**Universidade de São Paulo
Instituto de Química de São Carlos**

TESE DE DOUTORADO

**Aplicação da Irradiação Micro-Ondas em Biocatálise: Resolução
Cinética, Redução de Cetonas e Adição de Michael**

Sandra Santos Ribeiro

Orientador : Prof. Dr. André Luiz Meleiro Porto

SÃO CARLOS

2014

Aplicação da Irradiação Micro-Ondas em Biocatálise: Resolução Cinética, Redução de Cetonas e Adição de Michael

Sandra Santos Ribeiro

Tese apresentada ao Instituto de Química de
São Carlos, da Universidade de São Paulo,
como requisito para obtenção do título de
Doutor em Ciências.

Área de concentração: Físico-Química
Orientador: Prof. Dr. André Luiz Meleiro Porto

Exemplar revisado

O exemplar original encontra-se em acervo
reservado na Biblioteca do IQSC-USP.

SÃO CARLOS

2014

Dedico este trabalho aos meus pais, José Eurique Cardoso Ribeiro e Esmeralda Santos Ribeiro, aos meus irmãos Simone, Henrique e Elson e meus familiares que sempre me apoiaram e me ajudaram a não desistir dos meus sonhos.

"Não chores porque já terminou, sorria porque aconteceu".

Gabriel García Márquez

AGRADECIMENTOS

A Deus, por estar sempre ao meu lado, me protegendo e abençoando com novas oportunidades de aprendizado pessoal e profissional.

Aos meus pais, *José Eurique Cardoso Ribeiro* e *Esmeralda Santos Ribeiro*, e aos meus irmãos, *Simone*, *Henrique*, *Elson* e *Junior*. Obrigada pelo exemplo de amor, união, dignidade e determinação. A todos os meus familiares (tios, tias, primos e sobrinhos) que sempre estiveram comigo, me apoiando nos momentos mais importantes da minha vida. Ao meu namorado *Alexander* pelo seu amor e companheirismo do dia a dia.

Ao Prof. Dr. *André L. M. Porto*, pela orientação profissional e pela sua dedicação e humanidade, sempre nos tratado com respeito e dedicação. Aos amigos de laboratório que transformaram o ambiente de trabalho um lugar bom de viver. Amigos com os quais pude aprender e compartilhar experiências: *Julieta*, *Mariana*, *Lenilson*, *Natália*, *Ana Maria*, *Yara*, *Irlon*, *William*, *X-Darlisson* e outros tantos colegas que passaram pelo laboratório de Biocatálise e aos técnicos *João Pedro* e *Marília*.

Aos amigos que eu fiz aqui em São Carlos que estarão sempre no meu coração *Glaucia Helena*, *Ivana Leão*, *Larissa Sampaio*, *Marina Mecca*, *Missias Passos* e *Rafael*.

Profa. Dra. *Suzan Pantaroto de Vasconcellos* da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP) pela doação das bactérias termofílicas e ao Prof. Dr. *Roberto G. S. Berlinck* (IQSC-USP) pela doação do fungo.

Aos técnicos da CAQI-USP: *André*, *Aldimar* (Espectrometria de Infravermelho), *Silvana* (Ressonância Magnética Nuclear) e a *Luciana Vizotto* do laboratório de RMN da UFSCar pela obtenção dos espectros.

A equipe da Pós-Graduação e da biblioteca pela prestatividade e gentileza com que tratam todos os pós-graduandos.

Ao Instituto de Química de São Carlos da USP a todos os profissionais (professores, técnicos, bibliotecários...) que participaram de alguma forma destas etapas em minha vida.

A FAPESP pelo apoio financeiro recebido através da bolsa de doutorado (Processo: 2010/50529-0) e de projetos de auxílio à pesquisa.

Esta tese foi formatada de acordo com o manual simplificado de normas para elaboração de teses e dissertações do Instituto de Química de São Carlos - USP. CORDEIRO, E. C. A. Manual simplificado de normas para elaboração de teses e dissertações, 4. ed. -São Carlos: [s.n], 2013, 52p.

RESUMO

Neste trabalho foram realizadas reações de resolução enzimática de ciano-hidrinas [(±)-mandelonitrila **1a**, (±)-2-(4-clorofenil)-2-hidroxiacetonitrila **2a**, (±)-2-hidroxi-2-(4-hidroxifenil)acetonitrila **3a**, (±)-2-hidroxi-2-(4-fluorofenil)acetonitrila **5a**, (±)-2-hidroxi-2-(4-metoxifenil)acetonitrila **6a**, (±)-2-hidroxi-2-(3-fenoxifenil)acetonitrila **7a** e (±)-(*E*)-2-hidroxi-4-fenilbut-3-enonitrila **8a**] e de álcoois organofluorados [(±)-2,2,2-trifluoro-1-feniletanol **±9a**, (±)-1-(2,4,5-trifluorofenil)etanol **10a**, (±)-1-(3-bromofenil)-2,2,2-trifluoroetanol **11a**, (±)-1-(4-bromofenil)-2,2,2-trifluoroetanol **12a** e (±)-1-(2-trifluorometil)feniletanol **13a**] utilizando a lipase imobilizada de *Candida antarctica* (CALB). As reações foram realizadas em *agitador orbital* por um período de tempo que variou entre 24-168 h de reação apresentando diferentes conversões e excessos enantioméricos: [(*R*)-álcool **1a** (c = 51%, ee = 51%), (*S*)-acetato **1b** (c = 49%, ee = 98%); (*R*)-álcool **2a** (c = 42%, ee > 99%), (*S*)-acetato **2b** (c = 58%, ee = 94%); (*R*)-álcool **3a** (c = 34%), (*S*)-acetato **3b** (c = 32%, ee = 28%); (*R*)-álcool **4a** (c = 82%), (*S*)-acetato **4b** (c = 18%, ee = 25%); (*R*)-álcool **5a** (c = 5%), (*S*)-acetato **5b** (c = 55%, ee = 97%); (*R*)-álcool **6a** (c = 44%), (*S*)-acetato **6b** (c = 56%, ee = 99%); (*R*)-álcool **7a** (c = 53%), (*S*)-acetato **7b** (c = 47%, ee = 92%); (*R*)-álcool **8a** (c = 40%), (*S*)-acetato **8b** (c = 60%, ee = 80%); (*R*)-álcool **9a** (c = 51%, ee = 62%), (*S*)-acetato **9b** (c = 49%, ee > 99%); (*S*)-álcool **10a** (c = 50%, ee > 99%), (*R*)-acetato **10b** (c = 50%, ee > 99%); (*R*)-álcool **11a** (c = 49%, ee = 61%), (*S*)-acetato **11b** (c = 51%, ee = 82%); (*R*)-álcool **12a** (c = 51%, ee = 72%), (*S*)-acetato **12b** (c = 49%, ee > 99%); (*S*)-álcool **13a** (c = 88%), (*R*)-acetato **13b** (c = 12%, ee > 99)]. Os resultados por *irradiação micro-ondas* para os compostos obtidos apresentaram menores tempos de reação (1-14 h) comprovando a sua eficiência na resolução quimio-enzimática de compostos organofluorados e ciano-hidrinas: [(*R*)-álcool **1a** (c = 60%, ee = 89%), (*S*)-acetato **1b** (c = 40%, ee = 92%); (*R*)-álcool **2a** (c = 47%, ee = 82%), (*S*)-acetato **2b** (c = 53%, ee = 90%); (*R*)-álcool **3a** (c = 34%), (*S*)-acetato **3b** (c = 17%, ee = 59%); (*R*)-álcool **5a** (c = 4%, ee = 88%), (*S*)-acetato **5b** (c = 50%, ee = 92%); (*R*)-álcool **6a** (c = 44%, ee = 73%), (*S*)-acetato **6b** (c = 56%, ee = 90%); (*R*)-álcool **7a** (c = 50%, ee = 84%), (*S*)-acetato **7b** (c = 50%, ee = 84%); (*R*)-álcool **8a** (c = 41%, ee = 91%), (*S*)-acetato **8b** (c = 59%, ee = 74%); (*S*)-álcool **9a** (c = 95%), (*R*)-acetato **9b** (c = 5%, ee > 99%); (*R*)-álcool **10a** (c = 50%, ee > 99%), (*S*)-acetato **10b** (c = 50%, ee > 99%); (*R*)-álcool **11a** (c = 58%, ee = 43%), (*S*)-acetato **11b** (c = 42%, ee = 78%); (*S*)-álcool **12a** (c = 51%, ee = 70%), (*R*)-acetato **12b** (c = 49%, ee = 98%); (*S*)-álcool **13a** (c = 85%), (*R*)-acetato **13b** (c = 15%, ee > 99)]. Em especial destaca-se, neste trabalho o uso de células microbianas utilizando a irradiação micro-ondas na redução de fluorocetonas. Sendo assim, foi realizada reações de biorredução da (±)-2,2,2-trifluoroacetofenona **3** em *agitador orbital* e irradiação micro-ondas pelo fungo marinho *Mucor racemosus* CBMAI 847 nas concentrações de (2,9; 5,7; 8,5 e 14 mmol/L) em pH 8 e na concentração de 14 mmol/L em pH 5. Após 6 h de reação obtiveram-se conversões entre 39-100% e excessos enantioméricos entre 74-96% em *agitador orbital* e por *irradiação micro-ondas* obteve-se uma variação de 28-64% de conversão e excesso enantiomérico entre 73-96%. Também foram realizadas reações de biorredução com as bactérias termofílicas SPZSP005, SPZSP088, SPZSP051 e SPZSP055 para cetonas organofluoradas obtendo-se elevadas enantiosseletividades

(>99%) e conversões (>99%). Esse estudo relata a primeira investigação da literatura frente ao uso de fungo e bactérias termofílicas por irradiação micro-ondas aplicada em biocatálise. Foram também realizadas reações de adição de aza-Michael entre a benzilamina e cetonas α,β -insaturadas (ciclo-hexenona, 3-metil-2-ciclo-hexen-1-ona e a 2,5-dimetil-*para*-benzoquinona) utilizando a CALB em diferentes solventes orgânicos (EtOAc, CH₂Cl₂, *n*-hexano, MeOH, tolueno, éter etílico e THF) em agitador orbital e por irradiação micro-ondas. Através das reações de adição de aza-Michael foi obtido por adição-1,2 e adição-1,4 como adutos iminas, os quais foram caracterizadas por espectrometria de massas. Finalmente neste trabalho aplicou a irradiação micro-ondas em biocatálise via resolução cinética, redução de cetonas e adição de Michael.

ABSTRACT

In this study, enzymatic kinetic resolutions of cyanohydrins [(±)-mandelonitrile **1a**, (±)-2-(4-chlorophenyl)-2-hydroxyacetonitrile **2a**, (±)-2-hydroxy-2-(4-hydroxyphenyl)acetonitrile **3a**, (±)-2-hydroxybutanenitrile **4a**, (±)-2-(4-fluorophenyl)acetonitrile **5a**, (±)-2-hydroxy-2-(4-metoxiphenyl)acetonitrile **6a**, (±)-2-hydroxy-2-(3-fenoxiphenyl)acetonitrile **7a** and (±)-(E)-2-hydroxy-4-phenylbut-3-enonitrile **8a**], and organofluorine alcohols [(±)-2,2,2-trifluoro-1-phenylethanol **9a**, (±)-1-(2,4,5-trifluorophenyl)ethanol **10a**, (±)-1-(3-bromophenyl)-2,2,2-trifluoroethanol **11a**, (±)-1-(4-bromophenyl)-2,2,2-trifluoroethanol **12a** and (±)-1-(2-trifluoromethyl)phenylethanol **13a**] were performed using immobilized lipase from *Candida antarctica* (CALB). The reactions were performed on an orbital shaking for a period ranging from 24 to 168 h with different conversions and enantiomeric excesses. [(R)- alcohol **1a** (c = 51%, ee = 51%), (S)-acetate **1b** (c = 49%, ee = 98%); (R)-alcohol **2a** (c = 42%, ee > 99%), (S)-acetate **2b** (c = 58%, ee = 94%); (R)-alcohol **3a** (c = 34%), (S)-acetate **3b** (c = 32%, ee = 28%); (R)-alcohol **4a** (c = 82%), (S)-acetate **4b** (c = 18%, ee = 25%); (R)-alcohol **5a** (c = 5%), (S)-acetate **5b** (c = 55%, ee = 97%); (R)-alcohol **6a** (c = 44%), (S)-acetate **6b** (c = 56%, ee = 99%); (R)-alcohol **7a** (c = 53%), (S)-acetate **7b** (c = 47%, ee = 92%); (R)-alcohol **8a** (c = 40%), (S)-acetate **8b** (c = 60%, ee = 80%); (R)-alcohol **9a** (c = 51%, ee = 62%), (S)-acetate **9b** (c = 49%, ee > 99%); (S)-alcohol **10a** (c = 50%, ee > 99%), (R)-acetate **10b** (c = 50%, ee > 99%); (R)-alcohol **11a** (c = 49%, ee = 61%), (S)-acetate **11b** (c = 51%, ee = 82%); (R)-alcohol **12a** (c = 51%, ee = 72%), (S)-acetate **12b** (c = 49%, ee > 99%); (S)-alcohol **13a** (c = 88%), (R)-acetate **13b** (c = 12%, ee > 99)]. The results obtained by microwave irradiation for the substrates showed shorter reaction times (1 to 14 h) demonstrating its efficiency in chemoenzymatic esterifications of organofluorine compounds and cyanohydrins [(R)-alcohol **1a** (c = 60%, ee = 89%), (S)-acetate **1b** (c = 40%, ee = 92%); (R)-alcohol **2a** (c = 47%, ee = 82%), (S)-acetate **2b** (c = 53%, ee = 90%); (R)-alcohol **3a** (c = 34%), (S)-acetate **3b** (c = 17%, ee = 59%); (R)-alcohol **5a** (c = 4%, ee = 88%), (S)-acetate **5b** (c = 50%, ee = 92%); (R)-alcohol **6a** (c = 44%, ee = 73%), (S)-acetate **6b** (c = 56%, ee = 90%); (R)-alcohol **7a** (c = 50%, ee = 84%), (S)-acetate **7b** (c = 50%, ee = 84%); (R)-alcohol **8a** (c = 41%, ee = 91%), (S)-acetate **8b** (c = 59%, ee = 74%); (S)-alcohol **9a** (c = 95%), (R)-acetate **9b** (c = 5%, ee > 99%); (R)-alcohol **10a** (c = 50%, ee > 99%), (S)-acetate **10b** (c = 50%, ee > 99%); (R)-alcohol **11a** (c = 58%, ee = 43%), (S)-acetate **11b** (c = 42%, ee = 78%); (S)-alcohol **12a** (c = 51%, ee = 70%), (R)-acetate **12b** (c = 49%, ee = 98%); (S)-alcohol **13a** (c = 85%), (R)-acetate **13b** (c = 15%, ee > 99)]. In particular, this thesis show the use of microbial cells in reduction of fluoroketones by microwave irradiation. Thus, bioreduction reactions of (±)-2,2,2-trifluoroacetophenone **3** was performed in orbital shaking and microwave irradiation by marine fungus *Mucor racemosus* CBMAI 847 in different concentrations (2.9, 5.7,

8.5 and 14 mmol/L) at pH 8 and in the concentration of 14 mmol/L at pH 5. In the reactions after 6 h were obtained a conversion of 39 to 100% and enantiomeric excess of 74-96%, in orbital shaking. The reaction on microwave irradiation gave an increase conversion of 28-64% and enantiomeric excess of 73-96%. Bioreduction reactions were also performed with the thermophilic bacteria SPZSP005, SPZSP088, SPZSP051 and SPZSP055 for organofluorine ketones obtaining high enantioselectivities (> 99%) and conversions (> 99%). This study describes the first investigation on the literature regarding the use of thermophilic bacteria and fungus by microwave irradiation applied to biocatalysis. Were also carried out reactions of aza-Michael addition of benzylamine and α,β -unsaturated cyclohexenones (cyclohexenone, 3-methyl-2-cyclo-hexen-1-one and 2,5-dimethyl-*para*-benzoquinone) were investigated, using CALB in different organic solvents (EtOAc, CH₂Cl₂, *n*-hexane, MeOH, toluene, ethylic ether and THF) in orbital shaking and microwave irradiation. From aza-Michael addition reactions was possible to obtain by 1,2- and 1,4-addition the adduct imines, which were characterized by mass spectrometry. Finally this thesis applied the microwave irradiation in biocatalysis via kinetic resolution, reduction of ketones and aza-Michael addition.

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1

Figura 1.1 - Representação do espectro eletromagnético.	38
Figura 1.2 - a) Aquecimento convencional. b) Aquecimento por irradiação micro-ondas.	40
Figura 1.3 - Representação da resposta molecular a um campo eletromagnético. (a) Moléculas polarizadas alinhadas com o campo eletromagnético. (b) Desordem termicamente induzida quando o campo eletromagnético é alterado. E = campo elétrico.	40
Figura 1.4 - Representação esquemática de condução iônica. E = campo elétrico.	41
Figura 1.5 - Relação entre o fator de perda dielétrica (ϵ'') e capacidade de absorver potência de micro-ondas para alguns materiais comuns.	42
Figura 1.6 - Representação do encaixe perfeito do substrato ao sítio ativo da enzima e formação dos produtos.	50
Figura 1.7 - Representação de um diagrama de energia frente uma reação catalisada e não catalisada. São assinaladas a energia livre padrão (ΔG), ou seja, a diferença entre o conteúdo energético dos produtos e dos reagentes, e a energia de ativação ($\Delta\Delta G^\ddagger$).	52
Figura 1.8 - Estrutura cristalina da CALB (código PDB: 1TCA). ³⁷ . Destaque é a tríade catalítica no sítio ativo: Ser ¹⁰⁵ (vermelho), His ²²⁴ , (laranja) e Asp ¹⁸⁷ (amarelo). Duas hélices móveis podem ser encontradas próximas ao sítio ativo.	57

CAPÍTULO 2

Figura 2.1 - Rotas biossintéticas na resolução enantiomérica via transesterificação ou hidrólise catalisadas por hidrolases.	61
Figura 2.2 - Resolução cinética dinâmica.	63
Figura 2.3 - Síntese enantiosseletiva de diastereoisômeros via resolução cinética dinâmica.	65
Figura 2.4 - Ilustração do sítio catalítico de uma lipase e os enantiômeros de um álcool quiral contendo um grupo volumoso (esfera G) e um grupo pequeno ou menos volumoso (esfera P). A) Enantiômero que reage mais rapidamente. B) Enantiômero que reage mais lentamente.	69
Figura 2.5 - Evolução das publicações dos últimos anos (palavras chaves: <i>Microwave and Enzymatic reaction</i> , busca no Scifinder, Agosto de 2013).	71
Figura 2.6 - Fármaco e inseticida sintetizados a partir de compostos cianídricos.	74
Figura 2.7 - Fármacos que contém átomos de flúor em sua estrutura.	78
Figura 2.8 - Cromatogramas obtidos por GC-FID para a resolução enzimática da ($\pm$)-mandelonitrila 1a pela lipase de <i>C. antarctica</i> por irradiação micro-ondas (80 °C, 200 W). (a) Padrão da ($\pm$)-mandelonitrila 1a . (b) Padrão do ($\pm$)-acetato de ciano(fenil)metila 1b . (c) Reação da ($\pm$)-	98

mandelonitrila 1a após 8 h. (d) (R)-acetato de ciano(fenil)metila 1b após derivatização do (R)-mandelonitrila 1a com Ac ₂ O/pi remanescente.	
Figura 2.9 - Cromatograma obtido por CLAE do padrão da (±)-mandelonitrila 1a .	100
Figura 2.10 - Cromatograma obtido por CLAE do (±)-acetato de ciano(fenil)metila 1b .	101
Figura 2.11 - Cromatograma obtido por CLAE do banzaldeído 1 com tempo de retenção de 4,96 min.	101
Figura 2.12 - Cromatograma obtido por CLAE do (S)-mandelonitrila 1a (<i>ee</i> = 54%) purificada por cromatografia da reação realizada em agitador orbital (130 rpm, 168 h, 32°C).	102
Figura 2.13 - Cromatograma obtido por CLAE do banzaldeído 1 com tempo de retenção de 6,99 min.	102
Figura 2.14 - Cromatograma obtido por CLAE do (S)-acetato de ciano(fenil)metila 1b (98% <i>ee</i>) purificada por cromatografia da reação realizada em agitador orbital (130 rpm, 168 h, 32°C).	103
Figura 2.15 - Cromatogramas obtidos por GC-FID da resolução enzimática da (±)-2-(4-clorofenil)-2-hidroxiacetoneitrila 2a pela lipase de <i>C. antarctica</i> por irradiação micro-ondas em tolueno. (a) Padrão da (±)-2-(4-clorofenil)-2-hidroxiacetoneitrila 2a . (b) Padrão do (±)-acetato de (4-clorofenil)(ciano)metila 2b . (c) 5 h de reação. (d) Derivatização do álcool remanescente (R)- 2a com Ac ₂ O/pi para formação do (R)- 2b acetato.	106
Figura 2.16 - Cromatogramas obtidos por GC-FID da resolução enzimática da (±)-2-hidroxi-2-(4-hidroxifenil)acetoneitrila 3a pela lipase de <i>C. antarctica</i> em agitador orbital (32°C, 130 rpm) em tolueno. (a) Padrão da (±)-2-hidroxi-2-(4-hidroxifenil)acetoneitrila 3a . (b) Padrão do (±)-acetato de 4-(acetoxi(ciano)metil)fenila 3b . (c) Padrão do acetato de 4-formilfenila. (d) 48 h de reação.	108
Figura 2.17 - Cromatogramas obtidos por GC-FID da resolução enzimática da (±)-2-hidroxi-2-(4-hidroxifenil)acetoneitrila 3a pela lipase de <i>C. antarctica</i> por irradiação micro-ondas (T = 80°C, 200W) em tolueno. (a) Padrão da (±)-2-hidroxi-2-(4-hidroxifenil)acetoneitrila 3a . (b) Padrão do (±)-acetato de 4-(acetoxi(ciano)metil)fenila 3b . (c) 5 h de reação.	109
Figura 2.18 - Cromatograma e espectros de massas (70 eV) obtidos por GC-MS da resolução enzimática da (±)-2-hidroxi-2-(4-hidroxifenil)acetoneitrila 3a pela lipase de <i>C. antarctica</i> em agitador orbital com 48 h em tolueno. (a) Tempo de retenção de 10,0 min. (b) tempo de retenção de 14,5 min.	110
Figura 2.19 - Cromatogramas obtidos por GC-FID da resolução enzimática da (±)-2-hidroxibutanonitrila 4a pela lipase de <i>C. antarctica</i> . (a) Padrão da (±)-2-hidroxibutanonitrila 4a . (b) Padrão do (±)-acetato de 1-cianopropila (c) 2 h de reação. (d) 4 h de reação. (e) 24 h de reação. (f) 48 h de reação.	113
Figura 2.20 - Cromatogramas obtidos por GC-FID da resolução enzimática da (±)-2-(4-fluorofenil)-2-hidroxiacetoneitrila 5a pela lipase de <i>C. antarctica</i> por irradiação micro-ondas em tolueno. (a) Padrão do 4-fluorobenzaldeído	116

5. (b) Padrão da (±)-2-(4-fluorofenil)-2-hidroxiacetonitrila 5a . (c) Padrão do (±)-acetato de ciano(4-fluorofenil)metila 5a . (d) 4 h de reação.	
Figura 2.21 - Cromatogramas obtidos por GC-FID da resolução enzimática da (±)-2-hidroxi-2-(4-metoxifenil)acetonitrila 6a pela lipase de <i>C. antarctica</i> por irradiação micro-ondas em tolueno. (a) Padrão do (±)-álcool 6a . (b) Padrão do (±)-acetato de ciano(4-metoxifenil)metila 6b . (c) 3 h de reação. (e) Derivatização do álcool remanescente (<i>R</i>)- 6a com Ac ₂ O/pi para formação do (<i>R</i>)-acetato 6b .	120
Figura 2.22 - Cromatogramas obtidos por GC-FID da resolução enzimática da (±)-2-hidroxi-2-(3-fenoxifenil)acetonitrila 7a pela lipase de <i>C. antarctica</i> por irradiação micro-ondas em tolueno. (a) Padrão do (±)-álcool 7a . (b) Padrão do (±)-acetato de ciano(3-fenoxifenil)metila 7b . (c) 6 h de reação. (d) Derivatização do álcool remanescente (<i>R</i>)- 7a com Ac ₂ O/pi para formação do (<i>R</i>)-acetato 7b .	122
Figura 2.23 - Cromatogramas obtidos por GC-FID da resolução enzimática (±)-(<i>E</i>)-2-hidroxi-4-fenilbut-3-enonitrila 8a pela lipase de <i>C. antarctica</i> por irradiação micro-ondas em tolueno. (a) Padrão do (±)-álcool 8a . (b) Padrão do (±)-acetato de (<i>E</i>)-1-ciano-3-fenilalila 8b . (c) 3 h de reação. (e) Derivatização do álcool remanescente (<i>R</i>)- 8a com Ac ₂ O/pi para formação do (<i>R</i>)-acetato 8b .	125
Figura 2.24 - Gráfico da reusabilidade da CALB na resolução enzimática da (±)-(<i>E</i>)-2-hidroxi-4-fenilbut-3-enonitrila 8a por irradiação micro-ondas em tolueno (10 mL), CALB (160 mg), temperatura (80 °C) potência (200 W).	126
Figura 2.25 - Cromatogramas obtidos por GC-FID da resolução enzimática do (±)-2,2,2-trifluoro-1-feniletanol 9a pela lipase de <i>C. antarctica</i> em agitador orbital em tolueno. (a) Padrão do (±)-2,2,2-trifluoro-1-feniletanol 9a . (b) Padrão do (±)-acetato de 2,2,2-trifluoro-1-feniletila 9b . (c) 7 dias de reação. (d) Derivatização do álcool remanescente (<i>R</i>)- 9a com Ac ₂ O/pi para formação do (<i>R</i>)-acetato 9b .	130
Figura 2.26 - Espectro de absorção na região de infravermelho (cm ⁻¹) para o (±)-2,2,2-trifluoro-1-feniletanol 9a .	132
Figura 2.27 - Espectro de RMN de ¹ H (400 MHz, CDCl ₃) para o (±)-2,2,2-trifluoro-1-feniletanol 9a .	132
Figura 2.28 - Espectro de massas de alta resolução para o (±)-2,2,2-trifluoro-1-feniletanol 9a .	133
Figura 2.29 - Espectro de absorção na região de infravermelho (cm ⁻¹) para o (±)-acetato de 2,2,2-trifluoro-1-feniletila 9b .	134
Figura 2.30 - Espectro de RMN de ¹ H (500 MHz, CDCl ₃) para o (±)-acetato de 2,2,2-trifluoro-1-feniletila 9b .	135
Figura 2.31 - Espectro de RMN de ¹³ C (125 MHz, CDCl ₃) para o (±)-acetato de 2,2,2-trifluoro-1-feniletila 9b .	135
Figura 2.32 - Espectro de RMN de ¹⁹ F (470 MHz, CDCl ₃) para o (±)-acetato de 2,2,2-trifluoro-1-feniletila 9b .	136
Figura 2.33 - Cromatogramas obtidos por GC-FID da resolução enzimática	138

do (±)-1-(2,4,5-trifluorofenil)etanol 10a pela lipase de <i>C. antarctica</i> em agitador orbital (32 °C) em tolueno. (a) Padrão do (±)-1-(2,4,5-trifluorofenil)etanol 10a . (b) Padrão do (±)-acetato de 1-(2,4,5-trifluorofenil)etila 10b . (c) 2 h de reação (d) 48 h de reação.	
Figura 2.34 - Cromatogramas obtidos por GC-FID da resolução enzimática do (±)-1-(2,4,5-trifluorofenil)etanol 10a pela lipase de <i>C. antarctica</i> por irradiação micro-ondas em tolueno (65 °C, 200 W). (a) Padrão do (±)-1-(2,4,5-trifluorofenil)etanol 10a . (b) Padrão do (±)-acetato de 1-(2,4,5-trifluorofenil)etila 10b . (c) 5 min de reação. (d) 10 min de reação. (e) 20 min de reação. (f) 30 min de reação.	139
Figura 2.35 - Cromatogramas obtidos por GC-FID da resolução enzimática do (±)-1-(2,4,5-trifluorofenil)etanol 10a pela lipase de <i>C. antarctica</i> por irradiação micro-ondas (65 °C, 200 W) em tolueno. (a) 1h de reação. (b) 4h de reação. (c) 6h de reação. (d) 8h de reação.	140
Figura 2.36 - Espectro de absorção na região de infravermelho (cm ⁻¹) para o (±)-1-(2,4,5-trifluorofenil)etanol 10a .	142
Figura 2.37 - Espectro de RMN de ¹ H (400 MHz, CDCl ₃) para o (±)-1-(2,4,5-trifluorofenil)etanol 10a .	142
Figura 2.38 - Espectro de RMN de ¹³ C (125 MHz, CDCl ₃) para o (±)-1-(2,4,5-trifluorofenil)etanol 10a .	143
Figura 2.38a - Espectro ampliado de RMN de ¹³ C (125 MHz, CDCl ₃) para o (±)-1-(2,4,5-trifluorofenil)etanol 10a .	143
Figura 2.38b - Espectro ampliado de RMN de ¹³ C (125 MHz, CDCl ₃) para o (±)-1-(2,4,5-trifluorofenil)etanol 10a .	144
Figura 2.39 - Espectro de RMN de ¹⁹ F (470 MHz, CDCl ₃) para o (±)-1-(2,4,5-trifluorofenil)etanol 10a .	144
Figura 2.40 - Espectro de massas de alta resolução para o (±)-1-(2,4,5-trifluorofenil)etanol 10a .	145
Figura 2.41 - Espectro de absorção na região de infravermelho (cm ⁻¹) para o (±)-acetato de 1-(2,4,5-trifluorofenil)etila 10b .	147
Figura 2.42 - Espectro de RMN de ¹ H (400 MHz, CDCl ₃) para o (±)-acetato de 1-(2,4,5-trifluorofenil)etila 10b .	147
Figura 2.43 - Espectro de RMN de ¹³ C (125 MHz, CDCl ₃) para o (±)-acetato de 1-(2,4,5-trifluorofenil)etila 10b .	148
Figura 2.43a - Espectro ampliado de RMN de ¹³ C (125 MHz, CDCl ₃) para o (±)-acetato de 1-(2,4,5-trifluorofenil)etila 10b .	148
Figura 2.43b - Espectro ampliado de RMN de ¹³ C (125 MHz, CDCl ₃) para o (±)-acetato de 1-(2,4,5-trifluorofenil)etila 10b .	150
Figura 2.44 - Espectro de RMN de ¹⁹ F (470 MHz, CDCl ₃) para o (±)-acetato de 1-(2,4,5-trifluorofenil)etila 10b .	151
Figura 2.45 - Espectro de massas de alta resolução para o (±)-acetato de 1-(2,4,5-trifluorofenil)etila 10b .	151
Figura 2.46 - Cromatogramas obtidos por GC-FID para a resolução enzimática do (±)-1-(3-bromofenil)-2,2,2-trifluoroetanol 11a pela lipase de	154

<i>C. antarctica</i> por irradiação micro-ondas (80 °C, 200 W) em tolueno. (a) Padrão do (±)-1-(3-bromofenil)-2,2,2-trifluoroetanol 11a . (b) Padrão do (±)-acetato de 1-(3-bromofenil)-2,2,2-trifluoroetila 11b . (c) 14 h de reação.	
Figura 2.47 - Cromatogramas obtidos por GC-FID para a resolução enzimática do (±)-1-(3-bromofenil)-2,2,2-trifluoroetanol 11a pela lipase de <i>C. antarctica</i> em agitador orbital (32°C, 130 rpm) em tolueno. (a) Padrão do (±)-1-(3-bromofenil)-2,2,2-trifluoroetanol 11a . (b) Padrão do (±)-acetato de 1-(3-bromofenil)-2,2,2-trifluoroetila 11a . (c) 144 h de reação.	154
Figura 2.48 - Espectro de absorção na região de infravermelho (cm ⁻¹) para o (±)-1-(3-bromofenil)-2,2,2-trifluoroetanol 11a .	156
Figura 2.49 - Espectro de RMN de ¹ H (400 MHz, CDCl ₃) para o (±)-1-(3-bromofenil)-2,2,2-trifluoroetanol 11a .	156
Figura 2.50 - Espectro de RMN de ¹³ C (125 MHz, CDCl ₃) para o (±)-1-(3-bromofenil)-2,2,2-trifluoroetanol 11a .	157
Figura 2.51 - Espectro de RMN de ¹⁹ F (470 MHz, CDCl ₃) para o (±)-1-(3-bromofenil)-2,2,2-trifluoroetanol 11a .	157
Figura 2.52 - Espectro de massas de alta resolução para o (±)-1-(3-bromofenil)-2,2,2-trifluoroetanol 11a .	158
Figura 2.53 - Espectro de absorção na região de infravermelho (cm ⁻¹) para o (±)-acetato de 1-(3-bromofenil)-2,2,2-trifluoroetila 11b .	159
Figura 2.54 - Espectro de RMN de ¹ H (400 MHz, CDCl ₃) para o (±)-acetato de 1-(3-bromofenil)-2,2,2-trifluoroetila 11b .	160
Figura 2.55 - Espectro de RMN de ¹³ C (125 MHz, CDCl ₃) para o (±)-acetato de 1-(3-bromofenil)-2,2,2-trifluoroetila 11b .	160
Figura 2.56 - Espectro de RMN de ¹⁹ F (470 MHz, CDCl ₃) para o (±)-acetato de 1-(3-bromofenil)-2,2,2-trifluoroetila 11b .	161
Figura 2.57 - Cromatogramas obtidos por GC-FID para a resolução enzimática do (±)-1-(4-bromofenil)-2,2,2-trifluoroetanol 12a pela lipase de <i>C. antarctica</i> por irradiação micro-ondas (80 °C, 200 W) em tolueno. (a) Padrão do (±)-1-(4-bromofenil)-2,2,2-trifluoroetanol 12a . (b) Padrão do (±)-acetato de 1-(4-bromofenil)-2,2,2-trifluoroetila 12b . (c) 14 h de reação.	164
Figura 2.58 - Cromatogramas obtidos por GC-FID para a resolução enzimática do (±)-1-(4-bromofenil)-2,2,2-trifluoroetanol 12a pela lipase de <i>C. antarctica</i> em agitador orbital (32 °C, 130 rpm) e em tolueno. (a) Padrão do (±)-1-(4-bromofenil)-2,2,2-trifluoroetanol 12a . (b) Padrão do (±)-acetato de 1-(4-bromofenil)-2,2,2-trifluoroetila 12b . (c) 48 h de reação.	165
Figura 2.59 - Espectro de absorção na região de infravermelho (cm ⁻¹) para o (±)-1-(4-bromofenil)-2,2,2-trifluoroetanol 12a .	166
Figura 2.60 - Espectro de RMN de ¹ H (400 MHz, CDCl ₃) para o (±)-1-(4-bromofenil)-2,2,2-trifluoroetanol 12a .	167
Figura 2.61 - Espectro de massas de alta resolução para o (±)-1-(4-bromofenil)-2,2,2-trifluoroetanol 12a .	167
Figura 2.62 - Espectro de absorção na região de infravermelho (cm ⁻¹) para o (±)-acetato de 1-(4-bromofenil)-2,2,2-trifluoroetila 12b .	169

Figura 2.63 - Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) para o ($\pm$)-acetato de 1-(4-bromofenil)-2,2,2-trifluoroetila 12b .	169
Figura 2.64 - Espectro de RMN de ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) para o ($\pm$)-acetato de 1-(4-bromofenil)-2,2,2-trifluoroetila 12b .	170
Figura 2.65 - Espectro de RMN de ^{19}F (470 MHz, CDCl_3) para o ($\pm$)-acetato de 1-(4-bromofenil)-2,2,2-trifluoroetila 12b .	170
Figura 2.66 - Conformação de etanonas fluoradas.	172
Figura 2.67 - Cromatogramas obtidos por GC-FID da resolução enzimática do ($\pm$)-1-(2-trifluorometil)feniletanol 13a pela lipase de <i>C. antarctica</i> em agitador orbital em tolueno. (a) Padrão do ($\pm$)-1-(2-trifluorometil)feniletanol 13a . (b) Padrão do ($\pm$)-acetato de 1-(2-trifluorometil)feniletila 13b . (c) 192 h de reação.	173
Figura 2.68 - Cromatogramas obtidos por GC-FID da resolução enzimática do ($\pm$)-1-(2-trifluorometil)feniletanol 13a pela lipase de <i>C. antarctica</i> por irradiação micro-ondas em tolueno. (a) Padrão do ($\pm$)-1-(2-trifluorometil)feniletanol 13a . (b) Padrão do ($\pm$)-acetato de 1-(2-trifluorometil)feniletila 13b . (c) 8 h de reação.	174
Figura 2.69 - Espectro de absorção na região de infravermelho (cm^{-1}) para o ($\pm$)-1-(2-trifluorometil)feniletanol 13a .	175
Figura 2.70 - Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) para o ($\pm$)-1-(2-trifluorometil)feniletanol 13a .	176
Figura 2.71 - Espectro de RMN de ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) para o ($\pm$)-1-(2-trifluorometil)feniletanol 13a .	176
Figura 2.71a - Espectro ampliado de RMN de ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) para o ($\pm$)-1-(2-trifluorometil)feniletanol 13a .	177
Figura 2.72 - Espectro de RMN de ^{19}F (470 MHz, CDCl_3) para o ($\pm$)-1-(2-trifluorometil)feniletanol 13a .	178
Figura 2.73 - Espectro de massas de alta resolução para o ($\pm$)-1-(2-trifluorometil)feniletanol 13a .	178
Figura 2.74 - Espectro de absorção na região de infravermelho (cm^{-1}) para o ($\pm$)-acetato de 1-(2-trifluorometil)feniletila 13b .	180
Figura 2.75 - Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) para o ($\pm$)-acetato de 1-(2-trifluorometil)feniletila 13b .	180
Figura 2.76 - Espectro de RMN de ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) para o ($\pm$)-acetato de 1-(2-trifluorometil)feniletila 13b .	181
Figura 2.76a - Espectro ampliado de RMN de ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) para o ($\pm$)-acetato de 1-(2-trifluorometil)feniletila 13b .	182
Figura 2.76b - Espectro ampliado de RMN de ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) para o ($\pm$)-acetato de 1-(2-trifluorometil)feniletila 13b .	183
Figura 2.77 - Espectro de RMN de ^{19}F (470 MHz, CDCl_3) para o ($\pm$)-acetato de 1-(2-trifluorometil)feniletila 13b .	184
Figura 2.78 - Espectro de massas de alta resolução para o ($\pm$)-acetato de 1-(2-trifluorometil)feniletila 13b .	184

CAPÍTULO 3

Figura 3.1 - Transferência de um íon hidreto da coenzima NADPH para um composto carbonílico. R = grupo pequeno (CH ₃ , CF ₃). R` = grupo grande (Ph, <i>m</i> -Ph).	191
Figura 3.2 - Compostos bioativos de importância farmacológica que contém átomos de flúor.	192
Figura 3.3 - Colônias do fungo <i>M. racemosus</i> CBMAI 847 em meio sólido e líquido.	198
Figura 3.4 - Foto do agitador em banho-maria Dubnoff. (a) Foto externa do agitador em banho-maria. (b) Foto interna do agitador em banho-maria.	200
Figura 3.5 - Procedimento experimental para realização das reações de redução em agitador orbital e por irradiação micro-ondas para o fungo <i>M. racemosus</i> CBMAI 847.	201
Figura 3.6 - Colônias de bactérias termofílicas isoladas de compostagem do Jardim Zoológico de São Paulo.	202
Figura 3.7 - Cetonas fluoradas utilizadas nas reações de biorredução com as bactérias termofílicas.	203
Figura 3.8 - Representação do método das diluições sucessivas para determinar a concentração em UFC/mL.	204
Figura 3.9 - Procedimento experimental para realização das reações de redução em agitador orbital e por irradiação micro-ondas para as bactérias termofílicas.	206
Figura 3.10 - Cromatogramas obtidos por GC-FID da biorredução com o fungo <i>M. racemosus</i> da 2,2,2-trifluoro-1-feniletanona 9 . (a) Padrão da 2,2,2-trifluoro-1-feniletanona 9 . (b) Padrão do (±)-2,2,2-trifluoro-1-feniletanol 9a . (c) Reação em agitador orbital com 6 h. (d) Reação em micro-ondas com 6 h.	208
Figura 3.11 - Cromatogramas obtidos por GC-FID da biorredução com o fungo <i>M. racemosus</i> da 2,2,2-trifluoro-1-feniletanona 9 . (a) Padrão da 2,2,2-trifluoro-1-feniletanona 9 . (b) Padrão do (±)-2,2,2-trifluoro-1-feniletanol 9a . (c) Reação em agitador orbital com 6 h na concentração de 2,9 mmol/L. (d) Reação por irradiação micro-ondas com 6 h na concentração de 5,7 mmol/L.	210
Figura 3.12 . Cromatogramas obtidos por GC-FID da biorredução com o fungo <i>M. racemosus</i> da 2,2,2-trifluoro-1-feniletanona 9 por irradiação micro-ondas. (a) Padrão da 2,2,2-trifluoro-1-feniletanona 9 . (b) Padrão do (±)-2,2,2-trifluoro-1-feniletanol 9a . (c) Reação com 6 h na concentração de 2,9 mmol/L. (d) Reação com 6 h na concentração de 5,7 mmol/L.	211
Figura 3.13 - Cromatogramas obtidos por GC-FID da biorredução com o fungo <i>M. racemosus</i> da 2,2,2-trifluoro-1-feniletanona 9 . (a) Padrão da 2,2,2-trifluoro-1-feniletanona 9 . (b) Padrão do (±)-2,2,2-trifluoro-1-feniletanol 9a . (c) Reação em agitador orbital com 6 h na concentração de 5,7 mmol/L (50 °C, 130 rpm). (d) Reação por irradiação micro-ondas com 6 h na concentração de 5,7 mmol/L (50 °C, 200 W).	212

Figura 3.14 - Cromatogramas obtidos por GC-FID da biorredução com a bactéria termofílica SPZSP005. (a) Análise do solvente (acetato de etila). (b) Padrão da 1-(2-trifluorometil)fenil)etanona 13 . (b) Padrão do (±)-1-2-(trifluorometil)feniletanol 13a . (c) Reação em agitador orbital (5,2 mmol/L, 96 h, 45 °C).	214
Figura 3.15 - Cromatogramas obtidos por GC-FID da biorredução com a bactéria termofílica SPZSP005. (a) Padrão da 1-(4-bromofenil)-2,2,2-trifluoroetanona 12 . (b) Padrão do (±)-1-(4-bromofenil)-2,2,2-trifluoroetanol 12a . (c) Reação em agitador orbital (5,2 mmol/L, 96 h, 45 °C).	214
Figura 3.16 - Cromatogramas obtidos por GC-FID da biorredução com a bactéria termofílica SPZSP005. (a) Análise do solvente (acetato de etila). (b) Padrão da 2,2,2-trifluoro-1-feniletanona 9 . (c) Padrão do (±)-2,2,2-trifluoro-1-feniletanol 9a . (d) Reação em agitador orbital (5,6 mmol/L, 24 h, 45 °C). (e) Reação em agitador orbital (5,6 mmol/L, 96 h, 45 °C).	216
Figura 3.17 - Cromatogramas obtidos por GC-FID da biorredução com a bactéria termofílica SPZSP005. (a) Padrão da 2,2,2-trifluoroacetofenona 9 . (b) Padrão do (±)-2,2,2-trifluoro-1-feniletanol 9a . (c) Reação antes da amostra ser irradiada (5,6 mmol/L, 45 °C). (d) Reação por irradiação micro-ondas (5,5 mmol/L, 6 h, 45 °C).	217
Figura 3.18 - Cromatogramas obtidos por GC-FID da biorredução com a bactéria termofílica SPZSP005. (a) Análise do solvente. (b) Padrão da 1-(2,4,5-trifluorofenil)etanona 10 . (c) Padrão do (±)-1-(2,4,5-trifluorofenil)etanol 10a . (d) Reação em agitador orbital (6 mmol/L, 24 h, 45 °C). (c) Reação em agitador orbital (6 mmol/L, 96 h, 45 °C).	218
Figura 3.19 - Cromatogramas obtidos por GC-FID da biorredução com a bactéria termofílica SPZSP005. (a) Padrão da 1-(2,4,5-trifluorofenil)etanona 10 . (c) Padrão do (±)-1-(2,4,5-trifluorofenil)etanol 10a . (d) Reação antes da amostra ser irradiada em micro-ondas (6 mmol/L, 6 h, 45 °C). (c) Reação após a amostra ser irradiada em micro-ondas (6 mmol/L, 6 h, 45 °C).	219
Figura 3.20 - Cromatogramas obtidos por GC-FID da biorredução da cetona 12 com a bactéria termofílica SPZSP088. (a) Padrão da 1-(4-bromofenil)-2,2,2-trifluoroetanona 12 . (b) Padrão do (±)-1-(4-bromofenil)-2,2,2-trifluoroetanol 12a . (c) Reação em agitador orbital (5,2 mmol/L, 144 h, 45 °C).	220
Figura 3.21 - Cromatogramas obtidos por GC-FID da biorredução da cetona 13 com a bactéria termofílica SPZSP088. (a) Padrão da 1-2-(trifluorometil)acetofenona 13 . (b) Padrão do (±)-1-2-(trifluorometil)feniletanol 13a . (c) Reação em agitador orbital (5,2 mmol/L, 144 h, 45 °C).	220
Figura 3.22 - Cromatogramas obtidos por GC-FID da biorredução da cetona 9 com a bactéria termofílica SPZSP088. (a) Padrão da 2,2,2-trifluoro-1-feniletanona 9 . (b) Padrão do (±)-2,2,2-trifluoro-1-feniletanol 9a . (c) Reação em agitador orbital (5,6 mmol/L, 120 h, 45 °C).	222
Figura 3.23 - Cromatogramas obtidos por GC-FID da biorredução da	222

cetona **9** com a bactéria termofílica SPZSP088. (a) Padrão da 2,2,2-trifluoro-1-feniletanona **9**. (b) Padrão do (±)-2,2,2-trifluoro-1-feniletanol **9a**. (c) Reação antes de ser irradiada por micro-ondas (5,6 mmol/L, 6 h, 45 °C). (d) Reação após ser irradiada (5,6 mmol/L, 6 h, 45 °C).

Figura 3.24 - Cromatogramas obtidos por GC-FID da biorredução da cetona **10** com a bactéria termofílica SPZSP088. (a) Padrão da 1-(2,4,5-trifluorofenil)etanona **10**. (b) Padrão do (±)-2,4,5-trifluoro-1-feniletanol **10a**. (c) Reação em agitador orbital (6 mmol/L, 120 h, 45 °C). (d) Reação em agitador orbital (6 mmol/L, 144 h, 45 °C). 224

Figura 3.25 - Cromatogramas obtidos por GC-FID da biorredução da cetona **10** com a bactéria termofílica SPZSP088. (a) Padrão da 1-(2,4,5-trifluorofenil)etanona **10**. (b) Padrão do (±)-2,4,5-trifluoro-1-feniletanol **10a**. (c) Reação após ser irradiada por micro-ondas (6 mmol/L, 6 h, 45 °C). 224

Figura 3.26 - Cromatogramas obtidos por GC-FID da biorredução com a bactéria termofílica SPZSP051. (a) Padrão da 4-bromo-2,2,2-trifluoroacetofenona **12**. (b) Padrão do (±)-1-(4-bromofenil)-2,2,2-trifluoroetanol **12a**. (c) Reação em agitador orbital (5,2 mmol/L, 24 h, 45 °C). (d) Reação em agitador orbital (5,2 mmol/L, 144 h, 45 °C). 225

Figura 3.27 - Cromatogramas obtidos por GC-FID da biorredução da cetona **13** com a bactéria termofílica SPZSP051. (a) Padrão da 1-2-(trifluorometil)acetofenona **13**. (b) Padrão do (±)-1-2-(trifluorometil)feniletanol **13a**. (c) Reação em agitador orbital (5,2 mmol/L, 24 h, 45 °C). (d) Reação em agitador orbital (5,2 mmol/L, 144 h, 45 °C). 226

Figura 3.28 - Cromatogramas obtidos por GC-FID da biorredução da cetona **9** com a bactéria termofílica SPZSP051. (a) Padrão da 2,2,2-trifluoro-1-feniletanona **9**. (b) Padrão do (±)-2,2,2-trifluoro-1-feniletanol **9a**. (c) Reação em agitador orbital (5,6 mmol/L, 24 h, 45 °C). (d) Reação em agitador orbital (5,6 mmol/L, 144 h, 45 °C). 227

Figura 3.29 - Cromatogramas obtidos por GC-FID da biorredução da cetona **9** com a bactéria termofílica SPZSP051. (a) Padrão da 2,2,2-trifluoro-1-feniletanona **9**. (b) Padrão do (±)-2,2,2-trifluoro-1-feniletanol **9a**. (c) Reação antes de ser irradiada por micro-ondas (5,6 mmol/L, 6 h, 45 °C). (d) Reação após ser irradiada por micro-ondas (5,6 mmol/L, 6 h, 45 °C). 228

Figura 3.30 - Cromatogramas obtidos por GC-FID da biorredução da cetona **10** com a bactéria termofílica SPZSP051. (a) Padrão da 1-(2,4,5-trifluorofenil)etanona **10**. (b) Padrão do (±)-2,4,5-trifluoro-1-feniletanol **10a**. (c) Reação em agitador orbital (6 mmol/L, 24 h, 45 °C). (d) Reação em agitador orbital (6 mmol/L, 72 h, 45 °C). (e) Reação em agitador orbital (6 mmol/L, 144 h, 45 °C). 229

Figura 3.31 - Cromatogramas obtidos por GC-FID da biorredução da cetona **10** com a bactéria termofílica SPZSP051. (a) Padrão da 1-(2,4,5-trifluorofenil)etanona **10**. (b) Padrão do (±)-2,4,5-trifluoro-1-feniletanol **10a**. (c) Reação por irradiação micro-ondas (6 mmol/L, 6 h, 45 °C). 230

Figura 3.32 - Cromatogramas obtidos por GC-FID da biorredução da 232

cetona **9** com a bactéria termofílica SPZSP055. (a) Padrão da 2,2,2-trifluoro-1-feniletanona **9**. (b) Padrão do ($\pm$)-2,2,2-trifluoro-1-feniletanol **9a**. (c) Reação em agitador orbital (5,6 mmol/L, 24 h, 45 °C). (d) Reação em agitador orbital (5,6 mmol/L, 72 h, 45 °C). (e) Reação em agitador orbital (5,6 mmol/L, 144 h, 45 °C).

Figura 3.33 - Cromatogramas obtidos por GC-FID da biorredução da cetona **9** com a bactéria termofílica SPZSP055. (a) Padrão da 2,2,2-trifluoro-1-feniletanona **9**. (b) Padrão do ($\pm$)-2,2,2-trifluoro-1-feniletanol **9a**. (c) Reação antes da amostra ser irradiada (5,6 mmol/L, 45 °C). (d) Reação após a amostra ser irradiada por micro-ondas (5,6 mmol/L, 6 h, 45 °C).

Figura 3.34 - Cromatogramas obtidos por GC-FID da biorredução da cetona **10** com a bactéria termofílica SPZSP055. (a) Padrão da 1-(2,4,5-trifluorofenil)etanona **10**. (b) Padrão do ($\pm$)-2,4,5-trifluoro-1-feniletanol **10a**. (c) Reação em agitador orbital (6 mmol/L, 24 h, 45 °C). (d) Reação em agitador orbital (6 mmol/L, 72 h, 45 °C). (e) Reação em agitador orbital (6 mmol/L, 144 h, 45 °C).

Figura 3.35 - Cromatogramas obtidos por GC-FID da biorredução da cetona **10** com a bactéria termofílica SPZSP055. (a) Padrão da 1-(2,4,5-trifluorofenil)etanona **10**. (b) Padrão do ($\pm$)-2,4,5-trifluoro-1-feniletanol **10a**. (c) Reação após ser irradiada por micro-ondas (6 mmol/L, 6 h, 45 °C).

CAPÍTULO 4

Figura 4.1 - Aminoálcoois utilizados como fármacos contendo grupamento amino.

Figura 4.2 - Reação da cetona **1** com a amina **2** em metanol em agitador orbital (48 h, 33 °C, 133 rpm). (a) Padrão da cetona **1**. (b) Padrão amina **2**. (c) Presença de lipase. (b) Ausência de lipase.

Figura 4.3 - Gráficos da reação da cetona **1** com a amina **2** em metanol por agitação orbital em diferentes tempos reacionais (33°C, 133 rpm). (a) Presença de lipase. (b) Ausência de lipase.

Figura 4.4 - Reação da cetona **1** com a amina **2** em hexano em agitador orbital (48 h, 33 °C, 133 rpm). (a) Presença de lipase. (b) Ausência de lipase.

Figura 4.5 - Gráficos da reação da cetona **1** com a amina **2** em hexano por agitação orbital em diferentes tempos reacionais (33 °C, 133 rpm). (a) Presença de lipase. (b) Ausência de lipase.

Figura 4.6 - Reação da cetona **1** com a amina **2** em éter etílico em agitador orbital (48 h, 33 °C, 133 rpm). (a) Presença de lipase. (b) Ausência de lipase.

Figura 4.7 - Gráfico da reação da cetona **1** com a amina **2** em éter etílico por agitação orbital em diferentes tempos reacionais (33 °C, 133 rpm). (a) Presença de lipase. (b) Ausência de lipase.

Figura 4.8 - Reação da cetona **1** com a amina **2** em diclorometano em agitador orbital (48 h, 33 °C, 133 rpm). (a) Presença de lipase. (b) Ausência de lipase.

Figura 4.9 - Gráfico da reação da cetona **1** com a amina **2** em diclorometano

por agitação orbital em diferentes tempos reacionais (33 °C, 133 rpm). (a) Presença de lipase. (b) Ausência de lipase.	
Figura 4.10 - Reação da cetona 1 com a amina 2 em tolueno em agitador orbital (48 h, 33 °C, 133 rpm). (a) Presença de lipase. (b) Ausência de lipase.	257
Figura 4.11 - Gráficos da reação da cetona 5 com a amina 6 em tolueno por agitação orbital em diferentes tempos reacionais (33 °C, 133 rpm). (a) Presença de lipase. (b) Ausência de lipase.	257
Figura 4.12 - Placa de CCD obtida da reação entre a cetona 1 e a amina 2 por agitação orbital após 24 horas de reação em hexano.	259
Figura 4.13 Cromatograma e espectros de massas (70 eV) obtidos por GC-MS para a reação da cetona 1 com a amina 2 em hexano por agitação orbital por 4 dias (33 °C, 133 rpm). (a) Padrão da cetona 1 . (b) Padrão da amina 2 . (c) Espectro de massas obtido a partir do sinal com tempo de retenção em 14,5 minutos. (d) Espectro de massas obtido a partir do sinal com tempo de retenção em 15,9 minutos.	262
Figura 4.14 - Reação da cetona 1 com a amina 5 em metanol em agitador orbital (24 h, 33 °C, 133 rpm). (a) Padrão da amina 2 . (b) Padrão da cetona 5 . (c) Presença de lipase. (d) Ausência de lipase.	266
Figura 4.15 - Gráficos da reação da amina 1 com a cetona 2 em metanol por agitação orbital em diferentes tempos reacionais (33°C, 130 rpm). (a) Presença de lipase. (b) Ausência de lipase.	266
Figura 4.16 - Reação da cetona 5 com a amina 2 em hexano em agitador orbital (24 h, 33 °C, 133 rpm). (a) Presença de lipase. (b) Ausência de lipase.	267
Figura 4.17 - Gráficos da reação da amina 2 e com a cetona 5 em hexano por agitação orbital em diferentes tempos reacionais (33°C, 133 rpm). (a) Presença de lipase. (b) Ausência de lipase.	268
Figura 4.18 - Reação da cetona 5 com a amina 2 na presença de CALB em metanol por irradiação micro-ondas (2 h, 33 °C, 133 rpm).	269
Figura 4.19 - Reação da cetona 5 com a amina 2 em metanol por irradiação micro-ondas (2 h, 50 °C, 133 rpm). (a) Presença de lipase. (b) Ausência de lipase.	270
Figura 4.20 - Cromatograma e espectros de massas (70 eV) obtidos por GC-MS. (a) Amina 2 . (b) Cetona 5 . (c) Espectro obtido a partir do sinal com tempo de retenção em 15,9 minutos do cromatograma obtido da reação enzimática entre a amina 2 e a cetona 5 em hexano 24 h em agitação orbital.	271
Figura 4.21 - Cromatogramas obtidos por CG-FID. (a) Padrão da benzilamina 2 . (b) Padrão da 2,5-dimetil- <i>p</i> -benzoquinona 8 . (c) Reação de adição de Michael após 5 horas em agitador orbital e hexano (33 °C, 133 rpm).	273
Figura 4.22 - Cromatograma obtido por GC-MS da reação enzimática entre a benzilamina 2 e a benzoquinona 8 por agitação orbital após 4 dias (33°C, 133 rpm).	273
Figura 4.23 - Cromatogramas obtidos por CG-MS (70 eV). (a) Reação não	274

enzimática por irradiação micro-ondas (3 h, 60 °C, 70 W). (b) Reação enzimática por irradiação micro-ondas (5 h, 60 °C, 70 W).

Figura 4.24 - Cromatograma e espectros de massas (70 eV) obtidos por GC-MS da reação de aza-Michael entre a benzilamina **2** e a benzoquinona **8** por irradiação micro-ondas após 5 horas. (a) Benzilamina **2**. (b) Benzoquinona **8**. (c) Espectro de massas obtido no tempo de retenção de 15,0 minutos. (d) Espectro de massas obtido no tempo de retenção de 19,0 minutos. (e) Espectro da amida **11**. (f) Espectro do benzaldeído **12**. 277

Figura 4.25 - Cromatogramas obtidos por GC-MS (70 eV) (a) Análise da reação entre a amina **2** e a cetona **8** após reunião das reações em triplicata por agitação orbitalar (4 dias) e micro-ondas (5 h). (b) Análise da reação após extração em acetato de etila e água após 24 horas. 278

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1

Tabela 1.1 - Dados de ponto de ebulição, constante dielétrica (ϵ'), perda dielétrica (ϵ'') e $\tan \delta$ para alguns solventes orgânicos.	43
Tabela 1.2 - Prós e contras do uso de enzimas isoladas e sistemas de células íntegras.	46
Tabela 1.3 - Classificação das enzimas segundo a União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular (UIBBM).	48

CAPÍTULO 2

Tabela 2.1 - Resolução enzimática da <i>sec</i> -butilamina em agitação orbital e por irradiação micro-ondas em diferentes solventes, utilizando como biocatalisador a lipase de <i>Aspergillus niger</i> .	62
Tabela 2.2 - Resolução cinética dinâmica de <i>N</i> -acil-hemiaminais com as lipases de <i>Pseudomonas cepacia</i> e <i>Pseudomonas fluorescens</i> .	64
Tabela 2.3 - Desracemização combinada à hidrólise enzimática de acetatos benzílicos secundários utilizando a reação de Mitsunobu.	68
Tabela 2.4 - Hidrólise enzimática de 2-aciloxi-2-(pentafluorofenil)acetonitrilas com diferentes lipases.	76
Tabela 2.5 - Resolução enzimática de haloidrinas racêmicas pela lipase PS-30.	77
Tabela 2.6 - Resolução quimioenzimática de trifluoro(aril)etanois por lipases.	79
Tabela 2.7 - Hidrólise enzimática da 2-fluoro-2- fenilalquílicos pela lipase <i>P. cepacia</i> .	80
Tabela 2.8 - Resolução enzimática da ($\pm$)-mandelonitrila 1a em agitador orbital e irradiação micro-ondas com a lipase de <i>C. antarctica</i> .	97
Tabela 2.9 - Resolução enzimática da ($\pm$)-2-(4-clorofenil)-2-hidroxiacetonitrila 2a em agitador orbital e irradiação micro-ondas com a lipase de <i>C. antarctica</i> .	105
Tabela 2.10 - Resolução enzimática da ($\pm$)-2-hidroxi-2-(4-hidroxifenil)acetonitrila 3a em agitador orbital e por irradiação micro-ondas com a lipase de <i>C. antarctica</i> .	107
Tabela 2.11 - Resolução enzimática da ($\pm$)-2-hidroxibutanonitrila 4a em agitador orbital com a lipase de <i>C. antarctica</i> .	113
Tabela 2.12 - Resolução enzimática da ($\pm$)-2-(4-fluorofenil)-2-hidroxiacetonitrila 5a em agitador orbital e por irradiação micro-ondas com a lipase de <i>C. antarctica</i> .	115
Tabela 2.13 - Resolução enzimática da ($\pm$)-2-hidroxi-2-(4-metoxifenil)acetonitrila 6a em agitador orbital e por irradiação micro-ondas com a lipase de <i>C. antarctica</i> .	119

Tabela 2.14 - Resolução enzimática da (±)-2-hidroxi-2-(3-metoxifenil)acetonitrila 6a em agitador orbital e por irradiação micro-ondas com a lipase de <i>C. antarctica</i> .	121
Tabela 2.15 - Resolução enzimática da (±)-(E)-2-hidroxi-4-fenilbut-3-enonitrila 8a em agitador orbital e por irradiação micro-ondas com a lipase de <i>C. antarctica</i> .	124
Tabela 2.16 - Resolução enzimática do (±)-2,2,2-trifluoro-1-feniletanol 9a em agitador orbital e por irradiação micro-ondas com a lipase de <i>C. antarctica</i> .	129
Tabela 2.17 - Resolução enzimática do (±)-1-(2,4,5-trifluorofenil)etanol 10a em agitador orbital e por irradiação micro-ondas com a lipase de <i>C. antarctica</i> .	137
Tabela 2.18 - Resolução enzimática do (±)-1-(3-bromofenil)-2,2,2-trifluoroetanol 11a em agitador orbital e por irradiação micro-ondas com a lipase de <i>C. antarctica</i> .	153
Tabela 2.19 - Resolução enzimática do (±)-1-(4-bromofenil)-2,2,2-trifluoroetanol 12a em agitador orbital e por irradiação micro-ondas com a lipase de <i>C. antarctica</i> .	163
Tabela 2.20 - Resolução enzimática do (±)-1-(2-trifluorometil)feniletanol 13a em agitador orbital e por irradiação micro-ondas com a lipase de <i>C. antarctica</i> .	171
Tabela 2.21 - Resolução enzimática dos compostos 1a-13a em agitador orbital (A.O.) e por irradiação micro-ondas (M.O.) em solvente tolueno com a lipase de <i>C. antarctica</i> .	185
Tabela 2.22 - Dados de rotação óptica dos álcoois 1a-13a e acetatos 1b-13b .	186

CAPÍTULO 3

Tabela 3.1 - Redução da 1-(2-bromo-4-fluorofenil)etanona por diferentes micro-organismos.	195
Tabela 3.2 - Reação de biorredução da 2,2,2-trifluoro-1-feniletanona 9 com o fungo marinho <i>M. racemosus</i> CBMAI 847 em agitador orbital (6 h, 32 °C, 130 rpm, pH 8) e por irradiação micro-ondas (6 h, 40 °C, 200 W, pH 8).	210
Tabela 3.3 - Reação de biorredução da 2,2,2-trifluoro-1-feniletanona 9 com a bactéria termofílica SPZSP005 em agitador orbital e por irradiação micro-ondas.	215
Tabela 3.4 - Reação de biorredução da 1-(2,4,5-trifluorofenil)etanona 10 com a bactéria termofílica SPZSP005 em agitador orbital.	218
Tabela 3.5 - Reação de biorredução da 2,2,2-trifluoro-1-feniletanona 9 com a bactéria termofílica SPZSP088 em agitador orbital e por irradiação micro-ondas.	221
Tabela 3.6 - Reação de biorredução da 1-(2,4,5-trifluorofenil)etanona 10 com a bactéria termofílica SPZSP088 em agitador orbital.	223
Tabela 3.7 - Reação de biorredução da 2,2,2-trifluoro-1-feniletanona 9 com a	227

bactéria termofílica SPZSP051 em agitador orbital e por irradiação micro-ondas.

Tabela 3.8 - Reação de biorredução da 1-(2,4,5-trifluorofenil)etanona **10** com a bactéria termofílica SPZSP051 em agitador orbital. 229

Tabela 3.9 - Reação de biorredução da 2,2,2-trifluoro-1-feniletanona **9** com a bactéria termofílica SPZSP055 em agitador orbital e por irradiação micro-ondas. 231

Tabela 3.10 - Reação de biorredução da 1-(2,4,5-trifluorofenil)etanona **10** com a bactéria termofílica SPZSP055 em agitador orbital. 234

CAPÍTULO 4

Tabela 4.1 - Adição de aza-Michael catalisada por CALB. 241

Tabela 4.2 - Adição aza-Michael entre aminas com acrilato de metila usando como catalisador o líquido iônico [TMG][Lac]. 242

Tabela 4.3 - Reações de adição de Michael entre a cetona **1** e a amina **2** descritos na literatura. 264

LISTA DE ESQUEMAS

CAPÍTULO 1

Esquema 1.1 - Reação de hidrólise da benzamida realizada por Geyde em 1986. a) Aquecimento convencional. b) Por forno micro-ondas doméstico.	37
Esquema 1.2 - Formação da ligação peptídica entre dois aminoácidos.	47
Esquema 1.3 - Redução enantiosseletiva de uma cetona fluorada catalisada pela a bactéria <i>Bacillus</i> sp. ECU0013.	54
Esquema 1.4 - Hidroxilação regioseletiva do flavonoide quercetina pelo fungo <i>Agrocybe aegerita</i> .	55
Esquema 1.5 - Redução quimiosseletiva via desalogenação redutiva da 3-bromo-6-fenil-hex-3-en-2-ona com o fungo <i>Pichia stipitis</i> .	55
Esquema 1.6 - Reação geral de hidrólise de triglicerídeos.	56
Esquema 1.7 - Etapas do ciclo catalítico de uma reação de acilação enantiosseletiva de álcoois quirais secundários mediada pela lipase de <i>Candida antarctica</i> .	58

CAPÍTULO 2

Esquema 2.1 - Resolução enzimática <i>sec</i> -butilamina em agitação orbitalar e por irradiação micro-ondas, utilizando como biocatalisador a lipase <i>Aspergillus niger</i> .	62
Esquema 2.2 - Resolução cinética dinâmica de <i>N</i> -acil-hemiaminais com as lipases de <i>Pseudomonas cepacia</i> e <i>Pseudomonas fluorescens</i> .	64
Esquema 2.3 - RCD do 1-feniletanol com a lipase de <i>Pseudomonas fluorescens</i> , seguida de racemização por catalisador metálico de rutênio.	65
Esquema 2.4 - Síntese racêmica do (±)- <i>anti</i> -3-metil-pentano-1,4-diol, seguida de uma resolução cinética com CALB obtendo os diastereoisômeros, seguida de redução com LiAlH ₄ .	66
Esquema 2.5 - Reação de Mitsunobu.	67
Esquema 2.6 - Desracemização combinada à hidrólise enzimática do (±)-acetato benzílico utilizando a reação de Mitsunobu.	67
Esquema 2.7 - Resolução enzimática do 1-feniletanol pela lipase Steapsin e representação dos grupos grande e pequeno segundo regra de Kazlauskas.	70
Esquema 2.8 - Resolução enzimática do (±)-2-octanol por irradiação micro-ondas.	72
Esquema 2.9 - Resolução enzimática do (±)-1-(1-naftil)etanol por irradiação micro-ondas e aquecimento convencional.	72
Esquema 2.10 - Resolução cinética de álcoois secundários catalisada por CALB na presença da irradiação micro-ondas e aquecimento convencional.	73
Esquema 2.11 - Síntese do miristato de isoamila em sistema livre de solvente por irradiação micro-ondas.	74
Esquema 2.12 - Síntese da (<i>R</i>)-ciano-hidrina catalisada pela <i>R</i> -PaHNL.	75
Esquema 2.13 - Hidrólise enzimática de 2-aciloxi-2-(pentafluorofenil)acetonitrilas com diferentes lipases.	76

Esquema 2.14 - Resolução enzimática de haloidrinas racêmicas pela lipase PS-30.	76
Esquema 2.15 - Resolução quimioenzimática de trifluoro(aril)etanois por lipases.	78
Esquema 2.16 - Resolução cinética dinâmica do (<i>R</i>)-1-(3,5-bis-trifluorometilfenil)etanol com CALB.	79
Esquema 2.17 - Hidrólise enzimática da 2-fluoro-2-fenilalquílicos pela lipase de <i>P. cepacia</i> .	80
Esquema 2.18 - Síntese das ciano-hidrinas 2a-3a .	86
Esquema 2.19 - Síntese das ciano-hidrinas 5a-8a .	87
Esquema 2.20 - Síntese dos álcoois racêmicos 9a-13a .	88
Esquema 2.21 - Síntese dos acetatos recêmicos 1b-13b .	89
Esquema 2.22 - Proposta de equilíbrio envolvendo a reação enzimática via decomposição espontânea da (<i>R</i>)-mandelonitrila 1a em benzaldeído e HCN. O equilíbrio espontâneo favoreceu o enriquecimento do (<i>S</i>)-mandelonitrila 1b .	99
Esquema 2.23 - Hidrólise assimétrica da 3-hidroxi-4-fenoxibutanonitrila catalisada pela <i>Rhodococcus</i> sp. levando a formação de (<i>S</i>)-álcoois, (<i>R</i>)-amidas e (<i>S</i>)-ácidos.	112
Esquema 2.24 - Proposta de equilíbrio envolvendo a reação enzimática da ($\pm$)-2-(4-fluorofenil)-2-hidroxiaetonitrila 5a . O equilíbrio espontâneo favoreceu a formação do 4-fluorobenzaldeído.	116

CAPÍTULO 3

Esquema 3.1 - Reação de redução catalisada por desidrogenases.	190
Esquema 3.2 - Produção do <i>Aspartame</i> produzido a partir de enzimas ou células microbianas imobilizadas.	191
Esquema 3.3 - Redução da 3,5-di(trifluorometil)acetofenona ao correspondente (<i>S</i>)-3,5-di(trifluorometil)-1-feniletanol pela bactéria <i>Rhodococcus erythropolis</i> .	193
Esquema 3.4 - Redução da 3,5-di(trifluorometil)acetofenona pela bactéria <i>Chryseobacterium</i> sp. CA49.	194
Esquema 3.5 - Produção dos enantiômeros (<i>S</i>) e (<i>R</i>)-1-(3-trifluorometil)fenil)etanol pelo fungo <i>Candida parapsilios</i> e pela bactéria <i>Lactobacillus kefir</i> , respectivamente.	194
Esquema 3.6 - Síntese do (<i>S</i>)-1-(2-bromo-4-fluorofenil)etanol por ADHs de diferentes micro-organismos.	195
Esquema 3.7 - Redução do ácido (<i>R</i>)-3-flúor-4-(2-oxo-2-(5,5,8,8-tetrametil-5,6,7,8-tetraidronaftalen-2-il)acetoamido)benzoico pelo extrato celular de <i>Aureobasidium pullulans</i> SC 13848.	195
Esquema 3.8 - Redução da 1-(4-bromofenil)-2,2,2-trifluoroetanona pelo extrato celular de <i>Geotrichum candidum</i> .	196
Esquema 3.9 - Ordem de prioridade segundo a Regra de Cahn-Ingold-Prelog para prever a configuração absoluta dos álcoois secundários.	208

CAPÍTULO 4

Esquema 4.1 - Reação de adição nucleofílica simples e conjugada em sistemas α,β -insaturados.	238
Esquema 4.2 - Reação de adição de aza-Michael.	239
Esquema 4.3 - Adição de aza-Michael de aminas alifáticas secundárias a acrilatos catalisada por CALB.	241
Esquema 4.4 - Adição aza-Michael entre aminas com acrilato de metila usando como catalisador o líquido iônico [TMG][Lac].	241
Esquema 4.5 - Reação aza-Michael catalisada por $\text{HClO}_4/\text{SiO}_2$ por irradiação micro-ondas.	242
Esquema 4.6 - Reação aza-Michael catalisada por K_2CO_3 por irradiação micro-ondas.	243
Esquema 4.7 - Reação aza-Michael seguida de adição retro-Michael para síntese do <i>E</i> -aldoxima.	243
Esquema 4.8 - Reação de adição de Michael entre a cetona 1 e amina 2 catalisada por CALB em agitador orbital e por irradiação micro-ondas.	251
Esquema 4.9 - Adição de Michael catalisada por CALB por diferentes aminas e acrilatos.	258
Esquema 4.10 - Reação retro-Michael do aduto 4 catalisada em meio ácido.	260
Esquema 4.11 Provável clivagem da ligação β do anel aromático fornecendo o íon tropílio.	263
Esquema 4.12 - Reação de adição de Michael entre a amina 2 e a cetona 5 .	265
Esquema 4.13 - Reação de adição de Michael entre a benzilamina 6 e benzoquinona 8 .	272
Esquema 4.14 - Representação do íon molecular e do segundo fragmento mais abundante obtido no espectro de massas da imina 9 .	275
Esquema 4.15 - Proposta de reação para formação da imina 10 frente a reação em micro-ondas (5 h) e agitador orbital (96 h).	276
Esquema 4.16 - Extração da reação de aza-Michael com acetato de etila e água (agitador orbital, 24 h, 33 °C, 133 rpm).	279
Esquema 4.17 - Acetilação da amina 2 com acetato de etila.	279

LISTADE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

CAQI	Central de análises químicas e instrumentais
CALB	Lipase de <i>Candida antarctica</i> fração B
CCD	Cromatografia em camada delgada
d	Dubleto
dd	Duplo dubleto
ddd	Duplo duplo dubleto
dt	Duplo tripleto
m	Multipleto
pi	Piridina
q	Quarteto
r	Taxa de aquecimento por minuto
s	Singleto
t	Tripleto
t.a.	Temperatura ambiente
t _c	Tempo de corrida
t _i	Temperatura inicial
t _r	Tempo de reação
δ	Deslocamento químico
q	Quarteto

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1	36
1. Micro-ondas e Biocatálise	36
1.1 Surgimento da irradiação micro-ondas	36
1.2 Fundamentos sobre a irradiação micro-ondas	38
1.3 Biocatálise	45
1.3.1 Enzimas	47
1.3.2 Lipases	55
CAPÍTULO 2	60
2. Resolução enzimática de compostos organofluorados e cianídricos por lipase de <i>Candida antarctica</i> (CALB)	60
2.1. Síntese de álcoois enantiomericamente puros ou enriquecidos por biocatálise	60
a) Resolução cinética ou quimioenzimática	60
b) Resolução cinética dinâmica (RCD)	62
c) Reação de Mitsunobu	66
2.2 Regra de Kazlauskas	68
2.3 Aplicação da irradiação micro-ondas em biocatálise	70
2.3.1 Enzimas isoladas	70
2.4 Resolução quimioenzimática de ciano-hidrinas	74
2.5 Resolução quimioenzimática de compostos organofluorados	77
2.6 OBJETIVO	81
2.7 PARTE EXPERIMENTAL	82
2.7.1 Materiais e métodos	82
2.7.1.1 Enzima	82
2.7.1.2 Reagentes	82
2.7.2 Métodos de análise, identificação e caracterização dos compostos	82
a) Espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN)	82
b) Espectroscopia de infravermelho (IV)	83
c) Medidas de rotação óptica	83
d) Reações em reator de micro-ondas	83
e) Cromatografia a gás acoplada ao detector de ionização em chamas (GC-FID)	83
f) Cromatografia a gás acoplada ao espectrômetro de massas (GC-MS)	84
g) Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)	84
h) Espectrometria de massas com ionização por eletrospray (EM-IES)	84
i) Evaporadores rotativos e agitadores orbitales	85
j) Outros equipamentos	85
2.7.3 Síntese dos compostos racêmicos	86
2.7.4 Condições experimentais em escala analítica para as reações convencionais	90
2.7.4.1 Resolução cinética dos álcoois 1a-13a com CALB por agitação orbitalar (escala analítica)	90
2.7.4.2 Resolução cinética dos álcoois 1a-13a com CALB por irradiação micro-ondas (escala analítica)	90

2.7.4.3 Resolução cinética dos álcoois 1a-13a com CALB por agitação orbitalar (escala semi-preparativa)	91
2.7.4.4 Derivatização dos álcoois remanescentes (que não foram esterificados enzimaticamente)	91
2.8 Dados espectroscópicos: (Anexos)	92
2.9 RESULTADOS E DISCUSSÃO	96
2.9.1 Resoluções enzimáticas de ciano-hidrinas pela CALB	96
2.9.1.1 Resolução enzimática da (±)-mandelonitrila 1a	96
2.9.1.2 Resolução enzimática da (±)-2-(4-clorofenil)-2-hidroxiacetonitrila 2a	104
2.9.1.3 Resolução enzimática da (±)-2-hidroxi-2-(4-hidroxifenil)acetonitrila 3a	107
2.9.1.4 Resolução enzimática da (±)-2-hidroxibutanonitrila 4a	112
2.9.1.5 Resolução enzimática da (±)-2-(4-fluorofenil)-2-hidroxiacetonitrila 5a	114
2.9.1.6 Resolução enzimática da (±)-2-hidroxi-2-(4-metoxifenil)acetonitrila 6a	118
2.9.1.7 Resolução enzimática da (±)-2-hidroxi-2-(3-fenoxifenil)acetonitrila 7a	121
2.9.1.8 Resolução enzimática da (E)-2-hidroxi-4-fenilbut-3-enonitrila 8a	124
2.9.2 Resoluções enzimáticas de compostos organofluorados pela CALB	128
2.9.2.1 Resolução enzimática do (±)-2,2,2-trifluoro-1-feniletanol 9a	128
a) Caracterização do (±)-2,2,2-trifluoro-1-feniletanol 9a	131
b) Caracterização do (±)-acetato de 2,2,2-trifluoro-1-feniletila 9b	133
2.9.2.2 Resolução enzimática do (±)-1-(2,4,5-trifluorofenil)etanol 10a	137
a) Caracterização do (±)-1-(2,4,5-trifluorofenil)etanol 10a	140
b) Caracterização do (±)-acetato de 1-(2,4,5-trifluorofenil)etila 10b	145
2.9.2.3 Resolução enzimática do (±)-1-(3-bromofenil)-2,2,2-trifluoroetanol 11a	152
a) Caracterização do (±)-1-(3-bromofenil)-2,2,2-trifluoroetanol 11a	155
b) Caracterização do (±)-acetato de 1-(3-bromofenil)-2,2,2-trifluoroetila 11b	158
2.9.2.4 Resolução enzimática do (±)-1-(4-bromofenil)-2,2,2-trifluoroetanol 12a	162
a) Caracterização do (±)-1-(4-bromofenil)-2,2,2-trifluoroetanol 12a	165
b) Caracterização do (±)-acetato de 1-(4-bromofenil)-2,2,2-trifluoroetila 12b	168
2.9.2.5 Resolução enzimática do (±)-1-(2-trifluorometil)feniletanol 13a	171
a) Caracterização do (±)-1-(2-trifluorometil)feniletanol 13a	174
b) Caracterização do (±)-acetato de 1-(2-trifluorometil)feniletila 13b	179
2.10 CONCLUSÃO	188
 CAPÍTULO 3	 189
3. Biorredução de compostos organofluorados pelo fungo de origem marinha <i>Mucor racemosus</i> e por bactérias termofílicas	189
3.1 Redução de cetonas por micro-organismos	189
3.2 OBJETIVOS	197
3.2.1 Objetivos específicos	197
3.3 PARTE EXPERIMENTAL	198
3.3.1 Reagentes e solventes	198
3.3.2 Micro-organismo	198
3.3.3 Preparo dos meios de cultura para o crescimento do fungo <i>M. racemosus</i> CBMAI 847	199
3.3.3.1 Composição de sais para o preparo da água do mar artificial	199

3.3.3.2 Composição dos meios de cultura	199
a) Preparo do meio de cultura sólido de malte 2%	199
b) Preparo do meio de cultura líquido de malte 2%	199
3.3.4 Reações de redução com células do fungo marinho <i>M. racemosus</i> CBMAI 847	200
3.3.4.1 Reações em agitador orbital	200
3.3.4.2 Reações por irradiação micro-ondas	201
3.4 Redução de cetonas fluoradas por bactérias termofílicas	202
3.4.1 Bactérias	202
3.4.2 Cultivo das bactérias	203
3.4.2.1 Composição dos meios de cultura para o crescimento bacteriano	203
a) Preparação do meio de cultura sólido	203
b) Preparação do meio de cultura líquido	203
c) Preparação da solução salina 0,86%	203
3.4.2.2 Quantificação do crescimento bacteriano	204
3.4.2.3 Reações de redução de flúor-acetofenonas por bactérias termofílicas em agitador orbital	205
3.4.2.4 Reações de redução de flúor-acetofenonas por bactérias termofílicas por irradiação micro-ondas	205
3.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	207
3.5.1 Biorredução da 2,2,2-trifluoro-1-feniletanona 9 com o fungo <i>M. racemosus</i> CBMAI 847	207
3.5.2 Biorredução com bactérias termofílicas	213
3.5.2.1 Biorredução com a bactéria termofílica SPZSP005	213
3.5.2.2 Biorredução com a bactéria termofílica SPZSP088	219
3.5.2.3 Biorredução com a bactéria termofílica SPZSP051	225
3.5.2.4 Biorredução com a bactéria termofílica SPZSP055	231
3.6 CONCLUSÃO	236
 CAPÍTULO 4	 237
4. Reação de adição de aza-Michael com lipase de <i>Candida antarctica</i> (CALB)	237
4.1 Adição de Michael	237
4.1.2 Reações de aza-Michael	239
4.2 OBJETIVOS	244
4.2.1 Objetivos específicos	244
4.3 PARTE EXPERIMENTAL	245
4.3.1 Materiais e métodos	245
4.3.1.1 Enzima	245
4.3.1.2 Reagentes	245
4.3.1.3 Equipamentos	245
4.3.2 Condições experimentais em escala analítica para as reações por agitação orbital	246
4.3.3 Condições experimentais em escala analítica para reações por irradiação micro-ondas	247
4.3.4 Condições experimentais em escala semi-preparativa para reações por agitação	248

<i>orbitalar</i>	
4.3.5 Reação de acetilação da benzilamina 2 com acetato de etila	249
4.3.6 Identificação dos compostos por GC-MS (EI, 70 eV)	249
4.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	251
4.4.1 Reação de aza-Michael –Parte A	251
4.4.2 Reação de aza-Michael –Parte B	265
4.4.3 Reação de aza-Michael –Parte C	272
4.5 CONCLUSÃO	280
5. REFERÊNCIAS	281
ANEXOS	295

1. Micro-ondas e Biocatálise

1.1 Surgimento da irradiação micro-ondas

Durante a Segunda Guerra Mundial, em 1945, os cientistas britânicos desenvolveram o magnétron que foi inicialmente utilizado em sistemas de radar (*Radio Detection and Ranging*) para detectar aeronaves inimigas. As micro-ondas ao serem refletidas pelo objeto procurado, eram detectadas pelo radar que fornecia sua posição, forma, velocidade e direção. Em 1947, Percy L. Spencer fez alterações nestes aparelhos e a companhia Raytheon (uma pequena empresa, com aproximadamente 15 funcionários) apresentou o primeiro forno de micro-ondas para aquecer ou descongelar alimentos. Chamado de *Radarange*, o forno micro-ondas possuía 1,5 m de altura, pesava cerca de 340 kg e custava entre US\$ 2.000 e 3.000. Hoje, os fornos de micro-ondas domésticos são bem mais leves e acessíveis (TEIXEIRA et al., 2010).

Embora os fornos de micro-ondas fabricados para uso doméstico tenham surgido nesse período, o primeiro relato de que estas fontes de energia também eram adequadas para acelerar reações orgânicas surgiu em 1986. A partir dos trabalhos pioneiros de Gedye e Guiguere (GEDYE et al., 1986; GUIGUERE et al., 1986) os químicos orgânicos passaram a utilizar o forno micro-ondas doméstico como uma ferramenta para realização de reações orgânicas. Nesses trabalhos os autores descrevem os resultados obtidos através da utilização de aparelhos de micro-ondas domésticos em reações de hidrólise, esterificação e cicloadição (Esquema 1.1) (GEDYE et al., 1986; LARHED; HALLBERG, 2001).

Esquema 1.1 - Reação de hidrólise da benzamida realizada por Geyde em 1986. a) Aquecimento convencional. b) Por forno micro-ondas doméstico.

Os riscos associados com a inflamabilidade dos solventes orgânicos e a falta de sistemas disponíveis para o controle da temperatura e pressão foram os principais motivos para utilização de reatores de micro-ondas desenvolvidos especialmente para síntese orgânica. Hoje, esses equipamentos são seguros e permite que o químico orgânico sintético controle todos os parâmetros reacionais (temperatura, pressão e potência), conseguindo, assim, uma maior reprodutibilidade e segurança nos experimentos realizados. Esses equipamentos podem realizar quase todos os tipos de reação, desde condições criogênicas (reações até $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$) até reações sob pressão de 20 bar, incluindo reatores especiais para *scale-up*, fluxo contínuo e para reações em batelada (LARHED; HALLBERG, 2001; SOUZA; MIRANDA, 2011).

As micro-ondas têm sido utilizadas para simplificar e melhorar as condições reacionais de muitas reações orgânicas clássicas. Reações realizadas em condições de micro-ondas, em geral, são mais rápidas, mais limpas e apresentam melhores rendimentos do que as reações realizadas em condições convencionais semelhantes (YADAV; DEVENDRAN, 2012; ZIAULLAH; RUPASINGHE, 2013). Os métodos de micro-ondas também fornecem uma tecnologia eficiente e segura conforme os princípios da “Química Verde” (BASSYOUNI et al., 2012). Devido esta técnica estar inserida nos princípios da Química Verde, tem atraído a atenção dos pesquisadores para melhorar ou desenvolver processos reacionais mais sustentáveis. Nesse contexto, pode-se citar algumas das vantagens da utilização da irradiação micro-ondas em reações orgânicas: realizar reações sem solventes; utilizar água como solvente; diminuir o número de reações competitivas e secundárias; aumentar o rendimento das reações; diminuir o tempo reacional (RISSO et al., 2012; WAN et al., 2012 ; YU et al., 2011).

A irradiação micro-ondas tem sido também uma importante ferramenta para realização de reações biocatalíticas. O enorme potencial dessa técnica nas reações biocatalíticas tem sido explorada, principalmente na resolução de racematos (álcoois e aminas) para obtenção de compostos enantiomericamente puros utilizando lipases imobilizadas (YOUNG et al., 2008; YADAV; PAWAR, 2012; RIBEIRO et al., 2012 e YADAV; BORKAR, 2009).

1.2 Fundamentos sobre a irradiação micro-ondas

As micro-ondas são ondas eletromagnéticas, e como tais, portadoras de energia, que situam-se na região do espectro eletromagnético entre o infravermelho e as ondas de rádio no intervalo de frequência entre 300-300.000 MHz (Figura 1.1) (LARHED; HALLBERG, 2001; BASSYOUNI et al., 2012).

As micro-ondas são radiações não ionizantes capazes de causar o movimento molecular por *condução iônica* e *polarização dipolar*, mas não podem causar mudanças na estrutura molecular (YOUNG et al., 2008), uma vez que a energia de um fóton de micro-ondas nesta região de frequência é de 0,037 Kcal.mol⁻¹, muito baixa para romper uma ligação química, que é geralmente da ordem de 80-120 Kcal.mol⁻¹ (KAPPE, 2006).

Figura 1.1 - Representação do espectro eletromagnético.

Fonte: Adaptação de Ribeiro (2013) a partir de NEAS, E. D.; COLLINS, M. J., 1988, p. 7.

Os aparelhos de micro-ondas domésticos e reatores para síntese química operam em uma frequência de 2450 MHz (correspondente ao comprimento de onda

de 12,24 cm) para evitar a interferência com as frequências de telecomunicações. De acordo com a “Federal Communications Commission – FCC”, somente quatro frequências são reservadas para fins industrial, científico e de saúde (Industrial, Scientific and Medical - ISM): 915 ± 25 , 2450 ± 13 , 5800 ± 75 e 22125 ± 125 MHz, sendo as mais comumente utilizadas as frequências de 915 e 2450 MHz (NEAS; COLLINS, 1988; THOSTENSON; CHOU, 1999; ESKILSSON; BJORKLUND, 2000). Fornos de micro-ondas que permitem processar uma variação de frequência de 0,9 a 18 GHz têm sido desenvolvidos para processamento de materiais, como: cerâmica (MENEZES et al., 2007), na produção e refino de petróleo (FORTUNY et al., 2008), na síntese de materiais de estrutura polimérica de complexos metálicos (redes metalorgânica) (WANDERLEY et al., 2011), dentre outros.

O processo de aquecimento convencional é fundamentalmente diferente do aquecimento por irradiação micro-ondas. No *aquecimento convencional* uma fonte externa de energia atinge as paredes do frasco e o calor é transferido da superfície do frasco para a solução (reagentes e solventes), através do processo de condução. Esse tipo de aquecimento pode causar, muitas vezes, uma corrente de convecção na solução (Figura 1.2a). Em contraste, no *aquecimento por irradiação micro-ondas*, a energia é transferida diretamente para as substâncias, através da interação molecular com os íons dissolvidos na solução e/ou com o solvente, ocorrendo, assim, um super-aquecimento localizado na substância que absorve as micro-ondas (Figura 1.2b) (NEAS; COLLINS, 1988; THOSTENSON; CHOU, 1999). Esse tipo de aquecimento irá depender da habilidade desse material específico e do reagente ou solvente em absorver a energia de micro-ondas e convertê-las em calor (KAPPE, 2006).

Figura 1.2 – a) Aquecimento convencional. b) Aquecimento por irradiação micro-ondas.

Fonte: Adaptação a partir de NEAS, E. D.; COLLINS, M. J., 1988, p. 7.

O aquecimento por micro-ondas, também chamado de aquecimento dielétrico, transforma a energia eletromagnética em calor por dois mecanismos principais: *polarização dipolar* e *condução iônica* (LARHED; HALLBERG, 2001).

O mecanismo de *polarização dipolar* está relacionado com o alinhamento das moléculas (que tem dipolos permanentes ou induzidos) com o campo elétrico aplicado. Quando o campo é removido as moléculas retornam a um estado desordenado, e a energia que foi absorvida para esta orientação, nestes dipolos, é dissipada na forma de calor, ocorrendo um pronto aquecimento destas moléculas no sistema (Figura 1.3) (ESKILSSON; BJORKLUND, 2000; KAPPE, 2006; SANSEVERINO, 2002).

Figura 1.3 - Representação da resposta molecular a um campo eletromagnético. (a) Moléculas polarizadas alinhadas com o campo eletromagnético. (b) Desordem termicamente induzida quando o campo eletromagnético é alterado. E= campo elétrico.

Fonte: SOUZA et al., 2002, p. 3.

O processo de *condução iônica* consiste na migração eletromagnética dos íons quando um campo elétrico é aplicado. O atrito gerado entre esses íons em solução, devido ao movimento de migração, provoca o aquecimento da solução através de

perdas por fricção. Estas perdas dependem do tamanho, carga, condutividade dos íons dissolvidos e interação destes com o solvente. O campo elétrico aplicado alterna-se rapidamente, cerca de 5 bilhões de vezes por segundo para a frequência aplicada de 2450 MHz (SANSEVERINO, 2002; SOUZA et al., 2002). Essa oscilação provoca considerável fricção intermolecular, resultando na geração de calor. Uma representação esquemática para o mecanismo de condução iônica é mostrada na Figura 1.4 (NOGUEIRA et al., 2001).

Figura 1.4 - Representação esquemática de condução iônica. E = campo elétrico.

Fonte: NOGUEIRA et al., 2001, p.106.

Quando a energia de micro-ondas incide sobre um material (ou molécula ou íon), existem três possibilidades quanto à penetração da onda eletromagnética: pode ocorrer uma reflexão, transparência e absorção (Figura 1.5). Materiais como os metais refletem as micro-ondas sem ser afetadas pela mesma, devido ao alto *fator de perda dielétrica* (ϵ'') e intensidade de penetração da onda eletromagnética aproxima-se do zero. Quando as micro-ondas atravessam o material sem provocar nenhum efeito, este material é transparente às micro-ondas. Quando um material absorve as micro-ondas ocorre uma interação da onda eletromagnética com o dipolo elétrico da molécula a nível molecular (THOSTENSON; CHOU, 1999). As propriedades físico-químicas como concentração, capacidade calorífica, estrutura molecular e constante dielétrica afetam na absorção da energia (SANSEVERINO, 2002; NOGUEIRA et al., 2001).

Figura 1.5 - Relação entre o fator de perda dielétrica (ϵ'') e capacidade de absorver potência de micro-ondas para alguns materiais comuns.

Fonte: THOSTENSON; CHOU, 1999, p. 1063.

O aquecimento de um determinado material submetido à irradiação micro-ondas irá depender das suas propriedades dielétricas, ou seja, da capacidade dessa substância específica converter a energia eletromagnética em calor numa dada temperatura e frequência. Este valor será determinado pelo *fator de dissipação* ($\tan \delta$) que é medido pela razão entre o *fator de perda dielétrica* (ϵ'') e pela *constante dielétrica* (ϵ') da substância ($\tan \delta = \epsilon''/\epsilon'$). O *fator de perda dielétrica* mede a eficiência da conversão de energia eletromagnética em calor. Já a *constante dielétrica* da substância é uma medida que indica a sua polaridade. Logo, quanto mais alto o *fator de dissipação* mais fortemente serão aquecidas as substâncias pelas micro-ondas (KAPPE, 2006; SANSEVERINO, 2002). Moléculas polares e soluções iônicas podem absorver fortemente a energia de micro-ondas por apresentarem momento de dipolo permanente e solventes apolares, como hexano, não aquecem pela irradiação micro-ondas (ESKILSSON; BJORKLUND, 2000).

Quando se utiliza solventes polares com alto *fator de dissipação* estes ainda podem ser superaquecidos rapidamente a temperaturas acima do seu ponto de ebulição ao utilizar reatores de micro-ondas com frascos fechados, “closed vessel”, permitindo que as reações ocorram de forma mais eficiente e em menor tempo. Esse aumento rápido da temperatura pode ser ainda mais acentuado para solventes com extremos fatores de dissipação, tais como, líquidos iônicos (YU et al., 2012). Obviamente, um determinado solvente com baixo *fator de dissipação* poderá aquecer

significativamente na presença de compostos polares, tais como, sais ou líquidos iônicos. Na Tabela 1.1 estão apresentados alguns parâmetros físicos, incluindo a *constante dielétrica* e o *fator de dissipação* para alguns solventes (ESKILSSON; BJORKLUND, 2000).

Tabela 1.1 - Dados de ponto de ebulição, constante dielétrica (ϵ'), perda dielétrica (ϵ'') e $\tan \delta$ para alguns solventes orgânicos.

Solvente	Constante dielétrica (ϵ')	Perda dielétrica (ϵ'')	$\tan \delta$	Ponto de ebulição (°C)	Temperatura "Closed-vessel" (°C)
Hexano	1,89	0,038	0,020	69	e -
Tolueno	2,4	0,096	0,040	111	e -
Diclorometano	9,1	0,382	0,042	40	e -
THF	7,4	0,348	0,047	66	e -
Acetona	20,7	1,118	0,054	56	164
Acetato de etila	6,0	0,354	0,054	77	e -
Acetonitrila	37,5	2,325	0,062	82	194
Nitrometano	36,0	2,034	0,064	101	e -
Clorofórmio	4,8	0,437	0,091	61	e -
Clorobenzeno	2,6	0,263	0,101	132	e -
Água	78,3	9,889	0,123	100	e -
1,2-Dicloroetano	10,4	1,321	0,127	83	e -
Metanol	32,6	21,483	0,659	65	151
2-Propanol	19,9	14,622	0,799	82	145
Etanol	24,3	22,866	0,941	78	164

e - não indicado no aquecimento por micro-ondas.

Fonte : ESKILSSON; BJORKLUND, 2000, p. 227. CORRÊA; BUENO, 2009, p. 63.

Como comentado anteriormente as reações químicas efetuadas na presença da irradiação micro-ondas apresentam diversas vantagens dentre elas: redução de reações competitivas, menor tempo de reação, aumento de produtividade e melhoria na reprodutibilidade (BACHU et al., 2007). Esses efeitos podem ser racionalizados através de três princípios: *efeitos térmicos*, *efeitos específicos de micro-ondas* e *efeitos não térmicos das micro-ondas*.

Os *efeitos térmicos* podem ser compreendidos como consequência direta das altas temperaturas reacionais, que podem ser obtidas quando reagentes e solventes polares são irradiados por micro-ondas. A diminuição dos tempos de reação em temperaturas elevadas pode ser evidenciada pela aplicação da equação de Arrhenius que permite calcular a dependência da constante de velocidade de uma reação química com a temperatura. Esta equação empírica é determinada pela Equação 1.1 (ATKINS; JONES, 2012; LUKASIEWICZ; KOWALSKI, 2012).

$$\ln K = \ln A - E_a/RT \quad (\text{Equação 1.1})$$

Uma forma alternativa desta expressão é obtida tomando-se os antilogaritmos de ambos os lados, obtendo a Equação 1.2:

$$K = Ae^{-E_a/RT} \quad (\text{Equação 1.2})$$

Onde: k = constante de velocidade; A = constante pré-exponencial (depende da área de contato); E_a = energia de ativação; R = constante dos gases; T = temperatura.

A equação de Arrhenius é proporcional à energia de ativação (E_a), então quanto maior for a energia de ativação, maior será a variação da constante de velocidade com a temperatura. As reações que têm energia de ativação baixa ($\sim 10 \text{ kJ.mol}^{-1}$) têm velocidades de reação que elevam muito pouco com a temperatura, e as que têm energia de ativação altas (acima de 60 kJ.mol^{-1}) têm velocidades que dependem fortemente da temperatura (ATKINS; JONES, 2012).

Os *efeitos específicos das micro-ondas* podem ser definidos como as taxas de aceleração que não podem ser alcançadas ou duplicadas pelo aquecimento convencional. Assim pode-se citar, por exemplo, o super-aquecimento de solventes à pressão atmosférica, o aquecimento seletivo de reagentes e a formação de “hot spots” (pontos isolados de alta temperatura no meio reacional). É importante ressaltar que apesar destes efeitos serem produzidos exclusivamente na presença da irradiação micro-ondas, os seus resultados observados são em função do aumento da temperatura reacional (RISSO et al., 2012; KAPPE, 2006).

Os *efeitos não térmicos das micro-ondas* resultam de uma interação direta entre o campo elétrico e as espécies presentes no meio reacional (WAN et al., 2012; CORRÊA; BUENO, 2009). A presença de um campo elétrico afeta a orientação dipolar das moléculas na reação, pelo aumento do fator pré-exponencial A da equação de Arrhenius e pela diminuição da energia livre do estado de transição ($\Delta\Delta G^\ddagger$). O primeiro baseia-se no aumento da probabilidade de choques

intermoleculares devido às sucessivas mudanças de orientação das moléculas polares, em função da oscilação do campo elétrico. O segundo sugere que mecanismos polares com formação de espécies carregadas no estado de transição deverão ser favorecidos pela irradiação das micro-ondas, devido à interação com o campo elétrico gerado (ATKINS; JONES, 2012; SOUZA; MIRANDA, 2011; KAPPE, 2006; CORRÊA; BUENO, 2009; LUKASIEWICZ; KOWALSKI, 2012).

1.3 Biocatálise

A Biocatálise, que faz uso da aplicação de enzimas como catalisadores seletivos para síntese química, tornou-se uma ferramenta útil na química orgânica, visando à preparação de compostos enantiomericamente puros ou enriquecidos (SCHULZE; WUBBOLTS, 1999). A biocatálise emprega reagentes mais seletivos e ambientalmente benéficos (biocatalisadores) e está inserida nos “12 Princípios da Química Verde” possibilitando processos químicos mais sustentáveis. Certamente, o principal benefício da metodologia quimioenzimática corresponde a estereo-, regio- e quimiosseletividade durante as transformações de moléculas orgânicas, realizadas tipicamente por enzimas em condições brandas de reações (RUFINO et al., 2010).

Os sistemas reacionais biocatalíticos podem utilizar células íntegras de organismos vivos ou enzimas isoladas, em suas formas livres ou imobilizadas (SILVA et al., 2005). As células íntegras têm como vantagens o baixo custo e o fato de conter tanto as enzimas, quanto as coenzimas necessárias ao processo envolvido na catálise. Porém, por ser um sistema multienzimático, quando contido em um conjunto de células, podem ocorrer reações laterais, além de dificuldades de permeabilidade do substrato pela membrana fosfolipídica, uma vez que as reações são realizadas em meio aquoso e os compostos orgânicos, em geral, são imiscíveis em água. Por outro lado, as enzimas isoladas oferecem maior controle do processo reacional, apesar do custo ser mais elevado devido às etapas de produção e purificação das enzimas (SILVA et al., 2005).

A escolha entre esses sistemas enzimáticos irá depender de muitos fatores, tais como: a) o tipo de reação que se deseja realizar;

- b) se há cofatores a serem reciclados no sistema;
- c) a escala em que a reação será realizada. Os prós e os contras desses sistemas podem ser resumidos na Tabela 1.2 (Faber, 2004).

Tabela 1.2 - Prós e contras do uso de enzimas isoladas e sistemas de células íntegras.

Biocatalisador	Forma	Prós	Contras
Enzimas isoladas	qualquer (líquida ou sólida)	procedimento simples; processamento simples; maior produtividade; tolerância a maiores concentrações de substratos	necessita de cofator dependendo da classe da enzima
	meio aquoso	atividade enzimática elevada	possíveis reações laterais; substratos lipofílicos insolúveis; requer processo de extração da reação
	meio orgânico	fácil execução; procedimento simples; substratos lipofílicos solúveis; fácil recuperação da enzima	atividade enzimática reduzida; perda de atividade enzimática.
	imobilizada	fácil recuperação da enzima	perda da atividade durante a imobilização
Células íntegras	qualquer	não necessita reciclagem de cofator	equipamentos caros; processamento mais laborioso e longo; grandes volumes de solventes; menor produtividade devido à tolerância das células a baixa concentração de substrato; baixa tolerância ao uso de solventes orgânicos; reações laterais ou competitivas, devido ao metabolismo estar em ação.
	prévio crescimento das células em meio de cultura	maior atividade enzimática.	grande quantidade de biomassa; mais subprodutos formados (metabólitos das células); controle mais laborioso.
	células em repouso	fácil processamento; menos subprodutos.	perda da atividade enzimática.
	células imobilizadas	possível reuso das células.	perda da atividade enzimática.

Fonte: FABER, K., 2004, p. 10.

1.3.1 Enzimas

As enzimas são proteínas especializadas na catálise de reações químicas em sistemas biológicas. Elas estão entre as biomoléculas mais notáveis devido a sua extraordinária *especificidade* e *poder catalítico* (LEHNINGER, 1976). As enzimas são constituídas de longas sequências de L-aminoácidos naturais, unidas por ligações peptídicas formando uma macromolécula de grande complexidade estrutural. A ligação peptídica é formada pela união do grupo α -carboxila de um aminoácido ao grupo α -amino do aminoácido subsequente (Esquema 1.2) (SAID ; PIETRO, 2004).

Esquema 1.2 - Formação da ligação peptídica entre dois aminoácidos.

Fonte: BERG, J. M., 2008, p. 34.

As enzimas são classificadas pela União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular (IUBBM) de acordo com o tipo de reação que catalisam, sendo estas divididas em seis grupos. Cada um desses grupos é ainda subdividido em classes e subclasses, numeradas de tal forma que cada enzima possa ser identificada sem ambiguidade (Tabela 1.3) (TORRES, 2001).

Tabela 1.3 - Classificação das enzimas segundo a União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular (UIBBM).

Número	Classe	Tipo de reação catalisada	Subclasse
1	Oxidorreductase	Transferência de elétrons ou remoção de hidrogênio: C-H, C-C, C=C.	Hidrogenase, oxidase, peroxidase, redutase.
2	Transferase	Transferência de grupos: aldeídico, cetônico, acila, metila, fosforila e glicosídico.	Transaldolase e transcetolase
3	Hidrolase	Hidrólise de ésteres, amidas, lactonas, epóxidos, nitrilas, glicosídeos.	Esterase, lipase, peptidase, fosfatase
4	Liase	Adição de grupos à ligação dupla ou formação de ligações duplas por remoção de grupos: C=C, C=N, C=O	Descarboxilase e fosfatase
5	Isomerase	Transferência de grupos intramolecularmente para produzir isômeros: racemização, epimerização, rearrranjos.	Racemase e epimerase
6	Ligase	Formação e clivagem: C-O, C-S, C-N, C-C com reações acopladas à clivagem de um pirofosfato do ATP (ou de um outro nucleotídeo).	Sintetase

Fonte: FABER, K., 2004, p. 10. TORRES, B. B., 2001. p. 151-176.

Algumas enzimas dependem, para exercer sua atividade catalítica, somente de sua própria estrutura protéica, enquanto outras necessitam da associação com outras moléculas ou íons para exercer sua função catalítica. Esses componentes da reação enzimática são genericamente chamados de cofatores (LEHNINGER, 1976).

Os cofatores podem ser um ou mais íons inorgânicos como Fe^{+2} , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+} ou uma molécula orgânica ou metalorgânica complexa, denominada de coenzima, como os derivados de vitaminas (flavina, tiamina, niacina), ácido ascórbico e dinucleotídeo de nicotinamida e adenina (NADH) ou fosfato de dinucleotídeo de nicotinamida e adenina (NADPH) (VOET, 2006; GRUNWALD, 2009). As coenzimas agem como carregadores transitórios de grupos funcionais específicos ou transportadores de elétrons, como o NADH que tem como função transferir íons hidreto, e a coenzima A que tem como função transferir grupos acilas. Quando uma coenzima ou um íon metálico se liga firmemente, ou mesmo covalentemente, a uma enzima é denominado de grupo prostético (NELSON; COX, 2011).

A função da coenzima consiste principalmente em apoiar a enzima na interação com o substrato (orientação, polarização) e sua transformação, assim como

na ligação dos produtos intermediários, no interior do sítio ativo da enzima (KLAUS, 1982).

O *sítio ativo* ou *sítio catalítico* de uma enzima é a parte da proteína necessária à ligação do substrato e da sua transformação em produto, esta região representa menos de 5% da superfície da enzima. O sítio ativo das enzimas situa-se mais comumente em uma fenda, situado no interior da molécula da enzima. Esta fenda é frequentemente delimitado por cadeias de aminoácidos apolares, constituídas também por grupamentos amino, ácido carboxílico, moléculas de água e íons inorgânicos (KAMOUN et al., 2006).

Uma molécula para ser reconhecida como substrato deve ter a forma adequada, ou seja, possuir certa configuração estérica e eletrônica, para acomodar-se no sítio ativo, e deve, possuir também uma ligação química suscetível de ser atacada pela enzima e estabelecer ligação com os grupos “R” ali presentes (TORRES, 2001). Essa ligação ocorre pelas mesmas forças não covalentes que ditam as conformações das próprias proteínas, pois ambas envolvem forças de van der Waals, ligações eletrostáticas, ligações de hidrogênio e interações hidrófobas e hidrolíticas (BERG et al., 2007).

Como todos os catalisadores, as enzimas podem aumentar as velocidades de certas reações químicas (especificidade de reação) e, assim, diminuir consideravelmente o tempo necessário à obtenção do equilíbrio final. A especificidade da enzima está diretamente relacionada à sua capacidade de discriminar entre um substrato e uma molécula competidora. Diferentes fatores intervêm para aumentar as velocidades das reações enzimáticas: a) efeito de orientação; b) modificação do ambiente; c) distorção do substrato; d) catálise ácido-básica; e) catálise covalente (KAMOUN et al., 2006).

O *efeito de orientação* está diretamente relacionado com a perfeita fixação do substrato no sítio ativo da enzima, favorecendo a ação da enzima sobre o substrato, isto é, a orientação precisa do substrato e do grupo catalítico da enzima em relação um ao outro, de maneira que seus orbitais de ligação fiquem alinhados em uma relação específica, necessária para produzir a formação dos complexos transitórios

enzima-substrato e enzima-produto e liberação dos produtos (LEHNINGER, 1976). Uma representação simbólica deste efeito é representado na Figura 1.6.

Figura 1.6 - Representação do perfeito encaixe do substrato ao sítio ativo da enzima e formação dos produtos.

Fonte: KOSHLAND et al., 1966, p. 365.

Como o sítio ativo é delimitado por cadeias laterais de aminoácidos a *modificação do ambiente* pode favorecer certas reações e alterar as constantes de dissociação das cadeias laterais dos aminoácidos do sítio ativo. Quando a enzima recebe seu substrato, de algum modo se “fecha sobre sua presa”, e a modificação da estrutura espacial da enzima pode criar uma *distorção do substrato* que favorece a transformação. Uma vez liberado o produto, a enzima retoma sua estrutura inicial, podendo produzir um novo ciclo catalítico, capturando e transformando uma nova molécula do substrato (KAMOUN et al., 2006).

Ao propiciar grupos funcionais capazes de agir como doadores ou aceptores de prótons, a enzima pode proporcionar uma *catálise ácida* ou *básica*. Existem dois tipos principais de catalisadores ácido-básicos: os *específicos* e *gerais*. Os *específicos* são definidos como os que aumentam a velocidade em proporção somente à concentração dos íons H^+ ou OH^- . Os catalisadores ácido-básicos *gerais* são os que aumentam a velocidade em proporção à concentração dos ácidos e bases gerais, isto é, doadores e aceptores de prótons (LEHNINGER, 1976).

Esses catalisadores *ácido-básicos gerais* são em particular, os aminoácidos cujas cadeias laterais podem facilmente ou alternadamente passar de uma forma protonada para uma não-protonada. Como por exemplo, a histidina, que age

principalmente na catálise ácida (ou básica) e aminoácidos polares (ácidos ou básicos) como a tirosina (por sua função fenol) e a cisteína (por sua função tiol) (KAMOUN et al., 2006).

A reação de *catálise covalente* envolve o ataque de um grupo nucleofílico do catalisador sobre um átomo, por exemplo, de carbono eletrofílico do substrato. Os grupos nucleofílicos contêm átomos ricos em elétrons, capazes de doar elétrons às espécies eletrofílicas. Os nucleófilos são muito eficientes e versáteis como catalisadores, principalmente por promoverem a hidrólise de ésteres orgânicos e a transferência de grupamentos acila de um composto para outro. As enzimas contêm pelo menos três espécies de grupamentos nucleofílicos potencialmente capazes de atuar cataliticamente nas transformações químicas (LEHNINGER, 1976).

Em uma reação catalítica, a enzima acelera a reação diminuindo a barreira energética entre o substrato e o produto, a chamada energia de ativação (E_a). A origem desta força catalítica deve-se ao aumento da velocidade da reação, que tem sido geralmente atribuída à estabilização do estado de transição da reação pela enzima, assumindo que o catalisador liga-se mais fortemente ao estado de transição que ao estado fundamental do substrato, devido à orientação do substrato no sítio ativo da enzima (FABER, 2004). O estado de transição é um momento molecular transitório no qual eventos como a quebra de ligação, a formação de ligação ou o desenvolvimento de carga ocorrem com a mesma probabilidade de seguirem tanto para retomar novamente ao substrato como para formar o produto (NELSON; COX, 2011). Na Figura 1.7 pode-se observar um diagrama de energia de uma reação catalisada *versus* uma reação não catalisada.

Figura 1.7 - Representação de um diagrama de energia frente uma reação catalisada e não catalisada. São assinaladas a energia livre padrão (ΔG), ou seja, a diferença entre o conteúdo energético dos produtos e dos reagentes, e a energia de ativação ($\Delta\Delta G^\ddagger$).

Fonte: TORRES, B. B., 2001. p. 151-176.

Além das reações enzimáticas serem termodinamicamente favoráveis, as enzimas apresentam quimio- regio- e enantiosseletividade. Em uma reação enantiosseletiva as duas formas de orientação de um substrato racêmico ou proquiral envolvendo seus grupos enantiotópicos ou faces, competem pelo sítio ativo da enzima. Devido ao ambiente quiral do sítio ativo, ambos os substratos enantioméricos ou faces proquirais possuem diferentes valores de energia livre (ΔG) para seus respectivos estados de transição, resultando numa diferença na energia de ativação ($\Delta\Delta G^\ddagger$) para os dois enantiômeros (ou faces), e como consequência, o enantiômero (ou face) que apresentar melhor orientação será transformado mais rapidamente que o outro (FABER, 2004). Assim, a enantiosseletividade está diretamente relacionada à diferença entre os dois estados de transição dos dois enantiômeros, ou faces, podendo ser calculada pela Equação 1.3.

$$E = - \exp(\Delta\Delta G^\ddagger/RT)$$

(Equação 1.3)

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

A enantiosseletividade enzimática de uma reação que envolve um substrato e um produto, pode ser determinada pela razão enantiomérica (E), que é descrita

numericamente pela velocidade de reação de cada enantiômero (*R*) e (*S*), como também pelos valores de k_{cat} (número de moléculas convertidas por segundo por molécula de enzima) e K_M (constante de saturação do substrato) (Equação 1.4) (FABER, 2004).

$$E = \frac{v_R}{v_S} = \frac{(k_{cat} / K_M)_R}{(k_{cat} / K_M)_S} \quad (\text{Equação 1.4})$$

Para uma reação irreversível que envolve um substrato e um produto, pode-se calcular o valor de (*E*) com os valores experimentais de excesso enantiomérico dos substratos ou dos produtos (ee_s ou ee_p) a uma dada fração de conversão (*c*) (Equação 1.5). Nesta equação o valor de (*E*) pode ser determinado a partir de análises cromatográficas dos respectivos excessos enantioméricos dos substratos ou produtos, ao invés de medidas de velocidade das reações enzimáticas (FABER, 2004; CHEN et al., 1982).

$$E = \frac{\ln[(1-c)(1-ee_s)]}{\ln[(1-c)(1+ee_s)]} = \frac{\ln[(1-c)(1-ee_p)]}{\ln[(1-c)(1+ee_p)]} \quad (\text{Equação 1.5})$$

Os excessos enantioméricos (ee_s) de compostos quirais podem ser calculados pela Equação 1.6. Onde *R* é a concentração do enantiômero (*R*) e *S* é a concentração do enantiômero (*S*). Assim, para um racemato, o valor de excesso enantiomérico é zero e para um composto enantiomericamente puro é 100%. Os valores dos excessos enantioméricos são de grande importância na determinação da pureza óptica de compostos quirais (FABER, 2004; BUGG, 2004).

$$ee_R (\%) = [(R-S)/(R+S)] * 100 \quad (R > S) \quad (\text{Equação 1.6})$$

Um exemplo de síntese enantiosseletiva é a produção do composto (*R*)-2,2,2-trifluoro-1-feniletanol, uma molécula bioativa utilizada na construção de blocos quirais. Através da redução enantiosseletiva da 2,2,2-trifluoro-1-feniletanona, utilizando como biocatalisador a bactéria *Bacillus* sp. ECU0013, obteve-se o respectivo (*R*)-álcool com rendimento de 100% e *ee* 99% em apenas 12 horas (Esquema 1.3). A reação foi realizada em pH 7 e temperatura de 30 °C (NI et al., 2011).

Esquema 1.3 - Redução enantiosseletiva de uma cetona fluorada catalisada pela a bactéria *Bacillus* sp. ECU0013.

Quanto à regiosseletividade, as enzimas podem distinguir grupos funcionais idênticos situados em diferentes regiões de uma mesma molécula do substrato. Como exemplo, enzimas presentes no fungo *Agrocybe aegerita* (AaeAPO) promoveram a hidroxilação regiosseletiva da quercetina, um flavonoide que possui propriedades farmacológicas, tais como anti-inflamatória e antialérgica. As enzimas do fungo produziram o derivado 6-hidroxilado com rendimento de 94% (Esquema 1.4) (BARKOVA et al., 2011).

Esquema 1.4 - Hidroxilação regioesletiva do flavonoide quercetina pelo fungo *Agrocybe aegerita*.

A quimiosseletividade está relacionada ao fato das enzimas atuarem em um grupo funcional específico em detrimento de outros grupos funcionais reativos presentes na molécula. Por exemplo, a redução quimiosseletiva da 3-bromo-4-fenilbut-3-en-2-ona, que apresenta em sua estrutura um grupo carbonílico e uma ligação C=C, ligada à posição- α da cetona. Através do fungo *Pichia stipitis*, este composto foi seletivamente reduzido ao 4-fenilbutan-2-ona via uma reação enzimática de desalogenação reductiva (Esquema 1.5) (ZAMPIERI et al., 2011).

Esquema 1.5 - Redução quimiosseletiva via desalogenação reductiva da 3-bromo-6-fenil-hex-3-en-2-ona com o fungo *Pichia stipitis*.

1.3.2 Lipases

As lipases são enzimas hidrolíticas presentes em diversos organismos, incluindo animais, plantas, fungos e bactérias. A maioria das lipases comerciais é de origem microbiana, devido a sua facilidade de produção e abundância na natureza (TREVISAN, 2004).

Em seu ambiente natural, estas enzimas possuem a função de catalisar a hidrólise de triacilgliceróis aos ácidos graxos e glicerol (Figura 1.6). Além das funções biológicas, as lipases possuem um papel importante em biotecnologia, não somente

na indústria de óleo e alimentos, mas também na síntese orgânica na preparação de compostos enantiomericamente puros ou enriquecidos (FABER, 2004).

Esquema 1.6 - Reação geral de hidrólise de triglicerídeos.

A lipase de *Candida antarctica* (CALB) é um dos catalisadores mais empregados na resolução cinética (RC) de álcoois e aminas, permitindo a preparação de uma variedade de álcoois, esteres, aminas e amidas opticamente puros ou enriquecidos (GOTOR-FERNANDEZ et al., 2006). Esta lipase é a mais comumente utilizada por apresentar excelente enantiosseletividade, aceitar um amplo número de substratos específicos com diferentes estruturas tridimensionais, sendo estável em diversos solventes orgânicos e apresentando boa estabilidade térmica em temperaturas na faixa 70-90°C (GOTOR-FERNANDEZ et al., 2006; BACHU et al., 2007; YU et al., 2007).

A estrutura proteica da CALB é constituída de 317 resíduos de aminoácidos e possui massa molecular de 33 kDa. Análise de raios X da CALB revelou a existência de uma “tampa” constituída por uma tríade catalítica de Asp¹⁸⁷-His²²⁴-Ser¹⁰⁵ no sítio ativo (Figura 1.8) (KLAHN et al., 2011; GOTOR-FERNANDEZ et al., 2006). Essa “tampa” é frequentemente protegida na molécula, e por ser hidrofóbica ao interagir com a interface lipídeo/água sofre uma mudança conformacional, expondo o sítio ativo da enzima (DALLA-VECCHIA, 2004).

Figura 1.8 - Estrutura cristalina da CALB (código PDB: 1TCA).³⁷ Destaque é a tríade catalítica no sítio ativo: Ser¹⁰⁵ (vermelho), His²²⁴ (laranja) e Asp¹⁸⁷ (amarelo). Duas hélices móveis podem ser encontradas próximas ao sítio ativo.

Fonte: KLAHN et al., 2011, p. 1649.

Em um ambiente não aquoso, no ciclo catalítico da CALB ocorrem duas etapas para acilação enantiosseletiva de álcoois quirais. A *primeira etapa*, inicia-se com o ataque do grupo hidroxila do resíduo serina, que se encontra ativado pela histidina, ao carbono da carbonila do doador acila representado no Esquema 1.7 pelo acetato de vinila, levando a formação de um intermediário conhecido como complexo acil-enzima. A carga negativa gerada no oxigênio carbonílico é estabilizada pela cavidade oxi-iônica. Esta estabilização é proporcionada por ligações hidrogênio com os resíduos de aminoácidos ali presentes como a glicina e treonina. Nesta etapa o intermediário tetraédrico se desfaz, formando o éster derivado do doador acila, denominado de acil-enzima.

Na *segunda etapa*, o derivado acil-enzima sofre um ataque nucleofílico de um dos enantiômero do álcool empregado como substrato racêmico levando a formação do intermediário tetraédrico, seguido da liberação do produto acetilado (ou esterificado) correspondente e reestabilização da tríade catalítica (LI et al., 2010).

Esquema 1.7 – Etapas do ciclo catalítico de uma reação de acilação enantiosseletiva de álcoois quirais secundários mediada pela lipase de *Candida antarctica*.

Fonte: LI et al., 2010, p. 28434–28441.

Para as enzimas se manterem em um ambiente não aquoso, uma quantidade mínima de água é necessária, denominada de camada de água essencial, pois protege a enzima de desnaturação pelos solventes orgânicos. Modificações nesta camada de hidratação, podem promover uma redução da atividade enzimática. O principal parâmetro utilizado para descrever a polaridade do solvente e seus principais efeitos na atividade da enzima é coeficiente de partição do octanol em água ($\log P$) (SOARES et al., 2012). Em geral, os solventes influenciam a seletividade da enzima porque podem alterar a conformação nativa e, assim, a atividade catalítica do biocatalisador. Solventes hidrofóbicos com $\log P \geq 4$ são considerados os mais adequados biocatalisadores para essas reações. Solventes com $\log P$ entre 2 e 4 são considerados moderados e os solventes polares com $\log P < 2$ são muitas vezes ineficazes para reações catalisadas por enzimas. Embora os valores de $\log P$ não se correlacionam diretamente com a eficiência da síntese enzimática, essa é uma importante informação em termos da seleção do solvente (PILISSÃO et al., 2012).

Li et al. (2010) investigaram através de um estudo teórico, a estabilidade e a atividade da CALB em solventes orgânicos polares e apolares. A parimetrização dos solventes foi realizada pelo $\log P$ e pela densidade experimental e de simulação. Os resultados obtidos para esse estudo demonstraram que a ligação hidrogênio entre a Ser¹⁰⁵ e a His²²⁴, e a ligação hidrogênio entre Asp¹⁸⁷ e a His²²⁴ são muito importantes para estabilização do estado de transição da reação enzimática e que a separação da ligação hidrogênio entre Ser¹⁰⁵ e a His²²⁴ conduz a baixa atividade da CALB em solventes polares, devido à intensa interação do sítio ativo e das moléculas do solvente. Também foi observado que atividade da CALB é maior em solventes apolares, devido a menor energia de ativação da CALB e menor energia de ativação na região do sítio ativo.

Assim, o uso de enzimas em reações biocatalíticas associada à técnica da irradiação micro-ondas são duas ferramentas tecnológicas, limpas e modernas, que podem ser utilizadas para aceleração da reação e na produção de moléculas de interesse biotecnológico.

2. Resolução enzimática de compostos organofluorados e cianídricos por lipase de *Candida antarctica* (CALB)

Capítulo

2

2.1. Síntese de álcoois enantiomericamente puros ou enriquecidos por biocatálise

a) Resolução cinética ou quimioenzimática

Nos últimos anos a enantioseparação de compostos quirais via resolução cinética (RC) ou quimioenzimática em diversos tipos de reações a partir da enantiorresolução de racematos tem sido praticada com sucesso (LAU et al., 2010). A resolução quimioenzimática pode ser obtida por duas metodologias biossintéticas como pode ser demonstrado na Figura 2.1. O álcool (R^*OH) e o acetato (R^*OAc) opticamente puros ou enriquecidos podem ser obtidos através de *transesterificação enzimática* entre um álcool racêmico ($R-OH$) e um agente acilante. Alternativamente, estes mesmos compostos quirais podem ser obtidos via *hidrólise enzimática* seletiva de um acetato racêmico ($R-OAc$). Em ambos os casos, a resolução enantiomérica é realizada na etapa biocatalítica. Dependendo da enzima, das propriedades estruturais do substrato e das condições experimentais utilizadas, os enantiômeros do álcool (R^*OH) e do acetato (R^*OAc) podem ser obtidos com rendimentos teóricos máximo de 50% e excessos enantioméricos de 100% (YADAV et al. 2008; COSTA et al. 1999; PELLISSIER, 2008).

Figura 2.1 - Rotas biossintéticas na resolução enantiomérica via transesterificação ou hidrólise catalisadas por hidrolases.

Fonte: COSTA et al., 1999, p. 863.

A resolução cinética de álcoois secundários e aminas primárias é ideal para aprofundar a investigação dos efeitos térmicos e não-térmicos da irradiação micro-ondas nas transformações quimioenzimáticas, a partir dos parâmetros como conversão e seletividade (excesso enantiomérico), que são tipicamente monitorados por métodos cromatográficos em comparação aos experimentos em aquecimento convencional ou em agitação orbitalar. Diversos estudos têm demonstrado significativas melhorias no rendimento e/ou enantiosseletividade dos produtos por irradiação micro-ondas quando comparados aos experimentos conduzidos em aquecimento convencional ou agitação orbitalar (SOUZA et al., 2009).

Um interessante exemplo de resolução enzimática envolvendo aminas primárias em agitação orbitalar (A.O.) e por irradiação micro-ondas (M.O.) foi realizada por PILISSÃO et al. (2012). Nesse estudo foi feita a resolução enzimática da *sec*-butilamina em diferentes solventes orgânicos, utilizando como biocatalisador a

lipase de *Aspergillus niger*, obtendo-se os diferentes enantiômeros (antípodas) dependendo da metodologia aplicada (Esquema 2.1). As aminas e seus derivados acetilados (amidas) são importantes classes de compostos que apresentam atividade farmacológica como na síntese (*S*)-metildopa (anti-hipertensivo) e (*S*)-penicilina (antibiótico). Os melhores resultados foram obtidos em *n*-hexano utilizando a técnica por irradiação micro-ondas (*ee* >99%, *E* >200) (Tabela 2.1).

Esquema 2.1 - Resolução enzimática *sec*-butilamina em agitação orbital e por irradiação micro-ondas, utilizando como biocatalisador a lipase *Aspergillus niger*.

Tabela 2.1 - Resolução enzimática da *sec*-butilamina em agitação orbital e por irradiação micro-ondas em diferentes solventes, utilizando como biocatalisador a lipase de *Aspergillus niger*.

Solvente	<i>log P</i>	Agitação orbital			Irradiação micro-ondas		
		<i>c</i> (%)	<i>ee</i> (%)	<i>E</i>	<i>c</i> (%)	<i>ee</i> (%)	<i>E</i>
<i>n</i> -hexano	3,90	41	89	32	21	> 99	> 200
ciclo-hexano	3,20	52	86	45	18	80	10
tolueno	2,50	63	84	19	10	83	9
CH ₂ Cl ₂	1,18	84	62	2.6	93	79	1,9

ee = excesso enantiomérico.

c = conversão.

E = razão enantiomérica.

b) Resolução cinética dinâmica (RCD)

Como demonstrado anteriormente, a resolução cinética (RC) de misturas racêmicas catalisadas por lipases é um dos métodos mais úteis para obtenção de compostos enantiopuros ou enriquecidos (GHANEM, 2007). No entanto, este processo sofre uma limitação, pois, somente é possível obter um rendimento teórico máximo de 50% destes enantiômeros. Neste contexto, muitos esforços têm sido realizados para superar esta limitação, e assim, obter compostos com elevados rendimentos e purezas enantioméricas (FABER, 2004).

A combinação destes objetivos individuais levou à evolução da resolução cinética clássica para a resolução cinética dinâmica (RCD). Em tal processo, pode-se, em princípio, obter um rendimento quantitativo de 100% de apenas um dos enantiômeros (PELLISSIER, 2008). Efetivamente, RCD combina a etapa de resolução cinética com um equilíbrio *in situ* ou racemização do substrato quiral que reage mais lentamente (PELLISSIER, 2003). Por exemplo, o enantiômero do (R)-substrato é transformado para o (R)-produto mais rapidamente do que o enantiômero (S)-substrato, logo ($K_A > K_B$) (Figura 2.2). Na resolução cinética convencional o enantiômero do (S)-substrato permanece intacto não reagindo, enquanto que na RCD, o substrato menos reativo é continuamente racemizado durante o processo de resolução. O (R)-substrato e o (S)-substrato estão em equilíbrio, o que permite a possibilidade de converter todo o material de partida racêmico em (R)-produto. Desta forma, um determinado substrato racêmico poderá ser convertido num único enantiômero do produto com um rendimento teórico de 100%.

Figura 2.2 - Resolução cinética dinâmica.

Fonte: PELLISSIER, 2003, p. 8291

Sharfuddin et al. (2003) realizaram a RCD de diferentes *N*-acil-hemiaminais utilizando as lipases de *Pseudomonas cepacia* e *Pseudomonas fluorescens*, obtendo como produto exclusivamente os (R)-enantiômeros com excessos enantioméricos > 99%. As *N*-acil-hemiaminais são importantes precursores na síntese de blocos de construção quirais de diversos compostos bioativos (Esquema 2.2).

Esquema 2.2 - Resolução cinética dinâmica de *N*-acil-hemiaminais com as lipases de *Pseudomonas cepacia* e *Pseudomonas fluorescens*.

Tabela 2.2 - Resolução cinética dinâmica de *N*-acil-hemiaminais com as lipases de *Pseudomonas cepacia* e *Pseudomonas fluorescens*.

R	Biocatalisador	Temperatura (°C)	Tempo (dias)	ee (%)
Me	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	65	4	63
<i>n</i> -Pr	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	65	4	>99
<i>i</i> -Pr	<i>Pseudomonas cepacia</i>	70	6	>99
<i>t</i> -Bu	<i>Pseudomonas cepacia</i>	70	6	>99
Ph	<i>Pseudomonas cepacia</i>	70	7	>99

R = consultar Esquema 2.2.

ee = excesso enantiomérico.

A racemização do substrato de partida, que reage mais lentamente, pode ser realizada por meio de uma catálise enzimática empregando células íntegras ou a combinação de enzimas isoladas ou, não-enzimaticamente, fazendo uso de catalisadores de complexos metálicos de rutênio, ródio, irídio e de alumínio. Na literatura são descritos vários métodos eficientes de RCD que combina a etapa de resolução cinética enzimática e a etapa de racemização catalisada por metais de transição (AHN et al., 2008). Por exemplo, na hidrólise enzimática do 1-feniletanol pela lipase de *Pseudomonas fluorescens*. Nesta reação o (*R*)-álcool interagiu mais rapidamente com a lipase e foi acetilado, e o (*S*)-álcool remanescente foi racemizado utilizando um catalisador metálico de rutênio para obtenção enantiosseletiva do (*R*)-acetato enriquecido com excesso enantiomérico de 98% e 60% de rendimento isolado (Esquema 2.3) (DINH et al., 1996).

Esquema 2.3 - RCD do 1-feniletanol com a lipase de *Pseudomonas fluorescens*, seguida de racemização por catalisador metálico de rutênio.

A utilidade da RCD não está limitada apenas a uma síntese seletiva de um enantiômero a partir de uma mistura racêmica. Uma síntese enantiosseletiva de um diastereoisômero também pode ser obtida, como produto isomérico com rendimento teórico de 100%, quando a reação ocorre juntamente com a criação de um novo centro estereogênico (Figura 2.3) (PELLISSIER, 2008).

Figura 2.3 - Síntese enantiosseletiva de diastereoisômeros via resolução cinética dinâmica.

Fonte: PELLISSIER, 2003, p. 8291

Lindstrom et al. (2005) realizaram uma síntese enantiosseletiva a partir de uma lactona por várias etapas de síntese até obtenção do diastereoisômero *rac-anti*-3-metil-pentano-1,4-diol, seguida de uma resolução cinética, utilizando a CALB como catalisador, a qual forneceu como produto dois diastereoisômeros (mono e diacetilado). A partir do produto diacetilado pela lipase foi realizada uma redução com LiAlH₄ para obtenção do *anti*-3-metil-pentano-1,4-diol o feromônio sexual da vespa do pinheiro (fêmea), uma praga encontrada no Hemisfério Norte (Esquema 2.4).

Esquema 2.4 - Síntese racêmica do *rac-anti*-3-metil-pentano-1,4-diol, seguida de uma resolução cinética com CALB obtendo os diastereoisômeros, seguida de redução com LiAlH_4 .

Várias condições reacionais devem ser aplicadas para que a racemização do substrato seja realizada eficientemente, e tanto a resolução cinética quanto o procedimento de racemização, devem ser compatíveis, numa resolução cinética eficiente a constante de velocidade ($K_A \gg K_B$) (GHANEM, 2007).

Claramente, alguns requisitos devem ser cumpridos a fim de obter o conjunto completo de vantagens de RCD, tais como, a irreversibilidade da etapa de resolução, e o fato de que nenhuma racemização do produto deve ocorrer sob as condições de reação. Assim, para obter produtos com uma pureza óptica elevada, a razão enantiomérica ($E = K_A/K_B$) da etapa de resolução deve ser de pelo menos 20. Além disso, a constante de velocidade para o processo de racemização (K_{inv}) deve ser mais rápida do que a constante de velocidade da resolução (K_A) (PELLISSIER, 2008).

c) Reação de Mitsunobu

A reação de Mitsunobu é uma importante metodologia aplicada na síntese orgânica, para obtenção de produtos com alto grau de pureza enantiomérica. Essa metodologia unida à resolução cinética clássica, que têm limitado rendimento teórico de 50%, pode fornecer um enantiômero com 100% de rendimento, utilizando um mecanismo $\text{S}_{\text{N}}2$ seguido de inversão de configuração (DANDAPANI; CURRAN, 2004).

A reação de Mitsunobu permite a substituição de álcoois primários ou secundários com uso de nucleófilos. As reações são mediadas pela combinação redox de uma trifenilfosfina (Ph_3P) e um dietil-azo-carboxilato (DEAD) (Esquema 2.5) (MAZURKIEWICZ et al., 2006; SWAMY et al., 2009). Os nucleófilos mais empregados na reação de Mitsunobu são: ácidos carboxílicos, imidas, tiois, tioaminas e até mesmo o carbono nucleofílico (MAZURKIEWICZ et al., 2006).

Esquema 2.5 - Reação de Mitsunobu.

Um exemplo interessante da aplicação da reação de Mitsunobu foi empregada na hidrólise quimioenzimática de uma série de acetatos benzílicos secundários, utilizando a CALB como biocatalisador, combinada a desracemização utilizando o protocolo de Mitsunobu (Esquema 2.6). A reação de hidrólise foi realizada em 3 dias à temperatura de 40 °C. Após obtenção do (*R*)-álcool e (*S*)-acetato foi adicionado à mistura reacional 1,2 equivalentes da Ph_3P e DEAD em ácido acético, obtendo-se $ee > 99\%$ e $E > 500$ para o (*S*)-acetato (Tabela 2.3) (HOUJINE et al., 2013).

Esquema 2.6 - Desracemização combinada à hidrólise enzimática do ($\pm$)-acetato benzílico utilizando a reação de Mitsunobu.

Tabela 2.3 - Desracemização combinada à hidrólise enzimática de acetatos benzílicos secundários utilizando a reação de Mitsunobu.

Substrato	Reação de hidrólise enzimática			Inversão de Mitsunobu	
	ee_s (%) (S)-acetato	ee_p (%) (R)-álcool	E	ee (%) (S)-acetato	rend. (%) (S)-acetato
>99	>99	>500	>99	70
>99	>99	>500	>99	82
98	98	>500	92	87

 ee = excesso enantiomérico. E = razão enantiomérica.

rend. = rendimento.

2.2 Regra de Kazlauskas

Em 1991, Kazlauskas e colaboradores desenvolveram uma regra empírica que permite prever qual dos enantiômeros de um álcool secundário racêmico pode reagir mais rapidamente com a lipase. Este estudo foi baseado na análise de mais de 130 exemplos de reações de hidrólise de ésteres de ácidos carboxílicos e de álcoois secundários, bem como, da esterificação de álcoois catalisada por lipases de *Candida rugosa* (CRL), de *Pseudomonas cepacia* (PCL) e de *Cholesterol esterase* (CE) (GRUNWALD, 2009).

Como relatado anteriormente, as lipases possuem em sua estrutura uma pequena região na qual a catálise enzimática ocorre, denominada de *sítio ativo*. A superfície do *sítio ativo* é revestida com resíduos de aminoácidos com grupos substituintes que se ligam ao substrato e catalisam sua transformação química (NELSON; COX, 2011). Assim, foi constatado que no *sítio ativo* da lipase existem duas porções hidrofóbicas, uma de tamanho grande e outra pequena e estas seriam as porções responsáveis pela “acomodação” dos grupamentos substituintes de um álcool secundário racêmico durante uma reação enzimática. Esta regra estabelece que a maioria das lipases apresentam a mesma enantiopreferência para um determinado

tipo de substrato. Naturalmente, o enantiômero que apresenta maior velocidade na reação será aquele que melhor acomodar os seus grupos substituintes nas porções hidrofóbicas, ou seja, o grupo substituinte de tamanho pequeno se acomodará na porção hidrofóbica pequena e o grupo substituinte de tamanho grande se acomodará na porção hidrofóbica grande (Figura 2.4) (GHANEM, 2007; JING; KAZLAUSKAS, 2008; KAZLAUSKAS, 1991).

O enantiômero que reage mais lentamente será então forçado a acomodar o seu grupo grande na porção média do sítio ativo da enzima, gerando repulsões estéricas com a tríade catalítica da enzima, levando uma menor velocidade na reação. Embora esta regra empírica tenha sido também realizada para álcoois primários e ésteres de ácidos carboxílicos sua confiabilidade é menor do que para álcoois secundários (GHANEM, 2007).

Figura 2.4 - Ilustração do sítio catalítico de uma lipase e os enantiômeros de um álcool quiral contendo um grupo volumoso (esfera G) e um grupo pequeno ou menos volumoso (esfera P). **A)** Enantiômero que reage mais rapidamente. **B)** Enantiômero que reage mais lentamente.

Fonte: GHANEM, 2007, p. 1721; JING; KAZLAUSKAS, 2008, p. 724. KAZLAUSKAS, 1991, p. 2556.

DHAKE et al. (2012) realizaram a resolução cinética do 1-feniletanol utilizando a lipase de Steapsin, uma enzima digestiva, mas pouco utilizada na resolução cinética. O 1-feniletanol é um bom exemplo para demonstrar interação do sítio ativo da enzima com um álcool secundário (Regra de Kazlauskas). O grupo fenílico seria o grupo volumoso (esfera G) e o grupo metílico (esfera P) o menos volumoso. O enantiômero que reagiu mais rapidamente foi esterificado pela lipase, o qual deve ter apresentado um encaixe semelhante ao da Figura 2.4A, e o enantiômero que reagiu mais lentamente sofre então o encaixe desfavorável como da Figura 2.4B.

Esta reação foi realizada à temperatura de 55 °C, por 24 h em solvente *n*-hexano utilizando o acetato de vinila como agente acilante (Esquema 2.7).

Esquema 2.7 - Resolução enzimática do 1-feniletanol pela lipase Steapsin e representação dos grupos grande e pequeno segundo regra de Kazlaukas.

2.3 Aplicação da irradiação micro-ondas em biocatálise

2.3.1 Enzimas isoladas

Algumas reações requerem horas de aquecimento convencional para serem completadas. Quando é utilizada a irradiação micro-ondas estas podem ocorrer em poucos minutos e com altos rendimentos e seletividades (YADAV; PAWAR, 2012). Essa importante ferramenta tecnológica é também concordante com os princípios da Química Verde e por isso tem sido utilizada em reações orgânicas e mais recentemente em reações catalisadas por enzimas (YU et al., 2011; KAPPE; STADLER, 2006; ZHU et al., 2006; YU et al., 2012).

Na literatura trabalhos envolvendo reações enzimáticas utilizando a técnica de irradiação micro-ondas são descritas (Figura 2.5). Realizando uma busca no *SciFinder* utilizando as palavras chaves *Microwave and Enzymatic reaction* obteve-se um total de 343 publicações, sendo que 149 artigos foram publicados nos últimos cinco anos.

Figura 2.5 - Evolução das publicações dos últimos anos (palavras chaves: *Microwave and Enzymatic reaction*, busca no Scifinder, Agosto de 2013).

Fonte: Autoria própria

Devido às vantagens das reações realizadas em reatores de micro-ondas, o número de publicações em livros e artigos científicos tem crescido expressivamente. Kappe e Dallinger mostraram que entre 2008 e 2009 foram mais de 900 artigos publicados em 50 revistas científicas (TEIXEIRA et al., 2010).

Dentre estes trabalhos realizados podem ser citados alguns exemplos da literatura que realizaram a resolução cinética de álcoois secundários utilizando a CALB como biocatalisador por irradiação micro-ondas comparando os seus resultados aos obtidos por condições convencionais (agitador orbital).

YU et al. (2007) realizaram a resolução cinética do ($\pm$)-2-octanol catalisada pela CALB, onde foi observado que as reações realizadas nas mesmas condições em agitador orbital e por irradiação micro-ondas apresentaram diferenças no tempo reacional. A reação que foi realizada na temperatura de 40 °C por irradiação micro-ondas apresentou 50% de conversão para o produto (*R*)-acetilado em 3 h de reação e por aquecimento convencional foi necessário um tempo reacional quatro vezes maior. A reação foi então realizada por irradiação micro-ondas na temperatura de 60 °C por 2 h, obtendo-se o (*S*)-2-octanol com 50,5% de conversão e excesso enantiomérico > 99%. Segundo os autores essa diferença no tempo reacional deve-se à absorção da energia de micro-ondas (temperatura), pelos grupos funcionais dos substratos e da solução, devido aos efeitos da condutividade iônica e de rotação de dipolo das ligações (Esquema 2.8).

Esquema 2.8 - Resolução enzimática do (±)-2-octanol por irradiação-micro-ondas.

Yadav e Devendran (2012) investigaram a resolução quimioenzimática do (±)-1-(1-naftil)etanol por irradiação micro-ondas e aquecimento convencional. O (±)-1-(1-naftil)etanol é um importante bloco de construção quiral para a síntese de produtos farmacêuticos intermediários ativos. Três diferentes lipases foram utilizadas: Novozyme 435® (*Candida antarctica*), lipozyme RMIM (*Rhizomucor miehei*), lipozyme TLIM (*Thermomyces lanuginosus*). A CALB foi o melhor biocatalisador em *n*-heptano ($\log P$ 4,6), obtendo-se uma conversão de 48% e excesso de 90% do (R)-acetato na temperatura de 60 °C em 3 h de reação (Esquema 2.9). Em aquecimento convencional foi obtido após 5 h de reação, 40% de conversão e excesso enantiomérico de 64% do (R)-acetato (YADAV; DEVENDRAN, 2012).

Esquema 2.9 - Resolução enzimática do (±)-1-(1-naftil)etanol por irradiação micro-ondas.

A resolução quimioenzimática de diversos álcoois secundários contendo diferentes funcionalidades, e a posição relativa do grupo hidroxila ao anel aromático foram avaliadas por Bachu et al. (2007), utilizando a CALB em tolueno à temperatura de 60 °C. Em todos os casos os valores de conversões por irradiação micro-ondas foram superiores aos obtidos por aquecimento convencional. Por irradiação micro-ondas foram obtidas conversões variando entre 30-50% e excessos enantioméricos

Esquema 2.11 - Síntese do miristato de isoamila em sistema livre de solvente por irradiação micro-ondas.

2.4 Resolução quimioenzimática de ciano-hidrinás

As ciano-hidrinás apresentam considerável potencial sintético como blocos quirais, uma vez que suportam um grupo hidroxila e um grupo ciano em um carbono estereogênico possibilitando a obtenção de moléculas quirais com grande versatilidade sintética, que podem facilmente ser transformadas em compostos de maior valor agregado, tais como, α -aminoácidos, α -hidroxiácidos, β -aminoálcoois, diois vicinais e α -hidroxicetonas que podem ser utilizadas na síntese de agroquímicos e fármacos (XU et al., 2010; DEGANI; KAKWANI, 2012).

Como um exemplo, temos a síntese do inseticida piretroide *Cipermetrina* 250EC (Nortox) e do fármaco *Cipralex* fabricado pela H. Lundbeck A/S utilizado para o tratamento de doença como depressão (Figura 2.6) (PAIZS et al., 2004; SAKAI et al., 1998).

Figura 2.6 – Fármaco e inseticida sintetizados a partir de compostos cianídricos.

A síntese estereosseletiva de ciano-hidrinas pode ser obtida por três principais metodologias:

- (a) Hidrocianação de aldeídos ou cetonas catalisadas por um catalisador químico;
- (b) Hidrocianação de aldeídos ou cetonas catalisadas por um catalisador biológico;
- (c) Acetilação de ciano-hidrinas ou hidrólise dos ésteres de ciano-hidrinas catalisadas por lipases e esterases, respectivamente, via resoluções quimioenzimáticas (XU et al., 2010).

Um exemplo interessante de uma reação catalisada biologicamente é o da enzima hidroxinitrila liase (HNL), utilizada na preparação de ciano-hidrinas quirais. Esta enzima pode ser encontrada em muitas espécies de plantas incluindo *Prunus amygdalus* (amendoeira), *Hevea brasiliensis* (seringueira) e a *Sorghum bicolor* (sorgueira). A enzima HNL da amendoeira, R-PaHNL [E.C. 4.1.2.10] é conhecida por catalisar a formação de ciano-hidrinas com (R)-configuração, previsto com grupos substituintes hidroxila e ciano, com prioridades sobre os substituintes alquílicos e arílicos de acordo com a Regra de Cahn-Ingold-Prelog (Esquema 2.12) (GERRITS et al., 2001).

Esquema 2.12 - Síntese da (R)-ciano-hidrina catalisada pela R-PaHNL.

Sakai et al. (1998) realizaram a hidrólise enzimática da 2-aciloxi-2-(pentafluorofenil)acetonitrila que são compostos de interesse devido à presença de átomos de flúor no anel aromático, o que lhe confere maior lipofilicidade, devido as propriedades elétron doadoras dos átomos de flúor. Nesse estudo foi realizada uma triagem com as lipases de *Pseudomonas cepacia*, *Pseudomonas fluorescens*, *Candida rugosa*, *Aspergillus niger* e *Pseudomonas aeruginosa* para o substrato, acetato de

ciano(perfluorofenil)metila em diferentes solventes e pH, e em tampão fosfato. A bactéria *P. aeruginosa* foi escolhida para resolução com outros dois substratos, obtendo-se altos rendimentos e enantiosseletividades dos produtos quirais (Esquema 2.13, Tabela 2.4).

Esquema 2.13 - Hidrólise enzimática de 2-aciloxi-2-(pentafluorofenil)acetonitrilas com diferentes lipases.

Tabela 2.4 - Hidrólise enzimática da 2-aciloxi-2-(pentafluorofenil)acetonitrila com diferentes lipases.

R_1	lipase	solvente	Tempo (h)	(S)-álcool		(R)-acetato		<i>E</i>
				rend.(%)	ee (%)	rend.(%)	ee (%)	
Me	<i>P. cepacia</i>	acetona	23	36	70	48	84	15
Me	<i>P. aeruginosa</i>	3-pentanona	8	39	94	39	85	92
Et	<i>P. aeruginosa</i>	3-pentanona	10,5	38	97	46	92	211
Pr	<i>P. aeruginosa</i>	3-pentanona	34	32	89	43	96	67

R_1 = consultar Esquema 2.13.

rend. = rendimento.

ee = excesso enantiomérico.

E = razão enantiomérica.

Xu et al. (2008) realizaram a resolução quimioenzimática de ciano-hidrinas aromáticas contendo diferentes grupos substituintes, possibilitando sintetizar moléculas biologicamente ativas. Nesse estudo foi utilizado como catalisador a lipase PS-30 e o acetato de vinila como agente acilante, obtendo-se excelentes conversões e excessos enantioméricos (Esquema 2.14, Tabela 2.5).

Esquema 2.14 - Resolução enzimática de halodrinhas racêmicas pela lipase PS-30.

Tabela 2.5 - Resolução enzimática de halodrinas racêmicas pela lipase PS-30.

R ₁	Tempo (h)	(S)-álcool		(R)-acetato		E
		c (%)	ee (%)	c (%)	ee (%)
42	58	71,1	42	98,3	249
32	68	47,1	32	98,7	244
50	50	93,6	50	92,8	94
45	55	80,7	45	98,4	314

R₁ = consultar Esquema 2.14.

c = concentração.

c = conversão.

ee = excesso enantiomérico.

E = razão enantiomérica.

2.5 Resolução quimioenzimática de compostos organofluorados

Compostos organofluorados possuem propriedades físicas, químicas e biológicas únicas que são exploradas numa vasta gama de aplicações, tais como na agroquímica e na síntese de produtos farmacêuticos. Na química medicinal, por exemplo, importantes propriedades fisiológicas podem ser conferidas através da adição de moléculas contendo átomos de flúor, aumentando a seletividade da ligação, elevando a lipofilicidade e melhorando a estabilidade metabólica dessas moléculas (HIYAMA, 2000; NAGIB et al., 2009).

A síntese e aplicação de compostos organofluorados para fins terapêuticos tem atraído uma atenção significativa. Pode-se citar como exemplo a síntese de fármacos utilizados para o tratamento da depressão como a *Fluoxetina* (Prozac®) e o *Risperidona* (Risperdal) uma das drogas mais utilizadas no tratamento da esquizofrenia, desordem bipolar e depressão psicótica (Figura 2.7) (KIRK, 2006).

Figura 2.7 - Fármacos que contêm átomos de flúor em sua estrutura.

Sendo assim, é também de interesse obter compostos organofluorados enantiomericamente puros (ou enriquecidos), possibilitando a síntese de moléculas quirais com atividade biológica.

Moléculas enantiomericamente puras ou enriquecidas podem ser obtidas através da resolução cinética de álcoois secundários racêmicos catalisadas por lipases. Na literatura são descritos alguns trabalhos envolvendo a resolução enzimática de compostos organofluorados, como por exemplo, a resolução quimioenzimática de trifluoro(aril)etanois catalisada pelas lipases de *Pseudomonas aeruginosa* (LIP) e *Alcaligenes* sp. (PLC), utilizando o acetato de vinila como agente acilante e como solvente o octano, obtendo excelentes excessos enantioméricos e rendimentos. Os trifluoro(aril)etanois opticamente ativos são intermediários importantes na síntese de moléculas bioativas funcionalizadas (Esquema 2.15, Tabela 2.6) (KATO et al., 2001).

Esquema 2.15 - Resolução quimioenzimática de trifluoro(aril)etanois por lipases.

Tabela 2.6 - Resolução quimioenzimática de trifluoro(aril)etanóis por lipases.

R ₁ /R ₂	lipase	Tempo (h)	(R)-álcool		(S)-acetato		E
			rend. (%)	ee (%) /	rend. (%)	ee (%) /	
R ₁ = R ₂ = H	LIP	24	49	>99	49	94	>100
R ₁ = H, R ₂ = CH ₃	LIP	65	51	94	47	98	>100
R ₁ = CH ₃ , R ₂ = H	LIP	330	-	-	-	-	-
R ₁ = R ₂ = H	PLC	45	61	65	38	93	54
R ₁ = H, R ₂ = CH ₃	PLC	65	42	99	54	89	100
R ₁ = CH ₃ , R ₂ = H	PLC	330	82	16	17	91	25

R₁/R₂ = consultar Esquema 2.15.

rend. = rendimento.

ee = excesso enantiomérico.

E = razão enantiomérica.

Bogár & Backvall (2007) realizaram a resolução quimioenzimática dinâmica de álcoois aromáticos fluorados com a CALB em tolueno, utilizando 5 mol% do catalisador de rutênio(I) para racemização do substrato que não foi primeiramente esterificado, obtendo rendimentos superiores a 97% e excelentes excessos enantioméricos ($\geq 99\%$). O composto (R)-1-(3,5-bis-trifluorometilfenil)etanol é um importante intermediário da síntese do fármaco *Aprepitant* utilizado na prevenção de náuseas e enjoos (Esquema 2.16).

Esquema 2.16 - Resolução cinética dinâmica do (R)-1-(3,5-bis-trifluorometilfenil)etanol com CALB.

Goj et al. (1997) realizaram a hidrólise enzimática da 2-fluoro-2-fenilalquílicos pela lipase de *Pseudomonas cepacia* (Amano PS) em tampão fosfato (0,5 M) à temperatura ambiente. Os 2-fluoro-2-fenilalquílicos são compostos interessantes, devido à distância do centro quiral do carbono quaternário ao centro reativo primário, e são raros de serem encontrados na literatura. Os resultados obtidos indicaram que o aumento da cadeia R₁ por grupos alquílicos melhorou o reconhecimento quiral favorecendo a obtenção de acetatos enantiopuros. Para esses

compostos foram obtidos rendimentos entre 19-37% e excessos enantioméricos entre 83-98% (Esquema 2.17, Tabela 2.7).

Esquema 2.17 - Hidrólise enzimática da 2-fluoro-2- fenilalquílicos pela lipase de *P. cepacia*.

Tabela 2.7 - Hidrólise enzimática da 2-fluoro-2- fenilalquílicos pela lipase *P. cepacia*.

R ₁	Tempo (h)	c (%)	(R)-álcool		(S)-acetato	
			rend. (%)	ee (%)	rend. (%)	ee (%)
CH ₃	0,5	46	35	64	34	83
C ₂ H ₅	4,5	48	35	91	27	98
<i>n</i> -C ₃ H ₇	8	43	29	86	34	92
<i>n</i> -C ₄ H ₉	8,5	46	31	88	33	96

R₁ = consultar Esquema 2.17.

c = conversão.

rend. = rendimento.

ee = excesso enantiomérico.

Diante do exposto, foi despertado nosso interesse em estudar reações de resolução quimioenzimática de compostos cianídricos e organofluorados, utilizando a irradiação micro-ondas como uma ferramenta para obtenção de compostos enantiomericamente puros ou enriquecidos e avaliar os resultados frente às reações em agitação orbitalar.

2.6 OBJETIVO

Realizar a resolução quimioenzimática de álcoois secundários em compostos cianídricos e organofluorados racêmicos usando a CALB como catalisador em condições convencionais (agitador orbital) e sobre irradiação micro-ondas.

✓ *Compostos cianídricos utilizados como substratos*

✓ *Compostos orgânicos fluorados utilizados como substratos*

2.7 PARTE EXPERIMENTAL

2.7.1 Materiais e métodos

2.7.1.1 Enzima

A lipase imobilizada em resina acrílica de *Candida antarctica* (CALB), $\geq 10,000$ U/g, recombinante, expressa em *Aspergillus oryzae* foi doada pela Novo Nordisk (Brazil).

2.7.1.2 Reagentes

A mandelonitrila (**1a**) e os aldeídos [*p*-clorobenzaldeído (**2**), *p*-hidroxibenzaldeído (**3**), 4-fluoro-benzaldeído (**5**), 4-metoxi-benzaldeído (**6**), 4-fenoxi-benzaldeído (**7**) e 3-fenil-2-propenaldeído (**8**)] foram obtidos da Sigma-Aldrich. A ($\pm$)-2-hidroxi-butanonitrila (**4a**) foi cedida pelo Prof. Dr. Alcindo A. dos Santos (IQ-USP). Os solventes (EtOAc, *n*-hexano, éter etílico e tolueno) foram obtidos comercialmente da Tedia (Brasil), Panreac (Espanha) e J.T. Baker (USA). As separações foram realizadas em colunas cromatográficas utilizando sílica gel 60 (230-400 mesh) como fase estacionária e misturas de hexano e acetato de etila (9:1) ou éter etílico e hexano (8:2) como eluentes. As frações coletadas foram monitoradas por cromatografia em camada delgada (CCD) utilizando placas de cromatofolhas de alumínio impregnadas com sílica gel 60 F₂₅₄ (Sorbent Technologies).

2.7.2 Métodos de análise, identificação e caracterização dos compostos

a) Espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN)

Espectros de RMN de ^1H e ^{13}C foram obtidos em espectrômetros: Bruker/AC-200 (CAQI-IQSC) - Frequências: 200 MHz (RMN ^1H) e 50 MHz (RMN ^{13}C); Agilent Technologies modelo: 500/54 e 400/54 Premium Shielded (CAQI-IQSC) - Frequência de 500 e 400 MHz, respectivamente; Bruker/AVANCE III (DQ-UFSCar, Prof. Dr. Antonio Gilberto Ferreira) - Frequência: 400 MHz (RMN ^1H) em campo Tesla.

Os deslocamentos químicos (δ) foram expressos em parte por milhão (ppm) e referenciados em relação ao RMN de ^1H pelo sinal de hidrogênio pertencente ao padrão interno tetrametilsilano (TMS). Para o RMN de ^{13}C o sinal de referência do carbono-13 foi solvente clorofórmio deuterado (CDCl_3) em δ 77,2.

b) Espectroscopia de infravermelho (IV)

Os espectros de absorção na região do infravermelho (IV) foram obtidos em um aparelho com transformada de Fourier, modelo Shimadzu IRAffinity e calibração interna com software IRSolution. As amostras foram preparadas na forma de filmes em pastilha de silício (líquidas) e em pastilhas de KBr (sólidas) e as frequências de absorção sendo expressas em cm^{-1} .

c) Medidas de rotação óptica

A leitura de rotação óptica dos enantiômeros **9a-13a** e **9b-13b** foram realizadas em polarímetro Perkin-Elmer 241 (Waltham, MA, USA), equipado com lâmpada de sódio ($\lambda = 589 \text{ nm}$), utilizando celas de 1 dm de diâmetro e concentrações expressas em g/100 mL (DQ-UFSCar, Prof. Dr. Timothy John Brocksom). As demais rotações ópticas foram realizadas em polarímetro Jasco modelo P2000, equipado com lâmpada de sódio ($\lambda = 589 \text{ nm}$) para os álcoois e acetatos enantiopuros, utilizando celas de 1 dm de diâmetro e concentrações expressas em g/100 mL, com o software Spectra manager (CAQI-IQSC).

d) Reações em reator de micro-ondas

As análises foram realizadas em reator de micro-ondas CEM Discover reflux open vessel, contendo sensor de infravermelho (IV) para monitoramento da temperatura de 300 °C. O reator possui uma cavidade monomodo com capacidade de uso de balões 10-125 mL, sistema de agitação com barra magnética, entrada de ar comprimido para acelerar o resfriamento do sistema, porta com interloque de segurança, software interno para calibração da temperatura do sensor tipo IR, e o software utilizado foi o Sinergy para preparação dos métodos de análises.

e) Cromatografia a gás acoplada ao detector de ionização em chama (GC-FID)

As reações foram analisadas utilizando um cromatógrafo da marca Shimadzu, modelo GC2010, equipado com auto-injetor AOC 20i com um detector de ionização de chama (FID-Flame Ionization Detector), utilizando nitrogênio como gás de arraste (74 KPa). O software utilizado foi o GCSolution e as condições de análise utilizadas

encontram-se abaixo dos cromatogramas exibidos nos resultados e discussão de cada capítulo.

f) Cromatografia a gás acoplada ao espectrômetro de massas (GC-MS)

Os espectros de massas foram obtidos em cromatógrafo a gás modelo Shimadzu GC2010 acoplado a um detector de massas (Shimadzu MS2010plus) com o modo de ionização por impacto de elétrons (EI), software GCsolution e uma coluna J&W Scientific DB-5 (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm); gás de arraste: nitrogênio (60 kPa); temperatura do injetor: 300 °C; razão split do injetor: 1:20; temperatura do detector 300 °C; forno: (temperatura inicial) 50 °C por min, (temperatura final) 270 °C por min; taxa de aquecimento: 10 °C/min, tempo total de análise de 32,0 min.

g) Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

As reações analisadas em cromatografia líquida de alta eficiência foram realizadas na CAQI em aparelho da Shimadzu modelo LC-10AD equipado com detector SPD-10Av (UV/Vis), degaseificador DGU-20A3, com arranjo de diodo (DAD), acoplado com uma CBM 20A. O detector de arranjo de diodos UV foi utilizado no comprimento de onda de 220 e 254 nm para aquisição dos cromatogramas. Como fase móvel foi utilizada uma mistura hexano:isopropanol (9:1) e como fase estacionária uma coluna quiral Chiralcel OD-H (0,46 x 25 cm) da marca Daicel®. O software utilizado foi o LCSolution.

h) Espectrometria de massas com ionização por eletrospray (EM-IES)

Os espectros de massas de alta resolução foram obtidos a partir de um aparelho da Thermo Fisher Scientific, com um analisador de massas LTQ Orbitrap Velos, operando no modo positivo e negativo. As análises foram realizadas pela Central Analítica do Instituto de Química de São Carlos (IQSC), utilizando o software Xcalibur.

i) 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. As reações foram realizadas em agitador orbital modelo Tecnal TE-421, agitador orbital refrigerado modelo 430/RDBP (Nova Ética) e banho-maria Dubnoff (Marconi).

j) 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, centrífuga Hermle Z200A e vortex Motion LSM56.

2.7.3 Síntese dos compostos racêmicos

Experimento 1 - Síntese das ciano-hidrinas **2a-3a**

As ciano-hidrinas **2a-3a** foram sintetizadas a partir da reação entre cianeto de trimetilsilano (TMSCN) e os correspondentes aldeídos: *p*-clorobenzaldeído (**2**) e o *p*-hidroxibenzaldeído (**3**) (Esquema 2.18) a partir de metodologia descrita na literatura (GASSMAN; TALLEY, 1978; KOBAYASHI, et al., 1991).

Esquema 2.18 - Síntese das ciano-hidrinas **2a-3a**.

Procedimento:

Em um balão de 50 mL, em atmosfera de nitrogênio foram adicionados CH₂Cl₂ seco (14 mL), TMSCN (3,5 mmol), o correspondente aldeído [*p*-hidroxibenzaldeído (4,1 mmol) ou *p*-cloro-benzaldeído (3,5 mmol)] e a trietilamina recém destilada (0,35 mmol) à temperatura de 0 °C. A mistura reacional foi mantida em agitação (0 °C, 2 h) e monitorada por CCD. Posteriormente, evaporou-se o solvente sob pressão reduzida. Em seguida, ao produto bruto foi adicionado lentamente 5 mL de solução de HCl 3 mol.L⁻¹. A mistura reacional foi agitada à temperatura ambiente por 1 h. O produto obtido foi extraído com Et₂O (2 x 15 mL). A fase orgânica foi seca com MgSO₄ anidro, filtrada e o solvente foi evaporado à pressão reduzida. O produto foi purificado por cromatografia em coluna utilizando sílica *gel* como fase estacionária e eluentes contendo hexano:AcOEt (9:1) com gotas de ácido acético glacial na fase móvel, obtendo-se os seguintes rendimentos: (±)-2-(4-clorofenil)-2-hidroxiacetonitrila **2a** (81%), (±)-2-hidroxi-2-(4-hidroxifenil)acetonitrila **3a** (86%). A síntese foi realizada em colaboração com o técnico João Pedro de Lima Freitas.

Experimento 2 - Síntese das ciano-hidrinas **5a-8a**

As ciano-hidrinas **5a-8a** foram sintetizadas a partir da metodologia descrita na literatura (DEGANI et al., 2012), utilizando o cianeto de trimetilsilano (TMSCN) (1,5 equivalentes), uma mistura de DMSO:H₂O (5:1), 12h de reação à temperatura ambiente, com os correspondentes aldeídos: 4-fluorobenzaldeído (**5**), 4-metoxibenzaldeído (**6**), 4-fenoxibenzaldeído (**7**) e 3-fenil-2-propenalaldeído (**8**) (Esquema 2.19).

Esquema 2.19 - Síntese das ciano-hidrinas **5a-8a**.

Procedimento:

Em um balão de 25 mL foram adicionados 5 mL de uma mistura de DMSO:H₂O (5:1 v/v), o TMSCN (0,7 mmol) e o correspondente benzaldeído (0,5 mmol). A mistura reacional foi mantida em agitação magnética à temperatura ambiente. A reação foi monitorada por CCD até o total consumo do material de partida (12h de reação). Posteriormente, o produto obtido foi extraído com AcOEt (2 x 25 mL) e água (2 x 10 mL). A fase orgânica foi seca com Na₂SO₄ anidro, filtrada e o solvente foi evaporado à pressão reduzida. O produto foi purificado por cromatografia em coluna utilizando sílica *gel* como fase estacionária a mistura de eluentes Et₂O:AcOEt (8:2), obtendo-se os seguintes rendimentos: 2-(4-fluorofenil)-2-hidroxiacetonitrila **5a** (61%), 2-hidroxi-2-(4-metoxifenil)acetonitrila **6a** (45%) e 2-hidroxi-2-(4-fenoxifenil)acetonitrila **7a** (95%) e (*E*)-2-hidroxi-4-fenilbut-3-enonitrila **8a** (82%). As reações foram realizadas em colaboração com o doutorando Irlon Marcial Ferreira.

Experimento 3 - Síntese de álcoois fluorados racêmicos **9a-13a**

Os álcoois fluorados ($\pm$)-2,2,2-trifluoro-1-feniletanol **9a**, ($\pm$)-1-(2,4,5-trifluorofenil)etanol **10a**, ($\pm$)-1-(4-bromofenil)-2,2,2-trifluoroetanol **11a**, ($\pm$)-1-(3-bromofenil)-2,2,2-trifluoroetanol **12a** e ($\pm$)-1-(2-trifluorometil)feniletanol **13a** foram sintetizados a partir da redução das correspondentes cetonas comerciais com boroidreto de sódio em metanol (Esquema 2.20).

Esquema 2.20 - Síntese dos álcoois racêmicos **9a-13a**.

Procedimento:

As reações de redução foram realizadas em um balão de 50 mL em agitação magnética com banho de gelo à temperatura de 0 °C. Para cada 1 equivalente das correspondentes cetonas **9** (7,1 mmol), **10** (3,8 mmol), **11** (3,2 mmol), **12** (3,2 mmol) e **13** (6,7 mmol) foram adicionadas 1,1 equivalente de boroidreto de sódio em metanol (10 mL) e manteve-se a reação em agitação magnética por 30 min. Em seguida, a reação foi monitorada por cromatografia em camada delgada e reveladas em solução de anisaldeído. Após confirmação da redução das cetonas, foi adicionada à reação água destilada (15 mL) e extraiu-se com acetato de etila (3 x 20 mL). A fase orgânica foi seca com Na_2SO_4 anidro, filtrada e concentrada a vácuo no rotaevaporador obtendo-se seguintes rendimentos: 2,2,2-trifluoro-1-feniletanol **9a** (93%), 1-(2,4,5-trifluorofenil)etanol **10a** (97%), 1-(4-bromofenil)-2,2,2-trifluoroetanol **11a** (82%), 1-(3-bromofenil)-2,2,2-trifluoroetanol **12a** (78%) e 1-(2-trifluorometil)feniletanol **13a** (86%).

Experimento 4 - Síntese de acetatos racêmicos **1b-13b**

Os acetatos racêmicos **1b-13b** foram sintetizados a partir da reação de esterificação dos álcoois racêmicos **1a** (0,67 mmol), **2a** (0,18 mmol), **3a** (0,24 mmol), **4a** (0,33 mmol), **5a** (0,25 mmol), **6a** (0,22 mmol), **7a** (0,16 mmol), **8a** (0,22 mmol), **9a** (2,19 mmol), **10a** (0,22 mmol), **11a** (0,13 mmol), **12a** (0,13 mmol) e **13a** (0,0005 mmol) (Esquema 2.21).

Esquema 2.21 - Síntese dos acetatos recêmicos **1b-13b**.

Procedimento:

A reação foi realizada em um balão de 25 mL em agitação magnética, adicionando-se sequencialmente o anidrido acético (10,5 mmol) e a piridina (12,4 mmol). A reação permaneceu em agitação por 24 h à temperatura ambiente. Após esse período, realizou-se uma CCD e quando se verificou o término da reação adicionou-se HCl 10% (2 mL). A fase orgânica foi extraída com AcOEt (3 x 10 mL) e seca com Na₂SO₄ anidro obtendo-se os seguintes rendimentos: (**1b**, 50%; **2b**, 85%; **3b**, 70%; **4b**, 65%; **5b**, 82%; **6b**, 86%; **7b**, 61%; **8b**, 86%; **9b**, 69%; **10b**, 82%; **11b**, 91%; **12b**, 94%; **13b**, 69%). Os compostos não requereram purificação por cromatografia em coluna.

2.7.4 Condições experimentais em escala analítica para as reações convencionais

2.7.4.1 Resolução cinética dos álcoois **1a-13a** com CALB em agitação orbital (escala analítica)

As reações foram realizadas em frascos Erlenmeyer de 50 mL onde se adicionou a lipase de *C. antarctica* (160 mg, 10.000 unidades de propil laurato por grama), o tolueno (10 mL), os álcoois racêmicos **1a** (0,67 mmol), **2a** (0,23 mmol), **3a** (0,40 mmol), **4a** (0,45 mmol), **5a** (0,33 mmol), **6a** (0,29 mmol), **7a** (0,22 mmol), **8a** (0,29 mmol), **9a** (0,29 mmol), **10a** (0,30 mmol), **11a** (0,26 mmol), **12a** (0,26 mmol) e **13a** (0,26 mmol) e o acetato de vinila (5,4 mmol). Após a adição do agente acilante fechou-se o frasco com septo de borracha e deixou-se a reação em agitação orbital termostatizado (32 °C, 130 rpm). As reações foram monitoradas retirando-se alíquotas do meio reacional em tempos de 2, 4, 24, 48, 72, 96, 120 e 144 h dependendo da reação. As alíquotas retiradas foram adicionadas em frascos *vials* onde o volume foi completado com acetato de etila (1,5 mL) e analisadas em cromatógrafo a gás (GC-FID).

2.7.4.2 Resolução cinética dos álcoois **1a-13a** com CALB em irradiação micro-ondas (escala analítica)

As reações foram realizadas em um balão de 50 mL no qual foi adicionado a lipase de *C. antarctica* (160 mg), o tolueno (10 mL), os álcoois racêmicos **1a** (0,67 mmol), **2a** (0,23 mmol), **3a** (0,40 mmol), **4a** (0,45 mmol), **5a** (0,33 mmol), **6a** (0,29 mmol), **7a** (0,22 mmol), **8a** (0,29 mmol), **9a** (0,29 mmol), **10a** (0,30 mmol), **11a** (0,26 mmol), **12a** (0,26 mmol) e **13a** (0,26 mmol) e o acetato de vinila (5,4 mmol). As reações foram realizadas no reator Discover CEM às temperaturas de 45, 65 e 80 °C (potência máxima de 200 W). As reações foram monitoradas retirando-se alíquotas de 250 µL do meio reacional em tempos de 1 h. As alíquotas retiradas foram adicionadas em frascos *vials* onde o volume foi completado com acetato de etila (1,5 mL) e analisadas em cromatógrafo a gás (GC-FID).

Para o substrato (±)-**8a** foi realizado um estudo de reuso da CALB em reator de micro-ondas utilizando o procedimento descrito no item 2.7.4.2.

2.7.4.3 Resolução cinética dos álcoois **1a-13a** com CALB em agitação orbitalar (escala semi-preparativa)

As reações foram realizadas em frascos Erlenmeyer de 50 mL onde se adicionou a lipase de *C. antarctica* (300 mg, 10.000 unidades de propil laurato por grama), o tolueno (10 mL), os álcoois racêmicos **2a-13a** (200 µL) e o acetato de vinila (5,4 mmol). Após adição do agente acilante fechou-se o frasco com septo de borracha e deixou-se em agitação orbitalar termostatizado (32 °C, 130 rpm). Para o *rac-1a* as reações foram realizadas em quadruplicata, utilizando balões de 50 mL onde se adicionou a lipase de *C. antarctica* (160 mg), o tolueno (10 mL), o acetato de vinila (5,4 mmol) e a mandelonitrila **1a** (0,67 mmol). As reações foram monitoradas retirando-se alíquotas do meio reacional em tempos de 24 h até 144 h dependendo da reação avaliada. Quando completada a reação a lipase imobilizada foi filtrada e o solvente (tolueno) foi evaporado à pressão reduzida. O resíduo foi purificado por cromatografia em coluna em sílica gel usando como eluente hexano:acetato de etila (8:2). As resoluções quimioenzimáticas dos álcoois **2a-13a** foram realizadas em duplicatas.

2.7.4.4 Derivatização dos álcoois remanescentes (que não foram esterificados enzimaticamente)

A derivatização dos álcoois (**1a**, **2a**, **6a**, **7a**, **8a** e **9a**) foi necessária para a determinação dos excessos enantioméricos, pois os enantiômeros desses álcoois não apresentaram enantioseparação nas colunas quirais utilizadas.

Procedimento:

Em diferentes tubos de ensaios foram adicionados os respectivos álcoois [**1a** (7,5x10⁻³ mmol), **2a** (0,18 mmol), **6a** (0,22 mmol), **7a** (0,16 mmol), **8a** (0,22 mmol) e **9a** (2,19 mmol)] não esterificados pela lipase, a piridina (6,2 mmol) e o anidrido acético (5,2 mmol), deixando os sistemas em agitação magnética durante 24 h. Em seguida realizou-se uma placa CCD com hexano:AcOEt (8:2) e após constatar o término da reação, adicionou-se duas gotas de uma solução de HCl 10%. Em seguida realizou-se uma extração com acetato de etila (10 mL) e água (10 mL). À fase orgânica adicionou-

se o Na_2SO_4 anidro e removeu-se o solvente no rotaevaporador. Posteriormente, as amostras foram diluídas em AcOEt em frascos *vials* e analisadas em coluna capilar quiral para a determinação dos excessos enantioméricos. Devido a baixa concentração das amostras os produtos não foram purificados, apenas analisados qualitativamente para determinação dos excessos enantioméricos.

2.8 Dados espectroscópicos: (Anexos)

Acetato de ciano(fenil)metila **1b**:

Óleo incolor. RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3) δ (ppm) = 7,48-7,34 (m, 5H), 6,33 ppm (s, 1H), 2,09 (s, 3H). RMN de ^{13}C (50 MHz, CDCl_3) δ (ppm) = 168,9; 131,6; 130,3; 129,2; 127,8; 116,1; 62,8; 20,4.

($\pm$)-2-(4-(Clorofenil)-2-hidroxiacetonnitrila **2a**:

Sólido branco. IV ν_{max} (cm^{-1}) = 3392 (OH), 2252 (CN), 1685, 1597, 1406, 1193, 1041, 840, 761. RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ (ppm) = 7,46 (d, J = 8 Hz, 2H), 7,42 (d, J = 8 Hz, 2H), 5,52 (s, 1H). RMN de ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) δ (ppm) = 133,6; 131,5; 129,4; 127,9; 118,45; 62,8. O espectro de massas de alta resolução foi realizado no modo positivo e negativo, mas não foi possível obter o seu HRMS (ESI-TOF): O valor calculado para composto $\text{C}_8\text{H}_6\text{ClNO}$ foi m/z 167,01379.

Acetato de (4-clorofenil)(ciano)metila **2b**:

Óleo amarelo. IV ν_{max} (cm^{-1}) = 2250 (CN, pico ausente), 1757, 1685, 1660, 1371, 1217, 1091, 1026, 819, 738, 609. RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ (ppm) = 7,47 (d, J = 8 Hz, 2H), 7,43 (d, J = 8 Hz, 2H), 6,39 (s, 1H), 2,17 (s, 3H). RMN de ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) δ (ppm) = 168,8; 136,6; 130,3; 129,5; 129,3; 115,8; 62,1; 20,4. HRMS (ESI-TOF): calculado para $\text{C}_{10}\text{H}_8\text{ClNNaO}_2$ [$\text{M} + \text{Na}^+$] 232,01413 e encontrado 232,01337.

(±)-2-Hidroxi-2-(4-hidroxifenil)acetonitrila 3a:

Sólido branco. IV $\nu_{\max}$ (cm^{-1}) = 3363 (OH), 3359 (OH), 2937, 2235 (CN), 1614, 1454, 1408, 1355, 1255, 1109, 846. RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ (ppm) = 7,47 (d, J = 8 Hz, 2H), 7,42 (d, J = 8 Hz, 2H), 5,53 (s, 1H), 3,17 (sl, 1H). HRMS (ESI-TOF): calculado para $\text{C}_8\text{H}_8\text{NO}_2$ [$\text{M} + \text{H}^+$] 150,05550 e encontrado 150,05496.

Acetato de ciano(4-hidroxifenil)metila 3b:

Óleo incolor. HRMS (ESI-TOF): calculado para $\text{C}_{10}\text{H}_9\text{NNaO}_3$ [$\text{M} + \text{Na}^+$] 214,04801 e encontrado 214,04733.

(±)-2-Hidroxibutanonitrila 4a:

Óleo amarelo. IV $\nu_{\max}$ (cm^{-1}) = 3442 (OH), 2978, 2941, 2883, 2249 (CN), 1463, 1126, 1105, 1062, 983. RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) δ (ppm) = 4,43 (t, J = 6,7 Hz, 1H), 3,38 (sl, 1H), 1,88 (qt, J = 7,5 Hz, 2H), 1,09 (t, J = 7,5 Hz, 3H). RMN de ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) δ (ppm) = 119,9; 62,4; 28,4; 8,8. HRMS (ESI-TOF): calculado para $\text{C}_4\text{H}_8\text{NO}$ [$\text{M} + \text{H}^+$] 86,06059 e encontrado 86,05967.

Acetato de 1-cianopropila 4b:

Óleo amarelo. RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ (ppm) = 5,28 (t, J = 6,6 Hz, 1H), 2,15 (s, 3H), 1,98-1,94 (m, 2H), 1,11 (t, J = 7,5, 3H). RMN de ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) δ (ppm) = 169,1; 116,6; 62,2; 25,8; 20,3; 8,9. HRMS (ESI-TOF): calculado para $\text{C}_6\text{H}_{10}\text{NO}_2$ [$\text{M} + \text{H}^+$] 128,07115 e encontrado 128,07065.

(±)-2-(4-Fluorofenil)-2-hidroxiacetonitrila 5a:

Óleo amarelo. IV $\nu_{\max}$ (cm^{-1}) = 3417 (OH), 2250 (CN), 1604, 1510, 1234, 1039, 835. RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ (ppm) = 7,54-7,51 (m, 2H), 7,14 (t, J = 8,6 Hz, 2H), 6,39 (s, 1H). RMN de ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) δ (ppm) = 163,5 (d, $J_{\text{C1-F}}$ = 249,5 Hz); 128,7 (d, $J_{\text{C3-F}}$ = 9,1 Hz); 125,3 (d, $J_{\text{C4-F}}$ = 3,05 Hz); 118,4; 115,7 (d, $J_{\text{C2-F}}$ = 21,4 Hz); 63,0. HRMS (ESI-TOF): calculado para $\text{C}_8\text{H}_7\text{FNO}$ [$\text{M} + \text{H}^+$] 152,05117 e encontrado 152,05049.

Acetato de ciano(4-fluorofenil)metila 5b:

Óleo incolor. IV $\nu_{\max}$ (cm^{-1}) = 2958, 2931, 2250 (CN, pico ausente), 1757, 1606, 1512, 1423, 1373, 1219, 1163, 1026, 835. RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ (ppm) = 7,48-7,56 (m, 2H), 7,14 (t, J = 8,6 Hz, 2H), 6,39 (s, 1H), 2,17 (s, 3H). RMN de ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) δ (ppm) = 168,8; 163,7 (d, $J_{\text{C1-F}}$ = 250,2 Hz); 130,0 (d, $J_{\text{C3-F}}$ = 9,1 Hz); 127,8 (d, $J_{\text{C4-F}}$ = 3,8 Hz); 116,4 (d, $J_{\text{C2-F}}$ = 22,1 Hz); 115,9; 62,1; 20,4. HRMS (ESI-TOF): calculado para $\text{C}_{10}\text{H}_8\text{FNNaO}_2$ [$\text{M} + \text{Na}^+$]: 216,04368 e encontrado 216,04291.

(±)-2-Hidroxi-2-(4-metoxifenil)acetonitrila 6a:

Óleo amarelo. IV $\nu_{\max}$ (cm^{-1}) = 3421 (OH), 2841, 2247 (CN), 1670, 1610, 1514, 1442, 1255, 1178, 1029, 835, 769. RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ (ppm) = 7,41 (d, J = 8,8 Hz, 2H), 6,92 (d, J = 8,8, 2H), 5,43 (s, 1H), 3,81 (s, 3H). RMN de ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) δ (ppm) = 160,5; 128,2; 127,5; 119,0; 114,4; 63,0; 55,3. HRMS (ESI-TOF): calculado para $\text{C}_9\text{H}_{10}\text{NO}_2$ [$\text{M} + \text{H}^+$]: 164,04368 e encontrado 164,07013.

Acetato de ciano(4-metoxifenil)metila 6b:

Óleo amarelo. IV $\nu_{\max}$ (cm^{-1}) = 3093, 3005, 2960, 2937, 2841, 2250 (CN, pico ausente), 1755, 1587, 1489, 1448, 1371, 1247, 1211, 1024, 829. RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ (ppm) = 7,45 (d, J = 8, 2H), 6,95 (d, J = 8, 2H), 6,36 (s, 1H), 3,84 (s, 3H), 2,14 (s, 3H). RMN de ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) δ (ppm) = 168,9; 161,1; 129,6; 123,8; 116,2; 114,5; 62,5; 55,3; 20,4. HRMS (ESI-TOF): calculado para $\text{C}_{11}\text{H}_{11}\text{NNaO}_3$ [$\text{M} + \text{Na}^+$]: 228,06366 e encontrado 228,06294.

(±)-2-Hidroxi-2-(3-fenoxifenil)acetonitrila 7a:

Óleo amarelo. IV $\nu_{\max}$ (cm^{-1}) = 3419 (OH), 3064, 3039, 2249 (CN), 1705, 1585, 1489, 1251, 1042. RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ (ppm) = 7,40-7,34 (m, 3H), 7,26 (d, J = 8 Hz, 1H), 7,16-7,13 (m,

2H) 7,04-7,01 (m, 3H), 5,49 (s, 1H), 3,20 (sl, 1H). RMN de ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) δ (ppm) = 158,2; 156,3; 137,0; 130,60; 129,9; 124,0; 120,9; 119,7; 119,3; 118,5; 116,6; 63,2. HRMS (ESI-TOF): calculado para $\text{C}_{14}\text{H}_{11}\text{NNaO}_2$ $[\text{M} + \text{Na}^+]$: 248,06875 e encontrado 248,06799.

Acetato de ciano(3-fenoxifenil)metila 7b:

Óleo incolor. IV ν_{max} (cm^{-1}) = 3066, 3039, 2250 (CN, pico ausente), 1757, 1585, 1489, 1247, 1211, 1024, 902, 750 609. RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ (ppm) = 7,41-7,36 (m, 3H), 7,23 (d, J = 7,7 Hz, 1H); 7,18-7,14 (m, 2H), 7,07-7,02 (m, 3H), 6,36 (s, 1H), 2,17 (s, 3H). RMN de ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) δ (ppm) = 168,8; 158,2; 156,1; 133,4; 130,6; 129,9; 124,1; 122,0; 120,0; 119,4; 117,7; 115,8; 62,4; 20,4. HRMS (ESI-TOF): calculado para $\text{C}_{16}\text{H}_{13}\text{NNaO}_3$ $[\text{M} + \text{Na}^+]$: 290,07931 e encontrado 290,07895.

(E)-2-Hidroxi-4-fenilbut-3-enonitrila 8a:

Óleo amarelo. IV ν_{max} (cm^{-1}) = 3354 (OH), 3084, 3028, 2253 (CN), 1729, 1450, 1300, 1024. RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ (ppm) = 7,44-7,40 (m, 2H), 7,39-7,31 (m, 3H), 6,93 (d, J = 15,8 Hz, 1H), 6,27 (dd, J = 15,8; 6,7 Hz, 1H), 5,17 (dd, J = 6,7, 1,1, 1H). RMN de ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) δ (ppm) = 135,4; 134,6; 129,1; 128,8; 127; 122,2; 118; 61,9. HRMS (ESI-TOF): calculado para $\text{C}_{10}\text{H}_8\text{NO}$ $[\text{M} - \text{H}^+]$: 158,06059 e encontrado 158,06065.

Acetato de (E)-1-ciano-3-fenilalila 8b:

Óleo incolor. IV ν_{max} (cm^{-1}) = 3061, 3030, 2250 (CN, pico ausente), 1753, 1496, 1450, 1371, 1217, 1022, 968, 750. RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ (ppm) = 7,42-7,40 (m, 2H), 7,38-7,31 (m, 3H), 6,96 (d, J = 15,8; 1H), 6,18 (dd, J = 15,8; 6,7 Hz, 1H), 6,01 (dd, J = 6,7; 1,1 Hz, 1H), 2,16 (s, 3H). RMN de ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) δ (ppm) = 168,8; 137,8; 134,3; 129,3; 128,8; 127,1; 118,3; 115,4; 61,4; 20,4. HRMS (ESI-TOF): calculado para $\text{C}_{12}\text{H}_{11}\text{NNaO}_2$ $[\text{M} + \text{Na}^+]$: 224,06875 e encontrado 224,06769.

2.9 RESULTADOS E DISCUSSÃO

2.9.1 Resoluções enzimáticas das ciano-hidrinas pela CALB

2.9.1.1 Resolução enzimática da ($\pm$)-mandelonitrila **1a**

Inicialmente realizou-se a otimização das condições de análises cromatográficas em GC-FID para obtenção da separação enantiomérica dos padrões racêmicos do álcool **1a** e o acetato **1b** em coluna quiral.

Após otimização das condições de análise dos padrões foi realizada a resolução quimioenzimática do ($\pm$)-mandelonitrila **1a** nos solventes (hexano, éter etílico e tolueno), utilizando a lipase de *C. antarctica* e o acetato de vinila como agente acilante em agitador orbital (32 °C, 130 rpm). A resolução enzimática foi realizada nesses diferentes solventes com o objetivo de avaliar a influência do solvente sobre a enantiosseletividade da CALB frente ao ($\pm$)-álcool **1a** (Tabela 2.8).

No solvente hexano foi possível obter após 120 h de reação uma conversão de 56% para o (*R*)-álcool **1a** e para o (*S*)-acetato **1b** (*c* = 44%, *ee* = 95%). Quando a reação foi realizada em éter etílico foi também necessário um tempo reacional longo de 120 h, obtendo-se uma conversão de apenas 34% do (*S*)-acetato **1b** e excesso enantiomérico de 95%. Em solvente tolueno obteve-se excelentes conversão e excesso enantiomérico para o (*S*)-acetato **1b** (*c* = 49%, *ee* = 98%), apesar de ser requerido um tempo reacional ainda mais longo de 184 h.

Na literatura foi descrita a resolução enzimática da ($\pm$)-mandelonitrila **1a** por agitação orbital em solvente tolueno, porém a reação foi efetiva somente após 14 dias, obtendo-se o (*R*)-álcool **1a** (*c* = 50%, *ee* = 95%) e o (*S*)-acetato **1b** (*c* = 50%, *ee* = 93%) (HANEFELD et al., 2001).

O tolueno tem sido um solvente muito utilizado na resolução quimioenzimática de álcoois por irradiação micro-ondas, isso se deve provavelmente ao seu alto ponto de ebulição e por se tratar de um solvente hidrofóbico possuindo uma boa interação com a porção hidrofóbica do sítio ativo da enzima (YADAV; PAWAR, 2012; PAULA et al., 2005). Sendo assim, o tolueno é um excelente solvente para investigação das resoluções quimioenzimáticas assistida por irradiação micro-ondas (BACHU et al., 2007).

A resolução enzimática da ($\pm$)-mandelonitrila **1a** foi então realizada em tolueno com a lipase de *C. antarctica* por irradiação micro-ondas. Essa técnica mostrou-se eficiente conseguindo uma conversão e excesso enantiomérico do (*R*)-álcool **1a** ($c = 60\%$, $ee = 89\%$) e para o (*S*)-acetato **1b** ($c = 40\%$, $ee = 92\%$) em menor tempo (8 h) de reação à temperatura de 80 °C (RIBEIRO et al., 2012). Esses resultados comprovam a eficiência da irradiação micro-ondas sobre determinadas reações, conseguindo, muitas vezes, maiores rendimentos em menor tempo de reação (Tabela 2.8) (BACHU et al., 2007).

Tabela 2.8 - Resolução enzimática da ($\pm$)-mandelonitrila **1a** em agitador orbital e irradiação micro-ondas com a lipase de *C. antarctica*.

Solvente	Tempo (h)	c (%) 1a	c (%) 1b	ee (%) 1b	[ca] 1b	E
Agitador orbital (32 °C, 130 rpm)						
Hexano	48	65	35	>98	[S]	-
	72	69	38	>98	[S]	-
	120	56	44	95	[S]	-
Éter etílico	48	77	23	>98	[S]	-
	72	70	30	>98	[S]	-
	120	66	34	95	[S]	-
Tolueno	48	67	33	>98	[S]	-
	72	65	35	>98	[S]	-
	120	63	37	>98	[S]	-
	168	54	46	>98	[S]	-
	184	51(15) ^a	49(25) ^b	>98	[S]	164
Irradiação micro-ondas (80 °C, 200 W)						
Tolueno	1	82	18	>98	[S]	-
	2	75	25	94	[S]	-
	3	71	29	94	[S]	-
	4	68	32	94	[S]	-
	5	65	36	93	[S]	-
	6	63	38	93	[S]	-
	7	62	39	93	[S]	-
	8	60(8) ^c	40(35) ^d	92	[S]	71

^{a,b}Rendimento isolado após purificação por cromatografia em coluna para o (*R*)-**1a** (15%, $ee = 51\%$) e (*S*)-**1b** (25%, $ee = 98\%$) em agitador orbital.

^{c,d}Rendimento isolado após purificação por cromatografia em coluna para o (*R*)-**1a** (8%, $ee = 89\%$) e (*S*)-**1b** (35%, $ee = 92\%$) por irradiação micro-ondas.

^eExcesso enantiomérico determinado após derivatização com Ac₂O/pi $ee = 88\%$.

c = concentração do álcool **1a** remanescente determinada por GC-FID.

c = conversão do acetato **1b** determinada por GC-FID.

[ca] = configuração absoluta.

E = razão enantiomérica.

ee = excesso enantiomérico.

Na Figura 2.8 tem-se os cromatogramas da resolução enzimática da ($\pm$)-mandelonitrila **1a** por irradiação micro-ondas após 8 h de reação. Após o isolamento do álcool remanescente **1a** foi necessário realizar uma derivatização do mesmo, já que não ocorreu a sua separação enantiomérica na coluna quiral utilizada para determinar o valor do excesso enantiomérico.

Figura 2.8 - Cromatogramas obtidos por GC-FID para a resolução enzimática da ($\pm$)-mandelonitrila **1a** pela lipase de *C. antarctica* por irradiação micro-ondas (80 °C, 200 W). (a) Padrão da ($\pm$)-mandelonitrila **1a**. (b) Padrão do ($\pm$)-acetato de ciano(fenil)metila **1b**. (c) Reação da ($\pm$)-mandelonitrila **1a** após 8 h. (d) (*R*)-acetato de ciano(fenil)metila **1b** após derivatização do (*R*)-mandelonitrila **1a** com Ac₂O/pi remanescente.

Condições de análises em GC-FID: $T_i = 100$ °C, $T_{f1} = 175$ °C (2 min), $r = 10$ °C/min, $T_{f2} = 180$ °C (5 min) $r = 5$ °C/min, $t_c = 15,5$ min. Coluna quiral CP-Chiralsil-Dex (β -ciclodextrina 25 m x 0,25 x 0,39 μ m).

Após a análise do cromatograma da Figura 2.8d observou-se que o (*S*)-**1b** formado a partir da derivatização do (*R*)-**1a** corresponde exatamente ao mesmo produto acetilado pela lipase. A princípio, este resultado não estaria concordante, pois se a configuração absoluta esperada do álcool não acetilado (remanescente) é *R*, a sua acetilação química com Ac₂O/pi deveria fornecer o acetato também de

configuração *R*. No entanto, observou-se que o derivado acetilado foi obtido com configuração absoluta *S*.

Devido às análises das reações terem sido realizadas por cromatografia a gás, poderia estar ocorrendo a degradação de uma parte da ($\pm$)-mandelonitrila **1a** em benzaldeído e ácido cianídrico na temperatura do injetor (180 °C). A análise do padrão do benzaldeído no mesmo método mostrou que o pico da ($\pm$)-mandelonitrila **1a** e do benzaldeído foram coincidentes. Portanto, por GC-FID não foi possível afirmar qual a concentração exata de ($\pm$)-mandelonitrila **1a** que não reagiu com a lipase.

Uma explicação para esse resultado seria de um provável equilíbrio entre o álcool remanescente **1a** e o benzaldeído, ocorrendo assim uma decomposição espontânea do (*R*)-mandelonitrila **1a**. Então a (*S*)-mandelonitrila **1a** poderia estar sendo enriquecida enantiomericamente através deste equilíbrio. Como a reação de acetilação pela lipase é lenta, ao ser interrompida a reação em 4 h ainda continha o álcool **1a**, porém com configuração *S*, que após a derivatização com Ac₂O/pi forneceu o (*S*)-acetato **1b** (Esquema 2.22).

Esquema 2.22 - Proposta de equilíbrio envolvendo a reação enzimática via decomposição espontânea da (*R*)-mandelonitrila **1a** em benzaldeído e HCN. O equilíbrio espontâneo favoreceu o enriquecimento do (*S*)-mandelonitrila **1a**.

Xiong et al. (2008) realizaram um estudo da catálise enzimática via transesterificação assimétrica da mandelonitrila **1a** em sistemas livres de solventes, no intervalo de temperatura entre 30-50 °C. Segundo os autores a concentração de aldeído aumentou de acordo com a elevação da temperatura. Uma das razões é que a

mandelonitrila **1a** se decompõe produzindo o benzaldeído e HCN mais rapidamente a maiores temperaturas.

Posteriormente, a resolução enzimática da ($\pm$)-mandelonitrila **1a**, previamente analisada por GC-FID, foi também analisada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) (Figuras 2.9-2.14). Os picos coincidentes por GC-FID da ($\pm$)-mandelonitrila **1a** e do benzaldeído foram então separados por CLAE. Através destes experimentos, pode-se concluir que há um equilíbrio entre a (*R*)-mandelonitrila **1a** não esterificada pela lipase e o benzaldeído (Figura 2.13). Este resultado foi importante, pois confirmou tanto o baixo rendimento da mandelonitrila **1a** não esterificada pela lipase, bem como a configuração absoluta oposta, o que não seria esperada para uma resolução cinética convencional.

Em algumas frações por cromatografia em coluna foi possível obter o (*R*)-mandelonitrila e fazer as análises de rotação óptica.

Figura 2.9 - Cromatograma obtido por CLAE do padrão da ($\pm$)-mandelonitrila **1a**.

Condições de análise no CLAE em coluna quiral Chiracel O-DH: hexano:isopropanol 9:1, fluxo de 1 mL/min, 254 nm, t_c 30 min.

Figura 2.10 - Cromatograma obtido por CLAE do (±)-acetato de ciano(fenil)metila **1b**.

Condições de análise no CLAE em coluna quiral Chiracel O-DH: hexano:isopropanol 9:1, fluxo de 1 mL/min, 254 nm, t_c 30 min.

Figura 2.11 - Cromatograma obtido por CLAE do benzaldeído **1** com tempo de retenção de 4,96 min.

Condições de análise no CLAE em coluna quiral Chiracel O-DH: hexano:isopropanol 9:1, fluxo de 1 mL/min, 254 nm, t_c 30 min.

Figura 2.12 - Cromatograma obtido por CLAE do (S)-mandelonitrila **1a** ($ee = 54\%$) separada em coluna cromatográfica da reação realizada em agitador orbital (130 rpm, 168 h, 32°C).

Condições de análise no CLAE em coluna quiral Chiracel O-DH: hexano:isopropanol 9:1, fluxo de 1 mL/min, 254 nm, t_c 30 min.

Figura 2.13 - Cromatograma obtido por CLAE do benzaldeído **1** com tempo de retenção de 6,99 min.

Condições de análise no CLAE em coluna quiral Chiracel O-DH: hexano:isopropanol 9:1, fluxo de 1 mL/min, 254 nm, t_c 30 min.

Figura 2.14 - Cromatograma obtido por CLAE do (S)-acetato de ciano(fenil)metila **1b** (98% *ee*) separada em coluna cromatográfica da reação realizada em agitador orbital (130 rpm, 168 h, 32°C).

Condições de análise no CLAE em coluna quiral Chiracel O-DH: hexano:isopropanol 9:1, fluxo de 1 mL/min, 254 nm, t_c 30 min.

A configuração absoluta da ($\pm$)-mandelonitrila **1a** obtida por resolução quimioenzimática foi determinada por comparação do sinal da medida de rotação óptica com a literatura (OGNYANOV et al., 1991; XU et al., 2008). O valor da rotação experimental para o (S)-álcool **1a** foi de $[\alpha]_D^{20} +19,1$ (c 1,15; CHCl_3 ; *ee* > 51%) e o valor encontrado na literatura foi de $[\alpha]_D^{20} +40,6$ (c 1,0; CHCl_3 ; *ee* 92%) (OGNYANOV et al., 1991). Enquanto para o (S)-acetato **1b** o valor da rotação experimental foi de $[\alpha]_D^{20} -3,95$ (c 0,82; CHCl_3 ; *ee* 98%) e o valor encontrado na literatura foi de $[\alpha]_D^{20} -5,6$ (c 0,58; CHCl_3 ; *ee* 98,3%) (XU et al., 2008).

2.9.1.2 Resolução enzimática da ($\pm$)-2-(4-clorofenil)-2-hidroxiacetonitrila **2a**

A partir das condições otimizadas na Tabela 2.8. Aplicou-se a resolução para os demais compostos cianídricos.

A resolução enzimática da ($\pm$)-2-(4-clorofenil)-2-hidroxiacetonitrila **2a** foi realizada com a lipase de *C. antarctica* em agitador orbital e irradiação micro-ondas. Utilizando-se a técnica de irradiação micro-ondas obteve-se uma eficiente resolução em tolueno, à temperatura de 65 °C, com 5 h de reação onde foi obtido o (*R*)-álcool **2a** (*c* = 47%, *ee* > 99%) e o (*S*)-acetato **2b** (*c* = 53%, *ee* = 90%). Enquanto que em agitador orbital obteve-se a resolução enzimática em tolueno com 48 h para o (*R*)-álcool **2a** (*c* = 42%, *ee* > 99%) e o (*S*)-acetato **2b** (*c* = 58%, *ee* = 94%) (Tabela 2.9).

Na literatura foi descrita a resolução enzimática da ($\pm$)-2-(4-clorofenil)-2-hidroxiacetonitrila **2a** utilizando a lipase de *Pseudomonas cepacia* (PS-30) em éter dietílico e acetato de vinila como doador de grupo acila à temperatura de 15 °C. Após 45 h de reação foi obtido o (*R*)-álcool **2a** (*c* = 54%, *ee* = 81%) e o (*S*)-acetato **2b** (*c* = 46%, *ee* = 96%) (Xu et al., 2010). Os estudos realizados pelo nosso grupo comprovam a eficiência da irradiação micro-ondas na resolução enzimática de ($\pm$)-**2a** com a CALB, onde foram obtidos maiores seletividades em um espaço de tempo inferior em comparação à reação por agitação orbitalar (YADAV; PAWAR, 2012).

Tabela 2.9 - Resolução enzimática da ($\pm$)-2-(4-clorofenil)-2-hidroxiacetonitrila **2a** em agitador orbital e irradiação micro-ondas com a lipase de *C. antarctica*.

Tempo (h)	c (%) 2a	c (%) 2b	ee (%) 2a	ee (%) 2b	[ca] 2b	<i>E</i>
Agitador orbital (32 °C, 130 rpm)						
2	82	18	Nd	99	[S]	-
4	72	28	Nd	99	[S]	-
24	45	55	Nd	96	[S]	-
48	42	58	Nd	94	[S]	-
Irradiação micro-ondas (65 °C, 200 W)						
1	60	25	Nd	94	[S]	-
2	53	32	Nd	94	[S]	-
3	50	38	Nd	93	[S]	-
4	47	53	Nd	91	[S]	-
5	47(50) ^a	53(30) ^b	82 ^c	90	[S]	48

^{a,b}Rendimento isolado após purificação por cromatografia em coluna para o (*R*)-álcool **2a** (50%) e para o (*S*)-acetato **2b** (30%, *ee* = 90%).

^cExcesso enantiomérico determinado após derivatização com Ac₂O/pi *ee* = 82%.

c = concentração do álcool **2a** remanescente determinada por GC-FID.

c = conversão do acetato **2b** determinada por GC-FID.

[ca] = configuração absoluta.

E = razão enantiomérica.

ee = excesso enantiomérico.

Na Figura 2.15 tem-se os cromatogramas da resolução enzimática da ($\pm$)-2-(4-clorofenil)-2-hidroxiacetonitrila **2a** por irradiação micro-ondas com 5 h de reação. Após isolamento do álcool remanescente foi necessário realizar a sua derivatização, já que não ocorreu a sua separação enantiomérica em coluna capilar quiral obtendo-se um excesso enantiomérico de 88% para o (*R*)-**2b** o qual foi esterificado com Ac₂O/pi.

Figura 2.15 - Cromatogramas obtidos por GC-FID da resolução enzimática da ($\pm$)-2-(4-clorofenil)-2-hidroxiacetonitrila **2a** pela lipase de *C. antarctica* por irradiação micro-ondas em tolueno. (a) Padrão da ($\pm$)-2-(4-clorofenil)-2-hidroxiacetonitrila **2a**. (b) Padrão do ($\pm$)-acetato de (4-clorofenil)(ciano)metila **2b**. (c) 5 h de reação. (d) Derivatização do álcool remanescente (*R*)-**2a** com Ac₂O/pi para formação do (*R*)-acetato **2b**.

Condições de análises em GC-FID: $T_i = 100\text{ }^{\circ}\text{C}$, $T_f = 160\text{ }^{\circ}\text{C}$ (11 min), $r = 7\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$, $t_c = 19,57\text{ min}$. Coluna quiral CP-Chiralsil-Dex (β -ciclodextrina 25 m x 0,25 x 0,39 μm).

A configuração absoluta do (*R*)-2-(4-clorofenil)-2-hidroxiacetonitrila **2a** obtido por resolução quimioenzimática foi determinada por comparação do sinal da medida de rotação óptica com a literatura (DEGANI; KAKWANI, 2012). O valor da rotação experimental para o (*R*)-álcool **2a** foi de $[\alpha]_D^{26} +2,6$ (c 0,0166; CHCl₃; $ee > 99\%$) e o valor encontrado na literatura foi de $[\alpha]_D^{26} +6,4$ (c 0,0109; CHCl₃; ee 85%) (DEGANI; KAKWANI, 2012). Enquanto para o (*S*)-acetato **2b** o valor da rotação experimental foi de $[\alpha]_D^{26} +3,90$ (c 0,011; CHCl₃; ee 90%) e o valor encontrado na literatura foi de $[\alpha]_D^{20} +8,26$ (c 0,58; CHCl₃; ee 96%) (XU et al., 2010).

2.9.1.3 Resolução enzimática da ($\pm$)-2-hidroxi-2-(4-hidroxifenil)acetonitrila **3a**

A resolução enzimática da ($\pm$)-2-hidroxi-2-(4-hidroxifenil)acetonitrila **3a** com a lipase de *C. antarctica* foi realizada em agitador orbital e irradiação micro-ondas. Utilizando-se a técnica de irradiação micro-ondas obteve-se em tolueno, à temperatura de 80 °C, com 5 h de reação o (*R*)-álcool **3a** ($c = 34\%$) e o (*S*)-acetato **3b** ($c = 17\%$, $ee = 59\%$). Enquanto que em agitador orbital obteve-se a resolução enzimática em tolueno com 48 h para o (*R*)-álcool **3a** ($c = 34\%$) e o (*S*)-acetato **3b** ($c = 32\%$, $ee = 28\%$) (Tabela 2.10). Esses baixos valores de conversão devem-se à formação do acetato de 4-(acetoxi(ciano)metil)fenila **3b** e do acetato de 4-formilfenila formado no tempo de retenção de 9,0 min observado no cromatograma por GC-FID (Figuras 2.16-2.17). O produto **3b** foi confirmado a partir do padrão químico e do espectro de massas obtido no GC-MS (Figura 2.18).

Tabela 2.10 - Resolução enzimática da ($\pm$)-2-hidroxi-2-(4-hidroxifenil)acetonitrila **3a** em agitador orbital e por irradiação micro-ondas com a lipase de *C. antarctica*.

Agitador orbital (32 °C, 130 rpm)					
Tempo (h)	c (%) 3a	c (%) 3b	c (%) A.F.	ee (%) 3b	[ca] 3b
2	89	-	11	-	[S]
4	77	-	23	-	[S]
24	28	9	63	76	[S]
48	34	32	34	28	[S]
Irradiação micro-ondas (80 °C, 200 W)					
1	54	2	44	Nd	[S]
2	42	6	52	71	[S]
3	37	11	52	69	[S]
4	35	14	51	63	[S]
5	34	17	49	59	[S]

c = concentração do álcool **2a** remanescente determinada por GC-FID.

c = conversão do acetato **2b** determinada por GC-FID.

[ca] = configuração absoluta.

A.F. = acetato de 4-formilfenila.

Nd = não determinado.

ee = excesso enantiomérico.

Figura 2.16 - Cromatogramas obtidos por GC-FID da resolução enzimática da ($\pm$)-2-hidroxi-2-(4-hidroxifenil)acetonitrila **3a** pela lipase de *C. antarctica* em agitador orbital (32°C, 130 rpm) em tolueno. (a) Padrão da ($\pm$)-2-hidroxi-2-(4-hidroxifenil)acetonitrila **3a**. (b) Padrão do ($\pm$)-acetato de 4-(acetoxi(ciano)metil)fenila **3b**. (c) Padrão do acetato de 4-formilfenila. (d) 48 h de reação.

Condições de análises em GC-FID: $T_i = 100\text{ }^{\circ}\text{C}$, $T_f = 180\text{ }^{\circ}\text{C}$ (11 min), $r = 7\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$, $t_c = 22,43\text{ min}$. Coluna quiral CP 7505-Chiralsil-Dex (β -ciclodextrina 25 m x 0,25 x 0,39 μm).

Figura 2.17 - Cromatogramas obtidos por GC-FID da resolução enzimática da ($\pm$)-2-hidroxi-2-(4-hidroxifenil)acetonitrila **3a** pela lipase de *C. antarctica* por irradiação micro-ondas ($T = 80^{\circ}\text{C}$, 200W) em tolueno. (a) Padrão da ($\pm$)-2-hidroxi-2-(4-hidroxifenil)acetonitrila **3a**. (b) Padrão do ($\pm$)-acetato de 4-(acetoxi(ciano)metil)fenila **3b**. (c) 5 h de reação.

Condições de análises em GC-FID: $T_i = 100^{\circ}\text{C}$, $T_f = 180^{\circ}\text{C}$ (11 min), $r = 7^{\circ}\text{C}/\text{min}$, $t_c = 22,43$ min. Coluna quiral CP 7505-Chiralsil-Dex (β -ciclodextrina 25 m x 0,25 x 0,39 μm).

A partir do cromatograma obtido por GC-MS (Figura 2.18) pode ser observado dois sinais nos tempos de retenção de 10,0 e 14,5 minutos. A análise do espectro de massas no tempo de retenção de 10,0 minutos mostrou a presença de um íon molecular com 165 u.m.a. (3,28%). O segundo fragmento mais intenso apresentou uma relação m/z 121 (100%), evidenciando uma perda de 43 u.m.a em relação ao íon m/z 165. Portanto, através destas informações foi possível sugerir que a estrutura obtida com m/z 165 correspondeu ao acetato de 4-formilfenila (Figura 2.18a).

A análise do espectro de massas no tempo de retenção de 14,5 min (Figura 2.18b) mostrou a presença de um íon com 233 u.m.a. que corresponde ao acetato de 4-(acetoxi(ciano)metil)fenila. A perda de 42 u.m.a corresponde ao grupo acila em relação ao íon molecular de 233 u.m.a. Estas análises foram confirmadas pelos padrões do acetato de 4-formilfenila e do acetato de 4-(acetoxi(ciano)metil)fenila. O espectro de RMN do padrão sintético do álcool **3a** também foi realizado para a confirmação da estrutura do composto.

Figura 2.18 - Cromatograma e espectros de massas (70 eV) obtidos por GC-MS da resolução enzimática da ($\pm$)-2-hidroxi-2-(4-hidroxifenil)acetonitrila **3a** pela lipase de *C. antarctica* em agitador orbital com 48 h em tolueno. (a) Tempo de retenção de 10,0 min. (b) tempo de retenção de 14,5 min.

Condições de análises em GC-MS: coluna DB-5 (30 m x 0.25 mm x 0.25 μ m) T_i = 50 $^{\circ}$ C, T_f = 270 $^{\circ}$ C, r = 10 $^{\circ}$ C/min, t = 32.0 min.

Na literatura já foi descrita a síntese da (*R*)-2-hidroxi-2-(4-hidroxifenil)acetonitrila **3a** catalisada pela (*R*)-hidroxinitrila liase (*R*-PaHNL) (EC 4.1.2.10) de *Prunus amygdalus*, cujo composto foi formado com rendimento de 90% e excesso enantiomérico de 99%. A reação foi realizada em pH 5,5 e à temperatura de 5 $^{\circ}$ C por 96 h (Esquema 2.12) (GERRITS et al., 2001).

A (*R*)-2-hidroxi-2-(4-hidroxifenil)acetonitrila **3a** e o (*S*)-acetato de 4-(acetoxi(ciano)metilfenila) **3b** não foram purificados devido os baixos rendimentos o que impossibilitou a determinação dos valores de rotação óptica e determinação da configuração absoluta.

O valor encontrado na literatura para a rotação do (*R*)-álcool **3a** foi de $[\alpha]_D^{26} +12,4$ (c 0,018; MeOH) (MATTHEWS et al., 1988), enquanto para o (*S*)-acetato de 4-

(acetoxi(ciano)metilfenila **3b** o valor da rotação da literatura foi de $[\alpha]_D^{20} + 8,4$ (c 0,01; CHCl₃; ee 91 %) (ZHANG et al., 2010).

2.9.1.4 Resolução enzimática da ($\pm$)-2-hidroxi-4-fenoxibutanonitrila **4a**

A resolução enzimática da ($\pm$)-2-hidroxi-4-fenoxibutanonitrila **4a** com a lipase de *C. antarctica* foi realizada em agitador orbital (32 °C, 130 rpm) em tolueno. Após 24 h de reação obteve-se o (*R*)-álcool **4a** ($c = 34\%$) e o (*S*)-acetato **4b** ($c = 66\%$ $ee = 41\%$) (Figura 2.19, Tabela 2.11). Ao monitorar a reação a partir de 2 h observou-se a formação dos dois enantiômeros simultaneamente do ($\pm$)-acetato de 1-cianopropila **4b**, evidenciando que não ocorreu uma boa enantiosseletividade pela CALB na resolução do *rac*-**4a**. Não existe nenhum relato na literatura de resolução enzimática para ($\pm$)-2-hidroxi-4-fenoxibutanonitrila **4a**. Sugeriu-se que o produto preferencialmente acetilado foi o (*S*)-**4b** pela regra empírica de Kazlauskas.

Exemplos de aplicações de ciano-hidrinas quirais também podem ser realizadas por outras abordagens biocatalíticas. Como por exemplo, Wu e Li (2003) avaliaram a hidrólise assimétrica de diversas 3-hidroxi-4-arilbutanitrilas utilizando *Rhodococcus* sp. onde se obteve a formação de (*S*)-álcoois, (*R*)-amidas e (*S*)-ácidos em tempos inferiores a 6 h de reação e com temperaturas de incubação variando-se entre 20-30 °C. Em alguns casos foram obtidos excessos enantioméricos superiores a 87% para (*R*)-amidas e (*S*)-ácidos (Esquema 2.23).

Esquema 2.23 - Hidrólise assimétrica da 3-hidroxi-4-fenoxibutanonitrila catalisada pela *Rhodococcus* sp. levando a formação de (*S*)-álcoois, (*R*)-amidas e (*S*)-ácidos.

Figura 2.19 - Cromatogramas obtidos por GC-FID da resolução enzimática da (±)-2-hidroxibutanonitrila **4a** pela lipase de *C. antarctica*. (a) Padrão da (±)-2-hidroxibutanonitrila **4a**. (b) Padrão do (±)-acetato de 1-cianopropila **4b** (c) 2 h de reação. (d) 4 h de reação. (e) 24 h de reação. (f) 48 h de reação.

Condições de análises em GC-FID: $T_i = 50\text{ }^{\circ}\text{C}$ (6 min), $T_f = 100\text{ }^{\circ}\text{C}$ (10 min), $r = 7\text{ }^{\circ}\text{C/min}$, $t_c = 23,14\text{ min}$. Coluna quiral CP 7505-Chiralsil-Dex (β -ciclodextrina 25 m x 0,25 x 0,39 μm).

Tabela 2.11 - Resolução enzimática da (±)-2-hidroxibutanonitrila **4a** em agitador orbital com a lipase de *C. antarctica*.

$ \begin{array}{c} \text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}(\text{CN})\text{OH} \\ \text{rac-4a} \end{array} \xrightarrow[\text{A.O. (32 }^{\circ}\text{C, 130 rpm)}]{\text{lipase, tolueno acetato de vinila}} \begin{array}{c} \text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}(\text{CN})\text{OH} \\ \text{(R)-4a} \end{array} + \begin{array}{c} \text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}(\text{CN})\text{OAc} \\ \text{(S)-4b} \end{array} $				
Tempo (h)	c (%) 4a	c (%) 4b	ee (%) 4b	[ca] 4b
2	15	85	49	[S]
4	25	75	46	[S]
24	66	34	41	[S]
48	82	18	25	[S]

c = concentração do álcool **4a** remanescente determinada por GC-FID.

c = conversão do acetato **4b** determinada por GC-FID.

[ca] = configuração absoluta.

ee = excesso enantiomérico.

2.9.1.5 Resolução enzimática da ($\pm$)-2-(4-fluorofenil)-2-hidroxiacetonitrila **5a**

A resolução enzimática da ($\pm$)-2-(4-fluorofenil)-2-hidroxiacetonitrila **5a** foi realizada com a lipase de *C. antarctica* em agitador orbital com 24 h de reação (32 °C, 130 rpm) e por irradiação micro-ondas com 4 h de reação (80 °C, 200 W) em tolueno.

Em agitador orbital obteve-se o (*R*)-álcool **5a** (*c* = 5%) e o (*S*)-acetato **5b** (*c* = 55% *ee* = 97%) e por irradiação micro-ondas em apenas 4 horas de reação obteve-se o (*R*)-álcool **5a** (*c* = 4%, *ee* = 88%) e o (*S*)-acetato **5b** (*c* = 50% *ee* = 92%) (Tabela 2.12).

Na resolução foi possível observar a degradação do *rac*-álcool **5a** no respectivo 4-flúor-benzaldeído através do cromatograma obtido por GC-FID. É importante ressaltar que a reação foi finalizada após surgimento do segundo enantiômero do (*S*)-acetato **5b** no cromatograma (Figura 2.20).

Com este resultado foi possível comprovar mais uma vez a eficiência da resolução enzimática de compostos cianídricos com a CALB por irradiação micro-ondas obtendo-se excelentes conversões e excessos enantioméricos em menores tempos reacionais.

Xu et al. (2008) e Xu et al. (2010) realizaram a resolução enzimática da ($\pm$)-2-(4-fluorofenil)-2-hidroxiacetonitrila **5a** utilizando a lipase PS-30 (15 °C) em éter etílico e acetato de vinila como agente acilante, obtendo-se também excelentes conversões e excessos enantioméricos para o (*R*)-álcool **5a** (*c* = 50% *ee* = 93,6%) e o (*S*)-acetato **5b** (*c* = 50% *ee* = 92,8%) após 50 h de reação. Destaca-se neste estudo o maior tempo reacional.

Tabela 2.12 - Resolução enzimática da ($\pm$)-2-(4-fluorofenil)-2-hidroxiacetonitrila **5a** em agitador orbital e por irradiação micro-ondas com a lipase de *C. antarctica*.

Agitador orbital (32 °C, 130 rpm)							
Tempo (h)	<i>c</i> (%) 5a	<i>c</i> (%) 5b	<i>c</i> (%) F.B.	<i>ee</i> (%) 5a	<i>ee</i> (%) 5b	[<i>ca</i>] 5b	<i>E</i>
2	9	28	63	35	>99	[S]	-
4	9	38	53	48	>99	[S]	-
24	5	55	40	>99	97	[S]	-
Irradiação micro-ondas (80 °C, 200 W)							
1	10	38	52	44	96	[S]	-
2	6	45	49	52	94	[S]	-
3	6	47	47	63	92	[S]	-
4	4 (49) ^a	50 (65) ^b	46	>99	92	[S]	70

^{a,b}Rendimento isolado após purificação por cromatografia em coluna para o (*R*)-**5a** (49%, *ee* = 99%) e (*S*)-**5b** (65%, *ee* = 92%) por irradiação micro-ondas.

c = concentração do álcool **5a** remanescente determinada por GC-FID.

c = conversão do acetato **5b** determinada por GC-FID.

[*ca*] = configuração absoluta.

F.B. = 4-fluorobenzaldeído.

E = razão enantiomérica.

ee = excesso enantiomérico.

Figura 2.20 - Cromatogramas obtidos por GC-FID da resolução enzimática da ($\pm$)-2-(4-fluorofenil)-2-hidroxiacetonitrila **5a** pela lipase de *C. antarctica* por irradiação micro-ondas em tolueno. (a) Padrão do 4-fluorobenzaldeído **5**. (b) Padrão da ($\pm$)-2-(4-fluorofenil)-2-hidroxiacetonitrila **5a**. (c) Padrão do ($\pm$)-acetato de ciano(4-fluorofenil)metila **5b**. (d) 4 h de reação.

Condições de análises em GC-FID: $T_i = 100\text{ }^{\circ}\text{C}$, $T_{f1} = 120\text{ }^{\circ}\text{C}$, $r = 3\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$, $T_{f2} = 185\text{ }^{\circ}\text{C}$ (3 min), $t_c = 24,67$ min. Coluna quiral CP-7502 Chiralsil-Dex (β -ciclodextrina 25 m x 0,25 x 0,39 μm).

Também foi observado que a formação do 4-flúor-benzaldeído (F.B.) foi favorecida pela decomposição do (*R*)-álcool não acetilado. Este dado é concordante com o baixo rendimento do álcool, bem como a baixa concentração nos cromatogramas. O acetato não foi decomposto no benzaldeído (Esquema 2.24).

Esquema 2.24 - Proposta de equilíbrio envolvendo a reação enzimática da ($\pm$)-2-(4-fluorofenil)-2-hidroxiacetonitrila **5a**. O equilíbrio espontâneo favoreceu a formação do 4-fluorobenzaldeído.

Os valores de rotação óptica para a (S)-2-(4-fluorofenil)-2-hidroxiacetonitrila **5a** e para o (R)-acetato de ciano(4-fluorofenil)metila **5b** foram comparados com a literatura (ZENG et al., 2007; SAKAI et al., 2008). O valor encontrado na literatura para a rotação do (R)-álcool **5a** foi de $[\alpha]_D^{25} +23,5$ (*c* 0,26; CHCl₃; *ee* 71%) e o valor obtido experimentalmente foi de $[\alpha]_D^{23} +21,4$ (*c* 0,021; CHCl₃; *ee* 88%) (ZENG et al., 2007). Enquanto para o (S)-acetato **5b** o valor da rotação experimental foi de $[\alpha]_D^{23} - 6,7$ (*c* 0,012; CHCl₃; *ee* 92%;) e os valores da literatura foram $[\alpha]_D^{26} - 1,98$ (*c* 1,01; CHCl₃; *ee* 92%) (SAKAI et al., 2008).

2.9.1.6 Resolução enzimática da ($\pm$)-2-hidroxi-2-(4-metoxifenil)acetonitrila **6a**

Inicialmente realizou-se a otimização das condições de análises cromatográficas em GC-FID para obtenção da separação enantiomérica dos padrões racêmicos do *rac*-álcool **6a** e *rac*-acetato **6b** em coluna quiral, não sendo possível obter a separação do álcool racêmico nas colunas quirais avaliadas (Figura 2.21).

A resolução enzimática da ($\pm$)-2-hidroxi-2-(4-metoxifenil)acetonitrila **6a** foi realizada por irradiação micro-ondas (80 °C, 200 W) e agitador orbital (32 °C, 130 rpm) em tolueno. A (*R*)-2-hidroxi-2-(4-metoxifenil)acetonitrila **6a** em agitador orbital apresentou após 24 h de reação 44% de concentração para o álcool remanescente e o (*S*)-acetato **6b** foi obtido com conversão de 56% e excesso enantiomérico de $\geq 99\%$ (Tabela 2.13). Por irradiação micro-ondas foi possível obter após 3 h de reação para o (*R*)-álcool **6a** (*c* = 44%, *ee* 72%) e para o (*S*)-acetato **6b** (*c* = 56%, *ee* 90%). Após isolamento dos enantiômeros por cromatografia em coluna fez-se necessária a derivatização do (*R*)-álcool **6a** que não foi acetilado, obtendo-se um excesso enantiomérico de 73%, o qual foi esterificado com Ac₂O/pi (Tabela 2.13).

Alguns autores na literatura descreveram sobre a resolução cinética para ($\pm$)-2-hidroxi-2-(4-metoxifenil)acetonitrila **6a**. Veum et al. (2002) realizaram a hidrólise enzimática do acetato de ciano(4-metoxifenil)metila **6b** utilizando a CALB, 60 °C, em *n*-propanol, obtendo o (*S*)-álcool com rendimento de 84% e excesso enantiomérico de 93% e o (*R*)-acetato **6b** com rendimento de 90% e *ee* 97%, após proteção da hidroxila com o grupo tetra-hidropiranyl éter.

Tabela 2.13 - Resolução enzimática da ($\pm$)-2-hidroxi-2-(4-metoxifenil)acetonitrila **6a** em agitador orbital e por irradiação micro-ondas com a lipase de *C. antarctica*.

Agitador orbital (32 °C, 130 rpm)						
Tempo (h)	c (%) 6a	c (%) 6b	ee (%) 6a	ee (%) 6b	[ca] 6b	E
2	79	21	Nd	>99	[S]	-
4	64	36	Nd	>99	[S]	-
24	44	56	Nd	>99	[S]	-
48	39	61	Nd	93	[S]	-
Irradiação micro-ondas (80 °C, 200 W)						
1	57	43	Nd	>99	[S]	-
2	48	52	Nd	93	[S]	-
3	44(22) ^a	56(70) ^b	73 ^c	90	[S]	41

^{a,b}Rendimento isolado após purificação por cromatografia em coluna para o (*R*)-**6a** (22%, *ee* 73%) e (*S*)-**6b** (70%, *ee* 90%) por irradiação micro-ondas.

^cExcesso enantiomérico determinado após derivatização com Ac₂O/pi (*ee* = 73%).

c = concentração do álcool **6a** remanescente determinada por GC-FID.

c = conversão do acetato **6b** determinada por GC-FID.

[ca] = configuração absoluta.

Nd = não determinada.

E = razão enantiomérica.

ee = excesso enantiomérico.

Na Figura 2.21 tem-se os cromatogramas da resolução enzimática da ($\pm$)-2-hidroxi-2-(4-metoxifenil)acetonitrila **6a** por irradiação micro-ondas com 3 h de reação. Após isolamento do álcool remanescente foi necessário realizar a derivatização, já que não ocorreu a sua separação enantiomérica em coluna capilar quiral, obtendo-se um excesso enantiomérico de 73% para (*R*)-**6b** o qual foi esterificado com Ac₂O/pi.

Figura 2.21 - Cromatogramas obtidos por GC-FID da resolução enzimática da ($\pm$)-2-hidroxi-2-(4-metoxifenil)acetonitrila **6a** pela lipase de *C. antarctica* por irradiação micro-ondas em tolueno. (a) Padrão do ($\pm$)-álcool **6a**. (b) Padrão do ($\pm$)-acetato de ciano(4-metoxifenil)metila **6b**. (c) 3 h de reação. (e) Derivatização do álcool remanescente (*R*)-**6a** com Ac₂O/pi para formação do (*R*)-acetato **6b**.

Condições de análises em GC-FID: Condições de análises em GC-FID: $T_i = 100\text{ }^{\circ}\text{C}$ (2 min), $T_{f1} = 150\text{ }^{\circ}\text{C}$ (2 min), $T_{f2} = 170\text{ }^{\circ}\text{C}$ (2 min), $r = 3\text{ }^{\circ}\text{C/min}$, $t_c = 33,33\text{ min}$. Coluna quiral CP-7502 Chiralsil-Dex (β -ciclodextrina 25 m x 0,25 x 0,39 μm).

Os valores de rotação óptica para a (*S*)-2-hidroxi-2-(4-metoxifenil)acetonitrila **6a** e para o (*R*)-acetato de ciano(4-metoxifenil)metila **6b** foram comparados com a literatura (TANG, ZANG, 2011; LEE, CHEN, 2005). O valor encontrado na literatura para a rotação do (*R*)-álcool **6a** foi de $[\alpha]_D^{20} +9,8$ (c 1,22; CHCl₃; ee 19%) e o valor obtido experimentalmente foi de $[\alpha]_D^{23} +0,02$ (c 0,005; CHCl₃; ee 73%) (TANG; ZANG, 2011). Enquanto para o (*S*)-acetato **6b** o valor da rotação experimental foi de $[\alpha]_D^{23} - 0,08$ (c 0,015; CHCl₃; ee 90%) e o valor da literatura foi de $[\alpha]_D^{24} - 3,1$ (c 1,10; CH₂Cl₂) (LEE; CHEN, 2005).

2.9.1.7 Resolução enzimática da ($\pm$)-2-hidroxi-2-(3-fenoxifenil)acetonitrila **7a**

A resolução enzimática da ($\pm$)-2-hidroxi-2-(3-fenoxifenil)acetonitrila **7a** foi realizada com a lipase de *C. antarctica* em tolueno. Utilizando a metodologia por irradiação micro-ondas obteve-se uma excelente resolução para o (*R*)-álcool **7a** ($c = 50\%$, $ee = 84\%$) e para o (*S*)-acetato **7b** ($c = 50\%$, $ee = 84\%$) após 6 h de reação. Em agitação orbital foi possível obter para (*R*)-álcool **7a** uma conversão de 53% e para o (*S*)-acetato **7b** ($c = 47\%$, $ee = 92\%$) após 24 h de reação (Tabela 2.14).

Inagaki et al. (1991) realizaram a resolução cinética dinâmica *in situ* da ($\pm$)-2-hidroxi-2-(4-fenoxifenil)acetonitrila **7a** com a lipase *Pseudomonas* sp. e com trocadores de resina de ânions, utilizando acetato de isopropenila como agente acilante. Nesse estudo obteve-se uma conversão de 88% para o (*R*)-acetato de ciano(3-fenoxifenil)metila **7b** e excesso enantiomérico 89% após 3 dias de reação.

Tabela 2.14 - Resolução enzimática da da ($\pm$)-2-hidroxi-2-(3-metoxifenil)acetonitrila **6a** em agitador orbital e irradiação micro-ondas com a lipase de *C. antarctica*.

Agitador orbital (32 °C, 130 rpm)						
Tempo (h)	c (%) 7a	c (%) 7b	ee (%) 7a	ee (%) 7b	[ca]	E
2	87	13	Nd	100	[S]	-
4	85	15	Nd	100	[S]	-
24	53	47	Nd	92	[S]	-
48	43	57	Nd	88	[S]	-
72	40	60	Nd	84	[S]	-
96	39	61	Nd	81	[S]	-
Irradiação micro-ondas (80 °C, 200 W)						
1	73	27	Nd	91	[S]	-
2	64	36	Nd	90	[S]	-
3	58	42	Nd	89	[S]	-
4	54	46	Nd	92	[S]	-
5	51	49	Nd	84	[S]	-
6	48(67) ^a	52(83) ^b	84 ^c	84	[S]	30

^{a,b}Rendimento isolado após purificação por cromatografia em coluna para o (*R*)-**7a** (67%, $ee = 84\%$) e (*S*)-**7b** (83%, $ee = 84\%$) por irradiação micro-ondas.

^cExcesso enantiomérico determinado após derivatização com Ac₂O/pi $ee = 84\%$.

c = concentração do álcool **7a** remanescente determinada por GC-FID.

c = conversão do acetato **7b** determinada por GC-FID.

[ca] = configuração absoluta.

Nd = não determinada.

E = razão enantiomérica.
 ee = excesso enantiomérico.

A partir dos cromatogramas da Figura 2.22 pode-se observar a resolução enzimática da ($\pm$)-2-hidroxi-2-(3-fenoxifenil)acetonitrila **7a** por irradiação micro-ondas após 6 h de reação. Após isolamento do álcool remanescente **7a** foi realizada a derivatização do mesmo para determinar o valor do excesso enantiomérico.

Figura 2.22 - Cromatogramas obtidos por GC-FID da resolução enzimática da ($\pm$)-2-hidroxi-2-(3-fenoxifenil)acetonitrila **7a** pela lipase de *C. antarctica* por irradiação micro-ondas em tolueno. (a) Padrão do ($\pm$)-álcool **7a**. (b) Padrão do ($\pm$)-acetato de ciano(3-fenoxifenil)metila **7b**. (c) 6 h de reação. (d) Derivatização do álcool remanescente (*R*)-**7a** com $\text{Ac}_2\text{O}/\text{pi}$ para formação do (*R*)-acetato **7b**.

Condições de análises em GC-FID: $T_i = 160\text{ }^\circ\text{C}$ (3 min), $T_{f1} = 180\text{ }^\circ\text{C}$ (5 min), $r = 3\text{ }^\circ\text{C}/\text{min}$, $T_{f2} = 200\text{ }^\circ\text{C}$ (15 min), $r = 5\text{ }^\circ\text{C}/\text{min}$, $t_c = 33,67\text{ min}$. Coluna quiral CP-7502 Chiralsil-Dex (β -ciclodextrina 25 m x 0,25 x 0,39 μm).

Os valores de rotação óptica para a (*R*)-2-hidroxi-2-(4-fenoxifenil)acetonitrila **7a** e do (*S*)-acetato de ciano(3-fenoxifenil)metila **7b** foram comparados com a literatura (CASAS et al., 2004; ZHANG et al., 2010). O valor encontrado na literatura para a rotação do (*R*)-álcool **6a** foi de $[\alpha]_D^{25} +12,9$ (c 0,01; CHCl_3) e o valor obtido experimentalmente foi de $[\alpha]_D^{23} +0,02$ (c 0,005; CHCl_3 ; ee 73%) (CASAS et al., 2004), enquanto para o (*S*)-acetato **7b** o valor da rotação experimental foi de $[\alpha]_D^{23} - 0,08$ (c

0,015; CHCl₃; ee 90%) e o valor da literatura foi de $[\alpha]_D^{25}$ - 7,02 (c 0,01; CHCl₃) (ZHANG et al., 2010).

2.9.1.8 Resolução enzimática da (E)-2-hidroxi-4-fenilbut-3-enonitrila **8a**

A resolução enzimática da (±)-(E)-2-hidroxi-4-fenilbut-3-enonitrila **8a** foi realizada em agitador orbital e por irradiação micro-ondas com a lipase de *C. antarctica*. Em agitação orbital obteve-se para o (R)-álcool **8a** remanescente uma concentração de 40%, após 48 h de reação e para o (S)-acetato **8b** (*c* = 60%, *ee* 80%). Por irradiação micro-ondas foi possível obter para o (R)-álcool **8a** (*c* = 48%) e para o (S)-acetato **8b** (*c* = 52%, *ee* 79%) após 2 h de reação (Tabela 2.15, Figura 2.23).

Shen et al. (2008) realizaram a síntese enantiomérica, em uma única etapa, para a (±)-(E)-2-hidroxi-4-fenilbut-3-enonitrila **8a** *in situ* em 4 dias de reação utilizando a lipase de *Pseudomonas cepacia* e acetato de vinila em líquido iônico à temperatura de 40 °C. Nesse estudo foi obtido o (R)-álcool **8a** com rendimento de 23% e excesso enantiomérico de 23% e para o (S)-acetato **8b** um rendimento de 40% e excesso enantiomérico de 60%.

Tabela 2.15 - Resolução enzimática da (±)-(E)-2-hidroxi-4-fenilbut-3-enonitrila **8a** em agitador orbital e por irradiação micro-ondas com a lipase de *C. antarctica*.

c1ccc(cc1)/C=C/[C@H](O)C#N (rac-**8a**) $\xrightarrow[\text{A.O. (32}^\circ\text{C, 130 rpm)}]{\text{lipase, tolueno, acetato de vinila}}$ c1ccc(cc1)/C=C/[C@H](O)C#N ((R)-**8a**) + c1ccc(cc1)/C=C/[C@@H](OC(=O)C)C#N ((S)-**8b**)

M.O. (80°C, 200 W)

Agitador orbital (32 °C, 130 rpm)						
Tempo (h)	<i>c</i> (%) 8a	<i>c</i> (%) 8b	<i>ee</i> (%) 8a	<i>ee</i> (%) 8b	[ca] 8b	<i>E</i>
2	78	22	Nd	97	[S]	-
4	71	29	Nd	95	[S]	-
24	43	57	Nd	87	[S]	-
48	40(51) ^a	60(39) ^b	91 ^c	80	[S]	-
Irradiação micro-ondas (80 °C, 200 W)						
1	60	40	Nd	85	[S]	-
2	48	52	Nd	79	[S]	-
3	41	59	Nd	74	[S]	21

^{a,b}Rendimento isolado após purificação por cromatografia em coluna para o (R)-**8a** (51%) e (S)-**8b** (39%, *ee* = 80%) em agitador orbital.

^cExcesso enantiomérico determinado após derivatização com Ac₂O/pi *ee* = 91%.

c = concentração do álcool **8a** remanescente determinada por GC-FID.

c = conversão do acetato **8b** determinada por GC-FID.

[ca] = configuração absoluta.

Nd = não determinada.

E = razão enantiomérica.

ee = excesso enantiomérico.

Na Figura 2.23 tem-se os cromatogramas da resolução enzimática da (*E*)-2-hidroxi-4-fenilbut-3-enonitrila **8a** por irradiação micro-ondas com 3 h de reação. Após o isolamento do álcool remanescente **8a** foi necessário realizar a derivatização, já que não ocorreu a sua separação enantiomérica em coluna capilar quiral obtendo-se um excesso enantiomérico de 91% para (*R*)-**8b**.

Figura 2.23 - Cromatogramas obtidos por GC-FID da resolução enzimática ($\pm$)-(*E*)-2-hidroxi-4-fenilbut-3-enonitrila **8a** pela lipase de *C. antarctica* por irradiação micro-ondas em tolueno. (a) Padrão do ($\pm$)-álcool **8a**. (b) Padrão do ($\pm$)-acetato de (*E*)-1-ciano-3-fenilalila **8b**. (c) 3 h de reação. (e) Derivatização do álcool remanescente (*R*)-**8a** com Ac₂O/pi para formação do (*R*)-acetato **8b**.

Condições de análises em GC-FID: $T_i = 140\text{ }^{\circ}\text{C}$ (3 min), $T_{fi} = 200\text{ }^{\circ}\text{C}$, $r = 2\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$, $t_c = 33,00\text{ min}$. Coluna quiral CP-7502 Chiralsil-Dex (β -ciclodextrina 25 m x 0,25 x 0,39 μm).

Os valores de rotação óptica para a (*R*)-(*E*)-2-hidroxi-4-fenilbut-3-enonitrila **8a** e para o (*S*)-acetato de (*E*)-1-ciano-3-fenilalila **8b** foram comparados com a literatura (ZENG et al., 2007; STEELE et al., 2006). O valor encontrado na literatura para a rotação do (*R*)-álcool **8a** foi de $[\alpha]_D^{25} -28,1$ (c 0,001; CHCl₃) e o valor obtido experimentalmente foi de $[\alpha]_D^{24} -11$ (c 0,012; CHCl₃; *ee* 91%) (ZENG et al., 2007). Enquanto para o (*S*)-acetato **8b** o valor da rotação experimental foi de $[\alpha]_D^{24} + 37,41$ (c

0,015; CHCl_3 ; *ee* 79%) e o valor da literatura foi de $[\alpha]_D^{25} + 14,4$ (*c* 0,011; CHCl_3) (STEELE et al., 2006).

Com intuito de observar a estabilidade térmica da CALB frente aplicação da irradiação micro-ondas foi realizado um estudo de reuso em cinco ciclos, utilizando o substrato $(\pm)$ -(*E*)-2-hidroxi-4-fenilbut-3-enonitrila **8a** nas mesmas condições reacionais (Figura 2.24). Para isso, após cada reação por irradiação micro-ondas o catalisador foi filtrado e lavado com acetato de etila e seco à temperatura ambiente. Após secagem a CALB imobilizada foi adicionada na reação seguinte até a obtenção dos produtos enantiopuros com conversões próximas a 50%.

A partir dos resultados obtidos na Figura 2.24 foi possível observar uma redução na conversão do acetato para cada ciclo aplicado. No primeiro ciclo com 180 min de reação obteve-se uma conversão de 59% do (*S*)-acetato **8b**, enquanto que no segundo ciclo, no mesmo tempo reacional, apenas 45% do (*S*)-**8b** foi biotransformado. No terceiro, quarto e quinto ciclos foram obtidas conversões de 39, 35 e 32% de (*S*)-**8b**, respectivamente, o que representa uma redução de 10% da atividade catalítica da enzima para cada ciclo aplicado, durante o seu manuseio e uso.

Figura 2.24 - Gráfico da reusabilidade da CALB na resolução enzimática da $(\pm)$ -(*E*)-2-hidroxi-4-fenilbut-3-enonitrila **8a** por irradiação micro-ondas em tolueno (10 mL), CALB (160 mg), temperatura (80 °C) potência (200 W).

De forma geral as ciano-hidrinas são pouco estáveis. Em alguns casos foi utilizada a cromatografia líquida para separar os enantiômeros. Em vários casos um dos enantiômeros do álcool/ou acetato não apresentaram enantioseparação nas colunas quirais utilizadas. Desta forma foram realizadas derivatizações destes compostos para determinar os excessos enantioméricos via reação de esterificação. No entanto, os acetatos obtidos na esterificação com CALB apresentam bons rendimentos e elevadas seletividades.

2.9.2 Resoluções enzimáticas de compostos organofluorados pela CALB

2.9.2.1 Resolução enzimática do ($\pm$)-2,2,2-trifluoro-1-feniletanol **9a**

Inicialmente, as reações de resolução quimioenzimática foram realizadas para o substrato ($\pm$)-2,2,2-trifluoro-1-feniletanol **9a** com o objetivo de avaliar o melhor solvente sobre a enantiosseletividade da CALB. Assim foram selecionados quatro solventes (tolueno, diclorometano, metanol e hexano) e a reação foi realizada em agitador orbital (32 °C, 130 rpm) (Tabela 2.16).

Dentre os solventes avaliados o tolueno apresentou a melhor conversão e seletividade do (*R*)-álcool **9a** ($c = 51\%$, $ee = 62\%$) e para o (*S*)-acetato **9b** ($c = 49\%$, $ee > 99\%$), apesar de requerer um tempo reacional bastante longo (168 h) para a resolução. Para os solventes diclorometano e metanol as reações apresentaram baixos valores de conversão ($c < 5\%$) para o (*S*)-acetato **9b** em até 48 h de reação.

A reação em hexano e tolueno com o tempo reacional de 48 h apresentaram valores muito próximo ($c = 24\%$) e ($c = 25\%$) para o (*S*)-acetato **9b** respectivamente. Em todas estas reações o (*S*)-acetato **9b** foi obtido com excelente excesso enantiomérico ($> 99\%$).

As enzimas quando suspensas em solventes hidrofóbicos, como o tolueno e hexano, requerem substancialmente uma menor quantidade de água para manutenção de sua atividade catalítica quando comparada às enzimas suspensas em solventes hidrofílicos. Sendo assim, solventes hidrofóbicos tornam-se menos “nocivos” que os hidrofílicos. Os solventes hidrofílicos são capazes de retirar a água essencial da camada protéica, levando até mesmo à perda da atividade enzimática.

Na literatura diversos estudos realizados empiricamente demonstraram a dependência da enantiosseletividade das enzimas em função do solvente empregado (FRINGS et al., 1999; PAULA et al., 2005). Através destes trabalhos foi mostrado que as lipases apresentaram comportamentos distintos de acordo com os solventes utilizados, podendo a enzima aumentar, diminuir ou não sofrer influência na sua atividade e especificidade.

Ao observar a enantiosseletividade promovida com a CALB frente aos diferentes solventes orgânicos utilizados com o substrato *rac*-álcool **9a**, optou-se em dar continuidade às resoluções quimioenzimáticas em tolueno para esse substrato,

como também para uma série de compostos organofluorados que serão discutidos mais adiante. O tolueno também é um solvente aromático que tem boa afinidade com as substâncias empregadas neste estudo. Sendo assim, essa mesma reação foi realizada em banho de óleo e por irradiação micro-ondas para o *rac*-álcool **9a** à temperatura de 45 °C (Tabela 2.16).

Em banho de óleo foi possível obter após 48 h de reação 20% de conversão do (S)-acetato **9a**. Quando a reação foi conduzida em reator de micro-ondas por um período de 5 h foi obtida uma baixa conversão de 5%.

Tabela 2.16 - Resolução enzimática do (±)-2,2,2-trifluoro-1-feniletanol **9a** em agitador orbital e por irradiação micro-ondas com a lipase de *C. antarctica*.

Solvente	Tempo (h)	<i>c</i> (%) 9a	<i>c</i> (%) 9b	<i>ee</i> (%) 9a	<i>ee</i> (%) 9b	[<i>ca</i>] 9b	<i>E</i>
Agitador orbital (32 °C)							
Tolueno	48	75	25	Nd	>99	[S]	-
	96	68	32	Nd	>99	[S]	-
	120	54	46	Nd	>99	[S]	-
	168	51(28) ^a	49(18) ^b	62 ^c	>99	[S]	>200
Diclorometano	48	96	4	Nd	>99	[S]	-
Metanol	48	100	Nc	-	-	Nc	-
Hexano	24	87	13	Nd	>99	[S]	-
	48	76	24	Nd	>99	[S]	-
Irradiação micro-ondas (45 °C)							
Tolueno	1	100	Nc	-	-	Nd	-
	2	97	3	Nd	>99	[S]	-
	4	96	4	Nd	>99	[S]	-
	5	95	5	Nd	>99	[S]	-
Banho de óleo (45 °C)							
Tolueno	2	97	3	Nd	>99	[S]	-
	4	95	5	Nd	>99	[S]	-
	24	86	14	Nd	>99	[S]	-
	48	80	20	Nd	>99	[S]	-

^{a,b}Rendimento isolado após purificação por cromatografia em coluna para o (R)-**9a** (28%, *ee* = 62%) e (S)-**9b** (18%, *ee* > 99%, *E* > 200) em agitador orbital.

^cExcesso enantiomérico determinado após derivatização com Ac₂O/pi (*ee* = 62%).

c = concentração do álcool **9a** remanescente determinada por GC-FID.

c = conversão do acetato **9b** determinada por GC-FID.

[*ca*] = configuração absoluta.

Nd = não determinado.

Nc = não ocorreu reação.

E = razão enantiomérica.

ee = excesso enantiomérico.

A partir dos cromatogramas da Figura 2.25 pode-se observar a resolução enzimática da **9a** em agitador orbital após 168 h de reação. Após isolamento do álcool remanescente **9a** foi realizada a derivatização do mesmo para determinar o valor do excesso enantiomérico. Através das análises do derivado (*R*)-acetilado obteve-se 62% de excesso enantiomérico.

Figura 2.25 - Cromatogramas obtidos por GC-FID da resolução enzimática do ($\pm$)-2,2,2-trifluoro-1-feniletanol **9a** pela lipase de *C. antarctica* em agitador orbital em tolueno. (a) Padrão do ($\pm$)-2,2,2-trifluoro-1-feniletanol **9a**. (b) Padrão do ($\pm$)-acetato de 2,2,2-trifluoro-1-feniletila **9b**. (c) 7 dias de reação. (d) Derivatização do álcool remanescente (*R*)-**9a** com Ac₂O/pi para formação do (*R*)-acetato **9b**.

Condições de análises em GC-FID: $T_i = 70^\circ\text{C}$ (3 min), $T_{fi} = 150^\circ\text{C}$, $r = 3^\circ\text{C}/\text{min}$, $t_c = 26,67$ min. Coluna quiral CP-7502 Chiralsil-Dex (β -ciclodextrina 25 m x 0,25 x 0,39 μm).

A configuração absoluta do (*R*)-2,2,2-trifluoro-1-feniletanol **9a** obtido por resolução quimioenzimática foi determinada por comparação do sinal da medida de rotação óptica com a literatura (KATO et al., 2001). O valor da rotação experimental para o (*R*)-2,2,2-trifluoro-1-feniletanol **9a** foi de $[\alpha]_D^{26} -1,77$ (c 0,124; CHCl_3 ; ee 62%) e o valor encontrado na literatura foi de $[\alpha]_D^{25} -20,41$ (c 0,48; CHCl_3 ; ee 68%) (XU et al., 2009). Para o (*S*)-acetato do 2,2,2-trifluoro-1-feniletanol **9b** o valor da rotação

experimental foi de $[\alpha]_D^{26} +3,90$ (c 0,023; CHCl_3 ; $ee > 99\%$) e não foi encontrado na literatura uma referência de rotação óptica para este composto.

a) Caracterização do ($\pm$)-2,2,2-trifluoro-1-feniletanol 9a

No espectro de absorção na região do infravermelho do composto **9a** foi observado uma banda larga característica de deformação axial da ligação O-H (3397 cm^{-1}). Além de uma banda referente às vibrações de deformação angular da ligação C-F (1267 cm^{-1}), uma banda atribuída às vibrações de deformação angular da ligação C-O de álcool secundário ($1128, 1267\text{ cm}^{-1}$) e uma banda em 706 cm^{-1} referente às ligações C-H fora do plano do anel aromático monossustituído (SILVERSTEIN, 2006) (Figura 2.26).

No espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) foi observado dois multipletos, um entre $\delta_{\text{H}} 7,49\text{-}7,47$ (m, 2H) e o outro entre $\delta_{\text{H}} 7,45\text{-}7,42$ (m, 3H), referente aos 5 hidrogênios aromáticos, um quarteto em $\delta_{\text{H}} 5,01$ (q, $J_{\text{F-H}} = 6,7\text{ Hz}$, 1H) referente ao hidrogênio metínico, um singlete largo referente ao hidrogênio da hidroxila em $\delta_{\text{H}} 2,80$ (s, 1H) (Figura 2.27).

O espectro de massas de alta resolução foi obtido no modo negativo e apresentou o pico do íon molecular m/z 175,03770, correspondente ao composto **9a** $[\text{M} - \text{H}^+]$, cujo valor calculado foi m/z 175,03707 (Figura 2.28).

Figura 2.26 - Espectro de absorção na região de infravermelho (cm^{-1}) para o ($\pm$)-2,2,2-trifluoro-1-feniletanol **9a**.

Figura 2.27 - Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) para o ($\pm$)-2,2,2-trifluoro-1-feniletanol **9a**.

Figura 2.28 - Espectro de massas de alta resolução para o (±)-2,2,2-trifluoro-1-feniletanol **9a**.

*b) Caracterização do (±)-acetato de 2,2,2-trifluoro-1-feniletila **9b***

No espectro de infravermelho do (S)-acetato **9b** foi possível observar uma banda intensa em 1763 cm^{-1} , correspondente ao estiramento C=O de éster, bandas de forte absorção na faixa de ($1300\text{-}1000\text{ cm}^{-1}$), referente ao estiramento C-O, bandas referentes às vibrações de deformação axial das ligações C-F (1217 cm^{-1}), uma banda forte em 704 cm^{-1} referente à ligação C-H do anel aromático monossustituído (PAVIA, 2010) (Figura 2.29).

No espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) foi observado dois multipletos em δ_{H} 7,49-7,47 (m, 2H) e em δ_{H} 7,43-7,42 (m, 3H) referentes aos 5 hidrogênios aromáticos, um quarteto em δ_{H} 6,16 (q, $J_{\text{H-F}} = 6,5\text{ Hz}$, 1H) referente ao hidrogênio metínico, um singlete em δ_{H} 2,21 (s, 3H) referente ao grupo metila α à carbonila (Figura 2.30).

O espectro de RMN de ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) do acetato **9b** apresentou um sinal referente ao carbono metílico em δ_{C} 20,6, um quarteto referente ao carbono

carbinólico em δ_C 71,9 (q, $J_{C-F} = 33,1$ Hz), quatro sinais referentes aos carbonos CH do anel aromático em δ_C 131,2; 129,8; 128,6; 128,0), um sinal referente ao carbono da carbonila em δ_C 168,7 e um sinal referente ao carbono do grupamento trifluorometílico em δ_C 123,1 (q, $J_{C-F} = 278,8$ Hz) (Figura 2.31). O espectro de RMN de ^{19}F (470 MHz, CDCl_3) apresentou um sinal em δ_F -76,05 (d, $J_{F-H} = 9,4$ Hz) (Figura 2.32).

O espectro de massas de alta resolução foi realizado no modo positivo e negativo, mas não foi possível obter os dados. O valor calculado para o composto **9b** foi m/z 218,05882.

Figura 2.29 - Espectro de absorção na região de infravermelho (cm^{-1}) para o ($\pm$)-acetato de 2,2,2-trifluoro-1-feniletila **9b**.

Figura 2.30 - Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) para o ($\pm$)-acetato de 2,2,2-trifluoro-1-feniletila **9b**.

Figura 2.31 - Espectro de RMN de ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) para o ($\pm$)-acetato de 2,2,2-trifluoro-1-feniletila **9b**.

Figura 2.32 - Espectro de RMN de ^{19}F (470 MHz, CDCl_3) para o ($\pm$)-acetato de 2,2,2-trifluoro-1-feniletila **9b**.

2.9.2.2 Resolução enzimática do ($\pm$)-1-(2,4,5-trifluorofenil)etanol **10a**

A resolução enzimática do ($\pm$)-1-(2,4,5-trifluorofenil)etanol **10a** foi realizada em tolueno na presença da lipase de *C. antarctica* em agitador orbital, após 48 h de reação obteve-se o (S)-álcool **10a** ($c = 41\%$, $ee > 99\%$) e o (R)-acetato **10b** ($c = 59\%$, $ee > 99\%$) (Tabela 2.17, Figura 2.33). Utilizando a técnica de irradiação micro-ondas (65 °C, 200 W) obteve-se uma eficiente resolução em tolueno em apenas 1 h de reação com excelentes conversões e excessos enantioméricos para o (S)-álcool **10a** ($c = 56\%$, $ee > 99\%$) e para o (R)-acetato **10b** ($c = 44\%$, $ee > 99\%$) (Tabela 2.17, Figura 2.34).

A reação foi monitorada por irradiação micro-ondas durante 8 h e o progresso da reação pode ser observado pelos cromatogramas das Figuras 2.34-2.35 e Tabela 2.17, onde ocorreu preferencialmente a esterificação do (R)-álcool **10a**. Novamente, estes resultados obtidos comprovaram a eficiência da irradiação micro-ondas obtendo-se as resoluções quimioenzimáticas em menores tempos reacionais em comparação à agitação orbital (YADAV; PAWAR, 2012).

Tabela 2.17 - Resolução enzimática do ($\pm$)-1-(2,4,5-trifluorofenil)etanol **10a** em agitador orbital e por irradiação micro-ondas com a lipase de *C. antarctica*.

Tempo (h)	c (%) 10a	c (%) 10b	ee (%) 10a	ee (%) 10b	[α] 10b	E
Agitador orbital						
2	50	50	99	99	[R]	>200
4	50	50	99	99	[R]	>200
24	50	50	99	99	[R]	>200
48	50(33) ^a	50(19) ^b	99	99	[R]	>200
Irradiação micro-ondas						
0,08	71	29	37	99	[R]	>200
0,16	58	42	60	99	[R]	>200
0,33	51	49	80	99	[R]	>200
0,5	48	52	90	99	[R]	>200
1	50	50	99	99	[R]	>200
4	50	50	99	99	[R]	>200
6	50	50	99	99	[R]	>200
8	50	50	99	99	[R]	>200

^aRendimento isolado após purificação por cromatografia em coluna para o (S)-1-(2,4,5-trifluorofenil)etanol **10a** (33%, $ee > 99\%$).

^bRendimento isolado após purificação por cromatografia em coluna para o (R)-acetato de 1-(2,4,5-trifluorofenil)etila **10b** (19%, $ee > 99\%$).

c = concentração do álcool **10a** remanescente determinada por GC-FID.

c = conversão do acetato **10b** determinada por GC-FID.

E = razão enantiomérica.
 ee = excesso enantiomérico.

A configuração absoluta do (S)-1-(2,4,5-trifluorofenil)etanol **10a** obtido por resolução quimioenzimática foi determinada por comparação do sinal da medida de rotação óptica com a literatura. O valor da rotação específica experimental para o (S)-1-(2,4,5-trifluorofenil)etanol **10a** foi de $[\alpha]_D^{26} -1,825$ (c 1,654; CHCl_3 ; $ee > 99\%$) e o valor de rotação específica da literatura foi de $[\alpha]_D^{20} -29,9$ (c 0,005; CHCl_3) (YU et al., 2011). Para o (R)-acetato de 1-(2,4,5-trifluorofenil)etila **10b** o valor da rotação específica experimental foi de $[\alpha]_D^{26} +12,02$ (c 0,937; CHCl_3 ; $ee > 99\%$). Também não foi encontrado na literatura uma referência de rotação óptica para este composto.

Figura 2.33 - Cromatogramas obtidos por GC-FID da resolução enzimática do ($\pm$)-1-(2,4,5-trifluorofenil)etanol **10a** pela lipase de *C. antarctica* em agitador orbital (32 °C) em tolueno. (a) Padrão do ($\pm$)-1-(2,4,5-trifluorofenil)etanol **10a**. (b) Padrão do ($\pm$)-acetato de 1-(2,4,5-trifluorofenil)etila **10b**. (c) 2 h de reação (d) 48 h de reação.

Condições de análises em GC-FID: $T_i = 90\text{ }^\circ\text{C}$ (2 min), $T_{f1} = 150\text{ }^\circ\text{C}$ (2 min), $r = 3\text{ }^\circ\text{C/min}$, $t_c = 24,00$ min. Coluna quiral CP-7502 Chiralsil-Dex (β -ciclodextrina 25 m x 0,25 x 0,39 μm).

Figura 2.34 - Cromatogramas obtidos por GC-FID da resolução enzimática do ($\pm$)-1-(2,4,5-trifluorofenil)etanol **10a** pela lipase de *C. antarctica* por irradiação micro-ondas em tolueno (65 °C, 200 W). (a) Padrão do ($\pm$)-1-(2,4,5-trifluorofenil)etanol **10a**. (b) Padrão do ($\pm$)-acetato de 1-(2,4,5-trifluorofenil)etila **10b**. (c) 5 min de reação. (d) 10 min de reação. (e) 20 min de reação. (f) 30 min de reação.

Condições de análises em GC-FID: $T_i = 40\text{ }^{\circ}\text{C}$ (2 min), $T_{fi} = 150\text{ }^{\circ}\text{C}$ (2 min), $r = 3\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$, $t_c = 40,67\text{ min}$. Coluna quiral CP-7502 Chiralsil-Dex (β -ciclodextrina 25 m x 0,25 x 0,39 μm).

Figura 2.35 - Cromatogramas obtidos por GC-FID da resolução enzimática do ($\pm$)-1-(2,4,5-trifluorofenil)etanol **10a** pela lipase de *C. antarctica* por irradiação micro-ondas (65 °C, 200 W) em tolueno. (a) 1h de reação. (b) 4h de reação. (c) 6h de reação. (d) 8h de reação.

Condições de análises em GC-FID: $T_i = 40\text{ °C}$ (2 min), $T_{fi} = 150\text{ °C}$ (2 min), $r = 3\text{ °C/min}$, $t_c = 40,67\text{ min}$. Coluna quiral CP-7502 Chiralsil-Dex (β -ciclodextrina 25 m x 0,25 x 0,39 μm).

a) Caracterização do ($\pm$)-1-(2,4,5-trifluorofenil)etanol **10a**

No espectro de absorção na região de infravermelho do composto **10a** foi observado uma banda larga característica da vibração de deformação axial da ligação O-H (3356 cm^{-1}). Além de uma banda referente à vibração de deformação axial da ligação C-F (1278 cm^{-1}) e uma banda atribuída à vibração de deformação angular de ligação C-O-H de álcool secundário (1331 cm^{-1}) e outra banda atribuída a deformação axial C-O de álcool secundário (1150 cm^{-1}) (SILVERSTEIN, 2006) (Figura 2.36).

No espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) foi observado um duplo duplo duplete em δ_{H} 7,22 (ddd, $J_{\text{H-F}} = 11,0\text{ Hz}$; $9,0\text{ Hz}$; $7,0\text{ Hz}$, 1H), referente ao Ha, e um tripleto duplo em δ_{H} 6,79 (td, $J_{\text{H-F}} = 10,0\text{ Hz}$, $5,3\text{ Hz}$, 1H), referente ao Hb, um quarteto em δ_{H} 5,03 (q, $J = 6,8\text{ Hz}$, 1H) referente ao hidrogênio metínico, um singlete largo em δ_{H} 2,52 (sl, 1H), referente ao hidrogênio da hidroxila, um duplete em δ_{H} 1,37 (d, $J = 8,0\text{ Hz}$, 3H), referente aos hidrogênios da metila (PAVIA, 2010) (Figura 2.37).

O espectro de RMN de ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) do álcool **10a** apresentou três duplo duplo dubletos referentes ao acoplamento heteronuclear ^{13}C - ^{19}F dos átomos de carbono do anel aromático, com os seguintes deslocamentos químicos: δ_{C} 154,2 (ddd, $J_{\text{C-F}} = 243,8 \text{ Hz}$; 8,8 Hz, 2,5 Hz), δ_{C} 149,0 (ddd, $J_{\text{C-F}} = 248,4 \text{ Hz}$, 14,1 Hz, 12,2 Hz) e δ_{C} 147,0 (ddd, $J_{\text{C-F}} = 243,4 \text{ Hz}$, 12,2 Hz, 3,4 Hz). Dois multipletos um com δ_{C} 129,4-129,3 (m) e um outro multiplete com δ_{C} 114,8-114,6 (m) referentes ao acoplamento via a uma e a duas ligações entre os carbonos do anel aromático e o átomo ^{19}F . Um duplo dublete em δ_{C} 105,4 (dd, $J_{\text{C-F}} = 28,1 \text{ Hz}$, 20,6 Hz), referente ao acoplamento heteronuclear ^{13}C - ^{19}F via duas ligações. Um sinal em δ_{C} 63,7 referente ao carbono ligado a hidroxila e um sinal referente ao carbono ligado aos hidrogênios da metila em δ_{C} 24,2 (PAVIA, 2010) (Figura 2.38).

O espectro de RMN de ^{19}F (470 MHz, CDCl_3) apresentou três linhas espectrais em δ_{F} -121, 84, -135,72 e -142,41 (Figura 2.39).

O espectro de massas de alta resolução foi obtido no modo negativo e apresentou o pico do íon molecular m/z 175,03728, correspondente ao composto **10a** $[\text{M} - \text{H}^+]$ cujo o valor calculado é de m/z 175,03707 (Figura 2.40).

Figura 2.36 - Espectro de absorção na região de infravermelho (cm^{-1}) para o ($\pm$)-1-(2,4,5-trifluorofenil)etanol **10a**.

Figura 2.37 - Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) para o ($\pm$)-1-(2,4,5-trifluorofenil)etanol **10a**.

Figura 2.38 - Espectro de RMN de ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) para o ($\pm$)-1-(2,4,5-trifluorofenil)etanol **10a**.

Figura 2.38a - Espectro ampliado de RMN de ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) para o ($\pm$)-1-(2,4,5-trifluorofenil)etanol **10a**.

Figura 2.38b - Espectro ampliado de RMN de ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) para o ($\pm$)-1-(2,4,5-trifluorofenil)etanol **10a**.

Figura 2.39 - Espectro de RMN de ^{19}F (470 MHz, CDCl_3) para o ($\pm$)-1-(2,4,5-trifluorofenil)etanol **10a**.

Figura 2.40 - Espectro de massas de alta resolução para o ($\pm$)-1-(2,4,5-trifluorofenil)etanol **10a**.

*b) Caracterização do ($\pm$)-acetato de 1-(2,4,5-trifluorofenil)etila **10b**.*

No espectro de infravermelho do (*S*)-acetato **10b** foi observado uma banda em 1749 cm⁻¹, correspondente ao estiramento C=O de éster, bandas de absorção na faixa de (1300-1000 cm⁻¹), referente ao estiramento C-O, além de bandas de ligações C-H do anel aromático (acima 3000 cm⁻¹ e próximas 800 cm⁻¹), banda referente à vibração de deformação axial das ligações C-F (1237cm⁻¹) (Figura 2.41).

No espectro de RMN de ¹H (500 MHz, CDCl₃) foi observado um duplo duplo duplete em δ_H 7,20 (ddd, J_{H-F} = 10,0 Hz, 7,5 Hz, 5,0 Hz, 1H), referente ao Ha, e um triplete duplo em δ_H 6,92 (td, J_{H-F} = 10,0 Hz, 5,0 Hz, 1H), referente ao Hb, um quarteto em δ_H 6,06 (q, J = 6,5 Hz, 1H), referente ao hidrogênio metínico, um singlete largo em δ_H 2,10 (sl, 3H) referente a metila da ligação éster e um duplete em δ_H 1,51 (d, J = 10,0 Hz, 3H), referente aos hidrogênios da metila (PAVIA, 2010) (Figura 2.42).

O espectro de RMN de ¹³C (125 MHz, CDCl₃) do acetato **10b** apresentou um sinal em δ_C 169,8 referente a carbono *sp*² da carbonila do éster, três duplo duplo dupletos referentes ao acoplamento heteronuclear ¹³C-¹⁹F dos átomos de carbono do

anel aromático, com os seguintes deslocamentos químicos: δ_C 154,5 (ddd, J_{C-F} = 245,9 Hz; 9,7 Hz; 2,8 Hz), 149,5 (ddd, J_{C-F} = 249,7 Hz; 14,7 Hz; 12,2 Hz) e 147,0 (ddd, J_{C-F} = 243,4 Hz, 12,8 Hz, 3,4 Hz). Dois multipletos, um em δ_C 125,7-125,0 (m) e outro em δ_C 115,2-115,0 (m) referentes ao acoplamento via uma e duas ligações entre os ^{13}C do anel aromático e os átomos de ^{19}F . Um duplo dubleto em δ_C 105,7 (dd, J_{C-F} = 27,5 Hz; 21,2 Hz), referente ao acoplamento heteronuclear ^{13}C - ^{19}F via duas ligações. Um dubleto em δ_C 65,7 (d, J_{C-F} = 2,5 Hz), referente ao carbono da ligação C-O. Um sinal em δ_C 21,3 referente ao carbono sp^3 do éster e uma linha espectral com δ_C 21,1 referente também ao carbono sp^3 da metila ligada ao C-O. Os deslocamentos das metilas em δ_C 21,3 e δ_C 21,1 podem ser intercambiáveis (PAVIA, 2010) (Figura 2.43).

O espectro de RMN de ^{19}F (470 MHz, $CDCl_3$) apresentou três linhas espectrais em δ_F -121, 84, -135,72, -142,41 (Figura 2.44). O espectro de massas de alta resolução foi obtido no modo positivo e apresentou o pico do íon molecular m/z 241,04439, correspondente ao composto **10b** $[M + Na^+]$ cujo valor calculado foi m/z 241,04523 (Figura 2.45).

Figura 2.41 - Espectro de absorção na região de infravermelho (cm^{-1}) para o ($\pm$)-acetato de 1-(2,4,5-trifluorofenil)etila **10b**.

Figura 2.42 - Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) para o ($\pm$)-acetato de 1-(2,4,5-trifluorofenil)etila **10b**.

Figura 2.43 - Espectro de RMN de ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) para o ($\pm$)-acetato de 1-(2,4,5-trifluorofenil)etila **10b**.

Figura 2.43a - Espectro ampliado de RMN de ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) para o ($\pm$)-acetato de 1-(2,4,5-trifluorofenil)etila **10b**.

Figura 2.43b - Espectro ampliado de RMN de ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) para o ($\pm$)-acetato de 1-(2,4,5-trifluorofenil)etila **10b**.

Figura 2.44 - Espectro de RMN de ^{19}F (470 MHz, CDCl_3) para o ($\pm$)-acetato de 1-(2,4,5-trifluorofenil)etila **10b**.

Figura 2.45 - Espectro de massas de alta resolução para o acetato de ($\pm$)-1-(2,4,5-trifluorofenil)etila **10b**.

2.9.2.3 Resolução enzimática do ($\pm$)-1-(3-bromofenil)-2,2,2-trifluoroetanol **11a**

Inicialmente realizou-se a otimização das condições de análises cromatográficas em GC-FID para obtenção da separação enantiomérica dos padrões racêmicos do álcool **11a** e do acetato **11b** em coluna quiral. Como pode ser observado na Figura 2.46 os enantiômeros dos correspondentes padrões racêmicos apresentaram enantioseparação na coluna quiral não requerendo derivatização para determinação dos excessos enantioméricos dos respectivos compostos.

A resolução enzimática do ($\pm$)-1-(3-bromofenil)-2,2,2-trifluoroetanol **11a** foi realizada com a lipase de *C. antarctica* em agitador orbital e em irradiação micro-ondas. Utilizando-se a técnica de irradiação micro-ondas obteve-se uma resolução em tolueno com 14 h de reação onde foi obtido o (*R*)-álcool **11a** (*c* = 58%, *ee* = 43%) e o (*S*)-acetato **11b** (*c* = 42%, *ee* = 78%) (Tabela 2.18, Figura 2.46). Enquanto que em agitador orbital obteve-se a resolução enzimática em tolueno com 144 h para o (*R*)-álcool **11a** (*c* = 49%, *ee* = 61%) e o (*S*)-acetato **11b** (*c* = 51%, *ee* = 82%) (Tabela 2.18, Figura 2.47). Novamente, estes resultados obtidos nas resoluções quimioenzimáticas utilizando a técnica por irradiação micro-ondas, comprovaram o quão eficiente tem sido esta metodologia na preparação de álcoois quirais em menores tempos de reação.

Os rendimentos dos compostos foram determinados após extração e purificação por cromatografia em coluna. Os valores obtidos para os rendimentos isolados encontram-se na Tabela 2.18.

Tabela 2.18 - Resolução enzimática do (±)-1-(3-bromofenil)-2,2,2-trifluoroetanol **11a** em agitador orbital e por irradiação micro-ondas com a lipase de *C. antarctica*.

Time (h)	<i>c</i> (%) 11a	<i>c</i> (%) 11b	<i>ee</i> (%) 11a	<i>ee</i> (%) 11b	[<i>ca</i>] 11b	<i>E</i>
Agitador orbital						
48	66	34	31	83	[<i>S</i>]	14
72	60	40	40	83	[<i>S</i>]	15
120	52	48	55	83	[<i>S</i>]	19
144	49(36) ^a	51(34) ^b	61	82	[<i>S</i>]	19
Irradiação micro-ondas						
1	94	6	5	83	[<i>S</i>]	11
3	84	16	22	82	[<i>S</i>]	12
6	74	26	22	81	[<i>S</i>]	12
9	65	35	32	80	[<i>S</i>]	12
12	62	38	38	81	[<i>S</i>]	14
14	58	42	43	78	[<i>S</i>]	12

^aRendimento isolado após purificação por cromatografia em coluna para o (R)-1-(3-bromofenil)-2,2,2-trifluoroetanol **11a** (36%, *ee* = 61%).

^bRendimento isolado após purificação por cromatografia em coluna para o (S)-acetato de 1-(3-bromofenil)-2,2,2-trifluoroetila **11b** (34%, *ee* = 82%).

c = concentração do álcool **11a** remanescente determinada por GC-FID.

c = conversão do acetato **11b** determinada por GC-FID.

[*ca*] = configuração absoluta.

E = razão enantiomérica.

ee = excesso enantiomérico.

A configuração absoluta do (R)-1-(3-bromofenil)-2,2,2-trifluoroetanol **11a** obtido por resolução quimioenzimática foi determinada por comparação do sinal da medida de rotação óptica com a literatura (OHNO et al., 1979). O valor da rotação experimental para o (R)-1-(3-bromofenil)-2,2,2-trifluoroetanol **11a** foi de $[\alpha]_D^{25}$ -13,26 (*c* 0,021; CHCl₃; *ee* > 61%) e o valor encontrado na literatura foi de $[\alpha]_D^{25}$ -25,1 (*c* 2,49; EtOH) (OHNO et al., 1979). Enquanto para o (S)-acetato de 1-(3-bromofenil)-2,2,2-trifluoroetila **11b** o valor da rotação experimental foi de $[\alpha]_D^{25}$ +178,1 (*c* 0,015; CHCl₃; *ee* 82%) não sendo encontrado na literatura uma referência de rotação óptica para o respectivo composto. As reações em agitador orbital forneceram bons rendimentos isolados obtendo-se 36% para o (R)-**11a** e 34% para o (S)-**11b**.

Figura 2.46 - Cromatogramas obtidos por GC-FID para a resolução enzimática do ($\pm$)-1-(3-bromofenil)-2,2,2-trifluoroetanol **11a** pela lipase de *C. antarctica* por irradiação micro-ondas (80 °C, 200 W) em tolueno. (a) Padrão do ($\pm$)-1-(3-bromofenil)-2,2,2-trifluoroetanol **11a**. (b) Padrão do ($\pm$)-acetato de 1-(3-bromofenil)-2,2,2-trifluoroetila **11b**. (c) 14 h de reação.

Condições de análises em GC-FID: $T_i = 100\text{ }^{\circ}\text{C}$ (1 min), $T_f = 180\text{ }^{\circ}\text{C}$, $r = 2\text{ }^{\circ}\text{C/min}$, $t_c = 40,0$ min. Coluna quiral CP-7500 CP-Cyclodextrin- β -2,3,6-M19 (25 m x 0,25 x 0,25 μm).

Figura 2.47 - Cromatogramas obtidos por GC-FID para a resolução enzimática do ($\pm$)-1-(3-bromofenil)-2,2,2-trifluoroetanol **11a** pela lipase de *C. antarctica* em agitador orbital (32°C, 130 rpm) e em tolueno. (a) Padrão do ($\pm$)-1-(3-bromofenil)-2,2,2-trifluoroetanol **11a**. (b) Padrão do ($\pm$)-acetato de 1-(3-bromofenil)-2,2,2-trifluoroetila **11a**. (c) 144 h de reação.

Condições de análises em GC-FID: $T_i = 100\text{ }^{\circ}\text{C}$ (1 min), $T_f = 180\text{ }^{\circ}\text{C}$, $r = 2\text{ }^{\circ}\text{C/min}$, $t_c = 40,0$ min. Coluna quiral CP-7500 CP-Cyclodextrin- β -2,3,6-M19 (25 m x 0,25 x 0,25 μm).

a) Caracterização do (±)-1-(3-bromofenil)-2,2,2-trifluoroetanol 11a

No espectro de absorção na região de infravermelho do (*R*)-álcool **11a** foi observado uma banda larga característica das vibrações de deformação axial da ligação O-H (3412 cm^{-1}). Além de bandas referentes às vibrações de deformação axial das ligações C-F (1269 cm^{-1}), uma banda atribuída à vibração de deformação angular da ligação C-O-H de álcool secundário (1132 cm^{-1}), uma banda de deformação axial C-O (1269 cm^{-1}) e bandas de deformação angular C-H fora do plano em (677 , 729 e 879 cm^{-1}) referente as ligações C-H do anel aromático (SILVERSTEIN, 2006) (Figura 2.48).

No espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) foi observado um singleto em δ_{H} 7,64 (s, 1H), referente ao hidrogênio (Hd) do anel aromático, um dubleto em δ_{H} 7,55-7,52 (m, 1H), referente ao hidrogênio (Hc) do anel aromático. Um dubleto em δ_{H} 7,39 (d, $J = 8,0\text{ Hz}$, 1H), referente ao hidrogênio (Ha) do anel aromático, um tripleto em δ_{H} 7,27 (t, $J = 8,0\text{ Hz}$, 1H), referente ao hidrogênio (Hb) do anel aromático. Um multiplete em δ_{H} 5,01-4,95 (m, 1H), referente ao hidrogênio da ligação (C-H), um dubleto em δ_{H} 2,89 (d, $J = 4,0\text{ Hz}$, 1H), referente ao hidrogênio da hidroxila (Figura 2.49).

O espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) do álcool **11a** apresentou cinco sinais referentes aos carbonos sp^2 do anel aromático, δ_{C} : 136,0; 132,6; 130,5; 130,1; 126,1. Um quarteto em δ_{C} 123,9 (q, $J_{\text{C-F}} = 281,0\text{ Hz}$), referente ao carbono sp^3 ligado diretamente ao grupo CF_3 . Um carbono em δ_{C} 122,6 referente ao carbono sp^2 ligado ao átomo de bromo. E um multiplete em δ_{C} 72,6-71,6 (m), referente a um carbono sp^3 ligado ao grupo hidroxila (PAVIA, 2010) (Figura 2.50).

O espectro de RMN de ^{19}F (470 MHz, CDCl_3) apresentou um dubleto em δ_{F} -78,34 (d, $J_{\text{F-H}} = 6,6\text{ Hz}$) (Figura 2.51). O espectro de massas de alta resolução foi obtido no modo negativo apresentando o pico do íon molecular m/z 252,94774, correspondente ao composto **11a** $[\text{M} - \text{H}^+]$ cujo valor calculado foi m/z 252,94759 (Figura 2.52).

Figura 2.48 - Espectro de absorção na região de infravermelho (cm^{-1}) para o ($\pm$)-1-(3-bromofenil)-2,2,2-trifluoroetanol **11a**.

Figura 2.49 - Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) para o ($\pm$)-1-(3-bromofenil)-2,2,2-trifluoroetanol **11a**.

Figura 2.50 - Espectro de RMN de ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) para o ($\pm$)-1-(3-bromofenil)-2,2,2-trifluoroetanol **11a**.

Figura 2.51 - Espectro de RMN de ^{19}F (470 MHz, CDCl_3) para o ($\pm$)-1-(3-bromofenil)-2,2,2-trifluoroetanol **11a**.

Figura 2.52 - Espectro de massas de alta resolução para o ($\pm$)-1-(3-bromofenil)-2,2,2-trifluoroetanol **11a**.

*b) Caracterização do ($\pm$)-acetato de 1-(3-bromofenil)-2,2,2-trifluoroetila **11b***

No espectro de infravermelho do composto **11b** foi observado uma banda intensa em 1765 cm⁻¹, correspondente ao estiramento (C=O) de éster, bandas de forte absorção na faixa de 1300-1000 cm⁻¹, referente ao estiramento C-O, bandas referentes às vibrações de deformação axial das ligações C-F (1217 cm⁻¹), e bandas de deformação angular C-H fora do plano em (680, 848 e 891 cm⁻¹) referente as ligações C-H do anel aromático (PAVIA, 2010) (Figura 2.53).

No espectro de RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃) foi observado um singlete em δ_H 7,62 (s, 1H), referente ao hidrogênio (Hd), um multiplete em δ_H 7,58-7,56 (m, 1H), referente ao hidrogênio (Hc), um dubleto em δ_H 7,40 (d, $J = 8,0$ Hz, 1H), referente ao hidrogênio (Ha), um triplete em δ_H 7,29 (t, $J = 8,0$ Hz, 1H), referente ao hidrogênio (Hb). Um quarteto em δ_H 6,10 (q, $J_{H-F} = 6,8$ Hz, 1H), referente ao acoplamento da ligação (H-F) e um dubleto em δ_H 2,22 (s, 3H), referente aos hidrogênios da metila α -carbonila do éster (Figura 2.54).

O espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) do álcool **11b** apresentou uma linha espectral em δ_{C} 168,5 referente ao carbono sp^2 da carbonila de éster. Cinco sinais referentes aos carbonos sp^2 do anel aromático com os seguintes deslocamentos químicos δ_{C} : 133,3; 133,1; 131,0; 130,2; 126,8. Um quarteto em δ_{C} 122,9 (q, $J_{\text{C-F}} = 279,0$ Hz), referente ao carbono sp^3 ligado diretamente ao grupo CF_3 . Um carbono sp^2 em δ_{C} 122,8 referente ao carbono ligado ao átomo de bromo e um quarteto em δ_{C} 71,1 (q, $J_{\text{C-F}} = 33,6$ Hz), referente ao carbono sp^3 da ligação (C-O) e uma linha espectral em δ_{C} 20,6 referente ao carbono sp^3 da metila (PAVIA, 2010) (Figura 2.55). O espectro de massas de alta resolução foi realizado no modo positivo e negativo, mas não foi possível obter o valor de massas. O valor calculado para composto **11b** foi m/z 295,96598. O espectro de RMN de ^{19}F (470 MHz, CDCl_3) apresentou um dubleto em δ_{F} -75,95 (d, $J_{\text{F-H}} = 9,4$ Hz) (Figura 2.56).

Figura 2.53 - Espectro de absorção na região de infravermelho (cm^{-1}) para o (±)-acetato de 1-(3-bromofenil)-2,2,2-trifluoroetila **11b**.

Figura 2.54 - Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) para o ($\pm$)-acetato de 1-(3-bromofenil)-2,2,2-trifluoroetila **11b**.

Figura 2.55 - Espectro de RMN de ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) para o ($\pm$)-acetato de 1-(3-bromofenil)-2,2,2-trifluoroetila **11b**.

Figura 2.56 - Espectro de RMN de ^{19}F (470 MHz, CDCl_3) para o ($\pm$)-acetato de 1-(3-bromofenil)-2,2,2-trifluoroetila **11b**.

2.9.2.4 Resolução enzimática do ($\pm$)-1-(4-bromofenil)-2,2,2-trifluoroetanol **12a**

A resolução quimioenzimática do ($\pm$)-1-(4-bromofenil)-2,2,2-trifluoroetanol **12a** foi realizada com a lipase de *C. antarctica* em agitador orbital e por irradiação micro-ondas. Utilizando-se a técnica de irradiação micro-ondas obteve-se uma eficiente resolução em tolueno com 14 h de reação onde foi obtido o (*R*)-álcool **12a** ($c = 51\%$, $ee = 70\%$) e o (*S*)-acetato **12b** ($c = 49\%$, $ee = 98\%$) (Tabela 2.19, Figura 2.57). Enquanto que em agitador orbital obteve-se a resolução enzimática em tolueno com 144 h para o (*R*)-álcool **12a** ($c = 51\%$, $ee = 72\%$) e o (*S*)-acetato **12b** ($c = 49\%$, $ee > 99\%$) (Tabela 2.19, Figura 2.58).

Ao comparar os dados apresentados na Tabela 2.19 junto à irradiação micro-ondas e em agitador orbital, pode-se observar que o tempo requerido para resolução cinética do *rac*-**12a** diminuiu em 10 vezes (14 h) em relação ao o tempo requerido em agitador orbital (144 h). Novamente destaca-se a eficiência da irradiação micro-ondas no tempo de reação frente à resolução quimioenzimática.

Nas reações de acetilação a enantiosseletividade depende de quão importante é a interação entre o anel aromático e o substrato no sítio ativo da enzima. Esta interação é a soma dos efeitos estéricos e eletrônicos (XU et al., 2010). Sendo assim, a resolução cinética para o *rac*-**11a** e *rac*-**12a** demonstraram que a atividade e a seletividade foram dependentes da posição do grupo substituinte no anel aromático (Tabelas 2.18-2.19). Através das Tabelas 2.18 e 2.19 pode ser observado que o átomo de bromo na posição *para* (*rac*-**12a**) apresentou uma melhor conversão e seletividade do que o átomo de bromo na posição *meta* (*rac*-**11a**) por irradiação micro-ondas (14 h) (Tabela 2.19). Portanto, o substrato com substituinte na posição *para* apresentou possivelmente uma melhor interação com o sítio ativo da enzima em comparação ao o mesmo grupo substituinte na posição *meta*.

Tabela 2.19 - Resolução enzimática do (±)-1-(4-bromofenil)-2,2,2-trifluoroetanol **12a** em agitador orbital e irradiação micro-ondas com a lipase de *C. antarctica*.

Time (h)	c (%) 12a	c (%) 12b	ee (%) 12a	ee (%) 12b	[ca] 12b	E
Agitador orbital						
2	95	5	4	99	[S]	-
4	94	6	6	99	[S]	-
24	65	35	42	99	[S]	-
48	51(20) ^a	49(21) ^b	72	99	[S]	>200
Irradiação micro-ondas						
1	88	12	12	99	[S]	-
3	75	25	27	99	[S]	-
6	65	35	43	99	[S]	-
9	57	43	57	99	[S]	-
12	54	46	66	98	[S]	-
14	51	49	70	98	[S]	>200

^aRendimento isolado após purificação por cromatografia em coluna para o (R)-1-(4-bromofenil)-2,2,2-trifluoroetanol **12a** (20%, ee = 72%).

^bRendimento isolado após purificação por cromatografia em coluna para o (S)-acetato de 1-(4-bromofenil)-2,2,2-trifluoroetila **12b** (21%, ee > 99%).

c = concentração do álcool remanescente **12a** determinada por GC-FID.

c = conversão do acetato **12b** determinada por GC-FID.

[ca] = configuração absoluta.

E = razão enantiomérica.

ee = excesso enantiomérico.

A configuração absoluta do (±)-1-(4-bromofenil)-2,2,2-trifluoroetanol **12a** obtido por resolução quimioenzimática foi determinada por comparação do sinal da medida de rotação óptica com a literatura (O'SHEA et al., 2009). O valor da rotação experimental para o (R)-1-(4-bromofenil)-2,2,2-trifluoroetanol **12a** foi de $[\alpha]_D^{32} -16,89$ (c 0,012; EtOH; ee 72%) e o valor encontrado na literatura foi de $[\alpha]_D^{20} -27,5$ (c 1,06; EtOH) (O'SHEA et al., 2009). Enquanto para o (S)-acetato de 1-(4-bromofenil)-2,2,2-trifluoroetila **12b** o valor da rotação experimental foi de $[\alpha]_D^{32} +78,41$ (c 0,011; CHCl₃; ee > 99%). Não foi encontrado na literatura uma referência de rotação óptica para o (S)-**12b**.

Nas Figuras 2.57 e 2.58 tem-se os cromatogramas da resolução enzimática da (±)-1-(4-bromofenil)-2,2,2-trifluoroetanol **12a** em agitação orbital após 48h de reação e por irradiação micro-ondas com 14 h.

É importante destacar que estes estudos referem-se às primeiras reações de resolução quimioenzimática de compostos organofluorados por CALB em agitador orbital e por irradiação micro-ondas (RIBEIRO et al., 2013).

Figura 2.57 - Cromatogramas obtidos por GC-FID para a resolução enzimática do ($\pm$)-1-(4-bromofenil)-2,2,2-trifluoroetanol **12a** pela lipase de *C. antarctica* por irradiação micro-ondas (80 °C, 200 W) em tolueno. (a) Padrão do ($\pm$)-1-(4-bromofenil)-2,2,2-trifluoroetanol **12a**. (b) Padrão do ($\pm$)-acetato de 1-(4-bromofenil)-2,2,2-trifluoroetila **12b**. (c) 14 h de reação.

Condições de análises em GC-FID: $T_i = 100\text{ }^{\circ}\text{C}$ (1 min), $T_f = 170\text{ }^{\circ}\text{C}$ (15 min), $r = 3\text{ }^{\circ}\text{C/min}$, $t_c = 38,33$ min. Coluna quiral CP-7500 CP-Cyclodextrin- β -2,3,6-M19 (25 m $\times$ 0,25 $\times$ 0,25 μm).

Figura 2.58 - Cromatogramas obtidos por GC-FID para a resolução enzimática do ($\pm$)-1-(4-bromofenil)-2,2,2-trifluoroetanol **12a** pela lipase de *C. antarctica* em agitador orbital (32 °C, 130 rpm) e em tolueno. (a) Padrão do ($\pm$)-1-(4-bromofenil)-2,2,2-trifluoroetanol **12a**. (b) Padrão do ($\pm$)-acetato de 1-(4-bromofenil)-2,2,2-trifluoroetila **12b**. (c) 48 h de reação.

Condições de análises em GC-FID: $T_i = 100\text{ }^{\circ}\text{C}$ (1 min), $T_f = 170\text{ }^{\circ}\text{C}$ (15 min), $r = 3\text{ }^{\circ}\text{C/min}$, $t_c = 38,33$ min. Coluna quiral CP-7500 CP-Cyclodextrin- β -2,3,6-M19 (25 m x 0,25 x 0,25 μm).

a) Caracterização do ($\pm$)-1-(4-bromofenil)-2,2,2-trifluoroetanol **12a**

No espectro de absorção na região de infravermelho do álcool **12a** foi observada uma banda característica da vibração de deformação axial da ligação O-H (3398 cm^{-1}). Além de bandas referentes às vibrações de deformação axial das ligações C-F (1267 cm^{-1}), uma banda atribuída à vibração de deformação axial da ligação C-O-H do álcool secundário (1130 cm^{-1}) e uma banda atribuída à vibração de deformação angular da ligação C-O-H do álcool secundário (1267 cm^{-1}), uma banda em 848 cm^{-1} referente as ligações C-H do anel aromático *para*-substituído (SILVERSTEIN, 2006) (Figura 2.59).

No espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) foi observado um dubleto em δ_{H} 7,52 (d, $J = 8,0\text{ Hz}$, 2H), referente aos hidrogênios (Hb e Hc), um dubleto em δ_{H} 7,32 (d, $J = 8,0\text{ Hz}$, 2H), referente aos hidrogênios (Ha e Hd). Um quarteto em δ_{H} 4,95

(q, $J_{H-F} = 4,0$ Hz, 1H), referente ao hidrogênio da ligação (C-H). Um singlete em δ_H 3,14 (s, 1H), referente ao hidrogênio da hidroxila (PAVIA, 2010) (Figura 2.60).

O espectro de massas de alta resolução foi obtido no modo negativo e apresentou o pico do íon molecular m/z 252,94844, correspondente ao composto **12a** $[M - H^+]$ cujo valor calculado foi m/z 252,94759 (Figura 2.61).

Figura 2.59 - Espectro de absorção na região de infravermelho (cm^{-1}) para o ($\pm$)-1-(4-bromofenil)-2,2,2-trifluoroetanol **12a**.

Figura 2.60 - Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) para o ($\pm$)-1-(4-bromofenil)-2,2,2-trifluoroetanol **12a**.

Figura 2.61 - Espectro de massas de alta resolução para o ($\pm$)-1-(4-bromofenil)-2,2,2-trifluoroetanol **12a**.

b) Caracterização do (±)-acetato de 1-(4-bromofenil)-2,2,2-trifluoroetila 12b

No espectro de infravermelho do acetato **12b** foi observado uma banda em 1763 cm^{-1} , correspondente ao estiramento (C=O) de éster, bandas de absorção na faixa de $1300\text{-}1000\text{ cm}^{-1}$, referente ao estiramento C-O, bandas referentes às vibrações de deformação axial das ligações C-F em 1217 cm^{-1} e uma banda em 812 cm^{-1} referente às ligações C-H do anel aromático *para*-substituído (PAVIA, 2010) (Figura 2.62).

No espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) foi observado um dubleto em $\delta_{\text{H}} 7,56$ (d, $J = 8,0\text{ Hz}$, 2H), referente ao hidrogênio (Hb e Hc), um dubleto em $\delta_{\text{H}} 7,35$ (d, $J = 8,0\text{ Hz}$, 2H), referente ao hidrogênio (Ha e Hd), um quarteto em $\delta_{\text{H}} 6,08$ (q, $J_{\text{H-F}} = 6,8\text{ Hz}$, 1H), referente ao hidrogênio da ligação (C-H) ligada ao átomo de hidrogênio. Um singlete em $\delta_{\text{H}} 2,20$ (s, 3H), referente aos hidrogênios da metila ligada ao éster (PAVIA, 2010) (Figura 2.63).

O espectro de RMN de ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) do composto **12b** apresentou um sinal em $\delta_{\text{C}} 168,5$ referente ao carbono sp^2 da carbonila de éster. Sinais referentes aos carbonos sp^2 do anel aromático em δ_{C} : 132,0; 130,2; 129,7; 124,3. Um quarteto em $\delta_{\text{C}} 122,8$ (q, $J_{\text{C-F}} = 279,2\text{ Hz}$), referente ao carbono sp^3 ligado diretamente ao grupo CF_3 , um quarteto em $\delta_{\text{C}} 71,3$ (q, $J_{\text{C-F}} = 33,0\text{ Hz}$), referente ao carbono sp^3 da ligação (C-O) e um sinal em $\delta_{\text{C}} 20,5$ referente ao carbono sp^3 da metila (PAVIA, 2010) (Figura 2.64).

O espectro de RMN de ^{19}F (470 MHz, CDCl_3) apresentou um dubleto com δ_{F} : -76,09 (d, $J_{\text{F-H}} = 4,7\text{ Hz}$) (Figura 2.65).

Figura 2.62 - Espectro de absorção na região de infravermelho (cm^{-1}) para o ($\pm$)-acetato de 1-(4-bromofenil)-2,2,2-trifluoroetila **12b**.

Figura 2.63 - Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) para o ($\pm$)-acetato de 1-(4-bromofenil)-2,2,2-trifluoroetila **12b**.

Figura 2.64 - Espectro de RMN de ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) para o ($\pm$)-acetato de 1-(4-bromofenil)-2,2,2-trifluoroetila **12b**.

Figura 2.65 - Espectro de RMN de ^{19}F (470 MHz, CDCl_3) para o ($\pm$)-acetato de 1-(4-bromofenil)-2,2,2-trifluoroetila **12b**.

2.9.2.5 Resolução enzimática do ($\pm$)-1-(2-trifluorometil)feniletanol **13a**

A resolução enzimática do ($\pm$)-1-(2-trifluorometil)feniletanol **13a** com a lipase de *C. antarctica* foi avaliada em agitador orbital e por irradiação micro-ondas em tolueno. A reação em agitador orbital forneceu baixos valores de conversão na resolução do *rac*-**13a** onde foi obtido o (*S*)-álcool **13a** ($c = 88\%$, $ee = 10\%$) e o (*R*)-acetato **13b** ($c = 12\%$) com 192 h de reação. Por irradiação micro-ondas após 8 h de reação foi possível obter o (*S*)-álcool **13a** ($c = 85\%$, $ee = 11\%$) e o (*R*)-acetato **13b** ($c = 15\%$) também com baixa eficiência (Tabela 2.20).

Tabela 2.20 - Resolução enzimática do ($\pm$)-1-(2-trifluorometil)feniletanol **13a** em agitador orbital e irradiação micro-ondas com a lipase de *C. antarctica*.

Time (h)	c (%) 13a	c (%) 13b	ee (%) 13b	[ca] 13b
Agitador orbital				
2	100	-	>99	[S]
4	100	-	>99	[S]
24	98	2	>99	[S]
48	95	5	>99	[S]
72	93	7	>99	[S]
144	90	10	>99	[S]
168	89	11	>99	[S]
192	88	12	>99	[S]
Irradiação micro-ondas				
1	98	2	>99	[S]
3	95	5	>99	[S]
6	91	9	>99	[S]
8	85	15	>99	[S]

c = concentração do álcool remanescente **12a** determinada por GC-FID.

c = conversão do acetato **12b** determinada por GC-FID.

[ca] = configuração absoluta.

ee = excesso enantiomérico.

Neste estudo observou-se uma baixa conversão na reação de acetilação para o *rac*-**13a**, possivelmente devido à presença do grupo substituinte trifluorometano que se encontra na posição *orto* dificultando o acesso do substrato ao sítio catalítico da lipase. Na literatura também é descrito que a acetilação enzimática de álcoois derivados do feniletanol com substituintes na posição *orto* é dificultada. O grupo CF₃

na posição *orto* em conformação *trans* possui uma barreira energética que impede a sua livre rotação afetando o perfeito encaixe deste substrato no sítio catalítico (Figura 2.66) (HOFF; SUNDBY, 2013).

Figura 2.66 - Conformação de etanonas fluoradas.

Os cromatogramas da resolução enzimática do ($\pm$)-1-(2-trifluorometil)feniletanol **13a** encontram-se nas Figuras 2.67 e 2.68. Neste caso não foi realizada a purificação dos enantiômeros, devido os baixos valores de conversão do composto **13a**. O valor da rotação na literatura para o (*S*)-álcool **13a** foi de $[\alpha]_D^{20} -35,4$ (*c* 0,7; MeOH; *ee* 74%) (MARTINS et al., 2009), enquanto para o (*R*)-acetato **13b** o valor da rotação da literatura foi de $[\alpha]_D^{25} +48,5$ (CHCl₃; *ee* 62%) (NAEMURA et al., 1996).

Figura 2.67 - Cromatogramas obtidos por GC-FID da resolução enzimática do ($\pm$)-1-(2-trifluorometil)feniletanol **13a** pela lipase de *C. antarctica* em agitador orbital em tolueno. (a) Padrão do ($\pm$)-1-(2-trifluorometil)feniletanol **13a**. (b) Padrão do ($\pm$)-acetato de 1-(2-trifluorometil)feniletila **13b**. (c) 192 h de reação.

Condições de análises em GC-FID: $T_i = 60\text{ }^{\circ}\text{C}$, $T_{fi} = 140\text{ }^{\circ}\text{C}$ (2 min), $r = 3\text{ }^{\circ}\text{C/min}$, $t_c = 28,67\text{ min}$. Coluna quiral CP-7500 CP-Cyclodextrin- β -2,3,6-M19 (25 m x 0,25 x 0,25 μm).

Figura 2.68 - Cromatogramas obtidos por GC-FID da resolução enzimática do ($\pm$)-1-(2-trifluorometil)feniletanol **13a** pela lipase de *C. antarctica* por irradiação micro-ondas em tolueno. (a) Padrão do ($\pm$)-1-(2-trifluorometil)feniletanol **13a**. (b) Padrão do ($\pm$)-acetato de 1-(2-trifluorometil)feniletila **13b**. (c) 8 h de reação.

Condições de análises em GC-FID: $T_i = 60\text{ }^{\circ}\text{C}$, $T_{fi} = 140\text{ }^{\circ}\text{C}$ (2 min), $r = 3\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$, $t_c = 28,67\text{ min}$. Coluna quiral CP-7500 CP-Cyclodextrin- β -2,3,6-M19 (25 m x 0,25 x 0,25 μm).

a) Caracterização do composto ($\pm$)-1-(2-trifluorometil)feniletanol **13a**

No espectro de absorção na região de infravermelho do composto **13a** foi obtida uma banda larga característica de vibrações de deformação axial das ligação O-H (3350 cm^{-1}), além de bandas de forte absorção referentes às vibrações de deformação axial das ligações C-F ($1250\text{--}1100\text{ cm}^{-1}$), uma banda atribuída à vibração de deformação angular de ligação C-O-H de álcool secundário (1000 cm^{-1}) e uma banda atribuída à vibração de deformação axial de ligação C-O-H de álcool secundário (1260 cm^{-1}) e uma banda em 770 cm^{-1} referentes às ligações C-H de anel aromático *orto*-substituído (SILVERSTEIN, 2006) (Figura 2.69).

No espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) foi observado dois dubletos um em $\delta_{\text{H}} 7,82$ (d, $J = 8,0\text{ Hz}$, 1H), referente ao hidrogênio (Hd) do anel aromático e um outro em $\delta_{\text{H}} 7,61$ (d, $J = 8,0\text{ Hz}$, 1H), referente ao hidrogênio (Ha). Dois tripletos um em $\delta_{\text{H}} 7,59$ (t, $J = 6,0\text{ Hz}$, 1H), referente ao hidrogênio (Hb) e um outro em $\delta_{\text{H}} 7,37$

(t, $J = 6,0$ Hz, 1H), referente ao hidrogênio (Hc). Um quarteto em δ_H 5,33 (q, $J = 6,8$ Hz, 1H), referente ao hidrogênio da ligação (C-H) com acoplamento com o flúor, um singleto largo referente ao hidrogênio da hidroxila em δ_H 2,22 (sl, 1H) e um dubleto em δ_H 1,48 (d, $J = 8,0$ Hz, 3H), referente aos hidrogênios da metila (Figura 2.70).

O espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) do composto **13a** apresentou quatro linhas espectrais em δ_C : 145,0; 132,3; 127,3; 127,1 referentes aos carbonos sp^2 do anel aromático. Um quarteto em δ_C 126,5 (q, $J_{\text{C-F}} = 30,0$ Hz), referente ao carbono sp^2 diretamente ligado ao grupo CF_3 . Dois quartetos um em δ_C 124,4 (q, $J_{\text{C-F}} = 272,0$ Hz), referente ao carbono sp^3 do grupo trifluorometil e um outro em δ_C 125,3 (q, $J_{\text{C-F}} = 6,0$ Hz), referente ao acoplamento do carbono sp^2 , via três ligações, do ^{13}C ao ^{19}F . Um quarteto em δ_C 65,6 (q, $J_{\text{C-F}} = 2,8$ Hz), referente ao carbono sp^3 da ligação (C-O) e uma linha espectral em δ_C 25,4 referente ao carbono sp^3 da metila (PAVIA, 2010) (Figura 2.71).

O espectro de RMN de ^{19}F (470 MHz, CDCl_3) apresentou um singleto com δ_F -58.36 (Figura 2.72). O espectro de massas de alta resolução foi obtido no modo negativo e apresentou o pico do íon molecular m/z 189,05327, correspondente ao composto **13a** $[\text{M} - \text{H}^+]$ cujo valor calculado foi m/z 189,05272 (Figura 2.73).

Figura 2.69 - Espectro de absorção na região de infravermelho (cm^{-1}) para o ($\pm$)-1-(2-trifluorometil)feniletanol **13a**.

Figura 2.70 - Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) para o ($\pm$)-1-(2-trifluorometil)feniletanol **13a**. Figura 2.71 - Espectro de RMN de ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) para o ($\pm$)-1-(2-trifluorometil)feniletanol **13a**.

Figura 2.71a - Espectro ampliado de RMN de ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) para o ($\pm$)-1-(2-trifluorometil)feniletanol **13a**.

Figura 2.72 - Espectro de RMN de ^{19}F (470 MHz, CDCl_3) para o ($\pm$)-1-(2-trifluorometil)feniletanol **13a**. **Figura 2.73** - Espectro de massas de alta resolução para o ($\pm$)-1-(2-trifluorometil)feniletanol **13a**.

b) Caracterização do (±)-acetato de 1-(2-trifluorometil)feniletila 13b

No espectro de infravermelho do composto **13b** foi observado uma banda de forte intensidade em 1751 cm^{-1} , correspondente ao estiramento da carbonila do éster, bandas de absorção na faixa de $1300\text{-}1000\text{ cm}^{-1}$, referentes ao estiramento C-O, bandas referentes às vibrações de deformação axial das ligações C-F (1240 cm^{-1}), uma banda em 772 cm^{-1} referente a deformação angular fora do plano do anel aromático *orto*-substituído (PAVIA, 2010) (Figura 2.74).

No espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) foi observado dois dubletos um em $\delta_{\text{H}} 7,67$ (d, $J = 8,0\text{ Hz}$, 1H), referente ao hidrogênio (Hd) e o outro em $\delta_{\text{H}} 7,64$ (d, $J = 8,0\text{ Hz}$, 1H), referente ao hidrogênio (Ha). Dois tripletos um em $\delta_{\text{H}} 7,58$ (t, $J = 8,0\text{ Hz}$, 1H), referente ao hidrogênio (Hb) e o outro em $\delta_{\text{H}} 7,39$ (t, $J = 8,0\text{ Hz}$, 1H), referente ao hidrogênio (Hc). Um quarteto em $\delta_{\text{H}} 6,24$ (q, $J = 6,8\text{ Hz}$, 1H), referente ao hidrogênio da ligação (C-H) ligado ao carbono carbinólico, um singlete em $\delta_{\text{H}} 2,08$ (s, 3H), referente aos hidrogênios da metila e um dubleto em $\delta_{\text{H}} 1,54$ (d, $J = 8,0\text{ Hz}$, 3H), referente aos hidrogênios da metila do éster (Figura 2.75).

O espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) do composto **13b** apresentou um sinal em $\delta_{\text{C}} 169,8$ referente ao carbono da carbonila, três quartetos em δ_{C} : $141,2$ (q, $J_{\text{C-F}} = 1,7\text{ Hz}$), $132,2$ (q, $J_{\text{C-F}} = 1,0\text{ Hz}$) e $125,6$ (q, $J_{\text{C-F}} = 5,5\text{ Hz}$), referentes aos carbonos do anel aromático via três ligações do acoplamento ^{13}C ao ^{19}F , como também dois outros sinais em $\delta_{\text{C}} 127,7$ e $\delta_{\text{C}} 127,1$ referentes aos carbonos aromáticos. Foi observado um quarteto em $\delta_{\text{C}} 126,9$ (q, $J_{\text{C-F}} = 30,0\text{ Hz}$), referente ao carbono sp^2 diretamente ligado ao grupo CF_3 . Um quarteto em $\delta_{\text{C}} 124,1$ (q, $J_{\text{C-F}} = 273,0\text{ Hz}$), referente ao carbono sp^3 do grupo trifluorometila e outro carbono em $\delta_{\text{C}} 68,4$ (q, $J_{\text{C-F}} = 5,0\text{ Hz}$), referente ao carbono sp^3 da ligação (C-O) e duas linhas espectrais em $\delta_{\text{C}} 23,0$ e $21,2$ referentes aos carbonos sp^3 das metilas (PAVIA, 2010) (Figura 2.76).

O espectro de RMN de ^{19}F (470 MHz, CDCl_3) apresentou um singlete com $\delta_{\text{F}} -58.83$ (Figura 2.77). O espectro de massas de alta resolução foi obtido no modo positivo e apresentou o pico do íon molecular de $m/z 255,05939$, correspondente ao composto **13b** $[\text{M} + \text{Na}^+]$ cujo valor calculado foi $m/z 255,06088$ (Figura 2.78).

Figura 2.74 - Espectro de absorção na região de infravermelho (cm^{-1}) para o ($\pm$)-acetato de 1-(2-trifluorometil)feniletila **13b**.

Figura 2.75 - Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) para o ($\pm$)-acetato de 1-(2-trifluorometil)feniletila **13b**.

Figura 2.76 - Espectro de RMN de ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) para o ($\pm$)-acetato de 1-(2-trifluorometil)feniletila **13b**.

Figura 2.76a - Espectro ampliado de RMN de ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) para o ($\pm$)-acetato de 1-(2-trifluorometil)feniletila **13b**.

Figura 2.76b - Espectro ampliado de RMN de ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) para o ($\pm$)-acetato de 1-(2-trifluorometil)feniletila **13b**.

Figura 2.77 - Espectro de RMN de ^{19}F (470 MHz, CDCl_3) para o ($\pm$)-acetato de 1-(2-trifluorometil)feniletila **13b**.

Figura 2.78 - Espectro de massas de alta resolução para o ($\pm$)-acetato de 1-(2-trifluorometil)feniletila **13b**.

Nas Tabelas 2.21 e 2.22 têm-se um resumo de todas as reações de resolução realizadas pela lipase de *Candida antarctica* em agitador orbital e por irradiação micro-ondas, com seus valores de conversão, excesso enantiomérico, razão enantiomérica e valores de rotação específica experimental comparados com a literatura.

Tabela 2.21 - Resolução enzimática dos compostos **1a-13a** em agitador orbital (A.O.) e por irradiação micro-ondas (M.O.) em solvente tolueno com a lipase de *C. antarctica*.

Substrato	Técnica	Tempo (h)	c (%) a	c (%) b	ee (%) b	[ca] 1b	E _R
1a	A.O.	184	51(15) ^a	49(25) ^a	>98	[S]	164
	M.O.	8	60(8) ^b	40(35) ^b	92	[S]	71
2a	A.O.	48	42	58	94	[S]	-
	M.O.	5	47(50) ^b	53(30) ^b	90	[S]	48
3a	A.O.	48	34	32	28	[S]	-
	M.O.	5	34	17	59	[S]	-
4a	A.O.	48	82	18	25	[S]	-
	M.O.	-	-	-	-	-	-
5a	A.O.	24	5	55	97	[S]	>200
	M.O.	4	4 (49) ^b	50 (65) ^b	92	[S]	70
6a	A.O.	48	39	61	93	[S]	-
	M.O.	3	44(22) ^b	56(70) ^b	90	[S]	41
7a	A.O.	96	39	61	81	[S]	-
	M.O.	6	50(67) ^b	50(83) ^b	84	[S]	30
8a	A.O.	48	40(51) ^a	60(39) ^a	80	[S]	-
	M.O.	3	41	59	74	[S]	21
9a	A.O.	168	51(28) ^a	49(18) ^a	>99	[S]	>200
	M.O.	5	95	5	>99	[S]	-
10a	A.O.	48	50(33) ^a	50(19) ^a	99	[R]	>200
	M.O.	8	50	50	99	[R]	>200
11a	A.O.	144	49(36) ^a	51(34) ^a	82	[S]	<20
	M.O.	14	58	42	78	[S]	<20
12a	A.O.	48	51(20) ^a	49(21) ^a	99	[S]	>200
	M.O.	14	51	49	98	[S]	>200
13a	A.O.	192	88	12	>99	[S]	-
	M.O.	8	85	15	>99	[S]	-

^aRendimento isolado após purificação por cromatografia em coluna em agitador orbital.

^bRendimento isolado após purificação por cromatografia em coluna por irradiação micro-ondas.

c = concentração do álcool remanescente determinada por GC-FID.

c = conversão do acetato determinada por GC-FID.

[ca] = configuração absoluta.

E_R = razão enantiomérica da reação.

ee = excesso enantiomérico.

Tabela 2.22 - Dados de rotação óptica dos álcoois **1a-13a** e acetatos **1b-13b**.

Compostos	$[\alpha]_D^{T_D}$ Rotação óptica experimental	$[\alpha]_D^{T_D}$ Rotação óptica da literatura	Referência
1a	$[\alpha]_D^{20} +19,1$ (c 1,15; CHCl ₃ ; ee > 51%)	$[\alpha]_D^{20} +40,6$ (c 1,0; CHCl ₃ ; ee 92%)	Ognyanov et al., 1991
1b	$[\alpha]_D^{20} -3,95$ (c 0,82; CHCl ₃ ; ee 98%)	$[\alpha]_D^{20} -5,6$ (c 0,58; CHCl ₃ ; ee 98,3%)	Xu et al., 2008
2a	$[\alpha]_D^{26} +2,6$ (c 0,016; CHCl ₃ ; ee > 99%)	$[\alpha]_D^{26} +6,4$ (c 0,01; CHCl ₃ ; ee 85%)	Zheng-chang & Chinpiao, 2010
2b	$[\alpha]_D^{26} +3,90$ (c 0,011; CHCl ₃ ; ee 90%)	$[\alpha]_D^{20} +8,26$ (c 0,58; CHCl ₃ ; ee 96%)	Xu et al., 2010
3a	-	$[\alpha]_D^{26} +12,4$ (c 0,018; MeOH)	Matthews et al., 1988
3b	-	$[\alpha]_D^{20} +8,4$ (c 0,01; CHCl ₃ ; ee 91%)	Zhang et al., 2010
4a	$[\alpha]_D^{23} +21,4$ (c 0,021; CHCl ₃ ; ee 88%)	$[\alpha]_D^{25} +23,5$ (c 0,26; CHCl ₃ ; ee 71%)	Zeng et al., 2007
4b	$[\alpha]_D^{23} -6,7$ (c 0,012; CHCl ₃ ; ee 92%)	$[\alpha]_D^{26} -1,98$ (c 1,01; CHCl ₃ ; ee 92%)	Sakai et al., 2008
5a	$[\alpha]_D^{23} +21,4$ (c 0,021; CHCl ₃ ; ee 88%)	$[\alpha]_D^{25} +23,5$ (c 0,26; CHCl ₃ ; ee 71%)	Zeng et al., 2007
5b	$[\alpha]_D^{23} -6,7$ (c 0,012; CHCl ₃ ; ee 92%)	$[\alpha]_D^{26} -1,98$ (c 1,01; CHCl ₃ ; ee 92%)	Sakai et al., 2008
6a	$[\alpha]_D^{23} +0,02$ (c 0,005; CHCl ₃ ; ee 73%)	$[\alpha]_D^{20} +9,8$ (c 1,22; CHCl ₃ ; ee 19%)	Tang & Zang, 2011
6b	$[\alpha]_D^{23} -0,08$ (c 0,015; CHCl ₃ ; ee 90%)	$[\alpha]_D^{24} -3,1$ (c 1,10; CH ₂ Cl ₂)	Lee & Chen, 2005
7a	$[\alpha]_D^{23} +0,02$ (c 0,005; CHCl ₃ ; ee 73%);	$[\alpha]_D^{25} +12,9$ (c 0,01; CHCl ₃)	Casas et al., 2004
7b	$[\alpha]_D^{23} -0,08$ (c 0,015; CHCl ₃ ; ee 90%)	$[\alpha]_D^{25} -7,02$ (c 0,01; CHCl ₃)	Zhang et al., 2010
8a	$[\alpha]_D^{24} -11$ (c 0,012; CHCl ₃ ; ee 91%)	$[\alpha]_D^{25} -28,1$ (c 0,001; CHCl ₃)	Zeng et al., 2007
8b	$[\alpha]_D^{24} +37,41$ (c 0,015; CHCl ₃ ; ee 79%)	$[\alpha]_D^{25} +14,4$ (c 0,011; CHCl ₃)	Steele et al., 2006
9a	$[\alpha]_D^{26} -1,77$ (c 0,124; CHCl ₃ ; ee 62%)	$[\alpha]_D^{25} -20,41$ (c 0,48; CHCl ₃ ; ee = 68%)	Xu et al., 2009
9b	$[\alpha]_D^{26} +3,90$ (c 0,023; CHCl ₃ ; ee > 99%)	-	-
10a	$[\alpha]_D^{26} -1,825$ (c 1,654; CHCl ₃ ; ee > 99%)	$[\alpha]_D^{20} -29,9$ (c 0,005; CHCl ₃)	Yu et al., 2011
10b	$[\alpha]_D^{26} +12,02$ (c 0,937; CHCl ₃ ; ee > 99%)	-	-
11a	$[\alpha]_D^{25} -13,26$ (c 0,021; CHCl ₃ ; ee > 61%)	$[\alpha]_D^{25} -25,1$ (c 2,49; EtOH)	Ohno et al., 1979
11b	$[\alpha]_D^{25} +178,1$ (c 0,015; CHCl ₃ ; ee = 82%)	-	-

12a	$[\alpha]_D^{32} -16,89$ (c 0,012; EtOH; <i>ee</i> 72%)	$[\alpha]_D^{20} -27,5$ (c 1,06; EtOH)	O'shea et al., 2009
12b	$[\alpha]_D^{32} +78,41$ (c 0,011; CHCl ₃ ; <i>ee</i> >99%)	-	-
13a	-	$[\alpha]_D^{20} -35,4$ (c 0,7; MeOH; <i>ee</i> 74%)	Martins et al., 2009
13b	-	$[\alpha]_D^{25} +48,5$ (CHCl ₃ ; <i>ee</i> 62%)	Naemura et al., 1996

2.10 CONCLUSÃO

As resoluções quimioenzimáticas das ciano-hidrinas **1a-8a** e dos compostos fluorados racêmicos **9a-13a** foram realizadas com sucesso pela lipase de *Candida antarctica* utilizando agitador orbital e irradiação micro-ondas, obtendo-se excelentes conversões e excessos enantioméricos para a maioria dos compostos avaliados.

Em geral a técnica de irradiação micro-ondas apresentou menores tempos de reação, maiores conversões e enantiosseletividades quando comparada às condições convencionais (agitador orbital), comprovando ser uma eficiente metodologia para resolução enzimática de álcoois racêmicos. Em agitador orbital obteve-se excelentes conversões e enantiosseletividades dos compostos, porém, sendo necessário um maior tempo de reação quando comparado à irradiação micro-ondas.

Nesse estudo foi possível constatar que a atividade e a seletividade da lipase é influenciada pela posição dos grupos substituídos no anel aromático. Onde os compostos cianídricos e fluorados foram bem resolvidos pela CALB, principalmente para os substituintes na posição *para* do anel aromático, sejam doadores ou captadores de elétrons. Finalmente, as enzimas podem ser aplicadas em reações biocatalíticas tanto em meios com aquecimento convencional quanto por irradiação micro-ondas.

3. Biorredução de compostos organofluorados pelo fungo de origem marinha *Mucor racemosus* e por bactérias termofílicas

Capítulo

3

Esse estudo foi desenvolvimento na última etapa do doutorado não possibilitando fazer uma triagem com vários micro-organismos e diferentes substratos. Para nosso conhecimento não existe descrito na literatura reações de biocatálise em micro-ondas por células microbianas.

3.1 Redução de cetonas por micro-organismos

A redução enantiosseletiva de grupos carbonílicos é uma importante metodologia para obtenção de álcoois secundários quirais que desempenham um papel crucial nas indústrias químicas, farmacêuticas e agroquímicas (NI; XU, 2012; LOUGHLIN, 2000).

Reduções biocatalíticas de grupos carbonílicos podem ser realizadas com enzimas isoladas ou células inteiras de micro-organismos através das oxidorredutases, enzimas intracelulares presentes em diversas vias metabólicas de uma variedade de micro-organismos, animais e vegetais. As oxidorredutases catalisam diferentes tipos de reações de oxidação e redução, por meio de reações envolvendo a transferência de elétrons, átomos de hidrogênio na forma de íon hidreto ou oxigênio molecular (LEHNINGER, 1976).

Todas as oxirredutases necessitam de cofatores como as coenzimas (NADH ou NADPH) ou derivados de vitaminas (flavina, tiamina, niacina e ácido ascórbico) e/ou íons metálicos (Na^+ , K^+ , Mg^{2+} etc.) para exercer sua atividade catalítica. Os íons metálicos podem atuar como ácidos de Lewis ativando substratos ou estabilizando os sítios catalíticos (GRUNWALD, 2009).

As oxidorreduções estão classificadas em três categorias: *desidrogenases*, *oxigenases* e *oxidases*. Dentre elas, as *desidrogenases* têm sido bastante utilizadas na redução de grupos carbonílicos de aldeídos e cetonas, devido à formação de produtos de valor agregado como na síntese de álcoois quirais enantiopuros. As reações de redução geralmente ocorrem com a formação de centro estereogênico através da dessimetrização de moléculas ou compostos carbonílicos proquirais (Esquema 3.1) (FABER, 2004).

Esquema 3.1 - Reação de redução catalisada por desidrogenases.

$R_1 \neq R_2$ = grupos substituinte e H.

Do ponto de vista biotecnológico as desidrogenases são as enzimas que produzem compostos quirais de maior valor agregado, principalmente por poderem ser empregadas na síntese de aminoácidos, hidroxíácidos e álcoois. Pode-se citar como exemplo a síntese do *Aspartame* um importante produto da indústria de bebidas não alcoólicas, utilizado como edulcorante artificial em refrigerantes gasosos. Como matéria prima para produção industrial de *Aspartame* utiliza-se a L-fenilalanina e ácido L-aspártico, ambos produtos provenientes da indústria microbiológica. A desidrogenase mais frequentemente utilizada para produção da L-fenilalanina é enzima de cepas da bactéria *Bacillus megaterium* que requer o NADH como coenzima (Esquema 3.2) (GRUNWALD, 2009; NAKAMURA et al., 2003; SATO, 2001).

Esquema 3.2 - Produção do *Aspartame* produzido a partir de enzimas ou células microbianas imobilizadas.

A estereoquímica da conversão de uma cetona proquiral para um álcool é governada pelo “tamanho” ou “volume” dos seus grupos substituintes nomeados de R e R' na cetona, podendo ocorrer quatro possibilidades quanto a transferência do íon hidreto ao grupo carbonílico levando ao produto de configuração (S)- ou (R) de acordo com a regra de prioridade de Cahn-Ingold-Prelog (Figura 3.1) (VASSE et al., 2001; GRUNWALD, 2009).

Figura 3.1 - Transferência de um íon hidreto da coenzima NADPH para um composto carbonílico. R = grupo pequeno (CH₃, CF₃). R' = grupo grande (Ph, *m*-Ph).

(E1, E2, E3 e E4 são diferentes tipos de enzimas)

Fonte: MATSUDA, 2009, p. 513-557.

O ataque do íon hidreto poderá ocorrer pela *face si* ou pela *face re* do grupo carbonílico, dependendo da ligação e orientação do substrato com a enzima, que resulta na formação de (R) e (S)-álcoois, respectivamente. Por outro lado, a enzima

poderá transferir tanto o íon hidreto pro-(*R*) como pro-(*S*) da coenzima dependendo do tipo de álcool-desidrogenase (ADH) (MATSUDA, 2009).

Reações de biotransformação utilizando micro-organismos e/ou enzimas isoladas, é cada vez mais explorado, tanto em laboratórios de síntese industrial quanto em institutos de pesquisas acadêmicos. Além disso, a busca por novos biocatalisadores é cada vez mais acentuada, principalmente compostos fluorados quirais devido as suas propriedades físico-químicas relacionadas à atividade biológica, estabilidade e lipofilicidade (CAO et al., 2013).

O átomo de flúor desempenha um papel importante na produção de compostos farmacêuticos e agroquímicos. Aproximadamente 20% dos produtos farmacêuticos no mercado contêm o átomo flúor, sendo que a maioria dos medicamentos conhecidos contêm o grupo trifluorometílico ou grupos aromáticos substituídos com átomos de flúor (EMA et al., 2010). Podem ser citados como exemplo o *Voriconazole* (Pfizer) um antifúngico indicado para o tratamento de infecções invasivas graves causadas por fungos; o *Crizotinib* (Pfizer) um inibidor da quinase utilizada no tratamento de câncer pulmonar e o *Odanacatib* (Merck) uma substância utilizada no tratamento da osteoporose (Figura 3.2) (EMA et al., 2010; HOFF; SUNDBY, 2013).

Figura 3.2 - Compostos bioativos de importância farmacológica que contêm átomos de flúor.

Neste contexto, devido à importância desses biocatalisadores, a procura por micro-organismos capazes de catalisar reações de biorredução de compostos organofluorados são de interesse industrial e biotecnológico. Por exemplo, a empresa

MercK emprega as enzimas ADHs de *Rhodococcus erythropolis* para reduzir a 3,5-di(trifluorometil)acetofenona ao (S)-3,5-di(trifluorometil)-1-feniletanol, utilizando como cofator a glucose desidrogenase (GDH 103). O (S)-3,5-di(trifluorometil)-1-feniletanol é um importante precursor que é incorporado em uma série de antagonistas seletivos com alta afinidade pelos receptores NK1. Análogos ao medicamento *Fosaprepitant* (EMEND®), utilizado para prevenir náuseas e enjoos causados por quimioterápicos estão em fase de avaliação clínica e também podem ser sintetizados a partir de um álcool quiral (Esquema 3.3) (POLLARD et al., 2006).

Esquema 3.3 - Redução da 3,5-di(trifluorometil)acetofenona ao correspondente (S)-3,5-di(trifluorometil)-1-feniletanol pela bactéria *Rhodococcus erythropolis*.

Um outro estudo mostrou a biorredução da 3,5-di(trifluorometil)acetofenona pela bactéria *Chryseobacterium* sp. CA49, isolada do solo, que formou o correspondente (R)-3,5-di(trifluorometil)-1-feniletanol utilizado como precursor na síntese do fármaco *Aprepitant* (EMEND®) medicamento utilizado também para prevenir náuseas e enjoos. A reação foi realizada em 24 h à temperatura de 30 °C e 230 rpm, obtendo-se uma conversão de 97% e *ee* de 99% (Esquema 3.4) (LIU et al., 2014).

Esquema 3.4 - Redução da 3,5-di(trifluorometil)acetofenona pela bactéria *Chryseobacterium* sp. CA49.

Compostos aromáticos fluorados também estão presentes em produtos para agricultura como o 1-(3-trifluorometil)fenil)etanol, precursor do antifúngico MA-20565, utilizado como herbicida. O enantiômero (S)-álcool foi obtido com 98% de excesso enantiomérico utilizando enzimas álcool-desidrogenases do fungo *Candida parapsilios*, ao passo que o micro-organismo *Lactobacillus kefir* promoveu a conversão da 1-(3-(trifluorometil)fenil)etanona com excesso enantiomérico de 86% ao respectivo (R)-álcool (Esquema 3.5) (HOFF; SUNDBY, 2013).

Esquema 3.5 - Produção dos enantiômeros (S) e (R)-1-(3-trifluorometil)fenil)etanol pelo fungo *Candida parapsilios* e pela bactéria *Lactobacillus kefir*, respectivamente.

Enzimas álcool-desidrogenases presente nos gêneros *Candida*, *Hansenula*, *Pichia*, *Rhodotorula*, *Saccharomyces* e *Sphingomonas* catalisaram a redução da 1-(2-bromo-4-fluorofenil)etanona, produzindo o (S)-1-(2-bromo-4-fluorofenil)etanol e (S)-hidroxi éster, composto intermediário útil na síntese de produtos farmacêuticos. Em 24 horas e à temperatura de 28 °C e 250 rpm, o álcool quiral foi obtido com

rendimento >90% e *ee* >99%, com diversos micro-organismos (PATEL et al., 2004) (Esquema 3.6, Tabela 3.1).

Esquema 3.6 - Síntese do (S)-1-(2-bromo-4-fluorofenil)etanol por ADHs de diferentes micro-organismos.

Tabela 3.1 - Redução da 1-(2-bromo-4-fluorofenil)etanona por diferentes micro-organismos.

Biocatalisador	c (%) (S)-álcool	<i>ee</i> %	[c.a]
<i>Candida sonorensis</i> SC 16117	100	99,2	[S]
<i>Rhodotorula glutinis</i> SC 16267	100	99,9	[S]
<i>Hansenula polymorpha</i> SC 13824	100	99	[S]
<i>Nocardia salmonicolor</i> SC 6310	100	99,3	[S]
<i>Pichia anomala</i> SC 16142	100	99	[S]
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> SC 13902	93	99,9	[S]
<i>Sphingomonas paucimobilis</i> SC 16113	100	99	[S]

Enzimas presentes no extrato celular do fungo *Aureobasidium pullulans* SC 13848 catalisaram a redução assimétrica da acetoamida ao ácido (R)-3-flúor-4-(2-oxo-2-(5,5,8,8-tetrametil-5,6,7,8-tetraidronaftalen-2-il)acetoamido)benzoico um importante receptor antagonista gama do ácido retinóico, o qual é utilizado na formulação de fármacos dermatológicos. A reação foi realizada em 48 h, à temperatura de 28 °C, obtendo um excesso enantiomérico de 96% (Esquema 3.7) (PATEL et al., 2002).

Esquema 3.7 - Redução do ácido (R)-3-flúor-4-(2-oxo-2-(5,5,8,8-tetrametil-5,6,7,8-tetraidronaftalen-2-il)acetoamido)benzoico pelo extrato celular de *Aureobasidium pullulans* SC 13848.

O composto 1-(4-bromofenil)-2,2,2-trifluoroetanol é também um importante bloco de construção para preparação de compostos bioativos como o 2,2,2-trifluoroetanol biarílicos. O átomo de bromo como substituinte é usado como grupo reativo na síntese de compostos biarílicos, via reação de acoplamento de Suzuki. As células imobilizadas da *Geotrichum candidum* biorreduziram a cetona com elevada conversão >99% e excesso enantiomérico >96%. A reação foi realizada por 24 h, à temperatura de 30 °C e 150 rpm (Esquema 3.8) (LOPES et al., 2014).

Esquema 3.8 - Redução da 1-(4-bromofenil)-2,2,2-trifluoroetanona pelo extrato celular de *Geotrichum candidum*.

As enzimas álcool-desidrogenases isoladas do *Rhodococcus erythropolis* também catalizaram a redução da 1-(4-bromofenil)-2,2,2-trifluoroetanona ao enantiômero (*R*)-1-(4-bromofenil)-2,2,2-trifluoroetanol, utilizando como cofator a glucose desidrogenase (GDH 103), com 100% de conversão e excesso enantiomérico >99%, após 24 h de reação à temperatura de 30 °C e pH 6,8 (HUSSAIN et al., 2008).

Estes exemplos mostram o interesse em reações de biorredução para obtenção de álcoois organofluorados. A aplicação de células microbianas na síntese de compostos fluorados é pouco usual na literatura e tem grande potencial para serem exploradas em biocatálise.

3.2 OBJETIVOS

O objetivo deste trabalho foi reduzir cetonas fluoradas proquirais empregando o fungo de ambiente marinho *Mucor racemosus* e bactérias termofílicas isoladas de compostagem.

3.2.1 Objetivos específicos

Promover reações de biorredução da 2,2,2-trifluoro-1-feniletanona **9** utilizando o fungo do ambiente marinho *Mucor racemosus* CBMAI 847 utilizando a agitação orbitalar e por irradiação micro-ondas.

Promover reações de biorredução de cetonas proquirais fluorados utilizando as bactérias termofílicas (SPZSP005, SPZSP088, SPZSP051 e SPZSP055), coletadas da compostagem do Jardim Zoológico de São Paulo.

3.3 PARTE EXPERIMENTAL

3.3.1 Reagentes e solventes

Para o desenvolvimento das reações biocatalíticas foi selecionada a cetona fluorada comercial 2,2,2-trifluoro-1-feniletanona **9** da Sigma-Aldrich. O extrato de Malte foi adquirido da Kasvi.

O ágar bacteriológico da HiMedia.

O meio *Luria Bertani* (LB BROTH, MILLER) foi adquirido da Acumedia e o acetato de etila da Synth.

3.3.2 Micro-organismo

O fungo *Mucor racemosus* CBMAI 847 (Figura 3.3) foi isolado de uma espécie brasileira de Cnidário, nomeado *Mussismilia hispida*, coletada na cidade de São Sebastião, Litoral Norte do Estado de São Paulo, Brasil. A coleta do micro-organismo marinho foi realizada pelo Prof. Dr. Roberto G. S. Berlinck (IQSC-USP).

O fungo *Mucor racemosus* CBMAI 847 foi depositado na Coleção Brasileira de Micro-organismos de Meio Ambiente e Indústria (CBMAI - CPQBA/UNICAMP). Para preservação da cepa fúngica utilizada nas reações biocatalíticas, as mesmas foram preservadas em placas de Petri ou em tubos de ensaio inclinados em meio de malte 2% em geladeira à temperatura de 4 °C e os repiques para manutenção das cepas foram realizadas a cada três meses.

Figura 3.3 - Colônias do fungo *M. racemosus* CBMAI 847 em meio sólido e líquido.

Fonte: Autoria própria.

3.3.3 Preparo dos meios de cultura para o crescimento do fungo *M. racemosus* CBMAI 847

3.3.3.1 Composição de sais para preparo da água do mar artificial

Composição da solução de água do mar artificial para um litro: $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (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), $\text{SrCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (0,04 g) e H_3BO_3 (0,03 g).

3.3.3.2 Composição dos meios de cultura

a) *Preparo do meio de cultura sólido de malte 2%*: Em um frasco Shott de 250 mL adicionou-se 3 g de extrato de malte e 3 g de ágar em 150 mL de solução de água do mar artificial. Em seguida o pH da solução foi ajustado para 8 com a solução de KOH 0,7 mol/L e o meio líquido foi autoclavado por 20 min (121 °C, 1,5 KPa). Em seguida esta solução foi vertida em placas de Petri e após 24 h da solidificação do meio líquido realizou-se o repique do fungo *M. racemosus* CBMAI 847. A placa permaneceu em estufa à temperatura de 35 °C durante 7 dias para permitir o crescimento do fungo.

b) *Preparo do meio de cultura líquido de malte 2%*: Em um frasco Becker de 500 mL adicionou-se 2,6 g de extrato de malte em 130 mL de solução de água do mar artificial.

Condição 1: o pH da solução foi ajustado para 5 com uma solução de HCl 0,5 mol/L. A solução foi transferida para frascos Erlenmeyer de 50 mL, onde foram adicionados 30 mL do meio líquido. Em seguida os frascos foram fechados e autoclavados por 20 min (121 °C, 1,5 KPa).

Condição 2: o pH da solução foi ajustado para 8 com uma solução de KOH 0,7 mol/L. A solução foi transferida para frascos Erlenmeyer de 50 mL, onde foram adicionados 30 mL do meio líquido. Em seguida os frascos foram fechados e autoclavados por 20 min (121 °C, 1,5 KPa).

A inoculação em meio líquido foi realizada em ambiente estéril por meio de 5 fatias circulares de 0,5 cm de diâmetro retiradas de uma placa fúngica, que foi previamente cultivada durante 7 dias em incubadora à temperatura de 35°C. Estes frascos Erlenmeyer foram mantidos em agitação orbital e em banho-maria Dubnoff

(Marconi) à temperatura controlada de 40 °C e 50 °C e 130 rpm por 7 dias (Figura 3.4).

Figura 3.4 - Foto do agitador em banho-maria Dubnoff. (a) Foto externa do agitador em banho-maria. (b) Foto interna do agitador em banho-maria.

Fonte: Autoria própria.

3.3.4 Reações de redução com células do fungo marinho *M. racemosus* CBMAI 847

Após o crescimento do fungo em meio líquido as células/micélios cultivadas em dois frascos Erlenmeyer foram unidas e filtradas a vácuo em funil de Buchner. Os micélios foram filtrados e pesados e igualmente distribuídos em dois diferentes recipientes: (a) um frasco Erlenmeyer de 50 mL e (b) em um balão de 50 mL. Em cada recipiente foram adicionados 1,0 g de células úmidas juntamente com 25 mL do caldo enzimático do fungo. Este experimento foi realizado na *Condição 1* para 2,2,2-trifluoro-1-feniletanona **9** (14,0 mmol/L) e 200 µL (3,3 mmol) de etanol. *Condição 2* em diferentes concentrações da 2,2,2-trifluoro-1-feniletanona **9** (2,9, 5,7, 8,5, 14,0 mmol/L) e 200 µL (3,3 mmol) de etanol. As reações após adição do substrato permaneceram em agitação magnética em bancada por um período de 1 h à temperatura ambiente, para aumentar a interação do substrato com as enzimas presentes, uma vez que no meio aquoso essa interação é dificultada (Figura 3.5).

3.3.4.1 Reações em agitador orbital

Após a solução contendo a mistura permanecer em agitação magnética por 1 h essa foi transferida para agitação orbital em banho-maria Dubnoff por um período de 6 h em rotação de 130 rpm e à temperatura de 40 °C (Figura 3.10-3.12) e a temperatura de 50 °C (Figuras 3.13). Após esse período foi retirada uma alíquota de 1

mL da solução e adicionou-se 1 mL de acetato de etila. A mistura foi agitada em vortex e em seguida foi centrifugada a 6000 rpm durante 6 min. Após esse tempo foi retirada uma alíquota da fase orgânica e analisada em GC-FID em coluna quiral (Figura 3.5).

3.3.4.2 Reações por irradiação micro-ondas

O mesmo procedimento descrito no item 3.3.4.1 foi realizado para a irradiação micro-ondas (6 h, 40 e 50 °C, 200 W). Entretanto, a reação foi realizada em um balão de 125 mL, como descrito no item 3.2.4.1 (Figura 3.5).

Figura 3.5 - Procedimento experimental para realização das reações de redução em agitador orbital e por irradiação micro-ondas para o fungo *M. racemosus* CBMAI 847.

Fonte: Autoria própria.

3.4 Redução de cetonas fluoradas por bactérias termofílicas

3.4.1 Bactérias

Neste trabalho foram utilizadas quatro linhagens de bactérias termofílicas codificadas em FPZSP005 (*Bacillus* sp.), FPZSP088 (*Bacillus subtilis*), FPZSP055 (*Bacillus licheniformis*) e FPZSP051 as quais foram cultivadas em meio de cultura *Luria Bertani* à temperatura de 45 °C. As bactérias foram gentilmente cedidas pela Profa. Dra. Suzan Pantaroto de Vasconcellos da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP) que vem se dedicando à bioprospecção de micro-organismos advindos do processo de compostagem de resíduos orgânicos da Fundação Parque Zoológico de São Paulo (FPZSP) (Figura 3.6). As bactérias estão em fase de identificação.

Figura 3.6 - Colônias de bactérias termofílicas isoladas de compostagem do Jardim Zoológico de São Paulo.

Fonte: Autoria própria.

As reações de biorredução com bactérias termofílicas foram realizadas para as cetonas 2,2,2-trifluoro-1-feniletanona **9**, 1-(2,4,5-trifluorofenil)etanona **10**, 1-(4-bromofenil)-2,2,2-trifluoroetanona **12** e 1-(2-trifluorometil)fenil)etanona **13** as quais foram obtidas da Sigma-Aldrich (Figura 3.7).

Figura 3.7 - Cetonas fluoradas utilizadas nas reações de biorredução com as bactérias termofílicas.

3.4.2 Cultivo das bactérias

3.4.2.1 Composição dos meios de cultura para o crescimento bacteriano

a) *Preparação do meio de cultura sólido*: Em um frasco Shott de 250 mL adicionou-se 3,12 g de meio *Luria Bertani* (LB BROTH, MILLER), ágar (1,88 g) e água destilada (125 mL). Em seguida o pH da solução foi ajustado para 7 com uma solução de KOH 0,7 mol/L e o meio líquido foi autoclavado por 20 min (121 °C, 1,5 KPa). Em seguida esta solução foi vertida em placas de Petri e após 24 h da solidificação do meio líquido, realizou-se o repique das bactérias que permaneceram em crescimento em estufa à temperatura de 45 °C por um período de 24 h.

b) *Preparação do meio de cultura líquido*: Em um frasco Becker de 500 mL adicionou-se 7 g de meio *Luria Bertani* (LB BROTH, MILLER) em 280 mL de água destilada. Em seguida o pH da solução foi ajustado para 8 com uma solução de KOH 0,7 mol/L. Esta solução foi transferida para um frasco Erlenmeyer de 50 mL, onde foi adicionado 30 mL de meio líquido, e em seguida foram fechados e autoclavados por 20 min (121 °C, 1,5 KPa).

c) *Preparação da solução salina 0,86%*: Em um frasco Shott de 500 mL adicionou-se NaCl (2,58 g) e água destilada (300 mL). Essa solução foi autoclavada por 20 min (121 °C e 1,5 KPa).

3.4.2.2 Quantificação do crescimento bacteriano

Após o período de 24 h de incubação da bactéria foi adicionado à placa de Petri uma solução salina de NaCl 0,86% (5 mL). Em seguida com a ajuda de uma alça de inoculação, previamente esterilizada, fez-se uma raspagem sobre a superfície da placa de Petri. Em um tubo de ensaio previamente esterilizado foi transferida toda a solução bacteriana obtida, a qual foi denominada de “solução mãe”.

O monitoramento do crescimento microbiano foi realizado através do método indireto da turbidez em espectrofotômetro Thermo Scientific, modelo Genesys 10uV scanning. A leitura da solução bacteriana foi realizada no comprimento de onda 610 nm e o valor da Densidade Óptica (D.O.) foi ajustado para aproximadamente 0,1 para padronização da concentração de todas as soluções bacterianas. As medidas foram realizadas no Laboratório de Microbiologia da Prof. Dra. Marcia Nitschke (IQSC-USP).

A determinação da concentração das bactérias foi dada por unidade formadoras de colônia (UFC/mL) a partir do método das diluições sucessivas, que consistiu em diluir 10 vezes cada solução bacteriana em solução salina (0,86%), a partir da suspensão da “solução mãe”, obtendo-se as diluições de 10^{-1} até 10^{-9} . Em seguida com o auxílio de uma pipeta automática com capacidade de 20 μ L transferiu 15 μ L da solução em placas de Petri contendo o meio *Luria Bertani*, com o objetivo de realizar a contagem e determinar a concentração da suspensão inicial para cada bactéria: FPZSP005 ($5,7 \times 10^7$ UFC/mL), FPZSP088 ($1,2 \times 10^7$ UFC/mL), FPZSP051 ($6,3 \times 10^8$ UFC/mL) e FPZSP055 ($3,97 \times 10^8$ UFC/mL) (Figura 3.8).

Figura 3.8 - Representação do método das diluições sucessivas para determinar a concentração em UFC/mL.

Fonte: Autoria própria.

3.4.2.3 Reações de redução de flúor-acetofenonas por bactérias termofílicas em agitador orbital

Após o ajuste da concentração de células bacterianas foram retiradas dessa solução 600 µL de amostra, as quais foram transferidas para frascos Erlenmeyer de 50 mL contendo o meio líquido (LB BROTH, MILLER) previamente preparado. Estes frascos Erlenmeyer foram mantidos em agitação orbital em banho-maria Dubnoff (Marconi) à temperatura controlada de 45 °C e 130 rpm por 24 h. Após esse período foi adicionada a 2,2,2-trifluoro-1-feniletanona **9** (20 µL, 0,14 mmol), 1-(2,4,5-trifluorofenil)etanona **10** (20 µL, 0,15 mmol), 1-(4-bromofenil)-2,2,2-trifluoroetanona **12** (20 µL, 0,13 mmol) e 1-(2-trifluorometil)fenil)etanona **13** (20 µL, 0,13 mmol). As reações foram monitoradas retirando-se alíquotas do meio reacional em tempos de 24 h até 144 h dependendo da reação avaliada. Após esse período foi retirada uma alíquota de 1 mL do meio e adicionou-se 1 mL de acetato de etila. A mistura foi agitada em vortex e em seguida foi centrifugada a 6000 rpm durante 6 min. Após esse tempo foi retirada uma alíquota da fase orgânica e analisada em GC-FID utilizando coluna quiral (Figura 3.9).

3.4.2.4 Reações de redução de flúor-acetofenonas por bactérias termofílicas por irradiação micro-ondas

Após o ajuste da concentração de células bacterianas foram retirados 600 µL da solução, a qual foi transferida para um balão de 50 mL contendo o meio líquido (LB BROTH, MILLER) previamente preparado. Em seguida o balão foi mantido em agitação orbital em banho-maria Dubnoff (Marconi) à temperatura de 45 °C e 130 rpm por 24 h. Após esse período de 24 h em agitador Dubnoff foram adicionadas as fluorocetonas **9-10** e **12-13** (20 µL) e o balão ficou exposto à irradiação micro-ondas por um período de 6 h (45 °C, 200 W). Após esse período foi retirada uma alíquota de 1 mL do meio e realizada a extração com 1 mL de acetato de etila. As amostras foram centrifugadas a 6000 rpm durante 6 min. Após esse tempo foi retirada uma alíquota da fase orgânica e analisada em GC-FID utilizando coluna quiral (Figura 3.9).

Também foram realizadas reações controles na qual após adição do substrato (cetona) o balão permaneceu em agitação em banho maria Dubnoff à temperatura de 45 °C por igual período 6 h. Após esse período foi retirada uma alíquota de 1 mL do

meio e realizada a extração com 1 mL de acetato de etila. As amostras foram centrifugadas a 6000 rpm durante 6 min. Após esse tempo foi retirada uma alíquota da fase orgânica e analisada em GC-FID utilizando coluna quirai.

Figura 3.9 - Procedimento experimental para realização das reações de redução em agitador orbital e por irradiação micro-ondas para as bactérias termofílicas.

Fonte: Autoria própria.

3.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.5.1 Biorredução da 2,2,2-trifluoro-1-feniletanona **9** com o fungo *M. racemosus* CBMAI 847

A reação de biorredução da 2,2,2-trifluoro-1-feniletanona **9** com as células do fungo de origem marinha *M. racemosus* CBMAI 847 foi realizada em agitador orbital e por irradiação micro-ondas com 6 h de reação na concentração 14 mmol/L em pH 5. O fungo *M. racemosus* CBMAI 847 apresentou bom crescimento em meio de cultura líquido à temperatura de 40 °C.

Quando as reações foram realizadas em agitador orbital após 6 h de reação observou-se uma conversão de apenas 12% de redução da cetona **9**. Apesar dessa baixa conversão obteve-se uma elevada enantiosseletividade ocorrendo a formação do (S)-álcool **9a** (c= 12%, ee > 99%) (Figura 3.10). Sobre o efeito da irradiação micro-ondas observou-se uma melhor biorredução da cetona, obtendo-se 42% de conversão com 6 h de reação, porém uma menor enantiosseletividade do (S)-álcool **9a** (c= 42%, ee = 66%) (Figura 3.10). Isso pode ser consequência da elevação da temperatura do meio reacional, bem como pode estar atuando diferentes álcoois desidrogenases (ADHs), enzimas responsáveis pela redução de grupos carbonílicos os quais são dependentes de cofatores como NADH ou NADPH. Algumas destas enzimas não catalisam oxidações, enquanto que outras podem catalisar oxidações e reduções (HOFF; SUNDBY, 2013).

A configuração absoluta do álcool formado pode ser prevista pela Regra de Prelog, na qual de acordo com o volume (tamanho) dos grupos substituintes ligados ao carbono carbonílico é possível inferir por qual face ocorrerá a transferência do íon hidreto. Se a transferência do íon hidreto ocorrer pela face *re* da carbonila obtém-se (S)-álcool e se ocorrer pela face *si* obtém-se (R)-álcool (FORNI et al., 1994). Neste caso o grupo de maior volume e de menor volume devem seguir a mesma ordem de prioridade de Cahn-Ingold-Prelog (Esquema 3.9).

Esquema 3.9 - Ordem de prioridade segundo a Regra de Cahn-Ingold-Prelog para prever à configuração absoluta dos álcoois secundários.

Figura 3.10 - Cromatogramas obtidos por GC-FID da biorredução com o fungo *M. racemosus* da 2,2,2-trifluoro-1-feniletanona **9**. (a) Padrão da 2,2,2-trifluoro-1-feniletanona **9**. (b) Padrão do (±)-2,2,2-trifluoro-1-feniletanol **9a**. (c) Reação em agitador orbital com 6 h. (d) Reação em micro-ondas com 6 h.

Condições de análises em GC-FID: $T_i = 70\text{ }^{\circ}\text{C}$, $T_f = 150\text{ }^{\circ}\text{C}$ (3 min), $r = 3\text{ }^{\circ}\text{C/min}$, $t_c = 26,67\text{ min}$. Coluna quiral CP-7502 Chiralsil-Dex (β -ciclodextrina 25 m x 0,25 x 0,39 μm).

Dando-se continuidade nas otimizações deste experimento, avaliou-se algumas variáveis como a concentração do substrato, pH e temperatura do meio

reacional. As reações de biorredução com o fungo *M. racemosus* CBMAI 847 foram realizadas em agitador orbital (A.O.) e por irradiação micro-ondas (M.O.) com 6 h de reação em pH 8 à temperatura de 40 °C e 50 °C.

Na temperatura 40 °C e pH 8 o fungo apresentou bom crescimento em meio de cultura líquido, realizado em pH 5. Estes ensaios foram conduzidos em duplicata em 4 diferentes concentrações (2,9; 5,7; 8,5 e 14 mmol/L) da 2,2,2-trifluoro-1-feniletanona **9**.

Em agitador orbital a 2,2,2-trifluoro-1-feniletanona **9** foi convertida totalmente no (S)-2,2,2-trifluoro-1-feniletanol **9a** (c = 100%, ee = 74%) na concentração de 2,9 mmol/L. Quando aumentou a concentração para (5,7 mmol/L) não obteve mudança na conversão e na enantiosseletividade do (S)-álcool **9a** (c = 100%, ee = 74%). Porém com o aumento da concentração da cetona **9** para 8,5 e 14 mmol/L ocorreu um decréscimo da conversão e um aumento da seletividade para o (S)-álcool **9a** (c = 56%, ee = 90%) e (c = 39%, ee = 95%), respectivamente (Tabela 3.2, Figura 3.11).

Quando as reações foram realizadas por irradiação micro-ondas após 6 h de reação na concentração de 2,9 mmol/L, obteve-se 38% de conversão do (S)-2,2,2-trifluoro-1-feniletanol **9a** com um excesso enantiomérico de 73%. Ao aumentar a concentração da cetona para 5,7 mmol/L, observou-se uma melhor conversão e enantiosseletividade do (S)-álcool **9a** (c = 64%, ee = 91%). Nas concentrações de 8,5 mmol/L e 14 mmol/L ocorreram moderados valores de conversão e excelentes excessos enantioméricos para o (S)-2,2,2-trifluoro-1-feniletanol **9a** (c = 51%, ee = 92%) e (c = 28%, ee = 96%), respectivamente (Tabela 3.2, Figura 3.12).

Tabela 3.2 - Reação de biorredução da 2,2,2-trifluoro-1-feniletanona **9** com o fungo marinho *M. racemosus* CBMAI 847 em agitador orbital (6 h, 32 °C, 130 rpm, pH 8) e por irradiação micro-ondas (6 h, 40 °C, 200 W, pH 8).

<i>c</i> (mmol/L) 9	<i>c</i> (%) 9	<i>c</i> (%) 9a	<i>ee</i> (%) 9a	[<i>ca</i>] 9a
Agitador orbital (40°C, 130 rpm)				
2,9	-	100	74	[S]
5,7	-	100	74	[S]
8,5	44	56	90	[S]
14,0	61	39	95	[S]
Irradiação micro-ondas (40°C, 200W)				
2,9	62	38	73	[S]
5,7	36	64	91	[S]
8,5	49	51	92	[S]
14,0	72	28	96	[S]

c = concentração da 2,2,2-trifluoro-1-feniletanona **9** remanescente determinada por GC-FID.

c = conversão do (S)-2,2,2-trifluoro-1-feniletanol **9a** determinada por GC-FID.

ca = configuração absoluta.

ee = excesso enantiomérico.

Figura 3.11 - Cromatogramas obtidos por GC-FID da biorredução com o fungo *M. racemosus* da 2,2,2-trifluoro-1-feniletanona **9**. (a) Padrão da 2,2,2-trifluoro-1-feniletanona **9**. (b) Padrão do (±)-2,2,2-trifluoro-1-feniletanol **9a**. (c) Reação em agitador orbital com 6 h na concentração de 2,9 mmol/L. (d) Reação por irradiação micro-ondas com 6 h na concentração de 5,7 mmol/L.

Condições de análises em GC-FID coluna CP 7500: $T_i = 105\text{ °C}$, $T_f = 150\text{ °C}$, $r = 3\text{ °C/min}$, $t_c = 15\text{ min}$. Coluna quiral CP-7500 CP-Ciclodextrina- β -2,3,6-M-19 (25 m x 0,25 x 0,25 μm).

Figura 3.12. Cromatogramas obtidos por GC-FID da biorredução com o fungo *M. racemosus* da 2,2,2-trifluoro-1-feniletanona **9** por irradiação micro-ondas. (a) Padrão da 2,2,2-trifluoro-1-feniletanona **9**. (b) Padrão do (±)-2,2,2-trifluoro-1-feniletanol **9a**. (c) Reação com 6 h na concentração de 2,9 mmol/L. (d) Reação com 6 h na concentração de 5,7 mmol/L.

Condições de análises em GC-FID: $T_i = 105\text{ }^{\circ}\text{C}$, $T_f = 150\text{ }^{\circ}\text{C}$, $r = 3\text{ }^{\circ}\text{C/min}$, $t_c = 15\text{ min}$. Coluna quiral CP-7500 CP-Ciclodextrina- β -2,3,6-M-19 (25 m x 0,25 x 0,25 μm).

É conhecido que a atividade da enzima depende do ambiente, notadamente do pH e da temperatura (TORRES, 2001). Diante disso, realizou um terceiro experimento com o intuito de observar a atividade catalítica dessas ADHs à temperatura de 50 $^{\circ}\text{C}$. Embora deve ser destacado que o pH do meio externo, pode ser muito diferente do pH celular.

Quando a temperatura do meio reacional foi alterado para 50 $^{\circ}\text{C}$ o fungo também apresentou um bom crescimento em meio de cultura líquido. Em agitador orbital a 2,2,2-trifluoro-1-feniletanona **9** apresentou boa conversão no (S)-2,2,2-trifluoro-1-feniletanol **9a** ($c = 78\%$, $ee = 82\%$) na concentração de 5,7 mmol/L (Figura 3.13).

Quando esta reação foi submetida à irradiação micro-ondas nas mesmas condições, não ocorreu diferença significativa na conversão da 2,2,2-trifluoro-1-feniletanona **9** ao (S)-2,2,2-trifluoro-1-feniletanol **9a** ($c = 77\%$), quando comparada ao experimento realizado em agitador orbital, porém apresentou um excelente excesso enantiomérico ($>99\%$) nestas condições (Figura 3.13).

Com esses resultados concluiu-se que a melhor condição experimental para a biorredução da 2,2,2-trifluoro-1-feniletanona **9** foi na concentração de 5,7 mmol/L, pH 8 e temperatura de 40 °C para as duas metodologias utilizadas. Apesar da menor conversão em M.O. do (S)-2,2,2-trifluoro-1-feniletanol **9a** este apresentou melhores enantiosseletividades que os experimentos realizados em agitador orbital (Tabela 3.2). É importante destacar que este foi o primeiro estudo realizado para reações de biorredução com fungo filamentososo utilizando a técnica de irradiação micro-ondas.

Figura 3.13 - Cromatogramas obtidos por GC-FID da biorredução com o fungo *M. racemosus* da 2,2,2-trifluoro-1-feniletanona **9**. (a) Padrão da 2,2,2-trifluoro-1-feniletanona **9**. (b) Padrão do (±)-2,2,2-trifluoro-1-feniletanol **9a**. (c) Reação em agitador orbital com 6 h na concentração de 5,7 mmol/L (50 °C, 130 rpm). (d) Reação por irradiação micro-ondas com 6 h na concentração de 5,7 mmol/L (50 °C, 200W).

Condições de análises em GC-FID: $T_i = 105\text{ }^{\circ}\text{C}$, $T_f = 150\text{ }^{\circ}\text{C}$, $r = 3\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$, $t_c = 15\text{ min}$. Coluna quiral CP-7500 CP-Ciclodextrina- β -2,3,6-M-19 (25 m x 0,25 x 0,25 μm).

Em alguns experimentos observou-se um decréscimo na seletividade das reações quando foram realizadas por irradiação micro-ondas em comparação às reações em agitação orbital. Sugere-se que a irradiação micro-ondas pode provocar uma maior mobilidade do sítio catalítico da enzima permitindo que ambas as faces do substrato sejam favorecidas para o ataque do íon hidreto do cofator.

3.5.2 Biorredução com bactérias termofílicas

3.5.2.1 Biorredução com a bactéria termofílica SPZSP005

As reações de biorredução foram realizadas com a bactéria termofílica SPZSP005 para a 2,2,2-trifluoro-1-feniletanona **9**, 1-(2,4,5-trifluorofenil)etanona **10**, 1-(4-bromofenil)-2,2,2-trifluoroetanona **12** e 1-(2-trifluorometil)fenil)etanona **13** em agitador orbital e por irradiação micro-ondas.

Inicialmente fez-se necessário realizar a otimização das condições de análise para separação enantiomérica dos álcoois racêmicos e posterior análises das reações. As cetonas 1-(4-bromofenil)-2,2,2-trifluoroetanona **12** e 1-(2-trifluorometil)fenil)etanona **13** não foram biorreduzidas pela bactéria FPZSP005 em agitador orbital por um período de até 96 h (Figuras 3.14-3.15).

Estudos descrevem que substituintes na posição *orto* em relação ao grupo etanona podem dificultar sua redução, pois a face da carbonila pode estar estericamente impedida pelo substituinte (trifluorado), o qual apresenta carga parcialmente negativa dificultando a aproximação do íon hidreto (LI et al., 2000). Entretanto mesmo contendo o substituinte bromo em posição *para* a bactéria FPZSP005 não reduziu este composto. Possivelmente este substrato xenobiótico não interagiu com as enzimas redutases da bactéria ou a concentração destas enzimas foram insignificantes (Figura 3.14).

Figura 3.14 - Cromatogramas obtidos por GC-FID da biorredução com a bactéria termofílica SPZSP005. (a) Análise do solvente (acetato de etila). (b) Padrão da 1-(2-trifluorometil)fenil)etanona **13**. (b) Padrão do (±)-1-2-(trifluorometil)feniletanol **13a**. (c) Reação em agitador orbital (5,2 mmol/L, 96 h, 45 °C).

Condições de análises em GC-FID: $T_i = 100\text{ }^{\circ}\text{C}$, $T_f = 145\text{ }^{\circ}\text{C}$, $r = 3\text{ }^{\circ}\text{C/min}$, $t_c = 15\text{ min}$. Coluna quiral CP-7500 CP-Ciclodextrina- β -2,3,6-M-19 (25 m x 0,25 x 0,25 μm).

* Impureza detectada no solvente (AcOEt).

Figura 3.15 - Cromatogramas obtidos por GC-FID da biorredução com a bactéria termofílica SPZSP005. (a) Padrão da 1-(4-bromofenil)-2,2,2-trifluoroetanona **12**. (b) Padrão do (±)-1-(4-bromofenil)-2,2,2-trifluoroetanol **12a**. (c) Reação em agitador orbital (5,2 mmol/L, 96 h, 45 °C).

Condições de análises em GC-FID: $T_i = 140\text{ }^{\circ}\text{C}$, $T_f = 185\text{ }^{\circ}\text{C}$, $r = 3\text{ }^{\circ}\text{C/min}$, $t_c = 15\text{ min}$. Coluna quiral CP-7500 CP-Ciclodextrina- β -2,3,6-M-19 (25 m x 0,25 x 0,25 μm).

* Impureza detectada no solvente (AcOEt).

No entanto, a 2,2,2-trifluoro-1-feniletanona **9** foi totalmente reduzida e apresentou um excesso enantiomérico de 82% após 96 h de reação em agitador orbital com a bactéria termofílica SPZSP005 (Tabela 3.3, Figura 3.16). A reação de biorredução com a bactéria FPZSP005 utilizando a técnica de irradiação micro-ondas foi também realizada com a 2,2,2-trifluoro-1-feniletanona **9**. Após 6 h de reação em reator Discover CEM obteve-se uma conversão de 30% e um excesso enantiomérico de 62% para o (S)-álcool **9a**. Antes da reação ser submetida à irradiação micro-ondas, após as 24 h de incubação do substrato em agitador orbital, observou-se uma conversão de 12% para o álcool **9a** e um excesso enantiomérico de 59% (Figura 3.17).

O melhor desempenho com a reação em A.O. em comparação à reação em M.O. provavelmente foi o maior tempo de reação.

Tabela 3.3 - Reação de biorredução da 2,2,2-trifluoro-1-feniletanona **9** com a bactéria termofílica SPZSP005 em agitador orbital e por irradiação micro-ondas.

Tempo (h)	<i>c</i> (%) 9	<i>c</i> (%) 9a	<i>ee</i> (%) 9a	[<i>ca</i>] 9a
Agitador orbital (45°C, 130 rpm)				
24	44	56	74	[R]
48	7	93	82	[R]
72	2	98	82	[R]
96	-	100	82	[R]
Irradiação micro-ondas				
6*	88	12	59	[R]
6	70	30	62	[R]

c = concentração da 2,2,2-trifluoroacetofenona **9** remanescente determinada por GC-FID.

c = conversão do (S)-2,2,2-trifluoro-1-feniletanol **9a** determinada por GC-FID.

ca = configuração absoluta.

*reação antes de ser irradiada.

ee = excesso enantiomérico.

Figura 3.16 - Cromatogramas obtidos por GC-FID da biorredução com a bactéria termofílica SPZSP005. (a) Análise do solvente (acetato de etila). (b) Padrão da 2,2,2-trifluoro-1-feniletanona **9**. (c) Padrão do (±)-2,2,2-trifluoro-1-feniletanol **9a**. (d) Reação em agitador orbital (5,6 mmol/L, 24 h, 45 °C). (e) Reação em agitador orbital (5,6 mmol/L, 96 h, 45 °C).

Condições de análises em GC-FID: $T_i = 105\text{ }^{\circ}\text{C}$ (1 min), $T_f = 150\text{ }^{\circ}\text{C}$, $r = 3\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$, $t_c = 15\text{ min}$. Coluna quiral CP-7500 CP-Ciclodextrina- β -2,3,6-M-19 (25 m x 0,25 x 0,25 μm).

* Impureza detectada no solvente (AcOEt).

Figura 3.17 - Cromatogramas obtidos por GC-FID da biorredução com a bactéria termofílica SPZSP005. (a) Padrão da 2,2,2-trifluoroacetofenona **9**. (b) Padrão do (±)-2,2,2-trifluoro-1-feniletanol **9a**. (c) Reação antes da amostra ser irradiada (5,6 mmol/L, 45 °C). (d) Reação por irradiação micro-ondas (5,5 mmol/L, 6 h, 45 °C).

Condições de análises em GC-FID: $T_i = 105\text{ °C}$ (1 min), $T_f = 150\text{ °C}$, $r = 3\text{ °C/min}$, $t_c = 15\text{ min}$. Coluna quiral CP-7500 CP-Ciclodextrina- β -2,3,6-M-19 (25 m x 0,25 x 0,25 μm).

* Impureza detectada no solvente (AcOEt).

A reação de biorredução da 1-(2,4,5-trifluorofenil)etanona **10** com a bactéria termofílica FPZSP005 apresentou uma conversão de 87% para o (S)-1-(2,4,5-trifluorofenil)etanol **10a** e excelente enantiosseletividade ($ee > 99\%$) em agitador orbital em 96 h de reação (Tabela 3.4, Figura 3.18).

Contudo, a bactéria termofílica FPZSP005 não reduziu a 1-(2,4,5-trifluorofenil)etanona **10** por irradiação micro-ondas. Este resultado pode estar relacionado à perda da atividade catalítica desta enzima (ADH), durante o processo de repicagem ou armazenamento, pois os experimentos foram realizados em períodos diferentes das outras reações (Figura 3.19). As bactérias após serem preservadas por um período de tempo e sendo submetidas à novos repiques podem perder a atividade catalítica, como observou-se neste caso. Entretanto, mais experimentos devem ser realizados para verificar porque a reação de redução não ocorreu, como por exemplo adaptando previamente a bactéria ao substrato.

Tabela 3.4 - Reação de biorredução da 1-(2,4,5-trifluorofenil)etanona **10** com a bactéria termofílica SPZSP005 em agitador orbital.

Tempo (h)	c (%) 10	c (%) 10a	ee (%) 10a	[ca] 10a
Agitador orbital (45°C, 130 rpm)				
24	84	16	>99	[S]
48	47	53	>99	[S]
72	27	73	>99	[S]
96	13	87	>99	[S]

c = concentração (±)-1-(2,4,5-trifluorofenil)etanona **10** remanescente determinada por GC-FID.

c = conversão do (S)-1-(2,4,5-trifluorofenil)etanol **10a** determinada por GC-FID.

ca = configuração absoluta.

ee = excesso enantiomérico.

Figura 3.18 - Cromatogramas obtidos por GC-FID da biorredução com a bactéria termofílica SPZSP005. (a) Análise do solvente. (b) Padrão da 1-(2,4,5-trifluorofenil)etanona **10**. (c) Padrão do (±)-1-(2,4,5-trifluorofenil)etanol **10a**. (d) Reação em agitador orbital (6 mmol/L, 24 h, 45 °C). (e) Reação em agitador orbital (6 mmol/L, 96 h, 45 °C).

Condições de análises em GC-FID: $T_i = 100\text{ }^{\circ}\text{C}$, $T_f = 140\text{ }^{\circ}\text{C}$ (3 min), $r = 3\text{ }^{\circ}\text{C/min}$, $t_c = 16,33\text{ min}$. Coluna quiral CP-7500 CP-Ciclodextrina- β -2,3,6-M-19 (25 m x 0,25 x 0,25 μm).

* Impureza detectada no solvente (AcOEt).

Figura 3.19 - Cromatogramas obtidos por GC-FID da biorredução com a bactéria termofílica SPZSP005. (a) Padrão da 1-(2,4,5-trifluorofenil)etanona **10**. (c) Padrão do (±)-1-(2,4,5-trifluorofenil)etanol **10a**. (d) Reação antes da amostra ser irradiada em micro-ondas (6 mmol/L, 6 h, 45 °C). (c) Reação após a amostra ser irradiada em micro-ondas (6 mmol/L, 6 h, 45 °C).

Condições de análises em GC-FID: $T_i = 100\text{ }^{\circ}\text{C}$, $T_f = 140\text{ }^{\circ}\text{C}$ (3 min), $r = 3\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$, $t_c = 16,33\text{ min}$. Coluna quiral CP-7500 CP-Ciclodextrina- β -2,3,6-M-19 (25 m x 0,25 x 0,25 μm).

3.5.2.2 Biorredução com a bactéria termofílica SPZSP088

As reações de biorredução também foram realizadas com a bactéria termofílica SPZSP088 para 2,2,2-trifluoro-1-feniletanona **9**, 1-(2,4,5-trifluorofenil)etanona **10**, 1-(4-bromofenil)-2,2,2-trifluoroetanona **12** e 1-(2-trifluorometil)fenil)etanona **13** em agitador orbital e por irradiação micro-ondas. Interessantemente, para os compostos 4-bromo-2,2,2-trifluoroacetofenona **12** e 1-2-(trifluorometil)acetofenona **13** também não ocorreram biorredução das cetonas aos seus respectivos álcoois pela bactéria FPZSP088 em agitador orbital após 144 h de reação (Figuras 3.20-3.21), como foi observado também para bactéria termofílica SPZSP005. Outra possibilidade pode ser a toxicidade do substrato pela bactéria.

Figura 3.20 - Cromatogramas obtidos por GC-FID da biorredução da cetona **12** com a bactéria termofílica SPZSP088. (a) Padrão da 1-(4-bromofenil)-2,2,2-trifluoroetanona **12**. (b) Padrão do (±)-1-(4-bromofenil)-2,2,2-trifluoroetanol **12a**. (c) Reação em agitador orbital (5,2 mmol/L, 144 h, 45 °C).

Condições de análises em GC-FID: $T_i = 140\text{ }^{\circ}\text{C}$, $T_f = 185\text{ }^{\circ}\text{C}$, $r = 3\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$, $t_c = 15\text{ min}$. Coluna quiral CP-7500 CP-Ciclodextrina- β -2,3,6-M-19 (25 m x 0,25 x 0,25 μm).

* Impureza detectada no solvente (AcOEt).

Figura 3.21 - Cromatogramas obtidos por GC-FID da biorredução da cetona **13** com a bactéria SPZSP088. (a) Padrão da 1-2-(trifluorometil)acetofenona **13**. (b) Padrão do (±)-1-2-(trifluorometil)feniletanol **13a**. (c) Reação em agitador orbital (5,2 mmol/L, 144 h, 45 °C).

Condições de análises em GC-FID: $T_i = 100\text{ }^{\circ}\text{C}$, $T_f = 145\text{ }^{\circ}\text{C}$, $r = 3\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$, $t_c = 15\text{ min}$. Coluna quiral CP-7500 CP-Ciclodextrina- β -2,3,6-M-19 (25 m x 0,25 x 0,25 μm).

* Impureza detectada no solvente (AcOEt).

A cetona **9** foi biorreduzida ao 2,2,2-trifluoro-1-feniletanol **9a** pela bactéria FPZSP088 após 144 h em agitador orbital e apresentou uma excelente conversão de 100%, no entanto, apresentando uma baixa enantiosseletividade ($ee = 24\%$) (Tabela 3.5, Figura 3.22). Por irradiação micro-ondas a cetona **9** foi reduzida pela bactéria

FPZSP088 ao 2,2,2-trifluoro-1-feniletanol **9a** após 6 h de reação e apresentou uma boa conversão de 42%, contudo, com uma baixa enantiosseletividade ($ee = 22\%$). Mas ao comparar o resultado antes da amostra ser irradiada praticamente não ocorreu mudança na conversão ($c = 60\%$, $ee = 20\%$) (Tabela 3.5, Figura 3.23). Neste caso, praticamente a reação não foi influenciada pela irradiação micro-ondas.

Tabela 3.5 - Reação de biorredução da 2,2,2-trifluoro-1-feniletanona **9** com a bactéria termofílica SPZSP088 em agitador orbital e por irradiação micro-ondas.

Tempo (h)	c (%) 9	c (%) 9a	ee (%) 9a	[ca] 9a
Agitador orbital (45°C, 130 rpm)				
24	62	38	18	[R]
48	33	67	20	[R]
72	18	82	22	[R]
96	7	93	22	[R]
120	4	96	24	[R]
144	-	100	24	[R]
Irradiação micro-ondas				
6*	60	40	20	[R]
6	58	42	22	[R]

c = concentração 2,2,2-trifluoroacetofenona **9** remanescente determinada por GC-FID.

c = conversão do (*R*)-2,2,2-trifluoro-1-feniletanol **9a** determinada por GC-FID.

ca = configuração absoluta.

ee = excesso enantiomérico.

Figura 3.22 - Cromatogramas obtidos por GC-FID da biorredução da cetona **9** com a bactéria termofílica SPZSP088. (a) Padrão da 2,2,2-trifluoro-1-feniletanona **9**. (b) Padrão do (±)-2,2,2-trifluoro-1-feniletanol **9a**. (c) Reação em agitador orbital (5,6 mmol/L, 120 h, 45 °C).

Condições de análises em GC-FID: $T_i = 105\text{ °C}$ (1 min), $T_f = 150\text{ °C}$ (1 min), $r = 3\text{ °C/min}$, $t_c = 15\text{ min}$. Coluna quiral CP-7500 CP-Ciclodextrina- β -2,3,6-M-19 (25 m x 0,25 x 0,25 μm).

Figura 3.23 - Cromatogramas obtidos por GC-FID da biorredução da cetona **9** com a bactéria termofílica SPZSP088. (a) Padrão da 2,2,2-trifluoro-1-feniletanona **9**. (b) Padrão do (±)-2,2,2-trifluoro-1-feniletanol **9a**. (c) Reação antes de ser irradiada por micro-ondas (5,6 mmol/L, 6 h, 45 °C). (d) Reação após ser irradiada (5,6 mmol/L, 6 h, 45 °C).

Condições de análises em GC-FID: $T_i = 105\text{ °C}$ (1 min), $T_f = 150\text{ °C}$ (1 min), $r = 3\text{ °C/min}$, $t_c = 15\text{ min}$. Coluna quiral CP-7500 CP-Ciclodextrina- β -2,3,6-M-19 (25 m x 0,25 x 0,25 μm).

*Impureza do solvente.

A biorredução da 1-(2,4,5-trifluorofenil)etanona **10** para (S)-1-(2,4,5-trifluorofenil)etanol **10a** foi obtida com sucesso após 144 h de reação pela bactéria FPZSP088 e apresentou uma excelente enantiosseletividade (*ee* >99%) em agitador orbital (Tabela 3.6, Figura 3.24). A bactéria FPZSP088 não reduziu o substrato **10** por irradiação micro-ondas (Figura 3.25). Como relatado anteriormente para bactéria FPZSP005 as reações de biorredução com as bactérias termofílicas FPZSP088, FPZSP051 e FPZSP055 também não mais apresentaram atividade catalítica para nenhum dos substratos (**10**, **12** e **13**), tanto por irradiação micro-ondas como por agitação orbital. Sugere-se a mudança da atividade catalítica desta enzima (ADH) durante o processo de repicagem ou armazenamento, pois os experimentos foram realizados em períodos diferentes das reações que apresentaram bons resultados. No entanto, destaca-se que as bactérias apresentaram um bom crescimento tanto em placa de Petri como em meio de cultura LB após a reativação em diferentes épocas realizadas. Uma adaptação das bactérias aos substratos neste caso pode ser necessário, para ativar as enzimas ADHs e redutases, uma vez que suas atividades foram suprimidas durante o processo de preservação e reativação. Cabe ressaltar que os fungos geralmente são bastante reprodutivos nas reações biocatalíticas não perdendo a atividade catalítica após sucessivos repiques.

Tabela 3.6 - Reação de biorredução da 1-(2,4,5-trifluorofenil)etanona **10** com a bactéria termofílica FPZSP088 em agitador orbital.

Tempo (h)	<i>c</i> (%) 10	<i>c</i> (%) 10a	<i>ee</i> (%) 10a	[<i>ca</i>] 10a
24	94	6	>99	[S]
48	88	12	>99	[S]
72	72	28	>99	[S]
96	41	59	>99	[S]
120	19	81	>99	[S]
144	-	100	>99	[S]

c = concentração 1-(2,4,5-trifluorofenil)etanona **10** remanescente determinada por GC-FID.

c = conversão do (S)-2,4,5-trifluoro-1-feniletanol **10a** determinada por GC-FID.

ca = configuração absoluta.

ee = excesso enantiomérico.

Figura 3.24 - Cromatogramas obtidos por GC-FID da biorredução da cetona **10** com a bactéria termofílica SPZSP088. (a) Padrão da 1-(2,4,5-trifluorofenil)etanona **10**. (b) Padrão do (±)-2,4,5-trifluoro-1-feniletanol **10a**. (c) Reação em agitador orbital (6 mmol/L, 120 h, 45 °C). (d) Reação em agitador orbital (6 mmol/L, 144 h, 45 °C).

Condições de análises em GC-FID: $T_i = 100\text{ }^{\circ}\text{C}$, $T_f = 140\text{ }^{\circ}\text{C}$ (3 min), $r = 3\text{ }^{\circ}\text{C/min}$, $t_c = 16,33\text{ min}$. Coluna quiral CP-7500 CP-Ciclodextrina- β -2,3,6-M-19 (25 m x 0,25 x 0,25 μm).

*Impureza do solvente.

Figura 3.25 - Cromatogramas obtidos por GC-FID da biorredução da cetona **10** com a bactéria termofílica SPZSP088. (a) Padrão da 1-(2,4,5-trifluorofenil)etanona **10**. (b) Padrão do (±)-2,4,5-trifluoro-1-feniletanol **10a**. (c) Reação após ser irradiada por micro-ondas (6 mmol/L, 6 h, 45 °C).

Condições de análises em GC-FID: $T_i = 100\text{ }^{\circ}\text{C}$, $T_f = 140\text{ }^{\circ}\text{C}$ (3 min), $r = 3\text{ }^{\circ}\text{C/min}$, $t_c = 16,33\text{ min}$. Coluna quiral CP-7500 CP-Ciclodextrina- β -2,3,6-M-19 (25 m x 0,25 x 0,25 μm).

*Impureza do solvente.

3.5.2.3 Biorredução com a bactéria termofílica SPZSP051

Novamente, para os compostos 4-bromo-2,2,2-trifluoroacetofenona **12** e 1-2-(trifluorometil)acetofenona **13** não ocorreram biorredução das cetonas aos seus respectivos álcoois pela bactéria FPZSP051 em agitador orbital após 24 h de reação (Figura 3.26 e 3.27).

Figura 3.26 - Cromatogramas obtidos por GC-FID da biorredução com a bactéria termofílica SPZSP051. (a) Padrão da 4-bromo-2,2,2-trifluoroacetofenona **12**. (b) Padrão do (±)-1-(4-bromofenil)-2,2,2-trifluoroetanol **12a**. (c) Reação em agitador orbital (5,2 mmol/L, 24 h, 45 °C). (d) Reação em agitador orbital (5,2 mmol/L, 144 h, 45 °C).

Condições de análises em GC-FID: $T_i = 140\text{ }^{\circ}\text{C}$, $T_f = 185\text{ }^{\circ}\text{C}$, $r = 3\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$, $t_c = 15\text{ min}$. Coluna quiral CP-7500 CP-Ciclodextrina- β -2,3,6-M-19 (25 m x 0,25 x 0,25 μm).

*Impureza do solvente.

Figura 3.27 - Cromatogramas obtidos por GC-FID da biorredução da cetona **13** com a bactéria SPZSP051. (a) Padrão da 1-2-(trifluorometil)acetofenona **13**. (b) Padrão do (±)-1-2-(trifluorometil)feniletanol **13a**. (c) Reação em agitador orbital (5,2 mmol/L, 24 h, 45 °C). (d) Reação em agitador orbital (5,2 mmol/L, 144 h, 45 °C).

Condições de análises em GC-FID: $T_i = 100\text{ }^{\circ}\text{C}$, $T_f = 145\text{ }^{\circ}\text{C}$, $r = 3\text{ }^{\circ}\text{C/min}$, $t_c = 15\text{ min}$. Coluna quiral CP-7500 CP-Ciclodextrina- β -2,3,6-M-19 (25 m x 0,25 x 0,25 μm).

*Impureza do solvente.

A biorredução da 2,2,2-trifluoro-1-feniletanona **9** foi realizada pela bactéria FPZSP088 após 144 h em agitador orbital e apresentou uma excelente conversão de 92%, no entanto apresentou uma baixa enantiosseletividade ($ee = 10\%$) (Tabela 3.7, Figura 3.28).

Utilizando a técnica de irradiação micro-ondas foi possível reduzir a cetona **9**, após 6 h de reação em reator Discover CEM, obtendo-se uma conversão de 34% e um excesso enantiomérico de 26%. Antes da reação ser submetida à irradiação após as 24 h de incubação do substrato em agitador orbital, observou-se uma conversão de 28% para o álcool **9a** e um excesso enantiomérico de 22% (Tabela 3.7, Figura 3.29).

Como mencionado anteriormente estes estudos são preliminares e requerem experimentos adicionais para melhorar o desempenho destas reações tanto em agitação orbital quanto por irradiação micro-ondas, além de experimentos que possam evitar alterações das atividades enzimáticas após preservação e repique destas bactérias.

Tabela 3.7 - Reação de biorredução da 2,2,2-trifluoro-1-feniletanona **9** com a bactéria termofílica SPZSP051 em agitador orbital e por irradiação micro-ondas.

Agitador orbital				
Tempo (h)	c (%) 9	c (%) 9a	ee (%) 9a	[ca] 9a
24	80	20	17	[R]
48	55	45	11	[R]
72	28	72	1	[R]
96	21	79	7	[R]
120	12	88	7	[R]
144	8	92	10	[R]
Irradiação micro-ondas				
6*	72	28	22	[R]
6	66	34	26	[R]

c = concentração 2,2,2-trifluoro-1-feniletanona **9** remanescente determinada por GC-FID.

c = conversão do (R)-2,2,2-trifluoro-1-feniletanol **9a** determinada por GC-FID.

ca = configuração absoluta.

*reação antes de ser irradiada.

ee = excesso enantiomérico.

Figura 3.28 - Cromatogramas obtidos por GC-FID da biorredução da cetona **9** com a bactéria termofílica SPZSP051. (a) Padrão da 2,2,2-trifluoro-1-feniletanona **9**. (b) Padrão do (±)-2,2,2-trifluoro-1-feniletanol **9a**. (c) Reação em agitador orbital (5,6 mmol/L, 24 h, 45 °C). (d) Reação em agitador orbital (5,6 mmol/L, 144 h, 45 °C).

Condições de análises em GC-FID: $T_i = 105\text{ }^{\circ}\text{C}$ (1 min), $T_f = 150\text{ }^{\circ}\text{C}$ (1 min), $r = 3\text{ }^{\circ}\text{C/min}$, $t_c = 15\text{ min}$. Coluna quiral CP-7500 CP-Ciclodextrina- β -2,3,6-M-19 (25 m x 0,25 x 0,25 μm).

Figura 3.29 - Cromatogramas obtidos por GC-FID da biorredução da cetona **9** com a bactéria termofílica SPZSP051. (a) Padrão da 2,2,2-trifluoro-1-feniletanona **9**. (b) Padrão do (±)-2,2,2-trifluoro-1-feniletanol **9a**. (c) Reação antes de ser irradiada por micro-ondas (5,6 mmol/L, 6 h, 45 °C). (d) Reação após ser irradiada por micro-ondas (5,6 mmol/L, 6 h, 45 °C).

Condições de análises em GC-FID: $T_i = 105\text{ }^{\circ}\text{C}$ (1 min), $T_f = 150\text{ }^{\circ}\text{C}$ (1 min), $r = 3\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$, $t_c = 15\text{ min}$. Coluna quiral CP-7500 CP-Ciclodextrina- β -2,3,6-M-19 (25 m x 0,25 x 0,25 μm).

A biorredução da 1-(2,4,5-trifluorofenil)etanona **10** foi realizada pela bactéria FPZSP051 após 144 h em agitador orbital e apresentou uma boa conversão de 85% e excelente enantiosseletividade ($ee > 99\%$) (Tabela 3.8, Figura 3.30). Utilizando a técnica de irradiação micro-ondas não foi possível a redução da cetona **10**, após 6 h de reação em reator Discover CEM, provavelmente devido a perda da atividade catalítica da enzima, uma vez que as reações foram realizadas em épocas diferentes. Neste caso a bactéria foi preservada e feito novos repiques, o que pode ter alterado sua constituição fenotípica (Figura 3.31).

Tabela 3.8 - Reação de biorredução da 1-(2,4,5-trifluorofenil)etanona **10** com a bactéria termofílica SPZSP051 em agitador orbital.

CC(=O)c1cc(F)c(F)c(F)c1
 $\xrightarrow[\text{FPZSP051}]{\text{bactéria}}$
CC(O)c1cc(F)c(F)c(F)c1

rac-**10** (*S*)-**10a**

Tempo (h)	<i>c</i> (%) 10	<i>c</i> (%) 10a	<i>ee</i> (%) 10a	[<i>ca</i>] 10a
24	100	-	>99	[<i>S</i>]
48	85	15	>99	[<i>S</i>]
72	65	35	>99	[<i>S</i>]
96	44	55	>99	[<i>S</i>]
120	22	77	>99	[<i>S</i>]
144	14	85	>99	[<i>S</i>]

c = concentração 1-(2,4,5-trifluorofenil)etanona **10** remanescente determinada por GC-FID.

c = conversão do (*S*)-2,4,5-trifluoro-1-feniletanol **10a** determinada por GC-FID.

ca = configuração absoluta.

ee = excesso enantiomérico.

Figura 3.30 - Cromatogramas obtidos por GC-FID da biorredução da cetona **10** com a bactéria termofílica SPZSP051. (a) Padrão da 1-(2,4,5-trifluorofenil)etanona **10**. (b) Padrão do (±)-2,4,5-trifluoro-1-feniletanol **10a**. (c) Reação em agitador orbital (6 mmol/L, 24 h, 45 °C). (d) Reação em agitador orbital (6 mmol/L, 72 h, 45 °C). (e) Reação em agitador orbital (6 mmol/L, 144 h, 45 °C).

Condições de análises em GC-FID: $T_i = 100\text{ }^{\circ}\text{C}$, $T_f = 140\text{ }^{\circ}\text{C}$ (3 min), $r = 3\text{ }^{\circ}\text{C/min}$, $t_c = 16,33\text{ min}$. Coluna quiral CP-7500 CP-Ciclodextrina- β -2,3,6-M-19 (25 m x 0,25 x 0,25 μm).

Figura 3.31 - Cromatogramas obtidos por GC-FID da biorredução da cetona **10** com a bactéria termofílica SPZSP051. (a) Padrão da 1-(2,4,5-trifluorofenil)etanona **10**. (b) Padrão do (±)-2,4,5-trifluoro-1-feniletanol **10a**. (c) Reação por irradiação micro-ondas (6 mmol/L, 6 h, 45 °C).

Condições de análises em GC-FID: $T_i = 100\text{ }^{\circ}\text{C}$, $T_f = 140\text{ }^{\circ}\text{C}$ (3 min), $r = 3\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$, $t_c = 16,33\text{ min}$. Coluna quiral CP-7500 CP-Ciclodextrina- β -2,3,6-M-19 (25 m x 0,25 x 0,25 μm).

3.5.2.4 Biorredução com a bactéria termofílica SPZSP055

As reações de biorredução foram também realizadas com a bactéria termofílica SPZSP055 para 2,2,2-trifluoro-1-feniletanona **9**, 1-(2,4,5-trifluorofenil)etanona **10**, 1-(4-bromofenil)-2,2,2-trifluoroetanona **12** e 1-(2-trifluorometil)fenil)etanona **13** em agitador orbital e por irradiação micro-ondas (Figuras 3.31-3.34).

Em agitador orbital a cetona **9** foi totalmente reduzida pela bactéria SPZSP055 após 120 h de reação fornecendo o (*R*)-2,2,2-trifluoro-1-feniletanol **9a** com excesso enantiomérico de 33% (Tabela 3.9, Figura 3.31).

Quando a reação foi submetida à irradiação micro-ondas após 6 h de reação a bactéria FPZSP055 reduziu 26% da cetona **9** ao (*S*)-álcool-**9a** com excesso enantiomérico de 5% (Tabela 3.9, Figura 3.32).

Tabela 3.9 - Reação de biorredução da 2,2,2-trifluoro-1-feniletanona **9** com a bactéria termofílica SPZSP055 em agitador orbital e por irradiação micro-ondas.

Tempo (h)	c (%) 9	c (%) 9a	ee (%) 9a	[ca] 9a
24	53	47	21	[R]
48	27	73	28	[R]
72	7	93	33	[R]
96	5	95	33	[R]
120	-	100	33	[R]
144	-	100	34	[R]
Irradiação micro-ondas				
6*	80	20	2	[R]
6	74	26	5	[R]

c = concentração 2,2,2-trifluoro-1-feniletanona **9** remanescente determinada por GC-FID.

c = conversão do (*R*)-2,2,2-trifluoro-1-feniletanol **9a** determinada por GC-FID.

ca = configuração absoluta.

* = reação antes da irradiação.

ee = excesso enantiomérico.

Figura 3.32 - Cromatogramas obtidos por GC-FID da biorredução da cetona **9** com a bactéria termofílica SPZSP055. (a) Padrão da 2,2,2-trifluoro-1-feniletanona **9**. (b) Padrão do (±)-2,2,2-trifluoro-1-feniletanol **9a**. (c) Reação em agitador orbital (5,6 mmol/L, 24 h, 45 °C). (d) Reação em agitador orbital (5,6 mmol/L, 72 h, 45 °C). (e) Reação em agitador orbital (5,6 mmol/L, 144 h, 45 °C).

Condições de análises em GC-FID: $T_i = 105\text{ }^{\circ}\text{C}$ (1 min), $T_f = 150\text{ }^{\circ}\text{C}$ (1 min), $r = 3\text{ }^{\circ}\text{C/min}$, $t_c = 15\text{ min}$. Coluna quiral CP-7500 CP-Ciclodextrina- β -2,3,6-M-19 (25 m x 0,25 x 0,25 μm).

*Impureza do solvente.

Figura 3.33 - Cromatogramas obtidos por GC-FID da biorredução da cetona **9** com a bactéria termofílica SPZSP055. (a) Padrão da 2,2,2-trifluoro-1-feniletanona **9**. (b) Padrão do (±)-2,2,2-trifluoro-1-feniletanol **9a**. (c) Reação antes da amostra ser irradiada (5,6 mmol/L, 45 °C). (d) Reação após a amostra ser irradiada no reator de micro-ondas (5,6 mmol/L, 6 h, 45 °C).

Condições de análises em GC-FID: $T_i = 105\text{ °C}$ (1 min), $T_f = 150\text{ °C}$ (1 min), $r = 3\text{ °C/min}$, $t_c = 15\text{ min}$. Coluna quiral CP-7500 CP-Ciclodextrina- β -2,3,6-M-19 (25 m x 0,25 x 0,25 μm).

*Impureza do solvente.

Em agitador orbital a 1-(2,4,5-trifluorofenil)etanona **10** foi também totalmente reduzida pela bactéria SPZSP055 após 120 h de reação fornecendo o (S)-2,4,5-trifluoro-1-feniletanol **10** com excelente excesso enantiomérico ($c = 100\%$, $ee > 99\%$) (Tabela 3.10, Figura 3.33).

Quando a reação foi submetida à irradiação micro-ondas após 6 h a bactéria FPZSP055 não reduziu a cetona **10** (Figura 3.34). Neste caso, a abactéria ficou preservada por um longo período de tempo, podendo ter ocorrido alterações em seu metabolismo.

Tabela 3.10 - Reação de biorredução da 1-(2,4,5-trifluorofenil)etanona **10** com a bactéria termofílica SPZSP055 em agitador orbital.

CC(=O)c1cc(F)c(F)c(F)c1
 $\xrightarrow[\text{FPZSP055}]{\text{bactéria}}$
CC(O)c1cc(F)c(F)c(F)c1

rac-**10** (*S*)-**10a**

Tempo (h)	<i>c</i> (%) 10	<i>c</i> (%) 10a	<i>ee</i> (%) 10a	<i>ca</i>
24	79	20	>99	[S]
48	59	41	>99	[S]
72	24	76	>99	[S]
96	12	88	>99	[S]
120	-	100	>99	[S]
144	-	100	>99	[S]

c = concentração ($\pm$)-2,4,5-trifluoroacetofenona **10** remanescente determinada por GC-FID.

c = conversão do (*S*)-2,4,5-trifluoro-1-feniletanol **10a** determinada por GC-FID.

ca = configuração absoluta.

ee = excesso enantiomérico.

Figura 3.34 - Cromatogramas obtidos por GC-FID da biorredução da cetona **10** com a bactéria termofílica SPZSP055. (a) Padrão da 1-(2,4,5-trifluorofenil)etanona **10**. (b) Padrão do ($\pm$)-2,4,5-trifluoro-1-feniletanol **10a**. (c) Reação em agitador orbital (6 mmol/L, 24 h, 45 °C). (d) Reação em agitador orbital (6 mmol/L, 72 h, 45 °C). (e) Reação em agitador orbital (6 mmol/L, 144 h, 45 °C).

Condições de análises em GC-FID: $T_i = 100\text{ }^{\circ}\text{C}$, $T_f = 140\text{ }^{\circ}\text{C}$ (3 min), $r = 3\text{ }^{\circ}\text{C/min}$, $t_c = 16,33\text{ min}$. Coluna quiral CP-7500 CP-Ciclodextrina- β -2,3,6-M-19 (25 m x 0,25 x 0,25 μm).

*Impureza do solvente.

Figura 3.35 - Cromatogramas obtidos por GC-FID da biorredução da cetona **10** com a bactéria termofílica SPZSP055. (a) Padrão da 1-(2,4,5-trifluorofenil)etanona **10**. (b) Padrão do (±)-2,4,5-trifluoro-1-feniletanol **10a**. (c) Reação após ser irradiada no reator de micro-ondas (6 mmol/L, 6 h, 45 °C).

Condições de análises em GC-FID: $T_i = 100\text{ }^{\circ}\text{C}$, $T_f = 140\text{ }^{\circ}\text{C}$ (3 min), $r = 3\text{ }^{\circ}\text{C/min}$, $t_c = 16,33\text{ min}$. Coluna quiral CP-7500 CP-Ciclodextrina- β -2,3,6-M-19 (25 m x 0,25 x 0,25 μm).

Os compostos 4-bromo-2,2,2-trifluoroacetofenona **12** e 1-2-(trifluorometil)acetofenona **13** também não foram biorreduzidos pela bactéria FPZSP055 em agitador orbital.

Este é o primeiro estudo com o emprego de bactérias para promover reações na presença da irradiação micro-ondas. Devido as bactérias serem facilmente mutáveis, algumas perderam atividade após permanecerem estocadas em refrigerador. No entanto, as bactérias podem ser reativadas e adaptadas ao substrato para induzir a sua redução. Este procedimento é requerido quando há perda de atividade ou os substratos são tóxicos ou recalcitrantes aos micro-organismos.

3.6 CONCLUSÃO

O fungo de origem marinha *Mucor racemosus* CBMAI 847 apresentou potencial para redução biocatalítica de cetonas proquirais apresentando uma eficiente resolução por irradiação micro-ondas para (±)-2,2,2-trifluoroacetofenona **9** na concentração de 5,7 mmol/L e pH 8 (*c* = 64, *ee* = 91%) e em agitador orbital (*c* = 100, *ee* = 74%) em 6 h de reação.

As bactérias termofílicas SPZSP005, SPZSP088, SPZSP051 e SPZSP055 catalisaram a biorredução da (±)-2,2,2-trifluoroacetofenona **9** e da (±)-2,4,5-trifluoroacetofenona **10** com boas conversões e excessos enantioméricos por agitação orbital e irradiação micro-ondas.

Conclui-se também que as reações de biorredução com o fungo marinho *Mucor racemosus* CBMAI 847 produziu o (*S*)-álcool **9a** e as bactérias termofílicas SPZSP005, SPZSP088, SPZSP051 e SPZSP055 forneceram o (*R*)-álcool **9a**, demonstrando assim a enantiocomplementariedade da reação para a 2,2,2-trifluoro-1-feniletanona **9** com estes diferentes micro-organismos.

Este estudo também, permitiu investigar a presença de álcoois desidrogenases ou redutases estáveis à temperatura de 45 °C nas reações por agitação orbital e por irradiação micro-ondas. Este trabalho descreve a primeira investigação da literatura frente ao uso de células microbianas (fungo e bactérias termofílicas) por irradiação micro-ondas aplicada em biocatálise.

4. Reação de adição de aza-Michael com lipase de *Candida antarctica* (CALB)

4.1 Adição de Michael

A reação de adição de Michael é uma das mais importantes estratégias disponíveis na formação da ligação carbono-carbono. Esta reação é convencionalmente caracterizada pela adição de nucleófilos (doadores de Michael) a olefinas ativadas (aceptores de Michael). Este tipo de adição pode gerar um centro estereogênico na molécula, sendo, portanto de grande interesse na síntese orgânica assimétrica (SIBI, MANYEM, 2000; MATTOS, MARZORATI, 1999).

Esta reação é também altamente versátil, uma vez que pode ocorrer entre vários *N*-nucleófilos (aminas alifáticas e aromáticas, amidas, carbamatos e azidas) e aceptores de Michael (enonas, acrilatos, nitrilas, amidas, sulfonas, fosfonatos, trifluorometilalquenos e nitroalquenos insaturados) (RULEV, 2011). Quando compostos carbonílicos α,β -insaturados reagem com reagentes nucleofílicos, eles podem reagir por uma *adição simples* ou pela *adição conjugada*. Na *adição simples* o nucleófilo é diretamente adicionado ao grupo carbonílico via adição-1,2. Na *adição conjugada* o nucleófilo ataca a ligação olefínica (C=C) adjacente à carbonila, formando um equilíbrio da forma enólica e cetônica via adição-1,4 (Esquema 4.1) (CAREY, 1984).

Esquema 4.1 - Reação de adição nucleofílica simples e conjugada em sistemas α,β -insaturados.

A força e a natureza do nucleófilo terá influência sobre o tipo de adição que será realizada, nucleófilos fortes favorecem adição simples e nucleófilos fracos geralmente favorecem adições conjugadas. A forma como esse nucleófilo irá agir dependerá da temperatura da reação, da natureza do composto α,β -insaturado, principalmente da sua eletronegatividade e do tipo de nucleófilo utilizado, duro ou mole (CLAYDEN, 2009).

Para nucleófilos duros (carga negativa concentrada em um átomo pequeno e eletronegativo), a atração eletrostática exerce papel fundamental no início da formação da ligação entre o HOMO do nucleófilo e o LUMO do sistema conjugado, e tende a predominar sobre a questão orbitalar, dirigindo a reação para a adição-1,2. Enquanto, para nucleófilos moles (carga negativa dispersa por ressonância ou por um átomo grande, pouco eletronegativo ou nucleófilos neutros), a atração eletrostática é um fator secundário e o fator orbitalar predomina no controle da regioquímica da reação, observando-se, nesses casos, principalmente produtos de adição-1,4 (adição conjugada) (COSTA et al., 2003).

O mecanismo para a reação de Michael entre uma amina e uma cetona α,β -insaturada em meio básico, envolve basicamente três etapas (Esquema 4.2). Primeiramente, ocorre o ataque nucleofílico ao carbono β do acceptor parcialmente positivo, formando um enolato. Em seguida em duas etapas separadas o átomo de

nitrogênio perde um próton e o átomo de oxigênio ganha um próton do meio reacional formando o aduto de Michael (Esquema 4.2) (SOLOMONS, 2002; CLAYDEN, 2009).

Esquema 4.2 - Reação de adição de aza-Michael.

4.1.2 Reações de aza-Michael

Aminas quirais compõem uma importante classe de compostos orgânicos, em virtude da sua utilidade na preparação de produtos farmacêuticos e industriais de considerável interesse (GOTOR-FERNÁNDEZ et al., 2006; YADAV et al., 2003). Podem ser citados como exemplos alguns aminoálcoois de importância farmacológica como a (*R*)-*Epinefrina* (adrenalina), utilizado em infartos cardíacos e anafilaxia, o (*R*)-*Isoproterenol* utilizado no tratamento de pacientes com bradicardia (frequência cardíaca lenta) e o (*R*)-*Nifenalol* um importante precursor bloqueador β -adrenérgico (Figura 4.1) (MONDAL et al., 2014; DAS et al., 2013; YANG et al., 2006).

Figura 4.1 - Aminoálcoois utilizados como fármacos contendo grupamento amino.

Devido a sua vasta gama de aplicações, a modificação e o aprimoramento de técnicas para a síntese de compostos β -amino carbonílicos tem sido objeto de pesquisas (YADAV et al., 2003; ZHANG et al., 2005). A adição conjugada do nitrogênio nucleofílico em compostos carbonílicos α,β -insaturados, ou seja, a reação de aza-Michael, constitui uma reação chave para a construção da ligação C-N na preparação de β -amino álcoois, ésteres e nitrilas (TRIVEDI et al., 2008).

Geralmente, a adição conjugada ocorre na presença de uma base ou por catálise ácida, empregando ácidos de Lewis, tais como, SnCl_4 , FeCl_3 , ZnCl_2 , AlCl_3 (MATTOS; MARZORATI, 1999). A escolha do catalisador é determinada pela atividade química de cada componente da reação. Em alguns casos, a adição de aminas alifáticas altamente nucleofílicas a sistemas conjugados ocorre na ausência de um catalisador. Evidentemente, quanto maior a nucleofilicidade do doador de Michael e maior a eletrofilicidade e acessibilidade estérica ao átomo de carbono do β -alqueno de partida mais facilmente se processa a reação (RULEV, 2011).

Embora essa reação seja normalmente catalisada por base, a procura de catalisadores eficientes para a reação aza-Michael, principalmente que sejam ligados ao desenvolvimento de metodologias que sigam os princípios da Química Verde, que requerem quantidades catalíticas e o uso de solventes menos tóxicos.

Dentro deste conceito, um eficiente protocolo enzimático foi relatado para a síntese de β -amino ésteres através da adição de aza-Michael de aminas primárias e secundárias com acrilatos. A lipase de *Candida antarctica* B foi utilizada como biocatalisador e os correspondentes β -amino ésteres foram produzidos com rendimentos entre 31-94% (Esquema 4.3, Tabela 4.1). A reação foi realizada à temperatura de 60 °C em tolueno por um tempo reacional de 3,5 h (DHAKE et al., 2010).

Esquema 4.3 - Adição de aza-Michael de aminas alifáticas secundárias a acrilatos catalisada por CALB.

Tabela 4.1 - Adição de aza-Michael catalisada por CALB.

R	R ₁	R ₂	Rend. %
Et	Et	Me	89
<i>n</i> -But	<i>n</i> -But	Me	51
Et	Et	Et	82
Et	ET	<i>n</i> -But	54

Rend. = rendimento

R = consultar Esquema 4.3.

Em outro trabalho desenvolvido por Ying et al. (2011) um eficiente protocolo da adição aza-Michael de aminas com alquenos deficientes de elétrons foi desenvolvido, usando líquido iônico [TMG] [Lac] como catalisador em condições livres de solventes (Esquema 4.4). As reações foram realizadas em tempos reacionais de 2 até 20 h, obtendo-se rendimentos entre 91-96% (Tabela 4.2).

Esquema 4.4 - Adição aza-Michael entre aminas com acrilato de metila usando como catalisador o líquido iônico [TMG][Lac].

Tabela 4.2 – Adição aza-Michael entre aminas com acrilato de metila usando como catalisador o líquido iônico [TMG][Lac].

R	Tempo (h)	Rend. %
20	96
3	90
2	95
2	91

R = consultar Esquema 4.4.

Rend. = rendimento.

Singh et al. (2009) também apresentaram resultados obtidos em reações da adição de aza-Michael livres de solventes, entre aminas e compostos carbonílicos α,β -insaturados por irradiação micro-ondas, catalisada por ácido perclórico, impregnado em sílica gel ($\text{HClO}_4/\text{SiO}_2$), produzindo adutos com rendimentos entre 78-98,95% (Esquema 4.5).

Esquema 4.5 - Reação aza-Michael catalisada por $\text{HClO}_4/\text{SiO}_2$ por irradiação micro-ondas.

Outra metodologia foi desenvolvida por Wei et al. (2010) para reações da adição de aza-Michael com acrilonitrilas formando derivados da 2-aril-oximetilbenzilmedazol, na presença de carbonato de potássio anidro e por irradiação de micro-ondas, os rendimentos variaram entre 80- 93% (Esquema 4.6).

Esquema 4.6 - Reação aza-Michael catalisada por K_2CO_3 por irradiação micro-ondas.

Chen et al. (2012) realizaram uma síntese estereosseletiva do *E*-Aldoxima utilizando uma reação de aza-Michael seguida de uma adição retro-Michael. As oximas são compostos que exibem atividade inseticida e fungicida, como por exemplo o inseticida *Lannate*® (Brasil) utilizado nas culturas de algodão e batata. O diastereoisômero da *E*-aldoxima foi obtido com rendimento isolado de 92% e pureza diastereoismérica na proporção de 95:5 em meio básico (NaOH aquoso, pH 12, temperatura ambiente, 4 h) (Esquema 4.7).

Esquema 4.7 - Reação aza-Michael seguida de adição retro-Michael para síntese do *E*-aldoxima.

Estes trabalhos demonstram a importância da investigação da adição conjugada de nucleófilos nitrogenados a cetonas elétron-deficientes, buscando catalisadores enzimáticos, aliada aos Princípios da Química Verde, bem como a utilização da irradiação micro-ondas.

4.2 OBJETIVOS

Realizar reações de adição de aza-Michael entre aminas e compostos carbonílicos α - β -insaturados em agitador orbital e por irradiação micro-ondas.

4.2.1 Objetivos específicos

Realizar reações de aza-Michael entre a ciclo-hexenona **1** e a benzilamina **2** utilizando a agitação orbital e por irradiação micro-ondas na presença e ausência da lipase de *C. antarctica*.

Realizar reações de aza-Michael entre a benzilamina **2** e a 3-metil-2-ciclo-hexen-1-ona **5** utilizando agitação orbital e por irradiação micro-ondas na presença e ausência da lipase de *C. antarctica*.

Realizar reações de aza-Michael entre a benzilamina **2** e a 2,5-dimetil-*para*-benzoquinona **8** utilizando a agitação orbital e por irradiação micro-ondas na presença e ausência da lipase de *C. antarctica*.

4.3 PARTE EXPERIMENTAL

4.3.1 Materiais e métodos

4.3.1.1 Enzima

A lipase imobilizada em resina acrílica de *Candida antarctica* (CALB), $\geq 10,000$ U/g, recombinante, expressa em *Aspergillus oryzae* foi doada pela Novo Nordisk (Brasil).

4.3.1.2 Reagentes

A benzilamina **2** e as cetonas (ciclo-hexenona **1**, 3-metil-2-ciclo-hexen-1-ona **5**) foram obtidas da Sigma-Aldrich. A 2,5-dimetil-*para*-benzoquinona **8** foi sintetizada pela Dra. Marciana L. P. Uliana (ULIANA et al., 2008; DOCKAL et al., 1985). Os solventes (EtOAc, CH₂Cl₂, *n*-hexano, MeOH, tolueno, éter etílico e THF) foram obtidos comercialmente da Tedia (Brasil), Panreac (Espanha) e J.T. Baker (USA). As separações e purificações das amostras foram realizadas em colunas cromatográficas utilizando sílica *gel* 60 (230-400 mesh) em misturas de hexano e acetato de etila 8:2 como eluentes. As frações coletadas foram monitoradas por cromatografia em camada delgada (CCD) utilizando placas de cromatofolhas de alumínio impregnadas com sílica gel 60 F₂₅₄ (Sorbent Technologies).

4.3.1.3 Equipamentos

As reações de aza-Michael foram realizadas utilizando agitador orbital Tecnal TE-421 e o reator de micro-ondas CEM Discover (descritos no item 2.7.2). Os equipamentos utilizados foram: cromatógrafo a gás modelo da Shimadzu GC 2010, com auto injetor AOC 20i e um detector de ionização de chama (FID), e equipado com coluna J&W Scientific DB-5 (30 m x 0,25 mm x 0,25 μ m); gás de arraste: nitrogênio (60 kPa); temperatura do injetor: 250 °C; razão split do injetor: 1:20; temperatura do detector 300 °C; forno: (temperatura inicial) 80 °C por min, (temperatura final) 259 °C por 3 min; taxa de aquecimento: 10 °C/min, tempo total de análise: 22 min. Os espectros de massas foram obtidos em cromatógrafo a gás modelo Shimadzu GC2010 acompanhado a um detector de massas (Shimadzu MS2010plus) com o modo de ionização por impacto de elétrons (EI), e equipado com

uma coluna J&W Scientific DB-5 (30 m x 0,25 mm x 0,25 μ m); gás de arraste: hélio (88,2 kPa); temperatura do injetor: 300 °C; razão split do injetor: 1:20; temperatura do detector 300 °C; forno: (temperatura inicial) 50 °C por min, (temperatura final) 270 °C por min; taxa de aquecimento: 10 °C/min, tempo total de análise: 32 min.

4.3.2 Condições experimentais em escala analítica para as reações convencionais

Experimento 1 - Reações de aza-Michael entre a ciclo-hexenona **1** e a benzilamina **2**

Em um frasco Erlenmeyer de 50 mL adicionou-se a lipase de *C. antarctica* (80 mg), 10 mL do solvente orgânico (hexano, CH₂Cl₂, metanol, THF, tolueno e éter etílico), a ciclo-hexenona **1** (40 μ L, 0,41 mmol) e a benzilamina **2** (40 μ L, 0,37 mmol). Em seguida fechou-se o frasco com septo de borracha e colocou em agitador orbital (33 °C, 133 rpm). As reações foram monitoradas retirando-se alíquotas (0,5 mL) do meio reacional em tempos de 2, 4, 24 e 48 horas (Figuras 4.2-4.11). As alíquotas foram adicionadas em frascos *vials* (2 mL) onde o volume foi completado com acetato de etila e posteriormente analisadas por cromatografia a gás (GC-FID). As reações controles (ausência de lipase) também foram realizadas sobre as mesmas condições.

Experimento 2- Reações de aza-Michael entre a benzilamina **2** e a 3-metil-2-ciclo-hexen-1-ona **5**

Em um frasco Erlenmeyer de 50 mL adicionou-se a lipase de *Candida antarctica* (80 mg), 10 mL do solvente orgânico (metanol e hexano), a benzilamina **2** (40 μ L; 0,37 mmol) e a 3-metil-2-ciclo-hexen-1-ona **5** (40 μ L; 0,35 mmol). Em seguida fechou-se o frasco com septo de borracha e colocou em agitador orbital (33 °C, 133 rpm). As reações foram monitoradas retirando-se alíquotas (0,5 mL) do meio reacional em tempos de 2, 4, 24 e 48 horas (Figuras 4.14-4.17). As alíquotas foram adicionadas em frascos *vials* (2 mL) onde o volume foi completado com acetato de etila e posteriormente analisadas por cromatografia a gás (GC-FID). As reações controles (ausência de lipase) também foram realizadas sobre as mesmas condições.

Experimento 3- Reações de aza-Michael entre a benzilamina 2 e a 2,5-dimetil-para-benzoquinona 8

Em um frasco Erlenmeyer de 50 mL adicionou-se a lipase de *C. antarctica* (80 mg), 10 mL de hexano, a benzilamina **2** (40 μ L, 0,37 mmol) e a 2,5-dimetil-para-benzoquinona **8** (40 μ L, 0,33 mmol). Em seguida fechou-se o frasco com septo de borracha e colocou em agitador orbital (33 °C, 133 rpm). As reações foram monitoradas retirando-se alíquotas (0,5 mL) do meio reacional em tempos de 1 - 5 horas durante 4 dias (Figuras 4.21, 4.22 e 4.25). As alíquotas foram adicionadas em frascos *vials* (2 mL) onde o volume foi completado com acetato de etila e posteriormente analisadas por cromatografia a gás (GC-FID). As reações controles (ausência de lipase) também foram realizadas sobre as mesmas condições.

4.3.3 Condições experimentais em escala analítica para reações por irradiação micro-ondas

Experimento 1 - Reações de aza-Michael entre a ciclo-hexenona 1 e a benzilamina 2

Em um balão de 50 mL adicionou-se a lipase de *C. antartctica* (80 mg), 10 mL do solvente orgânico (*n*-hexano, metanol, CH₂Cl₂ e THF), ciclo-hexenona **1** (40 μ L, 0,41 mmol) e a benzilamina **2** (40 μ L, 0,37 mmol). A reação foi submetida à irradiação micro-ondas por aquecimento em duas temperaturas diferentes (33 °C e 50 °C) na potência de 70 W. As reações foram monitoradas retirando-se alíquotas do meio reacional em tempos de 5, 10, 15, 20, 25, 30, 60, 120 e 180 min. As alíquotas de 0,5 mL foram adicionadas em *vials* de 2,0 mL onde o volume foi completado com acetato de etila e posteriormente analisadas por GC-MS.

Experimento 2 - Reações de aza-Michael entre benzilamina 2 e a 3-metil-2-ciclo-hexen-1-ona 5

Em um balão de 50 mL adicionou-se a lipase de *C. antartctica* (80 mg), 10 mL do solvente orgânico (hexano, metanol e CH₂Cl₂), a benzilamina **2** (40 μ L, 0,37 mmol) e a 3-metil-2-ciclo-hexen-1-ona **5** (40 μ L, 0,35 mmol). A reação foi submetida à irradiação micro-ondas por aquecimento em duas temperaturas diferentes (33 °C e 50 °C) na potência de 70 W. As reações foram monitoradas retirando-se alíquotas do meio reacional em tempos de 5, 10, 15, 20, 25, 30, 60, 120 e 180 min (Figuras 4.18-4.19).

As alíquotas de 0,5 mL foram adicionadas em *vials* de 2,0 mL onde o volume foi completado com acetato de etila e posteriormente analisadas em GC-FID.

Experimento 3- Reações de aza-Michael entre a benzilamina 2 e a 2,5-dimetil-para-benzoquinona 8

Em um balão de 50 mL adicionou-se a lipase *C. antarctica* (80 mg) o solvente hexano (10 mL), a benzilamina **2** (40 µL, 0,37 mmol) e a 2,5-dimetil-*p*-benzoquinona **8** (40 µL, 0,33 mmol). A mistura ficou em agitação magnética até a completa solubilização da 2,5-dimetil-*p*-benzoquinona **8**. Em seguida a reação foi submetida à irradiação micro-ondas pelo tempo de 5 h à temperatura de 60 °C na potência máxima de 200 W. Após as 5 h ocorreu a formação de um precipitado de coloração marrom na parede do recipiente, realizou-se uma rotoevaporação do solvente seguida da adição de acetato de etila (10 mL) para a completa solubilização e homogeneização do precipitado. A reação controle (sem lipase) foi realizada sobre as mesmas condições, permanecendo exposta à irradiação micro-ondas por um tempo de 3 h. As reações foram monitoradas por cromatografia em camada delgada (CCD) e posteriormente analisadas por GC-FID e GC-MS (Figuras 4.23-4.25).

Após observação das reações por placas de CCD foi adicionado 1,0 mL de água destilada à reação, deixando-se em agitação magnética por 24 h. Realizou-se a extração com acetato de etila (10 mL), água destilada (10 mL), seguida de secagem da fase orgânica com sulfato de sódio anidro. O resíduo obtido foi analisado por GC-MS (Figura 4.25).

4.3.4 Condições experimentais em escala semi-preparativa para reações convencionais (agitação orbital)

As reações foram realizadas em três diferentes frascos Erlenmeyer de 50 mL, onde adicionou-se a lipase de *C. antartctica* (80 mg), 10 mL de hexano, benzilamina **2** (40 µL; 0,37 mmol) e a ciclo-hexenona **2** (40 µL; 0,41 mmol) em cada frasco. As reações foram monitoradas retirando-se alíquotas do meio reacional em tempos de 24 e 48 horas (Figuras 4.4-4.5) e analisadas por cromatografia a gás acoplada à

espectrometria de massas. Os experimentos, após 48 h de reação, foram reunidos os três frascos e a mistura reacional foi filtrada e extraída com acetato de etila (10 mL) e água destilada (15 mL). Após extração da fase orgânica por três vezes adicionou-se sulfato de sódio anidro. O solvente foi removido em rotaevaporador e o produto obtido foi purificado cromatografia em coluna utilizando como fase estacionária sílica *gel* e como eluente hexano e acetato de etila (8:2).

4.3.5 Reação de acetilação da benzilamina **2** com acetato de etila

Em um frasco Erlenmeyer de 50 mL adicionou-se a benzilamina **2** (50 μ L, 0,45 mmol) e o acetato de etila (100 mL). A reação permaneceu em agitação magnética por 1 h e posteriormente uma alíquota foi retirada e transferida para um frasco *vial* e analisada em GC-MS.

4.3.6 Identificação dos compostos por GC-MS (EI, 70 eV)

ciclo-hexenona **1**, C_6H_8O , m/z (%): 68 (100), 96 (M^+ , 41), 40 (21), 55 (6), 81 (0,5).

benzilamina **2**, C_7H_9N , m/z (%): 106 (M^+-H , 100), 107 (M^+ , 61), 79 (42), 91 (12), 51 (11), 65 (6).

N-(ciclohex-2-en-1-ilideno)-1-fenilmetanamina **3**, $C_{13}H_{15}N$, m/z (%): 65 (15), 91 (100), 185 (M^+ , 30), 157 (7).

3-(benzilamino)ciclo-hexanona **4**, $C_{13}H_{17}NO$, m/z (%): 91 (100), 146 (44), 160 (32), 203 (M^+ , 30), 133 (27), 106 (31), 65 (13).

3-metilciclohex-2-en-1-ona **5**, $C_7H_{10}O$: m/z (%) 82 (100), 110 (40, M^+), 54 (36), 41 (8).

N-(3-metilciclo-2-en-1-ilideno)-1-fenilmetanamina **7**, $C_{14}H_{17}N$: m/z (%) 91 (100), 199 (M^+ , 30), 65 (17), 184 (11), 79 (10).

2,5-dimetil-*para*-benzoquinona **8**, $C_8H_8O_2$, EI-MS: m/z (%) 136 (M^+ , 100), 68 (66), 79 (28), 108 (29), 40 (28), 96 (22), 121 (3).

4-(benzilimino)-2,5-dimetilcicloexa-2,5-dienona **9**, $C_{15}H_{15}NO$: m/z (%) 225 (M^+ , 100), 148 (70), 224 (52), 209 (23), 77 (14).

N-(2-feniletilideno)benzenamina **10**, $C_{14}H_{13}N$: m/z (%) 65 (17), 91 (100), 92 (37), 117 (11), 194 (40), 195 (M^+ , 38).

acetamida **11**, C₉H₁₁NO: m/z (%) 106 (100), 149 (M⁺, 79), 91 (27), 79 (18), 43 (21).

4.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.4.1 Reação de aza-Michael –Parte A

As reações enzimáticas foram realizadas em agitador orbital (A.O.) e por irradiação micro-ondas (M.O.), utilizando a CALB. Essa lipase é comumente utilizada para promover reações de esterificação e transesterificação de álcoois e aminas, mas é também descrita na literatura o seu uso em reações não usuais, como a adição de Michael (SOUZA et al., 2009; PRIEGO et al., 2009; DHAKE et al., 2010). Desta forma foi interessante investigar este tipo de reação, pois permite a formação da ligação carbono-nitrogênio utilizando enzima.

Reações controles (ausência da CALB) foram também realizadas, uma vez que o grupo amino é um nucleófilo forte e a cetona α,β -insaturada é um bom receptor de Michael, o que poderia favorecer a formação do produto espontaneamente.

A reação enzimática em agitador orbital foi realizada para a ciclo-hexenona **1** e a benzilamina **2**. A escolha desse substrato foi devido ao livre impedimento estérico da cetona **1** na posição de adição-1,4 o que poderia favorecer a formação do aduto de Michael **4** (Esquema 4.8).

Esquema 4.8 - Reação de adição de Michael entre a cetona **1** e amina **2** catalisada por CALB em agitador orbital e por irradiação micro-ondas.

As reações foram realizadas em agitador orbital para diferentes solventes orgânicos (metanol, hexano, éter etílico, diclorometano, tetraidrofurano e tolueno), uma vez que a atividade e seletividade da enzima é fortemente afetada pelo solvente empregado (YU et al., 2007).

Quando a reação enzimática foi realizada em agitador orbital e com metanol, observou-se a formação majoritária de dois picos nos tempos de retenção de 15,5 e 17,0 minutos em 48 h de reação, respectivamente por CG-FID (Figura 4.2).

O produto no tempo de retenção em 15,5 minutos foi favorecido na reação enzimática obtendo uma conversão de 38%. Este produto, possivelmente, apresentou uma maior interação com o sítio ativo da enzima o que garantiu uma maior seletividade em relação à formação do composto minoritário em 17,0 minutos ($c = 14\%$). Enquanto que na reação não enzimática (ausência de lipase) o composto com tempo de retenção de 15,5 minutos apresentou uma conversão de 25% e o composto com tempo de retenção em 17,0 minutos apresentou uma maior conversão ($c = 29\%$), quando comparado à reação enzimática (Figura 4.3).

A seletividade dependerá das condições da reação e do catalisador (HOZ et al., 2001). Reações conduzidas em ambientes não aquosos, a interação entre o solvente orgânico e as moléculas de água ligadas à enzima controla a atividade enzimática. Solventes que são capazes de subtrair essa água estrutural da enzima como o metanol, podem provocar a inativação da enzima.

Figura 4.2 - Reação da cetona **1** com a amina **2** em metanol em agitador orbital (48 h, 33 °C, 133 rpm). (a) Padrão da cetona **1**. (b) Padrão amina **2**. (c) Presença de lipase. (d) Ausência de lipase.

Condições de análises em GC-FID: $T_i = 80\text{ }^{\circ}\text{C}$, $T_f = 250\text{ }^{\circ}\text{C}$, $r = 10\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$, $t = 22\text{ min}$.

Figura 4.3 - Gráficos da reação da cetona **1** com a amina **2** em metanol por agitação orbital em diferentes tempos reacionais (33°C, 133 rpm). (a) Presença de lipase. (b) Ausência de lipase.

Quando a reação de adição de Michael foi realizada na presença de hexano (solvente apolar) e CALB em agitador orbital observou-se também a formação de dois picos nos tempos de retenção de 15,5 minutos ($c = 23\%$) e 17,0 minutos ($c = 25\%$), respectivamente (Figura 4.4). Contudo, em hexano a reação enzimática como a não enzimática (ausência de lipase) favoreceu a formação do pico com maior tempo de retenção (Figura 4.5).

Na literatura é relatado que solventes hidrofóbicos aumentam a atividade e a enantiosseletividade, quando comparado aos solventes hidrofílicos (YADAV; PAWAR, 2012). Em nosso estudo as reações em metanol e hexano não foram eficientes, a alta polaridade dos substratos (cetona **1** e amina **2**) podem ter influenciado estes resultados, uma vez que reações de adição de Michael podem ocorrer de forma espontânea e reversível, produzindo produtos instáveis, sem ser promovido exclusivamente pela CALB (PRIEGO et al., 2009).

Figura 4.4 - Reação da cetona **1** com a amina **2** em hexano em agitador orbital (48 h, 33 °C, 133 rpm). (a) Presença de lipase. (b) Ausência de lipase.

Condições de análises em GC-FID: $T_i = 80\text{ }^{\circ}\text{C}$, $T_f = 250\text{ }^{\circ}\text{C}$, $r = 10\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$, $t = 22\text{ min}$.

Figura 4.5 - Gráficos da reação da cetona **1** com a amina **2** em hexano por agitação orbital em diferentes tempos reacionais (33 °C, 133 rpm). (a) Presença de lipase. (b) Ausência de lipase.

Após os resultados obtidos para esses dois experimentos em metanol e em hexano, realizou-se o experimento em éter etílico, com intuito de verificar o comportamento de outros solventes frente às espécies reagentes, ou seja, a cetona **1** e a amina **2**. Através dos cromatogramas da Figura 4.6 e dos gráficos de barras da Figura 4.7 pode-se verificar que a reação não-enzimática apresentou melhor conversão para os produtos formados em 15,5 minutos ($c = 16\%$) e em 17,0 minutos ($c = 24\%$). Em éter etílico também observou-se uma ligeira preferência do produto com tempo de retenção em 17,0 minutos para as duas condições.

Figura 4.6 - Reação da cetona **1** com a amina **2** em éter etílico em agitador orbital (48 h, 33 °C, 133 rpm). (a) Presença de lipase. (b) Ausência de lipase.

Condições de análises em GC-FID: $T_i = 80\text{ }^{\circ}\text{C}$, $T_f = 250\text{ }^{\circ}\text{C}$, $r = 10\text{ }^{\circ}\text{C/min}$, $t = 22\text{ min}$.

Figura 4.7 - Gráfico da reação da cetona **1** com a amina **2** em éter etílico por agitação orbital em diferentes tempos reacionais (33 °C, 133 rpm). (a) Presença de lipase. (b) Ausência de lipase.

As reações de adição de Michael também foram realizadas em diclorometano onde foi obtido valores muito baixos de conversões ($c < 10\%$) para os produtos com tempos de retenção em 15,5 e 17,0 minutos (Figuras 4.8-4.9). Provavelmente a baixa solubilidade da amina pode ter dificultado o desempenho destas reações.

Figura 4.8 - Reação da cetona **1** com a amina **2** em diclorometano em agitador orbital (48 h, 33 °C, 133 rpm). (a) Presença de lipase. (b) Ausência de lipase.

Condições de análises em GC-FID: $T_i = 80\text{ }^{\circ}\text{C}$, $T_f = 250\text{ }^{\circ}\text{C}$, $r = 10\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$, $t = 22\text{ min}$.

Figura 4.9 - Gráfico da reação da cetona **1** com a amina **2** em diclorometano por agitação orbital em diferentes tempos reacionais (33 °C, 133 rpm). (a) Presença de lipase. (b) Ausência de lipase.

Em solvente tolueno, como pode ser observado nas Figuras 4.10 e 4.11, a reação catalisada pela lipase foi favorecida em relação à reação não enzimática para os produtos formados em tempos de retenção de 15,5 min ($c = 14\%$) e 17,0 min ($c = 11\%$). Na reação não enzimática a formação dos produtos apresentou baixas conversões ($c < 4\%$).

A escolha do solvente depende em grande parte da solubilidade do catalisador e do doador e aceptor de Michael, bem como a capacidade do solvente em evitar a ocorrência de reações secundárias (MATHER et al., 2006).

Figura 4.10 - Reação da cetona **1** com a amina **2** em tolueno em agitador orbital (48 h, 33 °C, 133 rpm). (a) Presença de lipase. (b) Ausência de lipase.

Condições de análises em GC-FID: $T_i = 80\text{ }^{\circ}\text{C}$, $T_f = 250\text{ }^{\circ}\text{C}$, $r = 10\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$, $t = 22\text{ min}$.

Figura 4.11 - Gráficos da reação da cetona **5** com a amina **6** em tolueno por agitação orbital em diferentes tempos reacionais (33 °C, 133 rpm). (a) Presença de lipase. (b) Ausência de lipase.

As reações de adição aza-Michael com a CALB foram também realizadas por irradiação micro-ondas ($T = 40\text{ }^{\circ}\text{C}$, 70 W) para cetona **1** e a amina **2** frente aos solventes (metanol, THF, diclorometano e hexano). Nestas condições o aduto de Michael **4** apresentou conversões de 0,3-42% e a imina **3** variou entre 2-40% de conversão frente aos solventes utilizados. As conversões foram determinadas por GC-MS.

Em metanol obteve-se o melhor resultado para o aduto **4**, apresentando uma conversão de 42% e baixa conversão para a imina **3** ($c = 4\%$) em 3 h de reação. Em hexano e diclorometano somente a imina **3** ($c < 12\%$) foi formada em até 3 h de

reação. Em THF foi obtida uma baixa conversão do aduto **4** ($c < 6\%$) e a imina **3** ($c < 3\%$) em 3 h. Ao realizar as reações por irradiação micro-ondas na ausência de lipase tanto o aduto **4** quanto a imina **3** apresentaram conversões inferiores a 10% em todos os solventes utilizados.

A regioseletividade das reações pode ser dependente das condições em que são realizadas como o tipo de catalisador, o solvente e o nucleófilo (HOZ et al., 2001). Neste estudo tanto a reação na presença quanto na ausência da CALB favoreceu a formação de ambos os produtos via adição-1,2 e adição-1,4, com conversões similares, em geral, baixas.

DHAKE et al. (2010) realizaram diversas reações de aza-Michael com uma ampla variedade de aminas primárias e secundárias com diferentes acrilatos, utilizando uma triagem com oito lipases para obtenção de β -amino-ésteres. Nesses estudos a CALB apresentou o maior rendimento (96%) entre as enzimas avaliadas à temperatura de 60 °C e 3,5 h de reação. Como exemplo desta reação pode-se citar a dietilamina (1 mmol) com o acrilato de metila (2 mmol) em tolueno (3 mL) (60 °C, 3,5 h), que forneceu um rendimento de 89% do aduto de aza-Michael (Esquema 4.9).

Esquema 4.9 - Adição de Michael catalisada por CALB por diferentes aminas e acrilatos.

Neste estudo também foi observado que a atividade da enzima diminuiu a temperaturas mais elevadas (80 °C), o rendimento da reação passou para 75%, possivelmente devido a inativação da enzima (DHAKE et al., 2010).

Diante dos resultados obtidos para todos os solventes investigados optou-se em realizar o isolamento dos produtos formados nos tempos de retenção em 15,5 e 17,0 minutos em hexano frente à reação catalisada pela lipase de *C. antarctica*.

Selecionou-se este solvente, pois a reação apresentou um cromatograma mais limpo, ou seja, sem a presença de outros picos, que poderiam dificultar o isolamento dos produtos desejados.

Após a extração das reações que foram realizadas em triplicata procedeu-se a purificação por cromatografia em coluna utilizando sílica *gel* e hexano/acetato de etila como eluentes. Análises por cromatografia em camada delgada mostraram formação de produtos mais polares em comparação a cetona (Figura 4.12).

Figura 4.12 - Placa de CCD obtida da reação entre a cetona **1** e a amina **2** por agitação orbital após 24 horas de reação em hexano.

Após tentativas de purificação cromatográfica observou-se que nenhum produto foi isolado. Análises cromatográficas por CCD e CG-FID mostraram a presença dos materiais de partida, ou seja, a ciclo-hexenona **1** e a benzilamina **2**. Estas informações foram importantes, pois evidenciaram uma possível reação de retro-Michael catalisada em presença da sílica, cuja a reação pode ser catalisada em meio ácido ou básico. Através do Esquema 4.10 pode-se observar a possível reação de retro-Michael para o aduto **4** formado em meio ácido.

Esquema 4.10 - Reação retro-Michael do aduto 4 catalisada em meio ácido.

Devido à instabilidade intrínseca da imina 3 obtida via adição-1,2, o seu isolamento não foi possível, uma vez que esta sofre hidrólise inclusive na presença de traços de água. Destaca-se também que a produção da imina 3 foi baixa frente aos solventes utilizados, portanto seu isolamento não foi possível.

Assim, a mesma reação em hexano foi novamente realizada e analisada por cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC-MS) para comprovar a formação dos produtos 3 e 4. Nas análises por GC-MS verificou-se a presença da ciclo-hexenona 1, da benzilamina 2, da *N*-cicloexilideno(fenil)metanamina 3 e a 3-(benzilamino)cicloexanona 4.

O pico no cromatograma obtido por GC-MS (Figura 4.13) com tempo de retenção de 14,5 minutos forneceu o espectro de massas da Figura 4.13c. A formação a *N*-cicloexilideno(fenil)metanamina 3 era esperada para este tipo de reação frente aos reagentes utilizados (Esquema 4.8). No espectro de massas de baixa resolução (70 eV) observou-se o íon molecular com m/z 185 u.m.a., o qual apresentou semelhanças de fragmentação ao registrado na biblioteca Nist 5.0 (Figura 4.13c). A formação do íon tropílio (m/z 91 u.m.a) como sendo pico base também reforçou a identidade da imina 3. O não isolamento deste produto por cromatografia em coluna também está de acordo, devido a sua pouca estabilidade.

O pico com o tempo de retenção de 15,9 minutos obtido no cromatograma por GC-MS forneceu no espectro de massas a presença do íon molecular com m/z 203

u.m.a. condizente com a 3-(benzilamino)cicloexanona **4**. Este pico coincide com a formação do aduto proveniente da adição-1,4 entre a cetona **1** e a amina **2**. Também seu espectro de massas foi semelhante ao registrado na biblioteca Nist 5.0 (Figura 4.13d). Ainda foi verificada a formação do íon tropílio m/z 91 u.m.a.

Figura 4.13 Cromatograma e espectros de massas (70 eV) obtidos por GC-MS para a reação da cetona **1** com a amina **2** em hexano por agitação orbital por 4 dias (33 °C, 133 rpm). (a) Padrão da cetona **1**. (b) Padrão da amina **2**. (c) Espectro de massas obtido a partir do sinal com tempo de retenção em 14,5 minutos. (d) Espectro de massas obtido a partir do sinal com tempo de retenção em 15,9 minutos.

Condições de análises em GC-MS: $T_i = 50\text{ }^{\circ}\text{C}$, $T_f = 270\text{ }^{\circ}\text{C}$, $r = 10\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$, $t = 32\text{ min}$.

Assim, concluiu-se que nestes estudos foi possível obter os produtos de adição-1,2 e adição-1,4 a partir da enona **1** e da amina **2** (Esquema 4.11). Entretanto, devido a pouca estabilidade dos produtos, estes foram inicialmente caracterizados por espectrometria de massas. Como o rendimento destas reações foram baixos, não seria interessante dar continuidade na purificação dos produtos.

Esquema 4.11 Provável clivagem da ligação β do anel aromático fornecendo o íon tropílio.

Na literatura é descrito alguns trabalhos envolvendo a reação da cetona **1** e da amina **2**. Entretanto, a maioria destes estudos não descreve a purificação do aduto de Michael **4**, sendo fornecidos, somente dados de conversões por métodos cromatográficos. Na Tabela 4.3 tem-se um resumo dos trabalhos da literatura. Zhang et al. (2005) descreveram a caracterização por RMN 1H e IV para o aduto **4**.

Tabela 4.3 - Reações de adição de Michael entre a cetona **1** e a amina **2** descritos na literatura.

cetona 1	amina 2	Condições	Rendimento do aduto aza-Michael 4	Referências
1,5 mmol	1 mmol	30 mol% de líquido iônico básico [Bmim]OH, 6 h de reação, t.a.	84%. Determinado por GC-FID.	<i>Tetrahedron Lett.</i> 2006, 47(44), 7723-7726.
1,5 mmol	1 mmol	3 mL de líquido iônico [Bmim]PF ₆ , t.a.	85%. Isolado por extração com éter dietílico (dados espectroscópicos não fornecidos)*.	<i>Chemistry Lett.</i> 2003, 32(11), 988-989.
1,2 mmol	1,0 mmol	10 mol% de PANI-In e H ₂ O (2 mL), t.a.	90%. Isolado (dados espectroscópicos não fornecidos)*.	<i>J. Mol. Catal. A: Chemical</i> , 2007, 265(1-2), 244-249.
1,0 mmol	1,2 mmol	5 mol% de catalisador acetato de vanadila (IV), t.a.	91%. Isolado em sílica gel (dados espectroscópicos não fornecidos)*.	<i>Synth. Comm.</i> 2008, 38(20), 3556-3566.
-	-	catalisador Cu(OAc) ₂ em água 12 h de reação, t.a.	82%. Sem acesso a literatura informada.	<i>Synlett</i> , 2003, (15), 2425-2427.
0,146 mmol	0,145 mmol	catalisador (IPr)Cu(NHPh) 5 mol% em C ₆ D ₆ (0,5 mL), t.a. 2,5 h de reação.	90%. Isolado por RMN (dados espectroscópicos não fornecidos)*.	<i>Organometallics</i> , 2007, 26(6), 1483-1493.
1,2 mmol	1,0 mmol	catalisador Cu(OCOC) ₂ 2 mol% e líquido iônico [bmim]BF ₄ 1 mL, t.a. por 15 min.	80%. Isolado por RMN (dados espectroscópicos não fornecidos)**.	<i>Adv. Synth. Catal.</i> 2005, 347, 763-766.
10 mmol	10 mmol	catalisador RuCl ₃ .H ₂ O 0,05 mmol.	89%. Isolado por coluna cromatográfica em sílica gel e fornecido dados de RMN ¹ H e IV.	<i>Synthesis</i> , (13), 2129-2136, 2005

*Literatura citada não encontrada nas bases de dados.

**Comparados com padrões autênticos.

4.4.2 Reação de aza-Michael –Parte B

A próxima etapa foi avaliar a regioseletividade da reação de Michael, utilizando o aceptor de Michael substituído, 3-metil-ciclo-hex-2-en-1-ona **5** e a benzilamina **2** catalisada pela CALB em agitador orbital e por irradiação micro-ondas. A enona **5** tem um grupo metila que pode dificultar a adição-1,4.

Analizando a reação de adição de Michael entre a amina **2** e a cetona **5** é possível obter em uma primeira análise a formação dos adutos de Michael **6** e **7**, via adição-1,2 e adição-1,4, respectivamente (Esquema 4.12).

Esquema 4.12 - Reação de adição de Michael entre a amina **2** e a cetona **5**.

As reações foram realizadas na presença e na ausência de CALB em agitador orbital, com os solventes hexano e metanol. Quando a reação de adição de Michael foi realizada em metanol apresentou uma conversão de 27% na presença da CALB, e na ausência de lipase (c = 38%) com 24 horas de reação. Em ambos os experimentos realizados pode-se observar um comportamento semelhante, onde foi obtido um sinal no cromatograma com um tempo de retenção em 18,5 minutos (c = 27-38%), que poderia ser um dos adutos de Michael formado **6** ou **7**, devido a reatividade do grupo amino **2** com o composto carbonílico **5** (Esquema 4.12).

Na Figura 4.14 tem-se os cromatogramas e na Figura 4.15 os gráficos de barras referentes às reações de adição de Michael em metanol, na presença e na ausência de lipase, por agitação orbital.

Figura 4.14 - Reação da cetona **1** com a amina **5** em metanol em agitador orbital (24 h, 33 °C, 133 rpm). (a) Padrão da amina **2**. (b) Padrão da cetona **5**. (c) Presença de lipase. (d) Ausência de lipase.

Condições de análises em GC-FID: $T_i = 80\text{ }^{\circ}\text{C}$, $T_f = 250\text{ }^{\circ}\text{C}$, $r = 10\text{ }^{\circ}\text{C/min}$, $t = 22\text{ min}$.

Figura 4.15 - Gráficos da reação da amina **1** com a cetona **2** em metanol por agitação orbital em diferentes tempos reacionais (33°C, 130 rpm). (a) Presença de lipase. (b) Ausência de lipase.

Quando a reação de adição de Michael foi realizada em hexano, um solvente hidrofóbico, observou-se através das análises dos cromatogramas que a reação catalisada enzimaticamente formou um sinal com tempo de retenção também em 18,5 minutos ($c = 30\%$). Enquanto que na ausência de lipase, em hexano, a reação praticamente não foi efetiva (Figura 4.16). Ainda, estes resultados com a lipase em

hexano foram inferiores em relação às reações não enzimáticas em metanol. O hexano é um solvente apolar e as lipases em geral atuam muito bem em meio orgânico. Na literatura são descritos excelentes resultados de resolução enzimática com a lipase de *C. antarctica* em hexano (RIBEIRO et al., 2012). Entretanto, a amina **2** utilizada neste estudo é relativamente polar, o que pode ter levado a um menor desempenho da reação no solvente apolar, devido a falta de miscibilidade entre os reagentes.

Nestas reações, o grupo metila na posição 3 da enona **5** dificultou, a adição-1,4 de Michael, provavelmente por efeitos estéricos e também eletrônicos. Quanto mais impedido o grupo substituinte, mais desfavorável torna-se adição-1,4 (MATHER et al., 2006).

Estes resultados levaram a formação de um único composto com o tempo de retenção de 18,5 minutos. Pode-se sugerir que neste caso a obtenção deste produto pode ocorrer enzimaticamente ou mesmo espontaneamente. Os resultados da reação de adição de Michael em hexano com e sem lipase estão representados nas Figuras 4.16-4.17.

Figura 4.16 - Reação da cetona **5** com a amina **2** em hexano em agitador orbital (24 h, 33 °C, 133 rpm). (a) Presença de lipase. (b) Ausência de lipase.

Condições de análises em GC-FID: $T_i = 80\text{ }^{\circ}\text{C}$, $T_f = 250\text{ }^{\circ}\text{C}$, $r = 10\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$, $t = 22\text{ min}$.

Figura 4.17 - Gráficos da reação da amina **2** e com a cetona **5** em hexano por agitação orbital em diferentes tempos reacionais (33°C, 133 rpm). (a) Presença de lipase. (b) Ausência de lipase.

Devido a baixa reatividade obtida nas reações de adição de Michael entre a amina **2** e a cetona **5** nos experimentos discutidos anteriormente, procurou realizar estas reações por irradiação micro-ondas para verificar um melhor desempenho na obtenção do produto majoritário com tempo de retenção em 18,5 minutos. Estas reações foram realizadas às temperaturas de 33 °C e 50 °C na potência de 70 W, bem como realizada na ausência da lipase.

Através das análises cromatográficas foi possível verificar que as reações em metanol e diclorometano por irradiação micro-ondas (33 °C, 70 W), mesmo na presença da CALB, praticamente não ocorreram ($c < 5\%$), pois não se observou a formação do produto no tempo de retenção em 18,5 minutos (Figura 4.18). Isso poderia ser consequência da utilização de uma baixa temperatura no reator micro-ondas (33 °C, 70 W).

Figura 4.18 - Reação da cetona **5** com a amina **2** na presença de CALB em metanol por irradiação micro-ondas (2 h, 33 °C, 133 rpm).

Condições de análises em GC-FID: $T_i = 80\text{ }^{\circ}\text{C}$, $T_f = 250\text{ }^{\circ}\text{C}$, $r = 10\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$, $t = 22\text{ min}$

Yu et al. (2007) estudaram o efeito da temperatura na atividade e na enantiosseletividade da lipase de *C. antarctica* frente a reação de transesterificação do ($\pm$)-2-octanol. Neste estudo avaliou-se a variação de temperatura em um intervalo de 40-100 °C, onde verificou que atividade da enzima aumentou com o aumento da temperatura entre 40-80 °C, seguida de uma diminuição às temperaturas mais elevadas. De acordo com os autores, quando a temperatura da reação é elevada no reator micro-ondas aumenta a probabilidade de colisão entre enzima e as moléculas do substrato, o que poderia favorecer a formação do complexo enzima-substrato e assim aumentar a taxa de conversão da reação (YU et al., 2007).

No entanto, nos experimentos realizados na reação de adição de Michael entre a amina **2** e a cetona **5** não foi observado um desempenho da reação por a irradiação micro-ondas. Certamente, as características estruturais dos compostos também influenciaram estas reações. A amina **2** por ser um nucleófilo bastante reativo, pode estar interagindo com outras partes protéicas da lipase que não estejam voltadas para o seu sítio ativo, fazendo com que a reação de adição de Michael não ocorra nestas condições.

Devido à baixa reatividade destas reações em metanol e diclorometano à temperatura de 33 °C, elevou-se a temperatura do meio reacional para 50 °C (70 W), onde se observou um melhor desempenho da reação na formação do produto com tempo de retenção em 18,5 minutos (Figura 4.19). Entretanto, não houve diferença significativa entre a reação catalisada enzimaticamente ($c = 10\%$) e a reação controle na ausência de lipase ($c = 11\%$) à temperatura de 50 °C (70 W). Destaca-se que em

ambos os casos a reação por irradiação micro-ondas ocorreu com baixa produção do composto com tempo de retenção em 18,5 minutos (Figura 4.19).

Figura 4.19 - Reação da cetona **5** com a amina **2** em metanol por irradiação micro-ondas (2 h, 50 °C, 133 rpm). (a) Presença de lipase. (b) Ausência de lipase.

Condições de análises em GC-FID: $T_i = 80\text{ }^{\circ}\text{C}$, $T_f = 250\text{ }^{\circ}\text{C}$, $r = 10\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$, $t = 22\text{ min}$

As reações por irradiação micro-ondas em hexano também foram realizadas à temperatura de 50 °C (70 W) na presença e na ausência da lipase. No entanto, em ambos os casos, as conversões foram baixas ($c < 5\%$). As reações em micro-ondas são fundamentadas pelo rápido aquecimento das espécies através do efeito promovido pelo “aquecimento dielétrico”. Este efeito é dependente da capacidade dos solventes e / ou reagentes em absorver as micro-ondas e convertê-las em calor (CORRÊA; BUENO, 2009). Solventes que apresentam um alto valor de fator de perda ($\tan \delta$) aquecem mais rapidamente, o que não é o caso do solvente hexano que apresenta uma baixa absorção das micro-ondas ($\tan \delta < 0,1$), o que pode também ter influenciado no baixo valor de conversão nessa reação (PILISSÃO et al., 2012).

Os cromatogramas por espectrometria de massas para as reações entre a amina **2** e a cetona **5** também foram obtidos, onde foram adquiridos os espectros de massas para as espécies reagentes e o possível aduto de Michael **7** (Figura 4.20).

Análise do cromatograma mostrou a presença de um pico com tempo de retenção em 15,9 minutos (Figura 4.20). O espectro de massas deste pico apresentou um fragmento com íon molecular m/z 199, correspondente à formação da imina **7**. Devido a alta reatividade e instabilidade da imina **7**, uma vez formada no meio

reacional, rapidamente é hidrolisada, o que sugere sua baixa formação em todas as condições investigadas.

Para comprovar sua formação e instabilidade a reação foi realizada em metanol e após a obtenção do aduto **7** com tempo de retenção em 18,5 minutos (GC-FID), adicionou-se 10 mL de água destilada e a reação foi mantida agitação por um período de 1 hora. Em seguida a reação foi extraída e analisada por cromatografia a gás acoplada à espectrometria de massas, apresentando somente as espécies reagentes **2** e **5**.

Figura 4.20 - Cromatograma e espectros de massas (70 eV) obtidos por GC-MS. (a) Amina **2**. (b) Cetona **5**. (c) Espectro obtido a partir do sinal com tempo de retenção em 15,9 minutos do cromatograma obtido da reação enzimática entre a amina **2** e a cetona **5** em hexano 24 h em agitação orbitalar.

Condições de análises em GC-MS: $T_i = 50\text{ }^{\circ}\text{C}$, $T_f = 270\text{ }^{\circ}\text{C}$, $r = 10\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$, $t = 32\text{ min}$.

4.4.3 Reação de aza-Michael –Parte C

A terceira investigação realizada para a reação de aza-Michael foi com a benzilamina **2** e o composto sintético 2,5-dimetil-*p*-benzoquinona **8**. A 2,5-dimetil-*p*-benzoquinona **8** foi sintetizada pela Doutoranda Marciana P. Uliana do grupo do Prof. Dr. Timothy J. Brocksom do Departamento de Química da Universidade Federal de São Carlos (DQ-UFSCar). A reação de adição de Michael foi realizada com a lipase de *C. antarctica* em agitador orbital e por irradiação micro-ondas para amina **2** e a cetona **8** (Esquema 4.13).

Esquema 4.13 - Reação de adição de Michael entre a benzilamina **6** e benzoquinona **8**.

A reação de aza-Michael catalisada pela CALB foi realizada em agitador orbital (33 °C, 133 rpm) em hexano. Após 5 horas de reação obteve-se dois sinais com tempos de retenção em 12,8 e 13,8 minutos, que apresentaram baixos valores de conversão ($c < 3\%$) via análises por GC-FID (Figura 4.21). Algumas vezes as reações catalisadas por lipases requerem um tempo mais prolongado para que a reação enzimática ocorra de forma satisfatória. Assim, manteve-se a reação por 4 dias em agitador orbital (Figura 4.22). Analisando-se os dados obtidos no cromatograma da Figura 4.22 por GC-MS (70 eV) pode-se observar a obtenção de dois picos majoritários com tempos de retenção em 15,0 e 19,0 minutos. Estes picos foram analisados posteriormente quando realizou-se as reações também por irradiação micro-ondas.

Figura 4.21 - Cromatogramas obtidos por CG-FID. (a) Padrão da benzilamina **2**. (b) Padrão da 2,5-dimetil-*p*-benzoquinona **8**. (c) Reação de adição de Michael após 5 horas em agitador orbital e hexano (33 °C, 133 rpm).

Condições de análises em GC-FID: $T_i = 80\text{ }^{\circ}\text{C}$, $T_f = 250\text{ }^{\circ}\text{C}$, $r = 10\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$, $t = 22\text{ min}$.

Figura 4.22 - Cromatograma obtido por GC-MS da reação enzimática entre a benzilamina **2** e a benzoquinona **8** por agitação orbital após 4 dias (33°C, 133 rpm).

Condições de análises em GC-FID: $T_i = 50\text{ }^{\circ}\text{C}$, $T_f = 270\text{ }^{\circ}\text{C}$, $r = 10\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$, $t = 32\text{ min}$

Em seguida, a mesma reação foi realizada por irradiação micro-ondas com o intuito de verificar o comportamento dessa frente o campo magnético aplicado, já que a irradiação micro-ondas pode diminuir o tempo da reação em relação à agitação orbital que foi de 4 dias, bem como possibilitar melhor conversão.

Nesse caso, a reação por irradiação micro-ondas foi realizada à temperatura de 60 °C (70 W) já que segundo um estudo realizado por YU et al. (2007) mostraram que a CALB apresentou maior atividade nessa temperatura. BACHU et al. (2007) também mostraram que a CALB apresentou uma boa estabilidade térmica e atividade entre 70-90 °C.

O uso da irradiação micro-ondas para acelerar as reações tem sido observado para uma gama de reações orgânicas. As lipases apresentam uma pequena camada de hidratação que atua como componente primário do microambiente enzimático, servindo de tampa entre a superfície da enzima e o ambiente externo. Em reações conduzidas em solventes não aquosos, a interação entre os solventes orgânicos e as moléculas de água ligadas à enzima controla a atividade enzimática (COSTA; AMORIM, 1999).

Através dos cromatogramas obtidos por GC-MS da Figura 4.23, foi observado um pico no tempo de retenção de 15,0 minutos referente à reação realizada por irradiação micro-ondas na ausência de lipase (3 h). Enquanto que a reação enzimática por irradiação micro-ondas após 5 horas observou-se também a formação de um outro pico no tempo de retenção de 19,0 minutos. Destaca-se que nessa reação o pico da benzilamina **2** ($t = 5,4$ min.) não apareceu no cromatograma, mostrando que esses reagente foi consumido na reação após 5 horas.

Figura 4.23 - Cromatogramas obtidos por CG-MS (70 eV). (a) Reação não enzimática por irradiação micro-ondas (3 h, 60 °C, 70 W). (b) Reação enzimática por irradiação micro-ondas (5 h, 60 °C, 70 W).

Condições de análises em GC-FID: $T_i = 50$ °C, $T_f = 270$ °C, $r = 10$ °C/min, $t = 32$ min

A partir das Figuras 4.22 e 4.23 observou-se a formação de dois compostos com os tempos de retenção em 15,0 e 19,0 minutos para os dois experimentos realizados (agitador orbital e irradiação micro-ondas).

Na Figura 4.24 tem-se o cromatograma e os espectros de massas de alguns picos que foram selecionados devido a formação de produtos que envolvem os substratos **2** e **8** utilizados nestas reações. A análise do espectro de massas (Figura 4.24c) mostra a presença do íon molecular m/z 225, o qual também corresponde ao pico base (100 %). O segundo pico mais abundante no espectro de massas (75 %) apresenta m/z 148, evidenciando que houve uma perda de 77 u.m.a em relação ao íon molecular (m/z 225). A representação do íon molecular e do fragmento m/z 148 está no Esquema 4.14. Portanto através, destas informações foi possível sugerir que a estrutura obtida m/z 225 corresponde a imina 4-(benzilimino)-2,5-dimetilcicloexa-2,5-dienona **9**.

Esquema 4.14 - Representação do íon molecular e do segundo fragmento mais abundante obtido no espectro de massas da imina **9**.

O outro pico no cromatograma com o tempo de retenção em 19,0 minutos teve seu espectro obtido (Figura 4.24d). O espectro de massas forneceu a presença do íon molecular com m/z 195 e o pico base com m/z 91. Ainda o espectro de massas foi coincidente com um padrão registrado na biblioteca Nist 5.0, onde foi possível sugerir uma estrutura que corresponde a imina *N*-(2-feniletilideno)benzenamina **10**.

A formação da *N*-(2-feniletilideno)benzenamina **10** pode ser sugerida através do ataque nucleofílico da benzilamina **2** na imina 4-(benzilimino)-2,5-dimetilcicloexa-2,5-dienona **9** (Esquema 4.15). Como a reação em agitação orbital após 5 horas de reação não formou nenhum produto com alto rendimento, sugere-se que a reação por irradiação micro-ondas favoreceu a formação de novos produtos frente as reatividades das espécies envolvidas no meio reacional para o mesmo tempo

reacional (5 h). O pico com tempo de retenção 4,75 min corresponde ao benzaldeído **12** que pode ser formado a partir da hidrólise da imina **10** (Figura 4.24e).

Esquema 4.15 - Proposta de reação para formação da imina **10** frente a reação em micro-ondas (5 h) e agitador orbital (96 h).

Figura 4.24 - Cromatograma e espectros de massas (70 eV) obtidos por CG-EM da reação de aza-Michael entre a benzilamina **2** e a benzoquinona **8** por irradiação micro-ondas após 5 horas. (a) Benzilamina **2**. (b) Benzoquinona **8**. (c) Espectro de massas obtido no tempo de retenção de 15,0 minutos. (d) Espectro de massas obtido no tempo de retenção de 19,0 minutos. (e) Espectro de massas da amida **11**. (f) Espectro de massas do benzaldeído **12**.

Condições de análises em GC-FID: $T_i = 50\text{ }^{\circ}\text{C}$, $T_f = 270\text{ }^{\circ}\text{C}$, $r = 10\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$, $t = 32\text{ min}$

De acordo com os resultados discutidos anteriormente, diante da instabilidade e reatividade das iminas **9** e **10** formadas, realizou-se uma reação de hidrólise para confirmar a formação destes compostos. Assim, as reações foram realizadas em triplicata em agitador orbital (4 dias) e por irradiação micro-ondas (5 h) na presença e na ausência da lipase de *C. antarctica*.

Todas as reações em triplicata foram reunidas e analisadas por GC-MS (Figura 4.25). Em seguida essas reações foram submetidas à reação de hidrólise, adicionando-se 1 mL de água destilada em cada frasco reacional e mantendo-se as soluções em agitação magnética por 24 horas (Figura 4.25a). Posteriormente, realizou-se uma extração com acetato de etila e analisou por GC-MS, obtendo-se o cromatograma da Figura 4.25b (RIBEIRO et al., 2014).

Figura 4.25 - Cromatogramas obtidos por GC-MS (70 eV) (a) Análise da reação entre a amina **2** e a cetona **8** após reunião das reações em triplicata por agitação orbital (4 dias) e micro-ondas (5 h). (b) Análise da reação após extração em acetato de etila e água após 24 horas.

Condições de análises em GC-FID: $T_i = 50\text{ }^{\circ}\text{C}$, $T_f = 270\text{ }^{\circ}\text{C}$, $r = 10\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$, $t = 32\text{ min}$.

Através da reação de hidrólise observou-se que os compostos **9** ($t_r = 15,0$ min.) e **10** ($t_r = 19,0$ min.) foram hidrolisados, comprovando a formação das iminas **9** e **10**. Estes resultados estão de acordo com as estruturas das iminas **9** e **10** que foram

propostas pelas análises dos espectros de massas, uma vez que são facilmente hidrolisadas. No Esquema 4.16 encontra-se a reação de hidrólise das iminas **9** e **10**.

Esquema 4.16 - Extração da reação de aza-Michael com acetato de etila e água em agitador orbital (24 h, 33 °C, 133 rpm).

Como pode ser observado no cromatograma da reação de hidrólise (Figura 4.25b) não se observou o pico da benzilamina **2** ($t_r = 5,4$ min.). No entanto, a benzilamina **2** também foi identificada na forma da correspondente acetamida **11**, pois a acetilação da amina ocorreu espontaneamente durante a extração com acetato de etila. O tempo de retenção da acetamida corresponde a 11,3 minutos (Figura 4.25e). Inclusive realizou-se a acetilação da benzilamina com acetato de etila comprovando a sua formação no meio reacional (Esquema 4.17). Finalizando estes estudos também na Figura 4.24f (espectro de massas) e na Figura 4.25b confirmaram a presença do benzaldeído **12**, formado a partir da hidrólise da imina **10**.

Esquema 4.17 - Acetilação da amina **2** com acetato de etila.

4.5 CONCLUSÃO

Para a reação de aza-Michael entre a ciclo-hexenona **1** e a benzilamina **2** em agitador orbital e por irradiação micro-ondas foram obtidos os adutos de adição-1,2 (*N*-cicloexilideno(fenil)metanamina) **3** e adição-1,4, a (3-(benzilamino)cicloexanona) **4**, respectivamente. Dentre os diferentes solventes utilizados o hexano e metanol apresentaram melhores conversões ($c = 25-38\%$). As reações em metanol apresentaram melhores resultados para as reações não-enzimáticas (ausência de lipase).

Para a reação de adição de Michael entre a benzilamina **2** e a 3-metil-2-ciclohexen-1-ona **5** apenas foi obtido o aduto de adição-1,2, a (*N*-(3-metilciclo-2-en-1-ilideno)-1-fenilmetanamina) **7**. A reação ocorreu via ataque nucleofílico do grupo amino ao carbono carbonílico do aceptor de Michael. O produto de adição-1,4 poderia estar sendo desfavorecido devido a efeitos estéricos e eletrônicos do grupo metila na posição 3 do substrato carbonílico.

Através dos resultados obtidos da reação entre a benzilamina **2** e a 2,5-dimetil-*p*-benzoquinona **8** pode-se observar a formação exclusiva do aduto de Michael via adição-1,2, o (4-(benzilamino)-2,5-dimetilcicloexa-2,5-dienona) **9**.

A obtenção das iminas pouco estáveis nas condições reacionais realizadas foi confirmada pela reação de hidrólise destes compostos, cujos produtos forneceram os materiais de partida. A formação dos produtos majoritários foi confirmada através da interpretação dos espectros de massas e pelas reações de hidrólise, os quais foram regenerados nos materiais de partida e confirmados com padrões autênticos.

Sendo assim, as baixas conversões e a instabilidade dos produtos formados levou a concluir que esta reação não é viável de ser obtida sinteticamente nestas condições realizadas. Destaca-se também que esta reação não é viável de ser realizada na presença de CALB, uma vez que a reação também ocorreu espontaneamente. Possivelmente, estas reações realizadas em reatores de micro-ondas na ausência de umidade, devem favorecer melhores rendimentos das iminas via aza-Michael. Porém, o equipamento disponível não oferece estas condições.

5. REFERÊNCIAS

- AHN, Y.; KO, S-B.; KIM, M-J.; PARK, J. Racemization catalysts for the dynamic kinetic resolution of alcohols and amines. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 252, p. 647-658, 2008.
- ATKINS, P.; JONES, L. **Princípios de química**: questionando a vida moderna e o meio ambiente. Porto Alegre: Bookman, 2012. 587 p.
- BACHU, P.; GIBSON, J. S.; SPERRY, J.; BRIMBLE, M. A. The influence of microwave irradiation on lipase-catalyzed kinetic resolution of racemic secondary alcohols. **Tetrahedron: Asymmetry**, v. 18, n. 13, p. 1618-1624, 2007.
- BARKOVA, K.; KINNE, M.; ULLRICH, R.; HENNIG, L.; FUCHS, A.; HOFRICHTER, M. Regioselective hydroxylation of diverse flavonoids by an aromatic peroxygenase. **Tetrahedron**, v. 67, n. 26, p. 4874-4878, 2011.
- BASSYOUNI, F. A.; ABU-BAKR, S. M.; REHIM, M. A. Evolution of microwave irradiation and its application in green chemistry and biosciences. **Research on Chemical Intermediates**, v. 38, n. 2, p. 283-322, 2012.
- BERG, J. M.; TYMOCZKO, J. L.; STRYER, L. Enzymes: Basic concepts and kinetics. In: JULET, M.; MORAN, S.; DI VITTORIO, S. (Ed.). **Biochemistry**. New York: Freeman and Company, 2007. v. 1, p. 189-192.
- BOGAR, K.; BACKVALL, J. E. High-yielding metalloenzymatic dynamic kinetic resolution of fluorinated aryl alcohols. **Tetrahedron Letters**, v. 48, n. 31, p. 5471-5474, 2007.
- BUGG, T. All enzymes are proteins. In: BUGG, T. (Ed.). **Introduction to enzyme and coenzyme chemistry**. 2 nd. ed. Oxford: Blackwell, 2004. v. 1, p. 103-135.
- CAO, C.; FUKAE, T.; YAMAMOTO, T.; KANAMARU, S.; MATSUDA, T. Purification and characterization of fluorinated ketone reductase from *Geotrichum candidum* NBRC 5767. **Biochemical Engineering Journal**, v. 76, p. 13-16, 2013.
- CAREY, F. A.; SUNDBERG, R. J. **Advanced organic chemistry Part A**: Structure and mechanisms. New York: Plenum, 1984. 823 p.
- CASAS, J.; NAJERA, C.; SANSANO, J. M.; SAA, J. M. Enantioselective addition of trimethylsilyl cyanide to aldehydes by catalysed by bifunctional BINOLAM-AlCl versus monofunctional BINOL-AlCl complexes. **Tetrahedron**, v. 60, n. 46, p. 10487-10496, 2004.

- CHEN, C. S.; FUGIMOTO, Y.; GIRDAUKAS, G.; SIH, C. J. Quantitative analysis of biochemical kinetic resolutions of enantiomers. **Journal of the American chemical Society**, v. 104, n. 25, p. 7294-7299, 1982.
- CLAYDEN, G.; GREEVES, N.; WARREN, S.; WOTHERS, P. **Organic chemistry**. New York: Oxford, 2001. 234 p.
- CORRÊA, A. G. BUENO, M. A. Reações químicas por ultrassom e irradiação de microondas In: CORRÊA, A. G.; ZUÍN, V. G. (Ed.). Química verde: fundamentos e aplicações. São Carlos: EduFSCar, 2009. v. 5, p. 61-83.
- COSTA, P.; PILLI, R.; PINHEIRO, S.; VASCONCELLOS, M. **Substâncias carboniladas e derivados**. Porto Alegre: Bookman, 2003. 411 p.
- COSTA, V. E. U.; DE AMORIM, H. L. N. O emprego de lipases como agentes de resolução cinética de enantiômeros em síntese orgânica: aspectos gerais sobre a influência do solvente. **Química Nova**, v. 22, n. 6, p. 863-873, 1999.
- DALLA-VECCHIA, R. Aplicações sintéticas de lipases imobilizadas em polímeros. **Química Nova**, v. 27, n. 4, p. 623-630, 2004.
- DANDAPANI, S.; CURRAN, D. P. Second generation fluorous DEAD reagents have expanded scope in the Mitsunobu reaction and retain convenient separation features. **Journal of Organic Chemistry**, v. 69, p. 8751-8757, 2004.
- DAS A; KURESHY, R. I.; PRATHAP, K. J.; CHOUDHARY, M. K.; RAO, G. V. S.; KHAN, N-U. H.; ABDI, S. H. R.; BAJAJ, H. C. Chiral recyclable Cu(II)-catalysts in nitroaldol reaction of aldehydes with various nitroalkanes and its application in the synthesis of a valuable drug (R)-isoproterenol. **Applied Catalysis A: General**, v. 459, p. 97-105, 2013.
- DEGANI, M. S.; KAKWANI, M. D. A single-step, mild, neutral, catalyst-free method for cyanohydrins synthesis. **Monatshefte für Chemie/Chemical Monthly**, v. 143, n. 3, p. 461-465, 2012.
- DHAKE, K. P.; DESHMUKHA, K. M.; WAGHA, Y. S.; SINGHALB, R. S.; BHANAGE, B. M. Investigation of steapsin lipase for kinetic resolution of secondary alcohols and synthesis of valuable acetates in non-aqueous reaction medium. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 77, p. 15-23, 2012.
- DHAKE, K. P.; TAMBADE, P. J.; SINGHAL, R. S.; BHANAGE, B. M. Promiscuous *Candida antarctica* lipase B-catalyzed synthesis of α -aminoesters via aza-Michael addition of amines to acrylates. **Tetrahedron Letters**, v. 51, n. 33, p. 4455-4458, 2010.

- DINH, P. M.; HOWARTH, J. A.; HUDNOTT, A. R.; WILLIAMS, J. M. J. Catalytic racemisation of alcohols: applications to enzymatic resolution reactions. **Tetrahedron Letters**, v. 37, n. 42, p. 7623-7626, 1996.
- DOCKAL, E. R.; CASS, Q. B.; BROCKSOM, T. J.; BROCKSOM, U.; CORRÊA, A. G. SYNTH. A simple and efficient synthesis of thymoquinone and methyl *p*-benzoquinone. **Synthetic Communications**, v. 15, p. 1033-1036, 1985.
- EMA, T.; KADOYA, T.; AKIHARA, K.; SAKAI, T. Chemoenzymatic synthesis of optically active alcohol and β -amino-acid derivative containing the difluoromethylene group. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 66, n. 1-2, p. 198-202, 2010.
- ESKILSSON, C. S.; BJÖRKLUND, E. Analytical-scale microwave-assisted extraction. **Journal of Chromatography A**, v. 902, n. 12, p. 227-250, 2000.
- FABER, K. **Biotransformations in organic chemistry**. 5 th ed. New York: Springer-Verlag, 2004. 454 p.
- FORNI, A.; MORETTI, I.; PRATI, F.; TORRE, G. Stereochemical control in yeast reduction of fluorinated β -diketones. **Tetrahedron**, v. 50, n. 41, p. 11995-12000, 1994.
- FORTUNY, M.; RAMOS, A. L. D.; DARIVA, C.; EGUES, S. M. da S.; SANTOS, A. F.; NELE, M.; COUTINHO, R. C. C. Principais aplicações das microondas na produção e refino de petróleo. **Química Nova**, v. 31, n. 6, p. 1553-1561, 2008.
- FRINGS, K.; KOCH, M.; HARTMEIER, W. Kinetic resolution of 1-phenyl ethanol with high enantioselectivity with native and immobilized lipase in organic solvents. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 25, n. 3-5, p. 303-309, 1999.
- GASSMAN, P. G.; TALLEY, J. J. Cyanohydrins - A general synthesis. **Tetrahedron Letters**, v. 19, n. 40, p. 3773-3776, 1978.
- GEDYE, R.; SMITH, F.; WESTAWAY, K.; ALI, H.; BALDISERA, L.; LABERGE, L.; ROUSELL, J. The use of microwave ovens for rapid organic synthesis. **Tetrahedron Letters**, v. 27, n. 3, p. 279, 1986.
- GERRITS, P. J.; MARCUS, J.; BIRIKAKI, L.; VAN DER GEN, A. Difficult substrates in the *R*-hydroxynitrile lyase catalyzed hydrocyanation reaction: application of the mass transfer limitation principle in a two-phase system. **Tetrahedron: Asymmetry**, v. 12, n. 7, p. 971-974, 2001.
- GHANEM, A. Trends in lipase-catalyzed asymmetric access to enantiomerically pure/enriched compounds. **Tetrahedron**, v. 63, n. 8, p. 1721-1754, 2007.

GIGUERE, R. J.; BRAY, T. L.; DUNCAN, S. M.; MAJCTICH, G. Application of commercial microwave ovens to organic synthesis. **Tetrahedron Letters**, v. 27, n. 41, p. 4945, 1986.

GOJ, O.; BURCHARDT, A.; HAUFE, G. A versatile approach to optically active primary 2-fluoro-2-phenylalkanols through lipase-catalyzed transformations. **Tetrahedron: Asymmetry** v. 8, n. 3, p. 399-408, 1997.

GOTOR-FERNANDEZ, V.; BUSTO, E., GOTOR, V. *Candida antarctica* Lipase B: An ideal biocatalyst for the preparation of nitrogenated organic compounds. **Advanced Synthesis & Catalysis**, v. 348, p. 797-812, 2006.

GRUNWALD, P. **Biocatalysis, biochemical fundamentals and applications**. London: Imperial College Press, 2009. p. 297-304.

HANEFELD, U.; STRAATHOF, A. J. J.; HEIJNEN, J. J. Enzymatic formation and esterification of (S)-mandelonitrile. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 11, n. 4-6, p. 213-218, 2001.

HIYAMA, T. **Organofluorine compounds: chemistry and applications**. Berlin: Springer-Verlag, 2000. p. 1-14.

HOFF, B. H.; SUNDBY, E. Preparation of pharmaceutical important fluorinated 1-arylethanol using isolated enzymes. **Bioorganic Chemistry**, v. 51, p. 31-47, 2013.

HOUJENE, Z.; MERABET-KHELASSI, M.; BOUZEMI, N.; RIAANT, O.; Aribi-ZOUIOUECHE, L. A green route to enantioenriched (S)-arylalkyl carbinols by deracemization via combined lipase alkaline-hydrolysis/Mitsunobu esterification. **Tetrahedron: Asymmetry**, v. 24, n. 5-6, p. 290-296, 2013.

HOZ, A. de L.; DÍAS-ORTIZ, A.; GÓMEZ, M. V.; MAYORAL, J. A.; MORENO, A.; SÁNCHEZ-MIGALLÓN, A. M.; VAZQUEZ, E. Preparation of α - and β -substituted alanine derivatives by α -amidoalkylation or Michael addition reactions under heterogeneous catalysis assisted by microwave irradiation. **Tetrahedron**, v. 57, n. 25, p. 5421-5428, 2001.

HUSSAIN, W.; POLLARD, D. J.; TRUPPO, M.; LYE, G. J. Enzymatic ketone reductions with co-factor recycling: Improved reactions with ionic liquid co-solvents. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 55, p. 19-29, 2008.

- INAGAKI, M.; HIRATAKE, J.; NISHIOKA, T; ODA, J. Lipase-catalyzed kinetic resolution with in situ racemization: one-pot synthesis of optically active cyanohydrin acetates from aldehydes. **Journal of the American Chemical Society**, v. 113, p.9361-9363, 1991.
- JING, Q.; KAZLAUSKAS, R. J. Determination of absolute configuration of secondary alcohols using lipase-catalyzed kinetic resolutions. **Chirality**, v. 20, p. 724-735, 2008.
- KAMOUN, P.; LAVOINNE, A.; VERNEUIL, H. Estrutura e mecanismo de ação. In: **Bioquímica e biologia molecular**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006. v. 1, p. 67-94.
- KAPPE, C. O. The use of microwave irradiation in organic synthesis. From laboratory curiosity to standard practice in twenty years. **Chimia International Journal For Chemistry**, v. 60, n. 6, p. 308-312, 2006.
- KAPPE, C. O.; STADLER, A. **Microwaves in organic and medicinal chemistry**. Weinheim: Wiley-VCH, 2006. p. 253.
- KATO, K.; GONG, Y.; TANAKA, S.; KATAYAMA, M.; KIMOTO, H. Lipase-catalyzed optical resolution of trifluoroarylethanol. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 11, n. 4-6, p. 287-294, 2001.
- KAZLAUSKAS, R. J.; WEISSFLOCH, A. N. E.; RAPPAPORT, A. T.; CUCCIA, L. A.. A rule to predict which enantiomer of a secondary alcohol reacts faster in reactions catalyzed by cholesterol esterase, lipase from *Pseudomonas cepacia*, and lipase from *Candida rugosa*. **Journal Organic Chemistry**, v. 56, n. 8, p. 2556-2665, 1991
- KIRK, K. L. Fluorine in medicinal chemistry: recent therapeutic applications of fluorinated small molecules. **Journal of Fluorine Chemistry**, v. 127, p. 1013-1029, 2006.
- KLAHN, M.; GERALDINE, S. L.; SEDURAMAN, A. WU, P. On the different roles of anions and cations in the solvation of enzymes in ionic liquids. **Physics Chemical**, v. 13, p. 1649-1662, 2011.
- KOBAYASHI, S.; TSUCHIYA, Y.; MUKAIYAMA, T. A facile synthesis of cyanohydrin trimethylsilyl ethers by the addition reaction of trimethylsilyl cyanide with aldehydes under basic condition. **Chemistry Letters**, p. 537-540, 1991.
- LARHED, M.; HALLBERG, A. Microwave-assisted high-speed chemistry: a new technique in drug discovery. **Reviews Research Focus DDT**, v. 6, n. 8, p. 406-416, 2001.

- LAU, S. Y.; UZIR, M. H.; KAMARUDDIN, A. H.; BHATIA, S. Lipase-catalyzed dynamic kinetic resolution of racemic ibuprofen ester via hollow fiber membrane reactor: modeling and simulation. **Journal of Membrane Science**, v. 357, n. 1-2, p. 109-121, 2010.
- LEE, P. T.; CHEN, C. P. A C-2-symmetric chiral bipyridyldiol-titanium complex as a catalyst for the asymmetric trimethylsilylcyanation of substituted benzaldehydes. **Tetrahedron: Asymmetry**, v. 16, n. 16, p. 2704-2710, 2005.
- LEHNINGER, A. L. **Bioquímica**: componentes moleculares das células. São Paulo: Edgard Blucher, 1976. 126 p.
- LI, C.; TAN, T.; ZHANG, H.; FENG, W. Analysis of the conformational stability and activity of *Candida antarctica* lipase B in organic solvents insight from molecular dynamics and quantum mechanics/simulations. **Journal of Biological Chemistry**, v. 285, n. 37, p. 28434-28441, 2010.
- LI, J.; LIU, Y-C.; DENG, J-G.; LI, X-Z.; CUIB, X.; LIB, Z. Asymmetric reduction of 2-bromo-1-henylethylidenemalononitrile with chiral NADH models: substituent effects on enantioselectivity. **Tetrahedron: Asymmetry**, v. 11, n. 13, p. 2677-2682, 2000.
- LINDSTROM, M.; HEDENSTROM, E.; BOUILLY, S.; VELONIA, K.; SMONOU, I. Synthesis of diastereo- and enantiomerically pure *anti*-3-methyl-1,4-pentanediol via lipase catalysed acylation. **Tetrahedron: Asymmetry**, v. 16, n. 7, p. 1355-1360, 2005.
- LIU, Y.; TANGA, T-X.; PEI, X-Q.; ZHANG, C.; WU, Z-L. Identification of ketone reductase ChKRED20 from the genome of *Chryseobacterium* sp. CA49 for highly efficient *anti*-Prelog reduction of 3,5-bis(trifluoromethyl)acetophenone. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 102, p. 1-8, 2014.
- LOPES, R. O.; RIBEIRO, J. B.; MIRANDA, A. S.; SILVA, G. V. V.; MIRANDA, L. S. M.; LEAL, I. C. R.; SOUZA, R. O. M. A. Continuous flow whole cell bioreduction of fluorinated acetophenone. **Tetrahedron**, v. 70, n. 20, p. 3239-3242, 2014.
- LOUGHLIN, W. A. Biotransformations in organic synthesis. **Bioresource Technology**, v. 74, p. 49-62, 2000.
- LUKASIEWICZ, M.; KOWALSKI, S. Low power microwave-assisted enzymatic esterification of starch. **Starch/Starke**, v. 64, n. 124, p. 188-197, 2012.
- MATHER, B. D.; VISWANATHAN, K.; MILLER, K. M.; LONG, T. E. Michael addition reactions in macromolecular design for emerging technologies. **Progress in Polymer Science**, v. 31, n. 12, p. 487-531, 2006.

- MARTINS, J. E. D.; MORRIS, D. J.; WILLS, M. Asymmetric hydrogenation of ketones using Ir(III) complexes of *N*-alkyl-*N'*-tosyl-1,2-ethanediamine ligands. **Tetrahedron Letters**, v. 50, n. 6, p. 688-692, 2009.
- MATSUDA, T.; YAMANAKA, R.; NAKAMURA, K. Recent progress in biocatalysis for asymmetric oxidation and reduction. **Tetrahedron: Asymmetry**, v. 20, n. 5, p. 513-557, 2009.
- MATTHEWS, B. R.; JACKSON, W. R.; JAYATILAKE, G. S.; WILSHIRE, C.; JACOBS, H. Asymmetric hydrocyanation of a range of aromatic and aliphatic aldehydes. **Australian Journal of Chemistry**, v. 41, n. 11, p. 1697 – 1709, 1988.
- MATTOS, M. C.; MARZORATI, L. Aspectos mecanísticos da adição de Michael. **Química Nova**, v. 22, n. 5, p. 710-714, 1999.
- MAZURKIEWICZ, R.; GOREWODA, T.; KUZNIK, A.; GRYMEL, M. A new application of the Mitsunobu reaction in the synthesis of phosphonium salts. **Tetrahedron Letters**, v. 47, n. 25, p. 4219–4220, 2006.
- MENEZES, R. R.; SOUTO, P. M.; KIMINAMI, R. H. G. A. Sinterização de cerâmicas em micro-ondas. Parte III: Sinterização de zircônia, mulita e alumina. **Cerâmica**, v. 5, p. 218-226, 2007.
- MONDAL, P.; KANDALA, B.; AHRENS R.; CHESROWN, S. E.; HENDELES, L. Nonprescription racemic epinephrine for asthma. **Journal of Allergy and Clinical Immunology: In Practice**. Disponível em : <www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2213219814000877>. acesso em: 29 abr. 2014.
- NAEMURA, K.; MURATA, M.; TANAKA, R.; HIROSE, K.; TOBE, Y. Enantioselective acylation of alcohols catalyzed by lipase ql from *Alcaligenes* sp.: a predictive active site model for lipase QL to identify the faster reacting enantiomer of an alcohol in this acylation. **Tetrahedron: Asymmetry**, v. 7, n. 6, p. 1581-1584, 1996.
- NAGIB, D. A.; SCOTT, M. E.; MACMILLAN, D. W. C. Enantioselective α -trifluoromethylation of aldehydes via photoredox organocatalysis. **Journal of the American Chemical Society**, v. 131, p. 10875-10877, 2009.
- NAKAMURA, K.; YAMANAKA, R.; MATSUDA T.; HARADA T. Recent developments in asymmetric reduction of ketones with biocatalysts. **Tetrahedron: Asymmetry**, v. 14, n. 18, p. 2659-2681, 2003.
- NEAS, E. D.; COLLINS M. J. Microwave Heating Theoretical Concepts and Equipment. In: KINGSTON, H. M.; JASSIE, L. B., (Ed.) **Introduction microwave sample preparation theory and practice design**. Washington DC: ACS Professional, 1988. v. 1, p. 1-7.

- NELSON, D.; COX, M. M. Enzimas. In: LIMA, L. B.; PALUDO, C. C. **Princípios de Bioquímica de Lehninger**. Porto Alegre: Artmed, 2011. v. 1, p. 183-197.
- NOGUEIRA, A. R. A.; FLORES, E. M. M.; KRUG, F. J.; KNAPP, G.; NOBREGA, J. A.; BARIN, J. A. Digestão de amostra assistida por microondas. In: NAIME, J. M.; FORATO, L. A. (Ed.). **Curso em análise química. Plasmas em química analítica e preparo de amostras**. São Carlos: UFSCar, 2001. v. 1, p.106-149.
- NI, Y.; LI, C.-X.; WANG, L.-J.; ZHANG, J.; XU, J.-H. Highly stereoselective reduction of prochiral ketones by a bacterial reductase coupled with cofactor regeneration. **Organic & Biomolecular Chemistry**, v. 9, n. 15, p. 5463-5468, 2011.
- NI, Y.; XU, J. H. Biocatalytic ketone reduction: A green and efficient access to enantiopure alcohols. **Biotechnology Advances**, v. 30, n. 6, p. 1279-1288, 2012.
- OGNYANOV, V. I.; DATCHEVA, V. K.; KYLER, K. S. Preparation of chiral cyanohydrins by an oxynitrilase-mediated transcyanation. **Journal of the American Chemical Society**, v. 113, n. 18, p. 6992-6996, 1991.
- OHNO, A.; IKEGUCHI, M.; KIMURA, T.; OKA, S. Reduction by a model of NAD(P)H. 25. A chiral model which induces high asymmetry. **Journal of the American Chemical Society**, v. 101, p. 7036-7040, 1979.
- O'SHEA, P. D.; CHEN, C.; GAUVREAU, D.; GOSSELIN, F.; HUGHES, G.; NADEAU, C.; VOLANTE, R. P. A practical enantioselective synthesis of odanacatib, a potent cathepsin K inhibitor, via triflate displacement of an α -trifluoromethylbenzyl Triflate. **Journal of Organic Chemistry**, v. 74, p. 1605-1610, 2009.
- PATEL, R. N.; CHU, L.; CHIDAMBARAM, R.; ZHU, J.; KANT, J. Enantioselective microbial reduction of 2-oxo-2-(1',2',3',4'-tetrahydro-1',1',4',4'-tetramethyl-6'-naphthalenyl) acetic acid and its ethyl ester. **Tetrahedron: Asymmetry**, v. 13, n. 4, p. 349-355, 2002.
- PATEL, R.N.; GOSWAMI, A.; CHU, L.; DONOVAN, M. J.; NANDURI, V.; GOLDBERG, S. Enantioselective microbial reduction of substituted acetophenones. **Tetrahedron: Asymmetry**, v. 15, n. 8, p. 1247-1258, 2004.
- PAIZS, C.; TAHTINEN, P.; TOSA, M.; MAJDIK, C.; IRIMIE, F. D.; KANERVA, L. T. Biocatalytic enantioselective preparation of phenothiazine-based cyanohydrin acetates: kinetic and dynamic kinetic resolution. **Tetrahedron**, v. 60, n. 46, p. 10533-10540, 2004.
- PAULA, A. V.; BARBOZA, J. C. S.; CASTRO, H. F. Estudo da influência do solvente, carboidrato e ácido graxo na síntese enzimática de ésteres de açúcares. **Química Nova**, v. 28, n. 5, p. 792-796, 2005.

- PAVIA, D. L.; LAMPMAN, G. M.; KRIZ, G. S.; VYVYAN, J. R. **Introdução à espectroscopia**. São Paulo: Cengage Learning, 2010. 700 p.
- PELLISSIER, H. Recent developments in dynamic kinetic resolution. **Tetrahedron**, v. 64, n. 824, p. 1563-1601, 2008.
- PELLISSIER, H. Dynamic kinetic resolution. **Tetrahedron**, v. 59, n. 42, p. 8291-8327, 2003.
- PILISSÃO, C.; CARVALHO, P. O.; NASCIMENTO, M. G. The Influence of conventional heating and microwave irradiation on the resolution of (*RS*)-*sec*-butylamine catalyzed by free or immobilized lipases. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 23, n. 9, p. 1688-1697, 2012.
- POLLARD, D.; TRUPPO, M.; POLLARD, J.; CHEN, C. Y.; MOORE, J. Effective synthesis of (*S*)-3,5-bis(trifluoromethyl)phenyl ethanol by asymmetric enzymatic reduction. **Tetrahedron: Asymmetry**, v. 17, n. 4, p. 554-559, 2006.
- PRIEGO, J.; ORTÍZ-NAVA, C.; CARRILLO-MORALES, M.; LÓPEZ-MUNGUÍA, A. ESCALATE, J.; CASTILLO, E. Solvent engineering: na effective tool to direct chemoselectivity in a lipase-catalyzed Michael addition. **Tetrahedron**, v. 65, n. 2, p. 536-539, 2009.
- RIBEIRO, S. S.; OLIVEIRA, J. R.; PORTO, A. L. M. Lipase-catalyzed kinetic resolution of ($\pm$)-mandelonitrile under conventional condition and microwave irradiation. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 23, p. 1395-1399, 2012.
- RIBEIRO, S. S.; RAMINELLI, C.; PORTO, A. L. M. Enzymatic resolution by CALB of organofluorine compounds under conventional condition and microwave irradiation. **Journal of Fluorine Chemistry**, v. 154, p. 53-59, 2013.
- RIBEIRO, S. S.; ULIANA, M. P.; BROCKSOM, T. J.; PORTO, A. L. M. Analysis by GC-MS of an aza-Michael reaction catalyzed by CALB on an orbital shaker and under microwave irradiation. **Glogal Journal Frontier Research: B Chemistry**, v. 14, n. 1, p. 7-21, 2014.
- RISSO, M.; MAZZINI, M.; KRÖGER, S.; SAENZ-MÉNDEZ, P.; SEOANE, G.; GAMENARA, D. Microwave-assisted solvent-free lipase catalyzed transesterification of β -ketoesters. **Green Chemistry Letters and Reviews**, v. 5, n. 4, p. 539-543, 2012.
- RUFINO, A. R.; BIAGGIO, F. C.; SANTOS, J. C.; DE CASTRO, H. F. Screening of lipases for the synthesis of xylitol monoesters by chemoenzymatic esterification and the potential of microwave and ultrasound irradiations to enhance the reaction rate. **Journal of Biological Macromolecules**, v. 47, n. 1, p. 5-9, 2010.

- RULEV, A. Y. Aza-Michael reaction: achievements and prospects. **Russian Chemical Reviews**, v. 80, p. 197-218, 2011.
- SAKAI, T.; MIKI, Y.; NAKATANI, M.; EMA, T.; UNEYAMA, K.; UTAKA, M. Lipase-catalyzed kinetic resolution of 2-acyloxy-2-(pentafluorophenyl)acetonitrile. **Tetrahedron Letters**, v. 39, n. 29, p. 5233-5236, 1998.
- SAKAI, T.; WANG K.; EMA, T. Lipase-catalyzed dynamic kinetic resolution giving optically, ceramic-immobilized lipase. **Tetrahedron**, v. 64, n. 9, p. 2178-2183, 2008.
- SANSEVERINO, A. M. Microondas em síntese orgânica. **Química Nova**, v. 25, n. 4, p. 660-667, 2002.
- SAID, S.; PIETRO, R. C. L. R. Generalidades sobre a aplicação industrial de enzimas. In: SAID, S.; PIETRO, R. C. L. R. (Ed.). **Enzimas como agentes biotecnológicos**. Ribeirão Preto: Legis Summa, 2004. p. 1-8.
- SATO, S. Produção de aminoácidos. In: LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W. (Ed.). **Biotecnologia industrial**. São Paulo: Blucher, 2001. v. 3, p. 155-176.
- SHARFUDDIN, M.; NARUMI, A.; IWAI, Y.; MIYAZAWA, K.; YAMADA, S.; KAKUCHIC, T.; KAGAA, H. Lipase-catalyzed dynamic kinetic resolution of hemiaminals. **Tetrahedron: Asymmetry**, v. 14, n. 11, p. 1581-1585, 2003.
- SHEN, Z. L.; ZHOU, W. J.; LIU, Y. T.; JI, S. J.; LOH, T. P. One-pot chemoenzymatic syntheses of enantiomerically-enriched *o*-acetyl cyanohydrins from aldehydes in ionic liquid. **Green Chemistry**, v. 10, n. 3, p. 283-286, 2008.
- SOARES, D.; MADALOZZO, A. D.; BOTTON, V.; MARTINI, V. P.; KRIEGER, N. Biocatálise com lipases em solventes orgânicos. In: GONÇALVES, R. A. C.; OLIVEIRA, A. J. B. (Ed.). **Biocatálise e biotransformação fundamentos e aplicações**. São Paulo: Schoba, 2012. v. 2, p. 247-252.
- SOLOMONS, T. W.; FRYHLE, C. **Química orgânica 2**. Rio de Janeiro: LTC, 2002. 474 p.
- SOUZA, R. O. M. A.; ANTUNES, O. A. C.; KROUTIL, W.; KAPPE, C. O. Kinetic resolution of rac-1-phenylethanol with immobilized lipases: a critical comparison of microwave and conventional heating protocols. **Journal of Organic Chemistry**, v. 74, n. 16, p. 6157-6162, 2009.

- SOUZA, R. O. A.; MIRANDA, L. S. M. E. Irradiação de micro-ondas aplicada à síntese orgânica: uma história de sucesso no Brasil. **Química Nova**, v. 34, n. 3, p. 497-506, 2011.
- SOUZA, G. B.; NOGUEIRA, A. R. A.; RASSINI, J. B. Determinação de matéria seca e umidade em solos e plantas com forno de micro-ondas doméstico. **Circular Técnica da Embrapa**, v. 33, n. 1, p. 1-9, 2002.
- SOUZA, R. O. M. A.; ANTUNES, O. A. C.; KROUTIL, W.; KAPPE, C. O. Kinetic resolution of *rac*-1-phenylethanol with immobilized lipases: a critical comparison of microwave and conventional heating protocols. **Journal of Organic Chemistry**, v. 74, n. 16, p. 6157-6162, 2009.
- STEELE, R. M.; MONTI, C.; GENNARI, C.; PIARULLI, U.; ANDREOLI, F.; VANTHUYNE, N. Enantioselective cyanosilylation of aldehydes catalysed by a diastereomeric mixture of atropisomeric thioureas. **Tetrahedron: Asymmetry**, v. 17, n. 6, p. 999-1006, 2006.
- SWAMY, K. C. K.; KUMAR, N. N. B.; BALARAMAN, E.; KUMAR, K. V. P. P. Mitsunobu and related reactions: Advances and applications. **Chemical Reviews**, v. 109, p. 2551-2651, 2009.
- SIBI, M. P.; MANYEM, S. Enantioselective conjugate additions. **Tetrahedron**, v. 56, n. 41, p. 8033-8061, 2000.
- SILVA, F. M.; DE LACERDA, P. S. B.; JONES JUNIOR, J. Desenvolvimento sustentável e química verde. **Química Nova**, v. 28, n. 1, p. 103-110, 2005.
- SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X.; KIEMLE, D. J. **Identificação espectrométrica de compostos orgânicos**. Rio de Janeiro: LTC, 2006. 460 p.
- SINGH, S. P.; KUMAR, T. V.; CHANDRASEKHARAM, M.; GIRIBABU, L.; REDDY, P. Y. Microwave-assisted, rapid, solvent-free aza-Michael reaction by perchloric acid impregnated on silica gel. **Synthetic Communications**, v. 39, p. 3982-3989, 2009.
- SCHULZE, B.; WUBBOLTS, M. G. Biocatalysis for industrial production of fine chemicals. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 10, n. 6, p. 609-615, 1999.
- TANG, H. Y.; ZHANG, Z. B. A novel bifunctional Ti(IV) complex catalyzed asymmetric silylcyanation of aldehydes. **Heteroatom Chemistry**, v. 22, n. 1, p. 31-35, 2011.
- TEIXEIRA, E. F.; SANTOS, A. P. B.; BASTOS, R. S.; PINTO, A. C.; KÜMMERLE, A. E.; COELHO, R. R. O uso de aparelhos de micro-ondas domésticos em aulas experimentais de química orgânica: nitração de salicilaldeído. **Química Nova**, v. 33, n. 7, p. 1603-1606, 2010.

- THOSTENSON, E. T.; CHOU, T. W. Microwave processing: fundamentals and applications. **Composites Part A: Applied Science and Manufacturing**, v. 30, n. 9, p. 1055-1071, 1999.
- TORRES, B. B. Elementos de enzimologia. In: LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W. (Ed.). **Biotecnologia industrial**. São Paulo: Edgard Blucher, 2001. v. 1, p. 151-176.
- TREVISAN, H. C. Lipases. In: SAID, S.; PIETRO, R. C. L. R. (Ed.). **Enzimas como agentes biotecnológicos**. Ribeirão Preto: Legis Summa, 2004. v. 1, p. 115-135.
- TRIVEDI, R.; LALITHA, P.; ROY, S. Vanadyl(IV) acetate: An efficient, reusable heterogenous catalyst for aza-Michael reaction under solvent-free conditions. **Synthetic Communications**, v. 38, p. 3556-3566, 2008.
- ULIANA, M. P.; VIEIRA, Y. W.; DONATONI, M. C.; CORRÊA, A. G.; BROCKSOM, U.; BROCKSOM, T. J. Oxidation of mono-phenols to *para*-benzoquinones: a comparative study. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 19, p. 1484-1489, 2008.
- VASSE, J-L.; GOUMAIN, S.; LEVACHER, V.; DUPAS, G.; QUEGUINER, G.; BOURGUIGNON, J. New NADH models bearing a phosphonate or a chiral oxazaphospholidine oxide at the dihydropyridine ring. **Tetrahedron Letters**, v. 42, n. 10, p. 1871-1873, 2001.
- VEUM, L.; KUSTER, M.; TELALOVIC, S.; HANEFELD, U.; MASCHMEYER, T. Enantioselective synthesis of protected cyanohydrins. **European Journal of Organic Chemistry**, v. 9, p. 1516-1522, 2002.
- VOET, D.; VOET, J. Mecanismos de ação de enzimas. In: LIMA, L. B. (Ed.). **Bioquímica**. Porto Alegre: Artmed, 2006. v. 1, p. 463-465.
- WAN, H.; SUN, S.; HU, X.; XIA, Y. Nonthermal effect of microwave irradiation in nonaqueous enzymatic esterification. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 166, n. 6, p.1454-1462, 2012.
- WANDERLEY, K. A.; ALVES JÚNIOR, S.; SANTOS, C. de O. P. Síntese hidrotermal assistida por micro-ondas como metodologia sintética eficiente para obtenção da rede metalorgânica [Zn(BDC)(H₂O)₂]_n. **Química Nova**, v. 34, n. 3, p. 434-438, 2011.
- WEI, T-B.; HUA, M-T.; SHI, H-X.; LIU, Y.; ZHANG, Y-M. Aza-Michael addition of acrylonitrile with 2-aryloxymethylbenzimidazole derivatives under microwave irradiation. **Journal of Chemical Research**, v. 34, p. 452-454, 2010.

- WU, Z. L.; LI, Z. Y. Biocatalytic asymmetric hydrolysis of (+/-)- β -hydroxy nitriles by *Rhodococcus* sp. CGMCC 0497. **Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic**, v. 22, n. 1-2, p. 105-112, 2003.
- XIONG, J.; WU, J.; XU, G.; YANG, L. Kinetic study of lipase catalyzed asymmetric transesterification of mandelonitrile in solvent-free system. **Chemical Engineering Journal**, v. 138, p. 258-263, 2008.
- XU, Q.; GENG, X.; CHEN, P. Kinetic resolution of cyanohydrins via enantioselective acylation catalyzed by lipase PS-30. **Tetrahedron Letters**, v. 49, n. 45, p. 6440-6441, 2008.
- XU, Q.; ZHOU, H.; GENG, X.; CHEN, P. Nonenzymatic kinetic resolution of racemic 2,2,2-trifluoro-1-aryl ethanol via enantioselective acylation. **Tetrahedron**, v. 65, n. 11, p. 2232-2238, 2009.
- XU, Q.; XIE, Y.; GENG, X.; CHEN, P. Enzymatic kinetic resolution of racemic cyanohydrins via enantioselective acylation. **Tetrahedron**, v. 66, n. 3, p. 624-630, 2010.
- YADAV, J. S.; REDDY, B. V. S.; BASAK, A. K.; NARSAIAH, A. V. Aza-Michael reactions in ionic liquids. A facile synthesis of α -amino compounds. **Chemistry Letters**, v. 32, p. 988-989, 2003.
- YADAV, G. D.; SAJGURE, A. D.; DHOOT, S. B. Insight into microwave irradiation and enzyme catalysis in enantioselective resolution of *RS*-($\pm$)-methyl mandelate. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 83, n. 8, p. 1145-1153, 2008.
- YADAV, G. D.; BORKAR, I. V. Kinetic and mechanistic investigation of microwave-assisted lipase catalyzed synthesis of citronellyl acetate. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 48, p. 7915-7922, 2009.
- YADAV, G. D.; DEVENDRAN, S. Lipase catalyzed kinetic resolution of ($\pm$) 1-(1-naphthyl)ethanol under microwave irradiation. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 81, n. 1, p. 58-65, 2012.
- YADAV, G. D.; PAWAR, S. V. Synergism between microwave irradiation and enzyme catalysis in transesterification of ethyl-3-phenylpropanoate with *n*-butanol. **Bioresource Technology**, v. 109, p. 1-6, 2012.
- YADAV, G. D.; THORAT, P. A. Microwave assisted lipase catalyzed synthesis of isoamyl myristate in solvent-free system. **Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic**, v. 83, p. 16-22, 2012.
- 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, n. 12, p. 1769-1774, 2006.

- YING, A.; ZHENG, M.; XU, H.; QIU, F.; GE, C. Guanidine-based task-specific ionic liquids as catalysts for aza-Michael addition under solvent-free conditions. **Research on Chemical Intermediates**, v. 37, p. 883–890, 2011.
- YOUNG, D. D.; NICHOLS, J.; KELLY, R. M.; DEITERS, A. Microwave activation of enzymatic catalysis. **Journal of the American Chemical Society**, v. 130, n. 31, p. 10048–10049, 2008.
- YU, D.; WANG, Z.; CHEN, P.; Jin, L.; VHENG, Y.; ZHOU, J.; CAO, S. Microwave-assisted resolution of (*R,S*)-2-octanol by enzymatic transesterification. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 48, n. 1-2, p. 51–57, 2007.
- YU, D.; WANG, C.; YIN, Y.; ZHANG, A.; GAO, G.; FANG, X. A synergistic effect of microwave irradiation and ionic liquids on enzyme-catalyzed biodiesel production. **Green Chemistry**, v. 13, p. 1869–1875, 2011.
- YU, D.; MA, D.; WANG, Z.; WANG, Y.; PAN, Y.; FANG, X. Microwave-assisted enzymatic resolution of (*R,S*)-2-octanol in ionic liquid. **Process Biochemistry**, v. 47, p. 479–484, 2012.
- ZAMPIERI, D. S.; ZAMPIERI, L. A.; RODRIGUES, J. A. R.; DE PAULA, B. R. S.; MORAN, P. J. S. Hydride transfer versus electron transfer in the reduction of 4-phenyl-3-halo-3-buten-2-ones mediated by *Pichia stipitis*. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 72, n. 3-4, p. 289–293, 2011.
- ZENG, B. Q.; ZHOU, X.; LIU, X. H.; FENG, X. M. Enantioselective cyanosilylation of aldehydes catalyzed by a novel *N,N'*-dioxide-Ti((OPr)-Pr-*i*)(4) bifunctional catalyst. **Tetrahedron**, v. 63, n. 24, p. 5129–5136, 2007.
- ZHANG, Z. P.; WANG, Z.; ZHANG, R. Z.; DING, K. L. An efficient titanium catalyst for enantioselective cyanation of aldehydes: cooperative catalysis. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 49, n. 38, p. 6746–6750, 2010.
- ZHANG, H.; ZHANG, Y.; LIUA, L.; XUA, H.; WANG, Y. RuCl₃ in poly(ethyleneglycol): A highly efficient and recyclable catalyst for the conjugate addition of nitrogen and sulfur nucleophiles. **Synthesis**, v. 13, p. 2129–2136, 2005.
- ZHU, S.; WU, Y.; YU, Z.; ZHANG, X.; Li, H.; GAO, M. The effect of microwave irradiation on enzymatic hydrolysis of rice straw. **Bioresource Technology**, v. 97, n. 15, p. 1964–1968, 2006.
- ZIAULLAH, H. P.; RUPASINGHE, V. An efficient microwave-assisted enzyme-catalyzed regioselective synthesis of long chain acylated derivatives of flavonoid glycosides. **Tetrahedron Letters**, v. 54, n. 15, p. 1933–1937, 2013.

ANEXOS

Figura 6.1 - Espectro de RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3) para o ($\pm$)-acetato de ciano(fenil)metila **1b**.

Figura 6.2 - Espectro de RMN de ^{13}C (50 MHz, CDCl_3) para o ($\pm$)-acetato de ciano(fenil)metila **1b**.

Figura 6.3 - Espectro de absorção na região de infravermelho (cm^{-1}) para a ($\pm$)-2-(4-clorofenil)-2-hidroxiacetonitrila **2a**.

Figura 6.4 - Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) para a ($\pm$)-2-(4-clorofenil)-2-hidroxiacetonitrila 2a.

Figura 6.5 - Espectro de RMN de ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) para a ($\pm$)-2-(4-clorofenil)-2-hidroxiacetonitrila 2a.

Figura 6.6 - Espectro de absorção na região de infravermelho (cm^{-1}) para o ($\pm$)-acetato de (4-clorofenil)(ciano)metila **2b**.

Figura 6.7 - Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) para o ($\pm$)-acetato de (4-clorofenil)(ciano)metila **2b**.

Figura 6.8 - Espectro de RMN de ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) para o ($\pm$)-acetato de (4-clorofenil)(ciano)metila **2b**.

Figura 6.9 - Espectro de massas de alta resolução para o ($\pm$)-acetato de (4-clorofenil)(ciano)metila **2b**.

Figura 6.10 - Espectro de absorção na região de infravermelho (cm^{-1}) para a ($\pm$)-2-hidroxi-2(4-hidroxifenil)acetonitrila **3a**.

Figura 6.11 - Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) para a ($\pm$)-2-hidroxi-2(4-hidroxifenil)acetonitrila **3a**.

Figura 6.12 - Espectro de massas de alta resolução para a ($\pm$)-2-hidroxi-2(4-hidroxifenil)acetonitrila **3a**. **Figura 6.13** - Espectro de massas de alta resolução para o ($\pm$)-acetato de ciano(4-hidroxifenil)metila **3b**.

Figura 6.14 - Espectro de absorção na região de infravermelho (cm^{-1}) para a ($\pm$)-2-hidroxibutanonitrila 4a.

Figura 6.15 - Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) para a ($\pm$)-2-hidroxibutanonitrila 4a.

Figura 6.16 - Espectro de RMN de ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) para a ($\pm$)-2-hidroxibutanonitrila **4a**.

Figura 6.17 - Espectro de massas de alta resolução para a ($\pm$)-2-hidroxibutanonitrila **4a**.

Figura 6.18 - Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) para o ($\pm$)-acetato de 1-cianopropila **4b**.

Figura 6.19 - Espectro de RMN de ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) para o ($\pm$)-acetato de 1-cianopropila **4b**.

Figura 6.20 - Espectro de massas de alta resolução para o (±)-acetato de 1-cianopropila 4b.

Figura 6.21 - Espectro de absorção na região de infravermelho (cm^{-1}) para a (±)-2-(4-fluorofenil)-2-hidroxiacetonitrila 5a.

Figura 6.22 - Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) para a ($\pm$)-2-(4-fluorofenil)-2-hidroxiacetonitrila **5a**.

Figura 6.23 - Espectro de RMN de ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) para a ($\pm$)-2-(4-fluorofenil)-2-hidroxiacetonitrila **5a**.

Figura 6.24 - Espectro de massas de alta resolução para o (±)-acetato de ciano(4-fluorofenil)metila **5b**. **Figura 6.25** - Espectro de absorção na região de infravermelho (cm^{-1}) para o (±)-acetato de ciano(4-fluorofenil)metila **5b**.

Figura 6.26 - Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) para o (±)-acetato de ciano(4-fluorofenil)metila **5b**.

Figura 6.27 - Espectro de RMN de ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) para o (±)-acetato de ciano(4-fluorofenil)metila **5b**.

Figura 6.28 - Espectro de massas de alta resolução para o (±)-acetato de ciano(4-fluorofenil)metila **5b**.

Figura 6.29 - Espectro de absorção na região de infravermelho (cm^{-1}) para a (±)-2-hidroxi-2-(4-metoxifenil)acetona **6a**.

Figura 6.30 - Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) para a ($\pm$)-2-hidroxi-2-(4-metoxifenil)acetoni-trila **6a**.

Figura 6.31 - Espectro de RMN de ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) para a ($\pm$)-2-hidroxi-2-(4-metoxifenil)acetoni-trila **6a**.

Figura 6.32 - Espectro de massas de alta resolução para a (±)-2-hidroxi-2-(4-metoxifenil)acetonitrila **6a**.

Figura 6.33 - Espectro de absorção na região de infravermelho (cm⁻¹) para o (±)-acetato de ciano(4-metoxifenil)metila **6b**.

Figura 6.34 - Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) para o ($\pm$)-acetato de ciano(4-metoxifenil)metila **6b**.

Figura 6.35 - Espectro de RMN de ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) para o ($\pm$)-acetato de ciano(4-metoxifenil)metila **6b**.

Figura 6.36 - Espectro de massas de alta resolução para o (±)-acetato de ciano(4-metoxifenil)metila **6b**.

Figura 6.37 - Espectro de absorção na região de infravermelho (cm^{-1}) para a (±)-2-hidroxi-2-(3-fenoxifenil)acetonitrila **7a**.

Figura 6.38 - Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) para a ($\pm$)-2-hidroxi-2-(3-fenoxifenil)acetonitrila **7a**.

Figura 6.39 - Espectro de RMN de ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) para a ($\pm$)-2-hidroxi-2-(3-fenoxifenil)acetonitrila **7a**.

Figura 6.40 - Espectro de massas de alta resolução para a (±)-2-hidroxi-2-(3-fenoxifenil)acetonitrila **7a**.

Figura 6.41 - Espectro de absorção na região de infravermelho (cm^{-1}) para o (±)-acetato de ciano(3-fenoxifenil)metila **7b**.

Figura 6.42 - Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) para o ($\pm$)-acetato de ciano(3-fenoxifenil)metila **7b**.

Figura 6.43 - Espectro de RMN de ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) para o ($\pm$)-acetato de ciano(3-fenoxifenil)metila **7b**.

Figura 6.44 - Espectro de massas de alta resolução para o (±)-acetato de ciano(3-fenoxifenil)metila **7b**.

Figura 6.45 - Espectro de absorção na região de infravermelho (cm^{-1}) para a (*E*)-2-hidroxi-4-fenilbut-3-enonitrila **8a**.

Figura 6.46 - Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) para a (*E*)-2-hidroxi-4-fenilbut-3-enonitrila 8a.

Figura 6.47 - Espectro de RMN de ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) para a (*E*)-2-hidroxi-4-fenilbut-3-enonitrila 8a.

Figura 6.48 - Espectro de massas de alta resolução para a (*E*)-2-hidroxi-4-fenilbut-3-enonitrila **8a**.

Figura 6.49 - Espectro de absorção na região de infravermelho (cm^{-1}) para o ($\pm$)-acetato de (*E*)-1-ciano-3-fenilalila **8b**.

Figura 6.50 - Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) para o ($\pm$)-acetato de (*E*)-1-ciano-3-fenilalila **8b**.

Figura 6.51 - Espectro de RMN de ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) para o ($\pm$)-acetato de (*E*)-1-ciano-3-fenilalila **8b**.

Figura 6.52 - Espectro de massas de alta resolução para o (±)-acetato de (*E*)-1-ciano-3-fenilalila **8b**.