

Tarcila Cazetta

**Resolução cinética dinâmica da (\pm)-2-hidroxi-1-indanona
mediada por *Trichosporon cutaneum***

Dissertação de Mestrado

Prof. Dr. José Augusto Rosário Rodrigues

Campinas
SãoPaulo – Brasil
Abril 2006

FICHA CATALOGRÁFICA

Cazetta, Tarcila.

C319r

*Resolução cinética dinâmica da (\pm) -2-hidroxi-1-indanona mediada por *Trichosporon Cutaneum* / Tarcila Cazetta. -- Campinas, SP: [s.n], 2006.*

Orientador: José Augusto Rosário Rodrigues.

Dissertação – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Química.

1. Resolução cinética dinâmica. 2. Racemização. 3. Biocatálise. I. Rodrigues, José Augusto Rosário. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Química. III. Título.

Título em inglês: Dinamic kinetic resolution of (\pm) –2-hydroxindan-1-one mediated by *Trichosporon Cutaneum*

Palavras-chaves em inglês: Dinamic kinetic resolution, Racemization, Biocatalysis

Área de concentração: Química Orgânica

Titulação: Mestre em Química na Área de Química Orgânica

Banca examinadora: José Augusto Rosário Rodrigues (orientador), Antonio Claudio Herrera Braga e Leandro Helgueira de Andrade

Data de defesa: 20/04/2006

Para Nice e Luiz, meus pais.

Agradecimentos

Ao prof. Dr. José Augusto Rosário Rodrigues pela orientação, dedicação, amizade e pelos ensinamentos.

Ao prof. Paulo Moran pela valiosa contribuição durante o desenvolvimento do trabalho.

Aos amigos Inês e Gelson pela inestimável contribuição, pela descontração, pelo apoio e pela amizade. Obrigada!

Aos meus pais pelo carinho, dedicação e encorajamento nas horas difíceis.

As minhas queridas irmanas Eliana, Paula e Luiza. Por tudo.

Aos colegas do laboratório: Inês, Sérgio, Eva, Giuliano, Rodrigo, Cassiana, Renan, Luciana e Alice. Pelo convívio e pelos bons momentos.

Aos colegas e funcionários do IQ.

À Anita Salmazo pela cuidadosa revisão e ao Tiago Rebecca pelo ajuda com as figuras.

Aos amigos Olívia, Roger, Érica, Tico, Anita e Lincon pela presença, pela prazerosa convivência durante todos esses anos.

Aos amigos do IQ: Allan, Juliana, Mayra, Lili, André, Antonio e Lucas.

A todos que contribuíram direta ou indiretamente para a realização do trabalho.

À FAPESP pelo apoio financeiro.

Curriculum vitae

Participação em Cursos e Congressos Científicos

- Biorredução de (\pm)-2-hidroxi-1-tetralona por microrganismos. Trabalho apresentado no III Workshop de Biocatálise. São Paulo/SP 07-10/02/06.
- Towards the mechanism for the *T. Cutaneum* – mediated deracemization of –3-hydroxy-4-chromanone. Trabalho apresentado no 11th. Brazilian Meeting on Organic Synthesis. Canela/RS 29-31/08 a 02/09/2005.
- *Trichosporon cutaneum*-promoted deracemization of –2-hydroxindan-1-one: Towards the mechanism. Trabalho apresentado no 11th. Brazilian Meeting on Organic Synthesis. Canela/RS 29-31/08 a 02/09/2005.
- Advanced Course on Biocatalysis, Department of Biotechnology of the Delft University of Technology – Holanda – 04-08/04/2005.
- Preparo do (1*S*,2*R*)-indanodiol por Biocatálise com *Trichosporon cutaneum*: Influência da Glicose e do pH sobre o perfil reacional. Trabalho apresentado na “27^a. Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química”. Salvador/BA 05/2004.
- “II Workshop de Biocatálise – II BIOCAT” 16 a 18/02/2004, participação como monitora.
- Cloning and expression of the regulatory protein from the two-component regulatory systems of *Xylella fastidiosa*. Trabalho apresentado na “13^a. Reunião anual de usuários do Laboratório Nacional de Luz Síncrotron” Campinas SP 2003.
- Redução de *p*-Nitrobenzoilacetato de Etila Adsorvido em Amberlite XAD-7, Mediada por Redutases de *Saccharomyces cerevisiae* e *Pichia stipitis*. Trabalho apresentado no “5^o. Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática – ENZITEC2002”. Brasília/DF 07-10/04/2002.
- Reduções de 2- Aroilacetatos de atila por *Saccharomyces cerevisiae*. Trabalho apresentado na “25^a. Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química”. Poços de Caldas / MG – 25/05/2002.

Resumo

Diante a notável capacidade da levedura *Trichosporon cutaneum* de resolver uma mistura racêmica da 2-hidroxi-1-indanona através da redução para o (1*S*,2*R*)-1,2-indanodiol por um processo de resolução cinética dinâmica (RCD), resolveu-se estudar a reação de redução com os enantiômeros puros do substrato a fim de esclarecer o mecanismo da RCD bem como de estabelecer a cinética de conversão de cada um dos estereoisômeros. Os substratos (*R*)- e (*S*)-2-hidroxi-1-indanona foram preparados a partir da D- e L-fenilalanina com rendimento global de 35% (98% ee) e 32% (97% ee). Experimentos realizados na ausência de células da levedura, bem como na presença de células mortas do microrganismo mostraram que a etapa de racemização observada na RCD não é um processo espontâneo e nem mesmo quimicamente induzido por algum componente do meio reacional e, portanto, é um processo enzimático. Utilizando células íntegras da levedura observou-se que, enquanto o substrato (*R*)- é diretamente convertido no (1*S*,2*R*)-indanodiol em 24 horas, com rendimento de 90% e 99% ee, o substrato (*S*)-, por sua vez é primeiramente isomerizado para (*R*)- e em seguida reduzido para o indanodiol, de modo que a reação se completa em 46 horas. Observou-se também que (*S*)- é oxidado para a 1,2-indanodiona, e devido a essa constatação não é possível afirmar se a isomerização do material de partida ocorre via ação de uma isomerase, ou se ocorre a oxidação estereoespecífica de (*S*)-2-hidroxi-1-indanona para a 1,2-indanodiona e posterior redução dessa dicetona para (*R*)-2-hidroxi-1-indanona, através da ação de uma outra óxido-redutase com seletividade oposta. Foram efetuados diversos testes variando-se parâmetros reacionais como temperatura e pH na tentativa de resolver a questão da estero inversão do material de partida, no entanto esse objetivo não foi alcançado. Esses testes foram importantes na determinação das condições ótimas para realização da reação. Descobriu-se ainda que o produto de oxidação, a 1,2-indanodiona atua como um inibidor da óxido redutase atuante na redução da 2-hidroxi-1-indanona no (1*S*,2*R*)-1,2-indanodiol.

Abstract

Recently we have observed the deracemization of (\pm)-2-hydroxindan-1-one to obtain (1*S*,2*R*)-indan-1,2-diol by dynamic kinetic resolution (DKR) mediated by the yeast *Trichosporon cutaneum*. In order to understand the reaction mechanism we decided to study the bioreduction reaction using as substrates pure enantiomers of the substrate. The enantiomers (*R*)- and (*S*)-2-hydroxindan-1-one were prepared from D-(*R*)- and L-(*S*)-phenylalanine in 35% yield (98% ee) and 32% yield (97% ee), respectively. Experiments realized without cells or with dead cells showed no racemization of the pure enantiomers. Therefore, the racemization occurred during DKR is with certainly an enzymatic process. Using resting yeast cells it was observed that while the (*R*)-substrate was directly converted to (1*S*,2*R*)-indan-1,2-diol, in 22 hours, the (*S*)-2-hydroxindan-1-one was first transformed in its antipode. After that the (*R*)-substrate was converted to diol. The global reaction takes 46 hours. In addition, the oxidation of (*S*)-substrate to indan-1,2-dione was also observed. According to this data we proposed the action of an isomerase in the racemization step on DKR. Additional experiments in different pH and temperature were realized in order to find the optimal reaction conditions. Furthermore, we discovered that indan-1,2-dione acts as an inhibitor of the oxido-reductase able to transform (\pm)-2-hydroxindan-1-one to (1*S*,2*R*)-indan-1,2-diol, which is a well established route (1*S*,2*R*)-1-amino-2-indanol, a key raw material in the synthesis of the leading HIV-1 protease inhibitor oligopeptide mimic Indinavir.

Sumário

	Página
Lista de tabelas	xi
Lista de figuras	xii
Lista de espectros	xiv
1. Introdução	1
2. Justificativa	12
3. Objetivos	15
4. Resultados e discussão	16
4.1. Obtenção dos substratos quirais	16
4.2. Obtenção dos padrões (\pm)-cis -1,2-indanodiol e trans-(\pm)-1,2-indanodiol	18
4.3. Experimentos controle	18
4.3.1. na ausência de células da levedura	19
4.3.2. na presença de células mortas da levedura	19
4.3.3. na presença de células mortas da levedura, por tratamento com solventes	19
4.4. Biotransformações com a levedura <i>T. cutaneum</i> CCT 1903 em água	20
4.4.1. Redução da (<i>R</i>)- ou (<i>S</i>)-2-hidroxi-1-indanona (5), em água a 28 °C	20
4.4.2. Redução da (\pm)-2-hidroxi-1-indanona (5), em água a 28 °C	23
4.4.3. Biotransformação da 1,2-indanodiona (1) por <i>T. cutaneum</i> em água a 28 °C	24
4.5. Influência da temperatura sobre o desempenho de <i>T. cutaneum</i> ...	25
4.5.1. Experimentos realizados a 20°C	25
4.5.2. Experimentos realizados a 40 °C	26
4.5.3. Experimentos realizados após o tratamento das células a 50 °C por 30 minutos e posterior incubação a 28 °C	26

4.5.4. Tentativa de biotransformação da 1,2-indanodiona (1) a 50 °C ..	28
4.6. Influência do pH do meio sobre o desempenho de <i>T. cutaneum</i> ...	28
4.6.1. Experimentos em tampão fosfato pH 4,0	29
4.6.2. Experimentos em tampão fosfato pH 7,5	29
4.7. Avaliação da capacidade inibitória de (S)-2-hidroxi-1-indanona (5) e 1,2-indanodiona (1)	37
4.7.1. Testes realizados com a (S)-2-hidroxi-1-indanona (5)	37
4.7.2. Testes com a 1,2-indanodiona (1)	38
4.8. Evidências de atividade isomerase na levedura <i>T. cutaneum</i>	40
5. Conclusão	44
6. Parte experimental	46
6.1. Informações gerais	46
6.2. Obtenção dos substratos quirais	47
a. Preparo do (R)-ácido-2-hidroxi-3-fenil-propanóico (7)	47
b. Preparo do (R)-ácido-2-acetóxi-3-fenil-propanóico (9)	48
c. Formação do cloreto de ácido (10)	49
d. Reação de Friedel Crafts intramolecular	49
e. Hidrólise da (R)-2-acetóxi-1-indanona (8)	50
e2. Hidrólise da (R)-2-acetóxi-1-indanona (8) utilizando hidróxido de lítio e peróxido de hidrogênio	51
6.3. Obtenção dos padrões (±)- <i>cis</i> e <i>trans</i> -(±)-1,2-indanodiol	52
6.4. Reação dos substratos com a levedura <i>Trichosporon cutaneum</i> CCT 1903	53
6.4.1. Procedimento típico	53
6.4.2. Experimentos controle	54
6.5. Preparo do meio de cultura SDB (“Sabourad dextrose broth”)	55
6.6. Preparo das soluções tampão utilizadas nas reações de biocatálise	55
7. Apêndice	

Espectros	56
-----------------	----

Lista de tabelas

	Página
Tabela 1. Perfil da biotransformação da 1,2-indanodiona (1) por <i>T. cutaneum</i> em água, a 28°C.	22
Tabela 2. Proporção entre (\pm)-2-hidroxi-1-indanona (5) e 1,2-indanodiona (1) na oxidação de 5 favorecida pelo meio alcalino (pH 7,5).	27
Tabela 3. Tempo necessário para a conversão total dos substratos 1,2-indanodiona (1) e 2-hidroxi-1-indanona (5) no (1 <i>S</i> ,2 <i>R</i>)-indanodiol (2) nas reduções efetuadas em água, a 28°C pela levedura <i>T. cutaneum</i>	28
Tabela 4. Tempo necessário para a conversão total dos substratos 2-hidroxi-1-indanona (5) no (1 <i>S</i> ,2 <i>R</i>)-indanodiol (2).	34
Tabela 5. Tempo necessário para a conversão do material de partida (<i>R</i>)- 5 contendo quantidades crescentes da dicetona 1 no (1 <i>S</i> ,2 <i>R</i>)-indanodiol (2).	35
Tabela 6. Programação da temperatura da coluna cromatográfica DB-1..	46
Tabela 7. Programação da temperatura da coluna cromatográfica CHIRASIL-DEX Chromatopak.	47
Tabela 8. Composição das soluções tampão de fosfato.	55

Lista de figuras

	Página
Figura 1. Variação do ee de reagente e produto durante a resolução cinética com $E = 10$	4
Figura 2. Complexo metálico de rutênio.	9
Figura 3. Indinavir.	13
Figura 4. Proporção entre reagentes e produtos para a redução assimétrica de (<i>R</i>)- (5) por <i>Trichosporon cutaneum</i> , em água destilada, a 28 °C.	21
Figura 5. Proporção entre reagentes e produtos para a redução assimétrica de (<i>S</i>)- (5) por <i>Trichosporon cutaneum</i> , em água destilada, a 28 °C.	21
Figura 6. Proporção entre reagentes e produtos para a redução assimétrica de (\pm)- (5) por <i>Trichosporon cutaneum</i> , em água destilada, a 28 °C.	23
Figura 7. Proporção entre substratos e produtos para a redução assimétrica de (<i>S</i>)- 5 por <i>Trichosporon cutaneum</i> após tratamento da suspensão celular por 30 minutos a 50 °C.	27
Figura 8. Proporção entre substratos e produtos para a redução assimétrica de (<i>R</i>)- 5 por <i>Trichosporon cutaneum</i> em pH 7,5.	31
Figura 9. Proporção entre substratos e produtos para a redução assimétrica de (<i>S</i>)- 5 por <i>Trichosporon cutaneum</i> em pH=7,5.	32
Figura 10. Influência do pH na formação da 1,2-indanodiona (1) na redução assimétrica de (<i>S</i>)- 5 por <i>Trichosporon cutaneum</i>	32
Figura 11. Influência da presença de células de <i>T. cutaneum</i> na formação da indanodiona (1) a partir da (\pm)-2-hidroxi-1-indanona (5).	33
Figura 12. Proporção relativa entre reagentes e produtos para a redução da 1,2-indanodiona (1) por <i>T. cutaneum</i> em água, a 28 °C.	36
Figura 13. Cromatogramas obtidos após diferentes tempos, para a redu-	

ção da (<i>R</i>)-2-hidroxi-1-indanona (5) na presença do inibidor 1,2-indano- diona (1).	39
--	----

Lista de espectros

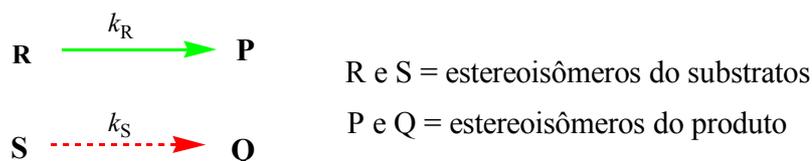
	Página
E1 – Espectro de massas (EI, 70 eV) do éster metílico (±)- 15	56
E2 – Espectro de massas (EI, 70 eV) do acetato (±)- 16	57
E3 – Espectro de massas (IE, 70 eV) do acetato (±)- 8	58
E4 – Espectro no infravermelho (KBr) do acetato (±)- 8	59
E5 – Espectro de RMN ¹ H (300 MHz, CDCl ₃), do acetato (±)- 8	60
E6 – Espectro de RMN ¹³ C (75 MHz, CDCl ₃), do acetato (±)- 8	61
E7 – Espectro de DEPT 90 e 135 (75 MHz, CDCl ₃), do acetato (±)- 8	62
E8 – Espectro de massas (EI, 70 eV), do cetol (±)- 5	63
E9 – Espectro no infravermelho (filme), do cetol (±)- 5	64
E10 – Espectro de RMN ¹ H (300 MHz, CDCl ₃), do cetol (±)- 5	65
E11 – Espectro de RMN ¹³ C (75 MHz, CDCl ₃), do cetol (±)- 5	66
E12 – Espectro de DEPT 90 e 135 (75 MHz, CDCl ₃), do cetol (±)- 5	67
E13 – Espectro de massas (EI, 70 eV), do <i>cis</i> -diol (±)- 2	68
E14 – Espectro no infravermelho (KBr) do <i>cis</i> -diol (±)- 2	69
E15 – Espectro de RMN ¹ H (500 MHz, DMSO- <i>d</i> 6), do <i>cis</i> -diol (±)- 2	70
E16 – Espectro de RMN ¹³ C (125 MHz, DMSO- <i>d</i> 6), do <i>cis</i> -diol (±)- 2	71
E17 – Espectro de DEPT 90 e 135 (125 MHz, DMSO- <i>d</i> 6), do <i>cis</i> -diol (±)- 2	72
E18 – Espectro de massas (EI, 70 eV) do <i>trans</i> -diol (±)- 2	73
E19 – Espectro no infravermelho (KBr), do <i>trans</i> -diol (±)- 2	74
E20 – Espectro de RMN ¹ H (500 MHz, DMSO- <i>d</i> 6), do <i>trans</i> -diol (±)- 2	75
E21 – Espectro de RMN ¹³ C (125 MHz, DMSO- <i>d</i> 6), do <i>trans</i> -diol (±)- 2	76
E22 – Espectro de DEPT 90 e 135 (125 MHz, DMSO- <i>d</i> 6), do <i>trans</i> - diol (±)- 2	77

1. Introdução

Estereoquímica e quiralidade são propriedades de importância fundamental na química moderna.¹ Desde os primeiros estudos de Pasteur sobre atividade ótica, o interesse na obtenção de compostos enantiomericamente puros cresce continuamente, devido em grande parte à necessidade das indústrias farmacêutica e agroquímica.

As vendas mundiais de drogas formuladas com compostos enantiopuros aumentam em uma razão anual de 13% e alcançaram mais de US\$ 130 bilhões no ano de 2000.² Assim sendo, companhias farmacêuticas e de química fina centradas na produção de drogas e intermediários, são desafiadas a inventar novas tecnologias quirais e aperfeiçoar os processos enantiosseletivos.³ Embora a catálise assimétrica tenha sofrido um crescimento espetacular durante as últimas duas décadas, o método mais comum de obtenção de compostos enantiomericamente puros em escala industrial ainda é via resolução de misturas racêmicas.⁴

A obtenção de um único enantiômero a partir de tais misturas pode ser feita utilizando-se técnicas de separação convencionais como a cristalização diastereoisomérica, ou usando a diferença de reatividade entre os estereoisômeros, por um processo chamado de resolução cinética (Esquema 1).



Esquema 1: Resolução cinética clássica

Nos dois casos, a maior desvantagem é que o produto desejado é obtido com um rendimento máximo de 50%. Se o outro estereoisômero não é requerido, o que

¹ Eliel, E. L.; Wilen, S. H. *Stereochemistry of Organic Compounds*; John Wiley and Sons: New York, **1994**.

² (a) Stinson S. C. *Chem. Eng. News* **2001**, 79, 79. (b) Stinson S. C. *Chem. Eng. News* **2000**, 78, 55.

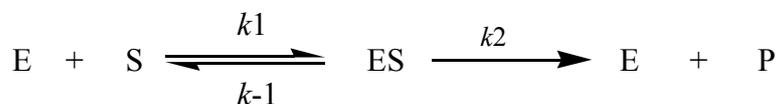
³ May, O.; Verseck, S.; Bommaris, A.; Drauz, K. *Org. Proc. Res. Dev.* **2002**, 6, 452.

⁴ Huerta, F. F.; Minidis, A. B. E.; Bäckvall, J. E. *Chem. Soc. Rev.* **2001**, 30, 321.

acontece normalmente, 50% do material de partida é perdido ou necessita ser reciclado em uma etapa adicional de racemização.

A resolução de racematos é eficientemente realizada por métodos quimio-enzimáticos. Devido à inerente quiralidade do sítio ativo das enzimas, um dos enantiômeros do substrato é convertido no produto mais rapidamente que sua imagem especular. Portanto, considerando uma situação ideal, a resolução enzimática deveria ser interrompida quando o enantiômero reativo fosse completamente convertido no produto. No entanto, em muitos casos, a diferença na velocidade de conversão dos estereoisômeros não é suficientemente grande, portanto, para obtenção do produto com alta enantiosseletividade é necessário finalizar a reação antes de 50% de conversão.

Muitas reações de resolução cinética enzimática seguem a equação de Michaelis-Menten.⁵ Nesses casos, o substrato (S) liga-se reversivelmente a enzima (E) formando um complexo enzima-substrato (ES). Este complexo por sua vez, é irreversivelmente convertido ao produto (P) (Esquema 2).



Esquema 2

A constante de velocidade K_{cat}/K_M (constante catalítica/constante de Michaelis Menten), aparentemente de segunda ordem, é utilizada para avaliar a eficiência global e a especificidade da reação enzimática.⁶

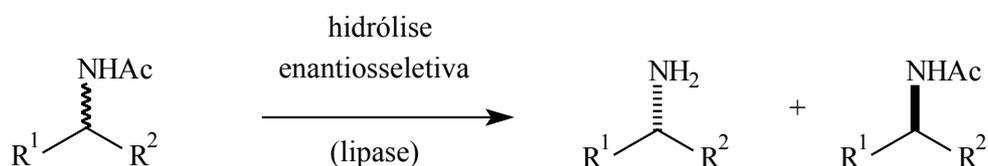
Em uma resolução cinética, os excessos enantioméricos do substrato (ee_s) e do produto (ee_p) variam de acordo com a taxa de conversão. Introduziu-se um parâmetro adimensional, a razão enantiomérica (E), para avaliar a capacidade de uma enzima em distinguir entre dois enantiômeros. O parâmetro E é a razão entre as constantes de velocidade dos dois enantiômeros. Estabeleceu-se empiricamente que, reações cujo

⁵ Michaelis, L.; Menten, M. L.; *Biochem. Z.* **1913**, *49*, 333.

⁶ Fersht, A. *Enzyme Structure and Mechanism*, 2nd ed.; Freeman: New York, **1985**.

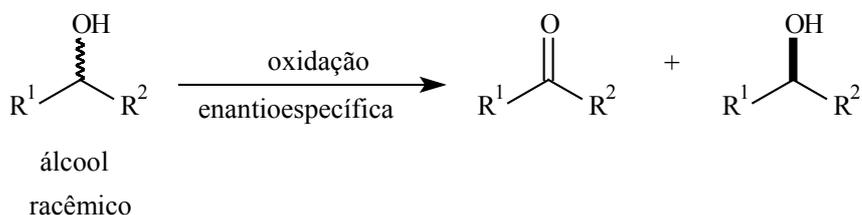
valor de E é menor que 15 são praticamente inúteis para procedimentos de resolução cinética.⁷

As enzimas mais frequentemente empregadas em protocolos de resolução cinética são as lipases,⁸ devido a sua grande aplicabilidade e eficiência. Bioquimicamente classificadas como EC 3.1.X.X. as lipases são enzimas hidrolíticas responsáveis pela transformação de triacilgliceróis nos respectivos ácidos graxos e glicerol. Compostos como álcoois, amins, ésteres e tioésteres podem ser eficientemente resolvidos usando lipases, que podem ser utilizadas tanto em reações de hidrólise como em reações de síntese de ésteres (reações de acilação) com alta seletividade em ambas (Esquema 3).



Esquema 3

Misturas racêmicas de álcoois secundários podem ser eficientemente resolvidas por meio da oxidação enantiosseletiva catalisada por enzimas, resultando em uma mistura do enantiômero remanescente do álcool e da cetona correspondente (Esquema 4).⁹



Esquema 4

⁷ Faber, K. *Biotransformations in Organic Chemistry*, 4th ed.; Springer-Verlag: Berlin, **2000**.

⁸ Kazlauskas, R. J.; Bornscheuer, U. T. *Hydrolases in Organic Chemistry*; Wiley-VHC: Weinheim, **1999**.

⁹ Kroutil, W.; Mang, H.; Edegger, K.; Faber, K. *Adv. Synth. Catal.* **2004**, *346*, 125.

As principais limitações de processos de resolução cinética são:

- rendimento teórico máximo de 50%,
- a etapa de separação do enantiômero do substrato remanescente do produto pode ser laboriosa,
- o excesso enantiomérico do produto diminui, à medida que a conversão se aproxima de 50% (Figura 1).

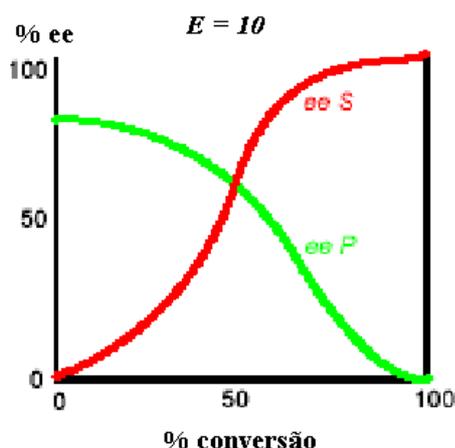


Figura 1. Variação do ee de reagente e produto durante a resolução cinética com $E = 10$.

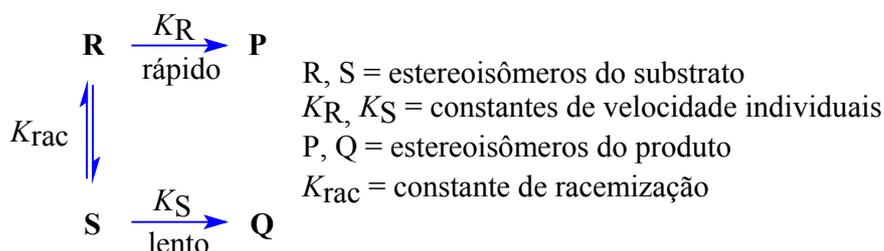
Para superar a maior limitação dos processos de resolução cinética, ou seja, o rendimento máximo de 50%, o substrato deve ser continuamente racemizado durante o processo de resolução, o que leva ao aproveitamento eficiente do material de partida e conseqüente rendimento teórico do produto desejado de 100%. Esse método, chamado de resolução cinética dinâmica (RCD), atualmente é alvo de grande interesse tanto acadêmico como industrial.¹⁰

¹⁰ (a) Chen, C. S.; Sih, C. J. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1989**, *101*, 711. (b) Chen, C. S.; Sih, C. J. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1989**, *28*, 695. (c) Gu, R. L.; Lee, I. S.; Sih, C. J. *Tetrahedron Lett.* **1992**, *33*, 1953. (d) Crich, J. Z.; Brieva, R.; Marquart, P.; Gu, R.L.; Flemming, S.; Sih, C. J. *J. Org. Chem.* **1993**, *58*, 3252. (e) Fulling, G.; Sih, C. J. *J. Am. Chem. Soc.* **1987**, *109*, 2845. (f) Ward, R. S. *Tetrahedron Asymmetry* **1995**, *6*, 1475. (g) Yokozeki, K.; Nakamori, S.; Eguchi, C.; Ymada, K.; Mitsugi, K. *Agric. Biol. Chem.* **1987**, *109*, 2845. (h) Tan, D. S., Günther, M. M.; Drueckhammer, D. G. *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 9093.

Processos de resolução cinética (tanto convencional como resolução cinética dinâmica) são freqüentemente realizados empregando-se células íntegras ou uma combinação de enzimas isoladas, chamados de processos biocatalíticos. Estes são ambientalmente compatíveis em contraste com os processos químicos catalíticos convencionais, especialmente quando fazem uso de catálise empregando metais pesados. Desta forma, a biocatálise é um campo de pesquisa altamente promissor, especialmente para o desenvolvimento de tecnologias sustentáveis para a produção de produtos químicos (“green chemistry”). Por outro lado, em muitos casos, a combinação de procedimentos químicos com métodos biocatalíticos pode ser uma estratégia excelente para a manufatura de produtos da química fina.¹¹ Atualmente, mais de 300 processos foram implantados na indústria,¹² e a demanda por processos ambientalmente limpos é cada vez maior.¹³

Resolução Cinética Dinâmica (RCD)

O princípio da resolução cinética dinâmica é ilustrado no Esquema 5.



Esquema 5

Em tal processo, a resolução cinética é efetuada em uma determinada condição na qual os estereoisômeros do substrato encontram-se em equilíbrio, controlado por

¹¹ Straathof A. J. J.; Panke S.; Schmid A. *Curr. Opin. Biotechnol.* **2002**, *13*, 548.

¹² Liese A.; Seebach K.; Wandrey C. *Industrial biotransformations*; Wiley-VCH Verlag GmbH: Weinheim, **2000**.

¹³ (a) Sheldon R. A. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **1997**, *68*, 381. (b) Bull A. T.; Bunch A. W.; Robinson G. K. *Curr. Opin. Microbiol.* **1999**, *2*, 246.

uma constante K_{rac} . À medida que a concentração do enantiômero mais reativo (no caso, o R) diminui, o equilíbrio é constantemente reajustado por meio da racemização do estereoisômero menos reativo (S).

Alguns aspectos devem ser observados na escolha de um processo de RCD:

(1) a resolução cinética deve ocorrer com alta enantiosseletividade (o que implica que $K_R \gg K_S$),

(2) a velocidade de racemização deve ser igual ou maior que a velocidade de conversão do substrato mais reativo (R) no produto desejado (P),

(3) os dois processos, resolução e racemização devem ser compatíveis, ou seja, dever ocorrer nas mesmas condições reacionais.

(4) obviamente, a racemização do produto deve ser minimizada.

A etapa de resolução deve ser irreversível para resultar em alta seletividade. Além disso, a razão enantiomérica ($E = K_R/K_S$) deve ser maior que 20, para que o processo global seja eficiente. Evidentemente, quanto maior a velocidade de racemização, maior a eficiência da RCD. Se a seletividade da resolução não for muito alta, a velocidade de racemização deve ser no mínimo dez vezes maior que a velocidade de conversão do substrato mais reativo (R) no produto desejado (P).

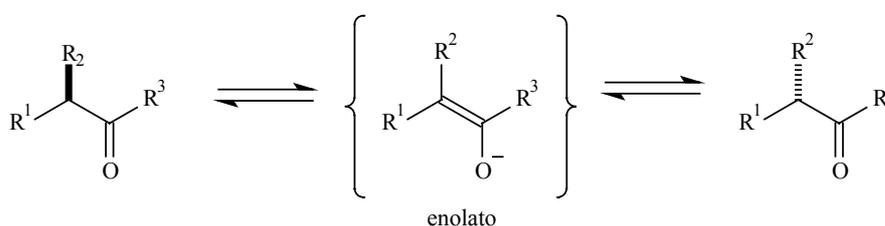
No desenvolvimento de um procedimento de resolução industrial, a racemização do enantiômero indesejado representa muitas vezes um dos obstáculos mais difíceis. Em muitos casos condições drásticas são necessárias, levando à decomposição do produto. Muitas vezes, o substrato deve ser alterado para viabilizar o processo de racemização.

A racemização é a formação de uma mistura racêmica a partir de um enantiômero puro, associado com perda total de atividade óptica. É um processo termodinamicamente irreversível devido ao aumento de entropia causado pela formação dos dois estereoisômeros a partir de um. A inversão de apenas um estereocentro em um composto contendo dois ou mais carbonos assimétricos é chamada de epimerização.

Embora a técnica de racemização dependa largamente das características do substrato a ser racemizado, Zwanenburg e colaboradores classificaram as reações de

racemização em diferentes métodos: i) racemização térmica; ii) catalisada por base; iii) catalisada por ácido; iv) via base de Schiff; v) catalisada por enzimas; vi) racemização via redox e vii) via radicais.¹⁴ Entre estes métodos, apenas aqueles que ocorrem em uma única etapa e em condições brandas, são adequados para uma RCD.

O método mais utilizado para a racemização de compostos opticamente ativos é a catálise básica. Esse método pode ser aplicado para a maioria dos compostos contendo um hidrogênio ácido no carbono quiral. Por exemplo, a racemização de um composto contendo uma carbonila, via um intermediário enolato (Esquema 6).



Esquema 6

O método de racemização via base de Schiff, embora restrito a substratos contendo um grupamento amino no centro quiral, é freqüentemente utilizado na racemização de aminoácidos. Muitos compostos opticamente ativos podem ser racemizados simplesmente pelo aquecimento a uma temperatura apropriada. Apesar de ser um método barato e muito atrativo, só pode ser aplicado em substratos com alta estabilidade térmica.

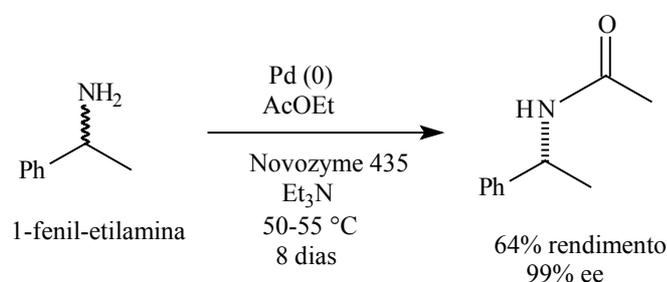
As enzimas utilizadas em reações de racemização são chamadas de racemases. Bioquimicamente classificadas como subgrupo EC 5.1.X.X., as racemases catalisam a inversão da estereoquímica de ambos os enantiômeros de um substrato.¹⁵ As epimerases são responsáveis pelo mesmo tipo de interconversão, porém em diastereoisômeros. As duas famílias pertencem ao heterogêneo grupo das isomerases e são responsáveis pela inversão da estereoquímica em sistemas biológicos.

¹⁴ Ebbers, E. J.; Arisans, G. J. A.; Houbiers, J. P. M.; Bruggink, A.; Zwanenburg, B. *Tetrahedron* **1997**, *28*, 9417.

¹⁵ Whitman, C. P.; Hegeman, G. D.; Cleland, W. W.; Kenyon, G. L. *Biochemistry* **1985**, *24* (15), 3936.

Freqüentemente, necessitam de um cofator fosfato de piridoxila ou um íon metálico divalente para funcionar adequadamente.¹⁶ Apesar da rara ocorrência na natureza, podem ser muito úteis na química orgânica sintética, pois catalisam reações de isomerização difíceis de serem conseguidas quimicamente. Os substratos usados nestas reações possuem dois aspectos em comum: a) o centro quiral possui um próton; b) adjacente ao centro quiral existe um grupo carbonila ou um substituinte retirador de elétrons, com capacidade de aumentar a acidez do hidrogênio em questão. Aminoácidos, α -hidroxiácidos,¹⁷ e estruturas relacionadas cobrem quase todos os exemplos conhecidos até o momento.

Há um número grande de exemplos na literatura de métodos eficientes de RCD que utilizam uma combinação enzima-metal, nos quais um metal, ou um complexo metálico atua na etapa de racemização e uma enzima (geralmente lipases) na etapa de resolução.¹⁸ Em um trabalho pioneiro, Reetz e Schimossek utilizaram catalisadores de paládio sob carbono em combinação com Novozyme 435[®], uma lipase imobilizada (do microrganismo *Candida antartica*) na presença de acetato de etila e trietilamina na resolução da 1-fenil-etilamina via acetilação.¹⁹ A racemização promovida pelo Pd(0) é a etapa lenta da RCD, que leva oito dias (Esquema 7).



Esquema 7

¹⁶ Kenyon, G. L.; Gerrlt, J. A.; Petsko, G. A.; Kozarich, J. W. *Acc. Chem. Res.* **1995**, *28*, 178.

¹⁷ Glueck, S. M.; Pirker, M.; Nestl, B. M.; Euberbacher, B. T.; Schnell, B. L.; Csar, K.; Hauer, B.; Stuermer, R.; Kroutil, W.; Faber, K. *J. Org. Chem.* **2005**, *70*, 4028.

¹⁸ (a) Person, B. A.; Larsson, A. L. E.; Ray, M. L.; Bäckvall, J-E. *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 1645. (b) Huerta, F. F.; Laxmi, Y. R. S.; Bäckvall, J-E. *Org. Lett.* **2000**, *2*, 1037. (c) Dijksmann, A.; Elzinga, J. M.; Li, Y. X.; Arends, I. W. C. E.; Sheldon, R. A. *Tetrahedron: Asymmetry* **2002**, *13*, 879. (d) Kim, M. J.; Choi, Y. K.; Choi, M. Y.; Kim, M. J.; Park, J. *J. Org. Chem.* **2001**, *66*, 4736. (e) Choi, J. H.; Kim, Y. H.; Nam, S. H.; Shin, S.T.; Kim, M. J.; Park, J. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 1037. (f) Reetz, M. T.; Schimossek, K. *Chimia* **1996**, *50*, 668. (g) Pamies, O.; Bäckvall, J-E. *J. Org. Chem.* **2001**, *66*, 4022. (h) Pamies, O.; Bäckvall, J-E.; *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 9006.

¹⁹ Reetz, M. T.; Schimossek, K. *Chimia*, **1996**, *50*, 668.

Complexos metálicos de rutênio (Figura 2) são largamente empregados em processos de RCD de álcoois secundários e dióis.²⁰ Por exemplo, a resolução quimioenzimática do 2,4-nonanodiol via acetilação ilustra um eficiente processo de dupla RCD (Esquema 8).

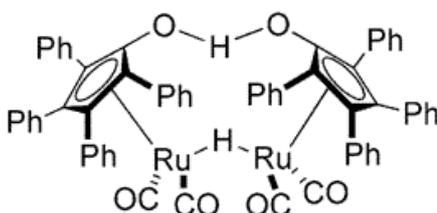


Figura 2



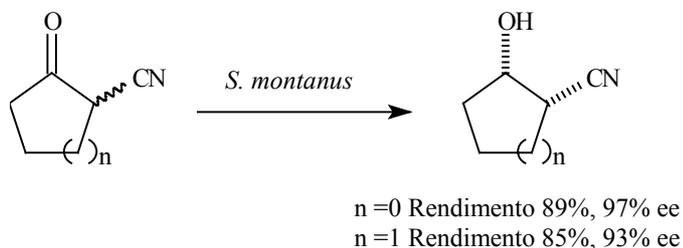
Esquema 8

Alguns exemplos de RCD quimioenzimáticas são efetuados via combinação de resolução cinética com métodos de racemização não-metálicos. Essa metodologia, no entanto, pode ser aplicada quase que exclusivamente em substratos contendo um hidrogênio ácido no centro estereogênico, no qual a racemização é catalisada por base, via formação de enol. Esse método vem sendo aplicado em combinação com redução assimétrica catalisada por enzimas em β -cetoésteres α -substituídos e nitrilas.²¹ Por exemplo, a redução estereosseletiva de 2-oxocicloalcanocarbonitrila para os

²⁰ Pamies, O.; Bäckvall, J-E. *Chem. Rev.* **2003**, *103*, 3247.

²¹ (a) Fogal, E.; Forzato, C.; Nitti, P.; Pitacco, G.; Valentin, E.; *Tetrahedron: Asymmetry* **2000**, *11*, 2599. (b) Howarth, J.; James, P.; Dai, J. *Tetrahedron Lett.* **2001**, *42*, 7517. (c) Dehli, J.; Gotor, V. *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 6816.

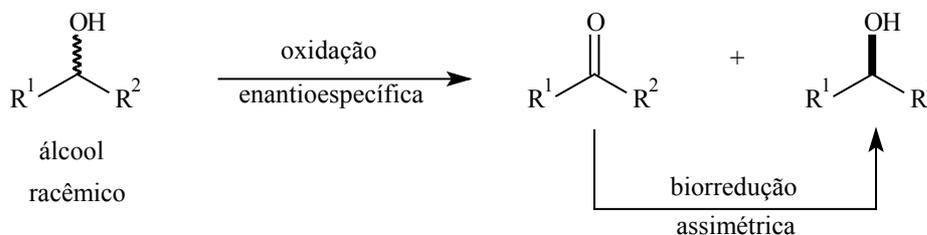
correspondentes *cis*-hidroxinitrilas em altos rendimentos e seletividade foi efetuada com a levedura *Saccharomyces montanus* CBS 6772²² (Esquema 9).



Esquema 9

O método de racemização catalisado por base também pode ser utilizado em combinação com resolução efetuada por lipases.²³

Há ainda alguns exemplos na literatura nos quais as duas etapas da RCD são efetuadas por métodos biocatalíticos, utilizando uma combinação de enzimas isoladas ou células íntegras de microorganismos. Por exemplo, uma mistura racêmica de álcoois secundários pode ser resolvida por meio de oxidação e redução estereosseletivas (Esquema 10).



Esquema 10

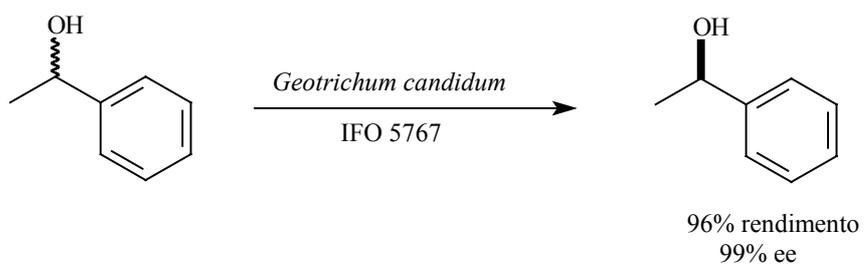
Nesse processo, pode-se utilizar dois microorganismos diferentes, sendo que um deles atua na oxidação e o outro na etapa de redução,²⁴ ou ainda, pode-se empregar

²² Brown, S. A.; Parker, M. C.; Turner, M. J. *Tetrahedron: Asymmetry* **2000**, *11*, 1687.

²³ (a) Turner, N. J.; Winterman, J. R.; McCague, R.; Parrat, J. S.; Taylor, S. J. *Tetrahedron Lett.* **1995**, *36*, 1113. (b) Chen, C. Y.; Cheng, Y. C.; Tsai, S. W. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **2002**, *77*, 699.

²⁴ (a) Fantin, G.; Fogagnolo, P. P.; Medici, A.; Pedrini, P.; *Tetrahedron: Asymmetry* **1995**, *6*, 3047. (b) Takahashi, E.; Nakamichi, K.; Furui, M. *J. Ferm. Bioeng.* **1995**, *80*, 247.

um único microrganismo que possua as atividades enzimáticas desejadas, com estereosseletividades opostas.²⁵ Por exemplo, a resolução do feniletanol pelo microrganismo *Geotrichum candidum* IFO 5767 estudada por Nakamura *et al*^{25(a)} (Esquema 11).



Esquema 11

²⁵ (a) Nakamura, K.; Inoue, Y.; Matsuda, T.; Ohno, A. *Tetrahedron Lett.* **1995**, *36*, 6263. (b) Takemoto, M.; Achiwa, K. *Tetrahedron: Asymmetry* **1995**, *6*, 2925.

2. Justificativa

Nos últimos anos, há um grande interesse na preparação de dióis vicinais por apresentarem atividades biológicas e serem de grande utilidade como precursores em muitas transformações orgânicas úteis.²⁶ Como a quiralidade é um fator chave na eficácia de muitas drogas farmacêuticas e produtos agroquímicos, o preparo desses dióis vicinais por meio de redução assimétrica de cetonas via biocatalisadores é hoje reconhecida como uma abordagem atraente para a síntese de compostos enantiomericamente puros.

Estudos recentes realizados em nosso laboratório mostraram que células em repouso da levedura *Trichosporon cutaneum* CCT 1903 são capazes de biotransformar a 1,2-indanodiona (**1**) no (1*S*,2*R*)-1,2-indanodiol (**2**), com elevada diastereo- e enantiosseletividade (90% de rendimento com um excesso enantiomérico >99%) através de um processo de resolução cinética dinâmica (Esquema 12).²⁷ A redução da diona **1** é de grande interesse comercial, pois o diol **2** é um importante precursor do (1*S*,2*R*)-1-amino-2-indanol (**3**), que além de ser utilizado como ligante quiral em síntese assimétrica,²⁸ é matéria prima chave na síntese do fármaco Indinavir (**4**), inibidor da protease do HIV, Crixivan[®], usado no tratamento da AIDS²⁹ (Figura 3). O (1*S*,2*R*)-indanodiol (**2**) é produzido em escala industrial via epoxidação assimétrica do indeno utilizando NaOCl aquoso, catalisado pelo complexo de Jacobsen salen-manganês.³⁰

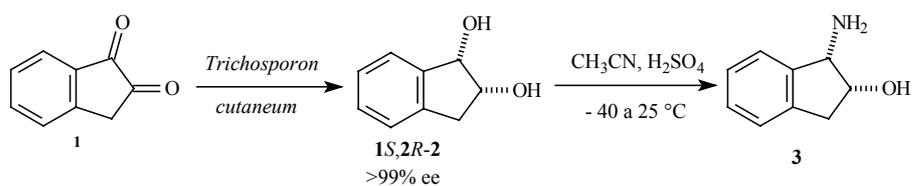
²⁶ (a) Angelastro M. R.; Mehdi S.; Burkhart J. P.; Peet N. P.; Bey P. *J. Med. Chem.* **1990**, *33*, 11. (b) Murakami M.; Masuda H.; Kawano T.; Nakamura H.; Ito Y. *J. Org. Chem.* **1991**, *56*, 1. (c) Seyferth, D.; Weinstein R. M.; Hui R. C.; Wei-Liang W.; Archer C. M. *J. Org. Chem.* **1991**, *56*, 5768.

²⁷ Conceição, G. J. A.; Moran, P. J. S.; Rodrigues, J. A. A.; *Tetrahedron: Asymmetry* **2003**, *14*, 2327.

²⁸ Senanayake, C.H. *Aldrichim. Acta* **1998**, *31*, 3.

²⁹ (a) Vacca, J. P.; Dorsey, B. D.; Schlieff, W. A.; Levin, R. B.; McDaniel, S. L.; Derke, P. L.; Zugay, J.; Quitero, J. C.; Blahny, O. M.; Roth, E.; Sardana, V. V.; Schalabach, A. J.; Graham, P. J.; Condra, J. H.; Gotlib, L.; Holloway, M. K.; Lin, J.; Chen, I. W.; Vastag, K.; Ostovic, D.; Ardenson, P. S.; Emini, E. A.; Huff, J. R. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1994**, *91*, 4096. (b) Reider, P. *Chimia*, **1997**, *51*, 306.

³⁰ Hughes, D. L.; Smith, G. B.; Liu, J.; Dezeny, G. C.; Senanayake, C. H.; Larsen, R. D.; Verhoeven, T. R.; Reider, P. J. *J. Org. Chem.*, **1997**, *62*, 2222.



Esquema 12

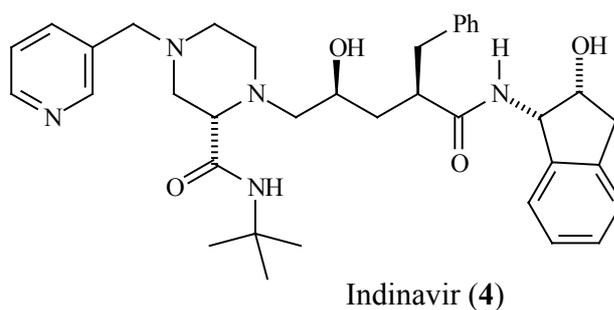
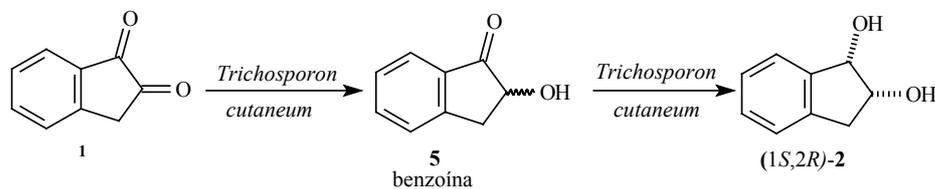


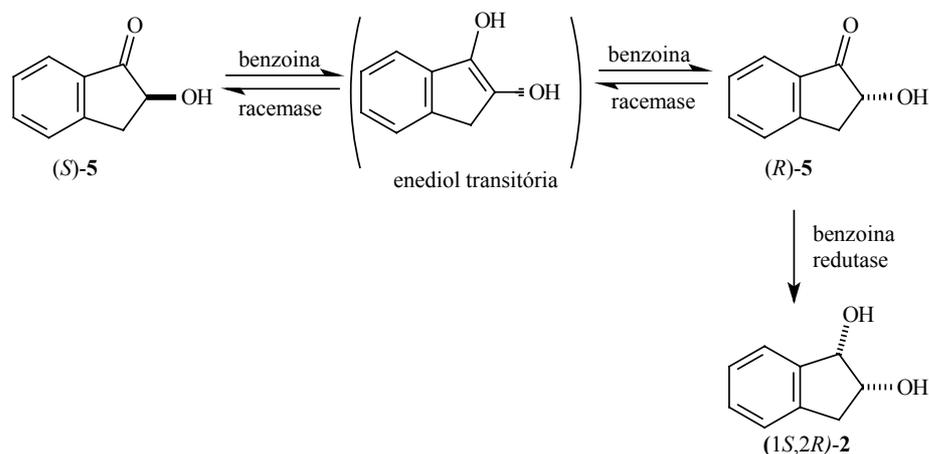
Figura 3

Durante a realização do experimento observou-se, através de monitoramento com análises por CG/EM (usando uma coluna quiral), que a benzoína **5** foi acumulada na forma racêmica e que, após muitas horas de reação (20 h em uma escala reacional de 1 g), somente o enantiômero (*R*)-**5** foi convertido lentamente ao (1*S*,2*R*)-indanodiol (**2**) (Esquema 13). Assim, conforme o enantiômero mais reativo (*R*)-**5** foi sendo consumido durante a reação de redução estereosseletiva para formar o produto **2** o equilíbrio (*R*)-**5**/*S*)-**5** foi sendo constantemente reajustado, até o consumo completo do substrato.



Esquema 13

Desta forma, em uma etapa concorrente, o enantiômero não-reativo (*S*)-**5** foi isomerizado para (*R*)-**5**. O resultado final foi a transformação completa de um racemato transitório em um único produto estereoisomérico com elevado rendimento (90%). Estas observações experimentais mostraram que a redução da dicetona **1** por células em repouso *Trichosporon cutaneum* não é simplesmente realizada em um processo de 2 etapas, *i.e.*, redução regio e enantiosseletiva de **1** para formar (*R*)-**5** seguida de uma redução estereosseletiva para fornecer **2**. Assim sendo, foi proposto que uma terceira enzima, uma racemase seria o agente responsável pela isomerização da benzoína **5**³¹ (Esquema 14).



Esquema 14

Diante da notável capacidade do *Trichosporon cutaneum* promover a resolução da (\pm)-2-hidroxi-1-indanona (**5**) levando ao diol homoquiral (*1S,2R*)-1,2-indandiol (**2**) com elevado rendimento e excelente ee, sentiu-se a necessidade de compreender os detalhes mecanísticos desta inédita transformação.

³¹ Tanner M. E. *Acc. Chem. Res.* **2002**, 35, 237.

3. Objetivos

Foram três os principais objetivos do presente trabalho de pesquisa:

(1) Estudar o processo de resolução cinética dinâmica (RCD) da (\pm)-2-hidroxi-1-indanona mediada pela levedura *Trichosporon cutaneum* CCT 1903, envolvendo as seguintes questões:

(a) determinar se a etapa de isomerização na RCD é ou não de natureza enzimática;

(b) estudar e estabelecer a cinética de isomerização dos enantiômeros da 2-hidroxi-1-indanona;

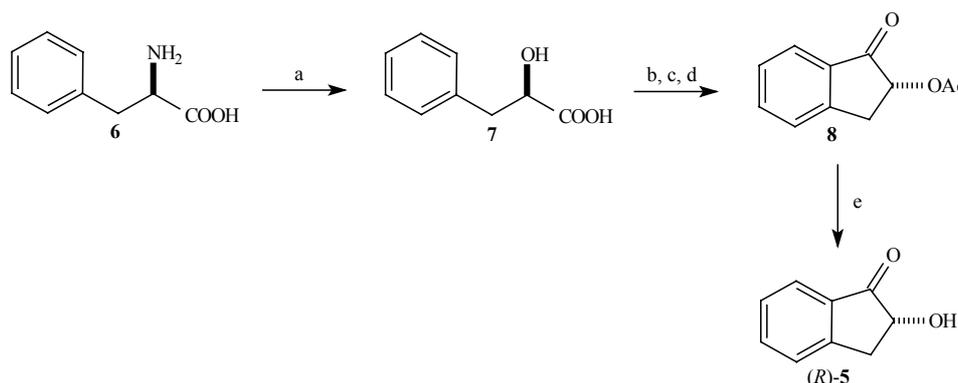
(2) Sintetizar os substratos (*R*)- e (*S*)-2-hidroxi-1-indanona, a serem utilizados no estudo sistemático da reação com *T. cutaneum*;

(3) Encontrar as condições ótimas para realização da reação de desracemização da (\pm)-2-hidroxi-1-indanona, visando a obtenção do (1*S*,2*R*)-1,2-indanodiol.

4 - Resultados e discussão

4.1 - Preparo dos substratos quirais

Utilizou-se a metodologia descrita por Kajiro *et al*³¹ para a síntese da (*R*)-**5** e da (*S*)-2-hidroxi-1-indanona (**5**), partindo-se respectivamente da D- e da L-fenilalanina (**6**). O Esquema 15 ilustra o preparo da (*R*)-2-hidroxi-1-indanona (**5**):



Esquema 15. Condições: NaNO_2 , H_2SO_4 1 mol \cdot L⁻¹; (b) $(\text{Ac})_2\text{O}$ /piridina; (c) SOCl_2 ; (d) $\text{AlCl}_3/\text{CH}_2\text{Cl}_2$; (e) $\text{Sc}(\text{OTf})_3$ (20 mol%)/ $\text{MeOH-H}_2\text{O}$.

A primeira etapa (a) da rota sintética é uma reação de diazotização, na qual o grupo amino da D-fenilalanina foi convertido em uma hidroxila, através da reação com nitrito de sódio em meio de ácido sulfúrico (1 mol \cdot L⁻¹), por 3 horas a 25 °C. Após recristalização obteve-se o α -hidroxiácido (*R*)-**7** com rendimento de 77%. O composto **7** foi caracterizado pelo ponto de fusão 118,4–121,5 °C (lit.³² 126,0–127,0 °C) e pela medida de $[\alpha]_D^{20}$: +25,4° (c 1, água) (lit.³²: +21,1° c 1, água).

Após a conversão de uma pequena quantidade do sólido (cerca de 1 mg) no éster metílico via tratamento com diazometano em éter etílico, determinou-se 99% ee por meio de CG/EM utilizando uma coluna quiral.

Utilizando-se a mesma metodologia, obteve-se o estereoisômero (*S*)-**7** com rendimento de 75% e 99% ee.

³¹ Kajiro, H.; Mitamura, S.; Mori, A.; Hiyama, T. *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **1999** 72, 1093.

³² Urban, F. J.; Moore, B. S. *J. Heterocycl. Chem.* **1992**, 29, 431.

Na etapa **b** efetuou-se a proteção da hidroxila de **7** através da reação com anidrido acético e piridina. O andamento da reação foi observado por CG/EM (tratando-se uma pequena alíquota da reação com diazometano, para formação do éster metílico) e após 12 horas observou-se o completo consumo do material de partida. Efetuada a manipulação da reação, obteve-se o produto desejado com rendimento quantitativo. No espectro de massas não se observou o íon molecular do composto, no entanto, o pico referente ao fragmento CH_3CO^+ m/z 43 (100%) foi detectado.

A etapa (**c**) consistiu na transformação do ácido protegido em um cloreto de ácido, através da reação com cloreto de tionila, a 50 °C, por 3 horas. Decorrido esse período, destilou-se a mistura para retirada do cloreto de tionila, e efetuou-se a próxima etapa com o material bruto, sem qualquer purificação.

Na etapa (**d**) efetuou-se uma reação de Friedel-Crafts intramolecular, utilizando-se cloreto de alumínio, como ácido de Lewis. Após várias tentativas que levaram a um rendimento muito baixo (cerca de 20%), sublimou-se o ácido de Lewis e então foi possível a obtenção do acetato **8** na forma de cristais amarelo-claro, com rendimento de 65% e ponto de fusão 81,3-81,5°C. (lit.³¹: 80,5-81,5°C). No espectro de massas não se observou o íon molecular, porém detectou-se o pico referente à perda do grupo acetila m/z 147 (7%), e o pico base m/z 43, referente ao fragmento CH_3CO^+ . No espectro de infravermelho, observou-se a presença da banda de estiramento da carbonila (1728 cm^{-1}).

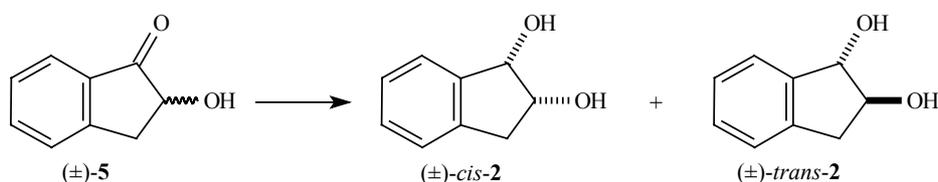
Por último, hidrolisou-se o acetato **8** com triflato de escândio (20 mol%) em metanol a 30 °C por 24 horas, e obteve-se a (*R*)-2-hidroxi-1-indanona (**5**) na forma de cristais brancos com rendimento de 82% e ponto de fusão 79,9-81,0°C (literatura³¹: 82,4 - 83,7°C). No espectro de massas observou-se o íon molecular m/z 148 (87%). Já no espectro de infravermelho, observou-se uma larga banda de estiramento O-H (3418 cm^{-1}). Efetuou-se também a hidrólise de **8** na presença de hidróxido de lítio e peróxido de hidrogênio³³. Essa alternativa, atraente devido ao baixo custo do reagente, levou a

³³ (a) Kerdeski, F. A. J.; Schmidt, S. P.; Brooks, D. W. *J. Org. Chem.*, 58, 3516, 1993. (b) Hayward, C. M.; Fisher, M. J.; Yohannes, D.; Danishefsky, S. J. *Tetrahedron Lett.* 1993, 34, 3989.

parcial decomposição do substrato, resultando em um baixo rendimento (50% rendimento, 97% ee). Apesar do alto custo do triflato de escândio, o mesmo pode ser recuperado, após evaporação do solvente e secagem em bomba de vácuo, e reutilizado, o que viabilizou seu uso.

Considerando-se as 5 etapas, obteve-se rendimento global de 35% (98% ee) para o composto (*R*)-**5** e 32% (97% ee) para (*S*)-**5**, que foi preparado com a mesma metodologia, a partir da L-fenilalanina (**6**). Com os dois enantiômeros da benzoína **5** em mãos, iniciou-se o estudo sistemático de suas biotransformações.

4.2 - Obtenção dos padrões (*±*)-*cis*-1,2-indanodiol e *trans*-(*±*)-1,2-indanodiol



Esquema 16

Os 1,2-indanodíois *cis* e *trans* foram preparados a partir da redução da (*±*)-benzoína **5** com borohidreto de sódio em metanol. O diastereoisômero *trans* foi obtido como produto principal (57% rendimento), ponto de fusão 160-161,5° (lit.³⁴: 157°C). O diastereoisômero *cis* foi o produto minoritário (17% rendimento), ponto de fusão 94-98°C (lit.³³: 98°C). No espectro de massas de ambos os 1,2-indanodíois detectou-se o íon molecular *m/z* 150 (13% para o *cis* e 44% para o isômero *trans*).

4.3 - Experimentos controle

Os experimentos controle foram idealizados e realizados a fim de definir de forma inequívoca se o passo de isomerização observado durante a resolução cinética

³⁴ Kato, Y., Asano, Y., *J. Mol. Cat. .: Enzymatic*, **2001**, 7, 27.

dinâmica da benzoína (\pm)-**5** é um processo enzimático ou simplesmente “espontâneo” (induzido pelas condições reacionais, tais como: pH, temperatura etc.).

Estes experimentos foram conduzidos de três maneiras diferentes:

4.3.1 - Na ausência total de células da levedura

Os compostos (*R*)-**5** e (*S*)-**5** foram dissolvidos separadamente em etanol (1 mL) e transferidos para dois erlenmeyers, contendo 50 mL de água destilada cada um. Incubou-se a 28°C em agitador orbital.

4.3.2 - Na presença de células mortas da levedura

Foram utilizadas células mortas de *T. cutaneum*, por autoclavagem da suspensão de 3 g (peso úmido) de células da levedura em água destilada (50 mL), a 121 °C por 15 min. Adicionaram-se 50 mg das benzoínas (*R*)-**5** ou (*S*)-**5** e incubou-se a 28 °C em agitador orbital.

4.3.3 - Na presença de células mortas da levedura, por tratamento com solventes

Utilizaram-se 3 g de células desidratadas da levedura, mortas pelo tratamento com etanol, acetona e secagem em estufa. À suspensão das células em água destilada (50 mL), adicionaram-se 50 mg das benzoínas (*R*)-**5** ou (*S*)-**5** e incubou-se a 28 °C em agitador orbital.

Todos os experimentos acima foram agitados a 28 °C por sete dias. Após este período, as fases aquosas foram extraídas com acetato de etila e secas sob sulfato de sódio anidro. Os extratos orgânicos resultantes foram concentrados sob pressão reduzida e analisados por CG/EM, utilizando coluna quiral.

A análise dos produtos obtidos nos três experimentos classificados como controle mostrou que a isomerização entre (*R*)-**5** e (*S*)-**5** não é um processo “espontâneo”, nem induzido por algum componente do meio reacional, já que os substratos foram recuperados quantitativamente (foram recuperados entre 45 e 48 mg de cada uma das benzoínas) e com excessos enantioméricos idênticos ao início da reação. Portanto, a etapa de isomerização entre (*S*)-**5** e (*R*)-**5** que ocorre na RCD de (\pm)-**5** é, com certeza, um processo enzimático.

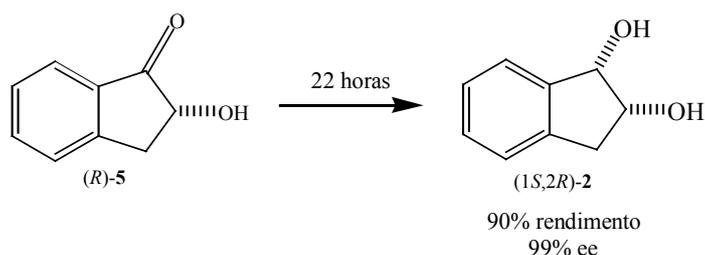
Após esta constatação, partiu-se efetivamente para as reações de biocatálise, buscando-se entender o processo de biotransformação de (*R*)-**5** e (*S*)-**5**, separadamente, em detalhes. Estas reações foram efetuadas utilizando-se 50 mg de substrato, 3 g (peso úmido) de células viáveis da levedura, em 50 mL de água destilada ou tampão. As suspensões foram sempre incubadas em agitador orbital (shaker), na temperatura desejada.

4.4 - Biotransformações com a levedura *Trichosporon cutaneum* CCT 1903 em água

4.4.1 - Redução da (*R*)- ou (*S*)-2-hidroxi-1-indanona (**5**), em água a 28 °C

Os experimentos realizados com os compostos (*R*)-**5** ou (*S*)-2-hidroxi-1-indanona (**5**), usando-se água destilada (incubação a 28 °C), mostraram uma grande diferença tanto na reatividade como no comportamento dos dois enantiômeros frente à reação com *Trichosporon cutaneum*. Verificou-se que o enantiômero *R* é diretamente convertido no *cis*-indanodiol em 21 horas (Esquema 17). Além disso, formou-se ainda uma pequena porcentagem relativa (~2,5%) do *trans*-indanodiol e, o que é mais importante, em nenhum momento a isomerização do isômero *R*-**5** no *S*-**5** foi observada.

As proporções relativas entre substratos e produtos, no decorrer das reações de redução mediadas por *T. cutaneum*, encontram-se ilustradas na Figura 4.



Esquema 17

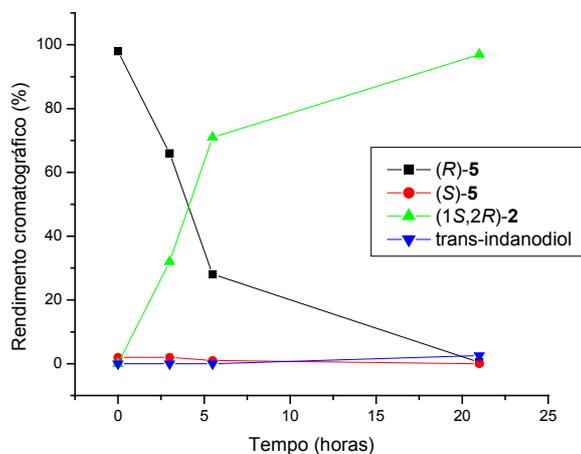


Figura 4. Proporção entre reagentes e produtos para a redução assimétrica de (R)-5 por *Trichosporon cutaneum*, em água destilada, a 28 °C

Por outro lado, a redução da benzoína (S)-5, além de ser mais lenta, é mais complexa (Figura 5).

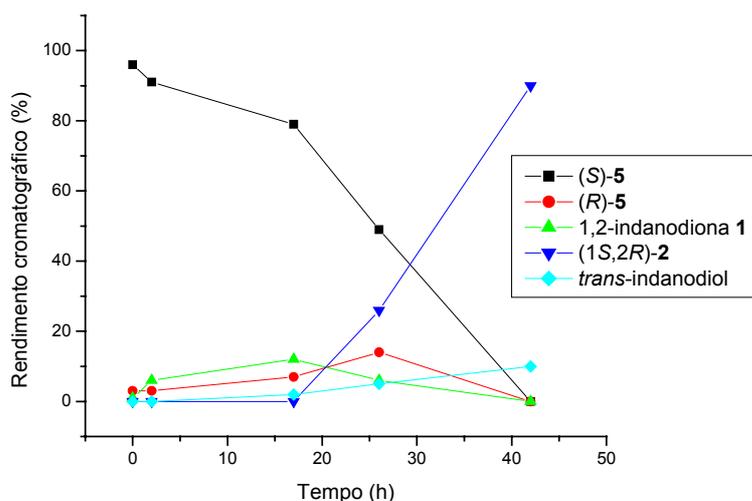


Figura 5. Proporção relativa entre substratos e produtos para a redução assimétrica de (S)-5 por *Trichosporon cutaneum* em água, a 28° C

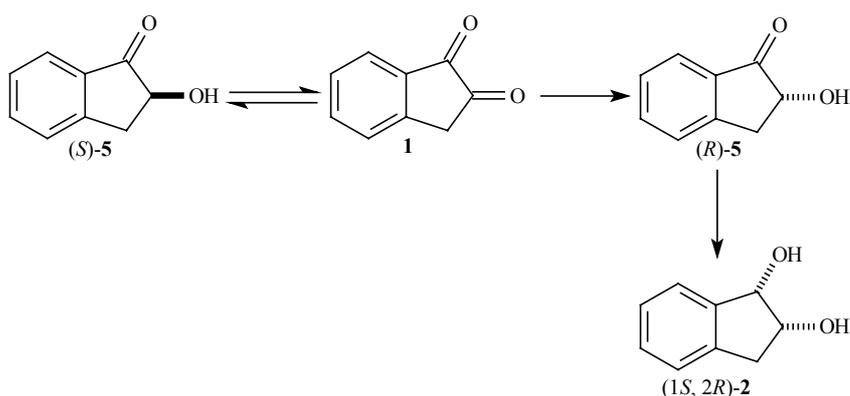
O tempo necessário para conversão total do material de partida foi de 42 horas, ou seja, o dobro do tempo necessário para a conversão de (R)-5. Além disso, o produto de redução, 1,2-indanodiol (2), só foi detectado após as 18 horas de reação. Nas primeiras 27 horas de reação observou-se a conversão parcial de (S)- 5 em (R)-5, além

da formação da 1,2-indanodiona (**1**). Estas informações foram de extrema relevância e nos levaram a repensar nossa proposta inicial sobre o mecanismo ocorrido na RCD.

A utilização das benzoínas (*R*)-**5** e (*S*)-**5** nas reações de redução biocatalisadas nos permitiu concluir que a estereoinversão do material de partida ocorreu apenas com o substrato (*S*)-**5**, ou seja, (*S*)-**5** é convertido em (*R*)-**5** pela ação de alguma enzima presente na levedura com atividade de isomerase, mas o oposto, a conversão de (*R*)-**5** em (*S*)-**5**, nunca foi observado.

Com isso, descarta-se a hipótese da ação de uma isomerase do tipo racemase no processo de RCD em estudo, pois uma isomerase como essa seria capaz, por definição, de estabilizar dois estados de transição estereoisoméricos,³¹ ou seja, deveria aceitar igualmente como substrato ambos enantiômeros de determinado composto quiral, o que levaria à obtenção de uma mistura racêmica¹⁵. Desta forma, como (*R*)-**5** não é isomerizado, é necessário evocar, no processo de resolução cinética dinâmica de (\pm)-**5**, a ação de uma isomerase que atua apenas sobre (*S*)-**5**.

Por outro lado, a formação da 1,2-indanodiona (**1**), na biotransformação da benzoína (*S*)-**5** pela levedura *T. cutaneum*, levou-nos a propor uma segunda hipótese para explicar a estereoinversão de (*S*)-**5** no processo de RCD de (\pm)-**5**. Nesta segunda hipótese propomos que ocorra uma oxidação seletiva de (*S*)-**5**, levando à formação da dicetona **1**, seguida da posterior redução enzimática da dicetona **1** tanto no composto (*S*)-**5** quanto no (*R*)-**5** (Esquema 18).

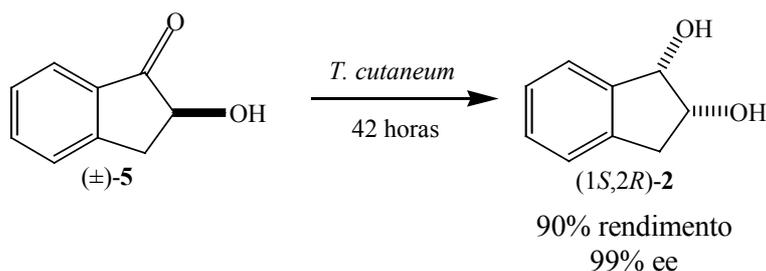


Esquema 18

Efetou-se em seguida, a biotransformação utilizando a benzoína racêmica (\pm)-**5** para observarmos se o produto de oxidação, a dicetona **1** realmente é formada durante a RCD.

4.4.2 - Redução da (\pm)-2-hidroxi-1-indanona (**5**), em água a 28 °C

A figura 6 mostra o perfil reacional para a redução do substrato racêmico (\pm)-**5** pela levedura *T. cutaneum*. O alto rendimento (90%) e excelente ee (99%) (Esquema 19) comprovam que a redução do substrato ocorre via um processo de resolução cinética dinâmica. De acordo com a estereoquímica do produto final (1*S*,2*R*)-indanodiol (**2**) conclui-se que o mesmo foi formado a partir da redução de (*R*)-**5**, e portanto, a estereoquímica do enantiômero (*S*)-**5** teve necessariamente de ser invertida.



Esquema 19

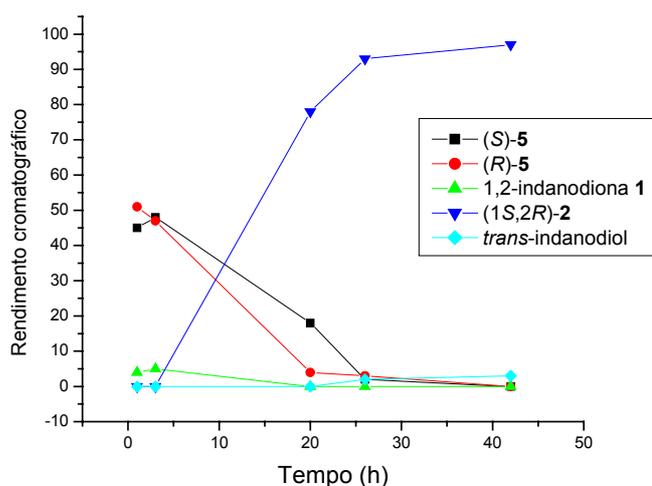


Figura 6. Proporção entre reagentes e produtos para a redução de (\pm)-**5** por *Trichosporon cutaneum* em água a 28° C

Observou-se que a 1,2-indanodiona (**1**) foi formada logo no início da reação. A presença deste produto de oxidação não nos permite concluir a origem a estereoinversão de (S)-2-hidroxi-1-indanona (**5**) durante a RCD.

Na tentativa de entendermos melhor o processo de resolução cinética dinâmica de (±)-2-hidroxi-1-indanona (**5**) e optarmos por uma das duas hipóteses, decidimos realizar alguns experimentos de biotransformação usando a 1,2-indanodiona (**1**) como substrato para a levedura *T. cutaneum*.

4.4.3 – Biotransformação da 1,2-indanodiona (**1**) por *T. cutaneum* em água a 28 °C

O progresso da reação de redução da dicetona **1** por *T. cutaneum*, em água destilada, a 28 °C, está ilustrado na Tabela 1. Logo após 10 min. de incubação, a análise de uma amostra da mistura por CG/EM indicou a presença da benzoína (S)-**5**. Por outro lado, a formação da benzoína (R)-**5** foi observada apenas após 90 minutos de reação.

Tabela 1. Perfil da biotransformação da 1,2-indanodiona (**1**) por *T. cutaneum* em água, a 28 °C.

Tempo de incubação (h)	(S)- 5 (%)	(R)- 5 (%)	1 (%)	(1S,2R)- 2 (%)
2	38	2	60	-
4	35	24	41	-
27	20	51	29	-
31	22	55	22	-
48	50	43	7	-
71	54	traços	1	45
79	37	traços	traços	63
120	-	-	-	100

Como pode ser observado na Tabela 1, na medida em que a dicetona **1** é reduzida, a proporção de (S)-2-hidroxi-1-indanona (**5**) decresce e a de (R)-**5** aumenta gradativamente (máximo de 55% em 31 horas de incubação), como se o primeiro composto estivesse sendo convertido no segundo. Esta tendência se inverte à medida que (R)-**5** é convertido ao diol (1S,2R)-indanodiol (**2**). É importante notar que a formação deste diol começa a ocorrer apenas após 48 horas de incubação, fato este que coincide com a presença de quantidades mínimas da dicetona **1** no meio reacional.

A partir dos resultados obtidos com os experimentos acima descritos, pode-se afirmar com certeza que a formação da (S)-2-hidroxi-1-indanona (**5**) ocorre via redução da 1,2-indanodiona (**1**). No entanto, ainda não há dados suficientes para afirmar o mesmo para a (R)-2-hidroxi-1-indanona (**5**). O aparecimento tardio deste composto no meio reacional indica que ele pode ter sido formado pela isomerização progressiva de (S)-**5**, devido à ação de uma isomerase. A hipótese de isomerização enzimática parece ser a mais atrativa, mas para afirmar isso, deve-se tentar impedir a oxidação de (S)-**5** para a dicetona **1**.

Na tentativa de obtermos mais informações sobre a influência das condições reacionais no processo de RCD de (±)-**5**, realizamos alguns experimentos para avaliar a influência da temperatura de incubação sobre a biotransformação de (R)-**5**, (S)-**5** e da dicetona **1** por *T. cutaneum*.

4.5 - Influência da temperatura sobre o desempenho de *T. cutaneum*

4.5.1 - Experimentos realizados a 20°C

Estes experimentos foram realizados usando-se água destilada e os substratos testados foram (R)-**5** e (S)-**5**. A reação realizada com (R)-**5** como substrato levou à obtenção do diol (1S,2R)-**2**, com rendimento de 92%, após 70 horas de reação, com recuperação de 8% do material de partida. Conforme já esperado, observou-se uma diminuição na velocidade de redução de (R)-**5**, quando comparado com a reação de redução efetuada a 28 °C, onde a conversão completa foi alcançada em apenas 21 horas. Nenhuma isomerização de (R)-**5** em (S)-**5** foi observada.

Deve-se salientar também que foram retiradas alíquotas periódicas para o acompanhamento da reação e que a presença da dicetona **1** não foi detectada em nenhuma dessas alíquotas. Isso mostra que (*R*)-**5** não é oxidado nem isomerizado nestas condições.

O perfil reacional da redução de (*S*)-**5** nestas condições é análogo àquele observado anteriormente, a 28 °C, ou seja, ocorreu a oxidação de (*S*)-**5** na dicetona **1**, seguida da formação de (*R*)-**5** e posterior conversão deste no diol **2**. A diferença é que a reação foi muito mais lenta a 20 °C, como esperado. Mesmo após 70 horas de incubação, a presença do diol **2** não foi detectada. No entanto, após 7 dias de reação, todo material de partida foi convertido ao diol (1*S*,2*R*)-**2**.

4.5.2 - Experimentos realizados a 40 °C

A redução de (*R*)-**5** a 40 °C levou à obtenção do (1*S*,2*R*)-indanodiol (**2**), como nas reações efetuadas a 28°C. A diferença é que a reação, apesar de ser rápida no início, não levou ao consumo completo do substrato.

Na redução de (*S*)-**5**, observou-se sua racemização quase que completa após 7 horas de incubação. O curioso é que, mesmo após 46 horas de reação (período no qual a mesma foi acompanhada) não houve formação do *cis*-diol **2**. Extraiu-se a mistura reacional após 7 dias de incubação e verificou-se a presença de uma fração muito pequena do (1*S*,2*R*)-indanodiol (**2**).

Portanto, foram observadas algumas diferenças aumentando-se a temperatura de incubação do meio reacional, porém nenhuma informação que levasse a um maior entendimento do mecanismo de RCD foi obtida a partir desses experimentos.

4.5.3 - Experimentos realizados após o tratamento das células de *T. cutaneum* a 50 °C por 30 minutos e posterior incubação a 28 °C

Quando a benzoína (*R*)-2-hidroxi-1-indanona (**5**) foi incubada nestas condições, o diol (1*S*,2*R*)-**2** foi obtido com 88% de conversão após 21 horas de reação. Além disso, obteve-se 1% do *trans*-indanodiol.

Nenhuma observação nova foi obtida a partir da realização desse teste. A benzoína (*R*)-**5** foi diretamente convertida no (1*S*,2*R*)-indanodiol (**2**) sem a formação de nenhuma espécie intermediária, ou seja, não ocorreu a formação da dicetona **1** e nem qualquer isomerização ao composto (*S*)-**5**.

Já para a benzoína (*S*)-**5**, o perfil reacional obtido encontra-se ilustrado na Figura 7. Comparando-se essa reação com aquela efetuada a 28 °C, observou-se uma aparente diminuição na velocidade de conversão da dicetona **1** na benzoína (*S*)-**5**. Na tentativa de observar a conversão da dicetona **1** diretamente para (*R*)-**5**, efetuou-se o mesmo tratamento térmico e utilizou-se a 1,2-indanodiona (**1**) como material de partida.

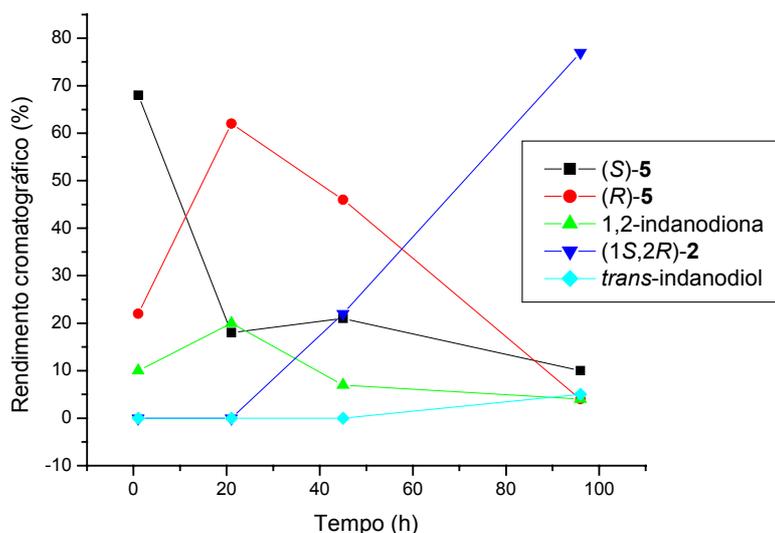


Figura 7. Proporção entre substratos e produtos para a redução assimétrica de (*S*)-**5** por *Trichosporon cutaneum* após tratamento da suspensão celular por 30 minutos a 50 °C.

Essa tentativa, no entanto, foi frustrada, pois as primeiras alíquotas (retiradas após 10, 30 e 60 minutos) mostraram a presença apenas da benzoína (*S*)-**5** e do material de partida, a dicetona **1**. O tempo necessário para conversão total do material de partida foi de 100 horas. Desta forma, o tratamento térmico efetuado nas células da

levedura não foi suficiente para provocar alguma alteração significativa no perfil reacional das biotransformações estudadas.

4.5.4 - Tentativa de biotransformação da 1,2-indanodiona (1) com *T. cutaneum* a 50 °C

Insistindo na possibilidade de observarmos a conversão seletiva da 1,2-indanodiona (1) na benzoína (*R*)-5, efetuou-se um experimento incubando-se uma suspensão celular da levedura a 50 °C por 1 hora. Em seguida, adicionou-se a dicetona 1 e incubou-se a mistura a 50 °C. Após 45 minutos de reação, observaram-se apenas traços de (*S*)-5. A reação foi acompanhada por 24 horas, mas neste período não foi observado nenhum progresso na conversão do substrato, o que indica morte celular devido à temperatura elevada.

A variação da temperatura das reações de biorredução provocou alterações significativas do ponto de vista da cinética enzimática, como esperado, apesar de não trazer informações adicionais a respeito do mecanismo da resolução cinética dinâmica. Esse estudo, no entanto, foi importante para alcançar um dos objetivos desse projeto, que é justamente encontrar as condições ótimas para a formação do (1*S*,2*R*)-indanodiol (2). Comprovou-se experimentalmente que a temperatura ótima para a realização da reação é 28 °C.

Terminado o estudo sobre a influência da temperatura sobre o desempenho da levedura, iniciou-se uma nova etapa, o estudo da influência do pH do meio sobre o perfil reacional. Os experimentos até agora descritos foram efetuados em água destilada, embora imediatamente após a obtenção da suspensão das células da levedura, o pH se encontrasse na faixa de 5,0 e, após cerca de 48 horas de incubação, na faixa de 4,0.

4.6 - Influência do pH do meio sobre o desempenho de *T. cutaneum*

Neste estudo foram realizados experimentos em pH 4, 7, 5 e 10, com os substratos (*S*)-5 e (*R*)-5.

4.6.1 – Experimentos em tampão fosfato pH 4,0

4.6.1.1 – Experimento branco - ausência de células em tampão fosfato pH 4,0

Para avaliação da influência do pH sob as benzoínas (*R*)-**5** e (*S*)-**5** efetuou-se primeiramente um branco, incubando-se a (\pm)-2-hidroxi-1-indanona (**5**) a 28°C em tampão fosfato pH 4,0 na ausência de *T. cutaneum*. Após 7 dias de incubação, analisou-se uma alíquota: de acordo com o CG/EM, o material de partida encontrava-se intacto, contendo 100% de (\pm)-**5**. Portanto, nas condições estudadas, nenhuma reação foi provocada pelo meio utilizado.

4.6.1.2 – Biorredução de (*R*)-2-hidroxi-1-indanona (5**) com *T. cutaneum* em tampão fosfato pH 4,0**

Nesse experimento observou-se a formação do produto de biorredução (1*S*,2*R*)-**2** onde a conversão completa se deu após 22 horas. Deve-se salientar que foram retiradas alíquotas periódicas para avaliação do comportamento reacional, porém, nenhuma diferença significativa foi observada.

4.6.1.3 – Biorredução de (*S*)- 2-hidroxi-1-indanona (5**) com *T. cutaneum* em tampão fosfato pH 4,0**

O pH do meio reacional foi medido periodicamente e verificou-se que o mesmo não variou. Observou-se que, o meio ácido diminui a velocidade de redução de (*S*)-**5**, no entanto, não houve alteração no perfil reacional, ou seja, ocorreu a estereoinversão de (*S*)-**5** em (*R*)-**5** e também houve formação da dicetona **1** logo no começo da reação.

4.6.2 - Experimentos em tampão fosfato pH 7,5

4.6.2.1 – Experimento branco - ausência de células em tampão fosfato pH 7,5

Para avaliação da influência do meio alcalino sobre as benzoínas (*R*)- **5** e (*S*)-**5** efetuou-se primeiramente um branco, incubando-se a (\pm)-2-hidroxi-1-indanona (**5**) a 28 °C em tampão fosfato pH 7,5, na ausência de células de *T. cutaneum*. Observou-se

que, nessas condições, a alcalinidade do meio favorece a oxidação da α -hidroxicetona **5** pelo oxigênio dissolvido, gerando a dicetona **1** (Tabela 2). Apesar de lenta, deve-se observar que após 160 horas, ocorre a conversão completa do material de partida no produto de oxidação **1**.

Tabela 2. Proporção entre (\pm)-2-hidroxi-1-indanona (**5**) e 1,2-indanodiona (**1**) na oxidação de **5** favorecida pelo meio alcalino (pH 7,5).

Tempo (h)	(\pm)- 5 (%)	1,2-indanodiona (1) %
0	98	2
2	96	4
20	82	18
42	70	30
50	61	39
71	46	54
160	traços	100

Em seguida, os substratos (*R*)-**5** e (*S*)-**5** foram tratados com células da levedura, em pH 7,5.

4.6.2.2 - Biotransformação de (*R*)-2-hidroxi-1-indanona (**5**) por *T. cutaneum* em tampão fosfato pH 7,5

O perfil reacional encontra-se ilustrado na Figura 8. Nesse experimento foi observada uma transformação inédita até o presente momento: a oxidação de (*R*)-**5** para a dicetona **1** nas primeiras horas de reação: na primeira alíquota, retirada após 1 hora observou-se 0,25% de **1**. Após 3 horas, o rendimento cromatográfico da dicetona **1** aumentou para 3%. A próxima alíquota só foi retirada após 20 horas de reação, e a presença da 1,2-indanodiona **1** não foi detectada.

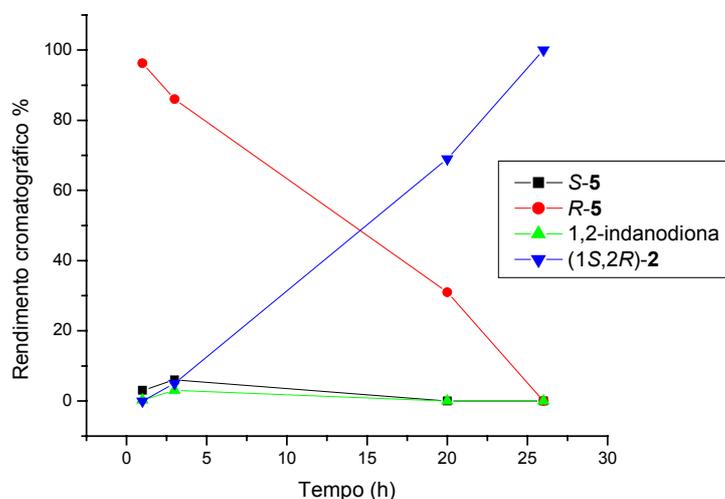


Figura 8. Proporção relativa entre substratos e produtos para a redução assimétrica de (*R*)-5 por *Trichosporon cutaneum* em tampão fosfato pH 7,5

A presença da dicetona **1** só foi detectada no início da reação pois, apesar da oxidação de (*R*)-5 para a dicetona **1** ser favorecida pelo meio alcalino, a mesma é muito lenta quando comparada com a velocidade de conversão de (*R*)-5 para (1*S*,2*R*)-2. Portanto, concluiu-se que, nessas condições experimentais, a oxidação da benzoína (*R*)-5 é favorecida exclusivamente pelo meio reacional e não por enzimas oxidativas presentes na levedura *T. cutaneum*.

4.6.2.3 – Biotransformação de (*S*)-2-hidroxi-1-indanona (**5**) por *T. cutaneum* em tampão fosfato pH 7,5

O perfil reacional desse experimento encontra-se ilustrado na Figura 9.

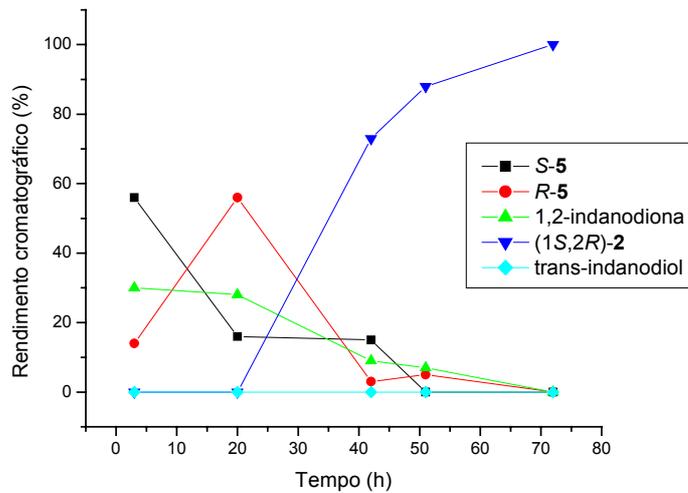


Figura 9. Proporção relativa entre substratos e produtos para a redução assimétrica de (S)-5 por *Trichosporon cutaneum* em tampão fosfato pH=7,5

Comparando-se a redução da benzoína (S)-5 em água, cujo pH nas primeiras 24 horas é aproximadamente 5,0 com a redução efetuada em pH 7,5, observou-se uma grande influência do pH na velocidade de conversão de (S)-5 na 1,2-indanodiona (1) (Figura 10).

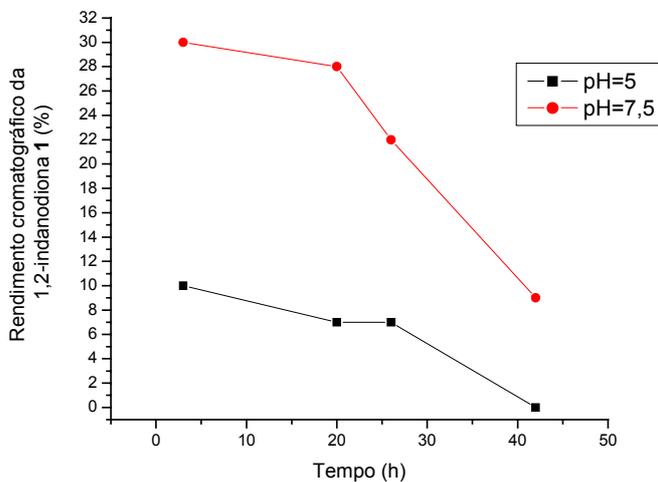


Figura 10. Influência do pH na formação da 1,2-indanodiona (1) na redução assimétrica de (S)-5 por *Trichosporon cutaneum*

Por outro lado, comparando-se a redução da (S)-2-hidroxi-1-indanona (**5**) com o branco, ambos efetuados em pH 7,5, observou-se que, a presença de células íntegras da levedura acelera significativamente a oxidação da benzoína **5** para a dicetona **1** nas primeiras 30 horas de reação, como pode ser observado na Figura 11.

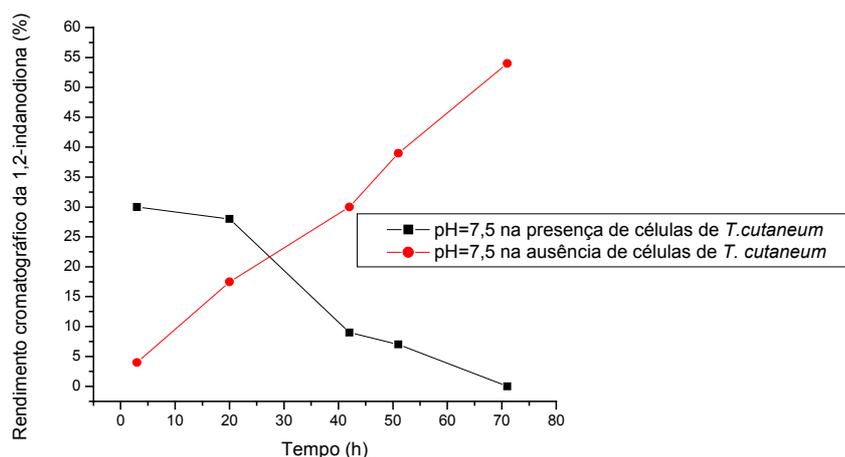
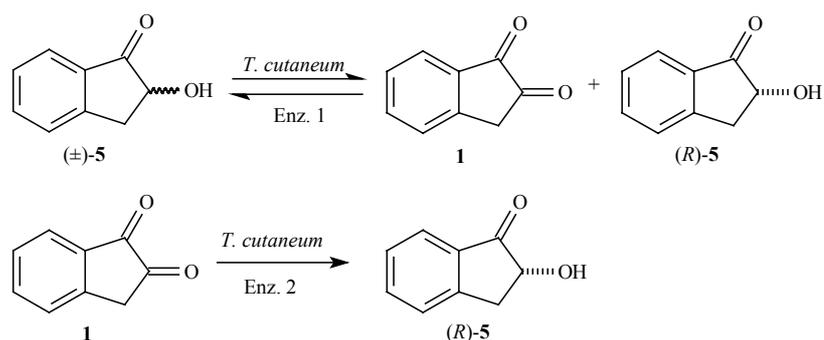


Figura 11. Influência da presença de células de *T. cutaneum* na formação da indanodiona (**1**) a partir da (\pm)-2-hidroxi-1-indanona (**5**)

Isso indica claramente que, além do oxigênio dissolvido, enzimas oxidativas da levedura estão catalisando a oxidação do substrato **5**. Deve-se salientar, que na presença de células de *T. cutaneum* a concentração da 1,2-indanodiona (**1**) diminui drasticamente entre 20 e 42 horas, pois ocorre concomitantemente a formação de (1S,2R)-indanodiol (**2**).

A partir dos experimentos efetuados em pH 7,5, constatou-se que a oxidação enzimática de 2-hidroxi-1-indanona (**5**) efetuada via enzimas oxidativas da levedura é um processo estereosseletivo (Esquema 18), ou seja, (S)-**5** é oxidado à dicetona e portanto, a oxidação da benzoína (R)-**5** para a dicetona **1** não foi observada. Essa observação aparentemente contradiz a possibilidade de a estereoinversão de (S)-**5** em (R)-**5** ser originada de um equilíbrio oxidação-redução, como propusemos anteriormente. No entanto, já que o estudo foi feito com células íntegras da levedura, um sistema multi-enzimático, existe a possibilidade de os dois processos, oxidação e

redução serem realizados por enzimas diferentes, com estereosseletividades opostas³⁵ (Esquema 20), ou seja, está ocorrendo ação de duas ou mais enzimas nesse equilíbrio óxido-redução. Uma delas é responsável pelo equilíbrio entre a benzoína (S)-**5** e a dicetona **1** e a outra é capaz de converter a 1,2-indanodiona (**1**) na benzoína (R)-**5**, por um processo irreversível.



Esquema 20

Visando um aumento ainda maior na velocidade de formação da dicetona **1** testou-se a redução das benzoínas (R)-**5** e (S)-**5** em tampão fosfato pH 10. No entanto, não obtivemos sucesso nesses experimentos. Observou-se, logo no início das reações, uma dificuldade na extração das alíquotas. Dessa forma, as reações foram agitadas por 40 horas, sem retirada de alíquotas, neutralizou-se com uma solução de HCl 5% e extraiu-se a reação. Obteve-se uma massa muito pequena de extrato e a caracterização do mesmo não foi possível, de modo que acreditamos que houve decomposição do material de partida devido à alcalinidade do meio.

Finalizado o estudo com a variação de pH pode-se concluir que a oxidação do substrato (S)-2-hidroxi-1-indanona (**5**) é um processo catalisado por enzimas oxidativas da levedura *T. cutaneum* e não simplesmente ocasionado pela ação do oxigênio dissolvido no meio reacional. Essa constatação, apesar de importante, não nos permite

³⁵ Kroutil, W., Mang, H., Edegger, K., Faber, K., *Adv. Synth. Catal.* **2004**, 346, 125.

esclarecer a origem da estereoinversão do substrato (S)-2-hidroxi-1-indanona (**5**) para (R)-**5** no processo de resolução cinética dinâmica.

Dentre as variações de pH testadas, pode-se comprovar que o pH ótimo para realização da reação é aproximadamente 5,0. Como esse valor de pH é alcançado logo após a suspensão das células da levedura em água destilada, não é necessário o uso de tampão para controle do pH da mistura, e portanto, a reação deve ser efetuada diretamente em água destilada.

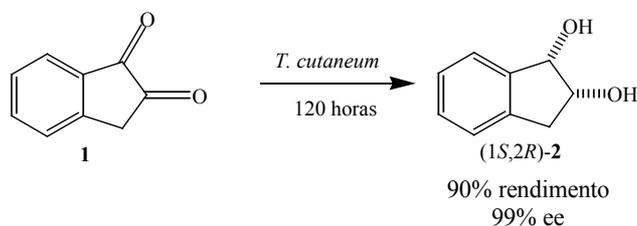
Os resultados obtidos até então levou-nos a uma observação bastante curiosa com relação ao tempo necessário para conversão dos substratos utilizados nas reduções: (±)-2-hidroxi-1-indanona (**5**), (S)-**5** e (R)-**5** e 1,2-indanodiona (**1**). Considerando por exemplo as biotransformações efetuadas a 28 °C, em água (pH ~ 5,0), observou-se uma diferença muito grande na velocidade de conversão de cada um dos substratos no (1S,2R)-indanodiol (**2**), como pode ser observado na Tabela 3.

Tabela 3. Tempo necessário para a conversão total dos substratos 1,2-indanodiona (**1**) e 2-hidroxi-1-indanona (**5**) no (1S,2R)-indanodiol (**2**) nas reduções efetuadas em água, a 28°C pela levedura *T. cutaneum*.

Substrato	Tempo (h) necessário para conversão completa
1	120
(±)- 5	42
(R)- 5	22
(S)- 5	42

O dado mais curioso foi observado na redução da dicetona **1** (esquema 21): inicialmente a mesma é convertida apenas em (S)-**5** (nos minutos iniciais) e logo em seguida observou-se a formação de (R)-**5**. Nas primeiras 48 horas de reação observou-se um "acúmulo" da benzoína **5**, pois a mesma é formada mas não é consumida.

Somente após 48 horas a redução de (*R*)-**5** se inicia, o (1*S*,2*R*)-indanodiol (**2**) começa a ser formado e a reação só se completa após 120 horas de incubação (figura 12).



Esquema 21

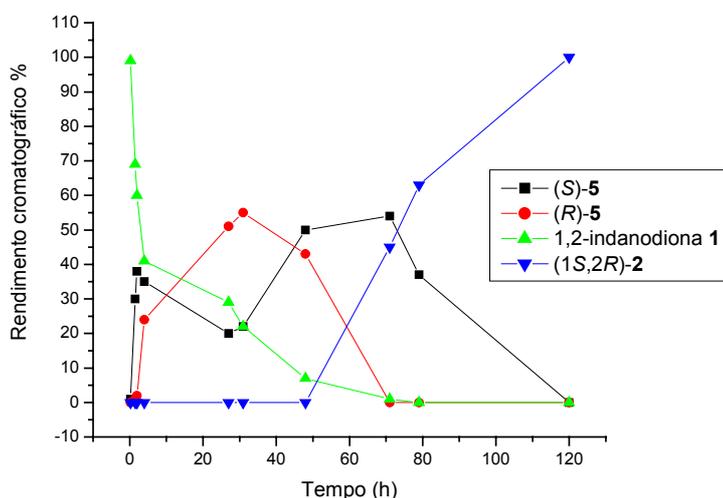


Figura 12. Proporção relativa entre reagentes e produtos para a redução da 1,2-indanodiona (**1**) por *T. cutaneum* em água destilada, a 28°C.

Sabendo que o enantiomero (*R*)-2-hidroxi-1-indanona (**5**) puro é rapidamente convertido no diol (1*S,2R*)-**2**, esperava-se que o mesmo fosse consumido imediatamente após a sua formação. Desta forma, desconfiou-se de que um dos componentes presentes no meio reacional pudesse retardar a formação do produto (1*S,2R*)-indanodiol (**2**). Os possíveis compostos seriam a 1,2-indanodiona (**1**) e/ou a (*S*)-benzoína **5**. Para avaliação dessa possibilidade, foram efetuados experimentos com o substrato (*R*)-**5**, adicionando-se quantidades crescentes da benzoína (*S*)-**5** ou da 1,2-indanodiona (**1**).

4.7 – Avaliação do efeito da (S)-2-hidroxi-1-indanona (5) e 1,2-indanodiona (1), na redução de (R)-5

4.7.1 - Testes realizados com a (S)-2-hidroxi-1-indanona (5)

Para avaliação do efeito da (S)-benzoína **5** na na redução de (R)-**5** foram efetuados sete experimentos diferentes. Incubaram-se 50 mg de (R)-**5**, 3 g de células da levedura e 50 mL de água (concentrações padrões). Em seguida, adicionaram-se em cada um dos erlenmeyers 5, 10, 20, 30, 40, 50 e 60 % em massa da benzoína (S)-**5**, respectivamente. Foi feito um branco para cada um dos testes, partindo-se de 52,5, 55, 60, 65, 70, 75 e 80 mg de (R)-**5**, de modo que as concentrações de substrato fossem exatamente as mesmas nos brancos e nos testes. O tempo necessário para conversão total da benzoína **5** no (1S,2R)-**2** nos brancos, sem a presença de (S)-**5**, foi de 22 horas, mesmo para concentrações mais elevadas. O tempo necessário para a conversão completa do material de partida em cada um dos testes, encontra-se descrito na Tabela 4:

Tabela 4. Tempo necessário para a conversão total dos substratos 2-hidroxi-1-indanona (**5**) no (1S,2R)-indanodiol (**2**)

Teste	Massa de (S)-5 adicionada (mg)	Tempo (h) necessário para conversão completa
1	2,5	22
2	5	22
3	10	22
4	15	23
5	20	28
6	25	28
7	30	28

Aparentemente, não houve nenhum efeito muito pronunciado pois, uma diminuição na velocidade de reação só foi observada com adição de 20 mg de (S)-**5**, o

que corresponde a 40 % em massa do substrato, e ainda assim, o aumento do tempo necessário para conversão total foi de apenas 6 horas, quando comparado com o branco. A partir dos experimentos anteriores, esperávamos uma diminuição na velocidade de formação do diol muito mais acentuada.

4.7.2 - Testes com a 1,2-indanodiona (1)

Efetuuou-se inicialmente um controle, incubando-se 90 mg de (*R*)-2-hidroxi-1-indanona (**5**), 3 g de células da levedura em 50 mL de água. O tempo necessário para conversão total do substrato (*R*)-**5** no (1*S*,2*R*)-indanodiol (**2**) no controle foi de 22 h.

Em seguida, foram efetuados quatro experimentos, incubando-se 50 mg de (*R*)-**5**, 3 g de *T. cutaneum* em 50 mL água, adicionando-se 5, 10, 20 e 30 mg de 1,2-indanodiona (**1**), respectivamente. Nos dois primeiros experimentos, nenhum efeito foi observado, como pode ser visto na Tabela 5:

Tabela 5. Tempo necessário para a conversão do material de partida (*R*)-**5** contendo quantidades crescentes da dicetona **1** no (1*S*,2*R*)-indanodiol (**2**)

Teste	Massa de dicetona 1 adicionada (mg)	Tempo necessário para conversão completa (h)
1	5	22
2	10	22
3	20	60
4	30	120

Por outro lado, aumentando-se a quantidade da dicetona **1** adicionada para 20 mg, ou seja, 40% da massa de (*R*)-**5** o efeito de inibição da formação do produto ficou evidente. Após 22 h de incubação, tempo suficiente para a conversão total da benzoína (*R*)-**5** no (1*S*,2*R*)-indanodiol (**2**) (como mostrado no branco) a presença do (1*S*,2*R*)-indanodiol (**2**) ainda não foi detectada, observou-se apenas o substrato **5** com 76% ee para o enantiômero *R*. O produto (1*S*,2*R*)-**2** só começou a ser detectado após 29 h de reação na proporção de 15% (produto) e 85% da benzoína **5** com 60% ee para o

estereoisômero *R*. Essas informações encontram-se ilustradas nos cromatogramas abaixo (figura 13).

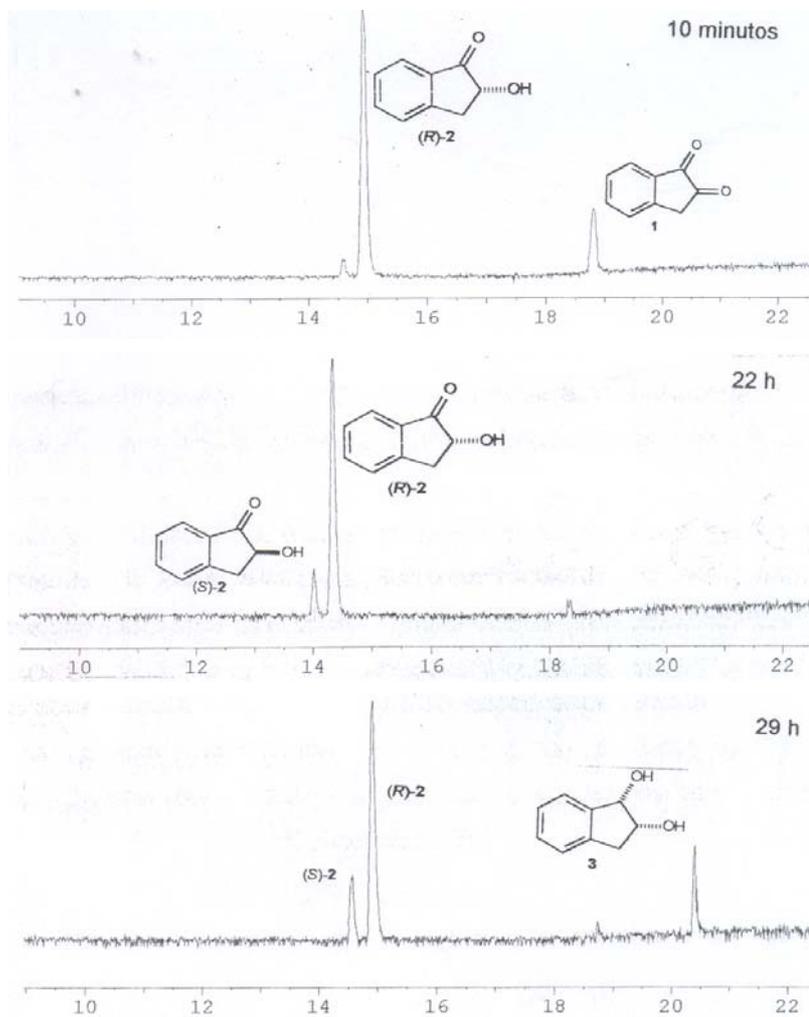


Figura 13. Cromatogramas obtidos após diferentes tempos, para a redução da (*R*)-2-hidroxi-1-indanona (5) na presença do inibidor 1,2-indanodiona (1).

Observou-se um contínuo aumento na proporção de (1*S*,2*R*)-indanodiol-2 nas próximas alíquotas, até conversão total do material de partida, em 60 horas de reação.

No teste quatro, no qual foram adicionados 30 mg da dicetona **1**, a diminuição na velocidade de formação do produto foi ainda mais pronunciada. Mesmo após 54 horas de incubação a presença de (1*S*,2*R*)-**2** não foi detectada. O mesmo começou a ser formado entre 54 e 72 horas, sendo que, em 72 horas observou-se 10% do diol (1*S*,2*R*)-**2**, 7% da dicetona **1** e 83% da α -hidroxicetona **5**, com 56% ee para o enantiômero (*R*)-**5**. A conversão total se deu após 120 horas.

A partir dos experimentos realizados com adição crescente da dicetona **1** pudemos comprovar que a presença desse composto retarda a formação do produto de redução, ou seja, do (1*S*,2*R*)-indanodiol (**2**). Provavelmente isso ocorre pois as duas reduções envolvidas no processo global, ou seja, a redução tanto de (\pm)-**5** como da dicetona **1** são efetuadas pela mesma óxido-redutase. Como a 1,2-indanodiona (**1**) é o substrato mais reativo primeiro ocorre a redução completa da mesma, e a enzima só começa a atuar sobre a benzoína (*S*)-**5** quando a concentração da diona **1** é muito pequena.

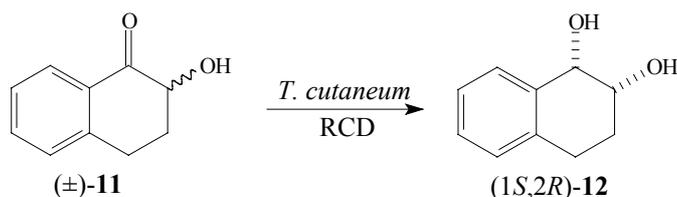
Com isso, comprovou-se que a melhor alternativa para o preparo do (1*S*,2*R*)-indanodiol (**2**) é a utilização da (\pm)-2-hidroxi-1-indanona (**5**) como material de partida e não da dicetona **1** pois, apesar de **1** ser invariavelmente formada a partir da oxidação de (*S*)-**5**, quando o substrato utilizado foi (\pm)-**5** a concentração da 1,2-indanodiona (**1**) formada não é suficientemente alta para provocar um efeito de inibição de formação do produto tão pronunciado. Com isso, diminui-se o tempo reacional de 120 horas (quando a dicetona **1** é o substrato) para 42 horas, utilizando-se o substrato racêmico (\pm)-**5** como material de partida.

4.8 - Evidências de atividade isomerase na levedura *Trichosporon cutaneum*

Devido ao grande interesse no preparo de dióis vicinais enantiomericamente puros, e ao excelente desempenho da levedura *Trichosporon cutaneum* na redução de carbonilas, estudos com substratos semelhantes, isto é, α -hidroxi-cetonas cíclicas foram realizados no nosso grupo de pesquisa. Alguns resultados serão discutidos, pois

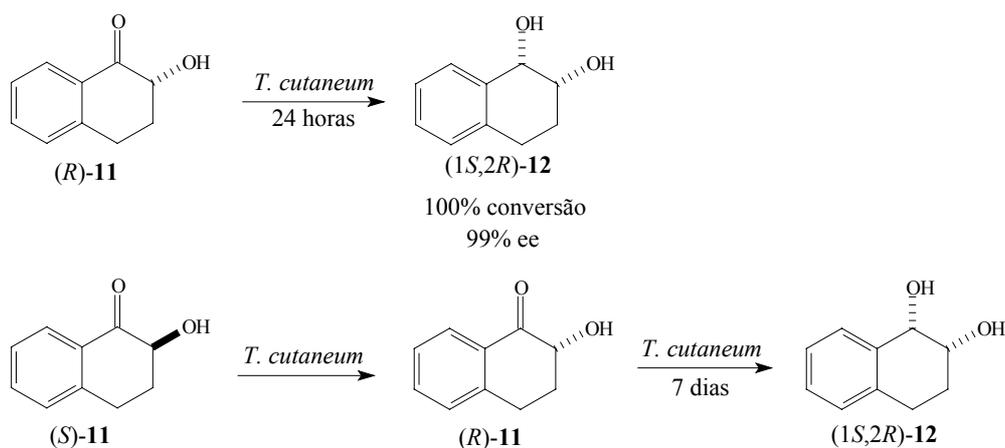
podem ajudar a esclarecer o mecanismo de ação enzimática na estereoinversão de centros assimétricos que possuem hidrogênio ácido (α -carbonílicos).

O diol (1*S*,2*R*)-1,2-tetraidronaftalenodiol (**12**) foi obtido com elevado rendimento (89%) e excelente ee (>99%) a partir da (\pm)-2-hidroxi-1-tetralona (**11**) por meio de uma resolução cinética dinâmica (Esquema 22).



Esquema 22

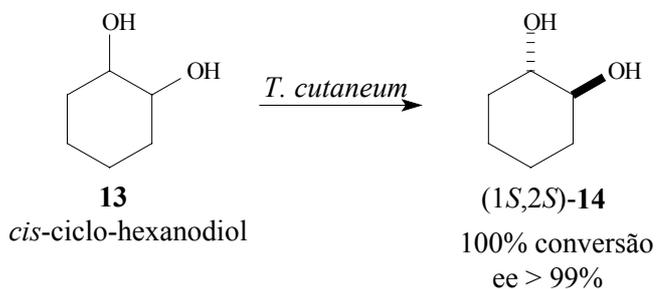
A obtenção do diol (1*S*,2*R*)-**12** como único produto indica que o substrato (*S*)-**11** foi necessariamente isomerizado para (*R*)-**11** exatamente como observado na resolução da (\pm)-2-hidroxi-1-indanona (**5**). Para entendimento dessa isomerização um estudo semelhante ao descrito anteriormente foi efetuado, ou seja, foram preparados os dois enantiômeros puros da 2-hidroxi-1-tetralona (**11**) e tratados separadamente com células em repouso da levedura *Trichosporon cutaneum*. Observou-se que, enquanto (*R*)-**11** foi diretamente reduzido para o (1*S*,2*R*)-1,2-tetraidronaftalenodiol (**12**) em 24 horas, (*S*)-**11** foi inicialmente isomerizado para (*R*)-**11**, e posteriormente reduzido para o diol **12**, de modo que a conversão se completou em 7 dias de incubação (Esquema 23).



Esquema 23

Um detalhe muito importante e esclarecedor nesse estudo foi que em nenhum momento a oxidação da benzoína (**(S)-11**) foi observada. O fato de não ser observada não indica necessariamente que a mesma não tenha ocorrido, porém permite-nos sugerir devido às evidências experimentais observadas que a origem da estereoinversão de (**(S)-11**) em (**(R)-11**) é a ação de uma isomerase presente no *Trichosporon cutaneum*.

Em um outro estudo, observou-se a desracemização do *cis*-ciclo-hexanodiol (**13**) via tratamento com células em repouso da levedura *Trichosporon cutaneum* levando a formação do (1*S*,2*S*)-ciclo-hexanodiol (**14**) com 100% de conversão e ee>99% (Esquema 24).



Esquema 24

Esse estudo não foi completamente concluído, de modo que o rendimento isolado ainda não foi determinado. No entanto, o acompanhamento da reação realizado por CG/EM mostrou que não ocorreu a formação de nenhum outro produto, nem mesmo a oxidação dos dióis para a α -hidroxiciclo-hexanona. Se nenhum produto de oxidação foi detectado, a inversão de um dos centros assimétricos do *cis*-ciclo-hexanodiol não pode ser explicada pela ação de óxido-redutases com seletividades opostas e, portanto, propomos a ação de uma isomerase na desracemização do *cis*-ciclo-hexanodiol.

Esses dois estudos brevemente discutidos evidenciam uma atividade isomerase na levedura estudada. Diante de tais evidências e das observações obtidas no estudo da resolução da (\pm)-2-hidroxi-1-indanona (**5**), acreditamos que, a hipótese mais atrativa para explicar a estereoinversão do material de partida (*S*)-2-hidroxi-1-indanona (**5**) em (*R*)-**5** é a ação de uma isomerase. No entanto, essa questão só poderá ser completamente esclarecida se as enzimas responsáveis pela transformação, ou seja, óxido-redutase(s) e a suposta isomerase forem isoladas e testadas, o que obviamente foge dos objetivos dessa dissertação.

5. Conclusão

O trabalho realizado durante o desenvolvimento do projeto de pesquisa, permitiu-nos atingir os principais objetivos propostos. Os substratos quirais (*R*)-**5** e (*S*)-2-hidroxi-1-indanona (**5**) foram preparados com rendimentos razoáveis e excelentes ee, 98 e 97 % respectivamente.

Os experimentos controle, efetuados na ausência de células da levedura, ou com células mortas por aquecimento em autoclave (experimentos branco) comprovaram que a etapa de estereoinversão do material de partida no processo de resolução cinética dinâmica é de natureza enzimática, e não um processo espontâneo ou quimicamente induzido por algum componente do meio reacional.

As reações de biocatálise, utilizando células íntegras de *T. cutaneum* mostraram uma grande diferença tanto na cinética de redução como no perfil reacional, dependendo do estereoisômero utilizado como material de partida, (*R*)-**5** ou (*S*)-**5**. A benzoína (*R*)-**5** é diretamente convertida no (1*S*,2*R*)-indanodiol-**2** em 22 horas, enquanto (*S*)-**5** é inicialmente convertida na dicetona **1**, concomitantemente ocorre a inversão de (*S*)-**5** para (*R*)-**5** e em seguida inicia-se a redução da benzoína para formação (1*S*,2*R*)-indanodiol-**2**. A conversão se completa em 42 horas. Várias tentativas foram efetuadas na tentativa de compreendermos definitivamente o mecanismo da estereoinversão do material de partida no processo de RCD, ou seja, se a mesma ocorre via ação de uma isomerase presente na levedura, ou se é resultado da ação de duas enzimas do tipo óxido-redutases com estereosseletividades opostas. No entanto, não foi possível optarmos por uma das hipóteses, devido a limitações experimentais. Outros estudos efetuados pelo nosso grupo de pesquisa com substratos estruturalmente semelhantes evidenciam a presença de uma enzima do tipo isomerase na levedura utilizada, o que levou-nos a acreditar que essa é a hipótese mais atrativa. No entanto, só será possível a elucidação completa do mecanismo se a(s) enzima(s) atuante(s) do processo de isomerização forem isoladas e testadas.

Comprovou-se ainda que a 1,2-indanodiona (**1**) apesar de ser reduzida pela levedura *T. cutaneum*, inibe a formação do produto (1*S*,2*R*)-**2**. Com isso, concluiu-se que a melhor alternativa para obtenção do (1*S*,2*R*)-indanodiol (**2**) é a utilização da

benzoína racêmica (\pm)-2-hidroxi-1-indanona (**5**) como material de partida, e não da 1,2-indanodiona (**1**). Com a substituição do substrato, diminui-se o tempo de reação de 120 para 42 horas. Determinou-se também que as condições ótimas para realização da biotransformação são: temperatura de 28 °C e pH na faixa de 5,0 , o que permite a realização da redução diretamente em água destilada, sem a necessidade de utilização de tampões para o controle do pH do meio reacional.

6 - Parte Experimental

6.1 - Informações gerais

Os pontos de fusão foram determinados em um aparelho MQAPF-301 Microquímica, não calibrado. Os espectros no infravermelho foram obtidos em um espectrômetro BOMEM MB Series Hartmann & Braun. Os espectros de RMN ^1H e ^{13}C foram obtidos em espectrômetro Varian INOVA 500 ou Varian Gemini 300P. Os solventes utilizados foram CDCl_3 ou $\text{DMSO-}d_6$. As medidas de rotação ópticas foram feitas em um polarímetro LEP A2, utilizando o comprimento de onda da raia D do sódio. As linhagens de levedura foram adquiridas da fundação André Tosello (Campinas-SP). Os espectros de massa foram obtidos em um aparelho Shimadzu GCMS QP5000, operando com energia de ionização de 70 eV, utilizando-se hélio como gás de arraste e colunas capilares de sílica fundida: J & W Scientific DB-1 (30m x 0,25mm x 0,25 μm), utilizado para obtenção dos espectros de massas ou CHIRASIL-DEX Chromatopak (30 m x 0,25 mm x 0,25 μm) método 2, utilizado para determinação dos excessos enantioméricos. Abaixo se encontram descritas as condições dos métodos utilizados para as análises de cromatografia gasosa.

Método 1: Gás de arraste: Hélio; Temperaturas iniciais: forno: 80 °C; injetor: 260 °C; detector: 270 °C. Pressão total da coluna: 85,9 KPa; Fluxo da coluna: 1,3 mL/min; Split Ratio: 1/40; Fluxo total: 29,8 mL/min.

Tabela 6. Programação da temperatura da coluna cromatográfica DB-1, método 1.

Taxa de aquecimento (°C/min)	Temperatura (°C)	Tempo de equilíbrio (min.)
-	80	1
15	200	0
30	280	1

Tempo total: 12,67 minutos.

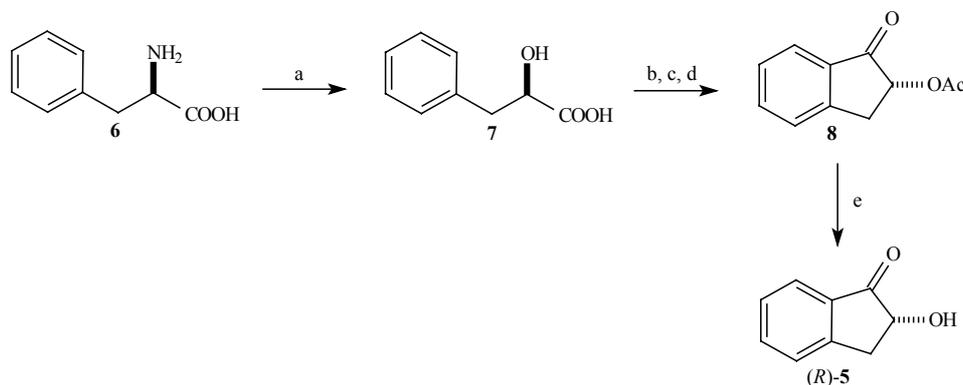
Método 2: gás de arraste: Hélio; Temperaturas iniciais: forno: 140 °C; injetor: 210 °C; detector: 220 °C; Pressão total da coluna: 43,1 KPa; Fluxo da coluna: 0,7 mL/min; Split Ratio: 1/23; Fluxo total: 17,8 mL/min.

Tabela 7. Programação da temperatura da coluna cromatográfica CHIRASIL-DEX Chromatopak, método 2.

Taxa de aquecimento (°C/min)	Temperatura (°C)	Tempo de equilíbrio (min.)
-	140	1
1	165	0
30	180	2

Tempo total: 28,5 minutos.

6.2 - Obtenção dos substratos quirais



Esquema 25

a. Preparo do (R)-ácido-2-hidroxi-3-fenil-propanóico (7)

A uma solução de D-fenilalanina (**6**) (10 g, 61 mmol) em H₂SO₄ (1 mol . L⁻¹, 200 mL) foram adicionados uma solução de NaNO₂ (21 g, 300 mmol em 50 mL de água) e H₂SO₄ (1 mol . L⁻¹, 50 mL) durante 30 minutos a 0°C . A mistura foi mantida sob agitação por 75 minutos a 0°C. Decorrido esse tempo, a reação foi extraída com acetato de etila (3x100 mL), os extratos orgânicos foram reunidos, secos sob sulfato de

sódio anidro e evaporados a pressão reduzida. Após recristalização (acetato de etila/hexano) foram obtidos 7,7 g (46 mmol) do α -hidroxi-ácido **7**, 77% rendimento.

Aspecto físico: cristais amarelos claro.

PF: 118,4 – 121,5 °C (lit.³² **PF:** 126,0 – 127,0 °C)

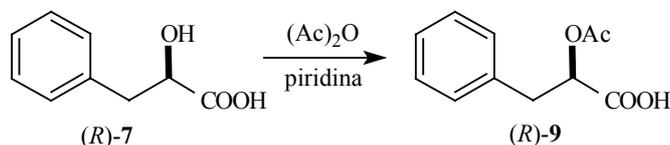
$[\alpha]_D^{20}$: +25,4° (c 1, água); lit.³². **$[\alpha]_D^{20}$:** +20,4° (c 1, água).

Partindo-se da L-fenilalanina e utilizando-se a mesma metodologia, obteve-se o estereoisômero (S)-**7** com 99% ee (determinado por CG, método 2) e **$[\alpha]_D^{20}$:** -27,0 (c 1, água), lit.³² **$[\alpha]_D^{20}$:** -20,0° (c 1, água).

Tratou-se uma pequena quantidade (1 mg) do sólido **7** com algumas gotas de diazometano em éter etílico, utilizando banho de gelo, para formação do correspondente éster metílico. O éster foi analisado por CG/EM.

EM m/z (%): 162 (16), 131 (7), 121 (9), 103 (14), 91 (100), 77 (12), 65 (16), 51 (13).

b. Preparo do (*R*)-ácido-2-acetoxi-3-fenil-propanóico (**9**)



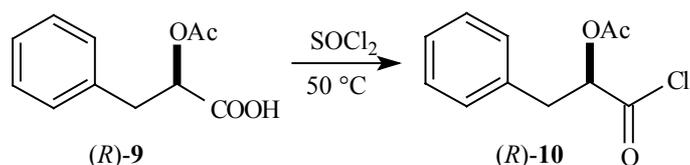
Esquema 26

A uma solução de (*R*)-ácido-2-hidroxi-2-fenil-propanóico (**7**) (7,7 g, 46,4 mmol) em piridina (50 mL) adicionou-se anidrido acético (5,3 mL, 56 mmol) a 0°C. Após a adição, o banho foi removido e a reação mantida sob agitação por 12 horas a temperatura ambiente. Em seguida, destilou-se sob vácuo para retirada da piridina. O resíduo foi redissolvido em acetato de etila (50 mL), lavado com HCl (1 mol . L⁻¹ , 2x50 mL), seco sob sulfato de sódio e concentrado sob vácuo resultando em 9,4 g (45 mmol, 97% rendimento) do (*R*)-ácido-2-acetoxi-3-fenil-propanóico como um óleo âmbar. O

produto foi utilizado na etapa seguinte (c), sem purificação adicional. Tratou-se uma pequena alíquota com algumas gotas de diazometano em éter etílico utilizando banho de gelo para análise por CG/EM.

EM *m/z* (%): 162 (14), 131 (16), 103 (3), 91 (13), 65 (5), 43 (100).

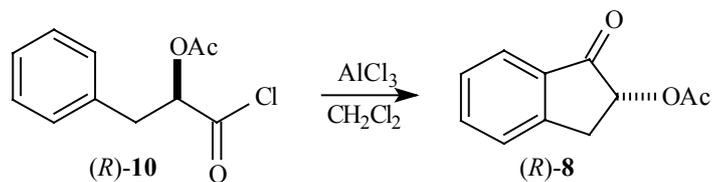
c. Formação do cloreto de ácido (10)



Esquema 27

Agitou-se uma solução de (*R*)-ácido-2-acetoxi-3-fenil-propanóico (**9**) (9,4 g, 45 mmol) em cloreto de tionila (17 mL, 0,15 mol) por 30 minutos a temperatura ambiente. Em seguida aqueceu-se a mistura a 50°C e agitou-se por mais 3 horas. Após a remoção do cloreto de tionila por destilação a pressão reduzida, foram obtidos 9,2 g do cloreto de ácido **10** (rendimento quantitativo) como um óleo âmbar. O produto bruto foi utilizado na próxima etapa (d), sem purificação adicional.

d. Reação de Friedel Crafts intramolecular



Esquema 28

A uma solução do cloreto de ácido (*R*)-**10** (9,2 g, 40 mmol) em CH₂Cl₂ (400 mL), adicionou-se cloreto de alumínio (13 g, 97 mmol) em uma só porção. Agitou-se a

mistura resultante por 80 minutos a temperatura ambiente. Em seguida, adicionou-se cuidadosamente, 300 mL de água gelada. Separou-se a fase orgânica e extraiu-se a fase aquosa com CH₂Cl₂ (3x100 mL). As fases orgânicas foram combinadas, secas sob sulfato de sódio e concentradas a pressão reduzida. O extrato bruto foi submetido à cromatografia em coluna de sílica gel flash utilizando como eluente uma mistura de hexano:acetato 8:2 para obtenção de 5 g (25 mmol) da indanona (*R*)-**8**, 65% rendimento e ee>99%. O excesso enantiomérico foi determinado via análise por cromatografia gasosa, utilizando coluna quiral (método 2).

PF: 81,3-81,5°C; (lit.³¹ **PF:** 80,5-81,5°C).

IV (KBr): 1728, 1607, 1372, 1252, 1223, 1184 cm⁻¹.

¹H RMN (CDCl₃) δ: 2,19 (s, 3H), 3,04 (dd, *J*=4,7 e 17,1 Hz, 1H), 3,66 (dd, *J*=8,0 e 17,1 Hz, 1H), 5,42 (dd, *J*=4,7 e 8,0 Hz, 1H), 7,39-7,46 (m, 2H), 7,64 (t, *J*=7,2Hz, 1H), 7,78 (d, *J*=7,8Hz, 1H);

¹³C RMN (CDCl₃) δ: 20,8; 33,4; 74,0; 124,3; 126,5; 128; 134,3; 135,7 150,2; 170,2; 200,3; [α]_D²⁰: -19,0° (*c* 1,0; MeOH); lit³¹ [α]_D²⁰: -19° (*c* 1,0; MeOH).

EM *m/z* (%): 147 (7), 130 (66), 119 (46), 102 (5), 91 (35), 77 (7), 65 (10), 43 (100).

O estereoisômero (*S*)-**8** foi obtido com 99% ee (determinado por CG, método 2) e [α]_D²⁰: +18,7°, (*c* 1,0; MeOH) a partir do cloreto de ácido (*S*)-**10**, utilizando-se as mesmas condições de reação descritas no preparo do acetato (*R*)-**8**.

e. Hidrólise da (*R*)-2-acetoxi-1-indanona (**8**)

A uma solução de *R*-**8** (5 g, 26 mmol) em metanol (200 mL), foi adicionada uma solução de Sc(OTf)₃ (2,6 g, 5,3 mmol em 5 mL de água). Agitou-se a mistura por 48 horas a 30°C e concentrou-se sob vácuo. Diluiu-se o resíduo com água (50 mL) e extraiu-se com acetato de etila (3x50 mL). Secou-se a fase orgânica com sulfato de sódio anidro e evaporou-se o solvente a pressão reduzida. O produto bruto foi submetido à cromatografia em coluna de sílica gel flash eluída com uma mistura de hexano:acetato 7:3, para obtenção de 3,2 g (22 mmol) da (*R*)-2-hidroxi-1-indanona (**5**) com 82% rendimento e 98% ee. O catalisador Sc(OTf)₃ foi recuperado

quantitativamente após lavagem da fase aquosa com CH_2Cl_2 (cerca de 30 mL) e concentração da fase aquosa à vácuo. O resíduo foi seco a pressão reduzida a 60 °C por 6 horas, formando um resíduo marrom utilizado nas próximas reações sem purificação adicional e sem perda de enantiosseletividade.³⁶

Aspecto físico: cristais brancos.

PF: 79,9 - 81,0°C; (lit³¹: 82,4 - 83,7°C).

IV (KBr): 3418, 1716, 1609, 1585, 1303, 1207, 1091, 912, 753 cm^{-1} .

¹H RMN (CDCl_3) δ : 3,02 (dd, $J=5,1$ e 16,4 Hz, 1H), 3,58 (dd, $J=7,8$ e 16,4 Hz, 1H), 3,74 (s, 1H), 4,58 (dd, $J=5,1$ e 7,8Hz, 1H), 7,37-7,47 (m, 2H), 7,60-7,66 (m, 1H), 7,75 (d, $J=7,5$ Hz, 1H);

¹³C RMN (CDCl_3) δ : 35,2; 74,2; 124,3; 126,6; 127,8; 133,9; 135,7; 150,8; 206,5;

$[\alpha]_D^{20}$: -53,0° (c 1, MeOH) lit³¹ **$[\alpha]_D^{20}$:** -57,0° (c 1, MeOH).

EM m/z (%): 148 (M^+ , 87), 131 (16), 119 (48), 105 (30), 91 (100), 77 (21), 65 (43), 63 (45), 51 (39), 50 (39).

Utilizando as mesmas condições descritas acima, obtive o estereoisômero (S)-**5** com 97% ee (determinado por CG, método 2) e **$[\alpha]_D^{20}$:** +54°, (c 1,0; MeOH), utilizando-se (S)-**8** como material de partida.

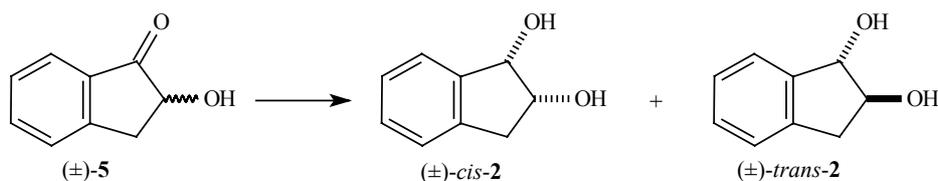
e 2. Hidrólise da (R)-2-acetoxi-1-indanona (8) utilizando hidróxido de lítio e peróxido de hidrogênio

Preparou-se uma solução de *R*-**6** (100 mg, 0,52 mmol) em uma mistura de THF:H₂O 4:1 (2 mL de THF, 0,6 mL de água). Fechou-se o balão com um septo, purgou-se argônio e resfriou-se a 0°C. Com o auxílio de uma seringa adicionou-se H₂O₂ 30% (0,2 mL) e uma solução de LiOH (0,02 g, 0,83 mmol em 0,6 mL de água). Agitou-se por uma hora, removeu-se o septo e adicionou-se uma solução de sulfito de sódio (0,27 g, 0,21 mol em 1,6 mL de água). Agitou-se por mais uma hora. Extraiu-se a reação com acetato de etila (3x30 mL), combinaram-se os extratos orgânicos, secou-se sob sulfato de sódio e evaporou-se o solvente a pressão reduzida. O produto bruto foi

³⁶ Kajiro, H.; Mitamura, S.; Mori, A.; Hiyama, T. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1999**, *72*, 1553.

submetido à cromatografia em coluna de sílica gel flash eluída com uma mistura de hexano:acetato 7:3, para obtenção da (*R*)-2-hidroxi-1-indanona (**5**) (40 mg, 0,27 mmol, 51% rendimento, 97% ee) como cristais brancos.

6.3 - Obtenção dos padrões (\pm)-*cis*-1,2-indanodiol e *trans*-(\pm)-1,2-indanodiol



Esquema 29

A uma solução de (\pm)-2-hidroxi-1-indanona (\pm)-**5** (296 mg, 2 mmol) dissolvidos em metanol (20 mL), a 0 °C, foi adicionado NaBH₄ (0,1 g, 2,65 mmol) em pequenas porções. Após adição o banho foi removido e a agitação foi mantida por 1 hora (acompanhou-se o consumo do material de partida por CCD). Após esse período adicionou-se água destilada (5 mL), extraiu-se a reação com acetato de etila (3x20 mL), reuniu-se os extratos orgânicos, secou-se sob sulfato de sódio anidro e evaporou-se o solvente a pressão reduzida. O produto bruto foi submetido à cromatografia em coluna de sílica gel flash usando como eluente uma mistura de hexano: acetato 1:1 para obtenção dos dióis (\pm)-*cis*-1,2-indanodiol (50 mg, 0,33 mmol, 17% rendimento) e (\pm)-*trans*-1,2-indanodiol (170 mg, 1,13 mmol, 57% rendimento).

Aspecto físico: cristais brancos.

(\pm)-*cis*-1,2-indanodiol

PF: 94-98°C (lit.³⁴ 98°C).

IV (KBr): 3529, 3439, 3298, 3153, 2923, 1459, 1337, 1187, 1155, 987, 737, 634 cm⁻¹.

RMN ¹H (DMSO-*d*₆) δ : 2,76 (dd, *J*=15,6 e 3,7 Hz, 1H), 2,92 (dd, *J*=15,6 e 5,6 Hz, 1H), 4,24-4,27 (m, 1H), 4,58 (d, *J*=4,9, 1H), 4,78 (dd, *J*=6,7 e 4,9 Hz, 1H), 4,99 (d, *J*=6,7 Hz, 1H), 7,17-7,20 (m, 3H), 7,30 (m, 1H).

RMN ¹³C (DMSO-*d*6) δ : 38,28, 72,90, 75,05, 124,76, 124,83, 126,29, 127,62, 140,57, 143,96.

EM *m/z* (%): 150 (M⁺, 13), 132 (46), 131 (28), 115 (48), 107 (44), 104 (100), 91 (32), 77 (46), 65 (25), 51 (43).

(\pm)-*trans*-1,2-indanodiol

PF: 160–161,5°C (lit.³⁴: 157°C).

IV (KBr): 3226, 2912, 1477, 1355, 1311, 1150, 1075, 1043, 746, 646.

RMN ¹H (DMSO-*d*6) δ : 2,58 (dd, *J*=15,3 e 7,0 Hz, 1H), 3,03 (dd, *J*=15,6 e 7,0 Hz, 1H), 4,07 (tt, *J*= 7,0 e 5,5 Hz, 1H), 4,68 (t, *J*=5,8 Hz, 1H), 5,17 (d, *J*=4,9 Hz, 1H), 5,38 (d, *J*=6,1 Hz, 1H), 7,13-7,18 (m, 3H), 7,22-7,27 (m, 1H).

RMN ¹³C (DMSO-*d*6) δ : 38,0, 80,0, 80,6, 124,2, 124,6, 126,5, 127,5, 139,4, 144,1.

EM *m/z* (%): 150 (M⁺, 44), 132 (51), 131 (30), 119 (15), 107 (55), 104 (100), 91 (39), 77 (53), 65 (28), 51 (48).

6.4 - Reação dos substratos com a levedura *Trichosporon cutaneum* CCT 1903

6.4.1 - Procedimento típico

A linhagem da levedura *Trichosporon cutaneum* fornecida em “slants” (tubos de ensaio contendo meio nutriente sólido em posição inclinada, inoculados com propágulos da linhagem) foi reativada transferindo-se (em condições assépticas, com auxílio de uma alça de platina em capela de fluxo laminar) uma pequena porção celular para um erlenmeyer de 250 mL contendo o caldo nutriente SDB (“Sabourad dextrose broth”) (50mL), previamente autoclavado a 121°C por 15 minutos. As células foram pré cultivadas a 28°C por 24 horas, em agitador orbital (150 rpm) e então toda a suspensão celular foi transferida diretamente para um erlenmeyer estéril de 2 L contendo 1 L de caldo SDB para o acúmulo de biomassa.

Após incubação a 28°C por 72 horas em agitador orbital (150 rpm), as células foram colhidas por centrifugação a 5000 rpm por 6 minutos. Certa quantidade de células, geralmente 3 g, em peso úmido foi colocada em erlenmeyers menores,

ressuspensas em água ou tampão, seguindo-se da adição do substrato a ser estudado: (\pm)-2-hidroxi-1-indanona (**5**), (*R*)-2-hidroxi-1-indanona (**5**), (*S*)-**5** ou 1,2-indanodiona (**1**).

Alíquotas (0,5 mL) periódicas foram tomadas, extraídas com acetato de etila, tratadas com sulfato de sódio e analisadas por CG/EM.

6.4.2 - Experimentos controle

A fim de comprovar se a etapa de isomerização da (\pm)-2-hidroxi-1-indanona (**5**) no processo de RCD promovido pela levedura *T. cutaneum*, é um processo enzimático ou quimicamente induzido por algum componente do meio reacional, foram efetuados três tipos de experimentos controle.

a) Na ausência total de células da levedura

Os compostos (*R*)- **5** e (*S*)-**5** foram dissolvidos separadamente em etanol (1 mL) e transferidos para dois erlenmeyers, contendo 50 mL de água destilada cada um. Incubou-se a 28°C em agitador orbital.

b) Na presença de células mortas da levedura

Foram utilizadas células mortas de *T. cutaneum*, por autoclavagem da suspensão de 3 g (peso úmido) de células da levedura em água destilada (50 mL), a 121 °C por 15 min. Adicionaram-se 50 mg das benzoínas (*R*)- **5** ou (*S*)-**5** e incubou-se a 28 °C em agitador orbital.

c) Na presença de células mortas da levedura, por tratamento com solventes

Utilizaram-se 3 g de células desidratadas da levedura, mortas pelo tratamento com etanol, acetona e secagem em estufa. À suspensão das células em água destilada (50 mL), adicionaram-se 50 mg das benzoínas (*R*)- **5** ou (*S*)-**5** e incubou-se a 28 °C em agitador orbital.

Todos os experimentos acima foram agitados a 28 °C por sete dias. Após este período, as fases aquosas foram extraídas com acetato de etila e secas sob sulfato de sódio anidro. Os extratos orgânicos resultantes foram concentrados sob pressão reduzida e analisados por CG/EM, utilizando coluna quiral.

6.5 - Preparo do meio de cultura SDB (“Sabourad dextrose broth”)

Para o preparo de 1 L de meio SDB, pesaram-se 10 g de dextrose anidra e 5 g de peptona bacteriológica e dissolveu-se em 1 L de água destilada.

6.6 - Preparo das soluções tampão utilizadas nas reações de biocatálise

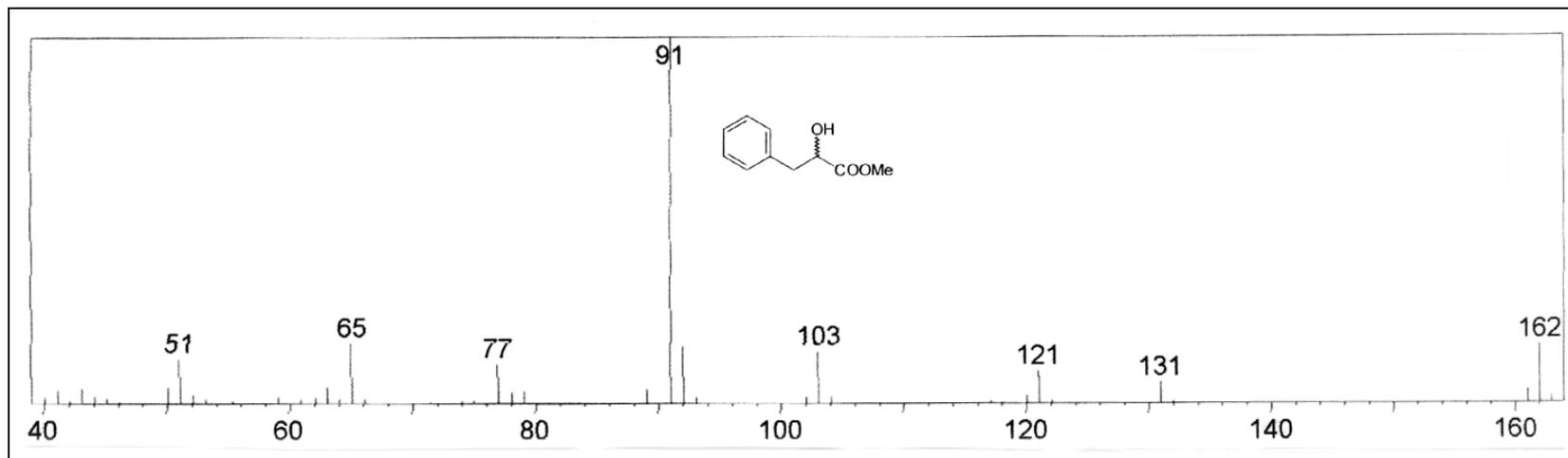
As quantidades de sais utilizadas para o preparo de 200 mL das soluções tampão³⁷ encontram-se descritas na Tabela 8.

Tabela 8. Composição das soluções tampão de fosfato^a

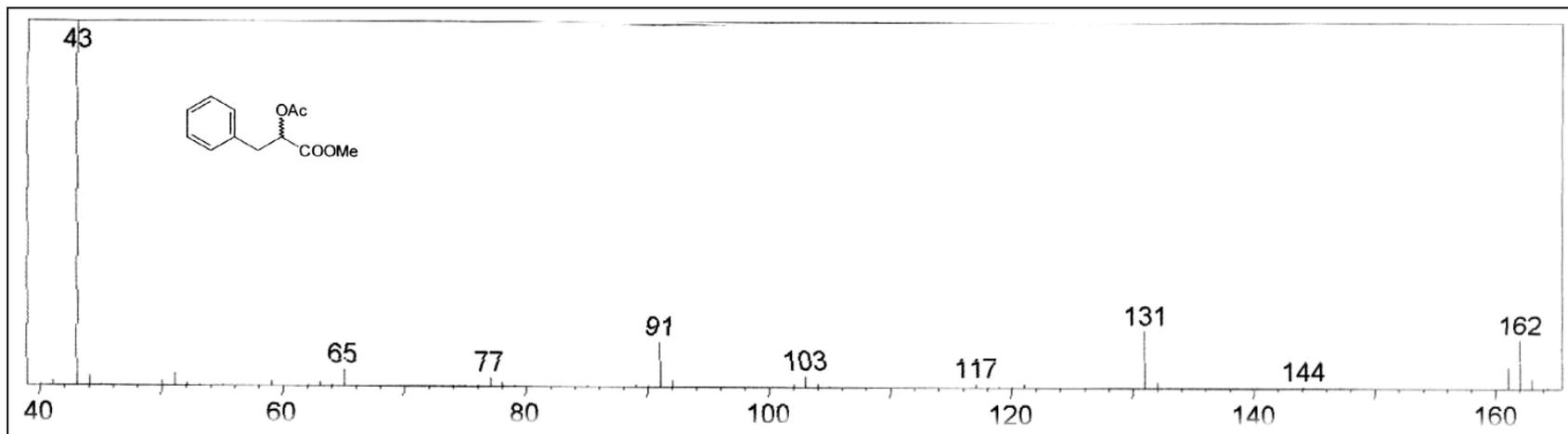
pH	KH ₂ PO ₄ (g)	Na ₂ HPO ₄ (g)	Na ₃ PO ₄ (g)
4,00	5,44	-	-
7,50	0,4285	1,747	-
10,00	-	1,784	0,1505

^a quantidades em massa para um volume final de 200 mL

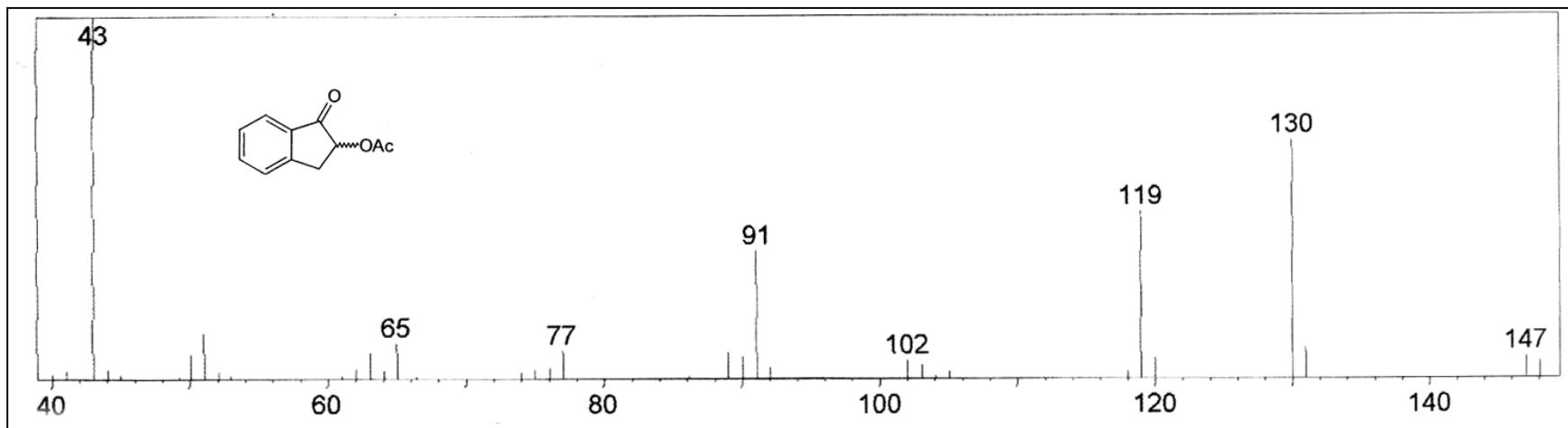
³⁷ Christian, G.D., Purdy, W.C. *J. Eletroanal. Chem.* **1962**, 3, 363.



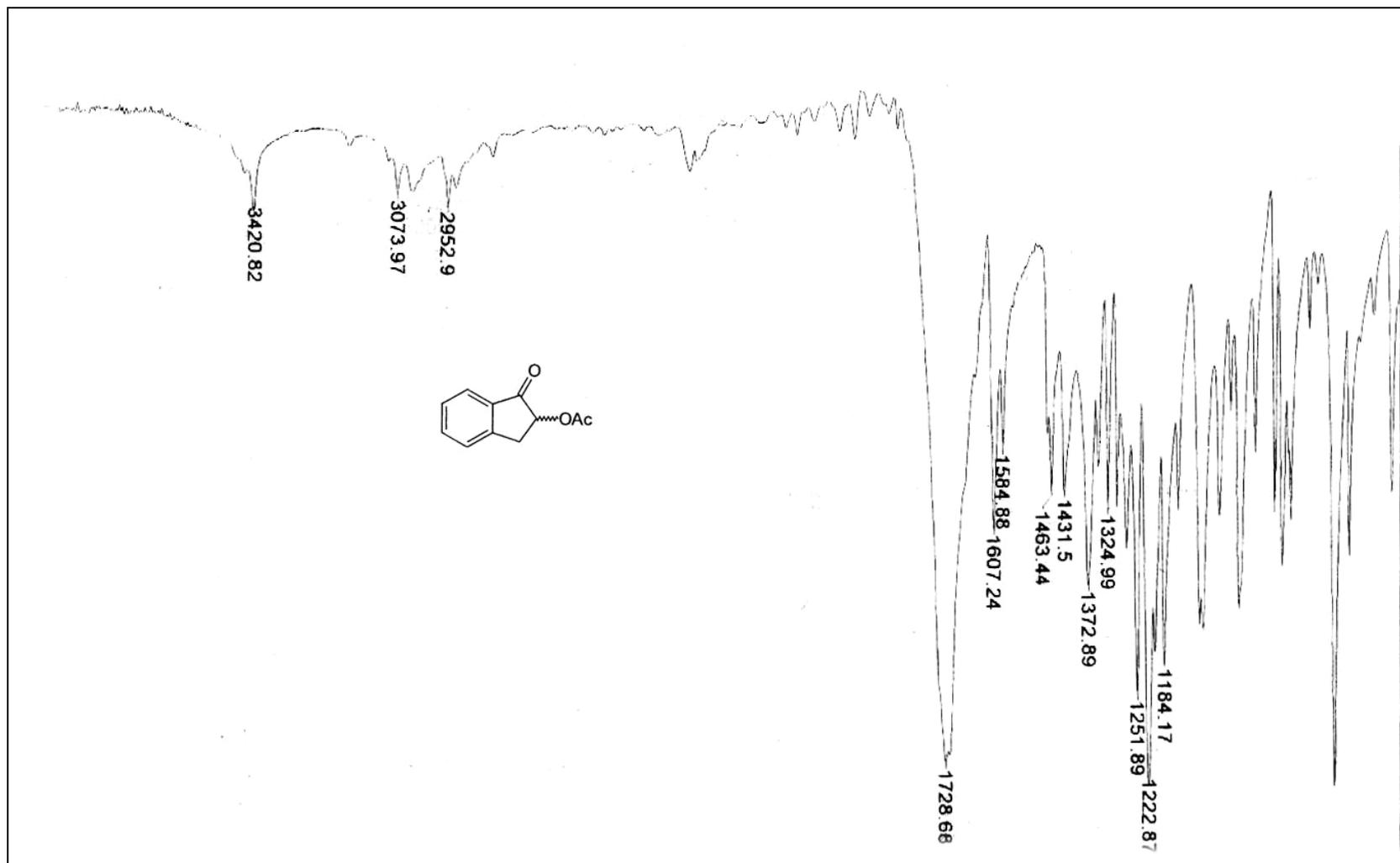
E1 – Espectro de massas (EI, 70 eV) do éster metílico (±)-**15**.



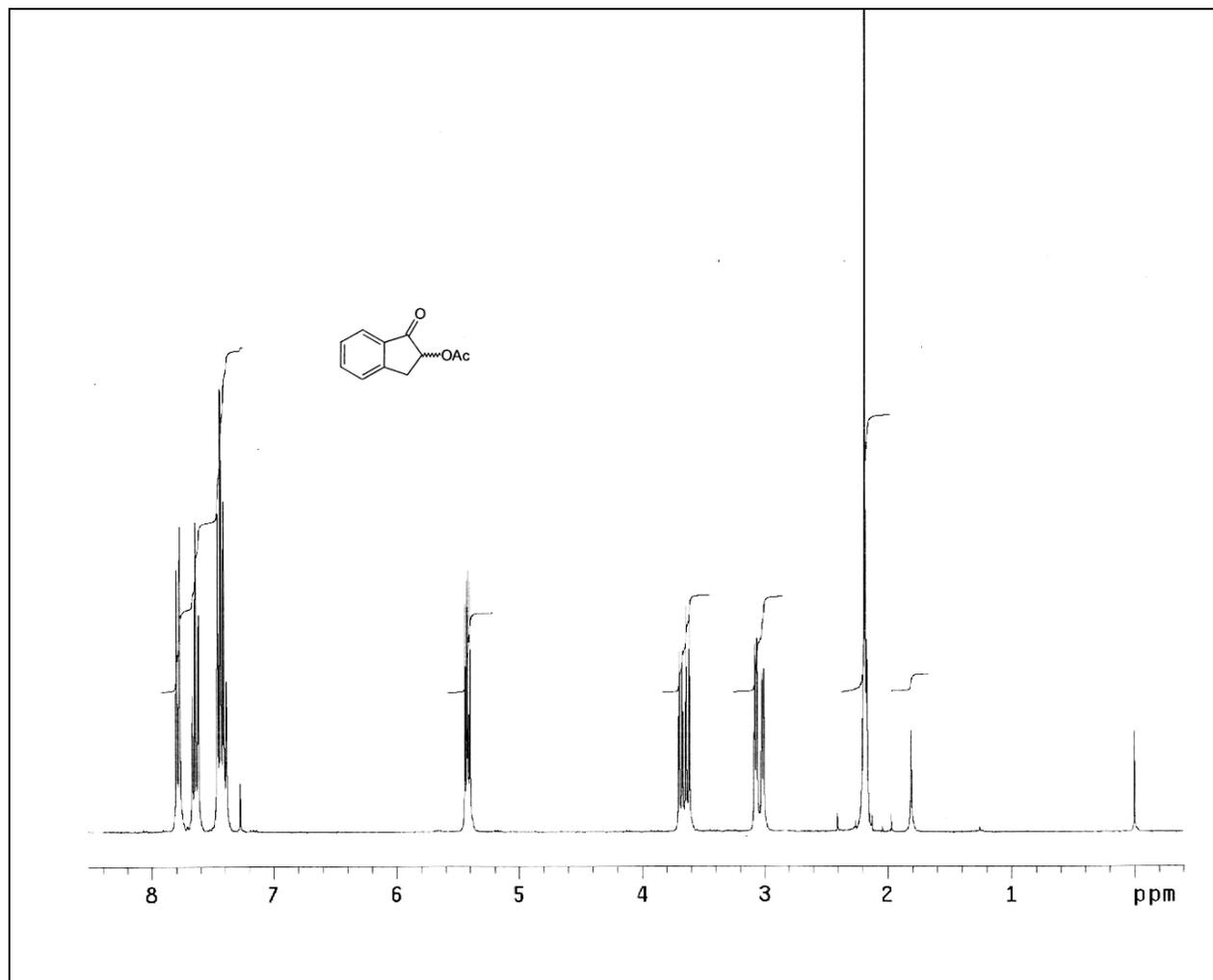
E2 – Espectro de massas (EI, 70 eV) do acetato (\pm)-**16**.



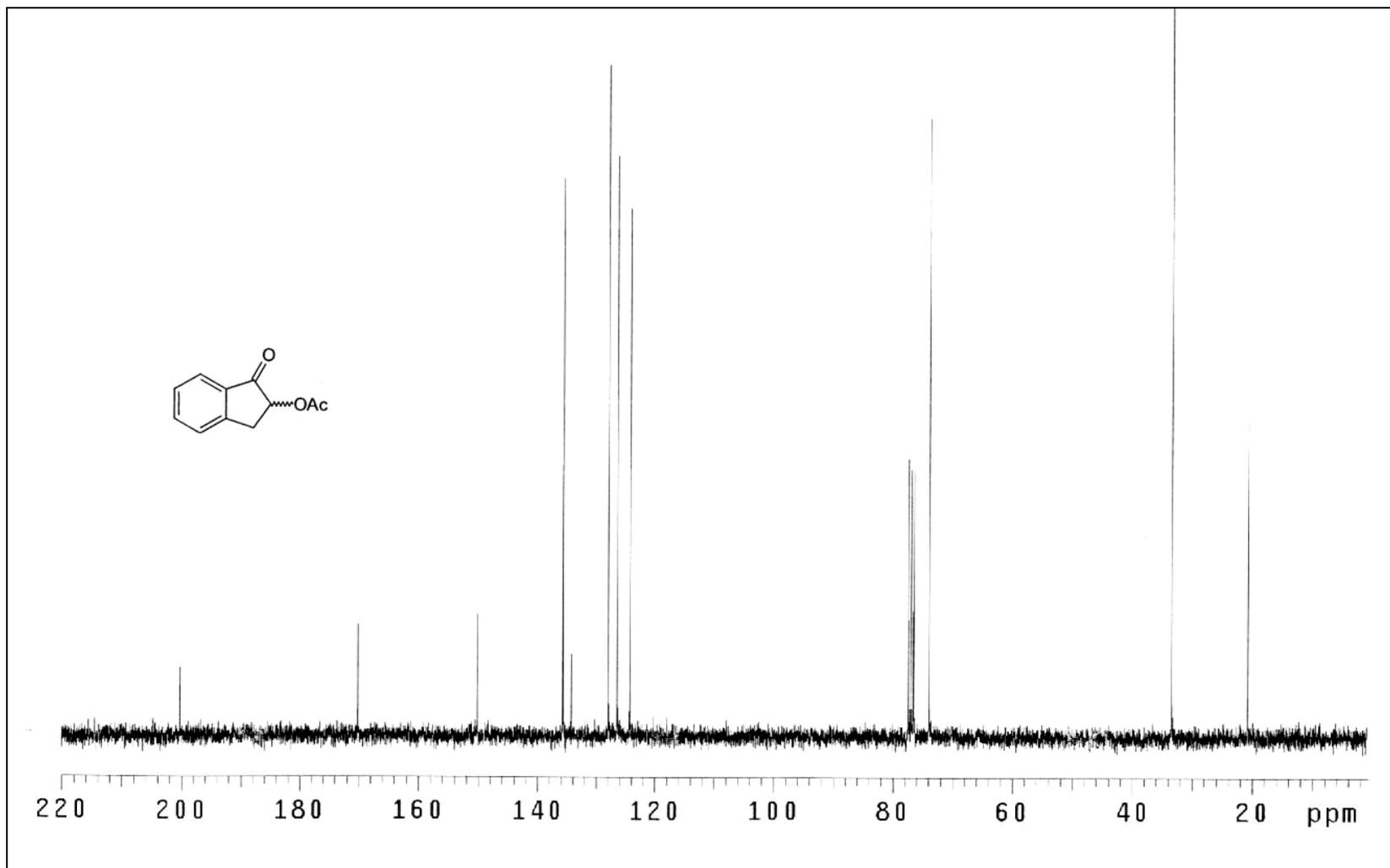
E3 – Espectro de massas (IE, 70 eV) do acetato (\pm)-**8**.



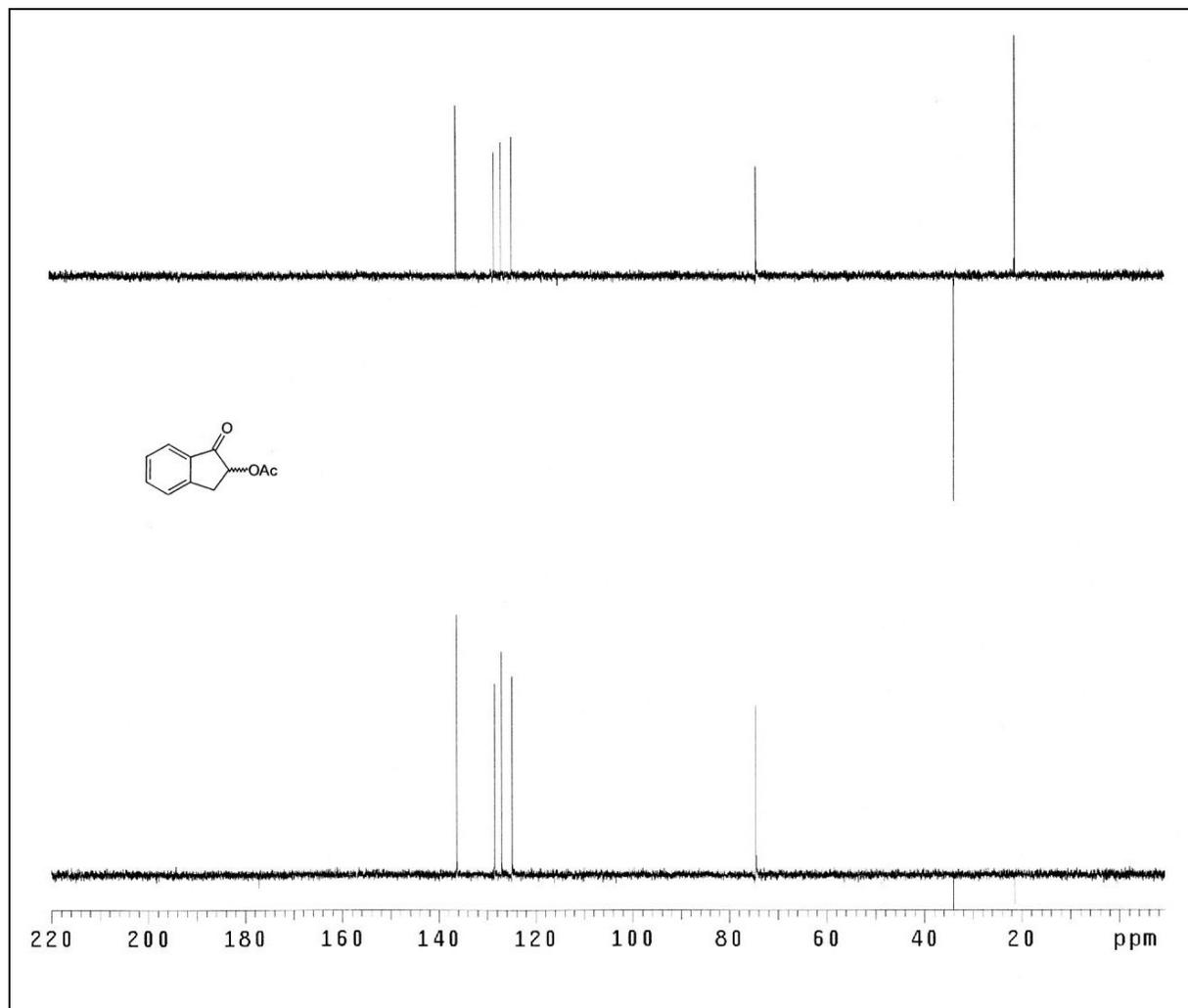
E4 – Espectro no infravermelho (KBr) do acetato (±)-8.



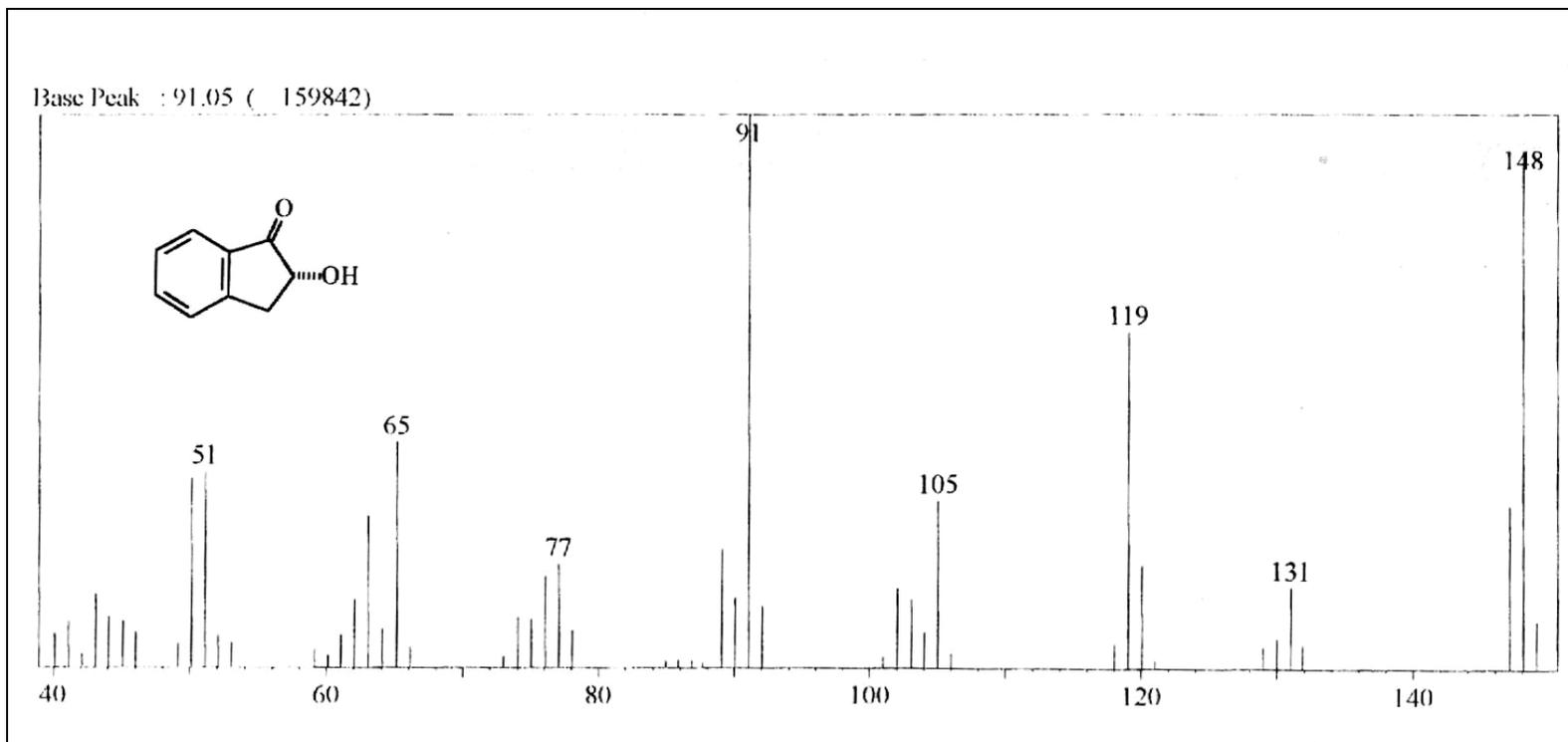
E5 – Espectro de RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃), do acetato (±)-**8**.



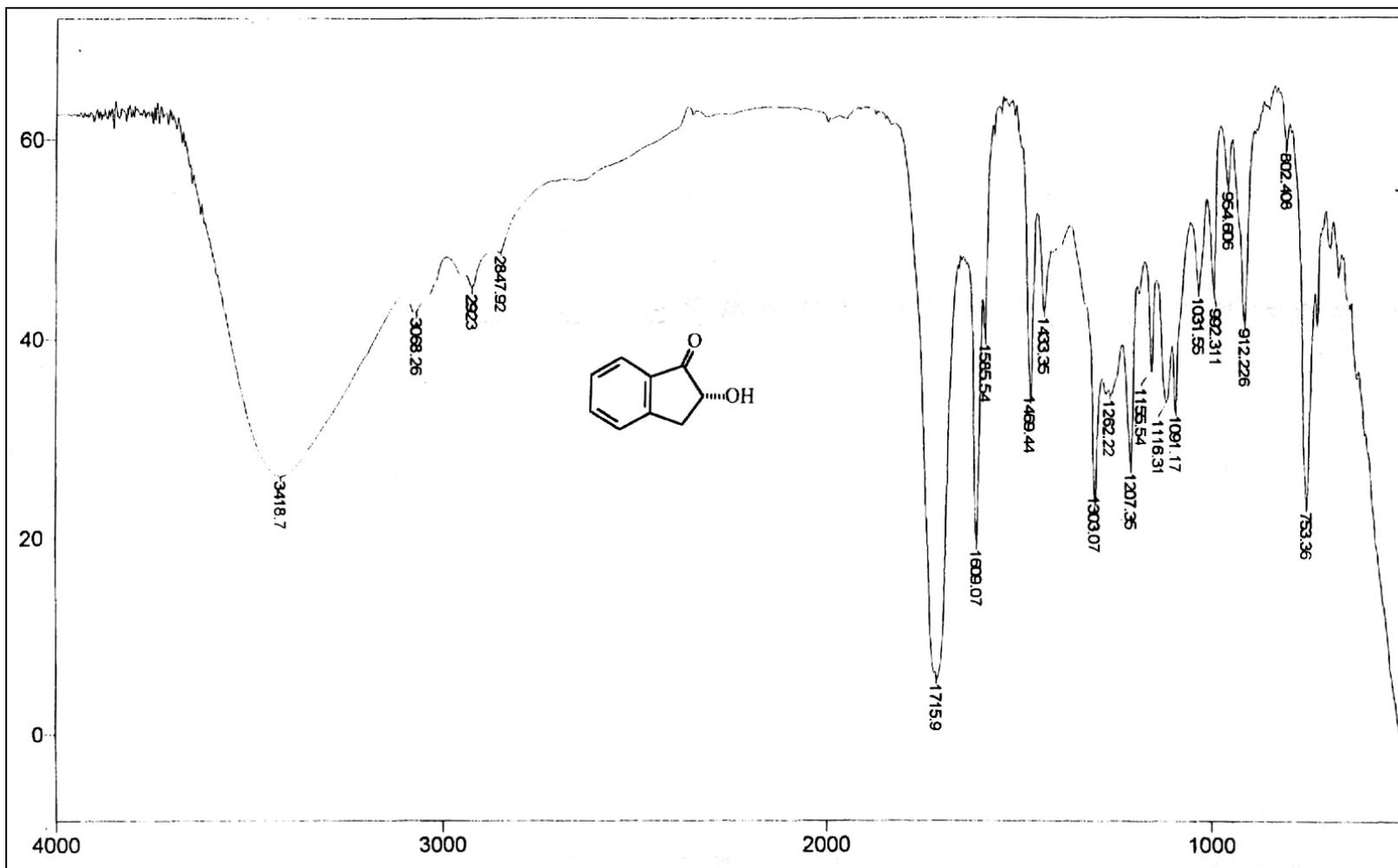
E6 – Espectro de RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃), do acetato (±)-8.



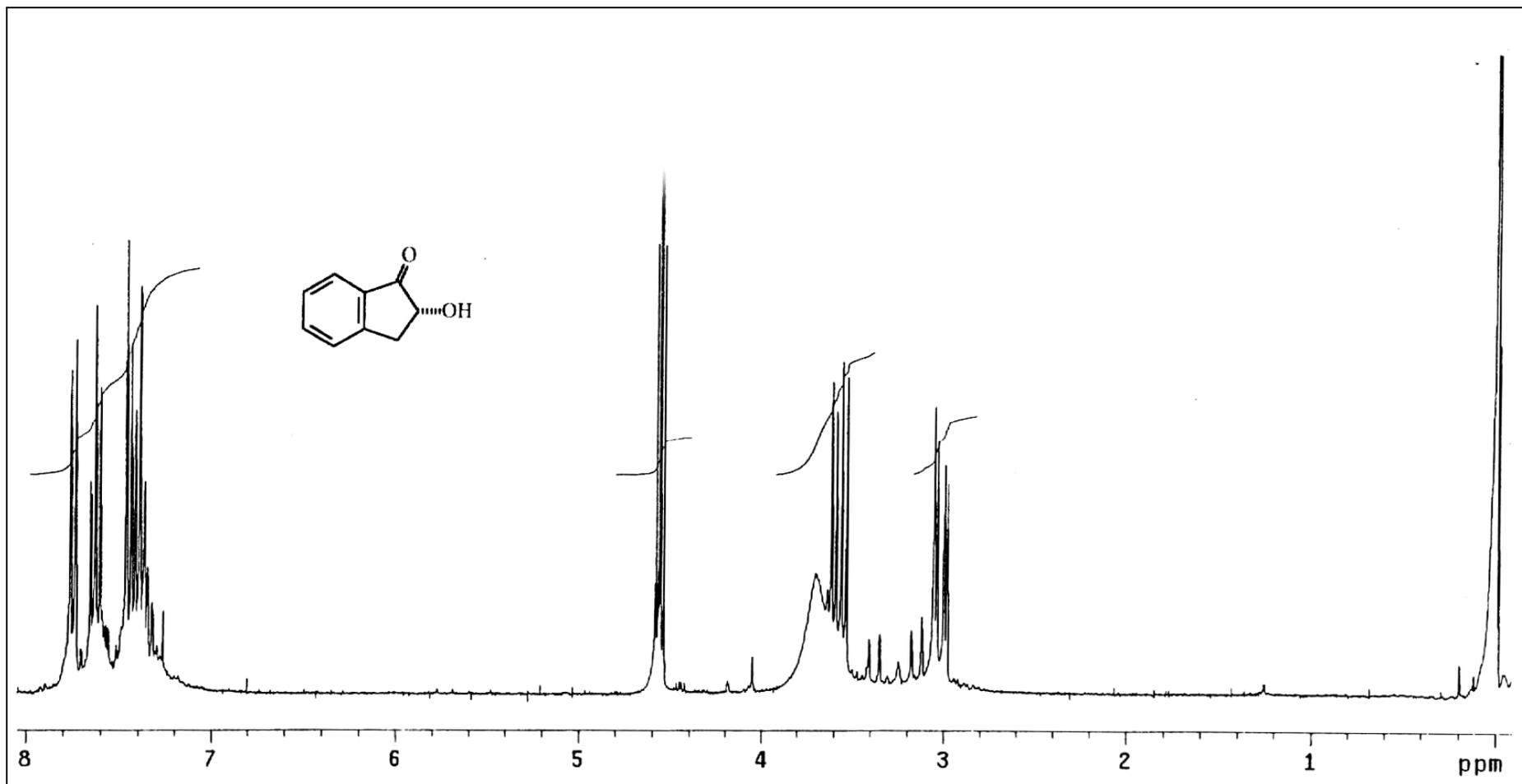
E7 – Espectro de DEPT 90 e 135 (75 MHz, CDCl₃), do acetato (±)-**8**.



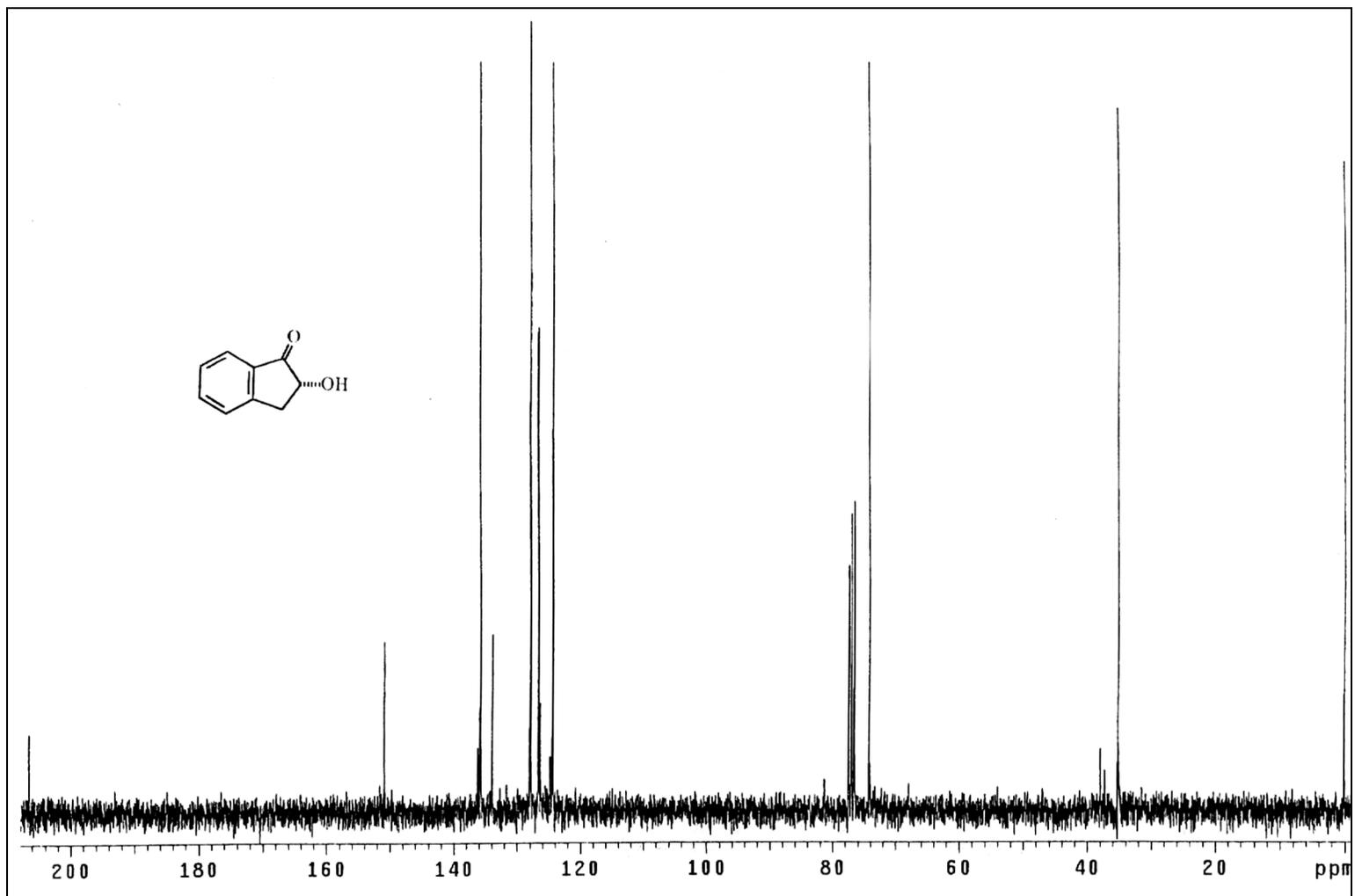
E8 – Espectro de massas (EI, 70 eV), do cetol (±)-5.



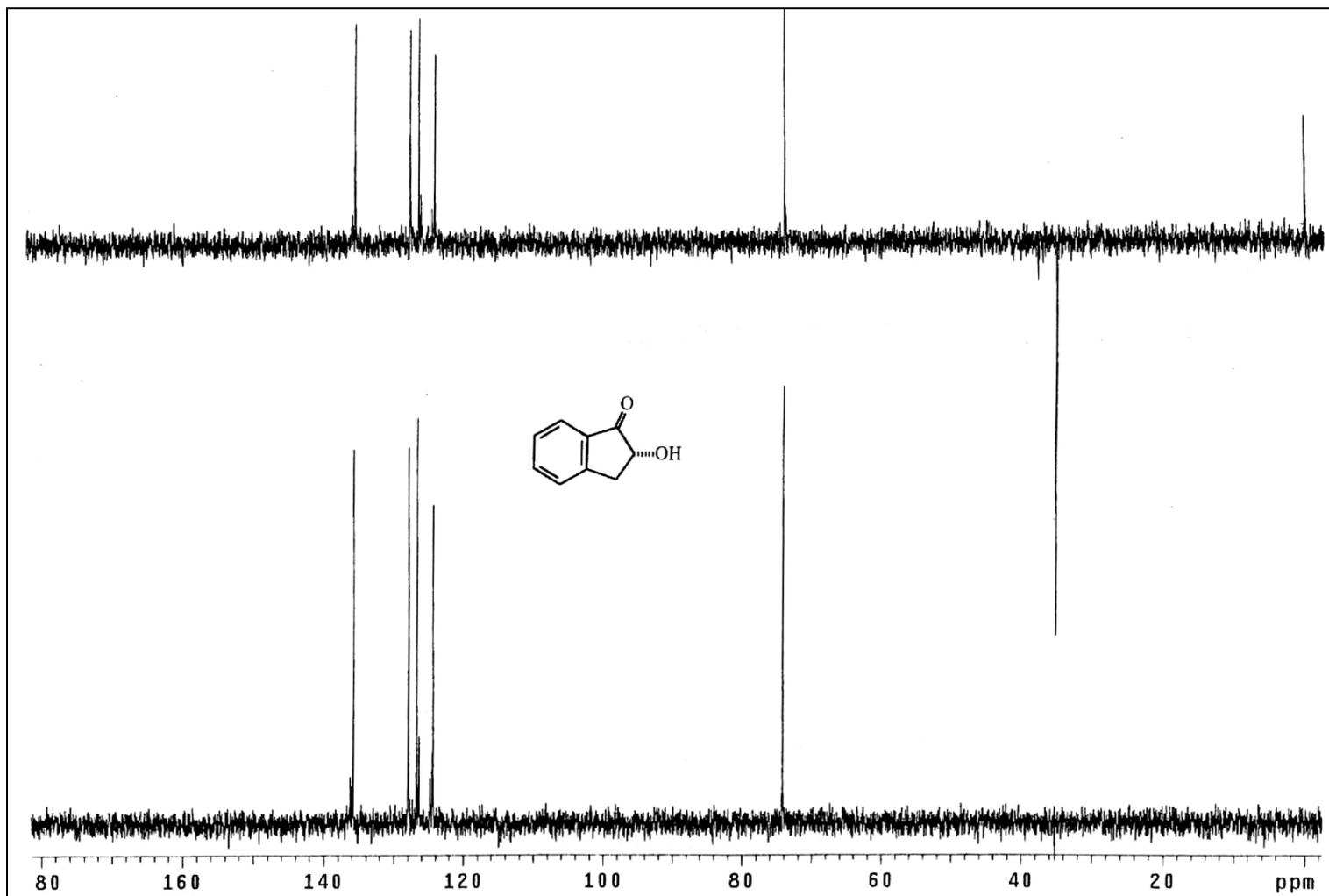
E9 – Espectro no infravermelho (filme), do cetol (±)-5.



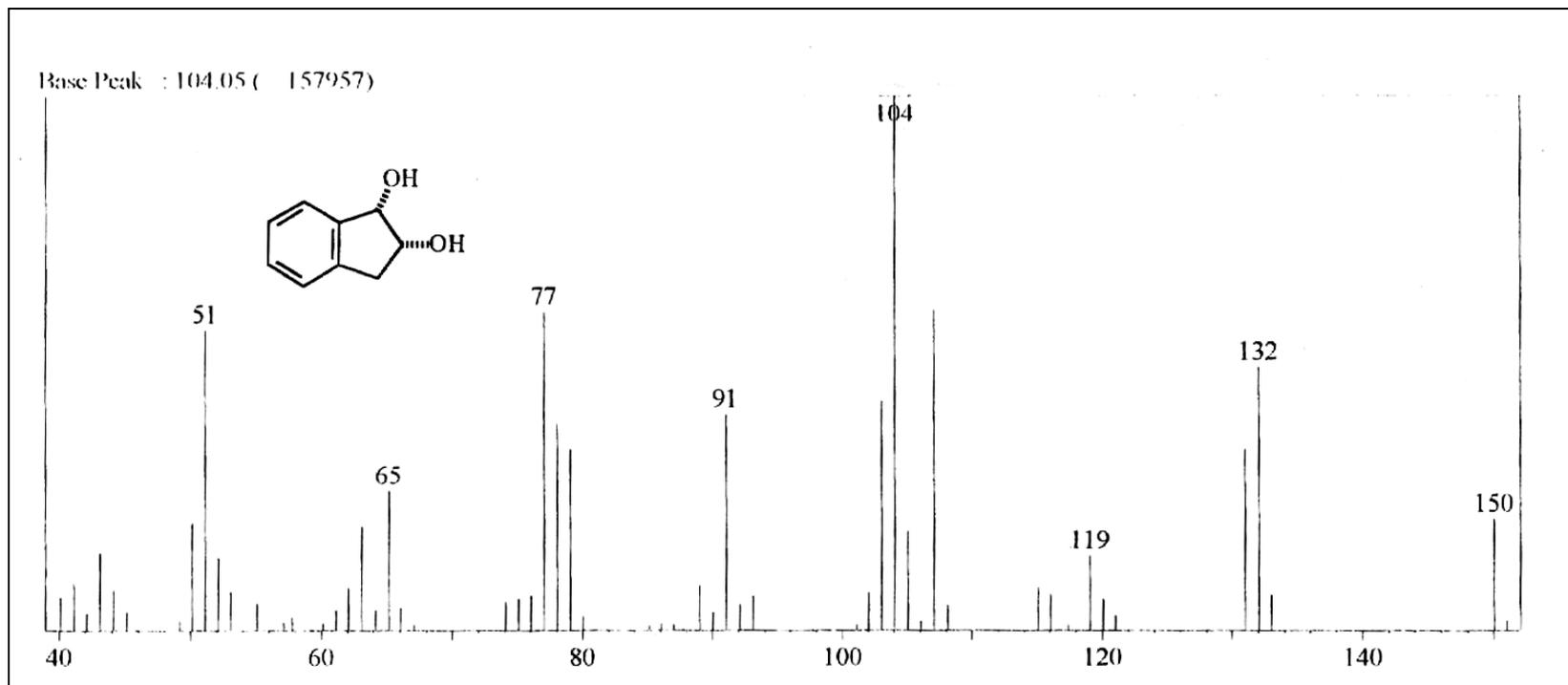
E10 – Espectro de RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3), do cetol (\pm)-5.



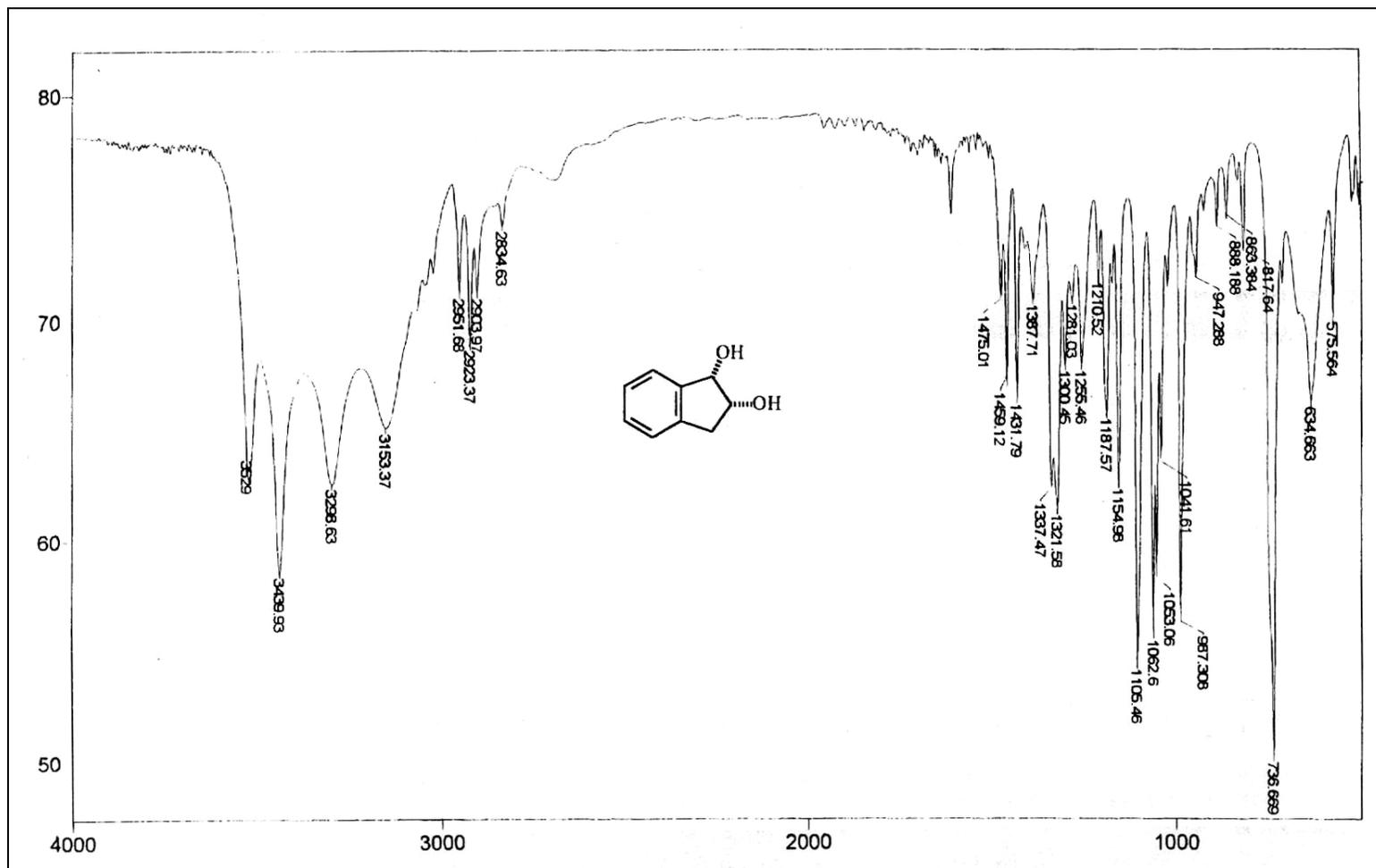
E11 – Espectro de RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl₃), do cetol (\pm)-5.



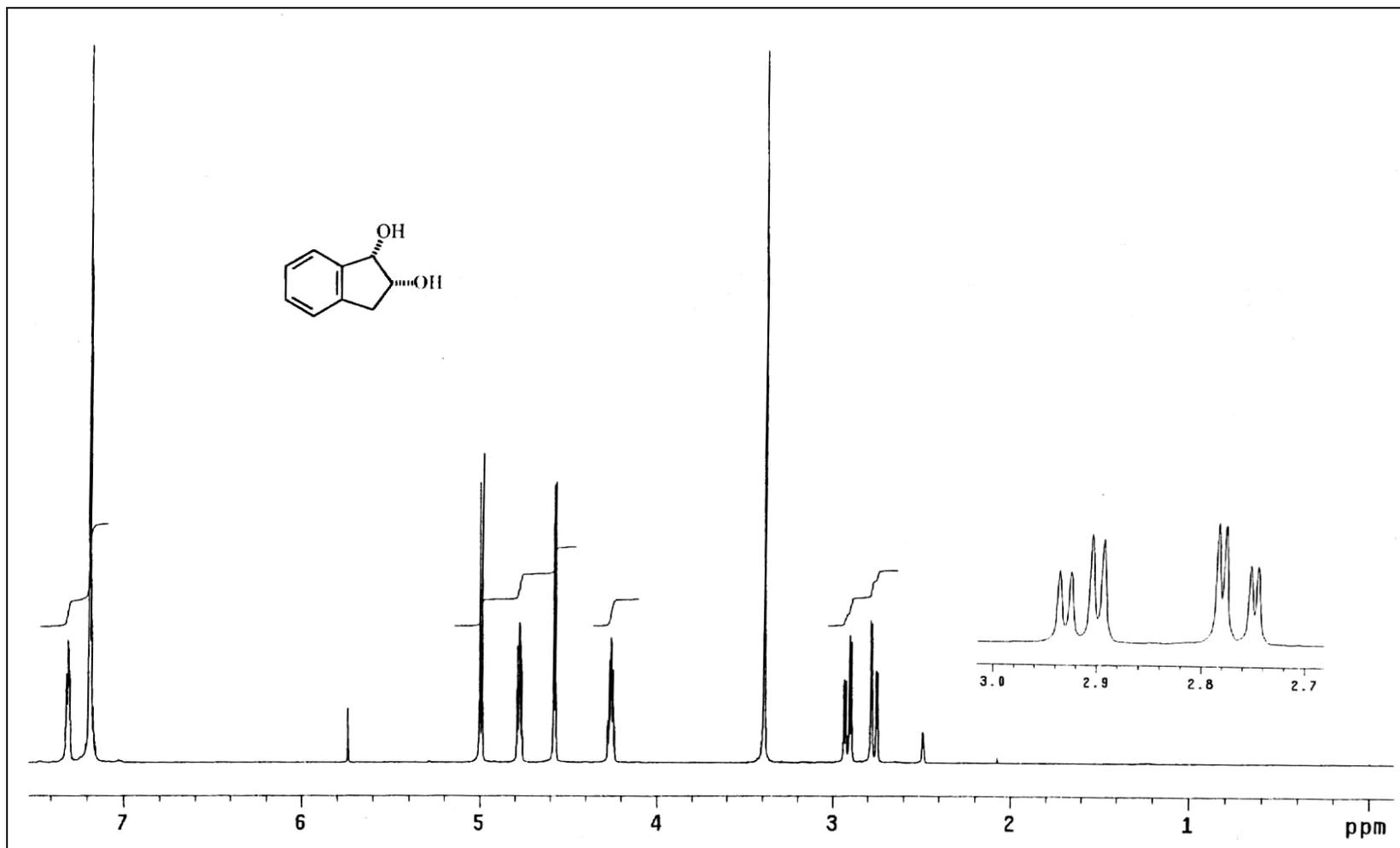
E12 – Espectro de DEPT 90 e 135 (75 MHz, CDCl_3), do cetol (\pm)-5.



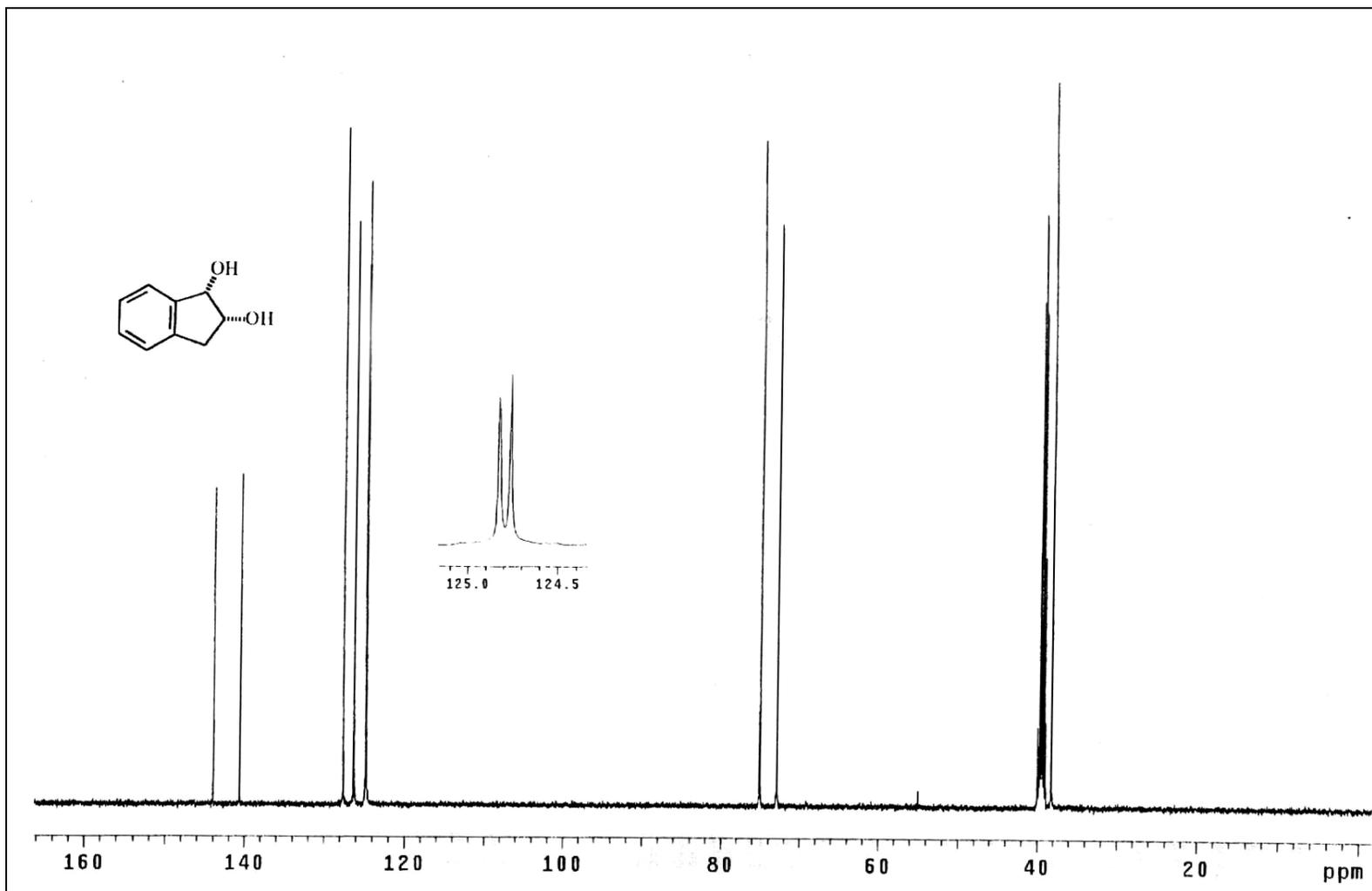
E13 – Espectro de massas (EI, 70 eV), do *cis*-diol (±)-2.



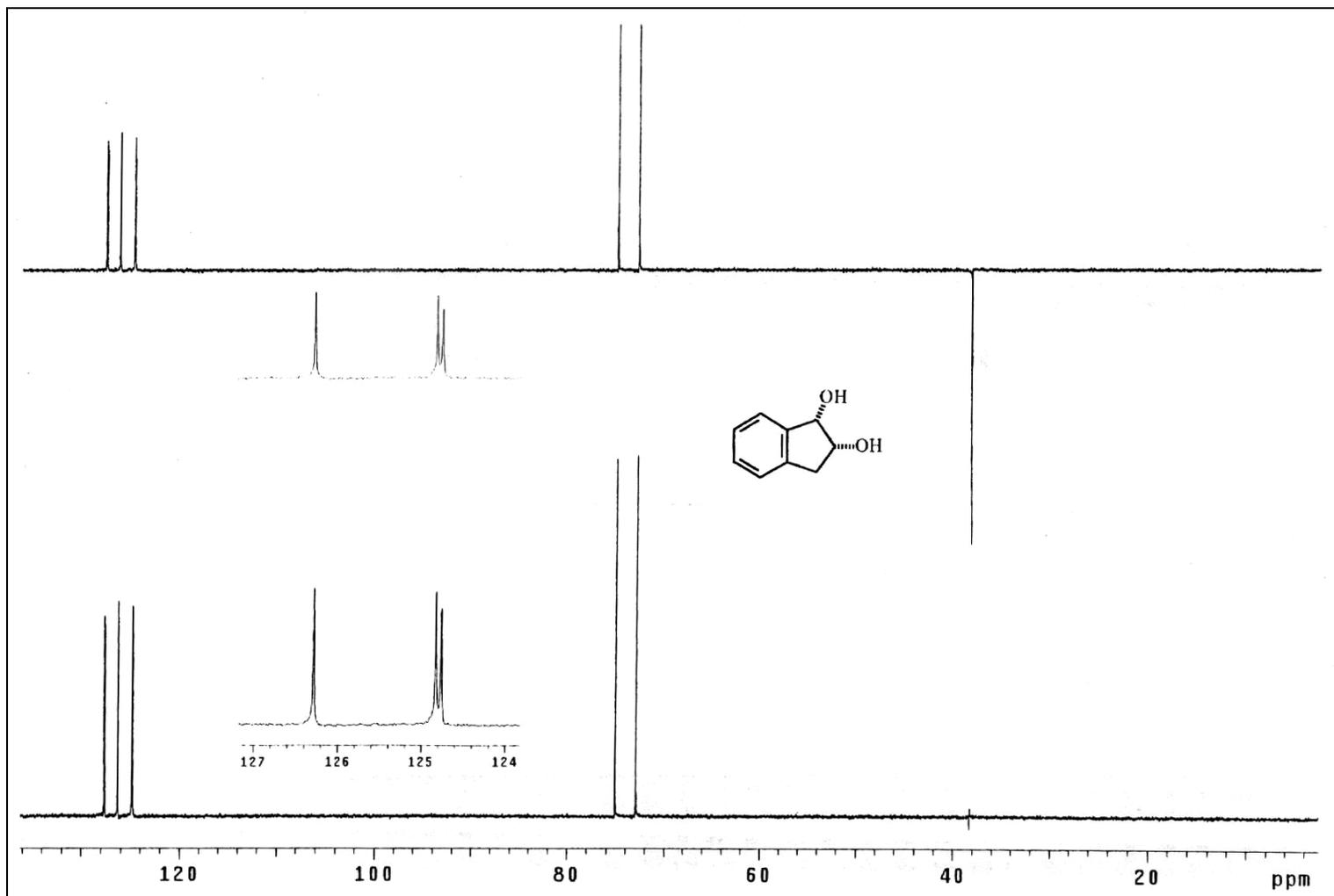
E14 – Espectro no infravermelho (KBr) do *cis*-diol (±)-2.



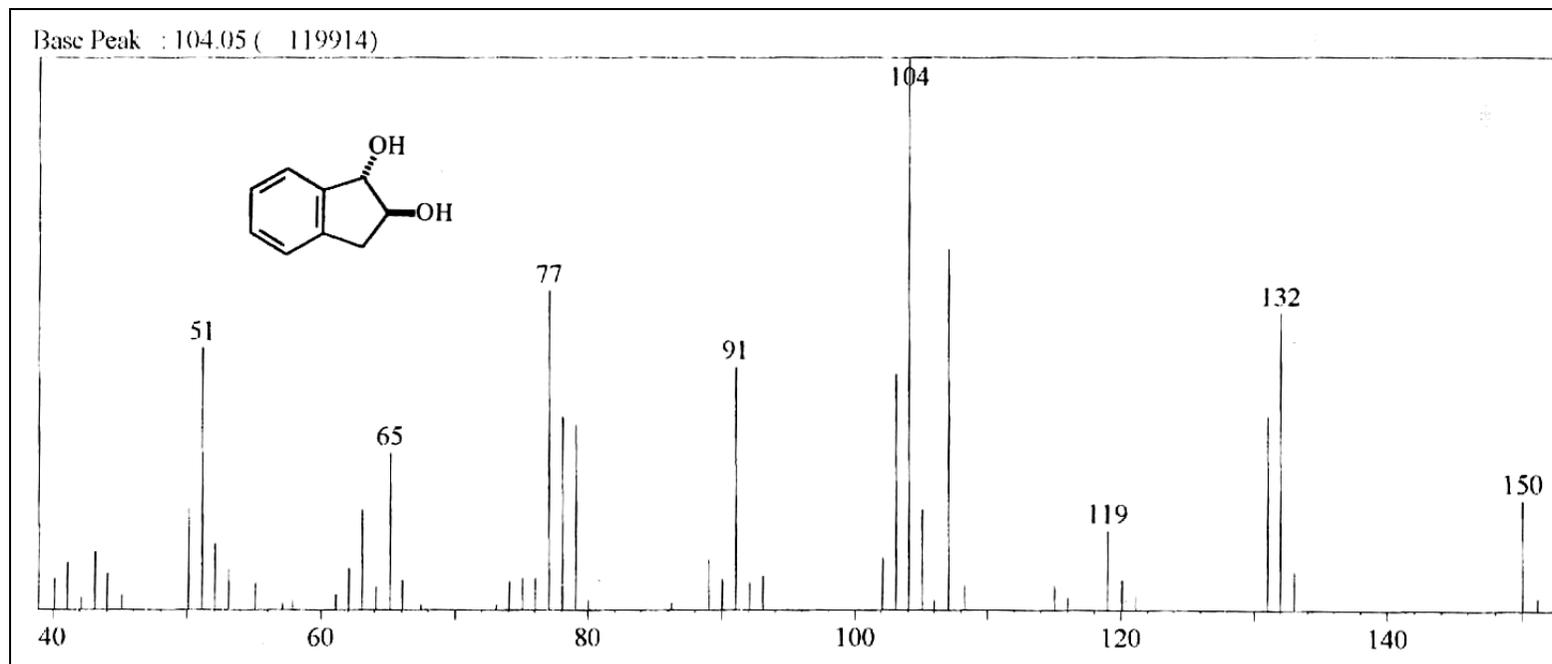
E15 – Espectro de RMN ^1H (500 MHz, DMSO-*d*₆), do *cis*-diol (\pm)-2.



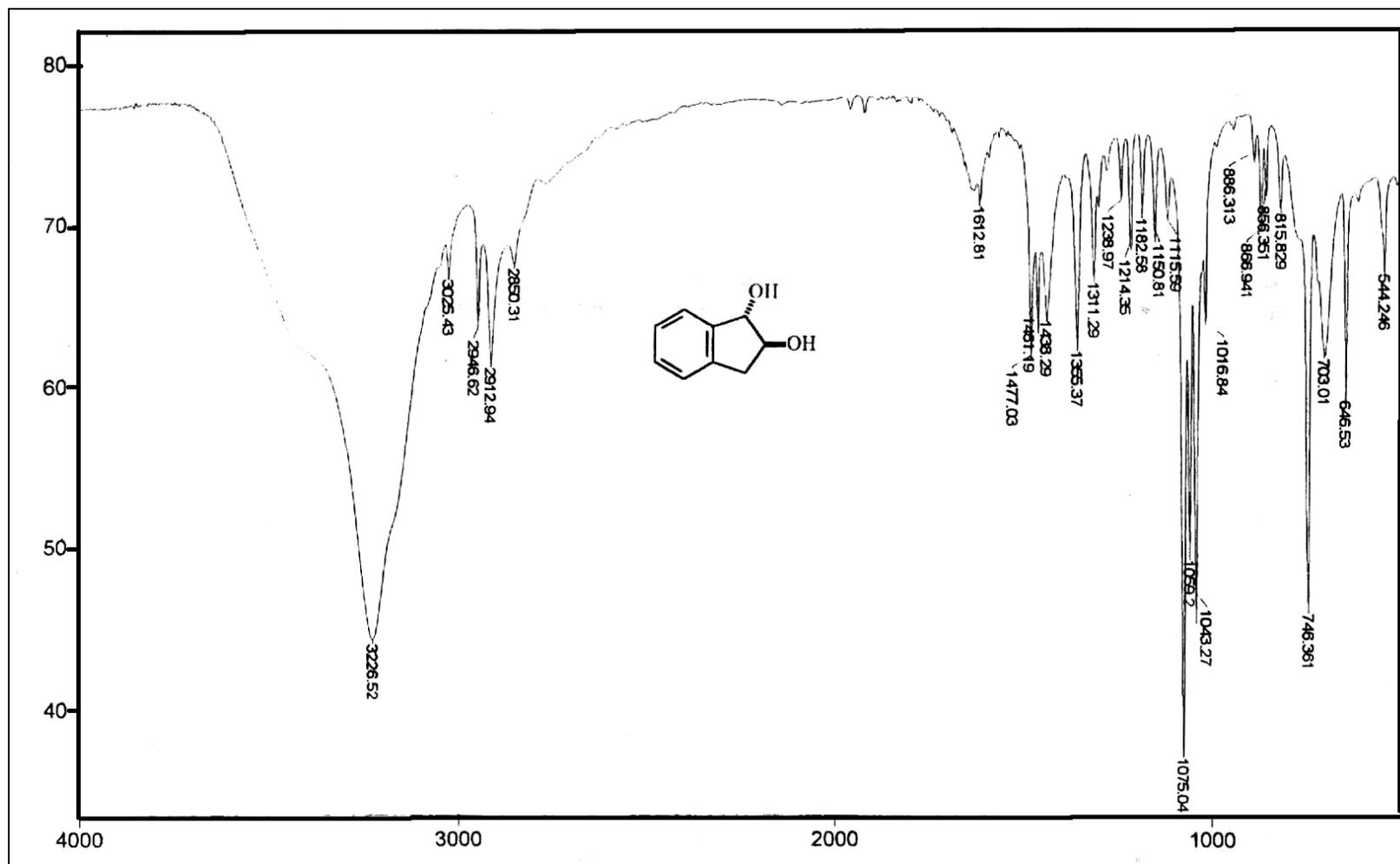
E16 – Espectro de RMN ^{13}C (125 MHz, $\text{DMSO-}d_6$), do *cis*-diol (\pm)-2.



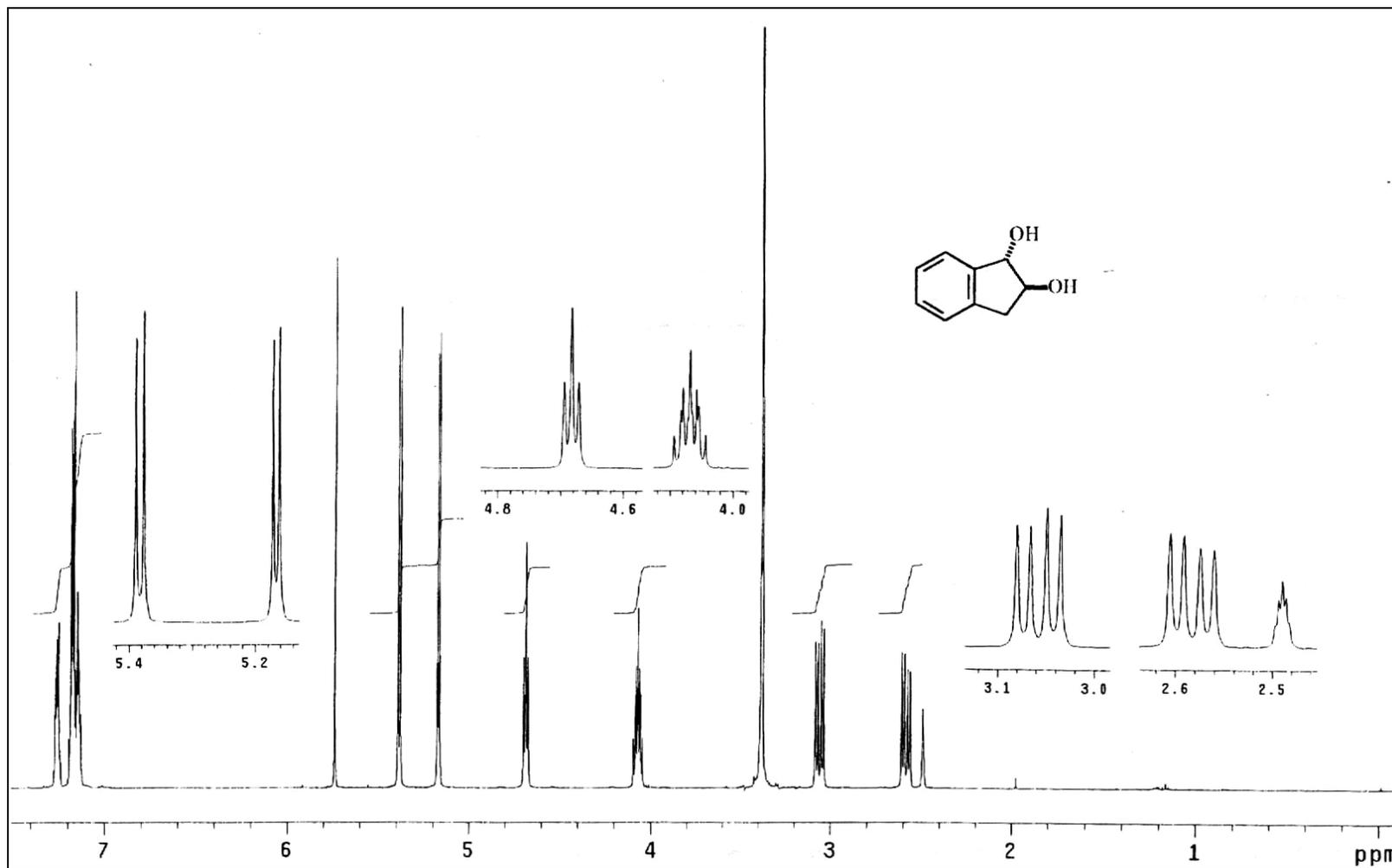
E17 – Espectro de DEPT 90 e 135 (125 MHz, DMSO-*d*6), do *cis*-diol (±)-2.



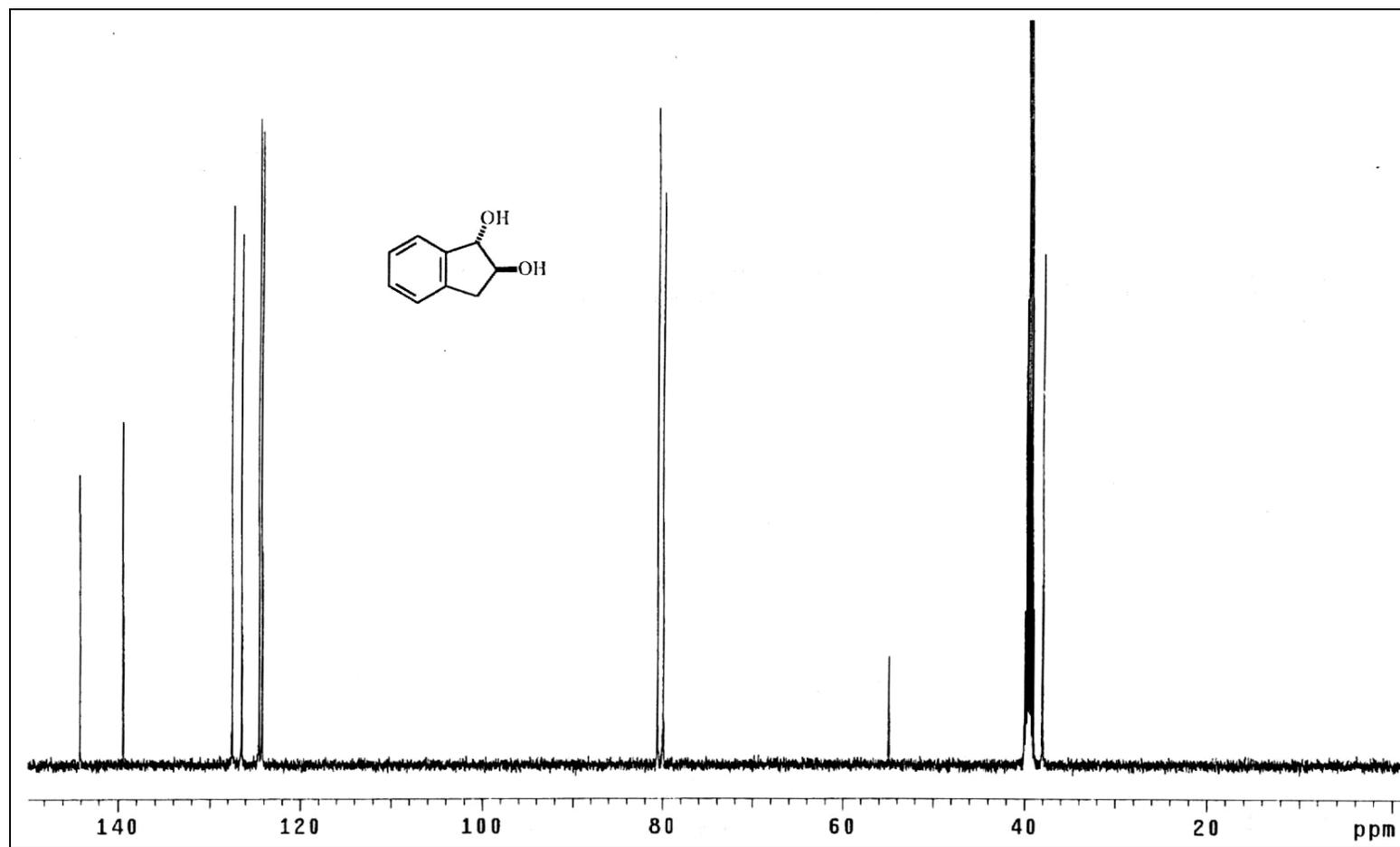
E18 – Espectro de massas (EI, 70 eV) do *trans*-diol (±)-2.



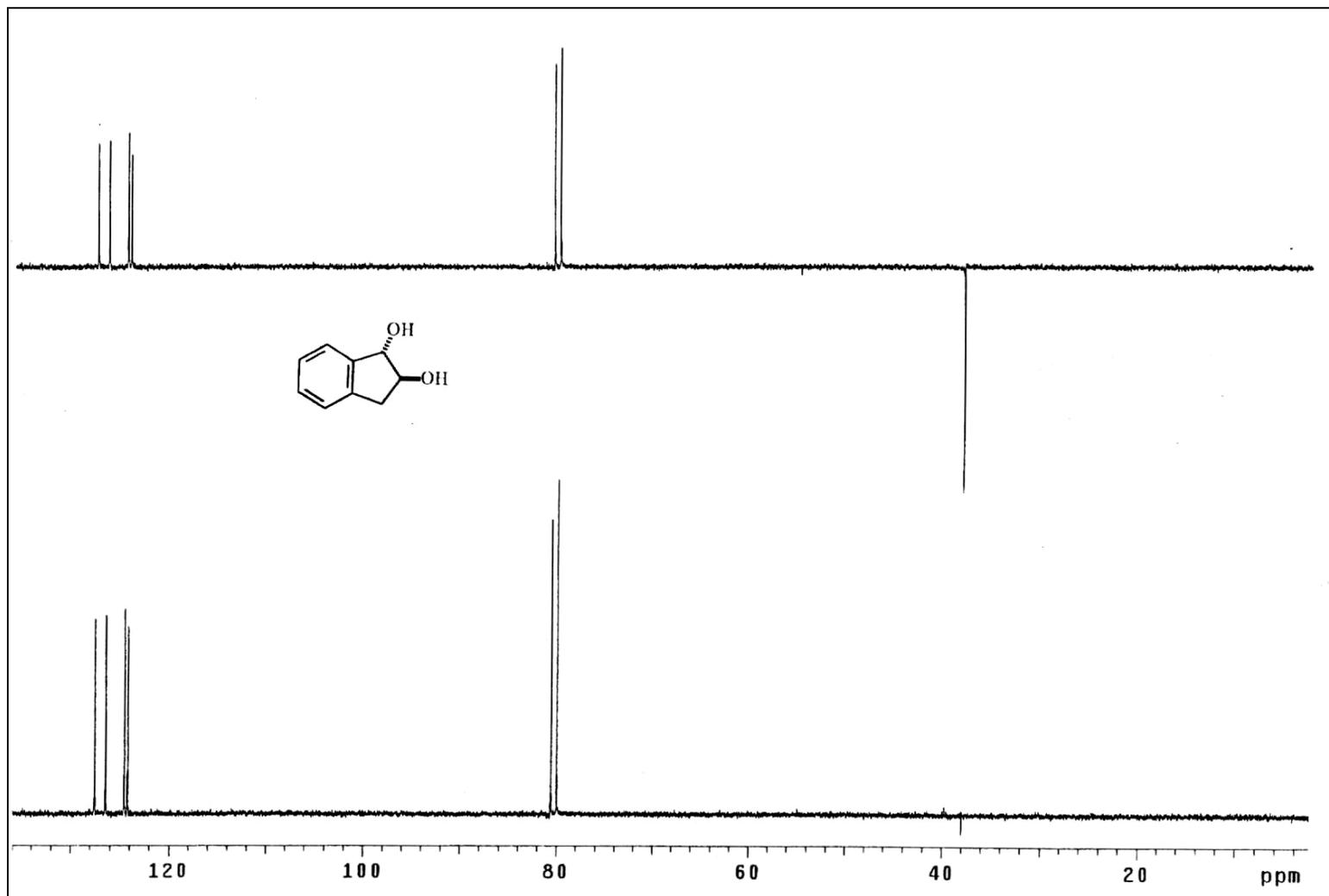
E19 – Espectro no infravermelho (KBr), do *trans*-diol (±)-2.



E20 – Espectro de RMN ^1H (500 MHz, DMSO-*d*6), do *trans*-diol (\pm)-2.



E21 – Espectro de RMN ^{13}C (125 MHz, DMSO- d_6), do *trans*-diol (\pm)-2.



E22 – Espectro de DEPT 90 e 135 (125 MHz, DMSO-*d*6), do *trans*-diol (±)-2.