UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA DE SÃO CARLOS

**Resolução enzimática de álcoois racêmicos com lipase
de *Candida antarctica* e redução de cetonas com fungos
de origem marinha**

Hercules Vicente Ferreira

Dissertação apresentada ao Instituto de Química de
São Carlos, da Universidade de São Paulo para
obtenção do Título de mestre em ciências, área de
concentração: físico-química.

Orientador: Prof. Dr. André Luiz Meleiro Porto

São Carlos
2008

Salmo 23

*O Senhor é o meu pastor e nada me faltará;
Ele me faz descansar em campinas verdejantes
e me leva a águas tranqüilas.
O eterno me dá novas forças;
e me guia no caminho certo.
Ainda que eu caminhe por um vale escuro
como a própria morte, não temerei.
Pois Deus, está comigo.
Tu me proteges e me diriges.
Preparas um banquete para mim
onde meus inimigos possam ver.
Sou teu convidado de honra e
enches meu copo até a borda.
Sei que a tua bondade e o teu perdão
ficarão comigo enquanto eu viver.
E todos os dias da minha vida
morarei na tua casa.*

Dedico este trabalho aos meus queridos pais: Luiz (in memoriam) e Aparecida, que sempre estiveram ao meu lado, incondicionalmente em todos os momentos da minha vida.

Este trabalho foi desenvolvido sob
orientação do Professor Dr. André
Luiz Meleiro Porto.

Agradecimento especial...

*Ao meu grande amigo e companheiro
Lenilson por esses últimos anos pela
lealdade e principalmente pela
amizade.*

*À Richele pela grandiosa e valiosa
contribuição para que este trabalho
pudesse ser realizado.*

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. André Luiz Meleiro Porto, por ter me aceito como seu aluno sem mesmo conhecer-me. Agradeço pela confiança depositada, pelos ensinamentos e amizade durante estes anos de convivência.

À Richele P. Severino por me ajudar a desenvolver as resoluções enzimáticas e a valiosa ajuda na elaboração final deste trabalho.

Aos meus amigos, pela amizade, companhia, incentivo, prontidão e por me proporcionarem momentos tão felizes. Nomeá-los seria impossível, não haveria espaço suficiente para tantos nomes.

À minha mãe Aparecida e meu pai Luiz (*in memoriam*), que muitas vezes sem mesmo entender meus objetivos, nunca mediram esforços para minhas realizações pessoais e profissionais, sempre me incentivaram para que tudo fosse alcançado com muita responsabilidade, honestidade e para que eu nunca desistisse diante das dificuldades.

Aos meus irmãos Clebes, Jonas, Andréia e minha querida prima Lucia, ao meu cunhado Antonio, minhas cunhadas Adelite e Joelma pelo amor incondicional e desprendimento, por estarem sempre ao meu lado incentivando e aconselhando nos momentos mais difíceis. Também aos meus amados sobrinhos Higor, Inglit, Páblia, Bruno, Luiz Gustavo e Natieli e meus queridos afilhados Hugo, Beatriz e Guilherme, por tornarem meus dias mais felizes.

Ao meu querido amigo Luiz Carlos e sua esposa Edinéia pela fiel, verdadeira e incondicional amizade, que em todos os momentos sempre estiveram ao meu lado me incentivando e aconselhando.

Ao meu amigo Leandro Piovan e sua esposa Thais por me acolherem em sua casa ao chegar a São Carlos.

À Professora Dra. Mirna H. R. Seleglim (UFSCar) e a técnica Darci da C. D. Javarotti (UFSCar) pela orientação técnica em microbiologia.

Ao Professor Dr. Benedito dos S. Lima Neto (IQSC) por conceder o uso do equipamento de cromatografia gasosa.

Aos amigos Eli Pimenta, Mirian, Raquel, Simone, Fábio e Michelle pelas dicas e boas discussões.

Aos meus amigos José Luiz, Valdemiro, Flávio Luiz, Jairo e Evania pela amizade e os bons momentos.

Às minhas amigas de laboratório Ana Maria e Mariana pela amizade e companheirismo durante o tempo de mestrado.

Ao Professor Dr. Roberto G. de S. Berlinck (IQSC) por ter gentilmente cedido os fungos utilizados neste trabalho.

Ao Professor Dr. Leandro H. Andrade (IQSP) pelas análises de RMN.

À Novo Nordisk (Araucária – PR) pela doação da CALB.

Ao CNPq pela bolsa concedida.

À Deus pela minha existência e oportunidade de viver tudo isso.

RESUMO

Neste trabalho realizaram-se reações de resolução enzimática de alcoóis secundários utilizando a enzima imobilizada lipase de *Candida antarctica* (NOVOZYME 435). Os alcoóis utilizados foram: (*RS*)-1-(4-metoxifenil)etanol (**1a**); (*RS*)-4-metil-2-pentanol (**3a**); (*RS*)-2-metil-3-hexanol (**4a**); (*RS*)-5-metil-2-hexanol (**5a**); (*RS*)-2-octanol (**6a**); (*RS*)-3-heptanol (**7a**); (*RS*)-6-metil-5-hepten-2-ol (**8a**); (*RS*)-1-octen-3-ol (**9a**). Todos os alcoóis foram resolvidos pela lipase, com exceção do álcool **4a**. Nas resoluções enzimáticas os excessos enantioméricos dos álcoois e acetatos foram superiores a 98 %, havendo a conversão total (50 %) dos enantiômeros *S* nos respectivos acetatos: (*S*)-1-acetato-4-metoxifenil (**1b**); (*S*)-2-acetato-4-metil-pentano (**3b**); (*S*)-2-acetato-5-metil-hexano (**5b**); (*S*)-2-acetato-octano (**6b**); (*S*)-3-acetato-heptano (**7b**); (*S*)-2-acetato-6-metil-5-hepteno (**8b**); (*S*)-3-acetato-1-octeno (**9b**). Realizou-se ainda um estudo biocatalítico envolvendo reações de redução de cetonas com fungos de origem marinha. Foram utilizadas na reduções as cetonas: 4-metoxiacetofenona (**1**), 1-fenil-etanona (**2**), 4-metil-2-pentanona (**3**), 2-octanona (**6**) e a 6-metil-5-hetpen-2-ona (**8**) e como biocatalisadores três fungos de origem marinha (*Bionectria* sp Ce5, *Aspergillus sydowii* Ce15 e *Aspergillus sydowii* Ce19). A 4-metoxiacetofenona (**1**) foi reduzida pelos fungos *Bionectria* sp Ce5, *Aspergillus sydowii* Ce15 e *Aspergillus sydowii* Ce19 com excesso enantiomérico de 98% e rendimento de 65 %. A 2-octanona (**6**) e a 6-metil-5-hepten-2-ona (**8**) foram reduzidas pelo fungo *A. sydowii* Ce15 nos respectivos (*S*)-álcoois **6a** e **8a** com pureza enantiomérica > 98 %. Já a 1-fenil-etanona (**2**) foi reduzida somente pelo fungo *Bionectria* sp Ce5 com excesso enantiomérico de 50 % e rendimento de 25 %. A 4-metil-2-pentanona (**3**) não foi reduzida por nenhum dos microrganismos estudados.

ABSTRACT

This work carried out the enzymatic reactions of alcohols by using a lipase from immobilized *Candida antarctica* (NOVOZYME 435). The alcohols used were: (*RS*)-1-(4-methoxyphenyl) ethanol (**1a**), (*RS*)-4-methyl-2-pentanol (**3a**), (*RS*)-2-methyl-3-hexanol (**4a**), (*RS*)-5-methyl-2-hexanol (**5a**), (*RS*)-2-octanol (**6a**), (*RS*)-3-heptanol (**7a**), (*RS*)-6-methyl-5-hepten-2-ol (**8a**) and (*RS*)-1-octen-3-ol (**9a**). All the alcohols were catalyzed by lipase, except for the alcohol **4a**. In this enzymatic resolutions the enantiomeric excesses of alcohols and acetates were more than 98% and total conversions (50%) for enantiomers of the acetates: (*R*)-1-acetate-4-methoxyphenyl (**1b**), (*R*)-2-acetate-4-methyl-pentane (**3b**), (*R*)-2-acetate-5-methyl-hexane (**5b**), (*R*)-2-acetate-octane (**6b**), (*R*)-3-acetate-heptane (**7b**), (*R*)-2-acetate-6-methyl-5-hepteno (**8b**) and (*S*)-3-acetate-1-octene (**9b**). In addition it was studied the biocatalytic reduction of ketones with marine-derived fungi. The ketones used were the 4-metoxyacetophenone (**1**), 1-phenyl-etanone (**2**), 4-methyl-2-pentanone (**3**), 2-octanone (**6**) and 6-methyl-5-hetpen-2-one (**8**). The marine-derived fungi used as biocatalysts were *Bionectria* sp Ce5, *Aspergillus sydowii* Ce15 and *Aspergillus sydowii* Ce19. The 4-metoxyacetophenone (**1**) was reduced by *Bionectria* sp Ce5 by *Aspergillus sydowii* Ce15 and *Aspergillus sydowii* Ce19 in high enantiomeric excess (98% e.e.) and good yield, i.g., 65%. The 2-octanone (**6**) and 6-methyl-5-hepten-2-one (**8**) were reduced by *A. sydowii* Ce15 in the (*R*)-alcohols **6a** and **8a** in high enantiomeric purities, > 98% e.e. However the 1-phenyl-etanone (**2**) was reduced only by the fungus *Bionectria* sp Ce5 with enantiomeric excess of 50% and yield of 25%. The 4-methyl-2-pentanone (**3**) was not reduced by the microorganisms studied.

I. LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1: Inserção da biocatálise em química verde e tecnologia quiral.....	15
Figura 1.2: Diagrama de energia de uma reação catalisada e não catalisada com enzima.....	18
Figura 1.4: Representação esquemática da estrutura tridimensional da lipase de <i>Candida antarctica</i> obtida por raio-x.....	22
Figura 1.5: Mecanismo da reação de aminólise de éster catalisada por lipases baseado na “tríade catalítica” (CAMPBELL, 2005).....	23
Figura 1.6: Frequência do uso de enzimas em biocatálise.....	25
Figura 3.1: Fungos utilizados nas reações de biocatálise.....	43
Figura 4.1: Esquema do sítio ativo para as lipases segundo o Modelo de Kazlauskas (a) o enantiômero reage rapidamente e (b) o enantiômero reage lentamente.....	58
Figura 4.2: Regra de Kazlauskas para esterificação de alcoóis racêmicos por algumas lipases.	59
Figura 4.3: Cromatogramas da resolução enzimática do álcool racêmico 1a com a lipase de <i>Candida antarctica</i>	60
Figura 4.4: Cromatogramas da resolução enzimática do álcool racêmico 3a pela lipase de <i>Candida antarctica</i>	61
Figura 4.5: Cromatogramas da resolução enzimática do álcool racêmico 5a pela lipase de <i>Candida antarctica</i>	62
Figura 4.6: Cromatogramas da resolução enzimática do álcool racêmico 6a pela lipase de <i>Candida antarctica</i>	64
Figura 4.7: Cromatogramas da resolução enzimática do álcool racêmico 7a pela lipase de <i>Candida antarctica</i>	66
Figura 4.8: Cromatogramas da resolução enzimática do álcool racêmico 8a pela lipase de <i>Candida antarctica</i>	68
Figura 4.9: Cromatogramas da resolução enzimática do álcool racêmico 9a pela lipase de <i>Candida antarctica</i>	70
Figura 4.10: Regra de Prelog para redução de compostos carbonílicos.....	72
Figura 4.11: Cromatogramas da redução da cetona 1 pelo fungo <i>Bionectria</i> sp. Ce5	76
Figura 4.12: Cromatogramas da redução da cetona 1 pelo fungo <i>Aspergillus sydowii</i> Ce15.....	77
Figura 4.13: Cromatogramas da redução da cetona 1 pelo fungo <i>Aspergillus sydowii</i> Ce19.....	78
Figura 4.14: Cromatogramas da redução da cetona 2 pelo fungo <i>Bionectria</i> sp. Ce5.....	79
Figura 4.15: Cromatogramas da redução da cetona 6 pelo fungo <i>Aspergillus sydowii</i> Ce15.....	81
Figura 4.16: Cromatogramas da redução da cetona 8 pelo fungo <i>Aspergillus sydowii</i> Ce15.....	82

II. LISTA DE TABELAS

Figura 1.1: Classificação das enzimas segundo UIBBM (FABER, 1997), (ALBERT, 1982).....	20
Tabela 3.1: Proporções estequiométricas dos reagentes para a síntese dos álcoois racêmicos.....	38
Tabela 3.2: Proporções estequiométricas dos reagentes para a síntese dos acetatos racêmicos.....	40
Tabela 4.1: Rendimento dos álcoois racêmicos obtidos a partir da redução de cetonas.....	48
Tabela 4.2: Rendimento dos acetatos racêmicos obtidos a partir de álcoois racêmicos.....	49
Tabela 4.3: Tempo de retenção e condições cromatográficas dos padrões racêmicos.....	51
Tabela 4.4: Resolução enzimática dos álcoois racêmicos com a enzima lipase de <i>Candida antarctica</i>	54
Tabela 4.5: Rotação ótica específica dos álcoois e acetatos enantiomericamente puros obtidos nas resoluções enzimáticas e os seus respectivos valores da literatura.....	56
Tabela 4.6: Reações biocatalisadas com o fungo <i>Bionectria</i> sp Ce5.....	73
Tabela 4.7: Reações biocatalisadas com o fungo <i>Aspergillus sydowii</i> Ce15.....	74
Tabela 4.8: Reações biocatalisadas com o fungo <i>Aspergillus sydowii</i> Ce19.....	75

III. LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1.1: Biorredução de α -bromoacetofenona e aplicação da (R)-bromoidrina na síntese do receptor β -3-agonista.....	26
Esquema 1.2: Biotransformação da 3-cianopiridina pela bactéria <i>Rhodococcus</i> <i>rodochrous</i>	26
Esquema 1.3: Hidrólise do (RS)-1-fenil-2-butil acetato usando esterase de fígado de porco (PLE).....	27
Esquema 1.4: Esterificação enantiosseletiva do ibuprofeno® por lipases microbianas.....	28
Esquema 1.5: Exemplos de redução com células inteiras de microrganismos.....	29
Esquema 3.1: Síntese de alcoóis racêmicos.....	37
Esquema 3.2: Síntese de acetatos racêmicos.....	39

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	14
1.1. BIOCATÁLISE E BIOTRANSFORMAÇÃO.....	16
1.2. ENZIMAS.....	17
1.3. O USO DE LIPASES COMO CATALISADORES.....	21
1.4. APLICAÇÕES DA BIOCATÁLISE E BIOTRANSFORMAÇÃO.....	24
1.5. REAÇÕES DE REDUÇÃO.....	28
1.6. RESOLUÇÃO ENZIMÁTICA.....	30
1.7. EFEITO DOS SOLVENTES ORGÂNICOS.....	31
2. OBJETIVOS.....	33
3. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL.....	34
3.1. EQUIPAMENTOS.....	34
3.2. MATERIAIS	35
3.3. MÉTODO: PARTE A – RESOLUÇÃO ENZIMÁTICA.....	36
3.3.1. Síntese dos álcoois racêmicos.....	36
3.3.2. Síntese dos acetatos racêmicos.....	39
3.3.3. Condições experimentais utilizadas nas reações com lipase de <i>Candida antarctica</i> (Novozym 435).....	41
3.4. MÉTODO: PARTE B – REDUÇÃO DE CETONAS POR FUNGOS DE ORIGEM MARINHA.....	42
3.4.1. Fungos de origem marinha.....	42
3.4.2. Preparo dos meios de cultura para o crescimento dos fungos	44
3.4.3. Água do mar artificial.....	44
3.4.4. Crescimento dos microrganismos.....	44
3.4.5. Reações de biocatálise com células totais dos microrganismos.....	45
3.4.6. Reações de biocatálise com o caldo enzimático (meio de cultura).....	45
3.4.7. Extração das reações com microrganismos.....	46
3.4.8. Análises e identificação dos compostos	46
4. RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	47
4.1. RESULTADOS E DISCUSSÕES: PARTE A – RESOLUÇÃO ENZIMÁTICA.....	47
4.1.1. Análise dos álcoois e acetatos racêmicos.....	47
4.1.2. Resolução enzimática.....	53
4.1.2.1. Resolução enzimática do álcool racêmico 1a	59
4.1.2.2. Resolução enzimática do álcool racêmico 3a	60
4.1.2.3. Resolução enzimática do álcool racêmico 5a	61
4.1.2.4. Resolução enzimática do álcool racêmico 6a	63
4.1.2.5. Resolução enzimática do álcool racêmico 7a	65
4.1.2.6. Resolução enzimática do álcool racêmico 8a	67
4.1.2.7. Resolução enzimática do álcool racêmico 9a	69
4.2. RESULTADOS E DISCUSSÃO: PARTE B - REDUÇÃO DE CETONAS COM FUNGOS DE ORIGEM MARINHA.....	71
4.2.1. Redução de cetonas com fungos de origem marinha.....	72

4.2.1. 1. Biorredução da cetona 1 .	75
4.2.1.2. Biorredução da cetona 2 .	79
4.2.1.3. Biorredução da cetona 3 .	80
4.2.1.4. Biorredução da cetona 6 .	80
4.2.1.5. Biorredução da cetona 8 .	81
4.3. CARACTERIZAÇÃO DOS PADRÕES QUÍMICOS.	83
5. CONCLUSÕES.	86
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.	87

1. INTRODUÇÃO

Atualmente, muitos químicos orgânicos têm se preocupado em desenvolver métodos sintéticos seletivos capazes de fornecer compostos nas formas enantiomericamente puras. O mercado de fármacos quirais atingiu cerca de 10 bilhões de dólares em 2001 (ORLANDO *et. al.*, 2007).

A importância de se obter compostos enantiomericamente enriquecidos está vinculada à relação entre a atividade biológica e estereoisomerismo, pois enantiômeros de um mesmo composto podem ter propriedades biológicas distintas. Assim, diante dessa preocupação, a agência americana FDA (*US Food and Drug Administration*) está cada vez mais relutante na permissão do uso de fármacos racêmicos.

Um método reconhecido de obtenção de compostos enantiomericamente enriquecidos é o uso de enzimas. As razões pelas quais as enzimas têm sido cada vez mais empregadas na síntese orgânica são inúmeras:

- (i) enzimas são catalisadores bastante eficientes, podendo ser empregados em concentrações de porcentagem molar de 10^{-3} a 10^{-4} % enquanto muitos catalisadores químicos convencionais necessitam de concentrações em torno de 0,1 a 1 mol % para expressar um bom desempenho catalítico;
- (ii) ao contrário dos metais pesados, as enzimas são biodegradáveis e em alguns casos as transformações podem ocorrer em meio aquoso, evitando o uso de solventes poluentes;
- (iii) as enzimas exercem um papel importante na seletividade, podendo ser quimiosseletivas, regioseletivas e enantiosseletivas (Figura 1.1).

Figura 1.1: Inserção da biocatálise em química verde e tecnologia quiral

Diante das questões da “tecnologia quiral” e da preocupação ambiental, mais intimamente relacionada à “química verde”, a biocatálise consiste em uma ferramenta muito importante na obtenção de compostos opticamente ativos. Como muitas enzimas mostram atividade frente a substratos não naturais e em solventes orgânicos, elas estão sendo amplamente utilizadas em transformações sintéticas (HILL *et al.*, 2007).

Atualmente são conhecidos inúmeros processos catalisados por enzimas em variadas reações orgânicas. Diversas reações como hidrólise/síntese de ésteres, amidas, lactonas e lactamas, reações de oxidação-redução, reações de halogenação e desalogenação e até reações de condensação aldólicas já foram reportadas (FABER, 2004).

Recentemente, tem havido um grande esforço na descoberta de novas aplicações de biocatalisadores. Trabalhos de Gotor (TORRE, 2004) e Berglund (SVEDENDAHL *et al.*, 2005) mostram que algumas enzimas são capazes de promover reações diferentes do seu processo natural. O uso “não convencional” de enzimas como promotoras de reação ainda é pouco explorado e, segundo Kazlauskas, esse tipo de estudo abre uma nova fronteira da biocatálise a ser investigada.

Diante desse cenário a aplicação de enzimas na promoção de reações não convencionalmente biocatalisadas, pode tornar a biocatálise ainda mais útil e presente na síntese orgânica.

1.1. BIOCATÁLISE E BIOTRANSFORMAÇÃO

A área multidisciplinar de biocatálise encontra-se atualmente em amplo desenvolvimento. Pesquisas realizadas em vários ramos da química e da biologia têm como principal objetivo o desenvolvimento de novos catalisadores para uso industrial. Novas técnicas de biologia molecular, metodologias de seleção de biocatalisadores e novas abordagens de pesquisa, foram desenvolvidas a fim de se obter catalisadores com suas especificidades alteradas bem como a exploração da biodiversidade. Os catalisadores biológicos nativos atualmente disponíveis, em sua maioria apresentam limitações quanto à utilização em processos industriais, sendo este o maior desafio do campo (SCHMID e VERGER, 1998).

As limitações encontradas na aplicação sintética de enzimas em sua forma nativa estão sendo contornadas atualmente através da alteração da estereoespecificidade, termoestabilidade e atividade envolvendo técnicas de biologia molecular de mutações sítio dirigidas ou aleatórias (SCHMID e VERGER, 1998).

Dentro deste contexto, pode-se inserir a biocatálise e a biotransformação como uma área onde o catalisador é uma enzima que permite converter um substrato (composto orgânico) em um produto através de um número limitado de reações.

A biotransformação tem sido intensamente utilizada na indústria ao longo dos últimos anos. Como exemplo destaca-se o etanol, que é produzido desde a antiguidade

pela fermentação de açúcares. Atualmente, mais da metade do etanol produzido em escala industrial é feito por biotransformação, onde uma enzima, a zimase, é responsável pela conversão dos açúcares em álcool e gás carbônico (TURNER, 1995).

Outro exemplo de substância química produzida por microrganismo é o ácido cítrico (2-hidróxi-1,2,3-propanotricarboxílico), um ácido orgânico fraco, utilizado como conservante natural (antioxidante), dando um sabor ácido e refrescante na preparação de alimentos e bebidas. Este ácido é obtido industrialmente pela fermentação da sacarose pelo microrganismo *Aspergillus niger* (ALBERT, 1982).

Atualmente, a biocatálise é de grande importância na transformação de produtos naturais ou sintéticos, representando uma extensão das rotas clássicas de síntese com significantes reduções nos custos e impactos ambientais (PRADO, 2003; SHAW *et al.*, 2003).

1.2. ENZIMAS

Enzimas são um grupo de substâncias orgânicas proteicas, com atividade intra ou extracelular que têm funções catalíticas, catalisando reações químicas que, sem a sua presença, aconteceriam a uma velocidade extremamente baixa. Isso é conseguido através do abaixamento da energia de ativação necessária para que se dê uma reação química, resultando no aumento da velocidade da reação e possibilitando o metabolismo, ou seja, as reações químicas dos seres vivos. A capacidade catalítica das enzimas torna-as adequadas para aplicações industriais, como na indústria farmacêutica ou alimentar (ALBERT, 1982).

O uso de enzimas em biocatálise tem se mostrado cada vez mais evidente devido a importantes aspectos (FABER, 1997).

- ***Maiores velocidades de reação:*** as velocidades das reações catalisadas por enzimas são tipicamente 10^6 a 10^{12} vezes maiores que as reações não catalisadas e são, no mínimo, várias ordens de magnitude maiores do que as mesmas reações catalisadas quimicamente (figura 1.2);

Figura 1.2: Diagrama de energia de uma reação catalisada e não catalisada com enzima.

- ***Condições reacionais mais brandas:*** temperaturas inferiores a 100 °C, sob pressão atmosférica, pH próximo do neutro e concentração salina praticamente constante. Estas condições minimizam problemas de isomerização, racemização e rearranjos, que freqüentemente ocorrem na metodologia tradicional;
- ***Maior especificidade da reação:*** as reações raramente formam produtos laterais ou secundários, quando são utilizadas enzimas isoladas;

- ***Apresentam diversos tipos de seletividade como:*** (i) *quimiosseletividade*: enzimas podem atuar em somente um tipo de grupo funcional mesmo na presença de outros grupos reativos; (ii) *regiosseletividade e diastereosseletividade*: enzimas podem distinguir entre grupos funcionais somente com a mudança do meio reacional; (iii) *enantiosseletividade*: enzimas são catalisadores quirais e sua especificidade pode ser explorada para sínteses seletivas e assimétricas;
- ***Capacidade de regular processos***: a atividade catalítica de muitas enzimas varia dependendo da concentração de outras substâncias que não são seus substratos;
- ***Catalisam um grande número de reações***: aceleram a velocidade da reação sem alterar o equilíbrio termodinâmico e podem catalisar uma grande diversidade de reações químicas.

Essa estereoespecificidade não é surpreendente, considerando-se a quiralidade inerente das enzimas, as quais possuem sítios ativos assimétricos, catalisando preferencialmente um dos enantiômeros. Outra característica específica de algumas enzimas por exemplo é a capacidade de agir em substratos pouco solúveis em água, atuando somente na interface da água/lipídio. Na ausência de uma interface a atividade catalítica destas lipases é sensivelmente diminuída.

A União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular (UIBBM), classifica as enzimas em seis grupos e cada uma delas em sub-grupos de acordo com o tipo de reações que catalisam (ALBERT, 1982; FABER, 1997) (tabela 1.1).

Número	Classes	Tipo de reação catalisada	Subclasse
1	oxidoreduases	transferência de elétrons ou remoção de hidrogênio	hidrogenases, oxidases, peroxidases
2	transferases	reações de transferência de grupos	transaldolases, transcetolases
3	hidrolases	reações de hidrólise	esterases, lipases, peptidases, fosfatases
4	liases	reações de adição de grupos a dupla ligação ou formação de duplas ligações por remoção de grupos	descarboxilases, fosfatases
5	isomerases	transferência de grupos dentro da molécula para produzir isômeros	racemases, epimerases, oxiredutases, mutase
6	ligases	formação e clivagem de ligações C-C, C-S, C-O, C-N e ésteres de fosfato	sintetases

Tabela 1.1: Classificação das enzimas segundo UIBBM (ALBERT, 1982; FABER, 1997)

1.3. O USO DE LIPASES COMO CATALISADORES

As lipases são enzimas hidrolíticas presentes em diversos organismos, incluindo animais, plantas, fungos e bactérias. São, em sua maioria, extracelulares, favorecendo a sua extração, isolamento e purificação (SARMA, 2001; CARVALHO, 2005).

Em seu ambiente natural estas enzimas possuem a função de catalisar a hidrólise de triacilglicerídeos aos correspondentes ácidos graxos e glicerol. Além das funções metabólicas, as lipases possuem um papel importante em biotecnologia, principalmente na indústria de óleo e de alimentos, e em síntese orgânica de compostos enantiomericamente puros ou enriquecidos (QUEIROS, 2002; CASTRO e ANDERSON, 2004; CASTRO *et. al.*, 2004; NASCIMENTO, 2004).

Atualmente as lipases são produzidas, preferencialmente, a partir de microrganismos, devido às facilidades de controle e aumento da capacidade produtiva dos processos fermentativos, além da redução do seu custo de obtenção. Os microrganismos mais utilizados para a produção de lipases são os fungos dos gêneros *Rhizopus*, *Aspergillus*, *Geotrichum*, *Mucor* e *Candida*. As vantagens de trabalhar com lipases são principalmente o baixo custo e a alta versatilidade catalítica destas enzimas. Além disso, não exigem cofatores, atuam em faixa de pH bastante ampla, são estereosseletivas e regiosseletivas (CIUFFREDA, 2002; LOHITH, 2005).

Em solvente orgânico, as lipases catalisam a transferência de grupos acilas de compostos doadores para uma ampla variedade de compostos aceptores (álcoois, aminas, ácidos carboxílicos). Dependendo do tipo do doador acila e doceptor, as reações catalisadas por lipases incluem esterificação, tioesterificação, amidação, transesterificação, síntese de peptídeos e formação de perácidos (FABER, 1997; ATHAWALE, 2002; MONTALBETTI, 2005).

O mecanismo de ação das lipases foi melhor compreendido quando suas estruturas cristalográficas foram resolvidas por raios-X (SCHMID, 1998). Estas enzimas hidrolisam as ligações de ésteres e/ou amidas através de uma tríade catalítica composta de um resíduo de serina nucleofílico ativado por ligação de hidrogênio, em conjunto com histidina, aspartato ou glutamato (Ser-His-Asp/Glu) (ALBERT, 1982). Na Figura 1.4, pode-se observar a representação esquemática da estrutura tridimensional da lipase de *Candida antarctica* (CAL-B) com a ampliação do sítio ativo formado pelas cadeias laterais da histidina, serina e aspartato.

Figura 1.4: Representação esquemática da estrutura tridimensional da lipase de *Candida antarctica* obtida por raio-X

O mecanismo da ação catalítica de uma lipase na aminólise de um éster consiste em cinco etapas e está exemplificado na Figura 1.5 (CAMPBELL, 2005): (i) ligação ao

substrato éster; (ii) formação do primeiro intermediário tetraédrico por ataque nucleofílico da serina catalítica, com oxiânion estabilizado por duas ou três ligações de hidrogênio, a chamada “cavidade oxiânion”; (iii) quebra da ligação éster; (iv) saída da porção alcoólica; (v) aminólise do intermediário acil-enzima. O ataque nucleofílico da amina ao intermediário acil enzima forma uma amida. Entretanto qualquer nucleófilo pode atuar nesta etapa, se for um álcool produz um acetato, se for um ânion carboxilato um éster, se for água um ácido carboxílico e se for um tiol, um tioéster, etc.

Figura 1.5: Mecanismo da reação de aminólise de éster catalisada por lipases baseado na “tríade catalítica” (CAMPBELL, 2005)

1.4. APLICAÇÕES DA BIOCATÁLISE E BIOTRANSFORMAÇÃO

O termo biocatálise ou biotransformação pode ser aplicado às modificações específicas ou interconversões da estrutura química realizada por catalisadores biológicos (WILLIS e MARAGONI, 1999). A escolha do tipo de biocatalisador é efetuada entre microrganismos vivos íntegros ou outros materiais biológicos como RNA, anticorpos ou enzimas isoladas ou contidas em células. O uso de enzimas isoladas é preferível, quando existirem limitações com relação à permeabilidade do substrato na membrana da célula, ou quando ocorrerem reações secundárias indesejáveis (CASTRO *et al.*, 2004). Entretanto se tornam limitadas quando as reações enzimáticas requerem a adição de dispendiosos cofatores.

Além da estereosseletividade das reações biocatalisadas pode-se também explorar outras transformações químicas, mesmo quando os produtos formados são aquirais. Atualmente, o crescente desenvolvimento da biologia molecular tem possibilitado a expressão de enzimas em diferentes hospedeiros, conseqüentemente permitindo a obtenção de biocatalisadores mais específicos e eficientes que os microrganismos nativos (TRAMPER, 1996; CHERRY, 2003).

Reações catalisadas por vários tipos de hidrolases estão sendo predominantemente usadas em biocatálise. Pelo fato de não necessitarem de cofatores tornam-se muito atrativas para a síntese orgânica, tornando-se responsáveis por dois terços de todas as reações biocatalisadas descritas na literatura. A Figura 1.6 mostra a frequência do uso de enzimas em biotransformação (FABER, 1997).

Figura 1.6: Frequência do uso de enzimas em biocatálise

(i) formação de ésteres, aminólises; (ii) hidrólise de ésteres; (iii) hidrólise de ésteres e amidas, síntese de peptídeos; (iv) hidrólise de nitrilas; (v) hidrólise de epóxidos, halogênios, fosfatos; (vi) redução de aldeídos, cetonas e enolatos; (vii) hidroxilação, sulfoxidação, epoxidação, oxidação Baeyer-Villiger, dihidroxilação; (viii) formação de cianoidrinas, reações aldólicas e acilação; (ix) transferência de grupo glicosil; (x) isomerização de carboidratos

As enzimas isoladas ou células inteiras, livres ou imobilizadas, têm sido utilizadas amplamente em diversas transformações sintéticas (TRAMPER, 1996; FABER, 2004). Com um mercado crescente e promissor, a maior parte da produção de enzimas ainda é destinada às indústrias de detergentes e amido. O mercado mundial de enzimas foi estimado em cerca de US\$ 1.355 milhões por ano (CASTRO *et. al.*, 2004).

Dentre os vários exemplos de aplicação da biocatálise na produção industrial de compostos enantiomericamente puros, pode-se citar a redução da α -bromoacetofenona pela bactéria *Spingomonas paucimobolis* SC 16113, a qual produziu o (*R*)-álcool com excesso enantiomérico > 98 %. Este álcool quiral é um *synthon* utilizado na síntese do receptor β -3-agonista (Esquema 1.1) (PATEL *et al.*, 1998; PATEL *et al.*, 2003).

Esquema 1.1: Biorredução de α -bromoacetofenona e aplicação da (*R*)-bromoidrina na síntese do receptor β -3-agonista

Uma grande variedade de processos quimio-enzimáticos também tem sido desenvolvido em larga escala na biotransformação de *N*-heterocíclicos aromáticos. Um exemplo desta aplicação industrial foi utilizado na síntese da nicotinamida, um precursor da vitamina B₃, pela bactéria *Rhodococcus rodochrous* (Esquema 1.2) (SHAW *et al.*, 2003). Essa bactéria foi imobilizada em um polímero de poliácridamida levando a uma produção de 3.500 toneladas por ano da nicotinamida.

Esquema 1.2: Biotransformação da 3-cianopiridina pela bactéria *Rhodococcus rodochrous*

Atualmente, muitas indústrias farmacêuticas (Glaxo, AstraZeneca, Pfizer), vêm desenvolvendo reações de biocatálise em larga escala na aplicação de compostos

quirais, que são utilizados como intermediários de fármacos (CHEMICAL & ENGINEERING NEWS, 2006).

Como mencionado anteriormente, as enzimas hidrolíticas, como as lipases e as esterases são os biocatalisadores mais frequentemente usados em síntese orgânica. O Esquema 1.3 mostra a hidrólise do (*RS*)-3-acetato-1-fenil-pentano catalisado por uma esterase de fígado de porco (PLE), tendo como produtos o (*R*)-álcool e o (*S*)-acetato enantiomericamente puros, com e.e. > 99% (LIU *et al.*, 2004).

Esquema 1.3: Hidrólise do acetato de (*RS*)-1-fenil-2-butila usando esterase de fígado de porco (PLE)

As enzimas hidrolíticas (lipases/esterases) necessitam de uma pequena quantidade de água para reter a sua conformação tridimensional ativa, mesmo quando estão ligadas covalentemente a um suporte. A água contribui ainda para a integridade estrutural, polaridade do sítio ativo e estabilidade da proteína e pode também limitar a solubilidade de substratos hidrofóbicos em torno da enzima.

A versatilidade das lipases tem sido explorada ou para substituir processos existentes, ou para, produzir uma série de compostos considerados praticamente inviáveis de serem obtidos por vias químicas convencionais.

É conhecido também que alguns fármacos são produzidos e comercializados na sua forma racêmica e que a atividade biológica depende, em muitos casos, de sua configuração absoluta. Normalmente um dos enantiômeros apresenta atividade biológica, enquanto o outro é menos ativo, inativo ou até mesmo tóxico. O ibuprofeno®

é um exemplo interessante de medicamento que ainda é comercializado como mistura racêmica. É conhecido que forma (*S*)-ibuprofeno é 160 vezes mais ativa que o (*R*)-ibuprofeno (Esquema 1.4) (CONTESINI e CARVALHO, 2006).

Esquema 1.4: Esterificação enantiosseletiva do ibuprofeno® por lipases microbianas.

1.5. REAÇÕES DE REDUÇÃO

Uma área em biocatálise amplamente explorada são as reações de óxido-redução, especificamente as reduções de grupos carbonílicos de cetonas. Considerando a química clássica, os catalisadores químicos não são tão eficazes quanto às enzimas para catalisar as reações de óxido-redução, mais especificamente, aqueles que envolvem a formação de centros estereogênicos (SHIMODA *et al.*, 2004).

Economicamente, as reações químicas de óxido-redução por biocatálise, tornam-se vantajosas quando se utilizam células inteiras de microrganismos do que as suas enzimas isoladas. Isso se dá pelo fato que as enzimas requerem a utilização de dispendiosos cofatores. Um grande atrativo industrial são os fungos por produzirem enzimas extracelulares, o que facilita sua extração do meio reacional (FABER, 2004).

Dentro deste contexto, as reações de redução assimétrica de grupos carbonílicos de cetonas são de grande interesse, pois podem levar a formação de alcoóis quirais,

podendo ser transformados, sem racemização, para sintetizar importantes produtos de interesse industrial, como fármacos, agroquímicos e produtos naturais (NAKAMURA *et al.*, 2003).

A biorredução de compostos carbonílicos com células inteiras de microrganismos são amplamente descritas na literatura. Como exemplo tem-se a redução do 4-cloro-3-oxobutanoato com a levedura *Candida magnoliae* (Esquema 1.5a). O intermediário sintético para a produção do Singulair® (comercializado para o tratamento de asma e renite alérgica) é obtido pela redução de uma cetona aromática com a bactéria *Microbacterium campoquemadoensis* (Esquema 1.5b) (YASOHARA *et al.*, 1999; NAKAMURA *et al.*, 2003). Nestes dois casos os alcoóis foram obtidos com elevadas enantiosseletividades, bons rendimentos e as reações foram realizadas em grande quantidade.

Esquema 1.5: Exemplos de redução com células inteiras de microrganismos

1.6. RESOLUÇÃO ENZIMÁTICA

Quando um substrato racêmico é submetido a uma reação enzimática, este sofre discriminação quiral entre os enantiômeros. Devido à quiralidade da enzima, o enantiômero que melhor se ajusta no seu sítio ativo sofre reação em uma velocidade mais alta. Para assegurar uma alta seletividade para ambos os enantiômeros, a diferença na velocidade de reação dos enantiômeros individuais deve ser a maior possível. Em alguns casos ideais a velocidade é tão extrema, que o “bom” enantiômero é transformado rapidamente e o outro não é convertido. Então, na resolução do racemato a reação enzimática cessaria automaticamente em 50% de conversão, quando já não existe mais o enantiômero reativo. Como consequência, cada enantiômero pode ser obtido somente com 50% de rendimento em uma resolução enzimática (FABER, 1997).

Um tratamento muito útil das resoluções cinéticas enzimáticas, e que descreve a dependência da conversão do substrato (c) e o excesso enantiomérico do produto ($e.e.$) foi desenvolvido por Sih em 1982 sob a base teórica de Sharpless e Fajans. O parâmetro que indica a discriminação de uma enzima entre dois enantiômeros foi introduzido como razão enantiomérica (E) (SIH *et al.*, 1989).

Valores de razão enantiomérica menores que 15 são inaceitáveis para propósitos práticos. Podem ser considerados moderados a bons valores de 15-30, e acima destes valores são excelentes. Deve ser enfatizado que $E > 200$ não pode ser determinado com precisão, devido às imprecisões emergidas dos métodos da determinação do excesso enantiomérico (RMN, CLAE ou CG), onde uma pequena variação do $e.e.$ pode causar uma mudança significativa no valor numérico de E (SIH *et al.*, 1989).

Para determinar a configuração absoluta a partir de compostos já conhecidos na literatura, compara-se a rotação dos compostos obtidos com os registrados na literatura. A rotação observada é simbolizada pela letra grega α (alfa) e expressa em graus.

Para expressar os valores de rotação ótica de uma forma que possam ser feitas comparações, é necessário padronizar as condições de medida. A rotação específica, $[\alpha]_D$, de um composto é definida como a rotação observada quando o comprimento caminho ótico (l) é de 1 decímetro; a concentração (C) da amostra é expressa em g/100 mL. e o comprimento de onda utilizado é de 589 nanômetros (nm) (McMURRY, 2006).

$$[\alpha]_D = \frac{\text{rotação observada (graus)}}{\text{caminho ótico x concentração}} = \frac{\alpha}{l \text{ (dm)} \times C \text{ (g/mL)}}$$

1.7. EFEITO DOS SOLVENTES ORGÂNICOS

A catálise enzimática era considerada um processo viável somente em fase aquosa. No entanto, pesquisas recentes demonstraram que as enzimas podem ser ativas em solventes orgânicos, solventes gasosos e fluídos supercríticos (BELL, *et al.*, 1995).

Uma das principais vantagens da catálise enzimática em meio orgânico é a possibilidade de efetuar reações que utilizam substratos pouco solúveis em água. A catálise enzimática em meio orgânico apresenta algumas vantagens como: (i) aumento da disponibilidade de substratos pouco solúveis em água; (ii) deslocamento do equilíbrio das reações; (iii) diminuição do número de reações indesejáveis; (iv)

simplificação dos procedimentos de recuperação do produto e do biocatalisador; (v) controle da estereosseletividade das reações enzimáticas; (vi) diminuição do risco de contaminação microbiana; (vii) redução de eventuais inibições por substratos e produtos; (viii) aumento da estabilidade da enzima (COSTA NETO, 2002).

A natureza do solvente orgânico é um fator importante a ser considerado na catálise enzimática em meio não aquoso, pois o solvente não apenas afeta a atividade e a estabilidade da enzima, como também modifica a sua enantiosseletividade (FITZPATRICK e KLIBANOV, 1991; NAKAMURA *et. al.*, 1995).

Além do efeito dos solventes na atividade, na estabilidade e na especificidade da enzima, deve-se também considerar o efeito do solvente na constante de equilíbrio das reações. A condição de equilíbrio será determinada pelas interações entre os reagentes, os produtos e o solvente. A natureza e o comportamento de qualquer catalisador influenciarão apenas a velocidade com que o sistema atinge o equilíbrio (HALLING, 1990-a).

O desenvolvimento da catálise em meio orgânico evidenciou que a quantidade de água realmente necessária para propiciar a atividade enzimática é muito pequena.

2. OBJETIVOS

O objetivo deste trabalho foi realizar reações de biocatálise em compostos orgânicos. As reações de interesse foram:

(i) Resolução enzimática de álcoois racêmicos utilizando a enzima lipase de *Candida antarctica* (Novozym 435) para obter compostos enantiomericamente puros (álcoois e acetatos);

(ii) Redução de cetonas utilizando-se células totais de fungos de origem marinha para detecção de enzimas desidrogenases em novos biocatalisadores.

3. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

3.1. EQUIPAMENTOS

- **Evaporadores Rotativos**

As reações foram evaporadas em evaporadores rotativos FISATOM, equipado com banho termostatzado modelo TE-2005 e bomba a vácuo modelo TE-058 da marca TECNAL.

- **Cromatógrafo a Gás (CG)**

As análises cromatográficas foram feitas nos cromatógrafos a gás Modelo CG-2010, marca SHIMADZU, equipado com auto injetor modelo AOC-29i detector FID e HP – 5890. Os excessos enantioméricos foram determinados através das áreas dos cromatogramas.

- **Colunas quirais**

(i) VARIAN WCOT / CP-Chirasil-Dex CB: sílica 25 m x 0,25 mm x 0,39 μm ;

(ii) VARIAN WCOT / CP-Ciclodextrina: sílica 25 m x 0,25 mm x 0,39 μm ;

(iii) SUPELCO, Gama Dex 120: sílica 30m x 0,25 mm x 0,25 μm .

- **Polarímetro**

As medida de rotação ótica foram realizadas em polarímetro da marca Perkin-Elmer (Waltham, MA, USA), modelo 241 polarimeter, lâmpada de Hg (λ 589 nm).

- **Espectrofotômetro de infravermelho**

Os espectros na região do infravermelho foram registrados em um espectrofotômetro BOMEM modelo MB–102, com transformada Fourier e calibração interna. As amostras foram preparadas na forma de filme e as absorções foram espessas em cm^{-1} .

- **Espectrômetro de Ressonância Magnética Nuclear (RMN)**

Os espectros de RMN ^1H a 500 MHz e RMN ^{13}C a 125 MHz foram registrados em um espectrômetro Bruker DPX-500 (IQ-USP), utilizando-se clorofórmio deuterado como solvente e tetrametilsilano (TMS) como calibração interna. Os deslocamentos químicos (δ) são expressos em partes por milhão (ppm) e as constantes de acoplamento (J) em Hertz (Hz). As multiplicidades estão assim representadas: s (singleto), d (dubleto) e t (triplete).

- **Outros equipamentos utilizados**

balança analítica modelo AY 2220 - SHIMADZU, capela de fluxo laminar Veco, autoclaves, centrífuga Hermle, pHgâmetro Hexis, agitador orbital termostatzado Tecnal TE-421, câmara de uv Tecnal.

3.2. MATERIAIS

- **Colunas Cromatográficas (CC)**

Utilizou-se como fase estacionária sílica gel 60 (230-400 *mesh*) da marca ACROSS, denominada sílica do tipo *flash*. Como fase móvel, utilizou-se uma mistura de solventes, sendo adequada para cada situação.

- **Cromatografia em Camada Delgada Analítica (CCDA)**

Utilizou-se cromatoplasas em sílica gel, da marca SORBENT Technologies, que foram observadas em uma câmara de luz UV (λ 254 e 365 nm).

- **Reveladores**

Como reveladores para CCDA foram utilizadas solução de vanilina e anisaldeído.

(i) *Solução de vanilina em ácido sulfúrico*: 3,0 g de vanilina dissolvida em uma solução contendo 135 mL de H₂O destilada, 35 mL de MeOH e 30 mL de H₂SO₄ concentrado.

A solução foi estocada em um frasco escuro e à temperatura ambiente.

(ii) *Solução de anisaldeído*: a solução foi preparada com 1 mL de *p*-anisaldeiro, 1 mL de H₂SO₄ concentrado e 100 mL de ácido acético. A solução foi estocada à temperatura ambiente.

- **Solventes**

Foram utilizados solventes (hexano, acetato de etila, éter de petróleo e metanol) comerciais e clorofórmio deuterado da marca CIL (Cambridge Isotope Laboratories, Inc.) para a obtenção dos espectros de ressonância magnética nuclear.

- **Reagentes**

Foram utilizados os reagentes: NaBH₄, anidrido acético, piridina, cetonas da marca Sigma.

3.3. MÉTODO: PARTE A – RESOLUÇÃO ENZIMÁTICA

3.3.1. Síntese dos alcoóis racêmicos

Os alcoóis racêmicos foram sintetizados a partir da redução das correspondentes cetonas (Tabela 3.1) com boroidreto de sódio (Esquema 3.1).

As reações foram realizadas num balão de 25 mL sob agitação magnética e à temperatura ambiente. Para cada reação adicionou-se 10 mL de metanol, cetona e boroidreto de sódio (NaBH₄), cujas proporções utilizadas estão descritas na Tabela 3.1. As reações foram monitoradas por CCD e em seguida reveladas com solução de anisaldeído. Após as reações terem sido completadas, adicionou-se 1 mL de água

destilada e evaporou o metanol em excesso sob vácuo no rotaevaporador. Em seguida adicionou-se água destilada (15 mL) e extraiu-se com acetato de etila (2 x 20 mL). A fase orgânica foi seca com sulfato de magnésio, filtrada e concentrada sob vácuo no rotaevaporador. Os produtos foram purificados por cromatografia em coluna utilizando como fase móvel uma mistura de hexano e acetato de etila, em ordem crescente de polaridade (9:1, 8:2, 7:3). Calculou-se os rendimentos obtidos.

Esquema 3.1: Síntese de alcoóis racêmicos

Tabela 3.1: Proporções estequiométrica dos reagentes para a síntese dos alcoóis racêmicos

	Estrutura	substrato (mmol)	NaBH ₄ (mmol)	Rendimento (%)
1		320,00	80,00	94
2		34,30	8,60	90
3		33,60	8,40	70
4		28,90	7,20	95
5		28,90	7,20	92
6		25,50	6,40	97
7		28,70	7,20	94
8		27,00	6,80	93

3.3.2. Síntese dos acetatos racêmicos

Os acetatos racêmicos foram sintetizados conforme o Esquema 3.2, a partir dos correspondentes alcoóis racêmicos (Tabela 3.2). As reações foram realizadas em um balão de 25 mL sob agitação magnética, adicionando-se sequencialmente anidrido acético, piridina e o álcool em proporções equivalentes conforme mostrado na Tabela 3.2. Manteve-se a reação sob agitação por 24 h. Posteriormente, realizou-se uma CCDA e quando constatado o final das reações (24 h), adicionou-se HCl 10% (2 mL). A fase orgânica foi extraída com acetato de etila (3 x 20 mL) e seca com sulfato de magnésio. O solvente foi removido no rotaevaporador. Os produtos foram purificados por cromatografia em coluna utilizando como fase móvel hexano e acetato de etila em ordem crescente de polaridade (9:1, 8:2, 7:3). Calculou-se o rendimento obtido para cada reação (Tabela 3.2).

Esquema 3.2: Síntese de acetatos racêmicos.

Tabela 3.2: Proporções estequiométricas dos reagentes para a síntese dos acetatos racêmicos

	Estrutura	Substrato (mmol)	Piridina/ Anidrido acético (mmol)	Rendimento (%)
(RS)-1a		3,55	3,55	85
(RS)-3a		3,95	3,95	80
(RS)-4a		3,55	3,55	87
(RS)-5a		3,50	3,50	85
(RS)-6a		3,20	3,20	92
(RS)-7a		3,50	3,50	89
(RS)-8a		3,30	3,30	90
(RS)-9a (*) Álcool comercial		3,20	3,20	93

3.3.3. Condições experimentais utilizadas nas reações com lipase de *Candida antarctica* (Novozym 435)

A enzima utilizada para as reações de resolução enzimática foi a lipase de *Candida antarctica* (Novozym 435), que foi gentilmente cedida pela empresa Novo Nordisk (Paraná).

a) Condições experimentais em escala analítica:

As reações foram realizadas em frascos Erlenmeyer de 50 mL, adicionando-se 10 mL de hexano, 500 µL de acetato de vinila, 40 µL dos alcoóis racêmicos e 80 mg de enzima lipase de *Candida antarctica*.

b) Condições experimentais em escala semi-preparativa:

As reações foram realizadas em frasco Erlenmeyer de 50 mL, adicionou-se 10 mL de hexano; 1,0 mL acetato de vinila; 200 µL dos alcoóis racêmicos; 100 mg de lipase de *Candida antarctica*.

Realizou-se o mesmo procedimento para a escala analítica e semi-preparativa. Após adicionar o agente acilante fechou-se o frasco com rolha de borracha e colocou-se imediatamente sob agitação num agitador orbital termostatizado (33 °C, 150 rpm). As reações foram monitoradas retirando-se alíquotas do meio reacional em tempos pré-determinados. Essas alíquotas foram diluídas em hexano e analisadas por CCDA e por cromatografia gasosa com coluna capilar quiral (β -ciclodextrina). Quando constatado que ocorreu cerca de 50 % da conversão, a reação foi interrompida. A mistura reacional foi filtrada em papel filtro e a enzima suportada foi lavada várias vezes com acetato de etila. Em seguida, o solvente orgânico foi removido no rotaevaporador. Purificou-se o

álcool e o acetato obtido por cromatografia em coluna, utilizando uma mistura de hexano:acetato de etila (9:1). Calculou-se os rendimentos das reações.

Nos casos, onde as análises por cromatografia gasosa (com coluna quirai) dos alcoóis racêmicos não apresentaram boa separação, foi necessário realizar uma reação de derivatização para avaliar qual dos enantiômeros a enzima havia biotransformado. Para isso, o álcool remanescente da reação com a enzima foi esterificado utilizando anidrido acético e piridina, produzindo assim o acetato proveniente do enantiômero do álcool não esterificado pela enzima.

Foi feita a medida da rotação ótica dos produtos obtidos pela reação com a lipase e comparados com os dados da literatura, quando encontrados.

3.4. MÉTODO: PARTE B – REDUÇÃO DE CETONAS POR FUNGOS DE ORIGEM MARINHA

3.4.1. Fungos de origem marinha

Em setembro de 2005 foi realizada uma coleta de vários invertebrados marinhos pelo Prof. Dr. Roberto G. de S. Berlinck (IQSC), em São Sebastião, litoral norte do estado de São Paulo. Para cada invertebrado marinho foi utilizado um código, que são as iniciais dos gêneros e das espécies destes invertebrados: *Axinela corrugata* (Ac); *Drummacidon reticulata* (Dr); *Didemnum granulatum* (Dg); *Didemnum branco* (Db); *Didemnum preto* (Dp); *Amphimedon viridis* (Av); *Didemnum ligulum* (Dl); *Chelonaplysilla erecta* (Ce); *Halichona melana* (Hm); Alga não identificada (AI). A partir destes invertebrados fez-se o isolamento dos microrganismos e a purificação de algumas linhagens. Essa parte do trabalho foi desenvolvida em colaboração com o

grupo da Profa. Dra. Mirna H. R. Seleghim (UFSCar) e as cepas originais encontram-se depositadas no laboratório de Microbiologia da Universidade Federal de São Carlos - UFSCar. Dentre os diversos fungos isolados do invertebrado *Chelonaplysilla erecta* (Ce), três microrganismos foram escolhidos para a realização das reações de biocatálise, por apresentarem um excelente crescimento em meio líquido de cultura. Esses fungos foram isolados por Hercules Vicente Ferreira e Lenilson Coutinho da Rocha.

Estes fungos foram identificados pela Dra. Lara Durães Sette e possuem um exemplar depositado na Coleção Brasileira de Microrganismos de Ambiente e Indústria (CBMAI) do Centro de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas (CPQBA/UNICAMP, Brasil) e fazem parte da coleção do Prof. Dr. Roberto G. de S. Berlinck (IQSC), que foram gentilmente cedidos para o desenvolvimento deste trabalho.

Os fungos foram identificados como *Bionectria* sp Ce5, *Aspergillus sydowii* Ce15 e *Aspergillus sydowii* Ce19 (figura 3.1).

Figura 3.1: Fungos utilizados nas reações de biocatálise.

Para o desenvolvimento das atividades envolvendo microbiologia, foi necessário um treinamento de 100 h no laboratório de Microbiologia da Universidade Federal de São Carlos - UFSCar, sob a supervisão da Profa. Dra Mirna H. R. Seleghim e orientação técnica da Sra. Darci da Conceição Diniz Javarotti (UFSCar). O armazenamento,

manipulação e repiques dos fungos para o crescimento microbiano foi realizado de acordo com protocolos utilizados em microbiologia (PELCZAR JR. *et al.*, 2005).

3.4.2. Preparo dos meios de cultura para o crescimento dos fungos

a) Meio líquido: em frascos Erlenmeyer de 2 L adicionou-se 30 g de extrato de malte, 3 g de peptona de farinha de soja e 1 L de solução de água do mar artificial. Em seguida o pH da solução foi ajustado para 8 e meio líquido foi autoclavado a 120 °C por 20 minutos.

b) Meio sólido: em frascos Erlenmeyer de 2 L adicionou-se 30 g de extrato de malte, 3 g de peptona de farinha de soja, 15 g de agar e 1 L de solução de água do mar artificial. Em seguida o pH da solução foi ajustado para 8 e autoclavado a 120 °C por 20 minutos.

3.4.3. Água do mar artificial

A composição da solução de água do mar artificial para 1 Litro foi: 1,26 g de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 9,68 g de $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0,61 g de KCl, 30,0 g de NaCl, 0,014 mg de Na_2HPO_4 , 3,47 g de Na_2SO_4 , 0,17 g de NaHCO_3 , 0,1 g de KBr, 0,04 g de $\text{SrCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ e 0,03 g de H_3BO_3 .

3.4.4. Crescimento dos microrganismos

a) Em meio sólido: os fungos foram crescidos em estufa à temperatura ambiente em placas de Petri, contendo o meio de cultura sólido. Após o crescimento dos microrganismos os mesmos foram preservados sob refrigeração (4 °C).

b) Em meio líquido: os fungos foram crescidos em frascos Erlenmeyer (2 L) contendo 1 L de meio de cultura líquido, sob agitação rotativa e temperatura controlada (32 °C, 150 rpm), durante 5 a 7 dias. O inóculo em meio líquido foi realizado a partir dos fungos preservados em placas de Petri a 4 °C.

3.4.5. Reações de biocatálise com células totais dos microrganismos

Após o crescimento dos microrganismos em meio líquido as células/micélios foram filtradas sob vácuo em funil de Buchner, pesadas e em seguida ressuspensas em solução tamponada (pH=7). A solução tampão foi preparada de acordo com o procedimento da literatura (MORITA,1968). As reações foram realizadas em frascos Erlenmeyer de 250 mL empregando-se 5,0 g de células úmidas de fungos ressuspensas em 100 mL de solução tampão Sorensen (Na_2HPO_4 , KH_2PO_4 , pH 7,0, 0,1M). Em seguida foi adicionado 100 mg ou 100 μL do composto orgânico de interesse e as reações foram conduzidas em agitador rotativo (32° C,150 rpm,).

Acompanhou-se as reações retirando-se uma alíquota de 1 mL em 3, 6 e 9 dias de reação. As alíquotas foram extraídas com acetato de etila e centrifugadas por 5 minutos com rotação de 6000 rpm. Em seguida o sobrenadante foi analisado por cromatografia gasosa (CG – coluna quiral) e cromatografia em camada delgada analítica (CCDA) até obter o máximo rendimento do produto.

3.4.6. Reações de biocatálise com o caldo enzimático (meio de cultura)

O caldo em que foram cultivados os fungos também foi utilizado nas reações de biocatálise, uma vez que é conhecido que muitas enzimas são excretadas para fora do

meio celular. Em um Erlenmeyer de 250 mL adicionou-se 100 mL do caldo enzimático em substituição à solução tampão fosfato. Adicionou-se a esta solução 100 µL ou 100 mg das cetonas de interesse.

O meio reacional foi colocado num agitador orbital com temperatura e agitação controladas (32 °C, 150 rpm). Acompanhou-se as reações em tempos pré-determinados durante 9 dias e seguiu-se o procedimento de análise das alíquotas conforme o item anterior (3.4.5).

3.4.7. Extração das reações com microrganismos

Após as reações com microrganismos terem sido completadas, filtrou-se em funil de Buchner e extraiu-se com acetato de etila (3 x 20 mL). À fase orgânica adicionou-se o sulfato de magnésio (MgSO₄) e posteriormente concentrou-se o solvente sob vácuo no rotaevaporador. Purificou-se os produtos por cromatografia em coluna utilizando sílica gel e determinou-se os rendimentos das reações.

3.4.8. Análises e identificação dos compostos

Os compostos sintetizados foram identificados através de métodos espectroscópicos e espectrométricos (RMN ¹H e ¹³C).

Para os produtos obtidos pelas reações enzimáticas com centros estereogênicos determinou-se os excessos enantioméricos em colunas capilares quirais de ciclodextrinas.

4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1. RESULTADOS E DISCUSSÕES: PARTE A – RESOLUÇÃO ENZIMÁTICA

Alcoóis quirais são importantes intermediários na síntese de vários produtos e que são de interesse de muitas indústrias farmacêuticas e de química fina. As reduções de cetonas biocatalisadas e resolução enzimática de alcoóis racêmicos estão presentes em muitos métodos para a obtenção de alcoóis enantiomericamente puros ou enriquecidos (OMORI *et al.*, 2007).

Neste trabalho os alcoóis racêmicos foram obtidos a partir da redução química das correspondentes cetonas, a fim de se obter padrões para os estudos de resolução enzimática com a lipase de *Candida antarctica* e bem como os álcoois obtidos via redução com os fungos de ambiente marinho.

4.1.1. Análise dos alcoóis e acetatos racêmicos

A redução química das cetonas utilizando boroidreto de sódio levou a obtenção de alcoóis racêmicos que foram utilizados como padrões nas análises cromatográficas em colunas quirais. Essas reações foram bem sucedidas e apresentaram bons rendimentos conforme os dados dispostos na Tabela 4.1.

Depois de obtidos os alcoóis racêmicos, estes foram esterificados utilizando anidrido acético e piridina, levando a formação de acetatos também racêmicos. Esses compostos (Tabela 4.2) foram utilizados como padrão de comparação nas reações realizadas com a lipase de *Candida antarctica*.

Tabela 4.1: Rendimento dos alcoóis racêmicos obtidos a partir da redução de cetonas com NaBH₄

	Estrutura	Rendimento (%)
(<i>RS</i>)-1a		94
(<i>RS</i>)-2a		90
(<i>RS</i>)-3a		70
(<i>RS</i>)-4a		95
(<i>RS</i>)-5a		92
(<i>RS</i>)-6a		97
(<i>RS</i>)-7a		94
(<i>RS</i>)-8a		93

Tabela 4.2: Rendimento dos acetatos racêmicos obtidos a partir da esterificação dos alcoóis racêmicos

	Estrutura	Rendimento (%)
(<i>RS</i>)-1b		85
(<i>RS</i>)-3b		80
(<i>RS</i>)-4b		87
(<i>RS</i>)-5b		85
(<i>RS</i>)-6b		92
(<i>RS</i>)-7b		89
(<i>RS</i>)-8b		90
(<i>RS</i>)-9b		93

Os alcoóis e acetatos racêmicos foram analisados por cromatografia gasosa utilizando coluna capilar quiral para se determinar o tempo de retenção dos compostos em análise.

O objetivo dessas análises foi a separação dos enantiômeros *R* e *S* dos dos álcoois **1a-9a** e dos acetatos **1b-9b**, para determinar o tempo de retenção (t_r) de cada um deles. Para todos os compostos foi necessário estabelecer as condições ótimas de análise, estando estas descritas na Tabela 4.3.

O tempo de retenção foi determinado para os dois enantiômeros, quando houve separação dos mesmos. Em alguns casos (**4a**, **5a**, **6a**, **7a** e **9a**), onde não houve separação dos álcoois, o tempo de retenção (t_r) foi determinado para a mistura racêmica. Como mencionado anteriormente, os álcoois obtidos na resolução enzimática foram posteriormente esterificados para determinação do excesso enantiomérico. Quando se realizou a análise dos acetatos racêmicos, todos foram separados pela coluna quiral, podendo assim determinar o tempo de retenção (t_r) para cada um dos enantiômeros.

Tabela 4.3: Tempo de retenção e condições cromatográficas dos padrões racêmicos

	Composto	t _r (min) (R) e (S)	T _i e T _f (°C)	t _i e t _f (min)	r (°C/min)
(RS)-1a		8,7 e 9,0	130 e 170	2 e 3	5
(RS)-1b		8,1 e 8,5	130 e 170	2 e 3	5
(RS)-2a		11,1 e 11,6	100 e 130	2 e 5	2,5
(RS)-3a		20,0 e 21,5	45 e 60	2 e 1	0,2
(RS)-3b		14,5 e 22,0	60 e 100	2 e 5	5
(RS)-4a		9,0	50 e 100	2 e 1	1
(RS)-4b		12,2 e 12,5	50 e 100	2 e 1	1
(RS)-5a		9,0	65 e 85	2 e 1	1
(RS)-5b		12,2 e 12,5	65 e 85	2 e 1	1

(<i>RS</i>)-6a		6,6	95 e 110	2 e 1	1
(<i>RS</i>)-6b		8,9 e 9,1	95 e 110	2 e 1	1
(<i>RS</i>)-7a		10,4	65 e 85	2 e 1	1
(<i>RS</i>)-7b		13,8 e 14,1	65 e 85	2 e 1	1
(<i>RS</i>)-8a		21,5 e 22,4	50 e 100	2 e 1	2
(<i>RS</i>)-8b		21,3 e 24,0	50 e 100	2 e 1	2
(<i>RS</i>)-9a		9,3	85 e 100	2 e 1	1
(<i>RS</i>)-9b		11,6 e 11,8	85 e 100	2 e 1	1

t_r : tempo de retenção; T_i : temperatura inicial; T_f : temperatura final; t_i : tempo inicial; t_f : tempo final;
r: gradiente de temperatura.

4.1.2. Resolução enzimática

O emprego crescente de enzimas na indústria justifica-se pela especificidade e eficiência com que estas catalisam diferentes reações. O seu uso como catalisadores em reações sintéticas iniciou-se no século XX. (SCHMID e VERGER, 1998), (ZAKS e KLIBANOV, 1985), A biocatálise é extremamente utilizada na produção de estereoisômeros enantiomericamente puros. Atualmente, a produção de intermediários opticamente puros é uma abordagem em crescimento nas indústrias farmacêuticas e química fina, fazendo da biocatálise um grande atrativo para desenvolvimento de novas metodologias (CSAJAGI *et al.*, 2008).

É conhecido na literatura que compostos químicos podem ser eficientemente resolvidos por enzimas. Bons resultados foram descritos quando alcoóis secundários foram reagidos com acetato de vinila, na presença de uma enzima imobilizada. Estudos mostram a produção em grande escala de alcoóis secundários utilizando lipase de *Candida antarctica* (RAMINELLI *et. al.*, 2004).

Neste trabalho, foi estudado a resolução enzimática de alcoóis secundários utilizando a lipase de *Candida antarctica*. A grande vantagem da utilização dessa enzima é o fato dessas reações serem efetuadas em hexano anidro (solvente facilmente eliminado ao final do processo) e por se tratar de uma enzima suportada em resina, sendo facilmente removida por filtração simples.

Os alcoóis racêmicos **1a**, **3a**, **5a-9a**, foram eficientemente resolvidos pela enzima lipase de *Candida antarctica*. Em todas as reações, com exceção do álcool racêmico **4a**, os alcoóis e acetatos apresentaram bons rendimentos isolados com conversão de 50 % de um dos enantiômeros e elevados excessos enantioméricos (Tabela 4.4).

Tabela 4.4: Resolução enzimática dos alcoóis racêmicos com a enzima lipase de *Candida antarctica*^a

$ \begin{array}{c} \text{OH} \\ \\ \text{R}_1-\text{C}-\text{R}_2 \\ (RS)\text{-a} \end{array} \xrightarrow[\text{acetato de vinila}]{\text{lipase / hexano}} \begin{array}{c} \text{OH} \\ \\ \text{R}_1-\text{C}-\text{R}_2 \\ (S)\text{-a} \end{array} + \begin{array}{c} \text{OAc} \\ \\ \text{R}_1-\text{C}-\text{R}_2 \\ (R)\text{-b} \end{array} $										
Composto	t	c (%) <u>a</u>	e.e. (%) <u>a</u>	ca <u>a</u>	Rend. (%) <u>a</u>	c (%) <u>b</u>	e.e. (%) <u>b</u>	ca <u>b</u>	Rend. (%) <u>b</u>	E
(RS)-1a	1 h	50	>98	S	40	50	>98	R	45	>200
(RS)-3a	1 h	40	-			40	-			
	2 h	50	>98	S	40	50	>98	R	45	>200
(RS)-4a	1 h	-	-	-		-	-	-		
	48 h	-	-	-	-	-	-	-	-	-
(RS)-5a	20 min	30	-			30	-			
	40 min	50	>98*	S	32	50	>98	R	31	>200
(RS)-6a	20 min	30	-			30	-			
	40 min	40	-	S	40	40	-	R	35	>200
	1 h	50	>98*			50	>98
(RS)-7a	1 h	10	-			10	-			
	4 h	30	-	S	35	30	-	<u>R</u>	38	>200
	8 h	50	>98			50	>98

$(RS)\text{-}8a$	20 min	20	-			20	-			
	40 min	40	-	<i>S</i>	46	40	-	<i>R</i>	43	>200
	1 h	50	>98*			50	>98
$(RS)\text{-}9a$	20 min	20	-			20	-			
	40 min	40	-	<i>R</i>	47	40	-	<i>S</i>	50	>200
	1 h	50	>98*			50	>98			

^a condições da reação em escala analítica: frasco Erlenmeyer de 50 mL; 10 mL de hexano; 40 μL do substrato; 500 μL de acetato de vinila; 80 mg de enzima; 150 rpm; 32 °C.

t: tempo; c: concentração determinada por CG; e.e.: excesso enantiomérico; ca: configuração absoluta; rend.: rendimento isolado; *E*: razão enantiomérica.

*Excesso enantiomérico determinado após reação de esterificação do álcool quiral.

Os alcoóis e acetatos enantiomericamente puros (obtidos após purificação em coluna cromatográfica de sílica gel), foram analisadas no polarímetro para determinação dos valores de $[\alpha]_D$. Na Tabela 4.5 estão expressos os valores de leitura da rotação ótica e os valores $[\alpha]_D$ calculados a partir das medidas realizadas. Em alguns casos foi possível comparar os valores de $[\alpha]_D$ com os valores já descritos na literatura.

Tabela 4.5: Rotação ótica específica dos alcoóis e acetatos enantiomericamente puros obtidos nas resoluções enzimáticas e os seus respectivos valores da literatura

	Composto	$[\alpha]_D^{25}$	$[\alpha]_D$ literatura
(S)-1a		-45,13° (c 0,5; CHCl ₃)	(S)-1a $[\alpha]_D^{22}$ -29,1° (c 1,03; CHCl ₃) ^a
(R)-1b		+99,56° (c 0,7; CHCl ₃)	
(S)-3a		+ 4,40° (c 0,4; CHCl ₃)	-
(R)-3b		-7,1° (c 0,8; CHCl ₃)	-
(S)-5a		+8,68° (c 0,5; CHCl ₃)	-
(R)-5b		Não determinado	-
(S)-6a		+7,90° (c 0,6; CHCl ₃)	(S)-1a $[\alpha]_D$ +9,0° (c 1,0; CHCl ₃) ^b
(R)-6b		-2,96° (c 0,5; CHCl ₃)	-

(S)-7a		+8,24° (c 0,2; CHCl ₃)	(S)-7a [α] ²⁴ _D +9,2 (c 0,7; CHCl ₃) ^d
(R)-7b		+1,79° (c 0,7; CHCl ₃)	(R)-7a [α] ²² _D -9,2 (c 0,7; CHCl ₃) ^d -
(S)-8a		+10,52° (c 0,4; CHCl ₃)	(S)-8a [α] ²⁴ _D +14,4 (c 0,7; EtOH) ^c
(R)-8b		-3,76° (c 0,4; CHCl ₃)	(R)-8a [α] ²² _D -14,5 (c 0,7; EtOH) ^c
(R)-9a		-8,06° (c 0,8; CHCl ₃)	(R)-9a [α] ²⁴ _D -11,5 (c 2,8; CHCl ₂) ^c
(S)-9b		-12,07° (c 0,9; CHCl ₃)	(S)-8b [α] ²⁴ _D -2,73 (c 0,95; CHCl) ^c

^c NAKAMURA et al., 1995, ^aWANG et al., 2007, ^bWANG J. et al., 1987, ^dHIRATA et al., 2003, ^eFELLUGA et al., 2007,

Uma teoria mais recente para explicar a preferência enantiosseletiva de enzimas lipases é a regra de Kazlauskas. A regra prevê uma diferença na estrutura do sítio ativo das lipases, que consiste em duas cavidades de tamanhos diferentes, outra grande e uma pequena. A enantiosseletividade para as estruturas que contêm um substituinte pequeno e grande (por exemplo, um álcool secundário, como mostrado na Figura 4.1) é explicada pela forma com que os substituintes laterais são encaixados nas cavidades do sítio catalítico. Na Figura 4.1a observa-se um melhor encaixe do grupo substituinte na cavidade do sítio catalítico da enzima, o que resulta em uma maior enantiosseletividade

do substrato biocatalisado. Enquanto que o outro enantiômero também tenta ser catalisado pela lipase, mas ao ser acomodado o substituinte grande na cavidade menor (Figura 4.1b) provoca repulsões estéricas entre os substituintes e a cavidade do sítio ativo, causando uma ruptura na tríade catalítica e resultando em uma baixa seletividade na reação para este enantiômero (GHANEM, 2007). Em alguns casos a reação deixa até mesmo de ocorrer para o enantiômero menos favorecido.

Figura 4.1: Esquema do sítio ativo para as lipases segundo o Modelo de Kazlauskas (a) o enantiômero reage rapidamente e (b) o enantiômero reage lentamente.

O fato de **4a** não ter sido resolvido pela lipase de *Candida antarctica*, pode ser justificado pela regra de Kazlauskas. O álcool **4a** não apresenta diferença significativa no tamanho dos grupos substituintes entre o *n*-propila e o isopropila. Neste caso estes grupos não se encaixam no sítio ativo da enzima, impedindo que ocorra a catálise promovida pela lipase. (Figura 4.2).

Figura 4.2: Regra de Kazlauskas para esterificação de alcoóis racêmicos por algumas lipases.

A configuração absoluta dos álcoois e acetatos foi sugerida pela concordância da regra de Kazlauskas. No caso dos álcoois e acetatos, a configuração absoluta foi determinada através da comparação da rotação ótica obtida com a reportada na literatura.

4.1.2.1. Resolução enzimática do álcool racêmico 1a

A resolução enzimática do álcool racêmico **1a** está ilustrada na Figura 4.3. Através da análise da alíquota coletada após 1 hora de reação (cromatograma **C**), pode concluir que houve conversão total (50%) do álcool (*S*)-**1a** para o acetato (*R*)-**1b**, com elevado excesso enantiomérico (e.e. > 98%). Isso pode ser previsto também pela regra de Kazlauskas. A configuração absoluta foi determinada por comparação da rotação ótica com a literatura.

Figura 4.3: Cromatogramas da resolução enzimática do álcool racêmico **1a** com a lipase de *Candida antarctica*.

A) Cromatograma do álcool racêmico **1a**; B) Cromatograma do acetato racêmico **1b**; C) Cromatograma da reação com 1 h.

4.1.2.2. Resolução enzimática do álcool racêmico **3a**

A resolução enzimática do álcool racêmico **3a** está ilustrada na Figura 4.4. A evolução dessa reação foi acompanhada por sucessivas injeções em cromatografia gasosa. A alíquota referente a 1 h de reação (cromatograma **C**) apresentou uma conversão de 40 % de um dos enantiômeros do álcool racêmico. Após 2 h de reação (cromatograma **D**), observou-se a completa conversão de um dos enantiômeros. Pode-se concluir que o acetato formado tratava-se do enantiômero *R*, segundo a regra de Kazlauskas. Houve conversão total (50 %) do álcool **(S)-3a** para o acetato **(R)-3b**, com elevado excesso enantiomérico ($e.e. > 98\%$).

Figura 4.4: Cromatogramas da resolução enzimática do álcool racêmico **3a** pela lipase de *Candida antarctica*

A) Cromatograma do álcool racêmico **3a**; B) Cromatograma do acetato racêmico **3b**; C) Cromatograma da reação com 1 h; D) Cromatograma da reação com 2 h.

4.1.2.3. Resolução enzimática do álcool racêmico **5a**

A evolução da resolução enzimática do álcool racêmico **5a** está ilustrada na Figura 4.5. A alíquota referente a 20 minutos de reação (cromatograma **C**) apresentou conversão de 30 % de um dos enantiômeros do álcool racêmico. Com 40 minutos de reação (cromatograma **D**) observou-se a completa conversão de um dos enantiômeros. Pode-se prever que o acetato formado tratava-se do enantiômero *R*, segundo a regra de Kazlauskas. Isso pôde ser comprovado pela análise comparativa dos tempos de retenção (t_r) dos respectivos padrões químicos. Houve conversão total (50 %) do álcool (*S*)-**5a** para o acetato (*R*)-**5b** (t_r 12,5 min), com elevado excesso enantiomérico ($e.e. > 98\%$).

Como o álcool racêmico **5a** não apresentou resolução na separação cromatográfica de seus enantiômeros (por cromatografia gasosa), o álcool remanescente

foi esterificado quimicamente, obtendo-se assim o acetato que não foi produzido na reação enzimática.

Observando-se o tempo de retenção (t_r) do acetato racêmico **5b** (t_r 12,2 e 12,5 minutos; cromatograma **B**), conclui-se que a esterificação química do álcool remanescente da resolução enzimática levou a formação do acetato (*S*)-**5b** (t_r 12,2 minutos) não formado durante a reação enzimática.

A configuração absoluta foi atribuída inequivocamente comparando-se a medida da rotação ótica com a literatura.

Figura 4.5: Cromatogramas da resolução enzimática do álcool racêmico **5a** pela lipase de *Candida antarctica*

A) Cromatograma do álcool racêmico **5a**; B) Cromatograma do acetato racêmico **5b**; C) Cromatograma da reação com 20 min.; D) Cromatograma da reação com 40 min.; E) Cromatograma da reação de esterificação química do álcool remanescente (*S*)-**5a**.

4.1.2.4. Resolução enzimática do álcool racêmico 6a

A resolução enzimática do álcool racêmico **6a** foi acompanhada pela análise das alíquotas por cromatografia gasosa (Figura 4.6). A alíquota analisada após 20 minutos de reação (cromatograma **C**) apresentou conversão de 30 % de um dos enantiômeros e com 40 minutos (cromatograma **D**) foi observado 40 %. A completa conversão (50 %) foi obtida com 1 h (cromatograma **E**). O acetato produzido nesta reação com lipase foi o (*R*)-**6b**, previsto pela regra de Kazlauskas, com elevado excesso enantiomérico (e.e. > 98%). A produção desse acetato foi comprovada pela análise do tempo de retenção de seu padrão químico (t_r 9,1 minutos).

Como o álcool racêmico **6a** também não apresentou resolução na separação cromatográfica (cromatograma **A**), foi realizada a esterificação do álcool remanescente obtendo assim o acetato (t_r 8,9 minutos; cromatograma **F**) não produzido na reação de resolução enzimática. Com isso, concluiu-se que o acetato formado pela reação química tratava-se do enantiômero (*S*)-**6b**.

Figura 4.6: Cromatogramas da resolução enzimática do álcool racêmico **6a** pela lipase de *Candida antarctica*

A) Cromatograma do álcool racêmico **6a**; **B)** Cromatograma do acetato racêmico **6b**; **C)** Cromatograma da reação com 20 min.; **D)** Cromatograma da reação com 40 min.; **E)** Cromatograma da reação com 1 h; **F)** Cromatograma da reação de esterificação do álcool remanescente da reação **(S)-6a**.

4.1.2.5. Resolução enzimática do álcool racêmico 7a

A conversão do álcool racêmico **7a** (Figura 4.7) começou com 1 h de reação (cromatograma **C**) apresentando formação de 10 % de acetato. Com 4 horas de reação houve 30 % de conversão (cromatograma **D**) e a conversão total (50 %) foi com 8 horas de reação (cromatograma **E**). O acetato formado e previsto pela regra de Kazlauskas foi o (*R*)-**7b**, com excesso enantiomérico (e.e. > 98%).

Como o álcool racêmico **7a** não apresentou resolução na separação cromatográfica de seus enantiômeros (cromatograma **A**), o álcool remanescente foi esterificado quimicamente, obtendo-se assim o acetato que não foi produzido na reação enzimática.

Observando-se o tempo de retenção (t_r) do acetato racêmico **7b** (t_r 13,8 e 14,1 minutos; cromatograma **B**), conclui-se que a esterificação química do álcool remanescente da resolução enzimática levou a formação do acetato (*S*)-**7b** (t_r 13,8 minutos; cromatograma **F**) não formado durante a reação enzimática.

A configuração absoluta foi atribuída inequivocamente pela comparação de rotação ótica da literatura (Tabela 4.5).

Figura 4.7: Cromatogramas da resolução enzimática do álcool racêmico **7a** pela lipase de *Candida antarctica*

A) Cromatograma do álcool racêmico **7a**; **B)** Cromatograma do acetato racêmico **7b**; **C)** Cromatograma da reação com 1 h; **D)** Cromatograma da reação com 4 h; **E)** Cromatograma da reação com 8 h; **F)** Cromatograma da reação de esterificação do álcool remanescente da reação (S)-**7a**.

4.1.2.6. Resolução enzimática do álcool racêmico **8a**

A evolução da resolução enzimática do álcool racêmico **8a** está ilustrada na Figura 4.8. Passado 20 minutos de reação, houve conversão de 20 % de um dos enantiômeros do álcool racêmico (cromatograma **C**) e com 40 minutos a conversão foi de 40 % (cromatograma **D**). A completa conversão (50%) do álcool (*S*)-**8a** para o acetato (*R*)-**8b** ocorreu com 1 hora (cromatograma **E**) e com excesso enantiomérico (e.e. > 98%). O acetato formado também foi previsto pela regra de Kazlauskas.

Neste caso, como a separação cromatográfica do álcool racêmico apresentou boa resolução, não foi necessário esterificar o álcool remanescente da reação com lipase.

Figura 4.8: Cromatogramas da resolução enzimática do álcool racêmico **8a** pela lipase de *Candida antarctica*.

A) Cromatograma do álcool racêmico **8a**; **B)** Cromatograma do acetato racêmico **8b**; **C)** Cromatograma da reação com 20 min.; **D)** Cromatograma da reação com 40 min.; **E)** Cromatograma da reação com 1h.

4.1.2.7. Resolução enzimática do álcool racêmico 9a

A resolução enzimática do álcool racêmico **9a** está ilustrada na Figura 4.9. A evolução dessa reação foi acompanhada por sucessivas injeções em cromatografia gasosa. A alíquota referente a 20 minutos de reação (cromatograma **C**) apresentou uma conversão de 20 % de um dos enantiômeros do álcool racêmico e com 40 minutos houve a conversão de 40 % (cromatograma **D**). Após 1 h de reação (cromatograma **E**), observou-se a completa conversão de um dos enantiômeros. Pode-se concluir que o acetato formado tratava-se do enantiômero *S*, segundo previsto pela regra de Kazlauskas. Isto foi comprovado pela análise comparativa dos tempos de retenção (t_r) dos respectivos padrões químicos. Houve conversão total (50 %) do álcool (*S*)-**9a** para o acetato (*S*)-**9b**, com elevado excesso enantiomérico (e.e. > 98%).

É importante observar neste caso, que a regra de Kazlauskas é baseada em volume/tamanho dos grupos substituintes, que em geral pode seguir a ordem de prioridade segundo Cahn-Ingold-Prelog. Porém neste caso tem-se uma inversão da ordem de prioridade para a atribuição da configuração absoluta. Portanto neste caso o acetato esterificado tem configuração (*S*), mesmo segundo o postulado de Kazlauskas, ou seja, o grupo volumoso à esquerda e o menor grupo à direita.

Como o álcool racêmico **9a** também não apresentou resolução na separação cromatográfica (t_r 9,3 minutos; cromatograma **A**), foi realizada a esterificação do álcool remanescente obtendo assim o acetato (t_r 11,6 minutos; cromatograma **F**) não produzido na reação de resolução enzimática. Com isso, concluiu-se que o acetato formado pela reação química tratava-se do enantiômero (*R*)-**9b**.

Figura 4.9: Cromatogramas da resolução enzimática do álcool racêmico **9a** pela lipase de *Candida antarctica*

A) Cromatograma do álcool racêmico **9a**; B) Cromatograma do acetato racêmico **9b**; C) Cromatograma da reação com 20 min.; D) Cromatograma da reação com 40 min.; E) Cromatograma da reação com 1 h; F) Cromatograma da reação de esterificação do álcool remanescente da reação **(S)-9a**.

4.2. RESULTADOS E DISCUSSÃO: PARTE B - REDUÇÃO DE CETONAS COM FUNGOS DE ORIGEM MARINHA

O curso estereoquímico na redução de cetonas proquirais por enzimas pode ser previsto aplicando-se a regra de Prelog (PRELOG, 1964). Nas reações de redução o papel das enzimas só se torna relevante se houver a presença do cofator. As redutases do tipo alcoóis desidrogenases são dependentes dos cofatores NADH ou NADPH, que são os responsáveis pela transferência de íon hidreto ao grupo carbonílico.

Foi postulado por Prelog que de acordo com o volume (tamanho) dos grupos substituintes ligados ao carbono carbonílico é possível inferir por qual face ocorrerá a transferência do íon hidreto. Se a transferência do íon hidreto ocorrer pela face *re* da carbonila obtém-se (*S*)-alcoóis e se ocorrer pela face *si* obtém-se (*R*)-alcoóis (Figura 4.10). Nas biorreduções, para se ter acesso a ambos os produtos isoméricos é requerida a disponibilidade de desidrogenases que mostram estereosseletividades opostas (especificidade Prelog que fornece (*S*)-alcoóis e anti-Prelog que fornece (*R*)-alcoóis) quando a ordem de prioridade segundo Cahm-Ingold-Prelog seguir a mesma preferência em relação ao grupo substituinte volumoso à esquerda e o de menos prioridade à direita. A maioria das desidrogenases segue a regra de Prelog, enquanto que as complementares (anti-Prelog) são mais difíceis de serem obtidas (FABER, 2004).

A seleção facial Prelog e anti-Prelog em adições de íon hidreto ao grupo carbonila em cetonas proquirais será investigada utilizando fungos de origem marinha. Em trabalhos recentes no grupo foi investigada a seleção anti-Prelog de alguns fungos de origem marinha em redução de cetonas (COUTINHO *et al.*, 2008).

Figura 4.10: Regra de Prelog para redução de compostos carbonílicos.

4.2.1. Redução de cetonas com fungos de origem marinha

As reações de biorredução das cetonas **1-3**, foram realizadas com três linhagens de fungos de origem marinha: *Bionectria* sp, *Aspergillus sydowii* Ce5, *Aspergillus sydowii* Ce15, e as cetonas **6** e **8** com o fungo *Aspergillus sydowii* Ce15,

O fungo *Bionectria* sp Ce5 apresentou bom crescimento em meio de cultura líquido. Quando utilizadas as células totais para realizar as reações de redução de cetonas, os resultados foram insatisfatórios (baixo rendimento). Já quando utilizado o caldo enzimático, os resultados foram bastante expressivos, havendo redução total das cetonas **1** e **2**, enquanto que a cetona **3** não foi reduzida. Provavelmente o fungo produziu enzimas extracelulares, fazendo do caldo um meio com grande atividade enzimática. Os resultados obtidos com as reduções utilizando o fungo *Bionectria* sp Ce5 estão descritos na Tabela 4.6.

Tabela 4.6: Reações biocatalisadas com o fungo *Bionectria* sp Ce5^a

Composto Orgânico	tempo (dias)	c cetona (%)	c álcool (%)	e.e. (%)	ca
1	3	23	77	55	S
	6	8	92	84	S
	9	0	100	> 98	S
2	3	98	2		Nd
	6	80	20		Nd
	9	75	25	50	Nd
3	3	100	-	-	-
	6	100	-	-	-
	9	100	-	-	-

^a reações com 100 mg ou 100μL de cetona; t: tempo (dias); c: concentração determinada por CG; e.e.: excesso enantiomérico; ca: configuração absoluta.

O fungo *Aspergillus sydowii* Ce15 apresentou bom crescimento em meio de cultura líquido, mas quando utilizadas as células totais para realizar as reações de redução de cetonas, essas não ocorreram. Já quando utilizado o caldo enzimático os resultados foram bastante expressivos para a cetona **1**, **6** e **8**, enquanto que a cetona **2** e **3** não foram reduzidas. Os resultados obtidos com as reduções utilizando o fungo *Aspergillus sydowii* Ce15 estão descritos na Tabela 4.7.

Tabela 4.7: Reações biocatalisadas com o fungo *Aspergillus sydowii* Ce15^a

Composto Orgânico	tempo (dias)	c cetona (%)	c álcool (%)	e.e. (%)	ca
1	3	100	0	-	S
	6	26	74	45	
	9	0	100	> 98	
2	3	100	-	-	Nd
	6	100	-	-	
	9	100	-	-	
3	3	100	-	-	Nd
	6	100	-	-	
	9	100	-	-	
6	3	100	-	-	S
	6	100	-	-	
	9	0	100	> 98	
8	3	100	-	-	S
	6	100	-	-	
	9	0	100	> 98	

^a reações com 100 mg ou 100μL de cetona; t: tempo (dias); c: concentração determinada por CG; e.e.: excesso enantiomérico; ca: configuração absoluta.

O fungo *Aspergillus sydowii* Ce19 apresentou bom crescimento em meio de cultura líquido. Para realizar as reações de redução de cetonas, utilizou-se células totais e o caldo enzimático. Em ambos os casos os resultados foram pouco expressivos, havendo apenas a redução de 10 % da cetona **1**. As cetona **2** e **3** não foram reduzidas. Os resultados obtidos com as reduções utilizando o fungo *Aspergillus sydowii* Ce19 estão descritos na Tabela 4.8.

Tabela 4.8: Reações biocatalisadas com o fungo *Aspergillus sydowii* Ce19^a.

Composto Orgânico	Tempo (dias)	c cetona (%)	c álcool (%)	e.e. (%)	ca
1	3	100	0	-	
	6	90	10	-	S
	9	90	10	-	S
2	3	100	-	-	
	6	100	-	-	
	9	100	-	-	
3	3	100	-	-	
	6	100	-	-	
	9	100	-	-	

^a reações com 100 mg ou 100μL de cetona; t: tempo (dias); c: concentração determinada por CG; e.e.: excesso enantiomérico; ca: configuração absoluta.

4.2.1. 1. Biorredução da cetona 1

A biorredução da cetona **1** apresentou ótimos resultados com os fungos *Bionectria* sp Ce5 (Tabela 4.6) e *Aspergillus sydowii* **Ce15** (Tabela 4.7) levando a formação do álcool (*S*)-**1a**. A configuração do álcool formado foi prevista pela regra de Prelog e confirmada pela medida da rotação ótica com a literatura.

A evolução da reação de biorredução da cetona **1** pelo fungo *Bionectria* sp Ce5 está ilustrada na Figura 4.11. Após 3 dias de reação observou-se 77 % (cromatograma **B**) de redução e com 6 dias houve 92 % (cromatograma **C**). A redução total (100 %) da cetona no álcool (*S*)-**1a** ocorreu com 9 dias de reação (cromatograma **D**), apresentando um ótimo excesso enantiomérico (e.e. > 98%).

Figura 4.11: Cromatogramas da redução da cetona **1** pelo fungo *Bionectria* sp Ce5.

A) Cromatograma do padrão da cetona **1** e do álcool racêmico **1a**; B) Cromatograma da reação com 3 dias, C) Cromatograma da reação com 6 dias; D) Cromatograma da reação com 9 dias.

A reação de biorredução da cetona **1** pelo fungo *Aspergillus sydowii* Ce15 está ilustrada na Figura 4.12. Com 3 dias (cromatograma **B**) de reação não houve redução da cetona. Já com 6 dias observou-se 74 % (cromatograma **C**) de redução e com 9 dias houve a redução total (100 %) da cetona no álcool (*S*)-**1a** (cromatograma **D**), excesso enantiomérico (e.e. > 98%).

Figura 4.12: Cromatogramas da redução da cetona **1** pelo fungo *Aspergillus sydowii* Ce15

A) Cromatograma do padrão da cetona **1** e do álcool racêmico **1a**; B) Cromatograma da reação com 3 dias; C) Cromatograma da reação com 6 dias; D) Cromatograma da reação com 9 dias.

A cetona **1** foi muito pouco reduzida pelo fungo *Aspergillus sydowii* Ce19 (Figura 4.13). Com 3 dias de reação não foi possível observar redução da cetona (cromatograma **B**) e observou-se uma baixa conversão, cerca de 10 %, com 6 e 9 dias de reação (cromatograma **C** e **D**).

Figura 4.13: Cromatogramas da redução da cetona **1** pelo fungo *Aspergillus sydowii* Ce19

A) Cromatograma do padrão da cetona **1** e do álcool racêmico **1a**; B) Cromatograma da reação com 3 dias; C) Cromatograma da reação com 6 dias; D) Cromatograma da reação com 9 dias.

4.2.1.2. Biorredução da cetona **2**

A biorredução da cetona **2** somente apresentou resultado satisfatório com o fungo *Bionectria* s. Ce5, com 25% de conversão (cromatograma C) em 9 dias de reação e apresentando excesso enantiomérico de 50% (Tabela 4.7; Figura 4.14).

A redução da cetona **2** levou a formação do álcool (*S*)-**2a**, conforme previsto pela regra de Prelog.

Figura 4.14: Cromatogramas da redução da cetona **2** pelo fungo *Bionectria* sp Ce5. A) Cromatograma do padrão da cetona **2**; B) Cromatograma do padrão do álcool racêmico **2a**; C) Cromatograma da reação com 9 dias.

4.2.1.3. Biorredução da cetona 3

A cetona **3** não foi reduzida com nenhuma das linhagens de fungos utilizadas, demonstrando que estes microrganismos não apresentam potencial de redução para essa cetona.

4.2.1.4. Biorredução da cetona 6

A evolução da reação de biorredução da cetona **6** pelo fungo *Aspergillus sydowii* Cel5 está ilustrada na Figura 4.15. Com 9 dias de reação observou-se a redução total (100 %) (cromatograma **C**), apresentando um ótimo excesso enantiomérico (e.e.>98%). (Tabela 4.7).

Figura 4.15: Cromatogramas da redução da cetona **6** pelo fungo *Aspergillus sydowii* Ce15. **A)** Cromatograma do padrão da cetona **6**; **B)** Cromatograma do padrão do álcool racêmico **6a**; **C)** Cromatograma da reação com 9 dias.

4.2.1.5. Biorredução da cetona **8**

A evolução da reação de biorredução da cetona **8** pelo fungo *Aspergillus sydowii* Ce15 está ilustrada na Figura 4.16. Com 9 dias de reação observou-se a redução total (100 %) (cromatograma **C**), apresentando um ótimo excesso enantiomérico ($e.e. > 98\%$). (Tabela 4.7).

Figura 4.16: Cromatogramas da redução da cetona **8** pelo fungo *Aspergillus sydowii* Ce15. **A)** Cromatograma do padrão da cetona **8**; **B)** Cromatograma do padrão do álcool racêmico **8a**; **C)** Cromatograma da reação com 9 dias.

4.3. CARACTERIZAÇÃO DOS PADRÕES QUÍMICOS

(RS)-1-(4-metoxifenil)etanol (1a)

F.M. C₉H₁₂O₂

M.M. 152,19 g/mol

RMN ¹H (200 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 1,49 (d, J 6,4 Hz, 3H); 1,98 (s, 1H); 3,81 (s, 3H, OCH₃); 4,86 (q, J 6,4 Hz, 1H); 6,89 (d, J 8,8, 2H); 7,31 (d, J 8,8 Hz, 2H).

RMN ¹³C (50 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 25,3 (CH₃), 55,6 (OCH₃), 70,3 (CHOH), 114,2 (2CH), 127,0 (2CH), 138,4 (CO), 159,4 (CO).

(RS)-1-acetato-4-metoxifenil (1b)

F.M. C₁₁H₁₄O₃

M.M. 378,21 g/mol

RMN ¹H (200 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 1,54 (d, J 6,0 Hz, 3H); 2,06 (s, 3H); 3,82 (s, 3H); 5,87 (q, J 6,0 Hz, 1H); 6,90 (d, J 8,8 Hz, 2H); 7,32 (d, J 8,8 Hz, 2H).

RMN ¹³C (50 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 21,3 (CH₃); 22,0 (CH₃); 55,3 (OCH₃); 72,0 (COH); 114,0 (2CH); 127,6 (2CH); 133,7 (C); 159,2 (C); 170,3 (CO).

(RS)-1-feniletanol (2a)

F.M. C₈H₁₀O

M.M. 122,17 g/mol

RMN ¹H (200 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 1,36 (d, J 6,4 Hz, 3H); 4,73 (q, J 6,4 Hz, 1H); 7,19 (m, 5H);

RMN ¹³C (50 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 25,5 (CH₃); 70,7 (COH); 125,7 (2CH); 127,8 (CH); 128,8 (2CH); 146,2 (CO).

(RS)-4-metil-2-pentanol (3a)

F.M. C₆H₁₄O

M.M. 102,18 g/mol

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 0,88 (d, J 6,0 Hz, 6H); 1,15 (d, J 6,0 Hz, 3H); 1,19-1,23 (m, 1H); 1,34-1,43 (m, 1H); 1,63-1,77 (m, 2H); 3,84 (sexteto, J 6,0 Hz, 1H).

RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 22,2 (CH₃); 23,1 (CH₃); 23,9 (CH); 24,8 (CH₃); 48,9 (CH₂); 66,1 (CH).

(RS)-5-metil-2-hexanol (5a)

F.M. C₇H₁₆O

M.M. 116,20 g/mol

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 0,86 (d, J 6,6 Hz, 6H); 1,18 (d, J 6,6 Hz, 3H); 1,20-1,60 (sobreposição, 2H); 1,51 (m, 3H); 2,00 (s, 3H, CH₃); 4,84 (q, J 6,6 Hz, 1H).

RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 19,9 (CH₃); 21,3 (CH₃); 22,5 (2CH₃); 27,9 (CH₂); 33,7 (CH₂); 34,4 (CH₂); 71,3 (CH); 170,8 (CO).

(RS)-2-acetato-5-metil-hexano (5b)

F.M. C₉H₁₈O₂

M.M. 342,22 g/mol

RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 0,86 (d, J 11,0 Hz, 6H, 2CH₃); 1,18 (d, J 10,0 Hz, 3H); 1,45-1,52 (m, 5H, 2 CH₂ e CH); 2,00 (s, CH₃); 4,84 (m, 1H).

RMN ¹³C (125 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 19,9 (CH₃); 21,4 (2CH₃); 27,9 (CH₃); 33,4 (CH); 34,4 (CH); 71,3 (HCOAc); 170,8 (CO).

(RS)-2-octanol (6a)

F.M. C₈H₁₈O

M.M. 130,23 g/mol

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 0,87 (t, J 6,0 Hz, 3H); 1,17 (d, J 6,0 Hz, 3H); 1,20-1,15 (m, 10H); 1,89 (s, 1H); 3,77 (m, 1H).

RMN ¹³C (125 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 14,0 (CH₃); 22,6 (CH₃); 23,4 (CH₂); 25,7 (CH₂); 29,3 (CH₂); 31,8 (CH₂); 39,3 (CH₂); 68,1 (CH).

(RS)-2-acetato-octano (6b)

F.M. C₁₀H₂₀O₂

M.M. 356,25 g/mol

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 1,17 (d, J 6,0 Hz, 3H); 1,21-1,26 (m, 11H); 1,49-1,51 (m, 3H); 2,00 (s, 3H); 4,87 (s, J 6,0 Hz, 1H).

RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 13,9 (CH₃); 19,9 (CH₃); 21,3 (CH₂); 22,5 (CH₃); 25,3 (CH₂); 29,0 (CH₂); 31,7 (CH₂); 35,9 (CH₂); 71,7 (CH₂); 170,5 (CO).

(RS)-3-heptanol (7a)

F.M. C₇H₁₆O

M.M. 116,20 g/mol

RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 0,98 (m, 6H); 1,34 (m, 8H); 1,60 (s, 1H); 3,47 (m, 1H).

RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 9,8 (CH₃); 14,2 (CH₃); 22,7 (CH₂); 27,8 (CH₂); 30,1 (CH₂); 36,6 (CH₂); 73,6 (CH).

(RS)-3-acetato-heptano (7b)

F.M. C₉H₁₈O₂

M.M. 342,22 g/mol

RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 0,86 (m, 6H); 1,28 (m, 4H) ; 1,52 (m, 4H) ; 2,02 (s, 3H); 4,79 (q, J 5,5 Hz, 1H).

RMN ¹³C (125 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 9,5 (CH₃); 14,0 (CH₃); 21,2 (CH₃); 22,5 (CH₂); 27,0 (CH₂); 27,5 (CH₂); 33,2 (CH₂); 75,2 (CH), 170,9 (CO).

(RS)-6-metil-5-hepten-2-ol (8a)

F.M. C₈H₁₆O

M.M. 128,21 g/mol

RMN ¹H (200 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 1,21 (d, J 6,2 Hz, 3H); 1,53 (m, 2H); 1,64 (s, 3H); 1,71 (s, 3H); 2,07 (m, 2H); 3,81 (m, 1H); 5,15 (t, J 1,4 Hz, 1H).

RMN ¹³C (50 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 18,0 (CH₃); 23,8 (CH₂); 24,8 (CH₃); 26,0 (CH₃); 39,6 (CH₂); 68,3 (COH) 124,4 (CH); 132,3 (C).

(RS)-2-acetato-6-metil-5-hepteno (8b)

F.M. C₁₀H₁₈O₂

M.M. 354,23 g/mol

RMN ¹H (200 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 1,22 (d, J 6,0 Hz 3H); 1,65-1,69 (m, 3H); 1,67 (s, 3H); 1,70 (s, 3H); 1,96-2,00 (m, 1H); 2,00 (s, 3H); 4,89 (m, 1H); 5,09 (m, 1H)

RMN ¹³C (50 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 17,6 (CH₃); 20,0 (CH₃); 21,3 (CH₃); 24,0 (CH₂); 35,6 (CH₃); 36,0 (CH₂); 70,7 (CH); 123,5 (CH); 132,0 (CH); 170,6 (CO).

(RS)-3-acetato-1-octeno (9b)

F.M. C₁₀H₁₈O₂

M.M. 354,23 g/mol

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 0,86 (s, 3H); 1,21-1,28 (m, 7H); 1,49-1,51 (m, 2H); 2,00 (s, 3H); 5,11-5,23 (m, 3H); 5,69-5,81 (m, 1H).

RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 13,9 (CH₃); 21,2 (CH₃); 22,5 (CH₃); 25,0 (CH₂); 31,5 (CH₃); 34,1 (CH₂); 74,8 (CH); 116,4 (CH₂); 136,6 (CH); 170,8 (OCOAc).

5. CONCLUSÕES

Neste trabalho foram realizadas as resolução enzimática de nove álcoois racêmicos, fornecendo álcoois quirais e os respectivos acetatos com excessos enantioméricos excelentes. Em todos os casos a pureza enantiomérica excede 99 %, exceto para o álcool **4a** que não foi resolvido pela enzima.

Os microorganismos utilizados são biocatalisadores potencias para redução de cetonas pró-quirais.

A configuração absoluta dos álcoois e acetatos foi sugerida pela regra de Kazlauskas e quando possível, foi provada inequivocamente pela comparação da rotação ótica experimental e com a descrita na literatura.

Todos os alcoóis e acetatos reforçam o postulado de Kazalaukas.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBERT, L.; LEHNINGER, D.; NELSON, L.; COX, M.M. **Principles of biochemistry**. New York: Worth Publishers, 1982. 1011p.

ATHAWALE, V.; MANJREKAR, N.; ATHAWALE M. Lipase-catalysed synthesis of geranyl methacrylate by transesterification: study of reaction parameters. **Tetrahedron Letters**, v. 43, p. 4797-4800, 2002.

BELL, G.; HALLING, P. J.L; MOORE, B. D.; PARTRIDGE, J.; REES D. G. Biocatalyst behaviour in low-water systems. **Tibtech**, v. 13, p. 468-473, 1995.

CAMPBELL, M. K. **Bioquímica**. São Paulo: Thompson, 2007. 3v.

CARVALHO, P. O.; CALAFATTI, S. A.; MARASSI, M.; SILVA, D.; CONTESINI, F. J.; BIZACO, R. Potencial de biocatalise enantiosseletiva de lípases microbianas. **Química Nova**, v. 28, n. 4, p. 1614-621, 2005.

CASTRO, H. F.; ANDERSON, W. A. Fine chemicals by biotransformation using lipases. **Química Nova**, v. 18, p. 544-554, 2004.

CASTRO; H. F.; MENDES, A. A.; SANTOS, J. C. Modificação de óleos e gorduras por biotransformação. **Química Nova**, v. 27, p. 146-156, 2004.

CHEMICAL & ENGINEERING NEWS. **Chiral chemistry biocatalysis competes as a synthetic tool**. New York: Washington, 2006. v.14.

CHERRY, J. R.; FIDANTSEF, A. L. Directed evolution of industrial enzymes: an update. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 14, p. 438-443, 2003.

CIUFFREDA, P.; CASATI, S.; SANTANIELLO, E. Lipase-catalysed monoprotection of 1,4-diols in a organic solvent using vinyl benzoate as acyl transfer agent. **Tetrahedron Letters**, v. 44, p. 3663-3665, 2003.

CONTESINI, F. J.; CARVALHO, P. O. Esterification of (RS)-ibuprofen by native and comercial lipases in a two-phase system containing ionic liquids. **Tetrahedron:Asymmetry**, v.17, p. 2069-2073, 2006.

COSTA NETO, P. R. **Obtenção de ésteres alquílicos (biodiesel) por via enzimática a partir do óleo de soja**. 2002. 152 f. Tese (Doutorado em Engenharia Química) – Universidade Federal de Santa Catarina, Santa Catarina, 2004.

CSAJAGI, C.; SZATZKER, G.; TOKE, E. R.; URGE, L. DARVAS, F.; POPPE, L. Enantiomer selective acylation of racemic alcohols by lipases in continuous-flow bioreactors. **Tetrahedron: Asymmetry**, v. 19, p. 237-246, 2008.

ELIEL, E.L.; WILEN, S.H. (Eds.). **Topics in stereochemistry**. New York: John Wiley, 1989. v.19, p.63

FABER, K. **Biotransformations in organic chemistry**. Berlin: Springer Verlag , 2004. 454 p.

FABER, K. Biotransformations of non-natural compounds: state of the art and future development. **Pure and Applied Chemistry**, v. 69, p. 1632-1997, 1997.

FABER, K. **Biotransformations in organic chemistry**. Berlin: Springer Verlag, 1997. 402 p.

FELLUGA, F.; FORZATO, C.; GHELFI, F.; NITTI, P.; PITACCO, G.; PAGNONI, U, M.; RONCAGLIA, F. Atom transfer radical cyclization (ATRC) applied to a chemoenzymatic synthesis of quercus lactones. **Tetrahedron: Asymmetry**, v. 18, p. 527-536, 2007.

FITZPATRICK, P. A.; KLIBANOV, A. M. How can the solvent affect enzyme enantioselectivity. **Journal of the American Chemical Society**, v. 113, p. 3166-3171, 1991.

GHANEM, A. Trends in lipase-catalysed asymmetric access to enantiomerically pure/enriched compounds. **Tetrahedron**, v. 63, p. 1721-1754, 2007.

HALLING, P.J. High-affinity binding of water by proteins is similar in air and in organic solvents. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 3, p. 225-228, 1990-a.

HILL, E. M.; BROERING, J. M.; HALLET, J. P.; BOMMARIUS, A. S.; LIOTTA, C. L.; ECKERT, C. A. Coupling chiral homogeneous biocatalytic reactions with benign heterogeneous separation. **Green Chemistry**, v. 9, p. 888-893, 2007.

HIRATA, H.; IKUSHIMA, M.; WATANABE, M.; KAWAUCHI, K.; MIYAGISHI, M.; CHEN, Y. G.; YANAGISHITA, H. Kinetic resolution of optically pure 3-alkanol by *Pseudomonas cepacia* lipase-catalyzed transesterification with vinyl acetate in organic solvent. **Journal of oleo science**, v. 52, p. 375-386, 2003.

KAZLAUSKAS, R.J.; WEISSFLOCH, A.; RAPPAPORT, A.T.; CUCCIA, L.A. A rule to predict which enantiomer of a secondary alcohol reacts faster in reactions catalyzed by cholesterol esterase, lipase from *Pseudomonas cepacia* and lipase from *Candida rugosa*. **Journal of Organic Chemistry**, v. 56, p. 2656-2665, 1991.

KITA, Y.; TAKEBE, Y.; MURATA, K.; NAKA, T.; AKAI, S. Convenient enzymatic resolution of alcohols using highly reactive, nonharmful acyl donors, 1-ethoxyvinil Ester. **Journal of Organic Chemistry**, v. 65, p. 83-88, 2000.

LIU, A.; WEIS, R.; GLIEDER, A. Enzymes from higher eukaryotes for industrial biocatalysis. **Food Technology and Biotechnology**, v.42, p. 237-249, 2004.

LOHITH, K.; DIVAKAR, S. Lipase-catalysed synthesis of L-phenylalanyl-D-glucose. **Journal of Biotechnological Chemistry**, v. 117, p. 49-56, 2005.

MACEDO, G. A.; MACEDO, J. A. Produção de biodiesel por transesterificação de óleos vegetais. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, v. 32, p. 38-46, 2004.

McMURRY, J. **Química orgânica**. São Paulo: Pioneira Thomson Learning, 2006. p. 271-300

MONTALBETTI, A. A. G. N.; FALQUE, V. Amide Bond formation and peptide coupling. **Tetrahedron**, v. 61, p. 10827-10852. 2005.

MORITA, T.; ASSUMPÇÃO, R. B. V. **Manual de soluções, reagentes e solventes**. São Paulo: Edgard Blucher, 1968. p. 273-278.

NAKAMURA, K.; KINOSHITA, M.; OHNO, A. Structure of solvent affects enantioselectivity of lipase-catalyzed transesterification. **Tetrahedron**, v. 51, p. 8799-8808, 1995.

NAKAMURA, K.; YAMANAKA, R.; MATSUDA, T.; HARADA, T.. Recent Developments in asymmetric reduction of ketones with biocatalysts. **Tetrahedron: Asymmetry**, v.14, p. 2659-2691, 2003.

OMORI, A. T.; ASSIS, L. F.; ANDRADE, A. H.; COMASSETO, J. V.; PORTO, A. L. M. Enantiomerically pure organoseleno-1-arylethanol by enzymatic resolution with *Candida antarctica* lipase; Novozym 435. **Tetrahedron: Asymmetry**, v. 18, p. 1048-1053, 2007.

ORLANDO, R. M.; FILHO, N. C.; GIL, E. S.; STRINGHETTA, J. P. S. Importância farmacêutica dos fármacos quirais. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 4, p. 8-14, 2007.

PATEL, R.; BANERJEE, A.; CHU, L.; BROZOZOWSKI, D.; NANDURI, V.; SZARKA, L. J. Microbial synthesis of chiral intermediates for beta-3-receptor agonists. **Journal of the American oil Chemistry Society**, v.75, p. 1473-1482, 1998.

PATEL, R.; HANSON, R.; GOSWAMI, A.; NANDURI, V.; BANERJEE, A.; DONOVAN, M.; GOLDBERG, S.; JOHNSTON, R.; BROZOZOWSKI, D.; TULLY, T.; HOWELL, J.; CAZZULINO, D.; KO, R. Enzymatic synthesis of chiral intermediates for pharmaceuticals. **Journal Industrial and Microbiology Biotechnology**, v.30, p. 252-259, 2003.

PRADO, A. G. S. Química verde, os desafios da química do novo milênio. **Química Nova**, v. 26, p. 738-744, 2003.

PRELOG, V. Specification of the stereospecificity of some oxido-reductases by diamond lattice sections. **Pure and Applied Chemistry**, v. 9, p. 119-130, 1964.

QUEIROS, N.; NASCIMENTO, M.G. Pseudomonas sp. Lipase immobilizes in polymers versus the use of free enzyme in the resolution of (R, S)-methyl mandelate. **Tetrahedron Letters**, v. 43, p. 5225-5227, 2002.

RAMINELLI, C.; COMASSETO, J. V.; ANDRADE, L. H.; PORTO, A. L. M. Kinetic resolution of propargylic and allylic alcohols by *Candida antarctica* lipase (novozyme 435). **Tetrahedron: asymmetry**, v. 15, p. 3117-3122, 2004.

SAID, S.; PIETRO, R. C. L. R. **Enzimas de interesse industrial e biotecnológico**. Ribeirão Preto: Eventos, 2002. p.11-20.

SCHMID, R.D.; VERGER, R. Lipases: Interfacial enzymes with attractive applications **Angewandte Chemie, International Edition**, v. 37, p. 1608-1633, 1998.

SHARMA, R.; CHISTI, Y.; BANERJEE, U. C. Production, purification, characterization, and applications of lipases. **Biotechnology Advances**, v. 19, p. 627-662, 2001.

SHAW, N. M.; ROBINS, K. T.; KIENER, A. Lonza: 20 years of biotransformations. **Advanced Synthesis and Catalysis**, v. 4, p. 425-435, 2003.

SHIMODA, K.; KUBOTA, N.; HAMADA, H.; YAMANE, S.; HIRATA, T. Asymmetric transformation of enones with *synechococcus* sp. **Bulletin of the Chemical Society of Japan**, p. 2269-2272, 2004.

SVEDENDAHL, M.; HULT, K.; BERGLUND, P. Fast carbon-carbon Bond formation by a promiscuous lipase. **Journal of the American Chemical Society**, v. 127, p. 1798-17989, 2005.

TORRE, O.; ALFONSO, I.; GOTOR, V. Lipase catalysed Michael addition of secondary amines to acrylonitrile. **Chemical Communications**, p. 1724-1725, 2004.

TRAMPER, J. Chemical Versus Biochemical Conversion: when and how to use biocatalysts. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 52, p. 290-295, 1996.

TURNER, M. K. Biocatalysis in organic chemistry (part I): past and present. **Tibtech**, v. 13, p.173-177, 1995a.

TURNER, M. K. Biocatalysis in organic chemistry (part II): past and present. **Tibtech**, 13, p. 253-258, 1995b.

WANG, J.; FENG, J.; OIN, R.; FU, H.; YAN, M.; CHEN, H.; LI, X. Asymetric hydrogenation of aromatic ketones catalysed by achiral monophosphine TPPTS-stabilized Ru in ionic liquids. **Tetrahedron: Asymmetry**, v. 18, p. 1643-1647, 2007.

WANG, Y, F.; LALONDE, J. J.; MOMONGAM, M.; BERGBREITER, D. E.; WONG, C, H. Lipase-catalysed irreversible transesterifications using enol esters as acylating reagents: preparative enantio- and regioselective syntheses of alcohols, glycerol derivatives, sugars, and organometalics. **Journal of the American Chemical Society**, v. 110, p. 7200-7205.

WILLIS, W. M.; MARAGONI, A.G. Biotechnological strategies for the modification os food lipids. **Biotechnology and Genetic Engineering Reviews**, v. 16, p. 141-175, 1999.

YASOHARA, Y.; KIZAKI, N.; HASEGAWA, J.; TAKAHASHI, S.; WADA, M.; KATAOKA, M.; SHIMIZU, S. Synthesis of optically active ethyl 4-chloro-3-hydroxybutanoate by microbial reduction. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 51, 847-851. 1999.

ZAKS, A.; CLIBANOV, A. M. Enzyme catalysed processes in organic solvents. **Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of American**, v. 82, p. 3192-3196, 1995.

ANEXOS

Anexo1: Espectro de RMN ^1H do composto (RS)-**7b** (500 MHz; CDCl_3).

Anexo1: Espectro de RMN ^1H do composto **(RS)-7b** (500 MHz; CDCl_3).

Anexo 2: Espectro de RMN ^{13}C do composto **(RS)-7b** (125 MHz; CDCl_3).

Anexo3: Espectro de RMN ^1H do composto (RS)-7a (500 MHz; CDCl_3).

Anexo3: Espectro de RMN ¹H do composto **(RS)-7a** (500 MHz; CDCl₃).

Anexo 4: Espectro de RMN ^{13}C do composto **(RS)-7a** (125 MHz; CDCl_3).

Anexo 5: espectro de RMN ¹H do composto (RS)-**8b** (200 MHz ; CDCl₃)

Anexo 5: espectro de RMN ¹H do composto **(RS)-8b** (200 MHz ; CDCl₃)

Anexo 6: Espectro RMN ^{13}C do composto (RS)-8b (50 MHz ; CDCl_3).

Anexo 7: Espectro de RMN $_1\text{H}$ do composto (RS)-8a (200 MHz; CDCl_3)

Anexo 7: Espectro de RMN ₁H do composto (RS)-**8a** (200 MHz; CDCl₃)

Anexo 8: Espectro RMN ¹³C do composto (RS)-8a (50 MHz ; CDCl₃).

Anexo 9: Espectro de RMN ¹H do composto (RS)-6b (300 MHz; CDCl₃)

Anexo 10: Espectro de RMN ^{13}C do composto (RS)-**6b** (125 MHz; CDCl_3).

Anexo11: Espectro de RMN ^1H do composto (RS)-6a (300 MHz; CDCl_3)

Anexo 12: Espectro de RMN ^{13}C do composto (*RS*)-**6a** (75 MHz; CDCl_3)

Anexo13: Espectro de RMN ^1H do composto **(RS)-5b** (300 MHz; CDCl_3)

Anexo 14: Espectro de RMN ^{13}C do composto (RS)-**5b** (75 MHz; CDCl_3)

Anexo 15: Espectro de RMN ¹H do composto (RS)-5a (300 MHz; CDCl₃)

Anexo 15: Espectro de RMN ¹H do composto (RS)-5a (300 MHz; CDCl₃)

Anexo 16: Espectro de RMN ^{13}C do composto (RS)-5a (75 MHz; CDCl_3)

Anexo 17: Espectro de RMN ^1H do composto **(RS)-9b** (300 MHz; CDCl_3)

Anexo 18: Espectro de RMN ^{13}C do composto (RS)-**9b** (75 MHz; CDCl_3)

Anexo 19: Espectro de RMN ¹H do composto (RS)-3a (300 MHz; CDCl₃)

Anexo 19: Espectro de RMN ¹H do composto **(RS)-3a** (300 MHz; CDCl₃)

Anexo 20: Espectro de RMN ^{13}C do composto (*RS*)-**3a** (75 MHz; CDCl_3)

Anexo 21: Espectro de RMN ¹H do composto (RS)-**1b** (200 MHz; CDCl₃)

Anexo 21: Espectro de RMN ₁H do composto (RS)-**1b** (200 MHz; CDCl₃)

Anexo 22: Espectro RMN ^{13}C do composto **(RS)-1b** (50 MHz ; CDCl_3).

Anexo 23: Espectro de RMN ¹H do composto (RS)-**1a** (200 MHz; CDCl₃)

Anexo 23: Espectro de RMN ¹H do composto (RS)-**1a** (200 MHz; CDCl₃)

Anexo 24: Espectro RMN ¹³C do composto (RS)-**1a** (50 MHz ; CDCl₃).

Anexo 25: Espectro de RMN ¹H do composto (RS)-**2a** (200 MHz; CDCl₃)

Anexo 25: Espectro de RMN ₁H do composto (RS)-2a (200 MHz; CDCl₃)

Anexo 26: Espectro RMN ^{13}C do composto (RS)-**2a** (50 MHz ; CDCl_3).