UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA DE SÃO CARLOS

**REDUÇÃO DE DERIVADOS DE ACETOFENONAS E RESOLUÇÃO DE FENILETANÓIS POR BIOCATÁLISE
E IMOBILIZAÇÃO DE FUNGOS MARINHOS**

Lenilson Coutinho da Rocha

Tese apresentada ao Instituto de Química de São Carlos, da Universidade de São Paulo para obtenção do Título de Doutor em Ciências área de concentração Físico-Química.

Orientador: Prof. Dr. André Luiz Meleiro Porto

São Carlos, 2012.

Dedico este trabalho a minha mãe Ana pelo apoio incondicional em todos os momentos da minha vida e a minha querida e amada esposa Josiane, pelo amor dedicado a mim nesses últimos anos não há como mensurar o amor que sinto por você.

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

“Viva para amar, ame sempre”.

Phob's

O POETA E O CIENTISTA

SÃO COMO ÁGUA E VINHO,
COMO O EXECUTIVO E O ADIVINHO;
TRAZEM AS DIFERENÇAS
DO SOL QUE VEM
E DO SOL QUE VAI.

MENDIGA UM,
LUZ,
A MATÉRIA ARREDIA,
DEDICA O OUTRO,
UM ACENO DE ACEITAÇÃO
AO TELÚRICO MISTÉRIO,
QUE NÃO MERECE,
ALGUMAS VEZES,
A INDISCRICÃO HUMANA.

FAZEM,
APESAR DAS DIFERENÇAS
COMO SERES ALADOS, SINGULARES...
O REGALO DE UM,
NO INÍCIO,
DO OUTRO,
NO FIM,
DO ACABADO MISTÉRIO
ENCONTRADO PERDIDO,
NUM POTE DE BARRO,
NUM POTE NÃO MUITO RARO,
NEM MUITO CARO...

FREDERICO DE ALMEIDA REGO JUNIOR

AGRADECIMENTOS

- A Deus, por tudo que tem me proporcionado até hoje;
- Ao amor da minha vida Josi, pela grandiosa contribuição e compreensão durante esses últimos anos;
- À minha mãe Ana por ter me ensinado tudo e pelo seu amor;
- Ao meu pai Laércio pelo apoio, companheirismo e por me ensinar a amar as pessoas;
- Ao meu querido irmão Leno por tudo que vivemos até hoje. A distância renovou ainda mais o amor que sinto por você;
- Aos meus adorados sogros: Francisco e Aparecida pessoas especiais que me receberam como filho e que sempre torcem por mim;
- À minha querida e amada tia Carolina por tudo e principalmente pelo amor a mim dedicado;
- A toda a minha família, em especial ao meu tio Luiz e tia Lourdes;
- Ao Professor André por me proporcionar a oportunidade de trabalhar em seu Grupo, pela orientação e por sempre ser exigente com os dados científicos;
- Ao Professor Roberto G. S. Berlinck pelos fungos marinhos;
- À Profa. Dra. Mirna H. R. Seleglim e a técnica Darci pela colaboração e pelo treinamento no laboratório de microbiologia;
- Ao Prof. Dr. Timothy John Brocksom e a Pós-doutoranda Marciana do Laboratório de Química Bio-orgânica (LQBO - UFSCar) pelas análises de rotação óptica;
- Ao Prof. Dr. Antonio Gilberto Ferreira e a técnica Luciana Vizotto do Laboratório de Ressonância Magnética Nuclear - (UFSCar) pelas análises realizadas;
- Ao Prof. Dr. Cristiano Raminelli – (UNIFESP), e em especial ao Prof. Dr. Alex Haroldo Jeller – (UEMS) pela grandiosa colaboração neste trabalho;

- Ao Professor Benedito S. L. Neto por sempre me receber bem e pelo empréstimo de materiais;
- Aos professores do exame de qualificação Prof. Dr. Alex Haroldo Jeller e a Profa. Dra. Carla C. S. Cavalheiro;
- A Profa. Dra. Maria O. O. Rezende pela disponibilização do cromatógrafo a gás acoplado ao espectrômetro de massas (GC-MS);
- Aos amigos da época de cursinho que me apoiam até hoje. André e Eder: vocês são demais;
- Aos amigos de graduação da Universidade Estadual de Maringá que apesar de estarem espalhados continuam fazendo parte do ciclo de amizades, em especial ao Rodolfo (Rudolf), Adriano (Neguin), Hercules, Franciele (Fran), Alexandra, Roberta, Silvia, Thiago (Backs), Leandro Piovan e Débora;
- Aos amigos de laboratório, Yara, Mariana, Ana Maria, Julieta, Sandra, Rodrigo, Gliseida Alex Jeller, Nathalia, Irlon, Willian, Fábio, Kátia e Matheus;
- Aos alunos do grupo de produtos naturais: Eli Pimenta, Mirian, Raquel, Fábio e Messias, pelas dicas e pelos bons debates;
- Aos amigos do laboratório de síntese orgânica: Isac Rosset, Vagner (Carioca), Barbara (Loirinha), Leornado e Rafael (Uai);
- Aos grandes amigos dos laboratórios de inorgânica: José Luiz (Zé), Valdemiro (Magão), Evânia (Ebania), Baiano, Viviana e ao meu grande amigo André (Candango) pelos bons momentos e por todas as nossas discussões;
- Aos amigos do Instituto: Flávio (Baixinho), Jairo (Tipão), Adriano (Manchinha), Orlando, Rommel e Sabrina;
- À técnica Maria Diva pelas análises de GC-MS;

- Aos técnicos do Central de Análise Química – CAQI, André (IV), Paulo (HPLC), Márcio (MEV) e Silvana (RMN);
- Aos técnicos do nosso laboratório João Pedro e Marília;
- Ao Romano (Administração/Financeiro);
- À Silvia e Andréia da secretaria de Pós-graduação do Instituto de Química de São Carlos – (IQSC) por tudo que fizeram por mim ao longo desses anos;
- À bibliotecária Eliana pela revisão bibliográfica.
- À faxineira Neuza;
- Ao Instituto de Química de São Carlos/USP, pelo apoio institucional;
- À CAPES pela bolsa de doutorado;
- À FAPESP e ao CNPQ pelo financiamento dos projetos;
- E a todos que de alguma forma contribuíram para o sucesso deste trabalho. Muito obrigado!!!

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

Ac ₂ O	Anidrido acético
ADH	Álcool desidrogenase
CAQI	Central de Análises Químicas e Instrumentais
CA	Configuração absoluta
CC	Cromatografia em coluna
CCD	Cromatografia em camada delgada
CALA	Lipase de <i>Candida antarctica</i> fração A
CALB	Lipase de <i>Candida antarctica</i> fração B
CDCl ₃	Clorofórmio
CPQBA	Centro de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrárias
d	Dupleto
dd	Duplo dupleto
DEX CB	β-ciclodextrina
DMSO	Dimetil sulfóxido
dt	Duplo tripleto
GC-FID	Gas chromatography - flame ionization detector (Cromatografo a gás com detector de ionização de chama)
GC-MS	Gas chromatography - Mass Spectrometry (Cromatografo a gás acoplado ao espectrômetro de massas de baixa resolução)
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Correlation
HPLC	High Performance Liquid Chromatography (Cromatografia líquida de alta eficiência)
HSQC	Heteronuclear Single Quantum Coherence
IV	Infravermelho
<i>J</i>	Constante de acoplamento
m	Multiplete
MeOH	Metanol
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
NADH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo na forma reduzida
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
pi	Piridina
Pd(PPh ₃) ₄	Trifenilfosfinapaládio
r	Taxa de aquecimento por minuto
RMN ¹ H	Ressonância Magnética Nuclear de hidrogênio
RMN ¹³ C	Ressonância Magnética Nuclear de carbono
sl	Singleto largo
t	Triplete
TEOS	Tetraetilortossilicato
td	Triplo dupleto
T _i	Temperatura inicial
T _f	Temperatura final
TMS	Trimetilsilano
UV	Ultravioleta
δ	Deslocamento químico
[α] _D ^T	Rotação óptica específica

RESUMO

Este trabalho envolveu reações de biocatálise com objetivo de obter compostos enantiomericamente puros. Assim foram realizadas reações de redução de derivados de acetofenonas, resolução enzimática de alcoóis e azido-alcoóis e imobilização de células fúngicas em suportes sólidos para aplicação em biocatálise. Foi realizada a redução enantiosseletiva da 1-(4-metoxifenil)etanona (**1**) através da triagem com nove fungos marinhos (*Aspergillus sydowii* CBMAI 935, *A. sydowii* CBMAI 934, *A. sclerotiorum* CBMAI 849, *Bionectria* sp. CBMAI 936, *Beauveria felina* CBMAI 738, *Cladosporium cladosporioides* CBMAI 857, *Mucor racemosus* CBMAI 847, *Penicillium citrinum* CBMAI 1186, *P. miczynskii* CBMAI 930). Os fungos *A. sydowii* CBMAI 935 e *Bionectria* sp. CBMAI 936 catalisaram a biorredução estereosseletiva da 1-(4-metoxifenil)etanona (**1**) para o correspondente (*R*)-1-(4-metoxifenil)etanol (**1a**) com excelentes excessos enantioméricos (>99%). Os fungos *B. felina* CBMAI 738 e *P. citrinum* CBMAI 1186 catalisaram a biorredução estereosseletiva da cetona **1** para o correspondente *S*-álcool **1a** com 69% de excesso enantiomérico. Os fungos marinhos (*A. sclerotiorum* CBMAI 849, *A. sydowii* CBMAI 934, *B. felina* CBMAI 738, *M. racemosus* CBMAI 847, *P. citrinum* CBMAI 1186, *P. miczynskii* CBMAI 931, *P. miczynskii* CBMAI 830, *P. oxalicum* CBMAI 1185, *Trichoderma* sp. CBMAI 932) foram utilizados na bioconversão assimétrica das iodoacetofenonas **2-4** para os correspondentes iodofeniletanois **2a-4a**. Todos os fungos marinhos produziram exclusivamente (*S*)-*o*-iodofeniletanol (**2a**) e (*S*)-*m*-iodofeniletanol (**3a**) com diferentes valores de excessos enantioméricos (62-99%). Os fungos *B. felina* CBMAI 738, *P. miczynskii* CBMAI 830, *P. oxalicum* CBMAI 1185 e *Trichoderma* sp. CBMAI 932 produziram o correspondente (*R*)-*p*-iodofeniletanol (**4a**) com excessos enantioméricos de 32-99%. A bioconversão da *p*-iodoacetofenona (**4**) com células microbianas do *P. oxalicum* CBMAI 1185 mostrou uma competição entre a reação de redução e oxidação. Também foram realizadas as reduções das ceto-azidas **13-16** com fungos marinhos fornecendo bons resultados de seletividade (28-99% *ee*). As células microbianas dos fungos *A. sclerotiorum* CBMAI 849 e *P. citrinum* CBMAI 1186 foram imobilizadas em suportes de sílica gel, xerogel de sílica e quitosana. As células do *P. citrinum* CBMAI 1186 imobilizadas em quitosana catalisaram a redução da 1-(4-metoxifenil)etanona (**1**) para o correspondente (*S*)-1-(4-metoxifenil)-etanol (**1a**) com excelente excesso enantiomérico (>99%). O fungo *P. citrinum* CBMAI 1186 imobilizado em quitosana também catalisou a biorredução de 2-cloro-1-feniletanona (**7**) para o 2-cloro-1-feniletanol (**7a**), mas neste caso, sem seletividade. Neste trabalho também foram realizadas as resoluções quimio-enzimáticas dos ($\pm$)-*o*-iodofeniletanol (**2a**), ($\pm$)-*m*-iodofeniletanol (**3a**), ($\pm$)-*p*-iodofeniletanol (**4a**), ($\pm$)-2-azido-1-feniletanol (**13a**), ($\pm$)-2-azido-1-(4-metoxifenil)etanol (**14a**), ($\pm$)-2-azido-1-(4-bromofenil)etanol (**15a**), ($\pm$)-2-azido-1-(4-nitrofenil)etanol (**16a**) e ($\pm$)-2-azido-1-(4-clorofenil)etanol (**17a**) com a lipase CALB. Os (*S*)-*m*-iodofeniletanol (**3a**) e (*S*)-*p*-iodofeniletanol (**4a**) foram obtidos com excelentes excessos enantioméricos (>99%) e posteriormente foram utilizados na síntese de compostos bifenílicos quirais por reação de acoplamento Suzuki fornecendo bons rendimentos (63-65%). A resolução quimio-enzimática dos azido-alcoóis **13a-17a** foram realizadas com lipase *Candida antarctica* e os (*R*)-2-azido-1-feniletanol (**13a**), (*R*)-2-azido-1-(4-metoxifenil)etanol (**14a**), (*R*)-2-azido-1-(4-bromofenil)etanol (**15a**), (*R*)-2-azido-1-(4-nitrofenil)etanol (**16a**) obtidos foram utilizados na síntese dos triazóis quirais (*R*)-2-(1H-benzo[d][1,2,3]triazol-1-il)-1-feniletanol (**13**), (*R*)-2-(1H-benzo[d][1,2,3]triazol-1-il)-1-(4-metoxifenil)etanol (**14**), (*R*)-2-(1H-benzo[d][1,2,3]triazol-1-il)-1-(4-bromofenil)etanol (**15**) e (*R*)-2-(1H-benzo[d][1,2,3]triazol-1-il)-1-(4-nitrofenil)etanol (**16**) e (*R*)-2-(1H-benzo[d][1,2,3]triazol-1-il)-1-(4-clorofenil)etanol (**17**), obtidos com ótimos rendimentos (79-85%).

ABSTRACT

This work involved reactions of biocatalysis in order to obtain enantiomerically pure compounds. Thus reactions were performed reduction of acetophenones derivatives, enzymatic resolution of azido-alcohols, secondary alcohols and immobilization of fungal cells on solid supports for use in biocatalysis. We performed the enantioselective reduction of 1-(4-methoxyphenyl)ethanone (**1**) by screening with nine marine fungi (*Aspergillus sydowii* CBMAI 935, *A. sydowii* CBMAI 934, *A. sclerotiorum* CBMAI 849, *Bionectria* sp. CBMAI 936, *Beauveria felina* CBMAI 738, *Cladosporium cladosporioides* CBMAI 857, *Mucor racemosus* CBMAI 847, *Penicillium citrinum* CBMAI 1186, *P. miczynskii* CBMAI 930). The fungi *A. sydowii* CBMAI 935 and *Bionectria* sp. 936 CBMAI catalyzed stereoselective bioreduction of 1-(4-methoxyphenyl)ethanone (**1**) to the corresponding (*R*)-1-(4-methoxyphenyl)ethanol (**1a**) with excellent enantiomeric excess (>99%). Fungi *B. felina* CBMAI 738 and *P. citrinum* 1186 CBMAI catalyzed stereoselective bioreduction of ketone **1** to the corresponding *S*-alcohol **1a** with 69% enantiomeric excess. The marine fungi (*A. sclerotiorum* CBMAI 849, *A. sydowii* CBMAI 934, *B. felina* CBMAI 738, *M. racemosus* CBMAI 847, *P. citrinum* CBMAI 1186, *P. miczynskii* CBMAI 931, *P. miczynskii* CBMAI 830, *P. oxalicum* CBMAI 1185, *Trichoderma* sp. CBMAI 932) were used in the bioconversion of asymmetric iodoacetophenones **2-4** to the corresponding iodophenylethanols **2a-4a**. All marine fungi produced exclusively (*S*)-*o*-iodophenylethanol (**2a**) and (*S*)-*m*-iodophenylethanol (**3a**) with different values of enantiomeric excess (62-99%). Fungi *B. felina* CBMAI 738, *P. miczynskii* CBMAI 830, *P. oxalicum* CBMAI 1185 and *Trichoderma* sp. CBMAI 932 produced the corresponding (*R*)-*p*-iodophenylethanol (**4a**) with enantiomeric excess of 32-99%. The bioconversion of *p*-iodoacetophenone (**4**) with microbial cells of *P. oxalicum* CBMAI 1185 showed a competition between oxidation and reduction reaction. Were also performed reductions of azido-ketones **13-16** with marine fungi providing good results of selectivity (28-99% *ee*). Microbial cells of fungi *A. sclerotiorum* CBMAI 849 and *P. citrinum* CBMAI 1186 were immobilized on supports of silica gel, silica xerogel and chitosan. Whole cells of *P. citrinum* 1186 CBMAI immobilized on chitosan catalyzed the reduction of 1-(4-methoxyphenyl)ethanone (**1**) to the corresponding (*S*)-1-(4-methoxyphenyl)ethanol (**1a**) with excellent enantiomeric excess (>99%). The fungus *P. citrinum* 1186 CBMAI immobilized on chitosan also catalyzed the bioreduction of 2-chloro-1-phenylethanone (**7**) to 2-chloro-1-phenylethanol (**7a**), but in this case without selectivity. In this work were also performed chemo-enzymatic resolutions of ($\pm$)-*o*-iodophenylethanol (**2a**), ($\pm$)-*m*-iodophenylethanol (**3a**), ($\pm$)-*p*-iodophenylethanol (**4a**), ($\pm$)-2-azido-1-phenylethanol (**13a**), ($\pm$)-2-azido-1-(4-methoxyphenyl)ethanol (**14a**), ($\pm$)-2-azido-1-(4-bromophenyl)ethanol (**15a**), ($\pm$)-2-azido-1-(4-nitrophenyl)ethanol (**16a**) and ($\pm$)-2-azido-1-(4-chlorophenyl)ethanol (**17a**) with the lipase *Candida antarctica*. The (*S*)-*m*-iodophenylethanol (**3a**) and (*S*)-*p*-iodophenylethanol (**4a**) were obtained with excellent enantiomeric excess (>99%) and were subsequently used in the synthesis of chiral biphenyl compounds by the Suzuki reaction with good yields (63-65%). Chemoenzymatic resolution of azido-alcohols **13a-17a** were carried out using lipase CALB and (*R*)-2-azido-1-phenylethanol (**13a**), (*R*)-2-azido-1-(4-methoxyphenyl)ethanol (**14a**), (*R*)-2-azido-1-(4-bromophenyl)ethanol (**15a**), (*R*)-2-azido-1-(4-nitrophenyl)ethanol (**16a**) obtained were used in the synthesis of chiral triazoles (*R*)-2-(1H-benzo[d][1,2,3]triazol-1-yl)-1-phenylethanol (**13**), (*R*)-2-(1H-benzo[d][1,2,3]triazol-1-yl)-1-(4-methoxyphenyl)ethanol (**14**) (*R*)-2-(1H-benzo[d][1,2,3]triazol-1-yl)-1-(4-bromophenyl)ethanol (**15**) and (*R*)-2-(1H-benzo[d][1,2,3]triazol-1-yl)-1-(4-nitrophenyl)ethanol (**16**) and (*R*)-2-(1H-benzo[d][1,2,3]triazol-1-yl)-1-(4-chlorophenyl)ethanol (**17**) obtained in good yields (79-85%) .

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	1
1.1	Biocatálise e biotransformação	1
1.2	Propostas mecanísticas para seletividade de reações enzimáticas	2
1.3	Vantagens do uso de células totais nas transformações de compostos orgânicos	4
1.4	Aplicações de reações de biocatálise e biotransformação	5
1.5	Uso de organismos marinhos em biocatálise e biotransformação	11
1.6	Aplicações de biotransformação e biocatálise na indústria	14
1.7	Lipases	18
1.7.1	Mecanismo de reação da lipase CALB em resolução de alcoóis secundários	18
1.7.2	Enantiosseletividade enzimática	20
1.7.3	Exemplos de resoluções cinéticas mediadas por lipases	22
1.8	Imobilização	25
2	OBJETIVOS	33
3	MATERIAIS E MÉTODOS	34
3.1	Reagentes e solventes	34
3.2	Identificação e quantificação dos compostos	34
3.3	Evaporadores rotativos e agitadores orbitales	36
3.4	Outros equipamentos	36
3.5	Síntese das ceto-azidas	37
3.6	Síntese dos alcoóis racêmicos utilizados como padrões	38
3.7	Coleta e identificação dos fungos marinhos	41
3.8	Composição da água do mar artificial	42
3.9	Meios de cultivo para o crescimento dos fungos marinhos	42
3.9.1	Meio líquido de extrato de malte 2% (M2)	42
3.9.2	Meio sólido de extrato de malte 2% (MA2)	42
3.9.3	Repique e crescimento das células microbianas	42
3.9.4	Solução tampão de Sorensen (Na_2HPO_4 - KH_2PO_4)	43
3.10	Reações de biorredução com fungos marinhos	43
3.11	Extração e purificação das reações de biorredução para determinação dos rendimentos isolados dos alcoóis	43
3.12	Resolução quimio-enzimática	43

3.12.1 Síntese dos padrões dos acetatos racêmicos	43
3.12.2 Resolução enzimática com lipase CALB	46
3.13 Procedimento experimental para a reação de acoplamento de Suzuki dos alcoóis quirais iodados 2a-4a	46
3.14 Procedimento da síntese dos triazóis	47
3.15 Procedimento para imobilização das células microbianas	48
3.15.1 Preparação do suporte xerogel de sílica	48
3.16 Imobilização das células dos fungos <i>A. sclerotiorum</i> CBMAI 849 e <i>P. citrinum</i> CBMAI 1186 em suporte de sílica gel, xerogel de sílica e quitosana.....	48
3.17 Microscopia eletrônica de varredura.....	49
3.18 Redução da 1-(4-metoxifenil)etanona (1) e 2-cloro-1-feniletanona (7) por células imobilizadas de <i>A. sclerotiorum</i> CBMAI 849 e <i>P. citrinum</i> CBMAI 1186.....	49
4 RESULTADOS E DISCUSSÕES	50
4.1 Biorredução da 1-(4-metoxifenil)etanona (1) com fungos marinhos.....	50
4.2 Bioconversão das iodoacetofenonas 2-4 com fungos marinhos.....	56
4.3 Biorredução das ceto-azidas 13-16 por fungos marinhos	67
4.4 Biorredução da 1-(4-metoxifenil)etanona (1) e da 2-cloro-1-feniletanona (7) com fungos marinhos imobilizados em sílica gel, xerogel de sílica e quitosana.....	72
4.5 Resolução quimio-enzimática de iodofeniletanóis 2a-4a por lipase CALB e sua aplicação em síntese de compostos quirais.....	84
4.6 Resolução quimio-enzimática dos azidofeniletanóis 13a-17a por lipase CALB.....	92
4.7 Identificação e caracterização dos triazóis 18-22	99
5 CONCLUSÕES	121
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	123

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Representação esquemática para a catálise enzimática.....	2
Figura 2 - Modelo da aproximação do substrato ao sítio ativo da enzima como uma chave-fechadura.	2
Figura 3 - Mecanismo ilustrativo do encaixe induzido.	3
Figura 4 - Ilustração da regra dos três pontos frente à seletividade das reações enzimáticas em substratos com quiralidade centrada em carbono sp^3 e carbono sp^2	4
Figura 5 - Percentual de artigos publicados com enzimas e células inteiras em diferentes meios de reação.....	6
Figura 6 - Pesquisa realizada na <i>Web of Science Database online</i> com o número de artigos utilizando como palavras-chave “Bioreduction and acetophenone”, “Bioreduction and ketones”, “Bioreduction and marine” e “Bioconversion and marine”.....	14
Figura 7 - Esquema geral das etapas da planta industrial para síntese industrial do (S)-1-fenilpropanol.....	16
Figura 8 - Anfetaminas obtidas a partir do precursor (S)-1-fenilpropan-2-ol.	17
Figura 9 - Representação do diagrama reacional da reação catalisada por uma enzima com os dois enantiômeros de uma mistura racêmica.....	20
Figura 10 - Representação da variação da energia livre do sistema (ΔG) em função da reação catalisada pela enzima.	20
Figura 11 - Diferentes métodos de imobilização celular de micro-organismos ou enzimas, adaptado de Pilkington.	26
Figura 12 - Pesquisa realizada na <i>Web of Science Database online</i> com o número de artigos que utilizam como palavras-chave “Cells immobilization marine”, “Cells immobilization”, “Whole cells immobilization” e “Whole cells immobilization marine”.	28
Figura 13 - Micrografia do fungo <i>A. terreus</i> CCT 3320 imobilizado em (A) fibras de crisotila, (B) e em celulose/TiO ₂	30
Figura 14 - Imobilização de <i>S. cerevisiae</i> em fibras de alginato de cálcio com dupla-camada.	30
Figura 15 - Cetonas proquirais para as reações biocatalíticas.	34
Figura 16 - Cromatogramas obtidos por GC-FID em coluna quiral de β -ciclodextrina.	51
Figura 17 - Cromatogramas das reações de redução da 1-(4-metoxifenil)etanona (1) com as células dos fungos marinhos.....	52

Figura 18 - Transferência de íons hidreto da nicotinamida na forma reduzida (NADH/NADPH) para o grupo carbonílico.	53
Figura 19 - Ressonância do 1-(4-metoxifenil)etanona (1).	54
Figura 20 - Cromatogramas das reações de redução da <i>o</i> -iodoacetofenona (2) com as células dos fungos marinhos <i>Trichoderma</i> sp. CBMAI 932, <i>P. oxalicum</i> CBMAI 1185 e <i>P. citrium</i> CBMAI 1186.	58
Figura 21 - Cromatogramas da reação de redução da <i>p</i> -iodoacetofenona (4) para o correspondente (<i>R</i>)-1-(4-iodofenil)etanol (4a) com as células do fungo marinho <i>Trichoderma</i> sp. CBMAI 932.	60
Figura 22 - Cromatogramas das reações de redução da <i>p</i> -iodoacetofenona (4) para o correspondente <i>R</i> -álcool 4a com as células do fungo marinho <i>P. oxalicum</i> CBMAI 1185.	61
Figura 23 - Cromatogramas da reação de oxidação da <i>p</i> -iodofeniletanol (4a) com as células do fungo marinho <i>P. oxalicum</i> CBMAI 1185.	62
Figura 24 - Cromatogramas e espectro de massas: (A) Padrão 4-hidroxi-3-iodoacetofenona (5); (B) Padrão 4-(1-hidroxietil)-iodofenol (5a).	64
Figura 25 - Cromatogramas da reação com a 4-hidroxi-3-iodoacetofenona (5) catalisada pelo fungo <i>P. oxalicum</i> CBMAI 1185 e espectro de massas do 2-iodobenzeno-1,4-diol (5d).	65
Figura 26 - Cromatogramas da resolução do (±)-2-azido-1-feniletanol (13a) com fungos marinhos.	70
Figura 27 - Cromatogramas da resolução do (±)-2-azido-1-(4-metoxifenil)etanol (14a) com fungos marinhos.	70
Figura 28 - Cromatogramas da resolução do (±)-2-azido-1-(4-bromofenil)etanol (15a) com fungos marinhos.	71
Figura 29 - Cromatogramas da resolução do (±)-2-azido-1-(4-nitrofenil)etanol (16a) com fungos marinhos.	71
Figura 30 - Biorredução da 1-(4-metoxifenil)etanona (1) com o fungo <i>P. citrinum</i> CBMAI 1186 com e sem imobilização.	76
Figura 31 - Biorredução da 1-(4-metoxifenil)etanona (1) com o fungo <i>A. sclerotiorum</i> CBMAI 849 com e sem imobilização.	76
Figura 32 - Biorredução da 2-cloro-1-feniletanona (7) com o fungo <i>P. citrinum</i> CBMAI 1186 com e sem imobilização.	77
Figura 33 - Biorredução da 2-cloro-1-feniletanona (7) com o fungo <i>P. citrinum</i> CBMAI 1186 com e sem imobilização.	77

Figura 34 - Digitalização das micrografias por microscopia eletrônica varredura.	78
Figura 35 - Digitalização das micrografias por microscopia eletrônica de varredura.	79
Figura 36 - Biorredução da 4-metoxiacetofenona (1) com as células microbianas livres dos fungos <i>P. citrinum</i> CBMAI 1186 e <i>A. sclerotiorum</i> CBMAI 849 preservadas por 30 dias.	82
Figura 37 - Biorredução da 2-cloro-1-feniletanona (7) com as células microbianas livres dos fungos <i>P. citrinum</i> CBMAI 1186 e <i>A. sclerotiorum</i> CBMAI 849 preservadas por 30 dias.	82
Figura 38 - Biorredução da 4-metoxiacetofenona (1) com as células microbianas imobilizadas dos fungos <i>P. citrinum</i> CBMAI 1186 e <i>A. sclerotiorum</i> CBMAI 849 preservadas por 30 dias.	82
Figura 39 - Biorredução da 2-cloro-1-feniletanona (7) com as células microbianas imobilizadas dos fungos <i>P. citrinum</i> CBMAI 1186 e <i>A. sclerotiorum</i> CBMAI 849 preservadas por 30 dias.	83
Figura 40 - Cromatogramas da resolução do (±)-iodofeniletanol (2a) com a lipase CALB.	85
Figura 41 - Cromatogramas da resolução do (±)-iodofeniletanol (3a) com lipase CALB.	86
Figura 42 - Cromatogramas da resolução do (±)-iodofeniletanol (4a) com a lipase CALB.	87
Figura 43 - Ilustração das cavidades do sítio catalítico de uma lipase e os enantiômeros de um álcool quiral contendo um grupo volumoso (esfera G) e um grupo pequeno ou de menor volume (esfera P).	89
Figura 44 - Principais tipos de interações responsáveis pela estrutura terciária das enzimas.	89
Figura 45 - Enantiopreferência em reações enzimáticas de hidrólise de ésteres e esterificação de alcoóis secundários de acordo com o modelo empírico de Kazlauskas.	90
Figura 46 - Fármacos S-pronolol e R-denopamina.	92
Figura 47 - Cromatogramas da resolução do (±)-2-azido-1-feniletanol (13a) com a lipase CALB.	94
Figura 48 - Cromatogramas da resolução do (±)-2-azido-1-(4-metoxifenil)etanol (14a) com a lipase CALB.	95
Figura 49 - Cromatogramas da resolução do (±)-2-azido-1-(4-bromofenil)etanol (15a) com a lipase CALB.	95
Figura 50 - Cromatogramas da resolução do (±)-2-azido-1-(4-nitrofenil)etanol (16a) com a lipase CALB.	96
Figura 51 - Cromatogramas da resolução do (±)-2-azido-1-(4-clorofenil)etanol (17a) com a lipase CALB.	96
Figura 52 - Correlações observadas no espectro de HSBC para o metoxi-triazol 19	100
Figura 53 - Correlações observadas no espectro de HMBC para a metoxi-triazol 19	101
Figura 54 - Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) do metoxi-triazol 19	104

Figura 55 - Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) do metoxi-triazol 19	104
Figura 56 - Espectro de RMN 2D (HSQC, 400 MHz, CDCl_3) do metoxi-triazol 19	105
Figura 57 - Espectro de RMN 2D (HMBC, 400 MHz, CDCl_3) do metoxi-triazol 19	106
Figura 58 - Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) do triazol 18	107
Figura 59 - Espectro de RMN 2D (HSQC, 400 MHz, CDCl_3) do triazol 18	108
Figura 60 - Espectro de RMN 2D (HMBC, 400 MHz, CDCl_3) do triazol 18	109
Figura 61 - Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) do bromo-triazol 20	111
Figura 62 - Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) do bromo-triazol 20	111
Figura 63 - Espectro de RMN 2D (HSQC, 400 MHz, CDCl_3) do bromo-triazol 20	112
Figura 64 - Espectro de RMN 2D (HMBC, 400 MHz, CDCl_3) do bromo-triazol 20	113
Figura 65 - Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) do cloro-triazol 22	115
Figura 66 - Espectro de RMN 2D (HSQC, 400 MHz, CDCl_3) do cloro-triazol 22	116
Figura 67 - Espectro de RMN 2D (HMBC, 400 MHz, CDCl_3) do cloro-triazol 22	117
Figura 68 - Espectro de RMN de ^1H (200 MHz, DMSO) do nitro-triazol 21	120
Figura 69 - Espectro de RMN de ^{13}C (50 MHz, DMSO) do nitro-triazol 21	120

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1 - Sistemas de reciclagem dos cofatores em reações de redução	8
Esquema 2 - Redução e oxidação via complexação do íon Zn^{2+} e NADH no sítio ativo para álcool desidrogenase.....	9
Esquema 3 - Redução de α -acetofenonas por <i>Rhodotorula</i> sp. AS.2241.....	10
Esquema 4 - Desracemização de alcoóis racêmicos <i>p</i> -substituídos por células totais de fungos terrestres.....	10
Esquema 5 - Biorredução dos α - e β -ceto ésteres por microalgas marinhas como biocatalisadores.	12
Esquema 6 - Redução de α -ceto ésteres por actinomicetos marinhos.....	13
Esquema 7 - Biorredução de grupos carbonílicos por cepas de actinomicetos marinhos.....	13
Esquema 8 - Biorredução de fluorocetonas por <i>P. methanolica</i> SC 13825.....	14
Esquema 9 - Redução assimétrica da α -clorocetona por <i>Streptomyces nodosus</i> SC 13149.....	15
Esquema 10 - Síntese da L-carnitina envolvendo uma etapa quimio-enzimática.....	15
Esquema 11 - Biorredução do 1-fenilpropan-2-ona por álcool desidrogenase de <i>Rhodococcus erythropolis</i>	16
Esquema 12 - Ciclo catalítico de uma reação de acilação enantiosseletiva de alcoóis secundários quirais mediada pela tríade catalítica da lipase CALB.	19
Esquema 13 - Esterificação regioseletiva do cloranfenicol catalisada por lipase CALB.	23
Esquema 14 - Transesterificação do estiripentol utilizando lipase CALA.....	23
Esquema 15 - Resolução cinética dos β -hidroxichalcogênios em <i>sc</i> -CO ₂	24
Esquema 16 - Resolução cinética do acetato de ($\pm$)-1-feniletila por lipase CALB.	24
Esquema 17 - Imobilização da CPO em membrana de quitosana.....	29
Esquema 18 - Oxidação do sulfeto para sulfóxido por células livres e imobilizadas do fungo <i>A. terreus</i> CCT 3320.	30
Esquema 19 - Redução do 2-oxo-2-fenilacetato de etila por células de <i>S. cerevisiae</i> imobilizadas em alginato de cálcio.	31
Esquema 20 - Redução assimétrica da 4-fenilbutan-2-ona e da 1-fenoxipropan-2-ona pela enzima w 110a TeADH.....	31
Esquema 21 - Redução da 2-fluoroacetofenona pelo fungo <i>G. candidum</i> NBRC 5767 imobilizado sob <i>sc</i> -CO ₂	32
Esquema 22 - Síntese das ceto-azidas.	37

Esquema 23 - Síntese dos alcoóis racêmicos.....	39
Esquema 24 - Síntese de acetatos racêmicos.....	44
Esquema 25 - Reações de acoplamento cruzado de Suzuki.....	47
Esquema 26 - Síntese dos triazóis quirais.....	48
Esquema 27 - Biorredução da 1-(4-metoxifenil)etanona (1) para (<i>S</i>)- ou (<i>R</i>)-1-(4-metoxifenil)ethanol (1a) por fungos marinhos.....	50
Esquema 28 - Biorredução das iodoacetofenonas 2-4 para <i>S</i> - ou <i>R</i> -iodofeniletanois 2a-4a por fungos marinhos.	56
Esquema 29 - Bioconversão da 4-hidroxi-3-iodoacetofenona (5) com as células do fungo <i>P. oxalicum</i> CBMAI 1185.	63
Esquema 30 - Biorredução das ceto-azidas 13-16 para os correspondentes azido-alcoóis 13a-16a	67
Esquema 31 - Biorredução das 1-(4-metoxifenil)etanona (1) e 2-cloro-1-feniletanona (7) pelas células imobilizadas dos fungos marinhos.....	72
Esquema 32 - Reações de acoplamento cruzado de Suzuki.....	91
Esquema 33 - Síntese da temabime a partir dos (<i>R</i>)-2-azido-1-(4-metoxifenil)etanol.	93
Esquema 34 - Síntese dos triazóis quirais.....	98

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Biorredução da 1-(4-metoxifenil)etanona (1) com fungos marinhos.....	50
Tabela 2 - Bioconversão das iodoacetofenonas 2-4 por fungos marinhos.	57
Tabela 3 - Reação de oxidação-redução de <i>p</i> -iodofeniletanol (4a) com o fungo marinho <i>P. oxalicum</i> CBMAI 1185.....	62
Tabela 4 - Biorredução das ceto-azidas 13-16 por fungos marinhos.	68
Tabela 5 - Redução da 1-(4-metoxifenil)etanona (1) e 2-cloro-1-feniletanona (7) pelas células totais livres e imobilizadas ^a	73
Tabela 6 - Redução da 1-(4-metoxifenil)etanona (1) e 2-cloro-1-feniletanona (7) pelas células totais livres e imobilizadas em sílica gel após 30 dias ^a	80
Tabela 7 - Resolução quimio-enzimática dos (±)-iodofeniletanóis 2a-4a usando acetato de vinila e lipase CALB em hexano ^a	84
Tabela 8 - Dados de rotação experimental e da literatura para os alcoóis 2a-4a e do acetato 2b-4b	88
Tabela 9 - Resolução enzimática dos (±)-azido-alcoóis 13a-17a usando acetato de vinila e lipase CALB em hexano ^a	92
Tabela 10 - Dados de rotação experimental e da literatura para os azido-alcoóis 13a-17a e dos azido-acetatos 13b-17b	97
Tabela 11 - Dados de rotação óptica experimental dos triazóis 18-20 e 22	99
Tabela 12 - Experimentos de RMN de ¹ H, ¹³ C, HSQC e HMBC para o metoxi-triazol 19	102
Tabela 13 - Experimentos de RMN de ¹ H, ¹³ C, HSQC e HMBC o triazol 18	102
Tabela 14 - Experimentos de RMN de ¹ H, ¹³ C, HSQC e HMBC para o bromo-triazol 20	102
Tabela 15 - Experimentos de RMN de ¹ H, ¹³ C, HSQC e HMBC para o triazol 22	103

1 INTRODUÇÃO

1.1 Biocatálise e biotransformação

Os termos biocatálise ou biotransformação referem-se aos processos no qual um catalisador biológico é utilizado para a conversão de um substrato (composto orgânico) em produto por um número limitado de etapas enzimáticas, sendo o biocatalisador a enzima, o principal agente dessas reações (DEMIRJIAN, 2000). Estima-se que a biocatálise, também denominada “White biotechnology” será responsável pela produção global de 20% de todas as substâncias químicas não naturais até 2020 (ANTHONSEN, 2009). As enzimas são, em geral, proteínas de grande complexidade estrutural que atuam como catalisadores na maioria das reações químicas do metabolismo celular. São constituídas por resíduos de aminoácidos, unidos por ligações peptídicas e possuem massa molar que pode variar de milhares a milhões de Daltons (g/mol). Estas macromoléculas altamente especializadas na catálise de reações químicas exercem funções vitais nos organismos vivos e dependendo de sua atividade catalítica e do organismo que as sintetizou, apresentam características bastante peculiares (SILVERMAN, 2000). As enzimas apresentam os principais tipos de seletividades desejadas, tais como, quimiosseletividade, pois reagem preferencialmente com um grupo funcional presente no substrato; regioseletividade distinguem entre posições específicas de grupos funcionais posicionados no substrato; e enantioseletividade, as enzimas podem formar enantiômeros com elevados excessos enantioméricos (SILVERMAN, 2000).

A partir da estrutura protéica pode-se compreender melhor as propriedades catalíticas das enzimas. O primeiro ponto a ser considerado é a grande diferença de tamanho entre a enzima e seu substrato. As moléculas dos substratos devem ligar-se à enzima em uma região específica de sua superfície, chamada de *sítio ativo*. O sítio ativo é uma cavidade com forma definida, aberta na superfície da enzima e constituída por aminoácidos. É a forma definida do sítio ativo que confere a especificidade à catálise enzimática. Para ser reconhecida como substrato a molécula deve ter a forma adequada para acomodar-se no sítio ativo e os seus grupos químicos devem ser capazes de estabelecer ligações com os grupos presentes do sítio ativo. As interações do substrato com o sítio ativo da enzima ocorrem por ligação de hidrogênio, dipolo-dipolo e forças de Van der Waals (URGEL *et al.*, 2001).

O complexo enzima-substrato [En-S] (Figura 1) tem papel central na catálise enzimática, pois são o ponto de partida para os tratamentos matemáticos que definem o comportamento

cinético das reações catalisadas enzimaticamente e para as descrições teóricas dos mecanismos enzimáticos especialmente aqueles que envolvem misturas racêmicas de substratos (NELSON & COX, 2004). A figura 1 mostra uma representação esquemática da interação do substrato com o sítio ativo da enzima frente à catálise enzimática.

Figura 1 - Representação esquemática para a catálise enzimática.

1.2 Propostas mecanísticas para seletividade de reações enzimáticas

Existem algumas propostas mecanísticas em relação às especificidades dos substratos frente às reações catalisadas pelas enzimas. Emil Fisher (1894) propôs que o substrato deverá ajustar-se ao sítio ativo da enzima perfeitamente, como uma chave-fechadura o qual denominou “modelo chave-fechadura”. Neste modelo o substrato e o sítio catalítico da enzima são estruturalmente complementares em tamanho, forma e natureza química, portanto um sistema altamente rígido e definido (Figura 2) (FABER, 2004).

Figura 2 - Modelo da aproximação do substrato ao sítio ativo da enzima como uma chave-fechadura.

O modelo chave-fechadura falha ao considerar o substrato e a enzima como entidades rígidas, quando na verdade ocorrem mudanças conformacionais devido à interação entre o ligante (chave) e o receptor (fechadura), e que este modelo não representa uma catálise enzimática “verdadeira”. É justamente essa flexibilidade um dos fatores que permite que moléculas estruturalmente semelhantes apresentem conformações e orientações relativas distintas no sítio de ligação do receptor (enzima) e como consequência, atividades e afinidades entre substratos tornam-se ligeiramente distintas (FABER, 2004). Além desta variabilidade conformacional

intrínseca de estruturas protéicas, diversas teorias referem-se à ocorrência de mudanças conformacionais em enzimas, induzidas pelo substrato e/ou pelo ligante, dentre as quais se pode destacar a teoria do encaixe induzido (“Induced Fit”) ou interação flexível. A teoria do encaixe induzido foi proposta por Koshland, baseada em sistemas enzimáticos (KOSHLAND *et al.*, 1966). Nesta teoria sugere-se que através da complexação, o substrato induz uma ligeira mudança conformacional na subunidade da enzima com a qual interage. Esta mudança pode ser transmitida às subunidades vizinhas, induzindo na enzima a conformação que será responsável pela catálise (FERSHT, 1998). Portanto, a teoria do encaixe induzido considera a capacidade do ligante em promover ou induzir uma modificação da estrutura tridimensional do receptor biológico, ao mesmo tempo em que este receptor tem a propriedade de reconhecer uma ou um conjunto de conformações dos ligantes, que neste caso, são os substratos (TESTA, 2000). Este após causar a mudança conformacional de seu receptor, estará induzindo-o a adotar a conformação responsável para seu reconhecimento (Figura 3) (VERLI & BARREIRO, 2005).

Figura 3 - Mecanismo ilustrativo do encaixe induzido.

Outro modelo para demonstrar a especificidade das reações enzimáticas foi proposta por Ogston 1948, conhecida como a “regra dos três pontos”. O alto grau de seletividade obtido na catálise enzimática é devido ao substrato encaixar-se perfeitamente em um espaço tridimensional. Pela “regra dos três pontos”, o substrato tem três pontos distintos através dos quais pode encaixar-se no sítio ativo da enzima, isto pode ser exemplificado, pela discriminação entre os enantiômeros de um substrato racêmico, com a quiralidade centrada em um carbono sp^3 . Os compostos que possuem uma pro-quiralidade planar envolvendo carbono sp^2 a regra dos três pontos também pode ser racionalizada. Na figura 4, no caso I a interação dos grupos “coloridos” do enantiômero é complementar aos grupos “brancos” do sítio da enzima frente ao operador

químico (enzima). Assim, a disposição espacial destes grupos leva a uma maior velocidade de reação, propiciando uma reação estereosseletiva. No caso II, observa-se que o outro enantiômero não tem boa interação dos grupos com a porção do sítio catalítico e, portanto, não é complementar ao sítio ativo da enzima. Neste caso a catálise enzimática será menos favorecida cineticamente e estereoquimicamente (OGSTON, 1948). Este modelo é muito utilizado frente às reações enzimáticas denominadas de resolução cinética ou quimio-enzimática, por exemplo, resolução de alcoóis racêmicos mediadas por lipases. Inclusive é possível propor por uma regra empírica, *regra de Kazlauskas*, qual o enantiômero será preferencialmente esterificado na catálise. Nesse caso há requisitos definidos a serem considerados como o tipo de lipase e a estrutura do substrato (GHANEM, 2007).

Figura 4 - Ilustração da regra dos três pontos frente à seletividade das reações enzimáticas em substratos com quiralidade centrada em carbono sp^3 e carbono sp^2 .

1.3 Vantagens do uso de células totais nas transformações de compostos orgânicos

Uma das metodologias mais comumente empregadas em biocatálise é realizada através da utilização das células totais de micro-organismos cultivados em meios de cultura apropriados, sob condições definidas de pH, temperatura, e neste caso, tem-se uma engenharia enzimática disponibilizada para catalisar inúmeras reações interesse. Para ter acesso ao potencial enzimático

é necessário que os organismos apresentem algumas vantagens, neste caso, destacam-se os micro-organismos, pois são robustos, apresentam crescimento rápido fornecendo elevadas quantidades de massas microbianas e produzem todas as enzimas necessárias para catalisar as diversas reações químicas, e ainda, são possíveis de serem cultivados em laboratório (DEMIRJIAN, 2000). A utilização de micro-organismos como biocatalisadores também é vantajosa, pois são aceitáveis ambientalmente (biodegradáveis), catalisam as reações em condições brandas de pH como na faixa de 5-8 e em temperaturas de 20°C a 40°C sob pressão atmosférica (FABER, 2004).

1.4 Aplicações de reações de biocatálise e biotransformação

A biocatálise é um dos campos mais promissores dentre as novas biotecnologias para síntese de compostos orgânicos de valor agregado. A exploração da biodiversidade na busca de catalisadores por técnicas de seleção de micro-organismos, de plantas ou células animais representam os métodos tradicionais na descoberta de novas enzimas para o desenvolvimento de processos em escala industrial. Os micro-organismos são de particular interesse, devido à diversidade de processos metabólicos e enzimas envolvidas e, há um número ilimitado na natureza que podem ser avaliados, os quais são bastante diferentes entre si (DEMIRJIAN, 2000).

Foi a partir do fim da década de 80 que a biocatálise teve o seu maior impulso, principalmente devido à quebra do paradigma de que as enzimas só poderiam atuar em meio aquoso e de que seriam específicas para promoverem reações frente somente aos substratos naturais. A utilização de enzimas em meios não convencionais (solventes orgânicos) permitiu aplicar estes biocatalisadores em reações de sínteses quimio-enzimáticas. O potencial desta aplicação foi incrementado pelo fato de que em meios não aquosos as enzimas exibem seletividade, não só em quimiosseletividade, mas especialmente de enantiosseletividade. O fato das enzimas resolverem misturas racêmicas via processos de resolução quimio-enzimática foi de encontro às necessidades das indústrias farmacêuticas para a obtenção de compostos enantiomericamente puros (FABER, 2004). No entanto, a aplicação imediata desta tecnologia ficou condicionada pelos elevados custos associada aos biocatalisadores. Deste modo, a biocatálise nos últimos 20 anos tem sido direcionada para áreas como a biologia molecular e as ciências dos materiais, com o intuito de desenvolver biocatalisadores mais ativos, estáveis e seletivos, passíveis de serem utilizados pela indústria a um custo mais acessível. Assim, o emprego de células totais de micro-organismos nos processos de biotransformações se tornou bem conhecido (comumente

denominado de processo fermentativo) e são utilizados para catalisar um grande número de reações químicas (BARBIERI *et al.*, 2001).

A maioria dos trabalhos publicados em biocatálise na última década envolveu a utilização de enzimas em meios orgânicos e líquidos iônicos. Contudo, ainda são poucos os estudos envolvendo o uso de células inteiras em biocatálise com aplicação industrial visando à síntese de enantiômeros frente ao número de micro-organismos presentes na natureza (CARVALHO, 2011) (Figura 5).

Figura 5 - Percentual de artigos publicados com enzimas e células inteiras em diferentes meios de reação (CARVALHO, 2011).

O futuro da indústria de química fina, essencialmente devido às crescentes exigências de excessos enantioméricos dos compostos, bem como, as questões ambientais, faz com que as etapas de sínteses das reações químicas convencionais sejam gradativamente substituídas por processos biotecnológicos mais promissores (ANTHOSEN, 2009).

Deve-se destacar que, embora muitos avanços foram alcançados na área de biocatálise, há ainda desafios, como desenvolver reações enzimáticas utilizando-se compostos xenobióticos em meio aquoso, realizar reações em escala piloto, bem como aumentar o rendimento nos processos enzimáticos na produção de insumos químicos e obter enzimas com menores custos.

A indústria de química fina vem utilizando os biocatalisadores devido à extraordinária capacidade de reconhecimento quiral estereosseletivo das enzimas (ISHIGE *et al.*, 2005). Substâncias usadas como fármacos quirais não devem ser empregadas na forma de racematos, já que as diferenças existentes entre as formas espaciais de cada enantiômeros significam diferenças entre suas propriedades químicas, físicas e principalmente biológicas, influenciando diretamente na atividade do fármaco (PILLI, 2001). Para um fármaco quiral ser aprovado por uma agência reguladora, por exemplo, *Food and Drug Administration* (FDA), dos Estados Unidos, é preciso

ter um excesso enantiomérico (*ee*) no mínimo de 99,5%. Esta alta seletividade pode facilmente ser alcançada através de processos biocatalíticos (FABER, 2004). Para isso, naturalmente há a necessidade de que sejam realizados estudos a fim de selecionar o agente biológico (a enzima) e as condições adequadas para que a transformação de um determinado substrato forneça a seletividade desejada. Uma das formas de selecionar o biocatalisador mais adequado na transformação de uma determinada molécula é realizar uma triagem enzimática, sejam utilizando enzimas puras ou extratos enzimáticos ou mesmo células totais de organismos vivos (micro-organismos, plantas, algas). A escolha do biocatalisador vai depender, por exemplo, do custo do processo, a dependência ou não de cofatores e sua disponibilidade.

O uso de células microbianas pode ser aplicado, por exemplo, nas reações de redução de carbonilas de cetonas, pois fornece alta seletividade e exclui a necessidade de fornecer quantidades equimolares de coenzimas, como NADH/NAD⁺ ao sistema reacional, pois as enzimas e cofatores são sintetizados pelos organismos vivos e estão bem protegidos no seu ambiente celular (MANDAL *et al.*, 2004).

As enzimas oxidorredutases (desidrogenases e redutases) são responsáveis pela redução de grupos carbonílicos de aldeídos e cetonas (FABER, 2004). As alcoóis desidrogenases (ADHs) são responsáveis pela catálise na redução estereosseletiva de compostos carbonílicos e derivados (WONG & WHITESIDES, 1994). Das 134 biotransformações em escala industrial (>100 kg) 44% usam hidrolases e 30% oxidorredutases. Sendo as oxidorredutases a segunda classe de enzimas mais utilizadas na indústria (BOMMARIUS & RIEDEL, 2004).

Uma das formas de tornar um processo enzimático mais eficiente e com aplicação em maior escala é promover a reciclagem dos cofatores. Existem diferentes sistemas que permitem a reciclagem de cofatores envolvidos em reações de redução com o uso de enzimas complementares, células totais, substratos auxiliares e adição de aditivos ao meio reacional (Esquema 1).

Esquema 1 - Sistemas de reciclagem dos cofatores em reações de redução (FABER, 2004).

Na ausência de cofatores, determinadas classes de enzimas (oxidorreduktases) não promovem as reações químicas (CÁNOAS & IBORRA, 2005). O sistema de biotransformação depende do tipo de reação, do uso de cofatores, bem como da escala em que realizará a reação, entre outros parâmetros relevantes ao processo (FABER, 2004). O cofator pode ser um ou mais íons inorgânicos, tais como, Fe^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+} , ou uma molécula orgânica complexa chamada de coenzima ($NADH$, $NADPH$, $FADH_2$). Algumas enzimas requerem ambos, uma coenzima e um ou mais íons metálicos, para exibirem sua atividade catalítica. A coenzima que está covalentemente ligada à parte protéica da enzima é denominada de grupo prostético. As coenzimas funcionam como transportadoras transitórias de grupos funcionais específicos (NELSON & COX, 2004). Algumas enzimas alcoóis desidrogenases são dependentes de íons zinco, pois estes são ácidos de Lewis e auxiliam na ativação da carbonila durante a reação de redução. Assim, em alguns experimentos adicionam-se íons zinco durante o cultivo com *Saccharomyces cerevisiae*, pois a ADH é dependente deste cofator (MACLEOD, 1964). No esquema 2, tem-se a redução/ e oxidação de uma carbonila mediada pelos cofatores $NADH$ e íon zinco.

Esquema 2 - Redução e oxidação via complexação do íon Zn^{2+} e NADH no sítio ativo para álcool desidrogenase.

As enzimas alcoóis desidrogenases são encontradas em diversas fontes naturais além dos micro-organismos, tais como, algodão *Gossypium hirsutum* (MILLAR *et al.*, 1994), de girassol, *Helianthus annuus* (TORRES, 1974), soja, *Glycine max* (TANG & CHANG, 1990), pimentão, *Capsicum annuum* (SMITH & COBB, 1991), amendoim, *Arachis hypogaea* (CHUNG *et al.*, 1996), tabaco, *Nicotiana glauca* (ZARSKY *et al.*, 1994), morango, *Fragaria xananassa* (MITCHELL & JELENKOVIC, 1995), oliva, *Olea europaea* (SALAS & SANCHEZ, 1998), beterraba, *Beta vulgaris* (KONOVALOV, 1994).

Derivados de acetofenonas são substratos de interesse sintético e inúmeros estudos biocatalíticos vêm sendo realizados visando à obtenção de alcoóis quirais opticamente puros a partir de oxidoredutases de diferentes fontes naturais (BRZEZINSKA-RODAK *et al.*, 2006). No esquema 3, estão apresentados alguns exemplos de reações microbianas como o uso do fungo *Rhodotorula* sp. As 2.2241 na redução de α -halocetonas produzindo as correspondentes haloidrinas quirais (YANG *et al.*, 2006). O (*R*)-2-bromo-1-(4-nitrofenil)etanol obtido nesta reação foi utilizado na síntese do (*R*)-nifenalol um fármaco usado no tratamento de doenças cardíacas. As haloidrinas em geral são intermediários versáteis, que podem ser transformadas em compostos com importantes atividades biológicas, tais como, inibidores enzimáticos, feromônios, fármacos, etc.

Esquema 3 - Redução de α -acetofenonas por *Rhodotorula* sp. AS.2241.

Outro método enzimático que pode ser utilizado para a preparação de alcoóis enantiomericamente puros é denominado de desracemização ou estereoinversão. A desracemização consiste na transformação de uma mistura racêmica em um único enantiômero. A reação de desracemização fornece teoricamente 100% de conversão, e que não ocorre em uma resolução enzimática, onde o máximo de conversão obtido é de 50% (STRAUSS, 1999). Comasseto *et al.* estudaram a desracemização de alguns derivados *para*-substituídos de feniletanol, utilizando as células totais dos fungos *Aspergillus terreus* CCT 4083, *Aspergillus terreus* CCT 3320 e *Rhizopus oryzae* CCT 4964. Estes estudos demonstraram que os fungos *A. terreus* CCT 4083 e *A. terreus* CCT 3320 foram eficientes na desracemização destes compostos, com diferentes substituintes ($R = p\text{-NO}_2$, $p\text{-OMe}$, $p\text{-Br}$ e $p\text{-Cl}$). Os correspondentes alcoóis foram obtidos com excessos enantioméricos ($>99\% ee$) (COMASSETO *et al.*, 2004). No esquema 4, tem-se o processo da desracemização catalisadas pelos fungos.

Esquema 4 - Desracemização de alcoóis racêmicos *p*-substituídos por células totais de fungos terrestres.

1.5 Uso de organismos marinhos em biocatálise e biotransformação

Os oceanos cobrem mais de três quartos da superfície da Terra e assim oferecem abundantes recursos para pesquisa e desenvolvimento biotecnológico (RUSCH *et al.*, 2007). É neste ambiente que se encontram biocatalisadores a partir de várias fontes tais como: micro-organismos, algas, peixes, moluscos, esponjas, etc. Estes organismos vivos podem ser usados para transformar compostos orgânicos, xenobióticos, através das reações de biotransformação, biocatálise e biodegradação. Na literatura há muitos estudos de reações enzimáticas que envolvem biocatalisadores de origem terrestre, mas poucas reações catalisadas por organismos marinhos (organismos vivos ou enzimas purificadas) (VEBERLEN *et al.*, 2006). Organismos marinhos como algas, esponjas, moluscos e micro-organismos possuem um conjunto de enzimas que apresentam funções muito específicas para a aplicação em biocatálise, tais como, estabilidade em altas e baixas temperaturas, pH extremos, altas pressões, e principalmente, tolerância a elevadas concentrações de sais (ANTRANIKIAN *et al.*, 2005). De fato, o ambiente marinho é uma fonte muito rica em compostos extremamente potentes que exibem atividades significativas antitumoral, anti-inflamatória, analgésica, antialérgica e antivirais (NEWMAN & CRAGG, 2004; SAN-MARTÍN *et al.*, 2008). Além de fornecerem o maior número de produtos naturais marinhos conhecidos, deram origem a cerca de 65% das patentes existentes em antitumorais e antivirais (BONGIORNI & PIETRA, 1996). Dados da literatura descrevem alguns compostos isolados de algas que possuem atividade antiviral para herpesvírus (HSV-1, HSV-2 e HCMV), togavírus (Sindbis e Semliki), paramixovírus (RSV), rabdovírus (VSV) e retrovírus (SIV e HIV) (De CLERCQ, 2000).

Os fungos derivados de ambientes marinhos têm despertado interesse biotecnológico devido à capacidade de produzir metabólitos secundários e enzimas extracelulares diferentes daquelas produzidas por seus homólogos terrestres, pois os fungos estão adaptados às condições diferenciadas nos ecossistemas marinhos, como por exemplo, a alta salinidade (BUGNI & IRELAND, 2004; CHENG *et al.*, 2009). No entanto, apenas recentemente este grupo de micro-organismos de ambiente marinho tem atraído a atenção dos pesquisadores como potencial fonte para triagem de novos biocatalisadores em reações enantiosseletivas de interesse para a síntese orgânica (D'SOUZA *et al.*, 2006).

As microalgas marinhas *Chaetoceros gracilis*, *Chaetoceros* sp., *Nannochloropsis* sp., *Pavlova lutheri* e *Chorella* sp. foram utilizadas como biocatalisadores na redução estereosseletiva de α - e β -ceto-ésteres (Esquema 5). A microalga *C. gracilis* reduziu o benzoilformato de etila para o (*R*)-2-

hidroxi-2-fenilacetato de etila com uma conversão de 99% e excesso enantiomérico de 23%, e o 2-oxo-heptanoato de etila para o correspondente (*R*)-2-hidroxi-heptanoato de etila com conversão de 42% e excesso enantiomérico de 89%. O 3-metil-2-oxo-butanoato de etila foi reduzido pela microalga *Nannochloropsis* sp. para o correspondente (*S*)-1-etoxi-1-hidroxi-3-metilbutan-2-ona, com (98% ee) e (c = 99%). As microalgas (*Chaetoceros gracilis*, *Chaetoceros* sp., *Nannochloropsis* sp., *Pavlova lutheri*) foram capazes de catalisar a redução estereosseletiva do 2-metil-3-oxo-butanoato de etila para o correspondente *anti*-hidroxi éster com conversão de 25-68%. A microalga *Nannochloropsis* sp. catalisou a redução do 2-metil-3-oxo-butanoato de etila para o *anti*-hidroxi éster com excelente diasterosseletividade (*sin: anti* - 1:99) e enantiosseletividade (>99% ee) (ISHIHARA *et al.*, 2000; ISHIHARA *et al.*, 2001; ISHIHARA *et al.*, 2003).

Esquema 5 - Biorredução dos α - e β -ceto ésteres por microalgas marinhas como biocatalisadores.

Os actinomicetos marinhos, *Salinispora arenicola* e *Salinispora tropica*, são importantes produtores de compostos bioativos, tais como, arenimicina, um antibiótico resistente à metilicina, *Staphylococcus aureus* e salinisporamida A, um potente inibidor de proteassoma. A *S. arenicola* catalisou a redução de alguns α -ceto ésteres de cadeias curtas (2-oxo-propanoato de etila, 2-oxo-butanoato de etila e 2-oxo-pentanoato de etila) para os correspondentes alcoóis, com altas conversões e diferentes excessos enantioméricos: 2-hidroxi-propanoato de etila (c >99%, 50% ee), 2-hidroxi-butanoato de etila (c >99%, 77% ee) e 2-hidroxi-pentanoato de etila (c >99%, 73% ee) (Esquema 6) (ISHIHARA *et al.*, 2011).

Esquema 6 - Redução de α -ceto ésteres por actinomicetos marinhos.

A *S. tropica* catalisou a biorredução do piruvato de etila, 2-oxo-butanoato de etila e 2-clorobenzoil formamida aos alcoóis correspondentes com excelentes conversões e seletividades (Esquema 7) (ISHIHARA *et al.*, 2011).

Esquema 7 - Biorredução de grupos carbonílicos por cepas de actinomicetos marinhos.

No período de 1973-2007 os micro-organismos marinhos foram objetos de patentes, dentre os quais 53% e 33% correspondiam, respectivamente, aos setores químicos e farmacêuticos, seguidos dos setores alimentícios, cosméticos e agroquímicos (TRINCONI, 2011). Contudo, ainda são poucos os estudos de biotransformações com derivados de acetofenonas por micro-organismos marinhos. De acordo com uma pesquisa realizada na base de dados *Web of Science*, foram utilizadas as palavras-chave “*Bioreduction and acetophenone*”, “*Bioreduction and ketones*”, “*Bioreduction and marine*” e “*Bioconversion and marine*” entre o período de janeiro 2002 a dezembro de 2011, sendo que os resultados foram expressos em intervalos de um ano, para que fosse possível acompanhar a evolução das publicações. Entre o período de 2002-2007, nenhum artigo foi encontrado utilizando “*Bioreduction and marine*” (Figura 6). A partir de 2008-2011 foram encontrados poucos artigos envolvendo estudos biocatalíticos via redução de cetonas.

Este levantamento mostra o baixo número de publicações na área de biocatálise, demonstrando que o potencial enzimático de micro-organismos de origem marinha é muito pouco conhecido.

Figura 6 - Pesquisa realizada na *Web of Science Database online* com o número de artigos utilizando como palavras-chave “Bioreduction and acetophenone”, “Bioreduction and ketones”, “Bioreduction and marine” e “Bioconversion and marine”.

1.6 Aplicações de biotransformação e biocatálise na indústria

No setor farmacêutico os alcoóis quirais podem ser encontrados em diversas rotas sintéticas, por exemplo, na síntese da *sulfona 30* um fármaco utilizado no tratamento de Alzheimer. O processo enzimático envolveu a redução dos compostos 2-bromo-4-fluoroacetofenona e o ácido-4-(2-acetil-5-fluorofenil)butanóico. Estas moléculas foram reduzidas pela levedura *Pichia methanolica* SC 13825 que produziu os respectivos alcoóis com excelentes rendimentos e excessos enantioméricos (PATEL *et al.*, 2003). O esquema 8 ilustra a reação de redução com o levedura *P. methanolica* SC 13825.

Esquema 8 - Biorredução de fluorocetonas por *P. methanolica* SC 13825.

Outro exemplo interessante foi à redução enzimática da α -clorocetona catalisada pelo uso de células totais do fungo *Streptomyces nodosus* SC 13149 na obtenção da haloidrina, a qual foi utilizada como precursor na síntese do indinavir, um inibidor de protease do vírus HIV (Esquema 9) (PATEL, 2004).

Esquema 9 - Redução assimétrica da α -clorocetona por *Streptomyces nodosus* SC 13149.

A L-carnitina, um fármaco usado na prevenção de infarto do miocárdio, pode ser obtida através de duas etapas de reação. A primeira envolveu uma redução enzimática catalisada por *Saccharomyces cerevisiae* (Esquema 10). A produção seletiva do “R” ou “L” isômero foi essencial, pois a forma “S” ou “D” isomérica é tóxica para o organismo humano (PEREIRA, 1997).

Esquema 10 - Síntese da L-carnitina envolvendo uma etapa quimio-enzimática.

Anfetaminas e seus derivados são fármacos estimulantes do sistema nervoso central causadores de dependência química. No Brasil é grande o uso indevido de anfetamínicos (BELL *et al.*, 2001), destacando-se o femproporex ou cianoetilanfetamina (MOFFAT *et al.*, 1986). Vários trabalhos demonstram que até 70% de uma dose de femproporex pode biotransformar em anfetamina livre no organismo (CODY, 2002; KRAEMER & MAURER, 2002). Algumas anfetaminas são sintetizadas a partir do (S)-1-fenil-2-propanol. A síntese comercial deste fármaco é realizada pela a empresa *Forschungszentrum Jülich GmbH* utilizando uma etapa biocatalítica via reação de redução (Esquema 11).

Esquema 11 - Biorredução do 1-fenilpropan-2-ona por álcool desidrogenase de *Rhodococcus erythropolis*.

O processo de produção industrial do (S)-1-fenilpropan-2-ol consistiu em três etapas. Etapa I: os materiais de partida (1-fenilpropan-2-ona, a enzima e o cofator) são adicionados ao reator. Etapa II: as enzimas são filtradas por uma membrana hidrofílica e retornam para o reator, os materiais de partida e os cofatores passam através de um tubo de extração. Etapa III: o produto é extraído com solvente orgânico que é reciclado por destilação (Figura 7).

Figura 7 - Esquema geral das etapas da planta industrial para síntese industrial do (S)-1-fenilpropanol.

Neste processo industrial as condições de reação para redução da 1-fenilpropan-2-ona foram de 134,18 g/mol, 0,015M, (1,95 g/L), pH = 6,7, temperatura de 25°C, meio aquoso e o catalisador foi uma álcool desidrogenase extraída de *Rhodococcus erythropolis*. A regeneração do cofator foi realizada com formato desidrogenase de *Candida boidinii* (EC 1.2.1.), cujo substrato auxiliar utilizado foi o ácido fórmico, o qual é oxidado para CO₂. O produto (S)-1-fenilpropan-2-ol é utilizado como precursor na síntese da anfetamina, fosfato de anfetamina e anfetaminil (Figura 8) (LIESE *et al.*, 2004).

Figura 8 - Anfetaminas obtidas a partir do precursor (S)-1-fenilpropan-2-ol.

1.7 Lipases

As lipases triacilglicerol éster hidrolases, (E.C. 3.1.1.3), são classificadas como hidrolases e atuam sobre ligações ésteres presentes em acilgliceróis, liberando ácidos graxos e glicerol, constituindo uma classe especial de hidrolases (JAEGER *et al.*, 1999). Os processos básicos que fundamentam o mecanismo catalítico (hidrólise e síntese de ésteres) podem ser associados pela enzima para resultar em reações de interesterificação (acidólise, alcoólise e transesterificação), dependendo dos reagentes e dos solventes utilizados. Além de água e álcool, outros compostos podem ser utilizados como nucleófilos em reações catalisadas por estas enzimas. Desta forma, as lipases podem catalisar reações como aminólise, tiotransesterificação, lactonização e peroxidação, em solventes orgânicos fornecendo produtos com elevadas seletividades (KRIEGER *et al.*, 2004, CASTRO *et al.*, 2004).

As lipases representam um grupo de biocatalisadores acessíveis comercialmente e de baixo custo, que em geral, são flexíveis quanto às suas especificidades aos substratos. A diferenciação entre uma lipase e uma esterase (EC. 3.1.1.1) está no fato de que a primeira catalisa reações de substratos insolúveis em água (triacilgliceróis), enquanto que a esterase age em substratos solúveis em meio aquoso como, por exemplo, (ligações peptídicas de proteínas) (ALVAREZ-MACARIE *et al.*, 1999). É crescente o uso de enzimas hidrolíticas na indústria farmacêutica, sendo a mais utilizada as lipases microbianas (JAEGER *et al.*, 1999). As características de enantiosseletividade das lipases permitem sua utilização na resolução de misturas racêmicas de alcoóis, aminas, ácidos carboxílicos. Além disto, estas enzimas podem apresentar excelentes estabilidades na presença de solventes orgânicos, nos quais os substratos orgânicos são geralmente solúveis (FABER, 2004).

1.7.1 Mecanismo de reação da lipase CALB em resolução de alcoóis secundários

Dentre as reações enzimáticas, a resolução cinética de alcoóis secundários através da acilação enantiosseletiva mediada por lipases, é uma das reações mais estudadas em biocatálise. As lipases seguem um ciclo catalítico hidrolítico, no qual os resíduos de aminoácidos que se encontram no sítio ativo (serina, histidina e ácido aspártico) são denominados de tríade catalítica. O arranjo espacial destes três resíduos de aminoácidos no sítio enzimático propicia um decréscimo no pK_a da hidroxila da serina, possibilitando um ataque nucleofílico ao carbono do substrato, no caso um éster carboxílico ou qualquer agente doador de grupo acila frente a uma reação de esterificação.

Uma vez que reações hidrolíticas são reversíveis em meios aquosos, as lipases também podem catalisar a formação de ésteres a partir de alcoóis em presença de um reagente doador de

grupamento acila. Em um ambiente não aquoso, a acilação enantiosseletiva de alcoóis secundários quirais ocorre em duas etapas (Esquema 12). Na primeira etapa do ciclo catalítico, o grupo hidroxila da serina que está ativado pela histidina, reage com o grupo carbonílico do doador acila, por exemplo, o acetato de vinila, levando a um intermediário tetraédrico conhecido como complexo acil-enzima. A carga negativa gerada no oxigênio carbonílico é estabilizada pela cavidade oxi-iônica. Esta estabilização é proporcionada por ligações de hidrogênio com resíduos de aminoácidos como glicina a treonina. Em seguida, o intermediário tetraédrico se desfaz, formando o éster derivado da serina denominado de éster acil-enzima e liberando o álcool derivado do doador de acila. Neste caso é liberado um enol, pois o doador de grupo acila é o acetato de vinila que se encontra em equilíbrio tautomérico com o etanal. Na etapa seguinte, o intermediário acil-enzima reage com um nucleófilo, neste caso, um dos enantiômeros do álcool racêmico é usado como substrato, levando a formação seletiva do produto acetilado, e restabelecendo a tríade catalítica. O outro enantiômero do álcool, não reage ou reage muito lentamente. Assim conclui-se a reação quimio-enzimática, onde em uma resolução ideal um enantiômero da mistura racêmica é esterificado e o outro permanece no meio reacional.

Esquema 12 - Ciclo catalítico de uma reação de acilação enantiosseletiva de alcoóis secundários quirais mediada pela tríade catalítica da lipase CALB.

1.7.2 Enantiosseletividade enzimática

O fenômeno de enantiosseletividade enzimática (E) pode ser explicado, cineticamente, pela razão entre as velocidades de reação de cada enantiômero com a enzima (Equação 1).

$$E = \frac{v_R}{v_S} \quad (\text{equação 1})$$

Onde v_R é a velocidade de reação com o enantiômero R e v_S é a velocidade de reação com o enantiômero S .

A reação de cada enantiômero com a enzima forma ambos complexos enzima substrato (ES_R , e ES_S), um com cada enantiômero, e pode ser tratada como se fosse uma reação que envolve somente um substrato e um produto (FABER, 2004) (Figura 9).

Figura 9 - Representação do diagrama reacional da reação catalisada por uma enzima com os dois enantiômeros de uma mistura racêmica.

Onde: k representa a constante de velocidade, sendo k_{+ESR} = formação do complexo enzima – R -substrato; k_{-ESR} = dissociação do complexo enzima – R -substrato; k_{+ESS} = formação do complexo enzima – S -substrato; k_{-ESS} = dissociação do complexo enzima – R -substrato; k_{catR} = constante catalítica da reação para formação do R -produto e k_{catS} = constante catalítica da reação para formação do S -produto.

Devido ao ambiente quiral do sítio ativo da enzima, na presença do substrato racêmico é formado um complexo diastereoisomérico com cada enantiômero e com diferentes valores de energia livre (ΔG), nos respectivos estados de transição ($[ES_S]$ e $[ES_R]$). Como consequência, um dos enantiômeros será transformado mais rapidamente do que o outro (Figura 10) (FABER, 2004).

Figura 10 - Representação da variação da energia livre do sistema (ΔG) em função da reação catalisada pela enzima.

Onde: E representa a enzima, S_S é o enantiômero S do substrato, S_R é o enantiômero R do produto e $\Delta\Delta G^\ddagger$ é a energia livre de ativação entre os enantiômeros.

Como pode ser observada pela equação 2, a enantiosseletividade depende diretamente da variação de energia livre entre os dois estados de transição, que é chamada de energia livre de ativação entre os enantiômeros ($\Delta\Delta G^\ddagger$).

$$E = -\exp\left(\frac{\Delta\Delta G^\ddagger}{RT}\right) \quad (\text{equação 2})$$

Onde R é a constante dos gases, com valor de 8,31 J/mol.K e T é a temperatura em K (Kelvin).

Assim, a enantiosseletividade enzimática é descrita numericamente, pela razão enantiomérica (E). Para determinar E, cada constante de velocidade da equação 1, reação que envolve somente um substrato e um produto, é descrita pelos valores de k_{cat} (número de moléculas convertidas por segundo por molécula de enzima) e K_M (constante de saturação do substrato) (Equação 3) (FABER, 2004; CHEN *et al.*, 1982).

$$E = \frac{v_R}{v_S} = \frac{(k_{cat} / K_M)_R}{(k_{cat} / K_M)_S} \quad (\text{equação 3})$$

Chen *et al.*, desenvolveram uma equação para uma reação irreversível que envolve somente um substrato e um produto, que também pode ser utilizada para calcular E com os valores experimentais de excesso enantiomérico (ee_s ou ee_p) a uma dada fração de conversão (c) (Equação 4) (CHEN *et al.*, 1982). Nesta equação o valor de E pode ser obtido de análises cromatográficas, ao invés de realizar as medidas de velocidades das reações enzimáticas.

$$E = \frac{\ln[(1-c)(1-ee_s)]}{\ln[(1-c)(1+ee_s)]} = \frac{\ln[(1-c)(1-ee_p)]}{\ln[(1-c)(1+ee_p)]} \quad (\text{equação 4})$$

Os excessos enantioméricos (ee) que aparecem em equação 4 descrevem o excesso enantiomérico de compostos quirais, e são expressos pela equação 5.

$$ee_R(\%) = [(R - S) / (R + S)] * 100 \quad \text{par } R > S \quad (\text{equação 5})$$

Onde R é a concentração do enantiômero (R) e S é a concentração do enantiômero (S). Assim, para uma mistura racêmica, o valor de excesso enantiomérico é zero e, para um composto enantiomericamente puro, é 100%.

A conversão da reação (c) que aparece na equação 6 é definida como a fração de substrato que foi convertido em produto em um determinado tempo, e é calculada pela equação 6, que, por sua vez, é baseada nos valores dos excessos enantioméricos de substrato e produto.

$$c = \frac{ee_s}{ee_s + ee_p} \quad (\text{equação 6})$$

Substituindo c em equação 4 e simplificando os termos tem-se a equação 7.

$$E = \frac{\ln\left[\frac{1 - ee_s}{1 + (ee_s / ee_p)}\right]}{\ln\left[\frac{1 + ee_s}{1 + (ee_s / ee_p)}\right]} \quad (\text{equação 7})$$

Onde ee_s e ee_p correspondem aos excessos enantioméricos do substrato e do produto, respectivamente.

Com estas equações, é possível observar que um valor de E igual a 1 corresponde a uma reação não seletiva. Para uma resolução cinética ser considerada aceitável para dar continuidade às reações enzimáticas, o valor de E deve ser no mínimo, de 20 (GHANEM, 2007; GHANEM & ABOUL-ENEIN, 2004).

Para a caracterização e quantificação da resolução cinética catalisada por lipases, é fundamental a determinação dos excessos enantioméricos dos produtos ou dos substratos. Dentre os métodos disponíveis estão os polarimétricos, cromatográficos e espectroscópicos, os mais convenientes e sensíveis utilizados são a cromatografia a gás (GC) e a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), utilizando-se como fase estacionárias colunas quirais (GHANEM & ABOUL-ENEIN, 2004). Portanto, permite-se determinar a seletividade E de uma reação enzimática utilizando-se apenas os valores dos excessos enantioméricos do substrato e do produto.

1.7.3 Exemplos de resoluções cinéticas mediadas por lipases

O uso de lipase CALB em resolução enzimática é bem estabelecido, contudo novos estudos são continuamente investigados e desenvolvidos. Um exemplo interessante envolveu a esterificação regiosseletiva do cloranfenicol, um bactericida de amplo espectro. Contudo, este fármaco pode também produzir efeitos adversos, tais como anemia, leucemia infantil, entre outras, assim, este composto requer cuidados na prescrição médica. Por consequência, para a administração desta droga há atualmente algumas maneiras, através de cápsulas, óleo ou na forma líquida, mas o gosto amargo do fármaco levou a produção de diferentes alternativas, tal como, a produção do seu derivado, o cloranfenicol palmitato. A esterificação regiosseletiva foi realizada utilizando a

lipase CALB, fornecendo o (2*R*,3*R*)-2-(2,2-dicloroacetamido)-3-hidroxi-3-(4-nitrofenil)propil palmitato (éster cloranfenicol palmitato), em apenas 3 h de reação com excelente rendimento de 91% (Esquema 13) (BIZERRA *et al.*, 2011).

Esquema 13 - Esterificação regioseletiva do cloranfenicol catalisada por lipase CALB.

Outro exemplo foi à resolução enantiosseletiva do *rac*-estiripentol, um fármaco utilizado como antiepilético. A resolução cinética do *rac*-estiripentol foi catalisada pela lipase CALA e butanoato de vinila como doador de grupo acila, forneceu o (3*S*)-estiripentol com excesso enantiomérico de 86%, (*E* 24). Nestes estudos o acetato esterificado foi hidrolisado com a lipase CALA para fornecer o correspondente (3*R*)-estiripentol, que foi obtido com 94% *ee* (Esquema 14) (JACOBSEN *et al.*, 2012).

Esquema 14 - Transesterificação do estiripentol utilizando lipase CALA.

O dióxido de carbono no estado supercrítico tem sido empregado nos últimos anos como um solvente alternativo para várias finalidades no contexto da química verde, uma vez que o mesmo é barato, não tóxico e pode ser facilmente reutilizado (RAYNER, 2007). Além disso, reações em *sc*-CO₂ podem apresentar resultados diferentes dos obtidos em solventes convencionais, em virtude das características físico-químicas do mesmo (PRAJAPATI & GOHEIN, 2004). Entre as aplicações do *sc*-CO₂ como solvente “verde”, encontra-se seu uso em biocatálise. Foi observado que a pressão e a temperatura têm uma influência importante nas biotransformações (HOBBS &

THOMAS, 2007). Recentemente, foi demonstrada a viabilidade de resoluções cinéticas enzimáticas de β -hidroxichalcogênios nesse meio reacional. As reações foram realizadas em diferentes pressões e temperaturas (Esquema 15) (GARIANI *et al.*, 2011).

Esquema 15 - Resolução cinética dos β -hidroxichalcogênios em $sc\text{-CO}_2$.

Yongxian *et al.* descreveram a resolução enzimática do acetato de (*R,S*)-1-feniletila catalisado pela lipase CALB. A resolução foi realizada em diferentes sistemas de solventes, como butanol, hexano, heptano, acetato de etila, tolueno e benzeno. Também foi realizado uma otimização de alguns parâmetros de reação, tais como, a quantidade de enzima, a natureza e a quantidade de solvente orgânico, pressão e temperatura em $sc\text{-CO}_2$ e tampão fosfato para avaliar a reação. A lipase exibiu alta enantiosseletividade em ambos os sistemas, butanol com 0,025 mol/L de tampão fosfato (pH = 7,5) e em $sc\text{-CO}_2$ com 0,25 mol/L de tampão fosfato (pH = 7,5). A taxa de conversão foi de 41% superior em $sc\text{-CO}_2$. Em butanol com 0,025 mol/L de tampão fosfato (pH = 7,5) o tempo de reação diminuiu de 8 h para 90 min (Esquema 16) (YONGXIAN *et al.*, 2011).

Esquema 16 - Resolução cinética do acetato de ($\pm$)-1-feniletila por lipase CALB.

1.8 Imobilização

As enzimas estão sujeitas à inativação por fatores químicos, físicos ou biológicos, podendo ocorrer quando estocadas ou durante o uso. Para que a catálise seja eficiente em um determinado processo, há necessidade de protegê-las da interação com o solvente, meio no qual é realizada a reação, pois o mesmo pode provocar a inativação, impossibilitando ou dificultando a reação. A imobilização de biocatalisadores (enzimas ou células microbianas) é uma estratégia que pode ser utilizada para a condução de bioprocessos em situações variadas. De uma forma geral, busca-se, com a imobilização, propiciar o uso de enzimas ou células por períodos prolongados através de processos contínuos ou semicontínuos (CARVALHO *et al.*, 2006).

De acordo com a 1ª Conferência em Engenharia de Enzimas (HENNIKER, 1971), biocatalisadores imobilizados (enzimas ou células) são catalisadores fisicamente confinados ou localizados em uma região definida do espaço, com retenção de suas atividades catalíticas, e que podem ser utilizados repetidamente e/ou continuamente (KATCHALSKI-KATZIR & KRAEMER, 2000). As células imobilizadas em uma matriz podem ser protegidas de condições ambientais desfavoráveis como pH, temperatura, solventes orgânicos e substâncias tóxicas, podendo ser manipuladas e recuperadas das soluções (PARK & CHANG, 2000).

As técnicas de imobilização de células microbianas são divididas em algumas categorias, tais como, a adsorção na superfície de um suporte sólido; aprisionamento no interior de um suporte poroso; auto-agregação natural por floculação ou induzidas com agentes de reticulação ou ligantes; e contenção física dentro de uma barreira. O método de adsorção é utilizado pela sua simplicidade, baixo custo, fácil separação e manipulação e grande diversidade de suportes. Há um potencial de equilíbrio entre as células adsorvidas e livres, dependendo do crescimento microbiano e da densidade de células na matriz. Os métodos de aprisionamento são baseados na inclusão e retenção de células dentro de uma rede rígida ou interstícios das fibras ou poros do suporte para impedir que as células difundam-se no meio circunvizinho, enquanto ainda permite a transferência de nutrientes e metabólitos (KOURKOUTAS, 2004). A floculação consiste na formação de agregados celulares em suspensão, associada a uma rápida sedimentação de maneira natural, ou na presença de agentes floculantes ou ligantes. Assim, a floculação pode ser considerada como uma das técnicas mais promissoras de imobilização a serem utilizadas em larga escala, devido ao grande potencial de formar agregados celulares em reatores de leito fixo e fluidizado ou tanques com agitação (FREEMAN & LILLY, 1998). Contenção física dentro de uma matriz pode ser realizada pelo uso de membranas microporosas ou pela contenção das células em

microcápsulas. Esta técnica de imobilização é utilizada quando se requer produto livre de células, mínima transferência de compostos ou quando produtos de alta massa molecular precisam ser separados a partir do efluente (VEBERLEN *et al.*, 2006). Na figura 11, são apresentados esquematicamente os principais processos de imobilização.

Figura 11 - Diferentes métodos de imobilização celular de micro-organismos ou enzimas, adaptado de Pilkington *et al.*, (1998).

A imobilização celular pode ser empregada tanto na produção de metabólitos de interesse, a partir de micro-organismos, quanto no uso deles como biocatalisadores, em processos *in situ*. Como exemplos, podem ser citados a biodegradação de compostos xenobióticos e processos de biotransformação e biocatálise. A característica fundamental das células imobilizadas para o uso nestes processos é a sua alta resistência à exposição a compostos tóxicos e ambientes hostis (JUNTER & JOUENNE, 2004).

Assim, novas imobilizações têm sido desenvolvidas para fornecer estabilidade às enzimas e células para facilitar sua recuperação e reutilização. A utilização destas técnicas tem sido crescente nos últimos vinte anos e, com isso, novas informações teóricas e aplicações práticas estão surgindo (DALLA-VECHIA *et al.*, 2004). Um bom exemplo é imobilização das células do fungo *Phanerochaete chrysosporium* imobilizadas em espuma de poliuretana e utilizadas em biorreatores para oxidação de hidrocarbonetos poliaromáticos (ZHENG & OBBARD, 2002) em processos de descoloração de corantes como o *poly r-478* (COUTO *et al.*, 2000), e na degradação de organoclorados (SHIM & KAWAMOTO, 2002). A mineralização de pentaclorofenol e derivados também foram observados com *P. chrysosporium* imobilizado em espuma de poliuretana (SHIM & KAWAMOTO, 2002). As células do fungo *Trametes versicolor* imobilizadas em náilon foram utilizadas na transformação do pentaclorofenol e 2,4-diclorofenol, onde se observou um aumento da biotransformação, devido a produção de enzimas ligninolíticas, como lacases e manganês-peroxidases (SEDARATI *et al.*, 2003).

O uso de biocatalisadores imobilizados também é crescente em escala industrial, especialmente na indústria farmacêutica, de detergentes, couros e panificação, entre outras (CASTRO *et al.*, 2004). Uma das primeiras aplicações industriais de células imobilizadas de micro-organismo foi a produção de ácido L-aspartico em fluxo contínuo (CHIBATA *et al.*, 1974).

Nos últimos anos houve um grande aumento das pesquisas na área de biocatálise envolvendo a imobilização de enzimas e células inteiras de micro-organismos (WALSH & MALONE, 1995). Segundo uma pesquisa realizada na base de dados *Web of Science* (abril de 2012), foram utilizadas as palavras-chave “Cells immobilization marine”, “Cells immobilization”, “Whole cells immobilization” e “Whole cells immobilization marine” entre o período de janeiro 2002 a dezembro de 2011, o resultado foi expresso em intervalos de um ano para que fosse possível acompanhar a evolução das publicações. Pode-se observar que o número de publicações envolvendo a imobilização de células marinhas é pequena (Figura 12).

Figura 12 - Pesquisa realizada na *Web of Science Database online* com o número de artigos que utilizam como palavras-chave “Cells immobilization marine”, “Cells immobilization”, “Whole cells immobilization” e “Whole cells immobilization marine”.

A quitosana, $\beta(1-4)$ -2-amino-2-desoxi-D-glicose, é o principal derivado da quitina, obtida a partir da desacetilação por processo de hidrólise básica. A quitina, $\beta(1-4)$ -2-acetamido-2-desoxi-D-glicose, é o segundo polissacarídeo natural mais abundante encontrado na natureza e está presente em uma variedade de animais marinhos (caranguejo, camarão, lagosta), insetos, fungos e leveduras (GOY *et al.*, 2004). A quitosana é considerada um suporte ideal para imobilização de enzimas e células microbianas, devido ao grande percentual de grupos amino e hidroxilas disponíveis em sua estrutura química que permitem uma interação com hifas dos micélios. Possui facilidades para formação de gel, é hidrofílica, biodegradável, biocompatível e antibactericida. Além disso, é comumente empregada na medicina, em produtos farmacêuticos, na agricultura, em biotecnologia, na indústria de cosméticos e de alimentos e como adsorvente na remoção de corantes e no tratamento de efluentes industriais (JUSTI *et al.*, 2004).

A enzima cloroperoxidase (CPO) de fungo *Caldariomyces fumago* foi imobilizada em membrana de quitosana (Esquema 17). A estabilidade da (CPO) imobilizada foi avaliada contra agentes desnaturantes, tais como, temperaturas altas na presença de uréia e exposição a H_2O_2 . As enzimas CPO imobilizadas foram mais estáveis em temperaturas elevadas e na presença de produtos químicos desnaturantes e oxidantes em comparação com as enzimas livres. As CPOs imobilizadas retiveram cerca de 40% da atividade após 40 min à 50°C. Presumivelmente, a enzima

covalentemente ligada foi protegida da distorção conformacional ou danos impostos pelo calor. A uréia reduziu a atividade da CPO livre: que foi de apenas 68% na presença de 1,5 M de uréia após 20 h de incubação, enquanto a CPO imobilizada reteve quase 100% de atividade sob as mesmas condições (ZHANG *et al.*, 2009).

Esquema 17 - Imobilização da CPO em membrana de quitosana.

Poucos estudos na literatura relatam a imobilização de fungos filamentosos em suportes sólidos para aplicações em reações de biocatálise. Porto *et al.*, imobilizaram as células microbianas do fungo *Aspergillus terreus* CCT 3320 em suportes de crisotila e celulose/TiO₂ (Figura 13)). Posteriormente, as células livres e imobilizadas foram utilizadas para biotransformação de sulfetos. As células do fungo *A. terreus* CCT 3320 livres e imobilizadas em crisotila catalisaram a oxidação do sulfeto para o correspondente sulfóxido ($c = 100\%$, $>99\%$ *ee*) em 72 h de reação. Após 3 meses de incubação em refrigerador as células imobilizadas foram utilizadas na biotransformação do sulfeto, foram observados resultados semelhantes aos obtidos com as células livres e imobilizadas ($c = 100\%$, $>99\%$ *ee*) em 72 h de reação (Esquema 18). Estes resultados demonstraram que o fungo *A. terreus* CCT 3320 imobilizado, é um biocatalisador enantiosseletivo para oxidação do sulfeto proquiral, com atividade por pelo o menos três meses (PORTO *et al.*, 2004).

Figura 13 - Micrografia do fungo *A. terreus* CCT 3320 imobilizado em (A) fibras de crisotila, (B) e em celulose/TiO₂.

Esquema 18 - Oxidação do sulfeto para sulfóxido por células livres e imobilizadas do fungo *A. terreus* CCT 3320.

As células da levedura *Saccharomyces cerevisiae* foram imobilizadas em alginato de cálcio com dupla camada de gel (Figura 14). As células imobilizadas foram utilizadas na redução assimétrica do 2-oxo-2-fenilacetato de etila por processo contínuo. O (*R*)-2-hidroxi-2-fenilacetato de etila foi obtido com 82% rendimento e 92% *ee* (Esquema 19). O processo mostrou-se robusto mantendo o elevado excesso enantiomérico durante 8 dias (MILAGRE *et al.*, 2006).

Figura 14 - Imobilização de *S. cerevisiae* em fibras de alginato de cálcio com dupla-camada.

Esquema 19 - Redução do 2-oxo-2-fenilacetato de etila por células de *S. cerevisiae* imobilizadas em alginato de cálcio.

A enzima álcool desidrogenase W 110A mutante de *Thermoanero bacter ethanolicus* (TeADH) imobilizada por encapsulamento em processo sol-gel foi utilizada na redução assimétrica da 4-fenil-2-butanona para o correspondente (S)-4-fenil-2-butanol. O álcool quiral é usado como precursor na síntese dos “bufeniode” e “labetalol” (agentes anti-hipertensivos) (MUSA *et al.*, 2007). Neste tipo de suporte foi possível usar o biocatalisador imobilizado em meio orgânico e aumentar a concentração de substrato de 35 mM para 140 mM. O biocatalisador imobilizado também foi reutilizado por três vezes. A 1-fenoxipropan-2-ona também foi reduzida com ótima conversão e elevada enantiosseletividade para o correspondente (S)-álcool utilizando esta enzima imobilizada em sol-gel (Esquema 20) (MATSUDA *et al.*, 2009).

Esquema 20 - Redução assimétrica da 4-fenilbutan-2-ona e da 1-fenoxipropan-2-ona pela enzima w 110a TeADH.

A biorredução assimétrica da 2-fluoroacetofenona foi realizada pelas células do fungo *Geotrichum candidum* NBRC 5767 imobilizado em polímero adsorvente e em 10 Mpa de sc-CO₂.

Uma alta enantiosseletividade (>99% *ee*) foi obtida para o (*S*)-1-(2-fluorofenil)etanol com um rendimento de 81% (Esquema 21) (MATSUDA *et al.*, 2009).

Esquema 21 - Redução da 2-fluoroacetofenona pelo fungo *G. candidum* NBRC 5767 imobilizado sob *sc*-CO₂.

2 OBJETIVOS

O objetivo deste trabalho foi obter compostos enantiomericamente puros por reações de biocatálise. Para tanto foram realizadas:

- reações de biorredução de cetonas proquirais utilizando fungos marinhos;
- resoluções enzimáticas de derivados do feniletanol com lipase CALB;
- imobilização de fungos marinhos em sílica gel, xerogel de sílica e quitosana.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Reagentes e solventes

Na figura 15 têm-se todas as cetonas proquirais comerciais **1-4** e **7-12** que foram utilizadas neste trabalho. As cetonas e os reagentes Tetra(trifenilfosfina)paládio $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$, CsF, os suportes de sílica gel 60 F254 (Sorbent), a quitosana de alto peso molecular (159.000 g/mol, 25% grau médio de acetilação (código de lote: 407490/1 23 500) e tetraetilortossilicato (TEOS) utilizados para o desenvolvimento deste trabalho foram adquiridas da empresa Sigma-Aldrich. Acetato de vinila, acetato de etila, tolueno, acetonitrila, hexano, *iso*-propanol, acetona, NaBH_4 , NaN_3 , Na_2SO_4 , MgSO_4 anidro e demais substâncias, foram adquiridos das marcas Synth, Vetec, Merck e Tedia e utilizados sem prévia purificação. A enzima utilizada para as reações de resolução enzimática foi a lipase CALB gentilmente cedida pela empresa Novo Nordisk (Paraná). As cetonas **5-6** e as cetozidas **13-17** foram sintetizadas. Os solventes deuterados: clorofórmio (CDCl_3) e dimetilsulfóxido (DMSO) foram adquiridos da Tedia.

Figura 15 - Cetonas proquirais para as reações biocatalíticas.

3.2 Identificação e quantificação dos compostos

As reações de biocatálise foram analisadas por cromatografia a gás (GC-FID) e cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). Para cromatografia a gás utilizou-se as colunas quirais: CP-Chirasil-Dex-CB - Varian Capillary Column (25 m x 0,25 mm x 0,39 mm) e CP-Cyclodextrin - Varian Capillary Column (25 m x 0,25 mm x 0,39 mm). O gás de arraste foi nitrogênio (± 60 Kpa), com temperatura do injetor e detector 200°C . O volume injetado das amostras, foi de $2,0\ \mu\text{L}$ na

concentração de 1 mg/mL. O equipamento utilizado foi um cromatógrafo a gás da marca Shimadzu®, modelo GC-2010, com auto-injetor AOC-20i.

As análises por HPLC foram realizadas em dois equipamentos da marca Shimadzu®, modelos LC-10AD e 20AT, equipados com detector de ultravioleta. O Shimadzu® modelo LC-10AD, equipado com detector SPD-M10AVvp de DAD, desgaseificador DGU-14A, central de controle SCL-10Avp e injetor manual RHEODYNE e o Shimadzu® modelo LC-20AT, equipado com detector SPD-M10AVvp (UV/VIS), desgaseificador DGU-20A₃, central de controle CBM-20AV, injetor automático Sil-20A e forno CTO 20-A. O Modelo LC-10AD localizado na Central de Análises Químicas Instrumentais (CAQI) e o LC-20AT em nosso laboratório.

Foram utilizadas como eluentes as misturas de hexano e isopropanol nas proporções (90:10, 95:5, 80:20). Foram utilizadas colunas com fase estacionária quiral, a Chiracel OD-H, e a Chiracel AD-H ambas da marca Daicel®.

Os compostos sintetizados foram identificados e caracterizados através de métodos espectroscópicos e espectrométricos (IV, RMN de ¹H, de ¹³C e GC-MS).

Os espectros de RMN de ¹H e RMN de ¹³C foram obtidos nos espectrômetros: Bruker/AC-200 (CAQI-IQSC) - frequências: 200 MHz (RMN de ¹H) e 50 MHz (RMN de ¹³C), Bruker/AVANCE III (DQ-UFSCar) - frequências: 400 MHz (RMN de ¹H) e 100 MHz (RMN de ¹³C). Os solventes utilizados foram clorofórmio (CDCl₃) e dimetilsulfóxido (DMSO-*d*₆) deuterados. Os deslocamentos químicos (δ) foram expressos em parte por milhão (ppm) em relação ao padrão interno tetrametilsilano (TMS). A multiplicidade dos sinais observados foi indicada pelas seguintes abreviaturas: s = singleto, sl = singleto largo, d = duplete, t = tripleto, m = multiplete, dd = duplo duplete, dt = triplo duplete, dt = duplo tripleto, q = quarteto. O número de hidrogênios foi fornecido pela integral relativa e a constante de acoplamento (*J*) foi expressa em Hertz (Hz).

Foram utilizadas nas interpretações dos triazóis as técnicas bidimensionais de RMN 2D (HSQC e HMBC). Estas análises foram realizadas no laboratório de Ressonância Magnética Nuclear, o equipamento de responsabilidade do Prof. Dr. Antonio Gilberto Ferreira (DQ-UFSCar) .

Os espectros de absorção na região do infravermelho (IV) foram obtidos em um espectrofotômetro de infravermelho com transformada de Fourier Bomem/MB-102 e calibração interna. As amostras foram preparadas na forma de filmes em pastilha de silício (amostras líquidos) e em pastilhas de KBr (amostras sólidos). As frequências de absorção foram expressas em cm⁻¹.

As medidas de rotação óptica foram realizadas no DQ-UFSCar em um polarímetro Perkin-Elmer modelo 241 (Waltham MA, USA) equipado com lâmpada de Na ($\lambda = 589$ nm). As amostras foram diluídas em 1 mL de CHCl_3 grau espectroscópico e os experimentos foram realizados a 25°C. O equipamento é de responsabilidade do Prof. Dr. Timothy John Brocksom.

As análises de espectrometria de massas de baixa resolução foram realizadas em espectrômetro de massas acoplado a um cromatógrafo a gás (GC) modelo Shimadzu GC-MS QP-2010, empregando-se a técnica de ionização por elétrons, com 70 eV de ionização. A coluna empregada foi a DB-5 (25m x 0,25 mm e filme 0,25 μm) da marca J&W Scientific.

Os espectros de massas de alta resolução (HRMS) foram obtidos a partir de um aparelho Bruker Daltonics Micro TOF, com detector ESI-TOF (*electron spray ionization - time of flight*) operando em modo positivo. Essas análises foram realizadas pela Central Analítica do Instituto de Química de São Paulo (IQ-USP).

Para as purificações por cromatografia em coluna (CC) foi utilizada sílica gel *flash* 60 230-400 da Across. Para as cromatografias em camada delgada (CCD) foi utilizado cromatofolhas de sílica gel 60 F₂₅₄ da Sorbent Technologies. A revelação das cromatofolhas foi realizada com soluções de anisaldeído (100 mL de ácido acético, 1 mL de anisaldeído e 1 mL de ácido sulfúrico) vanilina (135 mL H₂O destilada, 30 mL de ácido sulfúrico, 35 mL MeOH e 3,0 g vanilina) ou de ácido fosfomolibdico (6,5 g de ácido fosfomolibdico em 100 mL de álcool etílico). Para as fases móveis foram determinadas as misturas de solventes mais adequadas em cada situação.

3.3 Evaporadores rotativos e agitadores orbitales

Para remoção dos solventes foram utilizados rotaevaporadores das marcas Fisaton e Tecnal T-210, equipados com bomba de vácuo TE-058 e refrigeração Tecnal modelo TE-2005. O crescimento dos fungos em meio líquido e as reações de biocatálise foram realizadas em agitador orbital rotativo modelo Tecnal TE-421 ou Superhom.

3.4 Outros equipamentos

Balança analítica modelo AY-220 marca Shimadzu, capela de fluxo laminar marca Veco, autoclave vertical modelo Phoenix, pHmetro modelo 8010 da marca Qualxtron e câmara de UV Tecnal.

3.5 Síntese das ceto-azidas

Em um balão de 25 mL sob agitação magnética à temperatura ambiente, foram adicionados a 2-bromo-1-feniletanona (**8**) (1,0 g; 3,6 mmol), 20 mL de acetona HPLC e azida de sódio (980 mg, 15 mmol), (Esquema 22). A reação foi mantida sob agitação magnética por 12 h e monitorada por CCD utilizando placas de sílica gel, e em seguida revelado com solução de anisaldeído ou ácido fosfomolibdico. Após a reação ser completada adicionou-se água destilada (5 mL), evaporou-se a acetona sob vácuo em rotaevaporador. Posteriormente, adicionou-se 15 mL de água destilada e realizou-se a extração com acetato de etila (3 x 20 mL). À fase orgânica adicionou-se Na₂SO₄ anidro, filtrou-se e concentrou-se sob vácuo em rotaevaporador. A 2-azido-1-feniletanona (**13**) foi purificada por CC utilizando sílica gel e misturas de eluentes (hexano/acetato de etila a partir de 95/05). Após a purificação do produto calculou-se o rendimento da reação. Análises de RMN de ¹H e de ¹³C, IV e GC-MS foram realizadas para confirmar a estrutura do produto.

A síntese das correspondentes ceto-azidas **14-17** foi realizada de acordo com o mesmo procedimento descrito para a ceto-azida **13**.

Esquema 22 - Síntese das ceto-azidas.

Os compostos **13-17** foram caracterizados por aplicação das técnicas espectroscópicas de ressonância magnética nuclear (RMN) e infravermelho (IV) (Anexos: p. 137-141).

2-azido-1-feniletanona (**13**): Óleo amarelo palha, RMN de ¹H (200 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 7,95-7,90 (2H, m), 7,69-7,47 (3H, m), 4,57 (2H, s); IV filme em pastilha de silício (cm⁻¹): 2103 (C-N₃), 1695 (C=O). Dados espectroscópicos de RMN de ¹H e IV do composto estão de acordo com os relatados na literatura (PATONAY *et al.*, 1994).

2-azido-1-(4-metoxifenil)etanona (**14**): Sólido amarelo palha, RMN de ¹H (200 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 7,90 (2H, d, J = 10,0 Hz), 6,97 (2H, d, J = 10,0 Hz), 4,51 (2H, s), 3,89 (3H, s); IV filme em

pastilha de silício (cm^{-1}): 2120 (C-N₃), 1684 (C=O), 1601 (C-O). Dados espectroscópicos de RMN de ^1H e IV do composto estão de acordo com os relatados na literatura (PATONAY *et al.*, 2002).

2-azido-1-(4-bromofenil)etanona (**15**): Óleo vermelho castanho, RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3), δ (ppm): 7,79 (2H, d, $J = 8,0$ Hz), 7,66 (2H, d, $J = 8,0$ Hz), 4,53 (2H, s); IV filme em pastilha de silício (cm^{-1}): 2102 (C-N₃), 1690 (C=O). Dados espectroscópicos de RMN de ^1H e IV do composto estão de acordo com os relatados na literatura (PATONAY *et al.*, 2002).

2-azido-1-(4-nitrofenil)etanona (**16**): Óleo vermelho castanho, RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3), δ (ppm): 8,32 (2H, d, $J = 8,0$ Hz), 8,08 (2H, d, $J = 8,0$ Hz), 4,64 (2H, s); IV filme em pastilha de silício (cm^{-1}): 2105 (C-N₃), 1706 (C=O). Dados espectroscópicos de RMN de ^1H e IV do composto estão de acordo com os relatados na literatura (GONG *et al.*, 2007).

2-azido-1-(clorofenil)etanona (**17**): Cristal amarelo palha, RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3), δ (ppm): 7,80 (2H, d, $J = 8,0$ Hz), 7,42 (2H, d, $J = 8,0$ Hz), 4,52 (2H, s); IV filme em pastilha de silício (cm^{-1}): 2101 (C-N₃), 1657 (C=O). Dados espectroscópicos de RMN de ^1H e IV do composto estão de acordo com os relatados na literatura (GONG *et al.*, 2007).

3.6 Síntese dos alcoóis racêmicos utilizados como padrões

Em um balão de 25 mL sob agitação magnética à temperatura de 0°C, adicionou-se o metanol (20 mL), a 1-(4-metoxifenil)etanona (**1**) (100 mg; 0,77 mmol) e um excesso de boroidreto de sódio (30 mg; 0,77 mmol), (Esquema 23). A reação foi mantida sob agitação magnética e monitorada por CCD utilizando placas de sílica gel, em seguida revelada em solução ácido fosfomolibdico e anisaldeído. Após a reação ser completada adicionou-se água destilada (5 mL), evaporou-se o metanol sob vácuo em rotaevaporador. Em seguida adicionou-se 15 mL de água destilada e realizou-se a extração com acetato de etila (3 x 20 mL). À fase orgânica adicionou-se Na_2SO_4 anidro, filtrou-se e concentrou-se sob vácuo no rotaevaporador. O produto foi purificado por CC utilizando sílica gel e uma mistura de eluentes (hexano/acetato de etila a partir de 95/05 respectivamente). A redução das cetonas **2-7** e **13-17** para os correspondentes alcoóis **2a-7a** e **13a-17a** foram realizadas de acordo com o mesmo procedimento descrito acima. Após purificação dos produtos calculou-se os rendimentos. Análises de RMN de ^1H e ^{13}C e IV foram realizadas para

confirmar as estruturas dos produtos. As análises por cromatografia a gás e líquida foram realizadas utilizando colunas quirais para a separação dos enantiômeros.

Esquema 23 - Síntese dos alcoóis racêmicos.

Os compostos **1a-5a**, **7a**, **13a-17a** foram caracterizados por aplicação das técnicas **espectroscópicas** de (RMN) e (IV) (Anexos: p. 142-162).

1-(4-metoxifenil)etanol (**1a**): Óleo amarelo palha, RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3), δ (ppm): 7,31 (2H, d, $J = 8,8$ Hz), 6,89 (2H, d, $J = 8,8$ Hz), 4,86 (1H, q, $J = 6,4$ Hz), 3,81 (3H, s, OCH_3), 1,98 (1H, s), 1,49 (3H, d, $J = 6,4$ Hz); RMN de ^{13}C (50 MHz, CDCl_3), δ (ppm): 159,4, 138,4, 127, 114,2, 70,3, 55,6, 25,3, IV filme em pastilha de silício (cm^{-1}): 3414 (OH), 1033 (C-O). Dados espectroscópicos de RMN de ^1H do composto estão de acordo com os relatados na literatura (VIEIRA *et al.*, 2010).

1-(2-iodofenil)etanol (**2a**): Óleo amarelo palha, RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3), δ (ppm): 7,79 (1H, dd, $J = 8,0$ e 1,2 Hz), 7,57 (1H, dd, $J = 8,0$ e 2,0 Hz), 7,37 (1H, t, $J = 8,0$ Hz), 6,98 (1H, td, $J = 8,0$ e 2,0 Hz), 5,06 (1H, q, $J = 6,4$ Hz), 2,0 (1H, s), 1,45 (3H, d, $J = 6,4$ Hz); RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3), δ (ppm): 147,4, 139,1, 129,0, 128,6, 126,2, 97,1, 73,5, 23,7; IV filme em pastilha de silício (cm^{-1}): 3341 (OH), 1087 (C-O). Dados espectroscópicos do composto estão de acordo com os relatados na literatura (XU *et al.*, 2005).

1-(3-iodofenil)etanol (**3a**): Óleo amarelo palha, RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3), δ (ppm): 7,73 (1H, t, $J = 1,6$ Hz), 7,61 (1H, dt, $J = 7,6$ e 1,6 Hz), 7,32 (1H, d, $J = 7,6$ Hz), 7,10 (1H, t, $J = 7,6$ Hz), 4,84 (1H, q, $J = 6,4$ Hz), 1,47 (3H, d, $J = 6,4$ Hz); RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3), δ (ppm): 148,1, 136,4, 134,5,

130,2, 124,6, 94,4, 69,5, 25,2; IV filme em pastilha de silício (cm^{-1}): 3348 (OH), 1086 (C-O); HRMS (ESI) m/z ; calculado para $\text{C}_8\text{H}_9\text{IO}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$: 247,9698. Encontrado: 247,9675. Os dados espectroscópicos do composto estão de acordo com os relatados na literatura (ROCHA *et al.*, 2010).

1-(4-iodofenil)etanol (**4a**): Sólido amarelo palha, RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3), δ (ppm): 7,66 (2H, d, $J = 8,4$ Hz), 7,11 (2H, d, $J = 8,4$ Hz), 4,85 (1H, q, $J = 6,4$ Hz), 1,45 (3H, d, $J = 6,4$ Hz); RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3), δ (ppm): 145,4, 137,4, 127,3, 92,6, 69,7, 25,1; IV pastilha de KBr (cm^{-1}): 3348 (OH) 1065 (C-O). Os dados espectroscópicos do composto estão de acordo com os relatados na literatura (HAMMERSCHMIDT *et al.*, 2005).

4-(1-hidroxietil)-2-iodofenol (**5a**): Cristal amarelo, RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3), δ (ppm): 7,69 (1H, d, $J = 2,0$ Hz); 7,24 (1H, d, $J = 8,0$ e 2,0 Hz), 6,95 (1H, d, $J = 8,0$ Hz), 5,45 (1H, s), 4,82 (1H, q, $J = 6,0$ Hz), 1,47 (3H, d, $J = 6,0$ Hz); GC-MS m/z (em percentual) encontrado para $\text{C}_8\text{H}_9\text{IO}_2$: 264 $[\text{M}^+]$ (50), 249 (98), 94 (100), 43 (48). Os dados espectroscópicos do composto estão de acordo com os relatados na literatura (ROCHA *et al.*, 2012).

2-cloro-1-feniletanol (**7a**): Óleo amarelo palha, RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3), δ (ppm): 7,34 (5H, m); 4,89 (1H, dd, $J = 8,8$ e 3,6 Hz), 3,73 (1H, dd, $J = 11,2$ e 3,6 Hz), 3,64 (1H, dd, $J = 11,2$ e 8,4 Hz), 2,7 (1H, s); IV filme em pastilha de silício (cm^{-1}): 3409 (OH), 1065 (C-O). Os dados espectroscópicos do composto estão de acordo com os relatados na literatura (TANIS *et al.*, 2006).

2-azido-1-feniletanol (**13a**): Óleo amarelo palha, RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3), δ (ppm): 7,35 (5H, m), 4,85 (1H, dd, $J = 8,0$ e 4,0 Hz), 3,35-3,52 (2H, m), 2,49 (1H, sl); RMN de ^{13}C (50 MHz, CDCl_3), δ (ppm): 140,5, 128,6, 128,3, 125,9, 73,3, 58,0; IV filme em pastilha de silício (cm^{-1}): 3400 (OH), 2103 (C-N₃); Dados espectroscópicos do composto estão de acordo com os relatados na literatura (KAMAL *et al.*, 2004).

2-azido-1-(4-metoxifenil)etanol (**14a**): Sólido amarelo castanho, RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3), δ (ppm): 7,30 (2H, d, 8,0 Hz), 6,91 (2H, d, 8,0 Hz), 4,84 (1H, dd, $J = 8,0$ e 4,0 Hz), 3,82 (3H, s), 3,36-3,54 (2H, m), 2,19 (1H, sl); RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3), δ (ppm): 159,2, 132,7, 127,0, 113,8, 72,6,

57,62, 55,0; IV pastilha de KBr (cm^{-1}): 3418 (OH), 2103 (C-N₃); Os dados espectroscópicos do composto estão de acordo com os relatados na literatura (BRENELLI & FERNANDES, 2003).

2-azido-1-(4-bromofenil)etanol (**15a**): Óleo vermelho castanho, RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3), δ (ppm): 7,51 (2H, d, 8,0 Hz), 7,26 (2H, d, 8,0 Hz), 4,85 (1H, t, $J = 6,0$), 3,46 (2H, d, 6,0 Hz); RMN de ^{13}C (50 MHz, CDCl_3), δ (ppm): 139,4, 131,8, 127,6, 122,2, 72,7, 58,0; IV filme em pastilha de silício (cm^{-1}): 3406 (OH), 2103 (C-N₃); Os dados espectroscópicos do composto estão de acordo com os relatados na literatura (KAMAL *et al.*, 2004).

2-azido-1-(4-nitrofenil)etanol (**16a**): Óleo vermelho castanho, RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3), δ (ppm): 8,08 (2H, d, 8,0 Hz), 7,51 (2H, d, 8,0 Hz), 4,96 (1H, dd, $J = 8,0$ e 4,0 Hz), 3,47-3,39 (2H, m), 1,95 (1H, s); RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3), δ (ppm): 148,0, 147,0, 126,6, 123,3, 72,0, 57,1; IV filme em pastilha de silício (cm^{-1}): 3401 (OH), 2108 (C-N₃); Os dados espectroscópicos do composto estão de acordo com os relatados na literatura (SPELBERG *et al.*, 2001).

2-azido-1-(4-clorofenil)etanol (**17a**): Cristal amarelo palha, RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3), δ (ppm): 7,35 (2H, d, 8,0 Hz), 7,30 (2H, d, 8,0 Hz), 4,84 (1H, dd, $J = 8,0$ e 4,0 Hz), 3,46-3,40 (2H, m), 2,67 (1H, sl); RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3), δ (ppm): 136,9, 134,0, 128,8, 127,2, 72,6, 57,9; IV filme em pastilha de silício (cm^{-1}): 3418 (OH), 2103 (C-N₃); Os dados espectroscópicos do composto estão de acordo com os relatados na literatura (FARDELONE *et al.*, 2006).

3.7 Coleta e identificação dos fungos marinhos

As cepas dos fungos marinhos *Penicillium miczynskii* CBMAI 930, *Trichoderma* sp. CBMAI 932 foram isolados a partir da esponja *Geodia corticostylifera*. As cepas dos fungos *Aspergillus sydowii* CBMAI 934, *Aspergillus sydowii* CBMAI 935, *Bionectria* sp. CBMAI 936 foram isolados a partir da esponja *Chelonaplysilla erecta*. As cepas dos fungos *Penicillium citrinum* CBMAI 1186 e *Beauveira felina* CBMAI 738 foram isolados a partir da alga marinha *Caulerpa* sp. (De VITA-MARQUES *et al.*, 2008). As cepas dos fungos *Aspergillus sclerotiorum* CBMAI 849, *Cladosporium cladosporioides* CBMAI 857 e *Mucor racemosus* CBMAI 847 foram isolados das espécies brasileiras de Cnidários, nomeadamente *Palythoa variabilis*, *Palythoa caribaeorum* e *Mussismilia hispida*, respectivamente, coletados na cidade de São Sebastião, Litoral Norte do Estado de São Paulo,

Brasil (SANTOS *et al.*, 2010). A coleta dos organismos marinhos foi realizada pelo Prof. Dr. Roberto G. S. Berlinck (IQSC-USP). Identificação taxonômica dos fungos derivados de ambiente marinho foi realizada pela Dra. Lara Durães Sette do Centro de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrárias (CPQBA/Unicamp). O isolamento dos fungos foi realizado pela Profa. Dra. Mirna Helena R. Selegim (UFSCar). A identificação baseou-se na utilização de métodos de taxonomia convencional e taxonomia molecular. A morfologia dos fungos isolados foi examinada por meio da observação da colônia em estereoscópico (Leica MZ6, Wetzlar, Germany) e por meio da análise de microscopia óptica das lâminas coradas com lactofenol azul de algodão (Leica DM LS, Wetzlar, Germany). Os fungos foram identificados baseados nas observações macro e microscópicas e seguindo os métodos descritos em literatura (PITT, 1979; SAMSON *et al.*, 2002).

3.8 Composição da água do mar artificial

Composição da água do mar artificial (1 L): $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (1,26 g), $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (9,68 g), KCl (0,61 g), NaCl (30,0 g), Na_2HPO_4 (0,014 mg), Na_2SO_4 (3,47 g), NaHCO_3 (0,17 g), KBr (0,1 g), $\text{SrCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (0,040 g), H_3BO_3 (0,030).

3.9 Meios de cultivo para o crescimento dos fungos marinhos

3.9.1 Meio líquido de extrato de malte 2% (M2)

Em frascos Erlenmeyer de 2 L foram adicionados água do mar artificial (1 L) e extrato de malte (20 g). O pH da solução foi ajustado em 8 com solução de KOH 2M e o meio foi posteriormente autoclavado (120°C, 20 min).

3.9.2 Meio sólido de extrato de malte 2% (MA2)

Em um frasco tipo *shott* foram adicionados água do mar artificial (1 L), extrato de malte (20 g), e agar (15 g). O pH do meio foi ajustado com solução de KOH 2 M em 8 e o meio foi autoclavado (120°C, 20 min).

3.9.3 Repique e crescimento das células microbianas

Os fungos foram preservados em placas de Petri e tubos inclinados e armazenados em refrigerador a 4°C para serem utilizados em posteriores repiques. Os inóculos dos fungos marinhos em meio líquido foram realizados em frascos Erlenmeyer de (2 L) e (250 mL) contendo 1 L e 100 mL de meio de cultura (M2), respectivamente. O crescimento foi realizado em agitadores rotativos (32°C e 130 rpm) de acordo com o tempo mais adequado para cada micro-organismo, variando-se entre 5 a 10 dias. Após o crescimento dos fungos em agitador orbital rotativo as células microbianas foram filtradas à vácuo em funil de Buchner para serem posteriormente utilizadas nas

reações de biocatálise. As células microbianas e o caldo resultante da filtração foram utilizados nas reações de biorredução.

3.9.4 Solução tampão de Sorensen (Na_2HPO_4 - KH_2PO_4)

Foram utilizadas solução tampão fosfato de sódio e potássio. Composição da solução tampão fosfato de sódio (1 L): Dissolveu-se 11,876 g de Na_2HPO_4 . Composição da solução tampão fosfato de potássio (1 L): Dissolveu-se 9,078 g de KH_2PO_4 . O pH desejado foi preparado de acordo com uma mistura apropriada de cada uma das soluções de tampão Sorensen (MORITA & ASSUMPÇÃO, 1995).

3.10 Reações de biorredução com fungos marinhos

As reações foram realizadas em frascos Erlenmeyer de 250 mL, onde se adicionou 5 g de células microbianas previamente suspensas em 100 mL de solução tampão fosfato. Em seguida, com o auxílio de uma micropipeta adicionou-se as cetonas (**1-7** e **13-16**). As cetonas sólidas foram dissolvidas com 200 μL de DMSO.

3.11 Extração e purificação das reações de biorredução para determinação dos rendimentos isolados dos alcoóis

As reações foram acompanhadas por CCD e reveladas em uma câmara com luz UV (254 nm) e reveladas com de solução de anisaldeído, solução alcoólica de vanilina ou solução de ácido fosfomolibdico. Após as reações serem completadas, foi realizada uma filtração das células microbianas em funil de Buchner sob vácuo em capela de fluxo laminar. As células foram lavadas com acetato de etila durante a filtração. Os produtos obtidos das reações biocatalisadas foram extraídos com acetato de etila (3 x 30 mL) em funil de separação. À fase orgânica adicionou-se Na_2SO_4 anidro, filtrou-se e evaporou-se o solvente sob pressão reduzida para obtenção do extrato. As purificações dos produtos foram realizadas utilizando-se sílica gel por CC. Como fases móveis utilizaram-se misturas de solventes (hexano e acetato de etila). Após a purificação dos produtos calculou-se os rendimentos das reações. Análises de RMN de ^1H e ^{13}C e IV foram realizadas para confirmar as estruturas dos produtos.

3.12 Resolução quimio-enzimática

3.12.1 Síntese dos padrões dos acetatos racêmicos

Os acetatos racêmicos **2b-4b** e **13b-17b** foram sintetizados a partir dos correspondentes alcoóis racêmicos **1a-7a** e **13a-17a** para realizar a separação dos enantiômeros por cromatografia a gás ou líquida (Seção 3.6). As reações foram realizadas em um balão de 25 mL sob agitação

magnética. Adicionou-se sequencialmente o anidrido acético (1,5 mmol), a piridina (1,5 mmol) e o álcool (1,0 mmol) em proporções equivalentes (Esquema 24). Manteve-se a reação sob agitação por 24 h. As reações foram acompanhadas por CCD. Após as reações serem completadas adicionou-se ao meio reacional 2 mL de solução de HCl 10%. A fase orgânica foi extraída com acetato de etila (3 x 20 mL) e seca com sulfato de magnésio. O solvente foi removido em rotaevaporador sob pressão reduzida. Os produtos foram purificados por CC utilizando como eluentes misturas de hexano e acetato de etila. Após a purificação dos produtos calculou-se os rendimentos das reações. Análises de RMN de ^1H , ^{13}C e IV foram realizadas para confirmar as estruturas dos produtos.

Esquema 24 - Síntese de acetatos racêmicos.

Os compostos **2b-4b**, **7a**, **13b-17b** foram caracterizados por aplicação das técnicas **espectroscópicas** de (RMN) e (IV) (Anexos: p. 163-174).

Acetato de 1-(2-iodofenil)etila (**2b**): Óleo amarelo palha, RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3), δ (ppm): 7,83 (1H, dd, $J = 8,0$ e $2,0$ Hz), 7,42 (1H, dd, $J = 8,0$ e $2,0$ Hz), 7,36 (1H, td, $J = 8,0$ e $4,0$ Hz), 6,98 (1H, td, $J = 8,0$ e $4,0$ Hz), 5,99 (1H, q, $J = 4,0$ Hz), 2,10 (3H, s), 1,51 (3H, d, $J = 4,0$ Hz); RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3), δ (ppm): 169,9, 144,2, 139,5, 129,3, 128,6, 126,3, 97,2, 75,9, 21,2, 21,2; IV filme em pastilha de silício (cm^{-1}): 1736 (C=O), 1241 (C-O); Os dados espectroscópicos do composto estão de acordo com os relatados na literatura (IZUMI *et al.*, 1996).

Acetato de 1-(3-iodofenil)etila (**3b**): Óleo amarelo palha, RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3), δ (ppm): 7,59-7,69 (2H, m), 7,27-7,32 (1H, m), 7,07 (1H, m), 5,78 (1H, q, $J = 6,0$ Hz), 2,07 (s, 3H), 1,49 (3H, d, $J = 6,0$ Hz); RMN de ^{13}C (50 MHz, CDCl_3), δ (ppm): 170,0, 144,0, 136,8, 135,0, 130,0, 125,3, 94,4, 71,3, 22,1, 21,2; IV filme em pastilha de silício (cm^{-1}): 3059 (H-Ar), 1727 (C=O), 1238 (C-O); HRMS

(ESI) m/z ; calculado para $C_{10}H_{11}IO_2$ $[M+Na]^+$: 289,9804, Encontrado: 289,9797. Os dados espectroscópicos do composto estão de acordo com os relatados na literatura (ROCHA *et al.*, 2010).

Acetato de 1-(4-iodofenil)etila (**4b**): Óleo amarelo palha, RMN de 1H (400 MHz, $CDCl_3$), δ (ppm): 7,85 (2H, d, $J = 8,0$ Hz), 7,28 (2H, d, $J = 8,0$ Hz), 5,98 (1H, q, $J = 4,0$ Hz), 2,24 (3H, s), 1,68 (3H, d, $J = 4,0$ Hz); RMN de ^{13}C (100 MHz, $CDCl_3$), δ (ppm): 170,1, 141,3, 137,5, 128,0, 93,3, 71,6, 22,1, 21,2; IV filme em pastilha de silício (cm^{-1}): 1741 (C=O), 1235 (C-O); Os dados espectroscópicos do composto estão de acordo com os relatados na literatura (HAMMERSCHMIDT *et al.*, 2005).

Acetato de 2-azido-1-feniletila (**13b**): Óleo amarelo palha, RMN de 1H (400 MHz, $CDCl_3$), δ (ppm): 7,37 (5H, m), 5,80 (1H, dd, $J = 8,0$ e 4,0 Hz), 3,63 (1H, dd, $J = 12,0$ e 8,0 Hz), 3,43 (1H, dd, $J = 12,0$ e 4,0 Hz), 2,14 (1H, s); RMN de ^{13}C (100 MHz, $CDCl_3$), δ (ppm): 169,4, 136,9, 128,4, 126,1, 74,3, 54,8, 20,7; IV filme em pastilha de silício (cm^{-1}): 2101 (C-N₃), 1752 (C=O), 1230 (C-O); Os dados espectroscópicos do composto estão de acordo com os relatados na literatura (BRENELLI & FERNANDES, 2003).

Acetato de 2-azido-1-(4-metoxifenil)etila (**14b**): Óleo amarelo palha, RMN de 1H (200 MHz, $CDCl_3$), δ (ppm): 7,20 (2H, d, $J = 8,0$ Hz), 6,81 (1H, d, $J = 10,0$ Hz), 5,79 (1H, dd, $J = 8,0$ e 4,0 Hz), 3,72 (3H, s), 3,54 (1H, dd, $J = 14,0$ e 8,0 Hz), 3,32 (1H, dd, $J = 14,0$ e 4,0 Hz), 2,04 (1H, s); RMN de ^{13}C (100 MHz, $CDCl_3$), δ (ppm): 169,9, 159,9, 129,1, 127,9, 114,1, 74,2, 55,2, 54,9, 21,1; IV filme em pastilha de silício (cm^{-1}): 2101 (C-N₃), 1737 (C=O), 1242 (C-O); Os dados espectroscópicos do composto estão de acordo com os relatados na literatura (BRENELLI & FERNANDES, 2003).

Acetato de 2-azido-1-(4-bromofenil)etila (**15b**): Óleo vermelho castanho, RMN de ^{13}C (100 MHz, $CDCl_3$), δ (ppm): 169,8, 135,8, 131,6, 127,9, 122,5, 73,8, 54,5, 20,6; IV filme em pastilha de silício (cm^{-1}): 3406 (OH), 2103 (C-N₃); Os dados espectroscópicos do composto estão de acordo com os relatados na literatura (BRENELLI & FERNANDES, 2003).

Acetato de 2-azido-1-(clorofenil)etila (**17b**): Óleo amarelo palha, RMN de ^{13}C (100 MHz, $CDCl_3$), δ (ppm): 169,8, 135,6, 134,7, 129,0, 127,9, 73,9, 54,9, 21,0; IV filme em pastilha de silício (cm^{-1}):

3406 (OH), 2103 (C-N₃); Os dados espectroscópicos do composto estão de acordo com os relatados na literatura (BRENELLI & FERNANDES, 2003).

3.12.2 Resolução enzimática com lipase CALB

As reações foram realizadas em frascos Erlenmeyer de 50 mL onde se adicionou 10 mL de hexano, 200 mg ou 200 µL dos alcoóis racêmicos **2a-4a** e **13a-17a**, 100 mg de lipase CALB e 1,0 mL de acetato de vinila. Após adicionar o agente acilante fechou-se o frasco com rolha de borracha e colocou-se imediatamente em um agitador orbital rotativo termostatizado (32°C, 130 rpm). As reações foram monitoradas retirando-se alíquotas do meio reacional em tempos pré-determinados. As alíquotas foram analisadas por CCD e por GC-FID com coluna quirai. Quando constatado que ocorreu cerca de 50% da conversão, a reação foi interrompida. A mistura reacional foi filtrada em papel filtro e a enzima imobilizada foi lavada 3 a 5 vezes com acetato de etila. Em seguida, o solvente orgânico foi removido no rotaevaporador. Purificou-se o álcool e o acetato obtido por CC, utilizando uma mistura de eluentes hexano:acetato de etila (9:1 e 8:2). Após a purificação dos produtos calculou-se os rendimentos das reações. Análises de GC-MS, RMN de ¹H, ¹³C, IV e polarimétrica foram efetuadas para confirmar as estruturas dos produtos.

3.13 Procedimento experimental para a reação de acoplamento de Suzuki dos alcoóis quirais iodados **2a-4a**

Estas reações foram realizadas em colaboração com o Prof. Dr. Cristiano Raminelli, na Universidade Federal da Grande Dourados (UNIFESP), a síntese foi realizada pelo aluno Isac George Rosset. Os alcoóis quirais **2a-4a** obtidos por biocatálise foram submetidos à reação de acoplamento cruzado (Reação de Suzuki) por meio de catalisador de paládio. Para a reação de Suzuki, foi empregado (0,3 mmol) do material de partida (alcoóis **2a-4a**), 0,3 mmol do ácido fenil borônico, carbonato de potássio como base, 0,9 mmol, tetra(trifenilfosfina)paládio como catalisador 0,015 mmol e tolueno:H₂O (8:2). As reações foram mantidas sob aquecimento em banho de óleo a 80°C por 24 h sob agitação magnética. Posteriormente, foi adicionado ao meio reacional 10 mL de solução saturada de NaCl e extraído com acetato de etila (3 x 20 mL). O material bruto foi seco com MgSO₄ anidro, submetido a uma filtração simples e o solvente removido por evaporação a pressão reduzida. O produto foi purificado em CC utilizando uma mistura de eluentes hexano:acetato de etila (7:3). Posteriormente, determinou-se o rendimento do produto isolado. Análises de espectrometria de massas, RMN de ¹H, ¹³C, IV e polarimétrica foram efetuadas para confirmar as estruturas dos produtos (Esquema 25).

Esquema 25 - Reações de acoplamento cruzado de Suzuki.

Os compostos **3c-4c** foram caracterizados por aplicação das técnicas espectroscópicas de (RMN), (IV) e (HRMS) (Anexos: p. 175-178):

(S)-(-)-1-(bifenil-3-il)etanol (**3c**): Óleo amarelo palha, $[\alpha]_D^{25}$ -13,0 (*c* 1,00; CHCl_3 ; 98% *ee*); RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3), δ (ppm): 7,60 (m, 1H), 7,51 (m, 2H), 7,49 (m, 1H), 7,46 (m, 2H), 7,44 (m, 1H), 7,37 (m, 1H), 7,32 (m, 1H), 4,77 (1H, q, $J = 4,0$ Hz), 1,54 (3H, d, $J = 4,0$ Hz); RMN de ^{13}C (50 MHz, CDCl_3), δ (ppm): 146,4, 141,5, 141,1, 129,6, 129,0, 128,8, 127,4, 127,2, 128,4, 124,4, 70,6, 25,3; IV filme em pastilha de silício (cm^{-1}): 3374 (OH), 1076 (C-O); HRMS (ESI) m/z ; calculado para $\text{C}_{10}\text{H}_{11}\text{IO}_2$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$: 221,0942, Encontrado: 221,0935. Os dados espectroscópicos do composto estão de acordo com os relatados na literatura (ROCHA *et al.*, 2010).

(S)-(-)-1-(bifenil-4-il)etanol (**4c**): Óleo amarelo palha, $[\alpha]_D^{25}$ -13,2 (*c* 1,00; CHCl_3 ; 98% *ee*); literatura: $[\alpha]_D^{25}$ -29,5 (*c* 1,0; CHCl_3 , 77 % *ee*), (ITO *et al.*, 2009). RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3), δ (ppm): 7,58 (m, 4H), 7,44 (m, 4H), 7,34 (m, 1H), 4,95 (1H, q, $J = 4,0$ Hz), 1,54 (3H, d, $J = 4,0$ Hz); RMN de ^{13}C (50 MHz, CDCl_3), δ (ppm): 144,8, 140,9, 140,5, 128,8, 127,3, 127,1, 125,9, 70,2, 25,1; IV filme em pastilha de silício (cm^{-1}): 3341 (OH), 1085 (C-O). Os dados espectroscópicos estão de acordo com a literatura (HATZAKIS *et al.*, 2005).

3.14 Procedimento da síntese dos triazóis

Em um balão de 15 mL foi adicionado o azido-álcool **13a-17a** (1,0 mmol) o sulfonato de 2-(trimetilsilil)fenil-trifluorometano (1,15 mmol) em 4 mL de acetonitrila anidra. Posteriormente foi adicionado o fluoreto de cério (2,0 mmol) (Esquema 26). A reação ficou sob agitação por 18 h em atmosfera de argônio. Para a extração, adicionou-se 8 mL de NaHCO_3 10% e extraiu-se com acetato de etila (3x20 mL). Removeu-se o solvente sob pressão reduzida no evaporador rotativo. A purificação foi realizada por CC com sílica gel utilizando uma mistura de eluentes hexano:acetato

de etila (7:3) (SHI *et al.*, 2008). Análises de RMN uni- e bidimensionais e IV foram realizadas para confirmar as estruturas dos produtos.

Esquema 26 - Síntese dos triazóis quirais.

3.15 Procedimento para imobilização das células microbianas

3.15.1 Preparação do suporte xerogel de sílica

A preparação deste suporte foi realizada pelo aluno de pós-doutorado Adriano Lopes de Souza em colaboração com o Prof. Dr. Ubirajara Pereira Rodrigues Filho (IQSC). O suporte xerogel de sílica foi preparado pela mistura dos reagentes químicos TEOS (26,8 mL, 0,12 mol), etanol (100,0 mL), água deionizada (1,5 mL, resistividade: 18,2 MΩ/cm) e 1,0 mL de solução NaOH 0,1 mol/L em um frasco de Teflon®. Esta mistura foi aquecida a 60°C e mantida nesta temperatura durante 20 min sob agitação magnética. Posteriormente, o frasco com a mistura foi deixada à temperatura ambiente até a secagem completa para formação do xerogel (ROCHA *et al.*, 2012).

3.16 Imobilização das células dos fungos *A. sclerotiorum* CBMAI 849 e *P. citrinum* CBMAI 1186 em suporte de sílica gel, xerogel de sílica e quitosana

Os suportes sílica gel, quitosana e xerogel de sílica foram utilizadas sem purificação e lavagem. As células dos fungos marinhos *A. sclerotiorum* CBMAI 849 e *P. citrinum* CBMAI 1186 foram cultivadas como descrito na (seção 3.9.3). Após o crescimento microbiano realizou-se uma filtração sob vácuo em funil de Buchner. As células microbianas (5,0 g) foram suspensas em 100 mL de solução tampão fosfato (Na₂HPO₄/KH₂PO₄, pH = 7, 0,1 M) em um frasco Erlenmeyer de 250 mL. Os suportes de sílica gel (10,0 g), xerogel de sílica (10,0 g) ou quitosana (3,0 g) foram adicionados a cada frasco Erlenmeyer separadamente. As misturas foram incubadas durante 24 h em um agitador orbital a 32°C e 120 rpm. Após filtração sob vácuo em funil de Buchner, as células imobilizadas foram posteriormente utilizadas nas reduções biocatalíticas. Os fungos suportados foram analisados por microscopia eletrônica de varredura (MEV).

3.17 Microscopia eletrônica de varredura

Para realização das análises de MEV as superfícies das amostras das células microbianas dos fungos *A. sclerotiorum* CBMAI 849 e *P. citrinum* CBMAI 1186 imobilizadas foram lavadas com água destilada para remover o excesso de suporte que não adsorveu às células. Em seguida, as amostras foram desidratadas por sucessivas lavagens com uma série de soluções água-etanol (10%, 25%, 40%, 50%, 70%, 80%, 90% e 100%). Foram adicionados 10 mL de cada mistura em frascos Erlenmeyer de 50 mL, durante 15 min. As amostras foram secas em dessecador e revestidas com 10 nm de ouro por *sputtering* de íons argônio utilizando um pulverizador catódico modelo (Baltec MED 020). As imagens foram obtidas com uma ampliação de 200 a 5.000 vezes em um microscópio eletrônico de varredura (Leica-Zeiss LEO 440), operando a uma voltagem de aceleração de 20 kV, equipado com um detector de elétrons secundário 7060.

3.18 Redução da 1-(4-metoxifenil)etanona (**1**) e 2-cloro-1-feniletanona (**7**) por células imobilizadas de *A. sclerotiorum* CBMAI 849 e *P. citrinum* CBMAI 1186

As reações de biorredução da 1-(4-metoxifenil)etanona (**1**) e da 2-cloro-1-feniletanona (**7**) com as células microbianas imobilizadas foram realizadas em frascos Erlenmeyer de 250 mL contendo 100 mL de solução tampão fosfato ($\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$, pH = 7, 0,1 M). Adicionou-se aos frascos Erlenmeyer as cetonas **1** ou **7** previamente dissolvidas em 300 μL de dimetilsulfóxido, e em seguida as células imobilizadas (12,0 g de sílica gel, 12,0 g de xerogel de sílica ou 7,0 g de quitosana). As células imobilizadas não foram liofilizadas. As misturas contendo as cetonas e as células imobilizadas foram incubadas durante 9 dias em agitador orbital (32°C e 120 rpm). As reações foram extraídas com acetato de etila (1,0 mL) por agitação em vórtex seguida por centrifugação (6000 rpm, 6,0 min) e analisados por GC-FID e GC-MS. Os produtos obtidos foram purificados por CC com sílica gel utilizando uma mistura de eluentes hexano:acetato de etila (95:5).

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 Biorredução da 1-(4-metoxifenil)etanona (**1**) com fungos marinhos

A biorredução da 1-(4-metoxifenil)etanona (**1**) foi realizada por uma triagem utilizando as células microbianas de nove fungos marinhos (*Aspergillus sydowii* CBMAI 934, *Aspergillus sydowii* CBMAI 935, *Aspergillus sclerotiorum* CBMAI 849, *Bionectria* sp. CBMAI 936, *Beauveria felina* CBMAI 738, *Cladosporium cladosporioides* CBMAI 857, *Mucor racemosus* CBMAI 847, *Penicillium citrinum* CBMAI 1186, *Penicillium miczynskii* CBMAI 930). Os resultados são apresentados no esquema 27 e tabela 1.

Esquema 27 - Biorredução da 1-(4-metoxifenil)etanona (**1**) para (S)- ou (R)-1-(4-metoxifenil)ethanol (**1a**) por fungos marinhos.

Tabela 1 - Biorredução da 1-(4-metoxifenil)etanona (**1**) com fungos marinhos.

Fungos marinhos	t (dias)	c (%) ^a 1	c (%) ^a 1a	ee (%) 1a	CA 1a
<i>A. sclerotiorum</i> CBMAI 849	3	-	100 ^b	>99	<i>S</i>
<i>P. citrinum</i> CBMAI 1186	3	100	0	-	
	6	90	10	-	
	9	60	40 ^c	69	<i>R</i>
<i>M. racemosus</i> CBMAI 847	3	95	5	-	
	6	95	5	-	
	9	95	5	-	<i>nd</i>
<i>Bionectria</i> sp. CBMAI 936	3	23	77	55	
	6	8	92	84	
	9	-	100 ^d	>99	<i>R</i>
<i>A. sydowii</i> CBMAI 935	3	100	0	-	
	6	26	74	45	
	9	-	100	>99	<i>R</i>
<i>A. sydowii</i> CBMAI 934	3	100	0	-	
	6	90	10	-	
	9	90	10	-	<i>nd</i>
<i>P. miczynskii</i> CBMAI 930	3	100	0	-	
	6	93	7	-	
	9	82	18 ^e	91	<i>S</i>
<i>C. cladosporioides</i> CBMAI 857	3	100	0	-	
	6	100	0	-	
	9	94	6	-	<i>nd</i>
<i>B. felina</i> CBMAI 738	3	15	85	93	
	6	1	99	>99	
	9	-	100 ^f	>99	<i>S</i>

Condições da reação: 5,0 g de células microbianas; 0,50 mmol da 1-(4-metoxifenil)etanona (**1**) dissolvida em 300 µL de DMSO; tampão fosfato (Na₂HPO₄/KH₂PO₄; 100 mL; pH 7; 0,1 M); 32°C; 150 rpm; *nd*: não determinado; *ee*: excesso enantiomérico; *Ca* configuração absoluta; ^aConcentração determinada por análise em GC-FID utilizando coluna quiral; Rendimento isolado: ^b 95%; ^c 35%; ^d 93%; ^e 15%; ^f 90%.

O progresso das reações foi acompanhado por coleta de alíquotas (2,0 mL) de acordo com os tempos indicados na tabela 1. As alíquotas foram extraídas com acetato de etila (1,0 mL) por mistura em vortex e centrifugadas (6.000 rpm, 6 min) e analisadas por GC-FID e GC-MS.

Os melhores resultados foram alcançados com os fungos *A. sclerotiorum* CBMAI 849, *B. felina* CBMAI 738, *Bionectria* sp. CBMAI 936 e *A. sydowii* CBMAI 935 que catalisaram a biorredução da 1-(4-metoxifenil)etanona (**1**) para o correspondente 1-(4-metoxifenil)etanol (**1a**) com excelente excesso enantiomérico e conversão (>99% ee, c = 100%), (Tabela 1, Figuras 16-17).

Figura 16 - Cromatogramas obtidos por GC-FID em coluna quiral de β -ciclodextrina.

(A) Cromatograma dos padrões: cetona **1** e álcool racêmico **1a** (B) Cromatograma 3 dias da reação com as células do fungo *A. sydowii* CBMAI 935 com 3 dias (C) cromatograma da reação com 6 dias (D) cromatograma da extração final com 9 dias de reação. Os parâmetros utilizados nas análises por GC-FID para obtenção dos cromatogramas foram: $T_i = 130^\circ\text{C}/2$ min a $T_f = 170^\circ\text{C}/3$ min, $r = 5^\circ\text{C}/\text{min}$. As reações foram realizadas com 100 mL de tampão fosfato (pH = 7,0, 0,1 M), (50 mg, 33,32 mmol) da 1-(4-metoxifenil)etanona (**1**); 200 μL de DMSO, 150 rpm, 32°C e 5 g células do fungo marinho *A. sydowii* CBMAI 935.

Todas as reações de biorredução da 1-(4-metoxifenil)etanona (**1**) com as células dos fungos *P. citrinum* CBMAI 1186, *C. cladosporioides* CBMAI 857, *A. sclerotiorum* CBMAI 849, *P. miczynskii* CBMAI 930, *M. racemosus* CBMAI 847, *B. felina* CBMAI 738, *Bionectria* sp. CBMAI 936, *A. sydowii* CBMAI 934 e *A. sydowii* CBMAI 935 foram monitoradas por CCD e por injeções no GC-FID entre 3, 6 e 9 dias. Na figura 17, são apresentados os cromatogramas das extrações finais com 9 dias de reação.

Figura 17 - Cromatogramas das reações de redução da 1-(4-metoxifenil)etanona (**1**) com as células dos fungos marinhos.

Cromatogramas obtidos por GC-FID equipado com coluna quiral β -ciclodextrina. Os parâmetros utilizados nas análises foram: $T_i = 130^\circ\text{C}/2 \text{ min}$ a $T_f = 170^\circ\text{C}/3 \text{ min}$, $r = 5^\circ\text{C}/\text{min}$. As reações foram realizadas com 100 mL de tampão fosfato (pH = 7,0, 0.1 M), (50 mg, 0,33 mmol) da 1-(4-metoxifenil)etanona (**1**), 200 μL de DMSO, 150 rpm, 32°C e 5 g de células microbianas dos fungos marinhos.

O fungo *A. sclerotiorum* CBMAI 849 catalisou a biorredução da cetona **1** para o S-álcool **1a** em apenas 3 dias de reação. O álcool (S)-**1a** foi obtido com 95% de rendimento isolado após purificação em coluna cromatográfica. O fungo *B. felina* CBMAI 738 catalisou a biorredução da cetona **1** para o S-álcool **1a** com 9 dias de reação e o rendimento isolado foi de 90%. Os fungos *B. felina* CBMAI 738, *A. sclerotiorum* CBMAI 849 catalisaram a biorredução da 1-(4-metoxifenil)etanona (**1**) de acordo com a regra empírica de Prelog. Segundo postulado por Prelog, de acordo com o tamanho dos substituintes ligados ao grupo carbonílico é possível prever empiricamente por qual face da carbonila a transferência do íon hidreto do cofator NADH/NADPH ocorrerá preferencialmente. As duas faces de um centro trigonal plano presentes no grupo carbonílico, têm as designações de face *re* (frente) e face *si* (oposta), que são estabelecidas de acordo com as prioridades por número atômico segundo Cahn-Ingold-Prelog. Se a transferência do íon hidreto ocorrer pela face *re* da carbonila proestereogênica obtém-se o S-álcool e se ocorrer

pela face *si* obtém-se *R*-álcool (REZENDE, 2007). Esta transferência pode ser realizada por um dos dois possíveis íons hidreto do cofator NAD(P)H para a carbonila proquiral (Figura 18).

Figura 18 - Transferência de íons hidreto da nicotinamida na forma reduzida (NADH/NADPH) para o grupo carbonílico.

Por outro lado, os fungos *Bionectria* sp. CBMAI 936 e *A. sydowii* CBMAI 935 catalisaram a biorredução da 1-(4-metoxifenil)etanona (**1**) para o correspondente (*R*)-1-(4-metoxifenil)etanol (**1a**) com 9 dias de reação de acordo com a regra *anti*-Prelog. O *R*-álcool **1a** obtido com os fungos *Bionectria* sp. CBMAI 936 e *A. sydowii* CBMAI 935 foi isolado com 93% e 92%, respectivamente. O fungo *P. citrinum* CBMAI 1186 catalisou a biorredução estereosseletiva *anti*-Prelog da cetona **1** para o *R*-álcool **1a** em 9 dias, com baixo excesso enantiomérica (69% *ee*) e 35% de rendimento isolado.

Os fungos *M. racemosus* CBMAI 847, *A. sydowii* CBMAI 934, *C. cladosporioides* CBMAI 857 e *P. miczynskii* CBMAI 930 catalisaram a biorredução da cetona **1** com baixa conversão (5-18%) com 9 dias de reação. Os fungos *A. sydowii* CBMAI 934 e *P. miczynskii* CBMAI 930 catalisaram a biorredução estereosseletiva da cetona **1** para o (*R*)-**1a** e (*S*)-**1a** com bom excesso enantiomérico 90 e 91% *ee*, respectivamente (Tabela 1, Figura 17). Estes resultados demonstraram que o uso de células microbianas na biorredução da cetona **1** foi relacionada com o tipo de micro-organismo utilizado. Estudos da literatura também reportaram a baixa conversão na redução estereosseletiva da 1-(4-metoxifenil)etanona (**1**) para obtenção do (*S*)-(-)-1-(4-metoxifenil)etanol (**1a**) utilizando a polpa das raízes de cenoura *Daucus carota* L. (*c* = 12%, 88% *ee*) e do aipo-rábano *Apium graveolens* L., var. *rapaceum* (*c* = 10%, 87% *ee*), (MAZCZKA & MIRONOWICZ, 2004). Outro estudo realizado com as células imobilizadas do fungo *Trigonopsis variabilis* AS2.1611 em vários sistemas bifásicos tampão/líquido iônico, também apresentaram grande variação nas conversões e

excessos enantioméricos ($c = 2,5$ -95%, 5-99% *ee*) na biorredução da cetona **1** para o *R*-álcool **1a**. Em sistemas aquosos muitos dos biocatalisadores utilizados proporcionaram baixa enantiosseletividade, possivelmente resultado da inibição da reação frente ao substrato ou produto, ou a toxicidade dos compostos para as células (LOU *et al.*, 2009).

Alguns estudos reportam que na presença de um grupo eletro-doador, como o grupo metoxi na posição *para* do anel aromático, torna-se mais difícil a catálise enzimática (CSUK & GLANZER, 1991). Possivelmente devido à maior estabilização pela ressonância que o grupo metoxi exerce sobre o anel, uma vez que ocorre uma efetiva sobreposição dos orbitais “p” por toda extensão da molécula, diminuindo o caráter eletrofílico do grupo carbonílico (Figura 19).

Figura 19 - Ressonância do 1-(4-metoxifenil)etanona (**1**).

Como exemplo, o enantiômero (*S*)-1-(4-metoxifenil)etanol (**1a**) foi obtido com 7% de conversão e 9% de excesso enantiomérico utilizando células de *Candida tropicalis* CE017 (VIEIRA *et al.*, 2010).

Alguns trabalhos reportam o uso de catalisadores sintéticos na redução da cetona **1**, por exemplo, o catalisador de rutênio. WANG *et al.*, utilizaram um catalisador quiral de rutênio para obter o *S*-álcool **1a** com bom excesso enantiomérico (96% *ee*) e excelente conversão (98%), (WANG *et al.*, 2009). O álcool **1a** foi obtido com (97% *ee*) e 80% de rendimento isolado utilizando catalisador sintético o 1-((1*R*,2*R*)-2-(benzilamino)cicloexil)-3-(3,5-bis(trifluorometil)fenil)tiouréia (LI *et al.*, 2010). Entretanto, a desvantagem do uso destes catalisadores sintéticos são os elevados custos, bem como, requerem condições especiais de reação como uso de meio inerte para evitar a decomposição dos mesmos.

A triagem com os fungos marinhos demonstraram um grande potencial para a biorredução estereosseletiva da cetona **1**. As enzimas presentes nas células de diferentes fungos foram capazes de catalisar a biorredução da cetona **1** produzindo *S* e *R* alcoóis com seletividade Prelog e *anti*-Prelog.

A configuração absoluta do (*S*)-1-(4-metoxifenil)etanol (**1a**) obtido por biorredução foi determinada por comparação do sinal da medida de rotação óptica com a literatura (VIEIRA *et al.*,

2010; XU *et al.*, 2005). O valor da rotação experimental para o (S)-(-)-1-(4-metoxifenil)etanol (**1a**) foi de $[\alpha]_D^{25} -45,13$ (c 0,5; CHCl₃; >99% *ee*); e os valores encontrados na literatura foram de $[\alpha]_D^{25} = -2,2$ (c 0,5; CH₂Cl₂), (VIEIRA *et al.*, 2010); $[\alpha]_D^{25} -41,3$ (c 0,20; CHCl₃; 97% *ee*), (XU *et al.*, 2005).

Os fungos marinhos utilizados demonstraram ser bons catalisadores frente à redução da cetona **1** para os correspondentes S- ou R-álcool **1a** com elevado excesso enantiomérico.

Em uma pesquisa no catálogo da Sigma-Aldrich pode-se constatar que 1 mL do (S)-(+)-2-cloro-1-feniletanol **7a** custa 753,00 R\$, 1 mL do (R)-(+)-2-cloro-1-feniletanol **7a** custa 1.084,00 R\$, 1 mL do (R)-(+)-1-feniletanol custa 793,00 R\$ e 1 mL do (S)-(-)-1-feniletanol custa 751,00 R\$.

Portanto, por biocatálise é possível agregar valor aos compostos via reações em condições brandas e sustentáveis.

4.2 Bioconversão das iodoacetofenonas 2-4 com fungos marinhos

A bioconversão das iodoacetofenonas **2-4** foram realizadas utilizando as células dos fungos marinhos (*A. sclerotiorum* CBMAI 849, *A. sydowii* CBMAI 934, *B. felina* CBMAI 738, *M. racemosus* CBMAI 847, *P. citrinum* CBMAI 1186, *P. miczynskii* CBMAI 931, *P. miczynskii* CBMAI 930, *P. oxalicum* CBMAI 1185, *Trichoderma* sp. CBMAI 932). Os resultados são apresentados na tabela 2, esquema 28, figuras 20-22.

Esquema 28 - Biorredução das iodoacetofenonas **2-4** para *S*- ou *R*-iodofeniletanois **2a-4a** por fungos marinhos.

Em geral, as reações enzimáticas usando um único micro-organismo não são capazes de catalisar a transformação de vários compostos xenobióticos com resultados semelhantes. Portanto, para obter e avaliar a seletividade de diferentes compostos um estudo biocatalítico com várias linhagens de micro-organismos torna-se necessário. Os resultados mostrados na tabela 2 da bioconversão das iodoacetofenonas **2-4** com fungos marinhos confirmaram essas evidências. Foram observadas diferentes seletividades nas bioconversões de acordo com o substrato e fungo utilizado para cada reação.

As células dos fungos marinhos *A. sclerotiorum* CBMAI 849, *A. sydowii* CBMAI 934 e *P. miczynskii* CBMAI 931 catalisaram a biorredução das iodoacetofenonas **2-4** de acordo com a regra de Prelog. Os fungos *P. miczynskii* CBMAI 931 e *A. sydowii* CBMAI 934 foram capazes de realizar a biorredução da *p*-iodoacetofenona (**4**) para o *S*-álcool **4a** em apenas 48 h com elevada conversão (72% e 92%) e excelente excesso enantiomérico (>99%), respectivamente. O *S*-álcool **4a** foi obtido com 70% e 90% de rendimento isolado, respectivamente, após purificação por cromatografia em coluna.

Não foi observado a biorredução da *o*-iodoacetofenona (**2**) utilizando as células do fungo *A. sydowii* CBMAI 934. As células do fungo *A. sydowii* CBMAI 934 catalisou a redução da *m*-iodoacetofenona (**3**) para o *S*-álcool **3a** com baixa conversão (18%) e seletividade (35% ee). A reação foi incubada em agitador orbital rotativo até 168 h, contudo não se observou uma melhora nas conversões frente aos fungos.

O fungo *A. sclerotiorum* CBMAI 849 catalisou a biorredução das cetonas **2-3** para os *S*-alcoóis **2a-3a** com moderada conversão (31%) e bom excesso enantiomérico (74% e >99% *ee*), respectivamente. O *S*-álcool **3a** foi obtido em apenas 48 h de reação com 28% de rendimento isolado após purificação por cromatografia em coluna.

Tabela 2 - Bioconversão das iodoacetofenonas **2-4** por fungos marinhos.

t (h)	orto-iodoacetofenona (2)			meta-iodoacetofenona (3)			para-iodoacetofenona (4)		
	c (%) ^a 2	c (%) ^a 2a	ee (CA) 2a	c (%) ^a 3	c (%) ^a 3a	ee (CA) 3a	c (%) ^a 4	c (%) ^a 4a	ee (CA) 4a
<i>A. sclerotiorum</i> CBMAI 849									
48	94	6	74 (S)	69	31	>99 (S)	63	37	77 (S)
96	94	6	74 (S)	69	31	>99 (S)	63	37	77 (S)
168	94	6	74 (S)	69	31	>99 (S)	63	37	77 (S)
<i>A. sydowii</i> CBMAI 934									
48	100	-	-	82	18	35 (S)	8	92	>99 (S)
96	100	-	-	82	18	35 (S)	8	92	>99 (S)
168	100	-	-	82	18	35 (S)	8	92	>99 (S)
<i>B. felina</i> CBMAI 738									
48	100	-	-	100	-	-	28	72	>99 (R)
96	100	-	-	100	-	-	28	72	>99 (R)
168	100	-	-	100	-	-	29	71	>99 (R)
<i>M. racemosus</i> CBMAI 847									
48	77	23	>99 (S)	71	29	>99 (S)	16	84	>99 (S)
96	77	23	>99 (S)	71	29	>99 (S)	16	84	>99 (S)
168	77	23	>99 (S)	71	29	>99 (S)	16	84	>99 (S)
<i>P. citrinum</i> CBMAI 1186									
48	20	80	>99 (S)	72	28	>99 (S)	100	-	-
96	19	81	>99 (S)	72	28	>99 (S)	100	-	-
168	14	86	>99 (S)	72	28	>99 (S)	100	-	-
<i>P. miczynskii</i> CBMAI 931									
48	100	-	-	44	56	94 (S)	28	72	99 (S)
96	96	4	-	44	56	94 (S)	28	72	99 (S)
168	96	4	-	44	56	94 (S)	28	72	99 (S)
<i>P. miczynskii</i> CBMAI 930									
48	91	9	>99 (S)	80	20	76 (S)	100	-	-
96	73	27	>99 (S)	77	23	75 (S)	100	-	-
168	73	27	>99 (S)	74	26	62 (S)	75	25	18 (R)
<i>P. oxalicum</i> CBMAI 1185									
48	83	17	>99 (S)	95	5	>99 (S)	41	59	85 (R)
96	79	21	>99 (S)	95	5	>99 (S)	65	35	>99 (R)
168	51	49	>99 (S)	90	10	>99 (S)	84	16	>99 (R)
<i>Trichoderma</i> sp. CBMAI 932									
48	38	62	>99 (S)	75	25	>99 (S)	27	73	55 (R)
96	38	62	>99 (S)	75	25	>99 (S)	29	71	38 (R)
168	38	62	>99 (S)	75	25	>99 (S)	33	67	32 (R)

Condições das reações: 5,0 g de células microbianas; 0,50 mmol das iodoacetofenonas **2-4** dissolvidos em 300 µL de DMSO, tampão fosfato (Na₂HPO₄/KH₂PO₄, 100 mL, pH = 7, 0,1 M); 32°C; 120 rpm, *ee* (%): excesso enantiomérico, Ca Configuração absoluta, ^aConcentração determinada por análise em coluna quiral GC-FID.

Figura 20 - Cromatogramas das reações de redução da *o*-iodoacetofenona (**2**) com as células dos fungos marinhos *Trichoderma* sp. CBMAI 932, *P. oxalicum* CBMAI 1185 e *P. citrinum* CBMAI 1186.

Cromatogramas obtidos por GC-FID equipado com coluna quiral de β -ciclodextrina. Os parâmetros utilizados nas análises foram: $T_i = 120^\circ\text{C}/2 \text{ min}$ a $T_f = 165^\circ\text{C}/8 \text{ min}$, $r = 2^\circ\text{C}/\text{min}$. As reações foram realizadas com 100 mL de tampão fosfato (pH = 7,0; 0,1 M), (50 mg, 0,20 mmol) da *o*-iodoacetofenona (**2**), 200 μL de DMSO, 150 rpm, 32°C e 5 g de células dos fungos marinhos *P. citrinum* CBMAI 1186, *P. oxalicum* CBMAI 1185 e *P. citrinum* CBMAI 1186.

O fungo *P. miczynskii* CBMAI 931 também catalisou a biorredução da *m*-iodoacetofenona (**3**) com conversão moderada (56%) e com bom excesso enantiomérico (94%) em 48 h de reação. No entanto observou-se uma baixa conversão (4%) na redução da *o*-iodoacetofenona (**2**) pelas células do fungo *P. miczynskii* CBMAI 931. Novamente não foi observada nenhuma melhora na conversão e excesso enantiomérico com 168 h de reação. O S-álcool **3a** obtido pela biorredução com as células do fungo *P. miczynskii* CBMAI 931 foi purificado por CC resultando em 51% de rendimento isolado.

O fungo *B. felina* CBMAI 738 catalisou a biorredução da *p*-iodoacetofenona (**4**) com excelente excesso enantiomérico (>99%) e boa conversão (72%). O curso estereoquímico da reação catalisada possivelmente pelas enzimas alcoóis desidrogenases presente nas células microbianas do *B. felina* mostraram estereopreferência *anti*-Prelog para o *R*-álcool **4a**. O *R*-álcool **4a** foi isolado com 71% de rendimento após purificação por cromatografia em coluna. No entanto, não foi observado a biorredução das cetonas **2-3** pelas células do fungo *B. felina* CBMAI 738.

Na literatura é descrito que grupos substituintes retiradores de elétrons localizados em posição *para* no anel aromático de derivados da acetofenona, favorecem a redução mediada por fermento de pão (BRENELLI *et al.*, 1992). Nakamura *et al.*, estudaram na década de 80 a redução da *p*-iodoacetofenona (**4**), e isolaram o (*S*)-1-(*p*-iodofenil)etanol (**4a**) com 30% de rendimento e 96% *ee*, no qual 50% da cetona remanescente foi recuperada após 2 dias de reação (NAKAMURA *et al.*, 1984). Grupos retiradores de elétrons posicionados tanto no anel, quanto na parte alifática (α -carbonila) de derivados da acetofenona podem favorecer o rendimento das reações de redução (RODRIGUES & MORAN, 2001).

Em nossos estudos foi observado que as células dos fungos *M. racemosus* CBMAI 847 e *P. citrinum* CBMAI 1186 foram capaz de catalisar a biorredução das cetonas **2-3** para os correspondentes iodofeniletanóis **2a-3a** com excelente excesso enantiomérico (>99%) de acordo com a regra de Prelog (Tabela 2). O fungo *M. racemosus* CBMAI 847 catalisou a biorredução das cetonas **2-3** em apenas 48 h. A biorredução da *p*-iodoacetofenona (**4**) utilizando as células microbianas do fungo *M. racemosus* CBMAI 847 ocorreu com uma alta conversão 84%. Os *S*-alcoóis **2a-4a** obtidos pela biorredução, foram purificados por CC obtendo-se 20, 25 e 80% de rendimento isolado, respectivamente. O fungo *P. citrinum* CBMAI 1186 catalisou a biorredução da *o*-iodoacetofenona (**2**) também com apenas 48 h de reação e com boa conversão (80%). Os *S*-alcoóis **3a-4a** obtidos pela biorredução das iodoacetofenonas **2-3** utilizando as células do fungo *P. citrinum* CBMAI 1186, foram purificados por CC, obtendo-se 80 e 25% de rendimentos isolados, respectivamente. As células do fungo *P. citrinum* CBMAI 1186 não foram capaz de catalisar a biorredução da *p*-iodoacetofenona (**4**) como mostrado na tabela 2.

O fungo *Trichoderma* sp. CBMAI 932 catalisou a biorredução das iodoacetofenonas **2** e **3** para os *S*-alcoóis **2a** e **3a** com excelente excesso enantiomérico (>99%). O *S*-alcoóis **3a** foi obtido em bom rendimento isolado (55%) após purificação por cromatografia em coluna. Observou-se um decréscimo na conversão e no excesso enantiomérico com o aumento do tempo reacional (55% *ee*, 48 h; 38% *ee*, 96 h; 32% *ee*, 168 h) na biorredução da *p*-iodoacetofenona (**4**) para o *R*-

alcoóis **4a** utilizando as células do fungo *Trichoderma* sp. CBMAI 932 (Figura 21). Este decréscimo no excesso enantiomérico sugere que pode existir uma competição entre as reações de biorredução e bio-oxidação, uma vez que teoricamente não é esperado este tipo de resultado.

Figura 21 - Cromatogramas da reação de redução da *p*-iodoacetofenona (**4**) para o correspondente (*R*)-1-(4-iodofenil)etanol (**4a**) com as células do fungo marinho *Trichoderma* sp. CBMAI 932.

Cromatogramas obtidos por GC-FID equipado com coluna quiral de β -ciclodextrina. Os parâmetros utilizados nas análises foram: $T_i = 120^\circ\text{C}/2 \text{ min}$ a $T_f = 165^\circ\text{C}/8 \text{ min}$, $r = 2^\circ\text{C}/\text{min}$. As reações foram realizadas com 100 mL de tampão fosfato (pH = 7,0, 0,1 M), (50 mg, 0,20 mmol) da *p*-iodoacetofenona (**4**), 200 μL de DMSO, 150 rpm, 32°C e 5 g de células do fungo *Trichoderma* sp. CBMAI 932.

Foi observado um comportamento similar para o excesso enantiomérico da (*S*)-*m*-iodofeniletanol (**3a**). Neste caso, o excesso enantiomérico foi de 76% *ee* (48 h) e 62% *ee* (168 h) de reação.

As células do fungo *P. oxalicum* CBMAI 1185 catalisaram a biorredução da *p*-iodoacetofenona (**4**) para o correspondente *p*-iodofeniletanol (**4a**). Novamente observou-se uma variação no excesso enantiomérico do *R*-álcool **4a** e um decréscimo na conversão ($c = 59\%$, 85%

ee, 48 h; *c* = 35%, >99% *ee*, 96 h; *c* = 16%, >99% *ee*, 168 h) de acordo com o tempo reacional (Tabela 2, Figura 22).

Figura 22 - Cromatogramas das reações de redução da *p*-iodoacetofenona (**4**) para o correspondente *R*-álcool **4a** com as células do fungo marinho *P. oxalicum* CBMAI 1185.

Cromatogramas obtidos por GC-FID equipado com coluna quiral de β -ciclodextrina. Os parâmetros utilizados nas análises foram: $T_i = 120^\circ\text{C}/2 \text{ min}$ a $T_f = 165^\circ\text{C}/8 \text{ min}$, $r = 2^\circ\text{C}/\text{min}$. As reações foram realizadas com 100 mL de tampão fosfato (pH = 7,0; 0,1 M), (50 mg, 0,20 mmol) da *p*-iodoacetofenona (**4**), 200 μL de DMSO, 150 rpm, 32°C e 5 g de células do fungo *P. oxalicum* CBMAI 1185.

Para confirmar a possível competição entre as reações de biorredução e bio-oxidação, o álcool racêmico *p*-iodofeniletanol (**4a**) foi utilizado na bioconversão com as células do fungo *P. oxalicum* CBMAI 1185. Os resultados mostrados na tabela 3 indicam que a mistura racêmica do *p*-iodofeniletanol (**4a**) foi bio-oxidado com boa concentração para a *p*-iodoacetofenona (**4**) (*c* = 22%, 72 h para *c* = 100%, 288 h) como pode ser observado na figura 23.

Tabela 3 - Reação de oxidação-redução de *p*-iodofeniletanol (**4a**) com o fungo marinho *P. oxalicum* CBMAI 1185.

	oxidado lentamente	oxidado rapidamente		
t (h)	c 4 (%)	c 4a (%)	ee 4a (%)	CA
72	22	78	32	<i>R</i>
120	57	43	53	<i>R</i>
168	72	28	15	<i>R</i>
240	80	20	-	<i>R</i>
288	100	0	-	

Condições da reação: 5,0 g de células microbianas, 0,50 mmol da iodoacetofenona (**4**) dissolvidos em 300 μ L de DMSO, tampão fosfato ($\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$, 100 mL, pH = 7,0; 0,1 M), 32°C; 130 rpm, t: tempo, ee: excesso enantiomérico, Ca: Configuração absoluta, Concentrações determinadas por análises por GC-FID.

Figura 23 - Cromatogramas da reação de oxidação da *p*-iodofeniletanol (**4a**) com as células do fungo marinho *P. oxalicum* CBMAI 1185.

Cromatogramas obtidos por GC-FID equipado com coluna quiral de β -ciclodextrina. Os parâmetros utilizados nas análises foram: $T_i = 120^\circ\text{C}/2$ min a $T_f = 165^\circ\text{C}/8$ min, $r = 2^\circ\text{C}/\text{min}$. As reações foram realizadas com 100 mL de tampão fosfato (pH = 7,0; 0,1 M), (50 mg, 0,20 mmol) da *p*-iodofeniletanol (**4a**), 200 μ L de DMSO, 130 rpm, 32°C e 5 g de células do fungo *P. oxalicum* CBMAI 1185.

O enantiômero *S*-álcool **4a** foi rapidamente bio-oxidado para a *p*-iodoacetofenona (**4**), enquanto que o enantiômero *R*-álcool **4a** foi lentamente bio-oxidado. No decorrer da reação de bio-oxidação observou-se um enriquecimento do excesso enantiomérico (53% *ee*; 120 h), como pode ser observado na tabela 3 e figura 23. As células microbianas do fungo *P. oxalicum* CBMAI 1185 demonstraram uma alta capacidade para catalisar (*c* = 100%, 288 h) a reação de bio-oxidação do álcool racêmico *p*-iodofeniletanol (**4a**).

As células do fungo *P. oxalicum* CBMAI 1185 também catalisaram a biorredução das iodoacetofenonas **2-4** para os correspondentes iodofeniletanóis **2a-4a** com excelentes excessos enantioméricos (>99%) (Tabela 3). Este fungo também demonstrou um grande potencial para catalisar as reações de biorredução e bio-oxidação.

A bioconversão da 4-hidroxi-3-iodoacetofenona (**5**) e da 4-hidroxi-3,5-diiodoacetofenona (**6**) também foram investigadas utilizando as células do fungo *P. oxalicum* CBMAI 1185. As células do *P. oxalicum* CBMAI 1185 catalisaram a biotransformação da 4-hidroxi-3-iodoacetofenona (**5**) por duas rotas diferentes (Esquema 29).

Esquema 29 - Bioconversão da 4-hidroxi-3-iodoacetofenona (**5**) com as células do fungo *P. oxalicum* CBMAI 1185.

As células do fungo *P. oxalicum* CBMAI 1185 catalisaram a biorredução da 4-hidroxi-3-iodoacetofenona (**5**) para o correspondente 4-hidroxi-3-iodofeniletanol (**5a**) em 48 h de reação. Bem como promoveu via reação de Baeyer Villiger, o intermediário 4-hidroxi-3-iodofenil acetato. Na sequência, este intermediário foi hidrolisado ao correspondente 2-iodobenzeno-1,4-diol (**5d**). Neste caso, a acetato de 4-hidroxi-3-iodofenila foi oxidado provavelmente pelas enzimas mono-oxigenases presentes nas células do fungo *P. oxalicum* CBMAI 1185, seguida de uma possível hidrólise, devido ao meio aquoso. Estas reações foram realizadas em triplicatas, em diferentes momentos e o 2-iodobenzeno-1,4-diol (**5d**) foi obtido como produto majoritário variando entre

50-100% de concentração determinada via análises de GC-MS (Figura 24-25). O espectro de massas obtido para 2-iodobenzeno-1,4-diol (**5d**) foi similar ao comparado com a biblioteca NIS-05 “database” (Biblioteca de massa espectral NIST/EPA/NIH). Resultado similar foi obtido para a biotransformação de derivados de acetofenona usando células de *Epicoccum nigrum* SSP 1948 (ANDRADE *et al.*, 2004).

Contudo, observou-se que as células do *P. oxalicum* CBMAI 1185 não foram capaz de catalisar a biorredução ou a biotransformação da 4-hidroxi-3,5-diiodoacetofenona (**6**). Estes resultados confirmam que o uso de células microbianas em reações de redução de derivados de acetofenonas depende da estrutura dos compostos xenobióticos.

Figura 24 - Cromatogramas e espectro de massas: (A) Padrão 4-hidroxi-3-iodoacetofenona (**5**); (B) Padrão 4-(1-hidroxi-etil)-iodofenol (**5a**).

Os parâmetros utilizados nas análises no GC-MS para obtenção dos cromatogramas e espectro de massas foram: $T_i = 50^\circ\text{C}/2 \text{ min}$ a $T_f = 270^\circ\text{C}/8 \text{ min}$, $r = 10^\circ\text{C}/\text{min}$.

Figura 25 - Cromatogramas da reação com a 4-hidroxi-3-iodoacetofenona (**5**) catalisada pelo fungo *P. oxalicum* CBMAI 1185 e espectro de massas do 2-iodobenzeno-1,4-diol (**5d**).

Os parâmetros utilizados nas análises no GC-MS para obtenção dos cromatogramas e espectro de massas foram: $T_i = 50^\circ\text{C}/2 \text{ min}$ a $T_f = 270^\circ\text{C}/8 \text{ min}$, $r = 2^\circ\text{C}/\text{min}$.

Mouad *et al.*, recentemente demonstraram o uso de algas marinhas *Bostrychia radicans* e *B. tenella* em reações de redução de derivados de acetofenona. Nestas reações foram observados a produção exclusivamente de *S*-feniletanois com excessos enantioméricos elevados (>99% *ee*), contudo em algumas reações as conversões foram modestas. Também foram estudados as biorreduções nos derivados de acetofenona com diferentes grupos na posição *orto* (Cl, Br e NO_2), que conduziram a uma variação na conversão dos derivados de acetofenonas. Novamente foram

obtidos elevados excessos enantioméricos (>99% *ee*) demonstrando a grande estereosseletividade dos biocatalisadores marinhos (MOUAD *et al.*, 2011).

O biorredução enantiosseletiva de derivados de acetofenonas contendo halogênios (Cl, Br, I) na posição *para* e o fluor nas posições *orto*, *meta* e *para* também foi realizada utilizando uma nova estirpe de levedura *Cândida tropicalis* MTCC 5158. Esta levedura foi capaz de biocatalisar os derivados de acetofenona para os correspondentes *S*-feniletanois com bons rendimentos e enantiosseletividades. Neste trabalho a *p*-iodoacetofenona (**4**) foi biorreduzida para o correspondente (*S*)-*p*-iodofeniletanol (**4a**) com (c = 67%, >97% *ee*) (SONI & BANERJEE, 2006).

A biorredução dos derivados de acetofenonas com iodo substituídos em *orto*, *meta* e *para*, foi descrito pela primeira vez utilizando micro-organismos de origem marinha pelo nosso grupo. Sendo raro encontrar trabalhos na literatura envolvendo redução derivados de acetofenonas utilizando micro-organismos com iodo nas posições *orto* e *meta* do anel aromático (MOUAD *et al.*, 2011, ROCHA *et al.*, 2012).

4.3 Biorredução das ceto-azidas **13-16** por fungos marinhos

A biorredução das ceto-azidas **13-16** foi realizada utilizando as células microbianas dos fungos marinhos (*A. sclerotiorum* CBMAI 849, *C. cladosporioidis* CBMAI 857, *P. raistrickii* CBMAI 931, *P. citrinum* CBMAI 1186, *M. racemosus* CBMAI 847, *B. felina* CBMAI 738, *P. chrysogenum*, *P. oxalicum* CBMAI 1185). Os resultados são mostrados na tabela 5 e esquema 30.

Esquema 30 - Biorredução das ceto-azidas **13-16** para os correspondentes azido-alcoóis **13a-16a**.

O desenvolvimento das reações foi acompanhado por análise das alíquotas em CCD coletadas entre 3 a 9 dias. Posteriormente, as alíquotas foram analisadas por HPLC utilizando coluna com fase quiral para determinação da conversão e excesso enantiomérico. Os fungos *A. sclerotiorum* CBMAI 849 e *M. racemosus* CBMAI 847 catalisaram a biorredução da 2-azido-1-feniletanona (**13**) para o correspondente (S)-2-azido-1-feniletanol (**13a**). As reações apresentaram boas conversões (c = 90-98%) e seletividades (72-85% ee) com 9 dias de reação fornecendo produtos *anti*-Prelog. O S-azido-álcool **13a** foi obtido com bons rendimentos isolados (86-90%) após purificação por CC. Por outro lado, os fungos *P. raistrickii* CBMAI 931 e *B. felina* CBMAI 738 catalisaram a redução da ceto-azida **13** para o correspondente (R)-2-azido-1-feniletanol (**13a**) com (c = 90%, 90% ee) e (c = 100%, 80% ee), respectivamente, de acordo com a regra de Prelog (Tabela 4 e Figura 26). O R-azido-álcool **13a** também foi purificado por CC com bons rendimentos (82 e 91%), respectivamente. Os fungos *C. cladosporioidis* CBMAI 857, *P. citrinum* CBMAI 1186, *P. chrysogenum* não catalisaram a biorredução da ceto-azida **13**. Os fungos *A. sclerotiorum* CBMAI 849, *C. cladosporioidis* CBMAI 857, *P. raistrickii* CBMAI 931 e *P. citrinum* CBMAI 1186 foram capaz de catalisar a biorredução da 2-azido-1-(4-metoxifenil)etanona (**14**) para o correspondente (R)-2-azido-1-(4-metoxifenil)etanol (**14a**) com boas conversões e seletividades (c = 68-100 e >99% ee) com 9 dias de reação de acordo com a regra de Prelog (Tabela 4 e Figura 27). Os R-azido-alcoóis **14a** obtidos nas biorreduções foram isolados com bons rendimentos (93, 90, 62 e 94%) após purificação por CC. Os fungos *M. racemosus* CBMAI 847, *B. felina* CBMAI 738, *P. chrysogenum* e não catalisou a biorredução da ceto-azida **14**.

Tabela 4 - Biorredução das ceto-azidas **13-16** por fungos marinhos.

2-azido-1-feniletanona (13)			2-azido-1-(4-metoxifenil)etanona (14)		
c (%) ^a 13	c (%) ^a 13a	ee (%) (CA) 13a	c (%) ^a 14	c (%) ^a 14a	ee (%) (CA) 14a
<i>A. sclerotiorum</i> CBMAI 849					
2	98	85 (S)	0	100	>99 (R)
<i>C. cladosporioidis</i> CBMAI 857					
-	-	-	1	99	>99 (R)
<i>P. raistrickii</i> CBMAI 931					
10	90	90 (R)	32	68	>99 (R)
<i>P. citrinum</i> CBMAI 1186					
-	-	-	1	99	>99 (R)
<i>M. racemosus</i> CBMAI 847					
10	90	72 (S)	100	0	-
<i>B. felina</i> CBMAI 738					
0	100	80 (R)	100	0	-
<i>P. chrysogenum</i>					
100	0	-	100	0	-
2-azido-1-(4-bromofenil)etanona (15)			2-azido-1-(4-nitrofenil)etanona (16)		
c (%) ^a 15	c (%) ^a 15a	ee (%) (CA) 15a	c (%) ^a 16	c (%) ^a 16a	ee (%) (CA) 16a
<i>A. sclerotiorum</i> CBMAI 849					
25	75	39 (S)	-	-	-
<i>C. cladosporioidis</i> CBMAI 857					
2	98	44 (S)	-	-	-
<i>P. raistrickii</i> CBMAI 931					
68	32	70 (S)	-	-	-
<i>P. citrinum</i> CBMAI 1186					
52	48	39 (S)	5	95	28 (S)
<i>M. racemosus</i> CBMAI 847					
21	79	29 (S)	-	-	-
<i>B. felina</i> CBMAI 738					
100	0	-	-	-	-
<i>P. chrysogenum</i>					
100	0	-	2	98	41 (R)
<i>P. oxalicum</i> CBMAI 1185					
-	-	-	4	96	51 (S)

Condições da reação: 5,0 g células microbianas, 0,50 mmol das ceto-azidas **13-16** dissolvidos em 300 µL de DMSO, tampão fosfato (Na₂HPO₄/KH₂PO₄, 100 mL, pH = 7,0; 0,1 M), 32°C; 130 rpm, 9 dias de reação, ee: excesso enantiomérico, Ca: Configuração absoluta, ^aConcentração determinada por análise em HPLC equipado com coluna quiral.

O fungos *A. sclerotiorum* CBMAI 849, *C. cladosporioidis* CBMAI 857, *P. raistrickii* CBMAI 931, *P. citrinum* CBMAI 1186 e *M. racemosus* CBMAI 847 catalisaram a biorredução da 2-azido-1-(4-bromofenil)etanona (**15**) para o correspondente (S)-2-azido-1-(4-bromofenil)etanol (**15a**) com 9 dias de reação de acordo com a regra de *anti*-Prelog em boas conversões e seletividades (c = 32-98%, 29-70% ee). Neste caso, apenas o S-azido-álcool **15a** obtido pela biorredução com o fungo *P. raistrickii* CBMAI 931 foi purificado por CC fornecendo 63% de rendimento. Os fungos *B. felina* CBMAI 738 e *P. chrysogenum* não foram capaz de catalisar a biorredução da ceto-azida **15** com 9 dias de reação (Tabela 4 e Figura 28).

O 2-azido-1-(4-nitrofenil)etanona (**16**) mostrou-se muito instável frente à luz e temperatura ambiente degradando-se facilmente. Ainda, devido à baixa solubilidade em meio aquoso as reações foram difíceis de serem realizadas. Contudo, os fungos *P. citrinum* CBMAI 1186, *P. chrysogenum* e *P. oxalicum* CBMAI 1185 catalisaram a biorredução da 2-azido-1-(4-nitrofenil)etanona (**16**). Curiosamente, todos os fungos são do mesmo gênero, onde os fungos *P. citrinum* CBMAI 1186 e *P. oxalicum* CBMAI 1185 catalisaram a biorredução da ceto-azida **16** para o correspondente (S)-2-azido-1-(4-nitrofenil)etanol (**16a**) com (c = 95, 96% e 28, 51% ee) respectivamente, de acordo com a regra de *anti*-Prelog, com 9 dias de reação. O fungo *P. chrysogenum* catalisou a biorredução da ceto-azida **16** para o correspondente (R)-2-azido-1-(4-nitrofenil)etanol (**16a**) de acordo com a regra de Prelog no mesmo período com (c = 98% e 51% ee) (Tabela 4 e Figura 29). Os produtos S- e R-azido-alcoóis **16a** foram obtidos com (17-42%) após purificação por cromatografia em coluna.

As configurações absolutas dos azido-alcoóis **13a-15a** foram determinadas através da comparação dos valores de rotação óptica obtidos com os reportados na literatura (KAMAL *et al.*, 2004). O valor da rotação experimental para o (R)-(+)-2-azido-1-feniletanol (**13a**) obtido na biorredução com o fungo *P. raistrickii* CBMAI 931 foi de $[\alpha]_D^{25} = +20,0$ (c 1,0; MeOH; 90% ee); e o valor encontrado na literatura foi de $[\alpha]_D^{25} = -2,2$ (c 89,2; CHCl₃; 98% ee); o valor da rotação óptica para o (R)-(-)-2-azido-1-(4-metoxifenil)etanol (**14a**) obtido na biorredução com o fungo *C. cladosporioidis* CBMAI 857 foi de $[\alpha]_D^{25} = -76,0$ (c 0,8; MeOH; >99% ee); na literatura $[\alpha]_D^{25} = -116,9$ (c 1,2; CHCl₃; 98% ee); o valor da rotação óptica para o (S)-(-)-2-azido-1-(4-bromofenil)etanol (**15a**) obtido na biorredução com o fungo *C. cladosporioidis* CBMAI 857 foi de $[\alpha]_D^{25} = -18,5$ (c 1,2; MeOH; >99% ee); na literatura $[\alpha]_D^{25} = -77,0$ (c 1,0; CHCl₃; 92% ee). A configuração absoluta do 2-azido-1-(4-nitrofenil)etanol (**16a**) foi sugerida pela comparação dos picos dos cromatogramas obtidos na resolução com a lipase CALB.

Estes foram os primeiros estudos envolvendo fungos marinhos em redução de ceto-azidas no Brasil. Os fungos marinhos demonstraram potencial para este tipo de reação, novos estudos deveram ser realizados para otimização dos resultados.

Figura 26 - Cromatogramas da resolução do (±)-2-azido-1-feniletanol (**13a**) com fungos marinhos.

Cromatogramas obtidos por HPLC em coluna quiral Daicel® ODH da extração final com 9 dias de reação com os fungos: Condições de análise no HPLC: 10% isopropanol, 90% hexano, fluxo 0,5 mL/min; 190 nm.

Figura 27 - Cromatogramas da resolução do (±)-2-azido-1-(4-metoxifenil)etanol (**14a**) com fungos marinhos.

Cromatogramas obtidos por HPLC em coluna quiral Daicel® ODH da extração final com 9 dias de reação com os fungos: Condições de análise no HPLC: 10% isopropanol, 90% hexano, fluxo 0,5 mL/min; 190 nm.

Figura 28 - Cromatogramas da resolução do (±)-2-azido-1-(4-bromofenil)etanol (**15a**) com fungos marinhos.

Cromatogramas obtidos por HPLC em coluna quiral Daicel® ODH da extração final com 9 dias de reação com os fungos: Condições de análise no HPLC: 10% isopropanol, 90% hexano, fluxo 0,5 mL/min; 190 e 215 nm.

Figura 29 - Cromatogramas da resolução do (±)-2-azido-1-(4-nitrofenil)etanol (**16a**) com fungos marinhos.

Cromatogramas obtidos por HPLC em coluna quiral Daicel® ODH da extração final com 9 dias de reação com os fungos: Condições de análise no HPLC: 20% isopropanol, 80% hexano, fluxo 0,5 mL/min; 254 nm.

4.4 Biorredução da 1-(4-metoxifenil)etanona (**1**) e da 2-cloro-1-feniletanona (**7**) com fungos marinhos imobilizados em sílica gel, xerogel de sílica e quitosana

Os fungos filamentosos são micro-organismos amplamente aplicados em processos fermentativos em indústrias, visando principalmente à produção de enzimas de interesse comercial (WANG *et al.*, 2005). Estas enzimas são utilizadas muitas vezes imobilizadas em biopolímeros ou mesmo em suportes porosos visto que ocorre uma interação das células microbianas com os mesmos melhorando a atividade catalítica. Quando os poros são maiores, as células em crescimento (hifas) penetram no suporte, preenchendo seu espaço interno. Este método de imobilização também se utiliza da habilidade dos micro-organismos produzirem e secretarem exopolissacarídeos (PRASAD *et al.*, 2005).

Recentemente, em nosso grupo, foi investigado o uso de fungos filamentosos de ambiente marinho para catalisar a redução de derivados de acetofenonas (ROCHA *et al.*, 2009, MOUAD *et al.*, 2011). Assim, com alguns resultados obtidos nas biorreduções dos derivados de acetofenonas com as células microbianas livres. Procurou-se imobilizar estes fungos e utilizar frente alguns substratos e comparar os resultados. A imobilização das células totais dos fungos marinhos *P. citrinum* CBMAI 1186 e *A. sclerotiorum* CBMAI 849 foi realizadas em três suportes diferentes (sílica gel, xerogel de sílica e quitosana). As células totais imobilizadas foram utilizadas na redução da 1-(4-metoxifenil)etanona (**1**) e da 2-cloro-1-feniletanona (**7**) (Esquema 31).

Esquema 31 - Biorredução das 1-(4-metoxifenil)etanona (**1**) e 2-cloro-1-feniletanona (**7**) pelas células imobilizadas dos fungos marinhos.

Também foram realizadas reações com as células microbianas livres (sem imobilização) para comparação dos resultados obtidos com as células imobilizadas frente aos fungos utilizados. Os resultados são mostrados na tabela 5, figuras 30-33. A escolha destes três suportes baseou-se em dados reportados sobre a imobilização dos fungos *Aspergillus* sp., *Monascus kaoliang* e *A. terreus* CCT 3320 (LUSTA *et al.*, 2000, BISSETT & STERNBERG, 1978, QUEZADA *et al.*, 2009, PORTO *et al.*, 2004). As células microbianas dos fungos *P. citrinum* CBMAI 1186 e *A. sclerotiorum* CBMAI

849 foram imobilizadas com sucesso, como mostrado nas imagens de microscopia eletrônica de varredura (Figuras 34-35).

Tabela 5 - Redução da 1-(4-metoxifenil)etanona (**1**) e 2-cloro-1-feniletanona (**7**) pelas células totais livres e imobilizadas^a

1-(4-metoxifenil)etanona (1)					
Fungos marinhos	Suportes	c (%) 1	c (%) 1a	ee (CA) 1a	Rend. (%)
<i>P. citrinum</i> CBMAI 1186	não imobilizado	60	40	69 (R)	35
	sílica gel	100	-	-	-
	xerogel de sílica	100	-	-	-
	quitosana	-	100	>99 (S)	95
<i>A. sclerotiorum</i> CBMAI 849	não imobilizado	-	100	>99 (S)	90
	sílica gel	-	100	>99 (S)	97
	xerogel de sílica	100	-	-	-
2-cloro-1-feniletanona (7)					
Fungos marinhos	Suportes	c (%) 7	c (%) 7a	ee 7a (Ac)	Rend. (%)
<i>P. citrinum</i> CBMAI 1186	não imobilizado	30	70	31 (R)	66
	sílica gel	35	65	25 (S)	62
	xerogel de sílica	100	-	-	-
	quitosana	-	100	0	98
<i>A. sclerotiorum</i> CBMAI 849	não imobilizado	11	89	68 (R)	85
	sílica gel	-	100	65 (R)	97
	xerogel de sílica	100	-	-	-

^aCondições de reação: (9 dias, 120 rpm, 32°C). As reações foram realizadas Erlenmeyer de 250 mL contendo 100 mL de tampão fosfato (pH = 7,0; 0,1 M), (0,20 mmol) da cetona **1** ou **7** dissolvidas em 200 µL de DMSO, e as células totais imobilizadas. Rend. = Rendimento obtido após purificação por CC; c = concentração determinada por análises em GC-FID usando coluna quiral; ee (%) = excesso enantiomérico; Ca: Configuração absoluta.

As células microbianas do fungo *P. citrinum* CBMAI 1186 não imobilizadas catalisaram a biorredução estereosseletiva da 1-(4-metoxifenil)etanona (**1**) para o correspondente (*R*)-1-(4-metoxifenil)etanol (**1a**) de acordo com a regra *anti*-Prelog, com 9 dias de reação. O *R*-álcool **1a** foi produzido com moderado excesso enantiomérico e conversão (c = 40%, 69% ee) (Tabela 5). O *R*-álcool **1a** foi isolado com rendimento de 35%, após purificação por CC utilizando sílica gel. Quando as células totais do fungo *P. citrinum* CBMAI 1186 foram imobilizadas em sílica gel e xerogel de sílica, a biorredução da cetona **1** não ocorreu (Tabela 5).

Como pode ser visto nas imagens de micrografias de sílica gel e xerogel de sílica, as células microbianas foram totalmente recobertas pelos suportes (Figura 34C-F). Nestas condições ocorreu uma forte interação do suporte com as células microbianas possivelmente dificultando o acesso dos substratos às enzimas oxidorreduções que poderiam atuar na biorredução da cetona **1**. No entanto, as células microbianas do fungo *P. citrinum* CBMAI 1186 imobilizadas em quitosana foram capaz de catalisar quantitativamente a biorredução da 1-(4-metoxifenil)etanona (**1**) para o correspondente 1-(4-metoxifenil)etanol (**1a**) (Figura 30). Destaca-se, neste caso, a biorredução foi fortemente aumentada por este tipo de suporte orgânico. A reação com as células microbianas

imobilizadas em quitosana também conduziu a uma inversão da configuração do álcool em comparação com as células microbianas livres, obtendo-se o *S*-álcool **1a** com (>99% *ee*). As células livres produziram o *R*-álcool **1a** com menor conversão (40%) e excesso enantiomérico inferior (69% *ee*) (Tabela 5). A inversão da configuração do *R*-álcool **1a** (não imobilizado) para o *S*-álcool **1a** (imobilizado) teve forte influência do processo de imobilização de acordo com o tipo de substrato utilizado (suporte e/ou cetona). No entanto, não é possível avaliar o que ocorreu, porque durante a imobilização também pode ter sido favorecido a ação de outra enzima álcool desidrogenase, e não necessariamente é a mesma enzima que catalisou a biorredução na ausência do suporte. O fato é que neste caso, o processo de imobilização foi eficiente, assim como promoveu um significativo aumento na seletividade da reação, também produziu o outro enantiômero, usando o mesmo micro-organismo.

Como pode ser visto nas imagens de micrografias (Figura 35A-B), as células microbianas do fungo *P. citrinum* CBMAI 1186 foram completamente entrelaçadas com o suporte de quitosana. As micrografias das células de *P. citrinum* imobilizadas em quitosana mostraram uma maior dispersão em comparação com os suportes inorgânicos de sílica e xerogel de sílica. O entrelaçamento entre as hifas e a quitosana está provavelmente relacionado com as interações das cargas da superfície das hifas com o suporte. As interações entre o suporte orgânico e as células provavelmente melhorou a afinidade com a cetona **1** e conservou a atividade da enzima, que foi capaz de catalisar a biorredução da cetona **1** para o *S*-álcool **1a** enantiomericamente puro. Portanto, concluiu-se que a quitosana foi um excelente suporte para a imobilização do fungo filamentoso *P. citrinum* CBMAI 1186, com uma influência benéfica sobre a atividade enzimática.

As células microbianas do fungo *A. sclerotiorum* CBMAI 849 sem imobilização e imobilizadas em sílica gel catalisaram a redução da 1-(4-metoxifenil)etanona (**1**) para o correspondente álcool (*S*)-1-(4-metoxifenil)etanol (**1a**) com excelente conversão e seletividade (*c* = 100%, >99% *ee*) (Tabela 5, Figura 31). Enquanto que as células microbianas do fungo *P. citrinum* CBMAI 1186 imobilizadas em xerogel de sílica não promoveram a redução da cetona **5**. Possivelmente, devido ao suporte xerogel de sílica ter sido fortemente aderido à superfície das hifas do fungo e assim, dificultando o acesso do substrato às enzimas (Tabela 5).

As células microbianas não imobilizadas do fungo *P. citrinum* CBMAI 1186 catalisaram a redução da 2-cloro-1-feniletanona (**7**) para o correspondente (*R*)-2-cloro-1-feniletanol (**7a**), com 9 dias de reação de acordo com a regra de Prelog. O *R*-álcool **7a** foi obtido com boa conversão, porém, com baixo excesso enantiomérico (*c* = 70%, 31% *ee*) (Tabela 5). Quando as células do

fungo *P. citrinum* CBMAI 1186 foram imobilizadas em sílica gel, observou-se que os resultados foram semelhantes aos obtidos com células microbianas livres para a redução da cetona **7** (c = 65%, 25% ee) (Tabela 5, Figura 32).

Contudo, observou-se uma estereopreferência para o *S*-álcool **7a** de acordo com a regra *anti*-Prelog. Neste caso, o suporte utilizado não afetou a atividade catalítica da enzima, mas alterou a seletividade da reação de redução. Destaca-se que o processo de imobilização pode oferecer novas alternativas frente à capacidade redutora das células microbianas.

Quando as células microbianas do fungo *P. citrinum* CBMAI 1186 foram imobilizadas no suporte xerogel de sílica, não se observou a redução da cetona **7**. Este resultado, como esperado, confirmou que o suporte xerogel de sílica formou uma forte barreira na superfície das células impedindo o acesso do substrato a uma ou mais enzimas responsáveis pela redução (Tabela 5, Figura 34E-F). As células microbianas do fungo *P. citrinum* CBMAI 1186 imobilizadas em quitosana catalisaram a redução da cetona **7** para o correspondente álcool **7a** com excelente conversão (100%) e rendimento de 98%, após purificação por CC. Neste caso, não foi observada seletividade (Tabela 5). Entretanto, quando as células microbianas do fungo *P. citrinum* CBMAI 1186 foram imobilizadas em quitosana ocorreu a total redução da 1-(4-metoxifenil)etanona (**1**) para o correspondente (*S*)-1-(4-metoxifenil)etanol (**1a**) (c = 100%, >99% ee) (Tabela 5).

A utilização da quitosana como suporte demonstrou ser uma ótima matriz para a imobilização de fungos filamentosos. Provavelmente, os grupos reativos hidroxí e amino presentes nas unidades de repetição das cadeias do biopolímero interagem com os micélios das células microbianas dos fungos, promovendo uma forte interação entre suporte e as células. Além disso, como a quitosana é um biopolímero orgânico, isso pode facilitar a interação do substrato com as células imobilizadas, favorecendo a interação do substrato às enzimas e consequentemente melhorando a seletividade e o rendimento da reação.

A utilização das células microbianas do fungo *A. sclerotiorum* CBMAI 849, tanto livres quanto imobilizadas em sílica gel, catalisaram a redução da cetona **7** para o *R*-álcool **7a** de acordo com a regra de Prelog, com ótimas conversões e seletividades (c = 89%, 68% ee) e (c = 100%, 65% ee), respectivamente (Tabela 5, Figura 33).

O fungo *A. sclerotiorum* CBMAI 849 imobilizado em xerogel de sílica não catalisou a redução da cetona **7** (Tabela 5). O fungo *A. sclerotiorum* CBMAI 849 não foi imobilizado em quitosana devido à falta de suporte.

Estes resultados demonstraram que as células totais dos fungos filamentosos *A. sclerotiorum* CBMAI 849 e *P. citrinum* CBMAI 1186 podem ser imobilizadas em sílica gel e quitosana. Estas células podem ser utilizadas em reações de biorredução de derivados de acetofenonas.

Figura 30 - Biorredução da 1-(4-metoxifenil)etanona (**1**) com o fungo *P. citrinum* CBMAI 1186 com e sem imobilização.

Os parâmetros utilizados nas análises no GC-FID para obtenção dos cromatogramas foram: $T_i = 120^\circ\text{C}/2$ min a $T_f = 165^\circ\text{C}/8$ min, $r = 2^\circ\text{C}/\text{min}$.

Figura 31 - Biorredução da 1-(4-metoxifenil)etanona (**1**) com o fungo *A. sclerotiorum* CBMAI 849 com e sem imobilização.

Os parâmetros utilizados nas análises no GC-FID para obtenção dos cromatogramas foram: $T_i = 120^\circ\text{C}/2$ min a $T_f = 165^\circ\text{C}/8$ min, $r = 2^\circ\text{C}/\text{min}$.

Figura 32 - Biorredução da 2-cloro-1-feniletanona (**7**) com o fungo *P. citrinum* CBMAI 1186 com e sem imobilização.

Os parâmetros utilizados nas análises no GC-FID para obtenção dos cromatogramas foram: $T_i = 120^\circ\text{C}/2 \text{ min}$ a $T_f = 165^\circ\text{C}/8 \text{ min}$, $r = 2^\circ\text{C}/\text{min}$.

Figura 33 - Biorredução da 2-cloro-1-feniletanona (**7**) com o fungo *P. citrinum* CBMAI 1186 com e sem imobilização.

Os parâmetros utilizados nas análises no GC-FID para obtenção dos cromatogramas foram: $T_i = 120^\circ\text{C}/2 \text{ min}$ a $T_f = 165^\circ\text{C}/8 \text{ min}$, $r = 2^\circ\text{C}/\text{min}$.

Os suportes de sílica e xerogel de sílica apresentaram irregularidades na densidade das partículas, sendo que o tamanho médio da partícula de sílica gel foi maior do que para o xerogel de sílica, ($77 \pm 20 \mu\text{m}$), e ($41 \pm 24 \mu\text{m}$) respectivamente. Pode-se observar que os suportes de sílica gel, xerogel de sílica e quitosana estão intimamente ligados com as hifas das células microbianas (Figuras 34-35).

Figura 34 - Digitalização das micrografias por microscopia eletrônica varredura.

(A) Células livres do fungo *A. sclerotiorum* CBMAI 849. (B) Células livres do fungo *P. citrinum* CBMAI 1186. (C), (D), Células microbianas do fungo *P. citrinum* CBMAI 1186 imobilizadas em sílica gel. (E), (F) As células microbianas de *P. citrinum* CBMAI 1186 imobilizadas em xerogel de sílica.

Figura 35 - Digitalização das micrografias por microscopia eletrônica de varredura.

(A), (B) Células do fungo *P. citrinum* CBMAI 1186 imobilizadas em quitosana. (C), (D), Células microbianas do fungo *A. sclerotiorum* CBMAI 849 imobilizadas em sílica gel. (E), (F) Células microbianas de *A. sclerotiorum* CBMAI 849 imobilizadas em xerogel de sílica.

As células microbianas dos fungos *A. sclerotiorum* CBMAI 849 e *P. citrinum* CBMAI 1186 livres e imobilizadas em sílica gel utilizadas nas biorreduções das cetonas **1** e **7** foram filtradas e armazenadas em refrigerador à 4°C pelo período de 30 dias. Posteriormente, foram reutilizadas nas biorreduções das cetonas **1** e **7**, para avaliação da atividade biocatalítica. Entretanto, não se observou a biorredução das cetonas **1** e **7** após o período de incubação. Certamente durante o processo de filtração sob vácuo em funil Buchner das células livres e imobilizadas, onde se utilizou acetato de etila para extrair o substrato, pode ter contribuído para a inativação da atividade biocatalítica.

As células microbianas dos fungos *A. sclerotiorum* CBMAI 849 e *P. citrinum* CBMAI 1186 livres e imobilizadas em sílica gel não utilizadas na biorredução também foram armazenadas em refrigerador à 4°C pelo período de 30 dias. Da mesma forma, após o período de incubação as células foram utilizadas nas biorreduções das cetonas **1** e **7**. Os resultados estão mostrados na tabela 6, figuras 36-39.

Tabela 6 - Redução da 1-(4-metoxifenil)etanona (**1**) e 2-cloro-1-feniletanona (**7**) pelas células totais livres e imobilizadas em sílica gel após 30 dias^a.

1-(4-metoxifenil)etanona (1)					
Fungos marinhos	Suportes	c (%) 1	c (%) 1a	ee (CA) 1a	Rend. (%)
<i>P. citrinum</i>	não imobilizado	100	-	-	-
CBMAI 1186	sílica gel	100	-	-	-
<i>A. sclerotiorum</i>	não imobilizado	-	100	>99 (S)	92
CBMAI 849	sílica gel	-	100	>99 (S)	90
2-cloro-1-feniletanona (5)					
Fungos marinhos	Suportes	c (%) 7	c (%) 7a	ee 7a (Ac)	Rend. (%)
<i>P. citrinum</i>	não imobilizado	100	0	-	-
CBMAI 1186	sílica gel	71	29	31 (S)	-
<i>A. sclerotiorum</i>	não imobilizado	88	12	20 (R)	-
CBMAI 849	sílica gel	2	98	73 (R)	87

^aCondições de reação: (9 dias, 120 rpm, 32°C). Rend. = Rendimento obtido após purificação por CC; c = concentração determinada por análises em GC-FID usando coluna quiral; ee (%) = excesso enantiomérico; Ca: Configuração absoluta.

As células livres do fungo *P. citrinum* CBMAI 1186 e *A. sclerotiorum* CBMAI 849 perderam parcialmente à atividade catalítica de redução das cetonas **1** e **7** após o período de incubação. As células livres do fungo *P. citrinum* CBMAI 1186 não catalisaram a redução da cetona **1** para o correspondente 1-(4-metoxifenil)etanona (**1**) com 9 dias de reação. Anteriormente, a incubação das células livres do fungo *P. citrinum* CBMAI 1186 foi observado a redução da cetona **1** para o correspondente *R*-álcool **1a** com moderado excesso enantiomérico e conversão (40%, 69% ee) (Tabela 5).

As células livres do fungo *A. sclerotiorum* CBMAI 849 mantiveram a atividade biocatalítica após incubação. A reação foi acompanhada por análises em GC-FID e CCD, com 9 dias onde se observou a total conversão (100%) para o correspondente *S*-álcool **1a** com (>99% *ee*), como pode ser observado na Figura 36.

As células livres do fungo *P. citrinum* CBMAI 1186 também não catalisaram a redução da cetona **7** para o correspondente álcool **7a** com 9 dias de reação. Com 30 dias de incubação as células livres do fungo *A. sclerotiorum* CBMAI 849 catalisou a redução da cetona **7** para o correspondente *R*-álcool **7a** com (*c* = 12%, 20% *ee*) com 9 dias de reação (Figura 37). Neste caso, foi observado um decréscimo na conversão e excesso enantiomérico comparados com os dados obtidos anteriormente (*c* = 89%, 68% *ee*) (Tabela 5). Portanto, através destes resultados pode-se observar que as células imobilizadas em sílica gel preservaram sua atividade catalítica.

As células totais do fungo *P. citrinum* CBMAI 1186 imobilizadas em sílica gel após incubação em refrigerador à 4°C pelo período de 30 dias também não foram capaz de catalisar a redução da cetona **1**. Entretanto, as células do fungo *A. sclerotiorum* CBMAI 849 imobilizadas em sílica gel mantiveram a atividade biocatalítica com 9 dias de reação produzindo o *S*-álcool **1a** com (*c* = 100%, 99% *ee*), como pode ser observado na figura 38.

As células imobilizadas do fungo *P. citrinum* CBMAI 1186 catalisaram a redução da cetona **7** para o correspondente (*S*)-álcool **7a** com (*c* = 29%, 31% *ee*) (Figura 39). Neste caso, também se observou um decréscimo na conversão e excesso enantiomérico comparados com os dados obtidos anteriormente na tabela 5 (*c* = 65%, 25% *ee*).

As células imobilizadas do fungo *A. sclerotiorum* CBMAI 849 catalisaram a redução da cetona **7** para o correspondente *R*-álcool **7a** com (*c* = 2%, 73% *ee*), após o mesmo período de incubação (Figura 39). Novamente, observou-se um decréscimo na conversão e excesso enantiomérico comparados com os estudos anteriores (*c* = 100%, 65% *ee*) (Tabela 5).

Os resultados são distintos devidos a toda complexidade envolvida no sistema. Entretanto, este suporte uma vez otimizado pode ser utilizado em reações de biocatálise devido à capacidade de preservar as células ativas por longo período. Ainda destaca-se que a sílica é um suporte fácil acesso e estocagem.

Figura 36 - Biorredução da 4-metoxiacetofenona (**1**) com as células microbianas livres dos fungos *P. citrinum* CBMAI 1186 e *A. sclerotiorum* CBMAI 849 preservadas por 30 dias.

Os parâmetros utilizados nas análises no GC-FID para obtenção dos cromatogramas foram: $T_i = 120^\circ\text{C}/2$ min a $T_f = 165^\circ\text{C}/8$ min, $r = 2^\circ\text{C}/\text{min}$.

Figura 37 - Biorredução da 2-cloro-1-feniletanona (**7**) com as células microbianas livres dos fungos *P. citrinum* CBMAI 1186 e *A. sclerotiorum* CBMAI 849 preservadas por 30 dias.

Os parâmetros utilizados nas análises no GC-FID para obtenção dos cromatogramas foram: $T_i = 120^\circ\text{C}/2$ min a $T_f = 165^\circ\text{C}/8$ min, $r = 2^\circ\text{C}/\text{min}$.

Figura 38 - Biorredução da 4-metoxiacetofenona (**1**) com as células microbianas imobilizadas dos fungos *P. citrinum* CBMAI 1186 e *A. sclerotiorum* CBMAI 849 preservadas por 30 dias

Os parâmetros utilizados nas análises no GC-FID para obtenção dos cromatogramas foram: $T_i = 120^\circ\text{C}/2$ min a $T_f = 165^\circ\text{C}/8$ min, $r = 2^\circ\text{C}/\text{min}$.

Figura 39 - Biorredução da 2-cloro-1-feniletanona (**7**) com as células microbianas imobilizadas dos fungos *P. citrinum* CBMAI 1186 e *A. sclerotiorum* CBMAI 849 preservadas por 30 dias.

Os parâmetros utilizados nas análises no GC-FID para obtenção dos cromatogramas foram: $T_i = 120^\circ\text{C}/2 \text{ min}$ a $T_f = 165^\circ\text{C}/8 \text{ min}$, $r = 2^\circ\text{C}/\text{min}$.

4.5 Resolução quimio-enzimática de iodofeniletanóis 2a-4a por lipase CALB e sua aplicação em síntese de compostos quirais

Inicialmente, foram realizadas as sínteses dos (±)-1-(2-iodofenil)etanol (**2a**), (±)-1-(3-iodofenil)etanol (**3a**) e (±)-1-(4-iodofenil)etanol (**4a**) em bons rendimentos 80-95% (Seção 3.6).

As resoluções dos (±)-iodofeniletanóis **2a-4a** foram realizadas com acetato de vinila e lipase CALB em hexano a 32°C e 130 rpm (Seção 3.12.2). A resolução enzimática dos (±)-iodofeniletanóis **2a-4a** foram realizadas entre 4 a 24 h de reação. Os resultados estão descritos na tabela 7.

Tabela 7 - Resolução quimio-enzimática dos (±)-iodofeniletanóis **2a-4a** usando acetato de vinila e lipase CALB em hexano^a.

$(\pm)\text{-2a: } o\text{-I}$
 $(\pm)\text{-3a: } m\text{-I}$
 $(\pm)\text{-4a: } p\text{-I}$

$S\text{-2a-4a}$ + $R\text{-2b-4b}$

Álcool quiral	t (h)	c (%)	ee (%)	CA	Acetato quiral	t (h)	c (%)	ee (%)	CA
2a	2	96	6	S	2b	2	4	>99	R
	24	75	24	S		24	25	>99	R
3a	2	50 ^b	>99	S	3b	2	50 ^c	>99	R
	24	50	>99	S		24	50	>99	R
4a	2	50 ^d	>99	S	4b	2	50 ^e	>99	R
	4	50	>99	S		4	50	>99	R

^aCondições de reação: Em um Erlenmeyer de 50 mL foram adicionados 10 mL de hexano HPLC, 1 mL de acetato de vinila, 100 mg de lipase CALB e o correspondente álcool **2a-4a** (200 mg, 0,8 mmol). O Erlenmeyer foi selado com uma rolha de borracha e a reação foi encubada em agitador orbital rotativo a 32°C e 130 rpm; t (h): tempo de reação. c: conversão; ee: excesso enantiomérico; Ca: Configuração absoluta; Rendimento isolado: ^b41%; ^c43%; ^d46%; ^e45%.

As análises das resoluções enzimáticas dos (±)-iodofeniletanóis **2a-4a** na presença de acetato de vinila e lipase CALB foram realizadas em cromatografo a gás utilizando coluna quiral. Os cromatogramas estão apresentados nas figuras 40-42.

A resolução do (±)-iodofeniletanol (**2a**) com acetato de vinila e lipase CALB forneceu o *R*-acetato **2b** com excesso enantiomérico de (>99%) e apenas 25% de conversão após 24 h de reação (Tabela 7, Figura 40). Devido o substituinte iodo ser um grupo “volumoso”, quando ligado na posição *orto* do anel aromático da (±)-iodofeniletanol (**2a**) dificultou a reação de esterificação promovida pela lipase.

Os *S*-alcoóis **3a-4a** e *R*-acetatos de **3b-4b** foram produzidos com excessos enantioméricos elevados (>99% ee) e com bons rendimentos isolados (41-46%), (Figuras 41-42).

Consequentemente, estas resoluções enzimáticas apresentaram altos valores de razões enantioméricas ($E > 200$).

O padrão racêmico do ($\pm$)-1-(3-iodofenil)etanol (**3a**) não apresentou resolução na separação dos enantiômeros em coluna quiral de β -ciclodextrina por cromatografia a gás (Figura 41). Assim, o excesso enantiomérico do *S*-álcool **3a** ($>99\%$ ee) produzido pela resolução quimio-enzimática utilizando a lipase CALB, foi determinado após a esterificação ao correspondente acetato **3b** com anidrido acético e piridina.

Figura 40 - Cromatogramas da resolução do ($\pm$)-iodofeniletanol (**2a**) com a lipase CALB.

Cromatogramas obtidos em GC-FID equipado com coluna quiral de β -ciclodextrina: **(A)** Padrão da 1-(2-iodofenil)etanona (**2**); **(B)** Padrão do álcool ($\pm$)-1-(2-iodofenil)etanol (**2a**); **(C)** Padrão do acetato de ($\pm$)-1-(2-iodofenil)etila (**2b**); **(D)** Resolução com a lipase CALB com 24 h de reação. Condições de análise no GC-FID: $T_i = 120^\circ\text{C}$, 2 min; $T_f = 165^\circ\text{C}$, 8 min; $r = 2^\circ\text{C}/\text{min}$.

Figura 41 - Cromatogramas da resolução do ($\pm$)-iodofeniletanol (**3a**) com lipase CALB.

Cromatogramas obtidos em GC-FID equipado com coluna quiral de β -ciclodextrina: **(A)** Padrão da 1-(3-iodofenil)etanona (**3**); **(B)** Padrão do álcool ($\pm$)-1-(3-iodofenil)etanol (**3a**); **(C)** Padrão do acetato de ($\pm$)-1-(3-iodofenil)etila (**3b**); **(D)** Resolução com a lipase CALB com 24 h de reação; **(E)** Esterificação do (*S*)-1-(3-iodofenil)etanol (**3a**) pela lipase CALB. Condições de análise no GC-FID: $T_i = 120^\circ\text{C}$, 2 min; $T_f = 165^\circ\text{C}$, 8 min; $r = 2^\circ\text{C}/\text{min}$.

Figura 42 - Cromatogramas da resolução do (±)-iodofeniletanol (**4a**) com a lipase CALB.

Cromatogramas obtidos em GC-FID equipado com coluna quiral de β -ciclodextrina: **(A)** Padrão da 1-(4-iodofenil)etanona (**4**); **(B)** Padrão do álcool (±)-1-(4-iodofenil)etanol (**4a**); **(C)** Padrão do acetato de (±)-1-(4-iodofenil)etila (**4b**); **(D)** Resolução com a lipase CALB com 4 h de reação. Condições de análise no GC-FID: $T_i = 120^\circ\text{C}$, 2 min; $T_f = 165^\circ\text{C}$, 8 min; $r = 2^\circ\text{C}/\text{min}$.

As configurações absolutas dos alcoóis **2a** e **4a** e do acetato **2b** foram determinadas através da comparação dos valores de rotação ópticas específicas reportadas na literatura (Tabela 8).

Tabela 8 - Dados de rotação experimental e da literatura para os alcoóis **2a-4a** e do acetato **2b-4b**

Composto	Rotação óptica experimental $[\alpha]_D^{25}$	Rotação óptica da literatura $[\alpha]_D^{25}$
S-2a	-13,8 (c 0,07; CHCl ₃ ; 24% ee)	-41,3 (c 0,20; CHCl ₃ ; 97% ee); (XU <i>et al.</i> , 2005).
S-3a	-20,7 (c 0,10; CHCl ₃ ; 98% ee)	-
S-4a	-38,5 (c 6,90; CHCl ₃ ; 98% ee)	-32,7 (c 5,99; CHCl ₃ ; 96% ee); (IZUMI <i>et al.</i> , 1996)
R-2b	+7,9 (c 0,12; CHCl ₃ ; 98% ee)	-6,8 (c 0,785; CHCl ₃ ; 69% ee); (IZUMI <i>et al.</i> , 1996)
R-3b	+6,9 (c 0,18; CHCl ₃ ; 98% ee)	-
R-4b	+71,1 (c 3,80; CHCl ₃ ; 98% ee)	-

Após análise por cromatografia a gás e da atribuição da configuração absoluta pode-se concluir que a lipase CALB teve uma preferência para esterificação do *R*-álcool. A preparação do *S*-álcool **3a** enantiomericamente enriquecido e dos *R*-acetatos **3b** e **4b** foram descritas pela primeira vez neste trabalho e as configurações absolutas destes compostos foram propostas de acordo com a regra de Kazlauskas (JING *et al.*, 2008). Esta regra empírica prevê uma diferença na estrutura do sítio ativo das lipases, que consiste em duas cavidades de tamanhos diferentes, uma grande e outra pequena (Figura 43). O modelo foi criado a partir de diferentes experimentos realizados com diferentes ésteres secundários. Estes foram submetidos à reação de hidrólise mediada pela lipase *Pseudomonas cepacia*. Observou-se nestes experimentos que a lipase *P. cepacia* catalisou preferencialmente a hidrólise do *R*-éster.

Figura 43 - Ilustração das cavidades do sítio catalítico de uma lipase e os enantiômeros de um álcool quiral contendo um grupo volumoso (esfera G) e um grupo pequeno ou de menor volume (esfera P).

A enantiosseletividade para as estruturas que contêm um substituinte pequeno e o outro grande, por exemplo, um álcool secundário, como mostrado na figura 43, é explicado pela forma com que os substituintes quirais são encaixados nas cavidades do sítio catalítico da lipase.

As reações iniciam-se pela interação do substrato ligando-se ao sítio ativo da enzima, o que acarreta mudanças na distribuição dos elétrons provenientes das possíveis interações intermoleculares (Figura 44).

Figura 44 - Principais tipos de interações responsáveis pela estrutura terciária das enzimas.

Estas mudanças possibilitam que as reações químicas ocorram e levem a formação dos produtos. Após a obtenção dos produtos, estes, por não mais terem ligações específicas com o

sítio catalítico das enzimas, são dissociados e liberados no meio reacional, e o ciclo catalítico é regenerado para novas reações.

Na figura 45 observa-se o melhor encaixe de um dos grupos substituintes na cavidade do sítio catalítico da enzima, o que resulta em uma maior enantiosseletividade do substrato biocatalisado tanto para uma reação de esterificação quanto de hidrólise catalisada por hidrolases. Enquanto que o outro enantiômero também pode ser catalisado pela lipase, mas ao ser acomodado o substituinte grande na cavidade menor provoca repulsões estéricas entre os substituintes e a cavidade do sítio ativo, causando uma ruptura na tríade catalítica e resultando em uma baixa seletividade na reação para este enantiômero (GHANEM, 2007). Em alguns casos a reação deixa até mesmo de ocorrer para o enantiômero menos favorecido.

Figura 45 - Enantiopreferência em reações enzimáticas de hidrólise de ésteres e esterificação de alcoóis secundários de acordo com o modelo empírico de Kazlauskas.

Para demonstrar a versatilidade dos *S*-alcoóis **2a-4a** enantiomericamente enriquecidos e também com o objetivo de construir novos blocos quirais, os *S*-alcoóis **2a-4a** foram utilizados em reação de acoplamento de Suzuki (Seção 3.13). Estas reações foram realizadas utilizando o tetra(trifenilfosfina)paládio e carbonato de cálcio. Após 24 h observou-se as reações por análise de CCD a formação dos produtos, estes foram extraídos, purificados por CC e caracterizados como o (*S*)-1-(bifenil-3-il)etanol (**3c**) e o (*S*)-1-(bifenil-4-il)etanol (**4c**). Como podem ser observados no esquema 32, os compostos bifenílicos quirais **3c** e **4c** foram obtidos em bons rendimentos (63-65%).

Esquema 32 - Reações de acoplamento cruzado de Suzuki.

No entanto o (*S*)-iodofeniletanol (**2a**) não conduziu à formação do composto bifenílico quiral (*S*)-1-(bifenil-2-il)etanol (**2c**) sob as mesmas condições de reação, provavelmente devido ao efeito estérico do substituinte iodo no anel aromático. Estas reações foram realizadas em colaboração com Prof. Dr. Cristiano Raminelli (UNIFESP) e pelo doutorando Isac George Rosset (IQSC-USP).

4.6 Resolução quimio-enzimática dos azidofeniletanóis 13a-17a por lipase CALB

Os α -azido-alcoóis são precursores utilizados na síntese de vários fármacos, tais como: o *S*-pronolol usado como um anti-hipertensivo e a *R*-denopamina usada no tratamento de insuficiência cardíaca (Figura 46) (PÀMIES & BÄCKVALL 2001).

Figura 46 - Fármacos *S*-pronolol e *R*-denopamina.

Uma ótima maneira de sintetizar α -azido alcoóis enantiomericamente puros é através da resolução quimio-enzimática utilizando lipase. Assim foram realizadas resoluções enzimáticas dos ($\pm$)-2-azido-1-feniletanol (**13a**), ($\pm$)-2-azido-1-(4-metoxifenil)etanol (**14a**), ($\pm$)-2-azido-1-(4-bromofenil)etanol (**15a**), ($\pm$)-2-azido-1-(4-nitrofenil) etanol (**16a**) e ($\pm$)-2-azido-1-(4-clorofenil)etanol (**17a**) utilizando a lipase CALB e acetato de vinila como agente acilante em agitador orbital. Os resultados estão mostrados na tabela 9. O desenvolvimento das reações foi acompanhado por análise das alíquotas em CCD coletadas entre 5 a 10 dias. Posteriormente, as alíquotas foram analisadas por HPLC utilizando coluna com fase quiral para determinação da conversão e excesso enantiomérico.

Tabela 9 - Resolução enzimática dos ($\pm$)-azido-alcoóis **13a-17a** usando acetato de vinila e lipase CALB em hexano^a.

Álcool quiral	t (dias)	c (%)	ee (%)	CA	Acetato quiral	t (dias)	c (%)	ee (%)	CA
13a	5	50	>99	<i>R</i>	13b	5	50	>99	<i>S</i>
14a	5	50	>99	<i>R</i>	14b	5	50	>99	<i>S</i>
15a	10	60	70	<i>R</i>	15b	10	40	>99	<i>S</i>
16a	10	72	49	<i>R</i>	16b	10	28	>99	<i>S</i>
17a	7	50	>99	<i>R</i>	17b	7	50	>99	<i>S</i>

^aCondições de reação: Em um Erlenmeyer de 50 mL foram adicionados 10 mL de hexano HPLC, 1 mL de acetato de vinila, 100 mg de lipase CALB e os correspondentes azido-alcoóis **13a-17a** (200 mg; 1 mmol). O Erlenmeyer foi selado

com uma rolha de borracha e a reação foi transferida para um agitador orbital rotativo a 32°C e 130 rpm; t: tempo de reação; c: concentração; ee: excesso enantiomérico; Ca: Configuração absoluta.

As resoluções dos (±)-azido-alcoóis **13a-17a** com acetato de vinila e lipase CALB forneceram os correspondentes *S*-azido-acetatos **13b-17b**, e os *R*-azido-alcoóis **13a-17a**. Os *S*-azido-acetatos **13b-17b** e os *R*-azido-alcoóis **13a-14a** e **17a** foram obtidos com excelentes excessos enantioméricos (>99%) e conversões (50%) entre 5 e 10 dias de reação (tabela 9, figuras 47-51). Os (±)-azido-alcoóis **15a** e **16a** foram parcialmente esterificados possivelmente devido à insolubilidade em hexano. Os *R*-azido-alcoóis **15a-16a** foram obtidos com (c = 60%, 70% ee) e (c = 72%, 49% ee) (Figuras 49-50), respectivamente.

Estudos na literatura reportaram a resolução do azido-álcool **13a**, obtido com baixo excesso enantiomérico (74%) com a lipase de *Pseudomonas cepacia* e acetato de vinila como agente acilante, sob condições de ultrassom em 62 h de reação (BRENELLI & FERNANDES, 2003). Outro estudo demonstrou a resolução do azido-álcool **14a**, o qual foi resolvido *in situ* pela lipase de *P. cepacia* imobilizada em partículas de cerâmica e acetato de isopropenila como agente acilante em 40 h e 40°C. O *R*-azido-álcool **14a** foi obtido com 99% de excesso enantiomérico. O *S*-azido-álcool **14a** foi obtido com 96% ee após hidrólise com carbonato de potássio anidro em metanol (KAMAL *et al.*, 2004).

O (*R*)-2-azido-1-(4-metoxifenil)etanol (**14a**) é um intermediário da “tembamide” (Esquema 33). A Tembamide é encontrada naturalmente e isolada de vários membros da família *Rutaceae*, e é usado na medicina tradicional indiana onde tem se mostrado ativo contra hipoglicemia (KAMAL *et al.*, 2004).

Esquema 33 - Síntese da temabime a partir dos (*R*)-2-azido-1-(4-metoxifenil)etanol.

Kamal *et al.*, demonstraram a resolução do azido-álcool **15a** racêmico com a lipase *P. cepacia* *in situ* utilizando acetato de isopropenila, como agente acilante e éter isopropílico. Os compostos *R*-azido-álcool **15a** e o *S*-azido-acetato **15b** resultantes da resolução foram obtidos em bons rendimentos isolados (42% e 44%) e excessos enantioméricos (92% e >99%) respectivamente, após 28 h de reação a 40°C (KAMAL *et al.*, 2004).

Os rendimentos das resoluções dos azido-alcoóis **13a-17a** foram determinados após purificação em coluna cromatográfica e estão sumarizados na tabela 10. A determinação das configurações absolutas dos azido-alcoóis **13a-15a**, **17a** e dos azido-acetatos **13b-15b**, **17b** foram realizadas através da comparação dos valores de rotação óptica específica com os dados reportados na literatura (BRENELLI & FERNANDES, 2003) (Tabela 10). A configuração absoluta do azido-álcool **16a** e do azido-acetato **16b** foram sugeridas de acordo com a regra empírica de Kazlauskas para resolução quimio-enzimática de alcoóis secundários onde o grupo azido foi considerado um grupo pequeno. O tempo longo para a resolução quimio-enzimática dos azido-alcoóis podem ser atribuídos às interações do grupo polar azido $[R-N=\overset{+}{N}=\overset{-}{N} \leftrightarrow R-\overset{-}{N}-\overset{+}{N}\equiv N]$ com a lipase dificultando a sua resolução.

Figura 47 - Cromatogramas da resolução do ($\pm$)-2-azido-1-feniletanol (**13a**) com a lipase CALB.

Cromatogramas obtidos por HPLC em coluna quiral Daicel® ODH. (A) Padrão do ($\pm$)-2-azido-1-feniletanol (**13a**). (B) Padrão do acetato de ($\pm$)-2-azido-1-feniletila (**13b**). (C) Resolução com lipase CALB após extração final com 5 dias de reação. Condições de análise no HPLC: 10% isopropanol, 90% hexano, fluxo 0,5 mL/min; 254 nm.

Figura 48 - Cromatogramas da resolução do (±)-2-azido-1-(4-metoxifenil)etanol (**14a**) com a lipase CALB.

Cromatogramas obtidos por HPLC em coluna quiral Daicel® ODH. **(A)** Padrão do (±)-2-azido-1-(4-metoxifenil)etanol (**14a**). **(B)** Padrão do acetato de (±)-2-azido-1-(4-metoxifenil)etila (**14b**). **(C)** Resolução com lipase CALB após extração final com 5 dias de reação. Condições de análise no HPLC: 10% isopropanol, 90% hexano; fluxo 0,5 mL/min, 254 nm.

Figura 49 - Cromatogramas da resolução do (±)-2-azido-1-(4-bromofenil)etanol (**15a**) com a lipase CALB.

Cromatogramas obtidos por HPLC em coluna quiral Daicel® ODH. **(A)** Padrão do (±)-2-azido-1-(4-bromofenil)etanol (**15a**). **(B)** Padrão do acetato de (±)-2-azido-1-(4-bromofenil)etila (**15b**). **(C)** Resolução com lipase CALB após extração final com 10 dias de reação. Condições de análise no HPLC: 6% isopropanol, 94% hexano, fluxo 0,5 mL/min; 200 nm.

Figura 50 - Cromatogramas da resolução do ($\pm$)-2-azido-1-(4-nitrofenil)etanol (**16a**) com a lipase CALB.

Cromatogramas obtidos por HPLC em coluna quiral Daicel® ODH. **(A)** Padrão do ($\pm$)-2-azido-1-(4-nitrofenil)etanol (**16a**). **(B)** Padrão do acetato de ($\pm$)-2-azido-1-(4-nitrofenil)etil (**16b**). **(C)** Resolução com lipase CALB após extração final com 10 dias de reação: Condições de análise no HPLC: 5% isopropanol, 95% hexano, fluxo 0,5 mL/min; 254 nm.

Figura 51 - Cromatogramas da resolução do ($\pm$)-2-azido-1-(4-clorofenil)etanol (**17a**) com a lipase CALB.

Cromatogramas obtidos por HPLC em coluna quiral Daicel® ODH. **(A)** Padrão do ($\pm$)-2-azido-1-(4-clorofenil)etanol (**17a**) **(B)**. Padrão do acetato de ($\pm$)-2-azido-1-(4-clorofenil)etil (**16a**). **(C)** Resolução com lipase CALB após extração final com 7 dias de reação: Condições de análise no HPLC: 5% isopropanol, 95% hexano, fluxo 0,5 mL/min; 254 nm.

Tabela 10 - Dados de rotação experimental e da literatura para os azido-alcoóis **13a-17a** e dos azido-acetatos **13b-17b**.

Composto	Rotação óptica experimental $[\alpha]_D^{25}$	Rotação óptica literatura $[\alpha]_D^{25}$	Rendimento
R-13a	- 69,1 (c 1,6; CHCl ₃ ; >99% ee)	-89,2 (c 1,0; CHCl ₃ ; 98% ee); (KAMAL <i>et al.</i> , 2004)	48%
S-13b	+93,1 (c 1,9; CHCl ₃ ; >99% ee)	+89,2 (c 1,0; CHCl ₃ ; 94% ee); (KAMAL <i>et al.</i> , 2004)	48%
R-14a	-93,1 (c 1,9; CHCl ₃ ; >99% ee)	-116,9 (c 1,2; CHCl ₃ ; 98% ee); (KAMAL <i>et al.</i> , 2004)	44%
S-14b	+94,1 (c 1,2; CHCl ₃ ; >99% ee)	+123,7 (c 1,0; CHCl ₃ ; 98% ee); (KAMAL <i>et al.</i> , 2004)	45%
R-15a	- 66,6 (c 1,1; CHCl ₃ ; 70% ee)	-77,0 (c 1,0; CHCl ₃ ; 92% ee); (KAMAL <i>et al.</i> , 2004)	55%
S-15b	+ 62,4 (c 1,2; CHCl ₃ ; >99% ee)	+93,8 (c 1,1; CHCl ₃ ; >99% ee); (KAMAL <i>et al.</i> , 2004)	38%
R-16a	49% ee	-	65%
S-16b	99% ee	-	24%
S-17a	- 51,8 (c 1,0; MeOH; >99% ee)	-79,3 (c 1,2; CHCl ₃ ; >99% ee); (FARDELONE <i>et al.</i> , 2006)	46%
S-17b	+ 55,8 (c 1,0; MeOH; >99% ee)	+93,8 (c 1,0; CHCl ₃ ; >99% ee); (KAMAL <i>et al.</i> , 2004)	48%

Os (*R*)-2-azido-1-feniletanol (**13a**), (*R*)-2-azido-1-(4-metoxifenil)etanol (**14a**), (*R*)-2-azido-1-(4-bromofenil)etanol (**15a**), (*R*)-2-azido-1-(4-nitrofenil)etanol (**16a**) e (*R*)-2-azido-1-(4-clorofenil)etanol (**17a**) quirais obtidos nas resoluções quimio-enzimática foram utilizados como precursores nas sínteses dos triazóis quirais (*R*)-2-(1H-benzo[1,2,3]triazol-1-il)-1-feniletanol (**18**), (*R*)-2-(1H-benzo[1,2,3]triazol-1-il)-1-(4-metoxifenil)etanol (**19**), (*R*)-2-(1H-benzo[1,2,3]triazol-1-il)-1-(4-bromofenil)etanol (**20**), (*R*)-2-(1H-benzo[1,2,3]triazol-1-il)-1-(4-nitrofenil)etanol (**21**) e (*R*)-2-(1H-benzo[1,2,3]triazol-1-il)-1-(4-clorofenil)etanol (**22**). Os triazóis quirais foram obtidos através da reação de ciclo adição 3+2 em bons rendimentos (>75%) após purificação por cromatografia em coluna (Esquema 24). Estas reações foram realizadas em colaboração com o Prof. Dr. Cristiano Raminelli (UNIFESP).

Esquema 34 - Síntese dos triazóis quirais.

Dentre os sistemas heterocíclicos mais estudados encontram-se os triazóis, que têm despertado muito interesse pelo fato de possuírem um vasto campo de aplicações, que vão desde usos como explosivos, até como agroquímicos e fármacos (DE SOUZA *et al.*, 2005, MELO *et al.*, 2006).

O grupo tem interesse na síntese de triazóis para realização de ensaios biológicos em colaboração com outros grupos de pesquisa.

4.7 Identificação e caracterização dos triazóis 18-22

As estruturas moleculares dos triazóis **18** a **22** foram determinadas por meio das análises dos dados obtidos de RMN de ^1H e ^{13}C , além de experimentos bidimensionais HSQC, HMBC (Figuras 52-69 e Tabelas 11-14) e ainda dados de espectrometria no (IV) e (HRMS) (ANEXOS: p. 179-186). Os valores de rotação óptica específica bem como os excessos enantioméricos para os compostos **18-20** e **22** foram determinados (Tabela 11).

Tabela 11 - Dados de rotação óptica experimental dos triazóis **18-20** e **22**.

Composto	Rotação $[\alpha]_D^{25}$
18	-20,5 (c 1,2; CHCl_3 ; >99% ee)
19	-43,3 (c 1,5; CHCl_3 ; >99% ee)
20	-6,8 (c 0,9; CHCl_3 ; 70% ee)
21	(Insolúvel em CHCl_3 ; 49% ee)
22	-34,8 (c 1,0; CHCl_3 ; >99% ee)

A análise do espectro de RMN de ^1H da substância (*R*)-2-(1H-benzo[1,2,3]triazol-1-il)-1-(4-metoxifenil)etanol (**19**), permitiu verificar a presença de dois duplos dupletos em δ 4,68 (1H, J = 14,3 e 8,0 Hz) e δ 4,73 (1H, J = 14,3 e 4,2 Hz), os quais foram caracterizados como hidrogênios metilênicos alfa ao grupo hidroxila. Em δ 5,27 foi observado um duplo duplete (J = 8,0 e 4,2 Hz), integrando para um hidrogênio, o qual foi atribuído ao hidrogênio metínico ao grupo hidroxila. Em δ 6,84 e 7,30, constatou-se dois dupletos (J = 8,0 Hz), integrando para dois hidrogênios cada grupo

de sinais, os quais foram caracterizados como hidrogênios do anel aromático em C-1 do etanol, sendo estes sinais típicos do padrão de substituição em anéis aromáticos *para* dissustituídos. Os sinais em δ 7,76 (d, 1H, $J = 8,4$ e 1,0), δ 7,23 (t, 1H, $J = 8,4$), δ 7,38 (t, 1H, $J = 8,4$) e δ 7,49 (d, 1H, $J = 8,4$), todos integrando para um hidrogênio, os quais foram atribuídos aos hidrogênios aromáticos desta junção ao grupo triazol, estando estes nas posições 2'', 3'', 4'' e 5'', respectivamente. Em δ 3,76 foi observado um singlete, integrando para três hidrogênios, o qual foi atribuído a um grupo metoxila em C-4'.

No espectro de RMN de ^{13}C foram observados 14 sinais para metoxi-triazol **19**. Foi observado um sinal em δ 72,7 característico de carbono carbinólico, atribuído ao C-1. Um sinal em δ 55,5 o qual foi atribuído ao carbono metilênico C-2. Em δ 55,5 foi observado um sinal, atribuído ao grupo metoxila de C-4'. Na região entre δ 110,0 a 145,1 região típica de aromáticos, foram verificados a presença de doze sinais, corroborando a presença de dois anéis aromáticos para o metoxi-triazol **19**.

A análise do experimento HSQC permitiu observar as correlações dos sinais em δ_{H} 4,68 e 4,73 com δ_{C} 55,5 e δ_{H} 5,27 com δ_{C} 72,7 caracterizando assim a presença do etanol dissustituído em C-1 e C-2. Foi possível observar as correlações dos sinais dos hidrogênios aromáticos *para* substituídos em δ_{H} 7,30 com δ_{C} 127,2 e δ_{H} 6,84 com δ_{C} 114,0 e os sinais dos hidrogênios aromáticos desta junção ao grupo triazol em δ_{H} 7,76 com δ_{C} 119,2, δ_{H} 7,23 com δ_{C} 123,9, δ_{H} 7,38 com δ_{C} 127,0, δ_{H} 7,49 com δ_{C} 110,0 caracterizando assim a atribuição dos hidrogênios aromáticos das posições C-2'', C-3'', C-4'' e C-5'', respectivamente. Em δ_{H} 3,76 com δ_{C} 55,2 observou-se a correlação do grupo metoxila em C-4. As correlações no experimento de HSQC podem ser observadas por meio da figura 52.

Figura 52 - Correlações observadas no espectro de HSQC para o metoxi-triazol **19**.

As interações observadas no experimento HMBC corroboram as atribuições propostas para esta substância. As correlações mais significativas correspondem às interações do hidrogênio δ

5,27 referente hidrogênio em C-1, com os carbonos aromáticos *para* substituído em δ 132,6 (C-1') e δ 127,2 (C-2') e ainda correlação com carbono metilênico em δ 55,5 (C-2). A correlação que permitiu observar a junção do anel aromático é a interação entre os sinais dos hidrogênios metilênicos (δ 4,68 e 4,73 em C-2) com o carbono aromático em δ 133,6 (C-6'') e ainda com o carbono carbinólico δ 72,7 (C-1). As correlações observadas no experimento HMBC podem ser visualizadas por meio da figura 53.

Figura 53 - Correlações observadas no espectro de HMBC para a metoxi-triazol **19**.

Tabela 11 - Experimentos de RMN de ^1H , ^{13}C , HSQC e HMBC para o metoxi-triazol **19**.

Posição	C (δ)	H (δ)	HSQC	HMBC
1 – OH	72,7	5,27 (dd, 1H, $J = 8,0$ e 4,2)	72,7	55,5(C-2); 127,2(C-2'); 132,6(C-1')
2	55,5	4,68 (dd, 1H, $J = 14,3$ e 8,0) 4,73 (dd, 1H, $J = 14,3$ e 4,2)	55,5	72,7(C-1); 133,6(C-6'')
1'	132,6	---	---	---
2' e 6'	127,2	7,30 (d, 2H, $J = 8,5$)	127,2	72,7(C-2'); 114,0(C-3'); 127,2(C-2'); 159,4(C-4')
3' e 5'	114,0	6,84 (d, 2H, $J = 8,5$)	114,0	114,0(C-3'); 132,6(C-1'); 159,4(C-4')
4'	159,4	---	---	---
1''	145,1	---	---	---
2''	119,2	7,76 (d, $J = 8,4$)	119,2	127,0(C-4''); 133,6(C-6'')
3''	123,9	7,23 (d, $J = 8,4$)	123,9	110,0(C-5''); 145,1(C-1'')
4''	127,0	7,38 (d, $J = 8,4$)	127,0	119,2(C-2''); 133,6(C-6'')
5''	110,0	7,49 (d, $J = 8,4$)	110,0	123,9(C-3''); 127,0(C-4''); 145,1(C-1'')
6''	133,6	---	---	---
CH ₃ O -C4'	55,2	3,76 (s)	55,2	159,4(C-4')

Tabela 12 - Experimentos de RMN de ^1H , ^{13}C , HSQC e HMBC o triazol **18**.

Posição	C* (δ)	H (δ)	HSQC	HMBC
1(OH)	73,1	5,36 (dd, 1H, $J = 8,0$; 4,0)	73,1	55,3(C-2); 126,0(C-2'); 140,5(C-2'')
2	55,3	4,73 (dd, 1H, $J = 12,0$; 8,0) 4,82 (dd, 1H, $J = 12,0$; 4,0)	55,3	73,1(C-1); 133,8(C-6''), 140,5(C-2'')
1'	140,5	---	---	---
2' e 6'	126,0	7,36 a 7,39 (m)	126,0	73,1(C-1), 126,0(C-2'); 125,6(C-4'); 140,5(C-1')
3' e 5'	128,4	7,41 a 7,45 (m)	128,4	125,6(C-4'); 128,4(C-3'); 140,5(C-1')
4'	125,6	7,36 a 7,39 (m)	125,6	126,0(C-2'); 128,4(C-3')
1''	145,5	---	---	---
2''	119,5	7,91 (dt, 1H, $J = 8,5$ e 0,9)	119,5	123,8(C-3''); 133,8(C-6'')
3''	123,8	7,28 a 7,30 (m)	123,8	145,5(C-1''); 109,8(C-5'')
4''	127,3	7,41 a 7,45 (m)	127,3	109,8(C-5''); 119,5(C-2''); 133,8 (C-6'')
5''	109,8	7,50 (dt, 1H, $J = 8,3$ e 0,9)	109,8	123,8(C3''); 145,5(C1'')
6''	133,8	---	---	--

C* Dados de ^{13}C obtidos a partir da correlação observada no espectro de HMBC.

Tabela 13 - Experimentos de RMN de ^1H , ^{13}C , HSQC e HMBC para o bromo-triazol **20**.

Posição	C (δ)	H (δ)	HSQC	HMBC
1(OH)	72,8	5,41 (dd, 1H, $J = 8,0$; 4,0)	72,8	55,4(C-2); 127,6(C-2'); 139,3(C-1'')
2	55,4	4,68 (dd, 1H, $J = 16,0$; 8,0) 4,82 (dd, 1H, $J = 16,0$; 4,0)	55,4	72,8(C-1); 133,8(C-6''); 139,3(C-1'')
1'	139,3	---	---	---
2' e 6'	127,6	7,24 (d, 2H, $J = 8,0$)	127,6	72,8(C-1'); 134,5(C-4'); 127,6(C-2')
3' e 5'	131,9	7,43 (m)	131,9	127,6(C-2'); 131,9(C-3'); 134,5(C-4'); 139,3(C-1'); 139,3(C-1')
4' (Br)	134,5	---	---	---
1''	145,0	---	---	---
2''	119,5	7,87 (d, 1H, $J = 8,0$)	119,5	109,5(C-5''); 127,7(C-4''); 133,8(C-6'')
3''	124,4	7,28 (d, 1H, $J = 8,0$)	124,4	109,9(C-5''); 145,0(C-1'')
4''	127,7	7,43 (m)	127,7	119,5(C-2''); 133,8 (C-6'')
5''	109,5	7,43 (m)	109,9	124,4(C-3''); 133,8(C-6''); 145,0(C-1'')
6''	133,8	---	---	--

Tabela 14 - Experimentos de RMN de ^1H , ^{13}C , HSQC e HMBC para o triazol **22**.

Posição	C* (δ)	H (δ)	HSQC	HMBC
1(OH)	72,7	5,41 (dd, 1H, $J = 8,0$; 4,0)	72,7	55,7(C-2); 127,2(C-2'); 138,9(C-6'')
2	55,7	4,68 (dd, 1H, $J = 16,0$; 8,0) 4,82 (dd, 1H, $J = 16,0$; 4,0)	55,7	72,7(C-1); 138,9(C-6'')
1'	138,9	---	---	---
2' e 6'	127,2	7,41 (d, 2H, $J = 8,0$)	127,2	72,7(C-1), 127,2(C-2'); 134,5(C-4'); 138,9(C-1')
3' e 5'	129,2	7,36 (d, 2H, $J = 8,0$)	129,2	129,2(C-3'); 134,5(C-4'); 138,9(C-1')
4' (Cl)	134,5	---	---	---
1''	145,5	---	---	---
2''	119,5	7,88 (dt, 1H, $J = 8,3$ e 1,0)	119,5	109,5(C-5''); 124,1(C-3''); 138,9(C-6'')
3''	124,1	7,30 (td, 1H, $J = 8,3$ e 1,0)	124,1	109,5(C-5''); 145,5(C-1'')
4''	127,4	7,47 (td, 1H, $J = 8,3$ e 1,0)	127,4	109,5(C-5''); 119,5(C-2''); 145,5(C-1'')
5''	109,5	7,53 (dt, 1H, $J = 8,3$ e 1,0)	109,5	124,1(C-3''); 145,5(C-1'')
6''	138,9	---	---	--

C* Dados de ^{13}C obtidos a partir da correlação observada no espectro de HMBC.

Figura 54 - Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) do metoxi-triazol **19**. **Figura 55** - Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) do metoxi-triazol **19**.

Figura 56 - Espectro de RMN 2D (HSQC, 400 MHz, CDCl_3) do metoxi-triazol **19**.

Figura 57 - Espectro de RMN 2D (HMBC, 400 MHz, CDCl_3) do metoxi-triazol **19**.

Figura 58 - Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) do triazol **18**.

Figura 59 - Espectro de RMN 2D (HSQC, 400 MHz, CDCl₃) do triazol **18**.

Figura 60 - Espectro de RMN 2D (HMBC, 400 MHz, CDCl_3) do triazol **18**.

Ampliação do espectro de RMN 2D (HMBC, 400 MHz, CDCl_3) do triazol **18**.

Figura 61 - Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) do bromo-triazol **20**. Figura 62 - Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) do bromo-triazol **20**.

Figura 63 - Espectro de RMN 2D (HSQC, 400 MHz, CDCl_3) do bromo-triazol **20**.

Figura 64 - Espectro de RMN 2D (HMBC, 400 MHz, CDCl₃) do bromo-triazol **20**.

Ampliação do espectro de RMN 2D (HMBC, 400 MHz, CDCl_3) do bromo-triazol **20**.

Figura 65 - Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) do cloro-triazol **22**.

Figura 66 - Espectro de RMN 2D (HSQC, 400 MHz, CDCl_3) do cloro-triazol **22**.

Figura 67 - Espectro de RMN 2D (HMBC, 400 MHz, CDCl₃) do cloro-triazol **22**.

Ampliação do espectro de RMN 2D (HMBC, 400 MHz, CDCl_3) do cloro-triazol **22**.

Devido a instabilidade do precursor ($\pm$)-2-azido-1-(4-nitrofenil)etanol (**16a**), possivelmente em função da polaridade do grupo nitro na posição *para* no anel aromático a síntese do nitro triazol **21** foi dificultada. Contudo, a resolução do ($\pm$)-2-azido-1-(4-nitrofenil)etanol (**16a**) com a lipase CALB foi realizada e o correspondente (*S*)-2-azido-1-(4-nitrofenil)etanol (**16a**) foi obtido com rendimento moderado.

O (*S*)-2-azido-1-(4-nitrofenil)etanol (**16a**) obtido na resolução com a lipase CALB foi utilizado na síntese do nitro-triazol **21** também obtido com rendimento moderado. O nitro-triazol **21** é insolúvel em CDCl_3 , assim as análises de RMN ^1H e ^{13}C foram realizadas em DMSO. Devido à frequência de (200 MHz) do equipamento de RMN e a quantidade de água no solvente (DMSO) as caracterizações por RMN foram dificultadas (Figuras 68-69).

(*R*)-2-(1H-benzo[d][1,2,3]triazol-1-il)-1-(4-nitrofenil)etanol (**21**): RMN de ^1H (200 MHz, DMSO), δ (ppm): 8,19 (d, 2H, $J = 8,5$), 8,00 (d, 1H, $J = 8,2$), 7,86 (d, 1H, $J = 8,2$), 7,67 (d, 2H, $J = 8,5$), 7,51 (t, 1H, $J = 8,0$), 7,37 (t, 1H, $J = 8,0$), 5,51 (m, 1H), 4,92 (m, 2H); RMN de ^{13}C (50 MHz, DMSO), δ (ppm): 149,8, 146,9, 133,7, 127,6, 127,0, 123,8, 123,3, 118,9, 111,4, 70,9, 59,8.

Figura 68 - Espectro de RMN de ^1H (200 MHz, DMSO) do nitro-triazol **21**.

Figura 69 - Espectro de RMN de ^{13}C (50 MHz, DMSO) do nitro-triazol **21**.

5 CONCLUSÕES

Os fungos marinhos (*A. sydowii* CBMAI 935, *A. sydowii* CBMAI 934, *A. sclerotiorum* CBMAI 849, *Bionectria* sp. CBMAI 936, *B. felina* CBMAI 738, *C. cladosporioides* CBMAI 857, *M. racemosus* CBMAI 847, *P. citrinum* CBMAI 1186, *P. miczynskii* CBMAI 930) apresentaram excelente potencial como biocatalisador frente a grande parte da redução enantiosseletiva dos derivados de acetofenonas, apontando as características estereosseletiva das enzimas. Muitas reações catalisadas por micro-organismos produziram alcoóis com elevado excesso enantiomérico e ótimos rendimentos. Destacando-se os fungos *A. sydowii* CBMAI 935 e *Bionectria* sp. CBMAI 936 que catalisaram a biorredução estereosseletiva da 1-(4-metoxifenil)etanona (**1**) para o correspondente (*R*)-1-(4-metoxifenil)etanol (**1a**) com excelente excesso enantiomérico (>99%) e rendimento isolado de 91% e 93%, respectivamente. O fungo *A. sclerotiorum* CBMAI 849 catalisou quantitativamente a biorredução da cetona **1** para o *S*-álcool **1a** em apenas 3 dias.

Os fungos marinhos também catalisaram a biorredução das ceto-azidas **13-16** para os *S*- ou *R*-azido-alcoóis com boas conversões e seletividades (*c* = 32-100%) e (29 - >99% *ee*). Este foi o primeiro estudo envolvendo biorredução de ceto-azidas com fungos marinhos no país.

A imobilização das células dos fungos *P. citrinum* CBMAI 1186 e *A. sclerotiorum* CBMAI 849 mostraram potencial para redução das cetonas **1** e **7** de acordo com o suporte utilizado. O suporte de sílica gel mostrou boa interação entre as células dos fungos filamentosos. Sendo que o suporte de xerogel de sílica aderiu fortemente as células microbianas dos fungos. No entanto, esta forte adesão pode ter contruído para a inativação da atividade biocatalítica frente aas reações de redução das cetonas **1** e **7**, criando uma barreira entre à enzima e o acesso do substrato ao seu sítio ativo. A utilização de quitosana como um suporte para a imobilização de fungos filamentosos é certamente muito vantajosa. As reações de redução das cetonas **1** e **7** avaliadas nestes estudos com as células do fungo *P. citrinum* levou a uma melhora das conversões em comparação com as reações realizadas com as células microbianas livres. As células dos fungos *P. citrinum* CBMAI 1186 e *A. sclerotiorum* CBMAI 849 imobilizadas em sílica gel mostraram boa atividade biocatalítica frente à redução das cetonas **1** e **7** após 30 dias de incubação em refrigerador.

A lipase CALB foi utilizada na resolução quimio-enzimática de feniletanóis **2a-4a**. Os (*S*)-iodofeniletanóis **3a-4a** foram obtidos com excelentes excessos enantioméricos (>99%) confirmando o grande potencial desta enzima na síntese de alcoóis enantiomericamente puros. Os (*S*)-iodofeniletanóis **3a-4a** obtidos pela resolução foram utilizados na síntese de compostos bifenílicos quirais com bons rendimentos (63-65%) por reação de acoplamento Suzuki. A resolução

dos azido-alcoóis **13a-16a** foram realizadas com lipase CALB e os azido-alcoóis quirais obtidos foram utilizados para preparação de triazóis quirais.

Este trabalho demonstrou a importância da realização de triagens com novas coleções de micro-organismos e o grande potencial biocatalítico da lipase de *C. antarctica* para resolução de feniletanóis.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVAREZ-MACARIE, E.; AUGIER-MAGRO; GUZZO, J.; BARATTI, J. Molecular characterization of gene encoding in esterase from *Bacillus licheniformis* sharing significant similarities with lipases.

Biotechnology Letters, v. 21, p. 313-319, 1999.

ANDRADE, L. H.; KEPPLER, A. F.; SCHOENLEIN-CRUSIUS, I. H.; PORTO, A. L. M.; COMASSETO, J. V. Evaluation of acetophenone monooxygenase and alcohol dehydrogenase activities in different fungal strains by biotransformation of acetophenone derivatives. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 31, p. 129-135, 2004.

ANTHONSEN, T. **Industrial biotechnology biocatalysis in organic chemistry**. Trondheim: Innspill til Biotek, 2009. p. 1-10.

ANTRANIKIAN, G.; VORGIAS, C. E.; BERTOLDO, C. Extreme environments as a resource for microorganisms and novel biocatalysts. **Advance in Biochemistry Engineer Biotechnology**, v. 96, p. 219-262, 2005.

BARBIERI, C.; BOSSI, L.; D'ARRIGO, P.; FANTONI, G. P.; SERVI, S. Bioreduction of aromatic ketones: preparation of chiral benzyl alcohols in both enantiomeric forms. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 11, p. 415-421, 2001.

BELL, R. R.; CROOKHAM, S. B.; DUNN, W. A.; GRATES, K. M.; REIBER, T. M. A contemporaneous finding of fenproporex in a polydrug suicide. **Journal of Analytical Toxicology**, v. 25, p. 652-656, 2001.

BISSETT, F.; STERNBERG, D. Immobilization of *Aspergillus* β -glucosidase on chitosan. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 35, p. 750-755, 1978.

BIZERRA, A. M. C.; MONTENEGRO, T. G. C.; LEMOS, T. L. G.; OLIVEIRA, M.; MATTOS, M. C.; LAVANDERA, I.; GONZALO, G. Enzymatic regioselective production of chloramphenicol esters. **Tetrahedron**, v. 67, p. 2858-2862, 2011.

BOMMARIUS, A. S.; RIEBEL, B. R. **Biocatalysis fundamentals and applications**. New York: Wiley, 2004. p. 611

BONGIORNI, L.; PIETRA, F. Marine natural products for industrial applications. **Chemistry and Industry**, v. 2, p. 54-58, 1996.

BRENELLI, E. C. S.; DE CARVALHO, M.; OKUBO, M. T.; MARQUES, M.; MORAN, P. J. S.; RODRIGUES, J. A. R.; SORRILHA, A. E. P. M. Enantioselective synthesis of (*R*)-(-)-1-phenylethanolamines using bakers-yeast reduction of some alpha-substituted methyl phenyl ketones. **Indian Journal of Chemistry**, v. 31B, p. 821-823, 1992.

BRENELLI, E. C. S.; FERNANDES, J. L. N. Stereoselective acylations of 1,2-azidoalcohols with vinyl acetate, catalyzed by lipase Amano PS. **Tetrahedron: Asymmetry**, v. 14, p. 1255-1259, 2003.

BRZEZINSKA-RODAK, M.; ZYMANCZYK-DUDA, E.; KLIMEK-OCHAB, M.; KAFARSKI, P.; LEJCZAK, B. A simple and green procedure for the microbial effective synthesis of 1-phenylethyl alcohol in both enantiomeric forms. **Biotechnology Letters**, v. 28, p. 511-513, 2006.

BUGNI, T. S.; IRELAND, C. M. Marine-derived fungi: a chemically and biologically diverse group of microorganisms. **Natural Product Reports**, v. 21, p. 143-163, 2004.

CÁNOAS, M.; IBORRA, J. L. Whole cell biocatalysts stabilization for L-carnitine production. **Biocatalysis and Biotransformation**, v. 23, p. 149-158, 2005.

CARVALHO, C. C. C. R. Enzymatic and whole cell catalysis: Finding new strategies for old processes. **Biotechnology Advances**, v. 29, p. 75-83, 2011.

CARVALHO, W.; CANILHA, L.; DA SILVA, S. S. Uso de biocatalisadores imobilizados: Uma alternativa para a condução de bioprocessos. **Revista Analytica**, v. 23, p. 60-70, 2006.

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

CHEN, C. S.; FUJIMOTO, Y.; GIRDAUKAS, G.; SIH, C. J. Quantitative analyses of biochemical kinetic resolutions of enantiomers. **Journal of the American Chemistry Society**, v. 104, p. 7294-7299, 1982.

CHENG, Z.; PAN, J.; TANG, W.; CHEN, Q.; LIN, Y. Biodiversity and biotechnological potential of mangrove-associated fungi. **Journal of Forestry Research**, v. 20, p. 63-72, 2009.

CHIBATA, I.; TOSA, T.; SATO, T. Immobilized aspartase-containing microbial cells: Preparation and enzymatic properties. **Applied Microbiology**, v. 27, p. 878-885, 1974.

CHUNG, S. Y.; VERCELLOTTI, J. R.; SANDERS, T. H. Rapid test for alcohol dehydrogenase during peanut maturation and curing. **Chemistry Markers for Processed and Stored Foods**, v. 631, p. 179-188, 1996.

CODY, J. T. Precursor medications as a source of methamphetamine and/or amphetamine positive drug testing results. **Journal of Occupational and Environmental Medicine**, v. 44, p. 435-450, 2002.

COMASSETO, J. V.; ANDRADE, L. H.; OMORI, A. T.; ASSIS, L. F.; PORTO, A. L. M. Deracemization of aryl ethanol and reduction of acetophenones by whole fungal cells of *Aspergillus terreus* CCT 4083, *Apergillus terreus* CCT 3320 and *Rhizopus oryzae* CCT 4964. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 29, p. 55-61, 2004.

COUTO, S. R.; RIVELA, I.; MUÑOZ, M. R.; SANROMÁN, A. Ligninolytic enzyme production and the ability of decolourisation of Poly R-478 in packed-bed bioreactors by *Phanerochaete Chrysosporium*. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 23, p. 287-293, 2000.

CSUK, R.; GLANZER, B. I. Baker's yeast mediated transformation in organic chemistry. **Chemical Reviews**, v. 91, p. 49-97, 1991.

DALLA-VECCHIA, R.; NASCIMENTO, M. G.; SOLDI, V. Aplicações sintéticas de lipases imobilizadas em polímeros. **Química nova**, v. 27, p. 623-630, 2004.

DE CLERCQ, E. Current lead natural products for the chemotherapy of human immunodeficiency virus (HIV) infection. **Medicinal Research Reviews**, v. 20, p. 323-349, 2000.

DE VITA-MARQUES, A. M.; LIRA, S. P.; BERLINCK, R. G. S.; SELEGHIM, M. H. R.; SPONCHIADO, S. R. P.; TAUKE-TORNISIELO, S. M.; BARATA, M.; PESSOA, C.; DE MORAES, M. O.; COELHO, B.; NASCIMENTO, G. G. F.; DE SOUZA, A. O.; GALETTI, F. C. S.; SILVA, C. L.; SILVA, M.; PIMENTA, E. F.; THIEMANN, O.; PASSARINI, M. R. Z.; SETTE, L. D. A multi-screening approach for marine-derived fungal metabolites and the isolation of cyclodepsipeptides from *Beauveria felina*. **Química Nova**, v. 31, p. 1099-1103, 2008.

DEMIRJIAN, D. S.; SHAH, P. C.; MORÍS-VARAS, F. Screening for novel enzymes. In: FRESSNER, W. D. (Ed.). **Biocatalysis from discovery to application**. Berlin: Springer, 2000. p. 1-30.

DE SOUZA, M. V. N.; FERREIRA, S. B.; MENDONÇA, J. S.; COSTA, M.; REBELLO, F. R. Métodos de obtenção e aplicações sintéticas de tiazóis, uma importante classe de compostos heterocíclicos. **Química Nova**, v. 28, p. 77-84, 2005.

D'SOUZA, D. T.; TIWARI, R.; SAH, A. K.; RAGHUKUMAR, C. Enhanced production of laccase by a marine fungus during treatment of colored effluents and synthetic dyes. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 38, p. 504-511, 2006.

FABER, K. **Biotransformations in organic chemistry**. Berlin: Springer-Verlag, 2004. p. 5-250.

FARDELONE, L. C.; RODRIGUES, J. A. R.; MORAN, P. J. S. Bioreduction of 2-azido-1-arylethanones mediated by *Geotrichum candidum* and *Rhodotorula glutinis*. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 39, p. 9-12, 2006.

FERSHT, A.; **Structure and mechanism in protein science**: a guide to enzyme catalysis and protein folding, Freeman: New York: Wiley, 1998. 295 p.

FREEMAN, A.; LILLY, M. D. Effect of processing parameters on the feasibility and operational stability of immobilized viable microbial cells. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 23, p. 335-345, 1998.

GARIANI, R. A.; LUENGO, F. A. G.; VALE, L. A. S.; BAZITO, R. C.; COMASSETO, J. V. Enzymatic kinetic resolution of organochalcogenides in supercritical CO₂. **Tetrahedron Letters**, v. 52, p. 3336, 2011.

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

GHANEM, A.; ABOUL-ENEIN, H. Y. Lipase-mediated chiral resolution of racemates in organic solvents. **Tetrahedron: Asymmetry**, v. 15, p. 3331-3351, 2004.

GONG, P.; BLOUGH, B. E.; BRIEADDY, L. E.; HUANG, X.; KUCHAR, M. J.; NAVARRO, H. A.; CARROLL, F. I. Synthesis, monoamine transporter binding, properties, and functional monoamine uptake activity of 3β-[4-methylphenyl and 4-chlorophenyl]-2β-[5-(substituted phenyl)thiazol-2-yl]tropanes. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 50, p. 3686-3695, 2007.

GOY, R. C.; ASSIS, O. B. G.; CAMPANA-FILHO, S. P. Produção de esferas de quitosana. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, v. 33, p. 30-34, 2004.

HAMMERSCHMIDT, F.; SIMOV, B. P; SHIMDT, S.; SHINEIDER, S.; ZOLLE, I. M. Chemoenzymatic synthesis of stannylated metomidate as a precursor for electrophilic radiohalogenations – regioselective alkylation of methyl 1 *H*-imidazole-5-carboxylate [1]. **Monatshefte für Chemie / Chemical Monthly**, v. 136, p. 229-239, 2005.

HATZAKIS, N. S.; SMONOU, I. Asymmetric transesterification of secondary alcohols catalyzed by feruloyl esterase from *Humicola insolens*. **Bioorganic Chemistry**, v. 33, p. 325-337, 2005.

HOBBS, H. R.; THOMAS, N. R. T. Biocatalysis in supercritical fluids, in fluoruous solvents, and under solvent-free conditions. **Chemical Reviews**, v. 107, p. 2786, 2007.

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

ISHIHARA, K.; NAKAJIMA, N.; YAMAGUCHI, H.; HAMADA, H.; UCHIMURA, Y. Stereoselective reduction of keto esters with marine micro algae. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 15, p. 101-104, 2001.

ISHIHARA, K.; YAMAGUCHI, H.; ADACHI, N.; HAMADA, H.; NAKAJIMA, N. Stereocontrolled reduction of α - and β -keto esters with micro green algae, *Chlorella* strains. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 64, p. 2099-2103, 2000.

ISHIHARA, K.; YAMAGUCHI, H.; NAKAJIMA, N. Stereoselective reduction of keto esters: Thermophilic bacteria and microalgae as new biocatalysts. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 23, p. 171-189, 2003.

ISHIHARA, K.; NAGAI, H.; TAKAHASHI, K.; NISHIYAMA, M.; NAKAJIMA, N. Stereoselective reduction of α -keto ester and α -keto amide with marine actinomycetes, *Salinispora* strains, as novel biocatalysts. **Biochemistry Insights**, v. 4, p. 29-33, 2011.

ITO, J.; UJIE, S.; NISHIAMA, H. New bis(oxazoliny)phenyl-ruthenium(II) complexes and their catalytic activity for enantioselective hydrogenation and transfer hydrogenation of ketones. **Organometallics**, v. 28, p. 630-638, 2009.

IZUMI, T.; ITOU, O.; KODERA, K. Chemoenzymic synthesis of optically active 3-methyl- and 3-butylphthalides. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 67, p. 89-95, 1996.

JACOBSEN, E. E.; ANTHONSEN, T.; EL-BEHAIRY, M. F.; SUNDBY, E.; ABOUL-ENEIN, M. N.; ATTIA, M. I.; EL-AZZOUNY, A. A. E.; AMIN, K. M.; ABDEL-REHIM, M. Lipase catalysed kinetic resolution of stiripentol. **International Journal of Chemistry**, v. 4, p. 1-7, 2012.

JAEGER, K. E.; DIJKSTRA, B. W.; REETZ, M. T. Bacterial biocatalist: molecular biology, three dimensional structures and biotechnological applications lipases. **Annual Review of Microbiology**, v. 53, p. 315-351, 1999.

JING, Q.; KAZLAUSKAS, R. J. Determination of absolute configuration of secondary alcohols using lipase-catalyzed kinetic resolutions. **Chirality**, v. 20, p. 724-735, 2008.

JUNTER, G. A.; JOUENNE, T. Immobilized viable microbial cells: from the process to the proteome in leader or the cart before the horse. **Biotechnology Advances**, v. 22, p. 633-658, 2004.

JUSTI, K. C.; LARANJEIRA, M. C. M.; NEVES, A.; MANGRICH, A. S.; FÁVERE, T. V. Chitosan functionalized with 2[-bis-(pyridylmethyl)aminomethyl]4-methyl-6-formyl-phenol: equilibrium and kinetics of copper (II) adsorption. **Polymer**, v. 45, p. 6285-6290, 2004.

KAMAL, A.; SHAIK, A. A.; SANDBHOR, M.; MALIK, M. S. Synthesis of enantiopure β -azidoalcohols from their ketoazides by reduction with NaBH_4 in the presence of alumina and *in situ* lipase resolution. **Tetrahedron: Asymmetry**, v. 15, p. 935-939, 2004.

KAMAL, A.; SHAIK, A. A.; SANDBHOR, M.; MALIK, M. S. Chemoenzymatic synthesis of (R)- and (S)-tembamide, aegeline and denopamine by a one-pot lipase resolution protocol. **Tetrahedron: Asymmetry**, v. 15, p. 3939-3944, 2004.

KATCHALSKI-KATZIR, E.; KRAEMER, D. M. *Eupergit C*, a carrier for immobilization of enzymes of industrial potential. **Journal of Molecular Catalysis**, v. 10, p. 157-176, 2000.

KONOVALOV, A. A. Selection for allelic variants of alcohol-dehydrogenase in inbred lines and hybrids of sugar-beet. **Genetika**, v. 30, p. 945-950, 1994.

KOSHLAND JR., D. E.; NEMÉTHY, G.; FILMER, D. Comparison of experimental binding data and theoretical models in proteins containing subunits. **Biochemistry**, v. 5, p. 365-385, 1966.

- KOURKOUTAS, Y.; MCERLEAN, C.; KANELAKI, M.; HACK, C. J.; MARCHANT, R.; BANAT, I. M.; KOUTINAS, A. A. High-temperature wine making using the thermotolerant yeast strain *Kluyveromyces marxianus* IMB3. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 112, p. 25-35, 2004.
- KRAEMER, T.; MAURER, H. H. Toxicokinetics of amphetamines: metabolism and toxicokinetic data of designer drugs, amphetamine, methamphetamine, and their *N*-alkyl derivatives. **Therapeutic Drug Monitoring**, v. 24, p. 277-289, 2002.
- KRIEGER, N.; BHATNAGAR, T.; BARATTI, J. C.; BARON, A. M.; LIMA, V. M. G.; MITCHELL, D. Non-aqueous biocatalysis in heterogeneous solvent systems. **Food Technology and Biotechnology**, v. 42, p. 279-286, 2004.
- LI, D. R.; HE, A.; FALCK, J. R. Enantioselective, organocatalytic reduction of ketones using bifunctional thiourea-amine catalysts. **Organic Letters**, v. 12, p. 1756-1759, 2010.
- LIESE, A.; SEELBACH, K.; WANDREY, C. **Industrial biotransformations**. New York: Wiley, 2004. 611 p.
- LOU, W. Y.; WANG, W.; SMITH, T. J.; ZONG, M. H. Biocatalytic *anti*-Prelog stereoselective reduction of 4'-methoxyacetophenone to (*R*)-1-(4-methoxyphenyl)ethanol with immobilized *Trigonopsis variabilis* AS2.1611 cells using an ionic liquid-containing medium. **Green Chemistry**, v. 11, p. 1377-1384, 2009.
- LUSTA, K. A.; CHUNG, I. K.; SUL, I. W.; PARK, H. S.; SHIN, D. I. Immobilization of fungus *Aspergillus* sp. by a novel cryogel technique for production of extracellular hydrolytic Enzymes. **Process Biochemistry**, v. 35, p. 1177-1182, 2000.
- MACLEOD, R.; PROSSER, H.; FIKENTSCHER, L.; LANYI, J.; MOSHER, H. S. Asymmetric reductions. XII Stereoselective ketone reductions by fermenting yeast. **Biochemistry**, v. 3, p. 838, 1964.
- MANDAL, D.; AHMAD, A.; KHAN, M. I.; KUMAR, R. J. Enantioselective bioreduction of acetophenone and its analogues by the fungus *Trichothecium* sp. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 27, p. 61-63, 2004.
- MATSUDA, T.; YAMANAKA, R.; NAKAMURA, K. Recent progress in biocatalysis for asymmetric oxidation and reduction. **Tetrahedron: Asymmetry**, v. 20, p. 513-557, 2009.

MAZCZKA, W. K.; MIRONOWICZ, A. Enantioselective reduction of bromo- and methoxy-acetophenone derivatives using carrot and celeriac enzymatic system. **Tetrahedron: Asymmetry**, v. 15, p. 1965-1967, 2004.

MELO, J. O. F.; DONNICI, C. L.; AUGUSTI, R.; FERREIRA, V. F.; SOUZA, M. C. B. V. FERREIRA, M. L. G.; CUNHA A. C. Heterociclos 1,2,3-triazólicos: histórico, métodos de preparação, aplicações e atividades farmacológicas. **Química Nova**, v. 29, p. 569-579, 2006.

MILAGRE, H. M. S.; MILAGRE, C. D. F.; MORAN, P. J. S.; SANTANA, M. H. A.; RODRIGUES, J. A. R. Reduction of ethyl benzoylformate mediated by *Saccharomyces cerevisiae* entrapped in alginate fibers with double gel layers in a continuously operated reactor. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 37, p. 121-125, 2006.

MILLAR, A. A.; OLIVER, M. R.; DENNIS, E. S. The expression and anaerobic induction of alcohol-dehydrogenase in cotton. **Biochemical Genetics**, v. 32, p. 279-300, 1994.

MITCHELL, W. C.; JELENKOVIC, G. Characterizing NAD-dependent and NADP-dependent alcohol-dehydrogenase enzymes of strawberries. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v. 120, p. 798-801, 1995.

MOFFAT, A. C.; JACKSON, J. V.; MOSS, M. S.; NIDDOP, B. **Clarck's isolation and identification of drugs**. London: Pharmaceutical Press, 1986. 349 p.

MORITA, T.; ASSUMPÇÃO, R. M. V. **Manual de soluções, reagentes e solventes**. 2. ed. São Paulo: Edgar Blücher, 1995. 629 p.

MOUAD, A. M.; MARTINS, M. P.; DEBONSI, H. M.; DE OLIVEIRA, A. L. L.; DE FELICIO, R.; YOKOYA, N. S.; FUJII, M. T.; DE MENEZES, C. B. A.; FANTINATTI-GARBOGGINI, F.; PORTO, A. L. M. Bioreduction of acetophenone derivatives by red marine algae *Bostrychia radicans* and *B. Tenella*, and marine bacteria associated. **Helvetica Chimica Acta**, v. 94, p. 1506-1514, 2011.

MUSA, M. M.; ZIEGELMANN-FJELD, K. I.; VIEILLE, C.; ZEIKUS, J. G.; PHILLIPS, R. S. J. Activity and selectivity of W110A secondary alcohol dehydrogenase from *Thermoanaerobacter ethanolicus* in organic solvents and ionic liquids: mono and biphasic media. **Organic Chemistry**, v. 72, p. 30-34, 2007.

NAKAMURA, K.; USHIO, K.; SHINZABURO, O.; OHNO, A. Stereochemical control in yeast reduction. **Tetrahedron Letters**, v. 25, p. 3979-3982, 1984.

NELSON, D. L; COX, M. M. **Lehninger: principles of biochemistry**. 4. ed. New York: Worth Publishers, 2004. 1152 p.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Marine natural products and related compounds in clinical and advanced preclinical trials. **Journal of Natural Products**, v. 67, p. 1216-1238. 2004.

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

PÀMIÉS, O.; BÄCKALL, J-E. Dynamic kinetic resolution of β -azidos alcohols. An efficient route to chiral aziridines and β -amino alcohols. **The Journal of Organic Chemistry**, v. 66, p. 4022-4025, 2001.

PARK, J. K; CHANG, H. N. Microencapsulation of microbial cells. **Biotechnology Advances**, v. 18, p. 303-319, 2000.

PATEL, R. N. Biocatalytic synthesis of chiral intermediates. **Food Technology and Biotechnology**, v. 42, p. 305-325, 2004.

PATEL, R. N.; CHU, L.; MUELLER, R. Diastereoselective microbial reduction of (S)-[3-chloro-2-oxo-1-(phenylmethyl)propyl]carbamic acid, 1,1-dimethylethyl ester. **Tetrahedron: Asymmetry**, v. 14, p. 3105-3109, 2003.

PATONAY, T.; HOFFMAN, R. V. A general and efficient synthesis of α -azido ketones. **The Journal of Organic Chemistry**, v. 59, p. 2902-2905, 1994.

PATONAY, T.; JUHÁSZ-TÓTH, E.; BÉNYEI, A. Base-induced coupling of α -azido ketones with aldehydes 2 an easy and efficient route to trifunctionalized synthons 2-azido-3-hydroxy ketones, **European Journal of Organic Chemistry**, p. 285-295, 2002.

PEREIRA, R. S. Projeto e construção de um bioreator para síntese orgânica assimétrica catalisada por *Saccharomyces cerevisiae*. **Química Nova**, v. 20, p. 551-554, 1997.

PILKINGTON, P. H.; MARGARITIS, A.; MENSOUR, N. A.; RUSSEL, I. Fundamentals of immobilized yeast cells for continuous beer fermentation: A review. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 104, p. 19-31, 1998.

PILLI, R. A. Catálise assimétrica e o prêmio Nobel de química de 2001. Novos paradigmas e aplicações práticas. **Química Nova na Escola**, v. 14, p. 16-24, 2001.

PITT, J. I. **The genus *Penicillium* and its teleomorphic states *Eupenicillium* and *Talaromyces***. London: Academic Press, 1979. 8 p.

PORTO, A. L. M.; CASSIOLA, F.; DIAS, S. L. P.; JOEKES, I.; GUSHIKEM, Y.; RODRIGUES, J. A. R.; MORAN, P. J. S.; MANFIO, G. P.; MARSAIOLI, A. *Aspergillus terreus* CCT 3320 immobilized on chrysotile or cellulose/TiO₂ for sulfide oxidation. **Journal of Molecular Catalysis B**, v. 19-20, p. 327-34, 2004.

PRAJAPATI, D.; GOHAIN, M. Recent advances in the application of supercritical fluids for carbon-carbon bond formation in organic synthesis. **Tetrahedron**, v. 60, p. 815-833, 2004.

PRASAD, K. K.; MOHAN, S. V.; BHASKAR, Y. V.; RAMANAIAH, S. V.; BABU, V. L.; PATI, B. R.; SARMA, P. N. Laccase production using *Pleurotus ostreatus* 1804 immobilized on PUF cubes in batch and packed bed reactors: influence of culture conditions. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, p. 301-307, 2005.

QUEZADA, M. A.; CARBALLEIRA, J. D.; SINISTERRA, J. V. Monascus kaoliang CBS 302.78 immobilized in polyurethane foam using iso-propanol co-substrate: Optimized immobilization conditions of a fungus as biocatalyst for the reduction of ketones. **Bioresource Technology**, v. 100, p. 2018-2025, 2009.

RAYNER, C. M. The potential of carbon dioxide in synthetic organic chemistry. **Organic Process Research & Development**, v. 11, p. 121-132, 2007.

REZENDE, C. M. Vladimir Prelog e a esterequímica das moléculas orgânicas - um centenário de nascimento. **Química Nova**, v. 30, p. 1046-1053, 2007.

ROCHA, L. C.; FERREIRA, H. V.; PIMENTA, E. F.; BERLINCK, R. G. S.; SELEGHIM, M. H. R.; JAVAROTI, D. C. D.; SETTE, L. D.; BONUGLI, R. C.; PORTO, A. L. M. Bioreduction of α -chloroacetophenone by whole cells of marine fungi. **Biotechnology Letters**, v. 31, p. 1559-1563, 2009.

ROCHA, L. C.; LUIZ, R. F.; ROSSET, I. G.; RAMINELLI, C.; SELEGHIM, M. H. R.; SETTE, L.D.; PORTO, A. L. M. Bioconversion of Iodoacetophenones by Marine Fungi. **Marine Biotechnology**, v. 14, p. 396-401, 2012.

ROCHA, L. C.; ROSSET, I. G.; LUIZ, R. F.; RAMINELLI, C.; PORTO, A. L. M. Kinetic resolution of iodophenylethanols by *Candida antarctica* lipase and their application for the synthesis of chiral biphenyl compounds. **Tetrahedron: Asymmetry**, v. 21, p. 926-929, 2010.

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

RUSCH, D. B.; HALPERN, A. L.; SUTTON, G.; HEIDELBERG, K. B.; WILLIAMSON, S.; YOOSEPH, S.; WU, D.; EISEN, J. A.; HOFFMAN, J. M.; REMINGTON, K.; BEESON, K.; TRAN, B.; SMITH, H.; BADEN-TILLSON, H.; STEWART, C.; THORPE, J.; FREEMAN, J.; ANDREWS-PFANNKUCH, C.; VENTER, J. E.; LI, K.; KRAVITZ, S.; HEIDELBERG, J. F.; UTTERBACK, T.; ROGERS, Y-H.; FALCÓN, L. I.; SOUZA, V.; BONILLA-ROSSO, G.; EGUIARTE, L. E.; KARL, D. M.; SATHYENDRANATH, S.; PLATT, T.; BERMINGHAM, E.; GALLARDO, V.; TAMAYO-CASTILLO, G.; FERRARI, M. R.; STRAUSBERG, R. L.; NEALSON, K.; FRIEDMAN, R.; FRAZIER, M.; VENTER, J. C. The sorcerer II global ocean sampling expedition: Northwest atlantic through eastern tropical pacific. **PLoS Biology**, v. 5, p. 398-431, 2007.

SALAS, J. J.; SANCHEZ, J. Alcohol dehydrogenases from olive (*Olea europaea*) fruit. **Phytochemistry**, v. 48, p. 35-40, 1998.

SAMSON, R. A.; HOEKSTRA E. S.; FRISVAD, J. C.; FILTENBORG, O. **Introduction to food- and airborne fungi**. 6th ed. Utrecht: Centraalbureau voor Schimmelcultures, 2002. p. 321-331.

SAN-MARTÍN, A.; ROVIROSA, J.; ASTUDILLO, L.; SEPÚLVEDA, B.; RUIZ, D.; SAN-MARTÍN, C. Biotransformation of the marine sesquiterpene pacifenol by a facultative marine fungus. **Natural Product Research**, v. 22, p. 1627-1632, 2008.

SANTOS, R. C. B.; DURRANT, L. R.; SILVA, M.; SETTE, L. D. Production of laccase, manganese peroxidase and lignin peroxidase by Brazilian marine-derived fungi. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 46, p. 32-37, 2010.

SEDARATI, M. R.; KESHAVARZ, T.; LEONTIEVSKY, A. A.; EVANS, C. S. Transformation of high concentrations of chlorophenols by the white-rot basidiomycete *Trametes versicolor* immobilized on nylon mesh. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 6, p. 104-114, 2003.

SHI, F.; WALDO, J. P.; CHEN, Y.; LAROCK, R. C. Benzyne click chemistry: synthesis of benzotriazoles from benzyne and azides. **Organic Letters**, v. 10, p. 2409-2412, 2008.

SHIM, S. S.; KAWAMOTO, K. Enzyme production activity of *Phanerochaete chrysosporium* and degradation of pentachlorophenol in a bioreactor. **Water Research**, v. 36, p. 4445-4454, 2002.

SILVERMAN, R. B. **The organic chemistry of enzyme-catalyzed reactions**. San Diego: Academic Press, 2000. 717 p.

SMITH, P. T.; COBB, B. G. Physiological and enzymatic activity of pepper seeds (*Capsicum annuum*) during priming. **Physiologia Plantarum**, v. 82, p. 433-439, 1991.

SONI P.; BANERJEE, U. C. Enantioselective reduction of acetophenone and its derivatives with a new yeast isolate *Candida tropicalis* PBR-2 MTCC 5158. **Biotechnology Journal**, v. 1, p. 80-85, 2006.

SPELBERG, J. H. L.; VLIEG, J. E. T. V. H.; TANG, L.; JANSSEN, D. B.; KELLOGG, R. M. Highly enantioselective and regioselective biocatalytic azidolysis of aromatic epoxides. **Organic Letters**, v. 3, p. 41-43, 2001.

STRAUSS, U. T.; FELFER, U.; FABER, K. Biocatalytic transformation of racemates into chiral building blocks in 100% chemical yield and 100% enantiomeric excess. **Tetrahedron: Asymmetry**, v. 10, p. 107-117, 1999.

TANG, S. L.; CHANG, H. H. Studies on the flooding tolerance during seed-germination of soybean (*Glycine-max* (L.) Merrill). II. Relationship between ADH activity, ethanol accumulation and flooding tolerance. **Journal of the Agricultural Association of China**, v. 22, p. 150, 1990.

TANIS, S. P.; EVANS, B. R.; NIEMAN, J. A.; PARKER, T. T.; TAYLOR, W. D.; HEASLEY, S. E.; HERRINTON, P. M.; PERRAULT, W. R.; HOHLER, R. A.; DOLAK, L. A.; HESTER, M. R.; SEEST, E. P. Solvent and in situ catalyst preparation impacts upon Noyori reductions of aryl-chloromethyl ketones: application to syntheses of chiral 2-amino-1-aryl-ethanols. **Tetrahedron: Asymmetry**, v. 17, p. 2154-2182, 2006.

TESTA, B.; BOJARSKI, A. J. Molecules as complex adaptative systems: Constrained molecular properties and their biochemical significance. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 11, Suppl. 2, p. S3-14, 2000.

TORRES, A. M. Genetics of sunflower seed alcohol-dehydrogenase. **Genetics**, v. 77, p. 65, 1974.

TRINCONI, A. Marine Biocatalysts: Enzymatic Features and Applications. **Marine Drugs**, v. 9, p. 478-499, 2011.

URGEL, A. L.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. **Biotecnologia industrial**: Processos fermentativos e enzimáticos. São Paulo: Edgard Blucher, 2001. 391 p.

VEBERLEN, P. J.; DE SCHUTTER, D. P.; DELVAUX, F.; VERSTREPEN, K. J.; DELVAU, F. R. Immobilized yeast cell systems for continuous fermentation applications. **Biotechnology Letters**, v. 28, p. 1515-1525, 2006.

VERLI, H.; BARREIRO, E. Um paradigma da química medicinal: a flexibilidade dos ligantes e receptores. **Química Nova**, v. 28, p. 95-102, 2005.

VIEIRA, G. A. B.; ARAUJO, D. M. F.; LEMOS, T. L. G.; MATTOS, M. C.; OLIVEIRA, M. C. F.; MELO, V. M. M.; GONZALO, G.; GOTOR-FERNÁNDEZ, V.; GOTOR, V. *Candida tropicalis* CE017: a New Brazilian enzymatic source for the bioreduction of aromatic prochiral ketones. **Journal of Brazilian Chemistry Society**, v. 21, p. 1509-1516, 2010.

WALSH, P. K.; MALONE, D. M. Cell growth patterns in immobilization matrices. **Biotechnology Advances**, v. 13, p. 13-43, 1995.

WANG, L.; RIDGWAY, D.; GU, T.; MOO-YOUNG, M. Bioprocessing strategies to improve heterologous protein production in filamentous fungal fermentations. **Biotechnology Advances**, v. 23, p. 115-129, 2005.

WANG, Y.; LIU, D.; MENG, Q.; ZHANG, W. Asymmetric hydrogenation of simple ketones with planar chiral ruthenocenyl phosphinoxazoline ligands. **Tetrahedron: Asymmetry**, v. 20, p. 2510-2512, 2009.

WONG, C. H.; WHITESIDES, G. M. **Enzymes in synthetic organic chemistry**. New York: Elsevier Science, 1994. p. 131-150.

XU, Y. A.; DOCHERTY, A. G. F.; WOODWARD, G.; WILLIS, M. Ru(II) complexes of cyclohexane diamine and monodentate phosphorus ligands for asymmetric ketone hydrogenation.

Tetrahedron: Asymmetry, v. 17, p. 2925-2929, 2005.

YANG, W.; XU, J.-H.; XIE, Y.; XU, Y.; ZHAO, G.; LIN, G.-Q. Asymmetric reduction of ketones by employing *Rhodotorula* sp. AS2.2241 and synthesis of the β -blocker (*R*)-nifenalol.

Tetrahedron: Asymmetry, v. 17, p. 1769-1774, 2006.

YONGXIAN, F.; ZHANGMING, X.; HUAWEI, Z.; JUNQING, Q. Kinetic resolution of both 1-phenylethanol enantiomers produced by hydrolysis of 1-phenylethyl acetate with *Candida antarctica* lipase B in different solvent systems. **Kinetics and Catalysis**, v. 52, p. 686-690, 2011.

ZARSKY, V.; CHOMATOVA, S.; TUPY, J. Alcohol-dehydrogenase isoenzymes from *Nicotiana tabacum* include ADH of both *N. sylvestris* and *N. tomentosiformis*. **Biologia Plantarum**, v. 36, p. 53-57, 1994.

ZHANG, L.-H.; BAI, C.-H.; WANG, Y.-S.; JIANG, Y.-C.; HU, M.-C.; LI, S.-N.; ZHAI, Q.-G. Improvement of chloroperoxidase stability by covalent immobilization on chitosan membranes. **Biotechnology Letters**, v. 31, p. 1269-1272, 2009.

ZHENG, Z.; OBBARD, J. P. Polycyclic aromatic hydrocarbon removal from soil by surfactant solubilization and *Phanerochaete chrysosporium* oxidation. **Journal of Environmental Quality**, v. 31, p. 1842-1847, 2002.

Espectro de RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3) do 2-azido-1-feniletanona (13) **Espectro de absorção no infravermelho do 2-azido-1-feniletanona (13)**

Espectro de RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3) do 2-azido-1-(4-metoxifenil)etanona (**14**) Espectro de absorção no infravermelho do 2-azido-1-(4-metoxifenil)etanona (**14**)

Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) do 2-azido-1-(4-bromofenil)etanona (15)

Espectro de absorção no infravermelho do 2-azido-1-(4-bromofenil)etanona (15)

Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) do 2-azido-1-(4-nitrofenil)etanona (**16**) Espectro de absorção no infravermelho do 2-azido-1-(4-nitrofenil)etanona (**16**)

Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) do 2-azido-1-(4-clorofenil)etanona (17)

Espectro de absorção no infravermelho do 2-azido-1-(4-clorofenil)etanona (17)

Espectro de RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3) do 1-(4-metoxifenil)etanol (1a) Espectro de RMN de ^{13}C (50 MHz, CDCl_3) do 1-(4-metoxifenil)etanol (1a)

Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) do 1-(2-iodofenil)etanol (2a) Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) do 1-(2-iodofenil)etanol (2a)

Espectro de absorção no infravermelho do 1-(2-iodofenil)etanol (2a)

Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) do 1-(3-iodofenil)ethanol (3a) Espectro de RMN de ^{13}C (50 MHz, CDCl_3) do 1-(3-iodofenil)ethanol (3a)

Espectro de absorção no infravermelho do 1-(3-iodofenil)etanol (3a)

Espectro de massas de alta resolução do 1-(3-iodofenil)etanol (3a)

Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) do 1-(4-iodofenil)etanol (4a) Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) do 1-(4-iodofenil)etanol (4a)

Espectro de RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3) do 4-(1-hidroxietil)-2-iodofenol (5a)

Espectro de absorção no infravermelho do 2-cloro-1-feniletanol (7a)

Espectro de RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3) do 2-azido-1-feniletanol (13a) Espectro de RMN de ^{13}C (50 MHz, CDCl_3) do 2-azido-1-feniletanol (13a)

Espectro de RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3) do 2-azido-1-(4-metoxifenil)etanol (**14a**) Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) do 2-azido-1-(4-metoxifenil)etanol (**14a**)

Espectro de RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3) do 2-azido-1-(4-bromofenil)etanol (**15a**) Espectro de RMN de ^{13}C (50 MHz, CDCl_3) do 2-azido-1-(4-bromofenil)etanol (**15a**)

Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) do 2-azido-1-(4-nitrofenil)etanol (16a) Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) do 2-azido-1-(4-nitrofenil)etanol (16a)

Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) do 2-azido-1-(4-clorofenil)etanol (**17a**) Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) do 2-azido-1-(4-clorofenil)etanol (**17a**)

Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) do acetato de 1-(2-iodofenil)etila (**2b**) Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) do acetato de 1-(2-iodofenil)etila (**2b**)

Espectro de RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3) do acetato de 1-(3-iodofenil)etila (3b) Espectro de RMN de ^{13}C (50 MHz, CDCl_3) do acetato de 1-(3-iodofenil)etila (3b)

Espectro de massas de alta resolução do acetato de 1(3-iodofenil)etila (3b)

Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) do acetato de 1-(4-iodofenil)etila (4b) Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) do acetato de 1-(4-iodofenil)etila (4b)

Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) do acetato de 2-azido-1-feniletila (**13b**) Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) do acetato de 2-azido-1-feniletila (**13b**)

Espectro de RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3) do acetato de 2-azido-1-(4-metoxifenil)etila (**14b**) Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) do acetato de 2-azido-1-(4-metoxifenil)etila (**14b**)

Espectro de absorção no infravermelho do acetato de 2-azido-1-(4-metoxifenil)etila (14b)

Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) do acetato de 2-azido-1-(4-bromofenil)etila (**15b**) Espectro de absorção no infravermelho do acetato de 2-azido-1-(4-bromofenil)etila (**15b**)

Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) do acetato de 2-azido-1-(clorofenil)etila (17b)

Espectro de absorção no infravermelho do acetato de 2-azido-1-(4-clorofenil)etila (17b)

Espectro de RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3) do 1-(bifenil-3-il)etanol (3c) Espectro de RMN de ^{13}C (50 MHz, CDCl_3) do 1-(bifenil-3-il)etanol (3c)

Espectro de absorção no infravermelho do 1-(bifenil-4-il)etanol (3c)

Espectro de massas de alta resolução do 1-(bifenil-4-il)etanol (3b)

Espectro de RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3) do 1-(bifenil-4-il)etanol (4c) Espectro de RMN de ^{13}C (50 MHz, CDCl_3) do 1-(bifenil-4-il)etanol (4c)

Espectro de absorção no infravermelho do 1-(bifenil-4-il)etanol (4c)

Espectro de absorção no infravermelho do bromo-triazol 20

Espectro de absorção no infravermelho do cloro-triazol 22

Espectro de massas de alta resolução do triazol 18

Espectro de massas de alta resolução do metoxi triazol 19

Espectro de massas de alta resolução do bromo triazol 20

Lenilson Triazol R=Br_120913181354 #1 RT: 0.00 AV: 1 NL: 1.93E7
T: FTMS + p ESI Full ms [100.00-800.00]

Lenilson Triazol R=Br_120913181354 #1 RT: 0.00 AV: 1 NL: 1.93E7
T: FTMS + p ESI Full ms [100.00-800.00]

Espectro de massas de alta resolução_do nitro triazol 21

Espectro de massas de alta resolução do cloro triazol 22

Lenilson Triazol R=Cl_120913181354 #1 RT: 0.00 AV: 1 NL: 2.13E7
T: FTMS + p ESI Full ms [100.00-700.00]

Lenilson Triazol R=Cl_120913181354 #1 RT: 0.00 AV: 1 NL: 2.13E7
T: FTMS + p ESI Full ms [100.00-700.00]

Biotechnol Lett (2009) 31:1559–1563
DOI 10.1007/s10529-009-0037-y

ORIGINAL RESEARCH PAPER

Bioreduction of α -chloroacetophenone by whole cells of marine fungi

Lenilson C. Rocha · Hercules V. Ferreira · Eli F. Pimenta ·
Roberto G. S. Berlinck · Mirna H. R. Seleguim · Darci C. D. Javaroti ·
Lara D. Sette · Rafaella C. Bonugli · André L. M. Porto

Received: 27 February 2009 / Revised: 18 May 2009 / Accepted: 19 May 2009 / Published online: 3 June 2009
© Springer Science+Business Media B.V. 2009

Abstract The asymmetric reduction of 2-chloro-1-phenylethanone (**1**) by seven strains of marine fungi was evaluated and afforded (*S*)-(-)-2-chloro-1-phenylethanol with, in the best case, an enantiomeric excess of 50% and an isolated yield of 60%. The ability of marine fungi to catalyse the reduction was directly dependent on growth in artificial sea water-based medium containing a high concentration of Cl^- (1.2 M). When fungi were grown in the absence of artificial sea water, no reduction of **1** by whole cells was observed. The biocatalytic reduction of **1** was more efficient at neutral rather than acidic pH values and in the absence of glucose as co-substrate.

Electronic supplementary material The online version of this article (doi:10.1007/s10529-009-0037-y) contains supplementary material, which is available to authorized users.

L. C. Rocha · H. V. Ferreira · E. F. Pimenta ·
R. G. S. Berlinck · A. L. M. Porto (✉)
Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São
Paulo, Av. Trabalhador São-carlense, 400, CP 780,
São Carlos, SP CEP 13560-970, Brazil
e-mail: alporto@iqsc.usp.br

M. H. R. Seleguim · D. C. D. Javaroti
Departamento de Ecologia e Biologia Evolutiva,
Universidade Federal de São Carlos, Via Washington
Luis, Km 235, São Carlos, SP CEP 13565-905, Brazil

L. D. Sette · R. C. Bonugli
Divisão de Recursos Microbianos, Centro Pluridisciplinar
de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas, CPQBA,
Universidade Estadual de Campinas, Rua Alexandre
Casellato, 999, Paulínia, SP CEP 13140-000, Brazil

Keywords Biocatalysis · Bioreduction ·
Chlorohydrin · Marine fungi

Introduction

The biocatalytic asymmetric reduction of α -haloketones represents a potentially useful method for the preparation of chiral halohydrins (De Carvalho et al. 1991; Barbieri et al. 2001), which are important intermediates in the synthesis of numerous compounds of biological interest (Barbieri et al. 2001; Wei et al. 1998). Many microbial-derived biocatalysts, including isolated enzymes and whole cells, may be considered as candidates for the reduction of ketones in the synthesis of enantiomerically pure alcohols of industrial interest (Pollard and Woodley 2006). However, an ideal biocatalyst should exhibit high enantioselectivity and conversion yield (Chartrain et al. 2001) and, at the same time, the reaction protocol should be simple and cheap. Reductions employing isolated reductases typically require the presence of significant amounts of expensive cofactors, such as NADH/NADPH, and in situ recycling is necessary (Itoh et al. 2002; Zhao and van der Donk 2003; Groger et al. 2004). On an industrial scale, therefore, the use of whole cells as the biocatalyst is usually preferred in order to reduce costs and to overcome the problem of cofactor regeneration (Amidjojo and Weuster-Botz 2005; Zhu et al. 2005).

Mar Biotechnol (2010) 12:552–557
DOI 10.1007/s10126-009-9241-y

ORIGINAL ARTICLE

Biotransformation of α -Bromoacetophenones by the Marine Fungus *Aspergillus sydowii*

Lenilson Coutinho Rocha · Hercules Vicente Ferreira · Eli Fernando Pimenta · Roberto Gomes Souza Berlinck · Maria Olímpia Oliveira Rezende · Maria Diva Landgraf · Mirna Helena Regali Seleglim · Lara Durães Sette · André Luiz Meleiro Porto

Received: 26 November 2008 / Accepted: 28 September 2009 / Published online: 27 November 2009
© Springer Science+Business Media, LLC 2009

Abstract The biotransformation reactions of α -bromoacetophenone (**1**), *p*-bromo- α -bromoacetophenone (**2**), and *p*-nitro- α -bromoacetophenone (**3**) by whole cells of the marine fungus *Aspergillus sydowii* Ce19 have been investigated. Fungal cells that had been grown in artificial sea water medium containing a high concentration of chloride ions (1.20 M) catalysed the biotransformation of **1** to 2-bromo-1-phenylethanol **4** (56%), together with the α -chlorohydrin **7** (9%), 1-phenylethan-1,2-diol **9** (26%), acetophenone **10** (4%) and phenylethanol **11** (5%) identified by GC-MS analysis. In addition, it was observed that the enzymatic reaction was accompanied by the spontaneous debromination of **1** to yield α -chloroacetophenone **5** (9%) and α -hydroxyacetophenone **6** (18%) identified by GC-FID analysis. When **2** and **3** were employed as substrates, various biotransformation products were detected but the formation

of halohydrins was not observed. It is concluded that marine fungus *A. sydowii* Ce19 presents potential for the biotransformations of bromoacetophenone derivatives.

Keywords Marine fungus · *Aspergillus sydowii* · α -Bromoacetophenone · Biotransformation

Introduction

Halohydrins are valuable intermediates in the synthesis of various important pharmaceutical products, including β -receptor agonists and bronchodilators (Patel et al. 1998; Wei et al. 1998; Antunes et al. 2004; Lagos et al. 2004; Zhu et al. 2005), and novel methods for their preparation are of considerable interest. In this context, a number of reports have recently become available concerning the application of biocatalysts, especially in the form of whole cells of microorganisms, to the reduction of ketones to yield chiral alcohols with high enantioselectivity (Goswami et al. 2000, 2001; Chartrain et al. 2002; Rodrigues et al. 2004; Goldberg et al. 2007). Although the microbial reduction of prochiral acetophenone-derivatives generally affords alcohols in good yield, the stereochemical course of the reaction may be influenced by the group linked to the carbonyl group as well as by selective oxidation of the alcohol formed or by selective reduction of the prochiral ketone.

Few studies have been carried out relating to enzymatic methods for the asymmetric reduction of α -haloketones, and in most cases the enantioselectivity of the reaction was found to be modest. Thus, α -bromoacetophenone was reduced to (*R*)-2-bromo-1-phenylethanol by *Rhodotorula rubra* in a moderate yield of 70% and with 61% enantiomeric excess (ee; De Carvalho et al. 1991).

L. C. Rocha · H. V. Ferreira · E. F. Pimenta · R. G. S. Berlinck · M. O. O. Rezende · M. D. Landgraf · A. L. M. Porto (✉)
Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, Av. Trabalhador, São-carlense, 400, CEP 13560-970, CP 780 São Carlos, SP, Brazil
e-mail: almparto@iqsc.usp.br

M. H. R. Seleglim
Departamento de Ecologia e Biologia Evolutiva, Universidade Federal de São Carlos, Via Washington Luís, Km 235, CEP 13565-905, São Carlos, SP, Brazil

L. D. Sette
Recursos de Divisão Microbianos, Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas, CPQBA, Universidade Estadual de Campinas, Rua Alexandre Casellato, 999, CEP 13140-000, Paulínia, SP, Brazil

J. Iran. Chem. Soc., Vol. 7, No. 4, December 2010, pp. 883-889.

JOURNAL OF THE
Iranian
Chemical Society

Enzymatic Resolution of Racemic Sulcatol by Lipase from *Candida Antarctica* in a Large Scale

H.V. Ferreira^a, L.C. Rocha^a, R.P. Severino^{a,b}, R.B. Viana^a, A.B.F. da Silva^a and A.L.M. Porto^{a,*}

^a*Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, Av. Trabalhador São-carlense, 400, CEP 13560-970, São Carlos, SP, Brazil*

^b*Departamento de Química, Universidade Federal de Goiás, Campus Avançado de Catalão, Av. Dr. Lamartine Pinto de Avelar, 1120, 75704-020, Catalão, GO, Brazil*

(Received 10 July 2009, Accepted 29 January 2010)

Large scale enzymatic resolution of racemic sulcatol **2** has been useful for stereoselective biocatalysis. This reaction was fast and selective, using vinyl acetate as donor of acyl group and lipase from *Candida antarctica* (CALB) as catalyst. The large scale reaction (5.0 g, 39 mmol) afforded high optical purities for *S*-(+)-sulcatol **2** and *R*-(+)-sulcatyl acetate **3**, i.e., *ee* > 99 per cent and good yields (45 per cent) within a short time (40 min). Thermodynamic parameters for the chemoesterification of sulcatol **2** by vinyl acetate were evaluated. The enthalpy and Gibbs free energy values of this reaction were negative, indicating that this process is exothermic and spontaneous which is in agreement with the reaction obtained enzymatically.

Keywords: Enzymatic resolution, Lipase, *Candida antarctica*, Sulcatol, Biocatalysis

INTRODUCTION

Natural sulcatol **2** is a male aggregation pheromone of the ambrosia beetle, *Gnathotrichus sulcatus*. The enantiomeric composition of the natural chiral pheromone was determined by NMR spectroscopy as 30 percent *ee* for (*S*)-(+)-sulcatol **2**. Both enantiomers are required for bioactivity. Enantiopure (*S*)- and (*R*)-sulcatol **2** are not bioactives, and the racemic mixture of sulcatol **2** was more active than the natural pheromone [1]. The bioactivity of many chiral compounds depends on the main composition of one of the enantiomers. Therefore, methods to synthesize pure enantiomers are constantly required. At present, biocatalysis is an important methodology for the synthesis of enantiomerically pure compounds [2-5]. Several enzymatic methodologies for the synthesis of sulcatol

2 using lipases are described in the literature. For example: lipase PS from *Pseudomonas cepacia* (*E* = 10-101) [6] and (*E* = 26-101) [7], *Pseudomonas* sp. (*E* = 27-29) [8], lipase Amano PS (*E* = 11-38) [9-10], lipase PPL from *Pseudomonas* sp. (*E* = 32-44) [11], lipase PPL Sigma (*E* = 17-62) [12], lipase PPL Sigma [(*S*)-sulcatol **2** (*ee* > 98 per cent) and (*R*)-sulcatol **2** (*ee* > 61 per cent)] [13], lipase PPL (*E* = 19-100) [14], lipase from *Burkholderia cepacia*-Amano PS (*E* = 29 -40) [15], lipase from *Nigella sativa* (*E* = 2.9-4.1) [16].

Enzyme catalyzed esterifications of sulcatol **2** afforded good or modest selectivities by using various groups of acyl donors in different solvents and experimental conditions. A convenient enzymatic kinetic resolution using CALB was obtained for sulcatol **2** on a small scale, using *i*-Pr₂O as solvent for 5 h (*E* = 183) [17].

Enzymatic hydrolysis of (±)-sulcatyl acetate **3** by lipase Novozyme 435 produced sulcatol in high excess (*ee* > 99

*Corresponding author. E-mail: alimporto@iqsc.usp.br

Tetrahedron: Asymmetry 21 (2010) 926–929

Contents lists available at ScienceDirect

Tetrahedron: Asymmetry

journal homepage: www.elsevier.com/locate/tetasy

Kinetic resolution of iodophenylethanols by *Candida antarctica* lipase and their application for the synthesis of chiral biphenyl compounds

Lenilson C. Rocha^a, Isac G. Rosset^a, Rodrigo F. Luiz^a, Cristiano Raminelli^b, André L. M. Porto^{a,*}^a Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, Av. Trabalhador São-carlense, 400, CEP 13560-970, São Carlos, SP, Brazil^b Faculdade de Ciências Exatas e Tecnologia, Universidade Federal da Grande Dourados, Rodovia Dourados-Itahum, Km 12, CEP 79804-970, Dourados, MS, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 31 March 2010

Accepted 11 May 2010

Available online 22 June 2010

ABSTRACT

The kinetic resolution of (±)-iodophenylethanols was carried out using lipase from *Candida antarctica* and in some cases the enantiomeric excesses were high (up to >98%). Enantiomerically enriched (S)-iodophenylethanols produced by the enzymatic resolution process were used in the synthesis of chiral biphenyl compounds by the Suzuki reaction with good yields (63–65%).

© 2010 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

The synthesis of enantiomerically pure drugs has been a great challenge in both academia and the pharmaceutical industry.¹ In this scenario, chiral alcohols have emerged as important building blocks for the synthesis of optically active compounds,² including biologically active compounds, due to the ease of access to their frameworks by a number of methods including, for example, the addition of the organometallics to aldehydes in the presence of chiral ligands,³ the catalytic asymmetric hydrogenation of prochiral ketones,⁴ and organocatalyzed direct asymmetric aldol reactions.⁵ In addition to these methods to produce chiral secondary alcohols, biocatalyzed transformations have arisen as advantageous alternatives.^{6,7} In this context, we mention the microbial reduction of prochiral ketones⁵ and the enzymatic kinetic resolution of secondary alcohols as important means of obtaining enantiopure alcohols.⁶ These methods are attractive because they employ simple and low cost procedures, which are environmentally friendly and produce a broad range of enantiomerically enriched alcohols.^{6,7} All these advantages led us to become interested in this area in which we have reported kinetic resolutions of secondary alcohols by *Candida antarctica* lipase⁸ and bioreductions of aromatic ketones using microbial cells.⁹ Herein, we report the first kinetic resolution of (±)-iodophenylethanols using immobilized CALB lipase (Novozym 435®) and the application of the enantiomerically enriched (S)-alcohols obtained in the preparation of chiral biphenyl compounds by the Suzuki cross-coupling reaction. The chiral biphenyl compounds produced can be considered versatile intermediates in organic synthesis which may be employed in the preparation of biologically active substances.¹⁰

2. Results and discussion

Initially, we accomplished the reactions of (±)-iodophenylethanols **1–3** with vinyl acetate and *C. antarctica* lipase in hexane at 32 °C and 130 rpm to obtain enantiomerically enriched (S)-iodophenylethanols **1–3** and (R)-iodophenyl acetates **4–6** (Table 1).

The results depicted in Table 1 show that the use of hexane as the solvent produced the enzymatic resolution of (±)-iodophenylethanols **2–3** in short reaction times. In these cases, (S)-alcohols **2–3** and (R)-acetates **5–6** were produced with high enantiomeric excess (>98% ee) and in good isolated yields (41–46%). Consequently, these enzymatic resolutions presented high enantiomeric rate values (*E* >200). On the other hand, when the (±)-iodophenylethanol **1** was treated with vinyl acetate and immobilized CALB lipase, (R)-acetate **4** was obtained with >98% enantiomeric excess in only 25% of conversion after 24 h (Table 1). Presumably the *ortho*-iodo substituent bonded the (±)-iodophenylethanol **1** aromatic ring and hindered the transesterification reaction promoted by the lipase (Table 1).

Analyses using gas chromatography with a chiral stationary phase for the enzymatic resolution of (±)-iodophenylethanols **1–3** in the presence of vinyl acetate and *C. antarctica* lipase were performed. The enantiomers of (±)-iodophenylethanol **2** could not be separated by gas chromatography with chiral stationary phase. Thus, the enantiomeric excess of the (S)-alcohol **2** produced by kinetic resolution employing immobilized CALB lipase was determined by chiral separation of its corresponding acetate (>98% ee) obtained using acetic anhydride in pyridine.¹³

After determining the absolute configurations of the (S)-alcohols **1** and **3** by comparing their specific rotation values with values reported in the literature,^{12,13} we could conclude that the immobilized *C. antarctica* lipase has stereochemical preference for (R)-alcohol esterification. The preparation of enantiomerically enriched (S)-iodophenylethanol **2** and (R)-iodophenyl acetates **5** and **6** is described

* Corresponding author. Tel.: +55 16 3373 8103; fax: +55 16 3373 9952.
E-mail address: alporto@iqsc.usp.br (A.L.M. Porto).

Mar Biotechnol (2012) 14:358–362
DOI 10.1007/s10126-011-9419-y

ORIGINAL ARTICLE

Stereoselective Bioreduction of 1-(4-Methoxyphenyl)ethanone by Whole Cells of Marine-Derived Fungi

Lenilson C. Rocha · Hercules V. Ferreira ·
Rodrigo F. Luiz · Lara D. Sette · André L. M. Porto

Received: 15 April 2011 / Accepted: 30 October 2011 / Published online: 13 December 2011
© Springer Science+Business Media, LLC 2011

Abstract Nine strains of marine-derived fungi (*Aspergillus sydowii* Ce15, *A. sydowii* Ce19, *Aspergillus sclerotiorum* CBMAI 849, *Bionectria* sp. Ce5, *Beauveria felina* CBMAI 738, *Cladosporium cladosporioides* CBMAI 857, *Mucor racemosus* CBMAI 847, *Penicillium citrinum* CBMAI 1186, and *Penicillium miczynskii* Gc5) were screened, catalyzing the asymmetric bioreduction of 1-(4-methoxyphenyl)ethanone **1** to its corresponding 1-(4-methoxyphenyl)ethanol **2**. *A. sydowii* Ce15 and *Bionectria* sp. Ce5 produced the enantiopure (*R*)-alcohol **2** (>99% *ee*) in accordance with the anti-Prelog rule and, the fungi *B. felina* CBMAI 738 (>99% *ee*) and *P. citrinum* CBMAI 1186 (69% *ee*) in accordance with the Prelog rule. Stereoselective bioreduction by whole cells of marine-derived fungi described by us is important for the production of new reductases from marine-derived fungi.

Keywords Bioreduction · Marine-derived fungi · Ketone · Biocatalysis · Prelog · Anti-Prelog

Introduction

The production of chiral compounds in the form of pure enantiomers is of ever increasing importance to the chemical

industry. Factors such as production costs, biological activity and regulatory issues have led to a growing demand for chiral pharmaceuticals (Matsuda et al. 2009; Wang et al. 2009). The technique using new enzymes from microorganisms is currently established as a useful tool in the production of intermediates by fine chemical processes (Valdez-Blanco and Linvingston 2009; Abas et al. 2010). For example, the (*R*)-1-(4-methoxyphenyl)ethanol can be employed for the syntheses of (*S*)-(4-methoxyphenyl)-butanoic acid (Hillier et al. 2004). Biocatalysts, both isolated enzymes and whole-cell systems, are increasingly being used to assist in synthetic routes to complex molecules of industrial interest (Pollard and Woodley 2006). In this context, the study of enzyme production by microorganisms is very important for applied biotechnology (Santos et al. 2010). The major advantage of using whole living cells relative to isolated biocatalysts is that the cells can regenerate their own cofactors. In addition, whole cells are often easy to produce and are relatively inexpensive. However, one disadvantage of using whole cells is that the volume efficiency of the reaction may be low and the reactions also frequently produce low yields (Alanvert et al. 2009; Kroutil et al. 2004). The use of whole cells from microorganisms has shown to be an important source of the new enzymes for the reduction of carbonylated compounds (Kratzer et al. 2008).

The sea presents a comprehensive biodiversity that is interconnected between the terrestrial biomes, and constitute the most of the biosphere, covering more 75% of the terrestrial surface. The primary source of marine enzymes can be considered the general category of marine microorganisms including symbiotic, deep sea microorganisms and extremophiles for the use in biocatalytic processes, reported almost a decade ago (Bustard et al. 2000). In this context, several microorganisms have been isolated and identified from sponges, algae, and oceanic sediments. However, the use

L. C. Rocha · H. V. Ferreira · R. F. Luiz · A. L. M. Porto (✉)
Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo,
Av. Trabalhador São-carlense, 400,
CEP 13560-970CP 780, São Carlos, São Paulo, Brazil
e-mail: almporto@iqsc.usp.br

L. D. Sette
Divisão de Recursos Microbianos, Centro Pluridisciplinar de
Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas, CPQBA,
Universidade Estadual de Campinas,
Rua Alexandre Casellato, 999,
Paulínia, São Paulo CEP 13140-000, Brazil

Mar Biotechnol (2012) 14:396–401
DOI 10.1007/s10126-012-9463-2

ORIGINAL ARTICLE

Bioconversion of Iodoacetophenones by Marine Fungi

Lenilson C. Rocha · Rodrigo F. Luiz · Isac G. Rosset ·
Cristiano Raminelli · Mirna H. R. Seleguim ·
Lara Durães Sette · André L. M. Porto

Received: 15 April 2011 / Accepted: 30 October 2011 / Published online: 1 June 2012
© Springer Science+Business Media, LLC 2012

Abstract Nine marine fungi (*Aspergillus sclerotiorum* CBMAI 849, *Aspergillus sydowii* Ce19, *Beauveria felina* CBMAI 738, *Mucor racemosus* CBMAI 847, *Penicillium citrinum* CBMAI 1186, *Penicillium miczynskii* Ce16, *P. miczynskii* Gc5, *Penicillium oxalicum* CBMAI 1185, and *Trichoderma* sp. Gc1) catalyzed the asymmetric bioconversion of iodoacetophenones 1–3 to corresponding iodophenylethanols 6–8. All the marine fungi produced exclusively (*S*)-*ortho*-iodophenylethanol 6 and (*S*)-*meta*-iodophenylethanol 7 in accordance to the Prelog rule. *B. felina* CBMAI 738, *P. miczynskii* Gc5, *P. oxalicum* CBMAI 1185, and *Trichoderma* sp. Gc1 produced (*R*)-*para*-iodophenylethanol 8 as product anti-Prelog. The bioconversion of *para*-iodoacetophenone 3 with whole cells of *P. oxalicum*

CBMAI 1185 showed competitive reduction–oxidation reactions.

Keywords Iodophenylethanols · Marine fungi · Reduction · Ketones

Introduction

Asymmetric reductions of ketones represent the most important methodology for the production of enantiomerically enriched alcohols with high optical purities. Recent advances have been developed in biocatalysis by asymmetric reduction of ketones (Nakamura et al. 2003; Kroutil et al. 2004). In this context, various sources of biocatalysts for reductions are used, such as isolated enzymes (alcohol dehydrogenases), microorganisms (bacteria, fungi), and plant or animal cells. However, the use of whole cells of microorganisms represents excellent advantages as there is no need to add expensive cofactors and the reduction requires mild conditions and water as solvent. For example, the reduction of ethyl 3-oxo-3-phenylpropanoate using immobilized cells from *Pichia kluyveri* CCT 3365 in multi-gram scale produced the (*S*)-ethyl-3-hydroxy-3-phenylpropanoate with 80 % yield and 99 % enantiomeric excess (ee) (Milagre et al. 2010).

Marine environments occupy about 70 % of the Earth's surface, and thousands of microorganisms inhabit the marine biome. Marine microbial enzymes can offer novel biocatalysts to the reduction of ketones with distinct characteristics such as high salt tolerance, hyperthermostability, barophilicity, and cold adaptivity (Baharum et al. 2010).

However, the growth of marine microorganisms in the laboratory and the isolation of novel enzymes from otherwise inaccessible microbes can be difficult. In these cases,

L. C. Rocha · R. F. Luiz · I. G. Rosset · A. L. M. Porto (✉)
Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo,
Av. Trabalhador, São-carlense, 400, CP 780,
13560-970, São Carlos, SP, Brazil
e-mail: almparto@iqsc.usp.br

C. Raminelli
Faculdade de Ciências Exatas e Tecnologia,
Universidade Federal da Grande Dourados,
Rodovia Dourados-Itahum Km 12,
79804-970, Dourados, MS, Brazil

L. D. Sette
Divisão de Recursos Microbianos, Centro Pluridisciplinar de
Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas, CPQBA,
Universidade Estadual de Campinas,
Rua Alexandre Casellato, 999,
Paulínia, SP 13140-000, Brazil

M. H. R. Seleguim
Departamento de Ecologia e Biologia Evolutiva,
Universidade Federal de São Carlos,
Via Washington Luís, Km 235,
São Carlos, SP 13565-905, Brazil

Molecules **2012**, *17*, 8955–8967; doi:10.3390/molecules17088955

OPEN ACCESS

molecules

ISSN 1420-3049

www.mdpi.com/journal/molecules

Article

Syntheses of Enantiopure Aliphatic Secondary Alcohols and Acetates by Bioresolution with Lipase B from *Candida antarctica*

Hercules V. Ferreira ¹, Lenilson C. Rocha ¹, Richele P. Severino ^{1,2} and André L. M. Porto ^{1,*}

¹ Institute of Chemistry of São Carlos, University of São Paulo, Av. Trabalhador São-carlense, 400, 13560-970, São Carlos, SP, Brazil; E-Mails: hercules_quimica@hotmail.com (H.V.F.); lenilson@iqsc.usp.br (L.C.R.); richlepe@yahoo.com.br (R.P.S.)

² Department of Chemistry, Federal University of Goiás, Campus Advanced of Catalão, Av. Dr. Lamartine Pinto de Avelar, 1120, 75704-020, Catalão, GO, Brazil

* Author to whom correspondence should be addressed; E-Mail: alporto@iqsc.usp.br; Tel.: +55-16-3373-8103; Fax: +55-16-3372-9952.

Received: 24 April 2012; in revised form: 27 June 2012 / Accepted: 3 July 2012 /

Published: 26 July 2012

Abstract: The lipase B from *Candida antarctica* (Novozym 435[®], CALB) efficiently catalyzed the kinetic resolution of some aliphatic secondary alcohols: (±)-4-methylpentan-2-ol (**1**), (±)-5-methylhexan-2-ol (**3**), (±)-octan-2-ol (**4**), (±)-heptan-3-ol (**5**) and (±)-oct-1-en-3-ol (**6**). The lipase showed excellent enantioselectivities in the transesterifications of racemic aliphatic secondary alcohols producing the enantiopure alcohols (>99% *ee*) and acetates (>99% *ee*) with good yields. Kinetic resolution of *rac*-alcohols was successfully achieved with CALB lipase using simple conditions, vinyl acetate as acylating agent, and hexane as non-polar solvent.

Keywords: kinetic resolution; lipase; *Candida antarctica*; aliphatic secondary alcohols

1. Introduction

The use of enzymes for organic synthesis has become an interesting area for organic and bio-organic chemists. Since many enzymes have been demonstrated to possess activity against non-natural substrates in organic media they have become widely used to carry out synthetic transformations. Hydrolases are the most frequently used enzymes due to their broad substrate spectrum and considerable stability. Additionally, many of them are commercially available and they work under

G Model
MOLCAB-2506; No. of Pages 6

ARTICLE IN PRESS

Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic xxx (2012) xxx–xxx

Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic

journal homepage: www.elsevier.com/locate/molcatb

Immobilization of marine fungi on silica gel, silica xerogel and chitosan for biocatalytic reduction of ketones

Lenilson Coutinho Rocha^a, Adriano Lopes de Souza^a, Ubirajara Pereira Rodrigues Filho^a, Sergio Paulo Campana Filho^a, Lara Durães Sette^b, André Luiz Meleiro Porto^{a,*}

^a Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, Av. Trabalhador São-carlense, 400, CEP 13560-970, São Carlos, SP, Brazil

^b Divisão de Recursos Microbianos, Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas, CPQBA, Universidade Estadual de Campinas, Rua Alexandre Casellato, 999, CEP 13140-000, Paulínia, SP, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:
Available online xxx

Keywords:
Biocatalysis
Penicillium citrinum
Aspergillus sclerotiorum
Whole living cells
Scanning electron microscopy

ABSTRACT

The scanning electron microscopy (SEM) analysis showed that whole living hyphal of marine fungi *Aspergillus sclerotiorum* CBMAI 849 and *Penicillium citrinum* CBMAI 1186 were immobilized on support matrices of silica gel, silica xerogel and/or chitosan. *P. citrinum* immobilized on chitosan catalyzed the quantitative reduction of 1-(4-methoxyphenyl)-ethanone (**1**) to the enantiomer (S)-1-(4-methoxyphenyl)-ethanol (**3b**), with excellent enantioselectivity (*ee* > 99%, yield = 95%). Interestingly, ketone **1** was reduced with moderate selectivity and conversion to alcohol **3b** (*ee* = 69%, *c* 40%) by the free mycelium of *P. citrinum*. This free mycelium of *P. citrinum* catalyzed the production of the (R)-alcohol **3a**, the antipode of the alcohol produced by the immobilized cells. *P. citrinum* immobilized on chitosan also catalyzed the bioreduction of 2-chloro-1-phenylethanone (**2**) to 2-chloro-1-phenylethanol (**4a,b**), but in this case without optical selectivity. These results showed that biocatalytic reduction of ketones by immobilization hyphal of marine fungi depends on the xenobiotic substrate and the support matrix used.

© 2012 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Biocatalytic processes can take advantage of the habitat-related properties of marine enzymes, such as salt tolerance, hyperthermostability, barophilicity and cold adaptivity, as well as the common enzyme characteristics of substrate specificity and affinity [1]. For a biocatalyst to be effective in a given process, it must be protected from interaction with the solvent in which the reaction is carried out, as this could lead to its inactivation, halting the catalytic reaction [2]. In this context, new immobilization techniques have been developed to provide stability to enzymes and facilitate their recovery and reutilization [3]. Immobilized enzymes are defined as enzymes that are physically confined or localized in a certain region of space with retention of catalytic activities that may be used continuously or repeatedly [4]. Enzymatic processes in the immobilization of biocatalysts offers advantages such as increased stability and improved process control, yield and purity of the final product, besides enabling the use of reactors of a variety of configurations [5]. One very simple immobilization technique is the adsorption of the enzyme on porous material, such as celite, silica or polyurethane foam. Immobilization has been achieved in a number

of other ways, by covalent linkage, ion-coagulation, crosslinking and/or entrapment methods, on a variety of matrices [6,7]. Among the biocatalysts, purified enzymes and whole living cells of bacteria and yeasts are commonly immobilized in various supports and matrices, but the immobilization of filamentous fungi has been rarely described [8]. However, whole mycelia of filamentous fungi are often used in biocatalytic processes, especially in redox reactions with various organic compounds [9]. The morphology of fungi is very complex, with different cellular structures at each stage of their life cycle [10]. One way to preserve the morphological structure of these microorganisms is the immobilization of whole living cells, such that the desired catalytic activity is preserved, and the immobilized cells can then be used in the laboratory and on the industrial scale [11]. The immobilization of whole living cells of microorganisms is interesting in view of the increasing number of industrial applications of biocatalytic process in the pharmaceutical and food industries, especially those involving filamentous fungi with high production of enzymes [12].

Most of the fungi contain chitin in the cell wall, forming 22–40% of the wall constituents [13]. The presence of chitin, together with that of other polysaccharides, has been used as a criterion in fungal taxonomy. This polysaccharide, which forms fibrils of different lengths, depending on the species and the cellular location [10,14], is a homopolymer and it has a broad spectrum of distribution in the biosphere, being formed in the shells of

* Corresponding author. Tel.: +55 16 3373 8103; fax: +55 16 3373 9952.
E-mail address: almporto@iqsc.usp.br (A.L.M. Porto).

1381-1177/\$ – see front matter © 2012 Elsevier B.V. All rights reserved.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.molcatb.2012.05.025>

Please cite this article in press as: L.C. Rocha, et al., J. Mol. Catal. B: Enzym. (2012), <http://dx.doi.org/10.1016/j.molcatb.2012.05.025>