Quando as α -halometil enonas foram submetidas ao sistema de biorredução, a sequência redução-eliminação-redução gerou os produtos (**R**)-**26** com *ee* de 78 a 99%. Em contrapartida, a redução das α -metil enonas produziu as α -metil cetonas (**S**)-**26** com 63 a 96% de *ee*. Dessa forma, a substituição de uma ligação C-H por uma C-halogênio na posição β -carbonila pode ser usada como uma estratégia para controlar a estereoquímica na biorredução da ligação C=C.



R = Ph, 2-Cl-Ph, 4-Cl-Ph, 3-NO₂-Ph, 4-NO₂-Ph, 4-MeO-Ph, *n*-C₅H₁₁

Esquema 3. Biorredução de enonas mediada por *S. cerevisiae*. Fonte: Adaptada de Paula et al. 2013.

Embora complexos de metais de transição tenham sido empregados com sucesso na hidrogenação assimétrica de compostos α,β -insaturados (BLASER; SPINDLER; STUDER, 2001; LU; BOLM, 2008; MAURER et al., 2012), as condições experimentais mais prejudiciais, como o uso de solventes orgânicos, o acúmulo de metais tóxicos, gás hidrogênio sob altas pressões, o custo elevado e a indisponibilidade comercial de muitos ligantes quirais, assim como os resíduos químicos gerados no decorrer do processo, incentivam o uso de biocatalisadores (DUNN, 2012; WOODLEY, 2008; NAKAMURA et al., 2003).

1.4.2. Resina adsorvente Amberlite

A fim de melhorar a enantiosseletividade dos produtos e o rendimento das reações biocatalíticas, uma técnica promissora é o emprego de resinas adsorventes.

Em 1962, a indústria "Rohm and Haas", atualmente conhecida por "Dow Chemical Company", iniciou a preparação de uma resina macrorreticular por meio de técnicas de polimerização (HUBBARD; FINCH; DARLING, 1998; KUNIN; MEITZNER; BORTNICK; 1962). Em 1967, a primeira resina adsorvente, chamada de Amberlite, tornou-se comercialmente disponível (HUBBARD; FINCH; DARLING, 1998).

As resinas Amberlite XAD são esferas brancas, às vezes, levemente amareladas, porosas, adsorventes e poliméricas. Atualmente, são fabricadas diversos tipos de resinas Amberlite, tais como, XAD-2, XAD-4, XAD-16, XAD-1180, XAD-7, entre outras, as quais apresentam diferenças em relação à natureza química, grau de polaridade, momento dipolo, tamanho do poro e área superficial (SIGMA ALDRICH, 2015; VOLPÉ; MALLET, 1979). Adicionalmente, o material a ser adsorvido pela resina deve ser capaz de migrar através dos poros para a superfície do adsorvente (SIGMA ALDRICH, 2015).

O termo adsorção se refere ao processo em que moléculas se aglomeram em uma camada interfacial, já a dessorção é o movimento inverso. A substância a ser adsorvida é definida como adsorbato e o sólido no qual ocorre a adsorção é o adsorvente (DABROWSKI, 2001). A classificação do processo de adsorção é resultante da força de interação entre o adsorvente e o adsorbato e, dessa forma, pode ser proveniente de interações de Van der Waals (adsorção física) ou envolver interações químicas específicas mais fortes como forças eletrostáticas e ligações covalentes (adsorção química). Casos as condições permitam, ambos os processos podem ocorrer simultaneamente ou alternadamente (DABROWSKI, 2001; TEIXEIRA; COUTINHO; GOMES, 2001).

A capacidade de dessorção do material de partida da resina para a fase aquosa e de adsorção do produto da fase aquosa para a resina são características importantes e que devem ser consideradas para a escolha de uma resina eficiente (YANG; YAO; GUAN, 2005). Os materiais orgânicos adsorvidos nas resinas podem ser dessorvidos utilizando diversos solventes orgânicos, por exemplo, éter etílico, acetona, acetato de etila, diclorometano e metanol (ANDERSSON; ANDERSSON, 1982).

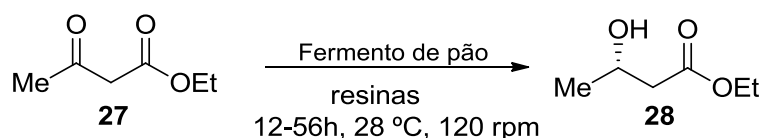
Inicialmente, as resinas Amberlite XAD foram empregadas na análise de pequenas quantidades de compostos orgânicos na água (ANDERSSON; ANDERSSON, 1982; JUNK et al. 1974; VOLPÉ; MALLET, 1979). Um outro campo de aplicação desses adsorventes é na análise de compostos orgânicos presentes no ar (ANDERSSON; LEVIN; NILSSON, 1981; ANDERSSON et al., 1981), em materiais biológicos (IBRAHIM; ANDRYAUSKAS; BASTOS, 1975) e extratos de plantas (ANDERSSON; ANDERSSON, 1982).

Nos últimos anos, segundo dados da literatura, (ARRIGO et al., 1998; CONCEIÇÃO; MORAN; RODRIGUES, 2003a; CONCEIÇÃO; MORAN; RODRIGUES, 2003b; YANG; YAO; GUAN, 2005; NAKAMURA; FUJII; IDA, 2000) a resina polimérica hidrofóbica também tem sido utilizada como uma ferramenta para contornar o problema da baixa estereosseletividade em reações de biocatálise utilizando micro-organismos. Nessa técnica, o substrato orgânico hidrofóbico é adsorvido na resina e, quando adicionado ao sistema reacional, fica particionado entre a fase sólida orgânica e a fase aquosa (CONCEIÇÃO; MORAN; RODRIGUES, 2003b).

De um modo geral, as resinas Amberlite apresentam afinidade semelhante tanto pelo substrato quanto pelo produto, controlando a concentração de ambos na fase aquosa. Dessa forma, o polímero age como um reservatório do substrato, controlando a massa do substrato que é consumida pelo biocatalisador na fase aquosa e ao longo da reação, o produto liberado pelo biocatalisador é extraído *in situ* pela resina (ARRIGO et al., 1998; CHAVES; MORAN; RODRIGUES, 2013; CONCEIÇÃO; MORAN; RODRIGUES, 2003a; CONCEIÇÃO; MORAN; RODRIGUES, 2003b; YANG; YAO; GUAN, 2005) Evita-se, assim, o acúmulo de ambos na fase aquosa e na superfície celular, que pode causar a inibição enzimática, toxicidade e levar a morte celular (ANDERSON et al., 1995; ARRIGO et al., 1998; CONCEIÇÃO; MORAN; RODRIGUES, 2003a; CONCEIÇÃO; MORAN; RODRIGUES, 2003b; ROFFLER; BLANCH; WILKE, 1984; YANG; YAO; GUAN, 2005).

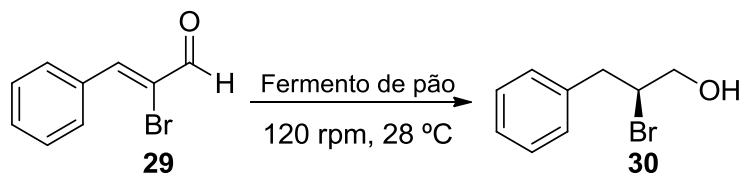
Uma aplicação dessa metodologia foi reportada por Arrigo et al. (1997), que estudaram a correlação entre o *ee* do *S*-(+)-3-hidroxi-butanoato de etila, obtido na biorredução do acetoacetato de etila mediada por FP, e a concentração do substrato no meio reacional

utilizando resinas adsorventes (Esquema 4). Esses pesquisadores realizaram um estudo comparativo com diferentes resinas (XAD-1, XAD-7, XAD-1180, Dow 24D) e na ausência das mesmas. Os resultados demonstraram uma elevação da enantiosseletividade do produto de 78% no experimento branco para 89-94% com o emprego dos adsorventes, que foi relacionada à diminuição da concentração do substrato na fase aquosa.



Esquema 4. Biorredução do acetoacetato de etila. Fonte: Adaptado de ARRIGO et al. 1997.

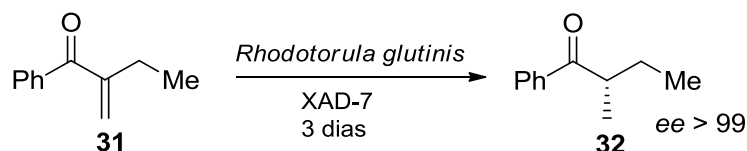
Dando continuidade aos estudos com a resina Amberlite, Arrigo e colaboradores (1998) confirmaram que o controle da concentração do substrato na fase aquosa é uma poderosa estratégia para alcançar alta seletividade nas reações de redução. Eles testaram diferentes concentrações do substrato **29** (Esquema 5) e relacionaram-nas com os *ee* obtidos. Observou-se que o aumento da concentração do substrato causou uma queda na enantioseletividade do produto, ou seja, o *ee* que era de 91,8% com a concentração de 0,1 g/L, diminuiu para 62,7% com a elevação da concentração para 5 g/L. A enantiosseletividade insatisfatória foi consequência da presença de múltiplas enzimas com diferentes enantiopreferências. Já com a presença de resina XAD-1180 e concentração de 2 g/L do substrato, o *ee* obtido foi maior que 95% em detrimento das biorreduções na ausência de resina, cujo *ee* foi de 68,2%. Tais estudos demonstraram que o controle dos parâmetros experimentais foi capaz de favorecer a atividade da enzima desejada e suprimir a ação das demais.



Esquema 5. Biorredução do composto carbonílico α,β -insaturado **29**. Fonte: Adaptado de ARRIGO et al. 1998.

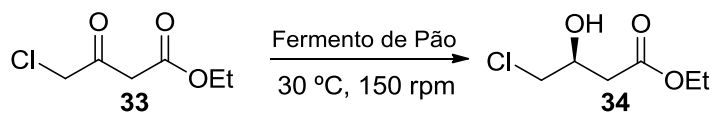
Conceição, Moran e Rodrigues (2003a), afim de obterem alto rendimento e *ee* também exploraram o uso da resina Amberlite em seus experimentos utilizando a levedura *Rhodotorula glutinis* para a redução da ligação C=C da enona 2-etil-1-fenil-pro-2-en-1-ona (Esquema 6). Devido a adsorção do substrato hidrofóbico na resina XAD-7, houve uma

diminuição da sua concentração na fase aquosa, já que a sua liberação foi controlada pela resina, o que foi crucial para garantir a redução eficiente e a obtenção do produto com alta enantiosseletividade. Nesses experimentos, o *ee* observado foi maior que 99%.



Esquema 6. Biorredução da cetona 2-etil-1-fenil-pro-2-en-1-ona. Fonte: Adaptado de CONCEIÇÃO; MORAN; RODRIGUES, 2003a.

Outro exemplo do emprego de resina na biorredução de compostos carbonílicos é apresentado nos trabalhos de Yang e colaboradores (2005). Esse trabalho tinha como objetivo aumentar a concentração inicial do substrato 4-cloro-3-oxobutanoato de etila e melhorar a estereosseletividade da sua redução assimétrica mediada por FP (Esquema 7).



Esquema 7. Biorredução do 4-cloro-3-oxobutanoato de etila. Fonte: Adaptado YANG; YAO; GUAN, 2005.

Primeiramente, eles avaliaram a capacidade de adsorção e dessorção de cinco tipos de resinas. Os pesquisadores selecionaram, para a continuidade aos seus experimentos, a resina XAD-1600 que adsorveu fortemente o produto (4-cloro-3-hidroxibutanoato de etila) e dessorveu o substrato (4-cloro-3-oxobutanoato de etila) moderadamente (Tabela 8). Com essas características, a resina apresentou a capacidade máxima para controlar a concentração do substrato e produto na fase aquosa e elevar a estereosseletividade da reação.

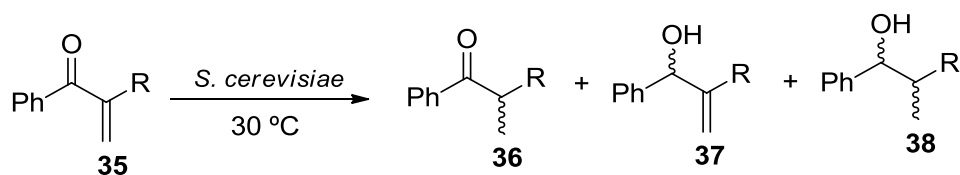
Tabela 8. Proporção de dessorção e adsorção do substrato e do produto. Fonte: Adaptada de YANG; YAO; GUAN, 2005

Resina	Dessorção(%)	Adsorção(%)
XAD-4	44,7	66,98
XAD-1180	53,36	63,45
XAD-1600	23,72	85,99
XAD-7HP	33,61	61,96
XE-749	34,65	76,36

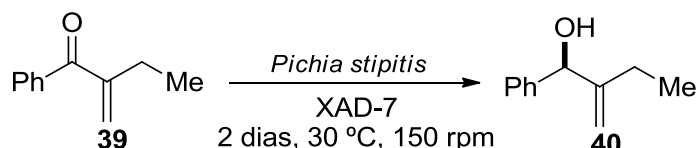
Posteriormente, os pesquisadores introduziram o substrato adsorvido na resina XAD-1600 no meio biocatalítico afim de que ele fosse liberado lentamente e, ao mesmo tempo, ocorresse a extração do produto *in situ*. Dessa forma, a concentração do substrato e do produto no sistema reacional poderia ser controlada conforme os comportamentos de adsorção de ambos. Os experimentos indicaram uma elevação da estereosseletividade de 78% para 95%, com a produção preferencial do *S*-enantiômero, e da concentração do substrato de 70 para 150 mmol/L. Os autores concluíram que essa técnica é promissora e conveniente quando comparada com outros métodos de controle da estereoquímica (YANG; YAO; GUAN, 2005).

Tanto Arrigo et al. (1997, 1998) quanto Conceição, Moran e Rodrigues (2003a) e Yang e colaboradores (2005) investigaram a influência da quantidade de resina na enantiosseletividade da biorredução. Nos experimentos de Arrigo et al. (1997), foi observado que o *ee* que era de 78,9% na ausência de resina, aumentou para 94,4% utilizando 9 g de resina. Em 1998, nos trabalhos publicados pelo mesmo grupo, o *ee* que era de 68,2% sem a resina, ascendeu para mais que 95% com o uso da resina. Resultados similares foram obtidos por Conceição, Moran e Rodrigues (2003a), o *ee* obtido com 1 g de resina que era de 85%, elevou-se para 99% na presença de 3 g. Yang e colaboradores (2005) também demonstraram que a enantiosseletividade e o rendimento aumentaram na medida em que elevou-se a quantidade de resina Amberlite, o *ee* que era de 87% com 60 g/L passou a ser de 94% com 140 g/L.

Nesse contexto, Conceição, Moran e Rodrigues (2003b), buscando alta quimio- e enantiosseletividade na preparação do produto (*S*)-2-etil-1-fenil-prop-2-en-1-ol **40**, primeiramente, realizaram uma triagem com diversos micro-organismos e os resultados que se destacaram foram aqueles obtidos com a levedura *Pichia stipitis*. Todavia, além do produto desejado ter sido obtido com rendimento e quimiosseletividade baixos, o aumento da concentração da enona também foi tóxico e prejudicou a conversão do substrato. Assim, buscando uma alternativa para superar essas limitações, os pesquisadores adicionaram o substrato adsorvido na resina polimérica hidrofóbica ao meio reacional afim de reduzir tanto a concentração do substrato quanto a do produto na fase aquosa. Eles verificaram que, diferente do trabalho reportado pelo grupo anteriormente (FILHO; RODRIGUES; MORAN, 2001), no qual para substratos semelhantes foi observado redução preferencial da ligação C=C, produto **36**, em detrimento da ligação C=O (Esquema 8), a adsorção do substrato na resina bem como a escolha da levedura *Pichia stipitis* foram determinantes para a obtenção de elevada enantio- e quimiosseletividade do produto **40** (Esquema 9).



Esquema 8. Biorredução da α -metil cetona. Fonte: Adaptado de CONCEIÇÃO; MORAN; RODRIGUES, 2003b.



Esquema 9. Biorredução do 2-etil-1-fenil-prop-2-en-1-ona. Fonte: Adaptado de CONCEIÇÃO; MORAN; RODRIGUES, 2003b.

A maioria das resinas Amberlite XAD são apolares, em contrapartida, a XAD-7 é considerada de polaridade intermediária, já que é um polímero de éster acrílico, alifático, insolúvel e não iônico (Figura 8). As capacidade de adsorção da XAD-7 provém da sua estrutura macrorreticular, grande área superficial e composição química alifática. Essa resina também apresenta grande estabilidade física e térmica resultante da sua estrutura. Devido a sua natureza alifática, ela é capaz de adsorver tanto compostos não polares de sistemas aquosos como também compostos relativamente polares de solventes apolares (SIGMA ALDRICH, 2015; ROHM AND HASS, 2003; VOLPÉ; MALLET, 1979).

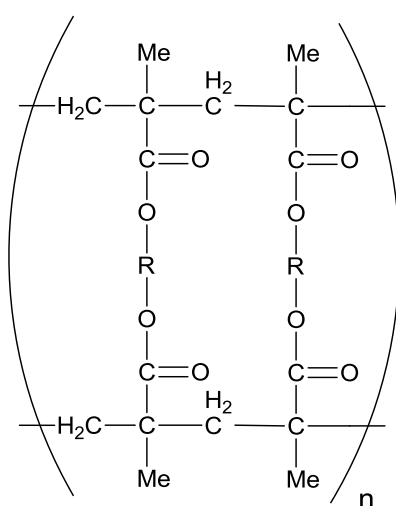
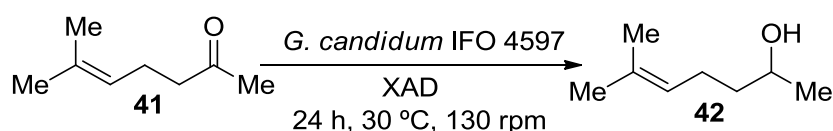


Figura 8. Estrutura química da resina adsorvente XAD-7. Fonte: Adaptada de ROHM AND HASS, 2003.

Em 2000, Nakamura, Fujii e Ida, visando controlar a estereoquímica das reduções de cetonas, testaram diversas resinas adsorventes poliméricas na redução do substrato 6-metil-hept-5-en-2-ona (Tabela 9). Os pesquisadores verificaram que a resina adsorvente XAD-7 apresentou os melhores resultados e aumentou, consideravelmente, a estereosseletividade e o rendimento da reação. O excesso enantiomérico que era de 27% na ausência de resina, elevou-se para 86% com a sua presença. Os autores relacionaram esses resultados à grande área superficial e a polaridade da resina XAD-7.

Tabela 9. Características e efeito da resina na redução de 6-metil-hept-5-en-2-ona. Fonte: Adaptada de NAKAMURA; FUJII; IDA, 2000.

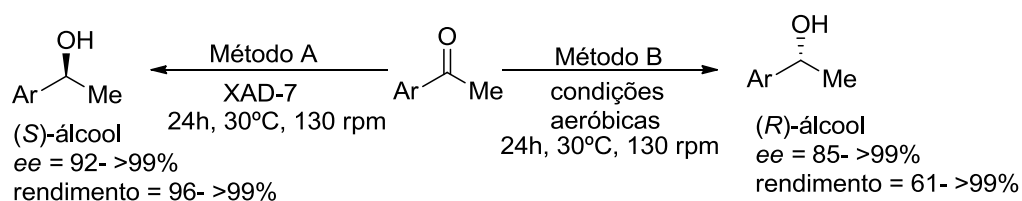


Resina	Material	Área Superficial (m ² /g)	Rendimento/ee (%)	Configuração
XAD-2	Estireno-DVB	280–320	20/50	<i>R</i>
XAD-4	Estireno-DVB	700–800	17/18	<i>R</i>
XAD-7	Éster acrílico	350–500	31/86	<i>S</i>
XAD-8	Éster acrílico	120–300	16/22	<i>S</i>
Nenhuma	-	-	28/27	<i>R</i>

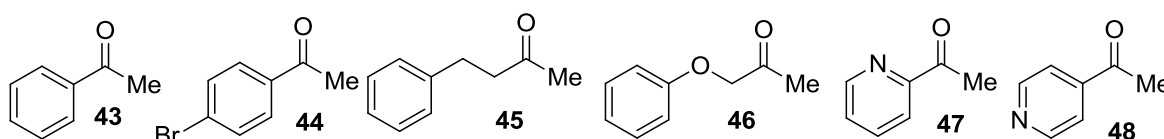
Posteriormente, Nakamura e colaboradores (2002) testaram a adição do substrato adsorvido na resina XAD-7 (método A) e condições aeróbicas (método B) para a obtenção dos enantiômeros de álcoois secundários e notaram que houve inversão da configuração absoluta, ou seja, o caminho estereoquímico para a formação dos enantiômeros foi dependente das condições reacionais empregadas (Esquema 10).

Em razão da existência de enzimas com preferência estereoquímica oposta, o uso de células íntegras de micro-organismos na biorredução de compostos carbonílicos pode resultar em produtos com baixa estereosseletividade (NAKAMURA et al., 1991). Todavia, nesses ensaios, a adição da resina Amberlite propiciou a preparação preferencial do (*S*)-álcool. Os pesquisadores (NAKAMURA et al., 2002) utilizaram a *K_m* (Constante de Michaelis-Menten) para discutir e explicar esses resultados, ou seja, com a adsorção do substrato na resina polimérica hidrofóbica, houve uma diminuição da sua concentração na fase aquosa e uma enzima com menor valor de *K_m* reage, preferencialmente, em baixas concentrações do substrato. Assim, a enzima-pró-(*S*) que, possivelmente, apresenta um menor valor de *K_m*

quando comparada a enzima-pró-(*R*), foi aquela que contribuiu predominantemente para a biorredução da cetona e obtenção do (*S*)-álcool.



Cetonas utilizadas:



Esquema 10. Redução assimétrica de cetonas com *G. candidum*. Fonte: Adaptado de NAKAMURA et al., 2002.

A aplicação da resina Amberlite é uma metodologia bastante atrativa, principalmente para a indústria, já que ela possibilita a utilização de reações de biotransformações em maiores escalas, ou seja, utilizando uma quantidade inicial maior de substrato sem comprometer o rendimento e *ee* do produto (YANG; YAO; GUAN, 2005).

2. Objetivos

2. OBJETIVOS

Sabendo que os processos biocatalíticos podem contribuir de forma decisiva com o desenvolvimento de uma química mais verde, o presente trabalho teve como objetivo estudar a aplicação de micro-organismos na preparação de intermediários opticamente ativos, de interesse para síntese de fármacos e produtos naturais, a partir da biorredução de compostos carbonílicos α,β -insaturados.

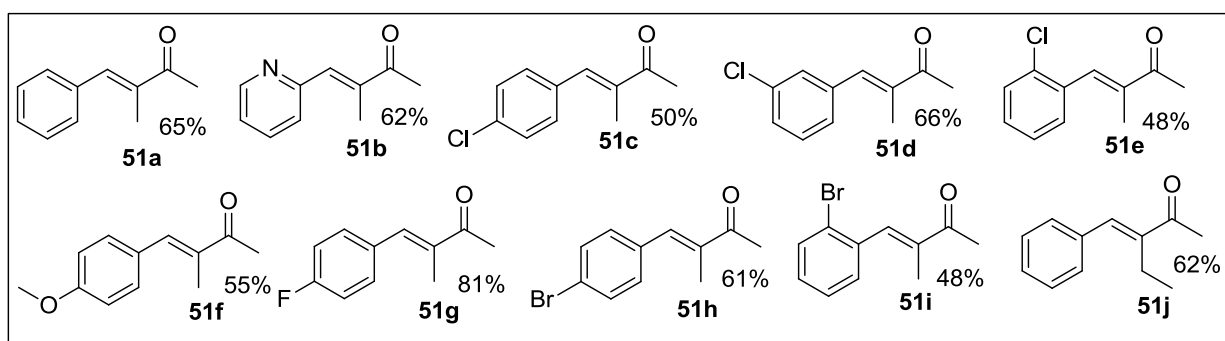
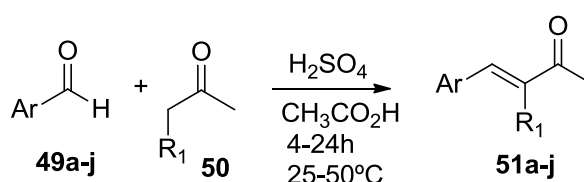
3.Resultados e discussão

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

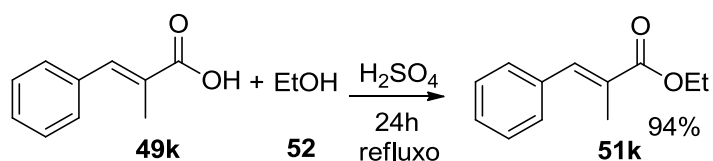
No presente trabalho, realizou-se a biorredução de compostos carbonílicos α,β -insaturados mediada por micro-organismos. Inicialmente, serão abordados a preparação dos substratos e dos padrões. Em seguida, serão apresentados e discutidos os resultados obtidos na otimização das condições reacionais para a biorredução das olefinas ativadas, na qual investigou-se os efeitos do uso de diferentes meios biocatalíticos, aditivos, biocatalisadores de origens distintas, resina adsorvente e substituintes. Posteriormente, serão demonstrados os procedimentos realizados para determinação da configuração absoluta das moléculas não reportadas na literatura e por fim, será apresentando a aplicação sintética da metodologia na síntese da muguesia, uma fragrância floral de grande interesse comercial.

3.1. Preparação dos compostos carbonílicos α,β -insaturados

As enonas do tipo **51a-j** foram preparadas através de uma condensação aldólica de diversos aril aldeídos com as cetonas alifáticas (LU; BOLM, 2008) (Esquema 11) e seus rendimentos variaram de 48% a 81%. As reações foram realizadas sob condições ácidas afim de induzir a formação do enol mais substituído e formação da ligação dupla de configuração *E*, as quais foram confirmadas através do experimento de NOEDIFF. Já o substrato **51k** foi preparado através de uma esterificação do ácido α -metil cinâmico com etanol sob condições ácidas (LI; QUAN; ANDERSSON, 2012) e seu rendimento isolado foi de 94% (Esquema 12)



Esquema 11. Preparação dos substratos **51a-j**.



Esquema 12. Preparação do substrato **51k**.

Todas as estruturas foram confirmadas e caracterizadas por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM) e ressonância magnética nuclear (RMN) de 1H e ^{13}C . A título de exemplo, adiante se encontram as propostas de fragmentações, os espectros de RMN de 1H e suas expansões e o experimento de NOEDIFF para o composto **51a**.

Na Figura 9 pode-se observar o espectro obtido no CG-EM para a molécula **51a** e no Esquema 13 estão apresentadas as propostas de fragmentação para os sinais observados. Como trata-se de um sistema carbonílico α,β -insaturado, a densidade eletrônica não fica concentrada apenas na carbonila, ou seja, a nuvem eletrônica está deslocada, permitindo que a retirada dos elétrons na fonte de ionização possa ocorrer em diferentes regiões da molécula. Tal fato resulta em reações de fragmentações competitivas, paralelas e consecutivas. Dessa forma, no espectro de massas observou-se a presença do íon molecular m/z 160. Encontrou-se também o pico m/z 145 referente a perda de uma metila. Por outro lado, o sinal m/z 91 (íon tropílio) indicou a presença de anel aromático. O fragmento m/z 43 é resultante da formação do íon acílio. Analisando os demais picos, foi possível propor rearranjos e eliminação de H_2 referentes aos fragmentos m/z 159, m/z 117 e ao pico base m/z 115. As fragmentações observadas nos espectros de CG-EM são condizentes com a estrutura da molécula.

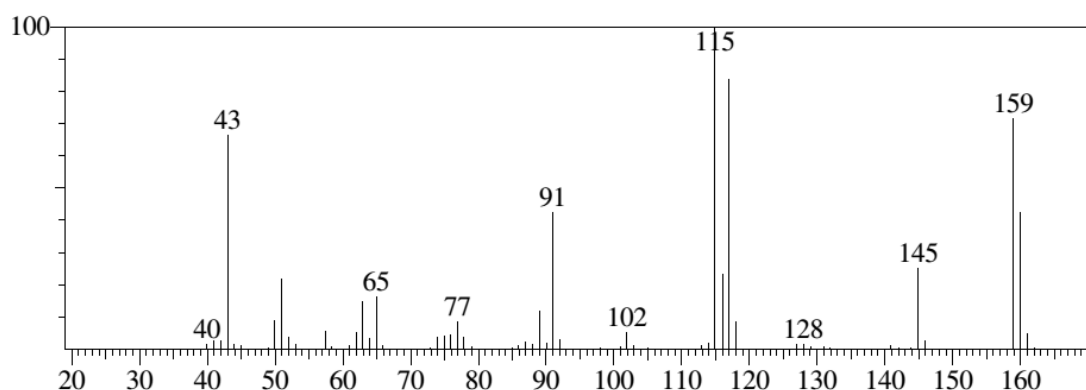
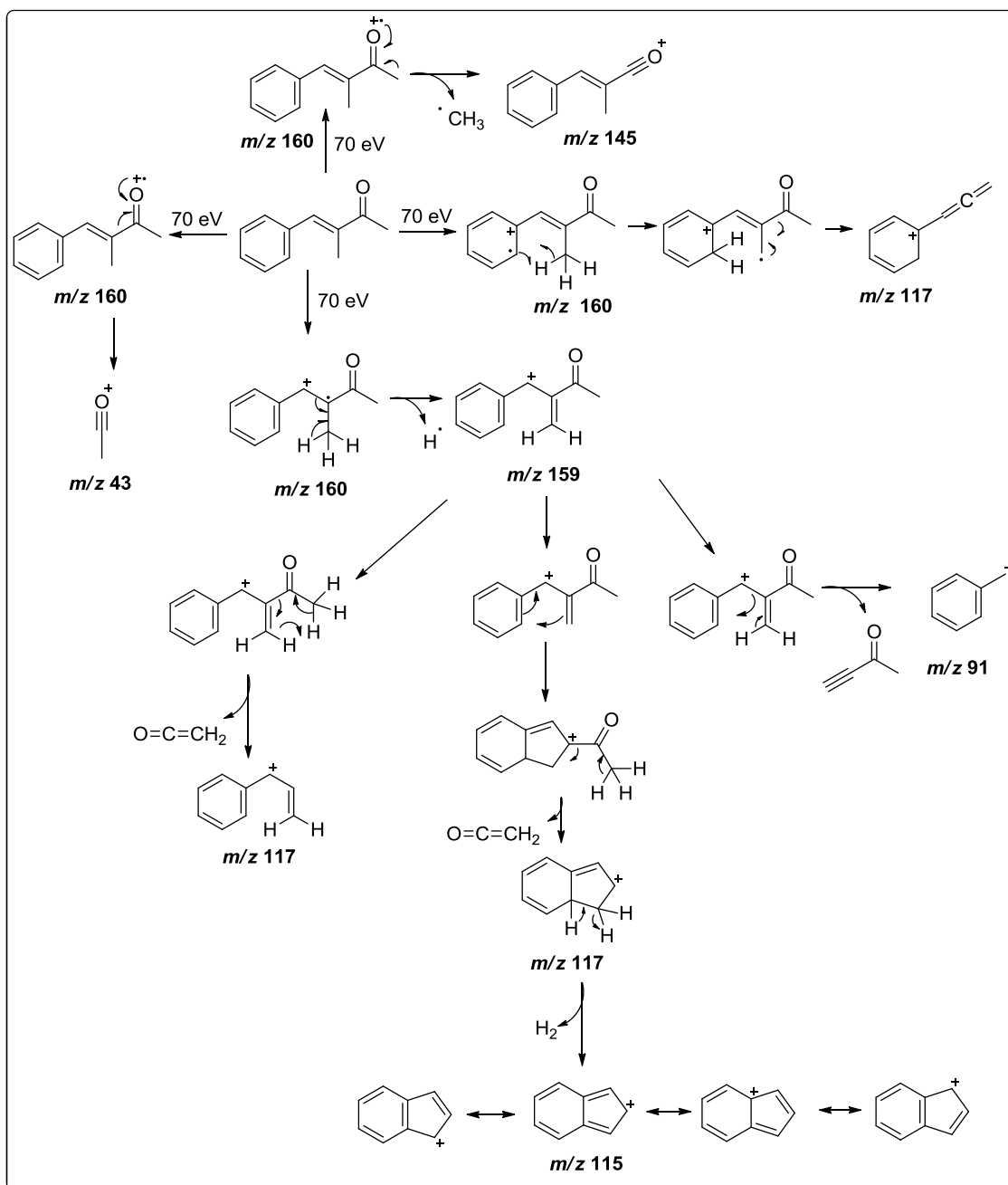


Figura 9. Espectro obtido no CG-EM do composto **51a**.



Esquema 13. Propostas de fragmentação do composto **51a** após ionização por impacto de elétrons (70 eV).

Já no espectro de RMN de ^1H (Figura 10), pode-se observar um duplete com deslocamento químico em 2,07 ppm, integrando para 3 hidrogênios e constante de acoplamento $J = 1,3$ Hz, indicando a presença de hidrogênios do grupo metila (H-11). Em seguida, visualiza-se um simpleto com deslocamento químico em 2,48 ppm e integral 3, indicando a presença de mais um grupo metila (H-1), um pouco mais desblindado devido a proximidade com a carbonila. Na região de 7,44-7,33 ppm encontra-se um multiplete com integral 5, referente aos hidrogênios aromáticos (H-6 a H-10). Por fim, observa-se também a

presença de um quarteto aparente com deslocamento químico de 7,53 ppm e integração para 1 hidrogênio, indicando a presença de um hidrogênio vinílico mais desblindado (H-4), e $J = 1,3$ Hz referente ao acoplamento alílico entre o hidrogênio vinílico (H-4) e os hidrogênios metílicos (H-11).

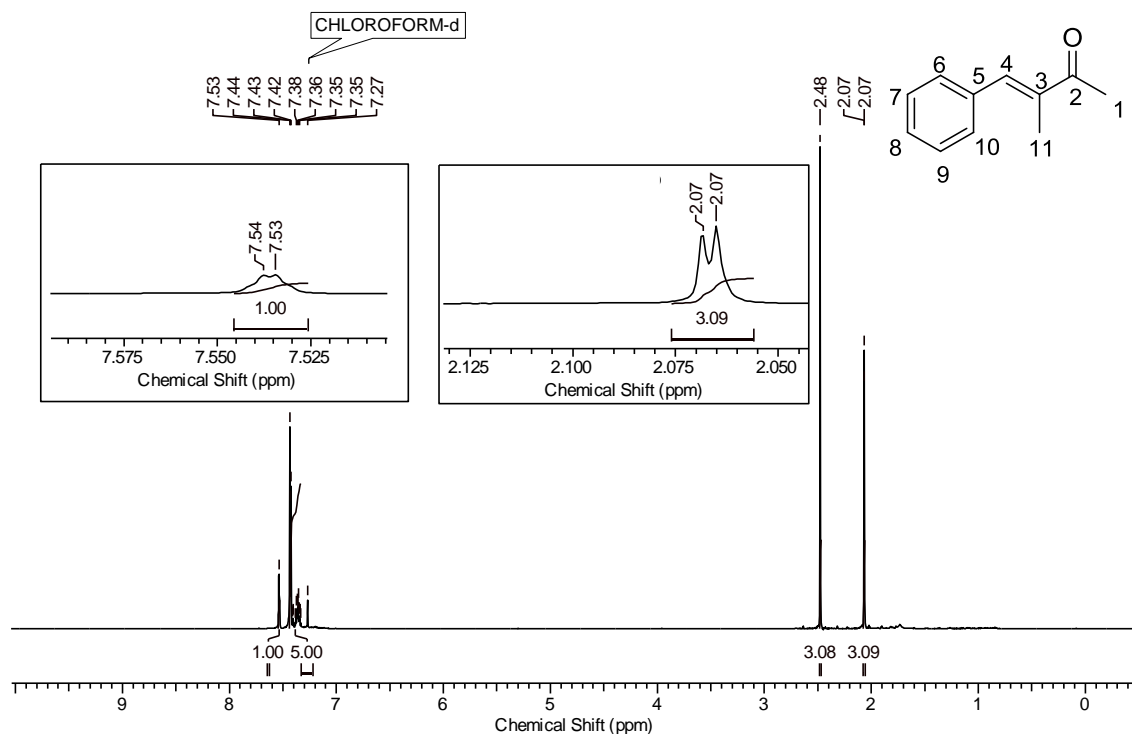


Figura 10. Espectro de RMN de ^1H do composto **51a** (400 MHz, CDCl_3).

A espectroscopia diferencial de efeito nuclear *Overhauser* (NOEDIFF) permitiu a confirmação da configuração da ligação dupla. Através da irradiação do duplete H-4 (δ 7,53), notou-se o efeito NOE com o simpleto da metila H-1 (δ 2,48) e assim, uma intensificação do seu sinal. Por sua vez, quando irradiou-se o sinal referente a mesma metila H-1, observou-se o efeito NOE com o duplete H-4 (Figura 11). Os efeitos NOE observados na análise indicam núcleos que interagem com os prótons irradiados. Dessa forma, avaliando as duas possíveis configurações da ligação dupla da molécula (Figura 12), pode-se concluir que a ligação dupla tem configuração *E*.

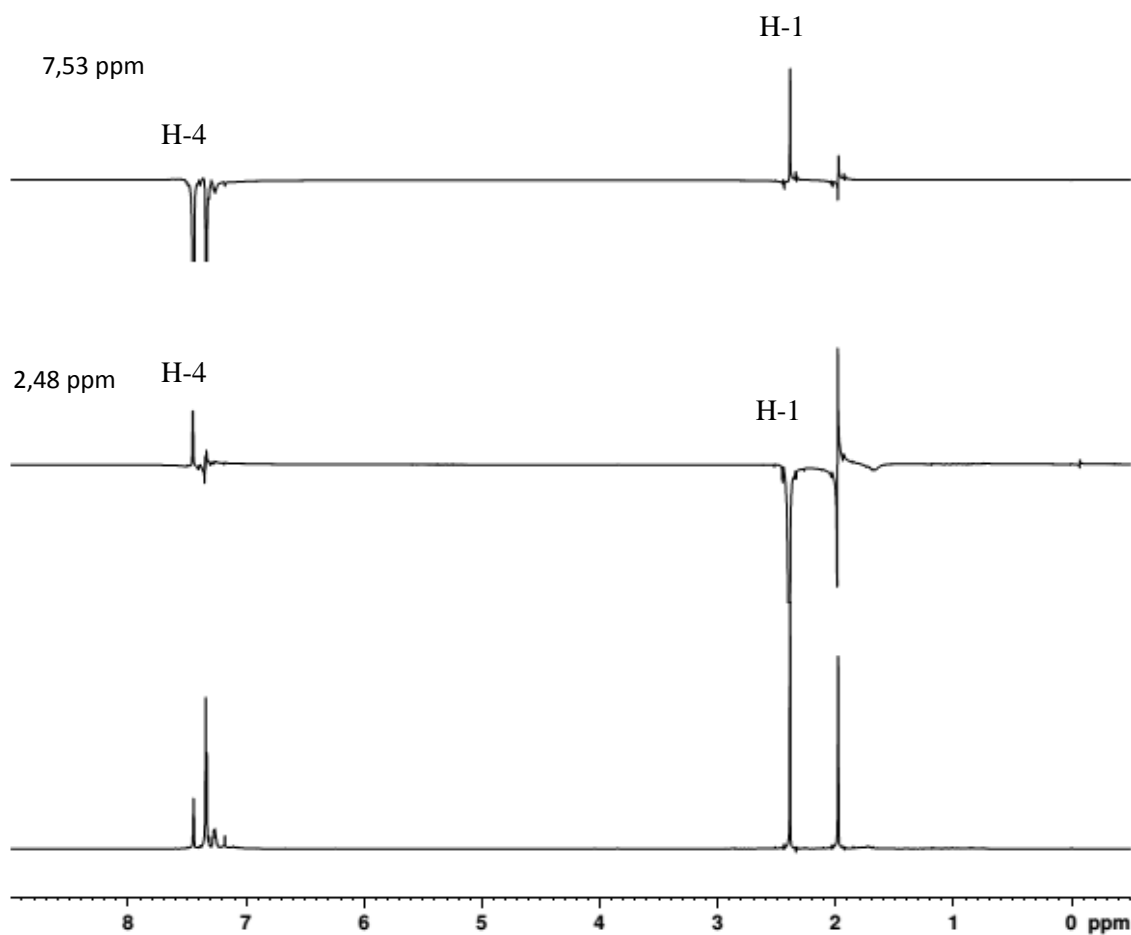


Figura 11. Espectros de diferença de NOE do composto **51a** (500 MHz, CDCl_3).

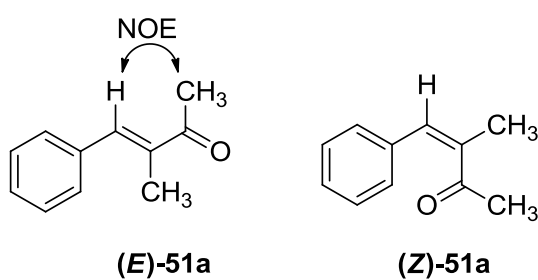
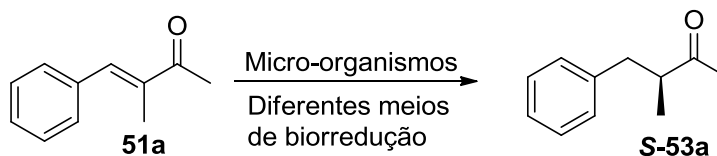


Figura 12. Possíveis configurações da ligação dupla para a olefina **51a**.

3.2. Otimização das condições reacionais na redução do composto (*E*)-4-fenil-3-metil-3-buten-2-ona (**51a**)

Já que diferentes parâmetros experimentais bem como modificações estruturais podem influenciar na quimio- e estereosseletividade da reação (SERVI, 1990), tais características foram avaliadas.

Inicialmente, a fim de obter condições reacionais que levassem a produção de compostos carbonílicos α -alquil substituídos opticamente ativos com conversões e excessos enantioméricos elevados, realizou-se um estudo dos diversos fatores experimentais a partir do substrato **51a** e determinou-se a condição reacional mais enantiosseletiva para a obtenção do produto **53a** (Esquema 14). Posteriormente, tal sistema biocatalítico foi utilizado para a biorredução dos demais compostos.



Esquema 14. Esquema geral da biorredução do substrato **51a**.

Nesses estudos, utilizou-se o CG-EM para o cálculo da porcentagem de conversão e o cromatógrafo à gás equipado com fase estacionária quiral (CG-FID-quiral) para a determinação dos excessos enantioméricos. Como exemplo, a Figura 13 mostra um cromatograma obtido no CG-FID-quiral da reação de biorredução do substrato **51a**. Adicionalmente, os enantiômeros também foram caracterizados por análise no CG-EM equipado com coluna quiral e a determinação da configuração absoluta da molécula **53a** foi feita a partir da comparação da sua rotação óptica ($[\alpha]_D^T$) com dados da literatura (LU; BOLM, 2008), a qual indicou que o enantiômero formado preferencialmente foi o *S*-(+)-**53a** [t_R : 56 min. (*R*-**53a**) e 57,7 min. (*S*-**53a**)].

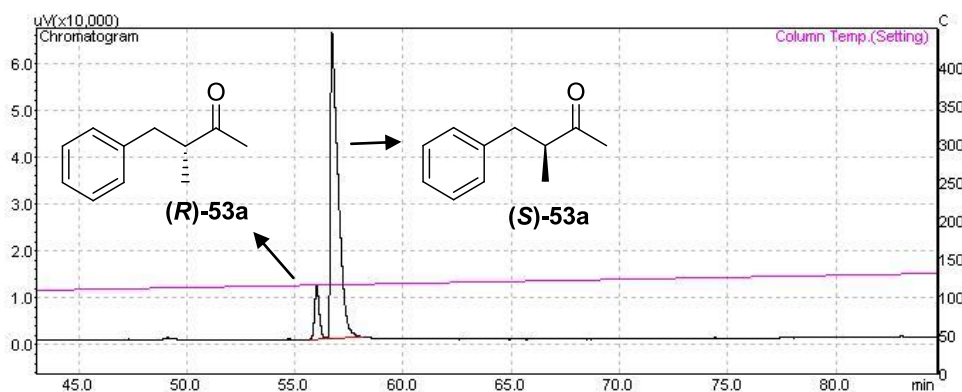
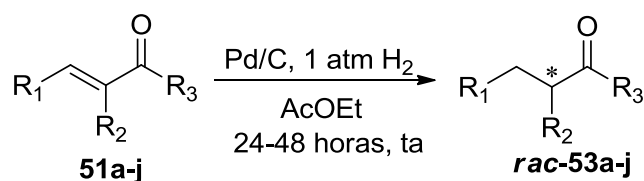


Figura 13. Cromatograma de CG-FID-quiral dos enantiômeros obtidos nas biorreduções do substrato **51a**.

3.2.1. Preparação dos padrões por meio de redução química

Os compostos carbonílicos α -alquil substituídos racêmicos, que foram utilizados como padrões nas análises de CG-FID-quiral e CG-EM, foram preparados por meio de redução química das olefinas ativadas utilizando Pd/C (10%), 1 atm de H₂ e acetato de etila (Esquema 15) (CLOSOSKI et al., 2007). Comparou-se os tempos de retenção e sobrepondo os cromatogramas das misturas racêmicas obtidas na hidrogenação química com o dos compostos carbonílicos α -alquil substituídos produzidos nas reações de biorredução, como no exemplo da Figura 14, pode-se verificar a preferência pelo enantiômero *S* com o uso de biocatalisador.



Esquema 15. Esquema geral da redução química das olefinas ativadas.

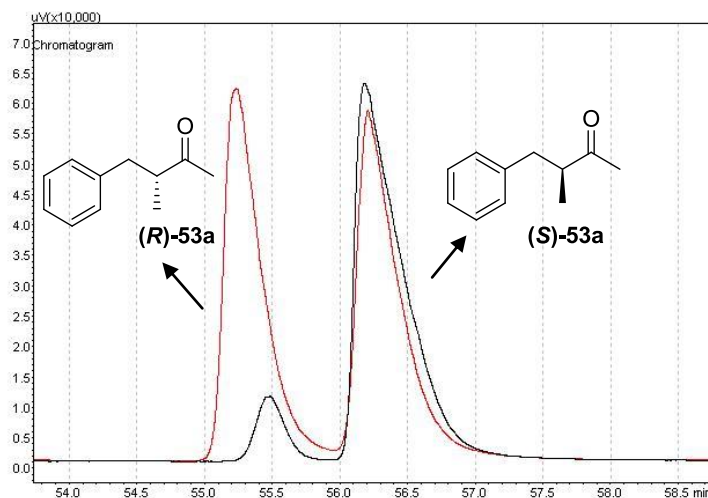


Figura 14. Sobreposição dos cromatogramas de CG-FID-quiral dos enantiômeros (*S*)- e (*R*)-**53a** obtidos nas biorreduções (preto) e o padrão racêmico *rac-53a* (vermelho).

Após a síntese dos padrões racêmicos dos 11 compostos estudados, iniciou-se os testes para a otimização das condições reacionais.

3.2.2. Efeitos do meio reacional e de aditivos

Uma maneira de elevar a conversão e a estereosseletividade das reações biocatalíticas é por meio da modificação das condições experimentais, como, por exemplo, a composição do meio e a presença de aditivos. Dessa forma, a fim de verificar os efeitos do meio reacional, as reações de biorredução do substrato **51a** foram realizadas explorando algumas variáveis como sistema aquoso, bifásico e tamponante, na presença e ausência de aditivos como glicose e catalisador de transferência de fase (brometo de etil hexadecil dimetilamônio e brometo de *N*-cetil *N,N,N*-trimetil amônio) mediadas pela levedura *Saccharomyces cerevisiae* Tipo II da Sigma Aldrich (LSC-II).

Para o monitoramento, foram retiradas alíquotas periodicamente e apesar do aumento da conversão ter sido observado ao longo da reação em todos os meios biocatalíticos, não houve alterações significativas no excesso enantiomérico. Portanto, os resultados obtidos em 24 horas de reação são demonstrados na Tabela 10. Observa-se que as conversões, assim como os *ee*, foram dependentes do meio reacional.

Tabela 10. Influência do meio reacional e da adição de aditivos na biorredução do substrato **51a** mediada pela LSC-II.

Entrada	Meio reacional	Conversão ^a (<i>ee</i>)% ^b
1	Água (50 mL)	> 99 (71)
2	Água e glicose (50 mL)	> 99 (69)
3	Água (25 mL)	14 (62)
4	Água (25 mL)/ <i>n</i> -heptano (25 mL)	11 (71)
5	Água (25 mL)/ hexano (25 mL)	15 (71)
6	Água (25 mL)/ MTBE (25 mL)	< 1 ^c
7	Água e brometo de etil hexadecil dimetilamônio (25 mL)/ <i>n</i> -heptano (25 mL)	< 2 ^c
8	Água e brometo de <i>N</i> -cetil <i>N,N,N</i> -trimetil amônio (25 mL)/ <i>n</i> -heptano (25 mL)	< 2 ^c
9	Tampão pH 6,5 (50 mL)	61 (65)
10	Tampão pH 6,5 (25 mL)/ hexano (25 mL)	13 (73)
11	Tampão pH 6,5 (25 mL)/ <i>n</i> -heptano (25 mL)	16 (73)
12	Tampão pH 6,5 (25 mL)/ MTBE (25 mL)	3 ^c
13	Tampão pH 4,5 (50 mL)	85 (69)
14	Tampão pH 7 (50 mL)	49 (64)
15	Tampão pH 7,5 (50 mL)	49 (63)

Condições: 1 g de LSC-II, 0,4 mmol do substrato, 24 horas, agitação de 130 rpm, 30 °C.

^a Determinada por CG-EM.

^b Determinada por CG-FID-quiral.

^c Não foi possível determinar o *ee*.

Uma grande quantidade de moléculas orgânicas de interesse sintético, potencialmente aptas ao processo de biotransformação, são insolúveis em água, podem exibir efeitos tóxicos e inibir a atividade catalítica do micro-organismo. Para amenizar essas limitações, os sistemas bifásicos de solventes têm sido utilizados como método alternativo. Os sistemas bifásicos são constituídos por uma fase aquosa, que contém o biocatalisador dissolvido e os cofatores hidrofílicos e uma fase orgânica, que age como um reservatório para os substratos e produtos. Como nesses sistemas a reação ocorre na fase aquosa, é necessário que haja uma transferência de massa do substrato para o produto a partir do biocatalisador e entre as duas fases, a qual é dependente de uma agitação constante para que as duas fases entrem em contato e haja a partição do substrato e posteriormente do produto. As vantagens da utilização dos sistemas bifásico são: baixa concentração de compostos tóxicos e/ou inibitórios na fase aquosa, aumento da solubilidade dos substratos apolares, remoção *in situ* do produto e facilidade de recuperação do produto e do biocatalisador (FABER, 2011; LEÓN et al., 1998; LI et al., 2007; MONTI et al., 2011; SCHAEFER et al. 2013).

A capacidade de dissolução do substrato, a biocompatibilidade, a alta estabilidade química e térmica, o menor custo e a baixa tendência em formar emulsões com a água são características importantes na escolha e implementação de um eficiente sistema de bioconversão bifásico. A classificação do solvente orgânico está relacionada com a sua biocompatibilidade, ou seja, a manutenção da estabilidade e atividade do biocatalisador; como também com a sua hidrofobicidade e é expressa, principalmente, pelo $\log P$ que é definido como logaritmo do coeficiente de partição do solvente no sistema octanol/água (FABER, 2011; LAANE et al. 1987; LEÓN et al., 1998; MONTI et al., 2011; SCHAEFER et al., 2013).

Muitos estudos foram feitos para tentar correlacionar o valor de $\log P$ e a atividade do biocatalisador (LEÓN et al., 1998; VERMUE et al., 1993). De forma geral, Laane et al. (1987) reportaram que os solventes orgânicos com $\log P < 2$ são polares e não adequados para a ação biocatalítica, pois eles alteram a interação entre a água e o biocatalisador, levando-o a inativação ou desnaturação; solventes com $\log P$ entre 2 e 4 alteram moderadamente a camada de água e, assim, não afetam significativamente a catálise enzimática; já os solventes apolares, com valores de $\log P > 4$, não distorcem essa camada que é essencial para hidratar, estabilizar e manter o biocatalisador em seu estado catalítico ativo. Os resultados obtidos, em geral, estão de acordo com a literatura (LAANE et al. 1987; LI et al., 2007; LOU et al., 2004; SILVA; STAMBUK; NASCIMENTO, 2010), os quais demonstraram que a reação nos sistemas bifásicos foi dependente do solvente orgânico. Os solventes com $\log P$ acima de 3 (hexano $\log P = 3,5$ e heptano $\log P = 4$), ou seja, aqueles menos polares (Entrada 4, 5, 10 e

11), apresentaram maiores conversões. Usando o éter *terc*-butil metílico (MTBE) que é mais polar (Entrada 6 e 12), com $\log P = 0,94$ (HANSCH; LEO; HOEKMAN, 1995), o produto praticamente não foi formado (conversões de 1% e 3%). Provavelmente, a baixa conversão de **51a** com os solventes mais polares deve-se ao fato das membranas celulares serem facilmente destruídas pelo solvente orgânico com baixo valor de $\log P$, pois estes deformam a camada de água que envolve o biocatalisador e, por serem parcialmente miscíveis, formam emulsão com a água, limitando a ação do micro-organismo (FABER, 2011; LAANE et al. 1987; LEÓN et al., 1998; LI et al., 2007; SILVA; STAMBUK; NASCIMENTO, 2010).

A água é o solvente natural de escolha e o mais comumente utilizado para as reduções com células íntegras de micro-organismos (HOLLMANN; ARENDS; HOLTSMANN, 2011; SILVA; STAMBUK; NASCIMENTO, 2010). Além de causar menos danos ao ambiente, ela é necessária para manter a conformação ativa das enzimas (DUNN, 2012; FABER, 2011; WOODLEY, 2008). Por outro lado, os solventes orgânicos podem apresentar efeitos tóxicos na atividade e estabilidade do biocatalisador, ou seja, eles podem ser incorporados na membrana lipídica das células íntegras provocando alteração na sua integridade, rompimento da sua função de membrana, inativação ou desnaturação das enzimas ligadas à membrana, desarranjo no mecanismo de transporte e, em altas concentrações, pode levar a ruptura celular (KHMELNITSKY et al., 1991; LEÓN et al., 1998; SIKKEMA et al. 1994; VERMUE et al., 1993). Nesse estudo, o meio aquoso monofásico (Entrada 1 e 2) apresentou os resultados mais satisfatórios. Dessa forma, este foi o escolhido para a continuidade dos experimentos.

Observou-se também que quando o volume da fase aquosa foi reduzido de 50 mL para 25 mL (Entrada 3), isto é, quando aumentou-se a concentração tanto da levedura quanto do substrato, ocorreu uma diminuição da conversão e do *ee* (CONCEIÇÃO; MORAN; RODRIGUES, 2003; SILVA; STAMBUK; NASCIMENTO, 2012; YANG; YAO; GUAN, 2005). Tal fato pode ser associado ao efeito inibitório da concentração do substrato e do produto sobre o biocatalisador (LI et al., 2007; ROFFLER; BLANCH; WILKE, 1984; SCHAEFER et al., 2013).

Os catalisadores de transferência de fase (CTF) são agentes transferidores capazes de acelerar a reação entre compostos que estão dissolvidas em fases imiscíveis (LUCHESE; MARZORATI, 2000). A função dos CTF é formar um par iônico com as espécies químicas presentes na fase aquosa e transferi-las para o solvente orgânico, no qual, por estarem praticamente livres, ou seja, não solvatadas devido a ausência de água, são altamente reativas e reagem com o material de partida que encontra-se na solução (LANG; COMASSETO, 1988; LUCHESE; MARZORATI, 2000). Dessa forma, os CTF aumentam a velocidade da

reação entre os substratos insolúveis em água e que encontram-se no solvente orgânico e o reagente iônico presente na fase aquosa (LANG; COMASSETO, 1988; LUCCHESI; MARZORATI, 2000). No entanto, apesar do sistema bifásico biocatalítico com CTF ser uma técnica inovadora, os resultados obtidos não foram satisfatórios (Entrada 7 e 8) e obteve-se baixas conversões, indicando a ineficiência desse sistema nas condições estabelecidas.

O pH do meio reacional é um outro fator importante nas reações catalisadas por enzimas isoladas ou células íntegras de micro-organismos. Cada enzima apresenta um pH ótimo, no qual sua atividade catalítica é máxima (SILVA; STAMBUK; NASCIMENTO, 2010; SCHAEFER et al., 2013). Alterações do pH podem modificar o estado de ionização do substrato e das enzimas que participam da reação, levando-o a desnaturação e, como consequência, a diminuição ou perda da atividade catalítica, bem como alteração no rendimento e na pureza enantiomérica da reação (BHALERAO et al., 1993; FADNAVIS; VADIVEL; BHALERAO, 1997; LI et al., 2007; LOU et al., 2004; SILVA; STAMBUK; NASCIMENTO, 2012). Assim, investigou-se o efeito do pH na biorredução de **51a**. Para isso, quatro diferentes sistemas de tampão fosfato na concentração de 0,1 mol/L foram utilizados: pH 4,5, 6,5, 7 e 7,5. Pode-se observar que nos pH 7 e pH 7,5 (Entrada 14 e 15), a conversão foi moderada de 49%. Já no pH 4,5, mais ácido, e no pH 6,5 que é ligeiramente ácido (Entrada 13 e 9), a conversão foi de 85% e 61%, respectivamente, um pouco melhor do que nos sistemas tamponantes mais básicos, o que pode indicar que a atividade enzimática é mais efetiva em meios acidificados. Os valores do *ee* variaram de 63% a 69% em função da mudança do pH do sistema tamponante. Dessa maneira, como a utilização do meio tamponante não alterou positivamente a conversão e o *ee* da biorredução de **51a**, o meio aquoso continuou sendo utilizado nos estudos subsequentes.

Por fim, é conhecido na literatura que a glicose pode funcionar como substrato auxiliar, ou seja, doador de elétrons para a reciclagem do cofator (ZHANG; PIONNIER, 2003). No entanto, na ausência de cosubstrato, o micro-organismo dispõe dos doadores de elétrons estocados em suas células e da água (CHU et al. 2006; ZHANG et al., 2001). Diante disso, observou-se semelhantes conversões e excessos enantioméricos nos meios reacionais monofásicos aquosos na ausência e na presença de glicose (Entrada 1 e 2). Tais meios demonstraram os melhores resultados e foram selecionados para a continuidade dos experimentos.

3.2.3. Efeito do uso de *Saccharomyces cerevisiae* de diferentes origens

Nos últimos anos, intensificou-se a exploração da levedura *Saccharomyces cerevisiae* como biocatalisador em síntese assimétrica e como já descrito, há inúmeras vantagens na utilização desses micro-organismos (PEREIRA, 1995a; RODRIGUES; MORAN 2001; SCHAEFER, 2013; SERVI, 1990).

Nesse contexto, realizou-se a triagem de cinco diferentes linhagens de *S. cerevisiae* comerciais encontradas em empresas especializadas em reagentes químicos (LSC-II Sigma Aldrich) ou em supermercados (marcas Dona Benta, Fleishmann, Dr. Oetker), e uma linhagem utilizada para a produção industrial de etanol e açúcar (Cocal)¹. Os resultados estão apresentados na Tabela 11.

Tabela 11. Biorredução de **51a** em meio aquoso monofásico com diferentes linhagens de leveduras de *S. cerevisiae*.

Entrada	Linhagem de <i>S. cerevisiae</i>	Meio reacional	Conversão ^a (<i>ee</i>)% ^b
1	LSC-II Sigma Aldrich	Água	> 99 (71)
2	LSC-II Sigma Aldrich	Água e glicose	> 99 (69)
3	Dona Benta	Água	85 (67)
4	Dona Benta	Água e glicose	63 (63)
5	Fleischmann fresco	Água	1 ^c
6	Fleischmann fresco	Água e glicose	12 (61)
7	Fleischmann seco	Água	12 (65)
8	Fleischmann seco	Água e glicose	16 (65)
9	Dr. Oetker	Água	37 (64)
10	Dr. Oetker	Água e glicose	15 (68)
11	Cocal	Água	1 ^c
12	Cocal	Água e glicose	3 ^c

Condições: 1 g de micro-organismo, 50 mL de água, 0,4 mmol do substrato, 24 h, agitação de 130 rpm, 30°C.

^a Determinada por CG-EM.

^b Determinada por CG-FID-quiral.

^c Não foi possível determinar o *ee*.

Em geral, as leveduras utilizadas, exceto o caldo fermentativo Cocal e o fermento de pão da marca Fleischmann (fresco e em meio aquoso sem glicose), apresentaram a capacidade de conduzir a biorredução do substrato **51a**, sendo que algumas foram mais eficientes

¹Caldo biológico das linhagens industriais CAT-1 e PE-2 de *S. cerevisiae* que encontrava-se no processo de fermentação para a produção de etanol e açúcar, cedidas, gentilmente, pela Usina Cocal, produtora de açúcar, etanol e energia elétrica, localizada em Paraguaçu Paulista.

(Entrada 1 a 4). Pode-se verificar que as melhores conversões e *ee* foram obtidos utilizando as linhagens de LSC-II Sigma Aldrich (Entrada 1 e 2).

A diferença nas conversões e enantiosseletividades pode ser consequência do uso de diferentes linhagens de *S. cerevisiae*, já que as indústrias produtoras utilizam suas linhagens específicas, as quais apresentam características morfológicas singulares e produzem distintas quantidades de NAD(P)H, assim, os rendimentos, que estão relacionados à produção de NAD(P)H, bem como os *ee* podem sofrer variação de uma linhagem para outra (PEREIRA, 1995a, 1995b; WEIJERS; LITJENS; BONT, 1992).

Como o propósito do estudo era obter o produto **53a** com boas conversões e excelente *ee*, baseado nesses resultados, a LSC-II Sigma Aldrich foi selecionada para ser utilizada nos experimentos subsequentes. Adicionalmente, o meio reacional aquoso, na presença e na ausência de glicose, demonstraram resultados semelhantes, portanto, optou-se por aquele que utilizasse a menor quantidade de reagentes e tivesse menores custos, ou seja, as condições reacionais da Entrada 1, para dar continuidade aos estudos.

3.2.4. Efeito do uso de diferentes leveduras

Afim de comparar e verificar o potencial de redução das enzimas presentes em diferentes micro-organismos, utilizou-se a levedura *Pichia kluyveri*² (Figura 15) em meio aquoso (Tabela 12), na forma de biomassa úmida (2g e 3g) e com diferentes volumes do caldo fermentativo.

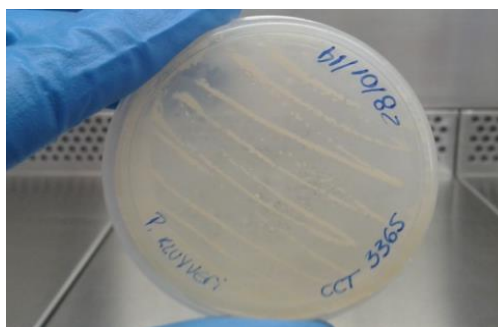


Figura 15. Levedura *Pichia kluyveri* em meio YMA.

A baixa conversão e excessos enantioméricos observados podem ser relacionados com a possível presença de enzimas com divergentes preferências estereoquímica que competem

² Cedidas gentilmente pelo Prof. José Augusto Rosário Rodrigues do Laboratório de Biocatálise e Síntese Orgânica da UNICAMP.

entre si pelo substrato nesse biocatalisador (FABBER, 2011; HOLLMANN, ARENDS, HOLTMANN, 2011; NAKAMURA et al., 1991; SHIEH, W.; GOPALAN, A. S.; SIH, 1985; YANG; YAO; GUAN, 2005). Os resultados indicaram menores conversões e *ee* quando comparados ao sistema aquoso monofásico utilizando linhagens de LSC-II (conversão > 99% e 71% de *ee*). Dessa forma, selecionou-se a LSC-II para os próximos experimentos.

Tabela 12. Influência do uso de diferentes meios reacionais na biorredução de **51a** com *Pichia kluyveri*.

Entrada	Meio reacional	Conversão ^a (<i>ee</i>) ^b
1	50 mL (caldo fermentativo)	1 ^c
2	100 mL (caldo fermentativo)	21 (42)
3	200 mL (caldo fermentativo)	79 (39)
4	2 g (biomassa úmida)*	5 (44)
5	3 g (biomassa úmida)*	8 (44)

Condições: 0,4 mmol do substrato, 24 h, agitação de 130 rpm, 30 °C.

*50 mL de água

^a Determinada por CG-EM.

^b Determinada por CG-FID-quiral.

^c Não foi possível determinar o *ee*.

3.2.5. Efeito do uso de resina adsorvente

Como já exemplificado e discutido na introdução, de um modo geral, de acordo com dados da literatura (ARRIGO et al.; 1997; ARRIGO et al.; 1998; NAKAMURA et al., 1995; YANG; YAO; GUAN, 2005), células íntegras de micro-organismos apresentam um sistema multienzimático complexo e quando usadas como biocatalisador, o principal problema apresentado é a seletividade. A existência de diversas enzimas em suas células com diferentes cinéticas e seletividades resulta em baixa estereosseletividade, pois elas podem catalisar a síntese, ao mesmo tempo, de compostos com configuração oposta. Dessa maneira, para alcançar alto *ee*, é necessário diminuir a concentração do substrato. Nesses casos, a enzima com valor de K_m mais baixo será a principal responsável pela catálise. Assim, a estereosseletividade da reação é fortemente influenciada pela quantidade de substrato na fase aquosa.

Nesse contexto, a resina adsorvente Amberlite XAD-7 foi empregada visando contornar essas limitações e melhorar a enantioseletividade dos produtos biorreduzidos. Optou-se pelo uso dessa resina, pois na literatura há diversos trabalhos que relatam sucesso em reações de biorredução empregando-a (CONCEIÇÃO; MORAN; RODRIGUES, 2003a; CONCEIÇÃO;

MORAN; RODRIGUES, 2003b; NAKAMURA; FUJII; IDA, 2000; NAKAMURA et al., 2002).

Inicialmente, foram feitos estudos sobre a influência da quantidade da resina na conversão e *ee* da biorredução assimétrica do substrato **51a**. Para isso, utilizou-se 1 g de LSC-II, 50 mL de meio aquoso e a reação foi mantida sob agitação rotativa de 130 rpm por 24 horas. Os resultados estão apresentados no gráfico da Figura 16. A conversão foi determinada por CG-EM e o *ee* por CG-FID-quiral.

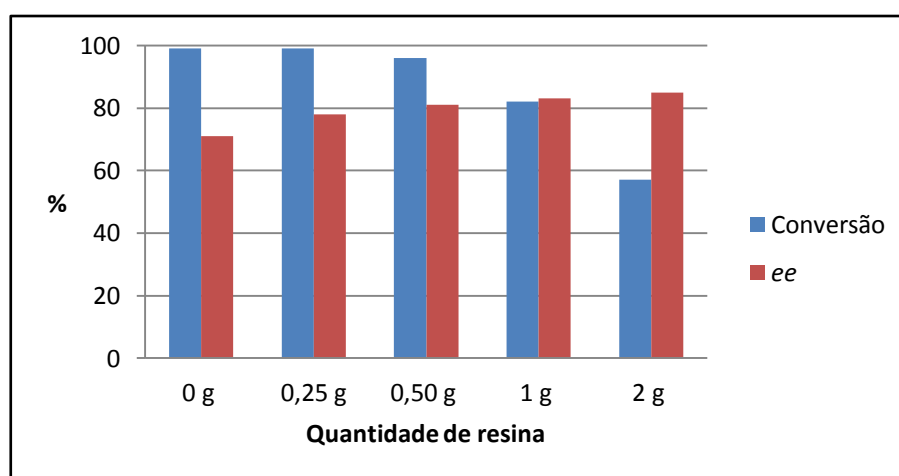


Figura 16. Gráfico da biorredução de **51a** em meio aquoso com diferentes quantidades de resina mediada pela LSC-II.

Pode-se observar que houve um aumento do *ee* com o aumento da quantidade de resina. Dessa forma, como a resina não tem interferência em outros fatores reacionais, o aumento do *ee* observado pode ser atribuído à diminuição da quantidade de material de partida na fase aquosa (ARRIGO et al.; 1997; ARRIGO et al.; 1998; CONCEIÇÃO; MORAN; RODRIGUES, 2003a; CONCEIÇÃO; MORAN; RODRIGUES, 2003b; NAKAMURA et al., 1995; YANG; YAO; GUAN, 2005). Nesse sentido, a baixa concentração do substrato favoreceu a atividade das enzimas-pró-(S), as quais, provavelmente, possuem um menor valor de K_m (CONCEIÇÃO; MORAN; RODRIGUES, 2003a; KAWAI et al., 1996; NAKAMURA et al., 2002; YANG; YAO; GUAN, 2005).

No entanto, a partir de 0,5 g verificou-se que, praticamente, houve uma estabilização no *ee* e uma diminuição significativa da conversão. Já era esperado que o período de incubação para o consumo total do substrato fosse maior na presença da resina (CONCEIÇÃO; MORAN; RODRIGUES, 2003a; YANG; YAO; GUAN, 2005). Entretanto, como o propósito do estudo era melhorar a estereosseletividade da reação sem comprometer intensamente a

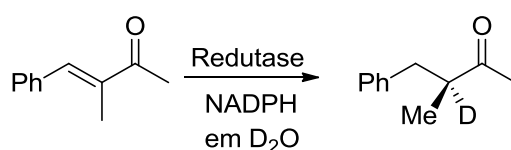
Verificou-se que a proporção de liberação pela resina XAD-7 do substrato **51a** foi baixa e em contrapartida, a taxa de adsorção do produto *rac*-**53a** foi alta, o que era desejado. Assim, foi possível concluir que essa resina é adequada e compatível ao substrato utilizado e tem uma excelente capacidade em alcançar o equilíbrio de adsorção bem como controlar a concentração do substrato e do produto na fase aquosa. Tal fato evita o acúmulo desses compostos no meio de biorredução e na superfície celular, o que pode ser tóxico ao micro-organismo, e também é essencial para melhorar a estereosseletividade das reações de redução assimétrica.

3.2.6. Efeito estérico e eletrônico dos substituintes

Após a otimização das condições reacionais, concluiu-se que o sistema aquoso sem aditivos (50 mL), utilizando como biocatalisador a LSC-II (1 g) e com o substrato adsorvido em 0,5 g de resina Amberlite XAD-7, foi aquele que apresentou os resultados mais satisfatórios e adequados ao propósito desse trabalho. Assim, os demais substratos foram submetidos à essas condições biocatalíticas.

Nessa etapa, analisou-se os efeitos do substituinte no β -aril, o alongamento do α -substituinte e a adição de um grupamento éster nas olefinas ativadas. Os resultados estão demonstrados na Tabela 14.

Inicialmente, afim de interpretar e entender os resultados, buscou-se o mecanismo catalítico da redução da ligação dupla pela ene redutase. Esse mecanismo está bem documentado na literatura. Em 1998, Kawai e colaboradores submeteram o substrato 4-fenil-3-metil-3-buten-2-ona à redução enzimática em D₂O (Esquema 16). Através do espectro de RMN de ¹H do produto, foi possível observar que a molécula possuía um deutério na posição α . Consequentemente, o hidrogênio incorporado na posição β era derivado do NADPH e aquele da posição α era proveniente da água ou de algum resíduo de aminoácido. A partir desses resultados, foi possível propor o arranjo dos grupos catalíticos no sítio ativo da enzima como demonstrado na Figura 17 (KAWAI et al., 1998).



Esquema 16. Biorredução do composto 4-fenil-3-metil-3-buten-2-ona. Fonte: Adaptada de KAWAI et al., 1998.

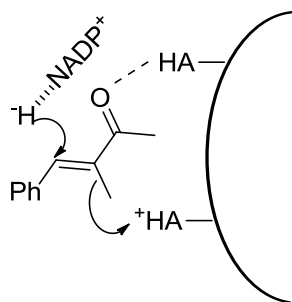
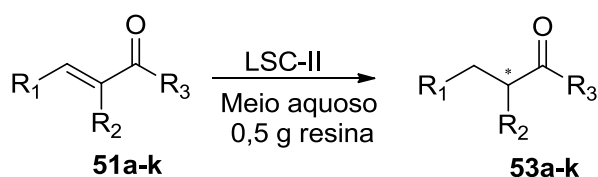


Figura 17. Arranjo dos grupos catalíticos na ene redutase. Fonte: Adaptada de KAWAI et al., 1998.

Tabela 14. Redução assimétrica de **51** em meio aquoso com a LSC-II e 0,5 g de resina.



Produto 53	R ₁	R ₂	R ₃	Tempo (h)	Conv. ^a	Rendimento (%)	([α] _D ^T)	Configuração absoluta (ee%) ^c
a	Ph	CH ₃ -	CH ₃ -	27	>99	42	+33,7 ^b	S ^d (81)
b	2-Py	CH ₃ -	CH ₃ -	8	>99	57	+12,9 ^b	S ^d (81)
c	4-Cl-Ph	CH ₃ -	CH ₃ -	72	>99	55	+25,1 ^b	S ^d (89)
d	3-Cl-Ph	CH ₃ -	CH ₃ -	30	>99	54	+20,2 ^b	S ^d (93)
e	2-Cl-Ph	CH ₃ -	CH ₃ -	48	>99	52	+46,0 ^b	S ^d (96)
f	4-MeO-Ph	CH ₃ -	CH ₃ -	48	>99	54	+30,4 ^b	S ^d (76)
g	4-F-Ph	CH ₃ -	CH ₃ -	24	>99	39	+24,1 ^{b,t}	S ^g (85)
h	4-Br-Ph	CH ₃ -	CH ₃ -	48	>99	67	+16,7 ^{b,t}	S ^g (83)
i	2-Br-Ph	CH ₃ -	CH ₃ -	168*	96	57	+35,4 ^{b,t}	S ^g (92)
j	Ph	CH ₃ -CH ₂ -	CH ₃ -	168*	98	20	+26,4 ^c	S ^d (98)
k	Ph	CH ₃ -	CH ₃ -CH ₂ -O-	168	NR	NR	--	--

Condições: 1 g de micro-organismo, 50 mL água, 0,4 mmol do substrato, agitação de 130 rpm, 30 °C.

^a Determinada por CG-EM.

^b c 1, CHCl₃.

^c c 0,7, CHCl₃.

^d Determinada por comparação do [α]_D^T dos produtos com dados da literatura (LU; BOLM, 2008).

^e Determinada por CG-FID-quiral.

^f Não foram encontrados dados da literatura.

^g Inferido a partir do espectro de DC

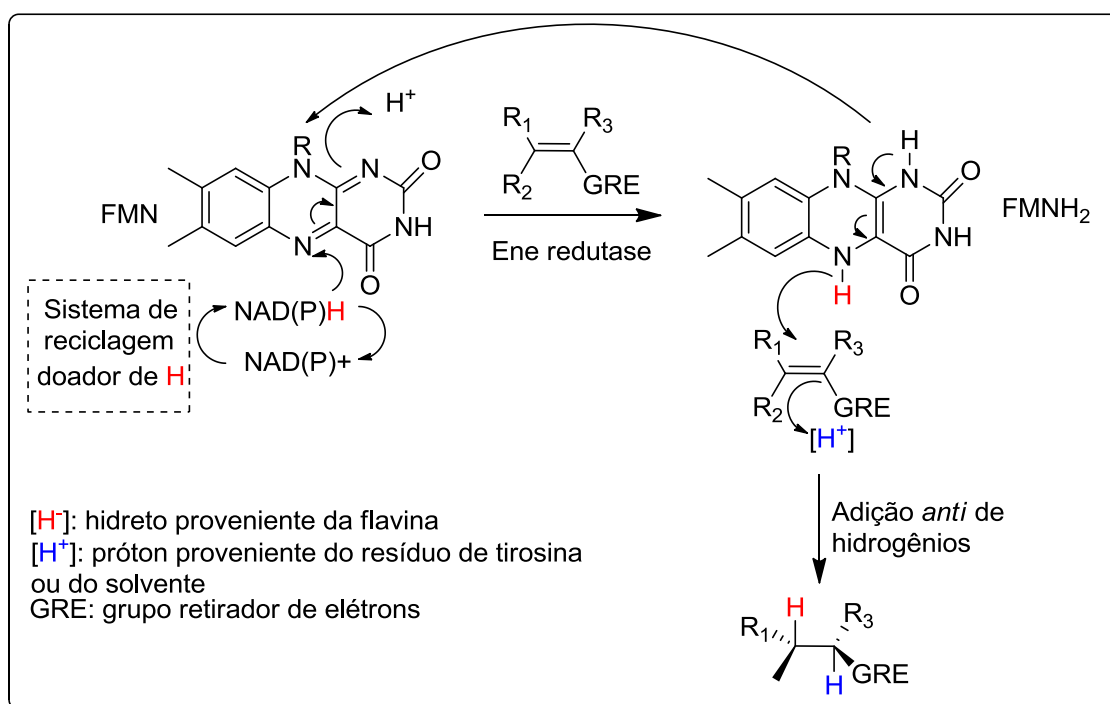
NR = não reagiu.

Conv. = conversão

T = 23 a 27 °C.

* Após 3 dias de reação, adicionou-se mais 1 g da LSC-II.

Portanto, pode-se dizer que a adição de $[H_2]$ na ligação dupla $C=C$, ativada por GRE, por meio da ene redutase assemelha-se a adição de Michael. Para serem ativas, as ene redutases requerem a presença do FMN e do NAD(P)H. No mecanismo mais detalhado ilustrado no Esquema 17, observa-se que ocorre três reações de redução. Primeiramente, o hidreto do NAD(P)H é transferido para o FMN, que está ligado à enzima. Assim, o FMN é reduzido a $FMNH_2$ e o NAD(P)H é oxidado à $NAD(P)^+$. Posteriormente, o FMN transfere o hidreto para o carbono β do substrato e o carbono α retira o segundo hidreto do meio (resíduo de tirosina ou água) (BRENNA et al., 2013; HALL et al., 2006; HALL; BOMMARIUS, 2011; STUERMER et al. 2007; WINKLER et al., 2012). Para a regeneração da forma reduzida do cofator, os micro-organismos podem usar a água ou os hidrogênios encontrados em substâncias presentes nas suas células (ZHANG; PIONNIER, 2003). Ocorre, assim, uma adição *anti* de hidrogênios na ligação dupla (FABER, 2011; KAWAI et al., 1996)



Esquema 17. Mecanismo catalítico da redução assimétrica pela ene redutase. Fonte: Adaptado de HALL et al., 2006; WINKLER et al., 2012.

Segundo dados da literatura (KAWAI et al., 1996; KAWAI; HAYASHI; TOKITOH, 2001), o caminho estereoquímico da redução enzimática da ligação dupla $C=C$ procede através da adição *anti* de hidrogênios mesmo quando a redução é acompanhada pela baixa estereosseletividade, a qual pode estar relacionada com a posição do substrato no sítio ativo da enzima e não com a estereoquímica da hidrogenação. Dessa forma, observando as

conversões e *ee* dos produtos **53a** e **53j**, pode-se verificar que apesar da conversão ter diminuído, o alongamento do grupo α -alquil (R_2) melhorou significativamente a estereosseletividade das reações que foi de 81% e 98%, respectivamente. Tal fato pode ser devido ao posicionamento do substrato no sítio ativo da enzima ocorrer de forma mais adequada na presença do grupo α -etila, já que o seu efeito estérico é maior, assim como a possibilidade de mais interações envolvidas no reconhecimento molecular pelo sítio ativo da enzima do que com o grupo metila (BRENNAN et al., 2013; KAWAI; HAYASHI; TOKITOH, 2001). Portanto, o composto carbonílico α,β -insaturado só é reduzido com alta seletividade se ele estiver encaixado adequadamente no sítio ativo.

No entanto, quando adicionou-se um grupamento éster, não foi possível observar a formação do produto, o que indica que a enzima é sensível ao efeito estérico na cadeia adjacente ao grupamento carbonílico (R_3) (BRENNAN et al., 2013). Adicionalmente, pode ser que na presença do grupamento éster (**53k**) o substrato permaneça menos ativado (FABER, 2011; TOOGOOD; SCRUTTON, 2014) fazendo com que ele não alcance a conformação ideal para se acomodar no sítio ativo da enzima e, conseqüentemente, a biorredução da ligação dupla torna-se menos susceptível. Os grupos funcionais catalíticos devem estar estrategicamente alinhados para que haja a atividade enzimática e assim, a quebra e a formação de ligações. Em outras palavras, caso o sítio ativo de uma enzima forme diversas interações com determinado substrato no estado de transição como consequência do posicionamento dos grupamentos funcionais, o biocatalisador não terá mais a capacidade de catalisar nenhum outro composto que não possuir essas mesmas funcionalizações especificamente e com a mesma veemência. Além disso, se o substrato possuir uma funcionalidade adicional para a qual a enzima não apresentar um bolsão para acomodá-la ou um sítio de ligação, provavelmente, não ocorrerá a catálise e o substrato será excluído da enzima (NELSON; COX, 2011; SILVERMAN, 2002).

Observou-se também que a redução das olefinas ativadas que não apresentaram substituinte no anel (**53a**) ou as que apresentam-no na posição *para* (**53c**, **53f**, **53g** e **53h**), geraram o correspondente composto carbonílico α -metil substituído com boa enantiosseletividade. A introdução do substituinte em *meta* (**53d**) ou *orto* (**53e** e **53i**) melhorou o *ee*. A adição de um anel heterocíclico (**53b**) no β -substituinte não ocasionou melhora na estereosseletividade. Esses resultados demonstraram que a posição dos substituintes tem um importante papel na estereodiscriminação da enzima, complementaridade molecular do substrato com o sítio receptor e estereosseletividade na

biorredução da ligação dupla (BRENNAN et al., 2013; KAWAI et al., 1995; KAWAI et al., 1996; KAWAI; HAYASHI; TOKITOH, 2001).

Apesar dos substratos **51i** e **51j** terem sido mantidos por mais de 7 dias no sistema biocatalítico (1 g de LSC-II, 50 mL água, 0,5 g de resina e 0,4 mmol do substrato), não observou-se o consumo total do substrato (sobraram 20% e 15% dos materiais de partida, respectivamente). Posteriormente, encontrou-se dificuldades na etapa de isolamento dos produtos. Diversas tentativas de purificação do composto **53j** foram realizadas alterando a polaridade da fase móvel bem como o tipo de fase estacionária:

- coluna de sílica flash, fase móvel: hexano e acetato de etila;
- coluna de sílica flash, fase móvel: *n*-heptano e acetato de etila;
- coluna de sílica flash, fase móvel: *n*-heptano e acetato de *n*-butila;
- coluna de sílica flash com AgNO₃ (3%), fase móvel: hexano e acetato de etila;
- cromatografia em camada delgada preparativa (CCDP), fase móvel: hexano e acetato de etila;
- coluna de sílica clássica, fase móvel: hexano e acetato de etila.

A coluna de sílica clássica com fase móvel hexano e acetato de etila apresentou os melhores resultados, todavia, ainda não foi suficiente para a purificação adequada. Dessa forma, associou-se a baixa conversão à viabilidade do micro-organismo e um novo teste foi feito adicionando mais 1 g do LSC-II após 3 dias de reação. Apesar da conversão ter sido maior sob essas condições, não foi possível alcançar o consumo total do substrato e obteve-se 96% de conversão para o composto **53i** e 98% para o composto **53j**. O produto **53i** foi purificado utilizando as condições descritas no primeiro item, já a purificação do **53j** foi feita de acordo com o último item.

As purificações dos demais produtos foram realizadas utilizando coluna de sílica flash e fase móvel hexano e acetato de etila. Todas as moléculas foram caracterizadas por CG-EM e RMN de ¹H e ¹³C. Os rendimentos isolados obtidos variaram de 20% a 67%. Calculou-se os *ee* por CG-FID-quiral e a confirmação da configuração absoluta, com exceção dos produtos **53g**, **53h** e **53i**, foi feita através da determinação da rotação óptica ($[\alpha]_D^T$) dos compostos obtidos e comparação com dados presentes na literatura (LU; BOLM, 2008). Para os produtos **53g**, **53h** e **53i**, que não estão reportados, experimentos de dicroísmo circular foram feitos e serão discutido a seguir. Dessa maneira, após esses experimentos, pode-se afirmar que os enantiômeros formados preferencialmente possuem a configuração absoluta *S*.

A título de exemplo, abaixo encontram-se o espectros de CG-EM (Figura 18) e RMN de ^1H e suas expansões (Figura 19) do produto de biorredução **53a**.

No Esquema 18 estão demonstradas as propostas de fragmentação para os principais picos da molécula **53a**. Observou-se a presença do íon molecular m/z 162 e também o sinal m/z 147 referente a perda de uma metila. Na sequência, o fragmento m/z 119 indica uma descarbonilação. O sinal m/z 91 (íon tropílio) confirma a presença de anel aromático. Por outro lado, o fragmento m/z 43 é resultante da formação íon acílio. Essas fragmentações estão de acordo com a estrutura do produto.

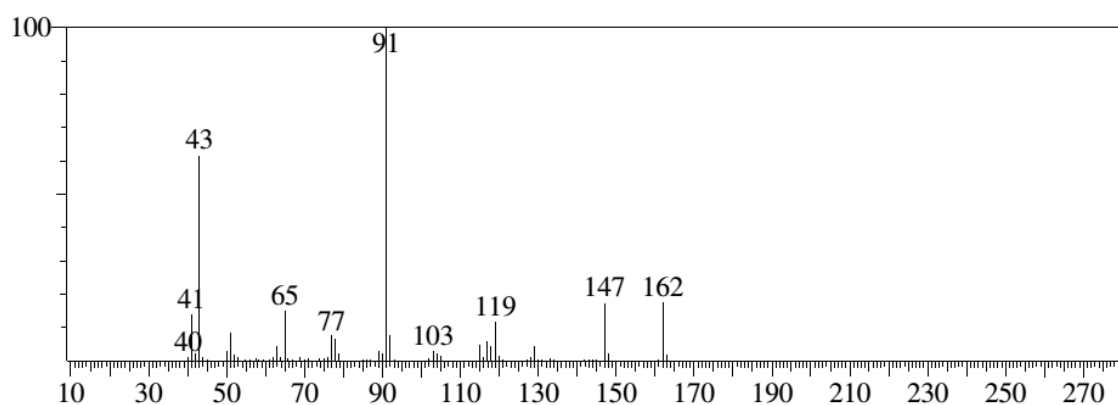
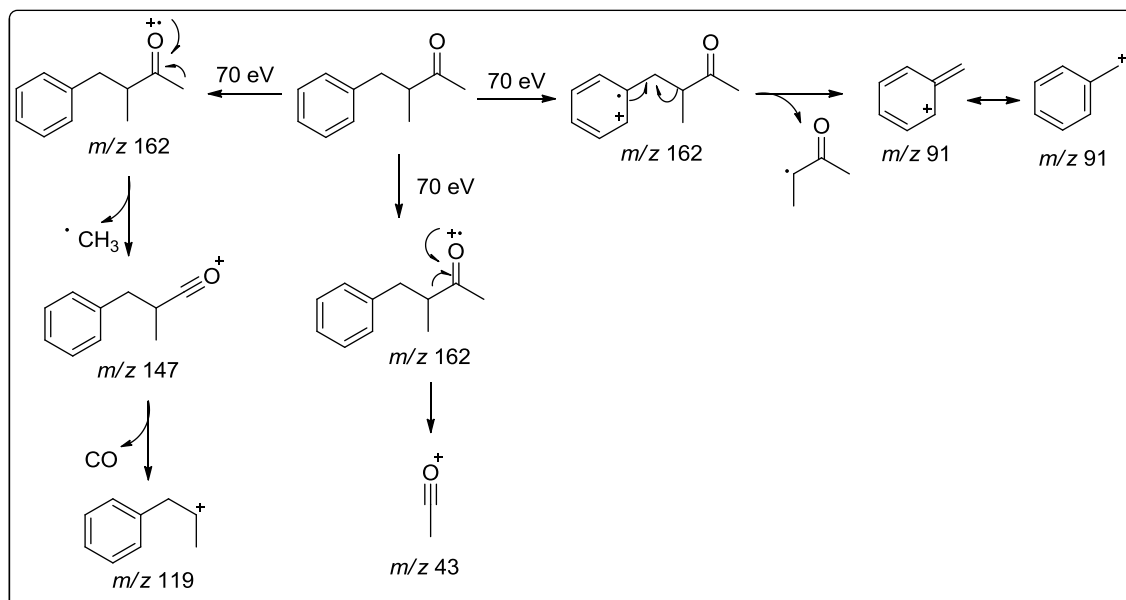


Figura 18. Espectro obtido no CG-EM do composto **53a**.



Esquema 18. Propostas de fragmentação do composto **53a** após ionização por impacto de elétrons (70 eV).

Pode-se observar, nos espectros de RMN de ^1H e em suas ampliações na Figura 19, um duplete com deslocamento químico em 1,10 ppm, com integração para 3 hidrogênios e

constante de acoplamento $J = 7,1$ Hz, indicando a presença dos hidrogênios do grupo metila (H-11). Em seguida, visualiza-se um simpleto com deslocamento químico em 2,10 ppm e integral 3, referente a presença de mais um grupo metila (H-1) um pouco mais desblindado devido a proximidade com a carbonila. Observa-se nos deslocamentos químicos de 2,58 ppm e 3,00 dois duplos dupletos com integração para 1 hidrogênio cada um, atribuídos aos hidrogênios metilênicos (H-4 e H-4') com $J = 13,5$ e 7,6 Hz e $J = 13,5$ e 6,8 Hz, a maior constante de acoplamento indica um acoplamento geminal. No deslocamento de 2,89-2,80 ppm, observa-se um multiplete integrando para 1 hidrogênio correspondente ao grupo CH (H-3). Por fim, na região de 7,31-7,15 ppm observa-se um multiplete com integral 5, característico dos hidrogênios aromáticos (H-6 a H-10).

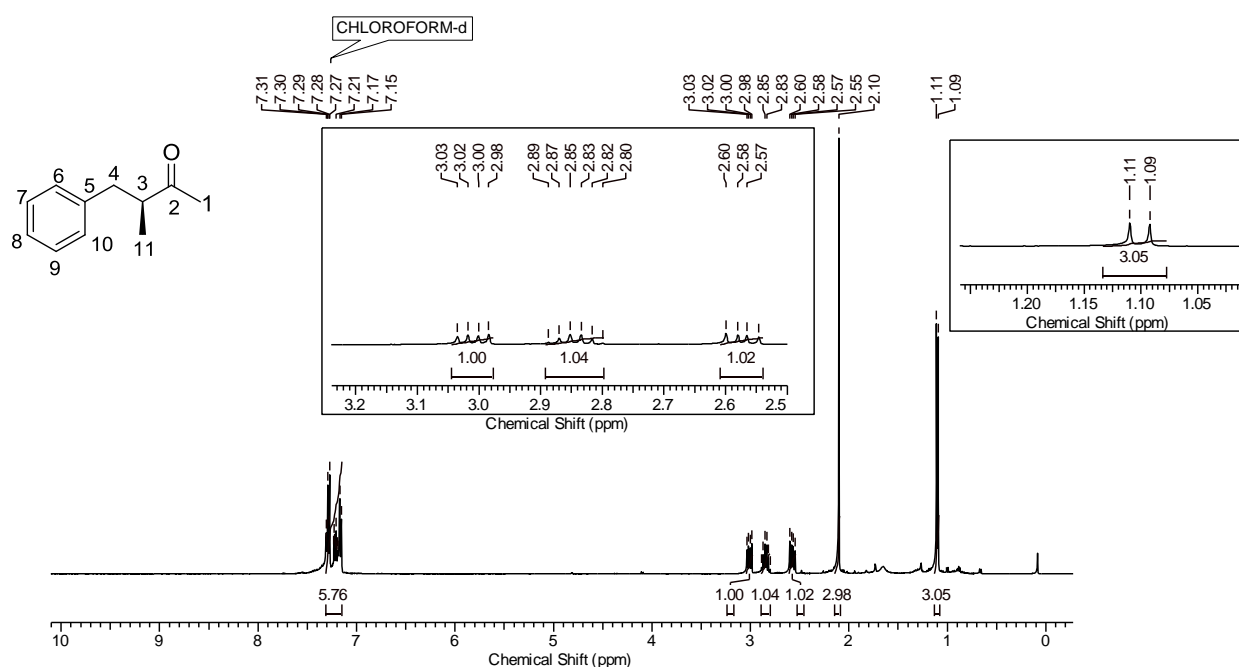


Figura 19. Espectro de RMN de ^1H do produto isolado **53a** (400 MHz, CDCl_3).

3.3. Determinação da configuração absoluta dos composto **53g**, **53h** e **53i**

Para a determinação da configuração absoluta dos produtos biorreduzidos, comparou-se os dados de rotação óptica ($[\alpha]_D^T$) obtidos com aqueles descritos na literatura. No entanto, para os compostos **53g**, **53h** e **53i** não foram encontrados dados publicados de rotação óptica e, assim, foi necessário buscar outras alternativas. Optou-se pela utilização da técnica de dicroísmo circular, pois, de acordo com a literatura, estas medidas são usadas para a determinação da configuração absoluta de cetonas alquílicas saturadas quando a conformação é conhecida ou para determinar a conformação quando a configuração absoluta é conhecida

(BEROVA; BARI; PESCIPELLI, 2007; BEROVA; NAKANISHI; WOODY, 2000; CRABBÉ, 1972; GORTHEY; VAIRAMANI; DJERASSI, 1984; MOFFITT et al., 1961; MISLOW et al., 1961). Dessa forma, essa técnica poderia ser efetiva para as análises dos compostos carbonílicos α -alquil substituídos obtidos por meio de reações de biocatálise, desde que não haja modificação no centro quiral, que é o caso deste trabalho.

Quando o feixe de luz polarizada passa através de uma substância opticamente ativa, ele é desviado para a direita ou para a esquerda com diferentes velocidades, concentrações ($c_L \neq c_D$) e comprimentos de ondas ($\lambda_L \neq \lambda_D$), e além disso, esses raios também são absorvidos com diferentes intensidades, o que gera absorvidade molar *levo* e *dextrorrotatório* distintas ($\Delta \epsilon_L \neq \Delta \epsilon_D$). Assim, o cálculo da diferença de intensidade de absorção da luz circularmente polarizada à esquerda e à direita (Equação 1) é denominado de *dicroísmo circular* (DC). O DC é considerado uma eficiente ferramenta para a análise estereoquímica, pois ele é sensível à configuração absoluta assim como às características conformacionais. Para a aplicação dessa técnica, é necessário que os compostos apresentem grupos cromóforos para a absorção na região do ultravioleta-visível (UV-visível) (BEROVA; BARI; PESCIPELLI, 2007; BEROVA; NAKANISHI; WOODY, 2000; CRABBÉ, 1972; LIMA, 1997). Além disso, deve ser feita uma analogia das propriedades ópticas obtidas com aquelas de um composto referência com configuração absoluta determinada que seja estruturalmente similar à molécula analisada, ou seja, apresente os mesmos substituintes ou similares no centro quiral (CRABBÉ, 1972; LIMA, 1997).

$$DC = \Delta A = A_L - A_D = (\epsilon_L - \epsilon_D) cl$$

$$\Delta \epsilon = \frac{1}{cl} \Delta A$$

$$\Delta \epsilon = \epsilon_L - \epsilon_D$$

A_L = Absorbância *levo*rotatória
 A_R = Absorbância *dextrorrotatória*
 c = concentração molar (mol/L)
 ϵ = absorvidade molar
 l = comprimento da cela de amostra (cm)

Equação 1. Diferença de absorção da luz polarizada *levo* e *dextrorrotatória*

Inicialmente, foram obtidos os espectros de absorção de luz UV-visível para os compostos **53g**, **53h** e **53i** (Figura 20) por meio do espectrofotômetro na faixa de comprimento de onda (λ) de 190 a 400 nm, a temperatura ambiente (aproximadamente 28 °C). Para correlação, analisou-se também mais dois produtos **53a** e **53c** (Figura 20) cuja configuração absoluta já havia sido determinada e estes foram utilizados como referência (Figura 21 e Tabela 15).

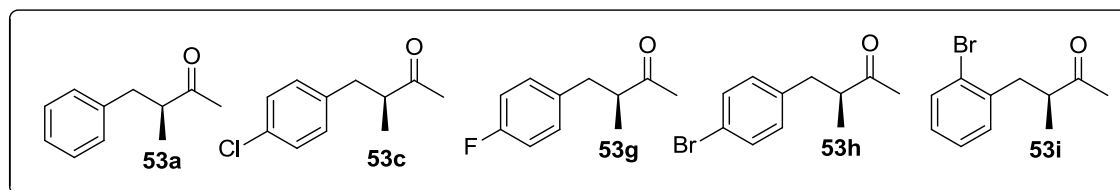


Figura 20. Compostos utilizados nas análises de UV-visível e DC.

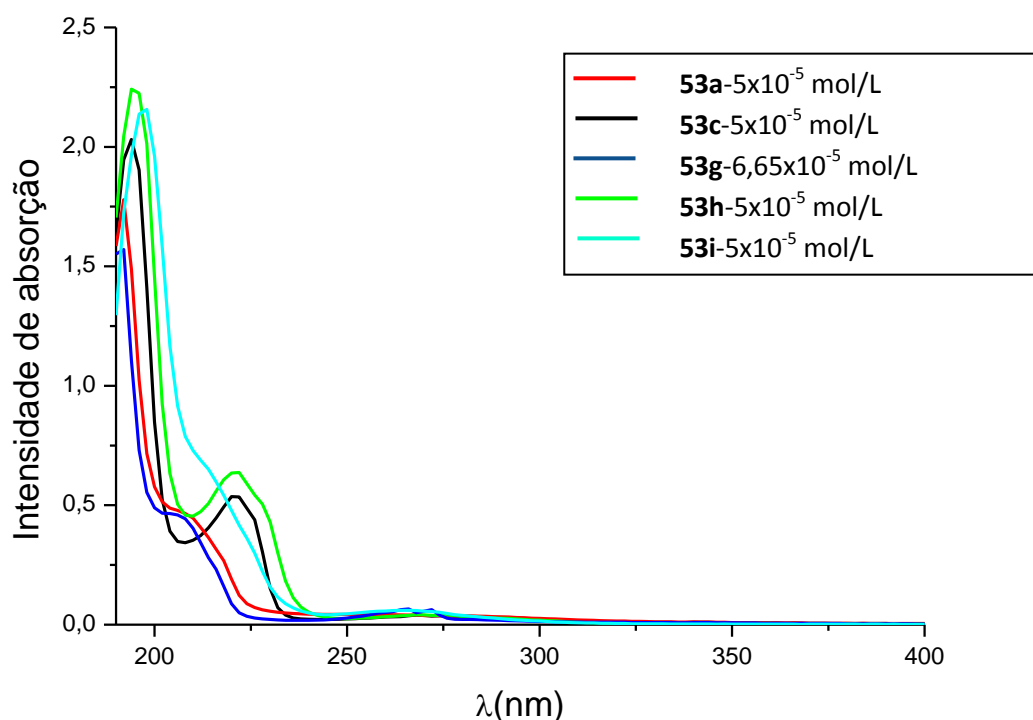


Figura 21. Espectros de absorção de luz UV-visível na região de 190 a 400 nm dos compostos **53a**, **53c**, **53g**, **53h**, **53i** em acetonitrila.

Tabela 15. Dados de comprimento de onda de absorção máxima ($\lambda_{\text{máx}}$) e absortividade molar (ϵ), dos produtos **53a**, **53c**, **53g**, **53h**, **53i** em acetonitrila.

Composto	$\lambda_{\text{máx}}$ (nm)	ϵ	$\lambda_{\text{máx}}$ (nm)	ϵ	$\lambda_{\text{máx}}$ (nm)	ϵ	$\lambda_{\text{máx}}$ (nm)	ϵ
53a	192	35580	b	b	b	b	b	b
53c	194	40620	220	10720	270	780	276	780
53g	a	a	b	b	266	992	272	947
53h	194	44840	222	12740	270	820	276	820
53i	198	43140	b	b	266	1200	b	b

a. Não detectado, pois foi inferior ao limite de detecção do aparelho.

b. Não detectado, pois não possui absorção máxima na região.

Os compostos analisados apresentam em sua estrutura um anel aromático sem substituintes e com os mesmos em *orto* ou *para*. Segundo dados da literatura (PAVIA et al., 2010), o benzeno apresenta três bandas de absorção relacionadas a transição $\pi \rightarrow \pi^*$. Essas

bandas se localizam em 184 nm, com uma absorvidade molar (ϵ) de 47000 (transição permitida), 202 nm ($\epsilon = 7400$) e em 255 nm ($\epsilon = 230$). As duas últimas bandas são transições eletrônicas proibidas por simetria (PAVIA et al., 2010). A presença de substituintes pode alterar a posição dessas bandas como mostrado na Figura 22 e Tabela 15.

Os compostos deste trabalho também possuem uma carbonila que apresenta bandas de absorção na região de 190 nm, relacionada com a transição $\pi \rightarrow \pi^*$ permitida e bastante intensa e outra transição proibida $n \rightarrow \pi^*$ em 280 nm de baixa intensidade (PAVIA et al., 2010). As bandas de menores intensidades ($n \rightarrow \pi^*$) são de interesse para a determinação da configuração absoluta em cetonas, mas nos compostos analisados, encontram-se sobrepostas com as bandas do anel aromático ($\pi \rightarrow \pi^*$) (BEROVA; NAKANISHI; WOODY, 2000; PAVIA et al., 2010). É possível notar a interação entre os níveis de energia eletrônico com o modo vibracional provocando uma definição da estrutura fina do espectro para os compostos **53c**, **53g** e **53h** (Figura 22), que está relacionada com o tipo de substituinte (Cl, F e Br) na posição *para* do anel aromático. Em contrapartida, com o substituinte Br na posição *orto* **53i**, não houve a definição do tipo estrutura fina, e assim, obteve-se uma banda alargada com menor definição. Tal fato pode ser justificado pela diminuição da intensidade de interação dos elétrons não ligantes do substituinte na posição *orto* com o anel aromático, pois haveria a possibilidade de sua interação com a carbonila (PAVIA et al., 2010).

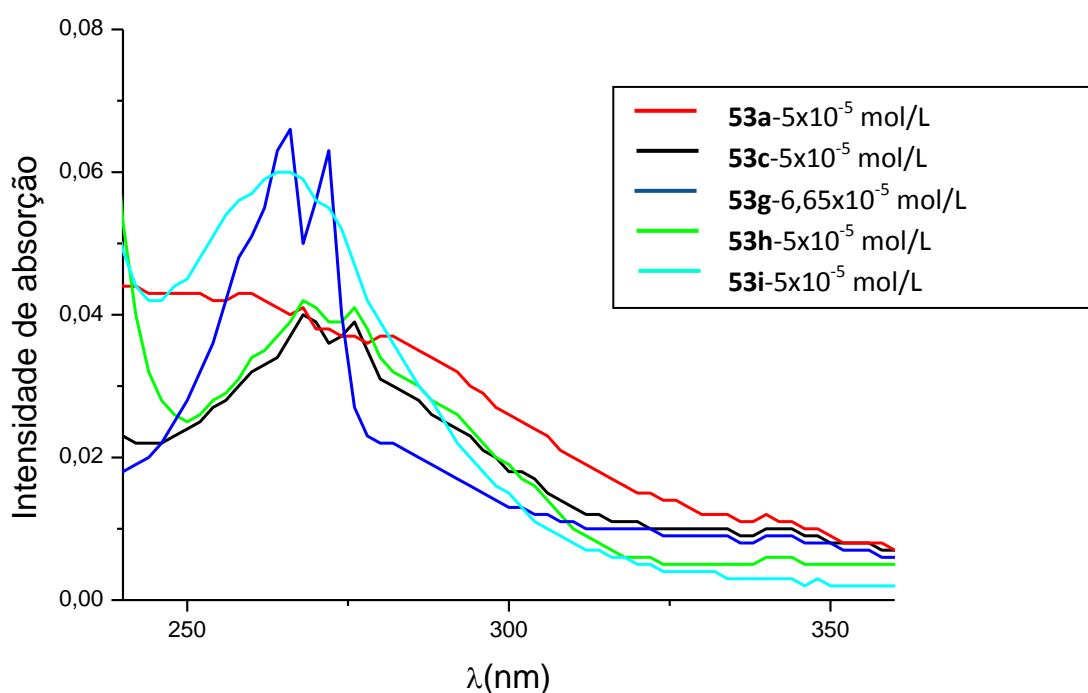


Figura 22. Ampliação do espectro de absorção de luz UV-visível na região de 240 a 360 nm dos compostos **53a**, **53c**, **53g**, **53h**, **53i** em acetonitrila.

Não foram encontradas informações sobre espectros de dicroísmo circular e de rotação óptica dos compostos **53g**, **53h** e **53i**. Já para os compostos **53a** e **53c**, encontrou-se os valores de $[\alpha]_D^{23}$ +40,7 e +27,7 (LU; BOLM, 2008), respectivamente, que são semelhantes aos encontrados experimentalmente $[\alpha]_D^{23} = +33,7$ e +25,1.

Apesar das medidas de rotação óptica dos produtos **53g**, **53h** e **53i** $[\alpha]_D^{23} = +24,1$, +16,7 e +35,4, terem apresentado desvio da luz polarizada para o mesmo lado (dextrorrotatória) dos compostos **53a** e **53c**, preferiu-se adquirir os espectros de dicroísmo circular para garantir a determinação da configuração absoluta.

Dessa forma, foram feitas as análises de dicroísmo circular dos compostos **53a**, **53c**, **53g**, **53h**, **53i**, na faixa de comprimento de onda de 200 a 400 nm, a 25 °C e selecionou-se a região de 240 a 360 nm (Figura 23). A transição eletrônica $n \rightarrow \pi^*$ da carbonila é fraca e quando localizada em um meio quiral, sofre perturbações no carbono assimétrico que levam a um sinal de dicroísmo circular. No espectro de dicroísmo, quando o sinal é positivo, diz-se que há um efeito Cotton positivo. Quando o sinal é negativo, o efeito Cotton é negativo. O máximo e o mínimo do efeito Cotton são as cristas e os vales, respectivamente, ou seja, as bandas de absorção máxima e mínima no espectro (BEROVA; NAKANISHI; WOODY, 2000).

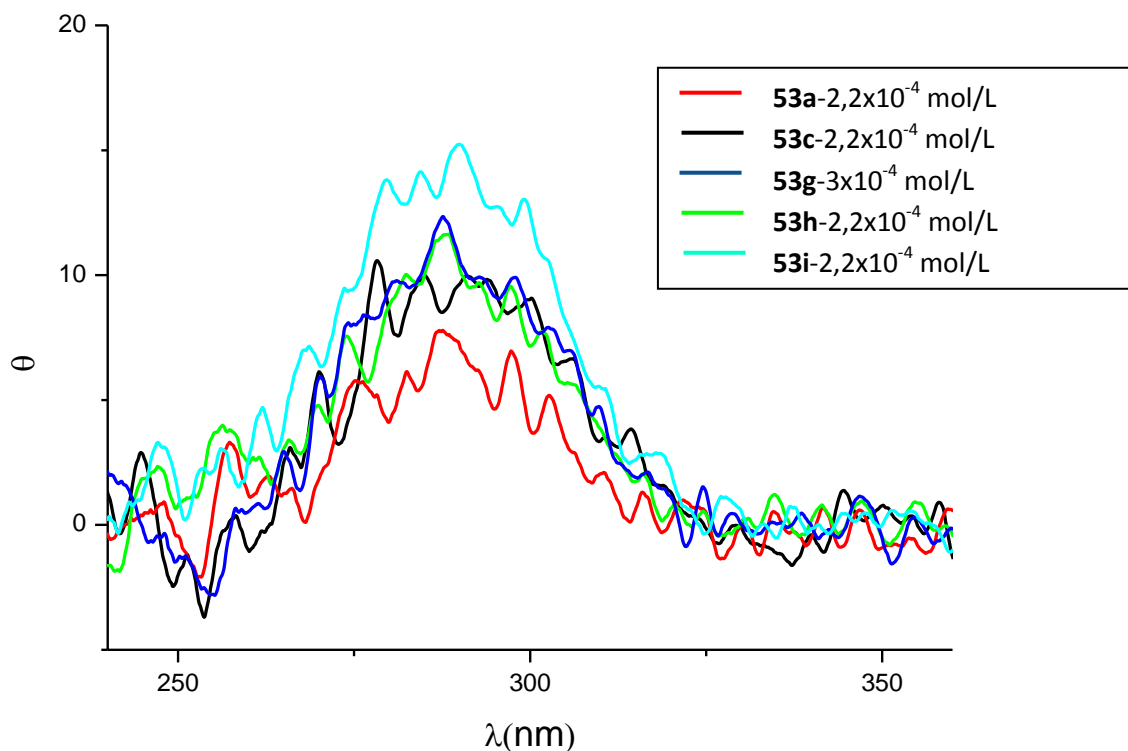


Figura 23. Espectros de dicroísmo circular (θ) dos compostos **53a**, **53c**, **53g**, **53h**, **53i** na região de 240 a 360 nm em acetonitrila.

No espectro de dicroísmo circular (Figura 23) observou-se que na faixa de absorção dos compostos **53a** e **53c** selecionada (Figura 22), a luz polarizada do espectropolarímetro apresentou um sinal positivo. Os demais compostos demonstraram o mesmo efeito Cotton positivo para as bandas entre 240 a 360 nm, conforme a Figura 23. Sabendo que o DC é sensível em relação às características estereoquímica dos compostos e que todas as transformações feitas nas moléculas **53g**, **53h**, **53i** não alteraram o centro quiral, os resultados são indicativo de que é possível correlacionar a configuração absoluta conhecida dos compostos **53a** e **53c**, com as substâncias sintetizadas neste trabalho. Portanto, como não houve alteração de tipo de substituinte diretamente ligado ao carbono quirático, pode-se assumir que elas possuem a mesma configuração absoluta *S*.

3.4. Aplicação sintética

Por fim, investigou-se a aplicação da metodologia na preparação da muguesia, uma substância biologicamente ativa. Para isso, a condição que gerou os produtos com as maiores enantiosseletividades foi a selecionada, ou seja, meio aquoso sem aditivos, a LSC-II e o substrato adsorvido em 0,5 g de resina XAD-7.

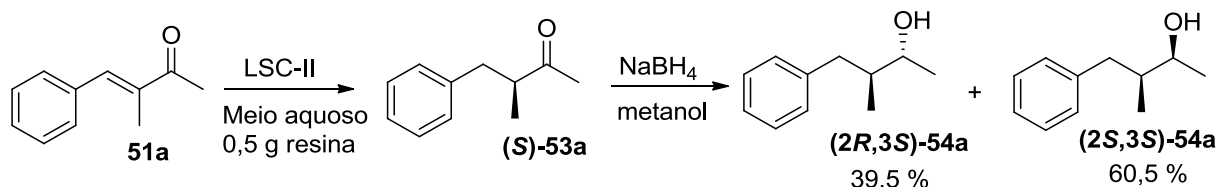
Os receptores olfatórios do nariz humano são assimétricos e podem detectar e discriminar os enantiômeros de um composto orgânico quiral, volátil e odorífero. Eles apresentam uma grande capacidade de reconhecimento molecular, a qual é influenciada pela orientação espacial dos elementos no centro quiral da molécula odorífera. Assim, a obtenção de compostos enantiomericamente puros é importante para a melhoria da performance do produto e também para a saúde humana, pois quando apenas o isômero odorífero ativo é empregado nos produtos comerciais, o risco toxicológico é reduzido, assim como torna o processo menos prejudicial ao ambiente, pois a preparação do enantiômero mais potente diminui a quantidade de substâncias químicas nas fragrâncias (ABATE et al., 2005; BRENNNA et al., 2014).

A muguesia é uma fragrância floral disponível comercialmente pela IFF ("International Flavors & Fragrances") como uma mistura de dois diastereoisômeros racêmicos. No catálogo da IFF, a muguesia é descrita como um líquido incolor amarelo claro, com aroma floral e rosa (ABATE et al., 2005; BRENNNA et al., 2011).

Nesse sentido, sabendo da semelhança estrutural da muguesia com os compostos estudados durante esse trabalho, optou-se pela sua preparação utilizando a biocatálise na biorredução enantiosseletiva da ligação dupla (Esquema 19).

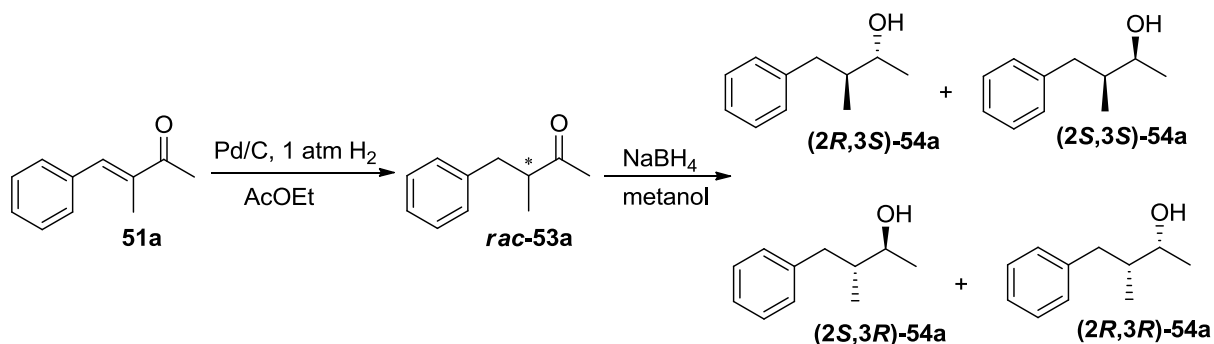
Segundo dados da literatura (BRENNA et al., 2014), a configuração absoluta do átomo de carbono na posição 3 é fundamental para estabelecer as propriedades odoríferas da muguesia. Após serem avaliados por perfumistas verificou-se que os isômeros (**2R,3S**)-**54a** e (**2S,3S**)-**54a** apresentam um odor floral forte, já os estereoisômeros (**2R,3R**)-**54a** e (**2S,3R**)-**54a** são descritos como fracos. Assim, os compostos (**2R,3S**)-**54a** e (**2S,3S**)-**54a** são os responsáveis pela propagação do odor floral da fragrância comercial (ABATE et al., 2005; BRENNA et al., 2011; BRENNA et al., 2014).

Dessa maneira, após a biorredução do substrato **51a**, o produto **53a** foi submetido à reação com NaBH₄, um agente redutor tradicional, para a redução da carbonila. Os compostos gerados predominantemente nessa reação foram os diastereoisômeros (**2R,3S**)-**54a** e (**2S,3S**)-**54a** da muguesia (Esquema 19). Eles foram caracterizados por CG-FID-quiral, CG-EM e RMN ¹H e ¹³C.



Esquema 19. Diastereoisômeros da muguesia produzidos preferencialmente na biorredução do substrato **51a** mediado por LSC-II seguida de redução da carbonila.

Sintetizou-se também os estereoisômeros da muguesia **54a** quimicamente, por meio de uma reação de hidrogenação clássica com Pd/C e posterior redução com NaBH₄ (Esquema 20). Esses foram utilizados como padrões para comparação com os isômeros obtidos utilizando a biocatálise.



Esquema 20. Preparação dos diastereoisômeros da muguesia utilizando redução química.

Diversas tentativas de purificação e isolamento dos diastereoisômeros **(2R,3S)-54a** e **(2S,3S)-54a** foram feitas utilizando coluna de sílica flash, coluna de sílica clássica e CCDP. O emprego da CCDP foi a técnica que apresentou os melhores resultados. Todavia, não foi possível separar os diastereoisômeros. Brenna et al. (2014) reportou a purificação dos isômeros **(2R,3S)-54a** e **(2S,3S)-54a** utilizando destilação horizontal, no entanto, já que o objetivo do trabalho era demonstrar a aplicação da metodologia na obtenção de uma substância bioativa e a massa produzida não era suficiente para o emprego dessa técnica, as análises e caracterização da muguesia foram feitas com a mistura dos diastereoisômeros *syn*- e *anti*-**54a**.

Na Figura 24, pode-se observar em preto os picos dos diastereoisômeros obtidos na redução química e em vermelho os diastereoisômeros **(2R,3S)-54a** e **(2S,3S)-54a** obtidos preferencialmente utilizando a biorredução na primeira etapa. De acordo com Brenna e colaboradores (2014), o diastereoisômero que elui primeiro é o *syn*-**54a** ($t_R = 76$ min), o *anti*-**54a** apresenta o tempo de retenção maior ($t_R = 79,2$ min). Tanto na redução química como na enzimática, o diastereoisômero observado em maior proporção foi o *syn*-**54a**, a conversão estimada pelo CG-FID-quiral foi de 56% e 60,5%, respectivamente.

É importante destacar que o produto biorreduzido (*S*)-**53a**, utilizado para a redução com NaBH_4 , apresentava um *ee* de 78% e verificou-se que, após a reação, o *ee* diminuiu para 76%, este foi calculado a partir do diastereoisômero *anti*-**54a**, o qual apresentou a melhor resolução. Possivelmente, tal resultado está relacionado ao processo de enolização que os substratos podem sofrer, levando à racemização e diminuição da estereosseletividade da reação.

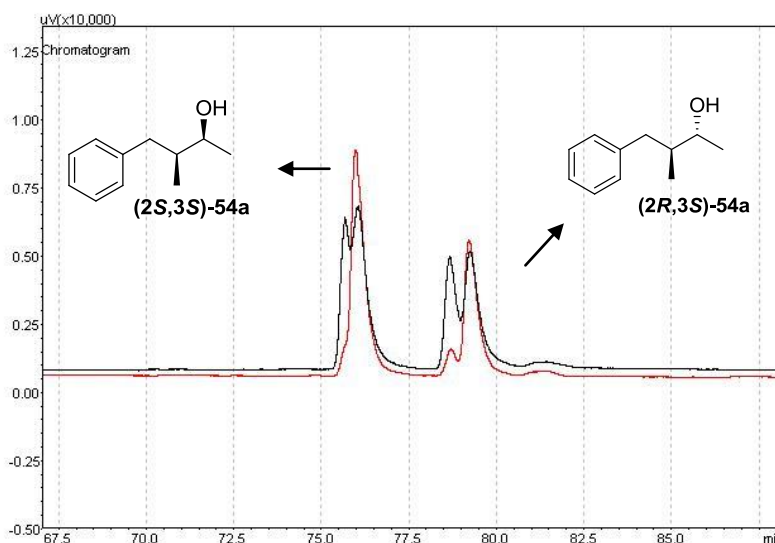


Figura 24. Estereoisômeros da muguesia obtidos utilizando redução química (preto) e biocatalítica (vermelho).

4. Conclusões

4. CONCLUSÕES

De acordo com as investigações realizadas neste período e os resultados obtidos, pode-se assumir que os objetivos do presente trabalho foram alcançados.

Como apresentado, os compostos carbonílicos α,β -insaturados foram obtidos com rendimentos satisfatórios, os quais foram submetidos a reação de biorredução e geraram compostos carbonílicos α -alquil substituídos opticamente ativos. Para encontrar a condição reacional que resultasse em produtos com alta conversão e *ee*, foram avaliados diversos parâmetros experimentais.

Em relação ao meio reacional, os melhores resultados foram obtidos utilizando sistema monofásico aquoso sem aditivos mediado pela LSC-II.

Apesar do uso da *Pichia kluyveri* e de linhagens de diferentes origens ter gerado o produto esperado, este foi obtido com rendimentos e enantiosseletividades inferiores ao desejado. Dessa forma, a levedura LSC-II foi a mais adequada para a continuidade dos experimentos. Além disso, o uso da resina Amberlite XAD-7 bem como mudanças na estrutura da molécula proporcionaram o aumento da conversão e *ee* dos compostos carbonílicos α -alquil substituídos, os quais foram isolados com rendimentos moderados a bons.

Por fim, estudou-se a aplicação sintética da metodologia na preparação da muguesia. Essa substância bioativa foi produzida com sucesso e com estereosseletividade satisfatória.

Cabe salientar que a otimização das condições reacionais é fundamental nas reações catalisadas por células íntegras de micro-organismos, já que foram observadas variações significativas nos rendimentos e estereosseletividades em condições distintas.

Em uma visão geral, os resultados são bastante promissores e indicam que essa levedura é capaz de atuar seletivamente em reações de redução. Observou-se que embora houvesse dois grupamentos funcionais susceptíveis à catálise enzimática, a biorredução da ligação C=C foi predominante em relação à C=O, o que demonstra a alta quimiosseletividade do processo.

Diante do exposto, concluiu-se que devido às condições reacionais desenvolvidas usando LSC-II, água e resina XAD-7 na primeira etapa, foi possível a síntese dos isômeros desejáveis da fragrância muguesia. Tal fato confirma o grande potencial da metodologia para a preparação enantiosseletiva de substâncias bioativas de interesse sintético.

5. Referências Bibliográficas

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABATE, A.; BRENNAN, E.; FUGANTI, C.; GATTI, F. G.; GIOVENZANA, T.; MALPEZZI, L.; SERRA, S. Chirality and Fragrance Chemistry: Stereoisomers of the Commercial Chiral Odorants Muguesia and Pamplefleure. **The Journal of Organic Chemistry**, v. 70, n. 4, p. 1281-1290, 2005.

ALEDO, J. C.; LOBO, L.; VALLE, A. E. Energy diagrams for enzyme-catalyzed reactions. **Biochemistry and Molecular Biology Education**, v. 31, n. 4, p. 234-236, 2003.

ANDERSON, B. A.; HANSEN, M. M.; HARKNESS, A. R.; HENRY, C. L.; VICENZI, J. T.; ZMIJEWSKI, M. J. Application of a Practical Biocatalytic Reduction to an Enantioselective Synthesis of the 5*H*-2,3-Benzodiazepine LY300164. **Journal of the American Chemical Society**, v. 117, n. 49, p. 12358-12359, 1995.

ANDERSSON, K.; LEVIN, J.-O.; NILSSON C.-A. Sampling of polychlorinated aromatics in workroom air using amberlite XAD-2 resin. **Chemosphere**, v. 10, n. 2, p. 137-142, 1981.

ANDERSSON, K.; LEVIN, J.-O.; LINDAHL, R.; NILSSON C.-A. Sampling of epichlorohydrin and ethylene chlorohydrin in workroom air using Amberlite XAD-7 resin. **Chemosphere**, v. 10, n. 2, p.143-146, 1981.

ANDERSSON, B.; ANDERSSON, K. Use of Amberlite XAD-7 as a concentrator column in the analysis of endogenous plant growth hormones. **Journal of Chromatography A**, v. 242, n. 2, p. 353-358, 1982.

ARRIGO, P. D.; FANTONI, G. P.; SERVI, S.; STRINI, A. The effect of absorbing resins on substrate concentration and enantiomeric excess in yeast reduction. **Tetrahedron: Asymmetry**, v. 8, n. 14, p. 2375-2379, 1997.

ARRIGO, P. D.; FUGANTI, C.; FANTONI, G. P.; SERVI, S. Extractive biocatalysis: a powerful tool in selectivity control in yeast biotransformations. **Tetrahedron**, v. 54, n. 49, p. 15017-15026, 1998.

BACH, J.; , M.; GARCIA, J.; ROMEA, P.; TEY, C.; URPI, F.; VILARRASA, J. Syntheses of the C-1 alkyl side chains of Zaragozaic acids A and C. **Tetrahedron Letters**, v. 39, n. 37, p. 6765-6768, 1998.

BARREIRO, E. J.; FERREIRA, V. F.; COSTA, P. R. R. Substâncias enantiomericamente puras (SEP): a questão dos fármacos quirais. **Química Nova**, v. 20, n. 6, p. 647-656, 1997.

BEROVA, N.; BARI, L. D.; PESCIPELLI, G. Application of electronic circular dichroism in configurational and conformational analysis of organic compounds. **Chemical Society Reviews**, v. 36, n. 6, p. 914-931, 2007.

BEROVA, N.; NAKANISHI, K.; WOODY R.W., **Circular Dichroism Principles and Applications**. New York: John Wiley & Sons, 2.ed., 2000.

BHALERAO, U. T.; CHANDRAPRAKASH Y.; BABU, R. L.; FADNAVIS, N.W. β -Ketoester reduction by baker's yeast immobilized in calcium alginate: an examination of ph effects on enantiospecificity. **Synthetic Communications**, v. 23, n. 9, p. 1201-1208, 1993.

BLASER, H. U.; SPINDLER, F.; STUDER, M. Enantioselective catalysis in fine chemicals production. **Applied Catalysis A: General**, v. 221, n. 1-2, p. 119-143, 2001.

BLASER, H. U.; PUGIN, B.; SPINDLER, F. Progress in enantioselective catalysis assessed from an industrial point of view. **Journal of Molecular Catalysis A: Chemical**, v. 231, n. 1-2, p. 1-20, 2005.

BRENNA, E.; FUGANTI, C.; GATTI, F. G.; SERRA, S. Biocatalytic methods for the synthesis of enantioenriched odor active compounds. **Chemical Reviews**, v. 111, n. 7, p. 4036-4072, 2011.

BRENNA, E.; GATTI, F. G.; MONTI, D.; PARMEGGIANI, F.; SACCHETTI, A. Cascade coupling of ene reductases with alcohol dehydrogenases: enantioselective reduction of prochiral unsaturated aldehydes. **ChemCatChem**, v. 4, n. 5, p. 653-659, 2012.

BRENNA, E.; COSI, S. L.; FERRANDI, E. E.; GATTI, F. G.; MONTI, D.; PARMEGGIANI, F.; SACCHETTI, A. Substrate scope and synthetic applications of the enantioselective reduction of α -alkyl- β -arylenones mediated by Old Yellow Enzymes. **Organic & Biomolecular Chemistry**, v. 11, n. 18, p. 2988-2996, 2013.

BRENNA, E.; CROTTI, M.; GATTI, F. G.; MONTI, D.; PARMEGGIANI, F.; PUGLIESE, A.; SANTANGELO, S. Multi-enzyme cascade synthesis of the most odorous stereoisomers of the commercial odorant Muguesia[®]. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, 2014, <http://dx.doi.org/10.1016/j.molcatb.2014.10.006>.

BRONSON, J.; BLACK, A.; DHAR, T. G. M.; ELLSWORTH, B. A.; MERRITT, J. R. To Market, To Market—2012. **Annual Report in Medicinal Chemistry**, v. 48, p. 471-546, 2013.

CALDWELL, J. Stereochemical determinants of the nature and consequences of drug metabolism. **Journal of Chromatography A**, v. 694, n. 1, p. 39-48, 1995.

CAMPBELL, M. K. **Bioquímica**, Porto Alegre: Artmed, 3. ed., 2000.

CARBALLEIRA, J. D.; QUEZADA, M. A.; HOYOS, P.; SIMEÓ, Y.; HERNAIZ, M. J.; ALCANTARA, A. R.; SINISTERRA, J. V. Microbial cells as catalysts for stereoselective red-ox reactions. **Biotechnology Advances**, v. 27, n. 6, p. 686-714, 2009.

CHAVES, M. R. B.; MORAN, P. J. S.; RODRIGUES, J. A. R. Regio- and enantioselective bioreduction of methyleneketoesters using both polymeric resin and cellulose matrix. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 98, p. 73-77, 2013.

CHU, Y.; ZHANG B. L.; SILVESTRE, V.; CHENG, J. P. Hydrogen transfer pathways of the asymmetric reduction of α,β -unsaturated ketone mediated by baker's yeast. **Bioorganic Chemistry**, v. 34, n. 3, p. 158–166, 2006.

CLAYDEN, J.; GREEVES, N.; WARREN, S. **Organic Chemistry**, New York: Oxford University Press, 2.ed., 2012.

CLOSOSKI, G. C.; MILAGRE, C.D.F.; MORAN, P. J. S.; RODRIGUES, J. A. Regio- and enantioselective of methyleneketoesters mediated by *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 48, n. 3-4, p. 70-76, 2007.

COELHO, F. A. S. Fármacos e quiralidade. **Cadernos Temáticos de Química Nova na Escola**, n. 3, p. 23-32, 2001.

COLOMBO, M.; AMICI, M.; MICHELI, C.; PITRÉ, D.; CARREA, G.; RIVA, S. Chemoenzymatic synthesis of the enantiomers of iopanoic acid. **Tetrahedron: Asymmetry**, v. 2, n. 10, p. 1021-1030, 1991.

CONCEIÇÃO, G. J. A.; MORAN, P. J. S.; RODRIGUES, J. A. R. Regio- and enantioselective reduction of a α -methylene ketone by *Rhodotorula glutinis*. **Archive for Organic Chemistry**, v. x, n. 10, p. 500-506, 2003a.

CONCEIÇÃO, G. J. A.; MORAN, P. J. S.; RODRIGUES, J. A. R. Highly efficient extractive biocatalysis in the asymmetric reduction of an acyclic enone by the yeast *Pichia stipitis*. **Tetrahedron: Asymmetry**, v. 14, n. 1, p. 43-45, 2003b.

CONSTANTINO, M. G. **Química Orgânica curso básico universitário**, Rio de Janeiro: LTC, v. 2, 2012.

CONTI, R.; RODRIGUES, J. A. R.; MORAN, P. J. S. Biocatálise: avanços recentes. **Química Nova**, v. 24, n. 5, p. 672-675, 2001.

CRABBÉ, P. **ORD and CD in chemistry and biochemistry: an introduction**, London: Academic Press Inc, 1972.

CROSBY, J. Synthesis of optically active compounds: a large scale perspective. **Tetrahedron**, v. 47, n. 27, p. 4789-4846, 1991.

DABROWSKI, A. Adsorption - from theory to practice. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 93, n. 1-3, p. 135-224, 2001.

DUNN, P. J. The importance of green chemistry in process research and development. **Chemical Society Reviews**, v. 41, n. 4, p. 1452-1461, 2012.

EICHELBAUM, M.; GROSS, A. S. Stereochemical aspects of drug action and disposition. **Advances in drug research**, v. 28, p. 1-64, 1996.

FABER, K. **Biotransformation in Organic Chemistry**, Berlin: Springer-Verlag, 6.ed., 2011.

FADNAVIS, N. W.; VADIVEL, S. K.; BHALERAO, U. T. Biotransformations with baker's yeast: pH effects on diastereoselectivity during α -hydroxy- β -ketoester reductions and carbon-carbon bond cleavages. **Tetrahedron: Asymmetry**, v. 8, n. 14, p. 2355-2359, 1997.

FILHO, E. P. S.; RODRIGUES, J. A. R.; MORAN, P. J. S. Baker's yeast reduction of α -methyleneketones. **Tetrahedron: Asymmetry**, v. 12, n. 6, p. 847-852, 2001.

GORTHEY, L. A.; VAIRAMANI, M.; DJERASSI, C. Optical rotatory dispersion studies. 137. Synthesis and chiroptical properties of α - and β -deuterium substituted aliphatic aldehydes and ketones. **The Journal of Organic Chemistry**, v. 49, n. 9, p. 1511-1517, 1984.

HALL, M.; HAUER, B.; STUERMER, R.; KROUTIL, W.; FABER, K. Asymmetric whole-cell bioreduction of α,β -unsaturated aldehyde (citral): competing *prim*-alcohol dehydrogenase and C-C lyase activities. **Tetrahedron: Asymmetry**, v. 17, n. 21, p. 3058-3062, 2006.

HALL, M.; BOMMARIUS, A. S. Enantioenriched compounds via enzyme-catalyzed redox reactions. **Chemical Reviews**, v. 111, n. 7, p. 4088-4110, 2011.

HANSCH, C.; LEO, A.; HOEKMAN, D. **Exploring QSAR: Hydrophobic, Electronic, and Steric Constants**, Washington D.C.: ACS Professional Reference Book, 1995.

HAWKINS, J. M.; WATSON, T. J. N. Asymmetric Catalysis in the Pharmaceutical Industry. **Angewandte Chemie-International Edition**, v. 43, n. 25, p. 3224-3228, 2004.

HOLLMANN, F.; ARENDS, I. W. C. E.; HOLTSMANN, D. Enzymatic reductions for the chemist. **Green Chemistry**, v. 13, n. 9, p. 2285-2314, 2011.

HOUNG, J.-Y., HSU, H.-F., LIU, Y.-H., WU, J.-Y. Applying the Taguchi robust design to the optimization of the asymmetric reduction of ethyl 4-chloro acetoacetate by baker's yeast. **Journal of Biotechnology**, v. 100, n. 3, p. 239-250, 2003.

HUANG, Y.; ZHANG, F.; GONG, Y. A convenient approach to (S)-2-ethylhexan-1-ol mediated by baker's yeast. **Tetrahedron Letters**, v. 46, n. 42, p. 7217-7219, 2005.

HUBBARD, K. L.; FINCH, J. A.; DARLING, G. D. Polymers with pendant vinyl groups, including poly (divinylbenzene-co-ethylvinylbenzene). **Reactive & Functional Polymers**, v. 36, n. 1, p. 1-16, 1998.

IBRAHIM, G.; ANDRYAUSKAS, S.; BASTOS, M. L. Application of amberlite XAD-2 resin for general toxicological analysis. **Journal of Chromatography**, v. 108, n. 1, p. 107-116, 1975.

ISHIGE, T.; HONDA, K.; SHIMIZU, S. Whole organism biocatalysis. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 9, n. 2, p. 174-180, 2005.

JUNK, G. A.; RICHARD, J. J.; GRIESER, M. D.; WITIAK, D.; WITIAK, J. L.; ARGUELLO, M. D.; VICK, R.; SVEC, H. J.; FRITZ, J. S.; CALDER, G. V. Use of macroreticular resins in the analysis of water for trace organic contaminants. **Journal of Chromatography A**, v. 99, p. 745-762, 1974.

KAWAI, Y.; SAITOU, K.; HIDA, K.; OHNO, A. Asymmetric reduction of α,β -unsaturated ketones with baker's yeast. **Tetrahedron: Asymmetry**, v. 6, n. 9, p. 2143-2144, 1995.

KAWAI, Y.; SAITOU, K.; HIDA, K.; DAO, D. H.; OHNO, A. Stereochemical control in microbial reduction. XVIII. asymmetric reduction of α,β -unsaturated ketones with baker's yeast. **Bulletin of the Chemical Society of Japan**, v. 69, n. 9, p. 2633-2638, 1996.

KAWAI, Y.; HAYASHI, M.; INABA, Y.; SAITOU, K.; OHNO, A. Asymmetric reduction of α,β -unsaturated ketones with a carbon-carbon double-bond reductase from baker's yeast. **Tetrahedron Letters**, v. 39, n. 19, p. 5225-5228, 1998.

KAWAI, Y.; HAYASHI, M.; TOKITOH, N. Asymmetric synthesis of α -chiral ketones by the reduction of enones with baker's yeast. **Tetrahedron: Asymmetry**, v. 12, n. 21, p. 3007-3013, 2001.

KAWAI, Y.; INABA, Y.; HAYASHI, M.; TOKITOH, N. Asymmetric synthesis of a nitroalkane by the use of novel nitroalkene reductases from baker's yeast. **Tetrahedron Letters**, v. 42, n. 19, p. 3367-3368, 2001.

KERGOMARD, A.; RENARD, M. F.; VESCHAMBRE, H. Microbiological reduction of α,β -unsaturated ketones by *Beauveria sulfurescens*. **The Journal of Organic Chemistry**, v. 47, n. 5, p. 792-798, 1982.

KHMELNITSKY, Y. L.; MOZHAEV, V. V.; BELOVA, A. B.; SERGEEVA, M. V.; MARTINEK, K. Denaturation capacity: a new quantitative criterion for selection of organic solvents as reaction media in biocatalysis. **European Journal of Biochemistry**, v. 198, n. 1, p. 31-41, 1991.

KUNIN, R.; MEITZSER, E.; BORTNICK, N. Macroreticular ion exchange resins. **Journal of the American Chemical Society**, v. 84, n. 2, p. 305-306, 1962.

LAANE, C.; BOEREN, S.; VOS, K.; VEEGER, C. Rules for the optimization of biocatalysis in organic solvents. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 30, n. 1, p. 81-87, 1987.

LANG, E. S.; COMASSETO, J. V. Catálise por transferência de fase. **Química Nova**, v. 11, n. 2, p. 238-257, 1988.

LEÓN, R.; FERNANDES, P.; PINHEIRO, H. M.; CABRAL, J. M. S. Whole-cell biocatalysis in organic media. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 23, n. 7-8, p. 483-500, 1998.

LI, J.-Q.; QUAN, X.; ANDERSSON, P. G. Highly enantioselective iridium-catalyzed hydrogenation of α,β -unsaturated esters. **Chemistry - A European Journal**, v. 18, n. 34, p. 10609-10616, 2012.

LI, Y.-N.; SHI, X.-A.; ZONG, M.-H.; MENG, C.; DONG, Y.-Q.; GUO, Y.-H. Asymmetric reduction of 2-octanone in water/organic solvent biphasic system with baker's yeast FD-12. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 40, n. 5, p. 1305–1311, 2007.

LIMA, V. L. E. Os fármacos e a quiralidade: uma breve abordagem. **Química Nova**, v. 20, n. 6, p. 657-663, 1997

LIN, G.-Q.; YOU, Q.-D.; CHENG, J.-F. **Chiral Drugs: Chemistry and Biological Action**, New Jersey: John Wiley & Sons, 1.ed, 2011.

LIU, W.; GAN, J.; SCHLENK, D.; JURY, W. A. Enantioselectivity in environmental safety of current chiral insecticides. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 102, n. 3, 701-706, 2005.

LOHRAY, B. B. Asymmetric catalysis – A novel chemistry to win the Nobel Prize – 2001. **Current Science**, v. 81, n. 12, 1519-1525, 2001.

LOU, W.-Y.; ZONG, M.-H.; ZHANG, Y.-Y.; WU, H. Efficient synthesis of optically active organosilyl alcohol via asymmetric reduction of acyl silane with immobilized yeast. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 35, n. 2-3, p. 190–196, 2004.

LU, S. M.; BOLM, C. Highly Enantioselective Synthesis of Optically Active Ketones by Iridium-Catalyzed Asymmetric Hydrogenation, **Angewandte Chemie-International Edition**, v. 47, n. 46, p. 8920-8923, 2008.

LUCCHESI, A. M.; MARZORATI L. Catálise de transferência de fase. **Química Nova**, v. 23, n. 5, p. 641-652, 2000.

LUO, F.; WANG, P.; GONG, Y. Highly enantioselective bioreduction of 2-fluorocinnamyl alcohols mediated by *Saccharomyces cerevisiae*. **Tetrahedron Letters**, v. 51, n. 13, p. 1693-1695, 2010.

MANNSCHRECK, A.; KIESSWETTER, R. Unequal Activities of Enantiomers via Biological Receptors: Examples of Chiral Drug, Pesticide, and Fragrance Molecules. **Journal of Chemical Education**, v. 84, n. 12, p. 2012-2018, 2007.

MATSUDA, T.; YAMANAKA, R.; NAKAMURA, K. Recent progress in biocatalysis for asymmetric oxidation and reduction, **Tetrahedron: Asymmetry**, v. 20, n. 5, p.513–557, 2009.

MAURER, F.; HUCH, V.; ULLRICH, A.; KAZMAIER, U. Development of catalysts for the stereoselective hydrogenation of α,β -unsaturated ketones. **The Journal of Organic Chemistry**, v. 77, n. 11, p. 5139-5143, 2012.

MILAGRE, C. D. F.; MILAGRE, H. M. S.; MORAN, P. J. S.; RODRIGUES, J. A. R. Screening and reaction for the bioreduction of ethyl benzoylacetate and its analogue **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 56, n. 1, p. 55-60, 2009.

MISLOW, K.; GLASS, M. A. W.; MOSCOWITZ, A.; DJERASSI, C.; Generalization of octant rule. **Journal of the American Chemical Society**, v. 83, n. 12, p. 2771-2772, 1961.

MOFFITT, W.; WOODWARD, R. B.; MOSCOWITZ, A.; KLYNE, W.; DJERASSI, C. Structure and optical rotatory dispersion of saturated ketones. **Journal of the American Chemical Society**, v. 83, n. 19, p. 4013-4018, 1961.

MONTI, D.; OTTOLINA, G.; GIACOMO, C.; RIVA, S. Redox Reactions Catalyzed by Isolated Enzymes. **Chemical Reviews**, v. 111, n. 7, p. 4111-4140, 2011.

MORI, K.; MASUDA S.; SUGURO, T. Stereocontrolled synthesis of all of the possible stereoisomers of 3,1 l-dimethylnonacosan-2-one and 29-hydroxy-3,1 l-dimethylnonacosan-2-one. **Tetrahedron**, v. 37, n. 7, p. 1329-1340, 1981.

MULLER, A.; HAUER, B.; ROSCHE, B. Enzymatic reduction of the α,β -unsaturated carbon bond in citral. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 38, n. 3-6, p.126-130, 2006.

MURAKAMI, H. From Racemates to Single Enantiomers – Chiral Synthetic Drugs over the last 20 Years. **Topics in Current Chemistry**, v. 269, p. 273-299, 2007.

NAKAMURA, K.; KAWAI, Y.; NAKAJIMA, N.; OHNO, A. Stereochemical control of microbial reduction. 17. A method for controlling the enantioselectivity of reductions with bakers' yeast. **The Journal of Organic Chemistry**, v. 56, n. 15, p. 4778-4783, 1991.

NAKAMURA, K.; KONDO, S.; NAKAJIMA, N.; OHNO, A. Mechanistic study for stereochemical control of microbial reduction of α -keto esters in an organic solvent. **Tetrahedron**, v. 51, n. 3, p. 687-694, 1995.

NAKAMURA, K.; FUJII, M.; IDA, Y. Asymmetric reduction of ketones by *Geotrichum candidum* in the presence of AmberliteTM XAD, a solid organic solvent. **Journal of the Chemical Society**, Perkin Transactions, v. 1, n. 19, p. 3205-3211, 2000.

NAKAMURA, K.; TAKENAKA, K.; FUJII, M.; IDA, Y. Asymmetric synthesis of both enantiomers of secondary alcohols by reduction with a single microbe. **Tetrahedron Letters**, v. 43, n. 20, p. 3629-3631, 2002.

NAKAMURA, K.; YAMANAKA, R.; MATSUDA, T.; HARADA, T. Recent developments in asymmetric reduction of ketones with biocatalysts. **Tetrahedron: Asymmetry**, v. 14, n. 18, p. 2659-2681, 2003.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de Bioquímica de Lehninger**, Porto Alegre, Artmed, 2011.

NGUYEN, L. A.; HE, H.; PHAM-HUY, C. Chiral Drugs: An Overview. **International Journal of Biomedical Science**, v. 2, n. 2, p. 85-100, 2006.

NOYORI, R. Asymmetric Catalysis: Science and Opportunities (Nobel Lecture 2001). **Advanced Synthesis & Catalysis**, v. 345, n. 1-2, p.15-32, 2003.

OGSTON, A. G. Interpretation of experiments on metabolic processes, using isotopic tracer elements. **Nature**, v. 162, n. 4129, p. 963, 1948.

PANKE, S.; HELD, M.; WUBBOLTS, M. Trends and innovations in industrial biocatalysis for the production of fine chemicals. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 15, n.4, p. 272–279, 2004.

PATEL, R. N. Synthesis of chiral pharmaceutical intermediates by biocatalysis. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 252, n. 5-7, p. 659-701, 2008.

PAULA, B. R. S.; ZAMPIERI, D. S.; RODRIGUES, J. A. R. MORAN, P. J. S. Enantiodivergence in the reduction of α -methyl an α -halomethyl enones by microorganisms. **Tetrahedron: Asymmetry**, v. 24, n. 17, 973-981, 2013.

PAVIA, D. L.; LAMPMAN, G. M.; KRIZ, G. S., VYVYAN, J. R. **Introdução à espectroscopia**, São Paulo: Cengage Learning, 4. ed., 2010.

PEREIRA, R. S. Fermento biológico de padaria (*Saccharomyces cerevisiae*) e seu uso em síntese assimétricas. **Química Nova**, v. 18, n. 5, p. 452-459, 1995a.

PEREIRA, R. S. Baker's yeast: some biochemical aspects and their influence in biotransformations. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 55, n.2, p.123-132, 1995b.

PERRIN, D. D.; ARMAREGO, W. L. F. ; PERRIN, D. R. **Purification of Laboratory Chemicals**, Oxford: Pergamon Press, 2.ed., 1980.

PINHEIRO, S.; FERREIRA, V. F. Abordagens em síntese assimétrica. **Química Nova**, v. 21, n. 3, p. 312-318, 1998.

POLLARD, D. J.; WOODLEY, J. M. Biocatalysis for pharmaceutical intermediates: the future is now. **Trends in Biotechnology**, v. 25, n. 2, p. 66-73, 2007.

RILEY, R.G.; SILVERSTEIN, R. M.; MOSER, J. C. Biological response of *Atta texana* to its alarm pheromone and the enantiomer of the pheromone. **Science**, v. 183, n. 4126, p. 760-762, 1974.

ROBERTS, S. M. Biocatalysts in synthetic organic chemistry. **Tetrahedron**, v. 60, n. 3, p. 499-500, 2004.

RODRIGUES, J. A. R. MORAN, P. J. S. Reduções enantiosseletivas de cetonas utilizando-se fermento de pão. **Química Nova**, v. 24, n. 6, p. 893-897, 2001.

RODRIGUES, J. A. R. MORAN, P. J. S.; CONCEIÇÃO, G. J. A.; FARDELONE, L. C. Recent advances in the biocatalytic asymmetric reduction of acetophenones and α,β -unsaturated carbonyl compounds. **Food Technology and Biotechnology**, v. 42, n. 4, p. 295-303, 2004.

ROFFLER, S. R.; BLANCH, H. W. ; WILKE, C. R. In situ recovery of fermentation products. **Trends in Biotechnology**, v. 2, n. 5, p. 129-136, 1984.

ROZZEL, J. D. Commercial scale biocatalysis: myths and realities. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 7, n. 11, p. 2253-2261, 1999.

ROHM AND HASS, **Amberlite™ XAD7HP Industrial Grade Polymeric Adsorbent**, Material Safety Data Sheets, 2003. Disponível em <http://www.dow.com/assets/attachments/business/process_chemicals/amberlite_xad/amberlite_xad7_hp/tds/amberlite_xad7hp.pdf>. Acesso em : 27 de março de 2015.

SAKAI, T.; MATSUMOTO, S.; HIDAKA, S.; IMAJO, N.; TSUBOI, S.; UTAKA, M. Asymmetric reduction of carbon-carbon double bonds of conjugated enones with fermenting bakers' yeast. **Bulletin of the Chemical Society of Japan**, v. 64, n. 11, p. 3473-3475, 1991.

SANTANIELLO, E.; FERRABOSCHI, P.; GRISENTI, P.; MANZOCCHI, A. The biocatalytic approach to the preparation of enantiomerically pure chiral building blocks. **Chemical Reviews**, v. 92, n. 5, p. 1071-1140, 1992.

SCHAEFER, C. A.; SILVA, V.D.; STAMBUK, B. U.; NASCIMENTO, M. G. Use of *Saccharomyces cerevisiae* yeast in the chemoselective bioreduction of (1E, 4E)1,5-bis(4-methoxyphenyl)-1,4-pentadien-3-one in biphasic system. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 24, n. 7, p. 1116-1122, 2013.

SCHMID, A.; DORDICK, J. S.; HAUER, B.; KIENER, A.; WUBBOLTS, M.; WITHOLT, B. Industrial biocatalysis today and tomorrow. **Nature**, v. 409, p. 258-268, 2001.

SCHOEMAKER, H. E.; BOESTEN, W. H.J.; BROXTERMAN Q. B.; ROOS, E. C.; KAPTEIN B.; TWEEL, W. J. J.; KAMPHUIS, J.; MEIJER, E. M.; RUTJES, F. P. J. T. Application of Enzymes in Industrial Organic Synthesis. **Chimia**, v. 51, n. 6, p. 308-310, 1997.

SERRA, S.; FUGANTI, C.; BRENNNA, E. Biocatalytic preparation of natural flavours and fragrances. **Trends in Biotechnology**, v. 23, n. 4, 194-198, 2005.

SERVI, S. Baker's yeast as a reagent in organic synthesis. **Synthesis**, v. 1, p. 1-25, 1990.

SHELDON, R. A.; PELT, S. Enzyme immobilisation in biocatalysis: why, what and how. **Chemical Society Reviews**, v. 42, n. 15, p. 6223-6235, 2013.

SHIEH, W.; GOPALAN, A. S.; SIH, C. J. Stereochemical control of yeast reductions. 5. characterization of the oxidoreductases involved in the reduction of beta-keto esters, **Journal of the American Chemical Society**, v. 107, n. 10, p. 2993-2994, 1985.

SHIMODA, K.; KUBOTA, N.; HAMADA, H. Asymmetric reduction of α,β -unsaturated carbonyl compounds with reductases from *Nicotiana tabacum*. **Tetrahedron: Asymmetry**, v.15, n. 15, p. 2443–2446, 2004.

SHIN, Y.; FOURNIER, J.-H., BRUCKNER, A.; MADIRAJU, C.; BALACHANDRAN, R.; RACCOR, B. S.; EDLER, M. C.; HAMEL, E.; SIKORSKI, R. P.; VOGT, A.; DAY, B. W.; CURRAN, D. P. Synthesis and biological evaluation of (–)-dictyostatin and stereoisomers. **Tetrahedron**, v. 63, n. 35, p. 8537–8562, 2007.

SIGMA ALDRICH, **Product information sheet Amberlite®XAD7HP**. Disponível em: <<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/xad7?lang=pt®ion=BR>>. Acesso em: 27 de março de 2015.

SIKKEMA, J.; WEBER, F. J.; HEIPIEPER, H. J.; BONT, J. A. M. Cellular toxicity of lipophilic compounds: mechanisms, implications, and adaptations. **Biocatalysis**, v. 10, n. 1-4, p. 113-122, 1994.

SILVA, V. D.; STAMBUK, B. U.; NASCIMENTO, M. G. Efficient chemoselective biohydrogenation of 1,3-diaryl-2-propen-1-ones catalyzed by *Saccharomyces cerevisiae* yeasts in biphasic system. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 63, n. 3-4, p. 157-163, 2010.

SILVA, V. D.; STAMBUK, B. U.; NASCIMENTO, M. G. Asymmetric reduction of (4*R*)-(–)-carvone catalyzed by baker's yeast in aqueous mono- and biphasic systems. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 77, p. 98-104, 2012.

SILVERMAN, R. B. **The Organic Chemistry of Drug Design and Drug Action**, San Diego: Academic Press, 1992.

SILVERMAN, R. B. **The Organic Chemistry of Enzyme-Catalyzed Reactions**, San Diego: Academic Press, 2. ed., 2002.

SIMPSON, H. D.; ALPHAND, V.; FURSTOSS, R. Microbiological transformations 49. Asymmetric biocatalysed Bayer-Villiger oxidation: improvement using a recombinant *Escherichia coli* whole cell biocatalyst in the presence of an adsorbent resin. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 16, n.2, p. 101-108, 2001.

SINHA, S. C.; KEINAN, E., Catalytic Antibodies in Organic Synthesis. Asymmetric Synthesis of (–)- α -Multistriatin. **Journal of the American Chemical Society**, v. 117, n. 12, p. 3653-3654, 1995.

SMITH, A. B.; FREEZE, S. (+)-Discodermolide: total synthesis, construction of novel analogues, and biological evaluation. **Tetrahedron**, v. 64, n. 2, p. 261-298, 2008.

SMITH, S. W. Chiral Toxicology: It's the Same Thing...Only Different. **Toxicological Science**, v. 110, n.1, p. 4-30, 2009.

SOLANO, D. M.; HOYOS, P.; HERNÁIZ, M. J.; ALCÁNTARA, A. R.; SÁNCHEZ-MONTERO, J. M. Industrial biotransformations in the synthesis of building blocks leading to enantiopure drugs. **Bioresource Technology**, v. 115, p. 196-207, 2012.

SOLOMONS, T. W. G.; FRYHLE, C. B. **Química Orgânica**, Rio de Janeiro: LTC, v. 1,7.ed., 2001.

STRAATHOF, A. J. J.; PANKE, S.; SCHMID, A. The production of fine chemicals by biotransformations. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 13, n. 6, p. 548-556, 2002.

STUERMER, R.; HAUER, B.; HALL, M.; FABER, K. Asymmetric bioreduction of activated C=C bonds using enoate reductases from the old yellow enzyme family. **Current Opinion in Chemical Biology**, v.11, n. 2, p. 203–213, 2007.

TEIXEIRA, V. G.; COUTINHO, F. M. B.; GOMES, A. S. Principais métodos de caracterização da porosidade de resinas à base de divinilbenzeno. **Química Nova**, v. 24, n. 6, p. 808-818, 2001.

TOOGOOD, H. S.; GARDINER, J. M.; SCRUTTON, N. S. Biocatalytic reductions and chemical versatility of the old yellow enzyme family of flavoprotein oxidoreductases. **ChemCatChem**, v. 2, n. 8, p. 892–914, 2010.

TOOGOOD, H. S.; SCRUTTON, N. S. New developments in 'ene'-reductase catalysed biological hydrogenations. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 19, p. 107–115, 2014.

TORRELO, G.; HANEFELD, U.; HOLLMAN, F. Biocatalysis. **Catalysis Letters**, v. 145, n. 1, p. 309-345, 2015.

TRIGGLE, D. J. Stereoselectivity of drug action. **Drug Discovery Today**, v. 2, n. 4, 138-147, 1997.

UPPADA, V.; BHADURI, S.; NORONHA, S. B. Cofactor regeneration –an important aspect of biocatalysis. **Current Science**, v. 106, n. 7, p. 946-957, 2014.

van DEURSEN, R.; STAMPFER, W.; EDEGGER, K.; FABER, K.; KROUTIL, W. Chemo- and stereo-selective biocatalytic reduction of, α,β -unsaturated ketones employing a chemo-tolerant ADH from *Rhodococcus ruber* DSM 44541. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 31, n. 4-6, p. 159-163, 2004.

VERMUE, M.; SIKKEMA, J.; VERHEUL, A.; BAKKER, R.; TRAMPER, J. Toxicity of homologous series of organic solvents for the gram-positive bacteria *Arthrobacter* and *Nocardia* Sp. and the gram-negative bacteria *Acinetobacter* and *Pseudomonas* Sp. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 42, n. 6, p. 747-758, 1993.

VOLPÉ, G.; MALLET, V. N. Recovery of fenitrothion from water using Amberlite resin XAD-7. **Journal of Chromatography A**, v. 177, n. 2, p. 385-389, 1979.

WACKETT, L. P.; HERSHBERGER, C. D. **Biocatalysis and Biodegradation: Microbial transformation of Organic Compounds**, Washington D. C. : ASM Press, 2001.

WANDREY, C.; LIESE, A.; KIHUMBU, D. Industrial Biocatalysis: Past, Present, and Future, **Organic Process Research & Development**, v. 4, n. 4, p. 286-290, 2000.

WANG, W.; ZONG, M.-H.; LOU, W.-Y. Use of an ionic liquid to improve asymmetric reduction of 4'-methoxyacetophenone catalyzed by immobilized *Rhodotorula* sp. AS2.2241 cells, **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 56, n. 1, p. 70-76, 2009.

WEIJERS, C. A. G. M.; LITJENS, M. J. J.; BONT, J. A. M. Synthesis of optically pure 1,2-epoxypropane by microbial asymmetric reduction of chloroacetone. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 38, n. 3, p. 297-300, 1992.

WINKLER, C. K. , TASNÁDI, G., CLAY, D., HALL, M., FABER, K. Asymmetric bioreduction of activated alkenes to industrially relevant optically active compounds. **Journal of Biotechnology**, v. 162, n. 4, p. 381–389, 2012

WOODLEY, J. M. New opportunities for biocatalysis: making pharmaceutical processes greener. **Trends in Biotechnology**, v. 26, n. 6, p. 321-327, 2008.

YAMADA, H.; SHIMIZU, S. Microbial and enzymatic processes for the production of biologically and chemically useful compounds. **Angewandte Chemie-International Edition in English**, v. 27, n. 5, p. 622-642, 1988.

YANG, Z.-H.; YAO, S.-J.; GUAN, Y.-X. A complex process of asymmetric synthesis of β -hydroxy ester by baker's yeast accompanied by resin adsorption. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 44, n. 15, p. 5411-5416, 2005.

ZAGOZDA, M.; PLENKIEWICZ, J. Enantioselective reduction of α,β -unsaturated ketones by *Geotrichum candidum*, *Mortierella isabellina* and *Rhodotorula rubra* yeast. **Tetrahedron: Asymmetry**, v. 17, n. 13, p. 1958–1962, 2006.

ZAKS, A. Industrial biocatalysis. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 5, n. 2, p. 130–136, 2001.

ZHANG, M.; MELOUK, H. A.; CHENAULT, K.; RASSI, Z. Determination of cellular carbohydrates in peanut fungal pathogens and baker's yeast by capillary electrophoresis and electrochromatography. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, n. 11, p. 5265–5269, 2001.

ZHANG, B.-L.; PIONNIER, S. Cofactor recycling mechanism in asymmetric biocatalytic reduction of carbonyl compounds mediated by yeast: which is the efficient electron donor? **Chemistry - A European Journal**, v. 9, n. 15, p. 3604-3610, 2003.

ZHENG, G.-W.; XU, J.-H. New opportunities for biocatalysis: driving the synthesis of chiral chemicals. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 22, n. 6, p. 784–792, 2011.

6. Parte experimental

6. PARTE EXPERIMENTAL

6.1. Materiais e Métodos

6.1.1. Reagente e solventes

Quando necessário, os reagentes e solventes empregados nas reações foram adequadamente purificados e tratados de acordo com técnicas presentes na literatura (PERRIN; ARMAREGO; PERRIN, 1980). Os demais reagentes foram obtidos comercialmente e utilizados sem prévia purificação.

As soluções saturadas de cloreto de sódio e bicarbonato de sódio, assim como as soluções básicas de hidróxido de sódio (25% m/v) foram utilizadas para extração de alguns produtos.

Utilizou-se a levedura *Saccharomyces cerevisiae* na forma liofilizada, disponível comercialmente, da marca Sigma Aldrich e na forma de fermento de pão adquirido em supermercados (marcas: Dona Benta, Fleishmann fresco e seco, Dr. Oetker).

A resina Amberlite empregada nas reações de biorredução é do tipo Amberlite XAD7HP da marca Sigma Aldrich.

A levedura *Pichia kluyveri* foi cedida pelo Prof. José Augusto Rosário Rodrigues e a linhagem denominada Cocal foi doada pela Usina Cocal, produtora de açúcar, etanol e energia elétrica, e consistia em um caldo em processo de fermentação contendo as linhagens CAT-1 e PE-2 de *Saccharomyces cerevisiae*.

6.1.2. Cromatografia em camada delgada, em coluna e em camada delgada preparativa

As reações e purificações foram acompanhadas por cromatografia em camada delgada (CCD). As análises de CCD foram realizadas em cromatoplasmas Fluka Analytical de sílica gel com indicador fluorescente em 254 nm. Essas foram reveladas em uma câmara sob luz ultravioleta ($\lambda = 254$ nm) e também com solução de vanilina e de anisaldeído.

As cromatografias em colunas (CC) foram realizadas com sílica gel flash 60, 230-400 mesh (40-63 μm) da marca Merck e sílica clássica, 70-230 mesh (63-200 μm).

As placas cromatográficas em camada delgada preparativa (CCDP) foram preparadas com sílica gel 60 PF₂₅₄, com 1 mm de espessura e sobre placas de vidro 20 x 20 cm.

Como fase móvel, utilizou-se mistura de solventes adequados.

6.1.3. Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas

As análises por cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massas (CG-EM) foram realizadas em um cromatógrafo gasoso Shimadzu, modelo QP2010, com injetor automático AOC-5000. O sistema operou com fonte de impacto de elétrons (70 eV). Utilizou-se uma coluna DB-5 MS (30 m x 0,25 mm x 25 µm) da marca J&W Scientific. Os fragmentos foram representados em suas unidades de massa e carga (m/z) e a abundância relativa para os principais fragmentos estão descritas em porcentagem (%) em relação ao pico base. As condições de análise para os compostos foram:

Método 1: Gás de arraste: Hélio; Temperatura do injetor: 250 °C; Temperatura da fonte de íons: 250 °C; Temperatura da interface: 290 °C; Programação: 70 °C (5 min), 70 – 140 °C (3 °C/min), 140 °C (10 min), 140 – 250 °C (15 °C/min), 250°C (5 min); Pressão total da coluna: 69,5 kPa; Fluxo da coluna: 1,10 mL/min.

Além disso, para os produtos quirais e padrões racêmicos também foram feitas análises de cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas equipada com a coluna quiral BETA DEXTM120 da marca Supelco (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm). Os métodos foram selecionados de acordo com a melhor eficiência e resolução dos picos. Foram eles:

Método 2: Gás de arraste: Hélio; Temperatura do injetor: 220 °C; Temperatura da fonte de íons: 220 °C; Temperatura da interface: 220 °C; Programação: 60 °C, 60 – 100 °C (2 °C/min), 100 °C (2 min), 100 – 150 °C (0,5 °C/min); 150 – 180 °C (10 °C/min), 180°C (2 min); Pressão total da coluna: 65,4 kPa; Fluxo da coluna: 1,10 mL/min.

Método 3: Gás de arraste: Hélio; Temperatura do injetor: 220 °C; Temperatura da fonte de íons: 220 °C; Temperatura da interface: 220 °C; Programação: 90 °C, 90 – 100 °C (2 °C/min), 100 – 150 °C (1 °C/min); 150 – 190 °C (4 °C/min), 190 °C (10 min); Pressão total da coluna: 75 kPa; Fluxo da coluna: 1,07 mL/min.

Método 4: Gás de arraste: Hélio; Temperatura do injetor: 220 °C; Temperatura da fonte de íons: 220 °C; Temperatura da interface: 220 °C; Programação: 60 °C, 60 – 100 °C (2 °C/min), 100°C (2 min), 100 – 150 °C (0,5 °C/min); 150 – 190 °C (10 °C/min), 190 °C (6 min); Pressão total da coluna: 65,4 kPa; Fluxo da coluna: 1,10 mL/min.

6.1.4. Cromatografia gasosa com detector por ionização de chama equipada com coluna quirral

As análises cromatográficas dos padrões racêmicos e dos produtos quirais para o cálculo dos excessos enantioméricos foram feitas utilizando um equipamento da marca Shimadzu, modelo GC-2014 com injetor automático AOC-20i equipado com coluna quirral (CG-FID-quiral). A coluna utilizada foi a BETA DEXTM120 da marca Supelco (30 m x 0,25 mm x 0,25 μ m).

De acordo com a melhor resolução e eficiência dos picos, três métodos foram empregados para análise dos produtos biorreduzidos. Abaixo encontram-se as condições utilizadas em cada um desses métodos:

Método 5: Gás de arraste: Nitrogênio; Temperatura do injetor: 220 °C; Temperatura do detector: 300 °C; Programação: 60 °C, 60 – 100 °C (2 °C/min), 100 °C (2 min), 100 – 150 °C (0,5 °C/ min), 150 – 180 °C (10°C/ min), 180°C (2 min); Pressão total da coluna: 83,4 kPa; Fluxo da coluna: 1,04 mL/min.

Método 6: Gás de arraste: Nitrogênio; Temperatura do injetor: 220 °C; Temperatura do detector: 300 °C; Temperatura do forno: 90 °C, 90 – 100 °C (2 °C/min), 100 – 150 °C (1 °C/ min), 150 – 190 °C (4 °C/ min); Pressão total da coluna: 97,8 kPa; Fluxo da coluna: 1,10 mL/min.

Método 7: Gás de arraste: Nitrogênio; Temperatura do injetor: 220 °C; Temperatura do detector: 300 °C; Temperatura do forno: 60 °C, 60 – 100 °C (2 °C/min), 100 °C (2 min), 100 – 150 °C (0,5 °C/ min), 150 – 190 °C (10 °C/ min) (10 min); Pressão total da coluna: 83,4 kPa; Fluxo da coluna: 1,04 mL/min.

6.1.5. Cromatografia em fase gasosa com detector por ionização de chama

A cromatografia em fase gasosa (CG-FID) foi realizada utilizando-se um cromatógrafo gasoso modelo GC-2014 da marca Shimadzu, com injetor automático AOC-20i, equipado com coluna RTX-1 da marca Restek. Essas análises auxiliaram no acompanhamento reacional e verificação da pureza dos compostos.

6.1.6. Espectrometria de ressonância magnética nuclear

Os espectros de ressonância magnética nuclear (RMN) foram obtidos em espectrômetro de 400 e 500 MHz para ^1H e 100 e 125 para ^{13}C em espectrômetros Bruker (DRX-400 e DRX-500) no Departamento de Química - FFCLRP. O solvente utilizado para solubilizar as amostras foi o CDCl_3 , usando como padrão interno tetrametilsilano (TMS) ou na ausência deste, utilizou-se como referência o sinal do CDCl_3 em 7,27 ppm para os espectros de RMN ^1H . Nos espectros de ^{13}C , o sinal central do tripleto do solvente CDCl_3 foi utilizado como referência em 77 ppm. Os espectros de RMN de ^{13}C também foram interpretados com o auxílio da técnica DEPT-135, na qual os sinais referentes aos grupos CH_3 e CH apresentaram sinal positivo (+), CH_2 demonstrou sinal negativo (-) e o sinal foi ausente para carbono quaternário C_0 .

Os deslocamentos químicos (δ) estão representados em parte por milhão (ppm) em relação às referências internas. Entre parênteses estão representadas as multiplicidades indicadas por s = simpleto, sl = simpleto largo, d = duplete, dl = duplete largo, dd = duplo duplete, ddd = duplo duplo duplete, t = tripleto, td = triplo duplete, q = quarteto, q ap. = quarteto aparente, m = multiplete, as constantes de acoplamento (J) em Hertz (Hz) e o número de hidrogênios deduzidos na integração relativa.

Os experimentos de NOEDIFF foram realizados no espectrômetro Bruker DRX-500.

6.1.7. Espectrometria de massas de alta resolução

Os espectros de massas de alta resolução (EMAR) foram adquiridos em um aparelho LC-MS - Bruker Daltonics, modelo MicroTOF QII, com detector ESI-TOF, equipado com uma fonte de ionização por *electrospray* e um analisador *time of flight*. Os espectros foram obtidos operando no modo positivo, resultando nos íons $[\text{M}+\text{H}]^+$ e $[\text{M}+\text{Na}]^+$.

6.1.8. Rotação óptica

As medidas de rotação óptica $[\alpha]_D^T$ foram feitas utilizando um polarímetro Jasco P-2000, equipado com lâmpada de sódio, operando com $\lambda=589$ nm, com temperatura de 23 a 27 °C, usando uma cela de caminho óptico de 0,5 dm. As amostras foram diluídas em CHCl_3 grau espectroscópico e as concentrações estão apresentadas em g/ 100 mL.

6.1.9. Espectrofotometria no infravermelho

Os espectros de absorção na região do infravermelho (IV) foram obtidos em um espectrofotômetro modelo IR-Prestige-21 da marca Shimadzu com transformada de Fourier. As amostras líquidas solúveis em clorofórmio ou diclorometano foram solubilizadas em um desses solventes e gotejadas sobre uma janela de cristal de KBr, posteriormente, o solvente foi evaporado e formou-se um filme de amostra. As frequências de absorção estão representadas em cm^{-1} .

6.1.10. Espectrofotometria no ultravioleta-visível

Os espectros no ultravioleta (UV-visível) foram obtidos em um espectrofotômetro Gehaka, modelo UV-380G com detector fotodiodo, usando uma cubeta de quartzo de caminho óptico de 1,0 cm. A faixa de varredura dos espectros foi de 400 a 190 nm. O solvente utilizado para o preparo das soluções foi acetonitrila.

6.1.11. Dicroísmo circular

Os espectros de dicroísmo circular foram realizados no espectropolarímetro J-180, Jasco, com sistema de controle interno de temperatura Jasco PTC-423S acoplado ao equipamento, usando uma cubeta de quartzo de caminho óptico de 1,0 cm. A linha de base foi obtida com acetonitrila, o mesmo solvente usado para o preparo das soluções. O sinal final obtido para cada amostra trata-se de uma média do registro de dois espectros, com correção automática de linha de base. As condições de varredura dos espectros foram: faixa de 400 a 200 nm e velocidade de 200 nm/min de modo contínuo.

6.1.12. Ponto de fusão

Os valores de ponto de fusão (p.f.) foram obtidos em um aparelho da Fisatom, modelo 431.

6.1.13. Outros

O crescimento dos micro-organismos e as reações de biorredução foram realizadas em agitação orbital rotativa utilizando incubadora refrigerada shaker de bancada, modelo CT-712-RN a 30 °C.

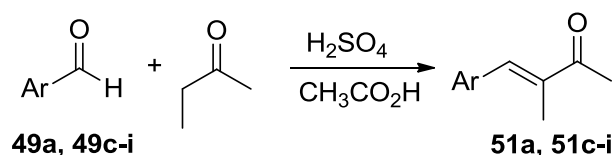
O meio de cultura YMA (extrato de levedura, malte e ágar) foi esterilizado em autoclave vertical Phoenix (120 °C por 15 minutos) e a levedura *Pichia kluyveri* foi manipulada sob condições assépticas em uma capela de fluxo laminar da marca Pachane.

Os tampões foram preparados utilizando os sais NaH₂PO₄ e K₂HPO₄ e o pH foi determinando por meio do pHmetro da marca Gehaka, modelo PG1800.

6.2. Procedimentos Experimentais

6.2.1. Preparação dos substratos

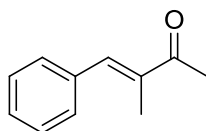
6.2.1.1. Preparação compostos carbonílicos α,β -insaturados 51a, 51c-i (Adaptada de LU; BOLM, 2008).



Em um balão de 50 mL, munido de agitação magnética e sob atmosfera de N₂, foram adicionados ácido acético glacial (10 mL), 2-butanona (50,0 mmol) e o aldeído (25 mmol) correspondente. Em seguida, sobre essa solução em agitação, adicionou-se lentamente H₂SO₄ (2,4 g). A mistura reacional foi mantida à temperatura ambiente por 4 horas. Após esse período, adicionou-se água (50 mL), neutralizou-se com NaOH (25%) e extraiu-se com acetato de etila (3 X 50 mL). A fase orgânica foi lavada com solução aquosa de NaHCO₃ (20 mL), uma solução saturada de NaCl (20 mL) e seca com MgSO₄ anidro. O solvente foi removido sob pressão reduzida e o produtos purificados em coluna cromatográfica de sílica gel flash com fase móvel hexano/acetato de etila (descrita para cada produto). Os compostos carbonílicos α,β -insaturados obtidos foram caracterizados por CG-EM, RMN de ¹H e ¹³C e a

confirmação da configuração *E* da ligação dupla foi feita por experimentos de NOEDIFF (anexos).

(E)-4-fenil-3-metil-3-buten-2-ona (51a)



Fase móvel: gradiente a partir de hexano puro até hexano/acetato de etila (9:1).

O produto foi obtido como um sólido amarelo em 65% de rendimento (2,59 g). **p.f.** = 34-35 °C.

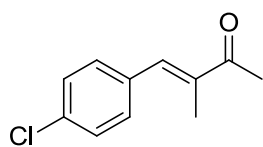
CAS: 42968-14-9

RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 7,53 (q ap., *J* = 1,3 Hz, 1H), 7,44-7,33 (m, 5H), 2,48 (s, 3H), 2,07 (d, *J* = 1,3 Hz, 3H).

RMN de ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 200,3, 139,7, 137,7, 135,8, 129,7, 128,5, 128,4, 25,8, 12,9.

CG-EM *m/z* (abundância relativa %): 160 (43, M⁺), 159 (72), 145 (26), 117 (84), 116 (24), 115 (100), 91 (43), 43 (67).

(E)- 4-(4-clorofenil)-3-metil-3-buten-2-ona (51c)



Fase móvel: gradiente a partir de hexano puro até hexano/acetato de etila (9:1).

O produto foi obtido como um sólido amarelo claro em 50% de rendimento (2,41 g). **p.f.** = 49-50 °C.

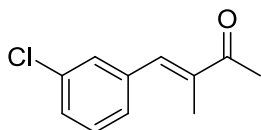
CAS: 69390-20-1

RMN de ¹H (500 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 7,46 (s, 1H), 7,39 (d, *J* = 8,6 Hz, 2H), 7,35 (d, *J* = 8,6 Hz, 2H), 2,46 (s, 3H), 2,03 (s, 3H).

RMN de ¹³C (125 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 199,9, 138,2, 138,1, 134,4, 134,3, 130,9, 128,7, 25,8, 12,9.

CG-EM *m/z* (abundância relativa %): 196 (9, M⁺ + 2), 194 (24, M⁺), 193 (23), 181 (10), 179 (30), 159 (65), 151 (34), 116 (74), 115 (100), 89 (15), 75 (11), 63 (14).

(E)- 4-(3-clorofenil)-3-metil-3-buten-2-ona (51d)



Fase móvel: gradiente a partir de hexano puro até hexano/acetato de etila (8:2).

O produto foi obtido como um óleo alaranjado em 66% de rendimento (3,19 g).

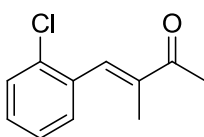
CAS: 69390-23-4

RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 7,44 (sl, 1H), 7,40-7,28 (m, 4H), 2,46 (s, 3H), 2,04 (d, $J = 1,5$ Hz, 3H).

RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 199,9, 138,8, 137,8, 137,6, 134,4, 129,7, 129,4, 128,5, 127,7, 25,8, 12,9.

CG-EM m/z (abundância relativa %): 196 (6, $\text{M}^+ + 2$), 194 (19, M^+), 193 (18), 181 (7), 179 (21), 159 (60), 151 (26), 116 (67), 115 (100), 89 (17), 75 (12), 63 (16).

(E)-4-(2-clorofenil)-3-metil-3-buten-2-ona (51e)



Fase móvel: gradiente a partir de hexano puro até hexano/acetato de etila (8:2).

O produto foi obtido como um óleo amarelo em 48% de rendimento (2,33 g).

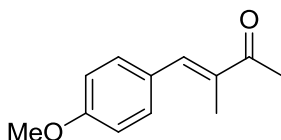
CAS: 1101197-82-3

RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 7,63 (sl, 1H), 7,46-7,43 (m, 1H), 7,37-7,29 (m, 3H), 2,50 (s, 3H), 1,94 (d, $J = 1,5$ Hz, 3H).

RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 200,1, 139,1, 136,5, 134,2, 133,9, 130,4, 129,6, 129,5, 126,4, 25,8, 12,8.

CG-EM m/z (abundância relativa %): 196 (0,4, $\text{M}^+ + 2$), 194 (1, M^+), 193 (1), 179 (1), 160 (12), 159 (100), 151 (5), 116 (25), 115 (36), 89 (7), 75 (4), 63 (6).

(E)-3-metil-4-(4-metoxifenil)-3-buten-2-ona (51f)



Fase móvel: gradiente a partir de hexano puro até hexano/acetato de etila (7:3).

O produto foi obtido como um óleo amarelo em 55% de rendimento (2,60g).

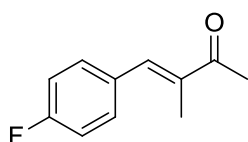
CAS: 69390-19-8

RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 7,48 (sl, 1H), 7,42 (d, $J = 8,9$ Hz, 2H), 6,95 (d, $J = 8,9$ Hz, 2H), 3,85 (s, 3H), 2,45 (s, 3H), 2,08 (d, $J = 1,3$ Hz, 3H).

RMN de ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 200,2, 159,9, 139,6, 135,8, 131,5, 128,4, 113,9, 55,3, 25,7, 12,9.

CG-EM m/z (abundância relativa %): 190 (44, M^+), 189 (30), 176 (6), 175 (51), 159 (42), 147 (60), 146 (22), 132 (22), 131 (28), 121 (7), 117 (22), 116 (17), 115 (54), 107 (13), 104 (23), 103 (46), 102 (15), 91 (100), 89 (17), 78 (36), 77 (53), 63 (27), 51 (34).

(E)-4-(4-fluorofenil)-3-metil-3-buten-2-ona (51g)



Fase móvel: gradiente a partir de hexano puro até hexano/acetato de etila (8:2).

O produto foi obtido como um óleo marrom em 81% de rendimento (3,61g).

RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 7,48 (sl, 1H), 7,44-7,39 (m, 2H), 7,14-7,08 (m, 2H), 2,46 (s, 3H), 2,04 (d, $J = 1,3$ Hz, 3H).

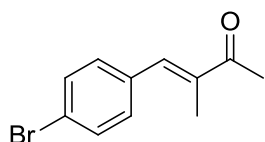
RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 200,1, 162,5 (d, $^1J_{\text{C-F}} = 249,6$ Hz), 138,4, 137,5, 131,9 (d, $^4J_{\text{C-F}} = 3,7$ Hz), 131,6 (d, $^3J_{\text{C-F}} = 8,1$ Hz), 115,5 (d, $^2J_{\text{C-F}} = 22$ Hz), 25,8, 12,9.

CG-EM m/z (abundância relativa %): 178 (43, M^+), 177 (48), 163 (49), 135 (100), 133 (67), 115 (59), 109 (36), 83 (16).

IV (KBr) cm^{-1} : 2993, 2922, 1666, 1599, 1508, 1438, 1365, 1226, 1162, 832.

EMAR-ESI m/z calculado para $\text{C}_{11}\text{H}_{11}\text{FO}$ $[\text{M} + \text{H}]^+$: 179,0867; encontrado 179,0870.

(E)-4-(4-bromofenil)-3-metil-3-buten-2-ona (51h)



Fase móvel: gradiente a partir de hexano puro até hexano/acetato de etila (8:2).

O produto foi obtido como um sólido amarelo em 61% de rendimento (3,61 g). **p.f.** = 51-53 °C.

CAS: 1341133-98-9

RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 7,55 (d, $J = 8,6$ Hz, 2H), 7,44 (sl, 1H), 7,29 (d, $J = 8,6$ Hz, 2H), 2,46 (s, 3H), 2,03 (d, $J = 1,3$ Hz, 3H).

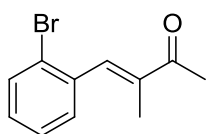
RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 200,0, 138,3, 138,2, 134,7, 131,7, 131,1, 122,7, 25,8, 12,9.

CG-EM m/z (abundância relativa %): 240 (14, $\text{M}^+ + 2$), 239 (14), 238 (14, M^+), 237 (13), 197 (8), 195 (8), 159 (66), 116 (100), 115 (67), 89 (12), 63 (11).

IV (KBr) cm^{-1} : 2971, 2924, 1658, 1622, 1586, 1489, 1359, 1075, 1004, 814.

EMAR-ESI m/z calculado para $\text{C}_{11}\text{H}_{11}\text{BrO}$ $[\text{M} + \text{H}]^+$: 239,0066; encontrado 239,0068.

(E)-4-(2-bromofenil)-3-metil-3-buten-2-ona (51i)



Fase móvel: gradiente a partir de hexano puro até hexano/acetato de etila (9:1).

O produto foi obtido como um óleo alaranjado em 48% de rendimento (2,84 g).

RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 7,64 (d, $J = 8,0$ Hz, 1H), 7,57 (sl, 1H), 7,37-7,32 (m, 2H), 7,23-7,19 (m, 1H), 2,50 (s, 3H), 1,92 (d, $J = 1,0$ Hz, 3H).

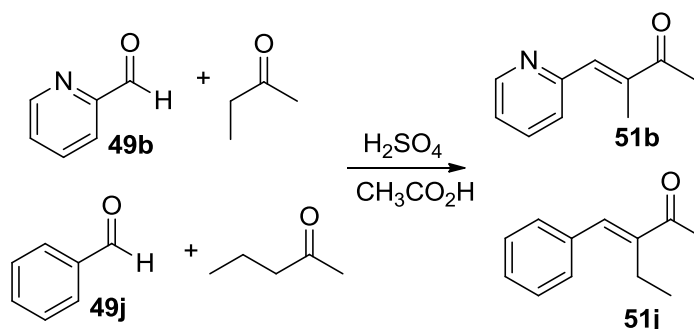
RMN de ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 200,1, 138,9, 138,8, 136,0, 132,7, 130,5, 129,7, 127,1, 124,2, 25,9, 12,7.

CG-EM m/z (abundância relativa %): 240 (1, $\text{M}^+ + 2$), 238 (1, M^+), 159 (100), 116 (43), 115 (33), 89 (9), 63 (8), 43 (36).

IV (KBr) cm^{-1} : 2967, 2922, 1672, 1629, 1471, 1431, 1360, 1243, 1022, 1004, 748.

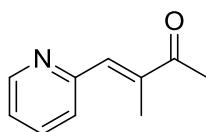
EMAR-ESI m/z calculado para $\text{C}_{11}\text{H}_{11}\text{BrO}$ $[\text{M} + \text{H}]^+$: 239,0066; encontrado 239,0067.

6.2.1.2. Preparação compostos carbonílicos α,β -insaturados 51b e 51j (Adaptada de KAWAI; HAYASHI; TOKITOH, 2001 e LU; BOLM, 2008).



Em um balão, equipado com condensador de refluxo, sob agitação magnética e atmosfera de N₂, foram adicionados ácido acético glacial (36 mL), 2-alkil cetona (50,0 mmol) e o aldeído (25 mmol) correspondente. Em seguida, sobre essa solução em agitação, adicionou-se lentamente H₂SO₄ (3,7 g). A mistura reacional foi mantida sob agitação constante à 50 °C por 24 horas. Após o término da reação, adicionou-se água (50 mL), neutralizou-se com NaOH (25%) e extraiu-se com acetato de etila. A fase orgânica foi lavada com solução aquosa de NaHCO₃ (20 mL), uma solução saturada de NaCl (20 mL) e seca com MgSO₄ anidro. O solvente foi evaporado sob pressão reduzida e os produtos foram purificados em coluna cromatográfica com sílica gel flash e sílica clássica usando como eluente hexano/acetato de etila (descrito para cada produto). Os compostos carbonílicos α,β-insaturados foram caracterizados por CG-EM, RMN de ¹H e ¹³C e a confirmação da configuração *E* da ligação dupla foi feita por experimentos de NOEDIFF (anexos).

(*E*)-3-metil-4-(2-piridil)-3-buten-2-ona (51b)



Fase móvel: gradiente a partir de hexano/acetato de etila (9:1) até hexano/acetato de etila (6:4).

O produto foi obtido como um sólido amarelo claro em 62% de rendimento (2,49 g). **p.f.** = 40-42 °C.

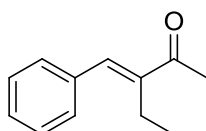
CAS: 169477-90-1

RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 8,71-8,69 (m, 1H), 7,77 (td, *J* = 7,8 Hz, *J* = 1,8 Hz, 1H), 7,53 (q ap., *J* = 1,3 Hz, 1H), 7,47 (dl, *J* = 7,8 Hz, 1H), 7,26 (ddd, *J* = 7,6 Hz, *J* = 4,8 Hz, *J* = 1,1 Hz, 1H), 2,49 (s, 3H), 2,20 (d, *J* = 1,3 Hz, 3H).

RMN de ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 200,6, 154,7, 149,2, 140,7, 137,4, 136,7, 125,6, 122,8, 26,0, 12,9.

CG-EM *m/z* (abundância relativa %): 161 (27, M⁺), 146 (3), 118 (100), 117 (55), 91 (24), 78 (11).

(*E*)-3-etil-4-fenil-3-buten-2-ona (51j)



Fase móvel: gradiente a partir de hexano puro até hexano/acetato de etila (9:1).

O produto foi obtido como um óleo alaranjado em 62% de rendimento (2,69 g).

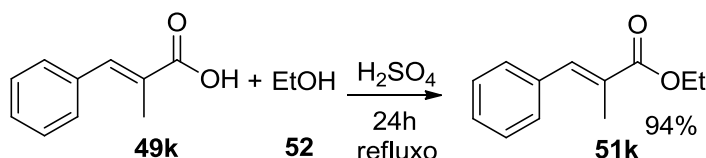
CAS: 69390-24-5

RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 7,48 (s, 1H), 7,43-7,34 (m, 5H), 2,54 (q, $J = 7,3$ Hz, 2H), 2,46 (s, 3H), 1,12 (t, $J = 7,3$ Hz, 3H).

RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 200,1, 144,0, 139,4, 135,7, 129,2, 128,5, 26,1, 19,6, 13,8.

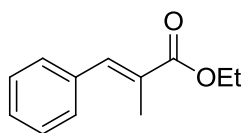
CG-EM m/z (abundância relativa %): 174 (68, M^+), 173 (80), 159 (53), 131 (93), 116 (36), 115 (49), 91 (100), 77 (23), 51 (21).

6.2.1.3. Preparação da olefina ativada 51k (Adaptada de LI; QUAN; ANDERSSON, 2012)



Em um balão de 100 mL, equipado com condensador de refluxo, sob atmosfera de N_2 e agitação magnética, foram adicionados ácido α -metil cinâmico (30 mmol) comercial e etanol (50 mL), seguida pela adição de H_2SO_4 (0,8 mL). A mistura foi aquecida sob refluxo e mantida em agitação por 24 horas. Depois de resfriada, adicionou-se água gelada (50 mL), neutralizou-se com solução saturada de NaHCO_3 e extraiu-se com acetato de etila (3 x 100 mL) e uma solução saturada de NaCl . A fase orgânica foi seca com MgSO_4 anidro. O solvente foi evaporado sob pressão reduzida. Posteriormente, o éster α,β -insaturado foi caracterizado por CG-EM, RMN de ^1H e ^{13}C e a confirmação da configuração *E* da ligação dupla foi feita por experimentos de NOEDIFF (anexos).

(*E*)-3-fenil-2-metil acrilato de etila (51k)



O produto foi obtido como um óleo amarelo claro em 94% de rendimento (5,35 g).

RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 7,70 (q ap., $J = 1,5$ Hz, 1H), 7,41-7,31 (m, 5H), 4,29 (q, $J = 7,2$ Hz, 2H), 2,13 (d, $J = 1,5$ Hz, 3H), 1,36 (t, $J = 7,2$ Hz, 3H).

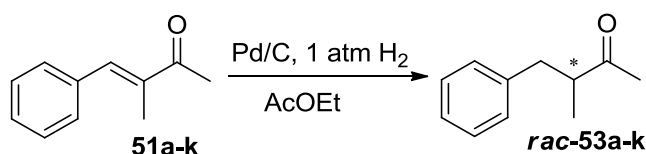
CAS: 7042-33-3

RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 168,7, 138,6, 135,9, 129,6, 128,6, 128,3, 128,2, 60,8, 14,3, 14,0.

CG-EM m/z (abundância relativa %): 190 (45, M^+), 161 (18), 145 (54), 144 (25), 117 (90), 116 (80), 115 (100), 91 (38).

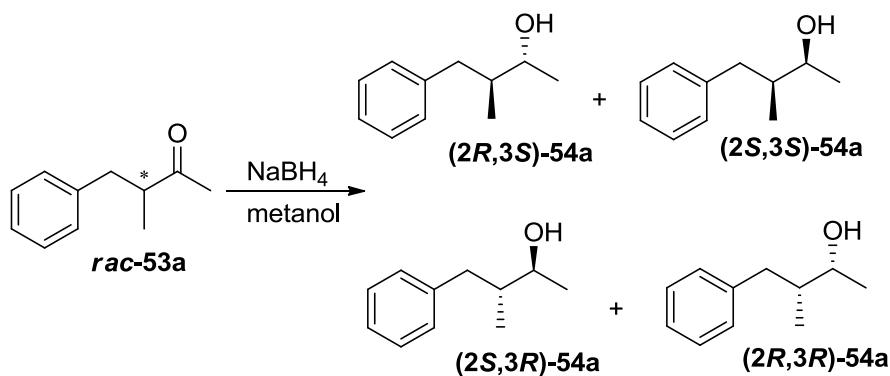
6.2.2. Preparação dos padrões racêmicos

6.2.2.1. Procedimento geral para hidrogenação catalítica (Adaptada de CLOSOSKI et al., 2007)



Em um balão de 25 mL, os compostos carbonílicos α,β -insaturados **51a-k** (0,2 mmol) foram solubilizados em acetato de etila (10 mL) e adicionou-se Pd/C (10%) (10 mg). A reação foi mantida sob 1 atm de H_2 e a temperatura ambiente por 24-48 horas. Ao final da reação, a mistura foi filtrada com celite e sílica gel flash utilizando acetato de etila como solvente. Este foi evaporado sob pressão reduzida e os produtos foram analisados e caracterizados por CG-EM e CG-FID-quiral.

6.2.2.2. Procedimento para redução do composto **rac-53a** com $NaBH_4$



Em um balão volumétrico de 50 mL, munido de agitação magnética e sob atmosfera de N_2 , os composto **rac-53a** (1 mmol) foram solubilizados em metanol (25 mL) e adicionou-se $NaBH_4$ (3 mmol). A reação foi mantida sob agitação por 24 horas a temperatura ambiente. Posteriormente, adicionou-se água (25 mL), a reação foi extraída com acetato de etila (3 x 50 mL) e a fase orgânica foi seca com $MgSO_4$ anidro. O solvente foi removido sob pressão reduzida e os produtos foram analisados e caracterizados por CG-EM e CG-FID-quiral.

A proporção da conversão estimada pelo CG-FID-quiral foi de 56% do isômero *syn-54a* (30% *ee* (**2S**, **3S**)-**54a**, preferencialmente) e 44% do *anti-54a* (7% *ee*, (**2R**, **3S**)-**54a**, preferencialmente).

6.2.3. Reações com os micro-organismos

6.2.3.1. Condições gerais para otimização dos parâmetros reacionais

Em erlenmeyers de 250 mL, contendo a levedura *S. cerevisiae* (1 g), foi adicionado de 25 (sistema bifásico) a 50 mL de água (aquoso) ou tampão previamente aquecidos a 40-42°C. Nos meios reacionais na presença de aditivos foram adicionados glicose (1 g) ou os catalisadores de transferência de fase, brometo de etil hexadecil dimetilamônio (1,4 g) e brometo de N-cetil N,N,N-trimetil amônio (1,2 g). O meio recém preparado foi pré-incubado com agitação rotativa de 130 rpm, à 30 °C por 60 minutos. Decorrido esse tempo, o substrato (0,4 mmol), dissolvido em etanol (1 mL) ou em solvente orgânico (25 mL) (sistema bifásico) ou adsorvido em determinada quantidade de resina Amberlite XAD-7 (0,25 g, 0,5 g, 1 g e 2 g), foi adicionado ao meio reacional pré-incubado. A reação foi mantida nas condições da pré-incubação por um período de 24 horas e o acompanhamento foi feito por meio da retirada de alíquotas periódicas, seguidas de extração e análise em CG-EM para determinação da conversão e em GC-FID-quiral para o cálculo dos excessos enantioméricos.

6.2.3.2. Protocolo geral para o cultivo, crescimento e biorredução com a levedura *Pichia kluyveri*

O meio nutriente e de manutenção do micro-organismo YMA (*yeast, malt, agar*) foi preparado com extrato de levedura (3 g/L), extrato de malte (3 g/L), peptona (5 g/L), glicose (10 g/L), ágar bacteriológico (20 g/L) e água destilada (1 L). Os meios preparados foram autoclavados (15 minutos, 121 °C) e colocados em placas de Petri. Após o esfriamento e endurecimento do meio, os microrganismos foram semeados com o auxílio de uma alça de platina através da técnica de semeadura de esgotamento por estrias. Esse procedimento foi feito em meio estéril (fluxo laminar). As placas foram incubadas em estufa à 30 °C por 24 horas e depois foram armazenadas em geladeira.

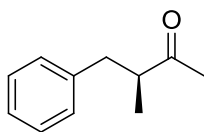
Posteriormente, preparou-se 1 L do meio YM, o qual foi esterilizado em autoclave por 15 minutos a 121 °C. O mesmo foi resfriado a temperatura ambiente e em seguida com uma

alça de platina, uma pequena porção de células foi retirada de uma placa de petri e semeada neste meio. Na sequência, esse meio foi mantido em agitação rotativa por 24 horas (180 rpm, 30 °C). Esse procedimento ocorreu sob condições assépticas e gerou o caldo fermentativo (suspensão celular).

Decorrido esse período, em erlenmeyers de volume adequado, o substrato **51a** (0,4 mmol) dissolvido em 1 mL de etanol foi adicionado em diferentes quantidades (50, 100 ou 200 mL) desse caldo fermentativo como também em 2 ou 3 g de célula úmida, obtida após centrifugação (5000 rpm, 5 min, 15 °C) desse caldo e suspensas em água (50 mL). A mistura foi incubada por 24 horas à 130 rpm e 30 °C. A reação foi acompanhada por meio da retirada de alíquotas periódicas seguidas de extração e análise. Ao final desse período, a mistura foi filtrada e o filtrado foi extraído com acetato de etila. O solvente foi removido sob pressão reduzida. As análises para determinação da conversão foram feitas por CG-EM e o excesso enantiomérico foi calculado por CG-FID-quiral.

6.2.3.3. Biorredução com LSC-II e resina Amberlite XAD-7

Em erlenmeyers de 250 mL, adicionou-se LSC-II (1g) e água (50 mL) previamente aquecidos a 40 - 42°C. O meio recém preparado foi então pré-incubado para ativação em um agitador orbital à 130 rpm e 30 °C por 60 minutos. Paralelamente, em um balão de 100 mL, adicionou-se a resina XAD-7 (0,5 g) e o substrato **51a-k** (0,4 mmol) solubilizado em acetona (2 mL). O solvente foi removido sob pressão reduzida, obtendo-se o substrato adsorvido. Após o tempo de ativação da levedura, o substrato adsorvido na resina foi adicionado ao meio biocatalítico. Após 3 dias de reação, adicionou-se mais LSC-II (1g) para os substratos **51i** e **51j**. A reação foi mantida nas condições de pré-incubação por um período de 8 a 168 horas, conforme a necessidade de cada substrato para sua conversão total. Após o tempo adequado, a resina foi filtrada e lavada com acetato de etila. O filtrado também foi extraído com acetato de etila (3 x 50 mL). Os extratos orgânicos foram combinados e secos com MgSO₄ anidro. O solvente foi evaporado em rotaevaporador e os produtos purificados em coluna cromatográfica com sílica gel flash, sílica clássica e placa preparativa usando como eluente hexano/acetato de etila (descrito para cada produto). Os compostos opticamente ativos obtidos foram analisados e caracterizados por CG-EM e RMN de ¹H e ¹³C e os excessos enantioméricos foram determinados por CG-FID-quiral. Com a finalidade de obtenção de uma maior quantidade de massa, essas reações foram feitas em duplicata.

(S)-4-fenil-3-metil-2-butanona (53a)

Coluna flash; fase móvel: gradiente a partir de hexano puro até hexano/acetato de etila (9:1).

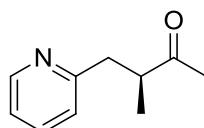
O produto foi obtido como um óleo amarelo claro em 42% de rendimento (54,5 mg). **CG-FID-quiral** - Método 5: [t_R : 56 min (**R-53a**) e 57,7 min (**S-53a**)], 81% *ee*, $[\alpha]_D^{23} = +33,7$ (*c* 1, CHCl₃); lit. (LU; BOLM, 2008) $[\alpha]_D^{23} = +40,7$ (*c* 0,9, CHCl₃, 98% *ee*) (*S*-isômero).

CAS: 21869-55-6

RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 7,31-7,15 (m, 5H), 3,00 (dd, $J = 13,5$ Hz, $J = 6,8$ Hz, 1H), 2,89-2,80 (m, 1H), 2,58 (dd, $J = 13,5$ Hz, $J = 7,6$ Hz, 1H), 2,10 (s, 3H), 1,10 (d, $J = 7,1$ Hz, 3H).

RMN de ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 212,2, 139,6, 128,9, 128,4, 126,2, 48,8, 38,9, 28,9, 16,2.

CG-EM m/z (abundância relativa %): 162 (18, M⁺), 147 (18), 119 (12), 91 (100), 43 (62).

(S)-3-metil-4-(2-piridil)-2-butanona (53b)

Coluna flash, fase móvel: gradiente a partir de hexano/ acetato de etila (6:5) até hexano/acetato de etila (2:3).

O produto foi obtido como óleo marrom em 57% de rendimento (73,9 mg).

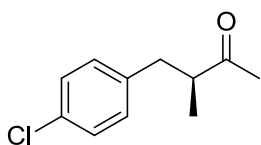
CG-FID-quiral - Método 5: [t_R : 63,4 min (**R-53b**) e 64,4 min (**S-53b**)] 81% *ee*, $[\alpha]_D^{26} = +12,9$ (*c* 1, CHCl₃); lit. (KAWAI; HAYASHI; TOKITOH, 2001) $[\alpha]_D^{30} = +6,5$ (*c* 1,77, EtOH, 49% *ee*) (*S*-isômero).

CAS: 183003-16-9

RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 8,52-8,51 (m, 1H), 7,58 (td, $J = 7,8$ Hz, 1,8 Hz, 1H), 7,10-7,15 (m, 2H), 3,14-3,24 (m, 2H), 2,78-2,71 (m, 1H), 2,17 (s, 3H), 1,12 (d, $J = 7,1$ Hz, 3H).

RMN de ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 212,1, 159,5, 149,2, 136,3, 123,8, 121,3, 46,6, 40,7, 28,7, 16,4.

CG-EM m/z (abundância relativa %): 163 (0,3, M⁺), 148 (30), 120 (100), 93 (45), 92 (28), 79 (13), 78 (15), 43 (34).

(S)-4-(4-clorofenil)-3-metil-2-butanona (53c)

Coluna flash, fase móvel: gradiente a partir de hexano puro até hexano/acetato de etila (9:1).

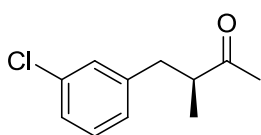
O produto foi obtido como um óleo amarelo claro em 55% de rendimento (86 mg). **CG-FID-quiral** - Método 5: [t_R : 95 min (**R-53c**) e 95,6 min (**S-53c**)], 89% *ee*, $[\alpha]_D^{23} = +25,1$ (*c* 1, CHCl₃); lit. (LU; BOLM, 2008) $[\alpha]_D^{23} = +27,7$ (*c* 0,94, CHCl₃, 99% *ee*) (*S*-isômero).

CAS: 1101197-89-0

RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 7,24 (d, *J* = 8,3 Hz, 2H), 7,08 (d, *J* = 8,3 Hz, 2H), 2,97 (dd, *J* = 13,6 Hz, *J* = 7,1 Hz, 1H), 2,84-2,75 (m, 1H), 2,53 (dd, *J* = 13,6 Hz, *J* = 7,3 Hz, 1H), 2,09 (s, 3H), 1,09 (d, *J* = 7,1 Hz, 3H).

RMN de ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 211,7, 138,1, 132,0, 130,3, 128,5, 48,7, 38,1, 28,9, 16,3.

CG-EM *m/z* (abundância relativa %): 198 (4, M⁺ + 2), 196 (12, M⁺), 181 (14), 153 (10), 127 (35), 125 (100), 117 (11), 115 (18), 91 (10), 89 (31), 63 (19).

(S)-4-(3-clorofenil)-3-metil-2-butanona (53d)

Coluna flash, fase móvel: gradiente a partir de hexano puro até hexano/acetato de etila (9:1).

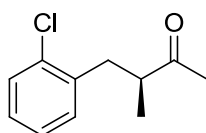
O produto foi obtido como um óleo incolor em 54% de rendimento (84,5 mg). **CG-FID-quiral** - Método 5: [t_R : 90,3 min (**R-53d**) e 90,9 min (**S-53d**)], 93% *ee*, $[\alpha]_D^{23} = +20,2$ (*c* 1, CHCl₃); lit. (LU; BOLM, 2008) $[\alpha]_D^{21} = +22,6$ (*c* 0,9, CHCl₃, 98% *ee*) (*S*-isômero).

CAS: 183003-14-7

RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 7,23-7,15 (m, 3H), 7,05-7,02 (m, 1H), 2,99 (dd, *J* = 13,6 Hz, *J* = 6,8 Hz, 1H), 2,86-2,77 (m, 1H), 2,52 (dd, *J* = 13,6 Hz, *J* = 7,6 Hz, 1H), 2,11 (s, 3H), 1,10 (d, *J* = 7,1 Hz, 3H).

RMN de ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 211,5, 141,8, 134,1, 129,6, 128,9, 127,2, 126,4, 48,5, 38,3, 28,8, 16,3.

CG-EM *m/z* (abundância relativa %): 198 (10, M⁺ + 2), 196 (30, M⁺), 181 (22), 153 (19), 127 (34), 125 (100), 117 (14), 115 (21), 91 (12), 89 (29), 63 (15).

(S)-4-(2-clorofenil)-3-metil-2-butanona (53e)

Coluna flash, fase móvel: gradiente a partir de hexano puro até hexano/acetato de etila (9:1).

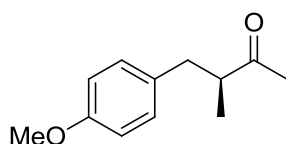
O produto foi obtido como um óleo amarelo em 52% de rendimento (81 mg). **CG-FID-quiral** - Método 5: [t_R : 78,7 min (**R-53e**) e 79,6 min (**S-53e**)], 96% *ee*, $[\alpha]_D^{23} = +46,0$ (*c* 1, CHCl₃); lit. (LU; BOLM, 2008) $[\alpha]_D^{21} = +44,9$ (*c* 1,1, CHCl₃, 98% *ee*) (*S*-isômero).

CAS: 1101197-87-8

RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 7,37-7,33 (m, 1H), 7,19-7,14 (m, 3H), 3,13 (dd, *J* = 13,6 Hz, *J* = 6,4 Hz, 1H), 3,02-2,93 (m, 1H), 2,65 (dd, *J* = 13,6 Hz, *J* = 7,8 Hz, 1H), 2,13 (s, 3H), 1,10 (d, *J* = 7,0 Hz, 3H).

RMN de ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 211,9, 137,3, 134,0, 131,5, 129,6, 127,8, 126,7, 46,5, 36,5, 28,9, 16,0.

CG-EM *m/z* (abundância relativa %): 198 (0,4, M⁺ + 2), 196 (1, M⁺), 181 (12), 161 (74), 153 (8), 127 (35), 125 (100), 117 (13), 115 (23), 91 (13), 89 (20), 63 (12).

(S)-3-metil-4-(4-metoxifenil)-2-butanona (53f)

Coluna flash, fase móvel: gradiente a partir de hexano puro até hexano/acetato de etila (9:1).

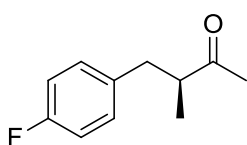
O produto foi obtido como um óleo alaranjado em 54% de rendimento (83 mg). **CG-FID-quiral** - Método 7: [t_R : 107,6 min (**R-53f**) e 108,3 min (**S-53f**)], 76% *ee*, $[\alpha]_D^{23} = +30,4$ (*c* 1, CHCl₃); lit. (LU; BOLM, 2008) $[\alpha]_D^{23} = +42,1$ (*c* 1,1, CHCl₃, 98% *ee*) (*S*-isômero).

CAS: 169477-94-5

RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 7,07 (d, *J* = 8,8 Hz, 2H), 6,82 (d, *J* = 8,8 Hz, 2H), 3,78 (s, 3H), 2,93 (dd, *J* = 13,6 Hz, *J* = 6,8 Hz, 1H), 2,83-2,75 (m, 1H), 2,52 (dd, *J* = 13,6 Hz, *J* = 7,6 Hz, 1H), 2,08 (s, 3H), 1,08 (d, *J* = 6,8 Hz, 3H).

RMN de ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 212,4, 157,9, 131,6, 129,8, 113,7, 55,2, 48,9, 38,0, 28,9, 16,1.

CG-EM *m/z* (abundância relativa %): 192 (10, M⁺), 121 (100), 91 (8), 77 (10).

(S)-4-(4-fluorofenil)-3-metil-2-butanona (53g)

Coluna flash, fase móvel: gradiente a partir de hexano puro até hexano/acetato de etila (9:1).

O produto foi obtido como um óleo amarelo em 39% de rendimento (56 mg). **CG-FID-quiral** - Método 6: [t_R : 32,6 min (**R-53g**) e 33 min (**S-53g**)], 85% *ee*, $[\alpha]_D^{23} = +24,1$ (*c* 1, CHCl₃) (*S*-isômero).

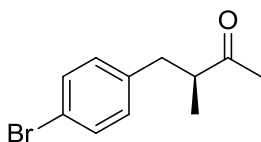
RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 7,13-7,10 (m, 2H), 7,0-6,94 (m, 2H), 2,97 (dd, $J = 13,6$ Hz, $J = 6,8$ Hz, 1H), 2,85-2,76 (m, 1H), 2,55 (dd, $J = 13,6$ Hz, $J = 7,6$ Hz, 1H), 2,10 (s, 3H), 1,10 (d, $J =$ Hz, 3H).

RMN de ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 211,9, 135,3 (d, $^4J_{C-F} = 2,9$ Hz), 130,3 (d, $^3J_{C-F} = 7,3$ Hz), 115,2 (d, $^2J_{C-F} = 21,2$ Hz), 48,9, 37,9, 28,9, 16,3.

CG-EM m/z (abundância relativa %): 180 (16, M⁺), 165 (19), 137 (11), 109 (100), 83 (12).

IV (KBr) cm⁻¹: 2916, 2846, 1714, 1601, 1508, 1456, 1359, 1224, 1163, 823.

EMAR-ESI m/z calculado para C₁₁H₁₃FO [M + H]⁺: 181,1023; encontrado 181,1026.

(S)-4-(4-bromofenil)-3-metil-2-butanona (53h)

Coluna flash, fase móvel: gradiente a partir de hexano puro até hexano/acetato de etila (9:1).

O produto foi obtido como um óleo amarelo em 67% de rendimento (128,1 mg). **CG-FID-quiral** - Método 7: [t_R : 116 min (**R-53h**) e 116,6 min (**S-53h**)], 83% *ee*, $[\alpha]_D^{23} = +16,7$ (*c* 1, CHCl₃) (*S*-isômero).

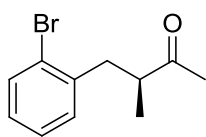
RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 7,40 (d, $J = 8,3$ Hz, 2H), 7,03 (d, $J = 8,3$ Hz, 2H), 2,95 (dd, $J = 13,6$ Hz, $J = 7,10$ Hz, 1H), 2,84-2,75 (m, 1H), 2,52 (dd, $J = 13,6$ Hz, $J = 7,6$ Hz, 1H), 2,09 (s, 3H), 1,09 (d, $J = 7,1$ Hz, 3H).

RMN de ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 211,6, 138,7, 131,5, 130,7, 120,1, 48,6, 38,1, 28,9, 16,3.

CG-EM m/z (abundância relativa %): 242 (30, M⁺ + 2), 240 (31, M⁺), 227 (29), 225 (29), 199 (14), 197 (15), 171 (97), 169 (100), 91 (25), 90 (50), 89 (42), 77 (20), 63 (25).

IV (KBr) cm⁻¹: 2968, 2930, 1709, 1490, 1460, 1357, 1072, 1012, 798.

EMAR-ESI m/z calculado para C₁₁H₁₃BrO [M + H]⁺: 241,0222; encontrado 241,0221.

(S)-4-(2-bromofenil)-3-metil-2-butanona (53i)

Coluna flash, fase móvel: gradiente a partir de hexano puro até hexano/acetato de etila (9:1).

O produto foi obtido como um óleo amarelo claro em 57% de rendimento (109,5 mg). **CG-FID-quiral** - Método 7: [t_R : 54,7 min (**R-53i**) e 55,2 min (**S-53i**)], 92% *ee*, $[\alpha]_D^{27} = +35,4$ (*c* 1, CHCl₃) (*S*-isômero).

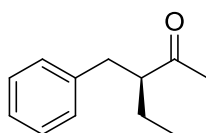
RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 7,54 (dd, $J = 8,0$ Hz, $J = 1,2$ Hz, 1H), 7,24-7,17 (m, 2H), 7,10-7,06 (m, 1H), 3,14 (dd, $J = 13,4$ Hz, $J = 6,6$ Hz, 1H), 3,04-2,95 (m, 1H), 2,65 (dd, $J = 13,4$ Hz, $J = 7,6$ Hz, 1H), 2,13 (s, 3H), 1,10 (d, $J = 7,10$ Hz, 3H).

RMN de ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 211,8, 138,9, 132,9, 131,6, 128,0, 127,3, 124,5, 46,5, 38,9, 28,9, 16,0.

CG-EM *m/z* (abundância relativa %): 171 (26), 169 (27), 161 (60), 119 (20), 115 (19), 91(16), 90 (13), 89 (14), 43 (100).

IV (KBr) cm⁻¹: 2971, 2930, 1712, 1470, 1438, 1359, 1160, 1022, 750.

EMAR-ESI *m/z* calculado para C₁₁H₁₃BrO [M + Na]⁺: 263,0041; encontrado 263,0041.

(S)-3-benzil-2-pentanona (53j)

Coluna clássica, fase móvel: gradiente a partir de hexano puro até hexano/acetato de etila (9:1).

O produto foi obtido como um óleo amarelo claro em 20% de rendimento (27,7 mg). **CG-FID-quiral** - Método 5: [t_R : 65,2 min (**R-53j**) e 65,8 min (**S-53j**)], 98% *ee*, $[\alpha]_D^{26} = +26,4$ (*c* 0,7 CHCl₃); lit. (LU; BOLM, 2008) $[\alpha]_D^{23} = +35,8$ (*c* 0,9, CHCl₃, 98% *ee*) (*S*-isômero).

CAS: 183003-17-0

RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 7,29-7,14 (m, 5H), 2,88 (dd, $J = 12,9$ Hz, $J = 7,8$ Hz, 1H), 2,79-2,72 (m, 1H), 2,68 (dd, $J = 12,9$ Hz, $J = 6,3$ Hz, 1H) 2,01 (s, 3H), 1,69-1,62 (m, 1H), 1,58-1,47 (m, 1H), 0,89 (t, $J = 7,4$ Hz, 3H).

RMN de ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 221,5, 139,7, 128,8, 128,4, 126,2, 56,1, 37,4, 30,2, 24,5, 11,6.

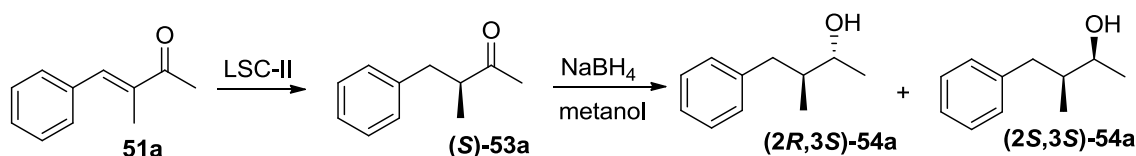
CG-EM *m/z* (abundância relativa %): 176 (6, M⁺), 147 (71), 129 (9), 117 (8), 91 (100), 65 (17), 43 (54).

6.2.4. Teste de dessorção e adsorção (adaptada de YANG; YAO; GUAN, 2005)

Para o teste de dessorção, adicionou-se a resina XAD-7 (0,5 g) e o substrato **51a** (0,4 mmol) solubilizado em acetona (1,5 mL) em um balão de 100 mL. Removeu-se o solvente sob pressão reduzida, obtendo-se o substrato adsorvido. Posteriormente, em um erlenmeyer de 250 mL, contendo água (50 mL), adicionou-se o substrato adsorvido e a mistura foi mantida sob agitação à 130 rpm e 30 °C por 3 horas. Após esse período, a resina foi filtrada e lavada com acetato de etila. A fase aquosa também foi extraída com acetato de etila (3 x 50 mL). Os extratos orgânicos foram secos separadamente com MgSO₄ anidro e o solvente foi evaporado. Por fim, pesou-se as amostras e a proporção do substrato **51a** liberado pela resina na fase aquosa foi calculado através da razão da quantidade do composto **51a** na fase aquosa e o total adicionado do **51a**. Obteve-se um valor de 9 % de dessorção.

Para o teste de adsorção, o composto *rac*-**53a** (0,4 mmol), solubilizado em 1 mL de etanol, foi adicionado em um erlenmeyer de 250 mL contendo água (50 mL) e resina XAD-7 (0,5 g). A reação foi agitada por 18 horas à 130 rpm e 30 °C. Posteriormente, a resina foi filtrada e lavada com acetato de etila e a fase aquosa também foi extraída com acetato de etila (3 x 50 mL). As fases orgânicas foram secas separadamente com MgSO₄ anidro e o solvente foi evaporado. A taxa de adsorção do produto foi calculada pesando-se a massa do composto *rac*-**53a** encontrada na resina e a quantidade total adicionada no sistema. O resultado foi 93 % de adsorção do produto da fase aquosa para a resina.

6.2.5. Preparação da muguesia



Em um balão volumétrico de 50 mL, munido de agitação magnética e sob atmosfera de N₂, os composto **(S)-53a** (0,8 mmol) foram solubilizados em metanol (20 mL) e adicionou-se NaBH₄ (2,4 mmol). A reação foi mantida sob agitação por 24 horas à temperatura ambiente. Posteriormente, adicionou-se água (25 mL), a reação foi extraída com acetato de etila (3 x 50 mL) e a fase orgânica foi seca com MgSO₄ anidro. O solvente foi removido sob pressão reduzida e os produtos foram purificados em CCDP usando como eluente hexano/acetato de

etila (8:2). Os diastereoisômeros obtidos foram analisados e caracterizados por CG-EM e RMN de ^1H e ^{13}C e a proporção diastereoisomérica foi determinada por CG-FID-quiral.

O produto foi obtido como um óleo amarelo claro em 19 % de rendimento global (24,4 mg). **CG-FID-quiral** - Método 5: (t_{R} : 76 min (*syn*-**54a**) e 78,7 e 79,2 min (*anti*-**54a**).

A proporção da conversão estimada pelo CG-FID-quiral foi de 60,5 % do isômero *syn*-**54a** e 39,5 % do *anti*-**54a** (76% *ee*, (**2R, 3S**)-**54a**, preferencialmente).

CAS (**2R, 3S**)-**54a**: 67180-09-0

CAS (**2S, 3S**)-**54a**: 67180-08-9

CAS (**2S, 3R**)-**54a**: 848413-13-8

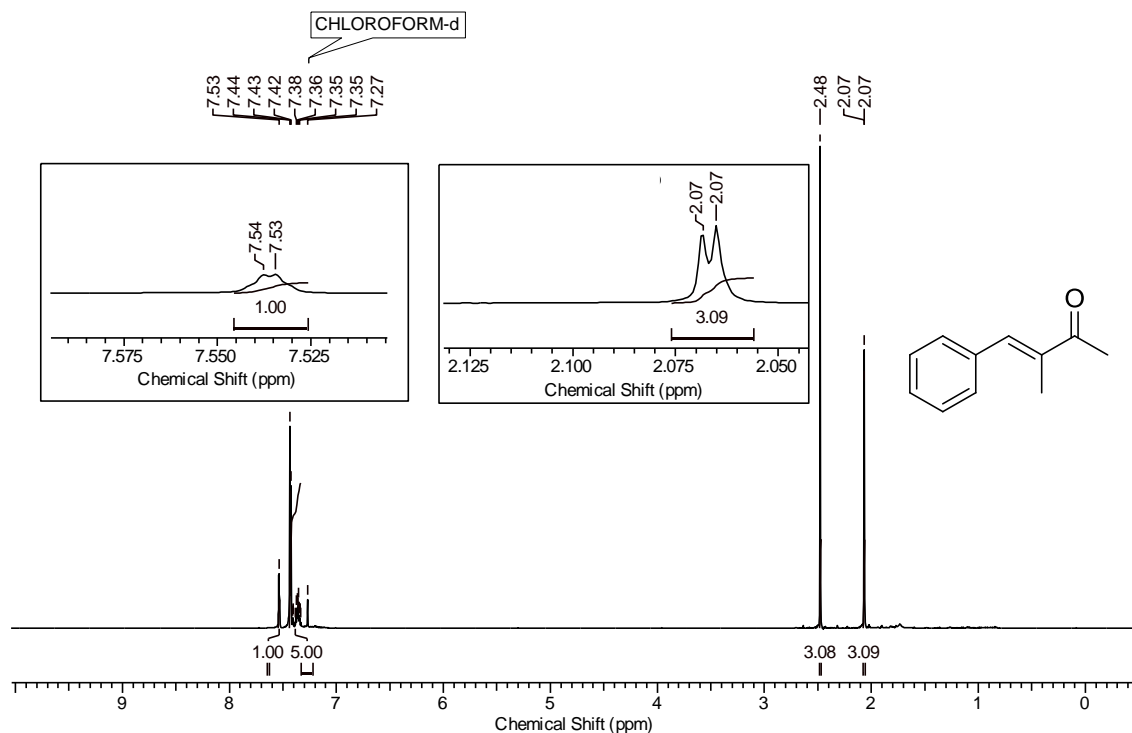
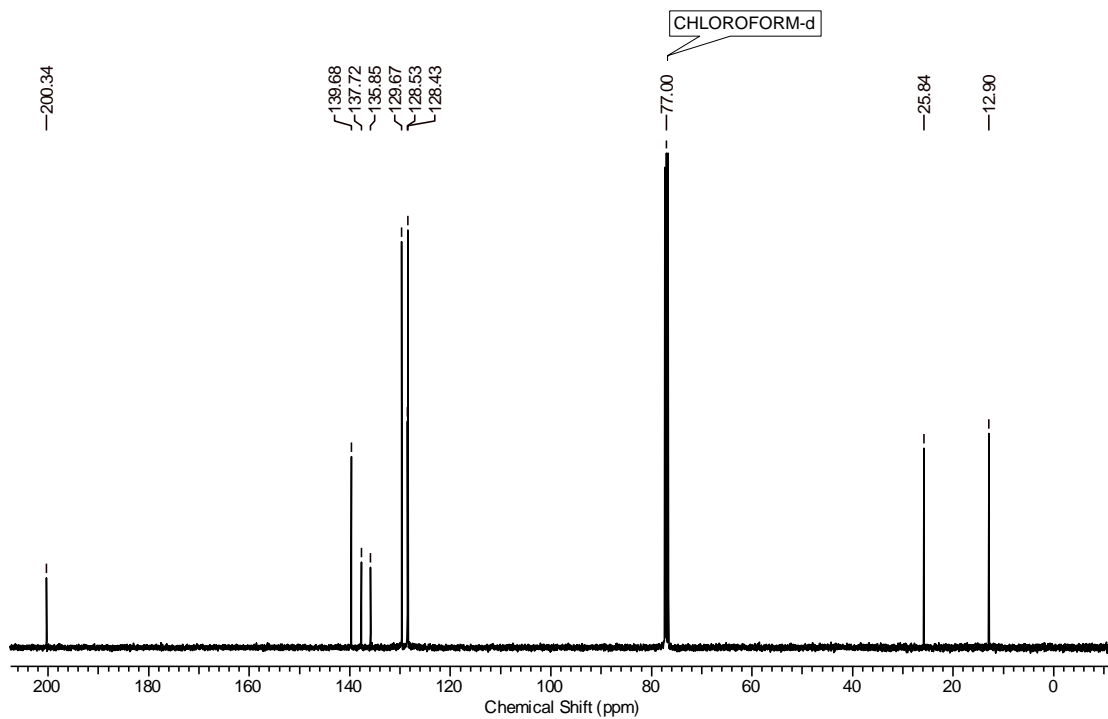
CAS (**2R, 3R**)-**54a**: 848413-12-7

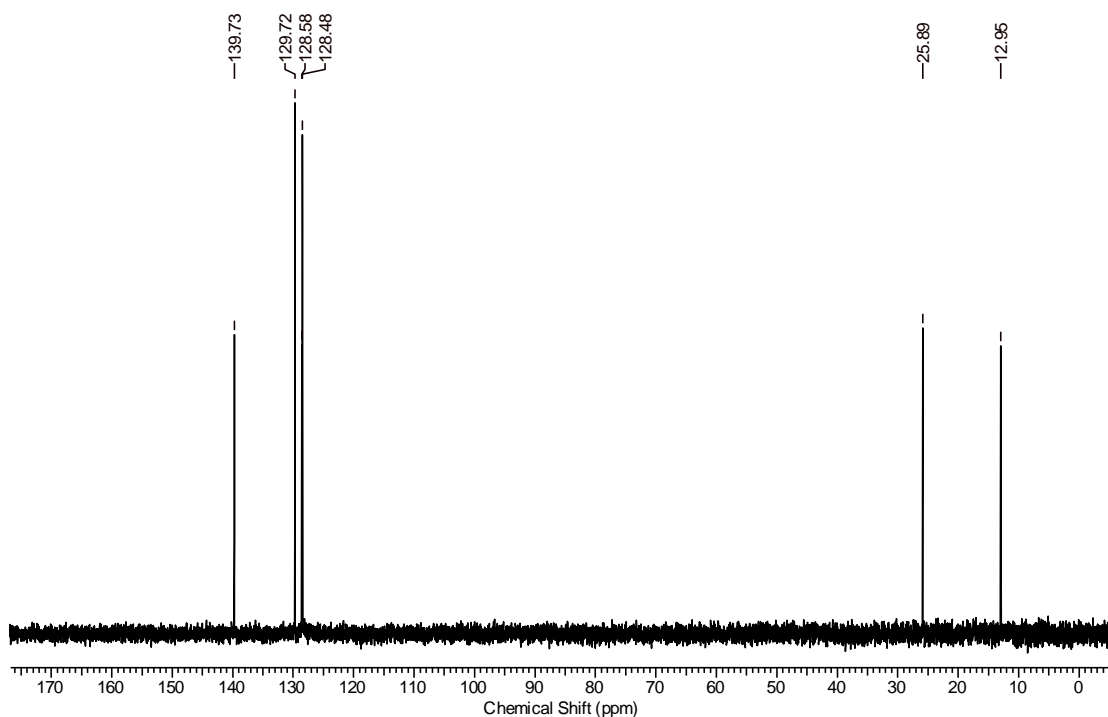
RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 7,30-7,26 (m, 2H), 7,21-7,17 (m, 3H), 3,80-3,64 (m, 1H), 2,90-2,80 (m, 1H), 2,43-2,31 (m, 1H), 1,86-1,73 (m, 1H), 1,21 (d, $J = 6,3$ Hz, 3H) [isômero, 1,20 (d, $J = 6,6$ Hz, 3H)], 0,86 (d, $J = 6,8$ Hz, 3H) [isômero, 0,83 (d, $J = 6,8$ Hz, 3H)].

RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 141,1 (isômero, 140,9), 129,1, 128,2, 125,8, 71,4 (isômero, 70,3), 42,2 (isômero, 41,7), 39,3 (isômero, 39,1), 20,5 (isômero, 19,7), 14,6 (isômero, 13,5).

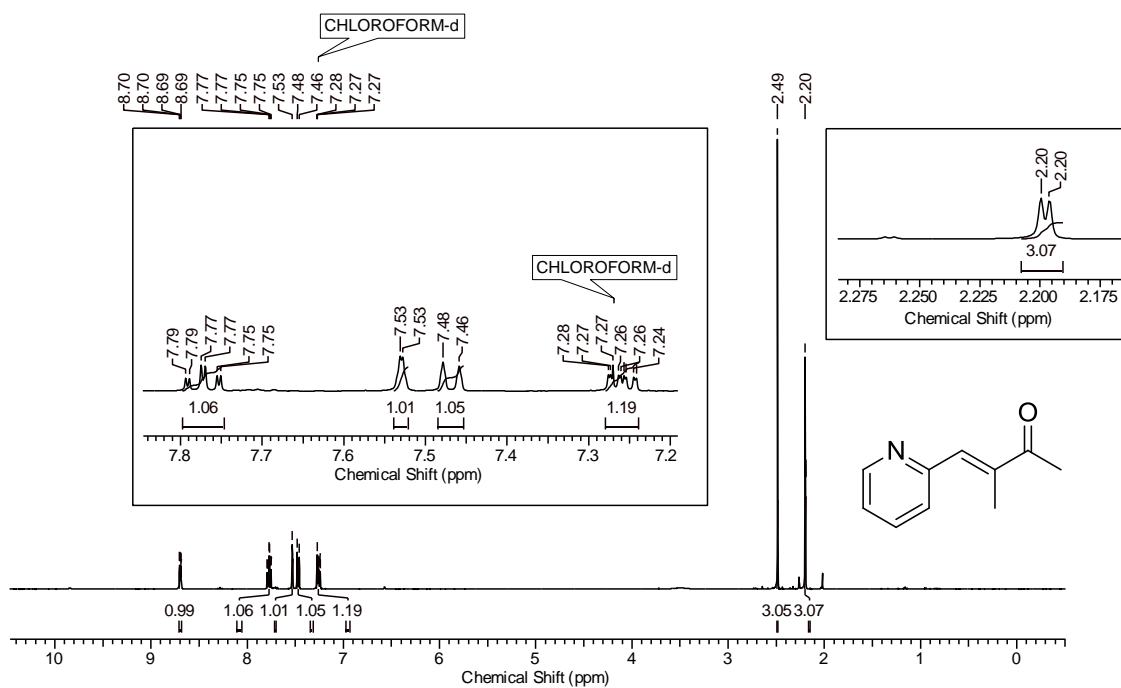
CG-EM m/z (abundância relativa %): 164 (3, M^+), 146 (26), 131 (51), 92 (26), 91 (100), 78 (26), 65 (16), 45 (30).

7. Anexos

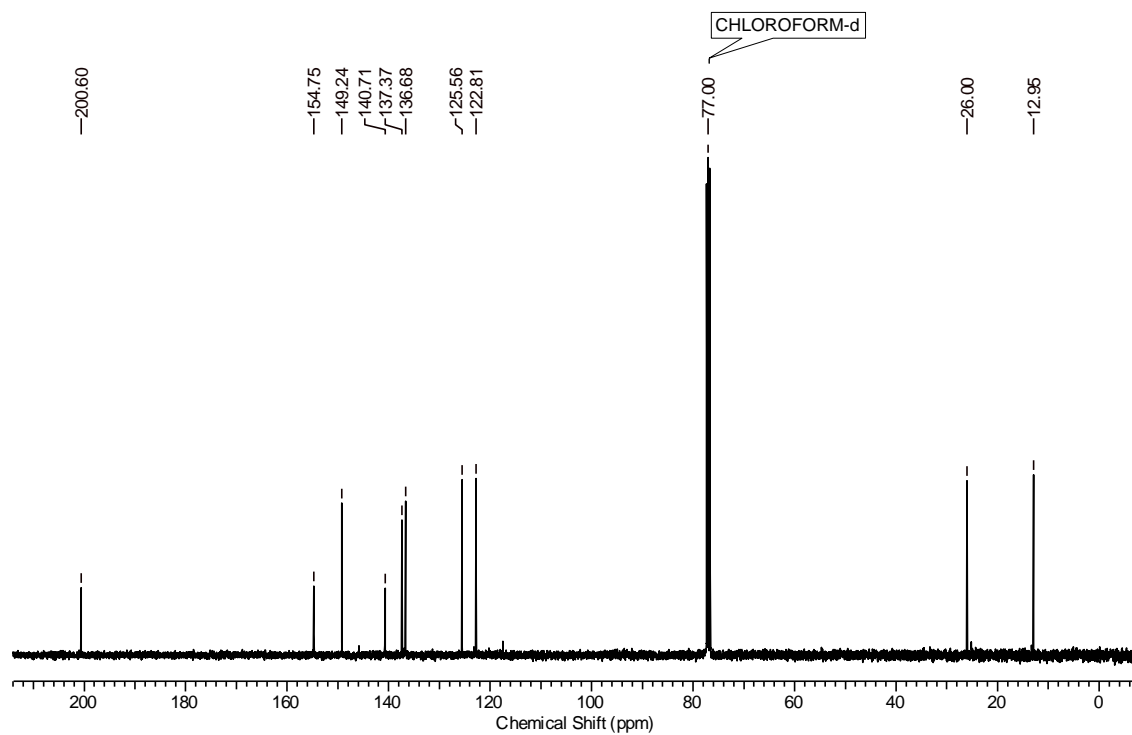
7.1. Espectros de RMN de ^1H , ^{13}C e DEPT-135Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) do composto 51aEspectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) do composto 51a



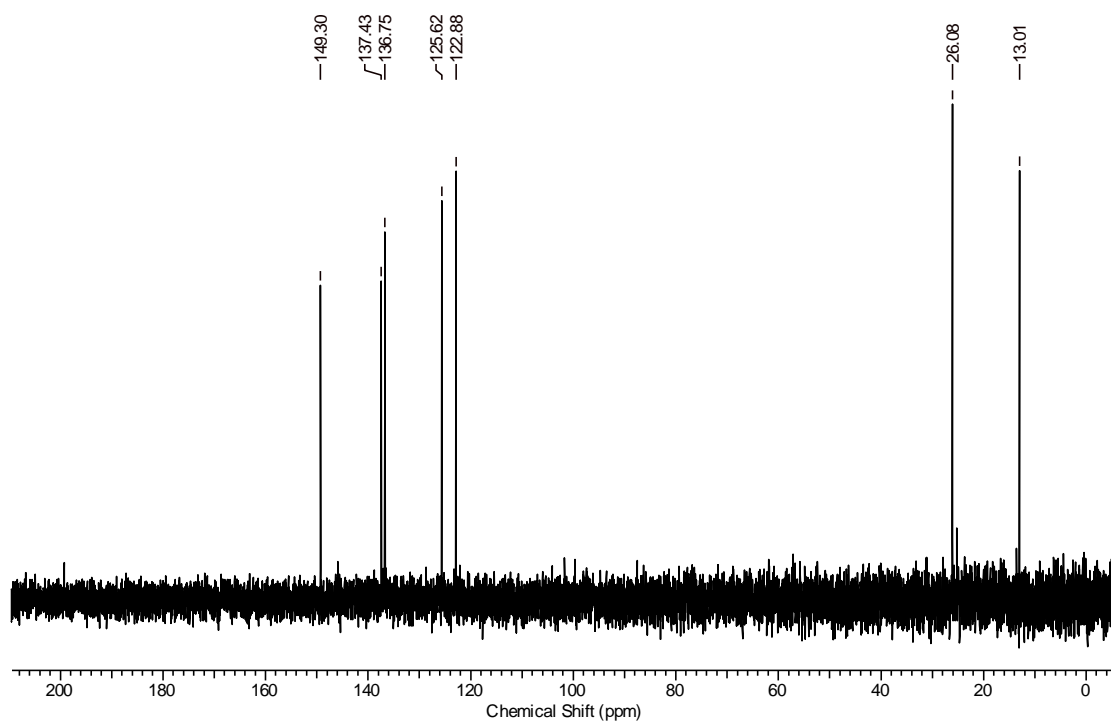
Espectro de RMN de DEPT-135 (100 MHz, CDCl_3) do composto 51a



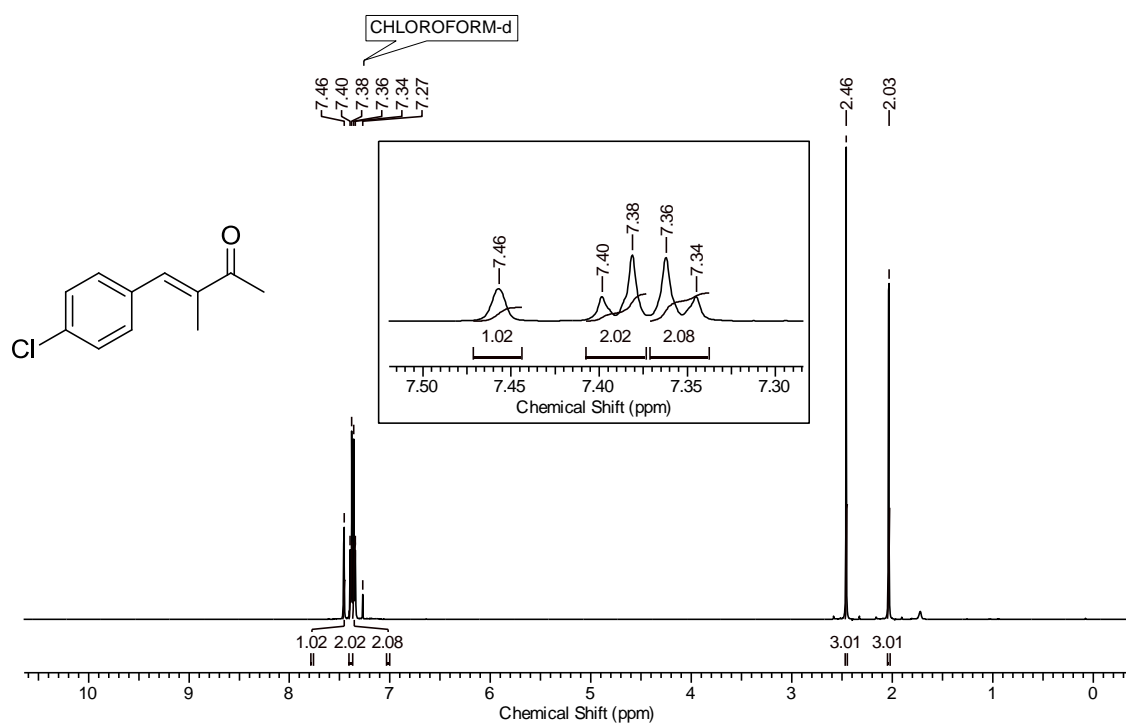
Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) do composto 51b



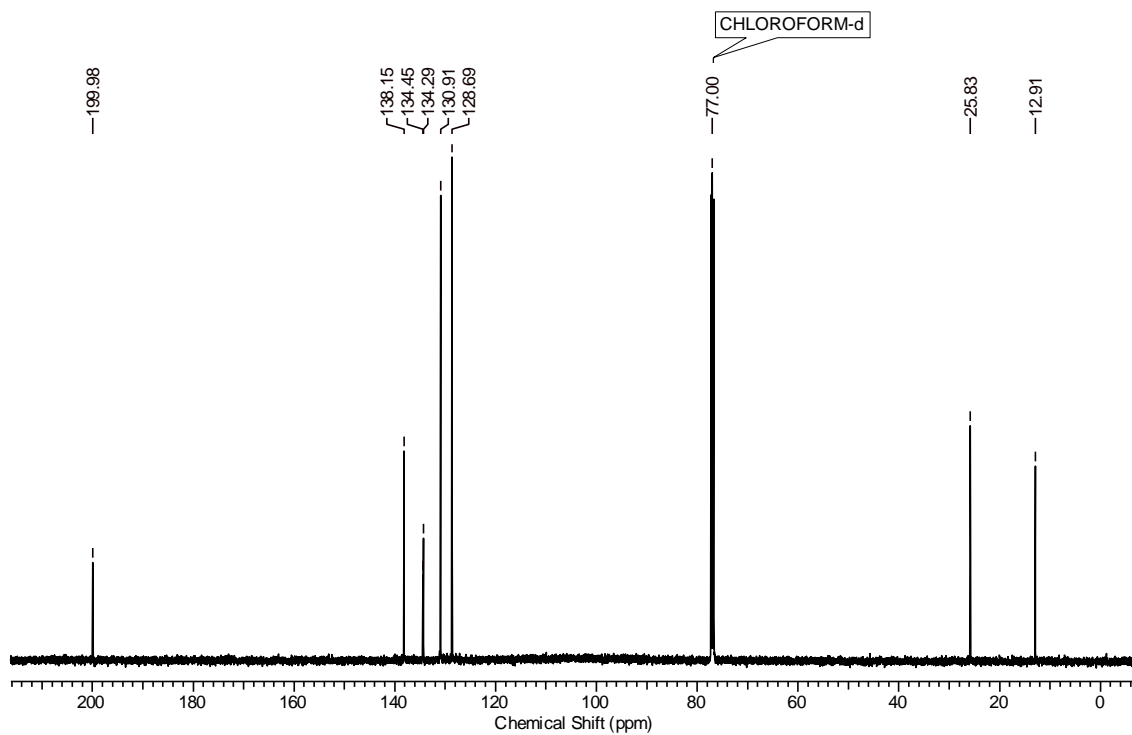
Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) do composto 51b



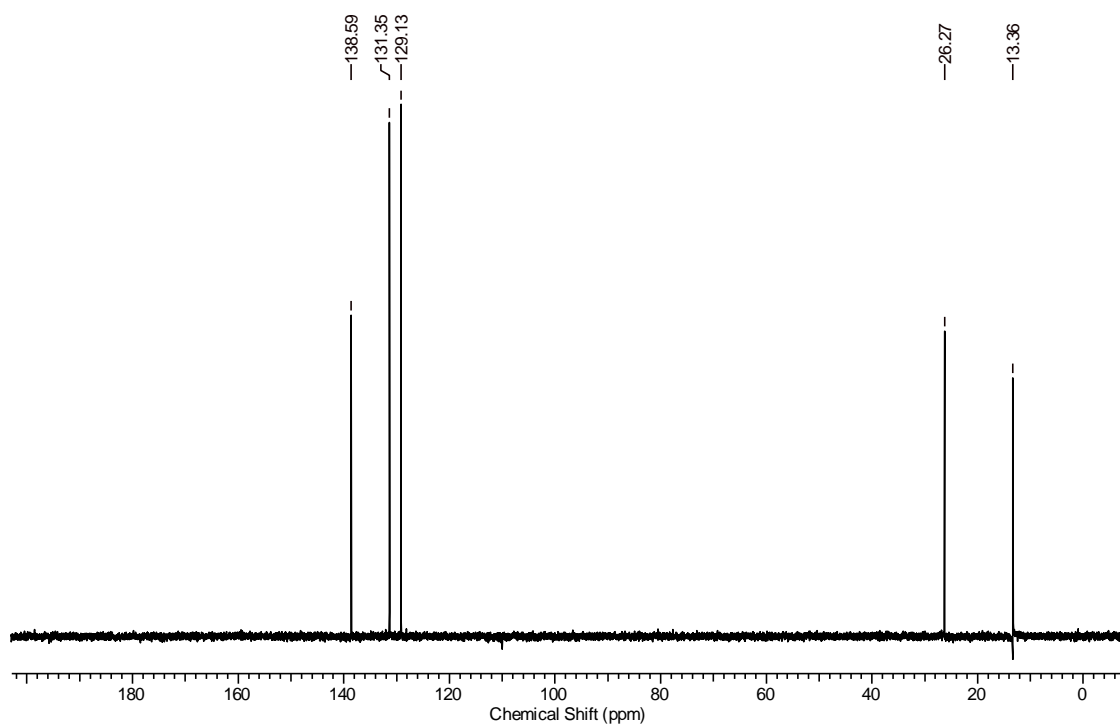
Espectro de RMN de DEPT-135 (100 MHz, CDCl_3) do composto 51b



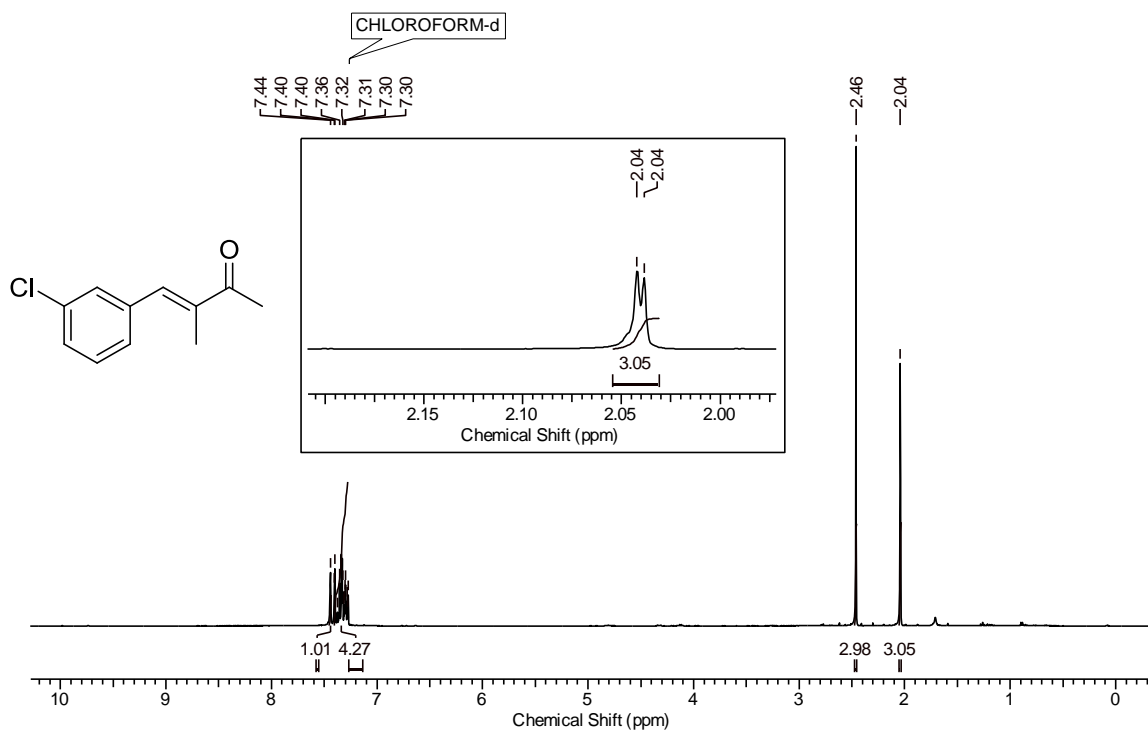
Espectro de RMN de ¹H (500 MHz, CDCl₃) do composto 51c



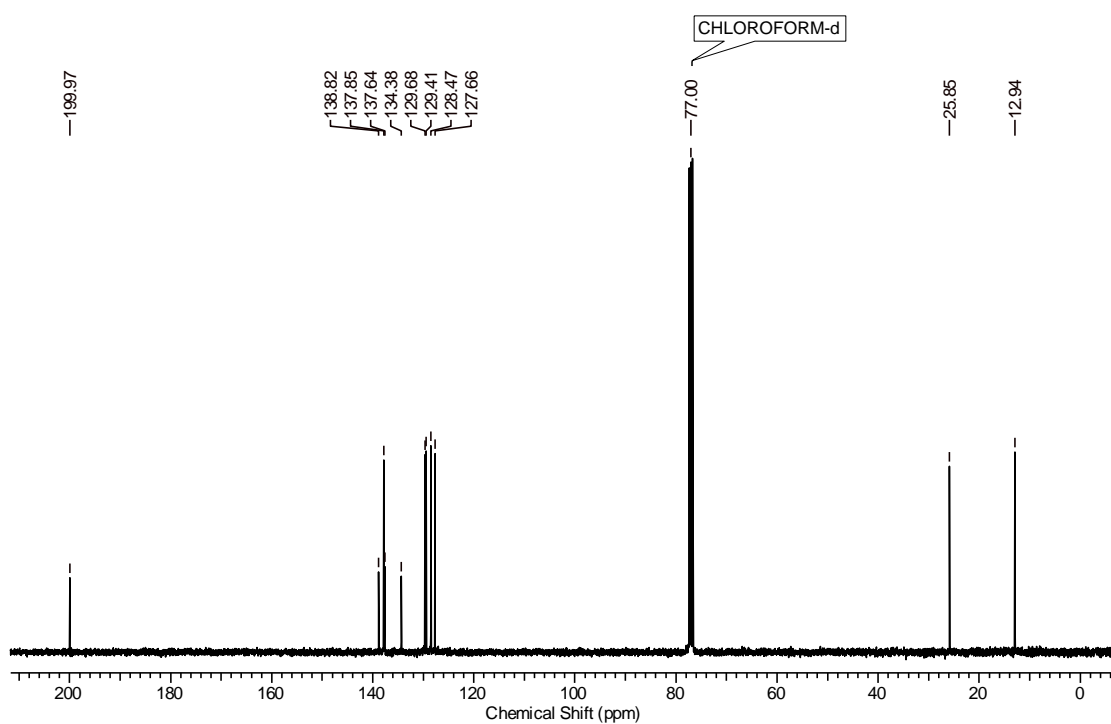
Espectro de RMN ¹³C (125 MHz, CDCl₃) do composto 51c



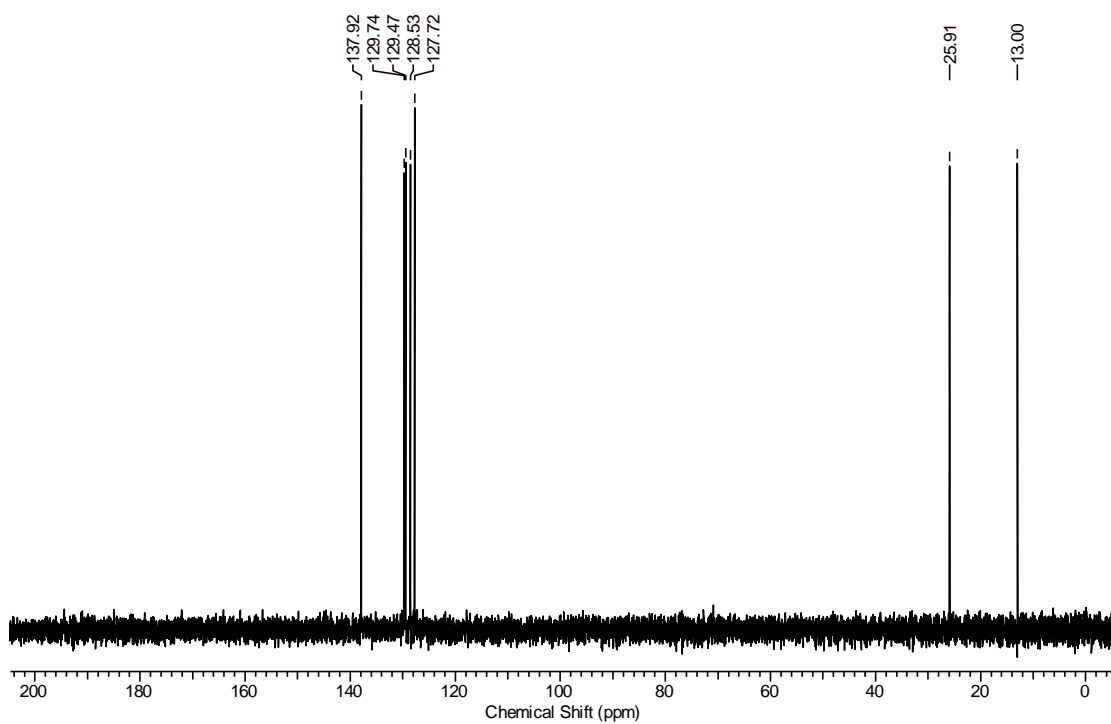
Espectro de RMN DEPT-135 (125 MHz, CDCl₃) do composto 51c



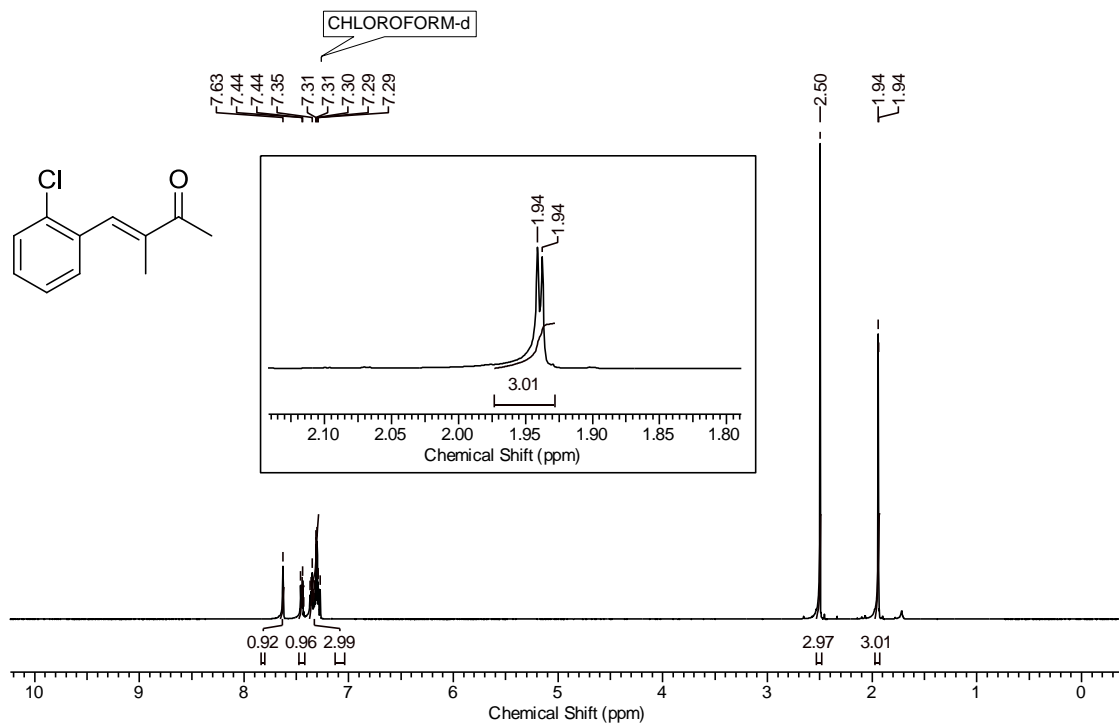
Espectro de RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) do composto 51d



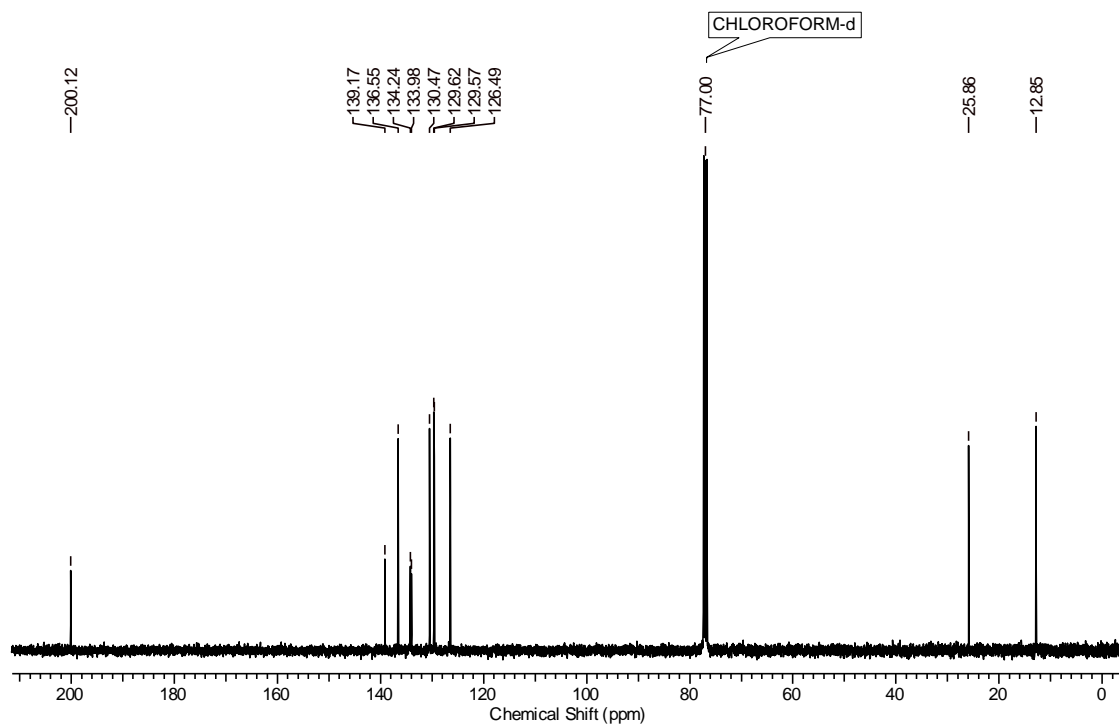
Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) do composto 51d



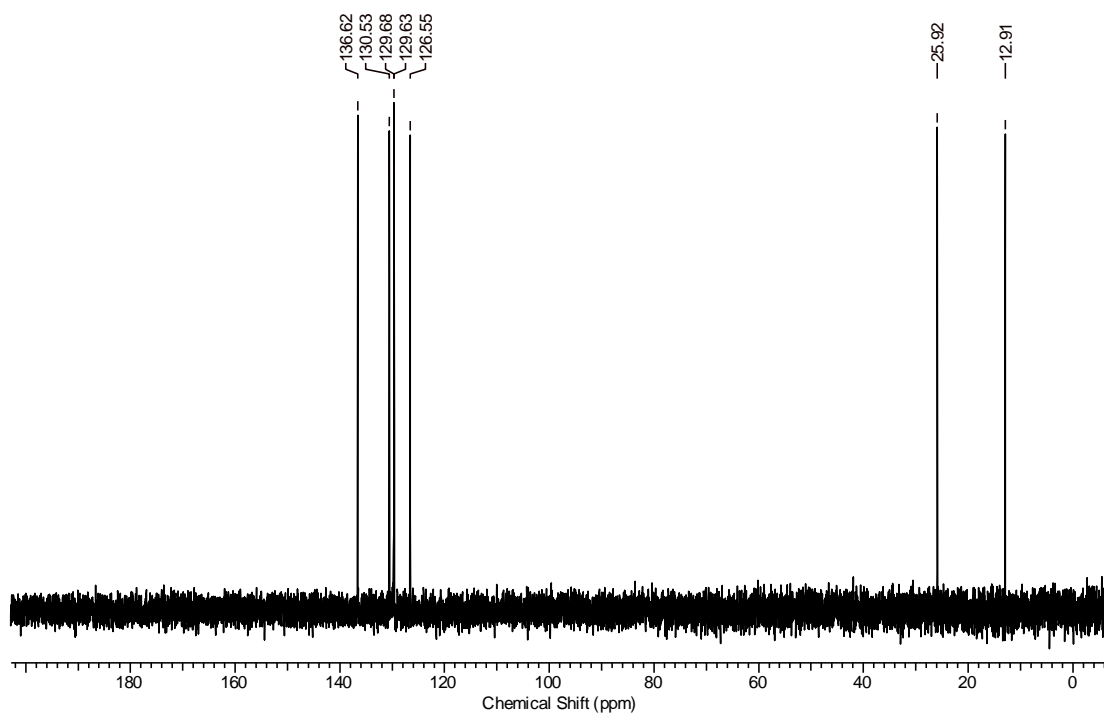
Espectro de RMN DEPT-135 (100 MHz, CDCl_3) do composto 51d



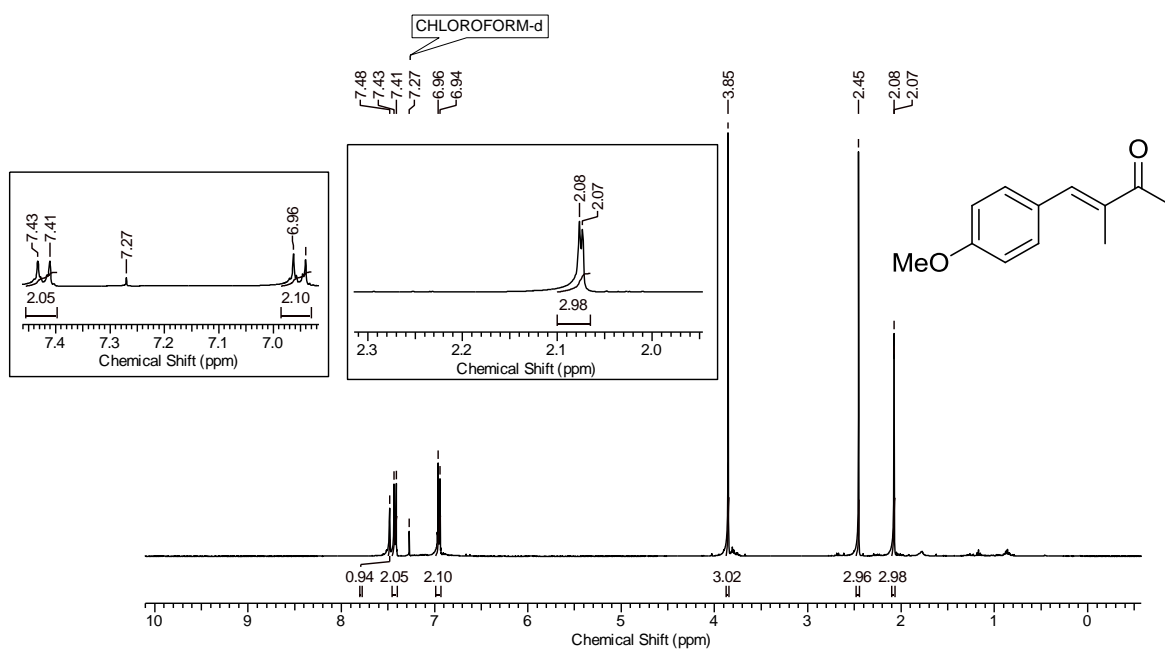
Espectro de RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) do composto 51e



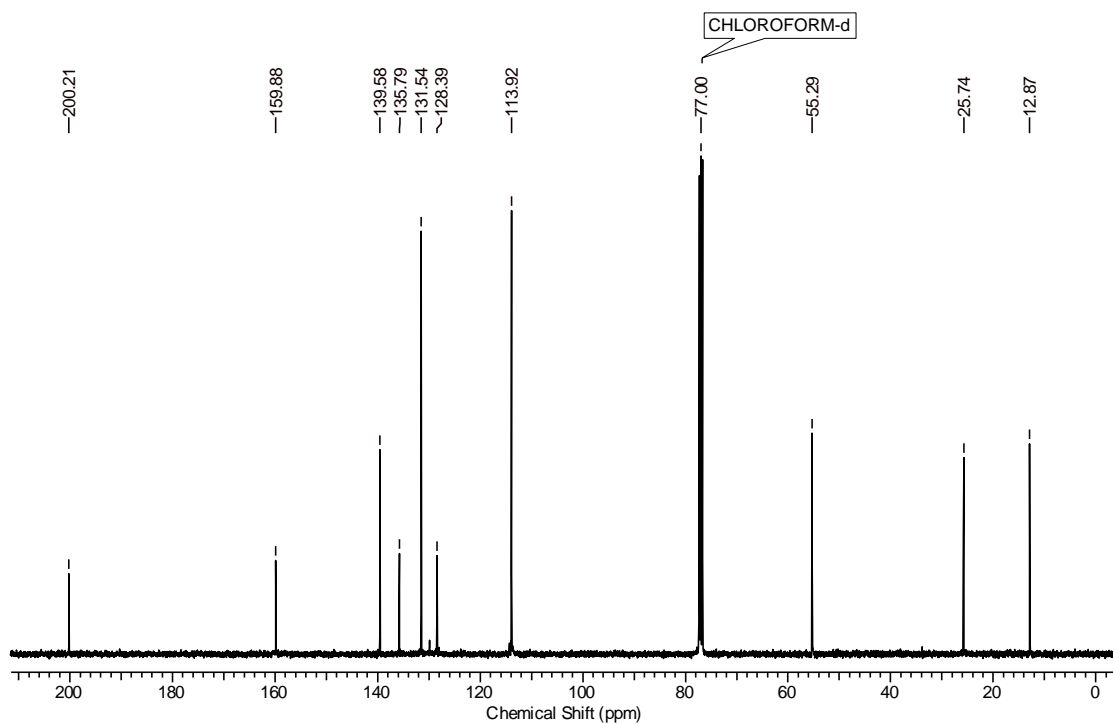
Espectro de RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) do composto 51e



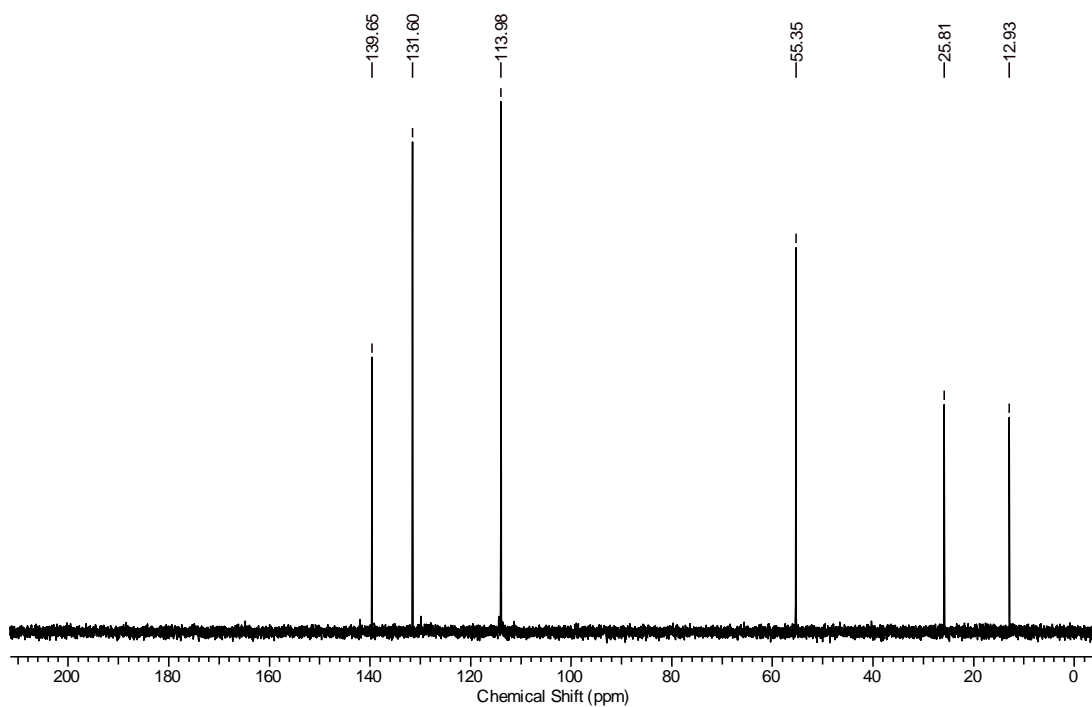
Espectro de RMN DEPT-135 (100 MHz, CDCl₃) do composto 51e



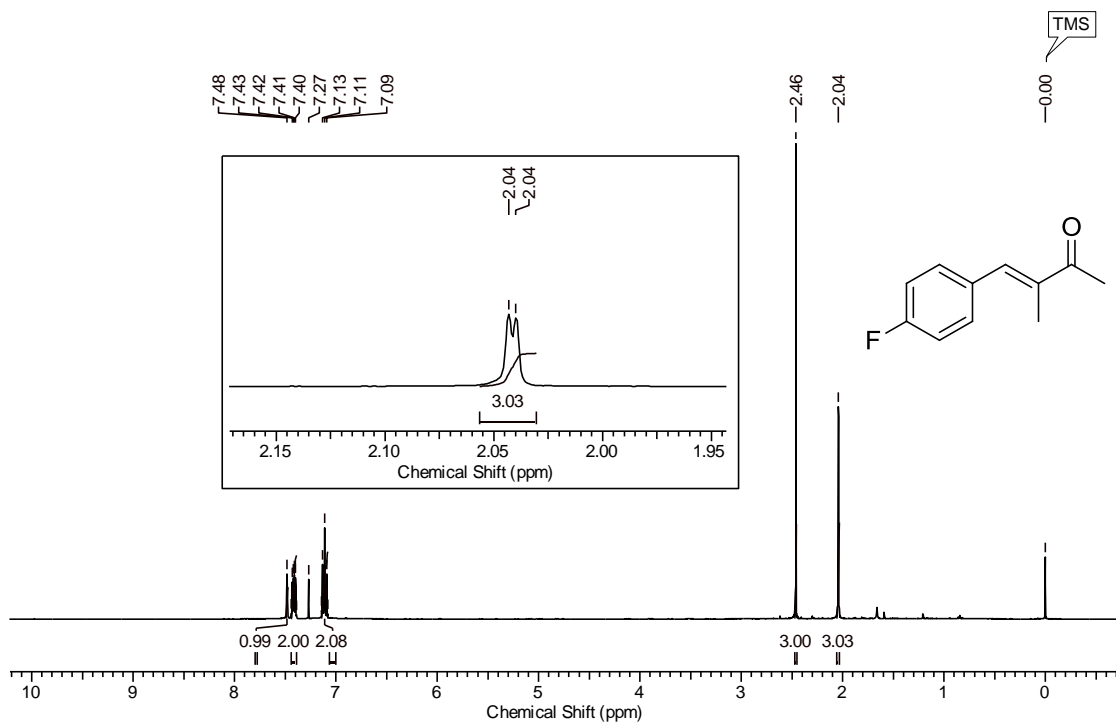
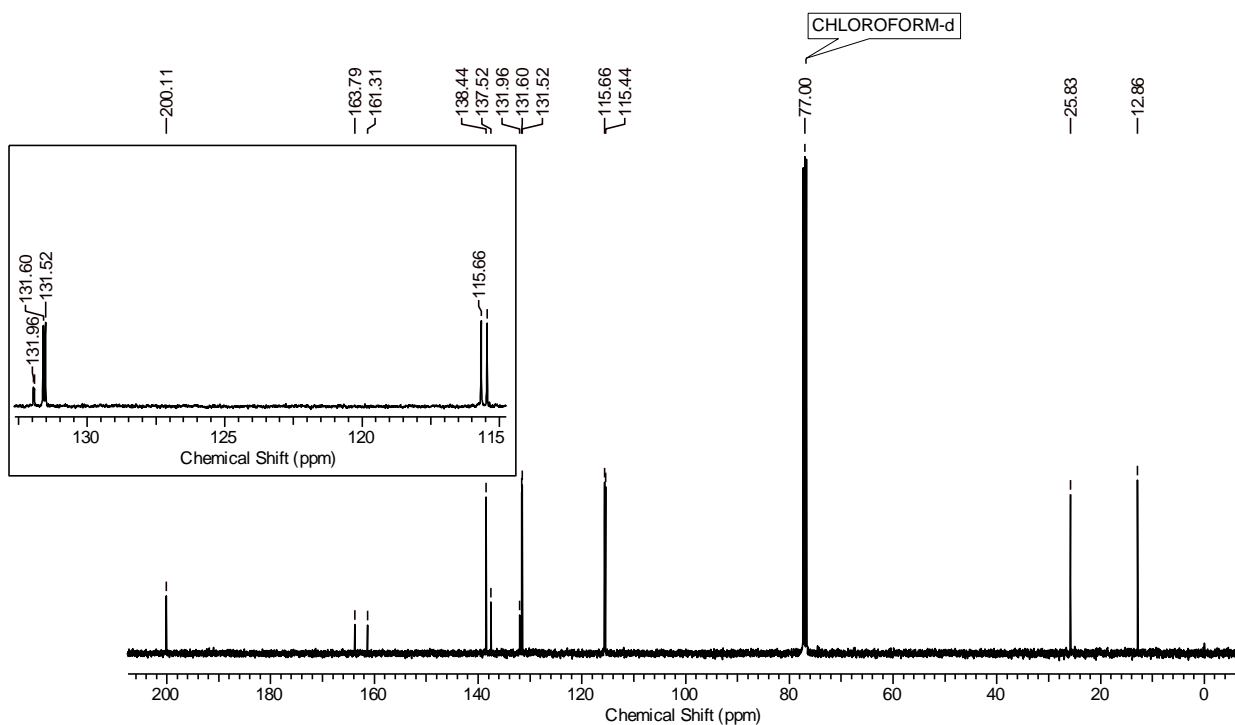
Espectro de RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃) do composto 51f

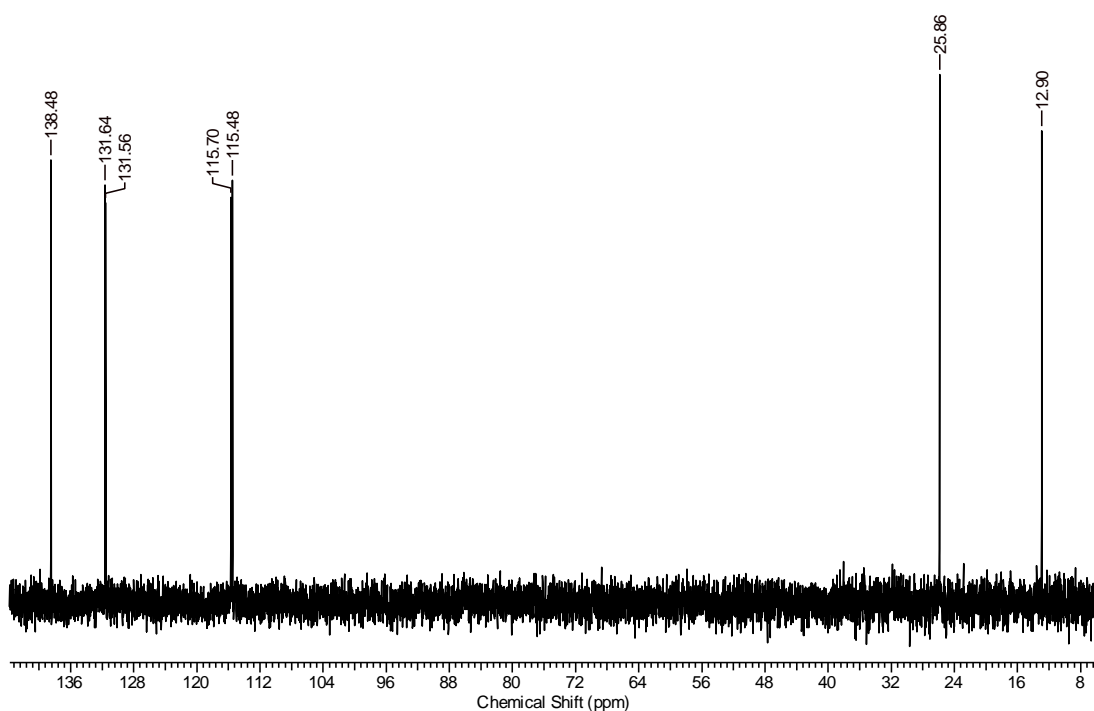


Espectro de RMN ¹³C (125 MHz, CDCl₃) do composto 51f

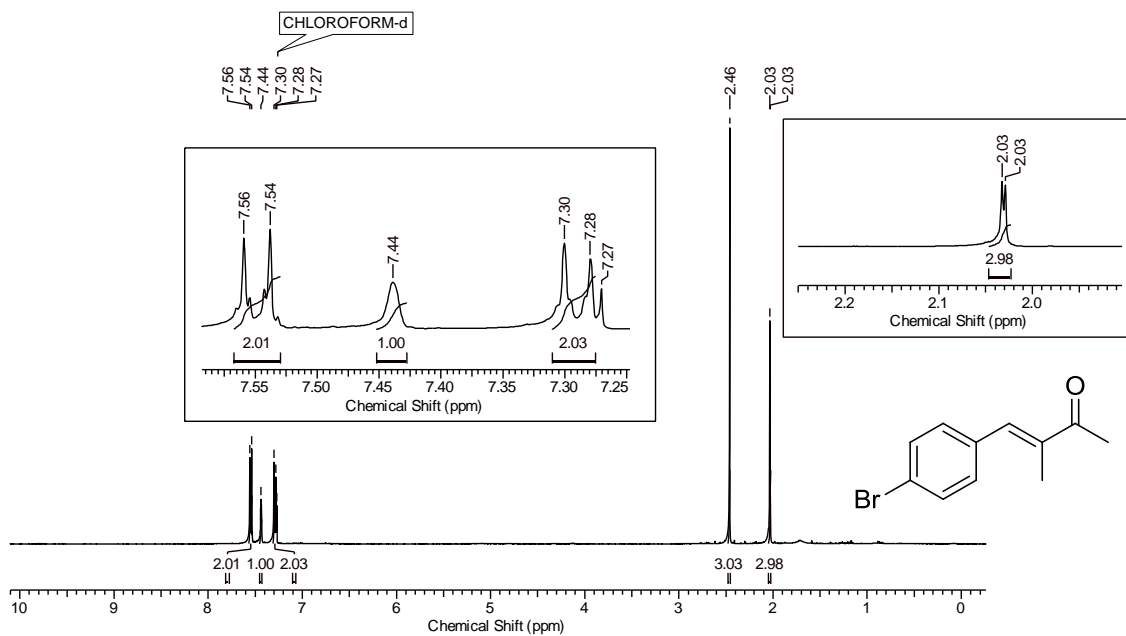


Espectro de RMN DEPT-135 (125 MHz, CDCl₃) do composto 51f

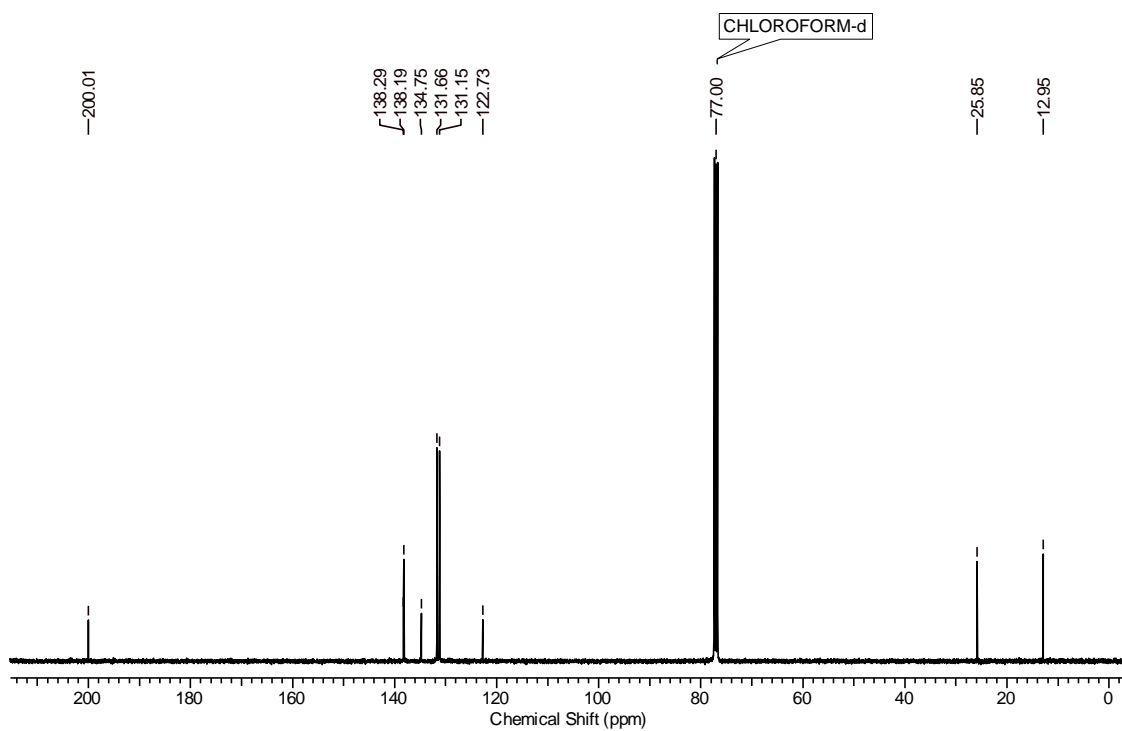
Espectro de RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) do composto 51gEspectro de RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) do composto 51g



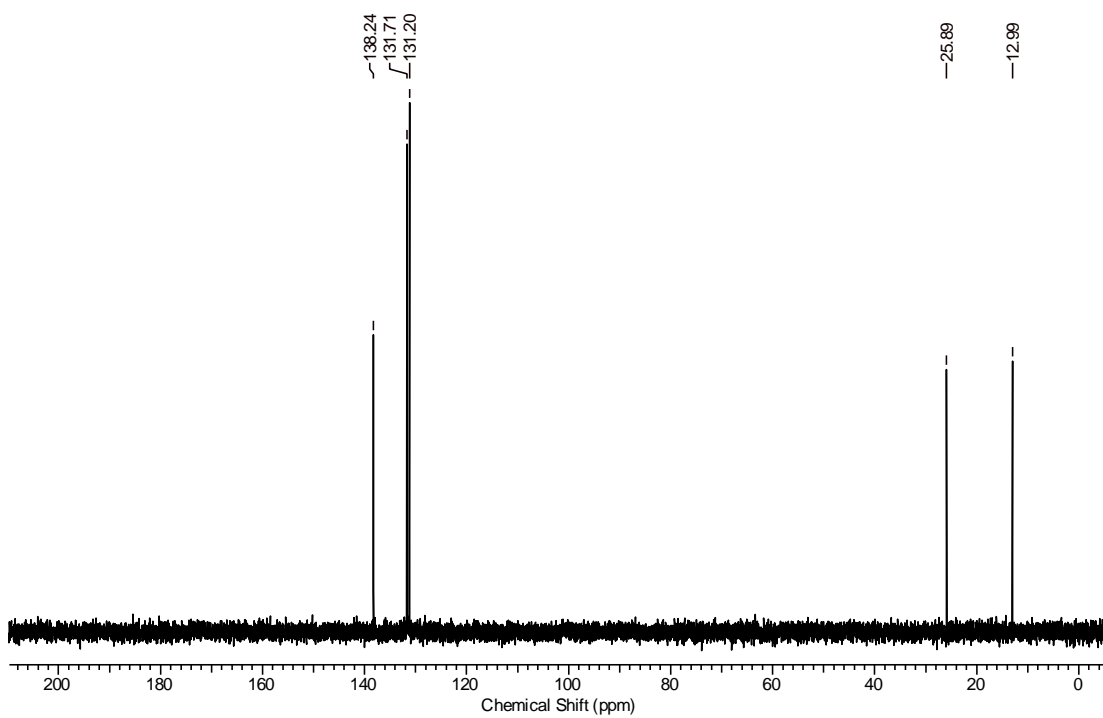
Espectro de RMN DEPT-135 (100 MHz, CDCl₃) do composto 51g



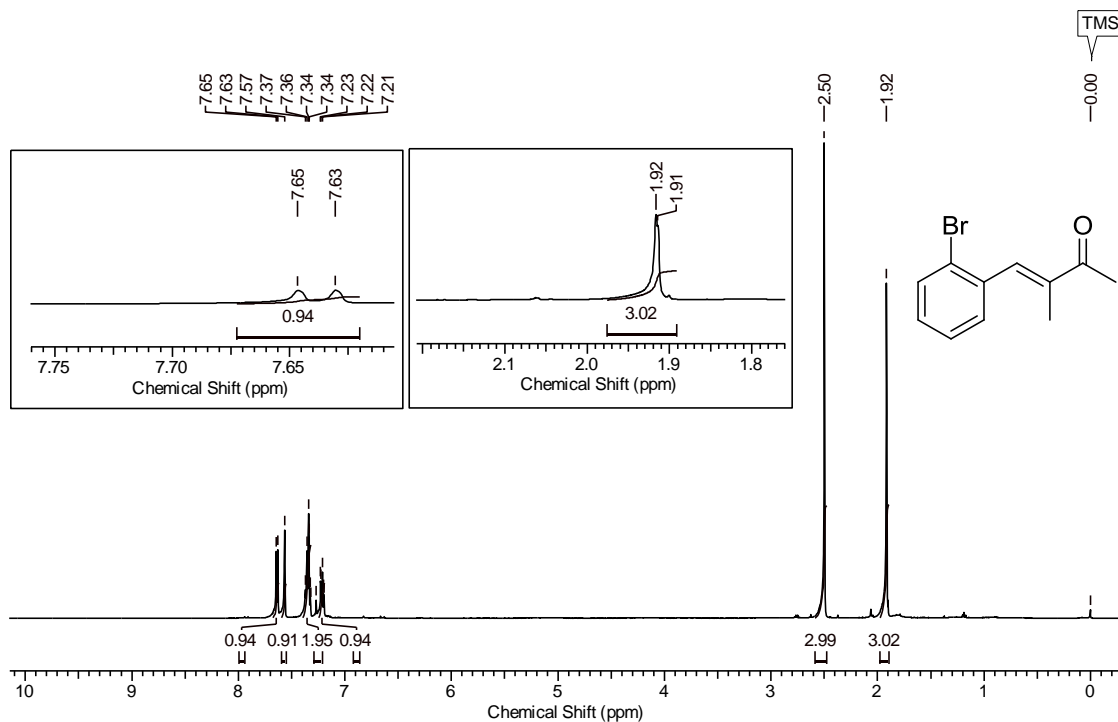
Espectro de RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) do composto 51h



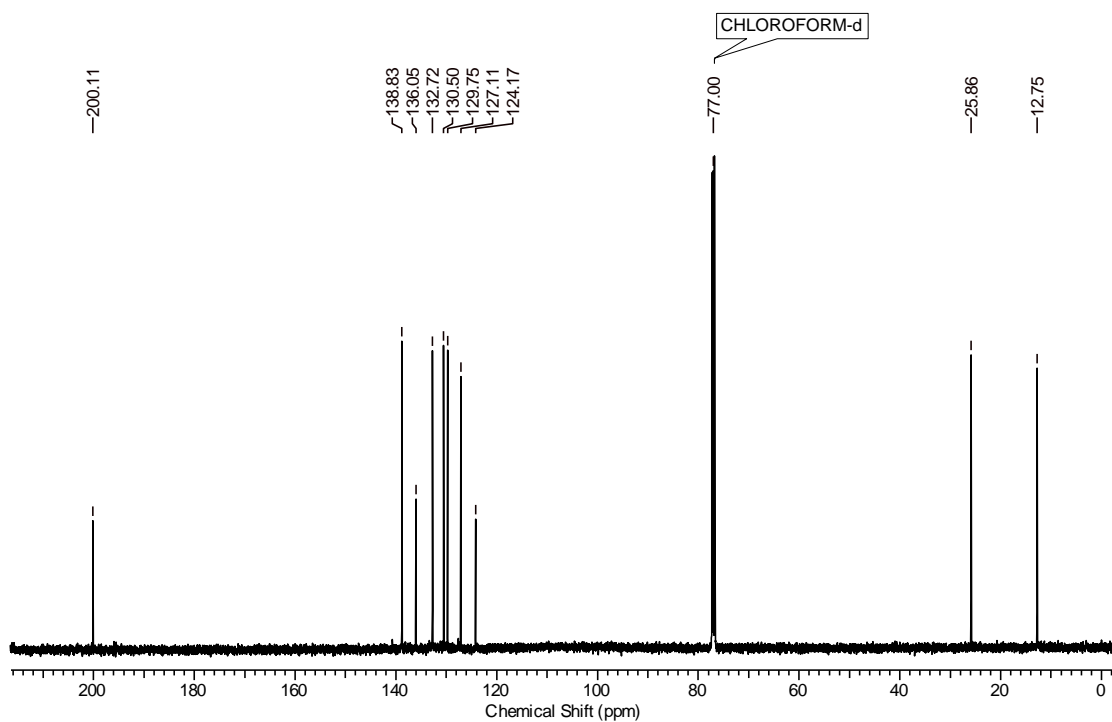
Espectro de RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) do composto 51h



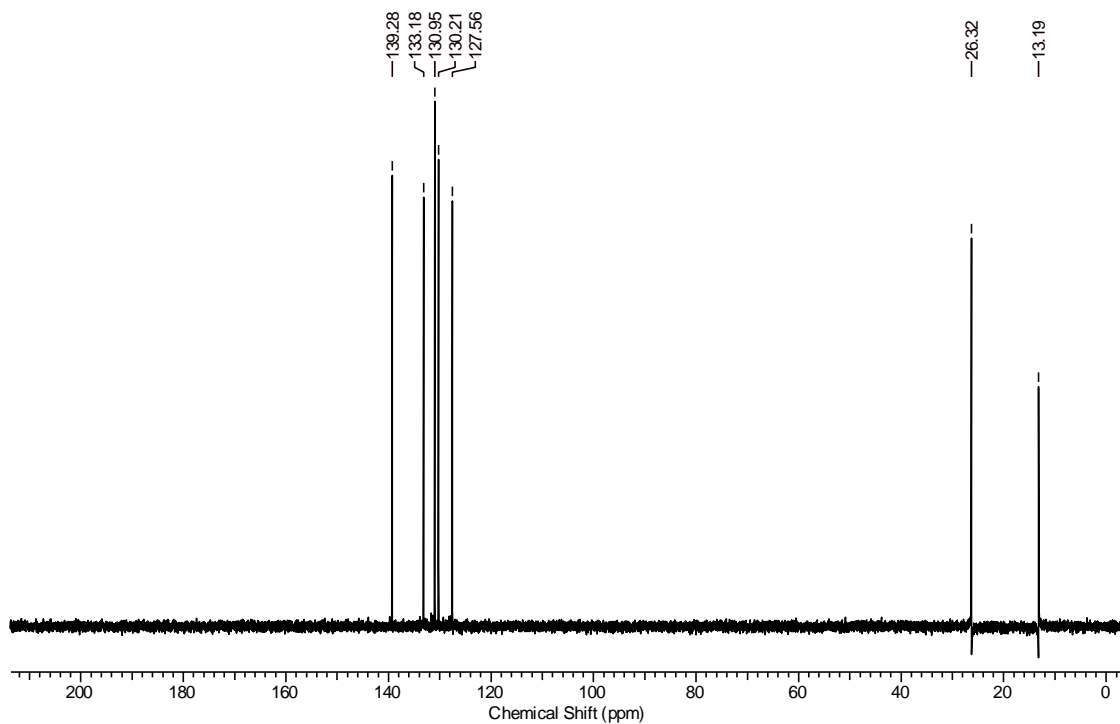
Espectro de RMN DEPT-135 (100 MHz, CDCl₃) do composto 51h



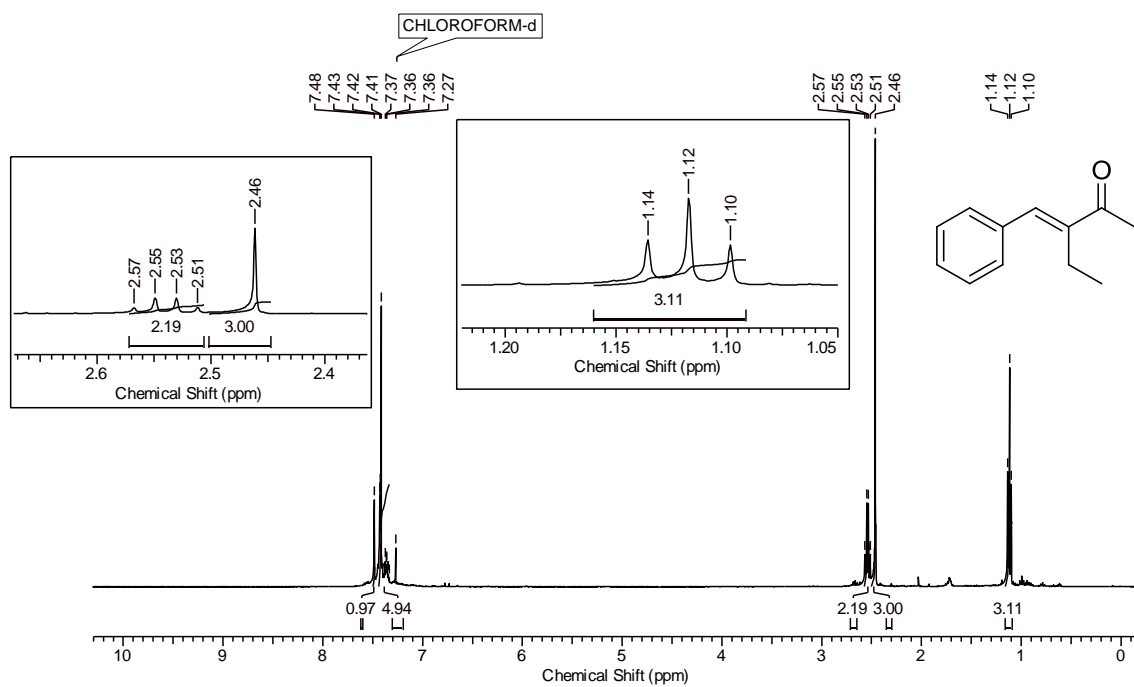
Espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) do composto 51i



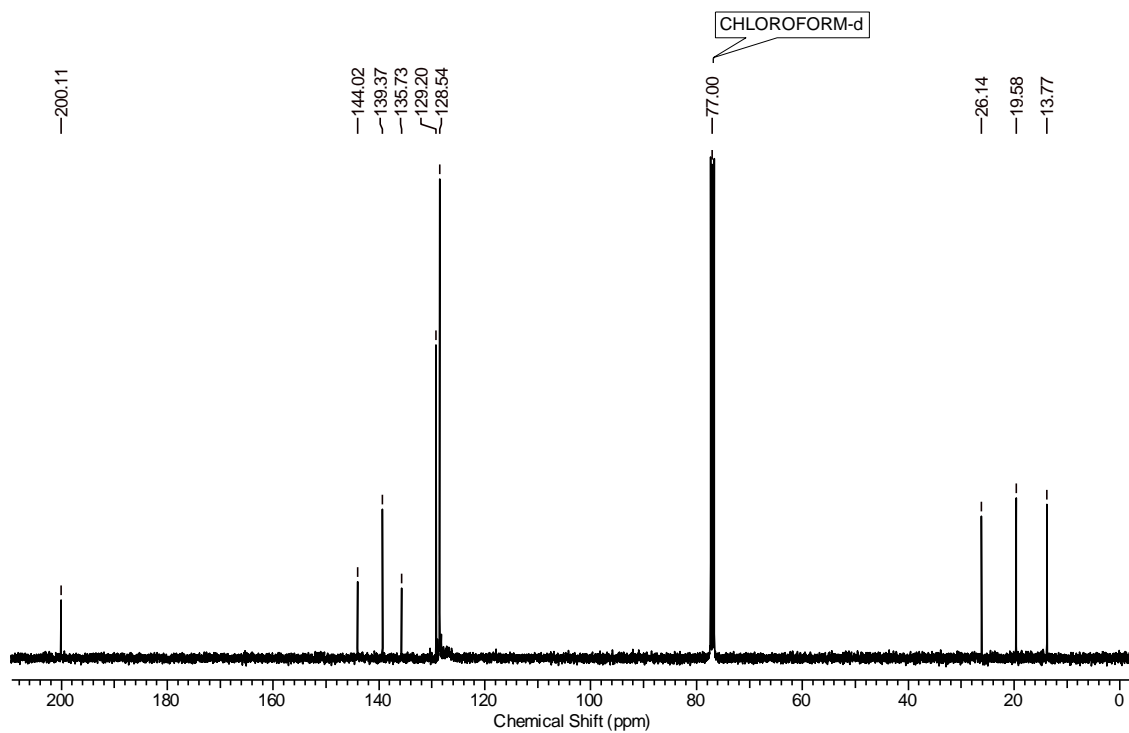
Espectro de RMN ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) do composto 51i



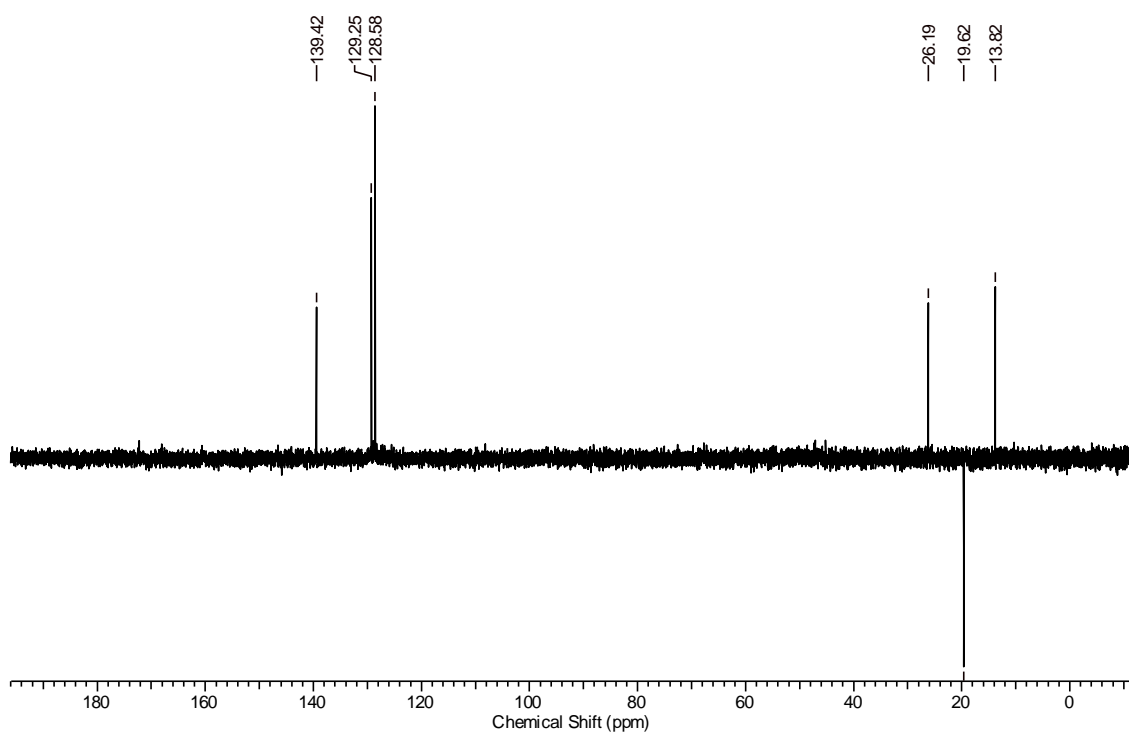
Espectro de RMN DEPT-135 (125 MHz, CDCl_3) do composto 51i



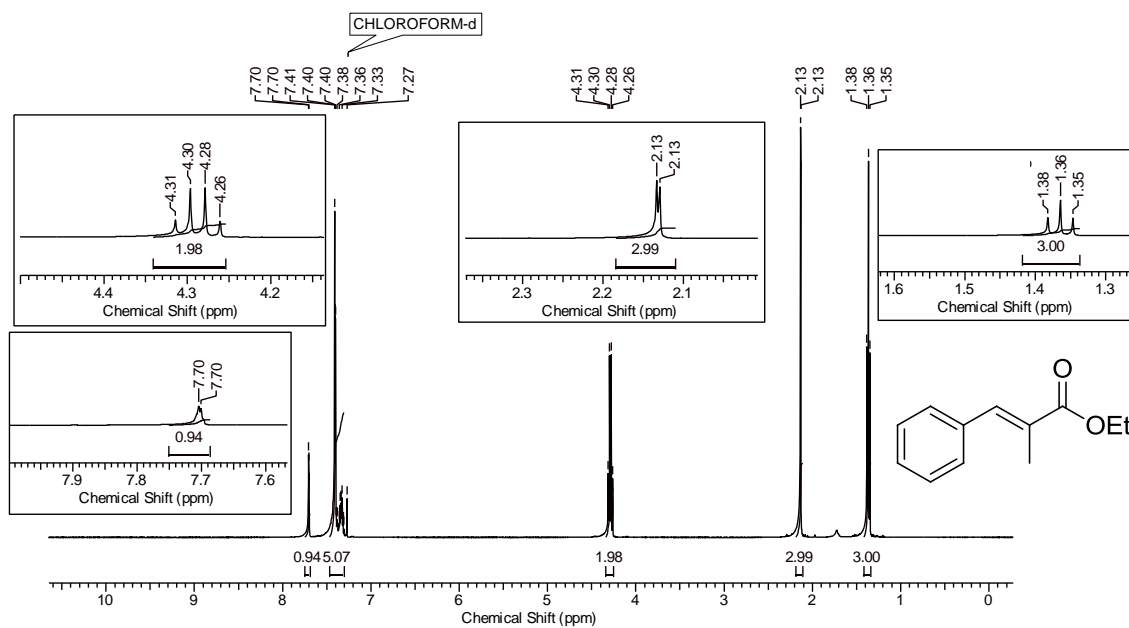
Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) do composto 51j



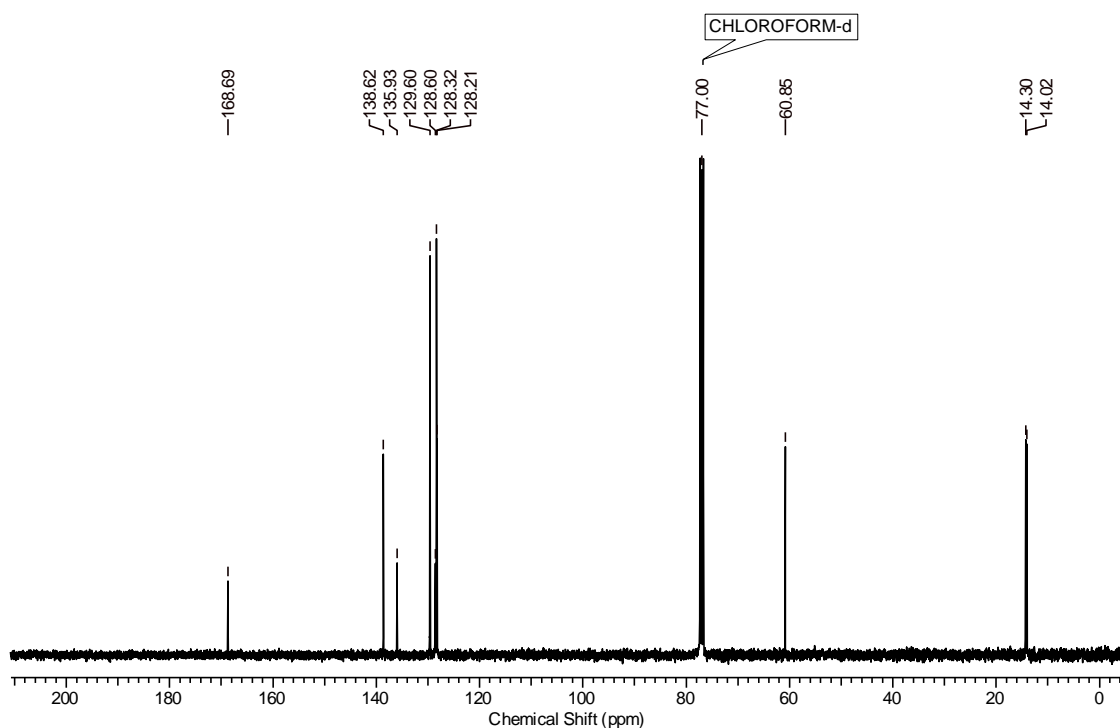
Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) do composto 51j



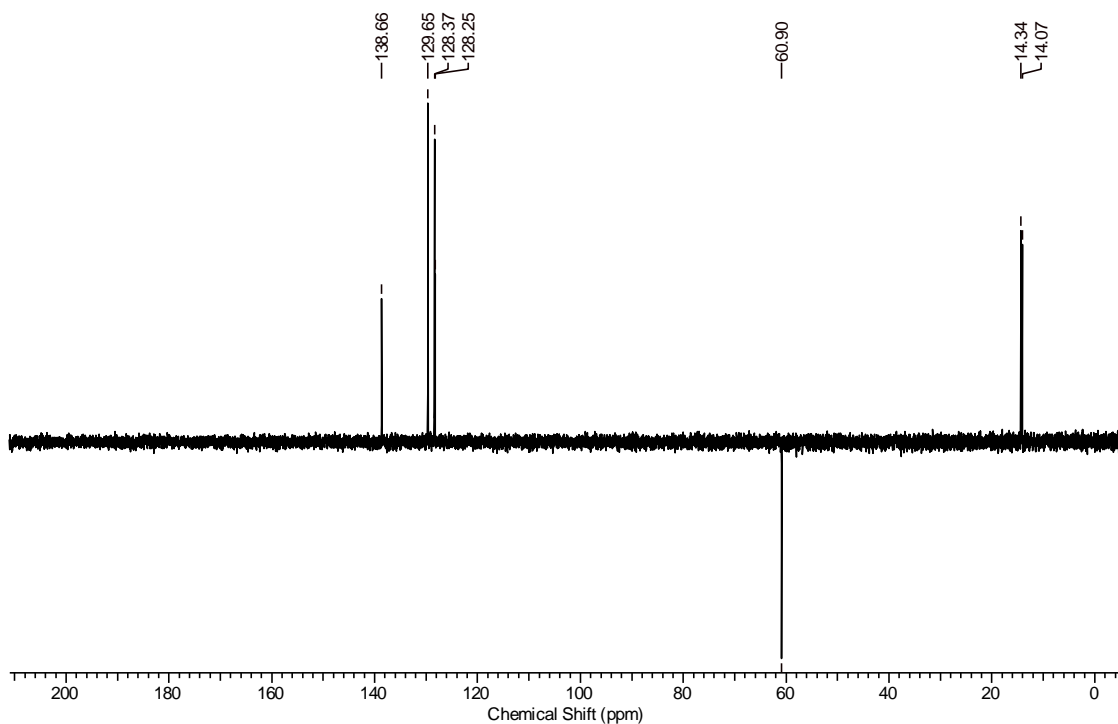
Espectro de RMN DEPT-135 (100 MHz, CDCl_3) do composto 51j



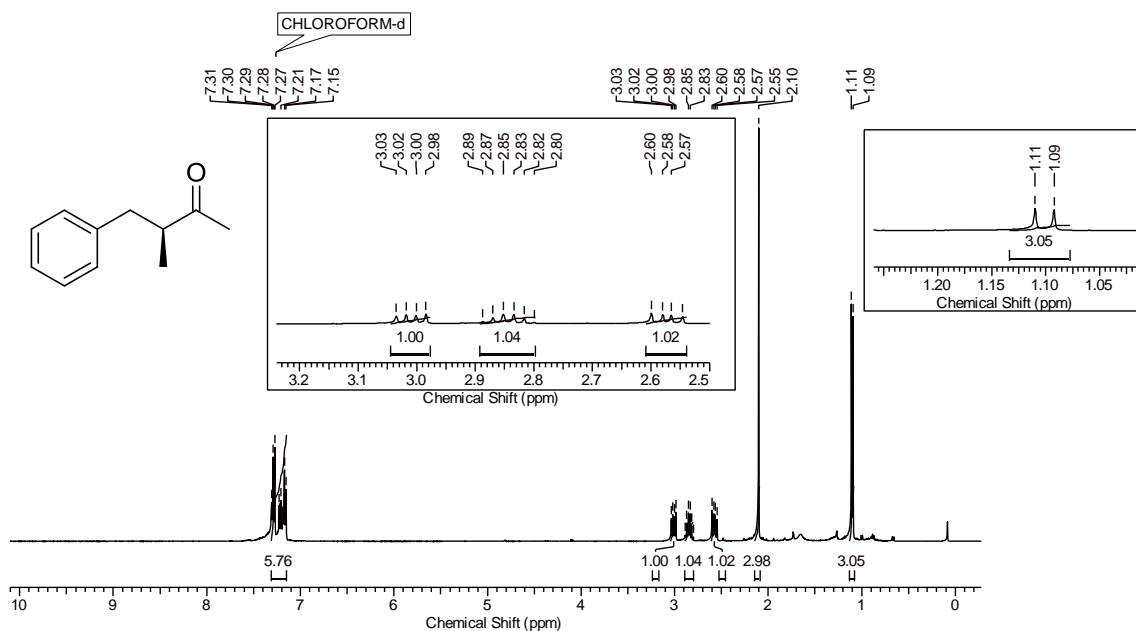
Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) do composto 51k



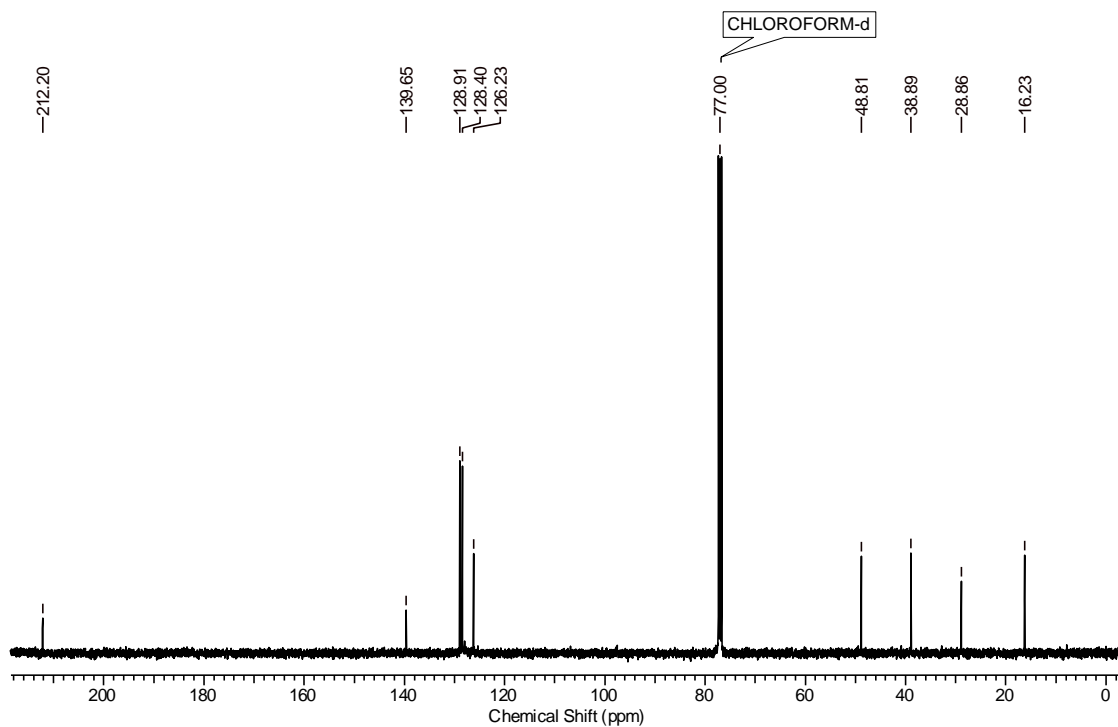
Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) do composto 51k



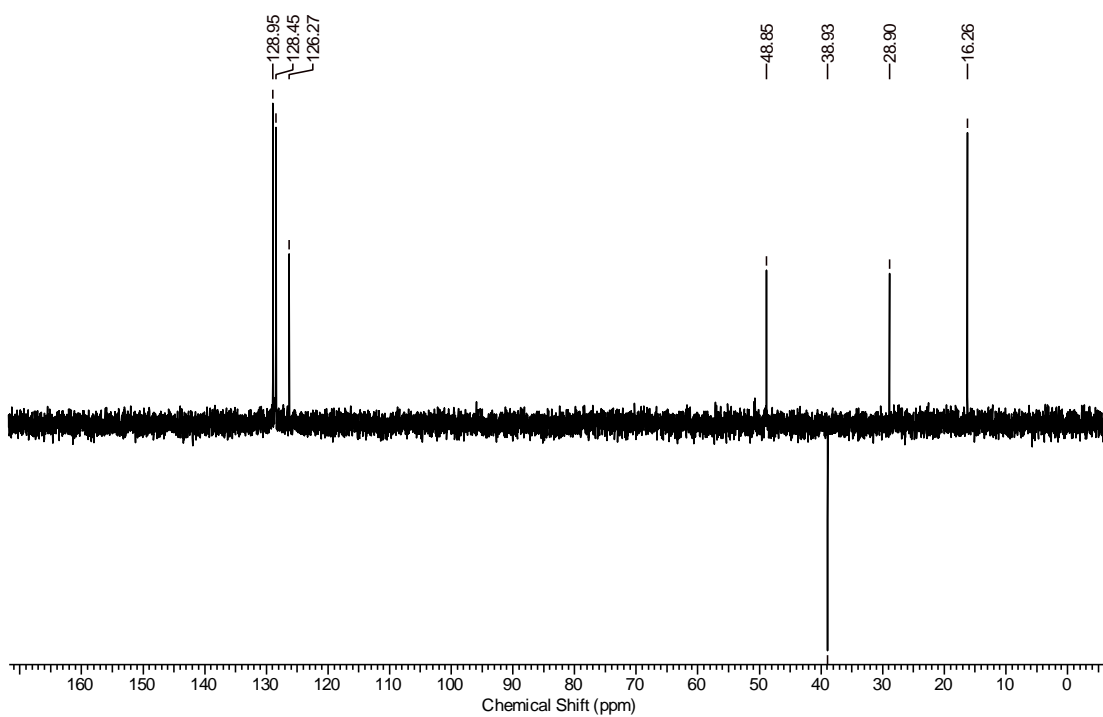
Espectro de RMN DEPT-135 (100 MHz, CDCl_3) do composto 51k



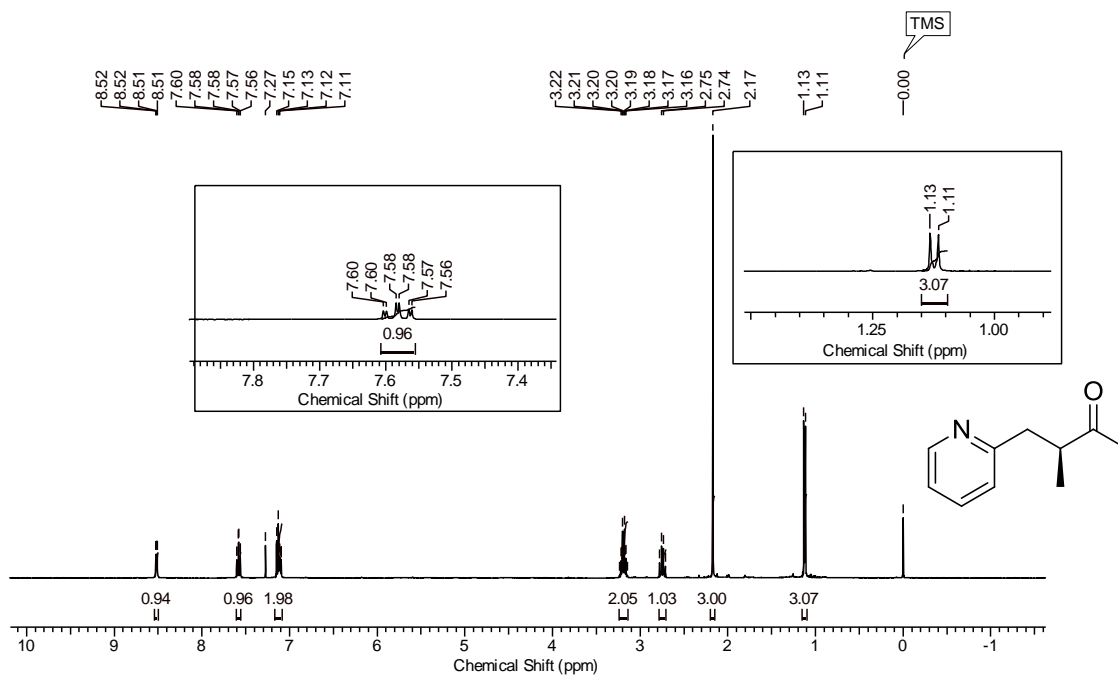
Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) do composto 53a



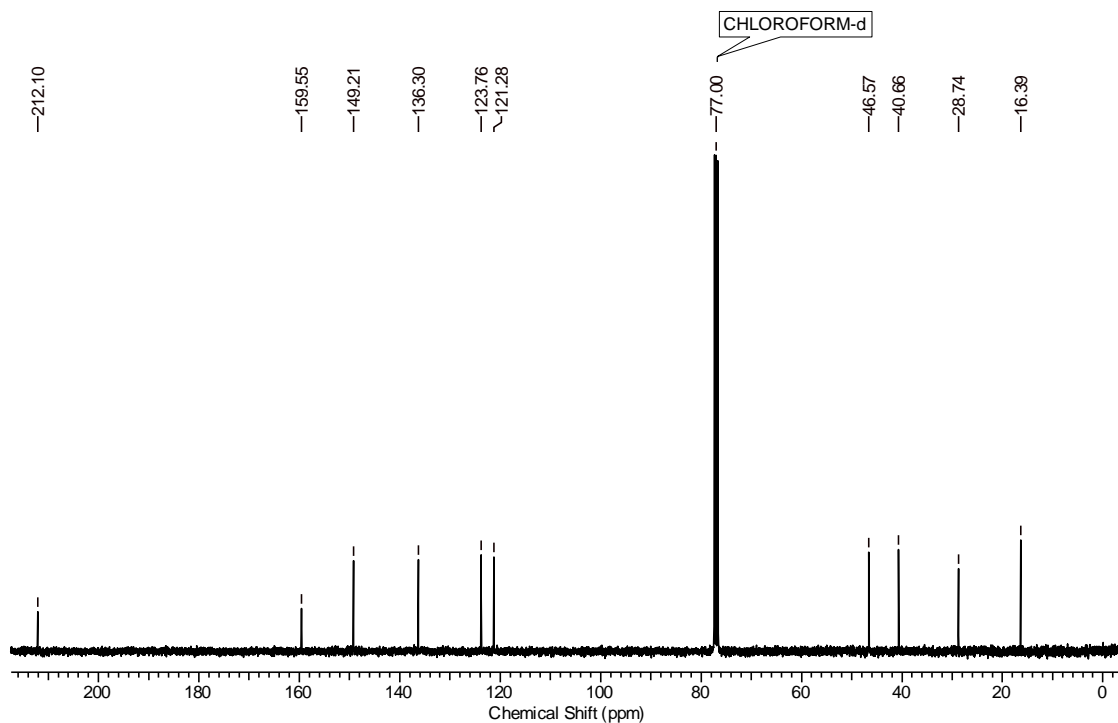
Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) do composto 53a



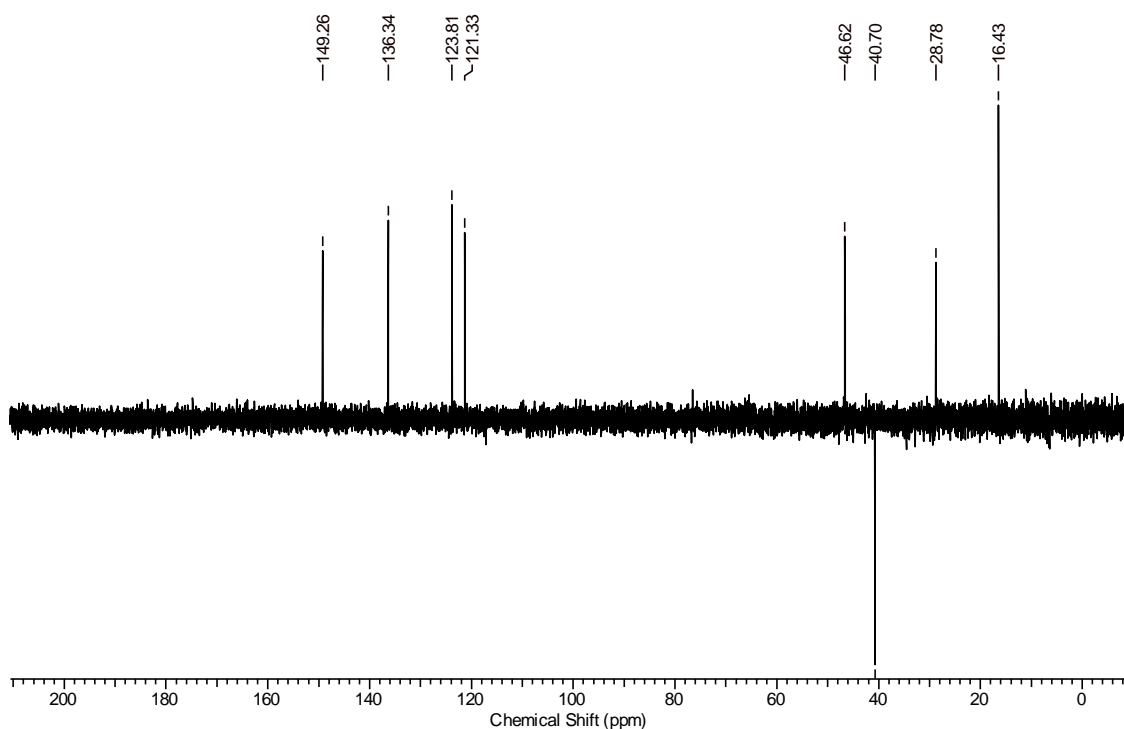
Espectro de RMN de DEPT-135 (100 MHz, CDCl_3) do composto 53a



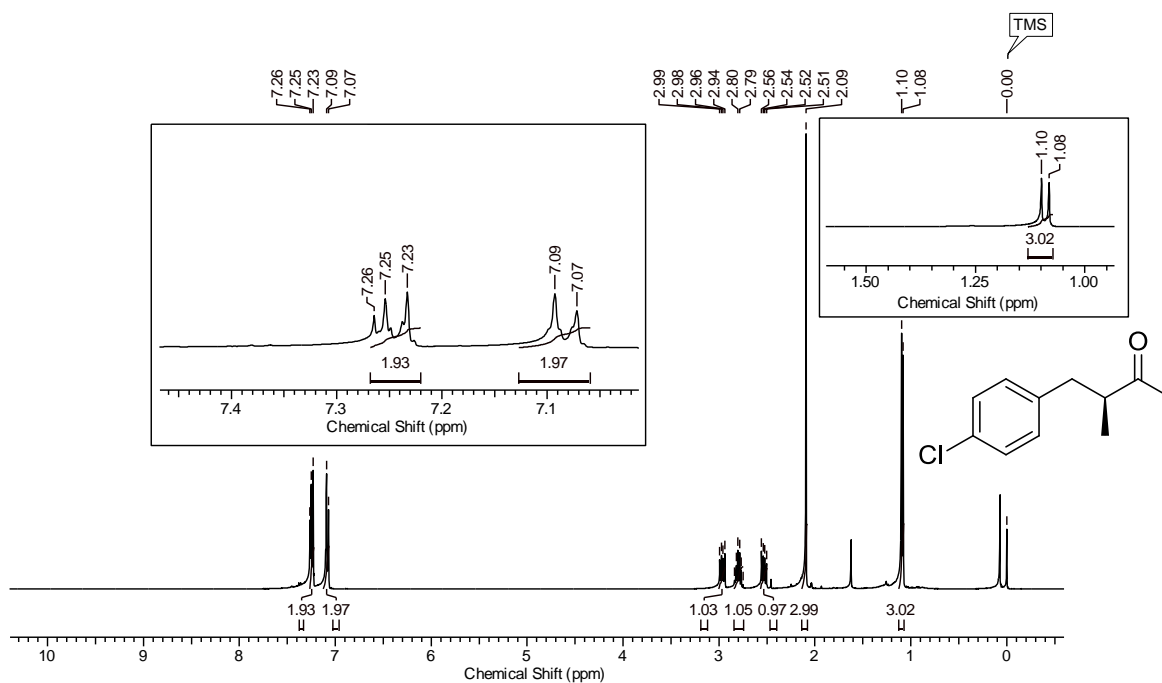
Espectro de RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃) do composto 53b



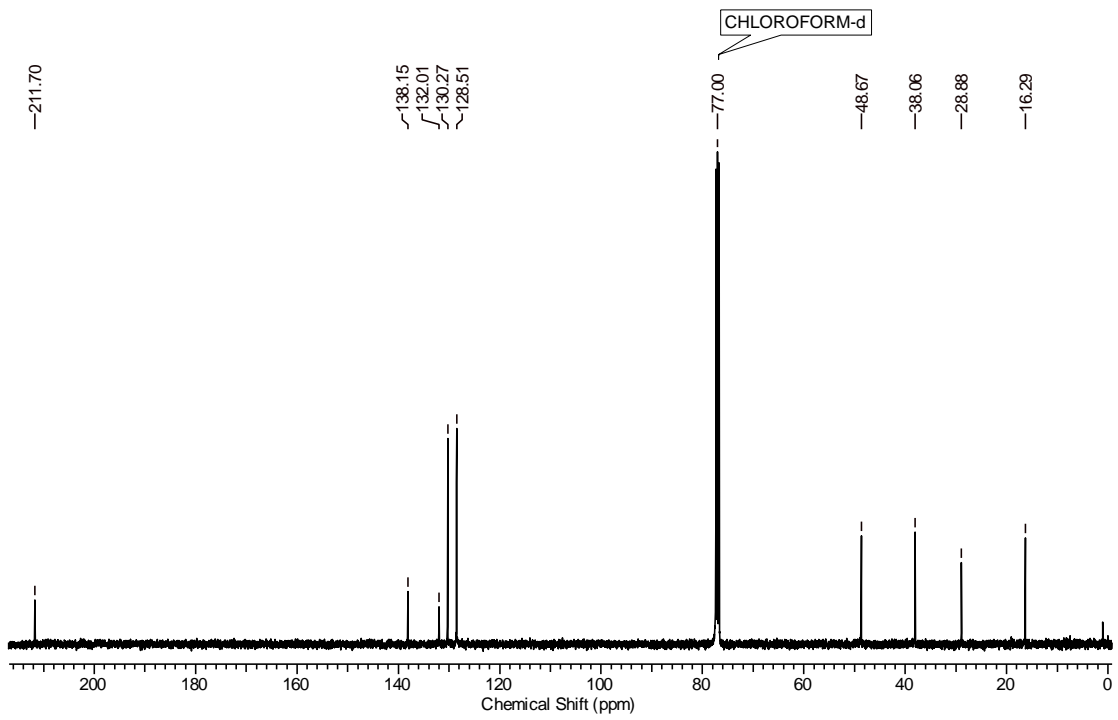
Espectro de RMN de ¹³C (100 MHz, CDCl₃) do composto 53b



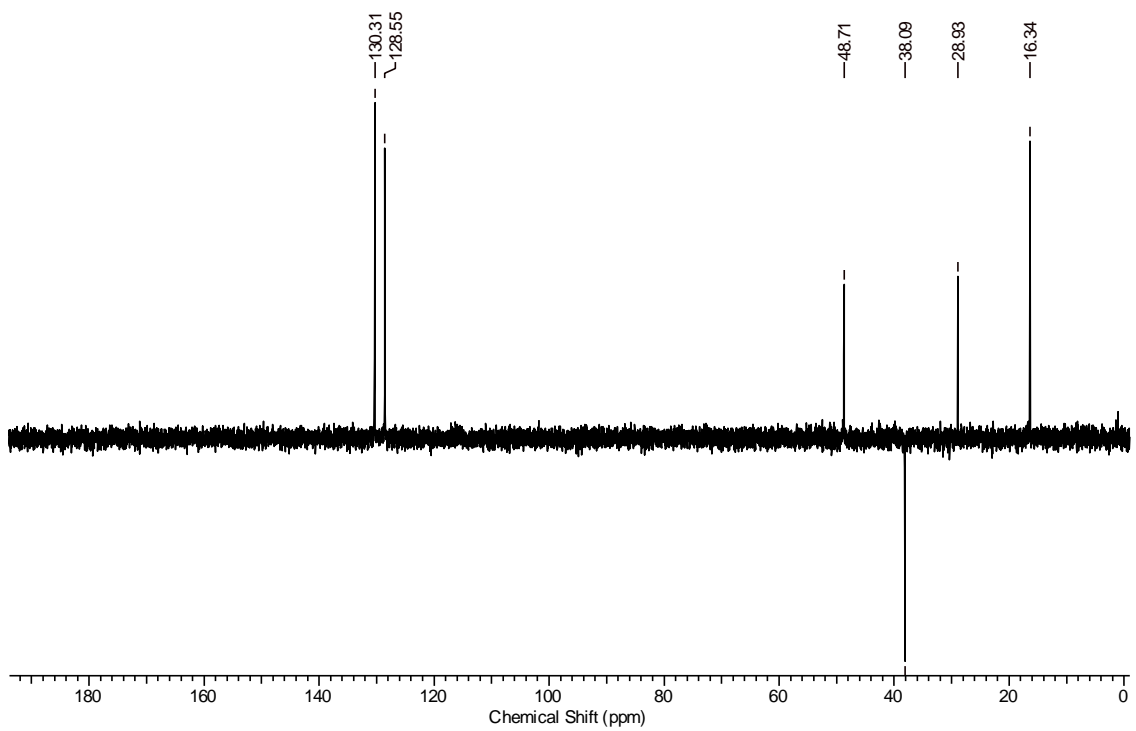
Espectro de RMN de DEPT-135 (100 MHz, CDCl_3) do composto 53b



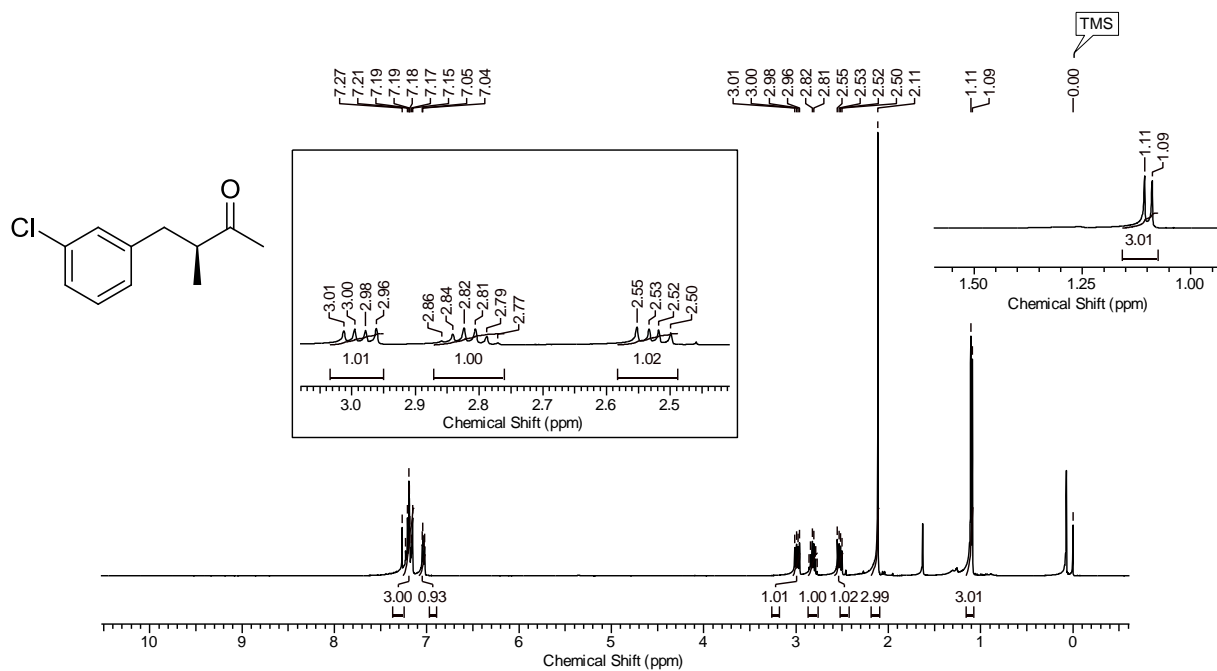
Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) do composto 53c



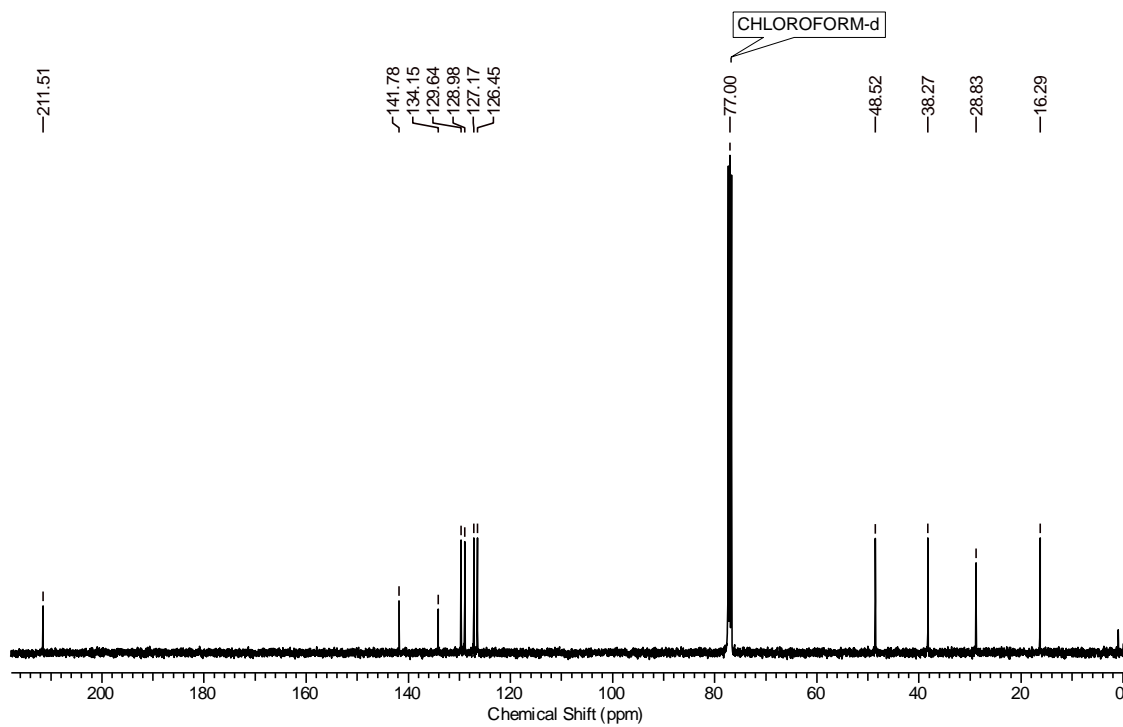
Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) do composto 53c



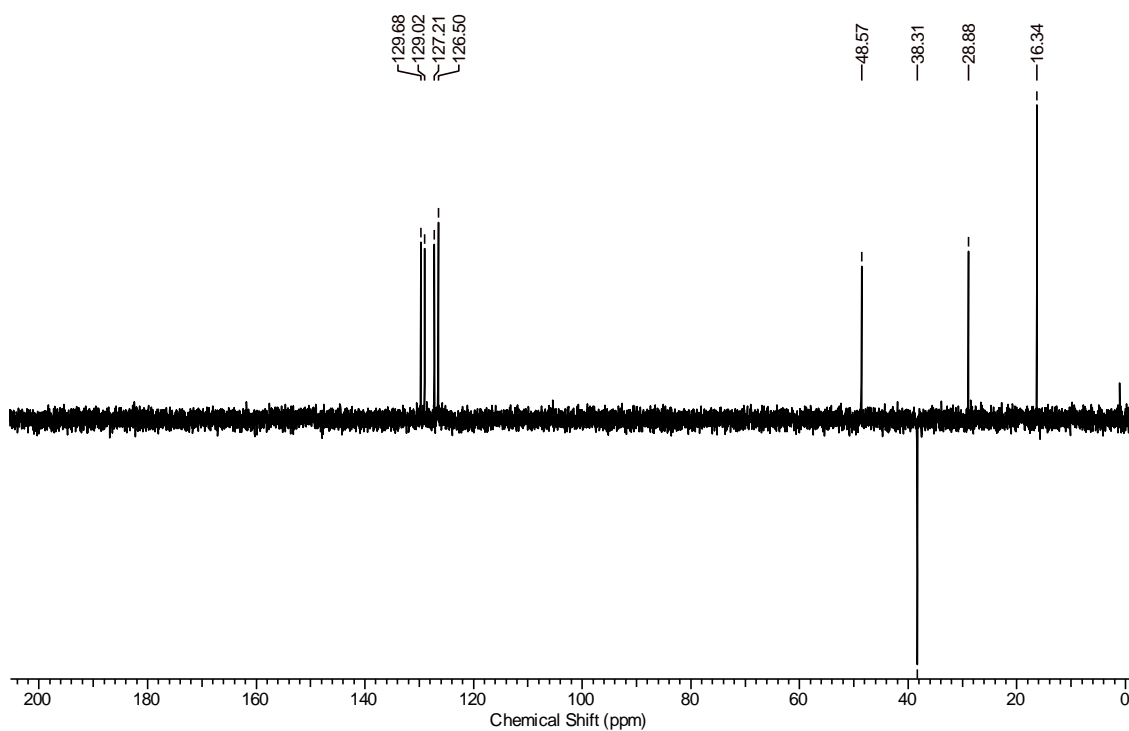
Espectro de RMN de DEPT-135 (100 MHz, CDCl_3) do composto 53c



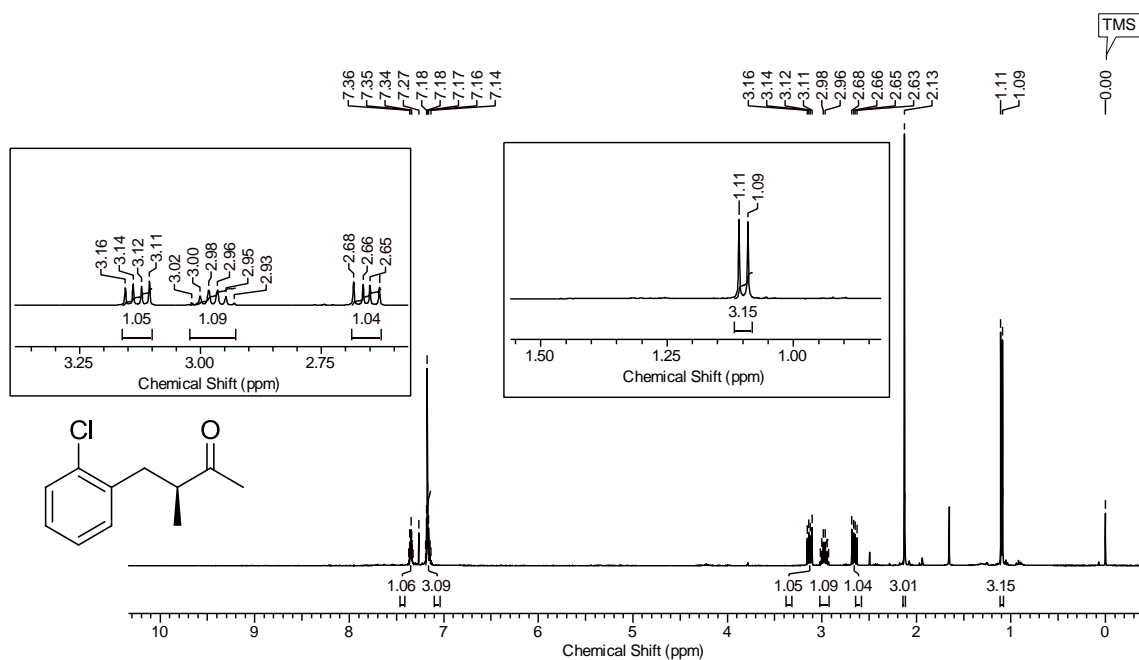
Espectro de RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃) do composto 53d



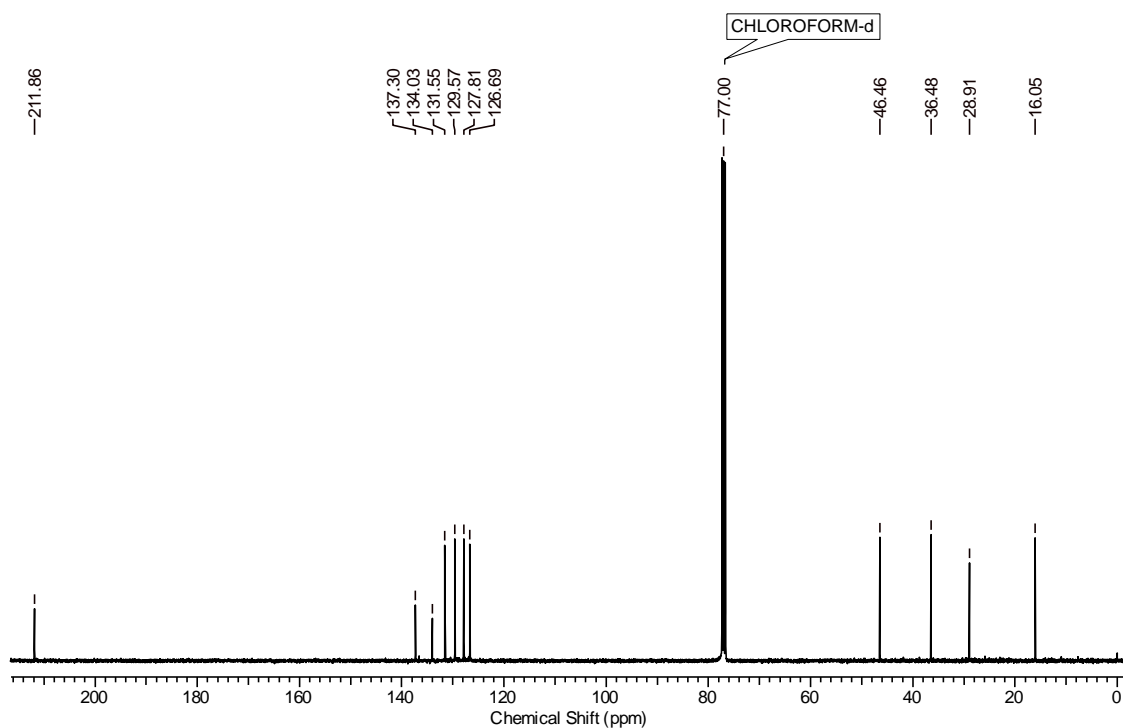
Espectro de RMN de ¹³C (100 MHz, CDCl₃) do composto 53d



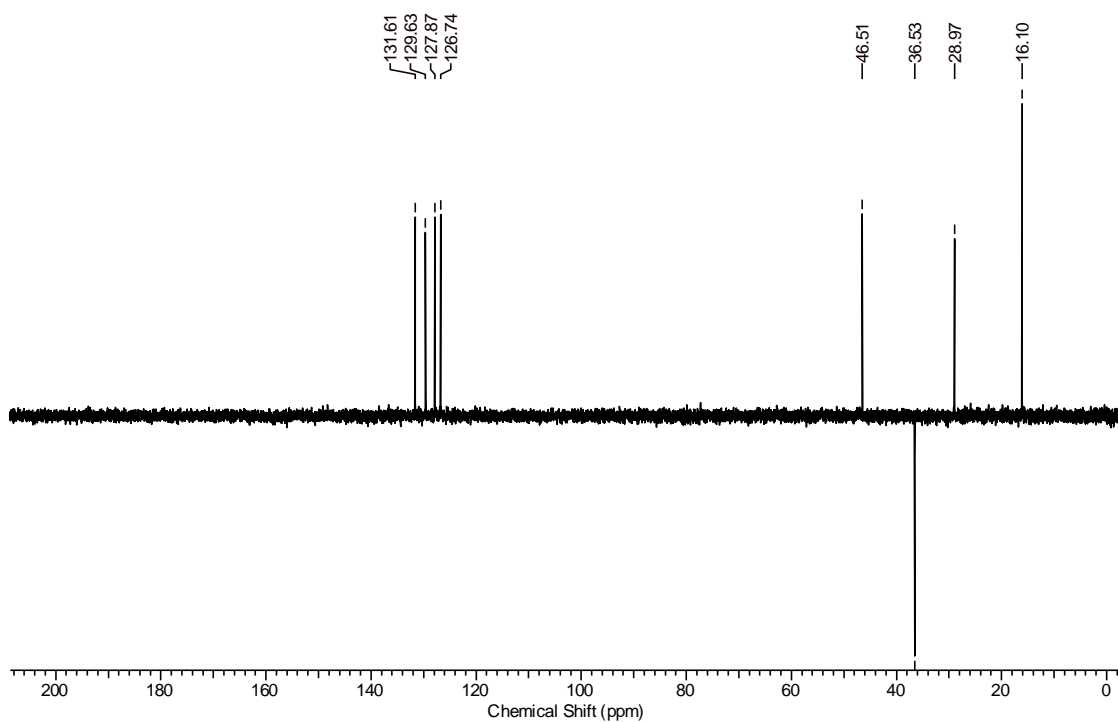
Espectro de RMN de DEPT-135 (100 MHz, CDCl_3) do composto 53d



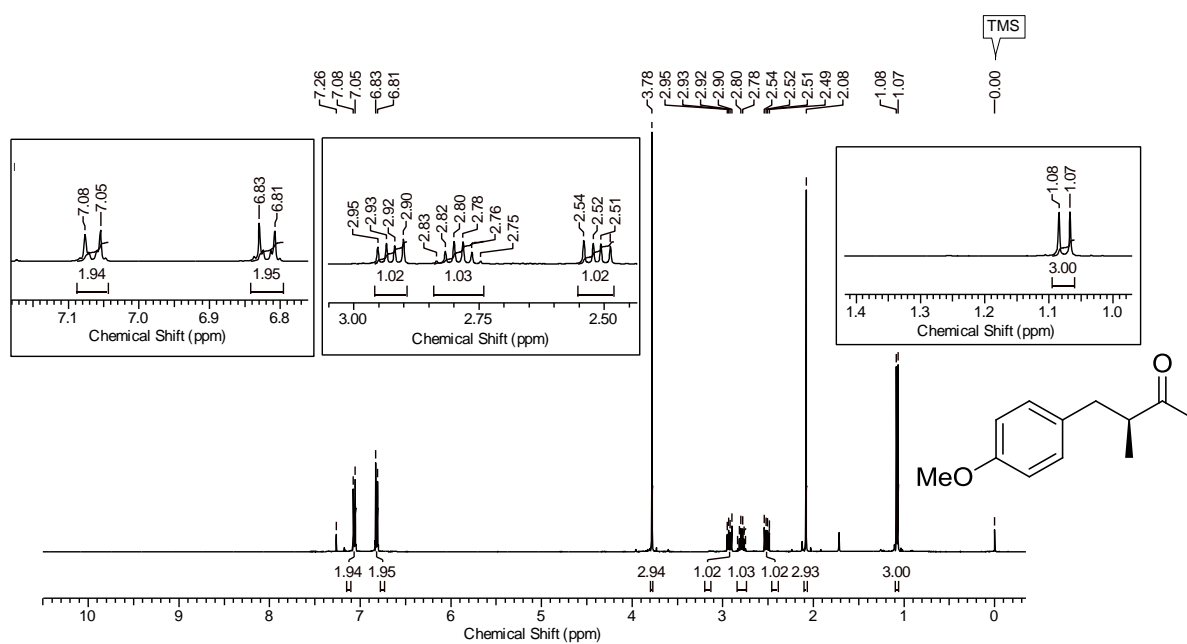
Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) do composto 53e



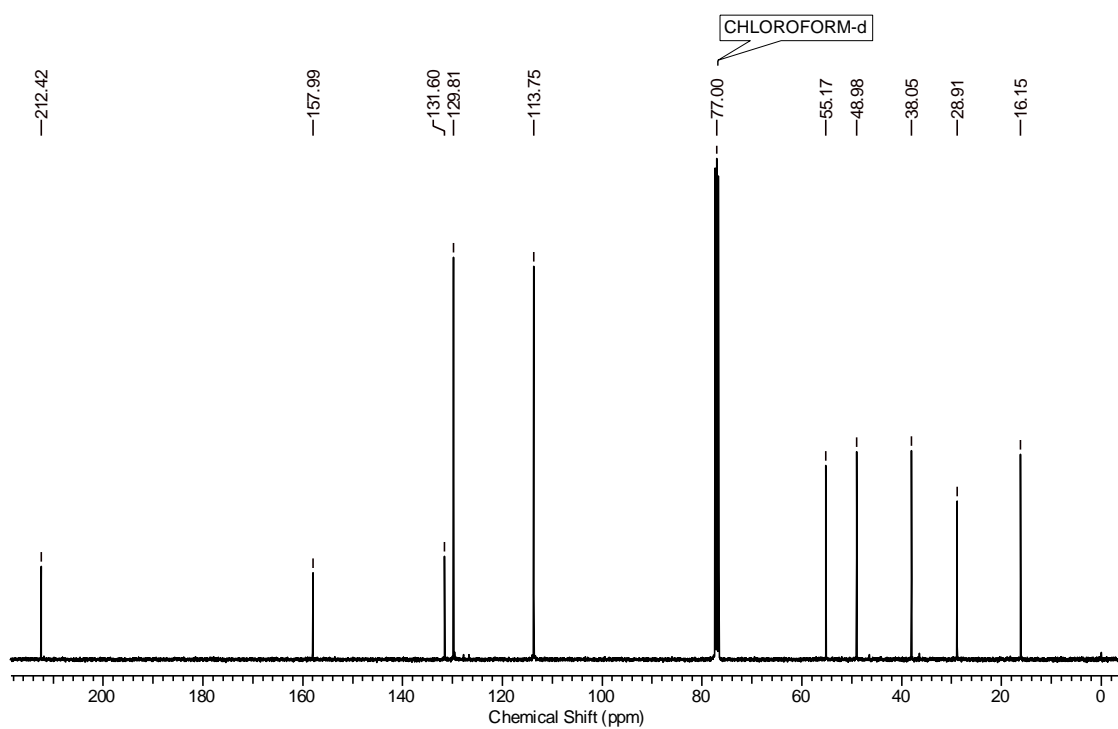
Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) do composto 53e



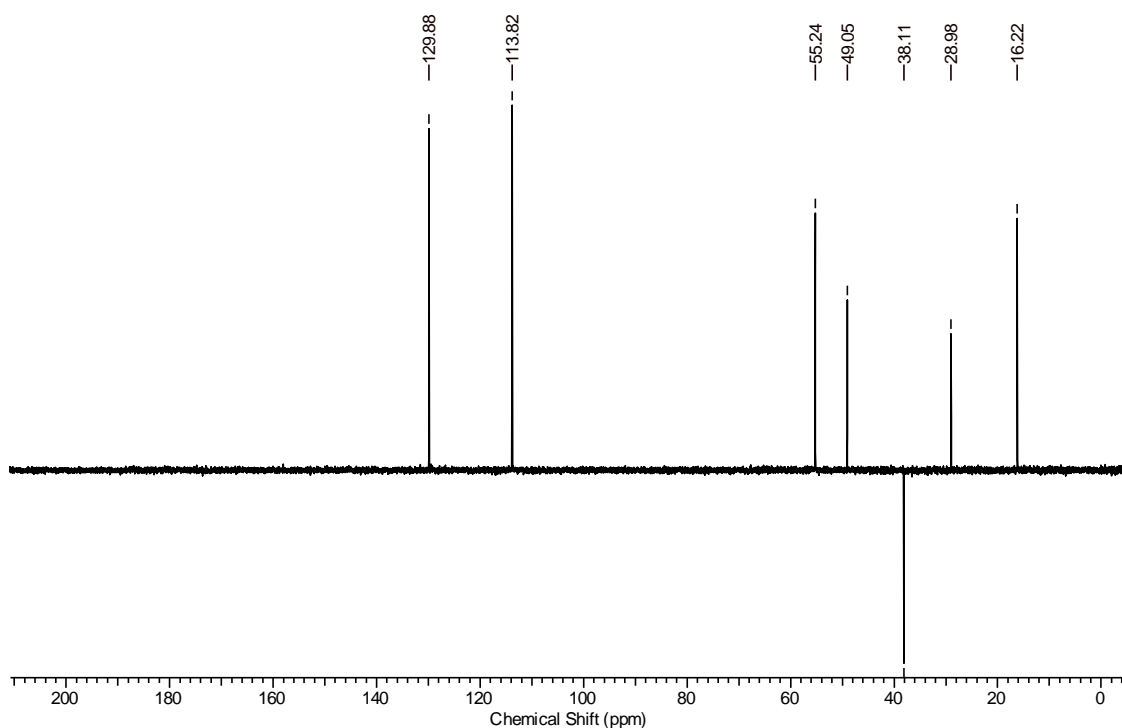
Espectro de RMN de DEPT-135 (100 MHz, CDCl_3) do composto 53e



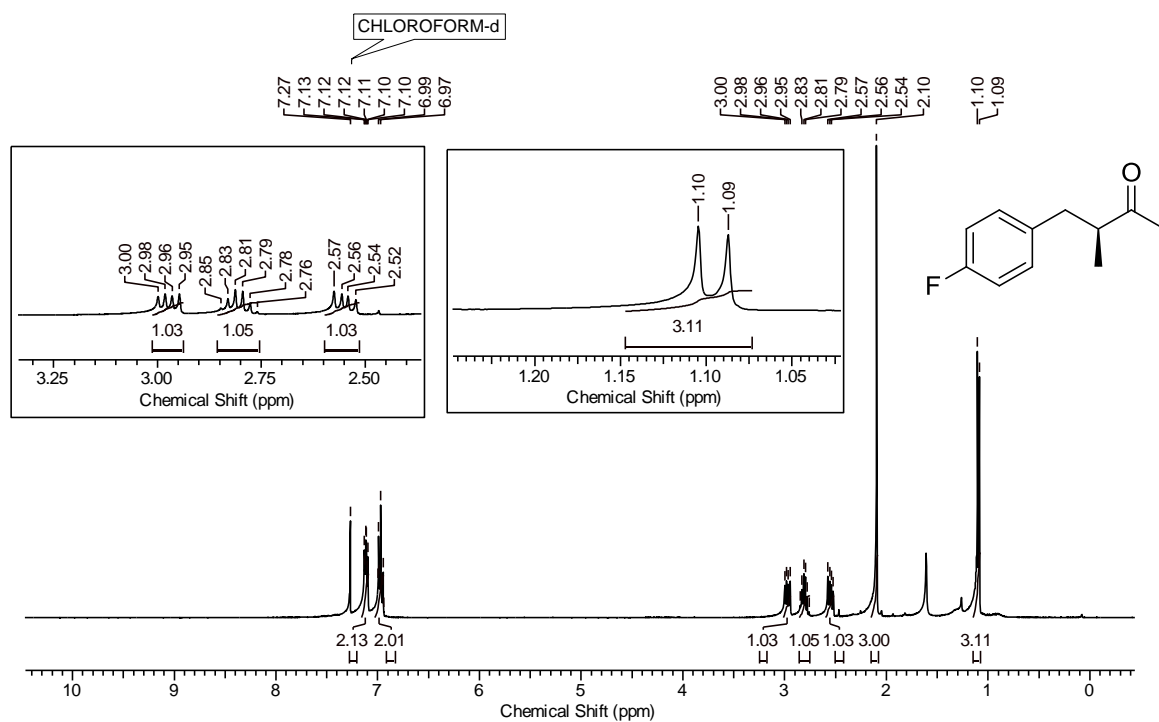
Espectro de RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃) do composto 53f



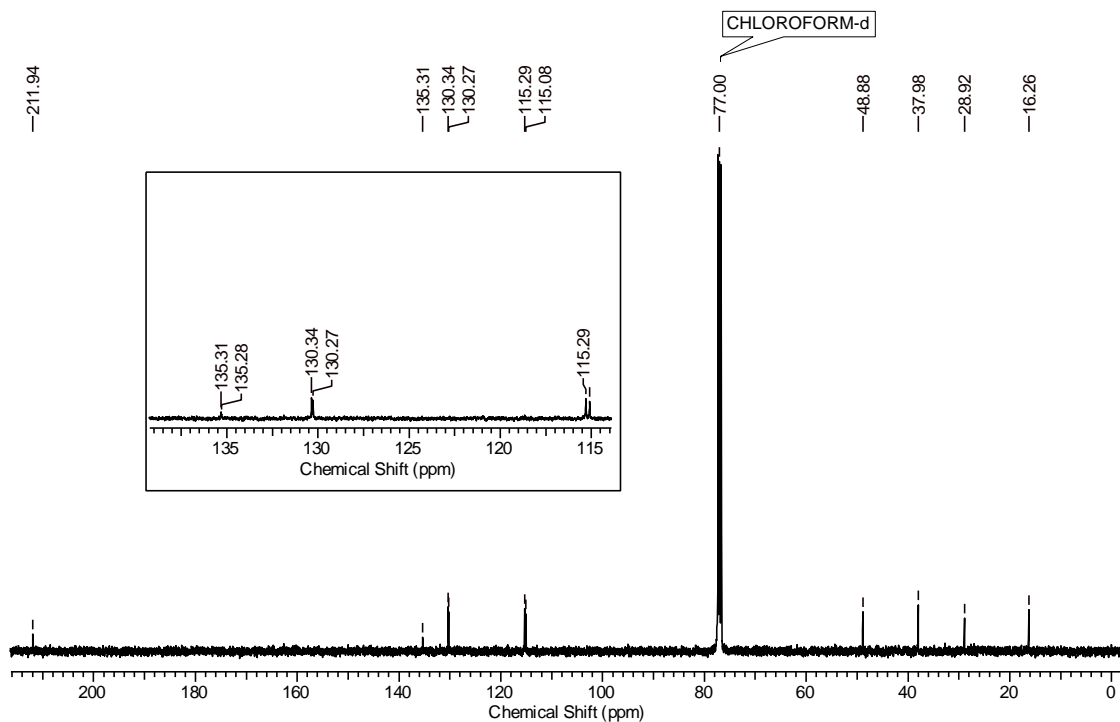
Espectro de RMN de ¹³C (100 MHz, CDCl₃) do composto 53f



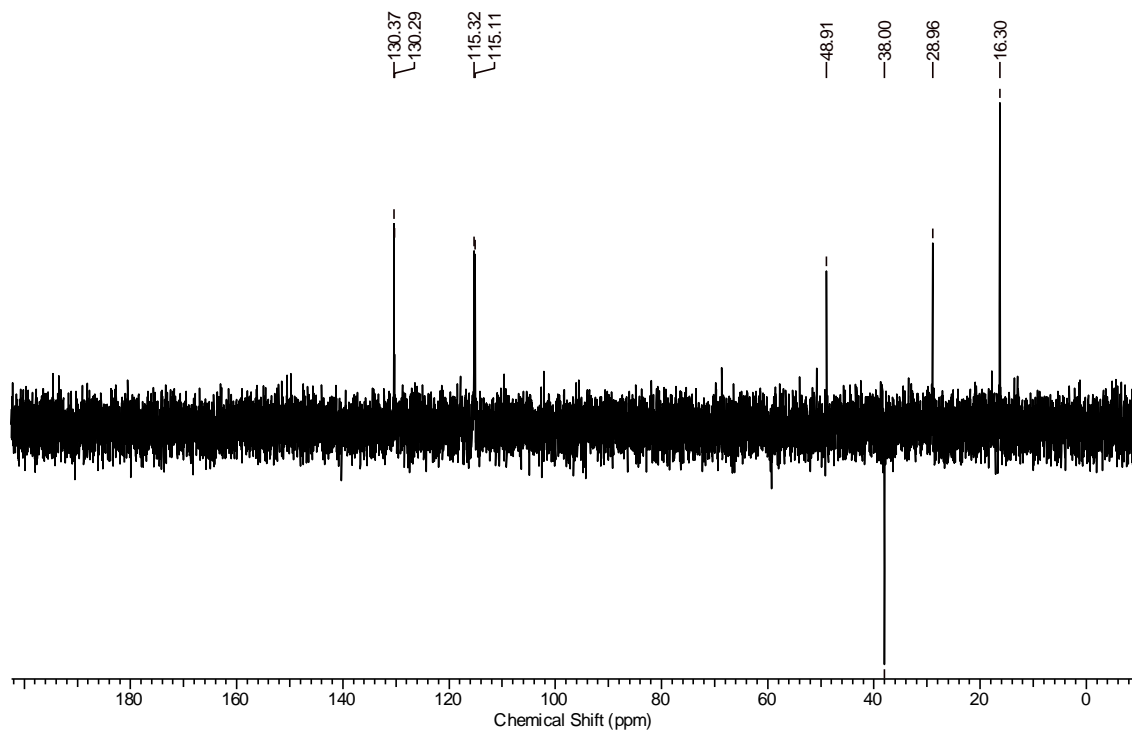
Espectro de RMN de DEPT-135 (100 MHz, CDCl_3) do composto 53f



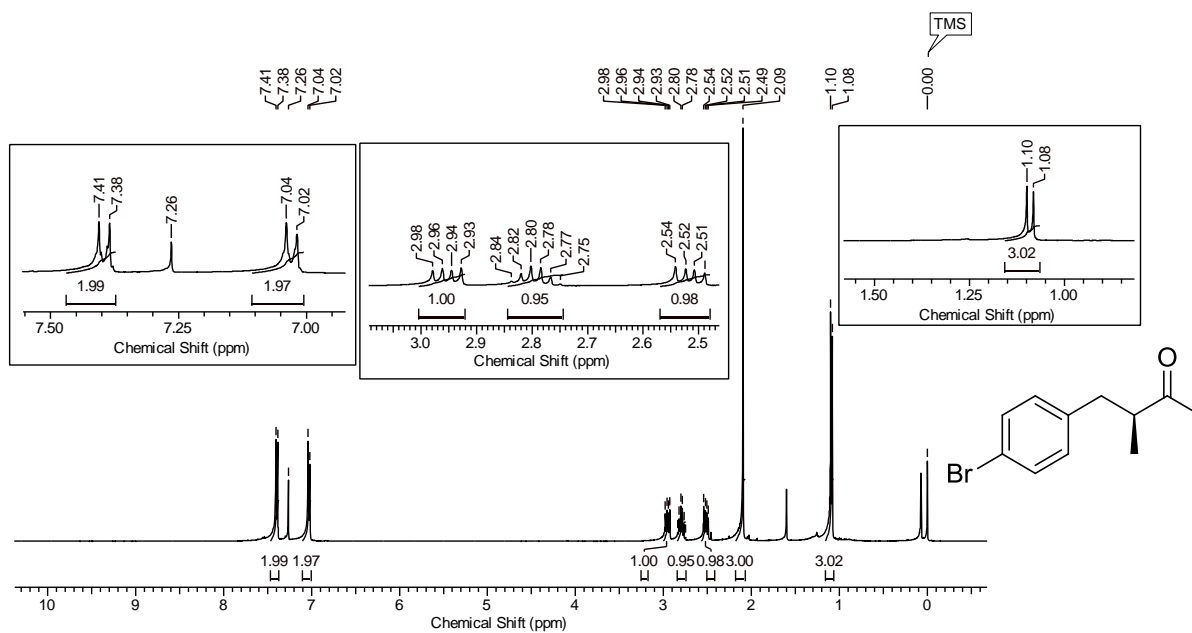
Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) do composto 53g



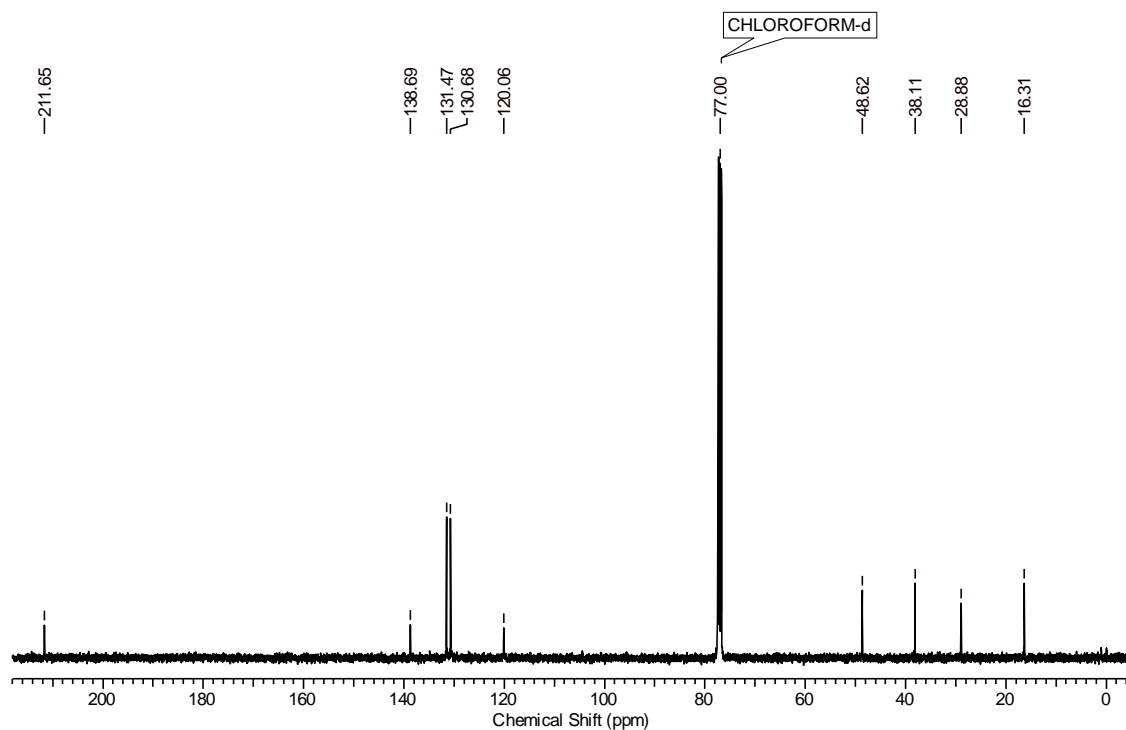
Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) do composto 53g



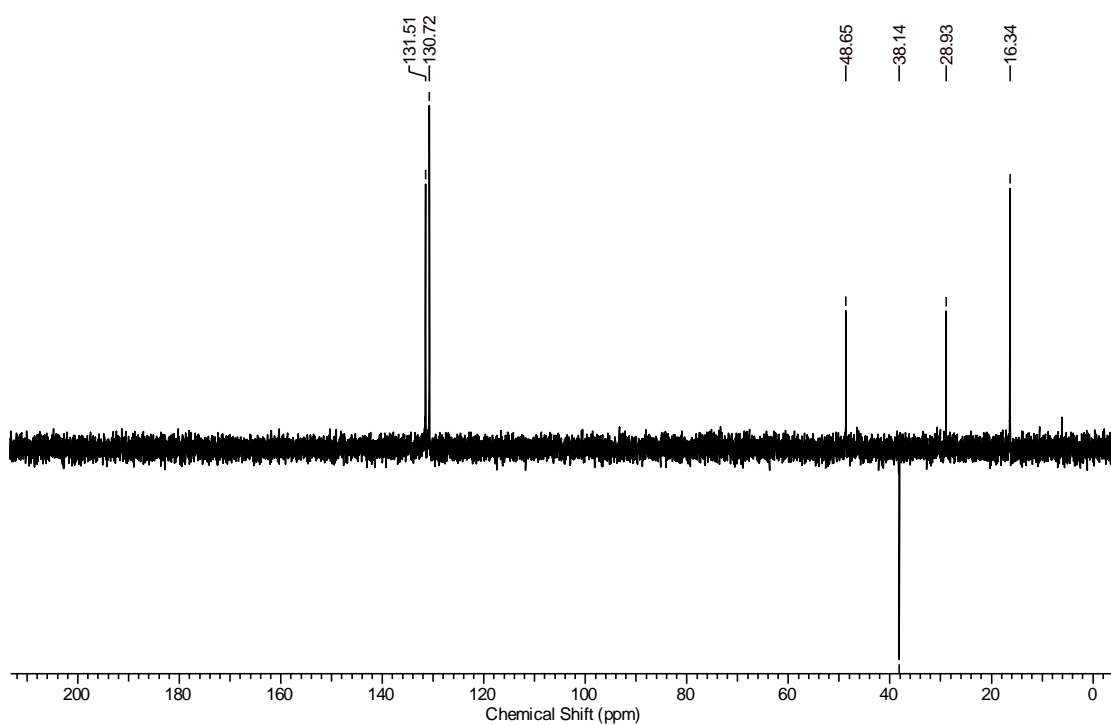
Espectro de RMN de DEPT-135 (100 MHz, CDCl_3) do composto 53g



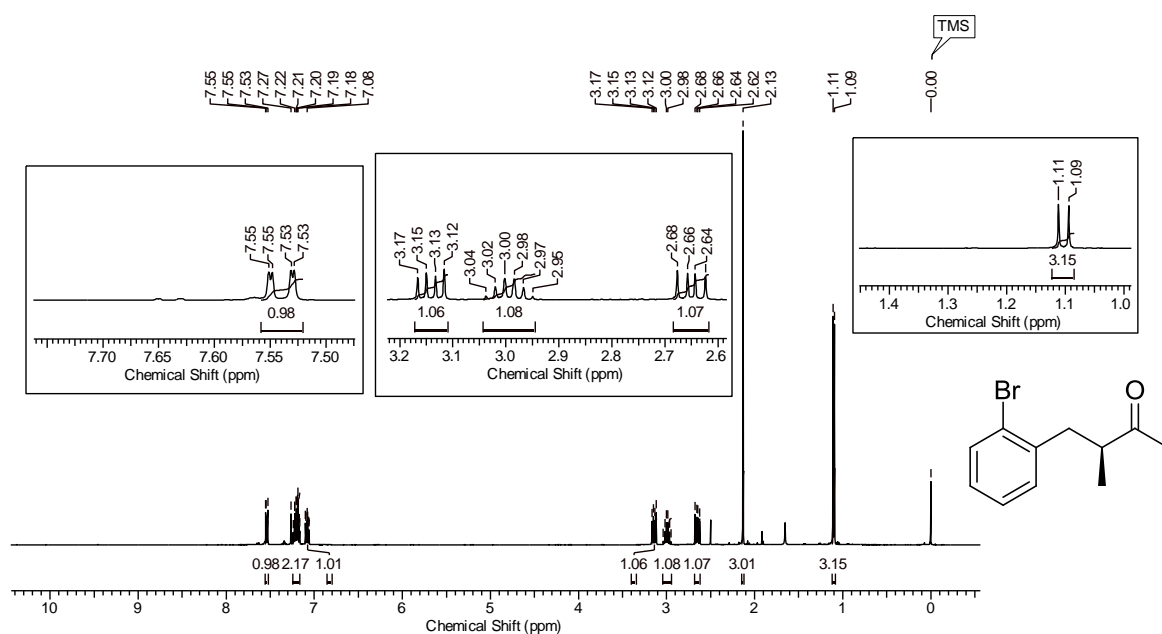
Espectro de RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃) do composto 53h



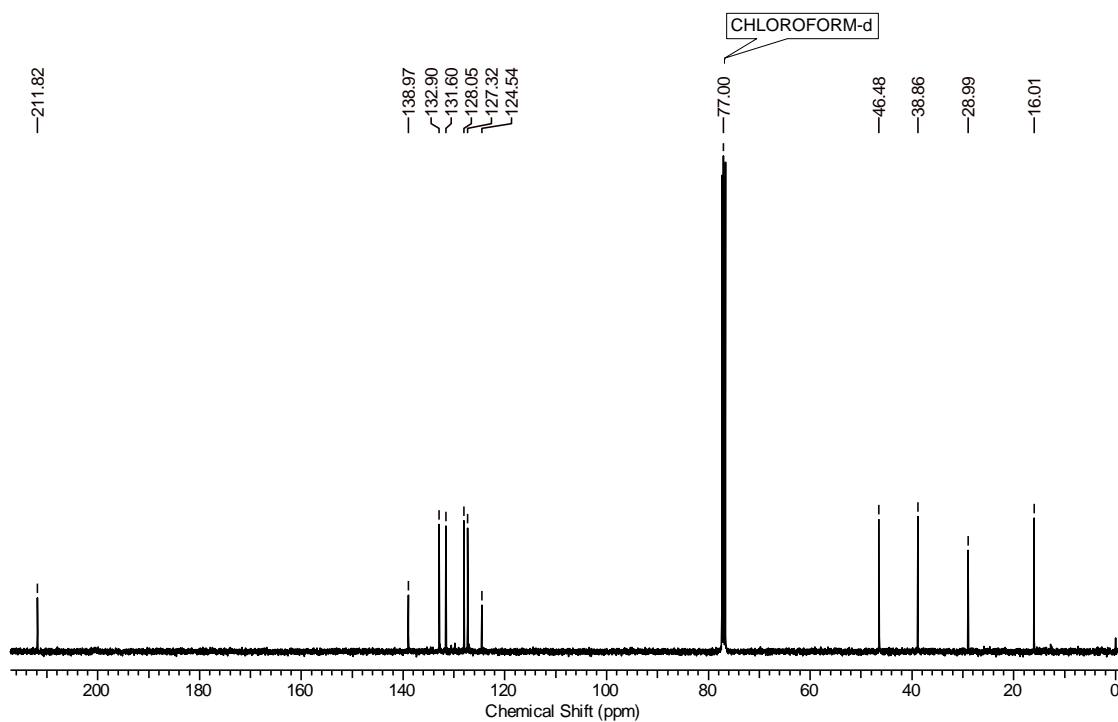
Espectro de RMN de ¹³C (100 MHz, CDCl₃) do composto 53h



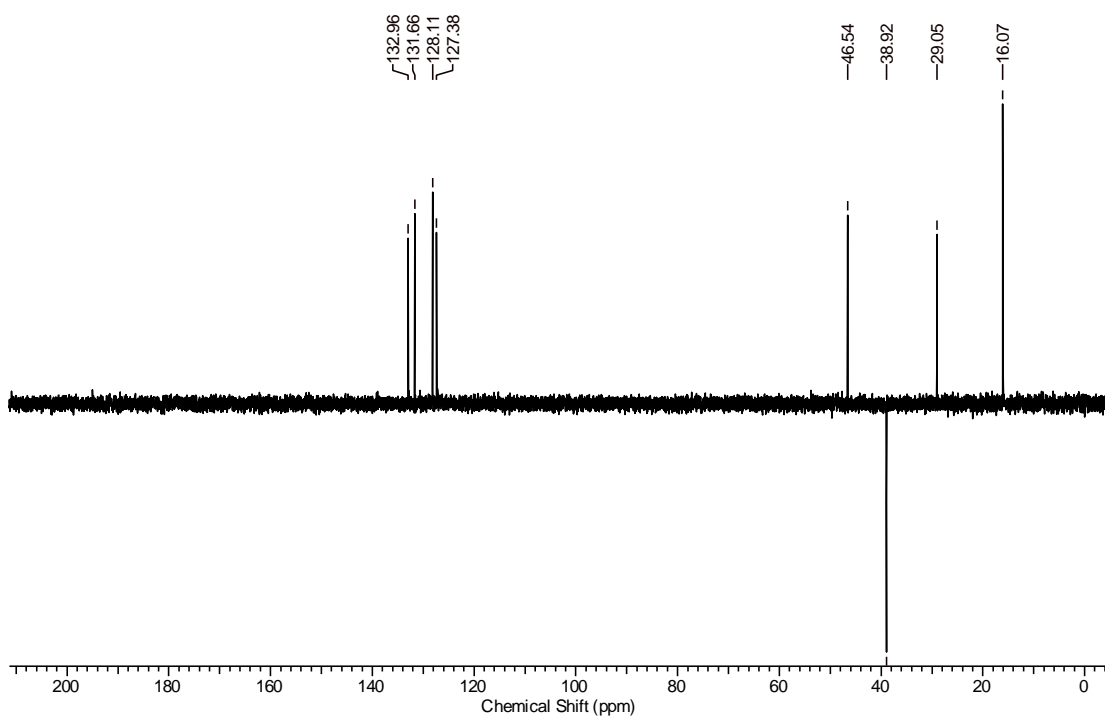
Espectro de RMN de DEPT-135 (100 MHz, CDCl_3) do composto 53h



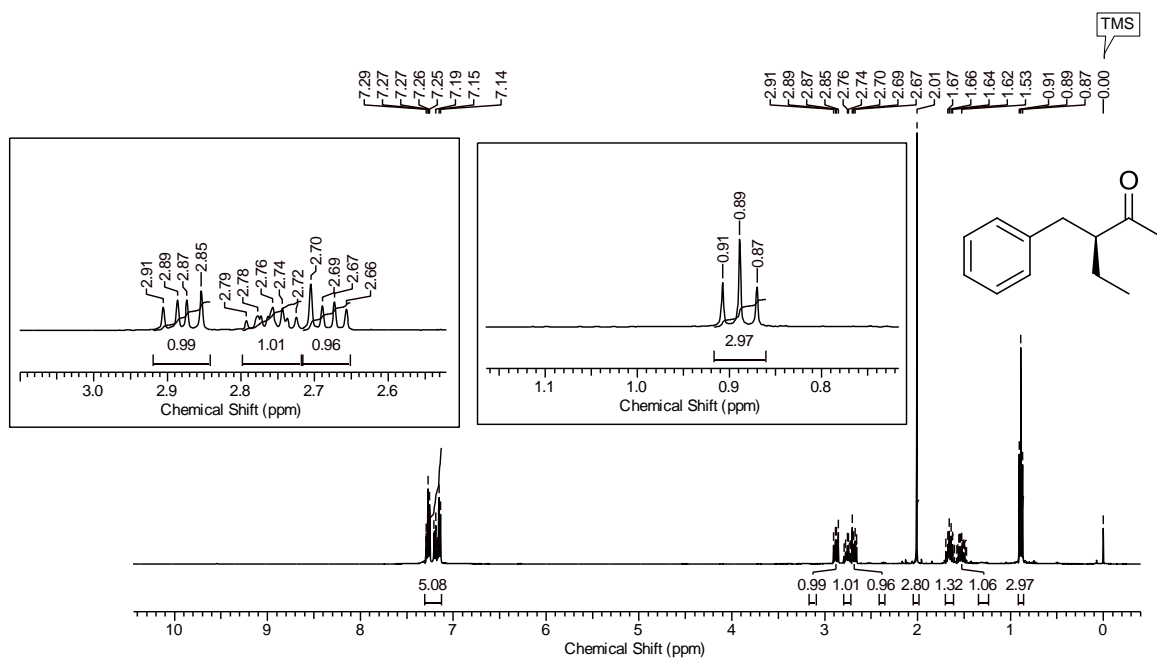
Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) do composto 53i



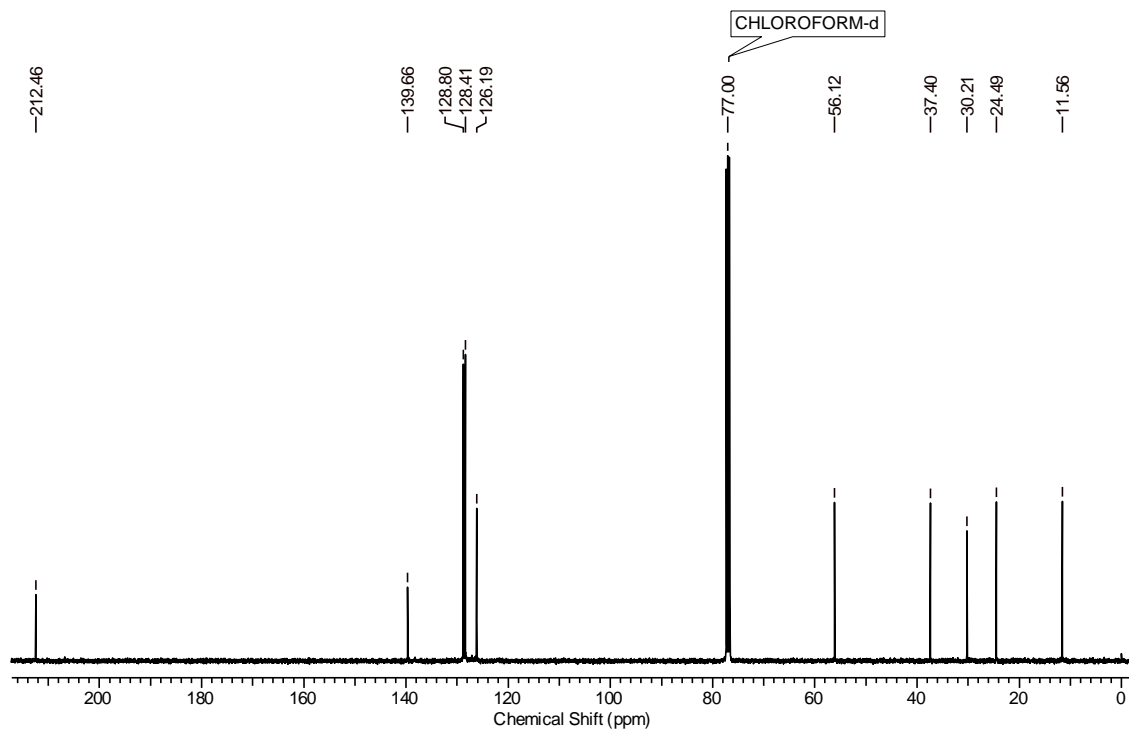
Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) do composto 53i



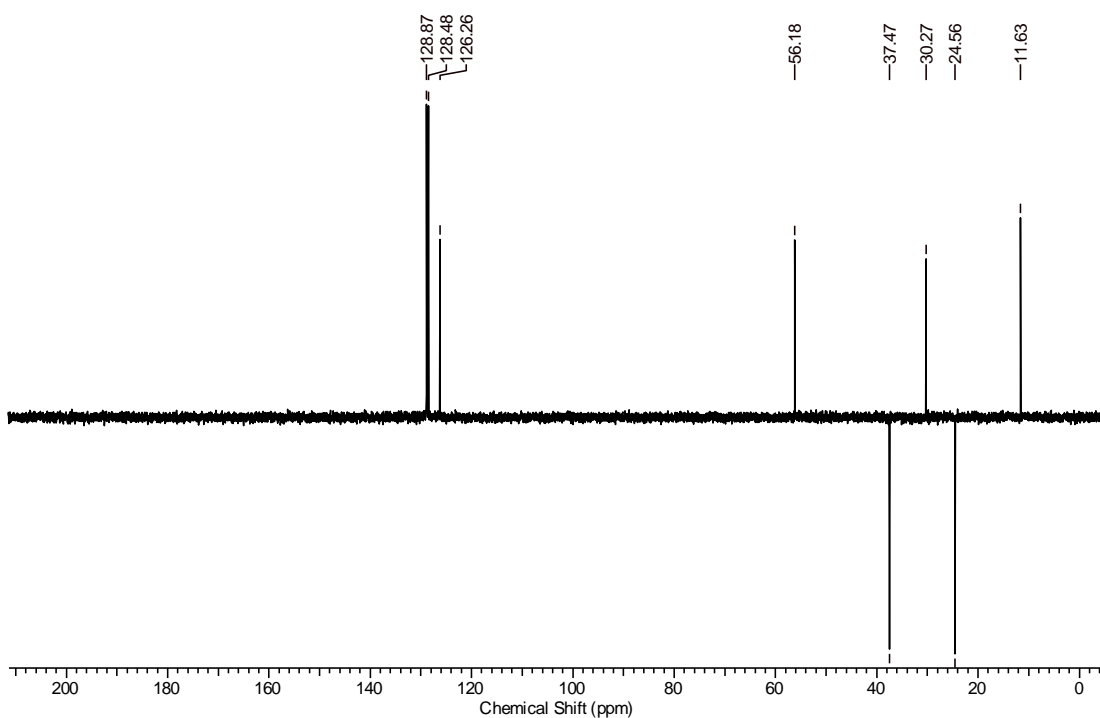
Espectro de RMN de DEPT-135 (100 MHz, CDCl_3) do composto 53i



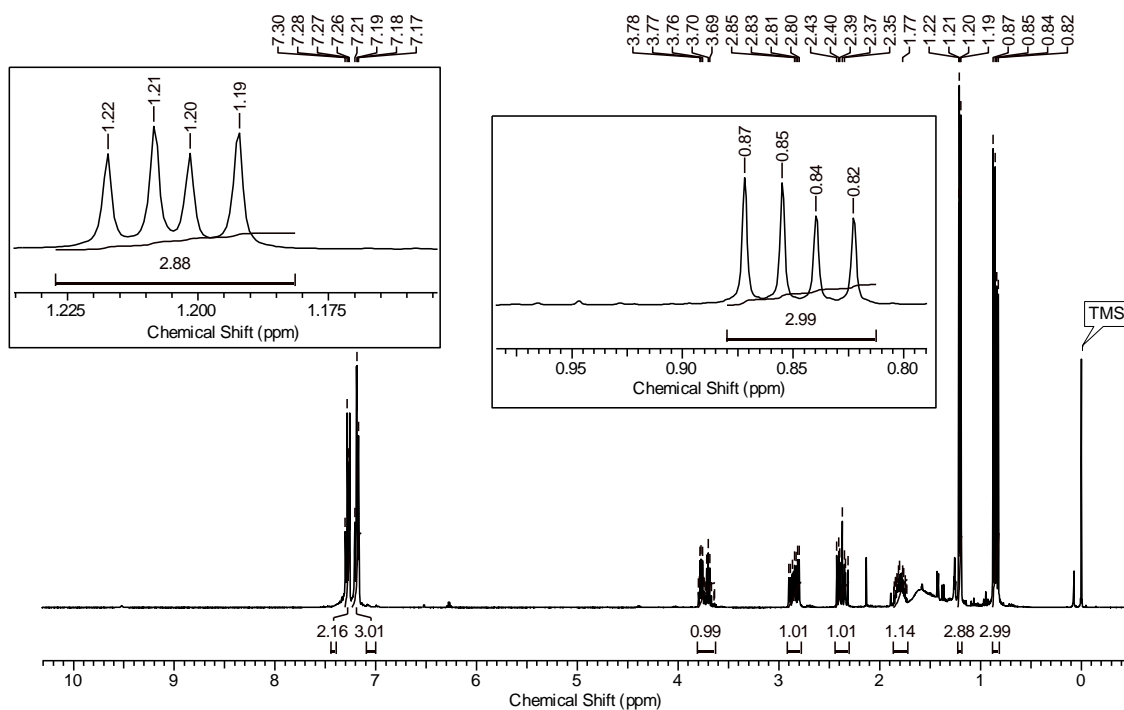
Espectro de RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃) do composto 53j



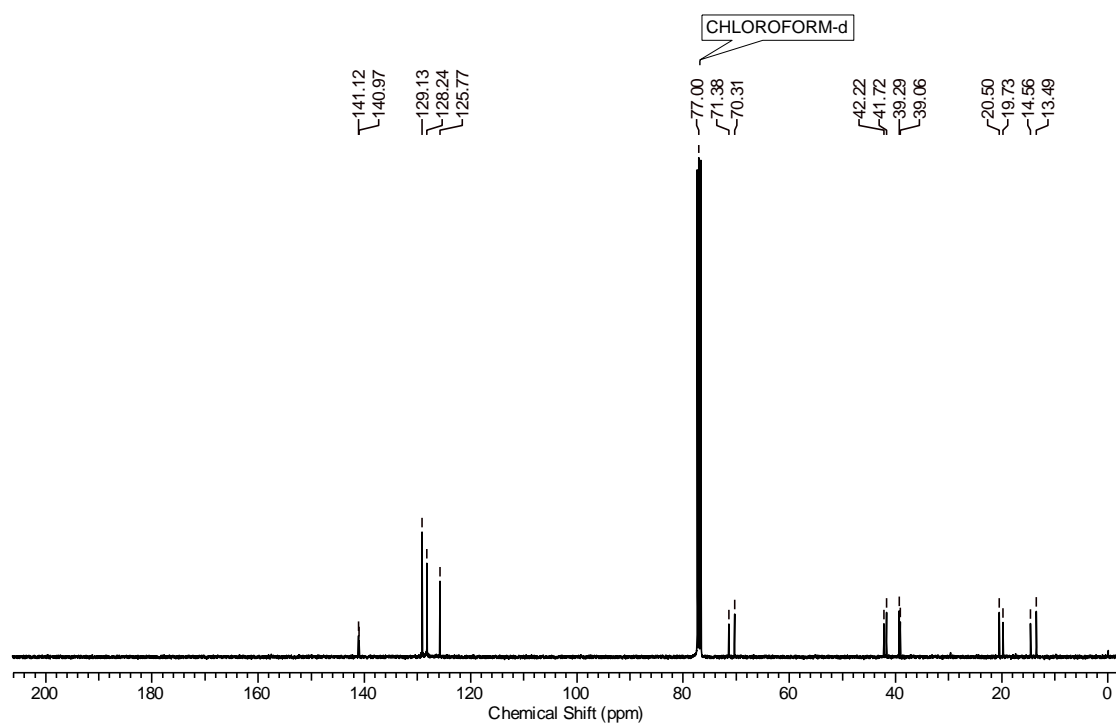
Espectro de RMN de ¹³C (100 MHz, CDCl₃) do composto 53j



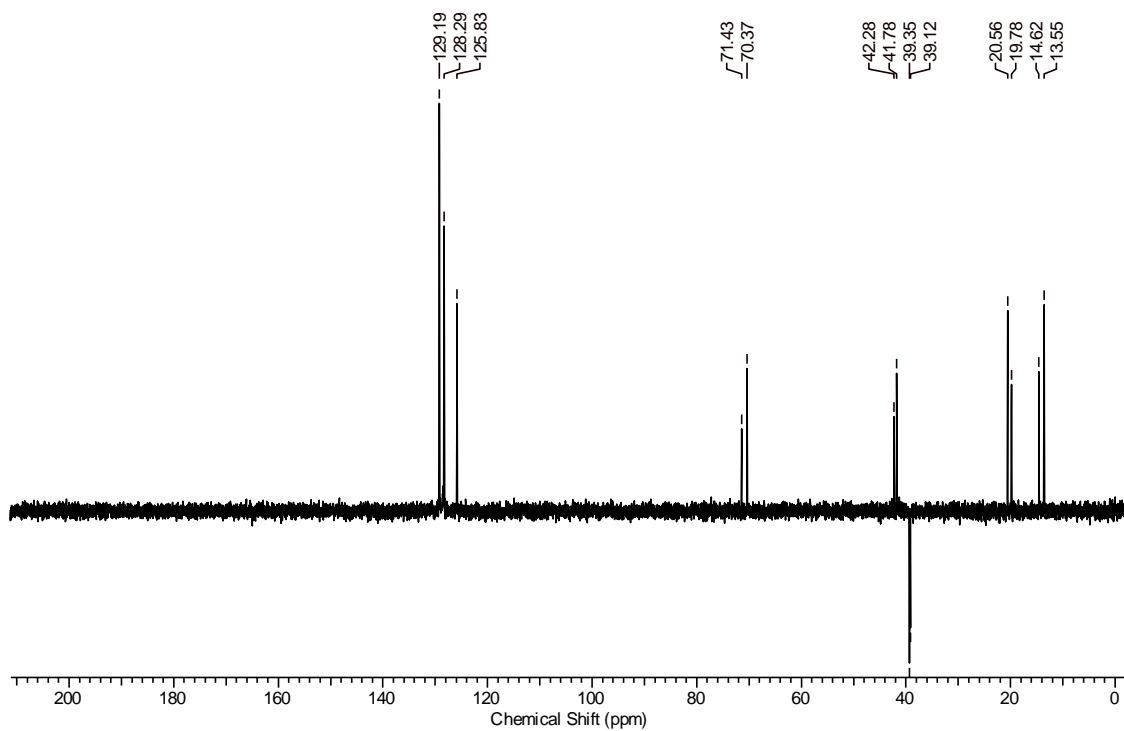
Espectro de RMN de DEPT-135 (100 MHz, CDCl_3) do composto 53j



Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) dos compostos *syn*-54a e *anti*-54a

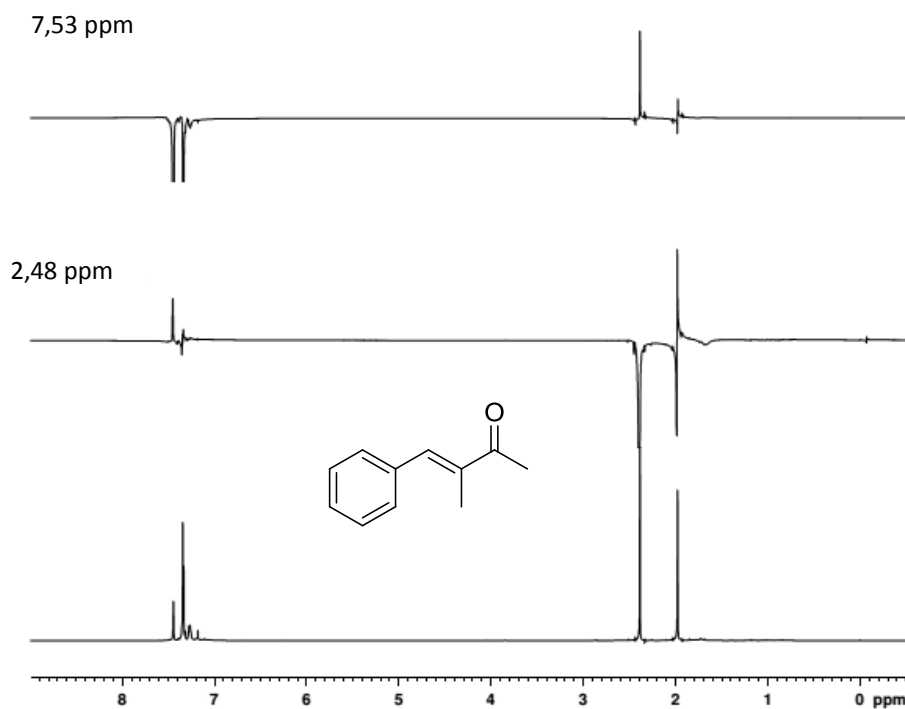
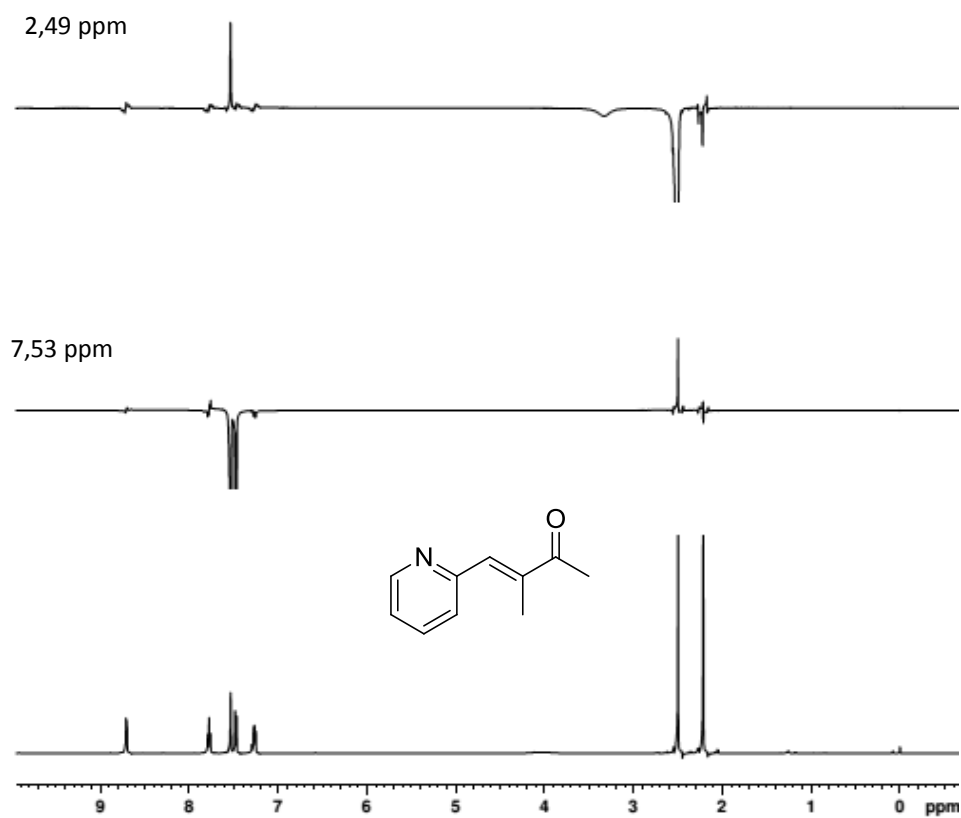


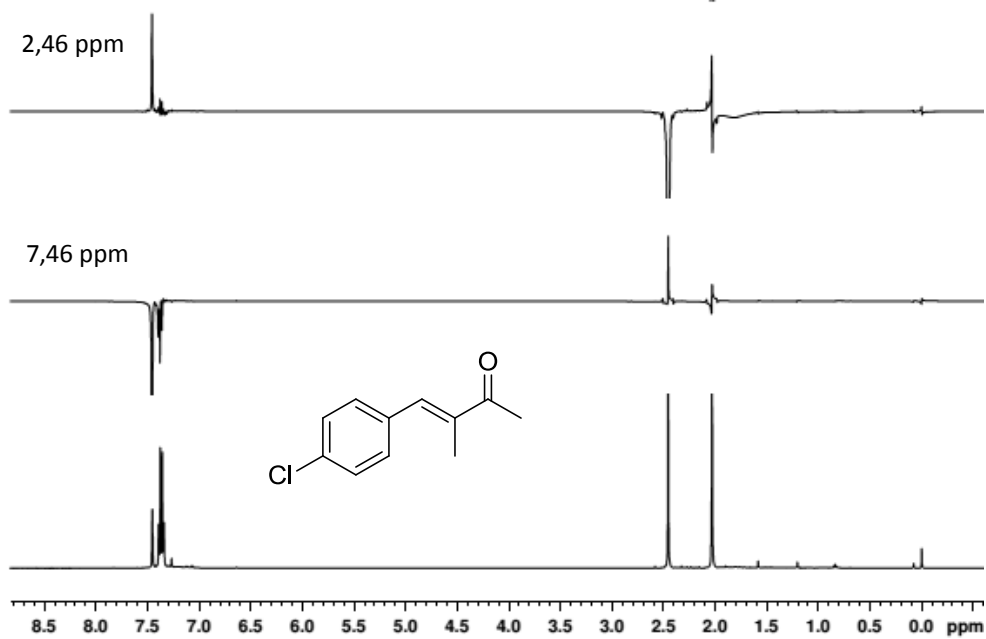
Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) do composto *syn*-54a e *anti*-54a



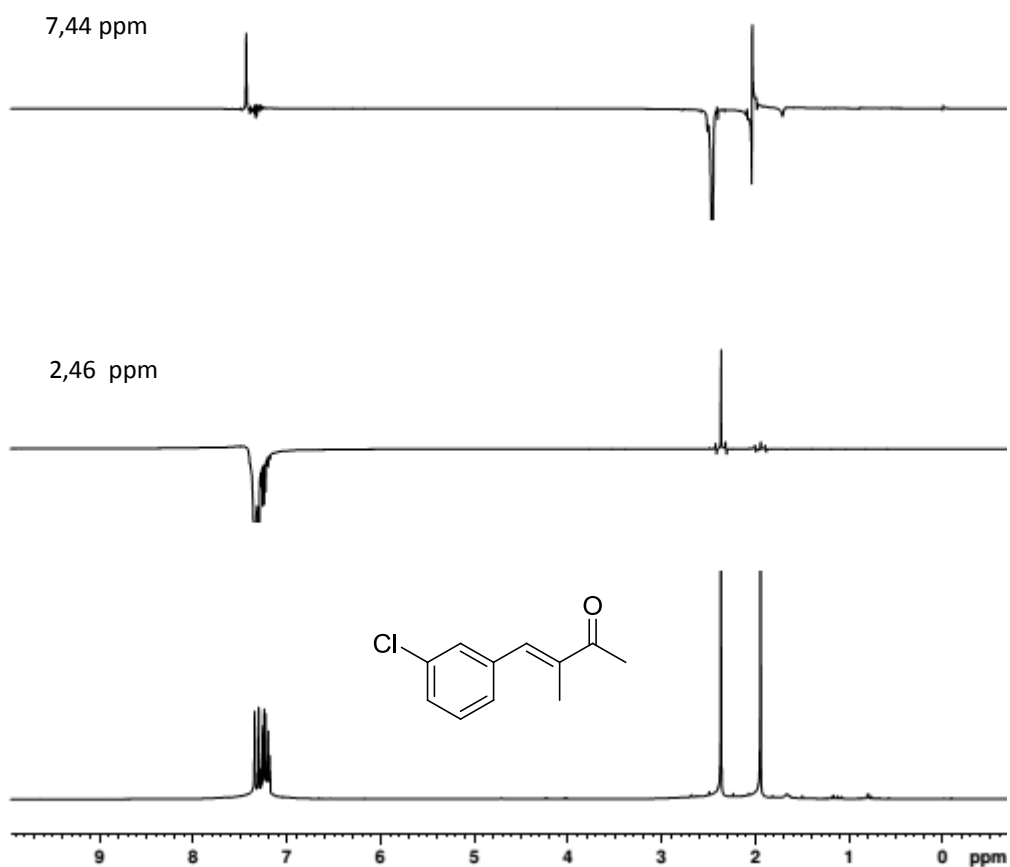
Espectro de RMN de DEPT-135 (100 MHz, CDCl_3) do composto *syn*-54a e *anti*-54a

7.2. Espectros de diferença de NOE

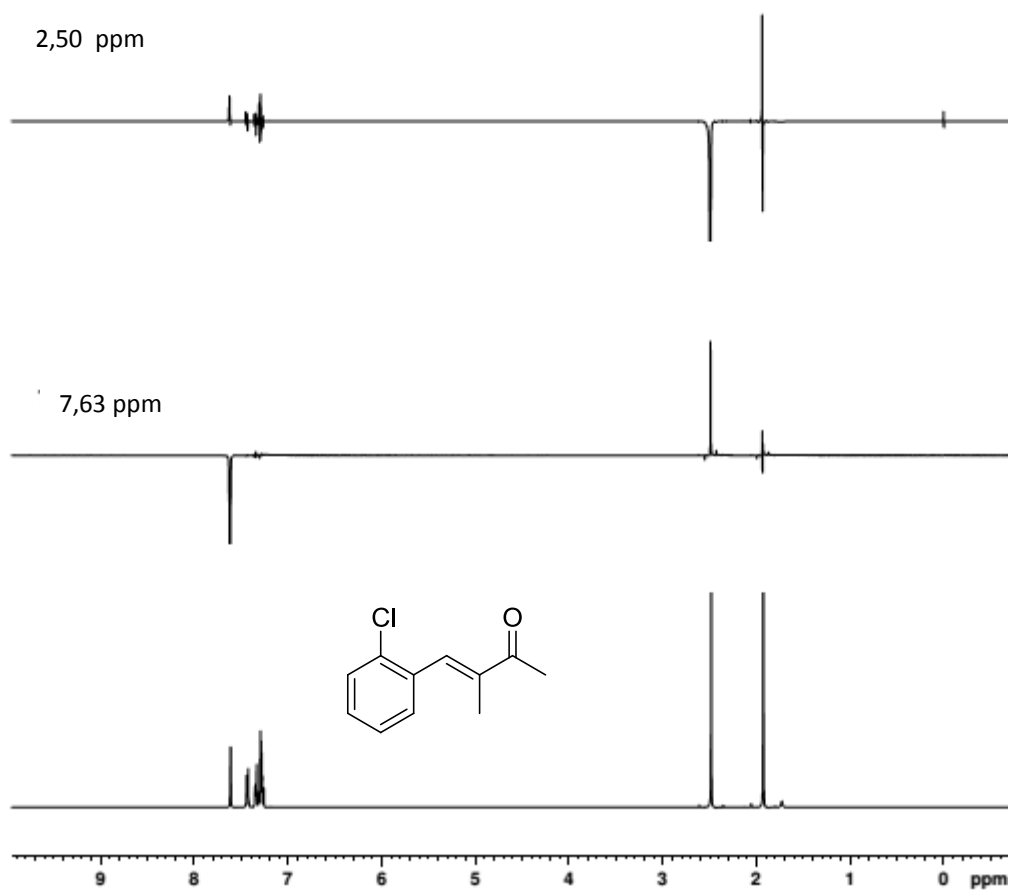
Espectro de NOEDIFF do composto 51a (500 MHz, CDCl₃)Espectro de NOEDIFF do composto 51b (500 MHz, CDCl₃)



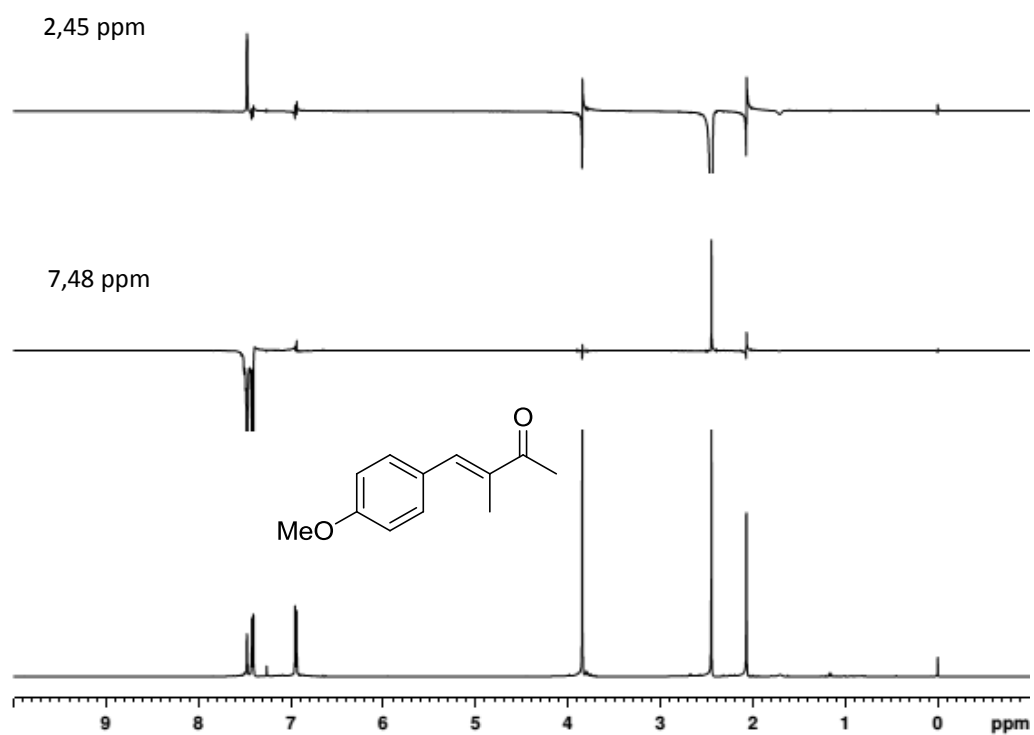
Espectro de NOEDIFF do composto 51c (500 MHz, CDCl₃)



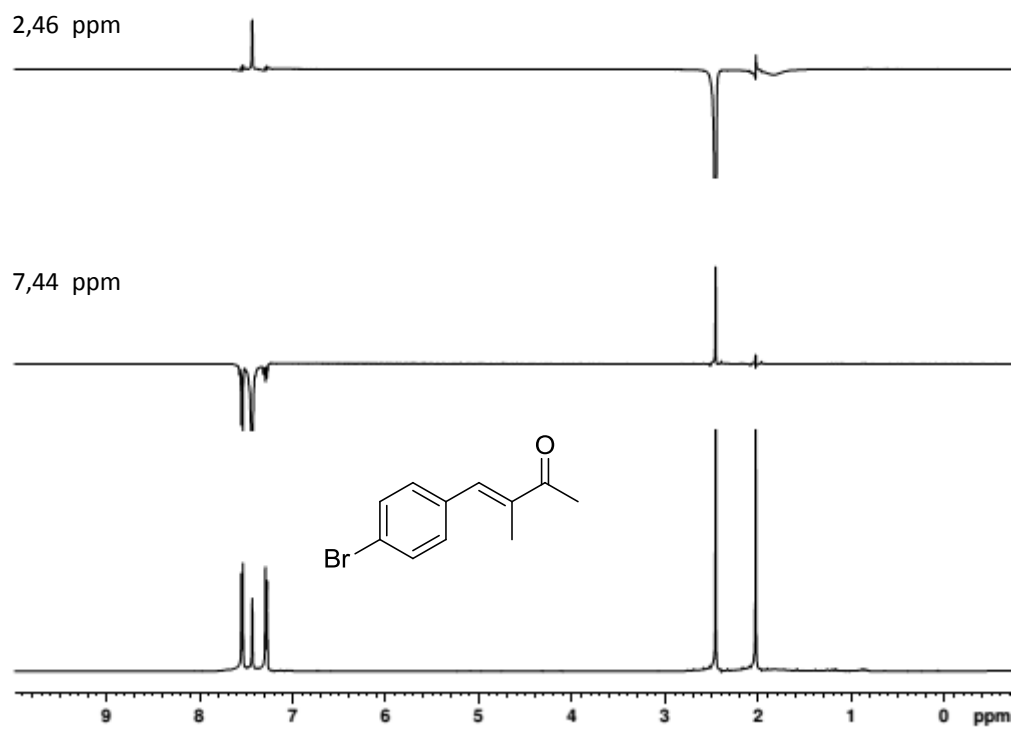
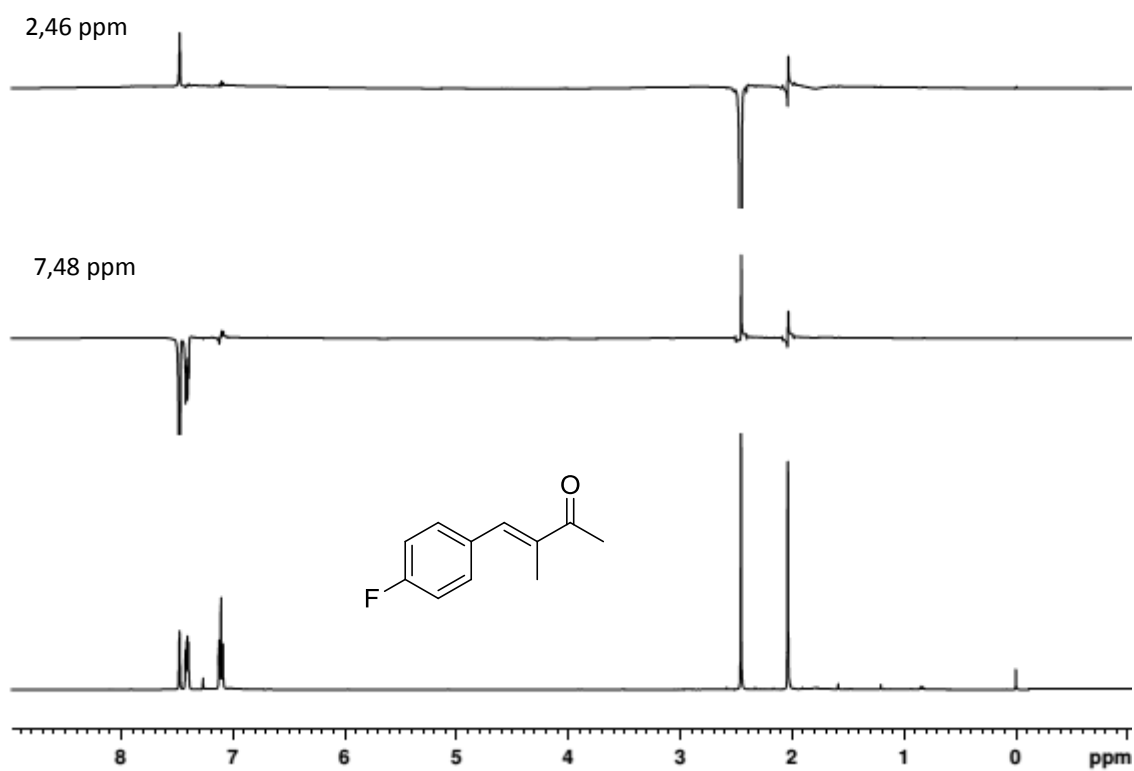
Espectro de NOEDIFF do composto 51d (500 MHz, CDCl₃)

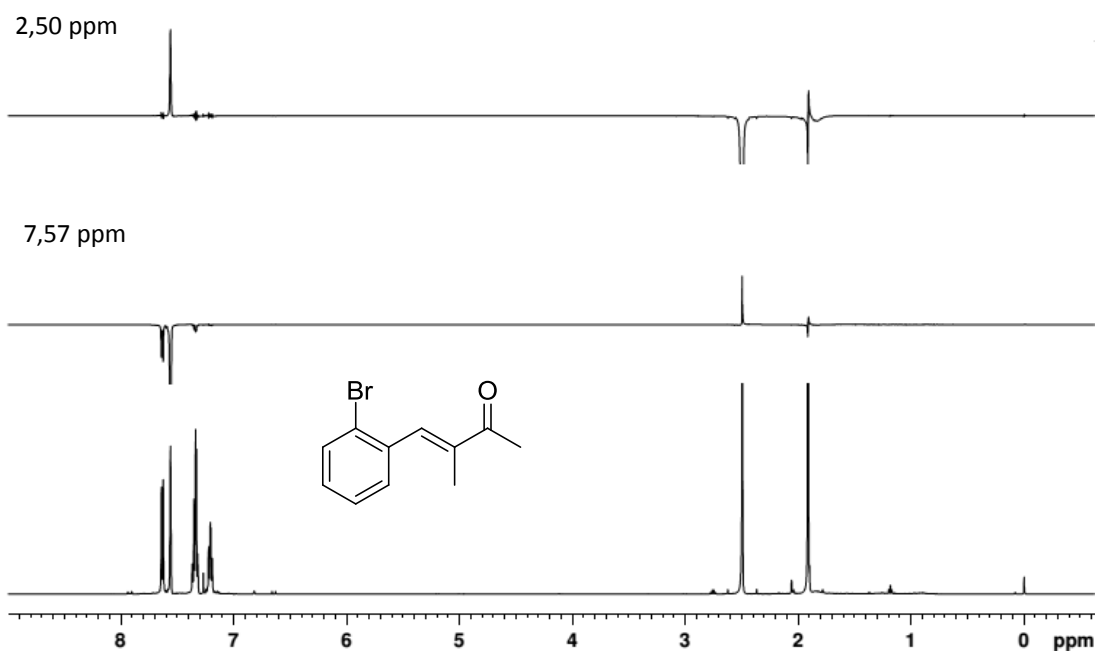


Espectro de NOEDIFF do composto 51e (500 MHz, CDCl_3)

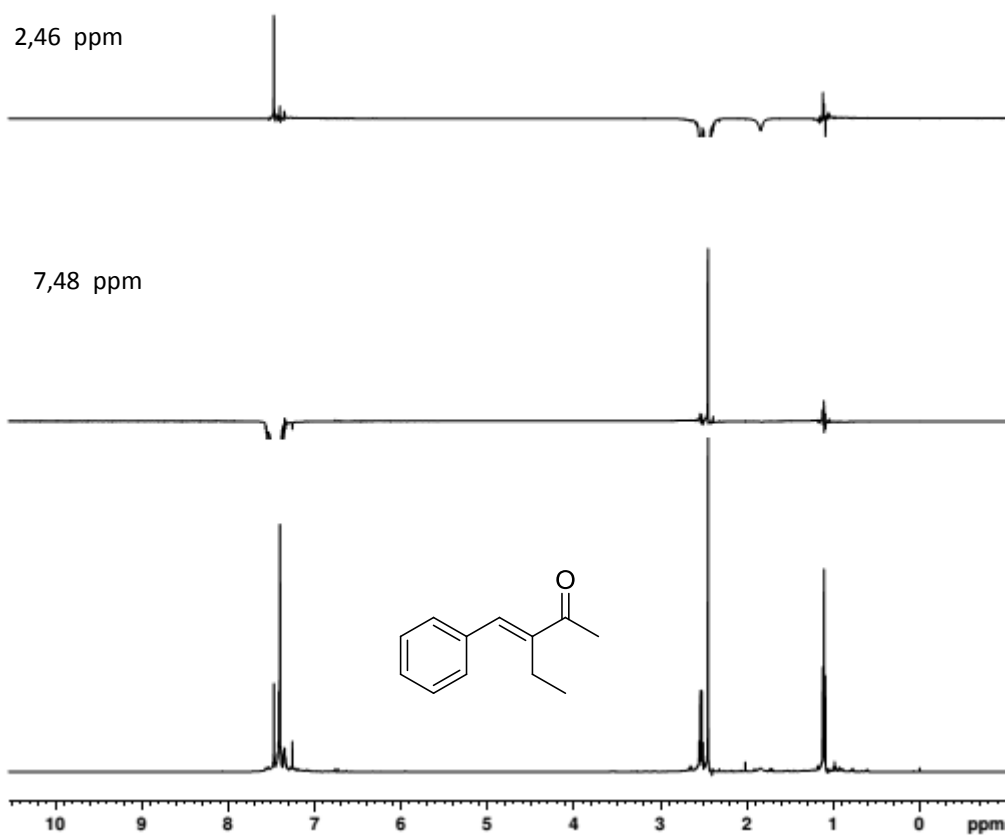


Espectro de NOEDIFF do composto 51f (500 MHz, CDCl_3)

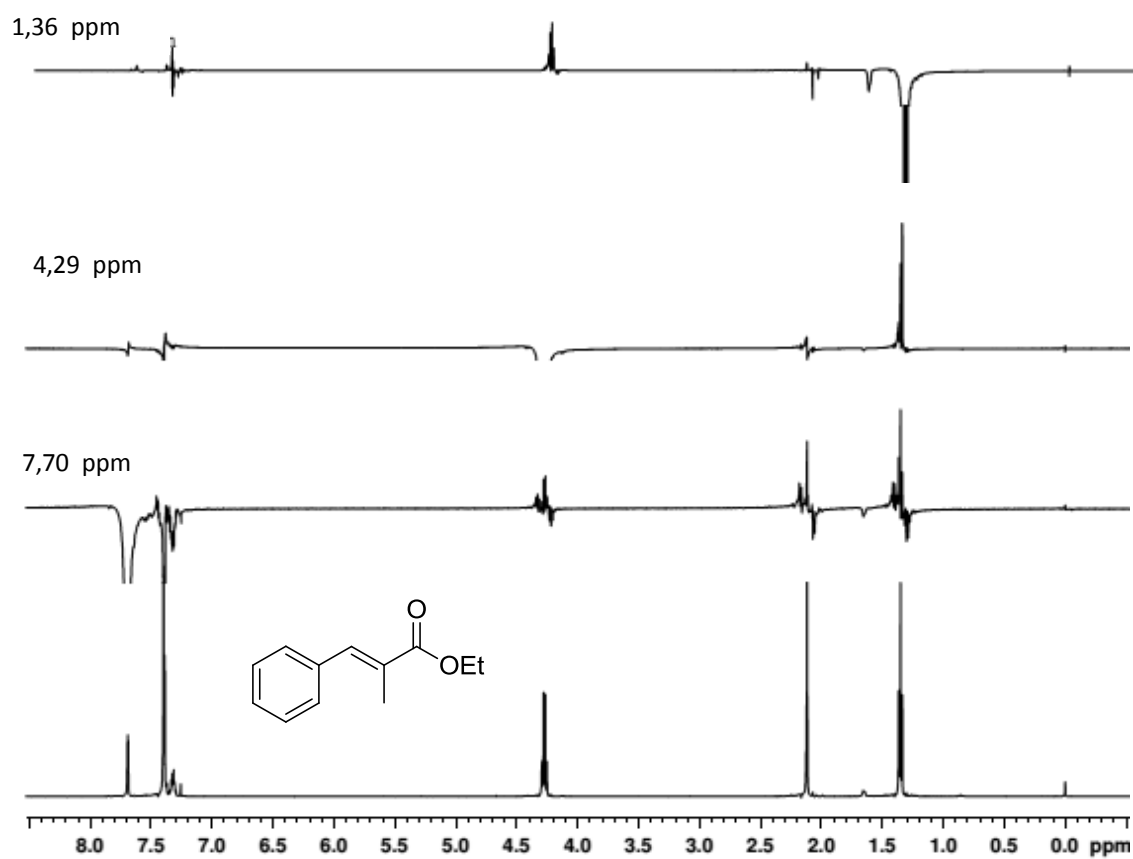




Espectro de NOEDIFF do composto 51i (500 MHz, CDCl_3)



Espectro de NOEDIFF do composto 51j (500 MHz, CDCl_3)



Espectro de NOEDIFF do composto 51k (500 MHz, CDCl₃)