UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO INSTITUTO DE QUÍMICA DE SÃO CARLOS

Promiscuidade enzimática de lipases na síntese de aldóis e 2H-cromenonas

Erika Vanessa Meñaca Orozco

São Carlos 2019

Erika Vanessa Meñaca Orozco

Promiscuidade enzimática de lipases na síntese de aldóis e 2H-cromenonas

Tese apresentada ao Instituto de Química de São Carlos da Universidade de São Paulo como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Química Orgânica e Biológica.

Orientador: Prof. Dr. André Luiz Meleiro Porto

São Carlos 2019

Se não acreditasse no que agencio Se não acreditasse no meu caminho Se não acreditasse no meu som Se não acreditasse no meu silêncio O que seria, coração, o que seria? O que seria a marreta sem pedreira? Se não acreditasse em cada ferida Se não acreditasse no que ronda Se não acreditasse no que esconde Fazer-se irmão da vida Se não acreditasse em quem me escuta Se não acreditasse no que dói Se não acreditasse no que resta Se não acreditasse naquele que luta O que seria, coração, o que seria? O que seria a marreta sem pedreira?

Tradução de algumas estrofes da música 'La Maza'. Composta por Silvio Rodríguez.

À minha família, Clara, Freddy, Victor e meu amor Felipe.

AGRADECIMENTOS

À divindade de todo ser que me faz tornar melhor pessoa.

Aos meus pais e irmão que torcem por mim sempre e são a força da minha vida.

A toda minha família pelo carinho e apoio.

Ao Felipe pelo amor, companheirismo, cumplicidade e por todos os seus ensinamentos.

Ao Professor André Luiz M. Porto por orientar meu trabalho, pela paciência e dedicação ao corrigir este documento.

As pessoas do Laboratório de Química Orgânica e Biocatálise que acompanharam vários momentos desta caminhada: Iara, Rafaely, Charlene, David, Lucas, Thayane, Juliana Galán, Juliana Barreiro, Samuel, Marília, Aline, William e Natália.

Aos colegas dos demais laboratórios em especial: Alexander, Edson, Patrícia, Bruna e João Pedro.

A minha segunda família em São Carlos, meus amigos: Andrea, Yina, Juan Camilo, Cristian, Cristancho, Lina, Claudia, Martín, Don Júlio, Vivian e Alfredo, que foram um grande apoio nesta jornada.

A meu time da corrida por fazer os dias mais leves, pelo apoio e a motivação a cumprir metas: Marina, Laura, Laís Silva, Raúl, Cristina, Laís Américo, Gizele e Cris.

Aos funcionários do IQSC pelo suporte e a solicitude com que sempre me atenderam, em especial ao André e a Silvana nas análises de RMN e ao Guilherme MiolaTitato pelas análises de massas de alta resolução, à Edvânia por trazer alegria e cuidado a nossas vidas, ao Fabiano por todos os favores realizados.

Ao Professor Javier Ellena pelas análises de raios x.

Ao Professor Antônio C. B. Burtoloso por toda a química orgânica que me ensinou e pelo apoio.

À Professora Fernanda Canduri pelas sugestões na qualificação e pelo apoio na análise de eletroforese.

Ao Professor Edenir Rodrígues Pereira Filho pelo aconselhamento na realização do planejamento experimental.

Ao Instituto de Química de São Carlos e à Universidade e de São Paulo por fornecer todo o suporte e a infraestrutura para a realização deste trabalho.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro através da bolsa de doutorado (Processo 140824/2015-4).

Finalmente, a nossos muitos colegas por suas contribuições essenciais para o planejamento, execução e análise de nossa própria pesquisa nessa área; os nomes dessas pessoas são listados individualmente nas referências.

Muito Obrigada!

RESUMO

Este trabalho apresenta o estudo de duas classes de reações de amplo uso na síntese de moléculas orgânicas através de formação de ligações carbono-carbono, a adição aldólica e a adição de Michael. O estudo das reações catalisadas por lipases foi dividido em dois capítulos. No Capítulo 1 foi realizado um estudo comparativo da adição aldólica entre a cicloexanona (CHX) e o 4-cianobenzaldeído (4-CNB) catalisada pelas lipases de Pâncreas de Porco tipo II (PPL-II) e a lipase de Rhizopus niveus (LRN). A catálise pela PPL-II destacou-se pelo rendimento e seletividade do produto aldólico anti em 72 h de reação (74%, 81:19 anti:syn, $ee_{anti} = 74$ % e $ee_{syn} = 48\%$) frente à catálise pela LRN que forneceu os aldóis em menores rendimentos e seletividades (40%, 73:23 anti:syn, $ee_{anti} = 52$ % e $ee_{syn} = 15$ %). No *Capítulo 2* foi abordada a adição de Michael (adição conjugada-1,2) de enolatos de β -dicetonas cíclicas a aldeídos α,β-insaturados, catalisada pelas lipases PPL-II e de *Pseudomonas fluorescens* (LPF) para a síntese de 2H-cromenonas, compostos presentes em produtos naturais e destacados pelas suas propriedades biológicas e aplicações em materiais fotoativos. A reação entre a 1,3-cicloexanodiona 1a e o crotonaldeído 2a catalisada pela PPL-II forneceu as 2H-cromenonas 3a, 4a e 5a. Seguidamente foi realizado um planejamento fatorial completo 2⁴ variando a massa de PPL-II, os equivalentes molares dos reagentes 1a e 2a, o porcentual de água e a temperatura. Foram escolhidas as variáveis massa de PPL-II e a temperatura para um ajuste fino aplicando o planejamento de composto central 2² para encontrar a condição que levasse ao melhor rendimento da 2-hidroxi-2H-cromenona 4a. A melhor condição encontrada por esta metodologia (20 mg/0,1 mmol da 1,3-cicloexanodiona 1a e 50 °C) foi utilizada na ampliação do escopo da reação com outros aldeídos α,β -insaturados **2a-e** que forneceram as 2-hidroxi-2H-cromenonas 4a-e em rendimentos entre 8-22% favorecendo os diastereoisômeros anti, porém, sem enantiosseletividades. A catálise da reação entre a 1,3-cicloexanodiona 1a e o crotonaldeído 2a pela LPF forneceu a 2-hidroxi-2H-cromenona 4a (93%), mesmo com a enzima inativada pela temperatura (>90 °C), constatando que a enzima realizou uma catálise proteica inespecífica. Portanto, a LPF apresentou uma excelente alternativa para a síntese de 2-hidroxi-2H-cromenonas. Assim, o escopo da reação foi ampliado variando-se os aldeídos α,β -insaturados **2a-c** e as β -dicetonas cíclicas **1a-d** fornecendo rendimentos entre 37- 93% para as 2-hidroxi-2H-cromenonas 4a-c e 4e-h, porém sem enantiosseletividades. Adicionalmente, foi realizada a reação de biotransformação da xxx-2Hcromenona 4a por células totais de fungos de ambiente marinho (Mucor racemosus CBMAI 847, Aspergillus sydowii CBMAI 934, Aspergillus sydowii CBMAI 935, Penicillium citrinum CBMAI 1185, Penicillium citrinum CBMAI 1186 e Cladosporium sp. CBMAI 1237), resultando no produto 6 a partir da redução da ligação dupla conjugada com conversões entre 73-99% via catálise promovida por eneredutases. Conclui-se que este trabalho demonstrou a importância do uso de enzimas promíscuas em síntese orgânica na formação da ligação carbono-carbono como uma eficiente metodologia biocatalítica.

ABSTRACT

Herein, we present the study of two types of reactions commonly used in the synthesis of organic compounds to form carbon-carbon bonds, i.e., aldol addition and Michael addition, which were divided in two chapters. Chapter 1 shows a comparative study of aldol addition reaction using cyclohexanone (CHX) and 4-cyanobenzaldehyde (4-CNB) catalyzed by the Porcine Pancreatic Lipase type II (PPL-II) and *Rhizopus niveus* Lipase (LRN). The catalysis by PPL-II afforded better yield and selectivity of aldol anti-product in 72 h of reaction (74%, 81:19 anti:syn, eeanti = 74% and eesyn = 48%) and, the LRN resulted in lower yields and selectivities for aldol products (40%, 81:19 anti:syn, $ee_{anti} = 52\%$ and ee_{syn} = 15%). Chapter 2 presents the Michael addition (1,2-conjugated addition) of cyclic β -diketone enolates to α,β -unsaturated aldehydes catalyzed by PPL-II and *Pseudomonas fluorescens* Lipase (LPF) in the synthesis of 2H-chromenones. These compounds are widely found in nature and are well-known for their biological properties and applications in photoactive materials. The reaction using 1,3cyclohexanedione 1a and crotonaldehyde 2a catalyzed by PPL-II provided 2H-chromenones 3a, 4a and **5a**. In addition, it was performed a complete factorial design 2^4 in which the mass of PPL-II, the molar equivalents of 1a and 2a, the percentage of water and the temperature were evaluated. The mass of PPL-II and temperature were selected for a fine adjustment applying Central Composite Design 2^2 to obtain the better yield of 2-hydroxy-2H-chromenone 4a. The best condition found using this methodology (20 mg / 0.1 mmol of 1.3-cyclohexanedione 1a and 50 ° C) was applied to other α . β -unsaturated aldehydes 2a-e, resulting in the 2-hydroxy-2H-chromones 4a-e with yields 8 -22% favoring the antidiastereoisomers, and did not show enantioselectivity. The catalysis of the reaction using 1,3cyclohexanedione 1a and crotonaldehyde 2a by LPF provided 2-hydroxy-2H-chromenone 4a (93%). Similar yield of 4a was obtained when the enzyme was denatured (> 90 °C), showing that LPF performed a nonspecific protein catalysis. The catalysis by LPF presented an excellent alternative for the synthesis of 2*H*-chromenones like **4a** and, the reaction scope was expanded using α,β -unsaturated aldehydes **2a-c** and the cyclic β -diketones **1a-d**, affording 2-hydroxy-2*H*-chromenones **4a-c** and **4e-h** with yields 37-93%, and did not show enantioselectivities. In addition, the biotransformation reaction of 2-hydroxy-2H-cromenone 4a was carried out by cells of marine derived-fungi (Mucor racemosus CBMAI 847, Aspergillus sydowii CBMAI 934, Aspergillus sydowii CBMAI 935, Penicillium citrinum CBMAI 1185, Penicillium citrinum CBMAI 1186 and Cladosporium sp. CBMAI 1237), resulting in the product 6 with conversions ranging between 73 and 99% by *ene*-reductases. As a conclusion, this work demonstrated the importance of using promiscuous enzymes in organic synthesis in the carbon-carbon bond formation as an efficient biocatalytic methodology.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO INSTITUTO DE QUÍMICA DE SÃO CARLOS

Capítulo 1

Atividade promíscua aldolase de lipases

Erika Vanessa Meñaca Orozco

Orientador: Prof. Dr. André Luiz Meleiro Porto

São Carlos 2019

RESUMO

Capítulo 1 apresenta um estudo detalhado da adição aldólica entre a cicloexanona (CHX) e o 4-cianobenzaldeído catalisada pelas lipases de Pâncreas de Porco tipo II (PPL-II) e de Rhizopus niveus (LRN). Foi realizada uma comparação entre as lipases em relação aos rendimentos, seletividades diastereoisoméricas e enantioméricas dos produtos aldólicos sobre condições reacionais similares (solvente, temperatura e concentração dos reagentes). A reação catalisada pela PPL-II em 72 h destacou-se pelo rendimento (74%, anti+syn) e diastereosseletividades entre os produtos aldóis anti (CHX-anti) e syn (CHX-syn) de 81:19 e excessos enantioméricos $(ee_{anti} = 74\%, ee_{syn} = 48\%)$. Enquanto a reação catalisada pela LRN forneceu um rendimento de 40% (anti+syn), diastereosseletividades de 73:27 (anti:syn) e enantiosseletividades (ee_{anti} = 52%, $ee_{syn} = 15\%$). A catálise promovida pelas lipases foi confirmada quando a reação foi realizada na ausência das enzimas, pois foi obtido um baixo rendimento do diastereoisômero CHX-syn (0,7%). Para constatar o grau de pureza da amostra comercial das enzimas PPL-II e LRN foi realizado a análise por eletroforese unidimensional de gel de poliacrilamida de dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE). Algumas impurezas foram constatadas, as quais poderiam ser quimiotripsinas, carboxipeptidases, peptídeos ou produtos de proteólise. Nesse sentido, os rendimentos e as seletividades apresentadas para os produtos aldólicos referem-se à catálise promovida pelas enzimas PPL-II e LRN e talvez também pelo extrato comercial total que poderiam estar influenciando na reação, bem como, promovendo uma reação retroaldólica. Finalmente, foi apresentado um estudo da atividade enzimática com a enzima PPL-II obtida do meio reacional, que demonstrou perder parcialmente a sua atividade ao longo da reação. Porém, em 72 horas continuou apresentando 16% atividade catalítica inicial (1.8x10⁻² mmol.min⁻¹.mg⁻ ¹ em tampão fosfato, pH 7,0) em comparação às condições não desnaturantes. Este estudo permitiu corroborar para a atividade aldólica promíscua das enzimas PPL-II e LRN provenientes de amostras comerciais. A PPL-II poderá ser utilizada como reagente biodegradável frente à reação aldólica, pois apresentou bons resultados na formação da ligação carbono-carbono em condições brandas de reação.

ABSTRACT

Chapter 1 presents a detailed study of the aldolic addition between cyclohexanone (CHX) and 4-cyanobenzaldehyde catalyzed by Porcine Pancreatic Lipase type II (PPL-II) and Rhizopus niveus Lipase (LRN). Under similar reaction conditions (solvent, temperature and reagent concentrations) for the two lipases, the reaction yield, the diastereoisomeric and enantiomeric selectivities were compared. The reaction catalyzed by PPL-II stood out for its yield in 72 h of reaction (74%), diastereoselectivities 81:19 (anti:syn) and enantiomeric excesses $ee_{anti} = 74\%$ and $ee_{syn} = 48\%$, respectively; while the LRN catalyzed reaction provided 40% yield, diastereoselectivities 73:27 (anti:syn) and $ee_{anti} = 52\%$ and $ee_{syn} = 15\%$. Lipase catalysis was confirmed by the low yield of the only distereoisomer formed, syn = 0.7%, when the reaction was performed in the absence of catalyst. In order to verify the purity of the commercial sample of PPL-II and LRN lipases, a one-dimensional electrophoresis analysis in sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel was also performed. Some impurities were revealed corresponding to some type of chymotrypsin and carboxypeptidase, peptides or proteolysis products in the samples. In this sense, the yields and selectivities presented here refer to the catalysis by the lipases PPL-II and LRN and total commercial extract that could be influencing the reaction as well as promoting a retroaldolic reaction. In addition, we study the enzymatic activity of the enzyme removed from the reaction medium, showing that PPL-II lost catalytic activity throughout the reaction. However, in the 72 hours of reaction it still had a percentage of 16% of the initial activity in non-denaturing conditions (1.8x10⁻⁴ mmol.min⁻¹.mg⁻¹ in phosphate buffer, pH 7.0). This study corroborated the promiscuous aldolic activity of PPL-II and LRN enzymes from commercial samples. Emphasizing that PPL-II can be used as the biodegradable catalyst in aldol reaction, as presented good results in the formation of carbon-carbon bond under mild reaction conditions.

LISTA DE FIGURAS

| Figura 1.1. Distribuição de enzimas arqueas pelo seu tipo de promiscuidade. Proporção de substrato |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| ou promiscuidade catalítica classificadas em categorias metabólicas na enciclopédia de genes e |
| genoma de Kyoto |
| Figura 1.2. Efeito do conteúdo de água na reação aldólica entre a cicloexanona e o 4-nitrobenzaldeído |
| catalisada por PPL |
| Figura 1.3. Efeito da temperatura no rendimento da reação entre o 4-nitrobenzaldeído e a |
| cicloexanona catalisada por PPL |
| Figura 1.4. Estruturas de estatinas e do ácido siálico |
| Figura 1.5. Estrutura cristalográfica da lipase CAL-B |
| Figura 1.6. Interação do oxiânion em enzimas hidrolíticas: atividades nativa (A) e promíscuas (B e |
| C) |
| Figura 1.7. Conformações gauche e anti nos diastereoisômeros CHX-anti e CHX-syn relacionadas |
| com suas constantes de acoplamento ${}^{3}J$ no espectro de RMN de ¹ H |
| Figura 1.8. Espectro de RMN de ¹ H (500 MHz, CDCl ₃) do produto aldol CHX-syn obtido por catálise |
| básica com NH ₄ OH na ausência de D ₂ O62 |
| Figura 1.9. Espectro de RMN de ¹ H (500 MHz, CDCl ₃) do aldol CHX- <i>syn</i> com adição de D ₂ O 63 |
| Figura 1.10. Espectro de RMN de ¹ H (500 MHz, CDCl ₃) do aldol CHX-anti obtido por catálise básica |
| com NH ₄ OH |
| Figura 1.11. Espectro de RMN de ¹³ C (125 MHz, CDCl ₃) do aldol CHX-syn obtido por catálise com |
| NH ₄ OH |
| Figura 1.12. Cromatograma obtido por HPLC-UV da reação entre o 4-CN-benzaldeído e a |
| cicloexanona catalisada por NH4OH |
| Figura 1.13. Cromatograma obtido por HPLC-UV dos diastereoisômeros CHX-anti e CHX-syn após |
| serem purificados por cromatografia em coluna da reação aldólica catalisada com NH4OH67 |
| Figura 1.14. Cromatogramas obtidos por HPLC-UV dos diastereoisômeros CHX-anti e CHX-syn da |
| reação aldólica catalisada por NH4OH após serem purificados por CCD analítica |
| Figura 1.15. Cromatogramas obtidos por HPLC-UV da reação aldólica entre o 4-CN-benzaldeído e a |
| cicloexanona catalisada por PPL-II ao longo do tempo reacional |

| Figura 1.16. Cromatogramas obtidos por HPLC-UV em fase reversa da reação aldólica entre o 4-Cl | N- |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------|------|
| benzaldeído e a cicloexanona catalisada pela LRN | 70 |
| Figura 1.17. Monitoramento da reação aldólica entre o 4-CN-benzaldeído e a cicloexanona catalisad | da |
| pelas enzimas PPL II e LRN | 71 |
| Figura 1.18. Cromatogramas obtidos por HPLC-UV da reação aldólica entre o 4-CN-benzaldeído e | a |
| cicloexanona na ausência de lipases | 73 |
| Figura 1.19. Cromatogramas obtidos por HPLC-UV da mistura de diastereoisômeros CHX-anti e | |
| CHX-syn das reações aldólicas catalisadas com NH4OH, PPL-II e LRN. | 74 |
| Figura 1.20. Eletroforegramas SDS-PAGE das preparações comerciais das lipases usadas na reação |) |
| aldólica, PPL-II e LRN em concentrações de 1 a 6 mg/mL | 77 |
| Figura 1.21. Espectro de absorção no ultravioleta do indicador vermelho de fenol, em pH 7,7 e as | |
| estruturas presentes no equilíbrio ácido-base. | 79 |
| Figura 1.24. Hidrólise de tributirina para a medição da atividade enzimática de alíquotas de reação | |
| entre 4-CN-benzaldeído e CHX catalisada pela PPL-II. | . 80 |

LISTA DE TABELAS

| Tabela 1.1. Efeito do pH na reação aldólica entre o 4-nitrobenzaldeído e a cicloexanona catalisada |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| pela BPL |
| Tabela 1.2. Classificação das aldolases segundo a especificidade do seu substrato doador. 37 |
| Tabela 1.3. Promiscuidade catalítica de algumas enzimas na reação aldólica para a reação entre |
| derivados de benzaldeído e de cicloexanona |
| Tabela 1.4. Parâmetros das equações das curvas analíticas obtidas das análises dos padrões CHX-anti |
| e CHX-syn e 4-cianobenzaldeído por HPLC |
| Tabela 1.5. Equações das curvas analíticas obtidas por análise HPLC-aquiral para as reações aldólicas |
| entre o 4-CN-benzaldeído e a cicloexanona catalisadas pelas enzimas PPL II e LRN |
| Tabela 1.6. Valores de rendimento e diastereosseletividade dos diastereoisômeros CHX-syn e CHX- |
| anti da reação aldólica catalisada com NH4OH 67 |
| Tabela 1.7. Conversões e diastereosseletividades observadas para a reação de adição aldólica entre o |
| 4-CN-benzaldeído e a cicloexanona catalisada pela PPL-II, analisadas por HPLC-UV aquiral 69 |
| Tabela 1.8. Conversões e diastereosseletividades obtidas para a reação de adição aldólica entre o 4- |
| CN-benzaldeído e a cicloexanona catalisada pela LRN, analisadas por HPLC-UV aquiral70 |
| Tabela 1.9. Conversões e diastereosseletividades obtidas para a reação de adição aldólica entre o 4- |
| CN-benzaldeído e a cicloexanona na ausência de catalisador, analisadas por HPLC-UV aquiral 72 |
| Tabela 1.10. Valores de rendimentos, diastereosseletividades e excessos enantioméricos das reações |
| entre o 4-CN-benzaldeído e a cicloexanona catalisadas por PPL-II, LRN e NH4OH74 |
| Tabela 1.11. Comparação de alguns catalisadores orgânicos e enzimas para a reação aldólica entre o |
| 4-CN-benzaldeído e a cicloexanona descritos na literatura |
| Tabela 1.12. Atividade específica determinada da PPL-II em diferentes tempos na reação aldólica |
| entre o 4-CN-benzaldeído e a cicloexanona |

LISTA DE ESQUEMAS

| Esquema 1.1. Hidrólise enantiosseletiva do substrato proquiral 1,4-diidropiridina pela lipase de |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Pseudomonas sp. destacando o efeito do solvente |
| Esquema 1.2. Acetilação regiosseletiva do composto diol utilizado como intermediário da síntese do |
| agente antifúngico SCH565992 catalisada pela CAL-B |
| Esquema 1.3. Ilustração simplificada do mecanismo da reação aldólica catalisada por (A) ácido e (B) |
| Exercise 14 Decessor and 14/1/2010 Defendence (for first and 1/2010 Decessor (for first |
| aldolase |
| Esquema 1.5. Reações catalisadas pelas 4-hidroxi-2-oxopentanoato aldolases, BphI e HpaI |
| Esquema 1.6. (A) Mecanismo de reação de aldolases classe I. (B) Mecanismo de reação de aldolases |
| classe II |
| Esquema 1.7 . Síntese de γ -hidroxi- α -cetoácidos derivados do oxaloacetato via reação aldólica |
| promíscua catalisada por macrofomato sintase |
| Esquema 1.8. Síntese de derivados de açúcares por reação aldólica promíscua catalisada por MPS39 |
| Esquema 1.9. Reação de hidrólise catalisada por lipases |
| Esquema 1.10. Mecanismo geral da hidrólise de ésteres catalisada por lipases |
| Esquema 1.11. Hidrólise enantiosseletiva de butirato de glicidila pela PPL |
| Esquema 1.12. Formação do hemicetal por lipases selvagens na presença de substratos carbonílicos. |
| Esquema 1.13. Reação aldólica promíscua entre o 4-nitrobenzaldeído e a acetona catalisada por PPL |
| em presença de água45 |
| Esquema 1.14. Atividade catalítica promíscua de PPL II para a reação aldólica |
| Esquema 1.15. Mecanismo proposto da reação de condensação aldólica catalisada por 4-OT entre o |
| acetaldeído e o benzaldeído para produzir o cinamaldeído47 |
| Esquema 1.16 . Mecanismo catalítico proposto e adaptado para a PPL na reação aldólica promíscua entre o 4-CN-benzaldeído e a cicloexanona |
| Esquema 1.17 - Reação aldólica entre o 4-cianobenzaldeído e a cicloexanona usada como modelo na |
| catálise pelas lipases PPL-II e LRN |
| Esquema 1.18. Hidrólise de tributirina em microemulsão de Triton X-100 |

LISTA DE SIGLAS, ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E FÓRMULAS

| AcOEt | Acetato de etila | | | | |
|------------------------|---------------------------------------------------------|--|--|--|--|
| CCD | Cromatografia em camada delgada | | | | |
| CG-EM | Cromatógrafo a gás acoplado ao espectrômetro de massa | | | | |
| d | Dupleto | | | | |
| dd | Duplo dupleto | | | | |
| DMSO | Dimetilsulfóxido | | | | |
| DMF | Dimetilformamida | | | | |
| EM-IES | Espectrometria de massas com ionização por electrospray | | | | |
| eq. | Equivalentes | | | | |
| Et ₂ O | Éter dietílico | | | | |
| Hz | Hertz | | | | |
| <i>i</i> -prOH | Isopropanol | | | | |
| IV | Infravermelho | | | | |
| J | Constante de acoplamento | | | | |
| LRN | Lipase de Rhizopus niveus | | | | |
| m | multipleto | | | | |
| MHz | Mega-hertz | | | | |
| δ | Deslocamento químico | | | | |
| LPF | Lipase de Pseudomonas fluorescens | | | | |
| PPL-II | Lipase de pâncreas de porco | | | | |
| ppm | Partes por milhão | | | | |
| q | Quarteto | | | | |
| R | Grupo alquila | | | | |
| RMN de ¹ H | Ressonância magnética nuclear de hidrogênio | | | | |
| RMN de ¹³ C | Ressonância magnética nuclear de carbono 13 | | | | |
| S | Singleto | | | | |
| t | Tripleto | | | | |
| t.a. | Temperatura ambiente | | | | |
| TBAF | Fluoreto de tributilamônio | | | | |
| TMS | Tetrametilsilano | | | | |
| | | | | | |

SUMÁRIO

| 1.1 | INT | RODUÇÃO | 24 |
|-----------|---------------|---------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 1.1 | 1.1 | Importância do estudo de promiscuidade enzimática | 24 |
| 1.1 | 1.2 | Promiscuidade enzimática | 25 |
| 1.1 | 1.3 | Fatores que afetam o desempenho de reações biocatalíticas | 27 |
| | 1.1.3.1 | Natureza do solvente | 27 |
| | 1.1.3.2 | Influência do pH | 31 |
| | 1.1.3.3 | Temperatura | 32 |
| 1.1 | 1.4 | Reação aldólica | 33 |
| | 1.1.4.1 | Biocatalisadores para reação aldólica | 35 |
| | 1.1.4.2 | Enzimas promíscuas com atividade aldolase | 40 |
| | 1.1.4.3 | Lipases | 41 |
| | 1.1.4.3 | .1 Mecanismo catalítico para a reação aldólica promíscua por lipases | 48 |
| 1.2 | OBJ | IETIVOS | 51 |
| 1.2 | 2.1 | Objetivo geral | 51 |
| 1.2 | 2.2 | Metas | 51 |
| 1.3 | MA | TERIAIS E MÉTODOS | 52 |
| 1.3 | 3.1 | Reagentes, solventes e materiais | 52 |
| 1.3 | 3.2 | Reação aldólica entre o 4-CN-benzaldeído e a cicloexanona | 52 |
| | 1.3.2.1 | Síntese de padrões racêmicos CHX-anti e CHX-syn | 53 |
| | 1.3.2.2 | Reação aldólica biocatalisada por lipases PPL-II e LRN | 54 |
| | 1.3.2.3 | Reação aldólica controle (branco) | 54 |
| 1.3 CH | 3.3 HX-syn | Métodos de análise, identificação e caracterização estrutural dos produtos CHX-anti e | 54 |
| | 1.3.3.1 | Análise por cromatografia líquida de alta eficiência | 54 |
| | 1.3.3.2 | Purificação dos produtos da reação aldólica entre o 4-cianobenzaldeído e a cicloexano | ona |
| | catalisa | adas pelas enzimas PPL-II e LRN | 56 |
| | 1.3.3.3 | Espectroscopia de ressonância magnética nuclear | 57 |

| 1.3.3.4 | Espectrometria de massas com ionização por electrospray | | |
|-------------|------------------------------------------------------------------------------------------|--|--|
| 1.3.3.5 | Medidas de rotação ótica dos enantiômeros CHX-anti e CHX-syn | | |
| 1.3.3.6 | Eletroforese unidimensional de gel de poliacrilamida de dodecil sulfato de sódio (SDS- | | |
| PAGE) | para as enzimas PPL-II e LRN | | |
| 1.3.3.7 | Determinação da atividade enzimática da PPL-II | | |
| 1.3.3.8 | Preparação das soluções usadas na determinação da atividade enzimática 59 | | |
| 1.3.3.9 | Curva analítica do ácido butírico 59 | | |
| 1.3.4 | Outros equipamentos utilizados | | |
| 1.4 RESU | JLTADOS E DISCUSSÃO 61 | | |
| 1.4.1 C | Caracterização espectroscópica dos diastereoisômeros CHX-anti e CHX-syn por RMN 61 | | |
| 1.4.2 A | Análises por cromatografia líquida de alta eficiência da reação aldólica entre o 4-CN- | | |
| benzaldeíd | o e a cicloexanona | | |
| 1.4.2.1 | Análises por HPLC-UV dos produtos da reação aldólica catalisada quimicamente por | | |
| NH4OH | | | |
| 1.4.2.2 | Análises por HPLC-UV da reação aldólica entre o 4-CN-benzaldeído e a cicloexanona | | |
| catalisad | a pelas enzimas PPL-II e LRN | | |
| 1.4.2.3 | Enantiosseletividade da reação aldólica entre o 4-CN-benzaldeído e a cicloexanona 73 | | |
| 1.4.2.4 | Determinação da configuração absoluta dos produtos aldólicos CHX-anti e CHX-syn75 | | |
| 1.4.3 I | Determinação da pureza das lipases PPL-II e LRN77 | | |
| 1.4.4 I | Determinação da atividade enzimática da PPL-II durante a reação entre a cicloexanona e o | | |
| 4-cianoben | zaldeído | | |
| 1.5 CON | CLUSÃO | | |
| REFERÊNCIAS | | | |

1.1 INTRODUÇÃO

1.1.1 Importância do estudo de promiscuidade enzimática

O comportamento promíscuo das enzimas vem se tornando cada vez mais útil, pois permite investigar outros tipos de reações que até então têm sido pouco exploradas na presença de biocatalisadores.

Esse comportamento promíscuo das enzimas possibilita a oportunidade para a evolução de novas aplicações em reações através de técnicas de biologia molecular para aplicação a síntese orgânica, bem como ferramentas para uma ampla faixa de aplicações tecnológicas.

Na atualidade são realizados muitos esforços relacionados à modificação racional de enzimas por mutagênese pontual ou evolução dirigida (1), engenharia de proteínas (2,3,4), engenharia de reação (5), com o intuito de favorecer novas atividades catalíticas ou melhorar as já existentes para catalisarem um determinado tipo de reação.

Enzimas promíscuas têm sido exploradas para a incorporação de resíduos de aminoácidos não naturais às proteínas (6) e para a síntese de DNA marcado com fluoróforos ou grupos quimicamente reativos para a reticulação a outras moléculas (7). A promiscuidade da Avidina para ligar-se a 8-oxodeoxiguanosina tem sido explorada em *kits* comerciais de ELISA para a detecção de DNA danificado oxidativamente (8).

Embora algumas aldolases, como a 2-desoxirribose 5-fosfato aldolase (DERA), serem empregadas industrialmente na síntese de intermediários chaves de moléculas bioativas como estatinas ou alguns antivirais como Zanamavir (9,10); a maioria não são de uso comum devido à elevada especificidade ao substrato e requerimento de cofatores, os quais são instáveis na maioria de condições reacionais. Neste sentido, é conveniente explorar outro tipo de enzimas que além de promover a síntese de moléculas orgânicas com atividade biológica, possuam vantagens em relação a sua estabilidade térmica e à exposição a solventes orgânicos, e que não requeiram o uso de cofatores para levar a cabo sua função.

A abordagem de explorar a promiscuidade catalítica como ponto de partida para criar biocatalisadores feitos sob medida pode apoiar estas áreas, e pode ser a chave para uma maior aplicação da biocatálise na indústria.

1.1.2 Promiscuidade enzimática

A promiscuidade enzimática é definida pelas teorias evolucionárias como a capacidade que uma enzima possui para catalisar reações secundárias que são irrelevantes ou ineficientes, ou que não ocorrem em condições fisiológicas pela ausência de substratos, mas na presença de substratos não naturais podem catalisar suas transformações químicas (11).

Levando em consideração que as enzimas divergiram de um ancestral comum, a promiscuidade enzimática é um mecanismo associado à evolução, que sobre pressão seletiva levou-as para uma função específica que se tornou a sua função principal, transformando-as em especialistas (específicas) e fazendo que se perdessem outras funções ou permanecessem silenciadas (1,3,12).

As *enzimas promíscuas* podem catalisar distintos tipos de transformações químicas com diferentes estados de transição ou possuir uma ampla especificidade de substrato. Sendo o caso oposto a uma *enzima especialista*, a qual é restrita a um tipo de reação e especificidade de substrato (2). Isto permite uma classificação da promiscuidade como *promiscuidade de substrato* e *promiscuidade catalítica* (13).

No estudo realizado por Martínez *et al.* (2) com o intuito de descrever estatisticamente a distribuição de enzimas promíscuas em organismos arqueas baseados nas reações que desempenham nas vias metabólicas, foi encontrado que ao menos 75 % das enzimas promíscuas exibem promiscuidade de substrato, enquanto um terço mostrou promiscuidade catalítica indicando que a evolução de um novo mecanismo catalítico é mais difícil (**Figura 1.1**) (2).

Figura 1.1. Distribuição de enzimas arqueas pelo seu tipo de promiscuidade. Proporção de substrato ou promiscuidade catalítica classificadas em categorias metabólicas na enciclopédia de genes e genoma de Kyoto.



Fonte: Martínez et al. (2)

Do ponto de vista da biocatálise é adicionado outro nível na classificação, a *promiscuidade de condição*. Segundo a qual as enzimas usadas como biocatalisadores podem realizar suas funções catalíticas na presença de solventes orgânicos, pH's e temperaturas diferentes, conteúdos de meios aquosos totalmente adversos das condições fisiológicas (13,14).

Diversos mecanismos que permitem a promiscuidade enzimática têm sido descritos, como o arranjo conformacional, diferentes interações de grupos funcionais com os substratos, diferentes estados de protonação, entre outros (15). Fundamentalmente, esses mecanismos de promiscuidade enzimática estão baseados nas interações enzima-substrato, as quais envolvem as ligações de hidrogênio, as interações eletrostáticas e hidrofóbicas (13,16).

As duas primeiras dependem da complementaridade de estruturas do substrato e os resíduos do sítio ativo da enzima. As ligações hidrofóbicas dependem da dessolvatação e são dirigidas pela entropia e são muito menos dependentes de estruturas especificas. Assim, a

eficiência catalítica de muitas enzimas para reações promíscuas depende da hidrofobicidade do substrato (13).

Essas interações podem ser alteradas aplicando o conhecimento dos mecanismos de reação, por exemplo, o desenvolvimento de reações de síntese de amidas e ésteres com hidrolases na ausência de água, a qual atua como nucleófilo, substituindo por uma amina ou um álcool favorecendo o equilíbrio para a reação de síntese (17).

O conhecimento das propriedades físico-químicas dos aminoácidos do sítio ativo, como os estados de estados de protonação e a nucleofilicidade em resposta ao pH, ou a hidrofobicidade sobre o desempenho na catálise, permite o desenvolvimento de biocatalisadores "desenhados" para propósitos de síntese orgânica.

Adicionalmente, o conhecimento da estrutura funcional da enzima, em relação aos canais de entrada e saída de moléculas de água, quais as condições que promovem a abertura e fechamento do *loop* em algumas enzimas, quais os resíduos de aminoácidos são importantes para manter a atividade promíscua; quais os resíduos de aminoácidos presentes na superfície são necessários para manter a hidratação e conferir estabilidade à enzima sem alterar sua função catalítica promíscua em solventes orgânicos são fatores importantes para a construção de um biocatalisador robusto (4). Tais alterações podem ser realizadas por mutagênese dirigida ou engenharia de reação e de substrato ampliando o desempenho e estabilidade das enzimas.

1.1.3 Fatores que afetam o desempenho de reações biocatalíticas

1.1.3.1 Natureza do solvente

Nas reações biocatalisadas o solvente é muito importante, sendo em geral as reações enzimáticas promovidas em meio aquoso ou soluções tamponantes. A função da água é solvatar as espécies carregadas na superfície da proteína e mediar a distribuição dos prótons para estabelecer o pH ideal destas cargas (4).

No entanto, atualmente é estabelecido firmemente que muitas enzimas podem catalisar reações em solventes orgânicos contendo pouca ou nenhuma quantidade de água, o que leva à expansão do repertório de reações promovidas pelas enzimas em meios não convencionais, as quais são suprimidas em soluções aquosas (4,18).

Klibanov descreveu de forma detalhada o efeito de solvente orgânico na atividade enzimática, na estabilidade térmica (100 °C) e na especificidade da enzima (18). Por exemplo, as lipases de pâncreas de porco, a ribonuclease e a quimotripsina à temperatura de 100 °C têm

tempos de meia-vida de várias horas em solventes orgânicos anidros, enquanto que em água elas podem desativar em poucos segundos nessas condições. Em geral a atividade enzimática em solventes orgânicos é muito menor do que em água, isto devido à perda de flexibilidade conformacional e aumento da rigidez estrutural.

A flexibilidade é conferida pela presença de moléculas de água facilitando a mobilidade conformacional ótima para a catálise. Neste sentido, não é a presença de solventes orgânicos o que desnatura a enzima, e sim a desidratação o que altera a estrutura da enzima e resulta em uma atividade enzimática alterada em solventes orgânicos. A menor constante dielétrica dos solventes orgânicos em relação à água, aumenta as interações intramoleculares, como consequência a enzima torna-se mais rígida (18).

Com o intuito de minimizar o efeito do solvente orgânico existem algumas alternativas para preservar a atividade enzimática, tais como: a adição de poucas quantidades de água às suspensões enzimáticas; a mimetização do efeito ativante da água por outros solventes usados em quantidades adequadas para evitar a desnaturação e capazes de formarem ligações de hidrogênio, como o etilenoglicol e o glicerol. Esta estratégia é usada também para preservar a conformação nativa, suspendendo as enzimas nestes tipos de solventes ou em soluções de açúcares e de sais inorgânicos como KCl (19), éter coroa ou mesmo a adição de substratos previamente à liofilização, a fim de preservar uma "memória molecular" quando forem empregados solventes orgânicos (18).

O efeito dos solventes orgânicos hidrofílicos e hidrofóbicos na catálise deve ser considerado. Solventes hidrofílicos removem as moléculas de água fortemente ligadas à enzima podendo afetar sua atividade catalítica. Enquanto os solventes hidrofóbicos, apesar de aumentarem a rigidez das enzimas, preservam a sua atividade catalítica (4,18). Solventes polares, como a cetona e a DMF interagem fortemente com a enzima e com as moléculas de água associadas afetando drasticamente a atividade catalítica (4).

Na literatura também é descrito o uso de outros solventes na catálise enzimática, incluindo fluidos supercríticos, gases, misturas eutéticas, cristais líquidos e líquidos iônicos, sistemas bifásicos, miniemulsões (18).

Outro efeito importante do solvente é na especificidade da enzima, apesar de ser uma propriedade intrínseca, há vários estudos que mostram que a seletividade tem sido alterada com a mudança de um solvente para outro. Alguns exemplos são a seletividade de substrato, enantiomérica, proquiral, regiosseletividade e quimiosseletividade (18).

A seletividade de substrato para as proteases α -quimiotripsina e subtilisina é guiada pelas interações hidrofóbicas. Diferenças na hidrofobicidade entre os resíduos de aminoácidos de uma cadeia peptídica permite à enzima discriminar quais ligações peptídicas serão clivadas. A subtilisina reage como a substrato N-Ac-L-Phe-OEt em diclorometano (log P = 130) oito vezes mais rápido do que com o substrato N-Ac- L-Ser-OEt (log P = 0,065), mas a reatividade é invertida quando o solvente usado é o álcool *terc*-butílico (log P = 23 e 1,9 para N-Ac-L-Phe-OEt e N-Ac- L-Ser-OEt, respectivamente) (20).

A enantiosseletividade induzida pelo solvente foi relatada para a α -quimiotripsina na transesterificação do composto 3-hidroxi-2-fenilpropionato de metila com propanol. Enquanto a enzima interage preferencialmente com o enantiômero-*S* do substrato em alguns solventes, o enantiômero-*R* é mais reativo em outros (21).

O uso de substratos proquirais na hidrólise enantiosseletiva realizada pela lipase de *Pseudomonas* sp. foi descrito por Hirose et al. (22) (**Esquema 1.1**). Os autores usaram diferentes dicarboxilatos de bis (aciloximetil)-1,4-di-hidro-3,5-piridina, que pela ação da lipase em diisopropil éter saturado com água forneceu o (*S*)-monoéster de 1,4-di-hidro-3,5-piridina em 87% e 99% de *ee*. Enquanto o mesmo substrato hidrolisado pela mesma enzima em cicloexano saturado com água produziu o (*R*)-monoester de 1,4-di-hidro-3,5-piridina em 88% e 89% de *ee*. Nestes casos diferentes enantiômeros foram obtidos simplesmente mudando o solvente da reação.

Esquema 1.1. Hidrólise enantiosseletiva do substrato proquiral 1,4-diidropiridina pela lipase de *Pseudomonas* sp. destacando o efeito do solvente.



Fonte: Hirose et al. (22)

O uso de solventes orgânicos na síntese de compostos de interesse industrial é também relatado na literatura, como por exemplo os ácidos 2-cloro e 2-bromo-propiônicos enantiopuros usados como intermediários na síntese de herbicidas fenoxipropiônicos obtidos da butanólise enantiosseletiva pela lipase de levedura *Candida cylindracea* em solventes orgânicos anidros.

Esse processo levou à escala de multi quilogramas pela indústria Chemie Linz AG (Áustria), contudo, é termodinamicamente impraticável, bem como, promove a racemização quando realizado em meio aquoso (23).

Schering-Plough sintetizou centenas de quilogramas do agente antifúngico SCH56592 tipo triazol, realizando uma acetilação altamente estereosseletiva de um diol em acetonitrila usando CAL-B (24) (**Esquema 1.2**).

Esquema 1.2. Acetilação regiosseletiva do composto diol utilizado como intermediário da síntese do agente antifúngico SCH565992 catalisada pela CAL-B.



Fonte: Dodds et al. (24)

Geralmente é estudada a influência da água como co-solvente no desempenho da reação enzimática, tanto em relação ao rendimento quanto à estereosseletividade. Há uma quantidade crítica de água necessária que atua como "lubrificante molecular" influenciando na flexibilidade/conformação da enzima e pode conduzir a um aumento da atividade catalítica em solventes não aquosos (18).

Na reação entre o 4-nitrobenzaldeído e a cicloexanona catalisada por PPL foi estudado o conteúdo ótimo de água em resposta ao rendimento (**Figura 1.2**) (25). Os resultados mostraram que o sítio ativo da PPL foi muito sensível à presença de água. As variações no rendimento, na diastereosseletividade e enantiosseletividade mostraram uma tendência similar com o incremento no conteúdo de água. Os valores de excesso enantiomérico e diastereosseletividade tiveram um máximo quando o conteúdo de água foi 5% (v/v). Foi observado um rendimento superior a 95%, uma diastereosseletividade *anti:syn* de 87:13 e um *ee* de 80% para o produto de adição aldólica (25).



Figura 1.2. Efeito do conteúdo de água na reação aldólica entre a cicloexanona e o 4-nitrobenzaldeído catalisada por PPL(25)(25)(25)(25).

Condições de reação: 4-nitrobenzaldeído (0,1 mmol), cicloexanona (1 mL), PPL (10 mg) e, água deionizada (37 °C, 24 h). Rendimento, *ee* e dr foram determinados por HPLC. Fonte: Xie *et al.* (2013)(25).

1.1.3.2 Influência do pH

O estado de protonação dos aminoácidos do sítio ativo é resultado do pH do meio, e influencia diretamente na sua função catalítica. Assim, as enzimas catalisam com maior desempenho as reações em uma faixa de pH que corresponde a seu ambiente nativo. Mas, quando o pH é alterado, a enzima apresenta mudanças conformacionais provocadas pelas novas interações geradas. Como consequência a atividade catalítica da enzima pode ser alterada.

Portanto, é importante realizar os estudos de variação de pH quando se utiliza enzimas, com o objetivo de determinar o seu pH ótimo. Por exemplo, a Lipase Pancreática Bovina (BPL, do inglês: *Bovine Pancreatic Lipase*) catalisou a reação aldólica cruzada em tampão fosfatocitrato [Na₂HPO₄/NaH₂PO₄ – (HCO₂CH₂)₂C(OH)CO₂H] entre o 4-nitrobenzaldeído e a cicloexanona, em uma faixa de pH's entre 4,0–8,0. Obteve-se melhores rendimentos do produto aldol em pH próximo de 8 (**Tabela 1.1**).

No entanto, as diastereosseletividades e enantiosseletividades foram melhores em pH's ácidos entre 4,6 e 5,6. Assim, esta reação foi realizada em pH 5,6 a 37°C com diferentes aldeídos e a cicloexanona. A melhor diastereosseletividade foi para o produto aldol *anti:syn*

(96:4) quando utilizou o 2,6-diclorobenzaldeído como reagente; e diastereosseletividade *anti:syn* (66:33) quando se utilizou o 3-nitrobenzaldeído e o 4-triflúor-benzaldeído (26).

Tabela 1.1. Efeito do pH na reação aldólica entre o 4-nitrobenzaldeído e a cicloexanona catalisada pela BPL.

| O ₂ N H | + | BPL O ₂ N | OH O \downarrow + O_2N | OH O |
|--------------------|-----|----------------------|-------------------------------|--------|
| | | ant | 1 | syn |
| Entrada | pН | (%) | rd. | ee (%) |
| 1 | 4.0 | 18 | 55:45 | 33 |
| 2 | 4,6 | 35 | 62:38 | 43 |
| 3 | 4,8 | 41 | 63:37 | 45 |
| 4 | 5,0 | 48 | 63:37 | 46 |
| 5 | 5,2 | 53 | 64:36 | 46 |
| 6 | 5,4 | 57 | 64:36 | 46 |
| 7 | 5,6 | 65 | 63:37 | 45 |
| 8 | 5,8 | 70 | 61:39 | 42 |
| 9 | 6,0 | 77 | 59:41 | 38 |
| 10 | 6,4 | 81 | 57:43 | 33 |
| 11 | 7,0 | 88 | 51:49 | 10 |
| 12 | 8,0 | 91 | 48:52 | 2 |

rd = razão diastereoisomérica, BPL= Lipase Pancreática Bovina

1.1.3.3 Temperatura

A temperatura é um fator que geralmente influencia a reação enzimática, pois é um parâmetro termodinâmico importante que afeta o equilíbrio das reações. Quando o catalisador é uma enzima a faixa de temperatura que pode ser testada não é muito ampla, e em geral, temperaturas elevadas conduzem a uma perda de atividade e consequentemente no rendimento das reações e nas enantiosseletividades dos produtos (27).

O solvente influencia na estabilidade térmica da enzima. Quando se utiliza a água, há uma maior probabilidade de ocorrer reações competitivas que podem prejudicar a estrutura da enzima, como a desaminação de resíduos de asparagina e glutamina, β -eliminação de resíduos de cisteína, oxidação de cisteína ou a hidrólise de ligações peptídicas (28).

Alguns estudos relataram que a estabilidade térmica de lipase de pâncreas de porco, ribonuclease e α-quimiotripsina a 100 °C apresentaram tempos de meia-vida de várias horas em solventes anidros. Quando foi usada água essas enzimas foram desativadas em segundos a

essa temperatura. A rigidez induzida pelo solvente orgânico conferiu estabilidade térmica à enzima (28).

Geralmente as reações em altas temperaturas aumentam o rendimento em detrimento da seletividade devido à influência na diferença de energia livre de ativação $\Delta\Delta G$ (29). Por exemplo, a reação aldólica entre o 4-nitro-benzaldeído e a cicloexanona catalisada por PPL (**Figura 1.3**) mostrou uma variação no rendimento, na diastereosseletividade e na enantiosseletividade de acordo com a mudança de temperatura de 20 a 50 °C (25).

Figura 1.3. Efeito da temperatura no rendimento da reação entre o 4-nitrobenzaldeído e a cicloexanona catalisada por PPL.



Condições de reação: 4-nitrobenzaldeído (0,1 mmol), PPL (10 mg), cicloexanona (950 mL), água deionizada (50 mL), 24 h de reação. Fonte: Xie et al. (25).

1.1.4 Reação aldólica

A reação aldólica é um dos métodos mais usuais para a formação de ligações carbonocarbono em síntese orgânica (30). Trata-se de uma reação onde são usados compostos carbonílicos que atuam como nucleófilos em forma de enolatos (doadores) e eletrófilos (aldeídos ou cetonas como aceitadores), para formar o produto β -hidroxi-aldeído ou β -hidroxicetona. O aduto aldol pode sofrer desidratação para formar um composto carbonílico α,β insaturado.

A combinação dos dois processos, a adição aldólica e a desidratação subsequente é chamada de condensação aldólica. Quando esta reação procede em condições de temperaturas mais elevadas, pode fornecer uma mistura de produtos de adição e condensação (30). Produtos

de auto-condensação podem ser formados, mas isto pode ser evitado com a seleção de cetonas enolizáveis e aldeídos não enolizáveis, ou vice-versa.

A reação aldólica é catalisada por ácidos, tanto de Lewis como de Brønsted, bem como por bases. Quando a reação é catalisada por ácidos ocorre a protonação do oxigênio da carbonila eletrofílica, deixando o carbono mais reativo e favorecendo o ataque do enol, proveniente do tautomerismo cetoenólico, devido à diminuição da energia do orbital molecular de fronteira LUMO (31). O produto aldol formado encontra-se na sua forma neutra e protonada em virtude do equilíbrio em meio ácido (**Esquema 1.3A**).

Na catálise básica é favorecida a formação de um íon enolato como consequência da acidez dos α -hidrogênios à carbonila abstraídos pela base. Na segunda etapa ocorre a adição nucleofílica do íon enolato ao carbono carbonílico de uma outra molécula, gerando um intermediário alcóxido, o qual captura um próton do médio básico que leva à formação do produto aldol (**Esquema 1.3B**).

Esquema 1.3. Ilustração simplificada do mecanismo da reação aldólica catalisada por (**A**) ácido e (**B**) base.



A adição do íon enolato à carbonila gera um centro estereogênico (**Esquema 1.3**). A estereoquímica do ataque nucleofílico pode ser controlada usando reagentes indutores de quiralidade, os quais podem fazer parte da estrutura do catalisador ou estarem ligados covalentemente ao íon enolato.

Algumas abordagens empregaram a reação *aldólica indireta*, ou seja, o uso de um íon enolato já pré-formado em combinação com o composto carbonílico aceitador e um catalisador quiral. Tipicamente, um metal está envolvido no mecanismo de reação, com a exceção de reações aldólicas tipo Mukaiyama catalisadas por base de Lewis (32,33).

Na abordagem da reação *aldólica direta* forma-se o íon enolato na presença do composto carbonílico aceitador e o catalisador quiral em uma única etapa reacional. Existem enzimas que participam da aldolização assimétrica na formação do íon enolato e como catalisadores quirais permitindo a reação *aldólica direta*, isto é devido ao fato das enzimas conterem resíduos de aminoácidos básicos no seu sítio ativo que podem realizar uma catálise via enamina; ou resíduos de aminoácidos ácidos que ativam o aldeído ao ataque nucleofílico por ligação de hidrogênio (31).

1.1.4.1 Biocatalisadores para reação aldólica

No interior das células dos organismos vivos, o metabolismo de carboidratos depende de enzimas chaves como as aldolases. As aldolases são essenciais na via glicolítica, por exemplo a *D*-frutose-6-fosfato aldolase (FSA) catalisa a clivagem da frutose/tagatose 1,6-bisfosfato em diidroxiacetona (DHA) e gliceraldeído 3-fosfato (GA3P), uma reação retroaldólica, mas também catalisam a reação reversa estereosseletiva (**Esquema 1.4**) (34).

Esquema 1.4. Reação retroaldólica da *D*-frutose 6-fosfato catalisada pela *D*-frutose-6-fosfato aldolase.



Fonte: Fessner et al. (34).

Outras aldolases reagem em vias de degradação de xenobióticos aromáticos, como as 4hidroxi-2-oxopentanoato aldolases dependentes de piruvato BphI e HpaI. A BphI catalisa a clivagem da ligação de 4-hidroxi-2-oxopentanoato a acetaldeído e a piruvato, sendo seletiva para o estereoisômero S e, a clivagem de 4-hidroxi-2-oxo-1,7-heptanedioato a piruvato e a semialdeído succínico (**Esquema 1.5**) (35).



Esquema 1.5. Reações catalisadas pelas 4-hidroxi-2-oxopentanoato aldolases, BphI e HpaI.

Fonte: Fessner et al. (34).

No sítio ativo estão presentes aminoácidos básicos como L-lisina (aldolases da classe I), (**Esquema 1.6A**) cuja cadeia lateral contendo o grupo amino permite a formação de um íon imínium – intermediário (A) o qual é desprotonado por algum outro resíduo de aminoácido básico para formar a enamina (B). Posteriormente, a enamina promove um ataque nucleofílico à carbonila e forma um outro íon imínium (C). Finalmente, por uma reação de hidrólise desligase da lisina e fornece o produto aldólico (D) (31).

Esquema 1.6. (A) Mecanismo de reação de aldolases classe I. (B) Mecanismo de reação de aldolases classe II.



Fonte: Mukherjee et al. (31).
As aldolases da classe II, encontradas em bactérias e fungos, requerem um cofator metálico, geralmente íons Zn^{2+} , mas são encontrados também Fe^{2+} , Co^{2+} ou Cd^{2+} (36), que promove a enolização do substrato doador e encontra-se ligado aos resíduos de histidina presentes no sítio ativo atuando como um ácido de Lewis (5) (**Esquema 1.6B**).

A maioria das aldolases podem aceitar uma ampla variedade de substratos aldólicos eletrofílicos, apesar de tolerarem poucas modificações estruturais no doador, como o aumento da cadeia alquílica na DHA para o hidroxietanal e para a 1-hidroxi-2-butanona, e modificações isostéricas, por exemplo, a substituição de um -OH por -OCH₃ na DHA (34). Assim, elas são classificadas de acordo com a especificidade do doador, como exemplificadas na **Tabela 1.2**.

| Especificidade | Doador | Produto ^[a] | Exemplo |
|----------------------------------------------|---------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Piruvato Oxaloacetato ou 2-oxobutirato | о Соон ноос Соон | $ \begin{array}{c} OH & O \\ R_4 & COOH \\ OH & O \\ R_4 & COOH \\ OH & O \\ R_4 & COOH \\ R_4 & COH \\ R_4 & COH \\ R_4 & COH \\ R_4 & CO$ | Ácido <i>N</i> -acetilneuramínico aldolase Macrofomato sintase (MPS) ^[b] SanM aldolase |
| | | | |

Tabela 1.2. Classificação das aldolases segundo a especificidade do seu substrato doador.

| Diidroxiacetona fosfato (DHAP) | HO PO32- | OH O R ₄ OH OPO ₃ ²⁻ | FruA, RhuA, FucA e TagA ^[c] aldolases |
|----------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------|
| Diidroxiacetona (DHA) Análogos não fosforilados | $\begin{array}{c} O\\ HO \\ R_1 \end{array} R_1 = H, CH_2OH, CH_3, \\ CH_2CH_3 \end{array}$ | R_4 R_1 R_1 R_1 | D-fructose-6-fosfato aldolase |
| Glicina Alanina | $ \begin{array}{c} $ | $R_{4} \overset{OH}{\underset{R_{2}}{\overset{OH}{\overset{OH}{\overset{OH}{\overset{OH}{\overset{OH}{\overset{OH}{\overset{OH}{\overset{OH}{\overset{OH}{\overset{OH}{\overset{OH}{\overset{OH}{\overset{OH}{\overset{OH}{\overset{OH}{\overset{OH}{\overset{OH}{\overset{OH}{\overset{OH}{\overset{OH}{\overset{OH}{\overset{OH}{\overset{OH}{\overset{OH}{\overset{OH}{\overset{OH}{\overset{OH}{\overset{OH}{\overset{OH}{\overset{OH}{\overset{OH}{\overset{OH}{\overset{OH}{\overset{OH}{\overset{OH}{\overset{OH}{\overset{OH}{\overset{OH}{\overset{OH}{\overset{OH}{\overset{OH}{\overset{OH}{\overset{OH}{\overset{OH}{\overset{OH}{\overset{OH}{\overset{OH}{\overset{OH}{\overset{OH}{\overset{OH}{\overset{OH}{\overset{OH}{\overset{OH}{\overset{OH}{\overset{OH}{\overset{OH}{\overset{OH}{\overset{OH}{\overset{OH}{\overset{OH}{\overset{OH}{\overset{OH}{\overset{OH}{\overset{OH}{\overset{OH}{\overset{OH}{\overset{OH}{\overset{OH}{\overset{OH}{\overset{OH}{\overset{OH}{\overset{OH}{\overset{OH}{\overset{OH}{\overset{OH}{\overset{OH}{\overset{OH}{\overset{OH}{\overset{OH}{\overset{OH}{\overset{OH}{\overset{OH}{\overset{OH}{\overset{OH}{\overset{OH}{\overset{OH}{\overset{OH}{\overset{OH}{\overset{OH}{\overset{OH}{\overset{OH}{\overset{OH}{\overset{OH}{\overset{OH}{\overset{OH}{\overset{OH}{\overset{OH}{\overset{OH}{\overset{OH}{\overset{OH}{\overset{OH}{\overset{OH}{\overset{OH}{\overset{OH}{\overset{OH}{\overset{OH}{\overset{OH}{\overset{OH}{\overset{OH}{\overset{OH}{\overset{OH}{\overset{OH}{\overset{OH}{\overset{OH}{\overset{OH}{\overset{OH}{\overset{OH}{\overset{OH}{\overset{OH}{\overset{OH}{\overset{OH}{\overset{OH}{\overset{OH}{\overset{OH}{\overset{OH}{\overset{OH}{\overset{OH}{\overset{OH}{\overset{OH}{\overset{OH}{\overset{OH}{\overset{OH}{\overset{OH}{\overset{OH}}{\overset{OH}{\overset{OH}{\overset{OH}{\overset{OH}}{\overset{OH}{\overset{OH}{\overset{OH}}{\overset{OH}{\overset{OH}}{\overset{OH}}{\overset{OH}}{\overset{OH}{\overset{OH}}{\overset{OH}}{\overset{OH}}{\overset{OH}{\overset{OH}}{\overset{OH}{\overset{OH}{\overset{OH}{\overset{OH}{\overset{OH}}{\overset{OH}{\overset{OH}}{\overset{OH}}{\overset{OH}}}{\overset{OH}}{\overset{OH}}}}}}}}}}}}}}}}}}}}}}}}}}}}}}}}}}$ | D,L-treonina aldolases |
| Acetaldeído | $R_{3} \xrightarrow{O} R_{3}$ $R_{3} = H, CH_{3}$ | R_4 R_3 R_3 R_3 | 2-deoxi-D-ribose-5-fosfato aldolase (DERA) |

[a] No produto o substituinte R_4 pode ser um grupo alquila cíclico ou acíclico, poliidroxilados ou heteroaromáticos. Para maiores detalhes consultar o artigo de revisão de Clapés et al. (35) [b] Não é uma reação natural de macrofomato sintase. [c] *D*-Frutose-1,6-bisfosfato aldolase, L-rhamnulose-1-fosfato aldolase, L-fuculose-1-fosfato aldolase e *D*-tagatosa-1,6-bisfosfato aldolase. A enzima macrofomato sintase (MPS, EC 4.1.2.X) do fungo *Macrophoma commelinae* foi investigada por Serafimov et al. (37). Trata-se de uma aldolase dependente de piruvato, originalmente catalisou as transformações de Diels–Alder de 2-pironas a macrofomato, mas também foi obtido o γ -hidroxi- α -cetoácido através de adição aldólica entre o oxaloacetato e o gliceraldeído protegido (**Esquema 1.7A**).

A reação consistiu na formação de um enolato-piruvato por descarboxilação de oxaloacetato, o qual reagiu com o gliceraldeído protegido e o benzaldeído para fornecer os produtos γ -hidroxi- α -cetoácidos derivados do oxaloacetato, com rendimento de 74% e diastereosseletividade *anti:syn* de 8:1 (**Esquema 1.7A**) e excesso enantiomérico de 44% (**Esquema 1.7B**) (37). Hilvert et al. (38) também investigaram a atividade aldolase da enzima MPS na obtenção de derivados de 3-desoxi-açúcares contendo de 3 a 6 carbonos. A enzima foi tolerante aos substratos contendo diferentes tipos de grupos protetores (éter, acetal, alil, benzil, silíl éter e éster) (**Esquema 1.8**).

Esquema 1.7. Síntese de γ -hidroxi- α -cetoácidos derivados do oxaloacetato via reação aldólica promíscua catalisada por macrofomato sintase.



Condições de reação: aldehyde (0,5 mL de solução de aldeído 1M em CH₃CN), oxoloacetato (0,42 mmol), MPS (5μ M) em 17 mL de buffer fosfato 50 mM, MgCl₂ 5mM, 7h. Fonte: Serafimov et al. (37).

Hilvert et al. (38) também investigaram a atividade aldolase da enzima MPS na obtenção de derivados de 3-desoxi-açúcares contendo de 3 a 6 carbonos. A enzima foi tolerante aos substratos contendo diferentes tipos de grupos protetores (éter, acetal, alil, benzil, silíl éter e éster) (**Esquema 1.8**).



Esquema 1.8. Síntese de derivados de açúcares por reação aldólica promíscua catalisada por MPS.

Condições de reação: aldehyde (0,5 mL de solução de aldeído 1M em CH₃CN), oxoloacetato (0,42 mmol), MPS (5 μ M) em 17 mL de buffer fosfato 50 mM, MgCl₂ 5mM, 7h. Fonte: Serafimov et al. (37)Fonte: Hilvert et al. (38).

Apesar dessas enzimas serem eficientes para catalisar a reação aldólica nas condições fisiológicas e sua elevada especificidade de substrato doador (íon enolato), contudo apresentam disponibilidade limitada que as tornam pouco utilizáveis em síntese orgânica. Apenas algumas são aplicadas em biocatálise, como na produção de intermediários na síntese de estatinas por variantes da enzima DERA (3,5,39) e do ácido siálico pela enzima KDO aldolase, uma variante da enzima ácido *N*-acetilneuramínico aldolase (5,12) (**Figura 1.4**). Portanto, a maioria das aldolases são ainda pouco aplicadas em larga escala devido às suas limitações e complexidades.





Fonte: Autoria própria

Além da família das aldolases, dendrímeros peptídicos sintéticos, anticorpos catalíticos, catalisadores de RNA, compostos de peptídeos, bem como, outras enzimas selvagens ou modificadas com funções completamente diferentes, têm sido aplicadas na formação de ligações carbono-carbono (35).

1.1.4.2 Enzimas promíscuas com atividade aldolase

Nas últimas duas décadas tem aumentado o número de estudos com biocatalisadores promíscuos da reação aldólica. Entre estes, as hidrolases as quais possuem ampla especificidade pelo substrato, enantio e regiosseletividade, bem como pela aplicação industrial em biotransformações (40).

Entre as hidrolases, destacam-se as lipases (EC 3.1.1.3, triacilglicerol lipases) como enzimas promíscuas, por terem se mostrado úteis em transformações diferentes ao metabolismo de lipídeos, função que realizam em condições fisiológicas. São as enzimas mais amplamente utilizadas em síntese orgânica via resolução cinética de compostos racêmicos. Isto se deve ao elevado número de preparações comerciais, a sua ampla tolerância aos substratos e a sua boa estabilidade em meios contendo solventes orgânicos quando comparada relativamente a outras enzimas (13). Elas foram descritas com maiores detalhes na **Seção 1.1.4.3**.

Outras enzimas que têm sido relatadas com atividade aldólica promíscua são listadas na **Tabela 1.3**. Entre estas estão as lipases (Entradas 1-5, **Tabela 1.3**) e serino proteases (Entradas 6-7, **Tabela 1.3**), as quais possuem um sítio catalítico similar, contendo o mesmo aminoácido nucleofílico da tríade catalítica, serina (Ser). Os rendimentos para estas enzimas foram muito variados desde 28% até 99% frente à reação aldólica entre aldeídos aromáticos substituídos e cetonas cíclicas.

A quimiopapaína e a ficina classificadas como cisteína proteases (Entradas 8 e 9, **Tabela 1.3**), forneceram rendimentos para os produtos aldólicos de 23 e 39%, respectivamente. As proteases de *Aspergillus usamii* e *Aspergillus melleus* que possuem na sua tríade catalítica o aspartarto (Entradas 10 a 12, **Tabela 1.3**), apresentaram rendimentos para os produtos aldólicos de 29 a 63%. A reação catalisada pela nuclease P1 de *Penicillium citrinum*, uma endonuclease dependente de zinco, cuja reação nativa é a clivagem de RNA de fita simples e DNA em 5-mononucleotídeo, forneceu os produtos aldólicos *anti* e *syn* em 25%. Em geral houve uma diastereosseletividade preferencial para o aldol-*anti* para todas as enzimas mencionadas (**Tabela 1.3**).

Na literatura também foi descrito o uso de anticorpos catalíticos com funcionalidade do tipo amino que mimetizam as aldolases, possibilitando a introdução de novas funções ao *scalfold* de proteínas já existentes e aumentando a habilidade de aceitar uma ampla faixa de substratos (41).

| | R ₁ | 0 + (| O enzima solvente | OH O R ₂ + anti | OH R1 syn | O R ₂ | |
|---------|-------------------|----------------|-------------------------|--------------------------------------|--------------|----------------------------|------|
| Entrada | \mathbf{R}_1 | \mathbf{R}_2 | Enzima | Solvente | Rend. (%) | rd. (<i>anti:syn</i>) | Ref. |
| 1 | $2-NO_2$ | N-Boc | PPL-II | MeCN/H ₂ O | 36 | 53:47 | (42) |
| 2 | $4-NO_2$ | 0 | PPL-II | MeCN/ H ₂ O | 56 | 38:62 | (42) |
| 3 | 3-NO ₂ | CH_2 | BPL | Cihex ^a /H ₂ O | 91 | 72:28 | (26) |
| 4 | 4-F | CH_2 | PPL | Cihex ^a /H ₂ O | 75 | 88:12 | (25) |
| 5 | 4-Br | CH_2 | PPL | Cihex ^a /H ₂ O | 99 | 88:12 | (25) |
| 6 | 4-Me | CH_2 | BLAP ^b | DMSO/ H ₂ O | 28 | 70:30 | (43) |
| 7 | $4-CF_3$ | CH_2 | Tripsina | H_2O | 34 | 59:41 | (44) |
| 8 | 4-Me | CH_2 | Quimiopapaína | MeCN/ H ₂ O | 23 | 63:37 | (45) |
| 9 | 3-NO ₂ | CH_2 | Ficina | MeCN/ H ₂ O | 39 | 86:14 | (46) |
| 10 | 3-Cl | CH_2 | AUAP ^c | MeCN/ H ₂ O | 29 | 92:8 | (47) |
| 11 | $4-NO_2$ | CH_2 | AUAP ^c | MeCN/ H ₂ O | 63 | 83:17 | (47) |
| 12 | 2-NO2 | CH_2 | AMP^d | MeCN/ H ₂ O | 52 | 92:8 | (48) |
| 13 | 4-Me | CH_2 | Nuclease p1 | H_2O | 25 | 80:20 | (49) |

Tabela 1.3. Promiscuidade catalítica de algumas enzimas na reação aldólica para a reação entre derivados de benzaldeído e de cicloexanona.

^a BLAP = Protease alcalina de *Bacillus licheniformis*, ^b Cihex = cicloexanona, ^c AUAP = Protease acídica de *Aspergillus usamii*, ^d AMP = Protease de *Aspergillus melleus*, rd. = razão diastereoisomérica (50).

1.1.4.3 Lipases

As lipases possuem uma composição de folha β central hidrofóbica, que consiste em oito cadeias β diferentes ligadas a seis α -hélices. Este arranjo de sua estrutura terciária é chamado dobramento α/β -hidrolase (51). O sítio ativo é formado por uma tríade catalítica de resíduos de L-serina (Ser), L-aspartato (Asp) (ou glutamato) e L-histidina (His), uma cavidade de oxiânion, e na maioria dos casos uma "tampa" hidrofóbica formada por uma α -hélice que cobre o local do sítio ativo da enzima (*loop*) (27). A **Figura 1.5** mostra os dobramentos α/β -hidrolase da CAL-B.





Fonte: Klahn et al. (2011)(52).

Em emulsões aquosas as lipases hidrolisam ésteres com diferentes estruturas de grupos acilas e cadeias alquílicas (51). A principal reação catalisada por lipases é a hidrólise de triacilgliceróis (TG) liberando ácidos graxos, diacilgliceróis (DG), monoglicerídeos (MG) e glicerol (**Esquema 1.9**).

Esquema 1.9. Reação de hidrólise catalisada por lipases.



Fonte: Benito-Gallo et al. (53)

O mecanismo de reação das enzimas hidrolíticas envolve a participação do oxiânion e uma tríade catalítica (**Esquema 1.10**). No primeiro passo, o nitrogênio básico do par Asp-His promove a transferência de um próton, enquanto a Ser assistida pelo par Asp-His atua como um nucleófilo, formando um intermediário tetraédrico (não mostrado), o qual libera uma molécula de álcool. Nessa etapa é formado um intermediário acil-enzima, o qual no segundo passo é hidrolisado pelo ataque nucleofílico de uma molécula de água, formando um intermediário tetraédrico (não mostrado). É liberada uma molécula de ácido carboxílico e reestabelecida a protonação inicial dos aminoácidos da tríade catalítica, que ficarão disponíveis para iniciar um novo processo catalítico (17).



Esquema 1.10. Mecanismo geral da hidrólise de ésteres catalisada por lipases.

Fonte: Faber, K et al. (17).

Quando as condições de reação e os substratos são diferentes dos naturais, os espectros de reações catalisadas por lipases aumentam consideravelmente. As lipases também catalisam reações não usuais de serem realizadas em meios aquosos como esterificação, transesterificação, interesterificação e poliésterficação, ou a transferência de grupos acilas a nucleófilos como aminas, oximas e tióis (54).

O espectro de reações que catalisam algumas lipases promíscuas também inclui a formação de ácidos peroxicarboxílicos, epoxidação de compostos insaturados em condições suaves, formação de ligações C-C como reações aldólicas, adições de Michael ou reações de Mannich (54).

Em relação a sua seletividade, as lipases são conhecidas pela sua estereosseletividade frente às reações que catalisam. Isto torna possível obter enantiômeros puros de muitas substâncias que por sua vez podem ser empregadas na síntese de moléculas mais complexas com atividade biológica. Por exemplo a hidrólise de (\pm)-butirato de glicidila pela PPL para obter o (*R*)-glicidol com 92% de rendimento e 92% de *ee*, o qual pode ser utilizado como intermediário na síntese de β -adrenobloqueadores, como o propanolol (**Esquema 1.11**) (54).



Esquema 1.11. Hidrólise enantiosseletiva de butirato de glicidila pela PPL.

Fonte: Eremeev et al. (54).

Uma das lipases mais amplamente estudada e com aplicações industriais é a de *Candida antarctica* B (CAL-B), também conhecida como lipase B de *Pseudozyma antarctica*, a qual possui boa estabilidade em solventes orgânicos apolares a elevadas temperaturas (70-90 °C) assim como um escopo amplo de substratos para reações de acilação e de trans-acilação quando a água é substituída por um nucleófilo apropriado (15). É o caso de reações de aminólise e amoniólise (55).

CAL-B também pode catalisar outros tipos de reações que procedem através de mecanismos e geometrias de estados de transição diferentes aos normalmente estabelecidos, como as adições aldólicas, as adições conjugadas, epoxidação de alcenos, reações de Mannich e adições Markovnikov, sendo exemplos de promiscuidade catalítica, pois a enzima nativa catalisa reações diferentes às quais geralmente realiza *in vivo* (16).

A promiscuidade catalítica nas lipases é favorecida em grande parte devido à cavidade oxiânion. Na reação uma função importante é polarização da ligação dupla da carbonila do éster deixando o carbono susceptível ao ataque nucleofílico da Ser (**Figura 1.6A**) (14).

As serino hidrolases contêm em seu sítio ativo também um resíduo de Ser, que atua como um importante nucleófilo na clivagem de ligação do tipo éster. Mas, quando é realizada uma mutação pontual, substituindo a Ser do sítio ativo, por um outro aminoácido menos polar, abre a possibilidade para novos tipos de reações, como a adição aldólica (**Figura 1.6B**) e a adição Michael (**Figura 1.6C**) (14).

Figura 1.6. Interação do oxiânion em enzimas hidrolíticas: atividades nativa (A) e promíscuas (B e C).



Fonte: Hult et al. (14).

CAL-B foi a primeira lipase relatada com atividade aldolase promíscua por Berglund et al. (41) em 2003. Esta enzima catalisou a reação de aldeídos simples como hexenal ou propanal e acetona, porém em longos tempos reacionais (50 dias). A CAL-B mutante Ser105Ala promoveu um aumento da atividade aldolase em comparação à CALB nativa, devido a ausência na formação do hemiacetal. Enquanto na presença da enzima nativa ocorre a formação do intermediário hemicetálico via ataque nucleofílico da serina ao substrato carbonílico, o qual é estabilizado pelas ligações de hidrogênio na cavidade oxiânion (**Esquema 1.12**) (41).

Esquema 1.12. Formação do hemicetal e sua estabilização nas lipases selvagens na presença de substratos carbonílicos.



No entanto, apesar de ter sido descrita a atividade promíscua aldolase para outras enzimas, somente em 2008 foi observada a estereosseletividade para a reação aldólica. A reação entre 4-Nitrobenzaldeído e acetona catalisada por PPL foi moderadamente enantiosseletiva (**Esquema 1.13**) (56). O produto aldol foi obtido com excesso enantiomérico de 44%, porém em baixo rendimento (12%). O incremento no conteúdo de água em 20% elevou o rendimento para 56%, afetando a enantiosseletividade, a qual decresceu para 16% de excesso enantiomérico.

Esquema 1.13. Reação aldólica promíscua entre o 4-nitrobenzaldeído e a acetona catalisada por PPL em presença de água.



Condições de reação: lipase (20 mg), 4-nitrobenzaldeído (0,12 mmol), acetona (1 mL), água deionizada (0,25 mL) temperatura (30 °C) (56).

A PPL também catalisou a reação entre o 4-nitrobenzaldeído e a cicloexanona em presença de água (10% v/v) e foi obtido um rendimento de 80% para o produto aldol (24 h, 37°C), diastereosseletividade *anti:syn* de 85:15 e um excesso enantiomérico de 77% para o diastereoisômero *anti*. A mesma reação na presença de líquido iônico [BMIM][PF₆] forneceu o produto aldol com rendimento de 93%, diastereosseletividade *anti:syn* de 91:9 e um excesso enantiomérico de 85% para o diastereoisômero *anti* (57).

Em geral, as reações aldólicas catalisadas por enzimas promíscuas forneceram bons rendimentos na maioria dos casos, porém acompanhados de excessos enantioméricos baixos. Em contrapartida, quando foram obtidos excessos enantioméricos elevados, os rendimentos foram baixos. Por exemplo, a reação aldólica promovida pela protease *Bacillus licheniformis* (BLAP) (43) e a nuclease P1 de *Penicillium citrinum* (49) forneceram excessos enantioméricos superiores a 99% quando os substratos foram a cicloexanona e o 4-metilbenzaldeído. Porém, com rendimento para os produtos aldólicos *anti* e *syn* foram de 28% e 25% para BLAP e nuclease P1, respectivamente.

Apesar disso, existem algumas exceções a esta característica geral, como o caso da reação entre 4-F-benzaldeído ou 4-Br-benzaldeído e a cicloexanona catalisada pela PPL. A reação forneceu um rendimento de 75%, diastereosseletividade *anti:syn* de 88:12 e excesso enantiomérico de 90% quando o substrato foi o 4-flúor-benzaldeído. Quando o substrato foi 4-bromo-benzaldeído o rendimento foi de 99%, a diastereosseletividade *anti:syn* de 88:12 e *ee* de 87% (*anti*) (50).

O escopo de substratos estudados na reação aldólica biocatalisada por lipases inclui cetonas cíclicas, heterocíclicas e alicíclicas, e como substratos aceitadores aldeídos aromáticos. A reação entre piperidin-4-ona *N*-Boc e o 4-nitrobenzaldeído em CH₃CN/H₂O catalisada por PPL-II (**Esquema 1.14**), forneceu um rendimento de 49%, diastereosseletividade *anti:syn* de 62:38 e excesso enantiomérico para o aldol *anti* de 62% (42). A mesma reação catalisada pela lipase de *Aspergillus niger* (Amano) forneceu um rendimento de 26%, diastereosseletividade *anti:syn* de 40:60 e excesso enantiomérico de 13% para o diastereoisômero *anti*. Enquanto para as lipases de *Candida rugosa* (LCR) e de *Rhizopus niveus* (LRN), não foram observadas atividades aldolases com estes substratos. Com a Albumina de Soro Bovino (BSA, do inglês *Bovine Serum Albumin*), uma proteína não enzimática, foi obtido um rendimento de 43%, diastereosseletividade *anti:syn* de 37:67 e excesso enantiomérico de 5% para o diastereoisômero *anti*.



Esquema 1.14. Atividade catalítica promíscua de PPL II para a reação aldólica.

Condições de reação: *N*-Boc-4-cetopiperidina (0,25 mmol), 4-nitrobenzaldeído (0,50 mmol), PPL II (50 mg), 1 mL de mistura de solventes $[H_2O/(H_2O+CH_3CN) = 1:10, v/v]$ a 30 °C.

Entretanto, os estudos que descrevem a capacidade dos biocatalisadores para levar até o produto da condensação aldólica têm sido escassos. A lipase de *Mucor miehei* catalisou duas reações processo *one-pot* (50), a qual envolveu uma reação de hidrólise do acetato de vinila para formar o acetaldeído. O acetaldeído gerado *in situ* reagiu com aldeídos aromáticos que levou aos correspondentes produtos de condensação. O melhor rendimento (78%) foi obtido quando o aldeído aromático foi o 4-nitrobenzaldeído.

A enzima 4-oxalocrotonato tautomerase (4-OT) e suas formas mutantes Leu8Asp e Phe50Ala catalisaram a condensação aldólica. A presença do aminoácido prolina no sítio ativo mostrou ser essencial para a catálise (58). O mecanismo proposto neste estudo mostrou a formação de um íon imínium entre a cetona e a resíduo de Prolina (I), o qual por eliminação de um próton formou a enamina (II) a qual realizou o ataque ao benzaldeído para gerar o íon β hidroxi imínium (III). Esse intermediário III eliminou água e produziu IV, que finalmente por hidrólise formou o cinamaldeído (**Esquema 1.15**).



Esquema 1.15. Mecanismo proposto da reação de condensação aldólica catalisada por 4-OT entre o acetaldeído e o benzaldeído para produzir o cinamaldeído.

Fonte: Poelarends, G et al. (58).

1.1.4.3.1 Mecanismo catalítico para a reação aldólica promíscua por lipases

O mecanismo catalítico proposto para lipases é descrito pela interação do substrato com o sítio ativo. O **Esquema 1.16** apresenta uma proposta deste mecanismo pela PPL. Esta é uma proteína globular composta de uma cadeia simples de 449 aminoácidos, e a tríade catalítica é formada pela Ser153, Asp177 e His264 (25).

No primeiro passo o hidrogênio ácido da cicloexanona é abstraído pela His264 e consequentemente é formado o íon enolato. O grupo hidroxila do resíduo de Ser153 contribui para a estabilização do íon enolato via ligação de hidrogênio. Subsequentemente, o substrato aldeídico é ativado pelo próton do anel imidazólico de His264. Em seguida, ocorre o ataque nucleofílico do íon enolato à carbonila para formar uma ligação C-C. Finalmente, o produto aldol é liberado e o sítio ativo retorna ao seu estado conformacional natural (25).

Esquema 1.16. Mecanismo catalítico proposto e adaptado para a PPL na reação aldólica promíscua entre o 4-CN-benzaldeído e a cicloexanona.



Fonte: Xie et al. (2013) (25)

Alguns estudos de reações controles demostraram que a catálise ocorre no sítio catalítico. Nesses estudos a enzima foi inibida com fluoreto de fenilmetanossulfonila (PMSF) ou metil *p*nitrofenil-*n*-hexilfosfonato, e nenhum produto aldol foi obtido, confirmando que o sítio ativo foi necessário para a catálise da reação aldólica (43,44,59). Outros experimentos visaram desnaturar a enzima, expondo-a na presença de ureia, a qual funciona como um agente caotrópico. Assim, constatou-se que os inibidores (ureia e PMSF) não favoreceram a reação (44,45,46,48). Porém, do ponto de vista mecanístico, são necessárias mais evidências que permitam esclarecer qual o caminho que levou a estes produtos aldólicos, uma vez que as reações em muitos casos formam produtos com baixos excessos enantioméricos.

Estudos teóricos de modelagem molecular acompanhados de estudos cristalográficos para estas enzimas, poderiam contribuir para conhecer os modos de interação de lipases com os substratos em reações promíscuas.

Existem dois caminhos que envolvem esse tipo de reação, a *catálise específica* e a *catálise proteica inespecífica*. No primeiro caso as interações enzima-substrato são favorecidas por ligações de hidrogênio, interações eletrostáticas e hidrofóbicas. Possivelmente as interações hidrofóbicas têm maior contribuição para as reações promíscuas. Elas são menos dependentes da especificidade do substrato, e podem contribuir para a orientação do substrato no sítio catalítico (16).

A *catálise proteica inespecífica* levaria até os mesmos produtos através de modos de interação diferentes. Nesse caso, um conjunto de resíduos de aminoácidos, os quais não fazem parte do sítio ativo, seriam os responsáveis pela catálise. Apesar da reação não ocorrer no sítio ativo, constitui-se uma catálise promíscua.

Como mostrado no estudo realizado por Birolli et al. (60) a reação aldólica entre o 4nitrobenzaldeído e a cicloexanona pela lipase de *Rhizopus niveus* tratou-se de uma catálise proteica inespecífica nas condições empregadas. Neste caso a reação ocorreu mesmo com a enzima desnaturada em solução de ureia, em água a 100 °C e inibida com o PMSF.

No entanto, apesar do mecanismo catalítico das lipases estarem bem definidos, não há um modo de interação comprovado dos substratos no sítio ativo para a reação aldólica promíscua. Isto possibilita uma investigação para o entendimento quais aminoácidos promovem a catálise específica e/ou inespecífica.

O número de metodologias em biocatálise assimétrica deste tipo de reação ainda é limitado, apesar do progresso na área de promiscuidade enzimática especialmente na formação de ligações carbono-carbono. Os desafios devem ser focados no rastreamento sistemático de novas atividades promíscuas em enzimas existentes e explorar essa promiscuidade como ponto de partida para desenvolver novos métodos biocatalíticos enantiosseletivos para a formação de ligações carbono-carbono (35).

Além dos desafios técnicos na aplicação de biocatalisadores para a síntese, há o desafio científico. A biocatálise é um campo multidisciplinar, e o progresso requer a integração de técnicas e metodologias químicas e biológicas. Descobertas futuras e aplicações mais difundidas da biotecnologia exigem que os químicos considerem as enzimas como parte das etapas sintéticas e, da mesma forma, que os biólogos considerem as aplicações químicas das enzimas. Assim, nos grupos de síntese orgânica e biocatálise deve existir uma forte interação entre a química e a biologia, para que a biocatálise seja considerada como uma opção na concepção de estratégias sintéticas (5).

As abordagens modernas de engenharia enzimática aplicam este conhecimento para construir enzimas 'feitas sob medida' com potencial aplicação em sínteses acadêmicas e industriais. Isto constitui uma excelente aproximação entre as áreas como a química e a biologia como parte de um processo interativo que busca por um lado, aumentar o espectro de enzimas promíscuas e por outro, melhorar o potencial catalítico já existente.

A proposta desta tese foi desenvolver um trabalho explorando a atividade promíscua de lipases em reações aldólicas.

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 Objetivo geral

Estudar as reações aldólicas catalisadas por enzimas promíscuas como as lipases de pâncreas de porco tipo II e de *Rhizopus niveus*, visando a obter a síntese de aldóis em condições reacionais otimizadas em bons rendimentos e seletividades.

1.2.2 Metas

- Otimizar o rendimento da reação aldólica variando as condições experimentais, como o tipo solvente e o tempo.
- > Determinar os rendimentos e as seletividades dos produtos aldólicos.
- > Determinar a atividade enzimática nas condições de reação utilizadas.

1.3 MATERIAIS E MÉTODOS

1.3.1 Reagentes, solventes e materiais

As enzimas foram adquiridas da Sigma-Aldrich em forma de pó: lipase de pâncreas de porco tipo II (PPL-II), (30,1 U mg⁻¹, CAS 9001-62-1) e lipase de *Rhizopus niveus* (LRN) (\geq 15 U mg⁻¹, CAS 9001-62-1).

Os reagentes 4-CN-benzaldeído (95%) e a cicloexanona (98%) foram obtidos comercialmente da Sigma-Aldrich. O NaOH (P.A.) foi adquirido da Synth.

Os solventes acetato de etila (AcOEt) (P.A.) e hexano (P.A.) foram adquiridos da Synth. Os solventes grau HPLC (hexano e isopropanol) foram adquiridos da Panreac. Clorofórmio deuterado (CDCl₃, 99,8% com 0,5% TMS) e metanol deuterado (CD₃OD, 99,9%).

Todos os reagentes e solventes foram usados sem purificação prévia.

A sílica gel utilizada nas separações cromatográficas, com um diâmetro de poro de 6 nm e tamanho de partícula de 35-70 µm foi adquirida da Acros Organic. Para a cromatografia de camada delgada (CCD) foram usadas placas de sílica gel 60 com o indicador fluorescente em 254 nm da marca Macherey-Nagel. Para a cromatografia de camada delgada preparativa foram usadas placas comerciais de sílica gel 60 da marca Scientific Adsorbents Incorporate.

1.3.2 Reação aldólica entre o 4-CN-benzaldeído e a cicloexanona

Para a análise exploratória da atividade aldólica das lipases PPL-II e LRN foi estudada a reação entre o 4-CN-benzaldeído (4-CNB) e a cicloexanona (CHX) (**Esquema 1.17**).

Esquema 1.17 - Reação aldólica entre o 4-cianobenzaldeído e a cicloexanona usada como modelo na catálise pelas lipases PPL-II e LRN.



Esta reação pode fornecer como produtos principais os diastereoisômeros *anti* e *syn* com e seus respectivos enantiômeros, e como produtos secundários de condensação os diastereoisômeros CHX-*E* e CHX-*Z* (**Esquema 1.17**).

Para a obtenção dos produtos racêmicos CHX-*anti* e CHX-*syn* como padrões nas análises cromatográficas para posterior comparação com as reações enzimáticas, realizou-se a síntese racêmica usando NH₄OH, 4-CN-benzaldeído, cicloexanona e H₂O como meio de reação.

1.3.2.1 Síntese de padrões racêmicos CHX-anti e CHX-syn

Em um balão de 5 mL foram adicionados 272 mg (2 mmol, 1 eq.) de 4-CN-benzaldeído, 1036 μ L (10 mmol, 10 eq.) de cicloexanona e 518 μ L de água destilada. À mistura reacional foram adicionados 20 mol% (53 μ L) de uma solução de NH₄OH (d 0,880 g/mL, 30% v/v).

O balão foi tampado com um septo de borracha e permaneceu em agitação magnética a 60 °C. A reação foi monitorada por CCD e após 24 h a mistura de reação foi extraída em um funil de separação com adição de AcOEt (3 x 20 mL). A fase orgânica foi lavada com 20 mL de uma solução saturada de NaCl. Após extração, à fase orgânica foi adicionado Na₂SO₄ anidro, filtrou o sólido e concentrou o produto através da evaporação do solvente a pressão reduzida em rotaevaporador.

A purificação da mistura dos diastereoisômeros racêmicos CHX-*syn* e CHX-*anti* foi realizada por cromatografia em coluna (CC) usando sílica gel e uma mistura de solventes contendo hexano e AcOEt (95:5) como fase móvel em modo isocrático. O índice de retenção foi de 0,4 para o CHX-*syn* e 0,3 para o CHX-*anti*. Porém, não foi possível ter uma separação total por CC devido à sobreposição dos compostos após ser eluído uma parte do primeiro diastereoisômero (CHX-*syn*). Devido à dificuldade de purificação dos diastereoisômeros realizou-se também uma purificação por CCD. Foram aplicados em cada placa de CCD analítica quantidade inferior a 20 mg de amostras e eluídas com uma mistura de hexano e éter etílico (4:6). Em seguida retirou a amostra retida na sílica com uma espátula e colocou em um frasco béquer, adicionou 10 mL de AcOEt e deixou em ultrasson por 15 minutos. Em seguida, filtrou a sílica, removeu o solvente no rotaevaporador e analisou por RMN.

1.3.2.2 Reação aldólica biocatalisada por lipases PPL-II e LRN

Em um balão de 5 mL adicionou-se a lipase (100 mg), a cicloexanona (518,2 μ L, 5 mmol, 5 eq.), H₂O (52 μ L, 10% v/v) e o 4-cianobenzaldeído (136,134 mg, 1,0 mmol). A reação foi mantida em agitação magnética à temperatura de 35 °C ± 3 °C e 500 rpm. Foi monitorada por métodos cromatográficos, como a cromatografia em camada delgada e HPLC-UV a cada 24, 48, 72 e 96 h.

Procedimento de extração das alíquotas: A cada 24, 48, 72 e 96 h de reação foram tomadas alíquotas de 200 μ L em tubos Falcon de 15 mL. Em seguida foram adicionados 800 μ L de água destilada e 2 mL de AcOEt. A mistura foi agitada manualmente por ± 30 segundos e submetida à centrifugação a 600 rpm x 5 min. A fase orgânica foi separada com uma pipeta de Pasteur. A extração foi realizada em triplicata. A fase orgânica foi evaporada a pressão reduzida utilizando um rotaevaporador e o extrato bruto foi diluído em 5 mL de isopropanol grau cromatográfico para posterior análise em HPLC-UV (**Seção 3.3.1**).

1.3.2.3 Reação aldólica controle (branco)

A reação controle ou branco consistiu na mistura dos reagentes na mesma ordem de adição e quantidades, exceto a enzima a qual não foi adicionada. Em seguida a reação também foi mantida nas mesmas condições de tempo, agitação e temperatura, assim como a extração e a análise foram idênticas à reação catalisada (**Seção 1.3.2.2**).

1.3.3 Métodos de análise, identificação e caracterização estrutural dos produtos CHX-*anti* e CHX-*syn*

1.3.3.1 Análise por cromatografia líquida de alta eficiência

As reações catalisadas pelas lipases PPL-II e LRN foram analisadas por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC-UV) em um cromatógrafo Shimadzu2010: controlador de sistema CBM-20A, bomba LC-20AT, desgaseificador DGU-20A5, amostrador automático SIL-20AHT, forno de coluna CTO-20A e detector UV-VIS SPD-M20A. Colunas: Chiralpack AD-H da Daicel (250 mm x 4,6 mm, 5 µm) e Shim-Pack CLC-CN (150 mm x 4,6 mm, 5 µm).

Para a análise cromatográfica aquiral da reação entre o 4-CN-benzaldeído e a cicloexanona foi usada uma coluna Shim-Pack CLC-CN (150 mm x 4,6 mm, 5 μ m), um método isocrático de eluição com os solventes hexano e isopropanol (90:10), fluxo 0,5 mL/min, λ = 233 nm e tempo de análise 30 min. A análise em coluna quiral foi realizada em uma coluna Chiralpak AD-H (250 mm x 4,6 mm, 5 μ m) empregando uma fase móvel de hexano e isopropanol (90:10), fluxo 0,5 mL/min, λ = 233 nm, tempo de análise 60 min.

1.3.3.2 Obtenção de curvas analíticas para a quantificação dos produtos CHXanti e CHX-syn e o 4-cianobenzaldeído

Foram obtidas as curvas analíticas para os produtos aldol CHX-*syn* e CHX-*anti* e o 4-CN-benzaldeído dentro do intervalo de linearidade da relação entre a absorbância e a concentração. As soluções dos padrões foram analisadas no mesmo método que foi empregado para amostras descrito na **Seção 1.3.3.1**.

Para o 4-CN-benzaldeído foram preparadas soluções do padrão de 25, 100, 200, 300 e 500 ppm a partir de uma solução estoque de 2000 ppm.

Para os aldóis CHX-*syn* e CHX-*anti* foram preparadas soluções dos padrões de 25, 100, 200, 300 e 500 ppm a partir de uma solução estoque de 2500 ppm.

Os resultados médios de resposta obtidos de triplicatas para cada nível de concentração foram tratados estatisticamente, com base no modelo da regressão linear. Foram obtidos os parâmetros da equação de primeira ordem que correspondem ao coeficiente de correlação linear e a inclinação da curva (**Tabela 1.4**).

Tabela 1.4. Parâmetros das equações das curvas analíticas obtidas das análises dos padrões CHX-antie CHX-syn e para 4-cianobenzaldeído por HPLC

| Composto | Linearidade | Coeficiente angular | Intercepto | \mathbf{P}^2 |
|------------------|-------------|---------------------|------------|----------------|
| Composio | (mg/L) | (mg/L) | (mg/L) | К |
| 4-CN-benzaldeído | 0-500 | 99731 | 0,0 | 0,9989 |
| CHX-syn | 0-500 | 82400 | 0,0 | 0,9993 |
| CHX-anti | 0-500 | 82666 | 0,0 | 0,9951 |

1.3.3.3 Determinação de rendimento, diastereosseletividade e enantiosseletividade dos produtos aldólicos da reação entre o 4cianobenzaldeído e a cicloexanona catalisadas pelas enzimas PPL-II e LRN

O rendimento da reação entre o 4-cianobenzaldeído e a cicloexanona foi calculado a partir da quantidade obtida de produtos puros após a purificação por cromatografia em coluna utilizando sílica gel ou em placas analíticas por CCD. A razão diastereoisomérica foi determinada por HPLC-UV, usando uma coluna aquiral Shim-Pack CLC-CN (150 mm x 4,6 mm, 5 μ m) e calculada a partir das **Equações 1.1** e **1.2**.

Os excessos enantioméricos foram determinados a partir da diferença das áreas dos picos dos enantiômeros sobre a soma das áreas dos enantiômeros (**Equação 1.3**) obtidas dos cromatogramas por HPLC-UV quiral, usando a coluna Chiralpak AD-H da Daicel (250 mm x 4,6 mm, 5 µm).

$$rd. syn = \frac{\acute{a}rea \ syn}{\acute{a}rea \ anti + \acute{a}rea \ syn}$$

$$rd. anti = 100 - rd. syn$$

$$ee = \frac{e_{s-}e_R}{e_{s+}e_R}$$
Equação 1.3

1.3.3.2 Purificação dos produtos da reação aldólica entre o 4cianobenzaldeído e a cicloexanona catalisadas pelas enzimas PPL-II e LRN

No monitoramento das reações foi usada CCD. Na purificação dos produtos de adição aldólica (CHX-*syn* e CHX-*anti*) utilizou-se a cromatografia em coluna com sílica gel 60 como fase estacionária e empregou-se uma mistura de solventes composta de hexano e AcOEt (95:5).

1.3.3.3 Espectroscopia de ressonância magnética nuclear

A identificação estrutural dos diastereoisômeros CHX-*syn* e CHX-*anti* foi realizada por RMN de ¹H e de ¹³C.

Os dados espectroscópicos de RMN de ¹H e ¹³C foram adquiridos no equipamento marca Agilent Technologies Modelo 500/54 Premium Shielded ou modelo 400/54 Premium Shielded da Central de Análises Químicas Instrumentais (CAQI-USP). A frequência de operação foi de 400 ou 500 MHz para os núcleos de ¹H e de 100 ou 125 MHz para os núcleos de ¹³C, respectivamente.

O solvente clorofórmio deuterado (CDCl₃) contendo tetrametilsilano (TMS) foi usado para solubilizar as amostras.

Os deslocamentos químicos (δ) foram expressos em ppm e as constantes de acoplamento (*J*) em Hz. As multiplicidades dos sinais no espectro de RMN de ¹H foram designadas como: s (simpleto), d (dupleto), t (tripleto), dd (duplo dupleto), ddd (duplo dupleto), q (quarteto), m (multipleto), dentre outras.

1.3.3.4 Espectrometria de massas com ionização por electrospray

As análises de Espectrometria de Massas com Ionização por Electrospray (EM-IES) foram realizadas no Laboratório de Cromatografia do Instituto de Química de São Carlos (CROMA/IQSC-USP) pelo técnico Dr. Guilherme Miola Titato. Foi utilizado um espectrômetro de massas micrOTOF-QII da marca Daltonics (Bremen, Alemanha), equipado com dois quadrupolos e um detector de tempo de voo. Como fonte de ionização um sistema electrospray (ESI). A amostra foi introduzida por uma bomba/seringa em uma vazão de 3 μ L/min. A fonte de ionização foi usada no modo positivo e as condições de ionização foram: voltagem do cone, 4,0 kV; fluxo de gás de secagem, 8,0 L/min; pressão de nebulização de gás, 4 bar e a temperatura da fonte foi de 200 °C. O modo de aquisição de dados foi MS completo (o intervalo quadrupolo *m/z* foi definido de 50 a 3000 Da a uma taxa de 1,0 Hz) e o modo MS/MS. O processamento de dados foi realizado com software Data Analysis (versão 4.1) da Bruker Daltonics.

1.3.3.5 Medidas de rotação ótica dos enantiômeros CHX-anti e CHX-syn

As medidas de rotação ótica foram realizadas na CAQI-IQSC e adquiridas em um polarímetro Jasco modelo P-2000, equipado com lâmpada de sódio ($\lambda = 589$ nm). As amostras foram dissolvidas em CHCl₃ grau espectroscópico e as medições realizadas a 25 °C. As concentrações foram expressas em g/100 mL.

1.3.3.6 Eletroforese unidimensional de gel de poliacrilamida de dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) para as enzimas PPL-II e LRN

Esta metodologia foi realizada em colaboração com a professora Dra. Fernanda Canduri (IQSC-USP). O método foi baseado no protocolo estabelecido por Laemli (61). Em um tubo Eppendorf de 1 mL com 20 µL de uma solução de enzima em água destilada foram adicionados 20 µL de tampão Tris-HCl 100mM pH 6,8 contendo 0,2% de azul de bromofenol, 20% de glicerol, 4% (w/v) de SDS e 200 mM de mercaptoetanol. Em seguida foram aquecidos a 95 °C por 5 min antes de serem carregados em uma unidade electroforética (Bio-Rad). Amostras de 20 µL carregadas inicialmente no gel de empilhamento SDS contendo 4,5% (w/v) de poliacrilamida, passaram para o gel de resolução SDS contendo 15% (w/v) de poliacrilamida da Thermo Scientific. Foi usado tampão Tris–HCl 20 mM de pH 8,3, contendo glicina 20 mM e SDS 0,1%. A separação electroforética levou um tempo de aproximadamente 45 minutos a 100 V. As proteínas foram coradas com azul de Coomassie e descoradas em água através de lavagens sucessivas.

1.3.3.7 Determinação da atividade enzimática da PPL-II

Como o intuito de determinar a atividade da PPL-II no transcurso da reação aldólica foram retiradas alíquotas do meio de reação em determinados intervalos de tempos e realizadas as medições da atividade enzimática.

1.3.3.8 Preparação das soluções usadas na determinação da atividade enzimática

Emulsão de tributirina 30 mM

Em um balão volumétrico de 100 mL foram adicionados 907 mg (879 μ L) de tributirina (>98,5%) dissolvidos em 100 mL de tampão fosfato 5 mM (Na₂HPO₄/KH₂PO₄, pH 7,7) contendo NaCl 100 mM e 3,5% de Triton X-100. Esta mistura foi mantida sob agitação magnética a 1200 rpm durante 15 min.

Vermelho de fenol 0,02%

Em um balão volumétrico de 10 mL foram adicionados 2 mg de vermelho de fenol, os quais foram diluídos em 10 mL de tampão fosfato 5 mM (Na₂HPO₄/KH₂PO₄, pH 7,7).

Extração de alíquotas da mistura reacional e medição da absorbância

Em um balão de 10 mL foram solubilizados 0,5 mmol de 4-CN-benzaldeído em 2250 μ L de cicloexanona, e adicionado 50 mg de enzima diluída previamente em H₂O. Alíquotas de 20 μ L foram retiradas do meio reacional e diluídas em 180 μ L de tampão fosfato 5 mM (Na₂HPO₄/KH₂PO₄, pH 7,7) em tempos de 20 min, 2, 24 e 72 h para a medição da atividade enzimática. Em uma cela de quartzo foram adicionados 1850 μ L de emulsão de tributirina, 100 μ L de solução de vermelho de fenol 0,02% e 50 μ L da alíquota da reação diluída. A leitura de absorbância foi realizada em 580 nm em um espectrofotômetro Shimadzu UV-1800.

1.3.3.9 Curva analítica do ácido butírico

Em balões volumétricos de 5 mL foram preparadas soluções padrão por triplicata para as concentrações de ácido butírico de 0,3 mM; 0,6 mM; 0,9 mM; 1,2 mM e 1,5 mM a partir de diluições de uma solução estoque de ácido butírico 30 mM em emulsão de tributirina. Nas soluções padrão também foram adicionados solução de vermelho de fenol 0,02% (238 μ L) e 50 μ L da mistura reacional original (sem enzima) diluída previamente em 10 vezes em tampão fosfato 5 mM (Na₂HPO₄/KH₂PO₄, pH 7,7). O volume foi completado para 5 mL com a emulsão de tributirina. Foi obtida a equação da reta a partir das absorbâncias correspondente ás soluções padrão (**Equação 1.4**).

$$Abs = -0.1247Conc + 0.2328$$
 ($R^2 = 0.9178$) Equação 1.4

59

1.3.4 Outros equipamentos utilizados

Balança analítica Shimadzu modelo AY-220, rotaevaporadores das marcas Fisaton e Tecnal modelo T-210, equipados com sistema de refrigeração Tecnal modelo TE-2005 e bomba de vácuo de membrana Edwards D-LAB 10 series. Vortex AV-2 marca Gehaka, centrífuga da Hermle modelo Z-200A e centrífuga de Hitachi CR22GIII e aparelho de ponto de fusão Fisaton modelo 431.

1.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

No estudo inicial deste trabalho foi selecionada a reação entre o 4-CN-benzaldeído e a cicloexanona como modelo para avaliar a promiscuidade de enzimas hidrolases frente à reação aldólica. A reação foi também catalisada quimicamente com NH₄OH para critério de comparação de rendimento, diastereosseletividade, bem como para a produção de padrões analíticos para o uso nas análises cromatográficas em colunas aquiral e quiral dos diastereoisômeros CHX-*syn* e CHX-*anti* e seus respectivos enantiômeros. Ainda foram realizadas reações controles, ou seja, na ausência das enzimas para verificar os efeitos catalíticos das mesmas.

Na literatura, estudos mostraram que o uso de NH₄OH como catalisador renderam os produtos aldólicos em 82%, diastereosseletividade de 50:50 e sem excesso enantiomérico para a reação aldólica entre o 4-CN-benzaldeído e a cicloexanona em 1 h (62). Enquanto o resultado obtido no presente trabalho o NH₄OH forneceu 63% de rendimento e razão diastereoisomérica de 57:43 (CHX-*syn*:CHX-*anti*) em 1 h de reação. Portanto, nossos resultados favoreceram ligeiramente o diastereoisômero CHX-*syn* embora em menor rendimento. Possivelmente pode ter ocorrido um enriquecimento diastereoisomérico durante o processo de purificação.

1.4.1 Caracterização espectroscópica dos diastereoisômeros CHX-*anti* e CHX-*syn* por RMN

Os produtos diastereoisoméricos CHX-*anti* e CHX-*syn* da reação aldólica entre o 4-CNbenzaldeído e a cicloexanona foram isolados, purificados e identificados espectroscopicamente. Assim, os deslocamentos químicos de hidrogênios e carbonos dos diastereoisômeros CHX-*anti* e CHX-*syn* apresentaram sinais característicos nos espectros de RMN ¹H e ¹³C, os quais possibilitaram a sua identificação, como o deslocamento químico do próton metínico no espectro de RMN de ¹H (C**H**-OH).

Em meio apolar é esperado que ocorra uma ligação de hidrogênio favorável entre o grupo OH e o oxigênio do grupo carbonila. Os prótons metínicos H_A e H_B (**Figura 1.7**) adotam as conformações *gauche*, as quais conduzem a acoplamentos com ³J entre 3-4 Hz, quando comparadas à conformação *anti* dos hidrogênios metínicos H_A e H_B com ³J entre 10-12 Hz (36-38). Assim, a ³J observada no espectro de RMN de ¹H corresponde a um valor médio dos acoplamentos gerados pelas conformações *gauche* e *anti*. Vale destacar que estes valores

referem-se a sistemas acíclicos. O valor da ${}^{3}J$ encontrada no nosso sistema contendo o anel cicloexanona foi menor no diastereoisômero CHX-*syn* (2,1 Hz) e maior no CHX-*anti* (8,42 Hz).

Figura 1.7. Conformações *gauche* e *anti* nos diastereoisômeros CHX-*anti* e CHX-*syn* relacionadas com suas constantes de acoplamento ${}^{3}J$ no espectro de RMN de ${}^{1}H$.



Fonte: adaptado de https://www.chem.wisc.edu/areas/reich/nmr/05-hmr-05-3j.htm

O aldol CHX-*syn* apresentou um sinal em δ 5,43 (1H, banda larga) (**Figura 1.8**) cujo valor foi de ³*J* = 2,1 Hz, a qual foi calculada a partir do respectivo sinal obtido no espectro da **Figura 1.9** adquirido após a adição de uma gota de óxido de deutério (D₂O), pois sem a presença de D₂O não foi possível observar o dupleto.

Figura 1.8. Espectro de RMN de ¹H (500 MHz, CDCl₃) do produto aldol CHX-*syn* obtido por catálise básica com NH₄OH na ausência de D_2O .





Figura 1.9. Espectro de RMN de ¹H (500 MHz, CDCl₃) do aldol CHX-syn com adição de D₂O.

*Adquirido em 500 MHz e CDCl₃ e algumas gotas de D₂O.

No espectro de RMN de ¹H na **Figura 1.9** além de ser observado o dupleto para o H7 carbinólico, observou-se também uma mudança na intensidade e na multiplicidade do hidrogênio da hidroxila (δ 3,18), que em CDCl₃ correspondeu a um singleto, na presença de D₂O tornou-se um dupleto de intensidade baixa devido à troca de D₂O.

Para o isômero CHX-*anti* o hidrogênio carbinólico H7 foi observado um dupleto em δ 4,83 (**Figura 1.10**) com ³*J* = 8,42 Hz, não exibindo diferença com as constantes de acoplamento presentadas nos sistemas acíclicos (66).

O espectro de RMN de ¹³C para o aldol CHX-*syn*, mostrado na **Figura 1.11**, apresentou doze sinais espectrais referentes aos 14 carbonos da molécula. Sendo que os carbonos aromáticos C9 e C13 e os carbonos C10 e C12 apresentaram sinais idênticos em δ 126,7 e δ 132,2, respectivamente. O sinal correspondente à carbonila observou-se em δ 214,3.



Figura 1.10. Espectro de RMN de 1 H (500 MHz, CDCl₃) do aldol CHX*-anti* obtido por catálise básica com NH₄OH.

*Adquirido em 500 MHz e CDCl₃

Figura 1.11. Espectro de RMN de ¹³C (125 MHz, CDCl₃) do aldol CHX-*syn* obtido por catálise com NH₄OH.



O sinal em δ 147,1 foi atribuído ao carbono sp³ aromático C8 por encontrar-se desblindado devido ao efeito retirador de elétrons do grupo substituinte *p*-CN. O carbono C11 do anel aromático, ligado ao CN, teve um deslocamento químico em 111 ppm. O sinal em δ 119 correspondeu ao carbono do grupo ciano. O carbono mais desblindado em δ 70,3 correspondeu ao carbinólico. Outros sinais obtidos no espectro corresponderam aos carbonos C2 e C6, vicinais à carbonila em δ 56,9 e δ 42,8, respectivamente. Enquanto, os carbonos C3, C4 e C5 foram atribuídos aos sinais em δ 26,0; 28,0 e 24,9, respectivamente.

1.4.2 Análises por cromatografia líquida de alta eficiência da reação aldólica entre o 4-CN-benzaldeído e a cicloexanona

Com o intuito de realizar uma análise comparativa das reações biocatalisadas e a reação catalisada quimicamente foram construídas curvas analíticas para o 4-CN-benzaldeído e para os produtos de adição aldólica, o CHX-*anti* e o CHX-*syn*, usando HPLC-UV em modo reverso. A partir das curvas analíticas (**Apêndice**) foram obtidas as equações correspondentes calculadas no programa EXCEL (**Tabela 1.5**). O intercepto nestes casos foi forçado a passar por zero pois, na ausência da substância a absortividade foi zero.

A partir das equações das curvas analíticas foram calculadas as concentrações destas substâncias para as reações catalisadas e não catalisadas.

| Tabela 1.5. Equações das curvas analíticas obtidas por análise HPLC-aquiral para as reações aldólicas |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| entre o 4-CN-benzaldeído e a cicloexanona catalisadas pelas lipases PPL II e LRN. |

| Composto | Equação da curva analítica | r ² |
|------------------|----------------------------|----------------|
| 4-CN-benzaldeído | Área = 99731 x c | 0,9989 |
| CHX-anti | Área = 82666 x c | 0,9951 |
| CHX-syn | Área = 88400 x c | 0,9993 |

 $c = concentração; r^2 = coeficiente de correlação linear.$

1.4.2.1 Análises por HPLC-UV dos produtos da reação aldólica catalisada quimicamente por NH4OH

No cromatograma obtido da análise por HPLC-UV do bruto da reação entre o 4-CNbenzaldeído e a cicloexanona catalisada por NH₄OH (**Figura 1.12**) foi observado a presença de 5 picos com tempos de retenção t_R, entre 10,32 e 16,93 minutos. O primeiro pico com t_R de 10,32 min correspondeu ao aldeído remanescente da reação. Os picos com t_R de 14,5 e 13,2 minutos corresponderam aos produtos diastereoisoméricos CHX-*anti* e CHX-*syn*, respectivamente. Os picos de intensidades baixas (t_R = 16,1 e 16,9 min) possivelmente corresponderam aos produtos de desidratação (*E/Z*), cuja massa foi constatada por CG-EM, mas não foram confirmados com padrões ou por isolamento e caraterização. A cicloexanona não foi detectada por não apresentar absorção no UV-Vis.

Figura 1.12. Cromatograma obtido por HPLC-UV da reação entre o 4-CN-benzaldeído e a cicloexanona catalisada por NH₄OH.



Condições de análises cromatográficas (HPLC-UV): Coluna aquiral Shim-Pack CLC-CN (150 mm x 4,6 mm, 5 μm), hexano e *i*-prOH (90:10), fluxo 0,5 mL/min, 233 nm.

Na **Tabela 1.6** estão apresentados os valores de rendimento e diastereosseletividade quando a reação de adição aldólica entre o 4-CN-benzaldeído e a cicloexanona foi catalisada por NH₄OH. A composição dos diastereoisômeros foi de 57% para o aldol CHX-*syn* e de 43% para o aldol CHX-*anti*.

Tabela 1.6. Valores de rendimento e diastereosseletividade dos diastereoisômeros CHX-*syn* e CHX*anti* da reação aldólica catalisada com NH₄OH.

| Tempo (h) | Rendimento prod. aldol (%) | Diastereosseletividade (anti:syn)* |
|-----------|----------------------------|------------------------------------|
| 24 | 63 | 43:57 |

*Dados obtidos das análises por cromatografia aquiral, associados aos cromatogramas da Figura 1.13.

Os produtos diastereoisoméricos CHX-*anti* e CHX-*syn* foram purificados por cromatografia em coluna usando sílica gel e uma mistura de hexano e AcOEt (95:5). O cromatograma obtido após a purificação está mostrado na **Figura 1.13**.

Figura 1.13. Cromatograma obtido por HPLC-UV dos diastereoisômeros CHX-*anti* e CHX-*syn* após serem purificados por cromatografia em coluna da reação aldólica catalisada com NH₄OH.



Condições de análises cromatográficas (HPLC-UV): Coluna aquiral Shim-Pack CLC-CN (150 mm x 4,6 mm, 5 µm), hexano e *i*-prOH (90:10), fluxo 0,5 mL/min, 233 nm, volume de injeção da amostra: 10 µL.

Para o isolamento de cada par de diastereoisômeros CHX-*syn* e CHX-*anti* foi realizada uma purificação por CCD em placa analítica contendo o indicador fluorescente em 254 nm (20 x 20 cm²). Utilizou-se uma mistura de eluente contendo hexano e Et₂O (4:6). Os cromatogramas obtidos estão apresentados na **Figura 1.14**. Como pode ser observado, a purificação por CCD analítica não resultou em 100% de cada diastereoisômero.



Figura 1.14. Cromatogramas obtidos por HPLC-UV dos diastereoisômeros CHX-*anti* e CHX-*syn* da reação aldólica catalisada por NH₄OH após serem purificados por CCD analítica.

Condições de análises cromatográficas (HPLC-UV): Coluna aquiral Shim-Pack CLC-CN (150 mm x 4,6 mm, 5 μ m), hexano e *i*-prOH (90:10), fluxo 0,5 mL/min, 233 nm, volume de injeção da amostra: 10 μ L.

1.4.2.2 Análises por HPLC-UV da reação aldólica entre o 4-CNbenzaldeído e a cicloexanona catalisada pelas enzimas PPL-II e LRN

As reações entre o 4-CN-benzaldeído e a cicloexanona foram catalisadas pelas enzimas LRN e PPL-II as quais foram selecionadas de acordo com resultados prévios obtidos para a adição aldólica entre o 4-NO₂-benzaldeído e a cicloexanona por Birolli et al. (60) e alguns dados da literatura (20, 21, 30, 31, 39).

A análise por HPLC da reação aldólica entre o 4-CN-benzaldeído e a cicloexanona catalisada pela PPL-II, ao longo do tempo, através de alíquotas coletadas a cada 24 horas até 96 horas permitiu obter uma sequência de cromatogramas, os quais foram comparados na **Figura 1.15**.

A sequência dos cromatogramas da **Figura 1.15** permitiu observar o progresso da reação aldólica catalisada por PPL-II. Durante as primeiras 24 h além dos produtos de adição CHXanti ($t_R = 15,9 \text{ min}$) e CHX-syn ($t_R = 14,2 \text{ min}$) ocorreu a formação dos produtos de condensação (CHX-*E* e CHX-*Z*, $t_R = 19,6$ e 18,5 min). Estes produtos de condensação desapareceram ao longo da reação até não serem mais detectados após 96 h. O desaparecimento desses compostos possivelmente ocorreu devido a adição de água, o que justificaria o aumento da diastereosseletividade CHX-anti ao longo da reação. Porém, não foi possível fazer uma comprovação dessa constatação.



Figura 1.15. Cromatogramas obtidos por HPLC-UV da reação aldólica entre o 4-CN-benzaldeído e a cicloexanona catalisada por PPL-II ao longo do tempo reacional.

Condições de análises cromatográficas (HPLC-UV): Coluna aquiral Shim-Pack CLC-CN (150 mm x 4,6 mm, 5 µm), hexano e *i*-prOH (90:10), fluxo 0,5 mL/min, 233 nm, volume de injeção da amostra: 10 µL.

Na **Tabela 1.7**, encontram-se resumidas as conversões e as diastereosseletividades obtidas ao longo das 96 h, quando a reação de adição aldólica foi catalisada pela PPL-II. Após 24 h de reação a diastereosseletividade favoreceu ligeiramente o diastereoisômero CHX*-anti*. Após 48 h de reação a diastereosseletividade *anti* aumentou e se manteve em um valor constante de 81:19 até 96 h. Enquanto o rendimento para o CHX*-syn* foi máximo em 72 h e apresentou um ligeiro decaimento em 96 h. As conversões foram obtidas das equações das curvas analíticas da **Tabela 1.5** e multiplicados pelo correspondente fator de diluição.

Tabela 1.7. Conversões e diastereosseletividades obtidas para a reação de adição aldólica entre o 4-CN-benzaldeído e a cicloexanona catalisada pela PPL-II, analisadas por HPLC-UV aquiral.

| Tempo [h] | Conversão prod. aldol [%] | Diastereosseletividade [anti:syn] |
|-----------|---------------------------|-----------------------------------|
| 24 | 50 | 56:44 |
| 48 | 64 | 82:18 |
| 72 | 68 | 81:19 |
| 96 | 61 | 81:19 |

Dados obtidos das análises por cromatografia aquiral, associados aos cromatogramas da Figura 1.15.

A **Figura 1.16** apresenta o progresso da reação de adição aldólica entre o 4-CNbenzaldeído e a cicloexanona catalisada pela LRN. Nesse caso além de serem observados os picos correspondentes aos compostos de adição aldólica CHX-*anti* e CHX-*syn*, apareceram também os picos correspondentes aos compostos de condensação aldólica. Estes últimos aumentaram a conversão ao longo do tempo, comportamento oposto à reação catalisada pela PPL-II sob condições idênticas de reação. Os dados de conversões e diastereosseletividades conforme o progresso da reação foram apresentados na **Tabela 1.8**.

Figura 1.16. Cromatogramas obtidos por HPLC-UV da reação aldólica entre o 4-CN-benzaldeído e a cicloexanona catalisada pela LRN.



Condições de análises cromatográficas (HPLC-UV): Coluna aquiral Shim-Pack CLC-CN (150 mm x 4,6 mm, 5 µm), hexano e *i-prOH* (90:10), fluxo 0,5 mL/min, 233 nm, volume de injeção da amostra: 10 µL.

| | | 1 | 3 | 3 | |
|-----------------------------|-----------------------------|-------------|--------|---------------------------------------|------|
| benzaldeído e a cicloexanor | na catalisada pela LRN, ana | alisadas po | r HPLC | C-UV aquiral. | |
| T | Commonsão mas de aldal | 0/1 | D: | · · · · · 1 · · · · · 1 · 1 · 1 · · · | ·· 1 |

Tabela 1.8. Conversões e diastereosseletividades obtidas para a reação de adição aldólica entre o 4-CN-

| Tempo [h] | Conversão prod. aldol [%] | Diastereosseletividade [anti:syn] |
|-----------|---------------------------|-----------------------------------|
| 24 | 5 | 70:30 |
| 48 | 18 | 73:27 |
| 72 | 26 | 73:27 |
| 96 | 28 | 73:27 |

Dados das análises por cromatografia aquiral, associados aos cromatogramas da Figura 1.16.

A catálise com LRN forneceu os produtos da condensação aldólica CHX-*E* e CHX-*Z* em quantidades significativas como pode ser observado nos cromatogramas da **Figura 1.16**, sendo que cada produto foi formado em quantidades distintas, porém estes compostos não foram

isolados e nem quantificados. Destaca-se que diferentemente da PPL-II, a LRN além de promover a adição aldólica, também se mostrou promíscua frente à reação de condensação aldólica fornececendo em quantidades significativas dos diastereoisômeros CHX-*E* e CHX-*Z*.

Com o intuito de estabelecer comparações entre os dois biocatalisadores foram realizados os gráficos da variação da concentração do 4-CN-benzaldeído e dos produtos diastereoisoméricos CHX-*syn* e CHX-*anti* através do tempo, os quais estão apresentados na **Figura 1.17A** para a catálise com PPL-II e **Figura 1.17B** para a catálise com LRN.

Figura 1.17. Monitoramento da reação aldólica entre o 4-CN-benzaldeído e a cicloexanona catalisada pelas enzimas PPL II e LRN.





A. Reação aldólica catalisada por PPL-II.

B. Reação aldólica catalisada por LRN.

Através dos dados das curvas analíticas da **Figura 1.17** observou-se claramente o progresso das reações com as enzimas PPL-II e LRN em relação ao consumo do substrato 4-CN-benzaldeído e a formação dos produtos aldólicos CHX-*anti* e CHX-*syn*.

Na catálise com a PPL-II o decréscimo da concentração do 4-CN-benzaldeído durante as 24 h foi mais pronunciado do que na reação catalisada pela LRN. Após este período reacional a concentração do 4-CN-benzaldeído permaneceu quase que constante, em 3,5 % do valor inicial (100%, 950 ppm) em 96 h quando foi usada a PPL-II como catalisador. Contudo, na presença da LRN a reação aldólica ocorreu mais lentamente e a concentração do 4-CN-benzaldeído permaneceu em 26% após 96 h de reação.

Na reação catalisada pela PPL-II a conversão dos diastereoisômeros CHX-*syn* e CHX*anti* aumentou até 24 h de 23 e 27 % (11456 e 12960 ppm), respectivamente. Após 72 h a conversão do aldol CHX-*anti* aumentou significativamente para 54% (26150 ppm). Enquanto a conversão do aldol CHX-*syn* diminuiu para 14% (6908 ppm). Em 96 h de reação a conversão do aldol CHX-*anti* diminuiu até 44% (21400 ppm) e o aldol CHX-*syn* aumentou sutilmente até 17% (8100 ppm). As oscilações entre as concentrações dos produtos CHX-*syn* e CHX-*anti* ao longo do tempo reacional evidencia um comportamento catalítico da lipase frente às reações de adição e condensação que precisam ser investigados em maiores detalhes, como o estudo da reação retro-aldol de cada produto de condensação *syn* e *anti*.

Quando o catalisador utilizado na reação de adição aldólica foi a LRN, a concentração dos aldóis (CHX-*syn* e CHX-*anti*) aumentou em uma taxa de conversão menor quando comparada com a catálise pela PPL-II. Com a LRN também foi favorecido o aldol CHX-*anti* em uma conversão de 49% (10003 ppm), enquanto foi de 7% (3488 ppm) para o CHX-*syn* após 96 h. Novamente destaca-se a formação dos produtos de condensação aldólica CHX-*E* e CHX-*Z* estáveis ao longo do tempo de reação pela LRN. Inclusive observou-se um diastereoisômero majoritário em 96 h de reação, requerendo um estudo mais detalhado desse comportamento frente à LRN.

1.4.3 Reação aldólica controle entre o 4-CN-benzaldeído e a cicloexanona na ausência de enzima

Para confirmar o efeito catalítico das enzimas PPL-II e LRN usadas nas reações aldólicas promíscuas entre o 4-CN-benzaldeído e a cicloexanona foram realizadas reações controles na ausência das enzimas. Através das análises cromatográficas por HPLC-UV verificou-se a presença de 85 % de 4-CN-benzaldeído remanescente após 96 h de reação e uma conversão do aldol CHX-*syn* de 0,6% (324 ppm), enquanto o diastereoisômero CHX-*anti* não foi detectado. Portanto, concluiu-se que a reação aldólica na ausênça de lipases era desprezível já que produziu somente o CHX-*syn* em 0,6% rendimento após 96h de reação. Os resultados das análises cromatográficas em coluna aquiral das alíquotas analisadas no monitoramento da reação controle estão descritos na **Tabela 1.9**.

Tabela 1.9. Conversões e diastereosseletividades obtidas para a reação de adição aldólica entre o 4-CNbenzaldeído e a cicloexanona na ausência de catalisador, analisadas por HPLC-UV aquiral.

| Tempo [h] | Conversão prod. aldol [%] | 4-CN-benzaldeído remanescente [%] |
|-----------|---------------------------|-----------------------------------|
| 24 | 0,3 | 87 |
| 48 | Nd | 85 |
| 96 | 0,6 | 84 |
Dados das análises por cromatografia aquiral, associados aos cromatogramas da Figura 1.18. Nd: Não detectado



Figura 1.18. Cromatogramas obtidos por HPLC-UV da reação aldólica entre o 4-CN-benzaldeído e a cicloexanona na ausência de lipases.

Condições de análises cromatográficas (HPLC-UV): Coluna aquiral Shim-Pack CLC-CN (150 mm x 4,6 mm, 5 μ m), hexano: *i*-prOH (90:10), fluxo 0,5 mL/min, 233 nm, volume de injeção da amostra: 10 μ L, λ = 233 nm.

1.4.2.3 Enantiosseletividade da reação aldólica entre o 4-CNbenzaldeído e a cicloexanona

A mistura de diastereoisômeros CHX-*syn* e CHX-*anti* foi analisada por cromatografia em fase normal, usando a coluna quiral Daicel Chiralpak AD-H. Os excessos enantioméricos foram calculados a partir das áreas obtidas na análise por HPLC-UV quiral, cujos cromatogramas estão apresentados na **Figura 1.19**. Os $t_R = 26,0$ e 31.1 min corresponderam ao par de enantiômeros do aldol CHX-*syn* e aqueles em $t_R = 35,3$ e 44,4 min corresponderam ao par de enantiômeros do aldol CHX-*anti*.

Os excessos enantioméricos calculados para as reações catalisadas com NH₄OH, PPL-II e LRN após 96 h de reação, os quais foram previamente purificados por CCD analítica, são apresentados na **Tabela 1.10**.



Figura 1.19. Cromatogramas obtidos por HPLC-UV quiral da mistura de diastereoisômeros CHX*anti e* CHX-*syn* das reações aldólicas catalisadas com NH₄OH, PPL-II e LRN.

Condições para análises cromatográficas (HPLC-UV): Coluna Chiralpak AD-H (250 mm x 4,6 mm, 5 µm), hexano e *i*-prOH (90:10), fluxo 0,5 mL/min, 233 nm, volume de injeção da amostra: 10 µL.

Tabela 1.10. Valores de rendimentos, diastereosseletividades e excessos enantioméricos das reações entre o 4-CN-benzaldeído e a cicloexanona biocatalisadas por PPL-II, LRN e NH₄OH.

| Lipase | % Rend. | CHX-anti:CHX-syn | ee CHX-anti (%) | ee CHX-syn (%) |
|--------------------|---------|------------------|-----------------|----------------|
| PPL-II | 74 | 81:19 | 74 | 48 |
| LRN | 40 | 73:27 | 52 | 15 |
| NH ₄ OH | 63 | 43:57 | 0 | 0 |

Dados das análises por cromatografia quiral, associados aos cromatogramas da **Figura 1.19**. Rend = rendimento isolado por cromatografia em coluna para os dois diastereoisômeros.

Uma análise comparativa dos dados da **Tabela 1.10** permitiu concluir que a reação catalisada por PPL-II apresentou diastereosseletividade superior à reação catalisada por LRN, favorecendo ligeiramente o isômero CHX-*anti*. Contudo, a reação catalisada com NH₄OH favoreceu ligeiramente o diastereoisômero CHX-*syn*.

Em relação à enantiosseletividade, a reação catalisada com NH₄OH não apresentou seletividade para nenhum dos enantiômeros, cujo resultado era esperado para uma catálise não assimétrica. Entretanto, as enzimas PPL-II e LRN mostraram diferenças nas enantiosseletividades, sendo que PPL-II forneceu melhores excessos enantioméricos (ee = 74% para CHX-*anti*, ee = e 48% para CHX-*syn*) frente à de LRN (ee = 52% para CHX-*anti*, ee = 15% para CHX-*syn*).

1.4.2.4 Determinação da configuração absoluta dos produtos aldólicos CHX-*anti* e CHX-*syn*

As configurações relativas e absolutas dos produtos foram determinadas por comparação com as descritas para os compostos CHX-*anti* e CHX-*syn* por meio da ordem de eluição dos compostos no cromatograma obtidos por HPLC em coluna Chiralpak AD-H (hexano:2-propanol 95: 0,5), 40 °C, 233 nm, 0,5 mL/min uma vez que já foi apresentado na literatura (**Tabela 1.11**).

Assim o enantiômero majoritário CHX-*anti* correspondeu ao composto (2S,1'R)-2-(hidroxi-(*p*-cianofenil) metil) cicloexan-1-ona. O enantiômero majoritário CHX-*syn* correspondeu ao composto (2R,1'R)-2-(hidroxi-(*p*-cianofenil) metil) cicloexan-1-ona.

Tabela 1.11. Comparação de alguns catalisadores orgânicos e enzimas para a reação aldólica entre o 4-CN-benzaldeído e a cicloexanona descritos na literatura.



| Catalisador / Solvente, | Rend | dr. | ee anti ^[a] | Eluente: Hex: i-pr, | t _R syn (min) | t _R anti (min) | |
|------------------------------------------------|------|------------|------------------------|-------------------------------|--------------------------|--------------------------------------|-----------------------|
| tempo, tempo | (%) | (anti:syn) | | Fluxo (mL/min) | | | Ref. |
| | | | | $e\;\lambda_{detecção}\;(nm)$ | | | |
| A / Cicloexanona, H ₂ O | 74 | 81:19 | 74 | 95:5; 0,5 e 233 | 26,0 maj | 33,5 | Pres |
| (10%), 37 °C, 96 h | | | 48 (syn) | | 31,1 | 44,3 maj) (2 <i>S</i> ,1' <i>R</i>) | |
| A / CH ₃ CN, Tampão fosfato | 95 | 73:27 | 75 | 90:10; 0,5 e 254 | Não relatado | 24,728 | (67) |
| pH 5,4 (10%), 20 °C, 168 h | | | | | | 31,162 maj | |
| B / H ₂ O TFA (0.1 mol%), 25 | 99 | 86.14 | 87 | 90:10: 0 5 e 254 | 34 952 | 47.03 mai (25.1'R) | (68) |
| °C, 48 h | | 00111 | 01 | >0110, 0,0 0 20 1 | 40,982 maj | 59.042 | (00) |
| | 70 | 75.05 | 40 | 00.0.1.0.007 | 22.20 | 21.00 | $\langle c 0 \rangle$ |
| C / H_2O , t.a., 9 dias | /0 | 15:25 | 49 | 98:2; 1,0 e267 | 25,20 27.33 mai | 31,98 40.88 mai (2S.1'R) | (69) |

| <i>Contin.</i> Tabela 1.11 . D / H ₂ O, t.a., 24 h | 97 | 99:1 | 98 | 80:20; 0,5 e 254 | Não relatado | 37,9 46,6 maj (2 <i>S</i> ,1' <i>R</i>) | (70) |
|--------------------------------------------------------------------------------|----|-------|----------------|------------------|----------------------------------------------|------------------------------------------------|------|
| ${\bf E}$ / sem solvente, 15 °C, 165 h | 43 | 86:14 | 91 | 90:10; 0,5 e 254 | Não relatado | 53,9 68,2 maj (2 <i>S</i> ,1' <i>R</i>) | (49) |
| ${\bf F}$ / DMSO, H2O (13%), 20 °C, 47 h | 59 | 75:25 | 51 | Não relatado | Não relatado | Não relatado | (43) |
| G / H ₂ O, 30 °C, 162 h | 47 | 55:45 | 54 | 90:10; 1,0 e 254 | 19,336 maj 22,415 | 25,818 32,57 maj (2 <i>S</i> ,1' <i>R</i>) | (44) |
| H / CH ₃ CN, H ₂ O (15%), 30 °C, 117 h | 21 | 79:21 | 77 5 (syn) | 90:10; 1,0 e 254 | 21,3 (<i>rac</i>) 21,05 | 28,50 36,93 maj (2 <i>S</i> ,1' <i>R</i>) | (46) |
| I / CH ₃ CN, Tampão fosfato pH 4,9 (12%), 30 °C, 240 h | 60 | 72:28 | 76 | 90:10; 1,0 e 254 | 22,739 (<i>rac</i>) 26,296 | 29,9 38,6 maj (2 <i>S</i> ,1' <i>R</i>) | (45) |
| ${\bf J}$ / CHCN, H2O (10 %), 30 °C, 130 h | 74 | 84:16 | 89 | 90:10; 0,5 e 254 | 37,570 maj 43,630 | 50,208 63,18 maj (2 <i>S</i> ,1' <i>R</i>) | (48) |
| K / Tampão fosfato-citrato pH 5,6 (12%), 30 °C, 5 dias | 99 | 67:33 | 60 | 80:20; 0,5 e 220 | 15,1 16,8 maj | 18,5 21,8 maj (2 <i>S</i> ,1' <i>R</i>) | (26) |
| L / DMSO, Tampão imidazol pH 7,0 (30%), 30 °C, 48 h | 39 | 61:39 | 23 | 80:20; 0,5 e 225 | 15,8 (<i>Rac</i>) 17,8 | 19,5 23,9 maj (2 <i>S</i> ,1' <i>R</i>) | (60) |
| M / Cicloexanona, H ₂ O (5%), 37 °C, 72 h | 97 | 79:21 | 81 32 (syn) | 80:20; 0,5 e 225 | 17,1 maj 19,2 | 21,8 26,7 maj (2 <i>S</i> ,1' <i>R</i>) | (25) |
| M / [BMIM][PF6], H ₂ O (8%), 37 °C, 168 h | 88 | 85:15 | 80 | 80:20; 0,5 e 225 | Não relatado | 21,7 26,2 maj (2 <i>S</i> ,1' <i>R</i>) | (57) |
| N / sem solvente, ácido succínico (10 mol%), t.a., 36 h | 85 | 31/69 | 75 (syn) | 90:10; 0,5 e 254 | 34,7 40,5 maj (<i>S</i> ,' <i>S</i>) | 47,0 maj (2 <i>S</i> ,1' <i>R</i>) 58,8 | (71) |
| O / sem solvente, 0-3°C, 120 h, sem agitação | 99 | 35:65 | 91 (syn) | 90:10; 0,5 e 254 | 36,0 maj (<i>R</i> ,' <i>R</i>) 42,0024 | | (72) |

dr. = diastereosseletividade, [a] *ee* determinado por HPLC em coluna Daicel Chiralpak AD-H, Hex: *i*-pr = hexano:isopropanol, t_R = tempo de retenção, t.a = temperatura ambiente, $t_R syn$ = tempo de retenção do CHX-*syn*, $t_R anti$ = tempo de retenção do CHX-*anti*, (maj) = majoritário. Pres = presente trabalho. [BMIM][PF₆] = O hexafluorofosfato de 1-butil-3-metilimidazólio. ChCl:Gly = cloreto de colina e glicerol (1:2 mol/mol).

Como observado na **Tabela 1.11** houve uma maior quantidade de catalisadores que favoreceram a obtenção do aldol CHX-*anti*. O enantiômero predominante foi o (2S,1'R)-CHX-*anti*, e o seu par enantiomérico foi raramente formado (73). O aldol CHX-*syn* foi produzido, porém com menor frequência, por exemplo, o *cat*. *N* levou a formação do aldol (2S,1'S)-CHX-*syn* e o *cat*. *O* produziu o aldol (2S,1'S)-CHX-*syn*.

1.4.3 Determinação da pureza das lipases PPL-II e LRN

A determinação da pureza das lipases PPL-II e LRN foi realizada no laboratório coordenado pela Profa. Dra. Fernanda Canduri (IQSC-USP).

A preparação comercial das duas lipases empregadas neste trabalho, corresponde aos extratos os quais podem conter algumas proteínas contaminantes que podem inclusive apresentarem atividades catalíticas, como estearases, proteases e outras lipases (19, 20). De tal maneira que pode haver interferência nos resultados quando usados como biocatalisadores, apresentando-se falsos positivos ou falsos negativos pelas atividades opostas destas proteínas contaminantes.

Com o intuito de conhecer o grau de pureza das enzimas comerciais utilizadas foram realizadas análises pela técnica de eletroforese unidimensional de gel de poliacrilamida de dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE). Os resultados estão ilustrados na **Figura 1.20**, os quais correspondem aos eletroforegramas obtidos por SDS-PAGE.

Figura 1.20. Eletroforegramas SDS-PAGE das preparações comerciais das lipases usadas na reação aldólica, PPL-II e LRN em concentrações de 1 a 6 mg/mL.

| kDa | | _ | PP | L-II | | _ | LR | N | | | | P.M. (KDa) | Proteína | Fonte |
|--------|---|---|----|------|---|----|----|---|---|------|---|------------|------------------|------------------|
| | | 6 | 4 | 2 | 1 | 6 | 4 | 2 | 1 | mg/m | L | | | |
| 116.0- | | | | | | | | • | | | | 116,0 | β-galactosidase | E. coli |
| 66.2- | | | | | | - | - | - | - | | | | | |
| | | | - | | | | | | | | | 66,2 | BSA | Plasma bovino |
| 45.0- | | | | | | | | | | | | | | |
| 35.0- | _ | | | | | | | | | | | 45,0 | Ovalbumina | ovo de galinna |
| | | | | | | | | | | | | | T | branco |
| 25.0- | _ | | | | | | | | | | | 35,0 | Lactato | Músculo de porco |
| | | | | | | | | | | | | | desidrogenase | |
| 10.4 | | | | | 1 | | | | | | | 25.0 | REase Bsp981 | E. coli |
| 18.4- | | | | | 1 | | | | | | | , | 1 | |
| 14.4- | - | | | | | | | | | | | 18.4 | β-lactoglobulina | Leite bovino |
| | | | | | | | | | | | | - 7 | 1 | |
| | | | | | | i. | | | | | | 14.4 | Lisozima | Ovo de galinha |
| | | | | | | | | | | | | 1 ., . | LISOZIIIu | branco |

A partir do eletroforegrama da **Figura 1.20** foi estimada a massa molecular (MM) para cada lipase, pela realização de uma curva analítica da MM (kDa) *versus* migração relativa dos marcadores moleculares. A preparação de PPL-II apresentou quatro bandas. A banda mais intensa com MM de 60,7 kDa correspondeu a PPL-II. Duas bandas de menores intensidades com MM de 36,0 e 28,5 kDa, associadas provavelmente a algum tipo de quimiotripsina e carboxipeptidase. A quarta banda observada apresentou baixa MM (<14 kDa) compatível com peptídeos ou produtos de proteólise. Enquanto para LRN foi calculada uma MM de 76 kDa e

junto outras duas bandas em 56 e 40 kDa atribuídas a proteínas contaminantes não especificadas pelo fornecedor.

A presença de outras enzimas no preparado enzimático pode influenciar os resultados da reação. Assim, algumas enzimas presentes como impurezas podem promover a reação aldólica, afetando os resultados de rendimentos, seletividades, bem como, formando subprodutos. Desta maneira, os resultados aqui obtidos referem-se à catálise correspondente às lipases em um preparado comercial, as quais não se encontram totalmente puras.

1.4.4 Determinação da atividade enzimática da PPL-II durante a reação entre a cicloexanona e o 4-cianobenzaldeído

Com o intuito de determinar se a PPL-II apresentava atividade catalítica no solvente orgânico (cicloexanona) durante a realização da reação aldólica, foi realizado um experimento para a determinação da atividade enzimática com amostras da enzima coletadas do meio reacional.

A determinação da atividade enzimática para a enzima PPL-II foi baseada na hidrólise de tributirina emulsificada em Triton X-100 em pH 7,7 e na temperatura ambiente (~30 °C). Os produtos da hidrólise foram dibutirina, monobutirina e ácido butírico (76) (**Esquema 1.18**).



Esquema 1.18. Hidrólise de tributirina pela PPL-II em mircroemulsão de Triton X-100.

As reações catalisadas por lipases ocorrem na interface entre a fase aquosa contendo a enzima e a fase oleosa, onde está o triglicerídeo (tributirina). A hidrólise de tributirina em ácido butírico e dibutirina é o primeiro passo da reação. Com a acumulação de dibutirina na interface, a tributirina é concentrada no núcleo da gota da microemulsão, tornando mais lenta a velocidade de hidrólise de tributirina, enquanto ocorre a hidrólise da dibutirina a monobutirina em uma segunda etapa, a qual se sobrepõe com a primeira etapa (76).

A medição da cinética da reação de hidrólise foi possível pelo uso do indicador vermelho de fenol, o qual apresenta um equilíbrio entre duas estruturas moleculares, causado pela variação do pH (**Figura 1.21**).

A coloração da solução de vermelho de fenol muda de acordo com a estrutura predominante em solução. No espectro da **Figura 1.21** observa-se os dois comprimentos de onda de máxima absorção para as duas estruturas. A estrutura **I**, tem o máximo de absorção em 430 nm e coloração amarela em pH 6,8. Enquanto a estrutura **II** apresenta máxima absorbância em 560 nm e coloração vermelha em pH acima de 8,2. O acompanhamento da reação de hidrólise da tributirina foi feito a 560 nm, monitorando ao desaparecimento da estrutura **II**, a qual é diretamente proporcional ao aumento da concentração do ácido butírico.

Figura 1.21. Espectro de absorção do indicador vermelho de fenol, em pH 7,7 e as estruturas presentes no equilíbrio ácido-base.



A atividade específica da enzima foi expressa pela quantidade de ácido butírico formado por minuto, por mg de enzima (mmol.min⁻¹.mg⁻¹). Assim, os valores de absorbância foram convertidos em concentrações de ácido butírico. Para isto, utilizou-se da equação da curva analítica contendo diferentes quantidades de ácido butírico emulsificado (entre 0 e 1,5 mM).

Com a equação obtida da curva analítica, Abs=-0,1247[C]+0,2328 ($R^2 = 0,9178$) os valores de absorbância foram convertidos em concentração de ácido butírico. Desta forma foi possível determinar a velocidade inicial, a qual ao ser dividida pela quantidade de enzima forneceu a atividade específica da enzima.

A atividade específica da PPL-II em tampão fosfato 5 mM (Na₂HPO₄/KH₂PO₄, pH 7,7) foi considerada como 100% (1,8x10⁻² mmol min⁻¹mg⁻¹) e as atividades medidas durante o transcorrer da reação estão apresentadas na **Tabela 1.12**. Como pode ser observado, a atividade específica da PPL-II determinada variou de acordo com o tempo de reação. Isto pode ser devido à limitação da metodologia de coleta da alíquota do meio de reação para análise, uma vez que não foi possível coletar a mesma quantidade da enzima em cada período de tempo, devido à insolubilidade da enzima na cicloexanona. Destaca-se que esse experimento não foi realizado em replicatas.

Figura 1.22. Hidrólise de tributirina para a medição da atividade enzimática no decorrer da reação entre o 4-CN-benzaldeído e CHX catalisada pela PPL-II.



Tabela 1.12. Atividade específica da PPL-II em diferentes tempos frente à reação aldólica entre o 4-CN-benzaldeído e a cicloexanona.

| Tompo | Velocidade inicial | Atividade específica | 0/ de atividade específica inicial | |
|--------|------------------------|--------------------------------------------|------------------------------------|--|
| rempo | (mmol.s^{-1}) | (mmol min ⁻¹ mg ⁻¹) | 70 da anvidade específica iniciar | |
| 0 | 0,5400 | $1,08 \times 10^{-02}$ | 100 | |
| 20 min | 0,1020 | 2,04 x10 ⁻⁰³ | 19 | |
| 2 h | 0,5400 | 1,08 x10 ⁻⁰² | 100 | |
| 24 h | 0,4920 | 9,84 x10 ⁻⁰³ | 91 | |
| 72 h | 0,0840 | 1,68 x10 ⁻⁰³ | 16 | |

1.5 CONCLUSÃO

Dentre as lipases usadas, a PPL-II mostrou-se como sendo o melhor biocatalisador para a reação de adição aldólica entre a cicloexanona e o 4-CN-benzaldeído, devido aos maiores rendimentos para os produtos aldólicos CHX-*anti* e CHX-*syn* (74 %) em 96 h, frente à catálise por LRN (40%). Além disso para a LRN foram produzidos os compostos de condensação aldólica, gerando uma maior mistura de produtos. A produção dos compostos de condensação abre um caminho para futuros estudos com esta enzima focados na melhoria dos rendimentos e seletividades.

A reação enzimática catalisada pela PPL-II foi diastereosseletiva (CHX-*anti*:CHX-*syn*, 81:19) e destacou-se quanto à sua enantiosseletividade (ee = 74 % para CHX-*anti*; ee = 48% para CHX-*syn*). Enquanto a reação de adição aldólica entre a cicloexanona e o 4-cianobenzaldeído catalisada pela LRN apresentou menor diastereosseletividade (CHX-*anti*:CHX-*syn*, 73:27) assim como a enantiosseletividade (ee = 52 % para CHX-*anti*; 15% para CHX-*syn*).

A função catalítica das enzimas PPL-II e LRN foi evidenciada pelos resultados da reação controle (ausência de enzima), na qual os compostos diastereoisoméricos (CHX-*anti*:CHX-*syn*) foram obtidos em quantidades traços. Também as seletividades das reações biocatalisadas destacaram-se em relação à reação com NH₄OH, pois esta apresentou uma diastereosseletividade de 43:57 (CHX-*anti*:CHX-*syn*) fornecendo os produtos racêmicos.

Análises por eletroforese constataram a presença de impurezas presentes nas amostras aenzimáticas comerciais as quais poderiam também influenciar frente aos resultados obtidos nas reações entre o 4-CN-benzaldeído e a cicloexanona.

Estes estudos possibilitaram o uso das enzimas PPL-II e de LRN para promoverem reações de adição aldólica e de condensação, as quais abrem um campo para o desenvolvimento de metodologias biocatalíticas frente à formação da ligação carbono-carbono de interesse em síntese orgânica.

A única vitória que perdura é a que se conquista sobre a própria ignorância. Jigoro Kano

REFERÊNCIAS

1 BOLT, A.; BERRY, A.; NELSON, A. Directed evolution of aldolases for exploitation in synthetic organic chemistry. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 474, n. 2, p. 318–330, 2008.

2 MARTÍNEZ, N. M.; RODRÍGUEZ, E. Z.; RODRÍGUEZ, V. K.; PÉREZ, R. E. Tracing the repertoire of promiscuous enzymes along the metabolic pathways in archaeal organisms. **Life**, v. 7, p. 1–14, 2017.

3 GIJSEN, H.; WONG, C. Unprecedented asymmetric aldol reactions with three aldehyde substrates catalyzed by 2-deoxyribose-5-phosphate aldolase. **Journal of American Chemical Society**, v. 116, p. 8422–8423, 1994.

4 ARNOLD, F. H. Engineering enzymes for non-aqueous solvents. **Trends in Biotechnology**, v. 8, p. 244–249, 1990.

5 DEAN, S. M.; GREENBERG, W. A.; WONG, C. Recent advances in aldolase-catalyzed asymmetric synthesis. Advanced Synthesis & Catalysis, v. 349, p. 1308–1320, 2007.

6 LIU, C. C.; SCHULTZ, P. G. Adding new chemistries to the genetic code. Annual Review of Biochemistry, v. 79, n. 1, p. 413–444, 2010.

7 HOCEK, M. Synthesis of base-modified 2'-deoxyribonucleoside triphosphates and their use in enzymatic synthesis of modified DNA for applications in bioanalysis and chemical biology. **Journal of Organic Chemistry**, v. 79, n. 21, p. 9914–9921, 2014.

8 STRUTHERS, L.; PATEL, R.; CLARK, J.; THOMAS, S. Direct detection of 8-oxodeoxyguanosine and 8-oxoguanine by avidin and its analogues. **Analytical Biochemistry**, v. 255, n. 1, p. 20–31, 1998.

9 PATEL, R. N. Biocatalytic key steps in semisynthesis and total synthesis. In: Biocatalysis. [s.l: s.n.].
v. 35p. 403–459.

10 BEZBORODOV, A. M.; ZAGUSTINA, N. A. Enzymatic biocatalysis in chemical synthesis of pharmaceuticals (Review). **Applied Biochemistry and Microbiology**, v. 52, n. 3, p. 237–249, 2016.

11 COPLEY, S. D. An evolutionary biochemist's perspective on promiscuity. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 40, n. 2, p. 72–78, 2015.

12 MAHMOUDIAN, M.; NOBLE, D.; DRAKE, C. S.; MIDDLETON, R. F.; MONTGOMERY, D. S.; PIERCEY, J. E.; RAMLAKHAN, D.; TODD, M.; DAWSON, M. J. An efficient process for production of *N*-acetylneuraminic acid using *N*-acetylneuraminic acid aldolase. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 20, n. 5, p. 393–400, 1997.

13 KAPOOR, M.; GUPTA, M. N. Lipase promiscuity and its biochemical applications. **Process Biochemistry**, v. 47, n. 4, p. 555–569, 2012.

14 HULT, K.; BERGLUND, P. Enzyme promiscuity: mechanism and applications. **Trends in Biotechnology**, v. 25, n. 5, p. 231–238, 2007.

15 KHERSONSKY, O.; ROODVELDT, C.; TAWFIK, D. S. Enzyme promiscuity : evolutionary and mechanistic aspects. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 10, p. 498–508, 2006.

16 BABTIE, A.; TOKURIKI, N.; HOLLFELDER, F. What makes an enzyme promiscuous ? Current Opinion in Chemical Biology, v. 14, n. 2, p. 200–207, 2010.

17 FABER, K. **Biotransformations in Organic Chemistry**. . Berlin: Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2011.

18 KLIBANOV, A. M. Improving enzymes by using them in organic solvents. **Nature**, v. 409, n. January, p. 241–246, 2001.

19 KHMELNITSKY, Y. L.; WELCH, S. H.; CLARK, D. S.; DORDICK, J. S. Salts dramatically enhance activity of enzymes suspended in organic solvents. Journal of the American Chemical Society, v. 116, n. 6, p. 2647–2648, 1994.

20 WESCOTT, C. R.; KLIBANOV, A. M. Solvent variation inverts substrate specificity of an enzyme. **Journal of the American Chemical Society**, v. 115, n. 5, p. 1629–1631, 1993.

21 WESCOTT, C. R.; NORITOMI, H.; KLIBANOV, A. M. Rational control of enzymatic enantioselectivity through solvation thermodynamics. **Journal of the American Chemical Society**, v. 118, n. 43, p. 10365–10370, 1996.

22 HIROSE, Y.; KARIYA, K.; SASAKI, I.; KURONO, Y.; EBIIKE, H.; ACHIWA, K. Drastic solvent effect on lipase-catalized enantioselective hydrolysis of prochiral 1,4-dihydropyridines. **Tetrahedron** Letters, v. 47, p. 7157–7160, 1992.

23 KIRCHNER, G.; SCOLLAR, M. P.; KLIBANOV, A. M. Racemic mixtures via lipase catalysis in organic solvents. Journal of American Chemical Society, v. 107, p. 1012–1016, 1985.

24 ZAKS, A.; DODDS, D. R. Application of biocatalysis and biotransformations to the synthesis of pharmaceuticals. **Drug Discovery Today**, v. 2, n. 12, p. 513–531, 1997.

25 XIE, Z.; WANG, N.; ZHOU, L.; WAN, F.; HE, T.; LE, Z. Lipase-catalyzed stereoselective crossaldol reaction promoted by water. **ChemCatChem**, v. 344000, n. 56, p. 1935–1940, 2013.

26 XIE, Z.; WANG, N.; JIANG, G.; YU, X. Biocatalytic asymmetric aldol reaction in buffer solution. **Tetrahedron Letters**, v. 54, n. 8, p. 945–948, 2013.

27 DE JESUS, C. M. C. Resolução cinética enzimática de álcoois secundários em água por tecnologia de miniemulsões. [s.l.] Universidade de Lisboa. Faculdade de ciências e tecnologia, 2010.

28 VOLKIN, D. B.; STAUBLI, A.; LANGER, R.; KLIBANOV, A. M. Enzyme thermoinactivation in anhydrous organic solvents. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 37, n. 9, p. 843–853, 1991.

29 YU, X.; PÉREZ, B.; ZHANG, Z.; GAO, R.; GUO, Z. Mining catalytic promiscuity from: Thermophilic archaea: An acyl-peptide releasing enzyme from *Sulfolobus tokodaii* (ST0779) for nitroaldol reactions. **Green Chemistry**, v. 18, n. 9, p. 2753–2761, 2016.

30 LI, C. Organic reactions in aqueous media with a focus on carbon – carbon bond formations : A decade update. **Chemical Reviews**, v. 105, p. 3095–3165, 2005.

31 MUKHERJEE, S.; YANG, J. W.; HOFFMANN, S.; LIST, B. Asymmetric enamine catalysis. **Chemical Reviews**, v. 107, p. 5471–5569, 2007.

32 DENMARK, S. E.; STAVENGER, R. A. Asymmetric catalysis of aldol reactions with chiral Lewis bases. Accounts of Chemical Research, v. 33, n. 6, p. 432–440, 2000.

33 DENMARK, S. E.; PHAM, S. M.; STAVENGER, R. A.; SU, X.; WONG, K. T.; NISHIGAICHI, Y. Chiral phosphoramide-catalyzed aldol additions of ketone trichlorosilyl enolates. Mechanistic aspects. **Journal of Organic Chemistry**, v. 71, n. 10, p. 3904–3922, 2006.

34 GÜCLÜ, D.; SZEKRENYI, A.; GARRABOU, X.; KICKSTEIN, M.; JUNKER, S.; CLAPÉS, P.; FESSNER, W. D. Minimalist protein engineering of an aldolase provokes unprecedented substrate promiscuity. **ACS Catalysis**, v. 6, n. 3, p. 1848–1852, 2016.

35 CLAPÉS, P.; GARRABOU, X. Current trends in asymmetric synthesis with aldolases. Advanced Synthesis and Catalysis, v. 353, n. 13, p. 2263–2283, 2011.

36 KATEBI, A. R.; JERNIGAN, R. L. Aldolases utilize different oligomeric states to preserve their functional dynamics. **Biochemistry**, v. 54, n. 22, p. 3543–3554, 2015.

37 SERAFIMOV, M.; GILLINGHAM, D.; KUSTER, S.; HILVERT, D. The putative diels - alderase macrophomate synthase is an efficient aldolase. **Journal of American Chemical Society**, v. 130, p. 7798–7799, 2008.

38 GILLINGHAM, D. G.; STALLFORTH, P.; ADIBEKIAN, A.; SEEBERGER, P. H.; HILVERT, D. Chemoenzymatic synthesis of differentially protected 3-deoxysugars. **Nature chemistry**, v. 2, n. 2, p. 102–105, 2010.

39 JENNEWEIN, S.; SCHÜRMANN, M.; WOLBERG, M.; HILKER, I.; LUITEN, R.; WUBBOLTS,
M.; MINK, D. Directed evolution of an industrial biocatalyst : 2-Deoxy- D -ribose 5-phosphate aldolase.
Biotechnology Journal, v. 1, p. 537–548, 2006.

40 LÓPEZ-IGLESIAS, M.; GOTOR-FERNÁNDEZ, V. Recent advances in biocatalytic promiscuity: hydrolase-catalyzed reactions for nonconventional transformations. **Chemical Record**, v. 15, n. 4, p. 743–759, 2015.

41 GUAN, Z.; FU, J.; HE, Y. Biocatalytic promiscuity: lipase-catalyzed asymmetric aldol reaction of heterocyclic ketones with aldehydes. **Tetrahedron Letters**, v. 53, p. 4959–4961, 2012.

42 LI, H.; HE, Y.; GUAN, Z. Protease-catalyzed direct aldol reaction. **Catalysis Communications**, v. 12, n. 7, p. 580–582, 2011.

43 CHEN, Y.; LI, W.; LIU, Y.; GUAN, Z.; HE, Y. Trypsin-catalyzed direct asymmetric aldol reaction. Journal of Molecular Catalysis. B: enzymatic, v. 87, n. 12880, p. 83–87, 2013.

44 HE, Y.; LI, H.; CHEN, Y.; XUE, Y.; YUAN, Y.; GUAN, Z. Chymopapain-catalyzed direct asymmetric aldol reaction. Advanced Synthesis & Catalysis, v. 354, p. 712–719, 2012.

45 FU, J.; GAO, N.; YANG, Y.; GUAN, Z.; HE, Y. Ficin-catalyzed asymmetric aldol reactions of heterocyclic ketones with aldehydes. **Journal of Molecular Catalysis. B, Enzymatic**, v. 97, p. 1–4, 2013.

46 XIE, B.; LI, W.; LIU, Y.; LI, H.; GUAN, Z.; HE, Y. The enzymatic asymmetric aldol reaction using acidic protease from *Aspergillus usamii*. **Tetrahedron**, v. 68, n. 15, p. 3160–3164, 2012.

47 YUAN, Y.; GUAN, Z.; HE, Y. Biocatalytic direct asymmetric aldol reaction using proteinase from *Aspergillus melleus*. Science China Chemistry, v. 56, n. 7, p. 939–944, 2013.

48 LI, H.-H.; HE, Y.-H.; YUAN, Y.; GUAN, Z. Nuclease p1: A new biocatalyst for direct asymmetric aldol reaction under. **Green Chemistry**, v. 13, p. 185–189, 2011.

49 MIAO, Y.; RAHIMI, M.; GEERTSEMA, E. M.; POELARENDS, G. J. Recent developments in enzyme promiscuity for carbon–carbon bond-forming reactions. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 25, p. 115–123, 2015.

50 BRANNEBY, C.; CARLQVIST, P.; MAGNUSSON, A.; HULT, K.; BRINCK, T.; BERGLUND, P. Carbon–Carbon bonds by hydrolytic enzymes. **Journal of American Chemical Society**, v. 125, p. 874–875, 2002.

51 JAEGER, K.-E.; RANSAC, S.; DIJKSTRA, B. W.; COLSON, C.; HEUVEL, M. VAN; MISSET,O. Bacterial lipases. FEMS Microbiology Reviews, v. 15, n. 1, p. 29–63, 1994.

52 KLÄHN, M.; LIM, G. S.; SEDURAMAN, A.; WU, P. On the different roles of anions and cations in the solvation of enzymes in ionic liquids. **Physical Chemistry Chemical Physics**, v. 13, n. 4, p. 1649–1662, 2011.

53 BENITO-GALLO, P.; FRANCESCHETTO, A.; WONG, J. C. M.; MARLOW, M.; ZANN, V.; SCHOLES, P.; GERSHKOVICH, P. Chain length affects pancreatic lipase activity and the extent and pH–time profile of triglyceride lipolysis. **European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics**, v. 93, p. 353–362, 2015.

54 EREMEEV, N. L.; ZAITSEV, S. Y. Porcine pancreatic lipase as a catalyst in organic synthesis. **Mini-Reviews in Organic Chemistry**, v. 13, n. 1, p. 78–85, 2016.

55 LIMA, R. N.; DOS ANJOS, C. S.; OROZCO, E. V. M.; PORTO, A. L. M. Versatility of candida antarctica lipase in the amide bond formation applied in organic synthesis and biotechnological processes. **Molecular Catalysis**, v. 466, p. 75–105, 2019.

56 LI, C.; FENG, X.; WANG, N.; ZHOU, Y.; YU, X. Biocatalytic promiscuity: the first lipase-catalysed asymmetric aldol reaction. **Green Chemistry**, v. 10, p. 616–618, 2008.

57 ZHANG, Y.; WANG, N.; XIE, Z. B.; ZHOU, L. H.; YU, X. Q. Ionic liquid as a recyclable and efficient medium for lipase-catalyzed asymmetric cross aldol reaction. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, v. 110, p. 100–110, 2014.

58 BAAS, B.; ZANDVOORT, E.; GEERTSEMA, E. M.; POELARENDS, G. J. Recent advances in the study of enzyme promiscuity in the tautomerase superfamily. **ChemBioChem**, v. 14, p. 917–926, 2013.

59 GONZÁLEZ-MARTÍNEZ, D.; GOTOR, V.; GOTOR-FERNÁNDEZ, V. Application of deep eutectic solvents in promiscuous lipase-catalysed aldol reactions. **European Journal of Organic Chemistry**, v. 1, p. 1513–1519, 2016.

60 BIROLLI, W. G.; FONSECA, L. P.; PORTO, A. L. M. Aldol reactions by lipase from *Rhizopus niveus*, an example of unspecific protein catalysis. **Catalysis Letters**, v. 147, n. 8, p. 1977–1987, 2017.

61 LAEMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, n. 5259, p. 680–685, 1970.

62 DZIEDZIC, P.; BARTOSZEWICZ, A.; CÓRDOVA, A. Inorganic ammonium salts as catalysts for direct aldol reactions in the presence of water. **Tetrahedron Letters**, v. 50, n. 52, p. 7242–7245, 2009.

63 STILES, M.; WINKLER, R. R.; CHANG, Y.-L.; TRAYNOR, L. Stereochemical assignments for β -ketols formed by aldol addition of three simple ketones to *p*-nitrobenzaldehyde. Journal of the American Chemical Society, v. 9, n. 86, p. 3337, 1964.

64 HOUSE, H. O.; CRUMRINE, D. S.; TERANISHI, A. Y.; OLMSTEAD, H. D. Chemistry of carbanions. XXIII. Use of metal complexes to control the aldol condensation. Journal of the American Chemical Society, v. 95, n. 3, p. 3310–3324, 1973.

65 MUKAIYAMA, T.; BANNO, K.; NARASAKA, K. New cross-aldol reactions. Reactions of silyl enol ethers with carbonyl compounds activated by titanium tetrachloride. **Journal of the American Chemical Society**, v. 96, n. 24, p. 7503–7509, 1974.

66 CHEN, J.-R.; LU, H.-H.; LI, X.-Y.; CHENG, L.; WAN, J.; XIAO, W. Readily tunable and bifunctional *L*-prolinamide derivatives : Design and application in the direct enantioselective aldol reactions. Supporting Information. **Organic letters**, v. 7, n. 20, p. 4543–4545, 2005.

67 ZHENG, J.; CHEN, Y.-L.; CAO, J.-F.; YANG, Y.; GUAN, Z.; HE, Y.-H.; XIE, B.-H. Direct asymmetric aldol reactions catalyzed by lipase from porcine pancreas. **Journal of Biosciences-Section C**, v. 69 C, p. 170–180, 2014.

68 MASE, N.; NAKAI, Y.; OHARA, N.; YODA, H.; TAKABE, K.; TANAKA, F.; BARBAS, C. F. Organocatalytic direct asymmetric aldol reactions in water. Journal of the American Chemical Society, v. 128, n. 3, p. 734–735, 2006.

69 LI, J.; YANG, G.; QIN, Y.; YANG, X.; CUI, Y. Recyclable Merrifield resin-supported thiourea organocatalysts derived from 1-proline for direct asymmetric aldol reaction. **Tetrahedron Asymmetry**, v. 22, n. 6, p. 613–618, 2011.

70 WU, Y.; ZHANG, Y.; YU, M.; ZHAO, G.; WANG, S. Highly efficient and reusable dendritic catalysts derived from *N*-prolylsulfonamide for the asymmetric direct aldol reaction in water. **Organic Letters**, v. 8, n. 20, p. 4417–4420, 2006.

71 GAO, J.; BAI, S.; GAO, Q.; LIU, Y.; YANG, Q. Acid controlled diastereoselectivity in asymmetric aldol reaction of cycloketones with aldehydes using enamine-based organocatalysts. **Chemical Communications**, v. 47, n. 23, p. 6716–6718, 2011.

72 MARTÍNEZ-CASTAÑEDA, Á.; RODRÍGUEZ-SOLLA, H.; CONCELLÓN, C.; DEL AMO, V. Switching diastereoselectivity in proline-catalyzed aldol reactions. **Journal of Organic Chemistry**, v. 77, n. 22, p. 10375–10381, 2012.

73 LIN, J. H.; ZHANG, C. P.; XIAO, J. C. Enantioselective aldol reaction of cyclic ketones with aryl aldehydes catalyzed by a cyclohexanediamine derived salt in the presence of water. **Green Chemistry**, v. 11, n. 11, p. 1750–1753, 2009.

74 SEGURA, R. L.; PALOMO, J. M.; A. CORTES, C. M.; TERRENI, M.; FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R.; GUISAN, J. M. Different properties of the lipases contained in porcine pancreatic lipase extracts as enantioselective biocatalysts. **Biotechnology Progress**, v. 20, n. 3, p. 825–829, 2004.

75 ZHOU, Y.; HU, C.; WANG, N.; ZHANG, W.; YU, X. Purification of porcine pancreatic lipase by aqueous two-phase systems of polyethylene glycol and potassium phosphate. **Journal of Chromatography B**, v. 926, p. 77–82, 2013.

76 JURADO, E.; CAMACHO, F.; LUZÓN, G.; FERNÁNDEZ-SERRANO, M.; GARCÍA-ROMÁN, M. Kinetics of the enzymatic hydrolysis of triglycerides in o/w emulsions. Study of the initial rates and the reaction time course. **Biochemical Engineering Journal**, v. 40, p. 473–484, 2008.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO INSTITUTO DE QUÍMICA DE SÃO CARLOS

Capítulo 2

Atividade promíscua das lipases de pâncreas porcino tipo—II e de *Pseudomonas fluorescens* na síntese de 2*H*-cromenonas e biotransformação de 2*H*-cromenonas por fungos de origem marinha

Erika Vanessa Meñaca Orozco

Orientador: Prof. Dr. André Luiz Meleiro Porto

São Carlos 2019

RESUMO

No Capítulo 2 é apresentada a síntese de 2H-cromenonas, compostos encontrados amplamente em produtos naturais e destacados pelas suas propriedades biológicas e aplicações como materiais fotoativos. A reação entre a 1,3-cicloexanodiona 1a e o crotonaldeído 2a catalisada pela PPL-II foi estudada através de planejamento fatorial completo 2⁴ com o intuito de identificar as variáveis (massa de PPL-II, equivalentes molares dos reagentes 1a e 2a, porcentagem de água e temperatura) que mais influenciaram nos rendimentos e nas seletividades entre os produtos 2H-cromenonas 3a, 4a e 5a. Estas cromenonas foram produzidas por diferentes vias de reação, pela adição conjugada-1,2 levando à 2Hcromenona **3a** ou pela adição conjugada-1,4 levando à 2-hidroxi-2*H*-cromenona **4a** ou por uma mistura das duas vias de reacão levando à 2H-cromenona **5a**. O uso desta metodologia permitiu uma compreensão mais completa deste sistema de reação através da identificação das variáveis que tiveram maior influência sobre os rendimentos das 2H-cromenonas 3a,4a e 5a. Foi possível identificar que presenca de PPL-II não exerceu influencia na produção das 2H-cromenonas 3a e 5a, mas foi significativa na produção da 2-hidroxi-2*H*-cromenona **4a**. Desta maneira foram escolhidas as variáveis massa de PPL-II e a temperatura para um ajuste fino das condições de reação aplicando o planejamento de composto central. A melhor condição encontrada por esta metodologia (20 mg/0,1 mmol da 1,3cicloexanodiona 1a e 50 °C) foi aplicada com outros aldeídos α , β -insaturados 2a-e que forneceram as 2H-cromenonas **4a-e** em rendimentos entre 8-22%, favorecendo os diastereoisômeros anti, porém, sem enantiosseletividades. A reação entre a 1,3-cicloexanodiona 1a e o crotonaldeído 2a catalisada pela FPL forneceu o melhor rendimento para a 2-hidroxi-2H-cromenona 4a (93%) nas condições de reação otimizadas, as quais foram o uso de CH₂Cl₂ com 10% de água como solvente a 30 °C e 24 h. O produto 2H-cromenona 4a foi obtido mesmo com a enzima inativada pela temperatura (>90 °C), constatando que a LPF realizou uma catálise proteica inespecífica. Portanto, a LPF constitui um excelente catalisador na síntese de 2-hidroxi-2H-cromenonas como a 4a, de forma que o escopo da reação foi ampliado por variação do aldeído α , β -insaturado **2a-c** e as β -dicetonas cíclicas **1a-d**, fornecendo rendimentos entre 37 e 93% para as 2-hidroxi-2*H*-cromenonas **4a-c** e **4e-h**, porém sem enantiosseletividades. Adicionalmente, a 2H-cromenona 4a foi utilizada como substrato na reação de biotransformação por células totais de fungos de ambiente marinho (Mucor racemosus CBMAI 847, Aspergillus sydowii CBMAI 934, Aspergillus sydowii CBMAI 935, Penicillium citrinum CBMAI 1185, Penicillium citrinum CBMAI 1186 e Cladosporium sp. CBMAI 1237). Foi obtido o produto 6 em conversões entre 73 e 99%, resultado de uma reação de redução da ligação dupla conjugada, provavelmente pela ação de enzimas eneredutases. Estes resultados possibilitaram a aplicação de enzimas na formação da ligação carbonocarbono através de metodologias biocatalíticas.

ABSTRACT

Chapter 2 presents the synthesis of 2H-chromenones, a type of compounds widely distributed in nature and important for their biological properties and applications in photoactive materials. The reaction using 1,3-cyclohexanodione 1a and crotonaldehyde 2a catalyzed by PPL-II was studied using a complete factorial design 2⁴ in order to identify the variables (PPL-II mass, molar equivalents of reagents 1a and 2a, percentage of water and temperature) that influenced the most in the yields and selectivities among 2H-chromenone products 3a, 4a and 5a. Different reaction pathways produced these 2Hchromenones. The 1,2-conjugated addition afforded 2H-chromenone 3a; 1,4-conjugated addition formed 2-hydroxy-2*H*-chromenone **4a** and both 1,2 and 1,4-additions taking place on α , β -unsatured aldehyde 1a resulted in 2*H*-chromenone 5a. This methodology gave a complete understanding of this reaction system by identifying the most influential variables on 2*H*-chromenone **3a**, **4a** and **5a** yields. It was possible to identify that the presence of PPL-II did not influence the production of 2H-chromenones **3a** and **5a**, but it was significant in the production of 2*H*-chromenone **4a**. Thus, the mass of PPL-II and temperature were the variables selected to fine-tune the reaction conditions applying Central Composite Design. The best condition (20 mg/0.1 mmol of 1,3-cyclohexanedione 1a and 50 °C) was used to extent the scope of the reaction to other α,β -unsaturated aldehydes **2a-e** that resulted in 2*H*-chromenones **4a-e** with yields 8-22%, and favored the anti diastereoisomers, nonetheless without enantioselectivities. LPF catalyzed the Michael addition of 1,3-cyclohexanodione **1a** to crotonaldehyde **2a** providing the major product 2H-chromenone 4a (93%) in reaction conditions optimized (CH₂Cl₂, H₂O-10%, 30 °C and 24 h). 2H-chromenone 4a product was observed even with the enzyme was inactivated by temperature (> 90 °C), showing that LPF performed a nonspecific protein catalysis. LPF showed to be an excellent catalyst in the synthesis of 2-hydroxy-2H-chromenones, for example, 4a, so we expand the scope of the reaction by varying α,β -unsaturated aldehyde **2a-c** and cyclic β -diketones **1a-d**. 2-hydroxy-2H-Chromenones 4a-c and 4e-h were obtained in yield 37-93%, however, without enantioselectivity. In addition, the biotransformation reaction of 2-hydroxy-2H-cromenone 4a was carried out by cells of marine derived-fungi (Mucor racemosus CBMAI 847, Aspergillus sydowii CBMAI 934, Aspergillus sydowii CBMAI 935, Penicillium citrinum CBMAI 1185, Penicillium citrinum CBMAI 1186 and Cladosporium sp. CBMAI 1237), resulting in the product 6 with conversions ranging 73-99% by enereductases. To conclude, with this work is demonstrated the importance of using promiscuous enzymes in organic synthesis in the carbon-carbon bond formation as an efficient biocatalytic methodology.

LISTA DE FIGURAS

| Figura 2.1. Exemplos de núcleos cromenonas na estrutura de produtos naturais |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Figura 2.2. Estruturas químicas de sistemas cromano, 2 <i>H</i> -cromeno, 4 <i>H</i> -cromeno e os derivados saturados |
| Figura 2.3. Ordem de reatividade na adição de Michael em sistemas carbonílicos α , β -insaturados. 123 |
| Figura 2.4. Modelo de ataque proposto por Li et al. para a adição de Michael de β-dionas a cinamonas catalisada por 9-amino(9-deoxi)- <i>epi</i> -quinina |
| Figura 2.5. Planejamento composto central com duas variáveis e α=2, (■) planejamento fatorial, (▲) pontos axiais e (●) ponto central |
| Figura 2.6. Método de análise por HPLC-UV aquiral para as reações de formação de 2 <i>H</i> -cromenonas 3a-e, 4a-i e 5a-e |
| Figura 2.7. Etapas experimentais envolvidas na biotransformação da 2-hidroxi-2 <i>H</i> -cromenona 4a para a triagem dos fungos de ambiente marinho |
| Figura 2.8. Porcentagem dos efeitos das variáveis e suas interações obtidas via planejamento fatorial |
| completo 2^4 . (A) probabilidade dos efeitos em influenciar no rendimento de cada produto 2 <i>H</i> -cromenona |
| 3a, 4a e 5a na reação entre a 1,3-cicloexanodienona 1a e o crotonaldeído 2a na presença da PPL-II (B). |
| Figura 2.9. Configuração dos experimentos do planejamento de composto central para a formação da |
| 2-hidroxi-2 <i>H</i> -cromenona 4a a partir da reação entre a 1,3-cicloexanodienona 1a e o crotonaldeído 2a na |
| presença da PPL-II, variando-se a massa de enzima e a temperatura |
| Figura 2.10. Gráfico de superfície de resposta modelando o rendimento da 2-hidroxi-2 <i>H</i> -cromenona 4a |
| na reação entre a 1,3-cicloexanodiona 1a e o crotonaldeído 2a na presença da PPL-II, variando-se a |
| massa da enzima e a temperatura |
| Figura 2.11. Valores residuais do modelo gerado pelo planejamento de composto central em função da |
| conversão da 2-hidroxi-2 <i>H</i> -cromenona 4a na reação entre a 1,3-cicloexanodienona 1a e o crotonaldeído |
| 2a na presença da PPL-II |

Figura 2.17. Gráfico do monitoramento da formação das 2*H*-cromenonas **3a**, **4a** e **5a** ao longo do tempo de reação entre a 1,3-cicloexanodienona **1a** e o crotonaldeído **2a** na presença e ausência de PPL-II. 180

Figura 2.19. Cromatogramas obtidos por HPLC-UV dos produtos 2*H*-cromenonas 3a-f, 4a-f e 5a-f obtidas da reação entre as β -dicetonas cíclicas 1a-b e os aldeídos α , β -insaturados 2a-f na presença da PPL-II.

| Figura 2.24. Proporções tautoméricas encontradas por RMN de ¹ H em uma amostra de (<i>S</i>)-Warfarina. |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Figura 2.25. Tautômeros da 2-hidroxi-2 <i>H</i> -cromenona 4a |
| Figura 2.26. Conformações mais estáveis dos diastereoisômeros anti-4a e syn-4a 199 |
| Figura 2.27. (A) Espectro de RMN de ¹ H (400 MHz, CDCl ₃) dos compostos diastereoisômeros <i>anti e syn</i> da 2-hidroxi-2 <i>H</i> -cromenona 4a. (B) Expansão das regiões espectrais 5,35-5,44 ppm, 2,25-2,45 ppm, 1,65-2,05 ppm e 1,00-1,30 ppm. 200 |
| Figura 2.28. (A) Espectro de RMN de ¹³ C (100 MHz, CDCl ₃) dos compostos isoméricos <i>anti</i> e <i>syn</i> -2- hidroxi-2 <i>H</i> -cromenonas 4a . (B) Expansões da região espectral de 19-39 ppm |
| Figura 2.29. (A) Espectro de RMN de ¹ H (500 MHz, CDCl ₃) do composto 2 <i>H</i> -cromenona 3a . (B) Expansão da regiões espectrais 6,42-6,47 ppm, 5,26-5,32 ppm, 4,98-5,06 ppm, 2,30-2,55 ppm, 1,90-2,05 ppm. 204 |
| Figura 2.30. Espectro de RMN de ¹³ C (126 MHz, CDCl ₃) do composto 2 <i>H</i> -cromenona 3a 205 |
| Figura 2.31. Gráfico comparativo das conversões das 2 <i>H</i> -cromenonas 3a , 4a , e 5a obtidas da reação entre a 1,3-cicloexanodiona 1a e o crotonaldeído 2a sob a catálise com a LPF e PPL-II a (A) 30 °C e (B) 50 °C. |
| Figura 2.32. Cromatograma obtido por HPLC-UV do produto 4a obtido da reação entre a 1,3- cicloexanodiona 1a e o crotonaldeído 2a catalisada pela LPF |
| Figura 2.33. Cromatograma obtido por HPLC-UV da reação catalisada pela LPF (A) <i>in natura</i> (B) desnaturada a 90 °C |
| Figura 2.34. Cromatogramas obtidos por HPLC-UV das reaçãoes de biotransformação da 2-hidroxi- 2 <i>H</i> -cromenona 4a realizadas por fungos de ambiente marinho |
| Figura 2.35. (A) Espectro de RMN de ¹³ C (101 MHz, CDCl ₃) do diastereoisômeros do composto 6 . (B) Espectro de RMN de ¹³ C (126 MHz, CDCl ₃) do diastereoisômero do composto 4a |
| Figura 2.36. (a) Espectro de RMN de ¹ H (400 MHz, CDCl ₃) do composto 6. (b) Espectro de RMN de ¹ H (500 MHz, CDCl ₃) do composto 4a |
| Figura 2.37. Expansão das regiões espectrais 3,94-4,10 ppm, 3,56-3,68 ppm, 1,80-2,40 ppm e 1,20-1,70 ppm do espectro de RMN de ¹ H (500 MHz, CDCl ₃) do composto 6 |

| Figura 2.38. Estruturas químicas dos estereoisômeros mais estáveis do produto de biotransformação 6. |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Figura 2.39. Transformação química espontânea do composto 6 ao composto 7 |
| Figura 2.40. Cromatograma do produto de biotransformação 6 obtido por HPLC-UV quiral |
| Figura 2.41. (A) Espectro de RMN de ¹³ C (101 MHz, CDCl ₃) do composto 7 . (B) Expansão da região espectral 19-39 ppm |
| Figura 2.42. Espectro de RMN de ¹ H (400 MHz, CDCl ₃) do composto 7 . (b) Expansão das regiões espectrais 3,95-4,25 ppm, 2,25-2,85 ppm e 1,52-1,97 ppm |
| Figura 2.43. Espectro de absorção na região de infravermelho (KBr) da (±)-2-metil-2,6,7,8-tetraidro- 5H-cromen-5-ona 3a. |
| Figura 2.44. Espectro de RMN de ¹ H (500 MHz, CDCl ₃) da (±)-2-metil-2,6,7,8-tetraidro-5 <i>H</i> -cromen- 5-ona 3a |
| Figura 2.45. Espectro de RMN de ¹³ C (126 MHz, CDCl ₃) da (±)-2-metil-2,6,7,8-tetraidro-5 <i>H</i> -cromen- 5-ona 3a |
| Figura 2.46. Espectro de massas para a (±)-2-metil-2,6,7,8-tetraidro-5 <i>H</i> -cromen-5-ona 3a |
| Figura 2.47. Espectro de RMN de ¹ H (400 MHz, CDCl ₃) da (±)-2-etil-2,6,7,8-tetraidro-5 <i>H</i> -cromen-5- ona 3b |
| Figura 2.48. Espectro de RMN de ¹³ C (101 MHz, CDCl ₃) da (±)-2-etil-2,6,7,8-tetraidro-5 <i>H</i> -cromen-5- ona 3b |
| Figura 2.49. Espectro de massas para a (±)-2-etil-2,6,7,8-tetraidro-5 <i>H</i> -cromen-5-ona 3b 239 |
| Figura 2.50. Espectro de RMN de ¹ H (400 MHz, CDCl ₃) da (±)-2-propil-2,6,7,8-tetraidro-5 <i>H</i> -cromen- 5-ona 3c |
| Figura 2.51. Espectro de RMN de ¹³ C (101 MHz, CDCl ₃) da (±)-2-propil-2,6,7,8-tetraidro-5 <i>H</i> -cromen- 5-ona 3c |
| Figura 2.52. Espectro de massas para a (±)-2-propil-2,6,7,8-tetraidro-5H-cromen-5-ona 3c |
| Figura 2.53. Espectro de RMN de ¹ H (400 MHz, CDCl ₃) da (±)-2,3-dimetil-2,6,7,8-tetraidro-5 <i>H</i> - cromen-5-ona 3d |

| Figura 2.54. Espectro de RMN de ¹³ C (101 MHz, CDCl ₃) da (±)-2,3-dimetil-2,6,7,8-tetraidro-5 <i>H</i> - |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| cromen-5-ona 3d |
| |
| Figura 2.55. Espectro de massas para a (\pm) -2,3-dimetil-2,6,7,8-tetraidro-5 <i>H</i> -cromen-5-ona 3d 242 |
| Figura 2.56. Espectro de RMN de ¹ H (400 MHz, CDCl ₃) da 2,2-dimetil-2,6,7,8-tetraidro-5 <i>H</i> -cromen- |
| 5-ona 3e |
| |
| Figura 2.57. Espectro de RMN de ¹³ C (126 MHz, CDCl ₃) da 2,2-dimetil-2,6,7,8-tetraidro-5 <i>H</i> -cromen- |
| 5-ona 3e |
| Figura 2.58. Espectro de massas para a 2,2-dimetil-2,6,7,8-tetraidro-5 <i>H</i> -cromen-5-ona 3e |
| Figura 2.59. Espectro de absorção na região de infravermelho (KBr) da (±)-2-hidroxi-4-metil- |
| 2,3,4,6,7,8-hexaidro-5 <i>H</i> -cromen-5-ona 4a |
| |
| Figura 2.60. Espectro de RMN de 1 H (400 MHz, CDCl ₃) da (±)-2-hidroxi-4-metil-2,3,4,6,7,8-hexaidro- |
| 5 <i>H</i> -cromen-5-ona 4a |
| Figura 2.61. Espectro de RMN de 13 C (101 MHz, CDCl ₃) da (±)-2-hidroxi-4-metil-2.3.4.6.7.8-hexaidro- |
| 5 <i>H</i> -cromen-5-ona 4a |
| |
| Figura 2.62. Espectro de massas para a (±)-2-hidroxi-4-metil-2,3,4,6,7,8-hexaidro-5 <i>H</i> -cromen-5-ona |
| 4a |
| Figure 2.63 Crometograme obtide por HDLC LW com colume quiral Phonomeney LUX® (250 mm y |
| Figura 2.05. Cromatograma oblido por HPLC-UV com coluna quirar Phenomenex LUX® (250 mm x 4.6 mm 5 mm) da (1) 2 hidravi 4 matil 2.2.4.6.7.8 havaidra 5 <i>U</i> araman 5 and 4a |
| 4,0 mm, 5 μ m) da (±)-2-maroxi-4-mem-2,5,4,6,7,8-mexaldro-3 <i>m</i> -cromen-3-ona 4a |
| Figura 2.64. Espectro de RMN de ¹ H (500 MHz, CDCl ₃) da (\pm) -4-etil-2-hidroxi-2,3,4,6,7,8-hexaidro- |
| 5 <i>H</i> -cromen-5-ona 4b |
| |
| Figura 2.65. Espectro de RMN de 13 C (126 MHz, CDCl ₃) da (±)-4-etil-2-hidroxi-2,3,4,6,7,8-hexaidro- |
| 5 <i>H</i> -cromen-5-ona 4b |
| Figura 2.66. Espectro de massas de alta resolução obtido para a (±)-4-etil-2-hidroxi-2.3.4.6.7.8- |
| hexaidro-5 <i>H</i> -cromen-5-ona 4b |
| |
| Figura 2.67. Cromatograma obtido por HPLC-UV com coluna quiral Phenomenex LUX [®] (250 mm x |
| 4,6 mm, 5 μ m) da (±)-4-etil-2-hidroxi-2,3,4,6,7,8-hexaidro-5 <i>H</i> -cromen-5-ona 4b |
| Figura 2.68 Espectro de RMN de ¹ H (400 MHz CDCla) da (+)-2-hidrovi-4-propil 2.3.4.6.7.8 |
| hexaidro-5 <i>H</i> -cromen-5-ona $4c$ 240 |
| xcix |

| Figura 2.69. Espectro de RMN de ${}^{13}C$ (101 MHz, CDCl ₃) da (±)-2-hidroxi-4-propil-2,3,4,6,7,8- |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| hexaidro-5 <i>H</i> -cromen-5-ona 4 c |
| Figura 2.70. Espectro de massas de alta resolução obtido para a (±)-2-hidroxi-4-propil-2,3,4,6,7,8- |
| hexaidro-5 <i>H</i> -cromen-5-ona 4 c |
| Figura 2.71. Cromatograma obtido por HPLC-UV com coluna quiral Phenomenex LUX [®] (250 mm x |
| 4,6 mm, 5 μm) da (±)-2-hidroxi-4-propil-2,3,4,6,7,8-hexaidro-5 <i>H</i> -cromen-5-ona 4c |
| Figura 2.72. Espectro de RMN de ¹ H (400 MHz, CDCl ₃) da (±)-2-hidroxi-3,4-dimetil-2,3,4,6,7,8- |
| hexaidro-5 <i>H</i> -cromen-5-ona 4d |
| Figura 2.73. Espectro de RMN de ¹³ C (101 MHz, CDCl ₃) da (±)-2-hidroxi-3,4-dimetil-2,3,4,6,7,8- |
| hexaidro-5 <i>H</i> -cromen-5-ona 4d |
| Figura 2.74. Espectro de RMN de ¹ H (500 MHz, CDCl ₃) da (±)-2-hidroxi-4,8,8-trimetil-2,3,4,6,7,8- |
| hexaidro-5 <i>H</i> -cromen-5-ona 4f |
| Figura 2.75. Espectro de RMN de ¹³ C (126 MHz, CDCl ₃) da (±)-2-hidroxi-4,8,8-trimetil-2,3,4,6,7,8- |
| hexaidro-5 <i>H</i> -cromen-5-ona 4f |
| Figura 2.76. Cromatograma obtido por HPLC-UV com coluna quiral Phenomenex LUX [®] (250 mm x |
| 4,6 mm, 5 μm) da (±)-2-hidroxi-4,8,8-trimetil-2,3,4,6,7,8-hexaidro-5 <i>H</i> -cromen-5-ona 4f |
| Figura 2.77. Espectro de RMN de ¹ H (400 MHz, CDCl ₃) da (±)-2-hidroxi-4,7,7-trimetil-2,3,4,6,7,8- |
| hexaidro-5 <i>H</i> -cromen-5-ona 4g |
| Figura 2.78. Espectro de RMN de 13 C (101 MHz, CDCl ₃) da (±)-2-hidroxi-4,7,7-trimetil-2,3,4,6,7,8- |
| hexaidro-5 <i>H</i> -cromen-5-ona 4g |
| Figura 2.79. Cromatograma obtido por HPLC-UV com coluna quiral Phenomenex LUX [®] (250 mm x |
| 4,6 mm, 5 μ m) da (±)-2-hidroxi-4,7,7-trimetil-2,3,4,6,7,8-hexaidro-5 <i>H</i> -cromen-5-ona 4g |
| Figura 2.80. Espectro de RMN de ¹ H (400 MHz, CDCl ₃) da (\pm) -2-hidroxi-4-metil-7-fenil-2.3.4.6.7.8- |
| hexaidro-5 <i>H</i> -cromen-5-ona 4h |
| Figura 2.81. Espectro de RMN de 13 C (101 MHz CDCl ₃) da (+)-2-hidroxi-4-metil-7-fenil-2.3.4.6.7.8- |
| hexaidro-5 <i>H</i> -cromen-5-ona 4h |
| Figure 2.82 Cromatograma obtido por HPI C-UV com coluna quiral Phenomenes I UX [®] (250 mm s |
| 4.6 mm, 5 μ m) da (±)-2-hidroxi-4-metil-7-fenil-2.3.4.6.7.8-hexaidro-5 <i>H</i> -cromen-5-ona 4h |
| |

| Figura 2.83. Espectro de RMN de ¹ H (400 MHz, CDCl ₃) da (±)-7-(4-clorofenil)-2-hidroxi-4-metil- |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 2,3,4,6,7,8-hexaidro-5 <i>H</i> -cromen-5-ona 4i |
| |
| Figura 2.84. Espectro de RMN de ¹³ C (101 MHz, CDCl ₃) da (\pm) -7-(4-clorofenil)-2-hidroxi-4-metil- |
| 2,3,4,6,7,8-hexaidro-5 <i>H</i> -cromen-5-ona 4i |
| Figura 2.85. Cromatograma obtido por HPLC-UV com coluna quiral Phenomenex LUX [®] (250 mm x |
| 4,6 mm, 5 μ m) da (±)-7-(4-clorofenil)-2-hidroxi-4-metil-2,3,4,6,7,8-hexaidro-5 <i>H</i> -cromen-5-ona 4i .257 |
| |
| Figura 2.86. Espectro de absorção na região de infravermelho (KBr) da (±)-2-(2-hidroxi-6-oxo-1- |
| cicloexen-1-il)-4-metil-2,3,4,6,7,8-hexaidro-5 <i>H</i> -cromen-5-ona 5a |
| Figure 2.87 Espectre de DMN de ¹ H (400 MHz, CDCL) de (1) 2 (2 hidroxi 6 exe 1 ejeleeven 1 i) |
| Figura 2.67. Espectito de Rivil de H (400 MHz, CDCI3) da (\pm) -2-(2-indroxi-0-0x0-1-cicroexen-1-ii)- 4 metil 2.3.4.6.7.8 haveidro 5 <i>H</i> gromon 5 one 5 and 5 an |
| 4-meth-2,3,4,0,7,8-nexalul0-371-c10men-3-0na 3a |
| Figura 2.88. Espectro de RMN de ¹³ C (101 MHz, CDCl ₃) da (±)-2-(2-hidroxi-6-oxo-1-cicloexen-1-il)- |
| 4-metil-2,3,4,6,7,8-hexaidro-5 <i>H</i> -cromen-5-ona 5a |
| |
| Figura 2.89. Espectro de massas da (±)-2-(2-hidroxi-6-oxo-1-cicloexen-1-il)-4-metil-2,3,4,6,7,8- |
| hexaidro-5 <i>H</i> -cromen-5-ona 5a |
| Figura 2.90. Cromatograma obtido por HPLC-UV com coluna quiral Phenomenex LUX [®] (250 mm x |
| 4,6 mm, 5 μ m) da (±)-2-(2-hidroxi-6-oxo-1-cicloexen-1-il)-4-metil-2,3,4,6,7,8-hexaidro-5 <i>H</i> -cromen-5- |
| ona 5a |
| |
| Figura 2.91. Espectro de RMN de ¹ H (500 MHz, CDCl ₃) da (±)-4-etil-2-(2-hidroxi-6-oxo-1-cicloexen- |
| 1-il)-2,3,4,6,7,8-hexaidro-5 <i>H</i> -cromen-5-ona 5 b |
| Figure 2.92 Espectro de PMN de ${}^{13}C$ (126 MHz CDCL) de (+) 4 etil 2 (2 hidroxi 6 ovo 1 cicloeven |
| Figura 2.32. Espectio de Kivil de C (120 Milz, CDCi3) da (\pm) -4-etil-2-(2-maroxi-0-oxo-1-cicloexen- 1 il) 2.3.4.6.7.8 havaidro 5 <i>H</i> groman 5 one 5 h |
| 1-11 <i>j</i> -2,5,4,0,7,8-11exalur0-511-croinen-5-0ila 50 |
| Figura 2.93. Espectro de massas para a (±)-4-etil-2-(2-hidroxi-6-oxo-1-cicloexen-1-il)-2,3,4,6,7,8- |
| hexaidro-5 <i>H</i> -cromen-5-ona 5b |
| |
| Figura 2.94. Espectro de RMN de 'H (400 MHz, $CDCl_3$) da (±)-2-(2-hidroxi-6-oxocicloex-1-en-1-il)- |
| 4-propil-2,3,4,6,7,8-hexaidro-5 <i>H</i> -cromen-5-ona 5c |
| Figura 2.95. Espectro de RMN de ${}^{13}C$ (101 MHz, CDCl ₃) da (±)-2-(2-hidroxi-6-oxocicloex-1-en-1-il)- |
| 4-propil-2,3,4,6,7,8-hexaidro-5 <i>H</i> -cromen-5-ona 5 c |
| |

| Figura 2.96. Espectro de massas para a (±)-2-(2-hidroxi-6-oxocicloex-1-en-1-il)-4-propil-2,3,4,6 | ,7,8- |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------|-------|
| hexaidro-5 <i>H</i> -cromen-5-ona 5 c. | 263 |
| | |
| Figura 2.97. Curva analítica para a determinação da conversão do produto de biotransformação d | la 2- |
| hidroxi-2 <i>H</i> -cromenona 4a pelos fungos de origem marinha | 263 |
| | |
| Figura 2.98. Curva analítica para a estimativa da concentração de proteína pelo método de Lo | owry |
| modificado | 264 |

LISTA DE TABELAS

| Tabela 2.1. Estudo das condições de reação entre 2-hidroxinaftoquinonas e aldeídos α , β -insaturados |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| catalizada por diarilprolinol sililéter desenvolvido por Rueping et al |
| Tabela 2.2. Escopo de substratos para a formação de 2 <i>H</i> -cromenonas catalisada pelas proteínas LPB e |
| LPF |
| Tabela 2.3. Matriz de coeficientes de contraste para um planejamento fatorial 2 ⁴ . 134 |
| Tabela 2.4 . Exemplo de ANOVA para a regressão múltipla do planejamento fatorial |
| Tabela 2.5. Valores dos níveis alto e baixo das variáveis investigadas no planejamento fatorial completo |
| aplicado à reação de formação de 2 <i>H</i> -cromenonas 3a , 4a e 5a 140 |
| Tabela 2.6. Configuração dos experimentos realizados no planejamento fatorial completo para a triagem nas variáveis mais importantes no rendimento de 2 <i>H</i> -cromenonas 3a, 4a e 5a utilizando a 1,3-cicloexanodienona 1a e o crotonaldeído 2a na presença da lipase PPL-II. Níveis codificados (-1 e +1) estão entre parênteses. 141 |
| Tabela 2.7. Parâmetros experimentais do planejamento fatorial composto central realizado para a reaçãoentre a 1,3-cicloexanodienona 1a e o crotonaldeído 2a na presença da PPL-II |
| Tabela 2.8. Parâmetros das equações de primeira ordem obtidas das análises cromatográficas na |
| obtenção de curvas analíticas para a quantificação das 2 <i>H</i> -cromenonas 3a , 4a e 5a 156 |
| Tabela 2.9. Fungos de ambiente marinho usados na triagem para as biotransformações da 2-hidroxi- 2 <i>H</i> -cromenona 4a. 160 |
| Tabela 2.10. Valores dos efeitos obtidos pelas interações das 4 variáveis frente à reação entre a 1,3- |
| cicloexanodiona 1a e o crotonaldeído 2a na formação dos produtos 2 <i>H</i> -cromenonas 3a , 4a e 5a na presença da PPL-II |
| Tabela 2.11. Variáveis e níveis que influenciaram positivamente no rendimento das 2 <i>H</i> -cromenonas 3a , |
| 4a e 5a a partir da reação entre a 1,3-cicloexanodienona 1a e o crotonaldeído 2a na presença da PPL-II. |
| Tabela 2.12. ANOVA para o modelo determinado no planejamento de composto central aplicado na 2- |
| hidroxi-2 <i>H</i> -cromenona 4a frente à reação entre a 1,3-cicloexanodienona 1a e o crotonaldeído 2a na |
| presença da PPL-II |

Tabela 2.14. Conversões das 2*H*-cromenonas 3a, 4a e 5a obtidos da reação entre a 1,3-cicloexanodiona1a e o crotonaldeído 2a catalisada pela PPL-II na presença e na ausência de luz visível no tempo de 1hora.181Tabela 2.15. Reação de formação de 2*H*-cromenonas 3a-e, 4a-e e 5a-e obtidas da reação entre a β-dicetona cíclica 1a e os aldeídos α,β-insaturados 2a-e na presença da PPL-II.185Tabela 2.16. Triagem de lipases na reação entre a 1,3-cicloexanodiona 1a e o crotonaldeído 2a para aformação das 2*H*-cromenonas 3a, 4a e 5a.189Tabela 2.17. Conversões obtidas para as 2*H*-cromenonas 3a, 4a e 5a na reação entre a 1,3-cicloexanodienona 1a e o crotonaldeído 2a na presença da LPF.190Tabela 2.18. Escopo da reação entre a β-dicetona cíclica 1a e os aldeídos α,β-insaturados 2a-c naformação das 2*H*-cromenonas 3a-c e 4a-c na presença da LPF.

Tabela 2.20. Sinais de RMN de ¹H dos prótons do hemiacetal para os derivados de 2-hidroxi-2*H*cromenonas **4a-d** obtidos da reação entre 1,3-cicloexadiona **1a** com os aldeídos α , β -insaturados **2a-d**.

Tabela 2.25. Matriz de coeficientes de contraste para o planejamento fatorial 2⁴ desenvolvido paraencontrar os efeito das variáveis e suas interações na reação entre a 1,3-cicloexanona 1a e ocrotonaldeído 2a catalisada pela PPL-II para a produção da 2*H*-cromenona 5a.234

Tabela 2.26. Respostas dos experimentos do planejamento de composto central realizado para otimizaro rendimento da 2-hidroxi-2H-cromenona 4a como produto da reação entre a β -dicetona cíclica 1a e oaldeído 2a catalisada pela PPL-II.235

Tabela 2.27. Respostas da condição otimizada no planejamento de composto central da reação entre aβ-dicetona cíclica 1a e o aldeído 2a catalisada pela PPL-II para a obtenção da 2-hidroxi-2H-cromenona4a em condições de ausência e presença de luz visível na presença de PPL-II como na sua ausência(controle).235

LISTA DE ESQUEMAS

| Esquema 2.1. Reação sequencial de Stille-oxo-eletrociclização descrita por Tambar et al |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Esquema 2.2. Síntese do cromeno, um aceptor antagonista do neuropeptídeo YY5 |
| Esquema 2.3. Síntese de 2 <i>H</i> -cromenonas fusionadas via uma metodologia convergente |
| Esquema 2.4. Síntese de pirano[<i>c</i>]cromenos via reação multicomponente116 |
| Esquema 2.5. Síntese de 2 <i>H</i> -cromenos via adição oxa-Michael por organocatálise117 |
| Esquema 2.6. Síntese de 2 <i>H</i> -cromenonas oticamente ativas utilizando a evoglucosenona |
| Esquema 2.7. Adição-1,2 e adição conjugada-1,4 na síntese de 2 <i>H</i> -cromenonas118 |
| Esquema 2.8. Mecanismo da reação de cicloadição formal oxo-[3+3]119 |
| Esquema 2.9. Síntese de 2 <i>H</i> -piranos através da abordagem de cicloadição formal oxo-[3+3] usando piperidina como catalisador |
| Esquema 2.10. Síntese de 2 <i>H</i> -piranos através da abordagem de cicloadição formal oxo-[3+3] usando L-prolina como catalisador |
| Esquema 2.11. Reação de cicloadição formal de uma β -dicetona acíclica e um aldeído α , β -insaturado |
| favorecendo a forma acíclica oxatrieno121 |
| Esquema 2.12 . Síntese de piripiropeno A via cloreto de acila descrita por Smith e Õmura's |
| Esquema 2.13. Reação de cicloadição oxa-[3+3] através de cloretos de acila |
| Esquema 2.14. Adição de Michael de compostos 1,3-dicarbonílicos a cetonas α,β-insaturadas ou α- cetoésteres |
| Esquema 2.15. Mecanismo proposto por Rueping et al. para a síntese enantiosseletiva de 2-hidroxi-2 <i>H</i> - |
| cromenonas catalisada por diarilprolinol éteres de silício |
| Esquema 2.16. Reação entre a 2-hidroxi-1,4-naftoquinona e aldeídos α,β -insaturados via processo em |
| cascata adição-ciclização catalisada por diarilprolinol éteres de silício pelo Método Magnus 127 |
| Esquema 2.17. Síntese de 2H-cromenonas utilizando lipases de Pseudomonas fluorescens e a de |
| pâncreas bovino |
| cvi |

| Esquema 2.18. Mecanismo proposto para as cicloadições catalisadas por LPB e LPF na formação de |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 2 <i>H</i> -cromenonas |
| Esquema 2.19. Reação em cascata oxa-Michael/aldólica de salicilaldeídos e cetonas α,β -insaturadas |
| catalisada pela α -amilase de <i>Bacillus subtilis</i> |
| Esquema 2.20. Adição de Michael de 4-hidroxicoumarina a benzilideneacetona catalisada por PPL para |
| a formação de Warfarina |
| Esquema 2.21. Reação da 1,3-cicloexanodiona 1a e o crotonaldeído 2a catalisada por lipases 147 |
| Esquema 2.22. Reação entre a 1,3-cicloexanodiona 1a e o crotonaldeído 2a catalisada pela PPL-II. |
| |
| Esquema 2.23. Estudo da reação entre a 4-hidroxi-6-metil-2-pirona e crotonaldeído por Moreno-Mañas. |
| |
| Esquema 2.24. Mecanismos propostos para a formação da 2H-cromenona 5a na reação entre a 1,3- |
| cicloexanodienona 1 e o crotonaldeído 2 na presença de PPL-II, através da adição-1,2 (Rota-A) e adição- |
| 1,4 (Rota-B) |
| Esquema 2.25. Equilíbrio entre as formas cíclica e acíclica das 2 <i>H</i> -cromenonas na presença de luz. |
| |
| Esquema 2.26. Tautomerização de subestruturas da Warfarina e da 2-hidroxi-2 <i>H</i> -cromenona 4a 196 |
| Esquema 2.27. Mecanismo da reação entre a 1,3-cicloexanodiona 1a e o crotonaldeído 2a favorecido |
| pela catálise com LPF |
| Esquema 2.28. Mecanismo da reação entre a 1,3-cicloexanodiona 1a e o crotonaldeído 2a favorecido |
| pela catálise com PPL-II para obtenção da 2 <i>H</i> -cromenona 3a |
| Esquema 2.29. Transformações químicas realizadas em compostos derivados de 2-hidroxi-2H- |
| cromenonas |
| Esquema 2.30. Mecanismo de reação proposto para a transformação química espontânea do composto |
| 6 ao composto 7 |

SUMÁRIO

| 2.1 | INT | RODUÇÃO |
|-----|--------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 2 | 2.1.1 | Síntese de 2 <i>H</i> -cromenonas |
| | 2.1.1.1 | Adição conjugada-1,2 na síntese de 2 <i>H</i> -cromenonas119 |
| | 2.1.1.2 | Adição conjugada-1,4 na síntese de 2-hidroxi-2 <i>H</i> -cromenonas |
| 2 | 2.1.2 | Biocatalisadores |
| 2 | 2.1.3 | Síntese de cromenonas por biocatálise |
| 2 | 2.1.4 | Planejamento experimental |
| | 2.1.4.1 | Planejamento fatorial completo |
| | 2.1.4.2 | Planejamento composto central |
| | 2.1.4.3 | Avaliação do modelo resultante do planejamento experimental136 |
| 2.2 | OBJ | IETIVOS |
| 2 | 2.2.1 | Objetivo geral |
| 2 | 2.2.2 | Metas |
| 2.3 | MA | TERIAIS E MÉTODOS |
| 2 | 2.3.1 | Reagentes, solventes e meios de cultura |
| 2 | 2.3.2 | Estudo da reação de formação de 2H-cromenonas biocatalisada pela PPL-II usando |
| p | lanejam | ento fatorial140 |
| | 2.3.2.1 crotona | Planejamento fatorial completo aplicado na reação entre 1,3-cicloexanodiona 1a e aldeído 2a catalisada pela PPL-II |
| | 2.3.2.2 | Planejamento fatorial de composto central aplicado na síntese de 2 <i>H</i> -cromenonas 141 |
| | 2.3.2.3 | Protocolo de síntese de 2 <i>H</i> -cromenonas extração e preparo de amostra para análise por |
| | HPLC | -UV |
| | 2.3.2.5 e | Uso de diferentes aldeídos α , β -insaturado na reação de formação das 2 <i>H</i> -cromenonas 4a- |
| 2 | 2.3.3 | Metodologia para a formação de cromenonas biocatalisada por lipases |
| | 2.3.3.1 | Triagem de biocatalisadores na síntese das 2 <i>H</i> -cromenonas 3a e 4a |
| | 2.3.3.2 | Uso de diferentes solventes na reação entre a 1.3-cicloexanodiona e crotonaldeído |
| | catalisa | ada pela lipase de <i>Pseudomonas fluorescens</i> |
| | | |

| 2.3.3.3 | Experimentos controle na formação de 2 <i>H</i> -cromenonas148 |
|---------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 2.3.3.4 | Ampliação do escopo da reação na formação de 2H-cromenonas catalisada por LPF 149 |
| 2.3.3.5 catalisa | Uso de diferentes aldeídos α,β-insaturado na formação de 2 <i>H</i> -cromenonas 4a-c da por LPF |
| 2.3.3.7 | Uso de diferentes β-dicetonas cíclicas na formação de 2 <i>H</i> -cromenonas catalisada por |
| LPF | |
| 2.3.4 | Determinação da concentração de proteína nos preparados enzimáticos comerciais usados |
| nos exper | imentos |
| 2.3.5 | Métodos de análise, identificação e caracterização estrutural 155 |
| 2.3.5.1 | Análise por cromatografia líquida de alta eficiência |
| 2.3.5.2 | Obtenção de curvas analíticas156 |
| 2.3.5.3 | Determinação de rendimento e enantiosseletividade das 2 <i>H</i> -cromenonas (3a-e, 4a-i e 5a- |
| e) | |
| 2.3.5.4 | Medidas de difração de raios X em monocristal da (±)-2 <i>H</i> -cromenona 5 a 157 |
| 2.3.5.5 | Outros equipamentos utilizados |
| 2.3.6 | Experimentos de biotransformação da 2-hidroxi-2 <i>H</i> -cromenona 4a 158 |
| 2.3.6.1 | Crescimento de fungos de ambiente marinho 158 |
| 2.3.6.2 | Crescimento de fungos de ambiente marinho em meio de cultura sólido 158 |
| 2.3.6.3 | Crescimento de fungos de ambiente marinho em meio de cultura líquido 159 |
| 2.3.6.4 | Triagem de fungos de ambiente marinho na biotransformação da 2-hidroxi-2H- |
| cromen | ona 4a |
| 2.4 RES | ULTADOS E DISCUSSÃO162 |
| 2.4.1 | Planejamento fatorial completo aplicado à reação entre a 1,3-cicloexanodienona 1a e o |
| crotonald | eído 2a na presença de enzima PPL-II |
| 2.4.2 | Planejamento fatorial de composto central aplicado à reação entre a 1,3-cicloexanodienona |
| 1a e o cro | tonaldeído 2a na presença da enzima PPL-II168 |
| 2.4.3 | Variação nas condições reacionais da reação entre a β-dicetona cíclica 1a e o crotonaldeído |
| 2a na pres | sença da PPL-II |
| 2.4.4 | Ampliação do escopo da reação entre a β -dicetona cíclica 1a e aldeídos α , β -insaturados 2a - |
| e catalisad | la pela PPL-II |

| 2.4.5 Triagem biocatalisadores para a obtenção da 2-hidroxi-2 <i>H</i> -cromenona 4a catalisada por |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| diferentes lipases |
| 2.4.6 Triagem de solventes frente à reação da 1,3-cicloexadienona 1a e o crotonaldeído 2a com |
| a lipase de Pseudomonas fluorescens |
| 2.4.7 Avaliação do escopo da reação biocatalisada pela LPF na formação de 2-hidroxi-2H- |
| cromenonas 4a-c |
| 2.4.8 Caracterização espectroscópica por RMN dos compostos 2-hidroxi-2 <i>H</i> -cromenonas 195 |
| 2.4.8.1 Caracterização da 2-hidroxi- $2H$ -cromenona 4a por RMN de ¹ H e ¹³ C |
| 2.4.8.2 Caracterização da 2 <i>H</i> -cromenona 3a por RMN de ¹ H e ¹³ C203 |
| 2.4.9 Regiosseletividade enzimática para a adição-1,2 e 1,4 na formação de 2 <i>H</i> -cromenonas 205 |
| 2.4.10 Determinação da concentração de proteínas no preparado enzimático comercial de PPL-II |
| e LPF |
| 2.4.11 Experimentos de biotransformação do composto 4a utilizando fungos de ambiente marinho |
| |
| 2.4.11.1 Caracterização do produto 6 de biotransformação obtido a partir da 2-hidroxi-2H- |
| cromenona 4a |
| 2.4.11.2 Caracterização do produto 7 obtido espontaneamente a partir do produto 6 de |
| biotransformação |
| 2.5 CONCLUSÃO |
| REFERÊNCIAS |
| APÊNDICE |
2.1 INTRODUÇÃO

O núcleo cromenona constitui uma fração estrutural incorporada em diversos produtos naturais como arisugacinas, piripropenos e cordipiridonas (**Figura 2.1**) (1). Trata-se de um grupo farmacofórico de interesse por suas atividades biológicas e aplicações medicinais. Muitos desses produtos naturais podem ser usados como espasmolíticos, diuréticos, coagulantes, antivirais, antitumorais e anti-anafilácticos, também podem ser usados como pigmentos, materiais fotoativos e agroquímicos biodegradáveis (2,3). Arisugarcina A, por exemplo, é um inibidor de acetilcolinesterase (AChE) com um IC50 de 1 nm o qual é significativo no tratamento de demências como Alzheimer (4,5,6,7).



Figura 2.1. Exemplos de núcleos cromenonas na estrutura de produtos naturais.

A nomenclatura das cromenonas é derivada das subestruturas de cromenos e cromanos (**Figura 2.2**), nas quais um anel pirano encontra-se fusionado a um anel aromático, formando cromanos, diidrobenzopiranos nos quais varia a posição da ligação dupla para ser 2*H*-cromenos ou 4*H*-cromenos (8). Os análogos saturados são nomeados de acordo ao número e à posição

das insaturações, como exemplos os hexaidrocromenos, tetraidrocromenos ou octaidrocromenos mostrados na **Figura 2.2**. Quando há presença de grupos funcionais como o grupo cetona confere-se o nome de cromenonas, como os exemplos mostrados na **Figura 2.2**. Estes últimos foram o objeto de estudo do presente trabalho, cujo nome foi simplicado a 2*H*-cromenonas.

Figura 2.2. Estruturas químicas de sistemas cromano, 2*H*-cromeno, 4*H*-cromeno e os derivados saturados.



2.1.1 Síntese de 2*H*-cromenonas

A síntese de núcleos 2*H*-cromenonas tem sido relatada por vários pesquisadores usando diferentes rotas e catalisadores (9,10,11). Muitas rotas usaram catalisadores com metais de transição, ácidos e bases de Lewis e Bronsted, os quais incluem organocatalisadores nãoenantiosseletivos e enantiosseletivos (1,12). Em 2002 Lee et al. (13) descreveram o uso de tricloreto de índio em acetonitrila (InCl₃, 50 mol%) como o melhor sistema ácido de Lewis, fornecendo as 2*H*-cromenonas com rendimentos moderados (40-70%). Hsung et al. (2005) relataram uma reação similar na presença de 1 equiv. de BF₃·Et₂O em cloreto de metileno (CH₂Cl₂) fornecendo os 2*H*-cromenonas cem rendimentos moderados a altos (49-94%). Lee et al. (14) descreveram a síntese de 2*H*-cromenonas catalisada por diacetato de etilenodiamina com rendimentos entre 40 e 97%. Algumas metodologias usaram catalisadores organometálicos baseados em paládio, como descrito por Tambar et al. (15), cuja estratégia para a síntese de 2*H*-cromenonas usou o processo sequencial Stille-oxo-eletrociclização na preparação de Saudin, um diterpeno natural com propriedades hipoglicêmicas (**Esquema 2.1**).





Fonte: Tambar et al. (15).

A formação de Saudin ocorreu através da reação entre a 4-*cis*-iodoenona e a 2estanilenona, através de duas reações sequenciais. A primeira foi a reação de acoplamento de Stille catalisada por Pd(PPh₃)₄, CuI em DMF a 23 °C; a segunda foi a reação de oxaeletrociclização (15). A reação também foi testada quando os substituintes estanano e iodo foram intercambiados entre as duas moléculas, com os reagentes 4-*cis*-estanilenona e a 2iodoenona, sendo que as duas rotas levaram ao mesmo rendimento de 92% (15).

Miyabe et al. (16) relataram a síntese *one-pot* de um antagonista aceptor do neuropeptídeo YY5 e derivados, através de uma reação multicomponente (**Esquema 2.2**). A reação envolveu o precursor de arino, triflato (**A**), DMF e a dimedona (2,5 equiv.), no solvente iônico fluoreto de tributilamônio (TBAF). O mecanismo inicia-se com a inserção do arino na ligação C=O de DMF, seguida pelo ataque nucleofílico de metilenos ativados, como a dimedona, para formar os produtos em moderados a altos rendimentos, **B** (86%) e **C** (87%). Um mecanismo plausível proposto pelos autores em base nas observações experimentais e cálculos teóricos orbitalares onde os passos da reação foram termodinamicamente favoráveis ($\Delta G^{\circ}_{298 \text{ K}} < 0 \text{ kJ mol}^{-1}$), consistiu na adição de um íon enolato aos intermediários **I** ou **II** seguida pela eliminação de dimetilamina.



Esquema 2.2. Síntese do cromeno, um aceptor antagonista do neuropeptídeo YY5.

Um método convergente para a síntese de uma variedade de 2*H*-cromenonas foi relatado por Sosnovskikh et al. (17). Esta metodologia procedeu através de duas via de reação, as quais levaram ao mesmo intermediário **I** (**Esquema 2.3**), a adição oxa-Michael e a condensação de Mannich de salicilaldeídos com cromonas, γ -pironas e β -furanonas ativadas por grupos polihaloalquila.

As cromonas substituídas reagiram facilmente com salicilaldeídos na presença de piperidina em benzeno sob refluxo para fornecer os 2*H*-cromenonas correspondentes com rendimentos de 12 a 96%. Porém, a presença de grupos eletro-retiradores na posição C6 (R_2) nas cromonas facilitou a adição nucleofílica ao carbono C2, enquanto que os grupos doadores de elétrons tiveram um efeito negativo sobre o rendimento.

Fonte: Miyabe et al. (16)



Esquema 2.3. Síntese de 2*H*-cromenonas fusionadas via uma metodologia convergente.

Fonte: Sosnovskikh et al. (17)

Karami et al. (18) relataram um processo envolvendo uma reação multicomponente de arilglioxal com 4-hidroxicoumarina e malonitrila para sintetizar pirano[c]cromenos contendo um grupo aroil (**Esquema 2.4A**). As reações foram catalisadas eficientemente por diidrogênio fosfato de amônio para produzir os produtos em bons a excelentes rendimentos (70-90%). A reação foi sensível à temperatura, sendo que os melhores resultados foram obtidos quando a reação foi agitada inicialmente à temperatura ambiente por 30-40 minutos seguida de aquecimento em condições de refluxo.

O mecanismo (**Esquema 2.4B**) mostrou que a reação procedeu via catálise por NH₄H₂PO₄ na qual o glioxal condensa com a malonitrila para produzir o aroilideno malonitrila I, que é protonado resultando na eliminação de uma molécula de água desencadeada pela abstração de um próton pela amônia. Subsequentemente, a adição de Michael da cromona IV ao intermediário III forneceu o intermediário V. O intermediário V sofreu uma reação de ciclização para formar a pirano[*c*]cromenona VI.



Esquema 2.4. Síntese de pirano[*c*]cromenos via reação multicomponente.

Fonte: Karami et al. (18)

Uma outra abordagem para a síntese de cromenonas foi relatada por Arvidsson et al. (19), através da adição oxa-Michael seguida pela condensação intramolecular entre o salicilaldeído e aldeídos α , β -insaturados catalisada pelo difenilsilienoléter em uma reação *one-pot* (**Esquema 2.5A**). Os produtos foram obtidos com diferentes rendimentos (14-90%) e enantiosseletividades (*ee* = 27-90%). Na presença de aditivos as enantiosseletividades foram maiores, porém, os rendimentos foram reduzidos. Quando o aditivo usado foi imidazol o rendimento foi de 10% e o *ee* = 69% e, com o ácido *p*clorobenzóico o rendimento foi de 52% e o *ee* = 72%.

O mecanismo para esta reação (**Esquema 2.5B**) envolveu a formação de um íon imínio quiral do aldeído α,β -insaturado **I**, o qual reagiu através de uma reação de adição oxa-Michael através do ataque nucleofílico pela face *Re* do salicilaldeído. Foi gerado um intermediário enamina **II**, a qual promoveu um ataque intramolecular à ligação C=O para formar o intermediário cíclico **III** que por hidrólise forneceu o cromanol **IV**. A eliminação de água produziu o cromeno final **V**.



Esquema 2.5. Síntese de 2H-cromenos via adição oxa-Michael por organocatálise.

Fonte: Arvidsson et al. (19)

Uma abordagem similar para a síntese de 2*H*-cromenos foi desenvolvida por Samet et al. (20) (**Esquema 2.6**). Os autores promoveram a síntese estereosseletiva de cromenonas a partir do salicilaldeído e a cetona bicíclica α , β -insaturada, evoglucosenona, conhecida pela sua ampla aplicação em síntese assimétrica. A estratégia sintética foi a reação sequencial aldol-oxa-Michael. A quiralidade no produto cromeno foi originada via ataque do ânion fenolato na face oposta da ponte anidra no oxabiciclo [3.2.1]. Em geral, a reação procedeu facilmente com a maioria dos aldeídos testados, exceto para o 5-nitro-salicilaldeído o qual mostrou reações lentas levando a um rendimento de 36%.





Fonte: Samet et al. (20)

Na literatura a síntese de 2*H*-cromenonas destacou-se pelo uso de compostos β dicarbonílicos, os quais são importantes sinteticamente porque incorporam ambas funcionalidades, eletrofílica e nucleofílica (1), as quais podem ser condensadas a aldeídos α , β insaturados para formar a estrutura 2*H*-pirano dos núcleos 2*H*-cromenonas. Vários estudos têm descrito a síntese de derivados de 2*H*-piranos a partir de aldeídos α , β -insaturados e β -dicetonas cíclicas na presença de ácidos de Lewis (1).

A reatividade dos aldeídos α,β -insaturados para a adição-1,2 e a adição-1,4 os tornam compostos versáteis para a construção de núcleos 2*H*-cromenona e 2-hidroxi-2*H*-cromenona (**Esquema 2.7**). Porém, também é necessária a busca por condições e catalisadores que levem a uma seletividade regioquímica e estereosseletiva.



Esquema 2.7. Adição-1,2 e adição conjugada-1,4 na síntese de 2H-cromenonas.

De acordo com a teoria de acidez e basicidade de Pearson compostos carbonílicos α , β insaturados podem sofrer o ataque de nucleófilos duros no carbono carbonílico, que apresenta o centro reativo com maior característica de dureza. O ataque no carbono β é comumente o resultado de uma reação mais lenta realizado por um nucleófilo mole, porém favorável termodinamicamente. Ainda assim, existe a possibilidade de favorecer o ataque de nucleófilos moles na carbonila, tomando a vantagem da coordenação ao oxigênio por parte de um íon metálico ou um próton. Isto diminui a energia do orbital de fronteira LUMO e torna o coeficiente orbitalar do carbono carbonílico "mais parecido" com o de um eletrófilo mole (21).

2.1.1.1 Adição conjugada-1,2 na síntese de 2*H*-cromenonas

Na formação de 2*H*-cromenonas pela reação entre a cetona e aldeídos conjugados o produto de adição-1,2 é formado através de duas reações sequenciais, uma do tipo Knoevenagel ou aniônica seguida por uma reação de fechamento de anel eletrocíclica de 6 elétrons π reversível. A reação resulta na formação de duas ligações σ e um novo centro estereogênico adjacente ao heteroátomo a depender dos substituintes R₁ e R₂ presentes nos derivados do aldeído α , β -insaturado (11,22) como mostrado no **Esquema 2.8**. Esta sequência de reações constitui um protocolo de cicloadição formal oxo-[3+3] por etapas (11).

O mecanismo da cicloadição formal oxo-[3+3] proposto por Hsung et al. (11) (**Esquema** 2.8) iniciou-se com a adição-1,2 de 6-alquil ou 6-aril-2*H*-pironas ao sal de imínio de aldeídos α,β -insaturados gerado *in situ* e uma amina secundária. Subsequentemente ocorre uma β eliminação, a qual leva a um intermediário 1-oxatrieno. O segundo passo envolve a reação
electrocíclica-6 π via fechamento do anel, conduzindo a 2*H*-piranos. Em termos gerais, da soma
dos dois passos obtém-se a cicloadição formal oxo-[3+3], na qual três átomos de carbono do
aldeído foram adicionados a dois átomos de carbono e um átomo de oxigênio da pirona (11).
Esta é uma abordagem eficiente do ponto de vista sintético, porque forma múltiplas ligações,
ciclos e novos centros estereogênicos (1).



Esquema 2.8. Mecanismo da reação de cicloadição formal oxo-[3+3].

Fonte: Hsung et al. (11)

O uso de sais de imínio é uma alternativa para a regiosseletividade de adição a aldeídos α , β -insaturados pela abordagem de cicloadição formal oxa-[3+3], conduzindo exclusivamente aos produtos 2*H*-piranos via adição-1,2, como descrito por Hsung et al. (11), onde foi abordada

a síntese de núcleos 2*H*-piranos usando sais de imínio α,β -insaturados pré-formados ao invés de gerar estes *in situ*, obtendo rendimentos de 34 a 86% e diastereosseletividades moderadas nos oxa-espirociclos, mostrando ter uma aplicabilidade estendida para o uso de aldeídos aromáticos α,β -insaturados e aldeídos cíclicos α,β -insaturados (**Esquema 2.9**). Uma desvantagem desta reação foi o uso de misturas de sais de imínio sensíveis às condições mais severas de reação.

Esquema 2.9. Síntese de 2*H*-piranos através da abordagem de cicloadição formal oxo-[3+3] usando piperidina como catalisador.



Fonte: Hsung et al. (11)

O uso de aldeídos cíclicos α,β -insaturados na abordagem de cicloadição formal oxa-[3+3] foi relatado por Hua et al. (23) usando *L*-prolina como catalisador (0,5 equiv.). Os aldeídos conjugados cíclicos possuem uma conjugação diminuída, o que conduziu a um melhor controle da estereoquímica, fornecendo os adutos cíclicos pela via de adição-1,2 em bons rendimentos (62-78%) (**Esquema 2.10**).



Esquema 2.10. Síntese de 2*H*-piranos através da abordagem de cicloadição formal oxo-[3+3] usando *L*-prolina como catalisador.

Fonte: Hua et al. (23)

Em relação ao intermediário oxatrieno foi obtido quando utilizou-se sais imínio para a abordagem de cicloadição formal oxa-[3+3] por Groot e Jansen (24). Neste caso foram usados a β -dicetona acíclica, o aldeído α , β -insaturado e a piridina em ebulição no qual foi obtido o oxatrieno e o 2*H*-pirano em equilíbrio, deslocado para o oxatrieno (**Esquema 2.11**). O equilíbrio resultou do fechamento eletrocíclico-6 π elétrons reversível (11).

Esquema 2.11. Reação de cicloadição formal de uma β -dicetona acíclica e um aldeído α , β -insaturado favorecendo a forma acíclica oxatrieno.



Fonte: Groot e Jansen (24).

Uma modificação relacionada com a abordagem de cicloadição formal oxa-[3+3] foi relatada por Smith e Õmura's na síntese total de piripiropeno A (25). Nessa estratégia sintética foram usados um cloreto de acila α , β -insaturado e uma pirona em medio de ácido trifluoroacético (TFA) a 80 °C para fornecer o produto em 47% de rendimento.

O mecanismo desta reação pode ocorrer através dois caminhos de reação os quais levam ao intermediário **II** (**Esquema 2.12**). Um desses caminhos ocorreu pela sequência de três passos, começando pela *O*-acilação que conduziu ao intermediário **I**, seguida da migração-1,3 de grupo acila produzindo o intermediário **II**.

A outra possibilidade é a adição-1,2 do íon enolato da pirona ao cloreto de acila, levando diretamente ao intermediário **II**. O seguinte passo consistiu na ciclização do intermediário **II** por meio de uma adição O-1,4 que forneceu o derivado cromenona em 47% de rendimento que finalmente foi reduzido com boridreto de sódio a piripiropeno A, obtido em 96% de rendimento.



Esquema 2.12. Síntese de piripiropeno A via cloreto de acila descrita por Smith e Õmura's.

Fonte: Smith e Õmura's (25)

Um inconveniente desta estratégia sintética quando aplicada a outros substratos como os compostos 4-hidroxi-6-metil-2H-(2-piranona) e o cloreto do ácido (*E*)-2-butenóico foi a migração-1,3 do grupo acila que levou ao éster em 45% de rendimento, o qual em condições básicas produziu a lactona em 48% de rendimento (**Esquema 2.13**).





Fonte: Hsung et al. (11)

Estes resultados ilustram a reatividade dos compostos carbonílicos α,β -insaturados. Quanto mais reativo o grupo carbonílico maior a probabilidade do ataque ocorrer na porção *C*-1,2 (26). A ordem de reatividade dos compostos carbonílicos α,β -insaturados para a adição-1,2 e adição-1,4 é apresentada na **Figura 2.3**.

Cloretos de ácido e aldeídos α , β -insaturados possuem uma forte tendência em reagir através de uma adição-1,2, contudo amidas e ésteres α , β -insaturados experimentam em sua maioria adição-1,4.

Figura 2.3. Ordem de reatividade na adição de Michael em sistemas carbonílicos α,β -insaturados.



Fonte: Clayden, J. (26).

2.1.1.2 Adição conjugada-1,4 na síntese de 2-hidroxi-2H-cromenonas

No caso da reação entre β -dicetonas e cetonas- α , β -insaturadas a adição-1,4 ou adição de Michael é predominante (27,28), bem como para os α -cetoésteres γ , β -insaturados (29,30).

No **Esquema 2.14** é mostrada a síntese da cetona de Hajos-Perris e da cetona de Wieland-Miesher, cuja formação foi através de uma anelação de Robinson, em meio ácido ou Prolina como catalisador. A adição de Michael de compostos 1,3-dicarbonílicos a cetonas α , β insaturadas foi descrita por Jorgensen et al. (28) usando catalisadores do tipo imidazolidina ou complexos de cobre(II) com bisoxazolinas quirais. **Esquema 2.14.** Adição de Michael de compostos 1,3-dicarbonílicos a cetonas α , β -insaturadas ou α -cetoésteres.



A reação entre a β -dicetonas cíclicas e cetonas aromáticas α , β -insaturadas como aceptores de Michael foi descrita por Li et al. (31). As cetonas α , β -insaturadas exibiram baixa reatividade, e uma alternativa foi a sua ativação através da formação de uma imina entre a amina primária do catalisador e o grupo carbonila da benzalacetona, como apresentado na **Figura 2.4**. De acordo com a proposta de Li et al. foi formado um intermediário que envolveu a formação de uma ligação de hidrogênio com a amina terciária do catalisador e os oxigênios da dimedona (5,5-dimetil-1,3-cicloexanodiona), a qual foi desprotonada pela amina terciária e orientada pelas ligações de hidrogênio para o ataque na face-*Si* da cinamona. Como resultado foi obtido o composto 2-hidroxi-2*H*-cromenona de configuração *S*.



Figura 2.4. Modelo de ataque proposto por Li et al. para a adição de Michael de β -dionas a cinamonas catalisada por 9-amino(9-deoxi)-*epi*-quinina.

Fonte: Li et al. (31).

Os aldeídos α , β -insaturados, por sua parte, apresentam a tendência em reagir através de adição-1,2, porém a adição-1,4 é favorecida em algumas condições de reação. Como foi o caso da reação entre aldeídos α , β -insaturados e a 2-hidroxi-1,4-naftoquinona catalisada por diarilprolinol sililéteres, descrito por Rueping et al. (2,3) (**Tabela 2.1**).

Nesse estudo desenvolvido por Rueping et al. (2) foram testados dois catalisadores diarilprolinol sililéteres, como mostrado na **Tabela 2.1**, com substituintes fenila (**a**) e 3,5bis(triflúor-metil)fenila (**b**). Também foi investigada a influência do solvente e da temperatura no rendimento e na enantiosseletividade da reação. As condições que promoveram o melhor rendimento e enantiosseletividade simultaneamente do produto de acoplamento (77%, *ee* = 99%) foram o solvente CH₂Cl₂ e o catalisador **b**.

Os excessos enantioméricos obtidos pelo método conhecido como "Método Magnus" foram devido ao elevado controle estérico exercido pelo íon imínio **I** (**Esquema 2.15**) formado entre o aldeído α , β -insaturado e a amina secundária do catalisador. A adição conjugada ocorreu pela face menos impedida do íon imínio **I**, fornecendo o intermediário **II**. Desta forma a adição-1,2 tornou-se dificultada pelo grupo volumoso do catalisador. Este intermediário **II** sofreu uma hidrólise e uma ciclo-hemiacetalização o qual levou ao produto 2-hidroxi-2*H*-cromenona.

Este protocolo organocatalítico eficiente e enantiosseletivo foi descrito através de vários estudos que envolveram um amplo escopo de aldeídos α , β -insaturados na reação com diferentes β -dicetonas (**Esquema 2.16**).

| | + | O H Solvente, 2 (-20 °C, 0 °C | Ar C TMS 20 h C e t.a) | Ar = (a) F = (b) 3 | Ph ou 3,5-(CF ₃) ₂ -C ₆ H ₃ - |
|------------------------|--------|----------------------------------------|---------------------------------|--------------------|-------------------------------------------------------------------------------|
| Entrada ^[a] | T [°C] | Catalisador | Solvente | Rendimento (%) | ee (%) |
| 1 | t.a | а | DMSO | 86 | 82 |
| 2 | t.a | b | DMSO | 78 | 98 |
| 3 | 0 | a | Et_2O | 48 | 90 |
| 4 | 0 | a | Bu ₂ O | 24 | 85 |
| 5 | 0 | a | CH_2Cl_2 | 71 | 90 |
| 6 | 0 | a | Tolueno | 54 | 66 |
| 7 ^[b] | -20 | a | CH_2Cl_2 | 76 | 92 |
| 8 ^[b] | -20 | b | CH_2Cl_2 | 77 | 99 |
| 9 | -20 | a | Tolueno | 34 | 92 |
| 10 ^[b] | -20 | b | Tolueno | 69 | 98 |

Tabela 2.1. Estudo das condições de reação entre 2-hidroxinaftoquinonas e aldeídos α , β -insaturados catalisada por diarilprolinol sililéter desenvolvido por Rueping et al.

^[a] As reações foram realizadas com 1,5 equiv. do aldeído α , β -insaturado, 20% do catalisador em um tempo de 20 h. ^[b] 40 h. (2).

Esquema 2.15. Mecanismo proposto por Rueping et al. para a síntese enantiosseletiva de 2-hidroxi-2*H*-cromenonas catalisada por diarilprolinol éteres de silício.



Fonte: Rueping et al. (2)



Esquema 2.16. Reação entre a 2-hidroxi-1,4-naftoquinona e aldeídos α , β -insaturados via processo em cascata adição-ciclização catalisada por diarilprolinol éteres de silício pelo Método Magnus.

Para concluir, a regiosseletividade das reações de adição conjugada 1,2 ou 1,4 é uma situação a controlar, devido que a adição de compostos 1,3-dicarbonílicos a aldeídos α , β -insaturados possuir uma forte tendência à adição-1,2. No entanto, esta pode ser controlada em grande parte pelo catalisador. Quando foram usados ácidos e bases de Lewis como: InCl₃ (13), BF₃ (11,34) ou SO₄²⁻/SnO₂ (35), o ácido etilenodiamino diacético (EDDA), EDDA/ZnCl₂ (14,36) ou organofosforados (1), as reações forneceram as 2*H*-cromenonas. Enquanto o uso de organocatalisadores contendo aminas secundárias como diarilprolinol éteres de silício ou catalisadores derivados de quinina forneceu o produto 2-hidroxi-2*H*-cromenona.

Uma outra situação a controlar é a estereoquímica, o qual torna-se um grande desafio sintético para a formação enantiosseletiva de 2*H*-cromenos. O uso de catalisadores organometálicos e organocatalisadores livres de metais, possuem a vantagem de conferir indução ao ataque pela face menos impedida durante a formação do estado de transição.

O uso de enzimas em síntese orgânica, apresenta uma alternativa ao uso de catalisadores orgânicos ou organometálicos. Uma das características das enzimas na síntese orgânica é o seu comportamento promíscuo natural ou induzido através da substituição dos resíduos de aminoácidos catalíticos, tornando-as atraentes para as transformações de compostos orgânicos. A aplicação de biocatalisadores, como enzimas isoladas ou microrganismos, para transformações químicas de compostos orgânicos é denominada biocatálise (37).

2.1.2 Biocatalisadores

Enzimas são moléculas quirais tridimensionais constituídas por cadeias de L-aminoácidos conectadas por ligações peptídicas. A ordem específica de aminoácidos dá a cada enzima uma dobra específica com propriedades únicas. A estrutura da enzima contém uma cavidade, chamada de sítio ativo, cujo caráter confere a cada tipo de enzima sua especificidade para selecionar seu substrato.

O sítio ativo coordena o substrato em uma orientação precisa para realizar a transformação química. A natureza do sítio ativo torna as enzimas capazes de reconhecer e operar em substratos de acordo com três tipos principais de seletividades de substrato, a quimiosseletividade, a regiosseletividade e a estereosseletividade.

O grau de especificidade e seletividade não é absoluto. Muitas enzimas apresentam aceitação mais ampla do substrato ou realizam transformações catalíticas alternativas que diferem do normal sob condições especiais, um comportamento que é chamado de promiscuidade enzimática (37).

Assim, o uso de biocatalisadores baseados em enzimas isoladas constitui uma excelente abordagem na busca pela síntese de 2*H*-cromenonas regiosseletivas e enantiosseletivas. Existem dados escassos na literatura sobre enzimas promíscuas catalisando estes tipos de reações. Para nosso conhecimento foram encontrados apenas três estudos (38,39,40). Além disso, até aqui, só uns poucos autores têm focado na funcionalização posterior dos núcleos 2*H*cromenos. Em particular as transformações destes em compostos com atividade biológica ainda é incipiente, fazendo necessário o desenvolvimento de metodologias eficientes e enantiosseletivas (12).

2.1.3 Síntese de 2H-cromenonas por biocatálise

A síntese de 2*H*-cromenonas por biocatálise foi relatada na literatura por Yang et al. (38), usando as Lipases de Pâncreas Bovino (LPB) e Lipase de *Pseudomonas fluorescens* (LPF) (**Esquema 2.17**). As enzimas mostraram ser seletivas para 2*H*-cromenonas e para 2-hidroxi-2*H*-cromenonas.

Esquema 2.17. Síntese de 2*H*-cromenonas utilizando lipases de *Pseudomonas fluorescens* e a de pâncreas bovino.



Fonte: Yang et al. (38).

A síntese consistiu na reação entre a 1,3-cicloexanodiona e um aldeído α , β -insaturado, levando aos compostos 2*H*-cromenona ou 2-hidroxi-2*H*-cromenona dependendo da enzima usada. Portanto, trata-se de uma síntese regiosseletiva e quimiosseletiva. A reação catalisada pela enzima LPB formou o produto de condensação aldólica via Knoevenagel, pela adição *C*-1,2 e quando catalisada pela LPF formou o produto 2-hidroxi-2*H*-cromenona pela adição conjugada *C*-1,4 (38).

Ambos os compostos ciclizaram em uma segunda reação. No caso da catálise pela enzima LPB foi uma reação de eletrociclização 6π térmica. Enquanto com a enzima LPF, ocorreu uma segunda desprotonação ao intermediário, desencadeando uma reação oxo-aldol ou acetalização que levou ao composto 2-hidroxi-2*H*-cromenona (**Esquema 2.18**). Em relação à enantiosseletividade não foram relatados excessos enantioméricos nesses estudos (38).



Esquema 2.18. Mecanismo proposto para as cicloadições catalisadas por LPB e LPF na formação de 2*H*-cromenonas.

Fonte: Yang, Q. et al. (38).

Na **Tabela 2.2** é apresentado o escopo da reação entre as β -dicetonas cíclicas e os aldeídos α , β -insaturados catalisadas pelas enzimas LPB e LPF. Foram usadas as β -dicetonas cíclicas 1,3-cicloexanodiona e a dimedona.

Na presença de LPB foram obtidas as 2*H*-cromenonas. Quando se utilizou a 1,3cicloexanodiona os rendimentos das 2*H*-cromenonas foram ligeiramente superiores quando se utilizou a dimedona. Também houve diminuição do rendimento ao aumentar a cadeia alquílica do aldeído α,β -insaturado de etila para propila. Contudo, quando se utilizou o aldeído substituído com o grupo metila em C3 (3-metil-2-butenal) foram produzidas as 2*H*-cromenonas em altos rendimentos (99%).

A reação entre as β -dicetonas cíclicas e os aldeídos α , β -insaturados catalisada pela LPF levou às 2-hidroxi-2*H*-cromenonas. A substituição de hidrogênios no C5 da 1,3cicloexanodiona pelas metilas (dimedona) não promoveu diferenças significativas nos rendimentos das 2-hidroxi-2*H*-cromenonas. Ainda, ao aumentar a cadeia alquílica dos aldeídos α , β -insaturados de metila para etila e propila observou-se uma diminuição no rendimento das 2-hidroxi-2*H*-cromenonas.



Tabela 2.2. Escopo de substratos para a formação de 2*H*-cromenonas catalisada pelas proteínas LPB e LPF.

Fonte: Yang et al. (38).

Outro grupo importante de compostos obtidos via biocatálise foram os derivados 2*H*cromenos substituídos na posição-3 a partir de salicilaldeído e cetonas α , β -insaturadas (39) (**Esquema 2.19**). Esta reação foi catalisada pela α -amilase de *Bacillus subtilis*, constituindo uma reação promíscua desta enzima, que originalmente no sistema biológico catalisa a hidrólise de ligações glicosídicas α -1,4 na cadeia linear do amido, gerando unidades de glicose, maltose e maltotriose (39). Rendimentos moderados a altos foram obtidos na formação de 2*H*-cromenos, contudo não foram relatados os excessos enantioméricos para os produtos obtidos.

Esquema 2.19. Reação em cascata oxa-Michael/aldólica de salicilaldeídos e cetonas α , β -insaturadas catalisada pela α -amilase de *Bacillus subtilis*.



Fonte: Zhou (39).

Outros estudos na literatura abordam a biocatálise por lipases da reação de adição de Michael na síntese de Warfarina, um fármaco com propriedades anticoagulantes (40). A síntese deste foi catalisada pela PPL (do inglês *Pancreatic Porcine Lipase*) (**Esquema 2.20**) fornecendo bom rendimento para o produto, mas com excesso enantiomérico baixo (22%).

Esquema 2.20. Adição de Michael de 4-hidroxicoumarina a benzilideneacetona catalisada por PPL para a formação de Warfarina.



Fonte: Xie (40).

Inicialmente, em nosso trabalho a PPL-II foi escolhida para promover a adição aldólica entre o crotonaldeído e a 1,3-cicloexanodiona, pois a reação aldólica estudada previamente entre o 4-cianobenzaldeído e a cicloexanona (*Capítulo 1*) forneceu um bom rendimento (74%) e diastereosseletividade para o aldol *anti* (63:36) e excesso enantiomérico de 74%. Nesse sentido a PPL-II poderia também catalisar a formação de cromenonas de nosso interesse. Adicionalmente para nosso conhecimento, não existem estudos na literatura do uso da PPL-II frente à reação de formação de 2*H*-cromenonas.

2.1.4 Planejamento experimental

O planejamento experimental é uma ferramenta estatística que busca determinar quais das variáveis exercem maior influência no desempenho de um determinado processo e, obter um modelo matemático apropriado para descrever o processo (41). O planejamento experimental permite eficiência e economia no processo experimental e o uso de métodos estatísticos na análise de dados obtidos resulta em objetividade científica nas conclusões (41).

Um planejamento experimental inicia-se com a seleção de variáveis ou fatores. Para isto é necessário a escolha de um planejamento experimental entre os quais estão o Fatorial Completo, Fatorial Fracionário, Fatorial com Ponto Central, Composto Central, Box Behnken, dentre outros (42).

2.1.4.1 Planejamento fatorial completo

Um planejamento fatorial completo é usado geralmente na etapa de triagem ou exploração da influência de todas as variáveis experimentais de interesse e os efeitos de interação na resposta ou respostas. Se a combinação de k variáveis é investigada em dois níveis, um planejamento fatorial consistirá de 2^k experimentos (42). A cada nível é atribuído um código, que varia de acordo como o experimentador, como sinais – (menos) para o nível mais baixo e + (mais) para o nível mais alto, porém o que importa é a relação inicial entre o sinal dado e o efeito obtido. As combinações de segunda ordem ou de ordem superior são obtidas do produto dos sinais originais das variáveis envolvidas. Desta maneira, é construída uma matriz de coeficientes de contraste, como a utilizada em nosso estudo (**Tabela 2.3**).

| No. | | Vari | áveis | | | | | | | Intera | ções * | | | | | Yi |
|------|-------|-------|-----------------------|------------|------------------------|------------------------|----------|------------------------|------------------------|-------------|-------------------------|-------------------------|--------------|-------------------------|--------------------------|----|
| Exp. | x_1 | x_2 | <i>x</i> ₃ | <i>X</i> 4 | <i>x</i> ₁₂ | <i>x</i> ₁₃ | x_{14} | <i>x</i> ₂₃ | <i>x</i> ₂₄ | <i>X</i> 34 | <i>x</i> ₁₂₃ | <i>x</i> ₁₂₄ | <i>x</i> 134 | <i>x</i> ₂₃₄ | <i>x</i> ₁₂₃₄ | |
| 1 | - | - | - | - | + | + | + | + | + | + | - | - | - | - | + | + |
| 2 | + | - | - | - | - | - | - | + | + | + | + | + | + | - | - | + |
| 3 | - | + | - | - | - | + | + | - | - | + | + | + | - | + | - | + |
| 4 | + | + | - | - | + | - | - | - | - | + | - | - | + | + | + | + |
| 5 | - | - | + | - | + | - | + | - | + | - | + | - | + | + | - | + |
| 6 | + | - | + | - | - | + | - | - | + | - | - | + | - | + | + | + |
| 7 | - | + | + | - | - | - | + | + | - | - | - | + | + | - | + | + |
| 8 | + | + | + | - | + | + | - | + | - | - | + | - | - | - | - | + |
| 9 | - | - | - | + | + | + | - | + | - | - | - | + | + | + | - | + |
| 10 | + | - | - | + | - | - | + | + | - | - | + | - | - | + | + | + |
| 11 | - | + | - | + | - | + | - | - | + | - | + | - | + | - | + | + |
| 12 | + | + | - | + | + | - | + | - | + | - | - | + | - | - | - | + |
| 13 | - | - | + | + | + | - | - | - | - | + | + | + | - | - | + | + |
| 14 | + | - | + | + | - | + | + | - | - | + | - | - | + | - | - | + |
| 15 | - | + | + | + | - | - | - | + | + | + | - | - | - | + | - | + |
| 16 | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |

Tabela 2.3. Matriz de coeficientes de contraste para um planejamento fatorial 2⁴.

* x_{12} , x_{13} , x_{14} , x_{23} , x_4 , x_{34} são os efeitos de interação de segunda ordem; x_{123} , x_{124} , x_{134} , x_{234} são os efeitos de interação de terceira ordem, x_{1234} é o efeito de interação de quarta ordem e Y_i é a variável resposta.

A diferença entre as médias das conversões no nível alto (\overline{Y}_+) e as médias das conversões no nível baixo (\overline{Y}_-) de cada coluna da matriz de coeficientes de contraste representa um efeito (**Equação 2.1**).

Efeito =
$$\overline{Y}_{+} - \overline{Y}_{-}$$
 Equação 2.1

No planejamento fatorial completo 2⁴ são obtidos 15 efeitos, classificados em:

- a. 4 principais ou de primeira ordem, que são produto da multiplicação da resposta por cada variável testada (x_1 , x_2 , x_3 e x_4);
- b. 6 efeitos secundários ou de segunda ordem, representando a interação de segunda ordem entre as variáveis estudadas, assim a multiplicação da resposta por x1 e x2 geram o efeito 12, a interação entre a variável x1 e x3 gera o efeito x13 e assim por diante, os quais resultam os efeitos x12, x13, x14, x23, x24 e x34;
- c. 4 efeitos terciários ou de terceira ordem, representando as interações entre três variáveis. Assim, a multiplicação da resposta por x_1 , x_2 e x_3 se denomina de efeito x_{123} , bem como para as outras interações de três variáveis são obtidos os efeitos x_{123} , x_{124} , x_{134} e x_{234} ;
- d. 1 efeito de quarta ordem, definido pela interação simultânea das quatro variáveis, identificado como x_{1234} .

2.1.4.2 Planejamento composto central

O planejamento de composto central possui a vantagem de usar um número baixo de experimentos, sendo que está composto por diferentes partes (42):

1. um planejamento fatorial completo de dois níveis, podendo ser usado ainda, um planejamento fatorial fracionário de dois níveis;

2. experimentos no ponto central, isto é, PC = 0,0 e,

3. experimentos nos pontos axiais em que $X_c = \pm \alpha$, com, e $\alpha = \sqrt{2}$. Estes pontos são situados nos eixos do sistema de coordenadas com distância $\pm \alpha$ da origem e formam a parte estrela do planejamento.

A **Figura 2.5** ilustra a configuração de um planejamento de composto central com duas variáveis.

Figura 2.5. Planejamento composto central com duas variáveis e $\alpha = \sqrt{2}$, (**•**) planejamento fatorial, (**•**) pontos axiais e (**•**) ponto central.



Para um planejamento fatorial de composto central 5 níveis são testados, - α , - X_c , PC, X_c , α . Os níveis α e x_c necessitam ser descodificados para os valores experimentais dos níveis das variáveis a serem estudadas, e para isso utiliza-se a **Equação 2.2**.

$$X_{\rm c} = \frac{X_o - {\rm PC}}{\frac{\Delta}{2}}$$
 Equação 2.2

Na **Equação 2.2**, X_c é a condição codificada e X_o é a condição original, Δ é a diferença entre os valores originais dos níveis altos e baixos do planejamento fatorial.

2.1.4.3 Avaliação do modelo resultante do planejamento experimental

A qualidade do modelo obtido a partir do planejamento experimental deve ser avaliado para determinar se é possível fazer estimativas sobre a região ótima. A forma de fazer essa avaliação é empregando a *análise de variância* (ANOVA) (41,43). Com a ANOVA busca-se distinguir se as diferenças nas respostas observadas são devidas às diferenças significativas derivadas de cada tratamento do planejamento ou são devidas ao acaso (44).

A ANOVA é apresentada em forma de tabela (**Tabela 2.4**), na qual são descritos diferentes parâmetros, a Somatória Quadrática da Regressão (SQRregr), a Somatória Quadrática dos Resíduos (SQRres), a Somatória da Falta de ajuste (SQfaj) e a Somatória Quadrática do erro puro (SQep). Os três primeiros parâmetros referem-se ao modelo proposto e a SQep é o erro experimental derivado das replicatas no ponto central.

São apresentados também os graus de liberdade para cada parâmetro, em que p é o número de parâmetros (coeficientes) do modelo, n é o número total de observações (experimentos) e m é o número de níveis do planejamento. As Médias Quadráticas (MQ) correspondem à razão entre as SQ e seus respectivos graus de liberdade.

A razão entre as médias quadráticas MQregr/ MQres e MQfaj/ MQep é usada para calcular o valor de *F*, que é comparado com o *F* tabelado (*Distribuição de Fischer*) levando em consideração o nível de probabilidade e seus respectivos números de graus de liberdade.

Um bom modelo precisa ter uma regressão significativa, com valores de F_{tab} inferiores ao do F_{calc} , e uma falta de ajuste não significativa com valores de F_{tab} superiores ao do F_{calc} (42). Assim, a variação das respostas em torno da média é descrita pelo modelo (equação de regressão) e os resíduos correspondem em maior parte ao erro experimental.

Na **Tabela 2.4** é apresentado o valor p, o qual representa a probabilidade de validade do erro envolvido no resultado observado (43,45).

| SQ | N° de graus de liberdade | MQ | F_{cal} | р |
|---------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| SQR _{regr} | <i>p-1</i> | MQregr | MOrear/MOres | |
| SQR _{res} | n-p | MQres | WQIegi/ WQies | |
| ${ m SQ}_{ m faj}$ | <i>m-p</i> | MQfaj | MOfei/MOen | |
| SQ_{ep} | n-m | MQep | wiQiaj/ wiQep | |
| SQ _{total} | n-1 | | | |
| | SQ SQR _{regr} SQR _{res} SQ _{faj} SQ _{ep} SQ _{total} | $\begin{array}{c} & \overset{\text{N}^{\circ} \text{ de graus}}{\text{de liberdade}} \\ \hline & & \\ SQR_{regr} & p-1 \\ SQR_{res} & n-p \\ SQ_{faj} & m-p \\ SQ_{ep} & n-m \\ SQ_{total} & n-1 \end{array}$ | SQN° de graus de liberdadeMQSQRregr $p-1$ MQregrSQRres $n-p$ MQresSQfaj $m-p$ MQfajSQep $n-m$ MQepSQtotal $n-1$ $m-1$ | SQN° de graus de liberdadeMQ F_{cal} SQRregr $p-1$ MQregr MQregrMQregr/MQresSQRres $n-p$ MQfaj MQfajMQfaj/MQepSQ _{ep} $n-m$ MQepSQ _{total} $n-1$ -1 |

Tabela 2.4. Exemplo de ANOVA para a regressão múltipla do planejamento fatorial.

Outro parâmetro é o coeficiente de determinação R^2 , o qual representa a fração da variação que é explicada pelo modelo. Sempre é desejável um R^2 próximo de 1, necessário para previsões precisas, este parâmetro não é suficiente por si só. É aconselhável examinar a distribuição dos resíduos, pois ajuda a verificar se não há erros com o modelo. Se não há uma distribuição aleatória dos resíduos pode-se desconfiar do modelo e investir em outros recursos para sua melhoria (42,46,47,48).

Neste trabalho, através da ferramenta de planejamento fatorial realizou-se um conjunto de experimentos para avaliar as melhores condições de reação entre a 1,3-cicloexanodiona e o crotonaldeído na síntese de 2*H*-cromenonas.

2.2 OBJETIVOS

2.2.1 Objetivo geral

Estudar a reação de formação de 2*H*-cromenonas por biocatálise empregando as lipases de pâncreas de porco (PPL-II) e de *Pseudomonas fluorescens* (LPF).

2.2.2 Metas

- Explorar a reação entre a 1,3-cicloexanodiona 1a e o crotonaldeído 2a na presença de PPL-II através de planejamento fatorial completo, mediante as variações nas condições de reação: massa da enzima PPL-II, temperatura, equivalentes dos reagentes e porcentagem de água.
- Realizar um ajuste fino das variáveis que mais influenciaram no rendimento da 2-hidroxi-2*H*-cromenona 4a como produto da reação entre a 1,3-cicloexanodiona 1a e o crotonaldeído 2a na presença de PPL-II, através da metodologia de planejamento de composto central.
- Demonstrar o escopo da reação através da extensão da metodologia encontrada para a síntese das 2*H*-cromenonas catalisada pela PPL-II.
- Otimizar as condições de reação para a formação das 2-hidroxi-2*H*-cromenonas catalisada pela LPF.
- Estender a metodologia sintética otimizada na síntese de 2-hidroxi-2H-cromenonas utilizando a enzima LPF para uma variedade de substratos.

2.3 MATERIAIS E MÉTODOS

2.3.1 Reagentes, solventes e meios de cultura

As enzimas foram adquiridas da Sigma-Aldrich: Lipases de Aspergillus niger (\geq 184 U g⁻¹), *Rhizopus niveus* (\geq 15 U mg⁻¹), *Thermomyces lanuginosus* (\geq 3 U mg⁻¹), Amano lipase de *Burkhodelaria cepacia* (\geq 3 U mg⁻¹), Amano lipase de *Pseudomonas fluorescences* (\geq 20.000 U mg⁻¹) e lipase de pâncreas de porco tipo II (30,1 U mg⁻¹), assim como a Albumina de Soro Bovino (BSA).

Os reagentes, crotonaldeído 1a (99%), (*E*)-2-pentenal (95%) 1b; (*E*)-2-hexenal (98%) 1c; (*E*)-3-metil-2-butenal (97%) 1d; (*E*)-2-metil-2-butenal (96%) 1e; 1,3-cicloexanodiona (95%) 2a; 5,5-dimetil-1,3-cicloexanediona (95%) 2b; 4,4-dimetil-1,3-cicloexanediona 2c (98%); 5-(4-clorofenil)-1,3-cicloexanediona (95%) 2d e 5-fenil-1,3-cicloexanediona (95%) 2e foram adquiridos da Sigma-Aldrich e usados sem purificação adicional.

Na preparação de água de mar sintética foram usados sais orgânicos adquiridos da Synth. O extrato de malte e o Agar foram adquiridos da Kasvi.

Os solventes acetato de etila (AcOEt) (P.A.), hexano (P.A.) e CH₂Cl₂ (P.A.) foram adquiridos da Synth. Os solventes grau HPLC (hexano, isopropanol e metanol) foram adquiridos da Panreac. Todos os reagentes e solventes foram usados sem purificação prévia.

A sílica gel utilizada nas separações cromatográficas, com um diâmetro de poro de 6 nm e tamanho de partícula de 35-70 μ m foi adquirida da Acros Organic. Para cromatografia de camada delgada (CCD) foram usadas placas de sílica gel 60 com indicador fluorescente em 254 nm da marca Macherey-Nagel. Para cromatografia de camada delgada preparativa foram usadas placas comerciais de sílica gel 60 da marca Scientific Adsorbents Incorporate 20 x 20 cm².

Foi usada uma solução de *p*-anisaldeído, preparada pela adição de 0,45 mL de anisaldeído em 9 mL de etanol (95%), 0,5 mL de H_2SO_4 concentrado e 0,1 mL de ácido acético glacial, todos da marca Synth.

2.3.2 Estudo da reação de formação de 2*H*-cromenonas biocatalisada pela PPL-II usando planejamento fatorial

2.3.2.1 Planejamento fatorial completo aplicado na reação entre 1,3cicloexanodiona 1a e crotonaldeído 2a catalisada pela PPL-II

Um planejamento fatorial completo 2⁴ foi realizado com o intuito de identificar quais as variáveis que poderiam ter maior influência sobre o rendimento das 2*H*-cromenonas **3a**, **4a e 5a**. Neste caso, 4 variáveis (V) foram testadas nos níveis, baixo (-1) e alto (1), como apresentado na **Tabela 2.5**. Todos os parâmetros estudados foram combinados nos experimentos mostrados na **Tabela 2.6**.

Tabela 2.5. Valores dos níveis alto e baixo das variáveis investigadas no planejamento fatorial completoaplicado à reação de formação de 2*H*-cromenonas **3a**, **4a e 5a**.

| Variável | Nome | Nível baixo | Nível alto |
|----------|-----------------------------------------------|--------------------------------------------------|--------------------------------------------------|
| V1 | Massa de PPL-II | 2 mg | 20 mg |
| V2 | Equivalentes molares de 1a e 2a | 0,1 mmol de 1a e 0,5 mmol de 2a | 0,5 mmol de 1a e 0,1 mmol de 2a |
| V3 | Porcentual de água | 5% | 95% |
| V4 | Temperatura | 30 °C | 60 °C |

Tabela 2.6. Configuração dos experimentos realizados no planejamento fatorial completo para a triagem nas variáveis mais importantes no rendimento de 2*H*-cromenonas **3a**, **4a e 5a** utilizando a 1,3-cicloexanodienona **1a** e o crotonaldeído **2a** na presença da PPL-II. Níveis codificados (-1 e +1) estão entre parênteses.

| o | он + , , , , , , , , , , , , , , , , , , | PPL-II O, H ₂ O (%) (°C), 1 h | + 0 + + | |
|---------------------|------------------------------------------|------------------------------------------------|----------------------------|--------------|
| 1a | 2a | 3a | 4a | 5a |
| Exp. ^[a] | Massa de PPL-II (mg) V1 | Equiv. ^[b] V2 | H ₂ O (%) V3 | T (°C) V4 |
| 1 | 2 (-1) | 5 de 2a (-1) | 5 (-1) | 30 (-1) |
| 2 | 20 (1) | 5 de 2a (-1) | 5 (-1) | 30 (-1) |
| 3 | 2 (-1) | 5 de 1a (1) | 5 (-1) | 30 (-1) |
| 4 | 20 (1) | 5 de 1a (1) | 5 (-1) | 30 (-1) |
| 5 | 2 (-1) | 5 de 2a (-1) | 95 (1) | 30 (-1) |
| 6 | 20 (1) | 5 de 2a (-1) | 95 (1) | 30 (-1) |
| 7 | 2 (-1) | 5 de 1a (1) | 95 (1) | 30 (-1) |
| 8 | 20 (1) | 5 de 1a (1) | 95 (1) | 30 (-1) |
| 9 | 2 (-1) | 5 de 2a (-1) | 5 (-1) | 60 (1) |
| 10 | 20 (1) | 5 de 2a (-1) | 5 (-1) | 60 (1) |
| 11 | 2 (-1) | 5 de 1a (1) | 5 (-1) | 60 (1) |
| 12 | 20 (1) | 5 de 1a (1) | 5 (-1) | 60 (1) |
| 13 | 2 (-1) | 5 de 2a (-1) | 95 (1) | 60 (1) |
| 14 | 20(1) | 5 de 2a (-1) | 95 (1) | 60 (1) |
| 15 | 2 (-1) | 5 de 1a (1) | 95 (1) | 60 (1) |
| 16 | 20 (1) | 5 de 1a (1) | 95 (1) | 60 (1) |

^[a] Todas as reações foram realizadas com 0,1 mmol de reagente limitante **1a** ou **2a** de acordo com o experimento, na presença de 1 mL de solvente. ^[c] As conversões foram determinadas por HPLC-UV.

2.3.2.2 Planejamento fatorial de composto central aplicado na síntese de 2*H*-cromenonas

Uma vez que foram determinadas as variáveis mais influentes nos rendimentos da reação para a obtenção dos produtos 2*H*-cromenonas **3a**, **4a** e **5a** foi realizado um planejamento fatorial de composto central buscando otimizar as condições que levaram a maior produção da 2*H*-cromenona **4a**. Foram escolhidas duas variáveis para realizar o ajuste fino, a massa enzimática e a temperatura.

As variáveis foram codificadas através de seus níveis. O número de níveis corresponde ao tipo de desenho experimental. Para um planejamento fatorial de composto central 5 níveis foram testados, e seus valores do menor ao maior corresponderam aos códigos $-\sqrt{2}$, -1, 0, $1,\sqrt{2}$ (49). Assim, aos valores originais (reais) baixo e alto foram atribuídos os códigos -1 e 1, respectivamente. O ponto central (PC = 0) correspondeu ao ponto médio entre os valores originais dos códigos -1 e 1. Aplicando a **Equação 2.3** foi possível calcular quais foram os valores originais correspondentes aos códigos $-\sqrt{2}$ e $\sqrt{2}$.

$$X_{c} = \frac{X_{o} - PC}{\frac{\Delta}{2}}$$
 Equação 2.3

Na **Equação 2.3**, X_c é a condição codificada e X_o é a condição original, Δ é a diferença entre os valores originais dos níveis -1 e 1. Na **Tabela 2.7**, são mostrados os experimentos que foram executados, com as variáveis nos valores originais e codificados.

Tabela 2.7. Parâmetros experimentais do planejamento fatorial composto central realizado para a reaçãoentre a 1,3-cicloexanodienona 1a e o crotonaldeído 2a na presença da PPL-II.

| O OF | H H H H H H H H H H H H H H H H H H H | 0 0 (5%) 1 h | + | + | O HO |
|--------------------|---------------------------------------|--------------------|------------|---------------------------|---------|
| 1a | 2a | 3a | 4a | | 5a |
| Exp ^[a] | Massa de PPL-II (mg) | T (°C) | | Conversões ^[b] | |
| 2p | 114000 00 11 2 11 (ing) | 1 (0) | 3 a | 4 a | 5a |
| 1 | 5 (-1) | 35 (-1) | 58,8 | 11,7 | 43,0 |
| 2 | 17 (1) | 35 (-1) | 51,3 | 19,7 | 49,2 |
| 3 | 5 (-1) | 55 (1) | 58,8 | 12,5 | 60,3 |
| 4 | 17 (1) | 55(1) | 53,2 | 19,2 | 51,7 |
| 5 | 11 (0) | 45 (0) | 53,6 | 15,3 | 54,4 |
| 6 | 11 (0) | 45 (0) | 55,7 | 16,1 | 52,7 |
| 7 | 11 (0) | 45(0) | 58,7 | 16,3 | 53,0 |
| 8 | $2(-\sqrt{2})$ | 45 (0) | 66,4 | 8,1 | 48,2 |
| 9 | 11 (0) | $30(-\sqrt{2})$ | 30,6 | 8,0 | 30,1 |
| 10 | $20(\sqrt{2})$ | 45 (0) | 56,4 | 19,3 | 50,2 |
| 11 | 11 (0) | $60(\sqrt{2})$ | 51,9 | 18,6 | 57,1 |
| | | | | | |

^[a] Todas as reações foram realizadas com **1a** (0,1 mmol), **2a** (0,5 mmol), DMSO (950 μ L), H₂O (50 μ L). ^[b] As conversões foram determinados por HPLC-UV.

2.3.2.3 Protocolo de síntese de 2*H*-cromenonas, extração e preparo de amostra para análise por HPLC-UV

Todas as reações dos experimentos apresentados nas **Tabela 2.6** e 2.7 foram realizadas em um frasco de 4 mL usando DMSO como solvente. Nos experimentos do planejamento fatorial completo a enzima foi previamente hidratada por 15 minutos antes de ser adicionada ao meio de reação, em um volume de água destilada (50 ou 950 μ L). A enzima hidrata foi adicionada ao frasco contendo os reagentes (aldeído e cetona) e adicionou o DMSO até completar 1mL.

As reações foram agitadas em agitador magnético (200 rpm) à temperatura correspondente (30 ou 60 °C). O tempo de reação total foi de 1 hora.

Após a reação ser finalizada, realizou-se a extração transferido todo o conteúdo para um tubo Falcon e foi adicionado 10 mL de água e 10 mL de acetato de etila. Agitou-se em vortex por 30 segundos e levou-se para centrifugação a 10.000 rpm por 5 min. A fase orgânica foi separada da fase aquosa com uma pipeta Pasteur. Este processo de extração foi realizado mais duas vezes e os volumes das fases orgânicas foram unificados para a evaporação a pressão reduzida.

O extrato de cada reação foi dissolvido em 25 mL de uma mistura de água Milli-Q e metanol (MeOH) (50%) e analisado por HPLC-UV.

Para os experimentos relatados na **Tabela 2.7** o protocolo foi similar ao descrito nesta seção, mas com as variações correspondentes à carga enzimática e à temperatura, usando 900 μ L de DMSO e 100 μ L de H₂O. O tempo de reação também foi de 1 h. Em seguida foi realizado o processo de extração e preparação da amostra para análise por HPLC-UV utilizando coluna quiral e aquiral. Todos os produtos foram caracterizados por IV, RMN de ¹H e ¹³C.

2.3.2.4 Avaliação do escopo da reação para a formação das 2*H*cromenonas 4a-e

Através da condição que levou o maior rendimento do produto 2*H*-cromenona **4a** a partir do planejamento fatorial de composto central, a reação foi realizada na escala de 1 mmol. Após 1 h de reação, os produtos foram isolados por cromatografia de coluna usando um gradiente de 95:5 a 60:40 de hexano e isopropanol. Os produtos foram detectados por UV e revelados com solução de *p*-anisaldeído.

2.3.2.5 Uso de diferentes aldeídos α,β-insaturados na reação de formação das 2*H*-cromenonas 4a-e

O escopo da reação foi estendido para outros aldeídos α , β -insaturados, os quais possuem diferentes cadeias alquílicas como o (*E*)-2-pentenal (>95%) **2b** e o (*E*)-2-hexenal (98%) **2c**, bem como cadeias ramificadas como o (*E*)-2-metil-but-2-enal (>97%) **2d**, empregando o mesmo procedimento descrito na **Seção 2.3.2.3**.

2.3.2.6 Caraterização dos compostos 2*H*-cromenonas 3a-e e 5a-c

(±)-2-metil-2,6,7,8-tetraidro-5*H*-cromen-5-ona (3a) (1,10,35,38,50).

Óleo incolor; rendimento: 56 mg, 34 %.

IV: \bar{v} (cm⁻¹) = 3404, 2947, 2878, 1722, 1618, 1406, 1227, 1190, 1134, 1070, 1036, 932, 756.

RMN de ¹H (500 MHz, CDCl₃): $\delta = 6,44$ (dd, J = 10,0 e 1,5 Hz, 1H), 5,29 (dd, J = 10,0 e 3,1 Hz, 1H), 5,02 (qdd, J = 6,5; 3,1 e 1,7 Hz, 1H), 2,43 – 2,35 (m, 4H), 2,00 – 1,94 (m, 2H), 1,41 (d, J = 6,6 Hz, 3H).

RMN de ¹³C (126 MHz, CDCl₃): δ = 195,13; 172,56; 118,98; 117,36; 111,41; 74,07; 36,48; 28,42; 21,77; 20,69.

HRMS: m/z [M + H]⁺ calcd. para C₁₀H₁₃O₂⁺: 165,0910; encontrado:165,0918.

(±)-2-etil-2,6,7,8-tetraidro-5*H*-cromen-5-ona (3b) (38).



RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃): $\delta = 6,40$ (d, J = 10,1 Hz, 1H), 5,23 (dd, J = 10,1 e 3,1 Hz,1H), 4,80 (td, J = 5,6 e 2,2 Hz, 1H), 2,41 – 2,17 (m, 4H), 1,90 (dt, J = 12,9 e 6,4 Hz, 2H), 1,74 – 1,62 (m, 2H), 0,92 (t, J = 7,4 Hz, 3H).

RMN de ¹³C (101 MHz, CDCl₃): δ = 194,95; 172,81; 117,74; 117,53; 111,35; 78,78; 36,39; 28,80; 28,27; 20,61; 8,58.

HRMS: m/z [M + H]⁺ calcd. para C₁₀H₁₃O₂⁺: 179,1067; encontrado:179,1066,



(±)-2-propil-2,6,7,8-tetraidro-5*H*-cromen-5-ona (3c) (35,38).

Óleo incolor; rendimento: 104 mg (54%).

 $\begin{array}{c} & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & &$

RMN de ¹³C (101 MHz, CDCl₃): δ = 194,93; 172,73; 117,78; 117,35; 111,23; 77,40; 37,75; 36,21; 28,17; 20,49; 17,44; 13,76.

HRMS: m/z [M + H]⁺ calcd. para C₁₀H₁₃O₂⁺: 193,1223; encontrado:193,1222.

(±)-2,3-dimetil-2,6,7,8-tetraidro-5*H*-cromen-5-ona (3d) (1,50).

Óleo incolor; rendimento: 105 mg (59%).

Constraints RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃): δ = 6,01 (s, 1H), 4,68 (q, *J* = 6,5 Hz, 1H), 2,28 – 2,16 (m, 4H), 1,84 – 1,75 (m, 2H), 1,56 (d, *J* = 0,6 Hz, 3H), 1,19 (d, *J* = 6,5 Hz, 3H). RMN de ¹³C (126 MHz, CDCl₃): δ = 194,70; 169,34; 126,98; 111,59; 111,12; 76,80; 36,12; 27,87; 20,47; 19,05; 18,55.

HRMS: m/z [M + H]⁺ calcd. para C₁₀H₁₃O₂⁺: 179,1067; encontrado: 179,1066.

2,2-dimetil-2,6,7,8-tetraidro-5H-cromen-5-ona (3e) (1,10,35,38,50).



Óleo incolor; rendimento: 139 mg (78%).

 $\begin{array}{c} & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & & \\ & &$

RMN de ¹³C (126 MHz, CDCl₃): δ = 194,74; 171,51; 122,81; 122,80; 115,73; 110,45; 79,63; 36,37; 28,56; 28,34; 20,59.

HRMS: m/z [M + H]⁺ calcd. para C₁₀H₁₃O₂⁺: 179,1067; encontrado:179,1058.



(±)-2-(2-hidroxi-6-oxo-1-cicloexen-1-il)-4-metil-2,3,4,6,7,8-hexaidro-5*H*-cromen-5-ona (5a)

Sólido incolor, rendimento: 102 mg, 35%. Mp. 98-99 °C.

HO IV: \bar{v} (cm⁻¹) = 3267, 2957, 2937, 2885, 2658, 1601, 1393, 1298, 1190, 1092, 1034, 995, 758, 615.

RMN de ¹H (400 MHz, CD₃OD): $\delta = 5,38 - 5,34$ (m, 1H), 2,80 - 2,72 (m, 1H), 2,46 (t, J = 6,4 Hz, 4H), 2,39 (t, J = 6,4 Hz, 2H), 2,37 - 2,27 (m, 2H), 2,02 - 1,90 (m, 4H), 1,42 (dd, J = 2,5, 1,5 Hz, 1H), 1,39 (dd, J = 2,5, 1,4 Hz, 1H), [1,14 (d, J = 6,5 Hz, 1H)], 1,10 (d, J = 6,9 Hz, 2H),

RMN de ¹³C (101 MHz, CD₃OD): δ = 200,91; 175,49; 116,76; 114,55; 69,15; (69,11; 69,08); 69,04; 37,95; 29,93; 24,43; [24,33]; 22,21; 21,71; 21,00; [20,98; 20,95].

HRMS: m/z [M + H]⁺ calcd. para C₁₀H₁₃O₂⁺: 277,1434; encontrado:277,1427.

O excesso enantiomérico foi determinado pela análise por HPLC em coluna Phenomenex LUX[®] (*n*-hexano/*i*-PrOH = 70:30, 1 mL/min), $\lambda = 254$ nm, t_R = 3,969 min, t_R = 4,868 min.



HO

(±)-4-etil-2-(2-hidroxi-6-oxo-1-cicloexen-1-il)-2,3,4,6,7,8-hexaidro-5*H*-cromen-5-ona (5b)

Sólido incolor, rendimento: 45 mg, 31%.

HO RMN de ¹H (500 MHz, CDCl₃): $\delta = 5,27$ (dd, J = 11,8; 1,6 Hz, 1H), 2,58 - 2,44 (m, 5H), 2,42 - 2,31 (m, 7H), 2,07 - 1,89 (m, 7H), 1,77 - 1,68 (m, 3H), 1,65-1,57 (m, 2H), 1,32 - 1,20 (m, 2H), [1,32 - 1,20 (m, 2H) 1,05 (t, J = 7,5 Hz, 1H)], 0,97 (t, J = 7,4 Hz, 3H), [0,89 (dt, J = 22,6,7,5 Hz, 2H), 0,81 (t, J = 7,5 Hz, 1H)]. RMN de ¹³C (126 MHz, CDCl₃): $\delta = 197,95$; 196,89; 174,08; 168,33; 118,43; 112,85; 73,15; 37,32; 36,75; 30,17; 29,62; 29,35; 28,79; 26,65; 20,97; 20,67; 11,93.

HRMS: m/z [M + H]⁺ calcd. para C₁₀H₁₃O₂⁺: 291,1591; encontrado:291,1590.

(±)-2-(2-hidroxi-6-oxocicloex-1-en-1-il)-4-propil-2,3,4,6,7,8hexaidro-5H-cromen-5-ona (5c)

Sólido incolor, rendimento: 32 mg, 21%.

RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃): δ = 5,28 (dd, *J* = 11,8, 1,5 Hz, 1H); [5,02 (d, *J* = 10,6 Hz, 1H); 4,63 (d, *J* = 4,0 Hz, 1H); 4,51 (dd, *J* = 10,8, 3,5 Hz,

1H)]; 2,54 – 2,27 (m, 14H), 2,07 – 1,87 (m, 9H); 1,70 – 1,52 (m, 5H); 1,38 – 1,17 (m, 11H); 0,92 (t, *J* = 7,0 Hz, 3H); [1,01 – 0,78 (m, 7H)].

RMN de ¹³C (101 MHz, CDCl₃): δ = 198,07; 168,45; 118,46; 112,85; 73,10; 37,29; 36,05; 29,86; 29,83; 28,79; 28,30; 20,95; 20,65; 20,48; 20,38; 14,21.

HRMS: m/z [M + H]⁺ calcd. para C₁₀H₁₃O₂⁺: 305,1747; encontrado:305,1741.
2.3.3 Metodologia para a formação de 2*H*-cromenonas biocatalisada por lipases

Foi realizada uma triagem entre as lipases de *Aspergillus niger* (\geq 184 U g⁻¹), *Rhizopus niveus* (\geq 15 U mg⁻¹), *Thermomyces lanuginosus* (\geq 3 U mg⁻¹), Amano lipase de *Burkhodelaria cepacia* (\geq 3 U mg⁻¹), Amano lipase de *Pseudomonas fluorescences* (\geq 20.000 U mg⁻¹) e a lipase de pâncreas de porco tipo II (30,1 U mg⁻¹) como catalisadores da reação entre a 1,3-cicloexanodiona **1a** e o crotonaldeído **2a** para selecionar a melhor enzima na síntese de 2*H*-cromenona **3a** e/ou 2-hidroxi-2*H*-cromenona **4a** (**Esquema 2.21**).

Esquema 2.21. Reação da 1,3-cicloexanodiona 1a e o crotonaldeído 2a catalisada por lipases.



2.3.3.1 Triagem de biocatalisadores na síntese das 2*H*-cromenonas 3a e4a

Em um balão de 5 mL foram adicionados 0,1 mmol (11,2 mg) de 1,3-cicloexanodiona **1a** e 1,0 mmol (41, 2 mg) de crotonaldeído **2a** os quais foram dissolvidos em 900 μ L de DMSO. A esta mistura reacional foram adicionados 100 μ L de H₂O contendo 20 mg da enzima. A reação foi mantida a 30 °C em agitação magnética (200 rpm).

Quando completadas 24 horas cada reação foi transferida para um tubo Falcon e foram adicionados 10 mL de água destilada e 10 mL de acetato de etila. Cada tubo Falcon contendo a reação para a extração foi agitado durante 30 segundos em um vortex e submetido a centrifugação a 10.000 rpm x 5 min. O solvente orgânico foi retirado com uma pipeta Pasteur. À fase aquosa foram adicionados 10 mL de acetato de etila e o processo de extração foi repetido por mais duas vezes. As fases orgânicas das extrações foram unificadas e o solvente foi removido em evaporador rotativo. A amostra obtida foi solubilizada em 25 mL de uma mistura de água e metanol (1:1) e analisada por HPLC-UV.

O experimento de controle na ausência da enzima também foi realizado para constatar qual foi a contribuição da catálise enzimática na reação, usando o mesmo procedimento descrito na **Seção 2.3.3.1.**

2.3.3.2 Uso de diferentes solventes na reação entre a 1,3-cicloexanodiona e crotonaldeído catalisada pela lipase de *Pseudomonas fluorescens*

Foram testadas misturas de solventes DMSO e água, CH_2Cl_2 e água, hexano e água, hexano e etanol, octanol e água, nas porcentagens 5%, 50% e 95% em todos os casos. As reações foram realizadas em um balão de 5 mL contendo 0,1 mmol (11,2 mg) de 1,3cicloexanodiona **1a** e 1,0 mmol (41, 2 mg) de crotonaldeído **2a** os quais foram dissolvidos em 900 µL do solvente e 100 µL de H₂O contendo 20 mg da lipase na triagem descrita na **Seção 2.3.3.1**. Cada reação foi mantida em agitação magnética (200 rpm) à temperatura de 30 °C. As reações contendo os solventes DMSO e CH₂Cl₂ foram testadas adicionalmente a 50 °C. Depois de 24 horas de reação cada mistura foi transferida para um tubo Falcon e extraída como descrito na **Seção 2.3.2.3**. Cada amostra foi solubilizada em 25 mL de uma mistura de água e metanol (1:1) e analisada por HPLC-UV.

Foram realizados alguns experimentos controles na ausência da enzima usando os solventes DMSO e CH₂Cl₂ nas temperaturas de 30 e 50 °C para constatar a contribuição de cada solvente em cada temperatura, usando o mesmo procedimento de síntese descrito na **Seção** 2.3.3.1 e extração descrito na **Seção** 2.3.2.3.

2.3.3.3 Experimentos controles na formação de 2*H*-cromenonas

Experimentos controles foram realizados na ausência da enzima, na presença da enzima desnaturada previamente a uma temperatura acima de 95 °C por 20 min, para determinar se a catálise promovida pela enzima foi específica ou inespecífica. Foi usado o mesmo procedimento de síntese descrito na **Seção 2.3.2.3**.

Adicionalmente, para contribuir ao estudo da especificidade, foi comparada com a reação na presença de BSA, uma proteína não enzimática. Os reagentes foram usados na escala de 0,1 mmol de 1,3-cicloexanodiona **1a** e 0,5 mmol do crotonaldeído **2a** em 900 μ L de CH₂Cl₂ e 100 μ L de água em 30 °C durante 24 h. Foi usado o mesmo procedimento de síntese descrito na **Seção 2.3.2.3**.

2.3.3.4 Avaliação do escopo da reação na formação de 2*H*-cromenonas catalisada por LPF

Uma vez que foram otimizadas as condições de reação com 0,1 mmol da 1,3cicloexanodiona **1a** e 5 equiv. (0,5 mmol) do aldeído α , β -insaturados **2a** em 1 mL da mistura de solventes CH₂Cl₂ e água (10%) a 30 °C em 24 h, o seguinte passo foi realizar a reação na escala de 1 mmol. Foram utilizados diferentes aldeídos α , β -insaturados **2a-c** e β -dicetonas cíclicas substituídas **1a-d**.

Os produtos foram isolados usando cromatografia de coluna e eluídos com um gradiente de 90:10 a 50:50 de hexano e isopropanol. A detecção foi realizada por CCD com indicador F-254, visualizada por irradiação com luz UV e com uma solução de *p*-anisaldeído.

2.3.3.5 Uso de diferentes aldeídos α,β-insaturados na formação de 2*H*cromenonas 4a-c catalisada por LPF

O escopo da reação foi estendido para os aldeídos α,β -insaturados: (*E*)-2-pentenal **2b**, (*E*)-2-hexenal **2c** e (*E*)-2-metil-but-2-enal **2c**, os quais possuem cadeias alquílicas maiores e ramificada. As condições de reação utilizadas para a obtenção das 2-hidroxi-2*H*-cromenonas foram 1 mmol da 1,3-cicloexanodiona **1a** e 5 mmol dos correspondentes aldeídos α,β insaturados **2a-c** em 10 mL de CH₂Cl₂ e água (10%) em 30 °C por 24 h. Os produtos 2-hidroxi-*2H*-cromenonas **4a-c** foram caracterizados por IV, RMN de ¹H e ¹³C, HRMS e analisadas por HPLC.

2.3.3.6 Caraterização dos compostos 2-hidroxi-2*H*-cromenonas

 (\pm) -2-hidroxi-4-metil-2,3,4,6,7,8-hexaidro-5*H*-cromen-5-one (4a) (38,51). Sólido branco; rendimento: 93%. Mp. 96-98 °C. Mistura de diastereoisômeros 8:2 (*anti:syn*).

IV: $\bar{\upsilon} = 3294, 2959, 2932, 2990, 1634, 1603, 1456, 1400, 1342, 1229, 1163, 1130, 1030, 972, 816, 648 \text{ cm}^{-1}$.

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃): $\delta = 5,39$ (dd, J = 9,34 e 2,50 Hz, 1H), 2,89 – 2,81 (m, 1H), 2,41 – 2,32 (m, 4H), 1,94 (dd, J = 13,1 e 6,6 Hz, 2H), 1,75 (ddd, J = 13,5; 9,3 e 5,9 Hz, 2H), 1,10 (d, J = 7,0 Hz, 3H),

RMN de ¹³C (101 MHz, CDCl₃): δ_{anti} = 198,51; 169,78; 116,13; 93,24; 37,14; 35,81; 28,80; 23,27; 21,09; 21,02. δ_{syn} = 198,51; 169,78; 116,72; 94,49; 37,26; 35,71; 28,93; 22,95; 20,6; 20,4.

HRMS: m/z [M + H]⁺ calcd. para C₁₀H₁₅O₃⁺: 183,1016; encontrado: 183,1015.

O excesso enantiomérico foi determinado pela análise por HPLC em coluna Phenomenex LUX[®] (*n*-hexano/*i*-PrOH = 95:5, 1 mL/min), $\lambda = 254$ nm, t_R = 35,459 min, t_R = 37,194 min.

(\pm) -4-etil-2-hidroxi-2,3,4,6,7,8-hexaidro-5*H*-cromen-5-ona (4b) (38). Sólido branco; rendimento: 58%. Mp. 91-92 °C. Mistura de diastereoisômeros 8:2 (*anti:syn*).

RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃): $\delta = 5.37$ (d, J = 7,8 Hz, 1H *anti*), 4.90 (d, J = 5,3 Hz, 1H *syn*), 2.61 (dd, J = 6,2 e 3,8 Hz, 1H), 2.44 – 2.25 (m, 4H), 2.08 (dt, J = 13,6 e 2,6 Hz, 1H), 1,92 (p, J = 6,5 Hz, 2H), 1,73 – 1,57 (m, 2H), 1,18 – 1,07 (m, 1H), 0,91 (t, J = 7,41 Hz, 3H *anti*), 0,86 (t, J = 7,43 Hz, 3H *syn*).

RMN de ¹³C (101 MHz, CDCl₃): δ_{anti} = 198,51; 170,01; 115,43; 93,39; 37,14; 31,48; 29,83; 28,86; 27,09; 21,01; 11,74. δ_{syn} = 198,67; 169,58; 115,99; 94,89; 37,25; 31,69; 29,37; 29,01; 25,81; 20,45; 11,18.

HRMS: m/z [M + H]⁺ calcd. para C₁₁H₁₇O₃⁺: 197,1172; encontrado: 197,1171.

O excesso enantiomérico foi determinado pela análise por HPLC em coluna Phenomenex LUX[®] (*n*-hexano/i-PrOH = 98:2, 1 mL/min), λ = 254 nm, t_R = 137,169 min, t_R = 152,024 min.



(±)-2-hidroxi-4-propil-2,3,4,6,7,8-hexaidro-5*H*-cromen-5-ona (4c) (3,38,51).

Sólido branco; rendimento: 37%. Mistura de diastereoisômeros 8:2 ^H (*anti:syn*).

RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃): $\delta = 5,38$ (d, J = 9,4 Hz, 1H *anti*), 4.91 (d, J = 4,3 Hz, 1H *syn*), 2,70 (dd, J = 6,1 e 3,9 Hz, 1H), 2,36 (dt, J = 13,5 e 6,3 Hz, 4H), 2,06 (dt, J = 13,6 e 2,5 Hz, 1H), 1,93 (dd, J = 12,9 e 6,4 Hz, 2H), 1,66 – 1,53 (m, 2H), 1,47 – 1,35 (m, 1H), 1,33 – 1,22 (m, 1H), 1,15 – 1,03 (m, 1H), 0,88 (t, J = 7,3 Hz, 3H *anti*), 0,87 (t, J = 7,2 Hz, 3H *syn*).

RMN de ¹³C (101 MHz, CDCl₃): $\delta_{anti} = 198,49$; 169,96; 115,55; 93,41; 37,13; 36,70; 32,02; 28,86; 28,11; 21,01; 20,41; 14,18. $\delta_{syn} = 198,66$; 169,39; 116,20; 94,81; 37,25; 35,47; 32,18; 29,00; 27,76; 20,43; 20,08; 14,25.

HRMS: m/z [M + H]⁺ calcd. para C₁₂H₁₉O₃⁺: 211,1329; encontrado: 211,1329.

O excesso enantiomérico foi determinado pela análise por HPLC em coluna Phenomenex LUX[®] (*n*-hexano/i-PrOH = 98,5:1,5; 1 mL/min), λ = 254 nm, t_R = 174,049 min, t_R = 214,826 min.



(±)-2-hidroxi-3,4-dimetil-2,3,4,6,7,8-hexaidro-5*H*-cromen-5-ona (4d) Sólido branco; rendimento: 10%.

O OH RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃): $\delta = 5,12$ (d, J = 9,1 Hz, 1H *anti*), 5,00 (d, J = 4,8 Hz, 1H *syn*),4,76 (s, 1H), 2,79 – 2,67 (m, 1H), 2,38 (t, J = 6,3 Hz, 3H), 2,36 – 2,32 (m, 2H), 1,97 – 1,88 (m, 2H), 1,05 (d, J = 7,0 Hz, 3H *anti*), 0,92 (d, J = 7,0 Hz, 3H *anti*), 1,10 (d, J = 6,9 Hz, 3H *syn*), 0,89 (d, J = 6,9 Hz, 3H *syn*).

RMN de ¹³C (101 MHz, CDCl₃): $\delta_{anti} = 198,41$; 169,76; 117,18; 97,15; 36,93; 36,51; 28,61; 28,19; 21,11; 14,99; 13,14. $\delta_{syn} = 199,16$; 169,33; 115,07; 94,62; 37,56; 37,20; 34,17; 30,88; 21,00; 14,21; 11,61.

2.3.3.7 Uso de diferentes β-dicetonas cíclicas na formação de 2*H*cromenonas catalisada por LPF

Foi substituída a 1,3-cicloexanodiona **1a** por outras β -dicetona cíclicas substituídas, como a 5,5-dimetil-1,3-cicloexanodiona **1b**; 4,4-dimetil-1,3-cicloexanodiona **1c**; 5-(4-clorofenil)-1,3-cicloexanodiona **1d** e 5-fenil-1,3-cicloexanodiona **1e**. Para sua síntese foram usadas as condições otimizadas, 1 mmol das β -dicetonas cíclicas **1b-e** e 5 mmol do aldeído α , β -insaturado **2a** em 10 mL do solvente CH₂Cl₂ e água (10%) em 30 °C por 24 h. Os produtos 2-hidroxi-2*H*cromenonas **4d-g** foram caracterizados por RMN de ¹H e ¹³C.



RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃): $\delta = 5,37$ (td, J = 9,2 e 2,2 Hz, 1H), 2,90 – 2,80 (m, 1H), 2,42 – 2,38 (m, 2H), 1,87 (tt, J = 16,3 e 2,6 Hz, 1H), 1,76 (qdd, J = 12,9; 10,8 e 6,3 Hz, 3H), 1,19 (d, J = 4,9 Hz, 3H), 1,10 (d, J = 3,7 Hz, 1H), 1,09 – 1,06 (m, 6H).

RMN de ¹³C (126 MHz, CDCl₃): δ = 202,77; 166,97; 114,01; 92,86; 77,27; 77,02; 76,76; 40,01; 35,71; 34,44; 25,45; 24,79; 24,58; 23,46; 20,94.

O excesso enantiomérico foi determinado pela análise por HPLC em coluna Phenomenex LUX[®] (*n*-hexano/*i*-PrOH = 97,5:2,5; 1 mL/min), $\lambda = 254$ nm, t_R = 59,577 min, t_R = 62,380 min.

(±)-2-hidroxi-4,7,7-trimetil-2,3,4,6,7,8-hexaidro-5*H*-cromen-5-ona (4g)

OH Isolado como óleo incolor; rendimento: 69%. Mp. 75-80 °C

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃): $\delta = 5,40$ (dd, J = 9,6 e 2,4 Hz, 1H *anti*), 5,44 (dd, J = 4,9 e 2,9 Hz, 1H *syn*), 2,89 – 2,80 (m, 1H), 2,25 (s, 2H), 2,23 (s, 1H), 2,19 (s, 1H), 1,87 (dt, J = 13,4 e 2,5 Hz, 1H), 1,80 – 1,70 (m, 1H), 1,22 (d, J = 6,9 Hz, 1H *syn*), 1,09 (d, J = 7,0 Hz, 3H *anti*), 1,05 (d, 3H *syn*), 1,04 (s, 3H *anti*), 1,02 (s, 3H *syn*), 1,01 (s, 3H *anti*).

RMN de ¹³C (101 MHz, CDCl₃): $\delta_{anti} = 198,35$; 168,23; 114,77; 93,34; 50,93; 42,46; 35,71; 32,26; 28,97; 27,80; 23,15; 21,11. $\delta_{syn} = 198,64$; 168,18; 115,29; 94,44; 51,07; 42,63; 35,40; 31,85; 28,60; 28,12; 22,56; 20,34. O excesso enantiomérico foi determinado pela análise por

HPLC em coluna Phenomenex LUX[®] (*n*-hexano/*i*-PrOH = 97:3, 1 mL/min), λ = 254 nm, t_R = 71,321 min, t_R = 105,487 min.



(±)-2-hidroxi-4-metil-7-fenil-2,3,4,6,7,8-hexaidro-5*H*-cromen-5ona (4h)

Isolado como óleo incolor; rendimento: 68%. Mp. 99-100 °C

RMN 1 H (400 MHz, CDCl₃): $\delta = 7,33 - 7,27$ (m, 2H), 7,25 - 7,16 (m,3H), 5,45 (ddd, J = 30,6; 9,1 e 2,6 Hz, 1H), 3,35 - 3,23 (m, 1H), 2,94 - 2,84 (m, 1H), 2,72 - 2,45 (m, 4H), 1,94 - 1,70 (m, 2H), 1,29 - 1,24 (m, 1H), 1,12 (d, J = 7,0 Hz, 3H).

RMN de ¹³C (101 MHz, CDCl₃): δ = 197,90, 169,14, 142,70, 128,83, 127,08, 126,67, 115,64, 93,60, 44,10, 39,33, 36,29, 35,57, 23,62, 22,77, 21,15, 20,91,198,49; 169,96; 115,55; 93,41; 37,13; 36,70; 32,02; 28,86; 28,11; 21,01; 20,41; 14,18.

O excesso enantiomérico foi determinado pela análise por HPLC em coluna Phenomenex $LUX^{(R)}$ (*n*-hexano/*i*-PrOH = 97:3, 1 mL/min), $\lambda = 254$ nm, $t_R = 181,560$ min, $t_R = 196,071$.



(±)-7-(4-clorofenil)-2-hidroxi-4-metil-2,3,4,6,7,8-hexaidro-5*H*cromen-5-ona (4i)

Isolado como óleo incolor; rendimento: 66%. Mp. 115-116 °C

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃): $\delta = 7,28$ (dd, J = 8,6, 2,5 Hz, 2H), 7,13 (dd, J = 8,4 e 3,6 Hz, 2H), 5,53 – 5,38 (m, 1H), 5,06 (dd, J = 27,7 e 6,7 Hz, 1H)(isômero), 3,34 – 3,23 (m, 1H), 2,95 – 2,84 (m, 1H), 2,71 – 2,42 (m, 4H), 1,96 – 1,69 (m, 2H), 1,16 (d, J = 7,0 Hz, 3H), 1,13 (d, J = 7,0 Hz, 3H).

RMN de ¹³C (101 MHz, CDCl₃): δ = 198,49; 169,96; 115,55; 93,41; 37,13; 36,70; 32,02; 28,86; 28,11; 21,01; 20,41; 14,18.

O excesso enantiomérico foi determinado pela análise por HPLC em coluna Phenomenex $LUX^{(R)}$ (*n*-hexano/*i*-PrOH = 96:4, 1 mL/min), $\lambda = 254$ nm, $t_R = 105,655$ min, $t_R = 117,552$ min.

2.3.4 Determinação da concentração de proteína nos preparados enzimáticos comerciais usados nos experimentos

A concentração de PPL-II e LPF nos extratos enzimáticos comerciais foi determinada através do método de Lowry modificado usando BSA como padrão (52).

Foi preparada uma curva analítica com concentrações de BSA de 25 μ g/mL, 50 μ g/mL, 100 μ g/mL, 150 μ g/mL, 200 μ g/mL e 250 μ g/mL. Adicionalmente, uma amostra de água foi usada como branco (controle).

A cada solução da curva contendo 1 mL das soluções padrão de BSA foram adicionados 5 mL da *Solução 1* preparada pela mistura das soluções A, B e C na hora de uso. Agitou-se por 15 minutos em temperatura ambiente e posteriormente foi adicionado 0,5 mL do reagente de Folin, preparado pela diluição do reagente comercial Folin 1:1 em água. A mistura foi agitada e incubada por 30 min em temperatura ambiente. Após os 30 minutos foi realizada a leitura da absorbância das seis soluções padrão no espectrofotômetro em 660 nm. Foi obtida a equação da reta (**Equação 2. 4**) que foi utilizada para determinar a concentração de proteínas nas amostras de interesse.

Preparação da Solução 1

Na hora do uso, misturou-se: 50 mL A + 0.5 mL B + 0.5 mL C.

Solução A: carbonato de sódio (Na₂CO₃) 2% em hidróxido de sódio (NaOH) 0,1 N.

Solução B: sulfato de cobre (II) (CuSO₄) 1% em água.

Solução C: Tartarato de sódio e potássio (KNaC₄H₄O₆·4H₂O) 1% em água.

Reagente de Folin:diluído 1:1 em água.

Abs =
$$0,0025$$
 [C] + $0,0402$, R² = $0,9945$ Equação 2. 4

2.3.5 Métodos de análise, identificação e caracterização estrutural

2.3.5.1 Análise por cromatografia líquida de alta eficiência

As análises por HPLC-UV foram realizadas em um cromatógrafo Shimadzu 2010: controlador de sistema CBM-20A, bombeamento LC-20AT, desgaseificador DGU-20A5, amostrador automático SIL-20AHT, forno de coluna CTO-20A e detector UV-VIS SPD-M20A. Foi usada uma coluna aquiral Luna C18 da Phenomenex (250 mm x 4,6 mm, 5 µm) equipada com uma pré-coluna.

Os experimentos do planejamento fatorial completo descritos na **Seção 2.3.2.1** foram analisados usando um método isocrático no modo reverso cuja composição da fase móvel foi água e metanol (60:40), com um fluxo de 0,5 mL/min, temperatura do forno de 40 °C e detecção a 254 nm. As amostras dos experimentos do planejamento fatorial de composto central, **Seção 2.3.2.2** e dos experimentos descritos na **Seção 2.3.3** foram analisadas usado um método em gradiente no modo reverso usando ácido fórmico ao 0,1% em água e metanol, como ilustrado na **Figura 2.6**. O fluxo foi 0,5 mL/min, a temperatura do forno, 40 °C, detecção a 254 nm para os compostos 2*H*-cromenonas **3a-e** e as 2-hidroxi-2*H*-cromenonas **4a-i**, enquanto o composto 2-(2-hidroxi-6-oxocicloex-1-en-1-il)-cromenona **5a-e** foi analisado a 286 nm.

Figura 2.6. Método de análise por HPLC-UV aquiral para as reações de formação de 2*H*-cromenonas **3a-e, 4a-i** e **5a-e** usando uma mistura de de MeOH/H₂O com 0,1% de HCOOH



Para as análises por cromatografia quiral foi usada uma coluna quiral Phenomenex LUX[®] (250 mm x 4,6 mm, 5 μ m). Em todos os casos foi usado um método isocrático usando hexano e isopropanol, cuja composição variou de acordo ao composto analisado. O fluxo usado foi de 1 mL/min, a temperatura do forno de 40 °C e a detecção a 254 nm.

Detalhes das análises encontram-se descritos nos cromatogramas na parte de Resultados e Discussão e no Apêndice.

2.3.5.2 Obtenção de curvas analíticas

Foram obtidas as curvas analíticas dentro do intervalo de linearidade da relação entre a absorbância e a concentração. A obtenção destas curvas analíticas foi realizada a partir de soluções padrão de concentrações que variaram desde 10 a 500 mg/L, analisadas pelos dois métodos apresentados na **Seção 2.3.5.1** por cromatografia aquiral.

Assim, para a 2*H*-cromenona **3a** e a 2-(2-hidroxi-6-oxocicloex-1-en-1-il)-cromenona **5a** foram preparadas soluções padrão de 12,5 μ g/mL; 25 μ g/mL; 50 μ g/mL; 100 μ g/mL; 200 μ g/mL; 300 μ g/mL; 400 μ g/mL e 500 mg/L. Enquanto para a 2-hidroxi-2*H*-cromenona **4a** foram preparadas soluções padrão de 10 μ g/mL, 20 μ g/mL, 30 μ g/mL, 50 μ g/mL, 100 μ g/mL, 200 μ g/mL, 300 μ g/mL, 400 μ g/mL e 500 mg/L.

As áreas correspondentes a cada concentração foram tratadas pelo método de mínimos quadrados ajustado ao modelo da regressão linear. Obteve-se as equações de primeira ordem, cujas parâmetros são especificados na **Tabela 2.8**.

| Tabela | 2.8. | Parâmetros | das | equações | de | primeira | ordem | obtidas | das | análises | cromatográficas | na |
|----------|--------|---------------|------|------------|------|-----------|------------------|---------|--------------|---------------------------|-----------------|----|
| obtenção | o de o | curvas analít | icas | para a qua | ntif | ïcação da | s 2 <i>H</i> -cr | omenona | is 3a | , 4a e 5a . | | |

| Composto | Linearidade | Coeficiente angular | Intercepto | r ² | |
|--------------------------------------------------------------|-------------|---------------------|------------|----------------|--|
| Composio | (mg/L) | (mg/L) | (mg/L) | | |
| 2H-cromenona 3a | 0-500 | 35767 | 0,0 | 0,9992 | |
| 2-hidroxi-2H-cromenona 4a | 0-500 | 58422 | 0,0 | 0,9984 | |
| 2-(2-hidroxi-6-oxocicloex-1-en- 1-il)-cromenona 5a | 0-600 | 18547 | 0,0 | 0,9983 | |

2.3.5.3 Determinação de rendimento e enantiosseletividade das 2*H*cromenonas (3a-e, 4a-i e 5a-e)

Através das análises cromatográficas por HPLC-UV aquiral foi possível calcular as conversões das 2*H*-cromenonas **3a**, **4a** e **5a** nos experimentos de planejamento fatorial e otimização. Os rendimentos das cromenonas (**3a-e**, **4a-i** e **5a-e**) foram determinados por isolamento em coluna cromatográfica.

Os *ee*'s foram calculados usando a **Equação 2.5** a partir das áreas dos cromatogramas obtidos quando se usou coluna quiral. Sendo que e_s e e_R representam as áreas dos enantiômeros

S e *R*, respectivamente. Estas análises foram realizadas após os produtos serem isolados por cromatografia em coluna.

$$ee = \frac{e_s - e_R}{e_{s+}e_R}$$
 Equação 2.5

2.3.5.4 Medidas de difração de raios X em monocristal da (±)-2*H*cromenona 5a

As medidas de difração de raios X foram realizadas no Laboratório Multiusuário de Cristalografia Estrutural do Instituto de Física de São Carlos pelo Professor Dr. Javier Ellena. Os dados foram coletados em um difractômetro XtaLAB Mini (ROW), equipado com duas microfontes (cobre e molibdênio), utilizando a radiação MoK α ($\lambda = 0,71073$). O cristal foi mantido a 293 K durante a obtenção dos dados. A estrutura foi resolvida usando Olex2 (53) com o programa de solução de estrutura ShelXT (54) usando Intrinsic Phasing e refinado com o pacote de refinamento ShelXL (55) usando minimização de Mínimos Quadrados.

2.3.5.5 Espectroscopia na região de absorção do infravermelho

Os espectros de absorção na região infravermelho (IV) foram realizados e adquiridos em espectrofotômetro operando com transformada de Fourier da marca Shimadzu, modelo IRafinity-1. As amostras sólidas foram preparadas utilizando pastilhas de KBr e as amostras líquidas foram aplicadas em forma de filmes sobre cristal de silício. Os espectros foram obtidos em frequências de absorção entre 400 e 4000 cm⁻¹.

2.3.5.6 Outros equipamentos utilizados

As técnicas espectroscópicas de RMN de ¹H e ¹³C usaram os equipamentos descritos previamente no **Capítulo 1** nas **Seção 1.3.3.3**. Do mesmo modo, o analisador de massas usado na técnica de espectrometria de massas de alta resolução com ionização por electrospray (EM-IES) foi descrito no **Capítulo 1**, na **Seção 1.3.3.4**. Outros equipamentos utilizados foram descritos no **Capítulo 1** na **Seção 1.3.3.9**.

2.3.6 Experimentos de biotransformação da 2-hidroxi-2*H*-cromenona 4a2.3.6.1 Crescimento de fungos de ambiente marinho

Para o crescimento dos fungos de ambiente marinho foram usados meios de cultura sólidos e líquidos de malte, preparados com água de mar sintética com a composição dos sais, $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ (1,36 g), $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ (9,68 g), KCl (0,61 g), NaCl (30,0 g), Na₂HPO₄ (0,14 g), Na₂SO₄ (3,47 g), NaHCO₃ (0,17 g), KBr (0,10 g), SrCl₂ · 6H₂O (0,04 g), H₃BO₃ (0,03 g), dissolvidos em 1 L de água destilada.

Os fungos foram manipulados em cabine de fluxo laminar da marca Veco. Os meios de cultura uma vez preparados foram esterilizados em autoclave da marca Phoenix Av-50 a 121 °C e 1,5 KPa durante 20 min.

2.3.6.2 Crescimento de fungos de ambiente marinho em meio de cultura sólido

A primeira etapa do crescimento dos fungos foi realizada em placas de Petri esterilizadas e contendo o *meio de cultura sólido de malte 2%* (m/v). Sobre este foram feitos os repiques e os inóculos dos fungos marinhos, usando uma alça de inoculação para a transferência de micélios e esporos da placa de Petri com a linhagem original. Cada placa de Petri foi vedada com fitas *parafilm* e incubadas a 32 °C durante 7 dias em uma estufa BOD da marca Nova Ética.

O *meio de cultura sólido de malte 2%* foi preparado pela diluição de 20 g de extrato de malte em 1 L de água do mar sintética ajustado a pH 7, usando soluções de NaOH 0,1 mol/L e/ou HCl 0,5 mol/L. Uma vez ajustado o pH foram adicionados 20 g de Agar e dissolvidos. A solução resultante foi esterilizada em autoclave. O meio resfriado a uma temperatura aproximada de 45 °C foi vertido em placas de Petri.

2.3.6.3 Crescimento de fungos de ambiente marinho em meio de cultura líquido

A segunda etapa do crescimento dos fungos foi realizada em meio de cultura líquido contendo 2% (m/v) de extrato de malte em água de mar sintética a pH 7. O meio de cultura líquido foi esterilizado em frascos Erlenmeyer de 250 mL contendo 100 mL deste meio. O procedimento de inoculação foi realizado com o meio líquido à temperatura ambiente, transferindo os discos de 5 mm de diâmetro contendo os micélios dos fungos e o meio sólido (10 discos por cada 100 mL de meio líquido de malte 2%).

O meio líquido inoculado com os fungos foi incubado a 32 °C e mantido em agitação a 130 rpm durante 7 dias em um agitador orbital da marca Tecnal TE-421.

Após o período de crescimento, os fungos foram retirados do agitador e filtrados a vácuo em um funil de Büchner. Como resultado foi obtida uma massa úmida dos micélios de 3 a 4 g, a qual foi usada nas reações de biotransformação da 2-hidroxi-2*H*-cromenona **4a**.

2.3.6.4 Triagem de fungos de ambiente marinho na biotransformação da 2-hidroxi-2*H*-cromenona 4a

As linhagens de fungos de ambiente marinho usados nos experimentos (**Tabela 2.9**) fazem parte da coleção do Grupo de Química Orgânica e Biocatálise do IQSC-USP. As coletas dos microrganismos a partir dos quais foram isolados os fungos foram realizadas pelo grupo de pesquisa do Professor Dr. Roberto G. S. Berlink (Laboratório de Química Orgânica de Sistemas Biológicos-IQSC). O isolamento e a identificação dos fungos foram realizados em parceria com o Grupo de Pesquisa coordenado pela Profa. Dra. Mirna Helena Regali Seleghim (Laboratório de Ecologia de Microrganismos Aquáticos–UFSCar). A coleção de fungos identificados foi depositada na Coleção Brasileira de Microrganismos de Meio Ambiente e Indústria, CBMAI-CPQBA-UNICAMP.

| Fungo | Códi | go Microrg | anismo |
|-------------------|--------------|-------------------------------|-------------------------|
| Mucor racemost | us CBMAI 84 | 47 Mussismidia hispil | a (cnidário) |
| Aspergillus sydo | owii CBMAI 9 | 34 Chelonaplysilla ere | ecta (esponja) |
| Aspergillus sydo | owii CBMAI 9 | 35 Chelonaplysilla ero | ecta (esponja) |
| Penicillium citri | inum CBMAI 1 | 185 <i>Caulerpa</i> sp. (Alga | ı marinha) |
| Penicillium citri | inum CBMAI 1 | 186 <i>Caulerpa</i> sp. (Alga | ı marinha) |
| Cladosporium s | p. CBMAI 12 | 237 Dragmacidon retic | <i>eulata</i> (esponja) |
| | | | |

Tabela 2.9. Fungos de ambiente marinho usados na triagem para as biotransformações da 2-hidroxi-2*H*-cromenona **4a**.

Para realizar a triagem dos fungos marinhos (**Tabela 2.9**) foi transferido 2,5 g de massa úmida dos micélios (obtida do crescimento dos em meio de cultura líquido de malte 2%, **Seção 2.3.6.1.2**) a um frasco Erlenmeyer contendo 50 mL de solução tampão fosfato (Na₂HPO₄/KH₂PO₄ 0,07 M, pH 7) previamente esterilizado. A esta suspensão de células dos fungos foram adicionados 20 mg do composto 2-hidroxi-2*H*-cromenona **4a** dissolvidos em 500 μ L de DMSO. Adicionalmente foram preparadas reações controles (bióticos e abióticos), ou seja tampão fosfato contendo a massa micelial fúngica e ausência do composto **4a** e, tampão fosfato contendo o composto **4a** em ausência da massa micelial fúngica.

Os experimentos foram realizados mantendo os frascos Erlenmeyer em agitação orbital de 130 rpm, a 32 °C durante 1, 3 e 7 dias. Após completado o tempo de cada experimento, foi adicionado um volume de AcOEt equivalente ao volume do meio reacional utilizado e, mantido sob agitação magnética por 30 min em temperatura ambiente. Em seguida foi realizada a filtração através de funil de Büchner a vácuo.

A fase líquida composta por água e AcOEt foi transferida a um funil de separação. A fase aquosa foi coletada e extraída por mais duas vezes com 50 mL de AcOEt. À fase orgânica obtida foi adicionado Na₂SO₄ anidro, e posteriormente filtrada e concentrada a pressão reduzida em rotaevaporador. O extrato concentrado foi dissolvido em 10 mL de MeOH grau cromatográfico e analisado por HPLC-UV.

As etapas experimentais envolvidas na reação de biotransformação da 2-hidroxi-2*H*cromenona **4a** para a triagem dos fungos marinhos estão ilustradas na **Figura 2.7**.



Figura 2.7. Etapas experimentais envolvidas na biotransformação da 2-hidroxi-2*H*-cromenona **4a** para a triagem dos fungos de ambiente marinho.

2.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

De acordo com o estudo realizado por Yang et al. (38) na catálise da reação entre as β dicetonas cíclicas e os aldeídos α , β -insaturados pelas lipase de pâncreas bovino e a lipase de *Pseudomonas fluorescens*, cada uma das enzimas mostrou-se seletiva para a formação de uma das 2*H*-cromenonas. Assim, a LPB catalisou a formação das 2*H*-cromenonas e LPF a formação da 2-hidroxi-2*H*-cromenonas.

Um dos objetivos neste estudo foi identificar se a lipase de pâncreas de porco tipo II (PPL-II) atuou como catalisador da reação entre a β -dicetona cíclica **1a** e o aldeído α , β -insaturado **2a**, assim como a seletividade para a formação da 2*H*-cromenona **3a** ou da 2-hidroxi-2*H*-cromenona **4a**.

A princípio seria esperado um certo grau de seletividade da enzima para catalisar a formação da 2*H*-cromenona **3a** ou da 2-hidroxi-2*H*-cromenona **4a**, as quais são formadas a partir de vias diferentes de reação (**Esquema 2.22**). A 2*H*-cromenona **3a** foi produzida através de uma reação de cicloadição formal oxa-[3+3] e, a 2-hidroxi-2*H*-cromenona **4a**, a partir de duas reações sequenciais, a primeira uma adição de Michael e a segunda uma reação de hemiacetalização. Contudo, foi obtido além das 2*H*-cromenonas **3a** e **4a**, a formação da 2*H*-cromenona **5a**. Este último correspondeu à adição do íon enolato da β -dicetona cíclica **1a** aos dois centros de reatividade do aldeído α , β -insaturado **2a**, ou seja via adições 1,2 e 1,4.





As duas vias de reações competitivas foram estudadas em detalhes por Moreno-Mañas (56,57) através da reação entre a 4-hidroxi-6-metil-2-pirona e aldeídos α,β -insaturados, como apresentadas no **Esquema 2.23**. Nesses estudos foram obtidos os compostos 2*H*-pirano em baixo rendimento (3-6%) produto da adição *C*-1,2 seguida de adição *O*-1,4 e o produto 2-hidroxi-2*H*-pirano com rendimento baixo a moderado (13-44%) que formou-se da adição *C*-1,4 ao

crotonaldeído gerando um produto cíclico (21-47%), o qual foi o equivalente ao composto **5a** identificado em nossos estudos, e um composto acíclico (12-47%)(**Esquema 2.23A**).

Um quinto composto foi formado com aproximadamente 24% de rendimento, o qual foi obtido pela perda de uma porção -CH₂CHO do intermediário gerado da adição *C*-1,4 e a subsequente adição de uma segunda molécula da 4-hidroxi-6-metil-2-pirona ao carbono de hibridização sp^2 formado após a perda da porção -CH₂CHO, como mostrado na parte inferior do **Esquema 2.23B**.

Com o intuito de melhorar a seletividade para a obtenção de um dos compostos 2*H*cromenona **3a** ou 2-hidroxi-2*H*- cromenona **4a** através das condições experimentais foi realizado um planejamento experimental.

Esquema 2.23. Estudo da reação entre a 4-hidroxi-6-metil-2-pirona e crotonaldeído por Moreno-Mañas.



Fonte: Moreno-Mañas (56,57).

2.4.1 Planejamento fatorial completo aplicado à reação entre a 1,3cicloexanodienona 1a e o crotonaldeído 2a na presença da enzima PPL-II

O planejamento fatorial completo foi a abordagem escolhida para explorar o comportamento da reação entre a β -dicetona cíclica **1a** e o aldeído α , β -insaturado **2a** catalisada pela enzima PPL-II.

Nesse planejamento fatorial avaliou-se alguns parâmetros, tais como a massa de enzima (variável 1 ou V1), os equivalentes molares dos reagentes (variável 2 ou V2), a porcentagem de água (variável 3 ou V3) e a temperatura (variável 4 ou V4). Nesses estudos foi usado o DMSO como solvente e o tempo de reação estabelecido foi de uma hora.

As quatro variáveis foram testadas em dois níveis, alto e baixo, codificados como 1 e -1, respectivamente, identificados na **Tabela 2.5**, na **Seção 2.3.2.1**. As combinações possíveis entre as quatro variáveis e os dois níveis implicaram em 16 experimentos (2 níveis, 4 variáveis), o que constituiu um planejamento fatorial completo 2⁴.

A partir das combinações da variáveis (massa da enzima, equivalentes molares dos reagentes, porcentagem de água e temperatura) foi construída a matriz de coeficientes de contraste para cada produto **3a**, **4a** e **5a**, sendo que as respostas de cada experimento foram as conversões em cada produto obtido (Apêndice).

Os valores dos efeitos calculados foram descritos na **Tabela 2.10** para cada produto 2*H*cromenona **3a**, **4a** e **5a** obtido da reação entre a 1,3-cicloexanodiona **1a** e o crotonaldeído **2a** catalisada por PPL-II. **Tabela 2.10.** Valores dos efeitos obtidos pelas interações das 4 variáveis frente à reação entre a 1,3cicloexanodiona **1a** e o crotonaldeído **2a** na formação das 2*H*-cromenonas **3a**, **4a** e **5a** na presença da PPL-II.

| Efaitos | Decorição | Valores dos e | Valores dos efeitos para as 2 <i>H</i> -cromenonas | | | | |
|--------------|-----------|---------------|----------------------------------------------------|------|--|--|--|
| Eleitos | Descrição | 3 a | 4 a | 5a | | | |
| | | | | | | | |
| | 1 | -10,9 | 6,2 | 19,6 | | | |
| Dringingis | 2 | -6,1 | -7,5 | 14,3 | | | |
| Fincipais | 3 | 12,5 | 2,0 | 6,8 | | | |
| | 4 | -24,3 | 4,6 | 17,6 | | | |
| | 12 | 2,3 | -2,8 | 13,2 | | | |
| | 13 | -10,6 | 0,7 | -6,8 | | | |
| Sagundárias | 14 | 4,2 | 0,2 | 1,6 | | | |
| Secundarios | 23 | -5,0 | -0,6 | -1,5 | | | |
| | 24 | -10,9 | -0,8 | 9,4 | | | |
| | 34 | -10,1 | -0,9 | -6,0 | | | |
| | 123 | 1,0 | -1,3 | -8,8 | | | |
| Tanaiániaa | 124 | -2,6 | 1,1 | 5,8 | | | |
| Terciarios | 134 | 6,3 | -0,4 | -2,7 | | | |
| | 234 | -1,4 | 1,1 | 1,0 | | | |
| Quaternários | 1234 | 7,3 | -0,2 | -4,7 | | | |

Variáveis: V1= massa de enzima, V2= equivalentes molares dos reagentes, V3= porcentagem de água e V4= temperatura.

Para a identificação de quais efeitos foram importantes e quais poderiam ser desconsiderados foi necessário aplicar critérios estatísticos. Para isto verificou-se qual foi a porcentagem que cada quadrado dos efeitos exerceu sobre a soma dos quadrados dos mesmos (**Equação 2.6**).

Porcentagem =
$$\left(\frac{\text{Efeito}_{i}^{2}}{\sum \text{Efeito}_{i}^{2}}\right) * 100$$
 Equação 2.6

Isto possibilitou uma distribuição gráfica da contribuição de cada um dos efeitos na conversão dos produtos 2*H*-cromenonas **3a**, **4a** e **5a**, como mostrado na **Figura 2.8A**.

Figura 2.8. (**A**) Porcentagem dos efeitos das variáveis e suas interações obtidas via planejamento fatorial completo 2⁴. (**B**) Probabilidade dos efeitos em influenciar no rendimento de cada produto 2*H*-cromenona **3a**, **4a** e **5a** na reação entre a 1,3-cicloexanodienona **1a** e o crotonaldeído **2a** na presença da PPL-II.



Para ficar mais evidente a relevância dos efeitos destacados pela sua porcentagem na conversão dos produtos **3a**, **4a** e **5a**, verificou-se através de gráficos de probabilidade a distribuição dos efeitos (**Figura 2.8B**). Os gráficos de probabilidade foram obtidos usando a função em Excel INV.NORMP mostrado em vídeo 4/7 por Rodríguez (49,58).

Os efeitos mais importantes foram aqueles afastados do zero ou que saíram da tendência que representa uma linha reta ao redor do zero nos gráficos da **Figura 2.8B**. Assim, foi observado que o efeito 4 (temperatura) apresentou maior influência sobre o rendimento da 2*H*-cromenona **3a**.

Enquanto que para o rendimento do composto 2-hidroxi-2*H*-cromenona **4a**, vários efeitos mostraram-se importantes, tais como os *efeitos 2, 1 e 4*, em ordem decrescente de importância, correspondentes aos equivalentes molares dos reagentes, à massa da enzima PPL-II e à temperatura, respectivamente.

Para a 2-(2-hidroxi-6-oxocicloex-1-en-1-il)-2*H*-cromenona **5a** quatro efeitos influenciaram sobre seu rendimento, os *efeitos 1, 4, 2 e 5*, em ordem decrescente de influência, ou seja, a massa da PPL-II, a temperatura, os equivalentes molares dos reagentes e a interação entre a massa da PPL-II e os equivalentes molares dos reagentes, respectivamente. Porém, para o produto **5a** todos os efeitos foram colineares, ou seja, não afetaram no rendimento dentro dos limites estudados nas quatro variáveis.

Também foi possível identificar como esses efeitos influenciaram os níveis baixos e altos de cada variável nas conversões das 2*H*-cromenonas **3a**, **4a** e **5a** produzidos a partir da reação entre a 1,3-cicloexanodienona **1a** e o crotonaldeído **2a** na presença da PPL-II nos 16 experimentos realizados (**Tabela 2.11**).

| Tabela 2.11. Variáveis e níveis que influenciaram positivamente o rendimento das 2 <i>H</i> -cromenonas 3a, 4a e 5a a |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| partir da reação entre a 1,3-cicloexanodienona 1a e o crotonaldeído 2a na presença da PPL-II. |

| Composto | Variável | Nível |
|--------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------|------------------------------------------------------|
| 2H-cromenona 3a | Temperatura | -1 (30°C) |
| 2-hidroxi-2 <i>H</i> -cromenona 4a | Equivalentes molares Massa de PPL-II Temperatura | -1 (5 equiv. crotonaldeído) 1 (20 mg) 1 (60°C) |
| 2-(2-hidroxi-6-oxocicloex-1-en- 1-il)-2 <i>H</i> -cromenona 5a | (-) | |

(-) = As variáveis empregadas não influenciaram no rendimento do produto 5a.

A partir da **Tabela 2.11** observou-se que a produção das 2*H*-cromenonas **3a** e **5a** não foi governada pela massa de enzima adicionada, enquanto a produção do composto **4a** foi afetada por esta variável. A partir disto o direcionamento deste estudo centrou-se na obtenção da 2-hidroxi-2*H*-cromenona **4a**.

2.4.2 Planejamento fatorial de composto central aplicado à reação entre a 1,3-cicloexanodienona 1a e o crotonaldeído 2a na presença da enzima PPL-II

Foi realizado um ajuste fino das condições experimentais por planejamento fatorial de composto central para a obtenção de 2-hidroxi-2*H*-cromenona **4a** por ser produzido pela PPL-II.

As variáveis investigadas foram a massa enzimática e a temperatura. Como a quantidade de água utilizada (5-95%) não influenciou no rendimento de **4a** e, visando um processo mais sustentável, empregou-se 90% de água e 10% de DMSO como co-solvente (10%).

A configuração dos experimentos para o planejamento fatorial de composto central foi descrita na **Tabela 2.7** na **Seção 2.3.2.2**, no qual foram estudadas as variáveis a massa de enzima e a temperatura em 5 níveis diferentes, $-\sqrt{2}$, -1, 0, 1, $\sqrt{2}$, os quais foram apresentados em seus valores originais na **Figura 2.9**.

Figura 2.9. Configuração dos experimentos do planejamento de composto central para a formação da 2-hidroxi-2*H*-cromenona **4a** a partir da reação entre a 1,3-cicloexanodienona **1a** e o crotonaldeído **2a** na presença da PPL-II, variando-se a massa de enzima e a temperatura.



Como resultado do planejamento de composto central foi obtido o modelo que melhor se ajustou ao comportamento na obtenção da 2-hidroxi-2*H*-cromenona **4a**. Este modelo foi representado através do gráfico de superfície de resposta, como mostrado na **Figura 2.10**, o qual foi obtido usando o Software Statistica 13 (StatSoftInc, Tulsa, USA, 2013).

Figura 2.10. Gráfico de superfície de resposta modelando o rendimento da 2-hidroxi-2*H*-cromenona **4a** na reação entre a 1,3-cicloexanodiona **1a** e o crotonaldeído **2a** na presença da PPL-II, variando-se a massa da enzima e a temperatura.



O modelo empírico calculado forneceu a **Equação 2.7**, onde a conversão do composto **4a** foi em função das duas variáveis, massa de enzima (m) e temperatura (t) multiplicadas pelos coeficientes de regressão na forma linear e quadrática, assim como na sua interação.

Conv. 4a % = $-19,826 + 1,237m + 0,950T - 0,017m^2 - 0,005 mt - 0,008T^2$ Equação 2.7

O modelo descrito pela **Equação 2.7** previu que 28 mg de enzima na temperatura de 52 °C forneceria a melhor convesão da 2-hidroxi-2*H*-cromenona **4a**. Porém, o ponto máximo central encontra-se fora da faixa experimental na qual empregou-se 20 mg de enzima. Contudo, o modelo do planejamento foi concordante com os resultados experimentais obtidos, onde realizou-se a reação com 20 mg de PPL-II a 52 °C fornecendo o rendimento predito para o composto **4a**.

Posteriormente foi realizada uma análise de variância e, dessa forma obteve-se os dados descritos na Tabela ANOVA (*Analysis of Variance*).

Tabela 2.12. ANOVA para o modelo determinado no planejamento de composto central aplicado na síntese da 2-hidroxi-2*H*-cromenona **4a** frente à reação entre a 1,3-cicloexanodienona **1a** e o crotonaldeído **2a** na presença da PPL-II.

| AN | NOVA; $\mathbf{R}^2 = 0$ |),81082 | 2; Ajuste: 0,62 | 164 | |
|----------------------------------------------------------|----------------------------------------------|---------|----------------------------------------------|-----------------------------------------------|--------------------------------------------------|
| Fatores | SQ | g,l | MQ | Teste F | Valor P (95%) |
| (1) Massa de enzima (mg) (L) Massa de enzima (mg) (Q) | 116,9234 | 1 | 116,9234 2 5611 ^{ns} | 395,3629 8 6602 ^{ns} | 0,002520 |
| (2) Temperatura (°C) (L) | 31,2570 | 1 | 31,2570 | 8,0002 ^m 105,6919 | 0,009329 |
| Temperatura (°C) (Q) Interação 1 L e 2 L | 4,0351 ^{ns} 0,4108 ^{ns} | 1 1 | 4,0351 ^{ns} 0,4108 ^{ns} | 13,6442 ^{ns} 1,3890 ^{ns} | 0,066106 ^{ns} 0,359794 ^{ns} |
| Falta de ajuste Erro puro | 35,2409 ^{ns} 0,5915 | 3 2 | 11,7470 ^{ns} 0,2957 | 39,7210 ^{ns} | 0,024658 ^{ns} |
| Total SQT | 189,4108 | 10 | | | |

* SQ: Soma quadrática, SQR: Soma quadrática da regressão, g,l: graus de liberdade, SQT: Soma quadrática total, MQ Média quadrática, Teste F (Distribuição de Fisher-Snedecor), ns: não significativo.

Dentre os parâmetros mostrados na Tabela ANOVA (**Tabela 2.12**), o coeficiente de determinação (\mathbb{R}^2) mostrou que 81% dos dados de rendimentos foram descritos pelo modelo do planejamento fatorial de composto central (**Equação 2.7**).

O R^2 não foi o único parâmetro usado para avaliar a capacidade preditiva do modelo, foi necessário analisar os resíduos, os quais representam o erro experimental, e verificar se eles estavam aleatoriamente distribuídos (homocedásticos), pois o que se espera é que a maior parte da variação total das observações em torno da média seja descrita pela equação de regressão e o restante certamente, ficará como resíduos (42).

Assim, a partir da **Figura 2.11** a qual ilustra o comportamento dos valores residuais frente aos valores preditos pelo modelo apresentaram uma distribuição aleatória em torno de zero em toda a faixa de valores preditos pelo modelo. Portanto, isso demonstrou que o modelo foi adequado para aplicar na síntese de 2-hidroxi-2*H*-cromenona.

Figura 2.11. Valores residuais do modelo gerado pelo planejamento de composto central em função da conversão da 2-hidroxi-2*H*-cromenona **4a** na reação entre a 1,3-cicloexanodienona **1a** e o crotonaldeído **2a** na presença da PPL-II.



Outro parâmetro da Tabela ANOVA foi a falta de ajuste do modelo de regressão, pois o valor-p resultou ser menor que o valor α (0,05), pelo qual o modelo calculado não se ajustou com exatidão aos dados experimentais. No entanto, nosso objetivo foi verificar o efeito das variáveis temperatura e massa enzimática e determinar uma condição ótima para obter o melhor rendimento para a 2-hidroxi-2*H*-cromenona **4a**.

Na Tabela ANOVA também foi observada a significância das variáveis e a tendência da conversão do produto 2-hidroxi-2*H*-cromenona **4a** dentro dos limites das variáveis testadas (2-20 mg de enzima e 30-60 °C). Usando como critério o valor-p para avaliar a significância estatística, encontrou-se que a massa de enzima e a temperatura afetaram a conversão da 2-hidroxi-2*H*-cromenona **4a**. Isto pode ser visualizado na **Figura 2.12**, através do diagrama de Pareto.

Figura 2.12. Diagrama de Pareto do planejamento experimental de composto central em função da conversão da 2-hidroxi-2*H*-cromenona **4a** na reação entre a 1,3-cicloexanodienona **1a** e o crotonaldeído **2a** na presença de PPL-II.



Os fatores quadráticos temperatura (Q) e massa de enzima (Q) e a interação das variáveis temperatura e massa de enzima (L x Q) não influenciaram na conversão do composto **4a**. Deste modo foi recalculado um novo modelo que correspondeu à **Equação 2.8**.

Conv.
$$4a \% = -0,446+0,618*m+,192*T$$
Equação 2.8Conv. = conversão; $m = massa; T = temperatura$

A equação de regressão linear (**Equação 2.8**) apresentou os valores preditos para as variáveis em estudo dentro das faixas testadas que levaram à conversão máxima de **4a** (22 %) sendo que a quantidade máxima de enzima foi de 20 mg e a temperatura foi de 60 °C.

Contudo, decidiu-se não realizar a reação na temperatura máxima (60 °C) para evitar a uma possível perda da estabilidade da enzima por desnaturação. Desta forma foi realizado um experimento dentro das faixas testadas na condição de 20 mg de enzima e 50 °C para verificar se o valor da conversão obtido foi condizente com o predito pelo modelo de regressão linear. Assim, uma conversão de 22 % foi obtida para **4a**, a qual esteve dentro dos limites de confiança ao 95% (20 a 23%), comprovando que o modelo estudado foi adequado.

Outros experimentos em relação ao aumento da quantidade de enzima foram realizados, os quais são discutidos na **Seção 2.4.3**.

2.4.3 Variação nas condições reacionais da reação entre a β-dicetona cíclica 1a e o crotonaldeído 2a na presença da PPL-II

Com a condição ótima estabelecida (20 mg de enzima e 50 °C), decidiu-se realizar outros experimentos à temperatura de 50 °C onde se variou a massa da enzima PPL-II de 20, 30 e 50 mg. Os três produtos cromenonas obtidos **3a**, **4a** e **5a** foram analisados por HPLC-UV e as conversões estão apresentadas na Figura 2.13.

A tendência observada para a 2-hidroxi-2*H*-cromenona **4a** foi um ligeiro incremento no rendimento de 24% para 28% quando passou de 20 para 50 mg de enzima, respectivamente. Enquanto os compostos **3a** e **5a** diminuíram as suas conversões de 25% para 20% para a 2*H*-cromenona **3a** e de 66 para 52 % para a 2*H*-cromenona **5a** quando foram adicionados 20 e 50 mg de PPL-II, respectivamente. Isto ocorreu provavelmente, pois uma maior quantidade de enzima pode ter favorecida a reação que levou à produção da 2-hidroxi-2*H*-cromenona **4a**, concomitantemente diminuíndo a quantidade de reagentes para a formação das 2*H*-cromenonas **3a e 5a**.

Provavelmente a participação da PPL-II na formação da 2*H*-cromenona **4a** foi via adição conjugada-1,4 a qual poderia estar competindo com a reação de adição aldólica (adição-1,2) no para a obtenção das 2*H*-cromenonas **3a** e **5a**.



Figura 2.13. Conversões das 2*H*-cromenonas **3a**, **4a** e **5a** em função da massa de PPL-II na reação entre a 1,3-cicloexanodienona **1a** e o crotonaldeído **2a**.

As conversões foram determinadas por HPLC-UV: coluna Luna C18 da Phenomenex (250 mm x 4,6 mm, 5 µm), método em gradiente no modo reverso usando ácido fórmico ao 0,1% em água e metanol, fluxo 0,5 mL/min.

Uma vez confirmada a participação da PPL-II na catálise da reação entre a β -dicetona cíclica **1a** e o crotonaldeído **2a** para a formação da 2-hidroxi-2*H*-cromenona **4a**, a questão ainda foi saber se a formação deste composto ocorreu via sítio ativo ou foi devido a uma catálise inespecífica, promovida por aminoácidos fora do sítio catalítico da enzima.

Para comprovar se foram os resíduos de aminoácidos presentes fora do sítio ativo da PPL-II poderiam catalisar a reação entre a β -dicetona cíclica **1a** e o crotonaldeído **2a** na formação da 2-hidroxi-2*H*-cromenona **4a**, realizou-se uma reação na presença da Albumina de Soro Bovino (BSA do inglês: *Bovine Serum Albumin*), uma proteína cuja função metabólica é a de transportar outras moléculas no sistema biológico, mas sem a função catalítica (**Figura 2.14**).

Figura 2.14. Conversões das 2*H*-cromenonas 3a, 4a e 5a na reação entre a 1,3-cicloexanodienona 1a e o crotonaldeído 2a na presença de PPL-II, BSA e controle na ausência de catalisador a 52 °C em 2 h de reação.



Conversões determinadas por HPLC-UV: coluna Luna C18 da Phenomenex (250 mm x 4,6 mm, 5 µm), método em gradiente no modo reverso usando ácido fórmico ao 0,1% em água e metanol, fluxo 0,5 mL/min.

A BSA promoveu a reação de formação das 2*H*-cromenonas **4a** e **5a** com rendimentos similares em um tempo de 2 h (14 e 22 % para **3a**, **4a** e **5a**, respectivamente). Este resultado demonstrou em parte que a reação não ocorreu totalmente no sítio catalítico da PPL-II, evidenciando uma possível catálise inespecífica.

Assim, até o momento foi possível fazer algumas inferências da reação na presença de PPL-II. A 2-hidroxi-2*H*-cromenona **4a** foi produzida com rendimento de 17% mas, foi favorecida pela presença de PPL-II e o excesso do crotonaldeído **2a** (5 equiv.) na temperatura

de 52 °C e o solvente H₂O e DMSO (90:10). Cabe ressaltar que o baixo rendimento é restringido pela competição inerente à reatividade dos reagentes na formação dos produtos **3a** e **5a** quando a reação é realizada na presença da lipase.

Na formação da 2*H*-cromenona **5a** também houve a participação da PPL-II (23%), pois a lipase catalisou a reação de adição de Michael, a qual constituiu o primeira etapa para a formação das 2*H*-cromenonas **4a** e **5a**.

A 2*H*-cromenona **3a** foi formada na ausência da PPL-II (68%) (**Figura 2.14**), porém, na presença da PPL-II o rendimento desta cromenona foi menor (62%) devido à reação competitiva (adição-1,4) que levou também à formação das 2*H*-cromenonas **4a** e **5a**. Ainda foi observada a instabilidade da 2*H*-cromenona **3a** na presença de luz e do ar pela transformação em produtos de degradação, como demostrado no final desta **Seção 2.4.3**.

Também foi estudada a influência da variação do número de equivalentes de 1,3cicloexanodiona **1a** e do crotonaldeído **2a** sobre a produção das 2*H*-cromenonas **3a**, **4a** e **5a** no tempo de 1 h de reação. Na **Tabela 2.13** encontram-se descritos os experimentos que consistiram na variação das quantidades molares da dicetona **1a** de 0,1 mmol a 0,5 mmol mantendo constante a quantidade de crotonaldeído **2a** em 0,1 mmol (Entradas 1-5) e a variação das quantidades molares do crotonaldeído **2a** de 0,1 mmol a 0,5 mmol mantendo constante a quantidade da dicetona **1a** em 0,1 mmol (Entradas 5-10). Todas as reações foram realizadas em 1 h.

| Exp. | mmol de 1a | mmol de 2a | equiv. 2a | conv. 3a % | conv. 4a % | conv. 5a % |
|------|-------------------|------------|------------------|------------|------------|------------|
| | | | | | | |
| 1 | 0,50 | 0,1 | 0,2 | 1,9 | 8,6 | 32,3 |
| 2 | 0,40 | 0,1 | 0,25 | 1,4 | 11,2 | 92,3 |
| 3 | 0,30 | 0,1 | 0,33 | 2,0 | 12,1 | 108,4 |
| 4 | 0,20 | 0,1 | 0,5 | 7,0 | 16,1 | 92,1 |
| 5 | 0,10 | 0,1 | 1 | 13,0 | 14,7 | 77,1 |
| 6 | 0,10 | 0,2 | 2 | 31,5 | 18,0 | 66,5 |
| 7 | 0,10 | 0,3 | 3 | 39,9 | 19,0 | 61,4 |
| 8 | 0,10 | 0,4 | 4 | 45,1 | 20,2 | 53,5 |
| 9 | 0,10 | 0,5 | 5 | 50,9 | 20,0 | 45,8 |
| 10 | 0,10 | 1 | 10 | 61,0 | 22,4 | 33,5 |

Tabela 2.13. Variação dos equivalentes molares dos reagentes usados na reação entre a 1,3cicloexanodienona **1a** e o crotonaldeído **2a** na presença da PPL-II no tempo de 1 hora.

conv. = conversão; equiv. = equivalente

As conversões apresentadas na **Tabela 2.13** podem ser melhor visualizadas na **Figura 2.15**. O aumentou do número de equivalentes do crotonaldeído **2a** para 0,33 equiv. levou a conversão máxima do composto **5a**, o qual era esperado de acordo com a sua proporção molecular na 2*H*-cromenona **5a**, onde foi incorporada uma molécula de crotonaldeído e duas moléculas da β -dicetona **1a**. Porém, equivalentes de crotonaldeído **2a** maiores a 0,33 levaram à diminuição da conversão da 2*H*-cromenona **5a**.

Para os compostos **3a** e **4a** também observou-se um incremento nas conversões quando o número dos equivalentes do crotonaldeído foi aumentado. Contudo, o incremento foi maior para **3a** do que para **4a**, o que demostrou uma maior reatividade para a adição-1,2.

Figura 2.15. Conversões dos compostos 3a, 4a e 5a em função na variação do número de equivalentes do crotonaldeído 2a na reação entre a 1,3-cicloexanodiona 1a na presença da PPL-II.



Conversões determinadas por HPLC-UV: coluna Luna C18 da Phenomenex (250 mm x 4,6 mm, 5 µm), método em gradiente no modo reverso usando ácido fórmico 0,1% em água e metanol, fluxo 0,5 mL/min.

Ao analisar a formação da 2*H*-cromenona **5a** foram propostas duas rotas de reação (**Esquema 2.24**). Na *Rota-A* a reação iniciou-se com a adição-1,2 do íon enolato da β -dicetona cíclica **1a** à carbonila do crotonaldeído **2a** fornecendo o intermediário **I**, o qual pode seguir dois caminhos de reação.

No *caminho i* ocorreu a eliminação de uma molécula de água, conduzindo ao intermediário oxatrieno **II-A**. O *caminho ii* de reação do intermediário **I-A** seria com um segundo íon enolato da β -dicetona cíclica **1a** através de uma adição de Michael e subsequente eliminação de uma molécula de água, produzindo o intermediário **III**.

Os dois caminhos são prováveis de ocorrerem, porém seria necessário comprovar a existência de um dos intermediários. Contudo, os intermediários **II-A** e **III** conduziriam ao intermediário **IV** o qual através de um equilíbrio tautomérico de anel-cadeia conduziu à 2*H*-cromenona **5a**.

Esta via de reação sugere porque na ausência da PPL-II a 2*H*-cromenona **5a** também foi produzida (~21%). Porém, na presença da PPL-II a 2*H*-cromenona **5a** aumentou ligeiramente seu rendimento (~35%). O que poderia ser favorecido pela participação da PPL-II, mostrado pela *Rota-B*, onde a reação iniciou-se com a adição-1,4 do íon enolato da β -dicetona cíclica **1a** ao crotonaldeído **2a**. Neste caso poderá ocorrer a ativação da carbonila via participação da enzima por ligação de hidrogênio, nesta etapa seria produzido o intermediário **I-B**, o qual reagiria com um segundo íon enolato da β -dicetona cíclica **1a** através de adição aldólica produzindo o intermediário **III.** Esse intermediário **III** presenta um equilíbrio tautomérico e a subsequente perda de uma molécula de água levaria ao intermediário **IV**. O intermediário **IV**

Como foi proposto no **Esquema 2.24**, o último passo levou à formação da 2*H*-cromenona **5a** via um equilíbrio tautomérico e gerando um produto com dois centros estereogênicos a partir de moléculas aquirais.

Esquema 2.24. Mecanismos propostos para a formação da 2*H*-cromenona **5a** na reação entre a 1,3cicloexanodienona **1** e o crotonaldeído **2** na presença de PPL-II, através da adição-1,2 (*Rota-A*) e adição-1,4 (*Rota-B*).



Através da análise de difração de raios X em monocristal e do refinamento dos dados da difração, foi observado a formação do diastereoisômero (\pm) -*anti*-**5a**, como ilustrado na **Figura 2.16**. O par enantiomérico correspondeu aos compostos (2S,4R)-2(2-hidroxi-6-oxocicloex-1-en-1-il)-4-metil-2,3,4,6,7,8-hexaidro-5*H*-cromen-5-ona **5a** e o (2R,4S)-2-(2-hidroxi-6-oxocicloex-1-en-1-il)-4-metil-2,3,4,6,7,8-hexaidro-5*H*-cromen-5-ona **5a**. As estruturas cristalográficas mostraram a presença de duas moléculas de água, cada uma próxima da hidroxila do anel cetoenol. Os dados do refinamento encontram-se no Apêndice.

Contudo, o par de diastereoisômeros (\pm) -*syn*-**5a** não foi obtido na reação. Possivelemente no produto *anti*-**5a** os grupos volumosos possuem a tendência em ocupar as posições opostas devido ao impedimento estérico menor do que no diastereoisômero (\pm) -*syn*-**5a**.

Figura 2.16. Representação ORTEP para os enantiômeros do diastereoisômero *anti-2H*-cromenona **5a** obtidas por difração de raios X em monocristal.



Também, procurou-se compreender melhor o comportamento da reação entre a 1,3cicloexanodienona **1a** e o crotonaldeído **2a** catalisada pela PPL-II em função do tempo. Para isto foi analisada a reação em diferentes tempos, de 2 a 24 h (**Figura 2.17A**). Experimentos controles na ausência da enzima também foram realizados para constatar qual foi a contribuição da catálise enzimática nesse processo (**Figura 2.17B**). Figura 2.17. Gráfico do monitoramento da formação das 2*H*-cromenonas 3a, 4a e 5a ao longo do tempo de reação entre a 1,3-cicloexanodienona 1a e o crotonaldeído 2a na presença e ausência de PPL-II.



As conversões foram determinadas por HPLC-UV.

A produção maioritária da 2*H*-cromenona **3a** no controle (78%) foi devido a que as condições de reação favoreceram a cicloadição formal oxa-[3+3] via adição-1,2 a qual foi favorecida majoritariamente. Apesar da excelente conversão para a 2*H*-cromenona **3a** na reação controle, foi observado um decréscimo em 24 h, o qual sugeriu sua degradação. Ainda, a degradação espontânea continuou ocorrendo, a qual foi comprovada pelas análises cromatográficas.

Ao ser analisada uma amostra do composto 2*H*-cromenona **3a** por HPLC-UV após a purificação por cromatografia em coluna, evidenciou-se nos cromatogramas (**Figura 2.18**) uma diminuição da área do pico em 38 min e a aparição de outros picos entre 8 e 20 min, os quais corresponderam aos possíveis produtos de degradação da 2*H*-cromenona **3a**. A presença de luz e o ar provavelmente contribuíram para esta degradação espontânea. Uma variação da cor foi observada, de translúcido para cor amarela a laranja à medida em que a 2*H*-cromenona **3a** foi sendo degradada.

Figura 2.18. Cromatogramas obtidos por HPLC-UV do composto 2*H*-cromenona **3a**. Amostra analisada após purificação (preto, não degradada), mesma amostra analisada após 72 h (vermelho, degradada).



Condições de análises cromatográficas (HPLC-UV): coluna Luna C18 da Phenomenex (250 mm x 4,6 mm, 5 µm), método em gradiente no modo reverso usando ácido fórmico ao 0,1% em água e metanol, fluxo 0,5 mL/min e detecção em 254 nm.

Devido à degradação da 2*H*-cromenona **3a** foi crucial investigar a influência da luz visível nesse processo. Assim, foram realizadas algumas reações controles, na ausência e na presença de luz visível e na ausência e na presença de PPL-II. As conversões foram descritas na **Tabela 2.14**. Os experimentos revelaram que não houve influência da luz visível nas conversões dos produtos 2*H*-cromenonas **3a**, **4a** e **5a**, tanto na presença, como na ausência da PPL-II dentro do tempo de 1 hora de reação. Assim a degradação poderia estar ocorrendo em um tempo mais longo.

Tabela 2.14. Conversões das 2*H*-cromenonas 3a, 4a e 5a obtidos da reação entre a 1,3-cicloexanodiona
1a e o crotonaldeído 2a catalisada pela PPL-II na presença e na ausência de luz visível no tempo de 1 hora.

| ОН | | · · · · · + | ОЦОСОН | + O HO |
|-----------------|----------------|-------------|------------|-----------|
| 1a | 2a | 3a | 4a | 5a |
| F | | | Conversões | s (%) |
| Experimento | | 3a | 4 a | 5a |
| | _ | | | |
| MC- Presença de | luz | 71 | 22 | 35 |
| MC- Presença de | luz - Controle | 98 | 6 | 22 |
| MC-Ausência de | luz | 71 | 22 | 31 |
| MC- Ausência de | luz – Controle | 96 | 6 | 18 |

Condições de reação: 0.1 mmol de 1, 0,5 mmol de 2, 950 μ L de água, 50 μ L de DMSO, 52 °C, 1 h. Conversões determinadas por HPLC, coluna Luna C18 da Phenomenex (250 mm x 4,6 mm, 5 μ m), método em gradiente no modo reverso usando ácido fórmico ao 0,1% em água e metanol, fluxo 0,5 mL/min.

Apesar de não ser observado diferenças nos rendimentos dos produtos para as reações na presença e na ausência de luz durante o tempo de 1 h, na literatura é descrito que os compostos 2*H*-cromenos sofrem abertura do anel pirano na irradiação de luz, devido à quebra da ligação $C(sp^3)$ -O que conduz a um equilíbrio entre a forma fechada e a forma aberta (**Esquema 2.25**) e um conjunto de estereoisômeros são formadados a partir da forma aberta (59,60).

A forma aberta possui diferentes estabilidades e seus espectros de absorção estão na faixa visível. O fenômeno é fotoquimicamente e termicamente reversível. Este processo pode ocorrer muitas vezes, mas nem sempre é completamente reversível, particularmente na presença de oxigênio podem ocorrer reações competitivas e/ou fotorreações, as quais limitam a aplicação comercial destes sistemas (59,60).

Esquema 2.25. Equilíbrio entre as formas cíclica e acíclica das 2*H*-cromenonas na presença de luz.



2.4.4 Ampliação do escopo da reação entre a β-dicetona cíclica 1a e aldeídos α,β–insaturados 2a-e catalisada pela PPL-II

Neste trabalho, outros substratos derivados da β -dicetona cíclica **1a** e aldeídos α,β insaturados foram avaliados para ampliar o escopo da reação. Devido ao melhor rendimento do
composto **3a** na reação na presença de PPL-II, as condições otimizadas foram aplicadas para a
obtenção das 2*H*-cromenonas **3b-e**. Cada uma delas foi obtida como um óleo e sua degradação
espontânea parcial foi observada nas primeiras 24 h.

Os cromatogramas das reações para a obtenção das 2*H*-cromenonas **3a-e**, **4a-e** e **5a-e** a partir da catálise pela PPL-II são apresentados na **Figura 2.19**. As reações foram analisadas após 1 h de reação, após serem extraídas e concentradas por evaporação rotativa.


Figura 2.19. Cromatogramas obtidos por HPLC-UV dos produtos 2*H*-cromenonas 3a-f, 4a-f e 5a-f obtidas da reação entre as β -dicetonas cíclicas 1a-b e os aldeídos α , β -insaturados 2a-f na presença da PPL-II.

Condições de análises cromatográficas (HPLC-UV): coluna Luna C18 da Phenomenex (250 mm x 4,6 mm, 5 µm), método em gradiente no modo reverso usando ácido fórmico ao 0,1% em água e metanol, fluxo 0,5 mL/min e detecção em 254 nm. Amostras das reações analisadas após *work-up*.

Os seus rendimentos foram determinados logo após a purificação por cromatografia de coluna e são apresentados na **Tabela 2.15**. A reação foi realizada em uma escala de 1 mmol da β -dicetona cíclica **1a** e do aldeído α , β -insaturado correspondente. Os cromatogramas dos compostos purificados das primeiras três reações apresentadas na **Figura 2.19** são apresentados na **Figura 2.20**. As 2*H*-cromenonas **3d** e **3e** não foram analisadas por HPLC-UV após purificação, devido aos processos de degradação serem muito rápidos.

Figura 2.20. Cromatogramas obtidos por HPLC-UV para os compostos 2*H*-cromenonas 3a-c, 4a-c e 5a-c



Condições de análises cromatográficas (HPLC-UV): coluna Luna C18 da Phenomenex (250 mm x 4,6 mm, 5 μ m), método em gradiente no modo reverso usando ácido fórmico ao 0,1% em água e metanol, fluxo 0,5 mL/min e detecção em 254 nm.



Tabela 2.15. Reação de formação de 2*H*-cromenonas **3a-e**, **4a-e** e **5a-e** obtidas entre a β -dicetona cíclica **1a** e os aldeídos α , β -insaturados **2a-e** na presença da PPL-II.

Os rendimentos (%) foram obtidos apôs o isolamento por cromatografia em coluna.

Essas reações produziram resultados moderados a elevados para as 2*H*-cromenonas **3a-e** através da reação de adição formal oxo-[3+3], que foi favorecida pelas condições da reação (solvente e temperatura) e não pela presença da PPL-II, como mostrado na reação controle.

Não foi observada uma tendência no rendimento das 2*H*-cromenonas **3a-c** de acordo o tipo de substituinte na cadeia lateral do aldeído α,β -insaturado. Quando o aldeído foi o

crotonaldeído **2a** ($R_1 = Me$, $R_2 e R_3 = H$) o rendimento de **3a** foi 34%; quando o aldeído α,β insaturado foi o 2-pentenal **2b** ($R_1 = Et e R_2 e R_3 = H$) o rendimento de **3b** foi 59 % e quando foi o 2-hexenal **2c** ($R_1 = Pr e R_2 e R_3 = H$) o rendimento de **3c** foi 54%. Esta falta de correlação do rendimento com a estrutura do aldeído pode ser devida a que os grupos R_1 estão afastados da carbonila e não influenciaram na adição aldólica.

O aldeído 2-metil-2-butenal **2d** ($R_1 e R_3 = Me e R_2 = H$) conduziu à 2*H*-cromenona **3d** com um rendimento de 59%, no qual a presença de um grupo metila em R_3 provavelmente ocasionou um impedimento estérico para a adição aldólica no primeiro passo da reação de cicloadição formal oxo-[3+3], por estar próxima à carbonila.

A 2*H*-cromenona **3e** foi obtida com um rendimento de 78%, a qual foi formada a partir do 3-metil-2-butenal **2d** ($R_1 e R_2 = Me e R_3 = H$). Este rendimento foi similar ao obtido para o crotonaldeído **2a** onde houve presença de apenas um grupo metila ($R_1 = Me, R_2 e R_3 = H$). Neste caso observou-se que a presença de dois grupos metilas em $R_1 e em R_2$ não provocou um impedimento estérico no processo de eletrociclização 6π .

Por outro lado os hemicetais cíclicos 2-hidroxi-2*H*-cromenonas **4a-d** foram produzidos na presença da PPL-II com rendimentos baixos (5-22%, **Tabela 2.15**) de acordo com o tipo de cadeia alquílica presente no aldeído α , β -insaturado (Me, Et, *n*-Pr). Assim, quando o aldeído foi o crotonaldeído o rendimento foi de 22%, ao passar para o 2-pentenal o rendimento foi de 15% e para o 2-hexenal obteve-se um rendimento de 5%. Vale destacar que a série de 2-hidroxi-2*H*-cromenonas **4a-d** foram obtidas e se mantiveram estáveis.

O rendimento também foi baixo quando o aldeído α,β -insaturado presentou ramificações na cadeia, como o 2-metil-2-butenal **2d** que levou à 2-hidroxi-2*H*-cromenona **4d** com 8% e, com o 3-metil-2-butenal **2e** para o qual incluive, não foi detectada a formação da 2-hidroxi-2*H*cromenona **4e**. A ramificação da cadeia no carbono sp^2 possivelmente dificultou a adição de Michael (adição-1,4) no 3-metil-2-butenal **2e** via adição nucleofílica do íon enolato da β dicetona cíclica **1a**.

A mesma tendência no decaimento do rendimento foi observada nos produtos **5a-e** onde o aumento do tamanho da cadeia alquílica do aldeído α,β -insaturado (**2a-c**) ou sua ramificação nos carbonos sp^2 (**2d-e**) ocasionou o desfavorecimento via adição-1,4 do correspondente íon enolato. Contudo, os rendimentos para as 2*H*-cromenonas **5a-d** foram maiores que nas 2hidroxi-2*H*-cromenonas **4a-d**. Uma razão pode ser que a reação da adição a partir do segundo íon enolato da β -dicetona cíclica **1a** ocorreu com uma maior velocidade do que a reação de ciclização que levou aos hemicetais cíclicos 2-hidroxi-2*H*-cromenonas **4a-d**.

2.4.5 Triagem biocatalisadores para a obtenção da 2-hidroxi-2*H*-cromenona4a catalisada por diferentes lipases

Com o intuito de encontrar outros biocatalisadores para a formação da 2-hidroxi-2*H*cromenona **4a**, foi realizada uma triagem com algumas lipases isoladas de microrganismos, como a lipase de *Aspergillus niger*, a lipase de *Rhizopus niveus*, a lipase de *Thermomyces lanuginosus*, a lipase de *Burkhodelaria cepacia* e a lipase de *Pseudomonas fluorescences*. Estas enzimas foram comparadas com a PPL-II nas mesmas condições de reação e com um controle realizado na ausência de lipases **Figura 2.21**.

As condições de reação usadas para a triagem foram o solvente DMSO e H₂O (90:10) e a temperatura 30 °C. Aqui inverteu-se a proporção dos solventes e diminuiu-se a temperatura em relação às condições obtidas no planejamento experimental (H₂O e DMSO, 90:10 e 52 °C), pois na reação controle (ausência de lipase) estas condições contribuíram para a conversão da 2*H*-cromenona **3a** (98%), e neste caso o objetivo foi a obtenção da 2-hidroxi-2*H*-cromenona **4a** sem a interferência das condições de reação. Cabe ressaltar, que o ideal seria fazer um estudo detalhado da melhor condição reacional com cada lipase, mas isso não foi realizado por razões de praticidade.

Em geral todas as lipases estudadas contribuíram para a produção das 2*H*-cromenonas **3a**, **4a e 5a (Tabela 2.16)**. A lipase de *Rhizopus niveus* e PPL-II catalisaram a formação de **3a**, contudo sem regiosseletividade, pois as cromenonas **4a** e **5a** foram produzidas em conversões similares. As lipases de *Thermomyces lanuginosus, Burkhodelaria cepacia e Aspergillus niger* contribuíram para a formação da 2*H*-cromenona **5a** em conversões de 54, 42 e 40%, respectivamente. Entretanto, a lipase de *Pseudomonas fluorescens* (LPF) foi a mais seletiva para a produção da 2-hidroxi-2*H*-cromenona **4a** com 74% de conversão. As cromenonas **3a** e **5a** foram produzidas em 17 e 38 %, respectivamente.



Figura 2.21. Cromatogramas obtidos por HPLC-UV da reação entre a 1,3-cicloexanodiona 1a e o crotonaldeído 2a para a formação das 2*H*-cromenonas 3a, 4a e 5a catalisadas por diferentes lipases e reação controle.

Condições de análises cromatográficas (HPLC-UV): coluna Luna C18 da Phenomenex (250 mm x 4,6 mm, 5 μ m), método em gradiente no modo reverso usando ácido fórmico ao 0,1% em água e metanol, fluxo 0,5 mL/min e detecção em 254 nm. Amostras das reações analisadas após *work-up*.

| $ \begin{array}{c} 0 \\ - \\ 0 \\ - \\ 0 \\ - \\ 0 \\ - \\ - \\ - \\ - \\ - \\ - \\ - \\ - \\ - \\ -$ | Lipase DMSO/H ₂ O (10%) 30°C, 24 h | | о | HO 5a | o J | |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------|----------------------------------------|---------------------------------------|----------------------------------------|--|
| Linges | A la | Adiatidada (II ma-1) | -1) | Conversões (%) | | |
| Lipase | Abreviatura | Auvidade (U mg |) 3a | 4 a | 5a | |
| Aspergillus niger Rhizopus niveus Thermomyces lanuginosus Burkhodelaria cepacia Pseudomonas fluorescences Pâncreas de porco tipo II Controle (ausência de lipase) | LAN LRN LTL LBC LPF PPL-II | $\geq 0,184$ ≥ 15 ≥ 3 ≥ 20.000 30,1 | 16 39 27 20 17 32 13 | 25 21 14 10 74 16 3 | 40 36 54 42 38 34 12 | |

Tabela 2.16. Triagem de lipases na reação entre a 1,3-cicloexanodiona **1a** e o crotonaldeído **2a** para a formação das 2*H*-cromenonas **3a**, **4a** e **5a**.

Conversões determinadas por HPLC-UV: coluna Luna C18 da Phenomenex (250 mm x 4,6 mm, 5 μ m), método em gradiente no modo reverso usando ácido fórmico ao 0,1% em água e metanol, fluxo 0,5 mL/min. Na triagem foram usados 20 mg de preparado enzimático comercial das lipases. Atividade das lipases fornecida pelo fornecedor.

Assim, a LPF foi selecionada para ampliar o escopo de reação após serem testadas algumas condições, especialmente o solvente com o intuito de encontrar uma condição que levasse à 2-hidroxi-2*H*-cromenona **4a** com maior seletividade em relação às 2*H*-cromenonas **3a** e **5a** (**Seção 2.4.6**).

2.4.6 Triagem de solventes frente à reação da 1,3-cicloexadienona 1a e o crotonaldeído 2a com a lipase de *Pseudomonas fluorescens*

A lipase de *Pseudomonas fluorescens* foi estudada por Yang et al. (38), os quais descreveram a formação majoritária da 2-hidroxi-2*H*-cromenona **4a** frente a à reação da 1,3-cicloexadienona **1a** e o crotonaldeído **2a**.

Neste trabalho o solvente utilizado foi o CH_2Cl_2 a 30 °C durante 24 h. Assim, no presente trabalho foram escolhidas misturas binárias de solventes imiscíveis, como CH_2Cl_2 e água, hexano e água e 1-octanol e água, assim como hexano-etanol (**Tabela 2.17**). Isto com o intuito de testar o fenômeno de ativação interfacial característico das lipases, no qual a 'alça' que permite a entrada e saída dos substratos no sítio catalítico se move em direção à conformação aberta na presença de solventes não polares e em interface óleo/água (61,62).

| Entrada | Condição | | Conversões (%) | | |
|---------|----------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------|----------------|------------|----|
| Entrada | Mistura | Mistura de solventes | | 4 a | 5a |
| 1 | CH ₂ Cl ₂ (1,25) | H ₂ O (5%) | 12 | 76 | 5 |
| 2 | CH_2Cl_2 | H ₂ O (10%) | 22 | 71 | 3 |
| 3 | CH_2Cl_2 | H ₂ O (95%) | 15 | 53 | 3 |
| 4 | Hexano (4,00) | EtOH (5%) | 27 | 55 | 10 |
| 5 | Hexano | EtOH (50%) | 43 | 43 | 8 |
| 6 | Hexano | EtOH (95%) | 41 | 44 | 10 |
| 7 | Hexano | H ₂ O (5%) | 26 | 56 | 11 |
| 8 | Hexano | H ₂ O (50%) | 35 | 62 | 5 |
| 9 | Hexano | H ₂ O (95%) | 27 | 52 | 10 |
| 10 | CH ₂ Cl ₂ | $Na_2HPO_4/KH_2PO_4^{[a]}(5\%)$ | 14 | 71 | 6 |
| 11 | CH_2Cl_2 | $Na_{2}HPO_{4}/KH_{2}PO_{4}^{[a](50\%)}$ | 16 | 25 | 3 |
| 12 | CH_2Cl_2 | Na ₂ HPO ₄ / KH ₂ PO ₄ ^[a] (95%) | 7 | 39 | 26 |
| 13 | 1-Octanol (3,07) | H ₂ O (5%) | 44 | 39 | 3 |
| 14 | 1-Octanol | H ₂ O (50%) | 26 | 64 | 3 |
| 15 | 1-Octanol | H ₂ O (95%) | 31 | 53 | 5 |
| 16 | CH ₂ Cl ₂ | H ₂ O (10%) ^[b] | 6 | 51 | 28 |

Tabela 2.17. Conversões obtidas para as 2*H*-cromenonas **3a**, **4a** e **5a** na reação entre a 1,3cicloexanodienona **1a** e o crotonaldeído **2a** na presença da LPF.

^[a] Tampão fosfato 70 mM, pH 7. ^[b] A reação foi realizada a 50 °C. Conversões determinadas por HPLC-UV: coluna Luna C18 da Phenomenex (250 mm x 4,6 mm, 5 μ m), método em gradiente no modo reverso usando ácido fórmico ao 0,1% em água e metanol, fluxo 0,5 mL/min. Os valores entre parênteses na segunda coluna correspondem aos log *P* dos solventes orgânicos (63).

A condição usada por Yang et al. (38) (**Entrada 1, Tabela 2.17**) mostrou ser claramente a melhor para a formação do composto **4a** (CH₂Cl₂ e H₂O, 95:5 e 30 °C, 24 h), pela conversão e formação minoritária dos compostos **3a** e **5a**. Ao mudar a composição do solvente (CH₂Cl₂ e H₂O, 90:10) a 30 °C não houve alteração significativa na conversão para o produto **4a** (71%). Ao inverter a proporção dos solventes CH₂Cl₂ e H₂O (5:95) a 30 °C a conversão diminuiu para a 2-hidroxi-2*H*-cromenona **4a** (53%) (**Entrada 3, Tabela 2.17**), demonstrando o efeito de ter conteúdo significativo de água na diminuição na conversão da 2-hidroxi-2*H*-cromenona **4a**.

A mistura dos solventes hexano e EtOH (**Entradas 4-6, Tabela 2.17**) foi utilizada nas proporções de 95:5, 50:50 e 5:95, nas quais foi observado um rendimento de **4a** de 55, 43 e 44%, respectivamente. Estes rendimentos foram moderados, porém foi produzida a 2*H*-190 cromenona **3a** em rendimentos de 27, 43 e 41 %, respectivamente. Estes resultados demostraram que conteúdos significativos do solvente polar, neste caso 50 e 95%, forneceram menores conversões para a 2-hidroxi-2H-cromenona **4a**.

Para a mistura de hexano e H₂O (**Entradas 7-9, Tabela 2.17**) foram utilizadas as proporções de 95:5, 50:50 e 5:95, nas quais as conversões da 2-hidroxi-2*H*-cromenona **4a** foram 56, 62 e 52%, respectivamente em competição com a 2*H*-cromenona **3a** a qual foi produzida em 26, 35 e 27 %, respectivamente.

Outra mistura de solventes testada foi a de CH₂Cl₂ e tampão fosfato (Na₂HPO₄/KH₂PO₄), onde utilizou-se a porcentagem do tampão fosfato de 5 a 50 e 95% (**Entradas 10-12, Tabela 2.17**). Observou-se que a proporção 5% do tampão fosfato não afetou significativamente a produção dos compostos **3a**, **4a** e **5a** (14, 71 e 6%) quando comparados ao experimento da **Entrada 1** (12, 76 e 5%). As proporções 50% e 95% renderam a 2-hidroxi-2*H*-cromenona **4a** em 25 e 39%, respectivamente.

A mistura de 1-octanol e H₂O (**Entradas 13-15, Tabela 2.17**) onde variou-se a porcentagem de H₂O de 50 % forneceu a 2-hidroxi-2*H*-cromenona **4a** em excelente rendimento (64%). Porém, a 2*H*-cromenona **3a** foi produzida com 26 % de rendimento. Uma desvantagem deste solvente é seu elevado ponto de ebulição (195 °C), ainda assim, pode ser uma alternativa frente ao uso de lipases em biocatálise.

Nestes estudos solventes polares como água e etanol em quantidades \geq 50% nas misturas binárias imiscíveis levaram à diminuição na conversão da 2-hidroxi-2*H*-cromenona **4a** pela LPF. Neste caso o rendimento pode ter sido afetado devido à solvatação dos grupos polares da enzima (21), os quais poderiam contribuir para a catálise da reação.

Tomando a composição de solventes da **Entrada 2** (**Tabela 2.17**) a uma temperatura de 50 °C (**Entrada 16, Tabela 2.17**) com o intuito de melhorar a regiosseletividade, foi observado o decaimento na conversão da 2-hidroxi-2*H*-cromenona **4a** (51%). Neste caso, o aumento da temperatura de 30 °C para 50 °C teve um efeito desfavorável na conversão da 2-hidroxi-2*H*-cromenona **4a** e o aumento na conversão da cromenona **5a** (28%).

Assim, de acordo com os dados da **Tabela 2.17**, foi escolhido a mistura de CH_2Cl_2 (log *P* 1,25) e água (90:10) e a temperatura de 30 °C, que favoreceram a produção da 2-hidroxi-2*H*cromenona **4a**. Contudo, o CH_2Cl_2 não atende aos princípios de química verde, por se tratar de um solvente tóxico, o que impossibilita se uso em larga escala visando à síntese de moléculas bioativas.

2.4.7 Avaliação do escopo da reação biocatalisada pela LPF na formação de 2-hidroxi-2*H*-cromenonas 4a-c

Após a escolha da melhor condição para a síntese da 2-hidroxi-2H-cromenona **4a** (CH₂Cl₂ e H₂O, 9:1, 30 °C), a próxima etapa do trabalho foi avaliar o escopo da reação com a LPF.

Na **Tabela 2.18** foram apresentados os produtos majoritários (**4a-c**) e minoritários (**3a-c**) formados pela reação dos aldeídos α,β -insaturados (**2a-c**) e a β -dicetona cíclica **1a**.

Tabela 2.18. Escopo da reação entre a β -dicetona cíclica **1a** e os aldeídos α , β -insaturados **2a-c** na formação das 2*H*-cromenonas **3a-c** e **4a-c** na presença da LPF.



Dentre os rendimentos obtidos com a LPF observou-se que ao aumentar a cadeia alquílica do aldeído α , β -insaturado (R = metil, etil, *n*-propil), o rendimento diminuiu concomitantemente. Quando R₁ foi o grupo metila o rendimento foi 93% para **4a**, porém ao substituir para o grupo etila o rendimento foi de 58 % para **4b**, e ao substituir para o grupo *n*-propila o rendimento foi de 37% para **4c**.

Essa redução do rendimento talvez seja devido ao fato que grupos substituintes maiores dificultaram o ataque do íon enolato da 1,3-cicloexanodiona **1a** via adição *C*-1,4, o qual corresponde ao primeiro passo para a formação das 2-hidroxi-2*H*-cromenonas **4a-c**. Porém, foi observada uma tendência oposta no rendimento das 2*H*-cromenonas **3a-c** ao aumentar o tamanho da cadeia alquílica dos aldeídos α , β -insaturados **2a-c**. Claramente, este

comportamento está associado com o ataque mais favorecido ao grupo carbonílico do aldeído. Assim houve favorecimento da adição-1,2 em detrimento da adição-1,4.

Por outro lado, alterando-se o tipo de β -dicetona cíclica **1a-d** (**Tabela 2.19**) não houve um efeito significativo no rendimento da reação de formação de 2-hidroxi-2*H*-cromenonas **4dg**, mostrando que todas as quatro dicetonas utilizadas apresentaram reatividades semelhantes, independentemente do tipo de grupos substituintes (alquilas ou aromático).

Tabela 2.19. Escopo da reação de formação de 2-hidroxi-2*H*-cromenonas **4e-h** na presença da LPF variando o tipo de β -dicetona cíclica **1a-d** e mantendo o crotonaldeído **2a**.



* Os rendimentos (%) foram obtidos pelo isolamento por cromatografia em coluna.

Os cromatogramas das reações para a obtenção das 2*H*-cromenonas **4d-g** a partir da catálise pela LPF são apresentados na **Figura 2.22**. Os cromatogramas dos compostos purificados foram analisados por HPLC-UV aquiral (**Figura 2.23**), para sua posterior análise por HPLC-UV quiral, os quais são apresentados no Apêndice. Não foram obtidos excessos enantioméricos de acordo com os cromatogramas via análises em coluna quiral, onde só foram observados os pares diastereoisoméricos maioritários (produto *anti*). Destaca-se que todos os compostos obtidos foram estáveis e possibilitaram suas análises cromatográficas e as caracterizações via RMN, IV, HRMS (Apêndice).



Figura 2.22. Cromatogramas obtidos por HPLC-UV dos produtos 2*H*-cromenonas **4d-g** obtidas da reação entre as β -dicetonas cíclicas **1a-d** e o crotonaldeído **2a** na presença de LPF.

Condições de análises cromatográficas (HPLC-UV): coluna Luna C18 da Phenomenex (250 mm x 4,6 mm, 5 µm), método em gradiente no modo reverso usando ácido fórmico ao 0,1% em água e metanol, fluxo 0,5 mL/min e detecção em 254 nm. Amostras das reações analisadas após *work-up*.



Figura 2.23. Cromatogramas obtidos por HPLC-UV das 2-hidroxi-2*H*-cromenonas **4a-g** obtidas da catálise com a LPF após purificação por cromatografia de coluna.

Condições de análises cromatográficas (HPLC-UV): coluna Luna C18 da Phenomenex (250 mm x 4,6 mm, 5 μ m), método em gradiente no modo reverso usando ácido fórmico ao 0,1% em água e metanol, fluxo 0,5 mL/min e detecção em 254 nm.

2.4.8 Caracterização espectroscópica por RMN dos compostos 2-hidroxi-2*H*-cromenonas

Antes de realizar a análise espectroscópica dos compostos obtidos, é importante entender a estrutura química das 2-hidroxi-2*H*-cromenonas sintetizadas. Para isto foi realizada inicialmente uma comparação com a estrutura da Warfarina, um fármaco usado como anticoagulante e do qual foi realizado um estudo teórico-experimental sobre seu tautomerismo por Guasch et al. (64). A estrutura do composto 2-hidroxi-2*H*-cromenona **4a** é similar à do composto Warfarina. Os autores deste estudo encontraram 40 tautômeros teóricos para a Warfarina a partir das combinações das formas tautoméricas das subestruturas mostradas no **Esquema 2.26**.



Esquema 2.26. Tautomerização de subestruturas da Warfarina e da 2-hidroxi-2H-cromenona 4a.

Adaptado de Guasch et al. (64).

A Warfarina exibe tautomerismo prototrópico, o movimento intramolecular de hidrogênio de um átomo para outro, bem como o tautomerismo de anel-cadeia onde o movimento do próton é acompanhado pela abertura ou fechamento do anel.

Todas as formas de Warfarina de cadeia aberta exibem tautomerismo cetoenólico tanto na parte β -ceto lactona como na parte ceto da cadeia lateral (**Esquema 2.26-A** e **B**). A parte β ceto lactona (**Esquema 2.26-A**) possui um centro estereogênico. Portanto, existem dois enantiômeros que somados às formas enólicas leva a quatro estruturas diferentes.

Com a porção ceto da cadeia lateral na forma de enol (**Esquema 2.26-B**) envolvendo a metila terminal tem dois isômeros possíveis: configuração E e configuração Z. Isto cria quatro formas distintas para a tautomerização da cadeia lateral. A combinação de ambas as partes conduz a 16 formas tautoméricas de cadeia aberta.

A formas tautoméricas abertas podem ciclizar para formar o hemicetal cíclico de 4hidroxicumarina ou o hemicetal cíclico 2-hidroxicromona (**Esquema 2.26-C**).

O fechamento do anel cria um novo centro de assimetria, de modo que dois possíveis diastereoisômeros podem se formar para cada fechamento, para um total de quatro tautômeros distintos. Levando em conta ambos os enantiômeros da Warfarina, o número de possíveis tautômeros atinge um total de 40.

Por analogia a 2-hidroxi-2*H*-cromenona **4a** presenta simetria na porção β -dicetona, a qual resulta em duas formas tautoméricas (**Esquema 2.26-A'**). A parte ceto da cadeia lateral conduz a três formas tautoméricas duas delas correspondentes aos isômeros de configuração *E* e configuração *Z* (**Esquema 2.26-B'**). A ciclização da forma tautomérica aberta gera um centro estereogênico, de modo que leva a dois enantiômeros (**Esquema 2.26-C'**). Assim, as formas tautoméricas teóricas para o composto **4a** somam 7 para cada enantiômero, para um total de 14 tautômeros; porém, nem todo os tautômeros resultam em compostos estáveis em solução ou no estado sólido.

As análises por RMN de uma amostra de (*S*)-Warfarina realizada por Guasch et al. (64) mostraram a presença das formas tautoméricas abertas e ciclizadas em solução de DMSO. As atribuições espectrais de RMN de ¹³C indicaram que a (*S*)-Warfarina existe principalmente como uma mistura dos diastereoisômeros dos hemicetais cíclicos *S*,*R* e *S*,*S* (70% e 28%), juntamente com uma pequena porção de uma forma de cadeia aberta (2%) (**Figura 2.24**). Estas proporções experimentais estiveram de acordo com as distribuições de Boltzmann calculadas a partir das energias quântico-químicas (64). A distribuição e os tipos de isômeros presentes dependem da polaridade e do pH do solvente (64).



Figura 2.24. Proporções tautoméricas encontradas por RMN de ¹H em uma amostra de (S)-Warfarina.

Fonte: Guasch et al. (64).

Esperava-se para a 2-hidroxi-2*H*-cromenona **4a** uma mistura de tautômeros de cadeia aberta e fechada (**Figura 2.25**). Assim, da análise de RMN de ¹³C foram observados sinais

duplicados para quase todos os carbonos, porém, não foi observada a presença do tautômero de cadeia aberta, devido à ausência do sinal do carbono aldeídico. O espectro de RMN ¹H mostrou a presença de sinais duplicados para os prótons da metila, não sendo possível diferenciar sinais entre os diastereoisômeros pela sobreposição de multipletos, exceto para os prótons do grupo metila. Uma análise mais detalhada dos espectros de RMN será apresentada na **Seção 2.4.8.1**.





2.4.8.1 Caracterização da 2-hidroxi-2H-cromenona 4a por RMN de ¹H e ¹³C



Em compostos bicíclicos com presença de heteroátomos e insaturações no anel são observadas distorções planares provocadas pela presença de ligações duplas, que induzem menor flexibilidade do anel, assim como alongamento ou diminuição das ligações pela presença do heteroátomos. Deste modo, o anel hemicetal do diastereoisômero (\pm)-*anti*-**4a** pode ter várias conformações, porém a conformação preferencial é a de uma meia cadeira na qual os grupos metila e hidroxila estão orientados pseudoaxialmente e pseudoequatorialmente, respectivamente no diastereoisômero *anti*-(*S*,*R*)-**4a** (**Figura 2.26a**), considerado o mais estável.

No diastereoisômero syn-(S,S)-4a as posições para a metila e a hidroxila ocorrem pseudoaxial e axial, respectivamente, no anel hemicetal (Figura 2.26b).



Figura 2.26. Conformações mais estáveis dos diastereoisômeros anti-4a e syn-4a.

*Estruturas obtidas no programa ChemBio3D ultra calculados através da função de minimização da energia MM2.

Para os diastereoisômeros *anti-(R,S)-***4a** e *syn-(R,R)-***4a** a posição da metila é pseudoequatorial enquanto a hidroxila ocupa a posição axial no *anti-(R,S)-***4a** e a equatorial no *syn-(R,R)-***4a**.

Na **Figura 2.27** foram enumerados as posições do composto *anti-(S,R)-***4a** para facilitar a atribuição dos sinais dos prótons. Porém, cabe ressaltar que o espectro de RMN de ¹H (**Figura 2.27a**) correspondeu à mistura de diastereoisômeros (\pm)-*anti* e (\pm)-*syn* do composto 2-hidroxi-

2*H*-cromenona **4a**, na proporção.de 78:22, determinada qualitativamente pelos sinais do grupo metila no espectro de RMN de ¹H (400MHz, CDCl₃, **Figura 2.27**).

Figura 2.27. (**A**) Espectro de RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃) dos compostos diastereoisômeros *anti e syn* da 2-hidroxi-2*H*-cromenona **4a.** (**B**) Expansão das regiões espectrais 5,35-5,44 ppm, 2,25-2,45 ppm, 1,65-2,05 ppm e 1,00-1,30 ppm.



Na interpretação do espectro de RMN de ¹H (**Figura 2.27A**) destacam-se os quatro tipos de prótons do anel hemicetal. O próton H1 ligado diretamente no C1, os prótons H2 equatorial e o axial, o próton H3 o qual ocupa a posição ou pseudoaxial ou pseudoequatorial devido à distorção provocada pela presença da insaturação no anel e, os prótons do grupo metila.

No espectro o próton H1 apresentou um sinal em δ 5,39 (dd, J = 2,50 e 9,34 Hz) (**Figura** 2.27B), estando relativamente desprotegido em comparação com outros prótons por estar ligado

ao hemiacetal. O acoplamento com o próton H2 equatorial forneceu uma constante de acoplamento de 2,5 Hz e com o próton H2 axial uma constante de acoplamento de 9,34 Hz.

Os prótons H2 apresentaram sinais diferentes que conduziram aos multipletos na faixa de 2,47-2,24 ppm e 1,68-1,80 ppm. O multipleto na região de 1,98-1,82 ppm correspondeu ao próton H3. Os sinais em δ 1,22 (d, J = 6,97 Hz) e δ 1,10 (d, J = 6,99 Hz) foram referentes aos prótons do grupo metila nos diastereoisômeros (±)-*syn*-**4a** e (±)-*anti*-**4a**, em uma razão de 22:78, respectivamente de acordo com as intensidades dos sinais.

Os demais sinais correspondentes ao anel 1,3-cicloexenona apresentaram uma sobreposição com os sinais dos hidrogênios do anel hemicetal. Porém, destacou-se o sinal de um dos prótons H7 por ser o mais desprotegido (α -carbonila) e estar afastado do restante dos sinais, sendo um multipleto na faixa 2,80-2,90 ppm.

Na **Tabela 2.20** foram apresentados os sinais de deslocamentos químicos do próton H1 para os produtos (\pm)-**4a-7a** obtidos da reação entre 1,3-cicloexadiona **1a** com aldeídos α , β -insaturados **2a-d**. Observou-se as constantes de acoplamento entre 7,8 e 9,5 Hz para os diastereoisômeros (\pm)-*anti*-**4a-7a**, e entre 4,9 e 5,0 Hz para os diastereoisômeros (\pm)-*syn*-**4a-7a**.

Também foi determinada a proporção diastereoisomérica dos produtos *anti* e *syn* através da análise dos sinais do espectro de RMN de ¹³C nos quais resultou mais fácil a comparação por presentar sinais diferenciados para a maioria dos carbonos.

Tabela 2.20. Sinais de RMN de ¹H dos prótons do hemiacetal para os derivados de 2-hidroxi-2*H*cromenonas **4a-d** obtidos da reação entre 1,3-cicloexadiona **1a** com os aldeídos α,β -insaturados **2a-d**.

| 0 | R ₁ | |
|---|----------------|----------------|
| | \land | R ₂ |
| | | Η¹ |
| | 0 | ОН |

| Composto | \mathbf{R}_1 | \mathbf{R}_2 | Deslocamento químico [ppm] (multiplicidade, constante de acoplamento ³ <i>J</i>) | | dr. ^[a] |
|------------|-----------------|----------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------|--------------------|
| | | | Diastereoisômeros anti | Diastereoisômeros syn | anti: syn |
| | | | 5,39 (dd, <i>J</i> = 2,50 e 9,34 | | |
| 4 a | CH ₃ | Н | Hz) | Não observado | 83:17 |
| 4 b | CH_2CH_3 | Н | 5,37 (d, <i>J</i> = 7,76 Hz); | 4,90 (d, <i>J</i> = 5,30 Hz) | 82:18 |
| 4c | $CH_2CH_2CH_3$ | Н | 5,38 (d, <i>J</i> = 9,43 Hz); | 4,91(d, <i>J</i> = 4,34 Hz) | 83:17 |
| 4d | CH ₃ | CH_3 | 5,12 (d, <i>J</i> = 9,13 Hz) | 5,00 (d, <i>J</i> = 4,79 Hz) | |

Os espectros foram adquiridos em $CDCl_3$ e 400MHz. δ : deslocamento químico. dr. = diastereosseletividade.^[a] calculado a partir da razão de sinais majoritários e minoritários no espectro de RMN de ¹³C.

Caracterização da 2-hidroxi-2H-cromenona 4a por RMN de ¹³C

O espectro de RMN de ¹³C (100 MHz, CDCl₃) mostrou uma clara duplicação dos picos com deslocamentos químicos muito similares e os correspondentes pares de intensidades oscilaram entre as proporções 78:22 e 85:15, provavelmente por que tempo de relaxamento programado no experimento foi insuficiente para que todos os prótons voltaram a seu estado de spin inicial (**Figura 2.28A**). Estes sinais duplicados corresponderam aos diastereoisômeros (\pm)-*anti*-4a (majoritário) e (\pm)-*syn*-4a (minoritário), pois foi descartada a presença da forma tautomérica enol de cadeia aberta, devido à ausência do sinal da carbonila do aldeído do fragmento CH₂-CHO, o qual seria esperado em ~ 200 ppm, bem com foram ausentes nos espectros de RMN de ¹H (δ 10).

O carbono C1 do hemicetal teve um sinal em δ 93,2 para o diastereoisômero (±)-*anti*-**4a** e, em δ 94,5 para o diastereoisômero (±)-*syn*-**4a**. Os carbonos C6 (δ 198,5) e C10 (δ 169,8) não apresentaram sinais duplicados referentes a cada estereoisômero. Ao carbono C5 foi atribuído o deslocamento químico em 116,1 ppm no diastereoisômero (±)-*anti*-**4a** e em 116,7 ppm ao C5 do diastereoisômero (±)-*syn*-**4a**.

Os sinais em δ 37,3 e 35,8 foram referentes aos carbonos metilênicos mais desprotegidos C7 e C2, respectivamente para o diastereoisômero (±)-*anti*-4a e, os sinais de menor intensidade em δ 37,1 e 35,7 foram atribuídos aos carbonos C7 e C2, respectivamente no diastereoisômero (±)-*syn*-4a (Figura 2.28B). Os sinais com deslocamentos químicos em 28,8 e 23,3 ppm corresponderam aos carbonos C9 e C3, respectivamente no diastereoisômero (±)-*anti*-4a. Enquanto os C9 e C3 no diastereoisômero (±)-*syn*-4a apresentaram sinais espectrais em δ 28,9 e 22,9 (Figura 2.28B).

O carbono metilênico C8 no diastereoisômero (\pm) -*anti*-**4a** foi associado ao sinal com δ 21,1 e no diastereoisômero (\pm) -*syn*-**4a** ao sinal com δ 20,6. O carbono do grupo metila identificado como C4 foi relacionado ao sinais em δ 21,0 para o diastereoisômero (\pm) -*anti*-**4a** e em δ 20,4 para o diastereoisômero (\pm) -*syn*-**4a**.



Figura 2.28. (**A**) Espectro de RMN de ¹³C (100 MHz, CDCl₃) dos compostos isoméricos *anti* e *syn*-2-hidroxi-2*H*-cromenonas **4a**. (**B**) Expansões da região espectral de 19-39 ppm.

2.4.8.2 Caracterização da 2H-cromenona 3a por RMN de ¹H e ¹³C



Na **Figura 2.29A** é mostrado o espectro de RMN de ¹H da 2*H*-cromenona **3a** racêmica e, suas expansões apresentadas na **Figura 2.29B**. O próton metínico H1 com δ 5,02 (qdd, *J* = 1,66; 3,07 e 6,54 Hz, 1H) apresentou um sinal de duplo quarteto de duplos dupletos, devido aos acoplamentos com a metila e o próton da ligação dupla. Os sinais correspondentes aos prótons com hibridização *sp*² do anel 2*H*-pireno, H2 e H3, forneceram um duplo dupleto, um deles 203 centrado em δ 6,44 (dd, J = 1,53 e 9,98 Hz, 1H) e outro centrado em δ 5,29 (dd, J = 3,09 e 9,98 Hz, 1H).

O conjunto dos prótons metilênicos do anel cicloexenona (H6, H7 e H8) apresentou deslocamentos químicos em campo alto. Os prótons α -metilênicos à carbonila, ligados em C6, forneceram um multipleto centrado em 2,39 ppm. Porém, neste multipleto também encontraram-se sobrepostos os sinais dos hidrogênios H8. O multipleto centrado em 1,97 ppm foi atribuído aos prótons H7 e o sinal com δ 1,41 (d, *J* = 6,5 Hz, 3H) foi referente aos prótons do grupo metila.

Figura 2.29. (A) Espectro de RMN de ¹H (500 MHz, CDCl₃) do composto 2*H*-cromenona **3a.** (B) Expansão da regiões espectrais 6,42-6,47 ppm, 5,26-5,32 ppm, 4,98-5,06 ppm, 2,30-2,55 ppm, 1,90-2,05 ppm.



Caracterização da 2H-cromenona 3a por RMN de ¹³C

O espectro de RMN de ¹³C (126 MHz, CDCl₃) da 2*H*-cromenona **3a** (**Figura 2.30**) apresentou um sinal em δ 195,1 atribuído ao carbono da carbonila, identificado como C5 e, um sinal espectral em δ 172,56 ppm referente ao carbono com hibridização *sp*² ligado ao oxigênio, atribuído ao C9.

O conjunto dois sinais subsequentes, δ 119,0; 117,4 e 111,4 corresponderam aos carbonos com hibridização *sp*², C2, C3 e C4 do anel 2*H*-pireno, respectivamente. A este conjunto de sinais do anel 2*H*-pireno somam-se o sinal em δ 74,1, correspondente ao carbono metínico, identificado como C1e o sinal em δ 20,7 referente ao carbono da metila, identificado como C10.

O seguinte conjunto de sinais em δ 36,5; 28,4 e 21,8 foram referentes aos carbonos metilênicos C6, C8 e C7, respectivamente.



Figura 2.30. Espectro de RMN de ¹³C (126 MHz, CDCl₃) do composto 2*H*-cromenona 3a.

2.4.9 Regiosseletividade enzimática para a adição-1,2 e 1,4 na formação de 2*H*-cromenonas

Realizou-se uma comparação entre as duas enzimas usadas (LPF e PPL-II) nas síntese das 2*H*- cromenonas **3a**, **4a** e **5a** nas temperaturas de 30 °C (**Figura 2.31A**) e 50 °C (**Figura 2.31B**) nas condições, CH_2Cl_2 e H_2O (90:10), 0,1 mmol de 1,3-cicloexanodiona **1a**, 0,5 mmol de crotonaldeído **2a**, 20 mg de enzima e 24 horas de reação. Foram realizadas as reações controles (ausência das enzimas).

Figura 2.31. Gráfico comparativo das conversões das 2*H*-cromenonas **3a**, **4a**, e **5a** obtidas da reação entre a 1,3-cicloexanodiona **1a** e o crotonaldeído **2a** sob a catálise com a LPF e PPL-II a (**A**) 30 °C e (**B**) 50 °C.



Foi observado que em 30 °C a reação controle na ausência de enzima favoreceu a 2*H*cromenona **3a** (54%). Enquanto a reação controle realizada a 50 °C rendeu a 2*H*-cromenona **3a** em menor conversão (35%). Sendo que as cromenonas **4a** e **5a** foram produzidas com conversões baixas nas duas temperaturas (1 a 4%).

Quando a reação foi realizada na presença das lipases a 30 °C, a LPF favoreceu a formação da 2-hidroxi-2*H*-cromenona **4a** (73%) enquanto a PPL-II favoreceu a produção da 2*H*-cromenona **3a** (73%). Porém, quando a reação foi realizada a 50 °C a LPF foi menos eficiente para a formação da 2-hidroxi-2*H*-cromenona **4a** (52%) e menos regiosseletiva, pois catalisou também a adição *C*-1,2 na formação da 2*H*-cromenona **3a** (28%). A PPL-II continuou favorecendo a 2*H*-cromenona **3a** (68 %) e catalisou também a conversão da 2-hidroxi-2*H*-cromenona **4a** (13%) ainda que com baixa conversão.

Contudo, foi observado que cada lipase, LPF e PPL-II, levou à catálise da reação entre a 1,3-cicloexanodiona **1a** e o crotonaldeído **2a** para a formação de uma das 2*H*-cromenonas **3a** ou **4a** através da adição C-1,2 e a adição C-1,4, respectivamente. Esta tipo de discriminação da posição do centro de ataque na função química é um caso de regiosseletividade.

A catálise pela LPF pode ser atribuída a uma ativação do enol da 1,3-cicloexanodiona **1a** atuando como base para formar o íon enolato. O íon enolato promove um ataque ao crotonaldeído **2a** via uma adição de Michael, com o qual forma-se o primeiro centro estereogênico e o intermediário **Ia** (**Esquema 2.27A**). O intermediário **Ia** através de um equilíbrio tautomérico leva à estrutura **Ib**. O intermediário **Ib** pode estabelecer ligações de hidrogênio com resíduos de aminoácidos ácidos e básicos da enzima que induziriam à reação

de fechamento do anel hemicetálico com o qual seria formado o segundo centro estereogênico da 2-hidroxi-2*H*-cromenona **4a**.

No entanto a catálise pela LPF poderia ocorrer através de outro mecanismo (**Esquema 2.27B**). Este iniciaria com o ataque do íon enolato à carbonila por uma adição *O*-1,2 que levaria ao hemicetal acíclico (**II**). Este seria protonado e ciclizaria eliminando uma molécula de água levando ao intermediário **IVa** que suporta uma carga positiva sobre o oxigênio. Um equilíbrio prototrópico conduziria ao intermediário **IVb** mais estável por ter a ligação dupla mais substituída. A adição de água no intermediário **IVb** geraria o intermediário **V** o qual conduziria à 2-hidroxi-2*H*-cromenona **4a**.

De qualquer maneira, estudos envolvendo o uso de intermediários é determinante para complementar o entendimento da catálise, porém, isso não foi realizado neste trabalho.

Esquema 2.27. Mecanismo da reação entre a 1,3-cicloexanodiona **1a** e o crotonaldeído **2a** favorecido pela catálise com LPF.



A análise cromatográfica quiral da 2-hidroxi-2*H*-cromenona **4a** mostrou a presença de dois picos de áreas similares correspondentes aos enantiômeros (R,S) e (S, R)-**4a** (**Figura 2.32**). Assim, a ausência de enantiosseletividade, nos levou a concluir que a LPF não forneceu indução quiral para nenhum dos passos da reação. O primeiro passo mesmo tendo a participação da

enzima não induziu quiralidade ao produto **4a**. Enquanto no segundo passo a ciclização pode ocorrer espontaneamente, sem a participação necessária da enzima.

Figura 2.32. Cromatograma obtido por HPLC-UV do produto **4a** obtido da reação entre a 1,3cicloexanodiona **1a** e o crotonaldeído **2a** catalisada pela LPF.



Condições para análise cromatográfica (HPLC -UV): Coluna Phenomenex LUX[®] (250 mm x 4,6 mm, 5 μ m), Ácido fórmico aquoso (0,5%) e MeOH (gradiente), fluxo 0,5 mL/min, 254 nm, volume de injeção da amostra: 10 μ L. Áreas t_R 35 min =11809068 e 37 min = 11971225.

Também neste trabalho foi realizada a reação entre a β -dicetona **1a** e o crotonaldeído **2a** com a LPF desnaturada na temperatura >90°C em solução aquosa (**Figura 2.33B**). As conversões obtidas foram semelhantes a quando a enzima foi adicionada em sua forma nativa em solução aquosa (**Figura 2.33A**). Assim, a catálise foi realizada provavelmente por aminoácidos não presentes no sítio ativo em um tipo de arranjo estrutural formado em condições desnaturantes tanto pela temperatura como pelo solvente orgânico empregado.



Figura 2.33. Cromatograma obtido por HPLC-UV da reação catalisada pela LPF (**A**) *in natura* (**B**) *desnaturada* a 90 °C.

Condições de análises cromatográficas (HPLC-UV): coluna Luna C18 da Phenomenex (250 mm x 4,6 mm, 5 μ m), método em gradiente no modo reverso usando ácido fórmico ao 0,1% em água e metanol, fluxo 0,5 mL/min e detecção em 254 nm. Amostras das reações analisadas após *work-up*. Áreas t_R 13 min (**A**) = 20420011 e t_R 13 min (**B**) = 20432610.

A PPL-II favoreceu a formação da 2*H*-cromenona **3a**. Através de uma sequência de condensação/eletrociclização a qual poderia ocorrer por uma ativação da PPL-II, agindo como um catalisador tipo ácido de Bronsted pela ativação do aldeído via ligação de hidrogênio e como um catalisador básico, ativando o íon enolato da β -dicetona. O mecanismo inicia com o ataque do íon enolato da β -dicetona cíclica **1a** à carbonila do aldeído α , β -insaturado **2a** que formou o intermediário aldol α , β -insaturado **I**, o qual sobre eliminação de uma molécula de água conduziu ao intermediário **II**. O intermediário **II** por rotação da ligação simples pode ter a conformação de **IIa** ou a **IIb**. A conformação **IIb** favoreceu a reação eletrocíclica de 6 elétrons π de fechamento de anel que levou à formação do centro estereogênico da 2*H*-cromenona **3a**.



Esquema 2.28. Mecanismo da reação entre a 1,3-cicloexanodiona **1a** e o crotonaldeído **2a** favorecido pela catálise com PPL-II para obtenção da 2*H*-cromenona **3a**.

Como descrito por Moreau et al., a quase ausência de enantiosseletividades, qualquer que seja o catalisador usado para a cicloadição, parece ser uma consequência direta da abordagem de eletrociclização. A qual não requer de ativação e o catalisador não pode ter qualquer influência sobre o novo centro estereogênico formado se não está firmemente ligado ao intermediário oxatrieno (1).

De outra parte, o fato das lipases PPL-II e LPF apresentarem conversões diferentes para a 2-hidroxi-2*H*-cromenona **4a** sob condições similares, é uma evidência de que o arranjo estrutural da enzima desnaturada constitui em si um mecanismo de catálise, mesmo que não foram encontrados excessos enantioméricos para o par de diastereoisômeros *anti* e *syn* dos compostos 2-hidroxi-2*H*-cromenonas **4a-g**.

Como relatado por Gupta et al. (65) as interações hidrofóbicas são responsáveis pela eficiência catalítica de muitas enzimas para reações promíscuas. Dependem da desolvatação, são dirigidas pela entropia e muito mais dependentes da hidrofobicidade do substrato. Diferente das outras interações como as ligações de hidrogênio e as interações eletrostáticas entre o substrato e a enzima, promovidas pela complementariedade de estruturas do substrato e resíduos do sítio ativo (65).

2.4.10 Determinação da concentração de proteínas no preparado enzimático comercial de PPL-II e LPF

Para determinar a concentração total de proteínas nos preparados enzimáticos comerciais de PPL-II e LPF foi realizado o experimento baseado no método de Lowry modificado (52). Trata-se provavelmente do ensaio de proteínas mais amplamente utilizado, apesar de ser apenas um método relativo, sujeito a interferências de tampão Tris, EDTA, detergentes não iônicos e catiônicos, carboidratos, lipídeos e alguns sais. Contudo, é um método simples, sensível e de fácil execução.

O princípio do método é a formação de um complexo que absorve no espectro visível na região de 660 nm emitindo uma cor púrpura azul. Este complexo é formado entre o reagente Folin-Ciocalteau com o grupo fenólico da tirosina e do anel indólico do triptofano da proteína previamente complexada com Cu²⁺ através de átomos de nitrogênio da ligação peptídica. O reagente de Folin-Ciocalteau consiste na mistura de sais de sódio e fosfato do molibdato e tungstato, os quais são reduzidos pelos aminoácidos tirosina e triptofano (52). O molibdato (MoO_4^{4-}) e o tungstato (WO_4^{2-}) são oxiânions do Molibdênio (Mo) e Tungstênio (W).

A intensidade da cor depende da quantidade destes aminoácidos aromáticos presentes e, portanto, pode variar para diferentes proteínas. A maioria das técnicas de estimativa de proteínas utiliza a BSA universalmente como uma proteína padrão, devido ao seu baixo custo, alta pureza, disponibilidade e sensibilidade. O método é sensível a cerca de $10 \mu g/mL$ e o tempo de incubação é muito crítico para a reprodutibilidade do ensaio, devido a que na faixa de trabalho do pH de 9 a 10,5 (essencial para a persistência da cor) o reagente é reativo por um curto período de tempo (52).

A estimativa da concentração de proteína em cada um dos preparados enzimáticos foi realizada através da curva de calibração com o padrão BSA, representada pela **Equação 2.9**. Os valores de absorbância e as concentrações encontram-se tabelados no **Apêndice.**

Abs =
$$0,0025 [C] + 0,0402$$

[C] = Concentração (μ g/mL) Equação 2.9

Foi encontrado que o preparado enzimático comercial da LPF teve uma concentração de 74 µg/mL, correspondentes a 4 % de proteína e para o da PPL-II teve uma concentração de 485 µg/mL, correspondentes a 32 % de proteína. Estas estimativas aproximadas de concentração de proteína sugerem que a catálise poderia também estar ocorrendo no sítio ativo da enzima.

Devido que ao ter menos proteína no preparado de LPF, contudo, foi o qual resultou na melhor seletividade para a 2-hidroxi-2*H*-cromenona **4a**, e no melhor rendimento quando comparada com a PPL-II.

Por outro lado, as atividades enzimáticas descritas na embalagem para LPF ($\geq 20,000$ U mg⁻¹) e para PPL-II (30,1 U mg⁻¹) são significativamente diferentes mostrando que LPF possui maior capacidade para realizar a hidrólise do éster de triacetina. Isto mostra claramente diferenças no sítio ativo de uma enzima frente à outra, assim como diferenças estruturais, as quais contribuem em diferente grau para a catálise inespecífica ou específica encontrada mesmo quando a enzimas foram desnaturadas ou utilizadas *in natura*.

Cabe ressaltar também que se trata de substratos não naturais para as enzimas o que pode resultar em atividades diferentes como foram observadas em nossos estudos.

2.4.11 Experimentos de biotransformação do composto 4a utilizando fungos de ambiente marinho

Os compostos com núcleo cromenona encontram-se presentes na natureza como metabólitos secundários de microrganismos, animais e plantas. Portanto, esses compostos são susceptíveis às biotransformações que podem resultar em outros derivados de importância biológica e de interesse sintético do ponto de vista da biocatálise.

Os compostos cromenonas podem sofrer uma variedade de transformações químicas que levam à formação de produtos estruturalmente interessantes e com atividades biológicas destacadas. Algumas transformações químicas como as descritas no **Esquema 2.29** (3,51), poderiam ser obtidas através de biotransformações.

Esquema 2.29. Transformações químicas realizadas em compostos derivados de 2-hidroxi-2*H*-cromenonas.



Realizou-se uma triagem dos fungos de ambiente marinho (*Mucor racemosus* CBMAI 847, *Aspergillus sidowii* CBMAI 934, *Aspergillus sidowii* CBMAI 935, *Penicillium citrinum* CBMAI 185, *Penicillium citrinum* CBMAI 1186 e *Cladosporium sp.* CBMAI 1237), para a biotransformação da 2-hidroxi-2*H*-cromenona **4a** (Figura 2.34).

Em um dia de reação o composto 2-hidroxi-2*H*-cromenona **4a** foi biotransformado no composto **6**, o qual foi purificado por cromatografia de coluna, obtido como um sólido cristalino de cor branca e usado como padrão na construção de uma curva analítica para a estimativa da quantidade produzida por cada fungo avaliado.

A curva analítica foi obtida a partir dos cromatogramas em 254 nm e, é representada pela **Equação 2.10**. Os dados das áreas e a curva analítica encontram-se no Apêndice. Vale ressaltar que o compostos **6** obteve-se como uma mistura diastereoisomérica, porém não foram separados cromatograficamente.

Área =
$$341,99$$
 [C] + 10672 , $R^2 = 0,9934$ Equação 2.10

Na triagem todos os fungos avaliados produziram o composto **6** em boas a excelentes conversões (73-99%), porém destacou-se o fungo *Aspergillus sydowii* CBMAI 935 por ser aquele que apresentou maior conversão do composto **6** (**Tabela 2.21**).

Tabela 2.21. Conversões estimadas para as amostras provenientes dos extratos das reações de biotransformação da 2-hidroxi-2*H*-cromenona **4a** realizadas por fungos de ambiente marinho.

| | CH ₃ Fungo m tampão fu ta, pH 7, | arinho osfato, 0, 24 h 6 \mathbf{CH}_3 \mathbf{CH}_3 \mathbf{O} \mathbf{CH}_3 \mathbf{O} \mathbf{O} O | |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------|
| Fungo | No CBMAI | Conc. de 6 (g/L) | Conversões (%) |
| Mucor racemosus Aspergillus sydowii Aspergillus sydowii Penicillium citrinum Penicillium citrinum Cladosporium sp. | 847 934 935 1185 1186 1237 | 3,0 3,8 4,0 3,9 3,2 3,0 | 74 94 99 98 80 73 |

Conc.: concentrações determinadas por HPLC-UV: coluna Luna C18 da Phenomenex (250 mm x 4,6 mm, 5 µm), método em gradiente no modo reverso usando ácido fórmico ao 0,1% em água e metanol, fluxo 0,5 mL/min.



Figura 2.34. Cromatogramas obtidos por HPLC-UV das reações de biotransformação da 2-hidroxi-2*H*-cromenona **4a** realizadas por fungos de ambiente marinho.

2.4.11.1 Caracterização do produto de biotransformação 6 obtido a partir da 2-hidroxi-2*H*-cromenona 4a

O composto diastereoisomérico **6** foi caracterizado por RMN de ¹H e ¹³C (**Figura 2.35A-31A**). Foi discutido primeiramente o espectro de RMN de ¹³C (101 MHz, CDCl₃) por ser mais claro em termos de sinais espectrais e ao mesmo tempo foi realizada a comparação com o espectro de RMN de ¹³C da 2-hidroxi-2*H*-cromenona **4a** (**Figura 2.35B**) para facilitar a visualização das diferenças dos sinais entre os dois compostos. A numeração dos átomos corresponde com a nomenclatura da IUPAC.

No espectro de RMN de ¹³C para o produtos de biotransformação **6** foram observados sinais majoritários e minoritários. Alguns deles corresponderam às impurezas, as quais foram identificadas com as setas (**Figura 2.35A**).

O sinal em δ 207,9 correspondeu ao carbono carbonílico C5, o qual a diferença do sinal da carbonila da 2-hidroxi-2*H*-cromenona **4a** teve um deslocamento à esquerda.

Os sinais referentes aos carbonos de hibridização sp^2 na 2-hidroxi-2*H*-cromenona **4a**, C4a (δ 116,1 para o *anti*-**4a** e δ 116,7 para o *syn*-**4a**) e C8a (δ 169,8) estiveram ausentes no espectro do produto **6**. A ausência destes sinais fez referência à redução destes carbonos, o qual também foi evidenciado pela presença dos sinais em δ 62,2 e 60,7 referentes a carbonos sp^3 C4a e ao C8a, respectivamente.

Os sinais em δ 98,6 e 99,2 deslocadas um pouco a direita em relação ao sinal para o carbono do hemicetal C2 da 2-hidroxi-2*H*-cromenona **4a** (δ 93,2 para o *anti*-**4a** e δ 94,5 para o *syn*-**4a**) indicaram a presença do hemicetal para dois diastereoisômeros maioritários.

Figura 2.35. (A) Espectro de RMN de ¹³C (101 MHz, CDCl₃) do diastereoisômeros do composto 6.
(B) Espectro de RMN de ¹³C (126 MHz, CDCl₃) do diastereoisômero do composto 4a.



No espectro de RMN de ¹H do composto **6** (**Figura 2.36A**) observou-se um multipleto na faixa de 3,97-4,04 ppm o qual trata-se aparentemente de dois duplos dupletos, em δ 4,02 (J= 2,42; 11,30 Hz) e δ 3,98 (J = 2,20 e 11,06 Hz). Estes podem ser melhor visualizados na expansão do espectro de RMN de ¹H mostrado na **Figura 2.37**. Os dois dupletos internos sobrepõem-se formando um tripleto, correspondentes aos prótons ligados a C2 (hemicetálico) dos diastereoisômeros majoritários formados.

Figura 2.36. (A) Espectro de RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃) do composto 6. (B) Espectro de RMN de ¹H (500 MHz, CDCl₃) do composto 4a.



Os sinais na faixa de 3,60-3,64 ppm com multiplicidades de dois duplos dupletos (ddd, J = 1,50; 5,01; 11,33 Hz) (Figura 2.37), corresponderam ao próton ligado ao C8a nos diastereoisômeros majoritários.





Figura 2.37. Expansão das regiões espectrais 3,94-4,10 ppm, 3,56-3,68 ppm, 1,80-2,40 ppm e 1,20-1,70 ppm do espectro de RMN de ¹H (500 MHz, CDCl₃) do composto **6**.

A expansão do espectro de 0,9 a 1,1 ppm (**Figura 2.37**) mostrou os sinais de dupletos correspondentes aos prótons do grupo metila em δ 1,1 (J = 6,89 Hz) e δ 0,95 (J = 6,59 Hz) para os diastereoisômeros minoritários e em δ 0,96 (J = 5,99 Hz) o sinal de maior intensidade para o diastereoisômero majoritário racêmico, o qual provavelmente correspondeu ao diastereoisômero *anti*-**6a**, (2*S*,4*R*,4a*S*,8a*R*)-2-hidroxi-4-metiloctaidro-5*H*-cromen-5-ona (**Figura 2.38**). Assim, o dupleto em δ 1,1 (J = 6,89 Hz) correspondeu ao produto **6b**, por ser o segundo mais estável de acordo com cálculos realizados no programa ChemBio Draw Ultra V.14.

Figura 2.38. Estruturas químicas dos estereoisômeros mais estáveis do produto de biotransformação 6.


Os multipletos na faixa de 2,4-2,3 ppm e 2,3-2,1 ppm corresponderam aos prótons ligados aos carbonos C6 e C4a, vicinais à carbonila. O multipleto na faixa de 1,8-2,05 ppm foi atribuído aos prótons ligados aos carbonos metilênicos C8 e C4. O multipleto na faixa de 1,7-1,6 ppm correspondeu aos prótons metilênicos ligados ao carbono C7 e o multipleto na faixa de 1,40-1,20 ppm aos prótons metilênicos ligados ao carbono C3.

As reações de biotransformação com células vivas é a mais fundamental das metodologias derivadas da biologia e dependem das enzimas. Para um químico é uma tarefa importante, conhecer as enzimas responsáveis pelas transformações dos compostos realizadas por microrganismos. Assim, analisando a transformação química realizada pelos fungos de ambiente marinho (**Tabela 2.21**) frente à 2-hidroxi-2*H*-cromenona **4a** transformando-a no produto **6**, a qual correspondeu a redução de uma ligação dupla, possivelmente à ação por parte das enzimas *ene*-redutases.

Ene-redutases (ERs) são enzimas altamente regiosselectivas para catalisar a redução assimétrica de ligações duplas conjugadas com grupos retiradores de elétrons. ERs não atuam sobre ligação duplas eletronicamente não ativadas (66). Isto torna a 2*H*-cromenona **4a** um bom substrato para estas enzimas.

O produto de biotransformação **6** mostrou ser uma mistura de diastereoisômeros como evidenciado pelos espectros de RMN. No processo de purificação deste produto foi observado que ele sofreu algumas transformações químicas sob as condições ambientais normais, luz e temperatura. Na tentativa de purificação o composto que inicialmente foi isolado como um sólido branco cristalino já não era mais encontrado, e os sinais de RMN já não eram aqueles mostrados nos espectros das **Figura 2.35A** e **B.** O produto **6a** transformou-se na oxadecalinona **7** (**Figura 2.39**).

Figura 2.39. Transformação química espontânea do composto 6 ao composto 7.



A análise cromatográfica deste produto em coluna quiral gerou o cromatograma da **Figura 2.40**. Foram observados picos com áreas similares em t_R 8 min = 14578725 e 9 min = 15153746. Com isto ficou evidente a ausência de enantiosseletividade na reação entre a β - dicetona cíclica **1a** e o crotonaldeído **2a** catalisada pela LPF, pois o carbono ligado ao grupo metila não sofreu biotransformação pelos fungos de ambiente marinho ou no processo de espontâneo de conversão do composto **6** ao **7**.



Figura 2.40. Cromatograma do produto de biotransformação 6 obtido por HPLC-UV quiral.

Condições de análises cromatográficas (HPLC-UV): coluna quiral Phenomenex LUX[®] (250 mm x 4,6 mm, 5 μ m), método isocrático no modo normal usando ácido hexano e isopropanol (95:5), fluxo 1,0 mL/min, 254 nm, volume de injeção da amostra: 5 μ L. Áreas t_R 8 min = 14578725 e 9 min = 15153746.

Ao realizar comparações com o espectro de RMN de ¹³C do produto **6** foi observado que os sinais relatados como impurezas, identificados com setas no espectro de RMN de ¹³C, corresponderam aos sinais do produto **7** (**Figura 2.41A**).

2.4.11.2 Caracterização do produto 7 obtido espontaneamente a partir do produto de biotransformação 6

O espectro do RMN de ¹³C (101 MHz, CDCl₃) para o composto **7** (**Figura 2.41A**) apresentou dez sinais, o qual indicou que este composto conservou o número de carbonos. O sinal da carbonila foi observado, com um deslocamento químico em 198,2 ppm.

O sinal correspondente ao carbono do hemiacetal dos compostos **4a** e **6**, não esteve mais presente no produto **7**. Porém, foram observados sinais em δ 171,23 e 116,63, correspondentes a carbonos com hibridização *sp*², os quais foram atribuídos aos carbonos C8a e C4a, respectivamente.

O sinal em δ 63,6 foi atribuído ao carbono metilênico C2. Os outros três carbonos metilênicos apresentaram sinais em δ 37,3 ppm, o qual foi referente ao carbono C6, em δ 28,7, o qual correspondeu ao carbono C3 e, em δ 28,9 atribuído ao carbono C8. Enquanto o sinal em δ 21.0 foi referente ao carbono C7. O sinal em δ 21,84 relacionado ao carbono metínico C4, e o sinal em δ 20,59 foi alusivo à metila C9.

Figura 2.41. (**A**) Espectro de RMN de ¹³C (101 MHz, CDCl₃) do composto **7**. (**B**) Expansão da região espectral 19-39 ppm.







O espectro de RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃) do produto **7** (**Figura 2.42A**) apresentou sinais para os prótons metilênicos H2 com multipletos centrados em δ 4,20 e 4,17, assim como quatro duplos dupletos em δ 4,07; 4,04; 4,05 e 4,01. Esta variedade de sinais pode ser explicada porque cada próton na posição axial de uma conformação tipo cadeira apresenta um sinal diferenciado em relação ao próton equatorial (67).

O multipleto na faixa 2,8-2,7 ppm (**Figura 2.42B**) correspondeu aos prótons na posição equatorial do metileno mais desprotegido H7. No multipleto na faixa de 2,3-2,4 ppm foram sugeridos sinais sobrepostos (*overlap*) atribuídos aos prótons metínico C4 e os metilênicos ligados ao carbono C8 e um dos prótons ligado ao carbono C3.

O multipleto na faixa de 1,83-1,95 ppm foi atribuído a sinais sobrepostos referentes aos prótons ligados aos carbonos C6, o segundo próton ligado ao carbono C3 e um dos prótons ligado ao carbono C7. Enquanto o sinal referente ao próton metilênico ligado ao C7 apresentou um sinal de duplo duplo dupleto em δ 1,58 (ddd, J = 2,56; 5,09 e 13,95, 1H). O sinal em δ 1,1 (d, J = 6,88 Hz, 3H) foi atribuído aos prótons do grupo metila.

Figura 2.42. Espectro de RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃) do composto **7**. (b) Expansão das regiões espectrais 3,95-4,25 ppm, 2,25-2,85 ppm e 1,52-1,97 ppm.



Uma possível explicação para a transformação do composto 6 ao composto 7 pode ser devido à reação intermolecular do composto 6 (Esquema 2.30). Esta reação envolveria a protonação de 6 por abstração do próton acídico de outra molécula de 6, levando aos intermediários 6-A e II. O intermediário 6-A apresentaria a eliminação de uma molécula de água pela substituição com um hidreto, gerado na reação na formação do intermediário II, o que conduziria ao intermediário I (Esquema 2.30-A).

Os intermediários I e II reagiriam em uma segunda reação (Esquema 2.30-B). A abstração do próton acídico do intermediário I por parte do intermediário II levaria ao intermediário II-A e ao composto 7. O intermediário II-A por eliminação de uma molécula de água pela substituição com um hidreto, gerado na reação de formação de 7, levaria também ao composto 7. Uma terceira reação também poderia estar acontecendo a qual também produziria o composto 7 pela abstração do próton levada pelo intermediário II ao composto 6. Esta reação produziria os intermediários II e II-A. Este último geraria o composto 7 como na reação anterior. Cabe destacar que este mecanismo é só uma propuesta, e a presença dos intermediários 6-A, I, II e II-A não foi comprovada experimentalmente.

Esquema 2.30. Mecanismo de reação proposto para a transformação química espontânea do composto 6 ao composto 7.



2.5 CONCLUSÃO

Esta investigação contribuiu em maiores detalhes frente ao conhecimento da atividade promíscua de lipases na reação de adição-1,2 e adição-1,4 na formação de 2*H*-cromenonas.

Uma série de 2*H*-cromenonas e 2-hidroxi-2*H* cromenonas foram sintetizados utilizando β -dicetonas cíclicas **1a-d** e diferentes aldeídos α , β -insaturados **2a-e** via a reação catalisada por PPL-II e LPF.

2*H*-Cromenonas **3a-e** foram obtidas em bons rendimentos (34-78%) na presença de PPL-II. Enquanto as 2-hidroxi-2*H* cromenonas **4a-g** foram os produtos maioritários na presença de LPF (37-93%).

Deste estudo pode-se destacar a regiosseletividade promovida pelas lipases PPL-II e LPF para a formação dos compostos 2-hidroxi-2*H*-cromenonas **4a-g** via adição conjugada-1,4, e posterior ciclização de anel para formar um produto hemicetal cíclico.

A diastereosseletividade *anti* observada para as 2-hidroxi-2*H*-cromenonas **4a-g** poderia ser influenciada pelas lipases. O modo como estas enzimas afetaram as transformações obtidas é ainda desconhecido, e sugere-se que pode estar sendo realizado via promiscuidade catalítica inespecífica. A ausência de enantiosseletividade para as 2-hidroxi-2*H*-cromenonas **4a-g** pode ser o resultado de um sítio ativo volumoso que não contribuiu para a indução quiral ou sem a sua participação.

A reação de biotransformação promovida pelos fungos de ambiente marinho na produção do composto **6** a partir da 2-hidroxi-2*H*-cromenona **4a** mostrou uma potencial aplicação frente a núcleos piranos. O produto de biotransformação **6** que foi o resultado da redução da dupla ligação conjugada à carbonila foi atribuído à ação de enzimas *ene*-redutases.

Finalmente, a implementação de novos processos biocatalíticos acadêmicos e industriais é importante para pesquisa no campo da biotecnologia, uma vez que a maioria das enzimas requerem modificações antes da aplicação industrial para se adequarem às condições do processo em termos de disponibilidade, estabilidade e especificidade do substrato.

A mente que se abre a uma nova idéia, jamais voltara a seu tamanho original Albert Einstein

REFERÊNCIAS

1 MOREAU, J.; HUBERT, C.; BATANY, J.; TOUPET, L.; ROISNEL, T.; HURVOIS, J. P.; RENAUDZ, J. L. Metal-free Brønsted acid catalyzed formal [3+3] annulation. Straightforward synthesis of dihydro-2H-chromenones, pyranones, and tetrahydroquinolinones. **Journal of Organic Chemistry**, v. 74, n. 23, p. 8963–8973, 2009.

2 RUEPING, M.; SUGIONO, E.; MERINO, E. Asymmetric iminium ion catalysis: an efficient enantioselective synthesis of pyranonaphthoquinones and β -lapachones. **Angewandte Chemie - International Edition**, v. 47, n. 16, p. 3046–3049, 2008.

3 RUEPING, M.; SUGIONO, E.; MERINO, E. Asymmetric organocatalysis: an efficient enantioselective access to benzopyranes and chromenes. **Chemistry - A European Journal**, v. 14, n. 21, p. 6329–6332, 2008.

4 OTOGURO, K.; SHIOMI, K.; YAMAGUCHI, Y.; ARAI, N.; SUNAZUKA, T.; MASUMA, R.; IWAI, Y.; OMURA, S. Arisugacins C and D, novel acetylcholinesterase inhibitors and their related novel metabolites produced by Penicillium sp. FO-4259-11. **The Journal of Antibiotics**, v. 53, n. 1, p. 50–57, 2000.

5 OMURA, S.; FUMIYOSHI, K.; OTOGURO, K.; SUNAZUKA, T.; SHIOMI, K.; MASUMA, R.; IWAI, Y. Arisugacin, a novel and selective inhibitor of acetylcholinesterase from *Penicillium* sp. FO-4259. Journal of Antibiotics, v. 48, n. 7, p. 745–746, 1995.

6 KUNO, F.; OTOGURO, K.; SHIOMI, K. Arisugacins A and B , novel and selective acetylcholinesterase inhibitors. Journal of Antibiotics, v. 49, p. 742–747, 1996.

7 OTOGURO, K.; KUNO, F.; OMURA, S. Arisugacins, selective acetylcholinesterase inhibitors of microbial origin. **Pharmacology and Therapeutics**, v. 76, n. 1–3, p. 45–54, 1997.

8 FERREIRA, S. B.; DA SILVA, F. DE C.; PINTO, A. C.; GONZAGA, D. T. G.; FERREIRA, V. F. Syntheses of chromenes and chromanes via o-quinone methide intermediates. **Journal of heterocyclic chemistry**, v. 46, p. 1080–1097, 2009.

9 SHEN, H. C. et al. A formal [3+3] cycloaddition reaction. Improved reactivity using α , β -unsaturated iminium salts and evidence for reversibility of 6π -electron electrocyclic ring closure of 1-oxatrienes. **Journal of Organic Chemistry**, v. 68, n. 5, p. 1729–1735, 2003.

10 JUNG, E. J.; PARK, B. H.; LEE, Y. R. Environmentally benign, one-pot synthesis of pyrans by domino Knoevenagel/ 6π -electrocyclization in water and application to natural products. **Green Chemistry**, v. 12, n. 11, p. 2003–2011, 2010.

11 HSUNG, R. P.; KURDYUMOV, A. V.; SYDORENKO, N. A formal [3+3] cycloaddition approach to natural-product synthesis. **European Journal of Organic Chemistry**, n. 1, p. 23–44, 2005.

12 MAJUMDAR, N.; PAUL, N. D.; MANDAL, S.; DE BRUIN, B.; WULFF, W. D. Catalytic synthesis of 2*H*-chromenes. **ACS Catalysis**, v. 5, n. 4, p. 2329–2366, 2015.

13 LEE, Y, R.; KIM, D, H.; SHIM, J.-J.; KIM, S, K.; PARK, J, H.; CHA, J, S.; LEE, C.-S. One-pot synthesis of 2*H*-pyrans by indium(III) chloride-catalyzed reactions. Efficient synthesis of pyranocoumarins, pyranophenalenones, and pyranoquinolines. **Bulletin of the Korean Chemical Society**, v. 23, n. 7, p. 998–1002, 2002.

14 LEE, Y. R.; KIM, D. H. A new route to the synthesis of pyranoflavone and pyranochalcone natural products and their derivatives. **Synthesis**, v. 4, p. 603–608, 2006.

15 TAMBAR, U. K.; KANO, T.; ZEPERNICK, J. F.; STOLTZ, B. M. The development and scope of a versatile tandem Stille-oxa-electrocyclization reaction. **Tetrahedron Letters**, v. 48, n. 3, p. 345–350, 2007.

16 YOSHIOKA, E.; KOHTANI, S.; MIYABE, H. A multicomponent coupling reaction induced by insertion of arynes into the C=O bond of formamide. **Angewandte Chemie - International Edition**, v. 50, n. 29, p. 6638–6642, 2011.

17 SOSNOVSKIKH, V. Y.; KOROTAEV, V. Y.; CHIZHOV, D. L.; KUTYASHEV, I. B.; YACHEVSKII, D. S.; KAZHEVA, O. N.; DYACHENKO, O. A.; CHARUSHIN, V. N. Reaction of polyhaloalkyl-substituted chromones, pyrones, and furanones with salicylaldehydes as a direct route to fused *2H*-chromenes. Journal of Organic Chemistry, v. 71, n. 12, p. 4538–4543, 2006.

18 KHODABAKHSHI, S.; KARAMI, B.; ESKANDARI, K.; FARAHI, M. Synthesis of new 4-aroylpyrano[*c*]chromenes via a one-pot, three-component reaction based on aryl glyoxals. **Tetrahedron Letters**, v. 55, n. 28, p. 3753–3755, 2014.

19 GOVENDER, T.; HOJABRI, L.; MOGHADDAM, F. M.; ARVIDSSON, P. I. Organocatalytic synthesis of chiral benzopyrans. **Tetrahedron Asymmetry**, v. 17, n. 12, p. 1763–1767, 2006.

20 SAMET, L. V.; LUTOV, D. N.; FIRGANG, S. I.; LYSSENKO, K. A.; SEMENOV, V. V. A concise approach to chiral chromenes based on levoglucosenone. **Tetrahedron Letters**, v. 52, n. 23, p. 3026–3028, 2011.

21 FLEMING, I. Molecular orbital and organic chemical reactions. . Padstow: John Wiley & Sons Ltd, 2009u.

22 HSUNG, R. P.; SHEN, H. C.; DOUGLAS, C. J.; MORGAN, C. D.; DEGEN, S. J.; YAO, L. J. Sequential 1,2-addition-electrocyclic ring closures involving acyclic α , β -unsaturated iminiums: a formal [3+3] cycloaddition strategy to unique pyranyl spirocycles. **Journal of Organic Chemistry**, v. 64, n. 3, p. 690–691, 1999.

23 HUA, D. H. et al. A one-pot condensation of pyrones and enals. Synthesis of 1H,7H-5a,6,8,9-tetrahydro-1-oxopyrano[4,3- b][1]benzopyrans. **The Journal of Organic Chemistry**, v. 62, n. 20, p. 6888–6896, 1997.

24 GROOT, A. DE; JANSEN, B. J. M. A simple synthesis of 2*H*-pyrans; a one-step synthesis of flindersine. **Tetrahedron Letters**, v. 39, p. 3407–3410, 1975.

25 NAGAMITSU, T.; SUNAZUKA, T.; OBATA, R.; TOMODA, H.; TANAKA, H.; HARIGAYA, Y.; ŌMURA, S.; SMITH, A. B. Total synthesis of (+)-pyripyropene A. A potent, orally bioavailable inhibitor of acyl-CoA:cholesterol acyltransferase. **Journal of Organic Chemistry**, v. 60, n. 25, p. 8126–8127, 1995.

26 CLAYDEN, J.; GREEVERS, N.; WARREN, S.; WOTHERS, P. **Organic Chemistry**. 2da. ed. [s.l.] Oxford University Press, 2012.

27 XIE, J.; YUE, L.; CHEN, W.; DU, W.; ZHU, J.; DENG, J.; CHEN, Y. Highly enantioselective Michael addition of cyclic 1,3-dicarbonyl compounds to α , β -unsaturated ketones. **Organic letters**, v. 9, n. 3, p. 413–415, 2007.

28 HALLAND, N.; HANSEN, T.; JØRGENSEN, K. A. Organocatalytic asymmetric Michael reaction of cyclic 1,3-dicarbonyl compounds and α , β -unsaturated ketones-a highly atom-economic catalytic onestep formation of optically active Warfarin anticoagulant. **Angewandte Chemie - International Edition**, v. 42, n. 40, p. 4955–4957, 2003.

29 HALLAND, N.; VELGAARD, T.; JØRGENSEN, K. A. Direct asymmetric Michael reactions of cyclic 1,3-dicarbonyl compounds and enamines catalyzed by chiral bisoxazoline-copper (II) complexes. **Journal of Organic Chemistry**, v. 68, p. 5067–5074, 2003.

30 CHEN, X.; ZHENG, C.; ZHAO, S.; CHAI, Z.; YANG, Y.; ZHAO, G.; CAO, W. Highly enantioselective Michael addition of cyclic 1,3-dicarbonyl compounds to β , γ -unsaturated α -keto esters. Advanced Synthesis and Catalysis, v. 352, p. 1648–1652, 2010.

31 WANG, Q.; WANG, W.; YE, L.; YANG, X.; LI, X.; ZHAO, Z.; LI, X. Enantioselective Michael addition of cyclic β -diones to α , β -unsaturated enones catalyzed by quinine-based organocatalysts. **Molecules**, v. 22, n. 1096, p. 3–17, 2017.

32 RUEPING, M.; MERINO, E.; SUGIONO, E. Enantioselective organocatalytic reactions of 4hydroxy- coumarin and 4-hydroxypyrone with α , β -unsaturated aldehydes. An eficient Michael additionacetalization cascade to chromenones, quinolinones and pyranones. **Advanced Synthesis & Catalysis**, v. 350, p. 2127–2131, 2008.

33 RUEPING, M.; MERINO, E.; SUGIONO, E. Catalytic asymmetric synthesis of chromene derivatives by iminium ion catalysis. **ChemCatChem**, v. 4, p. 987–992, 2012.

34 KURDYUMOV, A. V; LIN, N.; HSUNG, R. P.; GULLICKSON, G. C.; COLE, K. P.; SYDORENKO, N.; SWIDORSKI, J. J. A Lewis acid-catalyzed formal [3+3] Cycloaddition of α , β unsaturated aldehydes with 4-hydroxy-2-pyrone, diketones and vinylogous esters. **Organic letters**, v. 8, n. 2, p. 191–193, 2006.

35 NARAYANA, V. R.; PUDUKULATHAN, Z.; VARALA, R. SO4 ²⁻/SnO²⁻ catalyzed efficient onepot synthesis of 7,8-dihydro-2*H*-chromen-5-ones by formal [3+3] cycloaddition and 1,8-dioxooctahydroxanthenes via a Knoevenagel condensation. **Organic communications**, v. 6, n. 3, p. 110–119, 2013.

36 LEE, Y. R.; CHOI, J. H.; TRINH, D. T. L.; KIM, N. W. A concise route for the synthesis of pyranonaphthoquinone derivatives. **Synthesis**, v. 18, p. 3026–3034, 2005.

37 SVEDENDAHL, M. Lipase and ω-Transaminase. . [s.l.] Royal Institute of Technology, 2010.

38 YANG, Q.; ZHOU, L.; WU, W.; ZHANG, W.; WANG, N.; YU, X. Lipase-catalyzed regioselective domino reaction for the synthesis of chromenone derivatives. **RSC Advances**, v. 5, p. 78927–78932, 2015.

39 ZHOU, L.; WANG, N.; ZHANG, W.; XIE, Z.; YU, X. Catalytical promiscuity of a-amylase: Synthesis of 3-substituted 2*H*-chromene derivatives via biocatalytic domino oxa-Michael/aldol condensations. Journal of molecular catalysis B : enzymatic, v. 91, p. 37–43, 2013.

40 XIE, B.; GUAN, Z.; HE, Y. Promiscuous enzyme-catalyzed Michael addition: synthesis of warfarin and derivatives. **Journal of Chemical technology**, v. 87, n. May, p. 1709–1714, 2012.

41 CALADO, V.; MONTGOMERY, D. C. **Planejamento de experimentos usando o Statistica**. . Rio de Janeiro: E-paper serviçõs editoriais, 2003.

42 TEÓFILO, R. F.; FERREIRA, M. M. C. Quimiometria II: planilhas eletrônicas para cálculus de planejamentos experimentais, um tutorial. **Quimica Nova**, v. 29, n. 2, p. 338–350, 2006.

43 CHRISTENSEN, R. Analysis of variance, design, and regression. . New York: CRC press, 2000.

44 MILONE, G. Estatítica geral e aplicada. . [s.l.] Cengage, 2009.

45 OGEE, A.; MARK, E.; SCIBILIA, B.; SCIBILIA, B.; PAMMER, C.; STEELE, C. How to interpret regression analysis results: p-values and coefficients. Disponível em: https://blog.minitab.com/blog/adventures-in-statistics-2/how-to-interpret-regression-analysis-results-p-values-and-coefficients. Acesso em: 4 jul. 2019.

46 OGEE, A.; MARK, E.; SCIBILIA, B.; SCIBILIA, B.; PAMMER, C.; STEELE, C. **Regression analysis: how do i interpret r-squared and assess the goodness-of-fit?**. Disponível em: <https://blog.minitab.com/blog/adventures-in-statistics-2/regression-analysis-how-do-i-interpret-rsquared-and-assess-the-goodness-of-fit>. Acesso em: 4 jul. 2019.

47 OGEE, A.; MARK, E.; SCIBILIA, B.; SCIBILIA, B.; PAMMER, C.; STEELE, C. **How high should R-squared be in regression analysis?**. Disponível em: https://blog.minitab.com/blog/adventures-in-statistics-2/how-high-should-r-squared-be-in-regression-analysis. Acesso em: 4 jul. 2019.

48 OGEE, A.; MARK, E.; SCIBILIA, B.; SCIBILIA, B.; PAMMER, C.; STEELE, C. Why you need to check your residual plots for regression analysis: or, to err is human, to err randomly is statistically divine. Disponível em: https://blog.minitab.com/blog/adventures-in-statistics-2/why-you-need-to-check-your-residual-plots-for-regression-analysis. Acesso em: 4 jul. 2019.

49 RODRIGUES, P. E. Planejamento fatorial em química: maximizando a obtenção de resultados.. São Carlos: EdUFSCar, 2015.

50 EDAYADULLA, N.; LEE, Y. R. Microwave-assisted solvent and catalyst free synthesis of 2*H*-pyrans. **Bulletin of the Korean Chemical Society**, v. 34, n. 10, p. 2963–2967, 2013.

51 ROUDIER, M.; CONSTANTIEUX, T.; QUINTARD, A.; RODRIGUEZ, J. Enantioselective synthesis of medium-sized-ring lactones by organocatalytic Michael addition followed by reductively initiated fragmentation. **European Journal of Organic Chemistry**, v. 2015, n. 26, p. 5709–5711, 2015.

52 LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J. Protein measurement with the folin phenol reagent. Journal of Biological Chemistry, v. 193, p. 265–275, 1951.

53 DOLOMANOV, O. V.; BOURHIS, L. J.; GILDEA, R. J.; HOWARD, J. A. K.; PUSCHMANN, H. OLEX2: A complete structure solution, refinement and analysis program. Journal of Applied Crystallography, v. 42, n. 2, p. 339–341, 2009.

54 SHELDRICK, G. M. SHELXT. Integrated space-group and crystal-structure determination. Acta Crystallographica Section A: Foundations of Crystallography, v. 71, n. 1, p. 3–8, 2015.

55 SHELDRICK, G. M. Crystal structure refinement with SHELXL. Acta Crystallographica Section C: Structural Chemistry, v. 71, n. Md, p. 3–8, 2015.

56 DE MARCH, P.; MORENO-MAÑAS, M.; ROCA, J. L. The reactions of 4-hydroxy-2-pyrones with 2-hydroxybenzaldehydes. A note of warning. **Journal of heterocyclic chemistry**, v. 21, p. 1371, 1984.

57 DE MARCH, P.; MORENO-MAÑAS, M.; CASADO, J.; PLEIXATS, R.; ROCA, J. L.; TRIUS, A. The Reactivity of 4-hydroxy-6-methyl-2-pyrone towards aliphatic stured and α , β -unsatured aldehydes. **Journal of heterocyclic chemistry**, v. 21, p. 85–89, 1984.

58 PEREIRA FILHO, E. **Planejamento fatorial completo. Capítulo 1, vídeo 4/7.** Disponível em: https://www.youtube.com/watch?v=6G4yC3Dpg00>. Acesso em: 31 maio. 2019.

59 DOMINGUES, M. R. M.; DOMINGUES, P.; OLIVEIRA, M. M.; CARVALHO, L. H. M.; OLIVEIRA-CAMPOS, F.; FERRER CORREIA, A. J. Electrospray tandem mass spectrometry of 2*H*-chromenes. Rapid Communications in Mass Spectrometry. [s.l: s.n.].

60 BECKER, R. S.; MICHI, J. Photochromism of synthetic and naturally ocurring 2H-chromenes and 2*H*-pyrans. Journal of American Chemical Society, v. 88, n. 24, p. 5931–5933, 1966.

61 HAQUE, N.; PRABHU, N. P. Lid closure dynamics of porcine pancreatic lipase in aqueous solution. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1860, n. 10, p. 2313–2325, 2016.

62 BENITO-GALLO, P.; FRANCESCHETTO, A.; WONG, J. C. M.; MARLOW, M.; ZANN, V.; SCHOLES, P.; GERSHKOVICH, P. Chain length affects pancreatic lipase activity and the extent and pH–time profile of triglyceride lipolysis. **European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics**, v. 93, p. 353–362, 2015.

63 SANGSTER, J. Octanol-water partition coefficient. Journal of Physical and Chemical Reference Data, v. 18, n. 3, p. 1111–1227, 1989.

64 GUASCH, L.; PEACH, M. L.; NICKLAUS, M. C. Tautomerism of warfarin: combined chemoinformatics, quantum chemical, and NMR investigation. **Journal of Organic Chemistry**, v. 80, n. 20, p. 9900–9909, 2015.

65 KAPOOR, M.; GUPTA, M. N. Lipase promiscuity and its biochemical applications. **Process Biochemistry**, v. 47, n. 4, p. 555–569, 2012.

66 FABER, K. **Biotransformations in Organic Chemistry**. Berlin: Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2011.

67 FRANKLIN, N. C.; FELTKAMP, H. Conformational analysis of cyclohexanes derivates by nuclear magnetic resonance spectroscopy. **Engewandte Chemie International Edition**, v. 4, n. 9, p. 774–783, 1965.

Apêndice

Dados referentes ao planejamento fatorial completo aplicado à reação entre a 1,3-cicloexanodienona 1a e o crotonaldeído 2a na presença de lipase PPL-II

Tabela 2.22. Respostas dos experimentos do planejamento fatorial completo realizado para a triagem das variáveis mais importantes no rendimentos dos compostos **3a**, **4a** e **5a** frente à reação entre a β -dicetona cíclica **1a** e o aldeído **2a** catalisada pela PPL-II.

| Enn | | Áreas | | Conc | entrações (mg | g/L) | Rei | ndimentos (| %) |
|-----|----------|----------|----------|---------|---------------|---------|---------|-------------|---------|
| Exp | Crom 3a | Crom 4a | Crom 5a | Crom 3a | Crom 4a | Crom 5a | Crom 3a | Crom 4a | Crom 5a |
| 1 | 8026801 | 2596412 | 12135491 | 265,90 | 43,85 | 137,12 | 27,0 | 4,0 | 16,6 |
| 2 | 5228045 | 7562924 | 19889300 | 173,19 | 127,74 | 224,73 | 17,6 | 11,7 | 27,1 |
| 3 | 7209628 | 1099318 | 9117260 | 238,83 | 18,57 | 103,02 | 24,3 | 1,7 | 12,4 |
| 4 | 11072422 | 2435193 | 33777627 | 366,79 | 41,13 | 381,65 | 37,3 | 3,8 | 46,1 |
| 5 | 18919366 | 4092221 | 23421956 | 626,74 | 69,12 | 264,64 | 63,7 | 6,3 | 31,9 |
| 6 | 9895461 | 11986450 | 31181850 | 327,81 | 202,46 | 352,32 | 33,3 | 18,5 | 42,5 |
| 7 | 19730035 | 1935187 | 22769924 | 653,59 | 32,69 | 257,28 | 66,4 | 3,0 | 31,1 |
| 8 | 9765564 | 3357418 | 35272674 | 323,50 | 56,71 | 398,54 | 32,9 | 5,2 | 48,1 |
| 9 | 4300679 | 7881788 | 27840345 | 142,47 | 133,13 | 314,57 | 14,5 | 12,2 | 38,0 |
| 10 | 6145976 | 11808269 | 26556805 | 203,60 | 199,45 | 300,06 | 20,7 | 18,3 | 36,2 |
| 11 | 3703134 | 2230764 | 21777640 | 122,67 | 37,68 | 246,06 | 12,5 | 3,4 | 29,7 |
| 12 | 430841 | 6114256 | 68113230 | 14,27 | 103,27 | 769,61 | 1,4 | 9,5 | 92,9 |
| 13 | 10670774 | 7032864 | 25938360 | 353,49 | 118,79 | 293,08 | 35,9 | 10,9 | 35,4 |
| 14 | 4991343 | 13415520 | 30474938 | 165,35 | 226,59 | 344,33 | 16,8 | 20,7 | 41,6 |
| 15 | 1357623 | 4100158 | 38780034 | 44,97 | 69,25 | 438,17 | 4,6 | 6,3 | 52,9 |
| 16 | 426677 | 6317906 | 51470436 | 14,13 | 106,71 | 581,56 | 1,4 | 9,8 | 70,2 |

Exp = número de experimento.

Tabela 2.23. Matriz de coeficientes de contraste para o planejamento fatorial 2^4 desenvolvido para encontrar os efeito das variáveis e suas interações na reação entre a 1,3-cicloexanona **1a** e o crotonaldeído **2a** catalisada pela PPL-II para a produção da 2*H*-cromenona **3a**.

| Rend (%) | I | Efeitos p | rincipais | | | E | feitos sec | cundários | 3 | |] | Efeitos te | erciários | | E. Q |
|----------|-------|-----------|-----------|-------|-------|-------|------------|-----------|-------|------|-------|------------|-----------|-------|-------|
| Crom 3a | 1 | 2 | 3 | 4 | 12 | 13 | 14 | 23 | 24 | 34 | 123 | 124 | 134 | 234 | 1234 |
| 27,0 | -27,0 | -27,0 | -27,0 | -27,0 | 27,0 | 27,0 | 27,0 | 27,0 | 27,0 | 27,0 | -27,0 | -27,0 | -27,0 | -27,0 | 27,0 |
| 17,6 | 17,6 | -17,6 | -17,6 | -17,6 | -17,6 | -17,6 | -17,6 | 17,6 | 17,6 | 17,6 | 17,6 | 17,6 | 17,6 | -17,6 | -17,6 |
| 24,3 | -24,3 | 24,3 | -24,3 | -24,3 | -24,3 | 24,3 | 24,3 | -24,3 | -24,3 | 24,3 | 24,3 | 24,3 | -24,3 | 24,3 | -24,3 |
| 37,3 | 37,3 | 37,3 | -37,3 | -37,3 | 37,3 | -37,3 | -37,3 | -37,3 | -37,3 | 37,3 | -37,3 | -37,3 | 37,3 | 37,3 | 37,3 |
| | | | | | | | | | | | | | | | |

| 63,7 | -63,7 | -63,7 | 63,7 | -63,7 | 63,7 | -63,7 | 63,7 | -63,7 | 63,7 | -63,7 | 63,7 | -63,7 | 63,7 | 63,7 | -63,7 |
|----------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| 33,3 | 33,3 | -33,3 | 33,3 | -33,3 | -33,3 | 33,3 | -33,3 | -33,3 | 33,3 | -33,3 | -33,3 | 33,3 | -33,3 | 33,3 | 33,3 |
| 66,4 | -66,4 | 66,4 | 66,4 | -66,4 | -66,4 | -66,4 | 66,4 | 66,4 | -66,4 | -66,4 | -66,4 | 66,4 | 66,4 | -66,4 | 66,4 |
| 32,9 | 32,9 | 32,9 | 32,9 | -32,9 | 32,9 | 32,9 | -32,9 | 32,9 | -32,9 | -32,9 | 32,9 | -32,9 | -32,9 | -32,9 | -32,9 |
| 14,5 | -14,5 | -14,5 | -14,5 | 14,5 | 14,5 | 14,5 | -14,5 | 14,5 | -14,5 | -14,5 | -14,5 | 14,5 | 14,5 | 14,5 | -14,5 |
| 20,7 | 20,7 | -20,7 | -20,7 | 20,7 | -20,7 | -20,7 | 20,7 | 20,7 | -20,7 | -20,7 | 20,7 | -20,7 | -20,7 | 20,7 | 20,7 |
| 12,5 | -12,5 | 12,5 | -12,5 | 12,5 | -12,5 | 12,5 | -12,5 | -12,5 | 12,5 | -12,5 | 12,5 | -12,5 | 12,5 | -12,5 | 12,5 |
| 1,4 | 1,4 | 1,4 | -1,4 | 1,4 | 1,4 | -1,4 | 1,4 | -1,4 | 1,4 | -1,4 | -1,4 | 1,4 | -1,4 | -1,4 | -1,4 |
| 35,9 | -35,9 | -35,9 | 35,9 | 35,9 | 35,9 | -35,9 | -35,9 | -35,9 | -35,9 | 35,9 | 35,9 | 35,9 | -35,9 | -35,9 | 35,9 |
| 16,8 | 16,8 | -16,8 | 16,8 | 16,8 | -16,8 | 16,8 | 16,8 | -16,8 | -16,8 | 16,8 | -16,8 | -16,8 | 16,8 | -16,8 | -16,8 |
| 4,6 | -4,6 | 4,6 | 4,6 | 4,6 | -4,6 | -4,6 | -4,6 | 4,6 | 4,6 | 4,6 | -4,6 | -4,6 | -4,6 | 4,6 | -4,6 |
| 1,4 | 1,4 | 1,4 | 1,4 | 1,4 | 1,4 | 1,4 | 1,4 | 1,4 | 1,4 | 1,4 | 1,4 | 1,4 | 1,4 | 1,4 | 1,4 |
| ∑ Efeito | -10,9 | -6,1 | 12,5 | -24,3 | 2,3 | -10,6 | 4,2 | -5,0 | -10,9 | -10,1 | 1,0 | -2,6 | 6,3 | -1,4 | 7,3 |
| | | | | | | | | | | | | | | | |

E.Q = Efeito quaternário

Tabela 2.24. Matriz de coeficientes de contraste para o planejamento fatorial 2^4 desenvolvido para encontrar os efeito das variáveis e suas interações na reação entre a 1,3-cicloexanona **1a** e o crotonaldeído **2a** catalisada pela PPL-II para a produção da 2*H*-cromenona **4a**.

| Rend (%) |] | Efeitos p | rincipais | | | Е | feitos se | cundário | s | | | Efeitos te | erciários | | E. Q |
|----------|-------|-----------|-----------|-------|-------|-------|-----------|----------|-------|-------|-------|------------|-----------|-------|-------|
| Crom 4a | 1 | 2 | 3 | 4 | 12 | 13 | 14 | 23 | 24 | 34 | 123 | 124 | 134 | 234 | 1234 |
| 4,0 | -4,0 | -4,0 | -4,0 | -4,0 | 4,0 | 4,0 | 4,0 | 4,0 | 4,0 | 4,0 | -4,0 | -4,0 | -4,0 | -4,0 | 4,0 |
| 11,7 | 11,7 | -11,7 | -11,7 | -11,7 | -11,7 | -11,7 | -11,7 | 11,7 | 11,7 | 11,7 | 11,7 | 11,7 | 11,7 | -11,7 | -11,7 |
| 1,7 | -1,7 | 1,7 | -1,7 | -1,7 | -1,7 | 1,7 | 1,7 | -1,7 | -1,7 | 1,7 | 1,7 | 1,7 | -1,7 | 1,7 | -1,7 |
| 3,8 | 3,8 | 3,8 | -3,8 | -3,8 | 3,8 | -3,8 | -3,8 | -3,8 | -3,8 | 3,8 | -3,8 | -3,8 | 3,8 | 3,8 | 3,8 |
| 6,3 | -6,3 | -6,3 | 6,3 | -6,3 | 6,3 | -6,3 | 6,3 | -6,3 | 6,3 | -6,3 | 6,3 | -6,3 | 6,3 | 6,3 | -6,3 |
| 18,5 | 18,5 | -18,5 | 18,5 | -18,5 | -18,5 | 18,5 | -18,5 | -18,5 | 18,5 | -18,5 | -18,5 | 18,5 | -18,5 | 18,5 | 18,5 |
| 3,0 | -3,0 | 3,0 | 3,0 | -3,0 | -3,0 | -3,0 | 3,0 | 3,0 | -3,0 | -3,0 | -3,0 | 3,0 | 3,0 | -3,0 | 3,0 |
| 5,2 | 5,2 | 5,2 | 5,2 | -5,2 | 5,2 | 5,2 | -5,2 | 5,2 | -5,2 | -5,2 | 5,2 | -5,2 | -5,2 | -5,2 | -5,2 |
| 12,2 | -12,2 | -12,2 | -12,2 | 12,2 | 12,2 | 12,2 | -12,2 | 12,2 | -12,2 | -12,2 | -12,2 | 12,2 | 12,2 | 12,2 | -12,2 |
| 18,3 | 18,3 | -18,3 | -18,3 | 18,3 | -18,3 | -18,3 | 18,3 | 18,3 | -18,3 | -18,3 | 18,3 | -18,3 | -18,3 | 18,3 | 18,3 |
| 3,4 | -3,4 | 3,4 | -3,4 | 3,4 | -3,4 | 3,4 | -3,4 | -3,4 | 3,4 | -3,4 | 3,4 | -3,4 | 3,4 | -3,4 | 3,4 |
| 9,5 | 9,5 | 9,5 | -9,5 | 9,5 | 9,5 | -9,5 | 9,5 | -9,5 | 9,5 | -9,5 | -9,5 | 9,5 | -9,5 | -9,5 | -9,5 |
| 10,9 | -10,9 | -10,9 | 10,9 | 10,9 | 10,9 | -10,9 | -10,9 | -10,9 | -10,9 | 10,9 | 10,9 | 10,9 | -10,9 | -10,9 | 10,9 |
| 20,7 | 20,7 | -20,7 | 20,7 | 20,7 | -20,7 | 20,7 | 20,7 | -20,7 | -20,7 | 20,7 | -20,7 | -20,7 | 20,7 | -20,7 | -20,7 |
| 6,3 | -6,3 | 6,3 | 6,3 | 6,3 | -6,3 | -6,3 | -6,3 | 6,3 | 6,3 | 6,3 | -6,3 | -6,3 | -6,3 | 6,3 | -6,3 |
| 9,8 | 9,8 | 9,8 | 9,8 | 9,8 | 9,8 | 9,8 | 9,8 | 9,8 | 9,8 | 9,8 | 9,8 | 9,8 | 9,8 | 9,8 | 9,8 |
| ∑ Efeito | 6,2 | -7,5 | 2,0 | 4,6 | -2,8 | 0,7 | 0,2 | -0,6 | -0,8 | -0,9 | -1,3 | 1,1 | -0,4 | 1,1 | -0,2 |

E.Q = Efeito quaternário.

| Tabela | 2.25 | 5. | Matriz | de | coeficiente | s de | coi | ntraste para | 0] | planejan | nento | fate | orial 2 ^e | ⁴ desenvolv | ido | par | ra |
|----------|------|----|---------|------|-------------|--------|-----|--------------|-----|----------|-------|------|----------------------|------------------------|-----|-----|----|
| encontra | ar o | s | efeito | das | variáveis | e su | as | interações | na | reação | entre | a | 1,3-ci | cloexanona | 1a | e | 0 |
| crotonal | deíd | lo | 2a cata | lisa | da pela PPI | L-II p | ara | a produção | da | 2H-cro | menor | na 5 | Sa. | | | | |

| Rend (%) | l | Efeitos p | rincipais | | | Е | feitos sec | cundários | 5 | | 1 | Efeitos te | erciários | | E. Q |
|----------|-------|-----------|-----------|-------|-------|-------|------------|-----------|-------|-------|-------|------------|-----------|-------|-------|
| Crom 5a | 1 | 2 | 3 | 4 | 12 | 13 | 14 | 23 | 24 | 34 | 123 | 124 | 134 | 234 | 1234 |
| 16,6 | -16,6 | -16,6 | -16,6 | -16,6 | 16,6 | 16,6 | 16,6 | 16,6 | 16,6 | 16,6 | -16,6 | -16,6 | -16,6 | -16,6 | 16,6 |
| 27,1 | 27,1 | -27,1 | -27,1 | -27,1 | -27,1 | -27,1 | -27,1 | 27,1 | 27,1 | 27,1 | 27,1 | 27,1 | 27,1 | -27,1 | -27,1 |
| 12,4 | -12,4 | 12,4 | -12,4 | -12,4 | -12,4 | 12,4 | 12,4 | -12,4 | -12,4 | 12,4 | 12,4 | 12,4 | -12,4 | 12,4 | -12,4 |
| 46,1 | 46,1 | 46,1 | -46,1 | -46,1 | 46,1 | -46,1 | -46,1 | -46,1 | -46,1 | 46,1 | -46,1 | -46,1 | 46,1 | 46,1 | 46,1 |
| 31,9 | -31,9 | -31,9 | 31,9 | -31,9 | 31,9 | -31,9 | 31,9 | -31,9 | 31,9 | -31,9 | 31,9 | -31,9 | 31,9 | 31,9 | -31,9 |
| 42,5 | 42,5 | -42,5 | 42,5 | -42,5 | -42,5 | 42,5 | -42,5 | -42,5 | 42,5 | -42,5 | -42,5 | 42,5 | -42,5 | 42,5 | 42,5 |
| 31,1 | -31,1 | 31,1 | 31,1 | -31,1 | -31,1 | -31,1 | 31,1 | 31,1 | -31,1 | -31,1 | -31,1 | 31,1 | 31,1 | -31,1 | 31,1 |
| 48,1 | 48,1 | 48,1 | 48,1 | -48,1 | 48,1 | 48,1 | -48,1 | 48,1 | -48,1 | -48,1 | 48,1 | -48,1 | -48,1 | -48,1 | -48,1 |
| 38,0 | -38,0 | -38,0 | -38,0 | 38,0 | 38,0 | 38,0 | -38,0 | 38,0 | -38,0 | -38,0 | -38,0 | 38,0 | 38,0 | 38,0 | -38,0 |
| 36,2 | 36,2 | -36,2 | -36,2 | 36,2 | -36,2 | -36,2 | 36,2 | 36,2 | -36,2 | -36,2 | 36,2 | -36,2 | -36,2 | 36,2 | 36,2 |
| 29,7 | -29,7 | 29,7 | -29,7 | 29,7 | -29,7 | 29,7 | -29,7 | -29,7 | 29,7 | -29,7 | 29,7 | -29,7 | 29,7 | -29,7 | 29,7 |
| 92,9 | 92,9 | 92,9 | -92,9 | 92,9 | 92,9 | -92,9 | 92,9 | -92,9 | 92,9 | -92,9 | -92,9 | 92,9 | -92,9 | -92,9 | -92,9 |
| 35,4 | -35,4 | -35,4 | 35,4 | 35,4 | 35,4 | -35,4 | -35,4 | -35,4 | -35,4 | 35,4 | 35,4 | 35,4 | -35,4 | -35,4 | 35,4 |
| 41,6 | 41,6 | -41,6 | 41,6 | 41,6 | -41,6 | 41,6 | 41,6 | -41,6 | -41,6 | 41,6 | -41,6 | -41,6 | 41,6 | -41,6 | -41,6 |
| 52,9 | -52,9 | 52,9 | 52,9 | 52,9 | -52,9 | -52,9 | -52,9 | 52,9 | 52,9 | 52,9 | -52,9 | -52,9 | -52,9 | 52,9 | -52,9 |
| 70,2 | 70,2 | 70,2 | 70,2 | 70,2 | 70,2 | 70,2 | 70,2 | 70,2 | 70,2 | 70,2 | 70,2 | 70,2 | 70,2 | 70,2 | 70,2 |
| Efeito | 19,6 | 14,3 | 6,8 | 17,6 | 13,2 | -6,8 | 1,6 | -1,5 | 9,4 | -6,0 | -8,8 | 5,8 | -2,7 | 1,0 | -4,7 |

E.Q = Efeito quaternário.

Dados referentes ao planejamento fatorial de composto centra aplicado à reação entre a 1,3-cicloexanodienona 1a e o crotonaldeído 2a na presença de lipase PPL-II

Tabela 2.26. Respostas dos experimentos do planejamento de composto central realizado para otimizar o rendimento da 2-hidroxi-2*H*-cromenona **4a** como produto da reação entre a β -dicetona cíclica **1a** e o aldeído **2a** catalisada pela PPL-II.

| Ex | | Áreas | | Con | centrações (m | g/L) | Co | onversões (| %) |
|----|----------|---------|---------|---------|---------------|---------|---------|-------------|---------|
| р | Crom 3a | Crom 4a | Crom 5a | Crom 3a | Crom 4a | Crom 5a | Crom 3a | Crom 4a | Crom 5a |
| 1 | 13792186 | 4995370 | 4405033 | 385,6 | 85,5 | 237,5 | 58,8 | 11,7 | 43,0 |
| 2 | 12032184 | 8396388 | 5044701 | 336,4 | 143,7 | 272,0 | 51,3 | 19,7 | 49,2 |
| 3 | 13791611 | 5324747 | 6175491 | 385,6 | 91,1 | 333,0 | 58,8 | 12,5 | 60,3 |
| 4 | 12479427 | 8180304 | 5299836 | 348,9 | 140,0 | 285,8 | 53,2 | 19,2 | 51,7 |
| 5 | 12592992 | 6498114 | 5573499 | 352,1 | 111,2 | 300,5 | 53,6 | 15,3 | 54,4 |
| 6 | 13072760 | 6862457 | 5403108 | 365,5 | 117,5 | 291,3 | 55,7 | 16,1 | 52,7 |
| 7 | 13784550 | 6927444 | 5425397 | 385,4 | 118,6 | 292,5 | 58,7 | 16,3 | 53,0 |
| 8 | 15578209 | 3425535 | 4933059 | 435,5 | 58,6 | 266,0 | 66,4 | 8,1 | 48,2 |
| 9 | 7177346 | 3386135 | 3086859 | 200,7 | 58,0 | 166,4 | 30,6 | 8,0 | 30,1 |
| 10 | 13246177 | 8197654 | 5137178 | 370,3 | 140,3 | 277,0 | 56,4 | 19,3 | 50,2 |
| 11 | 12190396 | 7934570 | 5852763 | 340,8 | 135,8 | 315,6 | 51,9 | 18,6 | 57,1 |

Exp = número de experimento. As concentrações foram determinadas a partir das curvas de calibração de cada produto: Área Crom **3a** = 35767 (Conc. Crom **3a**). Área Crom **4a** = 58422 (Conc. Crom **3a**). Área Crom **5a** = 18547 (Conc. Crom **5a**).

Tabela 2.27. Respostas da condição otimizada no planejamento de composto central da reação entre a β -dicetona cíclica **1a** e o aldeído **2a** catalisada pela PPL-II para a obtenção da 2-hidroxi-2*H*-cromenona **4a** em condições de ausência e presença de luz visível na presença de PPL-II como na sua ausência (controle).

| | | Áreas | | Conc | entrações (m | g/L) | Re | ndimentos (% | 5) |
|--------------------------------|---------|---------|----------|---------|--------------|---------|---------|--------------|---------|
| Experimento | Crom 4a | Crom 5a | Crom 3a | Crom 4a | Crom 5a | Crom 3a | Crom 4a | Crom 5a | Crom 3a |
| Presença de luz | 9215516 | 3558787 | 16699965 | 157,74 | 191,88 | 466,91 | 22 | 35 | 71 |
| Controle na presença de luz | 2714386 | 2256856 | 22963126 | 46,46 | 121,68 | 642,02 | 6 | 22 | 98 |
| Escuridão | 9300380 | 3164443 | 16697817 | 159,19 | 170,62 | 466,85 | 22 | 31 | 71 |
| Controle na escuridão | 2503554 | 1876276 | 22511747 | 42,85 | 101,16 | 629,40 | 6 | 18 | 96 |

Caracterização espectral das cromenonas 3a-e

Figura 2.43. Espectro de absorção na região de infravermelho (KBr) da (±)-2-metil-2,6,7,8-tetraidro-5*H*-cromen-5-ona **3a**.





Figura 2.44. Espectro de RMN de ¹H (500 MHz, CDCl₃) da (±)-2-metil-2,6,7,8-tetraidro-5*H*-cromen-

Figura 2.45. Espectro de RMN de ¹³C (126 MHz, CDCl₃) da (\pm)-2-metil-2,6,7,8-tetraidro-5*H*-cromen-5-ona **3a**.





Figura 2.46. Espectro de massas para a (±)-2-metil-2,6,7,8-tetraidro-5*H*-cromen-5-ona 3a.

Figura 2.47. Espectro de RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃) da (±)-2-etil-2,6,7,8-tetraidro-5*H*-cromen-5-



Figura 2.48. Espectro de RMN de 13 C (101 MHz, CDCl₃) da (±)-2-etil-2,6,7,8-tetraidro-5*H*-cromen-5-ona **3b**.



Figura 2.49. Espectro de massas para a (±)-2-etil-2,6,7,8-tetraidro-5*H*-cromen-5-ona 3b.



Figura 2.50. Espectro de RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃) da (\pm)-2-propil-2,6,7,8-tetraidro-5*H*-cromen-5-ona **3c**.



Figura 2.51. Espectro de RMN de ¹³C (101 MHz, CDCl₃) da (\pm)-2-propil-2,6,7,8-tetraidro-5*H*-cromen-5-ona **3c**.





Figura 2.52. Espectro de massas para a (±)-2-propil-2,6,7,8-tetraidro-5*H*-cromen-5-ona 3c.









Figura 2.55. Espectro de massas para a (±)-2,3-dimetil-2,6,7,8-tetraidro-5*H*-cromen-5-ona 3d.





Figura 2.56. Espectro de RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃) da 2,2-dimetil-2,6,7,8-tetraidro-5H-cromen-5-ona **3e**.

Figura 2.57. Espectro de RMN de ¹³C (126 MHz, CDCl₃) da 2,2-dimetil-2,6,7,8-tetraidro-5*H*-cromen-5-ona **3e**.





Figura 2.58. Espectro de massas para a 2,2-dimetil-2,6,7,8-tetraidro-5*H*-cromen-5-ona 3e.

Caracterização espectral das cromenonas 4a-i

Figura 2.59. Espectro de absorção na região de infravermelho (KBr) da (\pm) -2-hidroxi-4-metil-2,3,4,6,7,8-hexaidro-5*H*-cromen-5-one **4a**.





Figura 2.60. Espectro de RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃) da (\pm)-2-hidroxi-4-metil-2,3,4,6,7,8-hexaidro-5*H*-cromen-5-one **4a**.

Figura 2.61. Espectro de RMN de 13 C (101 MHz, CDCl₃) da (±)-2-hidroxi-4-metil-2,3,4,6,7,8-hexaidro-5*H*-cromen-5-one **4a**.



130 110 90 Deslocamento químico (ppm) -10



Figura 2.62. Espectro de massas para a (±)-2-hidroxi-4-metil-2,3,4,6,7,8-hexaidro-5*H*-cromen-5-one **4a**.

Figura 2.63. Cromatograma obtido por HPLC-UV com coluna quiral Phenomenex LUX[®] (250 mm x 4,6 mm, 5 μ m) da (±)-2-hidroxi-4-metil-2,3,4,6,7,8-hexaidro-5*H*-cromen-5-one **4a**.



| Area | Height | Area % | Height % |
|--------------|----------------------------------------------------|------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|
| 52 11809068 | 217258 | 49.659 | 45.088 |
| .86 11971225 | 264599 | 50.341 | 54.912 |
| 23780293 | 481857 | 100.000 | 100.000 |
| | e Area 452 11809068 186 11971225 23780293 | AreaHeight452118090682172581861197122526459923780293481857 | AreaHeightArea %4521180906821725849.6591861197122526459950.34123780293481857100.000 |

Figura 2.64. Espectro de RMN de ¹H (500 MHz, CDCl₃) da (\pm)-4-etil-2-hidroxi-2,3,4,6,7,8-hexaidro-5*H*-cromen-5-ona **4b**.



Figura 2.65. Espectro de RMN de ¹³C (126 MHz, CDCl₃) da (\pm)-4-etil-2-hidroxi-2,3,4,6,7,8-hexaidro-5*H*-cromen-5-ona **4b**.





Figura 2.66. Espectro de massas de alta resolução obtido para a (\pm) -4-etil-2-hidroxi-2,3,4,6,7,8-hexaidro-5*H*-cromen-5-ona **4b**.

Figura 2.67. Cromatograma obtido por HPLC-UV com coluna quiral Phenomenex LUX[®] (250 mm x 4,6 mm, 5 μm) da (±)-4-etil-2-hidroxi-2,3,4,6,7,8-hexaidro-5*H*-cromen-5-ona **4b**.



| Peak# | Ret. Time | Area | Height | Area % | Height % |
|-------|-----------|----------|--------|---------|----------|
| 1 | 137.169 | 5956547 | 27924 | 50.208 | 55.642 |
| 2 | 152.024 | 5907152 | 22261 | 49.792 | 44.358 |
| Total | | 11863698 | 50184 | 100.000 | 100.000 |



Figura 2.68. Espectro de RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃) da (\pm)-2-hidroxi-4-propil-2,3,4,6,7,8-hexaidro-5*H*-cromen-5-ona **4c**.

Figura 2.69. Espectro de RMN de 13 C (101 MHz, CDCl₃) da (±)-2-hidroxi-4-propil-2,3,4,6,7,8-hexaidro-5*H*-cromen-5-ona **4c**.



230 220 210 200 190 180 170 160 150 140 130 120 110 100 90 80 70 60 50 40 30 20 10 0 -10 Deslocamento químico (ppm)

249



Figura 2.70. Espectro de massas de alta resolução obtido para a (\pm) -2-hidroxi-4-propil-2,3,4,6,7,8-hexaidro-5*H*-cromen-5-ona **4c**.

Figura 2.71. Cromatograma obtido por HPLC-UV com coluna quiral Phenomenex LUX[®] (250 mm x 4,6 mm, 5 μm) da (±)-2-hidroxi-4-propil-2,3,4,6,7,8-hexaidro-5*H*-cromen-5-ona **4c**.



| Peak# | Ret. Time | Area | Height | Area % | Height % |
|-------|-----------|---------|--------|---------|----------|
| 1 | 174.049 | 3509034 | 12387 | 49.969 | 51.637 |
| 2 | 214.826 | 3513442 | 11601 | 50.031 | 48.363 |
| Total | | 7022476 | 23988 | 100.000 | 100.000 |



Figura 2.72. Espectro de RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃) da (\pm)-2-hidroxi-3,4-dimetil-2,3,4,6,7,8-hexaidro-5*H*-cromen-5-ona 4d.

Figura 2.73. Espectro de RMN de ¹³C (101 MHz, CDCl₃) da (\pm)-2-hidroxi-3,4-dimetil-2,3,4,6,7,8-hexaidro-5*H*-cromen-5-ona 4d.



251



Figura 2.74. Espectro de RMN de ¹H (500 MHz, CDCl₃) da (\pm)-2-hidroxi-4,8,8-trimetil-2,3,4,6,7,8-hexaidro-5*H*-cromen-5-ona **4f**.

Figura 2.75. Espectro de RMN de ¹³C (126 MHz, CDCl₃) da (\pm)-2-hidroxi-4,8,8-trimetil-2,3,4,6,7,8-hexaidro-5*H*-cromen-5-ona **4f**.



Figura 2.76. Cromatograma obtido por HPLC-UV com coluna quiral Phenomenex LUX® (250 mm x 4,6 mm, 5 µm) da (±)-2-hidroxi-4,8,8-trimetil-2,3,4,6,7,8-hexaidro-5H-cromen-5-ona 4f.



| Detector A | Ch1 254nm | | | | |
|------------|-----------|---------|--------|---------|----------|
| Peak# | Ret. Time | Area | Height | Area % | Height % |
| 1 | 59.577 | 4275232 | 37042 | 45.921 | 41.144 |
| 2 | 62.380 | 5034767 | 52989 | 54.079 | 58.856 |
| Total | | 9309999 | 90031 | 100.000 | 100.000 |

Figura 2.77. Espectro de RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃) da (±)-2-hidroxi-4,7,7-trimetil-2,3,4,6,7,8hexaidro-5H-cromen-5-ona 4g.

Crom 4g





Figura 2.78. Espectro de RMN de ¹³C (101 MHz, CDCl₃) da (\pm)-2-hidroxi-4,7,7-trimetil-2,3,4,6,7,8-hexaidro-5*H*-cromen-5-ona **4g**.

Figura 2.79. Cromatograma obtido por HPLC-UV com coluna quiral Phenomenex LUX[®] (250 mm x 4,6 mm, 5 μm) da (±)-2-hidroxi-4,7,7-trimetil-2,3,4,6,7,8-hexaidro-5*H*-cromen-5-ona **4g**.



| Peak# | Ret. Time | Area | Height | Area % | Height % |
|-------|-----------|----------|--------|---------|----------|
| 1 | 71.321 | 32484134 | 146121 | 51.097 | 84.443 |
| 2 | 105.487 | 31088833 | 26919 | 48.903 | 15.557 |
| Total | | 63572967 | 173040 | 100.000 | 100.000 |


Figura 2.80. Espectro de RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃) da (\pm)-2-hidroxi-4-metil-7-fenil-2,3,4,6,7,8-hexaidro-5*H*-cromen-5-ona **4h**.

Figura 2.81. Espectro de RMN de ¹³C (101 MHz, CDCl₃) da (\pm)-2-hidroxi-4-metil-7-fenil-2,3,4,6,7,8-hexaidro-5*H*-cromen-5-ona **4h**.



Figura 2.82. Cromatograma obtido por HPLC-UV com coluna quiral Phenomenex LUX[®] (250 mm x 4,6 mm, 5 μ m) da (±)-2-hidroxi-4-metil-7-fenil-2,3,4,6,7,8-hexaidro-5*H*-cromen-5-ona **4h**.



| Peak# | Ret. Time | Area | Height | Area % | Height % |
|-------|-----------|---------|--------|---------|----------|
| 1 | 181.560 | 3994997 | 11782 | 62.352 | 75.718 |
| 2 | 196.071 | 2412145 | 3778 | 37.648 | 24.282 |
| Total | | 6407142 | 15560 | 100.000 | 100.000 |

Figura 2.83. Espectro de RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃) da (\pm)-7-(4-clorofenil)-2-hidroxi-4-metil-2,3,4,6,7,8-hexaidro-5*H*-cromen-5-ona **4i**.





Figura 2.84. Espectro de RMN de 13 C (101 MHz, CDCl₃) da (±)-7-(4-clorofenil)-2-hidroxi-4-metil-2,3,4,6,7,8-hexaidro-5*H*-cromen-5-ona **4i**.

Figura 2.85. Cromatograma obtido por HPLC-UV com coluna quiral Phenomenex LUX[®] (250 mm x 4,6 mm, 5 μm) da (±)-7-(4-clorofenil)-2-hidroxi-4-metil-2,3,4,6,7,8-hexaidro-5*H*-cromen-5-ona **4i**.



| Peak# | Ret. Time | Area | Height | Area % | Height % |
|-------|-----------|---------|--------|---------|----------|
| 1 | 105.655 | 1939160 | 10228 | 50.211 | 64.801 |
| 2 | 117.552 | 1922900 | 5556 | 49.789 | 35.199 |
| Total | | 3862060 | 15783 | 100.000 | 100.000 |

Caracterização espectral das cromenonas 5a-c





Figura 2.87. Espectro de RMN de ¹H (400 MHz, MeOD) da (\pm)-2-(2-hidroxi-6-oxo-1-cicloexen-1-il)-4-metil-2,3,4,6,7,8-hexaidro-5*H*-cromen-5-ona **5a**.



Figura 2.88. Espectro de RMN de ¹³C (101 MHz, MeOD) da (\pm) -2-(2-hidroxi-6-oxo-1-cicloexen-1-il)-4-metil-2,3,4,6,7,8-hexaidro-5*H*-cromen-5-ona **5a**.



Figura 2.89. Espectro de massas da (\pm) -2-(2-hidroxi-6-oxo-1-cicloexen-1-il)-4-metil-2,3,4,6,7,8-hexaidro-5*H*-cromen-5-ona **5a**.



Figura 2.90. Cromatograma obtido por HPLC-UV com coluna quiral Phenomenex LUX[®] (250 mm x 4,6 mm, 5 μ m) da (±)-2-(2-hidroxi-6-oxo-1-cicloexen-1-il)-4-metil-2,3,4,6,7,8-hexaidro-5*H*-cromen-5-ona **5a**.



Figura 2.91. Espectro de RMN de ¹H (500 MHz, CDCl₃) da (\pm)-4-etil-2-(2-hidroxi-6-oxo-1-cicloexen-1-il)-2,3,4,6,7,8-hexaidro-5*H*-cromen-5-ona **5b**.





Figura 2.92. Espectro de RMN de ¹³C (126 MHz, CDCl₃) da (\pm)-4-etil-2-(2-hidroxi-6-oxo-1-cicloexen-1-il)-2,3,4,6,7,8-hexaidro-5*H*-cromen-5-ona **5b**.

Figura 2.93. Espectro de massas para a (\pm) -4-etil-2-(2-hidroxi-6-oxo-1-cicloexen-1-il)-2,3,4,6,7,8-hexaidro-5*H*-cromen-5-ona **5b**.



Figura 2.94. Espectro de RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃) da (\pm)-2-(2-hydroxy-6-oxocyclohex-1-en-1-yl)-4-propyl-2,3,4,6,7,8-hexahydro-5*H*-chromen-5-one **5**c.



Figura 2.95. Espectro de RMN de ¹³C (101 MHz, CDCl₃) da (\pm)-2-(2-hydroxy-6-oxocyclohex-1-en-1-yl)-4-propyl-2,3,4,6,7,8-hexahydro-5*H*-chromen-5-one **5**c.





Figura 2.96. Espectro de massas para a (\pm) -2-(2-hydroxy-6-oxocyclohex-1-en-1-yl)-4-propyl-2,3,4,6,7,8-hexahydro-5*H*-chromen-5-one **5c**.

Experimento de biotransformação pelos fungos de ambiente marinha.

Figura 2.97. Curva analítica para a determinação da conversão do produto de biotransformação da 2hidroxi-2*H*-cromenona **4a** pelos fungos de origem marinha.



Tabela 2.28. Dados das áreas e concentrações estimadas do produto de biotransformação da 2-hidroxi-2*H*-cromenona **4a** nas amostras provenientes dos extratos das reações de biotransformação realizada por fungos de origem marinha.

| Fungo CBMAI | Diluiçãoª | Área | Conc. amostra analisada (mg/L) | Conc. amostra original (mg/L) | Conversão (%) |
|----------------|-----------|--------|-----------------------------------|----------------------------------|---------------|
| 847 | 3 | 357828 | 992,583 | 2978 | 74 |
| 934 | 3,5 | 391915 | 1090,044 | 3815 | 94 |
| 935 | 3 | 478843 | 1338,588 | 4016 | 99 |
| 1185 | 1,40 | 995957 | 2817,112 | 3944 | 98 |
| 1186 | 3 | 389904 | 1084,294 | 3253 | 80 |
| 1237 | 3 | 355177 | 985,004 | 2955 | 73 |

^a A quantidade total obtida das extrações foi diluída em 5 mL e, em seguida esta amostra foi diluída por segunda vez para ter áreas dentro do intervalo da curva analítica.

Determinação da concentração de proteínas no preparado enzimático comercial de PPL-II e LPF

Figura 2.98. Curva analítica para a estimativa da concentração de proteína pelo método de Lowry modificado.



Tabela 2.29. Estimativa da concentração de proteína nos preparados comerciais das lipase de *Pseudomonas fluorescens* e Lipase de pâncreas de porco tipo II.

| Lipase | Conc. amostra [mg/mL] | Abs | Conc. proteína [µg/mL] | Diluição | % Proteína | Média % Proteína |
|--------|--------------------------|-------|---------------------------|----------|------------|---------------------|
| LPF | 1,85 | 0,225 | 73,92 | 1 | 4,0 | 2.6 |
| | 0,92 | 0,114 | 29,52 | 2 | 3,2 | 5,0 |
| PPL-II | 0,8 | 0,647 | 242,72 | 1 | 30,3 | 21.7 |
| | 0,32 | 0,304 | 105,52 | 5 | 33,0 | 31,7 |

Dados cristalográficos e de refinamento dos dados de refração de raios x para a cromenona 5a

 Table 1 Crystal data and structure refinement for porto2_twin1_hklf4.

| porto2_twin1_hklf4 |
|--------------------|
| $C_{16}H_{22}O_5$ |
| 294.33 |
| 293(2) |
| monoclinic |
| P2 ₁ |
| 10.8941(15) |
| 16.333(3) |
| 9.2958(15) |
| 90 |
| 109.841(17) |
| 90 |
| 1555.8(4) |
| 4 |
| 1.257 |
| |

| μ/mm^{-1} | 0.093 |
|---------------------------------------------|-------------------------------------------------------|
| F(000) | 632.0 |
| Crystal size/mm ³ | $0.35 \times 0.26 \times 0.18$ |
| Radiation | MoKa ($\lambda = 0.71073$) |
| 2Θ range for data collection/° | 5.284 to 69.062 |
| Index ranges | $-17 \le h \le 17, -25 \le k \le 25, -8 \le l \le 14$ |
| Reflections collected | 9185 |
| Independent reflections | 9185 [$R_{int} = 0.0570$, $R_{sigma} = 0.1770$] |
| Data/restraints/parameters | 9185/1/384 |
| Goodness-of-fit on F ² | 1.035 |
| Final R indexes [I>= 2σ (I)] | $R_1 = 0.0754, wR_2 = 0.1464$ |
| Final R indexes [all data] | $R_1 = 0.2713, wR_2 = 0.1789$ |
| Largest diff. peak/hole / e Å ⁻³ | 0.25/-0.28 |
| Flack parameter | -6.3(10) |
| | |

Table 2 Fractional Atomic Coordinates (×10⁴) and Equivalent Isotropic Displacement Parameters (Å²×10³) for porto2_twin1_hklf4. U_{eq} is defined as 1/3 of of the trace of the orthogonalised U_{IJ} tensor.

| Atom | x | у | z | U(eq) |
|------|-----------|----------|-----------|--------|
| 011 | 16708(7) | 14502(4) | 16020(9) | 75(2) |
| O12 | 12462(7) | 13500(6) | 13804(9) | 108(3) |
| 013 | 18804(8) | 13653(8) | 19723(7) | 136(4) |
| O14 | 18570(7) | 13819(5) | 14681(6) | 78(2) |
| C101 | 15329(10) | 14533(7) | 15264(12) | 72(3) |
| C102 | 15093(10) | 15433(6) | 14805(19) | 125(6) |
| C103 | 13663(14) | 15453(8) | 13730(20) | 192(9) |
| C104 | 12805(9) | 14902(8) | 13693(18) | 144(6) |
| C105 | 13231(9) | 14114(7) | 14133(14) | 72(3) |
| C106 | 14590(7) | 13922(6) | 15025(10) | 51(2) |
| C107 | 15012(9) | 13072(6) | 15391(12) | 70(3) |
| C108 | 14611(13) | 12737(8) | 16737(14) | 110(4) |
| C109 | 16513(9) | 13012(6) | 15809(12) | 67(3) |
| C110 | 17140(8) | 13671(6) | 16710(11) | 71(3) |
| C111 | 18635(8) | 13726(5) | 17152(8) | 50(2) |
| C112 | 19342(9) | 13657(7) | 18791(9) | 70(3) |
| C113 | 20798(10) | 13565(9) | 19266(11) | 113(5) |
| C114 | 21354(7) | 13653(8) | 18181(12) | 105(4) |
| C115 | 20687(8) | 13679(7) | 16627(9) | 77(3) |
| C116 | 19247(8) | 13706(7) | 16205(9) | 63(3) |
| O21 | 13323(6) | 15505(3) | 8946(10) | 71(2) |
| O22 | 17584(6) | 16490(4) | 11196(9) | 82(2) |
| O23 | 11191(10) | 16391(7) | 5200(9) | 117(3) |
| O24 | 11450(7) | 16232(6) | 10321(7) | 95(3) |
| C201 | 14539(9) | 15434(5) | 9713(12) | 59(3) |
| C202 | 15033(12) | 14586(5) | 10210(18) | 116(6) |
| C203 | 16330(12) | 14460(8) | 11110(20) | 150(6) |
| C204 | 17317(13) | 15059(6) | 11237(19) | 138(6) |
| C205 | 16804(11) | 15966(6) | 10825(13) | 73(3) |
| | | | | 265 |

| C206 | 15460(9) | 16065(6) | 10078(12) | 62(2) |
|------|-----------|-----------|-----------|--------|
| C207 | 14978(9) | 16947(5) | 9570(11) | 56(2) |
| C208 | 15392(13) | 17245(6) | 8299(14) | 86(4) |
| C209 | 13556(9) | 16981(5) | 9300(13) | 71(3) |
| C210 | 12811(8) | 16258(6) | 8245(10) | 59(2) |
| C211 | 11368(10) | 16304(6) | 7738(13) | 71(3) |
| C212 | 10631(11) | 16329(8) | 6154(15) | 94(4) |
| C213 | 9186(11) | 16265(9) | 5672(16) | 109(4) |
| C214 | 8620(13) | 16515(10) | 6795(17) | 136(5) |
| C215 | 9279(9) | 16273(6) | 8470(12) | 86(3) |
| C216 | 10735(10) | 16236(6) | 8868(12) | 66(3) |
| O1W | 19816(6) | 13647(5) | 12798(7) | 97(3) |
| O2W | 10198(8) | 16322(5) | 12142(9) | 104(3) |

Table 3 Anisotropic Displacement Parameters (Å²×10³) for porto2_twin1_hklf4. The Anisotropic displacement factor exponent takes the form: $-2\pi^2$ [h²a^{*2}U₁₁+2hka*b*U₁₂+...].

| Atom | U ₁₁ | U ₂₂ | U ₃₃ | U ₂₃ | U ₁₃ | U ₁₂ |
|------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| 011 | 55(4) | 69(4) | 86(5) | -25(4) | 4(4) | 8(3) |
| O12 | 52(4) | 165(8) | 95(6) | -3(5) | 8(4) | -7(5) |
| 013 | 61(5) | 307(13) | 37(4) | -31(6) | 12(3) | 30(7) |
| O14 | 55(4) | 128(6) | 52(4) | -14(4) | 18(3) | 15(4) |
| C101 | 49(6) | 87(7) | 66(7) | -13(6) | 2(5) | 22(5) |
| C102 | 48(6) | 80(8) | 208(16) | 4(8) | -6(8) | 32(5) |
| C103 | 69(9) | 105(9) | 330(20) | 128(12) | -19(11) | 12(7) |
| C104 | 19(3) | 113(10) | 241(17) | 3(9) | -31(6) | 8(5) |
| C105 | 32(4) | 85(7) | 88(7) | -7(6) | 7(5) | 2(5) |
| C106 | 26(4) | 74(6) | 48(4) | -12(5) | 7(3) | 4(4) |
| C107 | 44(5) | 111(9) | 51(6) | 7(6) | 13(5) | 12(5) |
| C108 | 75(8) | 174(11) | 78(8) | 31(8) | 21(7) | -15(8) |
| C109 | 54(6) | 92(7) | 54(6) | -4(5) | 18(5) | 9(5) |
| C110 | 43(5) | 88(7) | 68(6) | -13(5) | 0(4) | 32(5) |
| C111 | 37(4) | 73(6) | 32(4) | -3(4) | 0(3) | 13(4) |
| C112 | 52(5) | 126(9) | 26(4) | -35(5) | 5(4) | 21(5) |
| C113 | 59(6) | 225(14) | 39(5) | -7(7) | -2(4) | 33(7) |
| C114 | 17(3) | 213(12) | 77(7) | 2(7) | 5(4) | -22(5) |
| C115 | 47(5) | 151(10) | 39(4) | 5(5) | 22(4) | 23(5) |
| C116 | 36(4) | 106(7) | 34(4) | -11(5) | -4(4) | 12(5) |
| O21 | 40(4) | 55(4) | 107(6) | -6(4) | 9(4) | 5(3) |
| O22 | 39(4) | 61(4) | 126(7) | 5(4) | 0(4) | -5(3) |
| O23 | 76(6) | 199(9) | 73(5) | 5(5) | 19(5) | 8(6) |
| O24 | 47(4) | 169(7) | 58(4) | 42(5) | 4(4) | 10(4) |
| C201 | 29(4) | 55(6) | 88(7) | -3(5) | 12(4) | 2(4) |
| C202 | 81(8) | 39(6) | 202(16) | -3(7) | 14(9) | -4(5) |
| C203 | 59(8) | 85(8) | 251(17) | -31(9) | -21(9) | 19(6) |
| C204 | 118(10) | 46(6) | 233(17) | 34(8) | 38(10) | 22(6) |
| C205 | 60(6) | 79(7) | 71(7) | 6(6) | 12(6) | 20(6) |
| C206 | 57(5) | 57(6) | 65(6) | 1(5) | 12(5) | 5(5) |
| C207 | 54(6) | 47(5) | 62(6) | -4(4) | 14(5) | -3(4) |
| | | | | | | 266 |

| C208 | 113(10) | 65(6) | 90(8) | 6(6) | 46(8) | 6(6) |
|------|---------|---------|--------|--------|-------|-------|
| C209 | 58(6) | 45(5) | 99(8) | 0(5) | 10(5) | 10(4) |
| C210 | 46(5) | 89(7) | 39(5) | 3(5) | 12(4) | -8(4) |
| C211 | 50(6) | 66(6) | 90(7) | -10(6) | 14(6) | 5(5) |
| C212 | 47(6) | 116(10) | 96(8) | 19(7) | -4(6) | 6(6) |
| C213 | 52(6) | 155(10) | 98(9) | -27(7) | -1(6) | 17(6) |
| C214 | 96(8) | 200(12) | 90(9) | 35(8) | 1(7) | 42(8) |
| C215 | 48(5) | 73(6) | 110(8) | -7(6) | -9(5) | -3(5) |
| C216 | 57(6) | 68(6) | 68(6) | 8(5) | 15(5) | 5(5) |
| O1W | 42(4) | 191(8) | 58(4) | -15(5) | 18(3) | 6(4) |
| O2W | 66(5) | 177(8) | 63(5) | 17(5) | 12(4) | 19(5) |

Table 4 Bond Lengths for porto2_twin1_hklf4.

| | | · · | | | 0 |
|------|------|-----------|------|------|-----------|
| Atom | Atom | Length/Å | Atom | Atom | Length/Å |
| 011 | C101 | 1.427(12) | O21 | C201 | 1.279(11) |
| 011 | C110 | 1.508(11) | O21 | C210 | 1.415(10) |
| O12 | C105 | 1.275(12) | O22 | C205 | 1.173(12) |
| 013 | C112 | 1.200(10) | O23 | C212 | 1.240(14) |
| O14 | C116 | 1.370(10) | O24 | C216 | 1.310(11) |
| C101 | C102 | 1.528(15) | C201 | C202 | 1.501(13) |
| C101 | C106 | 1.254(13) | C201 | C206 | 1.397(12) |
| C102 | C103 | 1.539(17) | C202 | C203 | 1.391(16) |
| C103 | C104 | 1.290(16) | C203 | C204 | 1.428(17) |
| C104 | C105 | 1.383(14) | C204 | C205 | 1.583(13) |
| C105 | C106 | 1.464(11) | C205 | C206 | 1.401(13) |
| C106 | C107 | 1.466(13) | C206 | C207 | 1.551(12) |
| C107 | C108 | 1.558(14) | C207 | C208 | 1.483(13) |
| C107 | C109 | 1.550(12) | C207 | C209 | 1.483(11) |
| C109 | C110 | 1.392(13) | C209 | C210 | 1.573(13) |
| C110 | C111 | 1.541(11) | C210 | C211 | 1.482(13) |
| C111 | C112 | 1.459(10) | C211 | C212 | 1.419(15) |
| C111 | C116 | 1.272(12) | C211 | C216 | 1.443(15) |
| C112 | C113 | 1.503(13) | C212 | C213 | 1.487(16) |
| C113 | C114 | 1.349(15) | C213 | C214 | 1.440(18) |
| C114 | C115 | 1.380(11) | C214 | C215 | 1.528(15) |
| C115 | C116 | 1.484(11) | C215 | C216 | 1.503(13) |

Table 5 Bond Angles for porto2_twin1_hklf4.

| Atom Atom Atom | Angle/° | Atom Atom Atom | Angle/° |
|----------------|-----------|----------------|-----------|
| C101 O11 C110 | 111.5(7) | C201 O21 C210 | 120.5(7) |
| O11 C101 C102 | 102.8(9) | O21 C201 C202 | 116.8(8) |
| C106 C101 O11 | 124.4(9) | O21 C201 C206 | 126.2(8) |
| C106 C101 C102 | 132.7(9) | C206 C201 C202 | 116.9(8) |
| C101 C102 C103 | 103.9(9) | C203 C202 C201 | 120.4(10) |
| C104 C103 C102 | 124.5(12) | C202 C203 C204 | 122.1(13) |

| C103 C104 C105 | 118.4(10) | C203 C204 C205 | 115.3(11) |
|----------------|-----------|----------------|-----------|
| O12 C105 C104 | 122.3(9) | O22 C205 C204 | 116.9(9) |
| O12 C105 C106 | 115.1(9) | O22 C205 C206 | 126.3(9) |
| C104 C105 C106 | 122.6(9) | C206 C205 C204 | 116.8(10) |
| C101 C106 C105 | 113.3(9) | C201 C206 C205 | 125.4(9) |
| C101 C106 C107 | 125.5(8) | C201 C206 C207 | 118.0(8) |
| C105 C106 C107 | 120.7(8) | C205 C206 C207 | 116.6(8) |
| C106 C107 C108 | 111.5(9) | C208 C207 C206 | 112.6(8) |
| C106 C107 C109 | 109.9(7) | C209 C207 C206 | 108.2(7) |
| C109 C107 C108 | 109.6(9) | C209 C207 C208 | 115.8(10) |
| C110 C109 C107 | 111.2(8) | C207 C209 C210 | 111.5(7) |
| O11 C110 C111 | 102.1(8) | O21 C210 C209 | 109.0(7) |
| C109 C110 O11 | 114.9(8) | O21 C210 C211 | 113.6(8) |
| C109 C110 C111 | 117.6(8) | C211 C210 C209 | 115.3(8) |
| C112 C111 C110 | 114.2(8) | C212 C211 C210 | 119.8(10) |
| C116 C111 C110 | 124.6(8) | C212 C211 C216 | 121.1(10) |
| C116 C111 C112 | 120.4(8) | C216 C211 C210 | 118.8(9) |
| O13 C112 C111 | 122.7(8) | O23 C212 C211 | 120.2(10) |
| O13 C112 C113 | 120.9(8) | O23 C212 C213 | 121.2(12) |
| C111 C112 C113 | 116.4(8) | C211 C212 C213 | 118.6(12) |
| C114 C113 C112 | 117.8(9) | C214 C213 C212 | 115.6(12) |
| C113 C114 C115 | 125.2(8) | C213 C214 C215 | 119.8(12) |
| C114 C115 C116 | 114.2(7) | C216 C215 C214 | 110.7(10) |
| O14 C116 C115 | 115.2(8) | O24 C216 C211 | 119.1(9) |
| C111 C116 O14 | 119.2(8) | O24 C216 C215 | 117.5(10) |
| C111 C116 C115 | 125.0(8) | C211 C216 C215 | 122.9(9) |

Table 6 Hydrogen Atom Coordinates (Å×10⁴) and Isotropic Displacement Parameters (Å²×10³) for porto2_twin1_hklf4.

| Atom | x | У | z | U(eq) |
|------|-------|-------|-------|-------|
| H14 | 19030 | 13685 | 14181 | 118 |
| H10A | 15676 | 15615 | 14281 | 150 |
| H10B | 15216 | 15777 | 15694 | 150 |
| H10C | 13307 | 15969 | 13924 | 231 |
| H10D | 13691 | 15488 | 12700 | 231 |
| H10E | 12192 | 14877 | 12655 | 172 |
| H10F | 12325 | 15087 | 14339 | 172 |
| H107 | 14598 | 12734 | 14485 | 83 |
| H10G | 15244 | 12904 | 17691 | 165 |
| H10H | 14571 | 12150 | 16688 | 165 |
| H10I | 13771 | 12951 | 16661 | 165 |
| H10J | 16820 | 12506 | 16357 | 80 |
| H10K | 16729 | 13002 | 14879 | 80 |
| H110 | 16945 | 13642 | 17664 | 86 |
| H11A | 21192 | 13962 | 20065 | 135 |
| H11B | 21025 | 13026 | 19717 | 135 |
| H11C | 21980 | 13210 | 18341 | 126 |
| | | | | 268 |

| H11D | 21859 | 14155 | 18428 | 126 |
|------|-------|-------|-------|-----|
| H11E | 20921 | 13200 | 16158 | 92 |
| H11F | 20969 | 14158 | 16206 | 92 |
| H24 | 10989 | 16124 | 10834 | 143 |
| H20A | 14500 | 14361 | 10764 | 139 |
| H20B | 14864 | 14259 | 9292 | 139 |
| H20C | 16608 | 13962 | 10737 | 181 |
| H20D | 16342 | 14346 | 12134 | 181 |
| H20E | 17797 | 14901 | 10573 | 165 |
| H20F | 17923 | 15053 | 12279 | 165 |
| H207 | 15398 | 17304 | 10447 | 67 |
| H20G | 16327 | 17234 | 8609 | 129 |
| H20H | 15088 | 17796 | 8041 | 129 |
| H20I | 15029 | 16898 | 7423 | 129 |
| H20J | 13210 | 17499 | 8822 | 86 |
| H20K | 13411 | 16952 | 10272 | 86 |
| H210 | 13040 | 16292 | 7314 | 70 |
| H21A | 8809 | 16596 | 4762 | 130 |
| H21B | 8940 | 15701 | 5393 | 130 |
| H21C | 7735 | 16303 | 6471 | 164 |
| H21D | 8555 | 17107 | 6756 | 164 |
| H21E | 9062 | 16670 | 9122 | 103 |
| H21F | 8958 | 15742 | 8650 | 103 |
| H1WA | 20898 | 13603 | 13102 | 145 |
| H1WB | 19509 | 13734 | 12001 | 145 |
| H2WA | 10477 | 16346 | 13158 | 157 |
| H2WB | 9442 | 16438 | 11843 | 157 |

Refinement model description

Number of restraints - 1, number of constraints - unknown. Details: 1. Twinned data refinement Scales: 0.6622(13) 0.3378(13)2. Fixed Uiso At 1.2 times of: All C(H) groups, All C(H,H) groups At 1.5 times of: All C(H,H,H) groups, All O(H) groups, All O(H,H) groups 3.a Riding coordinates: O1W(H1WA,H1WB), O2W(H2WA,H2WB) 3.b Ternary CH refined with riding coordinates: C107(H107), C110(H110), C207(H207), C210(H210) 3.c Secondary CH2 refined with riding coordinates: C102(H10A,H10B), C103(H10C,H10D), C104(H10E,H10F), C109(H10J,H10K), C113(H11A, H11B), C114(H11C,H11D), C115(H11E,H11F), C202(H20A,H20B), C203(H20C,H20D), C204(H20E,H20F), C209(H20J,H20K), C213(H21A,H21B), C214(H21C,H21D), C215(H21E, H21F) 3.d Idealised Me refined as rotating group: C108 (H10G, H10H, H10I), C208 (H20G, H20H, H20I) 3.e Idealised tetrahedral OH refined as rotating group: O14(H14), O24(H24)