UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE QUÍMICA

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida por Ana Elisa Pinto Moreira Sorrilha e aprovado pela Comissão Julgadora

Campinas, 10 de março de 1992

REDUÇÃO DE FENILCETONAS POR FERMENTO DE PÃO IMOBILIZADO

Tese de Mestrado

Ana Elisa Pinto Moreira Sorrilha

Orientador: Prof. Dr. José Augusto Rosário Rodrigues

Campinas 1992

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

AD04928-BC

a meus pais pelo apoio

durante toda a realização

do trabalho

ao Rogério

pelo carinho e dedicação

Pegadas na Areia

Uma noite eu tive um sonho...

Sonhei que estava andando na praia com o Senhor e, através do Céu passavam cenas que eram minha vida.

Para cada cena que passava, percebi que eram deixados dois pares de pegadas na areia.

Uma era o meu e o outro do Senhor.

Quando a última cena de minha vida passou diante de nós, olhei para trás, para as pegadas na areia e notei que muitas vezes no caminho da minha vida, havia apenas um par de pegadas na areia.

Notei também, que isso aconteceu nos momentos mais difíceis e angustiosos de meu viver.

Isso aborreceu-me deveras, e perguntei então ao Senhor: "Senhor tu me disseste que, uma vez que eu resolvi te seguir, Tu andarias sempre comigo, todo o caminho, mas notei que durante as maiores tribulações do meu viver havia na areia apenas um par de pegadas.

Não compreendo por que, nas horas que eu mais necessitava de ti, Tu me deixaste."

O Senhor me respondeu:

"Meu precioso filho, Eu te amo e jamais te deixarei nas horas de tua prova e do teu sofrimento.

Quando viste na areia, apenas um par de pegadas foi exatamente aí, que Eu te carreguei nos braços."

Autor desconhecido

Agradecimentos

- Ao prof. José Augusto, pela orientação e paciência ao longo de todos estes anos.
- Aos meus irmãos Nando e Dema e avós Marina e a Maria *in memorian*
- Às amigas Zezé e Angélica, pela ajuda no laboratório.
- À nossa "mãezona" Veroca.
- Aos amigos distantes Genaro e Tânia, meus grandes companheiros.
- À turma do laboratório: Paulinho, Pedro, Joana, Lolô, Giovani, Roseli, Flávio, Ari e Lucília.
- À minha grande amiga Margarete, principalmente pelas "dicas" do trabalho.
- À profa. Raquel, principalmente pela ajuda nos desenhos.
- À família do Roger pela grande acolhida.
- Ao pessoal das oficinas: Fontana, Miguel e todos os outros que ajudaram de alguma forma a realização deste trabalho.
- Ao pessoal da Planta Piloto, pela boa vontade e pelo empréstimo de equipamentos.
- Ao prof. Moran pelas sugestões dadas no trabalho e reagentes cedidos.
- À profa. Inês pela ajuda no trabalho, e seus alunos Zuca, Osvaldo, Adriano e Maria Helena.
- Aos amigos Beth, Moli, Denilse e Dri pela convivência durante todo esse tempo.
- Ao CNPq e à UNICAMP pelas bolsas concedidas e à FAPESP pelo auxílio à pesquisa (processo 90/0330-7).

ABREVIAÇÕES

s l - singleto largo

d - dubleto

dd - duplo dubleto

δ - deslocamento químico em ppm

e.e. - excesso enantiomérico

FP - fermento de pão

FPI - fermento de pão imobilizado

FPL - fermento de pão livre

CG-EM - espectro de massa acoplado ao cromatógrafo gasoso

H - hidrogênio

IV - infravermelho

J - constante de acoplamento

m - multipleto

m_a - massa de álcool

m_{cr} - massa de cetona recuperada

m/e - massa sobre carga

mmol - milimol

NADH - nicotinamida-adenina dinucleotídeo

NADPH - nicotinamida-adenina dinucleotídeo fosfato

PF - ponto de fusão

Ph - fenil

ppm - partes por milhão

R_{cr} - porcentagem de cetona recuperada

R_o - rendimento óptico

R_q - rendimento químico

RMN^{1}H - ressonância magnética nuclear de prótons

RMN^{13}C - ressonância magnética nuclear de carbono 13

s - singleto

t - tripleto

ÍNDICE

	pg
CAPÍTULO 1 – INTRODUÇÃO	1
1.1. Sistemas microbiológicos e/ou enzimáticos	1
1.2. *Saccharomyces cerevisiae*	8
1.3. Algumas considerações sobre substratos	13
1.3.1. Redução de cetonas	15
1.3.2. Outras reduções e reações diversas	19
1.3.2.1. Reações de ligações duplas **C=C**	19
1.3.2.2. Reduções de cetonas α,β-insaturadas	20
1.3.2.3. Formação de ligação **C-C**	20
1.3.2.4. Redução de compostos organometálicos	21
1.3.2.5. Redução de compostos contendo flúor	21
1.3.2.6. Oxidações	21
1.3.2.7. Hidrólise de ésteres	22
1.3.2.8. Hidrólise de hidrazona	23
1.3.2.9. Redução de nitro compostos aromáticos	23
1.3.2.10. Reações feitas com métodos não convencionais para aumentar o rendimento químico e e.e.	24
1.4. Imobilização de células	24
1.4.1. Alguns imobilizantes utilizados e suas características	28
1.4.1.1. Crisotila	45
1.4.1.2. Montmorilonita	51
OBJETIVO	55

CAPÍTULO 2 – RESULTADOS E DISCUSSÃO 56

2.1. Crisotila 56

2.1.1. Tratamento 56

2.1.2. Suporte e fermentação do açúcar 56

2.1.3. Testes de expansão com solventes 56

2.1.4. Testes de toxidez de solventes para com fermento de pão 58

2.1.5. Redução de α-cloroacetofenona 59

2.1.6. Tentativa de reutilização do FPI 62

2.1.7. Reação utilizando hexano como solvente 62

2.1.8. Método 2 - outro meio de cultura 63

2.1.9. Outros tipos de fermentos desidratados 66

2.1.10. Redução do α-nitroacetofenona 67

2.2. Síntese de novos substratos para redução com *S. c.* 67

2.2.1. Síntese do 1-fenil-1,2-propanodiona **94** 67

2.2.2. Síntese do O-acetil-1-fenil-1,2-propanodiona **95** 69

2.2.3. Síntese do O-benzil-1-fenil-1,2-propanodiona **96** 70

2.3. Redução dos derivados de $PhCOCXCH_3$ 72

2.3.1. Crisotila 72

2.3.1.1. Redução de **94** 72

2.3.1.2. Redução de **93** e **95** 76

2.3.1.3. Redução de **96** 76

2.4. Montimorilonita K10 77

2.4.1. Testes de expansão e fermentação 78

2.4.2. Redução de α-cloroacetofenona **88** 80

2.4.3. Redução de 1-fenil-1,2-propanodiona **94** 80

2.4.4. Redução de α-azidoacetofenona **101** 82

2.5. Redução catalítica do (-)-(R)-2-azido-1-feniletanol **102** 83

CONCLUSÃO 85

CAPÍTULO 3 – PARTE EXPERIMENTAL 87

3.1. Informações gerais 87

3.1.1. Aparelhagem utilizada 87

3.1.2. Observações 88

3.1.3. Alguns reagentes 89

3.2. Procedimentos experimentais 91

3.2.1. Tratamento da crisotila 91

3.2.1.1. Lavagem 91

3.2.1.2. Tratamento com ultra-som 91

3.2.2. Teste de expansão de crisotila com diversos solventes 91

3.2.3. Testes de toxidez de alguns solventes para com fermento de pão 92

3.2.4. Suporte com *Saccharomyces cerevisiae* 92

3.2.5. Reação com α-cloroacetofenona 88 93

3.2.5.1. Verificação do tempo mínimo de reação 93

3.2.5.2. Verificação da quantidade máxima de substrato 94

3.2.6. Reação de diluição 95

3.2.7. Tentativa de reaproveitamento das crisotilas suportadas 95

3.2.7.1. Método 1 95

3.2.7.2. Adicionando nutriente de cerveja 96

3.2.7.3. Adicionando açúcar 96

3.2.7.4. Lavagem do FPI com éter 96

3.2.8. Reação com hexano 97

3.2.9. Reação com α-cloroacetofenona (método 2) 97

3.2.9.1. Reutilização do FPI 98

3.2.10. Reação com fermento desidratado (Sigma) 98

3.2.11. Reação com fermento desidratado (Fleischmann) 99

3.2.12. Reação com α-nitroacetofenona **90** 99

3.2.13. Síntese de 1-fenil-2-oxima-1,2-propanodiona **93** 100

3.2.14. Síntese de 1-fenil-1,2-propanodiona **94** 102

3.2.15. Síntese de O-acetil-1-fenil-2-oxima-1,2-propanodiona **95** 102

3.2.16. Síntese de O-benzil-1-fenil-2-oxima-1,2-propanodiona **96** 103

3.2.17. Reação com 1-fenil-1,2-propanodiona **94** (método 1) 104

3.2.17.1. Reuso 105

3.2.18. Reação com 1-fenil-1,2-propanodiona **94** (método 2) 105

3.2.18.1. Reuso do FPI 106

3.2.19. Reação com 1-fenil-2-oxima-1,2-propanodiona **93** 106

3.2.20. Reação com O-acetil-1-fenil-2-oxima-1,2-propanodiona **95** 106

3.2.21. Reação com O-benzil-1-fenil-2-oxima-1,2-propanodiona **96** 107

3.2.22. Testes com K10 e alguns solventes 108

3.2.23. Suporte com *Saccharomyces cerevisiae* e K10 108

3.2.24. Testes de fermentação para K10 como imobilizante 108

3.2.25. Reação com K10 como imobilizante e α-cloroacetofenona **88** 108

3.2.25.1. Reuso 109

3.2.26. Reação com 1-fenil-1,2-propanodiona **94** e K10 como imobilizante (método 2) 109

3.2.26.1. Reuso do FPI 110

3.2.27. Reação com α-azidoacetofenona **101** 110

3.2.27.1 . Reuso 110

3.2.28. Redução do (-)-(R)-2-azido-1-feniletanol 102 111

3.2.28.1 . Redução do (-)-(R)-2-azido-1-feniletanol do reuso 111

BIBLIOGRAFIA 113

APÊNDICES

APÊNDICE A - ESPECTROS

APÊNDICE B - PROJETO DE PESQUISA INICIAL

RESUMO

Estudou-se a redução estereoespecífica de fenilcetonas através de FPI (fermento de pão imobilizado) que, além de produzir álcoois com altos rendimentos ópticos, pode ser reutilizado diversas vezes, após o cofator NADH ser regenerado. Os álcoois quirais são intermediários importantes da indútria farmacêutica. Como suportes empregou-se crisotila e montmorilonita e, como meio de cultura utilizou-se dois métodos: método 1 - FPI e água; método 2 - FPI, açúcar e solução KCl 2% (FPI/açúcar 1:1).

Os compostos do tipo $PhCOCH_2X$, (X = Cl ou N_3) foram reduzidos. A α-cloroacetofenona, foi reduzida à sua (R)-cloridrina, (crisotila-FPI) com rendimentos químico e óptico muito próximos aos obtidos para FPL (fermento de pão livre). A reutilização subsequente do catalisador só é possível quando se utiliza o método 2, e obtém-se a (S)-cloridrina. O FPI não foi ativo para posteriores reciclagens, após o 3º ciclo. Por esse método, é possível um eficiente controle na estereoquímica na redução de cetonas.

A redução da α-azidoacetofenona com montimorilonita K10-FPI propicia valores de rendimento químico muito maiores que os obtidos com FPL. O azidoálcool isolado foi reduzido ao (-)-(R)-2-amino-1-feniletanol, para comparar a sua pureza óptica com valores da literatura.

Foram estudados compostos do tipo $PhCOCXCH_3$, onde X = O (94), NOH (93), $NOCOCH_3$ (95), $NOCH_2Bz$ (96). Com (93) e utilizando-se o método 1 (crisotila-FPI), recuperou-se a cetona de partida. Com (94) e utilizando-se o método 1 isolou-se o álcool

(-)-(S)-2-hidroxi-1-fenilpropanona (97) (27-31%) e (-)-(1R,2S)-1-fenilpropano-1,2-diol (98) (5%). O reuso só é possível após o FPI permanecer em repouso em geladeira com açúcar e solução KCl 2%. Quando utilizou-se o método 2 obteve-se o diol, (98), (15-47%) e o álcool,(97) (1-5%). Quando utiliza-se crisotila como suporte, os rendimentos químicos são menores em relação ao K10, mas os rendimentos ópticos são maiores. O composto (95) é hidrolisado para (93) com crisotila-FPI. O composto (96) foi reduzido ao O-benzil-1-fenil-1-hidroxi-2-oxima-2-propanona com 23% de rendimento.

A pureza óptica dos compostos isolados foi determinada por comparação de valores de rotaçào óptica específica.

ABSTRACT

We have studied the stereospecific reduction of phenylketones by IMBY (immobilized baker's yeast) that not only gives alcohols with high optical yields but can be reused in further reactions after regeneration of the cofator NADH. The chiral alcohols are valuable intermediates for pharmaceuticals synthesis. We have used chrysotile and montmorillonite as supports and two methods for the culture medium: method 1 - IMBY and water; method 2 - IMBY, sugar and 2% KCl solution (IMBY/sugar 1:1).

We have reduced $PhCOCH_2X$ compounds where X=Cl or N_3. The α-chloroacetophenone was reduced (chrysotile-IMBY) to the corresponding (R)-chlorohydrin with chemical and optical yields very close to those obtained with FBY (free baker's yeast). The subsequent reuse of the catalyst was possible only with method 2 and gave the (S)-chlorohydrin. The IMBY was not active for further recycle after the 3rd cicle. By this methodology is possible to efficiently control the stereochemistry of the reduction of the ketones.

The reduction of α-azidoacetophenone with montmorillonite K10-IMBY gave higher chemical yields of the azidoalcohol than those obtained with FBY. The isoladed azidoalcohol was reduced to (-)-(R)-2-amino-1-phenylethanol in order to compare its optical purity with the literature value.

Compouds of the type $PhCOCXCH_3$ where X=O (94), NOH (93), $NOCOCH_3$ (95) and $NOCH_2Bz$ (96) were also studied. With (93) and using method 1 (chrysotile-IMBY), we have recover the starting ketone; with (94) and method 1 we have isolated

(-)-(S)-2-hydroxi-1-phenylpropanone (97) (in 27-31% yield) and (-)-(1R,2S)-1-phenyl-1,2-propanediol (98) (5%). The reuse was only achieved after leaving the IMBY overnight in the refrigerator with sugar and a 2% solution of KCl. Using method 2 we have obtained the diol (98) (15-47%) and the alcohol (97) (1-5%). With chrysotile as support, the chemical yields were lower than those with K10 but the optical yields were higher. Compound (95) was hydrolised to (93) when reacted with (chrysotile-IMBY). The compound (96) was reduced to O-benzil-1-hydroxi-1-phenyl-2-oxime-2-propanone in 23% yield.

The optical purity of the isoladed compouds was determinaded by comparison with the values of especific optical rotation.

CAPÍTULO 1 - INTRODUÇÃO

1.1. Sistemas microbiológicos e/ou enzimáticos.

Durante os últimos dez anos, as reações bioquímicas realizadas por microorganismos ou catalisadas por enzimas, têm sido extensivamente efetuadas do ponto de vista da química orgânica sintética.[1]

A redução assimétrica de compostos carbonílicos por microorganismos é agora bem reconhecida como um instrumento para a preparação de álcoois quirais, que são utilizados na preparação de produtos farmacêuticos, química fina, aditivos para alimentos e blocos quirais para síntese de produtos químicos mais complexos. Um simples microorganismo contendo um número significativo de oxidoredutases, pode servir de intermediário na redução de uma variedade de cetonas artificiais, para produzir álcoois quirais com alto grau de pureza ótica.[2]

A catálise assimétrica ocorre quando um catalisador quiral (enzima) e um substrato pró-quiral (cetona A) formam estados de transição diastereoméricos que diferem em energia; a magnitude dessa diferença de energia determina o excesso enantiomérico (e.e. = [R] - [S]/ [R] + [S]).[2] (figura 1)

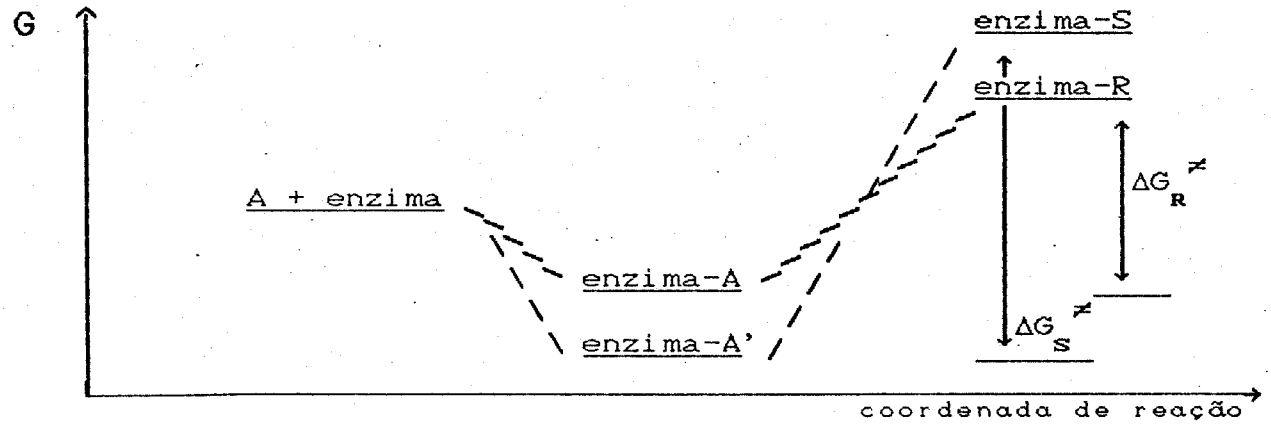


Figura 1 - Gráfico de energia[2]

Considere uma cetona pró-quiral com faces enantiotópicas Re e Si; se a probabilidade da enzima complexar com ambas as faces é a mesma, neste caso, e o álcool resultante será obtido como um racemato. A alta enantioseletividade é obtida quando a enzima é capaz de discriminar entre as duas faces enantiotópicas. Essa enantioseletividade é geralmente expressa em excesso enantiomérico (e.e.).[2]

A regra de Prelog nos diz que uma enzima é capaz de diferenciar entre as duas faces do substrato quando a cetona tiver um grupo grande (R_G) e um grupo pequeno (R_P) ligados à carbonila.[2,3]

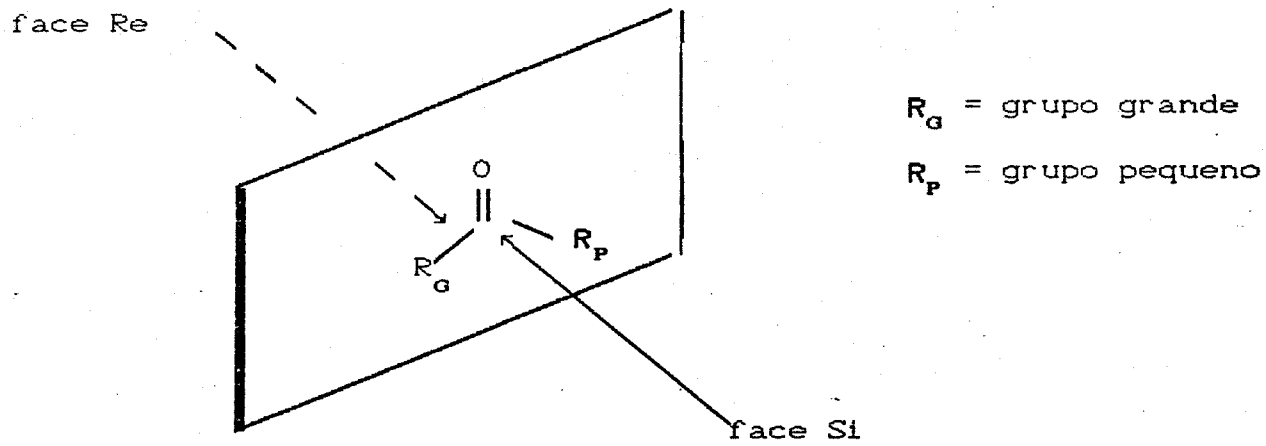


Figura 2 - Regra de Prelog[2,3]

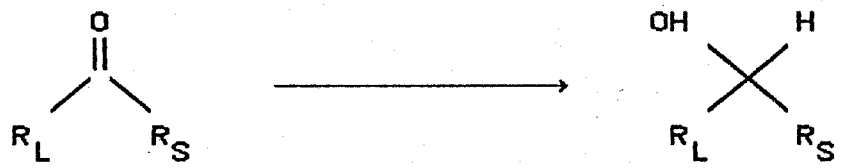


Figura 3 - Reação de redução de uma cetona[2]

A redução de uma cetona pró-quiral por uma oxidoredutase geralmente requer a presença de cofatores como NADH ou NADPH, que fornecem o equivalente de redução na reação. Assumindo que NADH é usado como coenzima temos:[2]

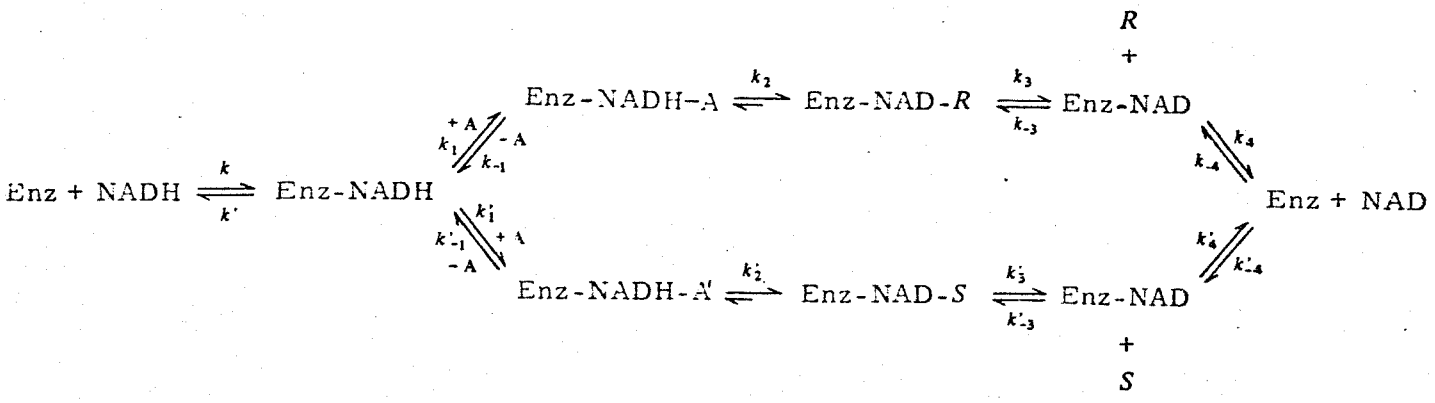


Figura 4 - Cinética de Reação[2]

As redutases que têm sido empregadas, portanto, requerem a oxidação do NADH ou do NADPH e, utilizam centenas de unidades por mol de cetona. Os nucleotídeos são usados em quantidades catalíticas e devem portanto ser regenerados[4], já que o custo destes cofatores é extremamente alto:[5]

NADP US$ 472,50/5g extraído de fermento com 98% de pureza

NAD US$ 94,75/5g extraído de fermento com 98% de pureza

O caminho mais eficiente de abaixar o custo efetivo dos cofatores é desenvolver procedimentos que tornem possível a sua regeneração (de reagentes baratos) *in situ*.[6]

Entre as considerações que determinam a vantagem de uma sequência sintética que envolve uma etapa enzimática requerendo cofator estão:[6]

1) O caráter da reação usada para regeneração do cofator. O reagente A deve ser disponível, barato e estável. O produto B não deve complicar o trabalho de isolamento do produto; a constante de equilíbrio para a reação $A + X \rightleftharpoons B + Y$ deve ser bem deslocada para a direita; as enzimas usadas (se alguma) devem ter baixo custo, alta estabilidade, e alta atividade específica (onde X e Y são os cofatores a ser regenerado e regenerado, respectivamente);

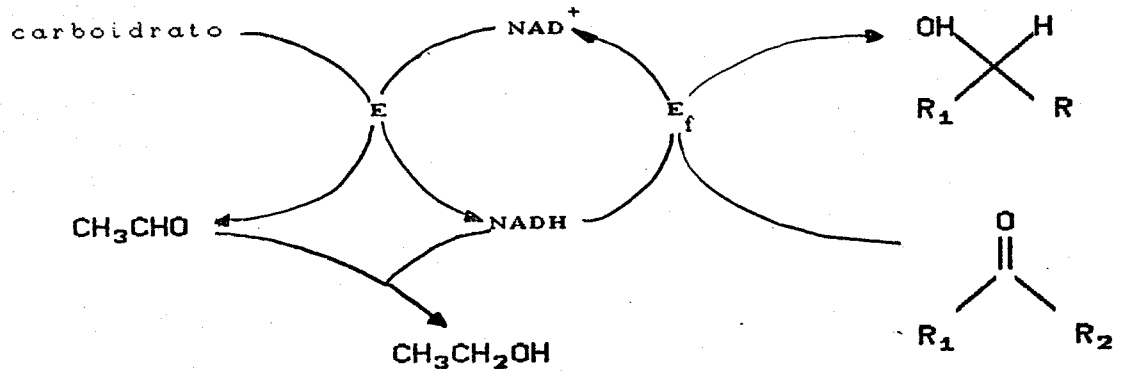
2) A estabilidade intrínsica dos cofatores X e Y sob as condições de reação;

3) O custo original do cofator;

4) A simplicidade operacional do esquema de regeneração.

A redução biocatalítica pode ser diferenciada de acordo com a natureza do doador e a rota de transporte de elétron do doador ao substrato.[4]

1) A rota mais usada é a que emprega o carboidrato como doador de elétrons:[4]

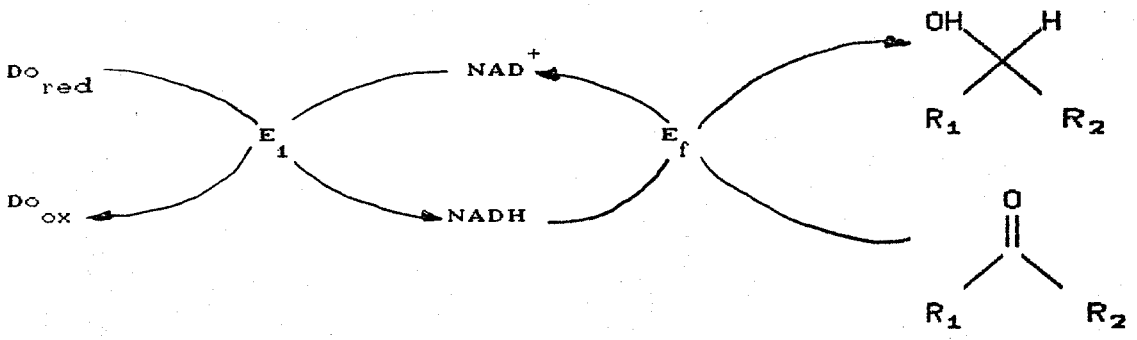


onde E_f = enzima "final"

Este deve submeter-se a 5 ou 6 reações consecutivas catalisadas por enzimas antes do NADH ser formado.[4] Dentre elas, duas importantes são a oxidação de glucose-6-fosfato por glucose-6-fosfato-desidrogenase seguida por oxidação de 6-fosfogluconato por 6-fosfogluconato-desidrogenase.[1]

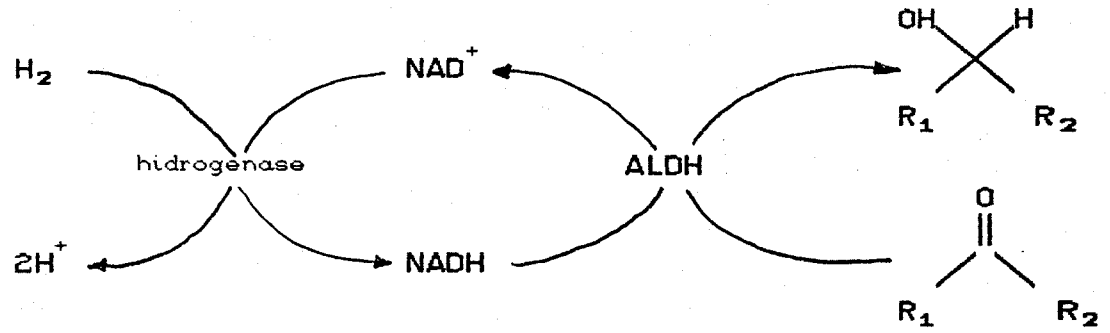
Nesta rota ocorre a competição do acetaldeído com a Ef da redução equivalente, e a formação do etanol é usualmente o principal produto de reação. Para cada mol de produto produzido 200-2000 mol de etanol são formados.[4]

2)



Onde o doador de elétron converte $NAD^+ \longrightarrow$ NADH numa única etapa irreversível, então sendo consumido na reação catalisada por E_f, da redução da cetona.[4]

3)

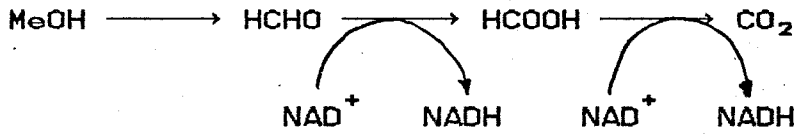


onde ALDH : álcool desidrogenase de *Thermoanaerobium brockii*

hidrogenase : isolada de *Alcaligenes eutrophius*

A reação é feita em tampão Tris-HCl (pH 8,0), e o H_2 é introduzido no sistema sob uma pressão de 300 Torr.[7]

As reações envolvendo a oxidação do metanol a CO_2 por microorganismos são consideradas um sistema muito útil para esta regeneração.[1]



É um processo vantajoso pela eliminação do CO_2, não causando problemas no isolamento do produto formado.[1]

Há dois tipos de reações utilizando microorganismos: transformação microbiológica e fermentação.[1]

Tabela 1 - Comparação dos processos microbiológicos[1]

	TRANSFORMAÇÃO MICROBIOLÓGICA	FERMENTAÇÃO
MICROORGANISMO	crescimento, descanso ou tratamento de células	crescimento de células
REAÇÃO	catalítica simples (uma ou várias etapas)	processo de vida (várias etapas)
TEMPO DE REAÇÃO	pequeno	grande
MATERIAL DE PARTIDA	substratos diversos	inexpressiva fonte de C e N
PRODUTO	natural ou não	natural
CONC. DE PROD.	alta	baixa
ISOL. DE PROD.	fácil	tedioso

Uma transformação microbiológica pode ser exemplificada pela redução enzimática de uma cetona (uma só etapa e requer uma enzima) e, a fermentação pela transformação do açúcar em etanol,

que são cinco ou seis reações consecutivas, catalizadas por enzimas diferentes. A fermentação é considerada ser um método biológico melhor, porque é o resultado do processo de vida efetivo de um microorganismo. A alta seletividade é uma das características mais importantes da catálise enzimática e, significa que reações secundárias indesejadas não são envolvidas quando enzimas puras são usadas. O uso de enzimas puras, entretanto, é sempre desvantajoso por causa da sua limitada utilidade e instabilidade, e também por razões econômicas.[4]

Uma desvantagem do uso de células intactas para operações em escala de laboratório é que o crescimento estéril de células as vezes é necessário e o processo de isolamento (do produto) é longo e não muito limpo, devido à separação do produto da imensa quantidade de biomassa; este processo é muitas vezes complicado por reações laterais que interferem, ou até dominam a transformação desejada.[8]

Uma complicação maior no uso de células intactas para as reduções catalíticas de cetona é que o processo é sempre parcialmente enantioseletivo. Este pode ser interpretado por duas maneiras: 1) A cetona pode ser reduzida por uma oxiredutase simples que interage com ambas as faces do grupo carbonila para formar dois estados de transição diastereoméricos, um dos quais é mais favorecido que o outro. 2) Duas ou mais oxidoredutases competindo com células intactas podem gerar álcoois de configurações opostas a diferentes velocidades (dependendo de V_{max} e K_M). Estas duas possibilidades devem ser prontamente distinguidas uma da outra por condução da redução de concentrações diferentes do substrato. No caso 1, a enantiseletividade é independente das mudanças na concentração do sustrato, e no caso 2

não é.[2]

Podemos utilizar sistemas complexos de enzimas, ou enzimas misturadas, algumas das quais podendo causar reações indesejadas. Tratamento físico ou químico como aquecimento, mudança de pH e adição de detergentes e solventes orgânicos podem levar a uma desnaturação das enzimas indesejadas ou podem ser usados inibidores específicos.[1] Em outros casos, podemos combinar dois microorganismos para obtermos a redução desejada.[4]

As enzimas requerem condições amenas de reação, diferentes das reações catalíticas normais, tais como pressão atmosférica, temperatura entre 20° a 40° C e valores de pH em torno de 7. Isto porque as suas estruturas são mantidas, por exemplo, por forças de van der Waals e rede de ligações de hidrogênio.[1]

A alta seletividade da catálise enzimática, que é uma das características mais importantes que fazem as enzimas promissoras como catalisadores em química sintética, pode também ser uma desvantagem, porque a seletividade implica em limitações. Por exemplo, platina é muito superior à redutase na habilidade de reduzir uma grande variedade de compostos.[1]

1.2. *Saccharomyces cerevisiae*

O uso de fermento de pão como um reagente em síntese tem sido aplicado desde o começo do século.[9] A ação de redução do fermento, *Saccharomyces cerevisiae*, foi primeiro observada por Dumas[10] em 1874. Ele notou que, adição de um pó fino de enxofre a uma suspensão de fermento fresco em uma solução de açúcar, liberou sulfito de hidrôgenio.[8,10]

Os objetivos gerais de biotransformações são: resolução de racematos, conversão seletiva de grupos funcionais entre vários

grupos de reatividade similares, introdução de um centro quiral, e funcionalização de um certo carbono não ativado.[8]

A redução de furfural a álcool furfurílico sob condições anaeróbicas de fermentação pelo método de fermento vivo, foi a primeira redução fitoquímica de uma molécula orgânica descrita na literatura.[8] Numerosas biotransformações microbiais ou enzimáticas, bioconversões, biodegradações e, fermentações seguiram e, como Chaleff[11] apontou, o excesso inicial de entusiasmo que invariavelmente acompanha o começo de um novo campo, as biotransformações foram aclamadas como uma panacéia que deveria substituir definitivamente a química orgânica tradicional. Mas a substituição não é necessária, e sim um sinergismo, onde biotransformações devem ser empregadas quando uma dada etapa de reação não é facilmente acompanhada por métodos químicos convencionais.[8]

Químicos orgânicos buscando uma transformação estereoseletiva, que eventualmente levará a intermediários quirais em sínteses de compostos enantiomericamente puros, preferem fermento de pão entre os microorganismos. A razão para esta escolha é que fermento de pão é barato, versátil e seu crescimento não requer a assistência de microbiologistas.[9] (produção mundial 600.000 toneladas/ano).[8]

A maneira e as quantidades relativas com que ele é usado na fermentação de substratos não convencionais, permite aos químicos orgânicos sintéticos o considerarem como um reagente e não como um catalisador.[9]

Nos anos 50, mais de 160 referências de trabalhos científicos nesta área foram publicados. Devida à precisão limitada de métodos analíticos, a informação de pureza enantiomérica de produtos foi

incompleta.[9]

O crescimento do interesse em sínteses de moléculas quirais em forma enantiomericamente puras tem promovido um grande desenvolvimento em biocatálise, e transformações utilizando fermento tem atraído novo interesse.[9]

Numa das publicações dos anos 70, utiliza fermento atuando em transformações, para sínteses de compostos enantiomericamente puros, na elucidação de estruturas e fixação estereoquímica de um produto natural. Desde então, o número de trabalhos científicos destinados à transformações com fermento, de pequenas moléculas orgânicas, tem crescido enormemente.[9]

Das mais de 1600 enzimas listadas no Handbook de enzimas, várias centenas tem sido purificadas de fermento e, provavelmente, mais estão presentes no microorganismo. Se considerarmos que a maior parte destas enzimas manifesta sua atividade em água dentro de uma faixa de pH entre 5 e 7,5, é evidente que, sob "condições normais de fermentação", o fermento de pão manifeste uma grande capacidade química.[9]

Isto, é claro, é bom e mau ao mesmo tempo. Na verdade, argumentos comuns contra o uso de fermento, comparados às transformações catalisadas por enzimas purificadas, são que reações envolvendo fermento são "intrinsicamente sujas", o que é geralmente verdade: o meio aquoso conterá a massa celular, nutrientes, metabólitos usuais e o substrato que será transformado sempre a mais de um produto.[9]

O isolamento do produto desejado e a recuperação do material de partida, que não reagiu, pode não ser simples ou quantitativo, e uma purificação geralmente é necessária. Em vários casos, contudo, conversões muito altas são publicadas e uma metodologia

apropriada de extração, eventualmente leva a um grande quantidade de produto.[9]

Se a transformação microbiológica é aplicada a materiais de partida baratos, em um estágio prematuro de um processo sintético, a falta de eficiência do processo enzimático não influenciará a conveniência na produção de um pequeno intermediário sintético, sempre muito funcionalizado, portanto muito valioso, com alto excesso enantiomérico.[9]

Um segundo argumento comum é que as reações são sempre pouco reprodutíveis. Porém, isto se refere a uma reação particular, a redução de ésteres de ácido acetoacético, onde tem sido mostrado que a baixa reprodutibilidade está relacionada com variações menores no procedimento experimental, não considerada por diferentes autores, mas responsável por profundas variações no curso da reação; portanto, o ponto importante neste caso particular é seletividade, e não, reprodutibilidade.[9]

De fato, quase todas as publicações simultâneas com resultados muito similares, realizadas com diferentes marcas de fermento comercial em diferentes países, ou estudos de reprodutibilidade nos mesmos laboratórios, geralmente mostram diferenças de uns poucos por cento.[9]

Os diferentes resultados obtidos em um grande número de experimentos demonstram que os fundamentos bioquímicos de reduções não são sempre bem racionalizados, e que os pesquisadores, as vezes, não estão cientes do fato de que o fermento usado não é sempre o mesmo. Ainda que se o mesmo tipo ou marca é utilizado, o comportamento do fermento em reduções pode depender fortemente das condições de cultura (o meio, a temperatura e o estágio de crescimento).[4]

Uma série de outras habilidades continuam sendo atribuídas ao fermento, quando novos substratos não convencionais são submetidos à sua ação. O conhecimento dos procedimentos enzimáticos tem aumentado muito; substratos nestes meios, podem sofrer muitas transformações paralelas, ao lado daquela desejada. Portanto, o problema de seletividade, dirigindo a capacidade catalítica do fermento, tem se tornado o maior problema; nos últimos anos, várias publicações neste campo tem contribuído para o entendimento da seletividade dos processos.[9]

Desde que a maioria das enzimas ativas do fermento demonstrarão suas propriedades sob condições similares, é a natureza do substrato que dirige a reação em uma ou em outra direção; modificações na estrutura do substrato tem aparecido como a maior ferramenta para influenciar a quimio e enantioseletividade, embora outros parâmetros também afetem o curso das biotransformações: pH, a natureza dos nutrientes, concentração do subtrato e, razão massa celular/substrato, imobilização das células, ação irreversível de inibidores de enzimas, condições de crescimento que desenvolvem habilidades especiais, pré-tratamento da massa celular, etc.[9]

O conhecimento das características do fermento de pão e sua atividade específica é muito limitada, desde que somente em poucos casos, a atividade de enzimas purificadas do fermento tem sido comparadas com aquela observada do sistema de células intactas. Informações sobre substratos naturais do fermento, é de grande importância na seleção de aspectos estruturais de substratos não naturais.[9]

Saccharomyces cerevisiae é o biocatalizador mais comumente utilizado nas reduções baseado na rota usando carboidratos ou

etanol para regenerar cofatores (ítem 1.1).[4]

O etanol deve ser, talvez, um doador melhor de elétrons que a glicose para o fermento de pão.[4] Experimentos têm sido realizados utilizando-se etanol ao invés de glicose, e notou-se que apenas a velocidade da reação diminui um pouco, de 8 para 10 horas, até toda a cetona ser consumida.[12]

Além disso, tem sido sugerido que cetonas podem ser reduzidas por fermento, sem adição de carboidratos ou qualquer outro doador de elétrons, pelo uso do próprio material existente nas células em grande quantidade (substrato endógeno).[4]

Mas o etanol pode se tornar altamente tóxico ao fermento gerando células mutantes. A baixas concentrações deste, a alteração nas razões de NAD/NADH e concentração de acetaldeído não é suficiente para causar inibição.[13]

A viabilidade da reação se dá quando a concentração do etanol está abaixo de 100 g/L de solução; acima disso, os efeitos inibitórios se tornam importantes.[13]

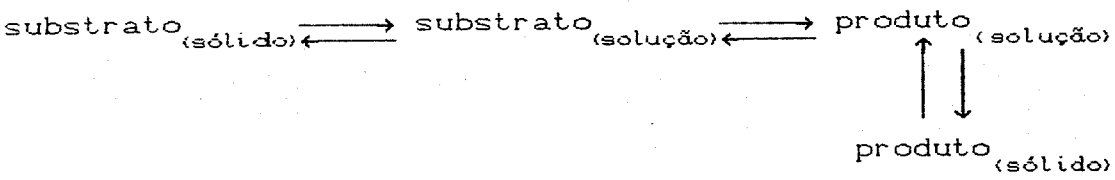
Em conclusão, crescimento aeróbico do fermento em etanol ou em glicose na presença do etanol, é controlado pelo etanol como um inibidor específico de enzima e pelas consequências do metabolismo do etanol, alterando as razões de NAD/NADH, e elevando os níveis de ácido acético e acetaldeído.[13]

1.3. Algumas considerações sobre substratos

Teoricamente, qualquer substrato pode ser usado para uma transformação microbiológica quando a molécula do substrato entra em contato com a enzima. Até mesmo gases como metano são substratos efetivos quando borbulhados em um meio reacional. Um substrato deve ser solúvel no meio e também ser capaz de passar

através da membrana da célula, a não ser que enzimas livres de células estejam sendo usadas como catalisadores.[1,8]

O substrato é geralmente adicionado ao meio reacional puro ou como uma solução concentrada. Somente o substrato dissolvido é convertido, portanto, substratos ligeiramente solúveis devem ser primeiramente dissolvidos e, depois da conversão, o produto pode cristalizar da solução:[1,8]



Os substratos podem também ser dissolvidos em água-solvente orgânico miscível. Os álcoois inferiores, acetona, dimetilformamida e dimetil sulfóxido são solventes apropriados. Surfactantes podem também ser usados para dispersar o substrato. A combinação de água-solvente orgânico miscível e um surfactante deve ter alguma vantagem. Em alguns casos, modificações químicas do substrato podem aumentar sua solubilidade.[1,8]

Quando o substrato não passa através da membrana da célula, é necessário tratá-la para promover a permeabilidade. A preparação de enzimas livres de células ou enzimas purificadas, é favorável para eliminação da barreira da permeabilidade.[1,8]

Se o substrato não se ajusta a conversão desejada, algumas modificações químicas devem ser consideradas. Adição, variação ou remoção de um grupo protetor, ou modificação de um grupo funcional na molécula do substrato, muitas vezes fazem-no interagir com a enzima, mais eficientemente. Além disso, essas modificações podem proteger o substrato de uma reação lateral indesejada, ou de sua

degradação.[1,8]

1.3.1. Redução de cetonas

Redução microbiológica e enantioseletiva de cetonas é agora reconhecida como um método de grande valor para a preparação de álcoois quirais.[2]

Essas reduções por sistemas enzima-coenzima, e a redução enantioseletiva assimétrica de compostos carbonílicos por reagentes opticamente ativos (ex: reagentes de Grignard), exibem muitas similaridades interessantes.[14]

Embora ambas reduções deem produtos opticamente ativos, as reações dos sistemas químicos tem produzido compostos opticamente menos puros, enquanto aquelas dos processos enzimáticos, utilizando substratos naturais, tem fornecido produtos opticamente mais puros, como tem sido demonstrado no caso clássico do 1-deuteroacetaldeído.[14]

A redutase específica para NADPH-desidroxicetona, purificada, extraída de *Mucor javanicus*, uma enzima que transfere hidrogênio exclusivamente à face Si do grupo carbonila de muitos substratos, tem sido investigada extensivamente pela escola de Prelog.[3] A estrutura única do sítio ativo desta enzima permite não somente uma ampla especificidade a substratos, mas também alta enantioseletividade.[2]

A velocidade da reação é aumentada significativamente quando o comprimento da cadeia alquila é diminuído. Análise de produto demonstrou que, com a exceção de 2-butanona, onde foi obtido o álcool racêmico , os homólogos mais altos foram reduzidos com alta enantioseletividade (*e.e.*=0,94) para os (R)-álcoois: (R)-2-pentanol, (R)-2-hexanol, e (R)-2-octanol. Disto, foi

concluído que o grupo etila de 2-butanona é muito pequeno para criar a interação hidrofóbica necessária. Por isso, 2-butanona é atacada pelo hidrogênio em ambas faces Re e Si para dar o 2-butanol racêmico.[2]

O primeiro estudo sistemático do curso estereoquímico da redução de cetonas acíclicas por fermento de pão foi publicada por MacLeod[14] e colaboradores. Eles examinaram a redução de uma série de cetonas com todas as combinações de substituintes: metila, etila, n-propila, n-butila, e fenila. Com a exceção do álcool derivado de butil-etil-cetona, onde a configuração R é preferida, os álcoois secundários possuem a configuração S em excesso.[2]

As cetonas mais impedidas, incluindo n-butil-n-propil-cetona, t-butil-metil-cetona, isobutil-isopropil-cetona, e n-amil-fenil-cetona não foram reduzidas por fermento. Resultados similares foram obtidos por outros grupos.[2]

Sih e colaboradores[15] encontraram que na redução do éster 4-cloro-3-oxibutirato com fermento de pão, o valor de *e.e.* é uma função do tamanho do grupo éster. O éster metílico é hidrogenado ao enantiômero S com um valor de *e.e.* de 65%, ao passo que o éster octilílico é convertido ao enantiomêro R com um valor de *e.e.* de 97%. Para outros resíduos alquilas do tipo $(CH_2)nH$ (n=2-7), os valores de *e.e.* situam-se entre estes.[4]

Estes resultados sugerem que o curso estereoquímico da redução segue, em contraste com o que ocorre com a redutase desidroxiacetona de *Mucor javanicus*, via transferência de hidrogênio à face Re da cetona proquiral.[2]

Uma tendência estereoquímica similar é observada em outras reduções microbiológicas de aril-α-halometil-cetonas, que produzem

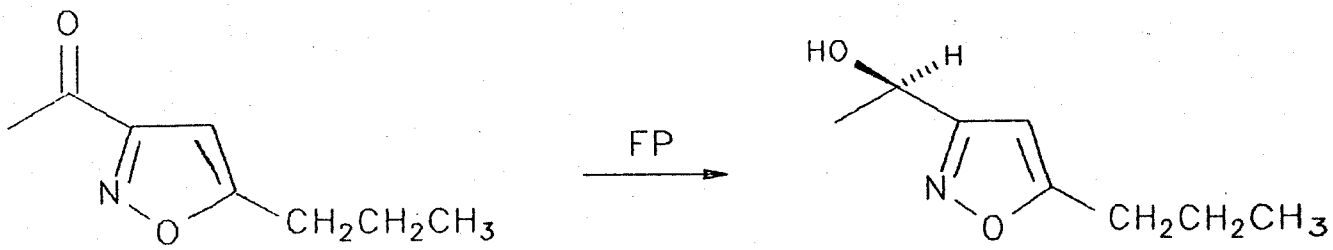
(R)-haloidrinas (e.e.≥0,80). Assim, parece que grupos metila monossubstituídos são efetivamente menores que um anel fenila. Aparentemente, a presença de um heteroátomo no sistema aromático, não influencia no curso estereoquímico da redução.[2]

A lista de compostos carbonílicos que podem ser reduzidos por fermento é continuamente crescente e, em muitos casos, o resultado estereoquímico da bioredução é bem explicada pela regra de Prelog.[3] Entretanto, umas poucas exceções tem sido encontradas e existem, em alguns exemplos, explicações que assumem que o substrato é reduzido por uma álcool desidrogenase que não segue a regra acima.[16]

Várias resenhas foram divulgadas sobre reduções utilizando fermento de pão em sínteses orgânicas. Nestes trabalhos, são citadas várias classes de compostos que podem ser reduzidos. Dentre elas, podemos destacar:[8,9]

A) Redução de compostos monocarbonílicos:[8,9]

-cetonas cíclicas, cetonas bi e policíclicas , cetonas alifáticas, moléculas contendo enxofre, cetonas α-heterocíclicas substituídas e compostos nitro-carbonílicos:



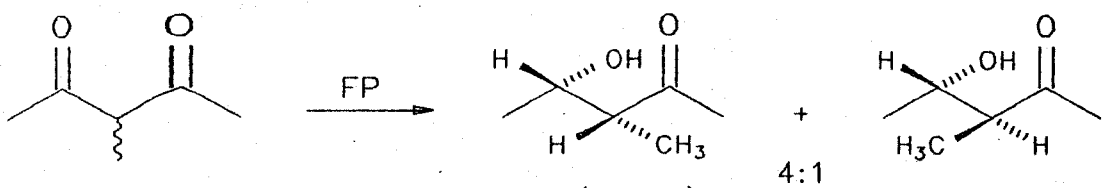
1

2 (R)

78%;e.e.=100%

B) Redução de compostos dicarbonílicos:[8,9]

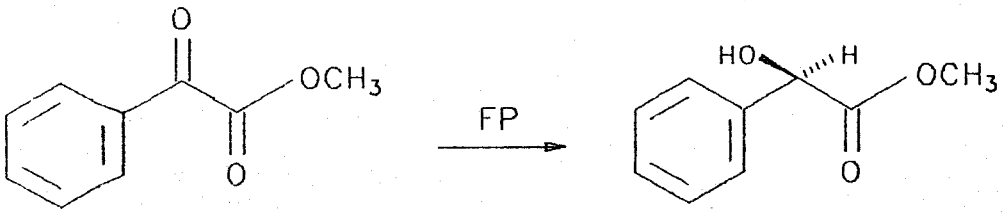
-dicetonas cíclicas (1,2-; 1,3- e 1,4-dicetonas) e acíclicas (1 ,2-; 1,3- e 1,4-dicetonas):



3 → 4 (3R,4S) + 5 (3S,4S)

30%;e.e.=95%

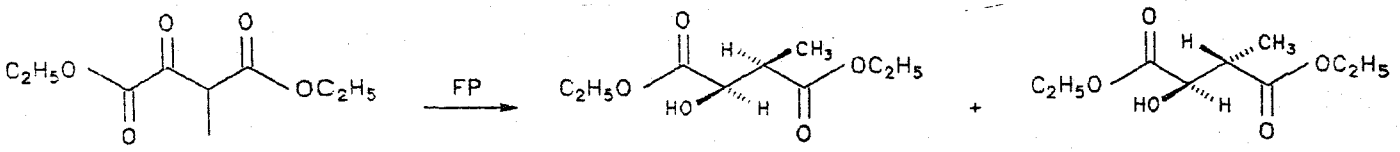
C) Redução de α-ceto ésteres:[8,9]



6 → 7 (R)

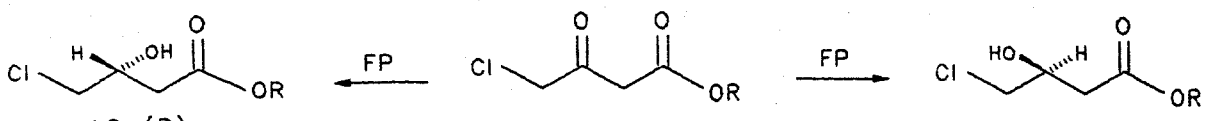
59%;e.e.=100%

D) Redução de α,γ-diceto éster e ceto α,γ-diésteres:[8,9]



8 → 9 syn (2R,3R) e.e.=79% + 10 anti (2S,3R) e.e.=31%

E) Redução de β-ceto ésteres, com o ceto grupo fazendo parte do anel e alifáticos:[8,9]

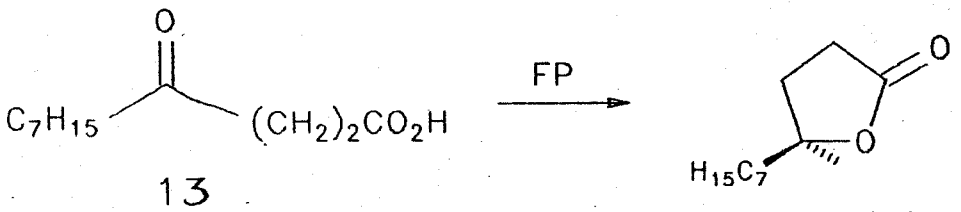


12 (R) b) 70%;e.e.=97%

11 a) R=CH_3 b) R=nC_8H_{17} c) R=C_2H_5

12 (S) a) e.e.=65% c) 30%;e.e.=56%

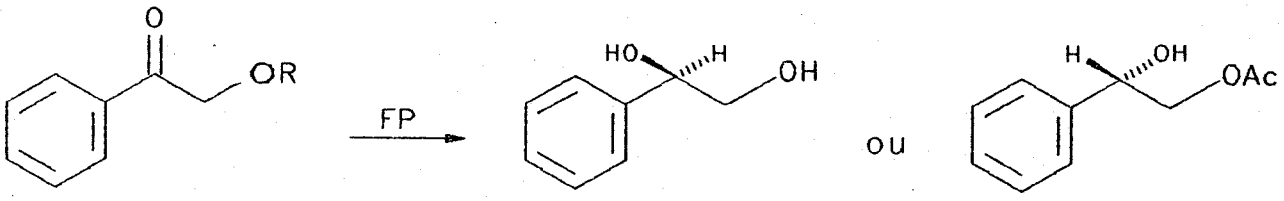
F) Redução de γ- e δ- ceto ácidos e ésteres:[8,9]



13 → 14 (R)

72-90%;e.e.>99%

G) Redução de α-hidroxi cetonas (e/ou aldeídos):[9]

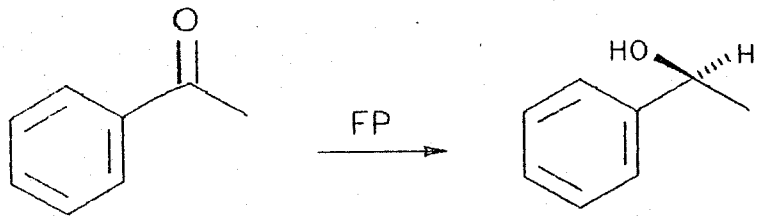


15 a) R=H
b) R=Ac

16 (R) a) 85%;e.e.=92%

16 (S) b) 70%;e.e.=94%

H) Redução de cetonas aromáticas:[9]



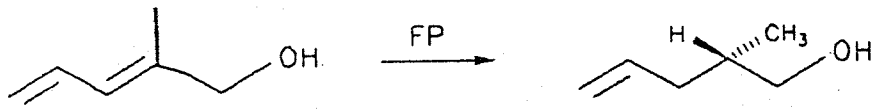
17 → 18 (S)

96%;e.e.=100%

1.3.2. Outras reduções e reações diversas

1.3.2.1. Redução de ligações duplas C=C:[9,17]

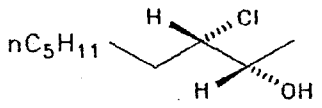
Fermento de pão tem sido usado para reduções estereoespecíficas de ligações duplas "ativadas". Estas ativações podem ser feitas por grupos nitro, ésteres, álcoois, alquilas, halogênios, fenilas, etc.



19 20 (S)

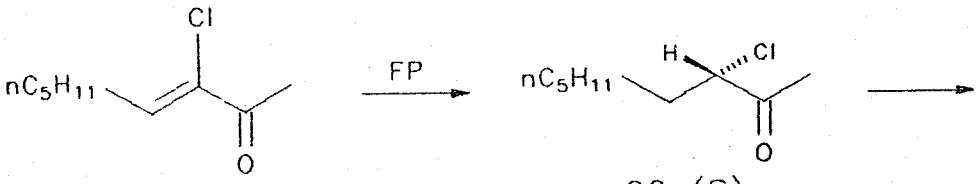
20%;e.e.=100%

1.3.2.2. Reduções de cetonas α,β-insaturadas:[9,18]



23 syn (2S,3S)

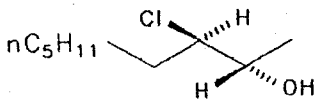
e.e.>98%



21 22 (S)

28%;e.e.=82%

+



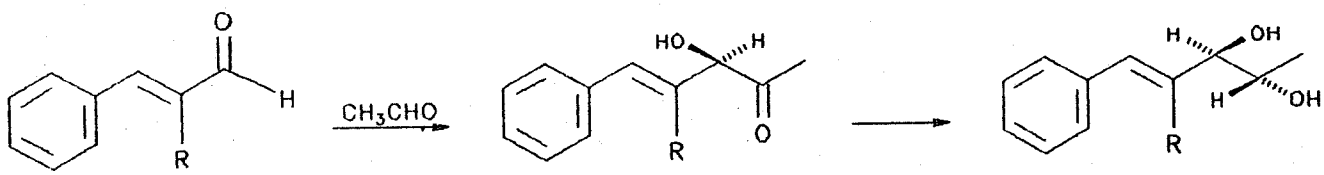
24 anti (2S,3R)

e.e>98%

61%,syn:anti (8,1:1)

1.3.2.3. Formação de ligação **C–C**:[8,9]

A) Condensação Aldólica e reduções de compostos α,β-insaturados



25 26 (R) 27 (3R,4S)

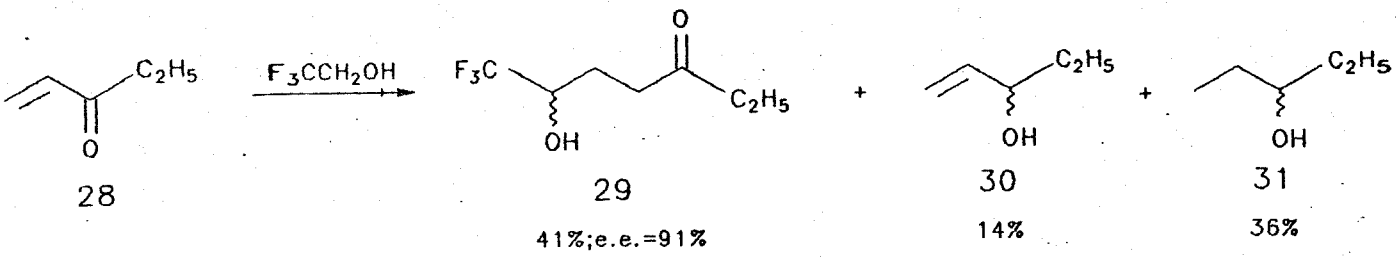
a) R=H

b) R=CH_3

a) 25%;e.e.=85%

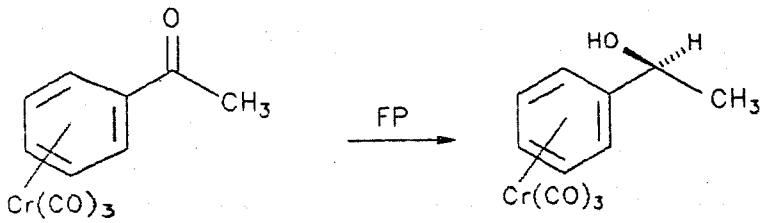
b) 25%;e.e.=95%

B) Descarboxilação (formação de ligação **C–C** através de adição tipo Michael):



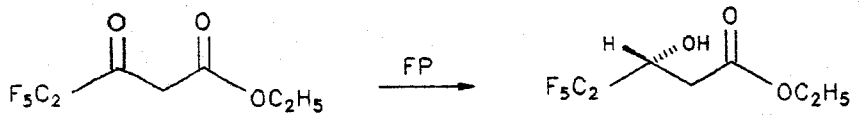
28 — 29 (41%; e.e.=91%) + 30 (14%) + 31 (36%)

1.3.2.4. Redução de compostos organometálicos:[8]



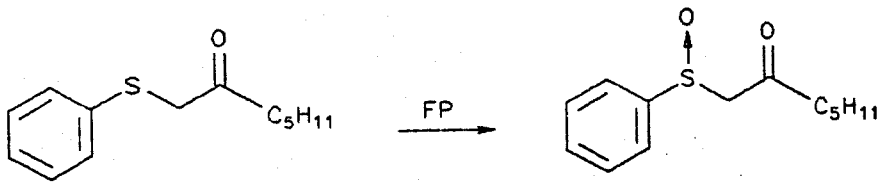
32 — 33 (S) (96%; e.e.=99%)

1.3.2.5. Redução de compostos contendo flúor (cetonas e ceto-ésteres):[8,9]



34 — 35 (R) (87%; e.e.=94%)

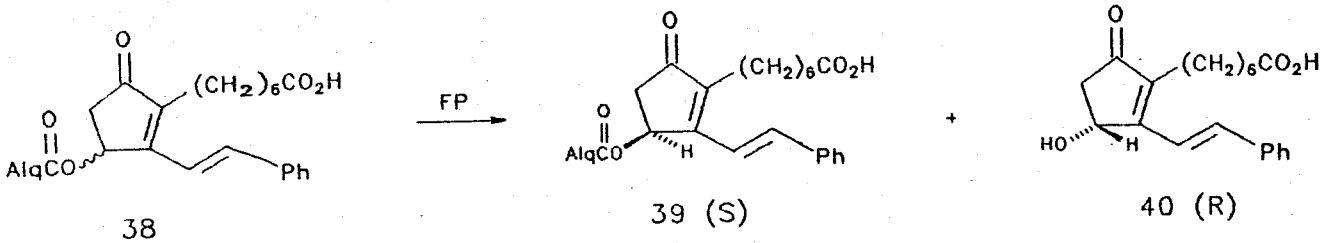
1.3.2.6. Oxidações:[8]



36 — 37 (5% rac)

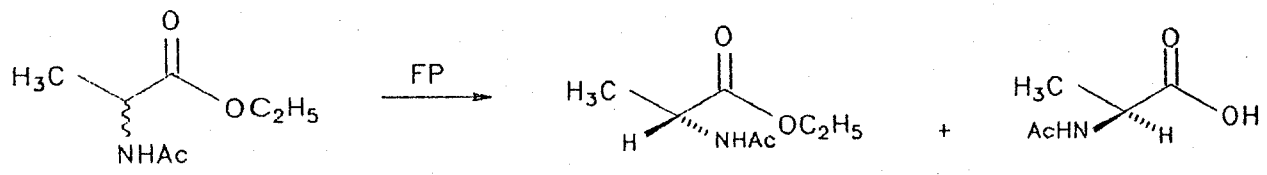
1.3.2.7. Hidrólise de ésteres:[8]

A) Cetonas:



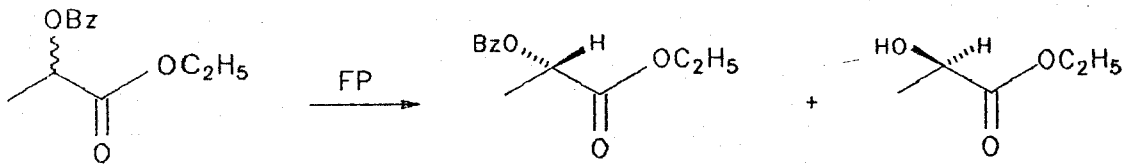
38 | 39 (S) | 40 (R)

B) Ésteres de amino ácidos:



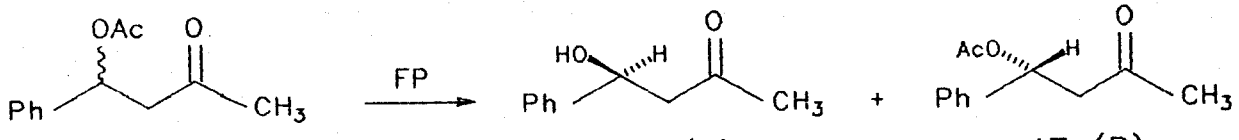
41 | 42 (R) 47%;e.e.=100% | 42' não foi isolado

C) Outros ésteres carboxílicos α-substituídos:



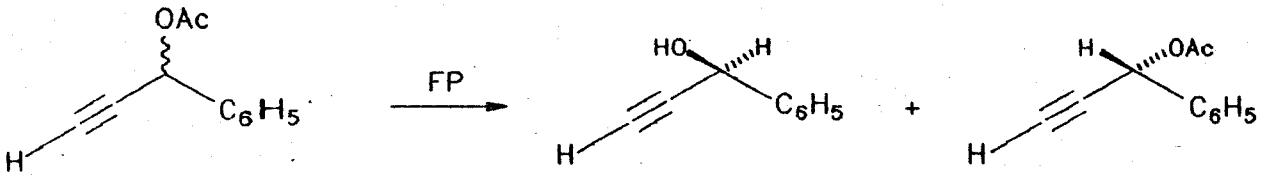
43 | 44 (S) 27%;e.e.=79% | 44' não foi isolado

D) Ésteres aciloxi (e/ou lactonas):



45 | 46 (S) 31%;e.e.=81% | 47 (R) 40%;e.e.=31%

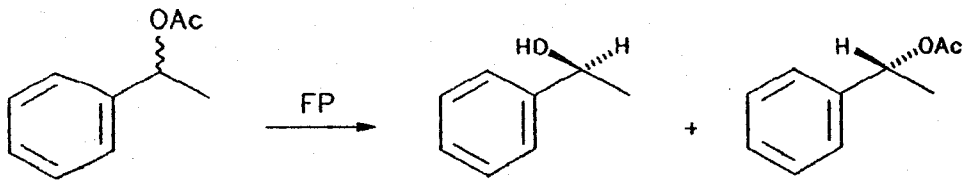
E) Acetatos de Alquinol:



48 | 49 | 50

14%;e.e.=86% | 45%;e.e.=64%

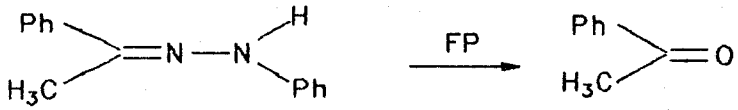
F) Hidrólise mista:



51 | 52 (S) | 53 (R)

20%;e.e.=20% | 45%;e.e.=3%

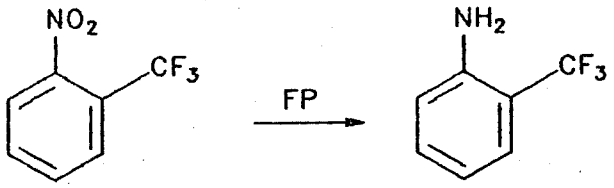
1.3.2.8. Hidrólise de hidrazona:[19]



54 | 55

97%

1.3.2.9. Redução de nitro compostos aromáticos:[20]



56 | 57

66%

1.3.2.10. Reações feitas com métodos não convencionais para aumentar o rendimento químico e *e.e.*

A) Utilizando ultrassom

Em um experimento feito para síntese de esteróides utilizando enzimas, foi analisado o efeito da ultrassonificação da suspensão de fermento de pão e tampão fosfato, antes de adicionar o substrato. O estudo realizado mostra que até duas horas de ultrassonificação da suspensão, a porcentagem de conversão relativa aumenta de 19% (sem ultrassom) a 100%. Após duas horas a porcentagem de conversão cai para 82%.[21]

Isto sugere que o efeito do ultrassom está, provavelmente, associado à facilidade da difusão do substrato, por remoção da membrana obstruidora exterior.[21]

B) Utilização de tubo de diálise

Um experimento foi realizado utilizando-se um tubo de diálise, onde o meio fermentativo é colocado dentro do tubo, e o substrato é adicionado à solução circunvizinha. A separação da biomassa fermentativa torna-se então fácil, e obteve-se um aumento no *e.e.* do produto (de 84-87 a 96%).[22]

A baixa concentração do substrato no meio fermentativo, é o maior fator que contribui para aumentar a enantioseletividade do fermento. Portanto, podemos concluir que, o uso de um tubo de diálise para separar o substrato e o fermento, aumenta o rendimento óptico limitando a concentração local do substrato que alcança o microorganismo.[22]

1.4. Imobilização de células

Células imobilizadas são células que são, ou fixadas ou

ligadas a uma superfície, ou incrustradas em matriz de gel.[1]

A eficácia dos suportes inorgânicos nas reações discutidas é esperada por uma combinação de fatores: a) um aumento na área superficial efetiva para a reação; b) a presença de poros que restringe ambos, substrato e reagente e, portanto, abaixa a entropia de ativação da reação e, c) um esforço conjugado (para reações de deslocamento) resultante da aproximação do eletrófilo e nucleófilo, enquanto ao mesmo tempo aumenta a nucleofilicidade (e basicidade) do último.[23]

Muitas reações podem ser realizadas limpas e rapidamente, em altos rendimentos sob condições brandas, utilizando reagentes suportados, ao passo que a tentativa de realizar as mesmas reações com reagentes não suportados, frequentemente falham ou resultam na formação de misturas de produtos.[23]

Um aspecto importante nas reações com reagentes suportados é que em muitos casos ambos, substrato e produto , são fortemente absorvidos na superfície do suporte inorgânico, ou ficam intercalados nele; por isso existe uma pequena contaminação dos produtos orgânicos ou solventes, por materiais inorgânicos. As reações são normalmente realizadas em solventes orgânicos comuns -tolueno, etanol, tetracloreto de carbono, diclorometano, etc - e o isolamento dos produtos orgânicos envolve simplesmente decantação ou filtração para remover o sistema de suporte gasto, seguido de evaporação do solvente. É possível em muitos casos envolvendo reagentes inorgânicos, regenerar o reagente ativo diretamente do sistema de suporte por reações inorgânicas padrão.[23]

É importante saber que o conceito de reàgentes suportados não é novo. Hidrogenação catalítica e outros numerosos processos que

ocorrem em metais e outras superfícies sólidas, podem convenientemente ser classificadas como exemplos de reagentes suportados, embora de uma natureza transitória. Além disso, resina de troca iônica tem sido usada rotineiramente por muitos anos em síntese orgânica, por exemplo, para hidrólise e esterificação, hidratação e desidratação, adições de Michael e condensações aldólicas, enquanto muitas reações anômalas, que tem sido descritas, ocorrendo em coluna cromatográfica de substratos orgânicos, são, indubitavelmente, mera consequência de água ou algum outro solvente adsorvido no suporte cromatográfico, funcionando como um reagente suportado.[23]

Em geral, estas imobilizações se dão sobre um suporte pouco solúvel, e podem ser classificadas de acordo com o tipo de interação existente entre o suporte e o material imobilizado, sendo normalmente divididas em duas categorias principais: interações de natureza física e de natureza química.[24]

Os métodos com interações de natureza química envolvem a formação de ligações do tipo covalente entre o suporte e a substância imobilizada, e incluem:

- ligação a um polímero funcionalizado,
- incorporação em cadeias poliméricas,
- formação de ligações cruzadas com um polímero.[24]

Já os métodos com interações de natureza física, não são dependentes de formação de ligações covalentes, e os principais tipos são:

- adsorção sobre um suporte inerte,
- encapsulamento no interior de um gel,
- encapsulamento com membrana semi-permiável.[24]

Apesar dessa divisão, um exemplo particular pode envolver,

simultaneamente, mais de um desses processos e, inclusive, adsorção física e ligação covalente.[24]

Dentre os vários métodos de imobilização, a adsorção se destaca pela sua simplicidade operacional, que consiste apenas em se colocar em contato a substância a ser imobilizada e a superfície ativa do suporte.[24]

Todas as células podem ser imobilizadas. A imobilização das mesmas traz muitas vantagens:

- a estabilidade das enzimas é melhorada;[25]
- retém suas atividades por vários meses;[1]
- enzimas podem ser feitas sob medida para uso específico;[25]
- mostram uma alta estabilidade operacional em comparação a células não suportadas;[1]
- fácil remoção do meio reacional;[1]
- uso repetido das células;[1,25]
- operações contínuas de reação;[1,25]
- regeneração da célula por imersão em um meio nutriente apropriado;[1]
- fácil isolamento do produto, com alta pureza e rendimentos;[1,25]
- reações requerem menos espaço;[25]
- é possível um melhor controle das reações;[25]
- os resíduos de reação têm a vantagem de não ser poluidores, como os de fermento livre.[25]

Por outro lado, desvantagens podem também ser consideradas:

- a atividade catalítica das células geralmente decresce durante o procedimento de imobilização.[1] Esta perda de atividade é causada por uma barreira adicional de permeabilidade introduzida pelo carregador do material e é esperado alguns danos às células ocorridos durante a imobilização,[8]

- a imobilização pode requerer equipamento especial.[1]

A etapa de transformação, especialmente operação contínua, requer um desenho especial de engenharia.[1]

Em contraste, para imobilização de enzimas, uma coenzima necessária é fornecida e é regenerada dentro da célula intacta. Estudos comparativos entre células de fermento livre e imobilizado tem sido executados raramente. Algumas diferenças em estereoseletividade e rendimento, portanto, tem sido observadas dependendo do tipo de imobilização.[8]

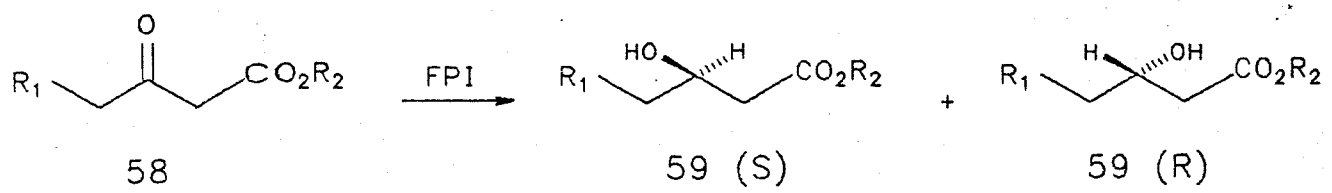
Esta observação parece razoável desde que células de fermento imobilizado exibem propriedades fisiológicas, morfológicas e metabólicas alteradas. Foram publicadas diferenças significantes em cinética, crescimentos, e DNA/RNA e conteúdo de proteína de *Saccharomyces cerevisiae*, adsorvidas em contas de vidro coberto de gelatina. Parece, portanto, que a imobilização afeta as células em vários aspectos simultaneamente e que a combinação destes efeitos impõe ênfase ao comportamento metabólico.[8]

Entre estes efeitos são encontradas limitações difusionais (primeiro para partição do material hidrofóbico, concentração reduzida de oxigênio e velocidade de transferência de oxigênio) bem como a criação de efeitos microambientais tais como atividade reduzida da água e alta concentração celular.[8]

1.4.1. Alguns imobilizantes utilizados e suas características

Um dos primeiros trabalhos publicados sobre redução com FPI (fermento de pão imobilizado) foi realizado por Nakamura[8,26] e colab.. Eles estudaram a imobilização de fermento de pão, que pode causar uma mudança definitiva na configuração e *e.e.* do produto reduzido, isto é, o rendimento assimétrico e a configuração na

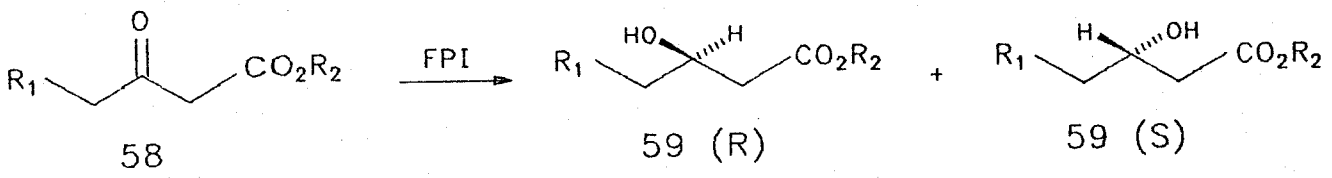
redução de β—ceto ésteres foi controlado por fermento imobilizado; assim, eles conseguiram o produto de configuração desejada com alto valor de e.e. (tabela 2).



58 59 (S) 59 (R)

a) R_1=Cl R_2=C_2H_5

b) R_1=Cl R_2=CH_3



58 59 (R) 59 (S)

c) R_1=CH_3 R_2=CH_3

d) R_1=H R_2=C_2H_5

Tabela 2 - Controle de redução por FPI[8,26]

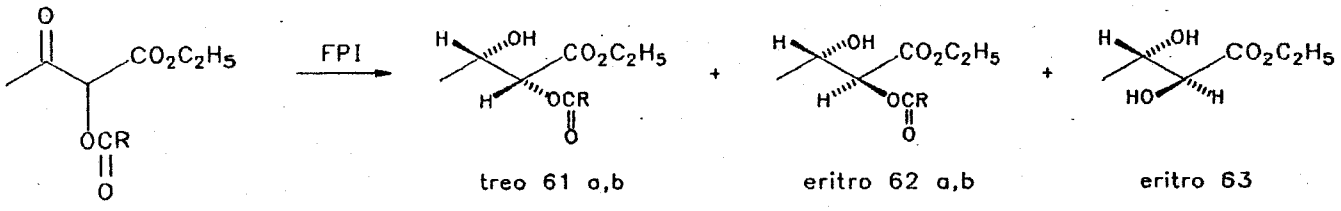
substrato	concentração (mM)	imobilizante[a]	produto[b]	sinal de rotação	e.e.[c]
58a	10	FPL	59a R	+	42
	20	FPL	59a R	+	27
	50	FPL	59a R	+	15
	20	Alg	59a R	+	16
	20	Car	59a R	+	11
	10	PAA	59a R	+	3
	10	PU	59a S	-	82
	50	PU	59a S	-	82
58b	10	FPL	59b R	+	31
	20	FPL	59b R	+	12
	20	Alg	59b R	+	10
	20	PU	59b S	-	90
58c	20	FPL	59c R	-	5
	20	Alg	59c R	-	17
	20	PU	59c R	-	86
58d	20	FPL	59d S	+	>98
	20	Alg	59d S	+	92
	20	PU	59d S	+	60

a) **FPL**: fermento livre; **Alg**: fermento imobilizado em alginato de cálcio; **Car**: fermento imobilizado em carragenam; **PAA**: fermento imobilizado em poliacrilamida; **PU**: fermento imobilizado em poliuretana.

b) Os rendimentos químicos dos produtos estão entre 60 e 80%.

c) Excessos enantioméricos foram determinados por RMN ^{1}H.

Em outro trabalho, Takeda[8,27] e colab. utilizaram fermento de pão imobilizado em alginato de cálcio e observaram a redução dos ésteres: (tabela 3)



60 a) R=CH_3
b) R=Ph

Tabela 3 - Redução de ésteres com FPI[8,27]

éster	método	tempo de reação	rendimento do produto (%)[a]	razão de produto[b]		
				61[c]	62[c]	63[c]
60a	A[d]	48	45	28	18	54
	B[e]	12	37	19	58	23
	B[e]	43	49	18	26	56
	B[e]	53	58	18	19	63
60b	A[d]	23	61	14	86	0
	B[e]	21	70	6	94	0
	B[f]	21	62	51	49	0

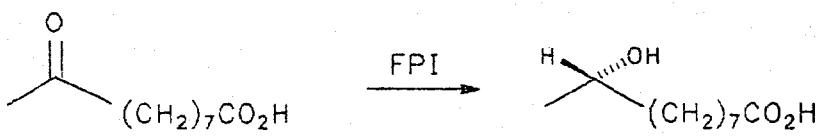
a) rendimento isolado; b) determinado após coluna cromatográfica c) pureza óptica maior que 95%; d) A: fermento de pão livre e e) B: fermento de pão imobilizado; f) pH do meio de cultura é 7 controlado por adição de $NaHCO_3$

Na redução de **60a** (tabela 3), o produto em maior quantidade é o **63**, que é obtido da hidrólise do **62a**, ao passo que quando

utilizou-se FPI obtém-se uma quantidade maior de **62**. Com o aumento do tempo de reação de 12 para 43 e 53 horas ocorre uma hidrólise do composto **62a** e assim pode ser explicado um aumento na quantidade do produto **63**.[8,27]

Para o composto **60b**, com o aumento do grupo R (de metil para fenil) não ocorre hidrólise do **62b**, portanto não se observa o composto **63**. Neste caso, foi feito um controle de pH perto de 7 com $NaHCO_3$ e não observou-se a formação de **63**, mas sim uma epimerização do produto.[8,27]

Um dos primeiros trabalhos publicados sobre a reutilização do fermento foi o de Naoshima[8,28], em uma das etapas da síntese de uma lactona, onde o imobilizante era κ-carragenam. (tabela 4)



64 65 (S)

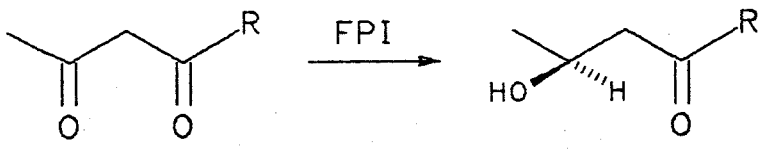
Tabela 4 - Uso repetido de células imobilizadas[8,28]

número do ciclo	rendimento %	pureza óptica de (S)-5, %e.e.	$[\alpha]_D^{22}$/°(c $CHCl_3$) (S)-5
1	12	95,5	-
2	23	96	+8,13 (c 0,23)
3	36	96	+8,13 (c 0,32)
4	35	96	+8,13 (c 0,33)
5	43	96	+8,14 (c 0,41)
6	40	96	+8,14 (c 0,35)
7	18	96	+8,13 (c 0,12)
8	6	95,5	+8,13 (c 0,036)
1[a]	36	92	+8,10 (c 0,32)

a) uso de fermento de pão livre

Na tabela 4 podemos notar que o rendimento químico aumenta até o 5º ciclo e depois decresce, e no 8º ciclo é muito baixo; a pureza óptica é sempre constante e >95%. Em comparação à FPL, onde temos o rendimento químico de 36%, e *e.e.* de 92%, a diferença não é muito grande em relação aos obtidos com FPI, mas neste último caso, temos a vantagem do fermento ser facilmente retirado do meio reacional e ser estável para vários reusos.[8,28]

Um estudo feito para reduções com dois imobilizantes diferentes (como afetam o rendimento químico e *e.e.*) foi realizado por Butsugan.[8,29] Os compostos estudados foram: (tabela 5)



66 R=NHC_2H_5 67

68 R=NHPh 69

Tabela 5 - Redução de acetoacetamidas por diferentes imobilizantes[8,29]

método de redução microbiológica	rendimento do produto	*e.e.* do produto (RMN ^{1}H)	substrato recuperado %
redução de **66** a **67**			
suspensão de fermento seco	0		82
suspensão de fermento fresco	0		90
FPI (seco) em alginato	9	90-95	54
FPI (seco) em poliuretana	9		37
redução de **68** a **69**			
suspensão de fermento seco	0		90
suspensão de fermento fresco	11		55
FPI (seco) em alginato	36	>95	46
FPI (fresco) em alginato	21	>98	53
FPI (seco) em poliuretana	28	84	45
FPI (seco) em poliuretana contendo alginato como aditivo	27	80	42
FPI (seco) em poliuretana contendo chitosan como aditivo	31	79	46

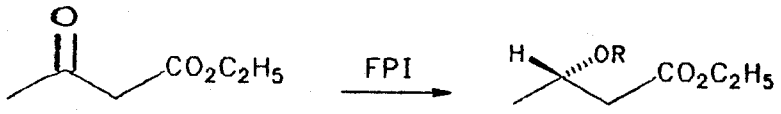
Na tabela 5 podemos observar que a redução de **66** a **67** não foi conseguida por fermento seco (granular) e fresco. Já com imobilizado, foi realizada, mas os rendimentos foram muito baixos. O *e.e.* obtido para alginato, foi muito bom e, também o único determinado.[8,29]

Na reação de **68** para **69**, o fermento seco não foi capaz de reduzir a cetona, mas a suspensão de fermento livre neste caso (contrário para o composto **66**) reduz a cetona, com baixo

rendimento químico.[8,29]

Quando imobilizados, os fermentos seco e fresco proporcionam uma redução com rendimentos químicos muito maiores do que quando livres, e valores de *e.e.* muito satisfatórios. Notou-se, também, que com poliuretana os valores de *e.e.* são mais baixos que com alginato. Acrescentaram-se aditivos para tentar um aumento no rendimento químico e *e.e.*, mas os resultados foram semelhantes aos sem aditivos.[8,29]

Novamente a reutilização foi estudada, agora por Naoshima[30], com alginatos de diâmetros diferentes.



70

71 (S)

a) R=H

b) R=Ph—C(=O)—

Quando o alginato utilizado é o de diâmetro maior, observa-se que o rendimento químico é menor que o obtido com fermento livre, como era esperado. Com a diminuição do diâmetro do alginato ocorre um aumento no rendimento químico, comparável ao FPL. Isso é devido à um aumento na área superficial específica para imobilizar o fermento, onde ocorre um contato maior do substrato com as enzimas (tabela 6).[30]

Tabela 6 - Reuso do FPI[30]

número do reuso	FPI-1A[a]		FPI-3A[b]		FPI-3C[c]	
	rend.(%)	%e.e.	rend.(%)	%e.e.	rend.(%)	%e.e.
1	47	98	18	98	11	98
2	46	97	20	98	17	98
3	55	98	25	99	28	99
4	52	99	41	96	39	99
5	64	95	12	98	15	98
6	63	99				
7	75	98				
8	48	97				
9	48	96				
10	18	98				
11	6	98				
12	5	97				

a) imobilizado em alginato de cálcio de 1-1,5 mm de diâmetro

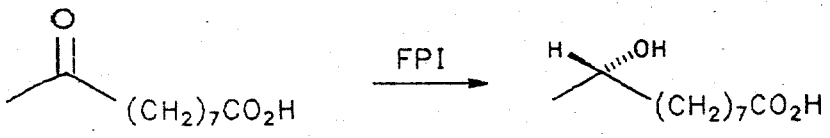
b) imobilizado em alginato de cálcio de 3-4 mm de diâmetro

c) imobilizado em carragenam de 3-4 mm de diâmetro

d) rendimento químico de 71a, purificado com coluna cromatográfica e micro destilação à vácuo

e) rendimento óptico de (S)-71a determinado por HPLC com o éster (S)71b; cada (S)-71a apresentou uma rotação específica $[\alpha]_D^{22}$ ($CHCl_3$) variando entre +37,63° (c 0,0276) e +42,25° (c 0,0237)

Naoshima[31] e colab. estudaram a síntese de um composto, que é uma secreção defensiva de *Phoracantha synonyma*. Estudaram também o reuso do catalisador com KCl 2% e, também, adicionando 10 ml de acetato de etila. (tabela 7)



64 65 (S)

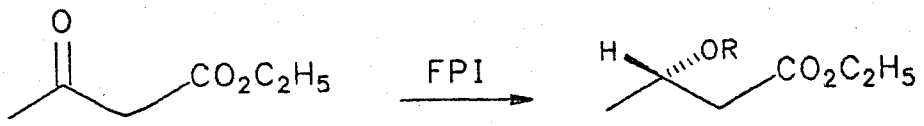
Tabela 7 - Reuso do catalisador utilizando acetato de etila[91]

número do ciclo	rendimento de 65 (%)		pureza óptica de 65 e.e. (%)	
	aquosa[a]	c/ A.E[b]	aquosa[a]	c/ A.E[b]
1	23	22	96	96
2	28	26	96	95
3	41	31	96	96
4	46	38	96	96
5	32	21	96	94
6	30	--	96	--
7	15	--	97	--

a) aquosa: solução de KCl 2%; b) c/ A.E.: solução aquosa de KCl 2% com 10 mL de acetato de etila (V_t = 1000 mL).

Podemos notar na tabela 7 que a adição de acetato de etila abaixa o rendimento químico (mas o e.e. permanece muito alto) e, após o 5º ciclo torna-se muito baixo (no caso da solução aquosa o reuso foi de até 6 vezes, só a partir daí o rendimento químico foi menor).[31]

Naoshima[32] e colab. estudaram ainda, em um trabalho posterior, a redução de ésteres com adição de outros solventes. (tabela 8).



70

71 (S)

a) R=H

b) R=Ph—C(=O)—

Tabela 8 - Reações com adição de solventes[32]

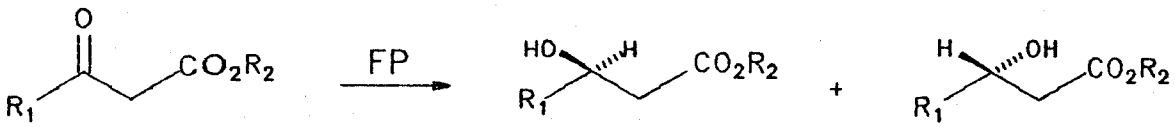
nº ciclo	rendimento (%)[a]			e.e. (%)[b]		
	H/A[c]	A/A[c]	AE/A[c]	H/A[c]	A/A[c]	AE/A[c]
A. 100 mL solvente/900 mL água[d]						
1	47	57	0	96	97	-
2	33	33		96	97	
3	5	6		97	-	
B. 500 mL solvente/ 500 mL água[d]						
1	51	0	0	97	-	-
2	38			97		
3	33			97		
C. 1000 mL hexano[d]	rendimento (%)[a]			e.e. (%)[b]		
1	32			96		
2	14			96		
3	2			-		
1[e]	53			95[f]		

a) purificado por coluna cromatográfica e microdestilação a vácuo

b) determinado po HPLC do éster 71b; c) H/A: hexano/água; A/A: acetonitrila/água; AE/A: acetato de etila/água; d) utilizou-se 2 g de 70 e 50 de FPI; e) utilizou-se 10 g de 70; f) $[\alpha]_D$ +40,47° (c 0,1738, $CHCl_3$)

Eles verificaram que com a adição de solvente orgânico (10% de hexano e acetonitrila) à suspensão de FPI, ocorre um abaixamento no rendimento químico (sem alterar o *e.e.*). A adição de acetato de etila desativa toda a capacidade de redução do fermento. Utilizando-se soluções de solvente orgânico/água, somente em hexano a redução tem efeito, e com hexano puro também.

Agora Nakamura[8,33] fez o estudo da concentração de sais metálicos na redução, e estes mudam a seletividade. (tabela 9)



72 73 D 73 L

Tabela 9 — Efeito de sais metálicos na redução assimétrica[8,33]

substrato R_1	R_2	aditivo (conc. M)	configuração	e.e. (%)	R_a (%)
Et	Me	nenhum	R(D)	12	46
Et	Me	KCl (1,0)	S(L)	8	54
Et	Me	KCl (2,0)	S(L)	24	47
Et	Me	KCl (4,0)	S(L)	45	41
Et	Me	NaCl (2,0)	S(L)	43	37
Et	Me	NaCl (4,0)	S(L)	47	14
Et	Me	NaBr (2,0)	R(D)	10	48
Et	Me	KBr (2,0)	R(D)	20	48
Et	Me	$MgCl_2$ (2,0)	S(L)	80	20
Et	Me	$MgCl_2$ (3,0)	S(L)	86	1
Et	Me	$CaCl_2$ (2,0)	S(L)	75	19
Et	Me	$MgCl_2$ (2,0), FPI[a]	S(L)	81	58
Et	Me	$MgCl_2$ (4,0), FPI[a]	S(L)	89	44
$ClCH_2$	Et	nenhum	S(D)	43	62
$ClCH_2$	Et	$MgCl_2$ (3,0), FPI[a]	R(L)	64	50
Me	Et	nenhum	S(L)	77	66
Me	Et	$MgCl_2$ (3,0), FPI[a]	S(L)	99	65

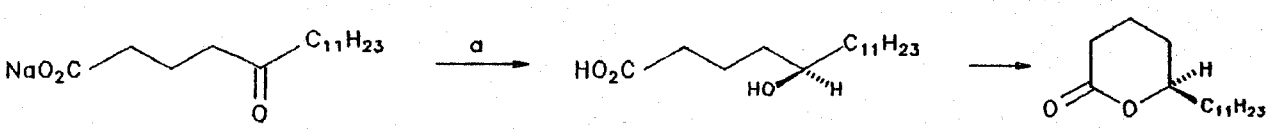
a) no FPI foi utilizado fermento de pão imobilizado em alginato de magnésio

A redução de 72 com fermento de pão sem adição de sais forma o (R-73) em 12% de *e.e.*. A adição de KCl muda a estereoquímica do produto produzindo (S-73) e, com o aumento da concentração de sal aumenta o *e.e.* do produto (S-73).[8,33]

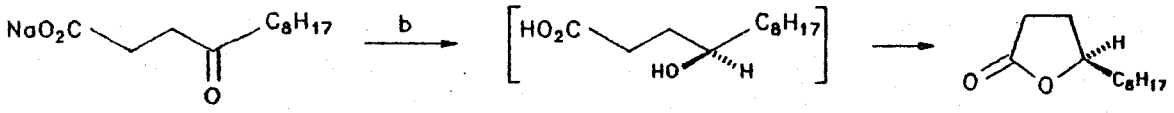
Com o íon brometo (NaBr e KBr) não ocorre a mudança na estereoquímica e obtém-se o (R-73), portanto podemos concluir que

o íon cloreto é que faz a mudança na configuração. Adicionando-se cloreto de magnésio ou cálcio observa-se um aumento muito grande no *e.e.*. Entretanto, aumentando-se a concentração de $MgCl_2$ a (3,0 M) o *e.e.* é de 86%, mas o rendimento químico cai a 1%. Na tentativa de aumentar o rendimento químico, imobilizou-se o fermento em alginato de magnésio e o que foi observado foi um grande aumento no mesmo com altos valores de *e.e.*.[8,33]

K-carragenam imobilizando fermento de pão foi tomado para a lactonização redutiva de **74** e **77** usado para síntese de (R)-5-hexanodecalina (R-**76**), o componente feromônio isolado da cabeça de rainhas da vespa oriental, *Vespa orientalis*, e do (R)-4-dodecanolida (R-**79**), a secreção defensiva das glândulas pigidial de besouros voadores, *Bledus mandibularis* e *Bledus spectabilis*. Estas reduções utilizam FPI e dão rendimentos baixos comparados com os análogos FPL.[8]



74 75 76 (R)



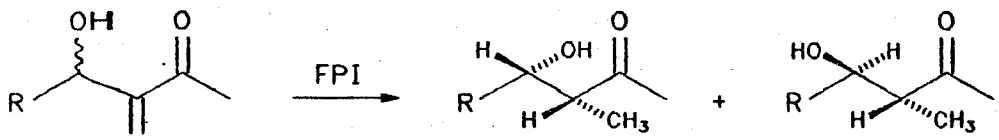
77 78 79 (R)

a) 6g, k-car/4g FP, 30C, 48h, 32%

b) 30C, 48h, 26%

Exemplos de redução de α-metileno ramificado à compostos carbonílicos por fermento imobilizado em alginato tem sido relatados. O composto **80** dá o syn (**81**R) e anti (**82**R). O grupo

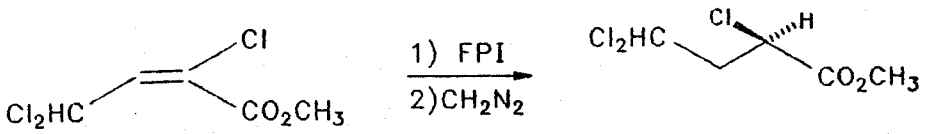
metileno foi reduzido em todos os casos ao passo que não reduz o grupo carbonila.[8]



80 81 82

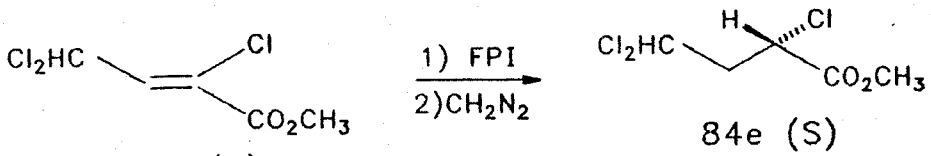
R	R_Q(%)	razao 81:82	e.e.(%) 81	e.e.(%) 82
a) C_2H_5	61	53:47	98	98
b) nC_3H_7	64	42:58	98	72
c) nC_4H_9	56	33:67	98	67
d) nC_5H_{11}	72	36:64	98	69

O fermento imobilizado também está sendo usado na redução de duplas ligações (C=C). Em uma primeira publicação de Utaka[8,34] foi descrita a redução de (E) e (Z)-83e, com fermento imobilizado em alginato de cálcio:



83e (E) 84e (R)

65%;e.e.=84-92%



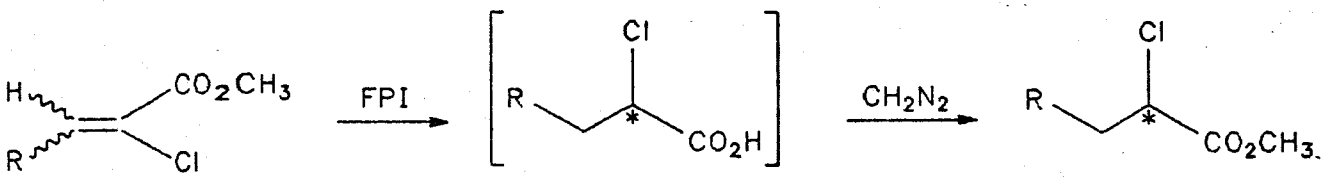
83e (Z) 84e (S)

60%;e.e.=97-98%

Quando o fermento é adicionado ao 83e, primeiro ele hidrolisa o éster a ácido, depois reduz a dupla ligação, por isso é feita uma nova esterificação com CH_2N_2.[8,34]

Nota-se que o valor de *e.e.* para R(84e) é menor que para S(84e); isto pode ser devido à isomerização de E ao Z ou da menor enantioseletividade da redutase do fermento para o isômero E. Sabe-se que ambos são estáveis no meio de cultura do fermento sem

sofrer isomerização. Conclui-se, então, que os valores de *e.e.* refletem a enantioseletividade da redutase do fermento.[8,34] Em um trabalho complementar, Utaka[8,35] descreveu a redução de uma série de isômeros, análogos aos descritos no trabalho anterior[8,34] (tabela 10).



83 85 84

Tabela 10 - Redução com fermento de pão imobilizado[8,35]

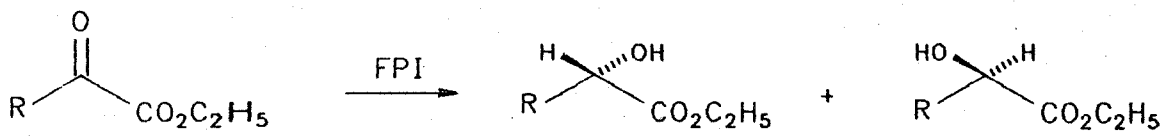
RCH=CClCO$_2$CH$_3$ 83			tempo(h)	RCH$_2$CHClCO$_2$CH$_3$ 84			
	R	E/Z		R_Q(%)[a]	e.e.(%)	$[\alpha]_D^b$,(c CHCl$_3$)	conf[c]
a	CH_3CH_2	E	40-44	23-28(0)	47	+10,6 (0,62)	R
		Z	30-53	23-35(2-3)	>98	-24,7 (1,03)	S
b	$(CH_3)_2CH$	E	41-47	6-10(0)	68	+24,1 (1,26)	R
		Z	48-77	16-19(5)	>98	-38,1 (0,74)	S
c	$CH_3(CH_2)_3$	E	30-60	30-40(0)	25	+5,4 (1,63)	R
		Z	76-96	32-40(4-8)	>98	-23,9 (1,19)	S
d	CH_2Cl	Z	30-68	0(20-66)	-	-	-
e	$CHCl_2$	E	28-30	54-65(0)	92	+42,4 (1,32)	R
		Z	30-32	58-71(0)	98	-44,0 (1,69)	S
f	CCl_3	Z	11-23	41-69(10)	>98	-10,5 (1,35)	S

a) R_Q: rendimento químico, massa recuperada de 83 entre parênteses

b) temperatura entre 22-26°C

c) conf: configuração

Finalmente, Nakamura[8,36] estudou ainda a redução de α-ceto ésteres com FPL e FPI em água e solvente orgânico (hexano) (tabela 11).



86 87 L 87 D

R=$CH_3(CH_2)n$ a)n=0
b)n=1
c)n=2
d)n=3
e)n=4

Tabela 11 - Redução com FPL e FPI em água e hexano[8,36]

substrato	e.e. (%)[a] / R_a (%)[b] / config.		
	FPL em água	FPI em água	FPI em hexano
86a	91/47/S	87/43/S	94/33/S
86b	75/42/S	66/42/S	36/28/S
86c	31/36/S	39/36/S	32/27/S
86d	50/29/S	78/20/S	47/41/R
86e	30/23/S	63/31/S	54/36/R

a) a razão dos e.e. foi determinada por análise de CLG do éster
b) rendimento isolado

Para a mudança na estereoquímica da reação temos algumas alternativas:[8,36]

1) A imobilização do fermento faz com que o e.e. de S para o sistema em água diminua, significando que mais produto R é produzido. Como foi dito em 1.4.1, a imobilização afeta a membrana da célula do fermento e toda sua morfologia. Para os compostos **86a**

e **86b** o *e.e.* de S decresce, para o **86c** é quase o mesmo, mas para **86d** e **86e** aumenta. Isto tem sido explicado por decomposições enantioseletivas do produto, que será descrito no 3º ítem.

2) O efeito do açúcar na redução diminui os valores de *e.e.* para a redução de **86e** (tabela 12). Sem adição de açúcar, a célula do fermento tem um certo poder de regeneração do NADPH, e isto faz os valores de *e.e.* alcançarem valores máximos.

Tabela 12 - Efeito do açúcar na redução de **86e**[8,36]

glicose (g/l)	R_Q (%)	*e.e.* (%)
0	25	>97
33	29	51
67	18	37
133	24	20
200	28	15

3) Uma reação longa do **86d** e **86e** leva ao produto S, em alto *e.e.*. Pode haver uma hidrólise do R hidroxi éster, no caso FPI-água, o que não é observado no caso do FPI-hexano por causa de uma inibição de alguma enzima (que catalisa a hidrólise) no solvente não aquoso. O FPI contém uma grande quantidade de água mas, o solvente parece, portanto, inibir a enzima hidrolítica.

1.4.1.1. Crisotila

Crisotila é uma variedade de amianto ou asbestos, na classe das serpentinas. A formação e ocorrência dos asbestos são de origem de calcários dolomíticos e de rochas ultrabásicas.[24]

A reação química melhor aceita para explicar a formação de um serpentinito a partir de calcário dolomítico é:[24]

$$\underset{\text{dolomita}}{3CaMg(CO_3)_2} + 2SiO_2 + 2H_2O \longrightarrow \underset{\text{serpentina}}{Mg_3Si_2O_5(OH)_4} + 3CO_2 + 3CaCO_3$$

Já a serpentinização a partir de rochas ultrabásicas envolve uma grande diversidade de idéias. Algumas reações sugeridas são:[24]

a) $\underset{\text{forsterita}}{Mg_2SiO_4} + \underset{\text{enstatita}}{MgSiO_3} + 2H_2O \longrightarrow \underset{\text{serpentina}}{Mg_3Si_2O_5(OH)_4}$

b) $\underset{\text{forsterita}}{2Mg_2SiO_4} + 3H_2O \longrightarrow \underset{\text{serpentina}}{Mg_3Si_2O_5(OH)_4} + Mg(OH)_2$

c) $\underset{\text{forsterita}}{3MgSiO_4} + SiO_2 + 2H_2O \longrightarrow \underset{\text{serpentina}}{2Mg_3Si_2O_5(OH)_4}$

A crisotila é formada a partir de rochas ultrabásicas de origem vulcânica e é resultado de duas etapas de transformações metamórficas. A primeira envolve a formação da serpentina por alterações hidrotérmicas da rocha, e a segunda, uma recristalização a partir da solução aquosa e reprecipitada nas fissuras existentes na rocha matriz.[24]

Na maioria dos casos, as fibras são dispostas em feixes paralelos e orientadas no sentido transversal às fissuras da rocha matriz, mas orientação paralela às fissuras e fibras, sem orientação muito definida, são também conhecidas.[24]

As propriedades físico-químicas das crisotilas dependem tanto do grau de substituição isomórfica, que ocorre no retículo cristalino, como das condições nas quais se deu o fenômeno de

serpentinização, sempre, portanto, variáveis de acordo com o jazimento na qual se encontram.[24]

A classificação das fibras é feita através do "Padrão de Classificação Canadense", o mais utilizado nas transações comerciais. A amostra usada consta de fibras da classificação 5R, porém são colocadas no circuito de classificação apenas fibras longas, de onde vem a denominação 5RL.[24]

Todo mineral do tipo serpentina possui camadas compostas do tipo $[Si_2O_5]$ tetraédrico, conhecidas como tridimita e $[Mg(OH)_2]$ octaédrico, chamada de brucita. Cada fibrila possui de 8 a 12 camadas de brucita/tridimita, variando de acordo com a procedência. O lado externo das fibrilas é constituído de $Mg(OH)_2$.[24]

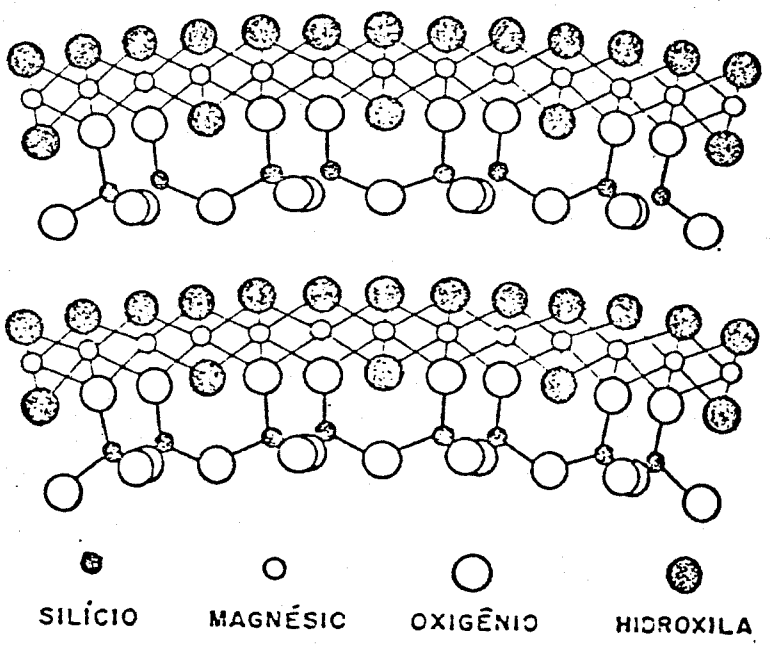


Figura 5 - Esquema de parte de uma camada da parede de uma fibrila[24]

A crisotila, como a grande maioria dos silicatos, é considerada um material de boa resistência química e muito boa estabilidade térmica.[24]

Frente a ácidos fortes (HCl, H_2SO_4 e H_3PO_4) ela reage prontamente destruindo a camada de $Mg(OH)_2$, restando apenas a armação de sílica. Porém, é muito pouco afetada por bases fortes (ex: NaOH), e apenas a superfície externa é afetada por ácidos fracos (HAc). Também não é afetada por intemperismos como sol, oxidação, H_2O e temperatura.[24]

Crisotila possui moléculas de água adsorvidas na sua superfície: 1 a 2% em massa, para umidade relativa do ar entre 50 a 70%, e se aproxima de 3% para umidade relativa acima de 90%. Quando seca e colocada na presença de umidade, readsorve esta quantidade de água instantaneamente.[24]

Khorami e colaboradores[37] obtiveram termogramas (utilizando um sistema de equipamento de termogravimetria interfaciado a um espectrômetro de massa), e estabeleceram quatro regiões de acordo com as seguintes equações:

1ª região: de 30 a 150°C; desidratação:

$$H_2O_{(l)} \longrightarrow H_2O_{(g)}$$

2ª região: de 250 a 400°C; decomposição da brucita

$$Mg(OH)_2 \longrightarrow MgO + H_2O_{(g)}$$

3ª região: de 450 a 550°C; descarboxilação da magnesita

$$MgCO_3 \longrightarrow MgO + CO_{2(g)}$$

4ª região: de 500 a 720°C; desidroxilação da crisotila

$$2Mg_3Si_2O_5(OH)_4 \longrightarrow 3Mg_2SiO_4 + SiO_2 + 4H_2O_{(g)}$$

a estrutura da sílica permanece, mas se torna quebradiça.

Uma outra propriedade dessas fibras é a sua grande flexibilidade, o que faz com que possuam pouco poder de abrasão, e

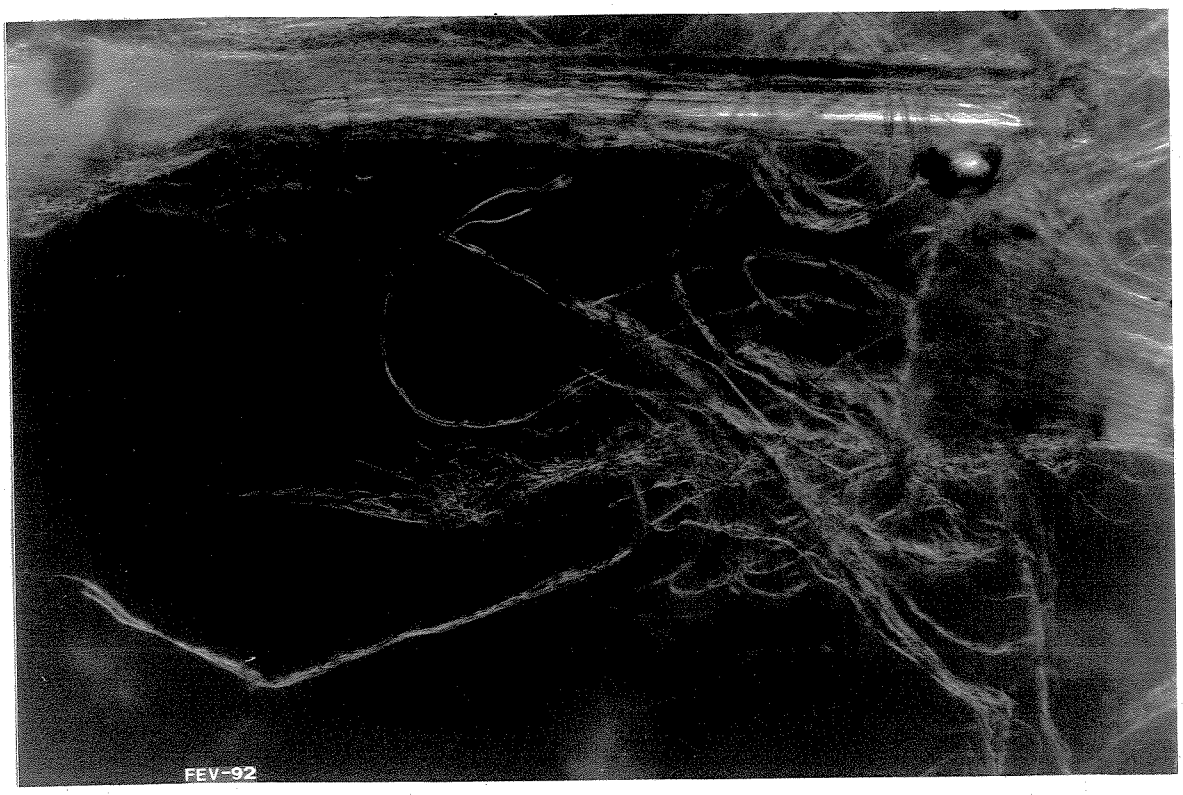
boa resistência a impacto.[24]

A crisotila como suporte apresenta muitas propriedades:[24]

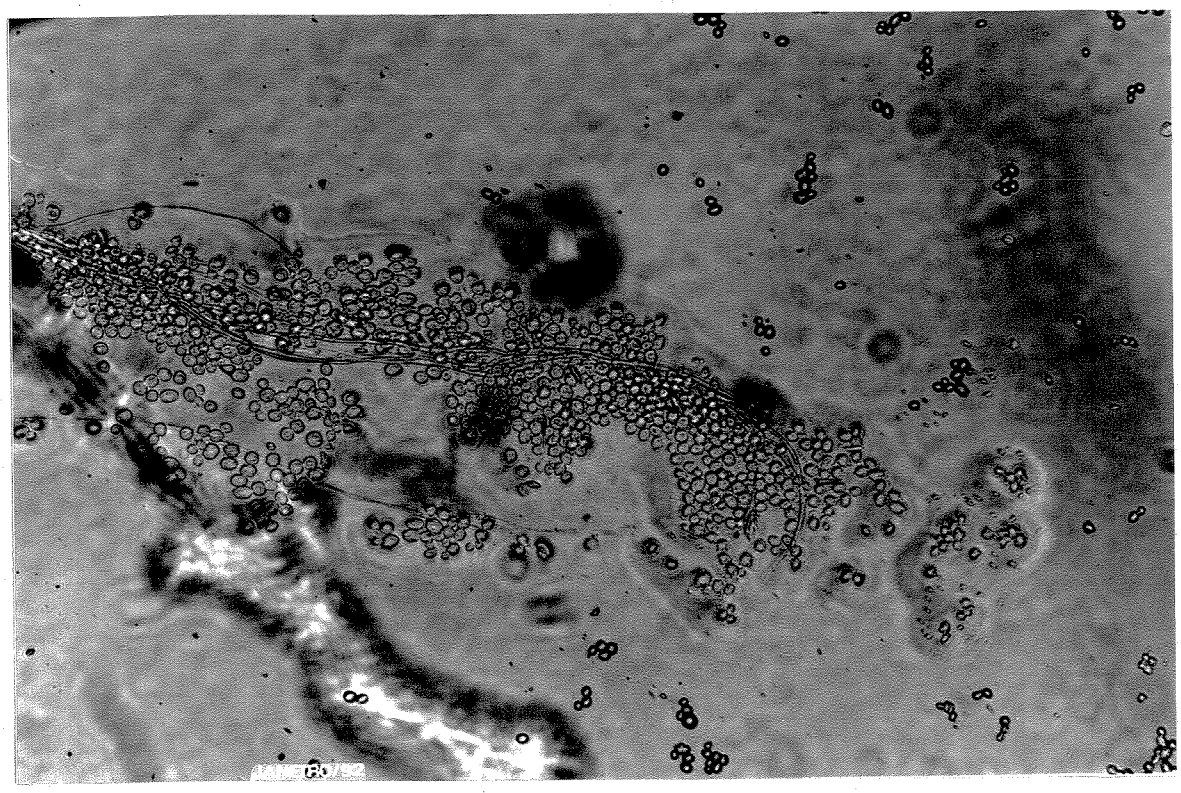
- baixa solubilidade (Kps = 10^{-11});
- potencial zeta positivo em soluções aquosas, numa larga faixa de pH;
- alta área superficial específica;
- alta densidade de sítios adsorventes;
- facilidade de aquisição no mercado nacional;
- baixo custo;
- facilidade de manuseio.

Parizotto[24] verificou que a capacidade de adsorção de *Saccharomyces cerevisiae* sobre crisotila tratada é de aproximadamente 0,9 g de fermento por grama de crisotila. Este valor situa-se em níveis superiores aos dos melhores suportes utilizados para esta imobilização.

Os experimentos por ele realizados mostraram uma grande potencialidade da crisotila para uso como suporte, onde alia seu alto valor de área superficial específica com sua alta densidade de sítios adsorventes ativos.[24]



A) Lavada e tratada com ultrassonificação (aumento 10 vezes)



B) Suportada com *Saccharomyces cerevisiae* (aumento 20 vezes)

Figura 6 - Fotografias de crisotila

1.4.1.2. Montmorilonita

Smectitas são as argilas minerais 2:1 que levam uma carga no retículo e expandem caracteristicamente quando solvatada com água e álcoois, notavelmente etileno glicol e glicerol. Em literatura recente, o termo montmorilonita foi usado para ambos grupos (agora smectita) e o membro particular do grupo em que **Mg** é um substituinte significante para **Al** na camada octaédrica. Fórmulas típicas são mostradas:[38]

montmorilonita	$[Al_{1,67}Mg_{0,33}(Na_{0,33})]Si_4O_{10}(OH)_2$
beidelita	$Al_{2,17}[Al_{0,33}(Na_{0,33})Si_{3,17}]O_{10}(OH)_2$
montronita	$Fe(III)[Al_{0,33}(Na_{0,33})Si_{3,67}]O_{10}(OH)_2$
hectorita	$[Mg_{2,67}Li_{0,33}(Na_{0,33})]Si_4O_{10}(OH,F)_2$
saponita	$Mg_{3,00}[Al_{0,33}(Na_{0,33})Si_{3,67}]O_{10}(OH)_2$
sauconita	$[Zn_{1,48}Mg_{0,14}\ Al_{0,74}Fe(III)_{0,40}]\ [Al_{0,99}Si_{3,01}]$ $O_{10}(OH)_2X_{0,33}$

Smectitas menos comuns incluem volkhonskoita que contém Cr^{2+}; menmontita Cu^{2+}; e pimelita Ni^{2+}.[38]

As smectitas são derivadas estruturalmente de pirofilita, $Si_8Al_4O_{20}(OH)_4$, ou talco, $Si_8Mg_6O_{20}(OH)_4$, por substituições principalmente nas camadas octaédricas. Muitas substituições devem ocorrer por **Si** na camada tetraédrica, e por F^- no lugar de OH^- na estrutura.[38]

Quando substituições ocorrem entre elementos (íons) de carga diferente, déficit ou excesso de carga se desenvolve na parte correspondente da estrutura. Déficit de carga em smectitas são compensadas por cátions (usualmente Na^+, Ca^{+2}, K^+) sorvidas entre as tres camadas (duas tetraédricas e uma octaédrica, portanto

2:1), sanduíches de argila mineral. Estes estão seguros fracamente, embora estequiometricamente, e ocasionam um aumento maior nas propriedades de troca de cátions da smectita. A composição das smectitas são dadas na tabela 13.[38]

Tabela 13 - Análise química das smectitas[38]

componente	1[a]	2[b]	3[c]	4[d]	5[e]	6[f]
SiO_2	51,14	47,28	43,54	55,86	42,99	34,46
Al_2O_3	19,76	20,27	2,94	0,13	6,26	16,95
Fe_2O_3	0,83	8,68	28,62	0,03	1,83	6,21
FeO			0,99		2,57	
MnO	traço				0,11	
ZnO	0,10					23,10
MgO	3,22	0,70	0,05	25,03	22,96	1,11
CaO	1,62	2,75	2,22	traço	2,03	
K_2O	0,11	traço		0,10	traço	0,49
Na_2O	0,04	0,97		2,68	1,04	
Li_2O				1,05		
Ti_2O						0,24
P_2O_6						
F				5,96		
H_2O removida						
a 150°C	14,81	19,72	14,05	9,90	13,65	6,72
acima 150°C	7,99		6,62	2,24	6,85	10,67
Total	99,75	100,37	100,02	102,98	100,29	99,95

a) montmorilonita
b) beidelita
c) nontronita
d) hectorita
e) saponita
f) sauconita

A capacidade de troca de cátions de minerais smectita é notavelmente alta, 80-90 meq ou maior por 100 g de argila seca ao ar, e oferece um critério diagnóstico do grupo. O retículo cristalino é, obviamente, ligado fracamente. Além disso, o retículo da smectita é expansível entre as camadas de silicato, tanto que, quando a argila é molhada em água, pode aumentar por várias vezes o seu volume seco (ex: argila bentonita).[38]

Os minerais do grupo da smectita são formados por intemperismos na superfície, processos hidrotérmicos a baixa temperatura, alteração do pó vulcânico em leitos estratificados, ação da circulação de água de fonte incerta ao longo de fraturas e em veios, e sínteses de laboratório. O meio ótimo de intemperismo é um em que cálcio, ferro II e, especialmente, magnésio, estão presentes em concentrações significantemente altas. A concentração de potássio deve ser baixa, ou menor que a de Mg, Ca e íon ferro. Matéria orgânica que exerce ação redutora é um usual concomitante, e um meio neutro para ligeiramente alcalino, geralmente prevalece sob condições onde os metais alcalinos e alcalino terrosos não são prontamente removidos.[38]

O intemperismo do meio para smectita é diferente daquele no qual caolinita é formada. Se o sistema permite lixiviação efetiva e, se íons H^+ tornam-se disponíveis em quantidade suficiente para permitir que os cátions metálicos sejam facilmente lixiviados, caolinita é formada. A reação reversa, raramente ocorre.[38]

Bentonita é uma rocha rica em montmorilonita que é normalmente resultado da alteração de pó (cinza) vulcânico do intermediário (latitico) do tipo silícico. Em geral, restos de feldspato parcialmente não alterado, quartzo ou fragmentos de vidro vulcânico, oferecem evidências da rocha de origem. Muitas

argilas adsorventes, argilas descoradas, e muitas argilas catalisadoras são smectitas, embora algumas são atapulgita.[38]

Montmorilonita tem sido usada como catalisador em reações orgânicas, devido o seu caráter ácido. Vários exemplos de reações foram descritos, do tipo K10, sendo utilizada como suporte para reagentes inorgânicos (ex: Cu^{+2}). A imobilização de enzimas com montimorilonita é um processo novo, e não há nada na literatura sobre reduções de cetonas (e reduções em geral) em imobilização em argilas.[23]

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

OBJETIVO

O objetivo deste trabalho é utilizar fermento de pão (*Saccharomyces cerevisiae*) imobilizado para redução de fenilcetonas, com alta enantioseletividade. Os produtos são muito úteis, como intermediários, na indústria farmacêutica e em sínteses mais complexas, e que são objetos de um projeto mais amplo do grupo de pesquisa. O estudo de redução microbiológica de fenilcetonas é pouco explorado na literatura, e em alguns casos, só é descrita a formação do produto racêmico.

Fermento de pão é um reagente barato, disponível e não tóxico, além de não exigir condições drásticas de reação, como os reagentes quirais convencionais. A sua imobilização aumenta a estabilidade das enzimas, que podem ser reutilizadas várias vezes, após o cofator NADH ser regenerado. O nosso estudo visa obter álcoois quirais com valores de rendimentos químico e óptico comparáveis aos obtidos com FPL, que foram objetos de estudos anteriores realizados em nosso laboratório.

A crisotila (um magnésio-silicato) tem a vantagem de ser um produto nacional e, de possuir uma grande quantidade de sítios adsorventes. A montmorilonita (um alumínio-silicato) não intumesce como a crisotila, e possui muitos sítios adsorventes. O emprego de FP em suportes argilo-minerais ainda não é descrito na literatura para efetuar reações químicas. É nosso objetivo desenvolver e otimizar esta técnica.

CAPÍTULO 2 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

2.1 - Crisotila

2.1.1 - Tratamento

O tratamento da crisotila foi feito segundo Parizotto[24], e está descrito no ítem 3.2.1. A lavagem com jatos de água forte serve para eliminar a parte não fibrosa da crisotila, que é um pó fino e não contém os sítios adsorventes. Nesta lavagem ocorre uma perda de massa de aproximadamente 35% no mínimo, e pode chegar a 50%.

O tratamento com ultrassom em tampão pH 4,7 elimina a última camada da crisotila que consiste de $Mg(OH)_2$, aumentando assim a área superficial de cada fibra e, através da vibração, as fibras se soltam e tornam-se mais homogêneas quando colocadas em água.

2.1.2 - Suporte e fermentação do açúcar

Parizotto[24] foi quem primeiro observou a capacidade de adsorção de *Saccharomyces cerevisiae* pela crisotila, e também a sua atividade fermentativa após a imobilização. Nesta fermentação ocorre a produção de etanol a partir de sacarose:

$$C_6H_{12}O_6 \xrightarrow[H_2SO_4]{FPI} 2\ CH_3CH_2OH + 2CO_2$$

2.1.3 - Testes de expansão com solventes

Verificou-se a capacidade de expansão da crisotila em diversos solventes (descrito no ítem 3.2.2) e os resultados obtidos estão na tabela 14. Estes testes foram necessários porque muitas reações são feitas em solventes.

Observou-se que em água a crisotila se expande bastante e facilita o contato das fibras com o reagente. A maioria dos solventes, entretanto, não a expande muito e em alguns casos ocorre uma retração. Quando foram submetidas a 1 minuto de ultrassonificação, não se notou uma grande mudança em relação à agitação manual de 1 minuto. Chegou-se a conclusão que só poderiam ser utilizados os seguintes solventes: etanol, metanol, acetonitrila e diclorometano, que sofrem expansão média.
[Resolveu-se verificar se, adicionando 10% de água aos solventes miscíveis, a expansão aumentaria. Os resultados obtidos estão na tabela 15, e observou-se que a expansão não se altera em nenhum caso.

Tabela 15 - Teste de expansão de crisotila com solventes e 10% de água

	agitação manual
Metanol	não altera
Etanol	não altera
Acetona	não altera
Acetonitrila	não altera
Tetrahidrofurano	não altera

2.1.4 - Testes de toxidez de solventes para com fermento de pão

O próximo passo foi verificar se os solventes eram tóxicos ao fermento, gerando células mutantes ou desnaturando-as. Os resultados estão na tabela 16, onde todos os solventes descritos na tabela 14 foram testados.

Tabela 14 - Teste de expansão da crisotila

	com pequena agitação	agitação manual 1 minuto	ultra-som 1 minuto
Água	grande expansão	aumenta muito expansão	aumenta muito expansão
Metanol	média expansão	aumenta pouco expansão	aparentemente rompe fibras
Etanol	média expansão	aumenta muito expansão	aumenta muito expansão
Acetona	pequena expansão	aumenta pouco expansão	aumenta pouco expansão
Hexano	não expande	aumenta muito pouco expansão	aumenta muito pouco expansão
Clorofórmio	pequena retração (escurecimento)	aumenta muito pouco expansão	aumenta muito pouco expansão
Acetato de Etila	não expande	aumenta pouco expansão	aumenta pouco expansão
Éter Etílico	média retração	aumenta muito pouco expansão	aumenta pouco expansão
Diclorometano	média expansão	aumenta muito expansão	aumenta muito expansão
Acetonitrila	média expansão	aumenta muito expansão	ocorre uma retração
Tetrahidrofurano	pequena expansão	aumenta pouco expansão	aumenta pouco expansão
Benzeno	não expande (escurecimento)	aumenta muito pouco expansão	aumenta muito pouco expansão

Tabela 16 - Testes de toxidez com fermento e solventes

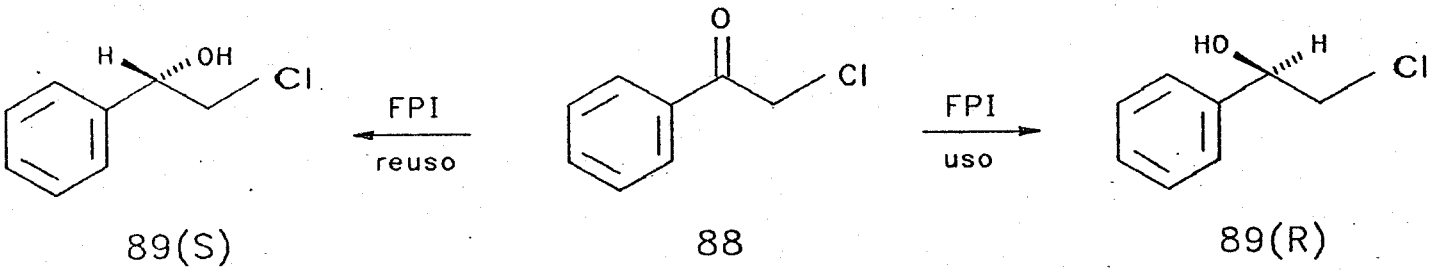
	Toxidez
Metanol	tóxico
Etanol	puro - tóxico (somente 12% em água não é tóxico)
Acetona	tóxico
Hexano	ligeiramente tóxico
Clorofórmio	tóxico
Acetato de Etila	tóxico
Éter Etílico	tóxico
Diclorometano	tóxico
Acetonitrila	tóxico
Tetrahidrofurano	tóxico
Benzeno	tóxico

Observou-se que exceto hexano e etanol 12% em solução, todos os demais solventes são tóxicos. Nos experimentos com os outros solventes, ocorre um escurecimeto no fermento e um mau cheiro, característico de que as células foram alteradas. Nestes casos, a redução de compostos carbonílicos não será possível.

2.1.5 - Redução da α-cloroacetofenona **88**

As primeiras reduções com fermento de pão imobilizado em crisotila (FPI) foram feitas com α-cloroacetofenona **88**, já que o grupo do professor Moran, em conjunto com o nosso[39a], estudou a sua redução com fermento livre (FPL); sendo assim, nós poderíamos

comparar os resultados.



89(S) 88 89(R)

Nas duas primeiras tentativas obteve-se um rendimento químico muito bom, 67%, comparado à do fermento livre, 74%. Nas medidas de rotação óptica, os resultados foram muito menores em relação ao da literatura ($[\alpha]_D^{25}$ -48,1°)[39], obtendo-se -30,6° para a reação com fermento suportado (com um rendimento óptico de 64%) e, -39,3° para o fermento livre (com um R_o=82%). É esperado que os valores de R_o para as reações com fermento suportado sejam menores pois, como citado no ítem 1.4, a imobilização afeta as células do fermento dificultando o acesso do substrato às mesmas.

Os dados espectrais para o álcool **89** obtido estão concordantes com os valores da literatura[39] onde, no espectro de IV, observou-se um desaparecimento da banda em 1694,8 cm^{-1} correspondente à carbonila e o aparecimento de uma banda larga em 3402,9 cm^{-1} correspondente ao grupo **OH** da haloidrina. No espectro de RMN^{1}H, notou-se que, além dos picos característicos do álcool: 2,90 ppm um singleto largo do **OH**; 3,57 - 3,84 ppm um multipleto dos dois hidrogênios do CH_2 e 4,89 ppm um duplo dubleto do **CH** (J = 4,8 e 7,6 Hz) ocorre uma mudança nos picos do grupo fenila: na cetona temos dois multipletos e no álcool eles tornam-se um singleto. Isto ocorre porque na cetona temos um sistema de α,β insaturado e, faz com que os prótons fenílicos não sejam

equivalentes quimica e magneticamente.

Notou-se depois, através de um estudo de tempo mínimo de reação, que a reação com FPI é mais lenta (4 h) que com FPL (2,40 h), pelo mesmo motivo citado acima, da imobilização reter a atividade de algumas enzimas e desativação de outras, além de tornar o acesso à elas mais difícil.

É conhecido que a imobilização afeta muito o comportamento enzimático; Nakamura[26] fez um estudo com vários imobilizantes e, observou uma mudança na estereoquímica do composto reduzido porque, variando-se o suporte, algumas enzimas são inibidas e outras não (ítem 1.4.1). No nosso caso, a crisotila não muda a estereoquímica do produto, obtendo-se o álcool R como quando utilizado FPL. A estabilidade do fermento, entretanto, é aumentada: ele puro tem vida útil de 30 dias e suportado chega até a 6 meses.

A maior vantagem de se utilizar a imobilização é a facilidade no isolamento dos produtos, e que no caso de fermento livre, consiste na extração contínua líquido-líquido num extrator (fig 8) por 40 h. Com imobilizado, filtra-se em funil de Büchner e sucção e extrai-se com solvente orgânico.

Realizou-se um estudo da saturação de FPI pelo substrato que poderia ser utilizado, quando se utiliza 20 g de FPI. A princípio utiliza-se 1 mmol para esta mesma quantidade (R_Q = 67%), mas era necessário verificar se era possível adicionar mais. Observou-se que com 2 mmol obtem-se 54% de álcool e recupera-se 16% da cetona adicionada (3,4:1). Para 5 mmol de substrato, nenhum álcool foi obtido, (foram realizadas duplicatas) e, isso nos levou a pensar que o cloro da α-cloroacetofenona era muito tóxico ao fermento,

prejudicando as células a ponto de não se obter nada de álcool.

Para testar se a concentração afeta muito os valores de *e.e.*, realizou-se uma reação com 1 mmol de α-cloroacetofenona em 100 g de FPI. Notou-se que a diferença entre os valores obtidos com a reação diluída ([α] -32,9°, R_o=68%) e com a reação normal (1 mmol para 20 g de FPI - [α] -30,6°, R_o=64%) é muito pequena. É esperado que na reação mais diluída o *e.e.* seja maior[22], mas nesse caso foi observado ser ligeiramente maior (pode ser erro experimental). O rendimento químico para a reação diluída é menor por causa da grande quantidade de água a ser extraída (5 L). Os dados espectrais estão de acordo aos descritos na literatura.[39]

2.1.6 - Tentativa de reutilização do FPI

A reutilização do FPI foi tentada (ítem 3.2.7) utilizando-se os mesmos catalisadores citados em 3.2.5 e, em nenhum caso conseguiu-se obter o álcool desejado. Dentre os vários métodos utilizados, a lavagem com éter foi testada para eliminar vestígios de cetona que possam ter ficado no catalisador (FPI), e isso ajudou a destruir as células de fermento qué poderiam estar ativas.

O nutriente mencionado no ítem 3.2.7.2 é composto de carboidratos, provavelmente glicose ou frutose, e íons inorgânicos, como cálcio, magnésio, sódio, potássio, manganês, zinco, cobre, ferro, fosfato, cloreto e sulfato.[40]

2.1.7 - Reação utilizando hexano como solvente

A reação descrita em 3.2.8 utilizando-se hexano , não foi bem sucedida, apesar do fermento suportar o solvente. A crisotila não

intumesce e não favorece o contato das células do fermento com o substrato. A agitação foi intensa com agitador mecânico, mas mesmo assim houve uma retração e não se observou nem traços de álcool. Quando se filtrou o catalisador, notou-se um mau cheiro característico de fermento desnaturado.

Nakamura[36] e colab. fizeram reações com FPI em poliuretana e hexano (sem reuso) e, Naoshima[32] e colab. fizeram reações utilizando 10% de hexano, acetato de etila e acetonitrila em água para fermento suportado em alginato de cálcio (ítem 1.4.1). Esse tipo de reação em solvente orgânico é muito útil para substratos que são insolúveis em água, mas com crisotila é impossível. Eles observaram que, com adição de solvente orgânico o rendimento químico varia muito pouco em relação ao sem solvente. Portanto adição de solvente orgânico ao meio reacional não compromete a redução, com a desativação das células do fermento.

2.1.8 - Método 2 - outro meio de cultura

Para tentar o reuso do catalisador mudou-se o meio de cultura, utilizando-se açúcar e KCl 2%. O sal serve como um soro fisiológico para o fermento, restaurando as células que foram utilizadas na redução e, o açúcar regenera o cofator NADPH (ou NADH), que é o fornecedor de elétrons ao substrato. Já foi mencionado (ítem 1.1) que o acetaldeído formado pelo açúcar compete com as enzimas de redução para formar o etanol e que também o fermento não tolera muito etanol[13].

Neste caso, conseguiu-se reduzir o substrato α-cloroacetofenona **88** no uso e reuso do catalisador (ítens 3.2.9 e 3.2.9.1). Quando o segundo reuso foi tentado, não obteve-se nenhum

álcool e, recuperou-se 23% de cetona. Para verificação da eficiência do método, foi realizado esse bloco de reações uso e reuso quatro vezes. Os resultados estão na tabela 17. Os espectros estão concordantes aos da literatura[39] (descrito anteriormente).

Observou-se, porém, que no reuso do primeiro bloco o álcool obtido tinha configuração oposta ao esperado, ou seja S, já que no uso obteve-se o R. Um segundo bloco de reações foi realizado, mas a quantidade obtida de produto era muito pequena e não foi possível fazer a medida de rotação óptica. Novamente tentou-se outro bloco, e no reuso obteve-se o álcool com configuração R, mas com um valor de $[\alpha]_D$ muito pequeno, o produto era quase racêmico. Num quarto bloco observou-se um valor de $[\alpha]_D$ para o reuso bastante alto (+46,6°), com o carbono assimétrico de configuração S, e um valor de R_o muito elevado (97%). Isto concorda com os resultados obtidos para o 1º bloco de reações.

Tabela 17 - Dados referentes aos produtos dos ítens 3.2.9 e 3.2.9

		R_Q (%)	$[\alpha]_D$	c (g/100ml)	R_o (%)	Prod.
I	1ªT	45	- 27,2°	1,80	57	R
	2ªT	22	+ 19,2°	1,78	40	S
II	1ªT	35	- 20,4°	1,77	42	R
	2ªT	2	-	-	-	-
III	1ªT	62	- 33,2°	1,79	69	R
	2ªT	51	- 4,7°	1,80	10	R
IV	1ªT	39	- 24,0°	1,78	50	R
	2ªT	78	+ 46,6°	1,74	97	S

onde 1ªT - uso

2ªT - reuso

I, II, III, IV são os blocos em que são utilizados diferentes FPI

$[\alpha]_D$ - 48,1° (c 1,73, C_6H_{12}) da literatura[39]

Quando se trata de reações com fermento de pão, os resultados nem sempre são reprodutíveis, apesar da mesma marca ser utilizada e as condições de reação serem as mesmas. Isto pode ser devido à grande quantidade de enzimas presentes no fermento e que, as vezes, afeta todo o curso da reação. Se fossem feitas reações com células íntegras (ou culturas de células controladas), os resultados deveriam ser concordantes. Também a atividade do fermento é limitada e decresce com o tempo.

Para a mudança na estereoquímica do produto no reuso, podemos dar uma explicação semelhante à de Nakamura[41], que utiliza cloroacetato de etila na redução de β-ceto ésteres por fermento de pão, para inibir as enzimas pró-R e obter álcoois de configuração

S. Neste caso, ao mesmo tempo em que a redução da α-cloroacetofenona está ocorrendo, também temos uma desativação das enzimas pró-R. Quando o catalisador é submetido ao reuso, as enzimas pró-S são mais ativas, proporcionando então o álcool de configuração S em maior quantidade.

Também, como foi mencionado em 1.4.1, Nakamura[33] fez um outro estudo sobre adição de sais, que podem mudar a estereoquímica do produto na redução de β-ceto ésteres. Em quase todos os casos, a adição de sais contendo íon cloreto muda a configuração do produto. No nosso caso, a utilização de FPI e FPL nos fornecem o álcool (R)-2-cloro-1-feniletanol 89. Já no reuso, a estereoquímica muda, podendo sofrer a influência do íon cloreto do KCl além do mencionado acima.

Chegou-se à conclusão, então, de que se nós quisermos álcoois de configuração S podemos desativar as enzimas pró-R adicionando α-cloroacetofenona 88 ao FPI, filtrando, e fazendo a redução de outro substrato qualquer; deve ter um controle de reação eficiente. De acordo com Nakamura[42], em outro trabalho, para obtenção de álcoois de configuração R basta adicionar álcool alílico que as enzimas pró-S são desativadas.

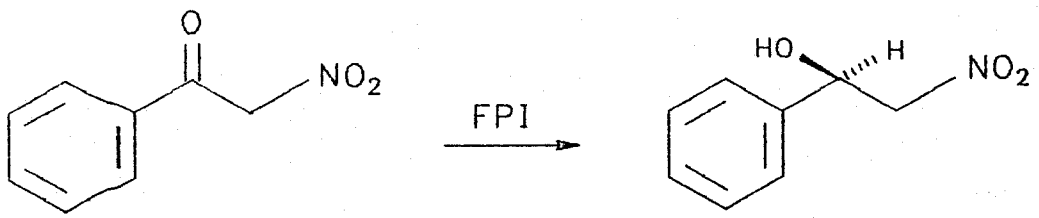
2.1.9 - Outros tipos de fermentos desidratados

Utilizou-se dois tipos de fermento desidratado, livres, em reações de redução: um da Sigma (pó) e um da marca Fleischca Fleisc (granular). A reação com o fermento desidratado da Sigma não reduz a α-cloroacetofenona, talvez por ter algumas enzimas redutoras desativadas na desidratação. Recuperou-se 21% da cetona adicionada. Já a reação com o fermento desidratado da Fleischmann,

reduziu o substrato com um rendimento razoável, 44%, e recuperou-se apenas 0,43% da cetona adicionada. O $[\alpha]_D$ medido para o **89** foi de $-44,3^\circ$ com um R_o de 92%, muito elevado em relação aos obtidos anteriormente. Os espectros do produto estão concordantes aos da literatura.[39]

2.1.10 - Redução do α-nitroacetofenona **90**

Nas reações de redução do α-nitroacetofenona[43] **90**, descritas em 3.2.12, apenas em uma delas pôde-se observar vestígios de álcool **91** no RMN^{1}H. Nas demais não se identificou nada nos espectros pois, a quantidade de produto isolado foi muito pequena e não foi possível fazer uma purificação. O reagente, assim como o produto, são muito instáveis e se decompõem facilmente em solução. A redução da α-nitroacetofenona é importante na obtenção de intermediários para a síntese de fármacos importantes.

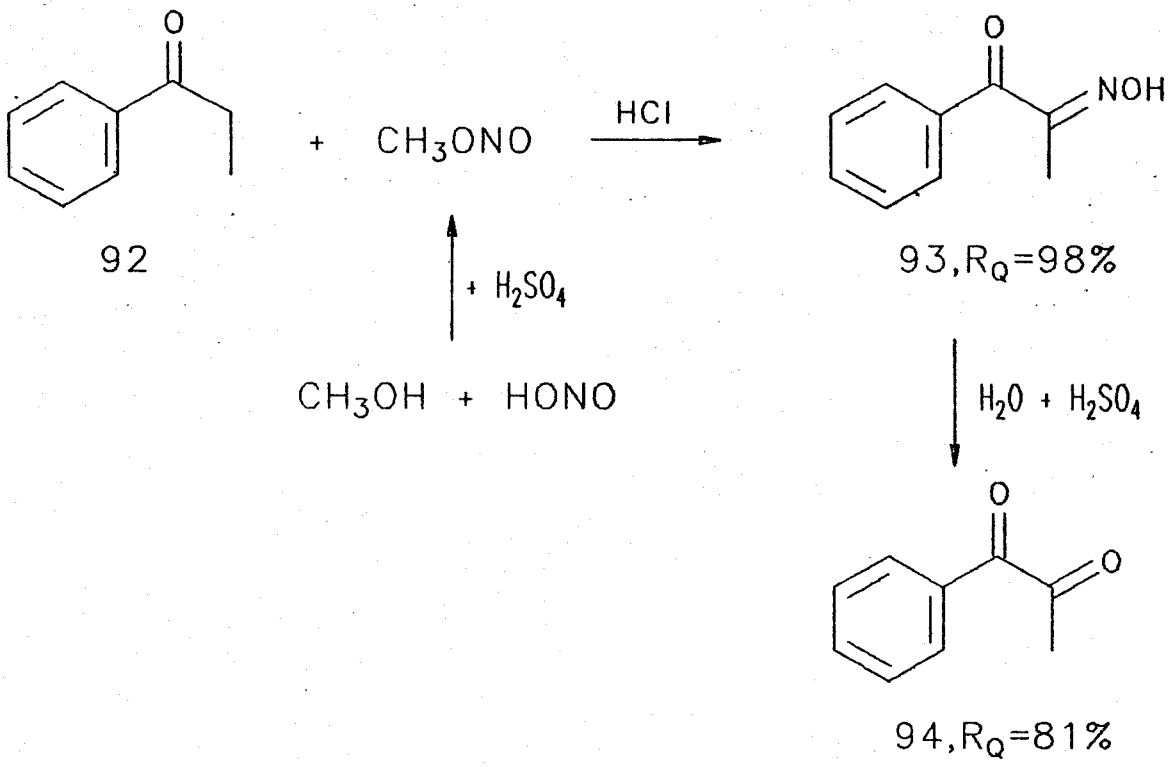


90 **91**

2.2 - Síntese de novos substratos para redução com *S. cerevisiae*

2.2.1 - Síntese do 1-fenil-1,2-propanodiona **94**

Passou-se então a estudar outros substratos que foram reduzidos com fermento livre. Para isto, sintetizamos o 1-fenil-1,2-propanodiona **94**, a partir da propiofenona **92**:



A síntese é simples e envolve duas etapas: na 1ª a geração dos gases deve ser feita simultaneamente, numa velocidade para que o éter refluxe devagar e, com o cuidado de não refluxar a solução etérea para os frascos geradores de gases (fig 9). No restante, a extração, precipitação e cristalização do produto é muito fácil. A reação é praticamente quantitativa com rendimento de 98%. Os dados espectrais estão de acordo com a literatura[44]: o espectro de IV do 93 apresentou uma banda larga em 3238,2 cm^{-1} relativa ao **OH** da oxima e em 1660,3 cm^{-1} da carbonila, onde o grupo **C=N** está sobreposto.

O espectro de RMN^{1}H do 93 apresentou um singleto em 2,15 ppm do grupo **CH_3**, um tripleto em 7,43 ppm (J =6,46 e 7,38 Hz) relativo aos prótons *meta* do fenil, um tripleto em 7,56 ppm (J = 7,38 Hz) relativo aos prótons em *para* do fenil e um dubleto em

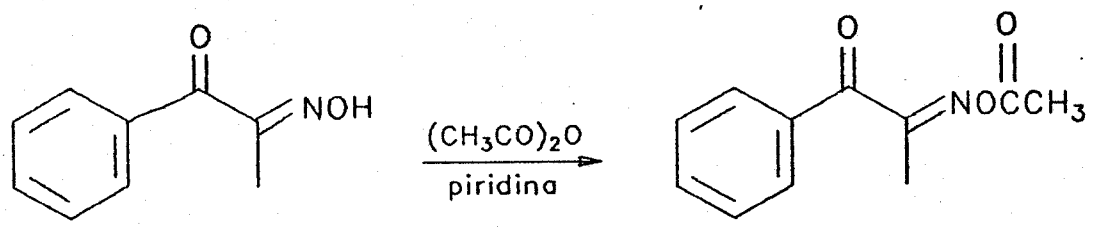
7,86 ppm (J = 6,46 Hz) relativo aos prótons em *orto* do fenil, todos em relação à carbonila e um singleto em 8,89 ppm do **H** do **NOH**. Os hm *orto* estão em campo mais baixo que os em *para* e *meta*, devido à sua grande proximidade à carbonila que retira elétrons do anel por ressonância, fazendo com que eles fiquem mais desprotegidos.

O espectro de RMN^{13}C do **93** foi registrado para servir de modelo para as sínteses posteriores e apresentou: um pico em 10,21 ppm relativo ao **CH_3**, um pico em 128,42 ppm relativo aos carbonos *meta* à carbonila do fenil, um pico em 130,45 ppm relativo aos carbonos *orto* em relação à carbonila, um pico em 133,06 ppm do carbono em *para* e um pico em 136,62 ppm do carbono *ipso*. O pico em 157,14 ppm é relativo ao **C=N** e o pico em 192,20 ppm é relativo ao carbono da carbonila **C=O**.

Na 2ª etapa, na destilação com arraste a vapor, não se encontrou dificuldades também. O produto **94**, entretanto, é muito volátil e uma destilação para purificação causa uma perda considerável de produto; ainda assim, obteve-se um rendimento de 87%. Os dados espectrais obtidos para o produto **94** estão de acordo com a literatura[45] e, o espectro de IV do **94** apresentou duas bandas em 1712,9 e 1674,0 cm^{-1} relativas às carbonilas. Observou-se no RMN^{1}H um singleto do **CH_3** em campo ligeiramente mais baixo (2,20 ppm) que no caso da oxima (2,15 ppm).

2.2.2 - Síntese do O-acetil-1-fenil-2-oxima-1,2-propanodiona **95**

Tomando-se o composto **93**, sintetizou-se o O-acetil-1-fenil-2-oxima-1,2-propanodiona **95**:

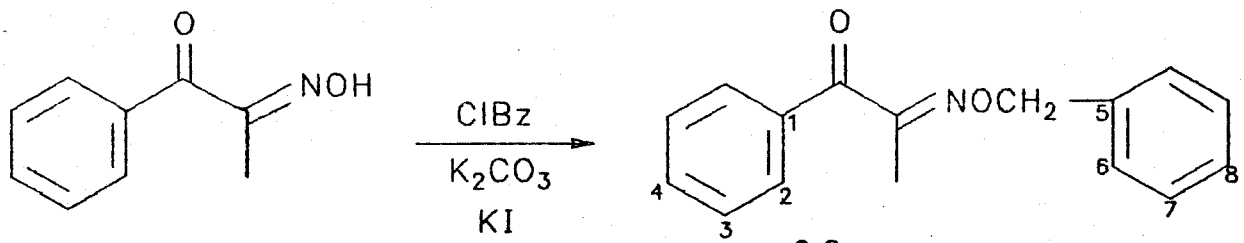


93 95

Este composto é feito a partir do **93** com adição de piridina e anidrido acético. A reação é simples e os espectros apresentaram: o de IV, duas bandas de carbonila em 1775 e 1670 cm^{-1}, sendo que a do **C=N** que deve estar sobreposta à uma delas, e observou-se um desaparecimento da banda larga de **OH** em 3238,2 cm^{-1} da oxima. Pelo espectro de RMN^{1}H observou-se o aparecimento de 2 singletos de **CH_3** em 2,20 e 2,24 ppm, além dos multipletos dos prótons da fenila e o desaparecimento do singleto em 8,46 ppm do **OH** da oxima.

2.2.3 - Síntese do O-benzil-1-fenil-2-oxima-1,2-propanodiona **96**

Uma síntese foi realizada para produção do composto O-benzil-1-fenil-2-oxima-1,2-propanodiona **96**, e o procedimento também é simples. No isolamento do produto encontrou-se alguma dificuldade porque o excesso de cloreto de benzila é um contaminante difícil de ser removido. Eluiu-se então numa coluna cromatográfica com solvente pouco polar para haver a separação. O rendimento químico (69%) foi muito bom, porque o método foi adaptado de outra síntese.



93 96

A caracterização do produto foi completa pois não se encontrou nenhum dado sobre ele na literatura. Na análise elementar obteve-se: C 75,94%, H 5,96%; N 5,28% e O 12,82%. Os valores calculados são: C 75,89%, H 5,93%, N 5,53% e O 12,65%. Por essa análise pode se concluir que o composto foi sintetizado com sucesso, pois as pequenas diferenças observadas são consideradas dentro do erro.

Os espectros apresentaram: o de IV do **96** uma banda em 1661,8 cm^{-1} da carbonila e a do **C=N** neste caso, pode estar sobreposta à da carbonila, além do desaparecimento da banda larga do **OH** em 3238,2 cm^{-1}. O RMN^{1}H do **96** apresentou um singleto em 2,14 ppm relativo ao **CH_3**, outro singleto em 5,22 ppm do **CH_2**, um singleto em 7,35 ppm relativo aos prótons uma das fenilas; um tripleto na região 7,29 - 7,37 ppm relativo aos prótons *meta*, que estão sobrepostos ao pico do anel em 7,35 ppm; um tripleto em 7,46 ppm (J= 7,50 e 6,82 Hz) relativo ao próton *para* e um dubleto em 7,81 ppm (J= 6,82 Hz) relativo aos prótons *orto* do anel fenila.

O espectro de RMN^{13}C foi analisado tomando-se o do composto **93** como modelo e também o álcool benzílico[46]. O espectro apresentou: um pico em 10,81 ppm relativo ao **CH_3** e um pico em 77,33 ppm relativo ao **CH_2**. Os picos dos anéis fenila foram atribuídos de acordo com os modelos e chegou-se a conclusão de que: 127,96 ppm foi atribuído ao carbono 3 ; 128,34 ppm o carbono 8; 128,59 ppm o carbono 6; 128,76 ppm o carbono 7; 130,89 ppm o carbono 2; 132,69 o carbono 4; 136,45 o carbono 1 e 137,32 o carbono 5.

Foi realizado também um espectro de massa, em um aparelho CG-EM (cromatógrafo gasoso acoplado ao espectrômetro de massa), e

obteve-se fragmentos em (m/z): 51,00 (19,56%) que foi atribuído a um $C_4H_3^+$; 65,05 (6,71%) que pode ser de $C_5H_5^+$; 77,00 (36,84%) que pode ser de $C_6H_5^+$; 91,15 (100%) que pode ser $C_7H_7^+$; 105,05 (18,84%) que pode ser $PhCO^+$; 132,15 (0,14%) que pode ser do $PhCOCH_2CH_3^+$ e finalmente o íon molecular em 253,15 (0,79%). O cromatograma apresentou um pico bastante intenso e uma pequena impureza.

Estas sínteses foram realizadas para tentar reduzir a carbonila dos compostos **93** ,**95** e **96** com o FPI e, depois transformar os demais grupos (oxima, acetato e benzila) em carbonila. Estes compostos ceto-álcoois são muito úteis na indústria farmacêutica.

2.3 - Redução dos derivados de $PhCOCXCH_3$

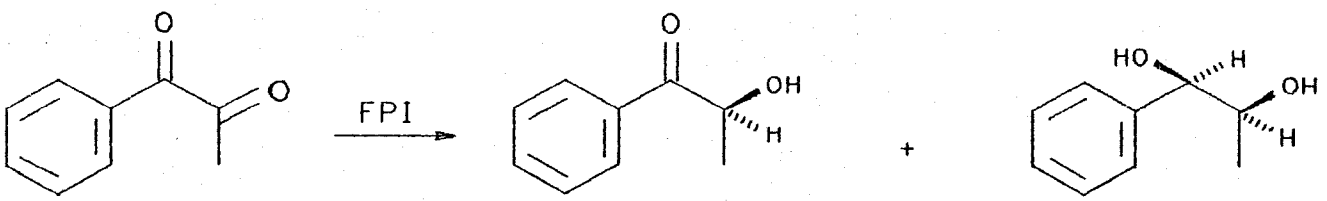
2.3.1 - Crisotila

2.3.1.1 - Redução de **94**

As reduções com o composto **94** utilizando-se o método 1 (ítem 3.2.17), forneceu o álcool (-)-(S)-2-hidroxi-1-fenilpropanona **97**. A configuração foi determinada por comparação dos valores de $[\alpha]_D$. Os espectros apresentaram para o **97**: o IV uma carbonila em 1672,9 cm^{-1} e em 3334,5 cm^{-1} uma banda larga relativa ao **OH** do álcool. O espectro de RMN^{1}H apresentou um dubleto em 1,44 ppm do CH_3, um multipleto em 5,10 - 5,20 ppm do $\underline{CH}$-CH_3. Os prótons da fenila estão na região de 7,20 - 7,94 ppm. O espectro apresenta um pico em 2,19 ppm que foi atribuído ao CH_3 da dicetona de partida, além de apresentar multipletos da dicetona sobrepostos aos do monoálcool. O que pode estar ocorrendo é uma oxidação lenta do monoálcool com o ar e produzindo a dicetona. Observou-se, porém, um

singleto em 2,19 ppm que pode ser relativo ao CH_3 do 1-hidroxi-1-fenil-2-propanona[47] que está em equilíbrio ceto-enólico com o composto **97**. O composto foi purificado fazendo-se cromatografia de camada espessa duas vezes, e ainda assim, apresentou estas impurezas. Os dados espectrais do **97** estão de acordo aos da literatura.[47] Nas referências encontradas não foi citado se o composto era instável ao ar ou não.

O rendimento químico não foi bom (31%) devido à solubilidade do álcool em água e a grande quantidade a ser extraída. O produto **97** apresentou um $[\alpha]_D$ $-74,4^\circ$ e em relação à literatura[49] ($-86,7^\circ$). Os valores de $[\alpha]_D$ não são comparáveis devido à sua decomposição. Obteve-se uma pequena quantidade do álcool **98**, 5%.



94 97 98

No reuso, após o catalisador descansar em geladeira por 3 dias com açúcar e solução KCl 2%, obteve-se os dois álcoois **97** (27%) e **98** (5%), mas com uma porcetagem de **98** maior que no uso, em relação ao **97**, talvez por causa do açúcar do repouso da geladeira. Quando tentou-se o reuso deixando o catalisador em repouso apenas com água em geladeira, não foi conseguido nenhum álcool, e recuperou-se pouca quantidade de reagente (8%).

Utilizando-se o método 2 para a redução do composto **94**, obteve-se o álcool **98** com 23% de rendimento. Os dados espectrais, que estão de acordo com a literatura[50] nos forneceram: no IV uma

banda larga em 3383,6 cm^{-1} dos grupos **OH** e houve o desaparecimento das duas carbonilas nas regiões entre 1600 e 1800 cm^{-1}. O RMN^1H apresentou um dubleto em 1,00 ppm (J= 5,80 Hz) do CH_3, um singleto largo em 3,01 ppm relativo aos dois hidrogênios dos grupos **OH**, um multipleto em 3,90-3,98 ppm do $\underline{CH}\text{-}CH_3$, um dubleto em 4,62 ppm (J= 3,87 Hz) do $\underline{CH}\text{-}CH\text{-}CH_3$ e um singleto dos prótons do grupo fenila em 7,30 ppm.

Nos reusos (tabela 18) obteve-se rendimentos químicos muito pequenos, devido à grande solubilidade do diol em água e a grande quantidade a ser extraída (chegando a 6 L). No 4º reuso, para diminuir a quantidade de água a ser extraída, a reação foi realizada em uma coluna, com o auxílio de uma bomba peristáltica para haver reciclagem da solução. A reação é muito lenta, e os R_Q e R_o caem bastante.

Tabela 18 - Dados referentes aos produtos **98**

	R_Q (%)[a]	$[\alpha]_D$	c (g/100ml)	R_o (%)
1ªT	23	- 37,7°	1,24	94
2ªT	15	- 36,6°	1,22	91
3ªT	25	- 38,4°	1,33	96
4ªT	18	- 36,6°	1,28	92
5ªT[b]	17	- 30,0°	1,21	75

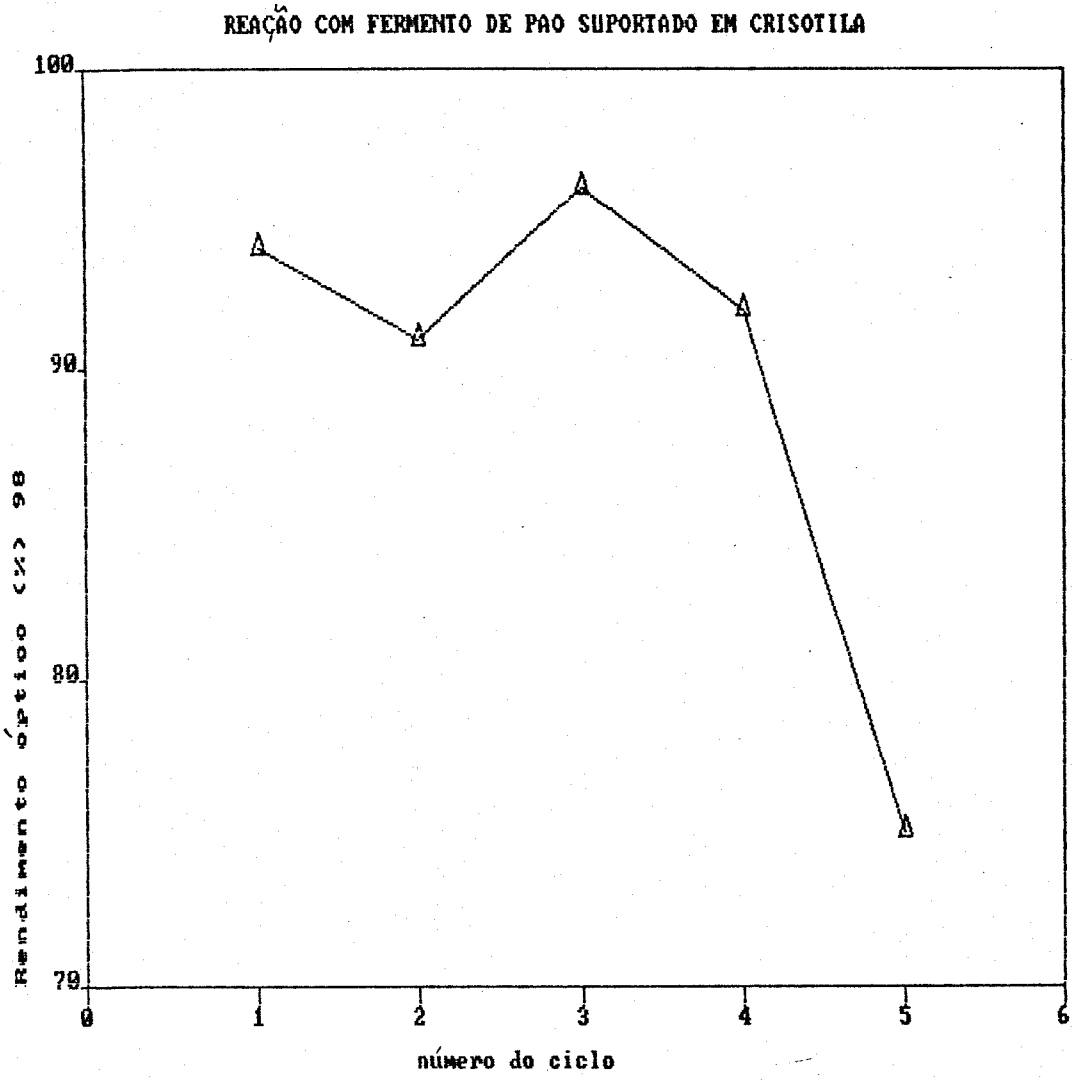
$[\alpha]_D$ - 40,0° (c 1,0, $CHCl_3$) da literatura [48]

a) foi isolado em média 1% do álcool **97**

b) reação feita em uma coluna acoplada a uma bomba peristáltica

Os resultados obtidos de rendimento óptico foram plotados em

um gráfico:

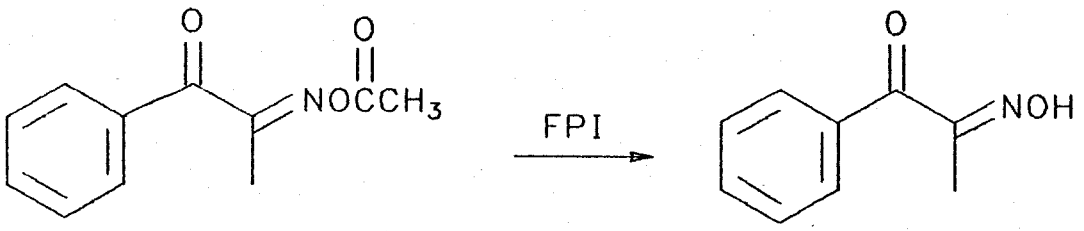


Observa-se que na 3ª reação obtém-se um R_o maior, e na 5ª, que foi feita em coluna, abaixa muito. As reações feitas pelo grupo do prof. Moran[50], com fermento livre forneceram somente o diol 98, com ou sem adição de açúcar, e os valores de R_Q foram muito maiores, por causa do sistema de extração, mas os valores de $[\alpha]_D$ foram semelhantes, chegando a ser maior com FPI.

	$[\alpha]_D$	R_Q
com açúcar -	$-37,6^\circ$	74
sem açúcar -	$-44,3^\circ$	67

2.3.1.2 - Redução de **93** e **95**

A reação com o composto **93** não foi bem sucedida, a redução da carbonila não foi efetuada e recuperou-se 98% do reagente adicionado. No caso da reação com **95** ocorre uma hidrólise do acetato, obtendo-se o composto **93**, a oxima, com 57% de rendimento.



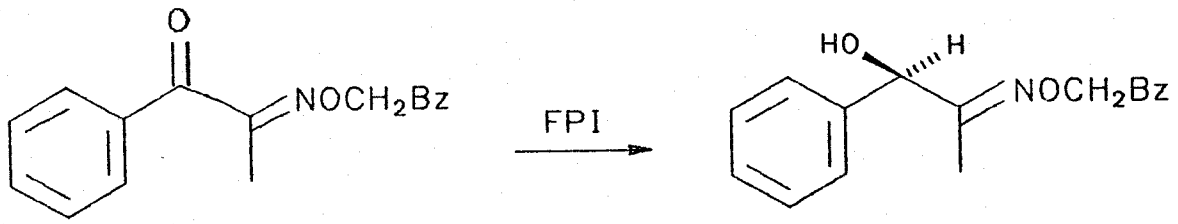
95 **93**

2.3.1.3 - Redução de **96**

Já na redução de **96**, conseguiu-se reduzir a carbonila, e obteve-se o álcool **99**, com um R_Q=23%. Os dados espectrais apresentaram: o de IV uma banda larga em 3405,7 cm^{-1} relativo ao grupo **OH**, e um desaparecimento da banda em 1661,8 cm^{-1} da carbonila da cetona. O RMN^{1}H apresentou um singleto em 1,68 ppm do **CH_3**, um singleto largo em 3,78 ppm do **OH**, outro singleto em 5,16 ppm do **CH_2**, um singleto em 5,17 ppm do **CH** e dois singletos em 7,30 e 7,31 ppm relativos aos prótons dos anéis fenila. O composto foi submetido a cromatografia de camada espessa duas vezes, e ainda assim apresentou esses picos.

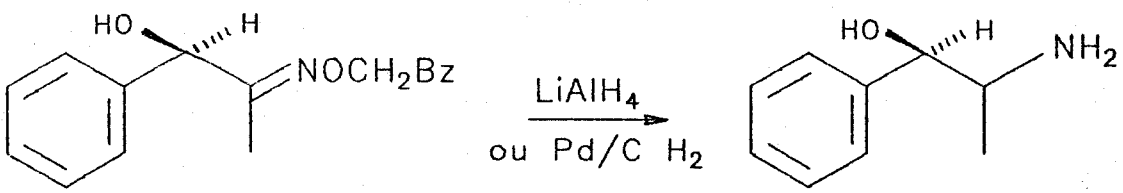
O cromatograma do composto nos mostra cinco picos e observou-se que a amostra estava bastante impura. Chegou-se à conclusão que o nosso composto era o que saiu em 13,32 minutos e pela análise do massa, obteve-se: 51,00 (20,40%) que pode ser

atribuído ao íon $C_4H_3^+$; 65,00 (11,11%) que pode ser $C_5H_5^+$; 77,00 (41,67%) que pode ser $C_6H_5^+$; 91,15 (100%) que pode ser do $C_7H_7^+$; 105,15 (10,91%) que pode ser do $PhCO^+$; 147,05 (14,17%) que pode ser do $PhCOHCNCH_2^+$ e 108,15 que pode ser do $PhCH_2OH$. Neste caso não aparece o íon molecular do composto que deveria estar em 255.



96 99

A remoção do grupo O-benziloxima pode ser feita com $LiAlH_4$[51a] ou com H_2-Pd/C[51b] para produzir o amino álcool **100** (a noradrenalina).



99 100

A redução da dicetona **94** foi realizada por Mousset[47] através de proteção da carbonila do carbono 2 por um grupo ditiol e, em seguida uma redução microbiológica. A desproteção é feita por eletroquímica e obtém-se novamente a carbonila.

2.4 - Montmorilonita K10

Devido ao alto poder de intumecimento da crisotila em água, acarretando problemas no isolamento do produto por causa da grande quantidade de solvente a ser extraído, decidiu-se mudar o

imobilizante para a montmorilonita K10, que é um pó fino e não intumesce.

2.4.1 - Testes de expansão e fermentação

Realizou-se testes de expansão em solventes orgânicos, semelhantes aos realizados para crisotila. Os resultados estão na tabela 19.

Tabela 19 - Teste de emulsão para o K10

	Grau de emulsão
Água	emulsão total (demora para decantar)
Metanol	emulsão total (demora para decantar)
Etanol	emulsão total (demora para decantar)
Acetona	emulsão total (demora para decantar)
Hexano	não emulsiona
Clorofórmio	não emulsiona
Acetato de Etila	emulsão parcial (decanta rápido)
Éter Etílico	não emulsiona
Diclorometano	não emulsiona
Acetonitrila	emulsão total (demora para decantar)
Tetrahidrofurano	emulsão parcial (decanta rápido)
Benzeno	não emulsiona

Podemos notar que solventes como água, *meta*nol, etanol, acetona e acetonitrila emulsionam totalmente. E em acetato de etila e tetrahidrofurano sofre emulsão parcial; nos demais que não emulsionam, as reações tornam-se difíceis de serem realizadas por falta de contato do substrato com as enzimas.

A imobilização com K10 é feita exatamente como para crisotila, mas a filtração é mais lenta. O pó mais fino entope um pouco o papel de filtro, por isso demora mais. Mesmo assim, a etapa não oferece problemas. A fermentação do açúcar com fermento imobilizado em K10 não ocorre, não se observa evolução de CO_2 no sistema (fig 7). Isto pode ser explicado porque talvez quando se faz a imobilização algumas enzimas fermentativas foram inibidas ou desativadas.

2.4.2 - Redução da α-cloroacetofenona **88**

As reduções foram realizadas com sucesso. A primeira foi feita com α-cloroacetofenona **88** e, de acordo com os espectros, obteve-se a haloidrina **89**, com um R_Q=59% semelhante ao obtido para crisotila (67%), e $[\alpha]_D$ -29,4° (R_o=61%) para o K10, quando para crisotila $[\alpha]_D$ -30,6° (R_o=64%). Não foi possível o reuso do catalisador, assim como para a crisotila, e recuperou-se 11% da cetona adicionada.

2.4.3 - Redução de 1-fenil-1,2-propanodiona **94**

Com o K10 imobilizando fermento e o método 2, reduziu-se a dicetona **94**, obtendo-se o diol **98** em maior proporção (R_Q=47%) que o álcool **97** (R_Q=2%). Nesta reação mediu-se os valores de pH, e notou-se um abaixamento no mesmo após cada adição de reagente. Ao final da reação ele estava em torno de 3,6 e, pode-se concluir que a reação se mantém a pH ácido ao longo de toda a reação. Isto é um sinal de que ao mesmo tempo em que a redução está ocorrendo, também está havendo a fermentação do açúcar.

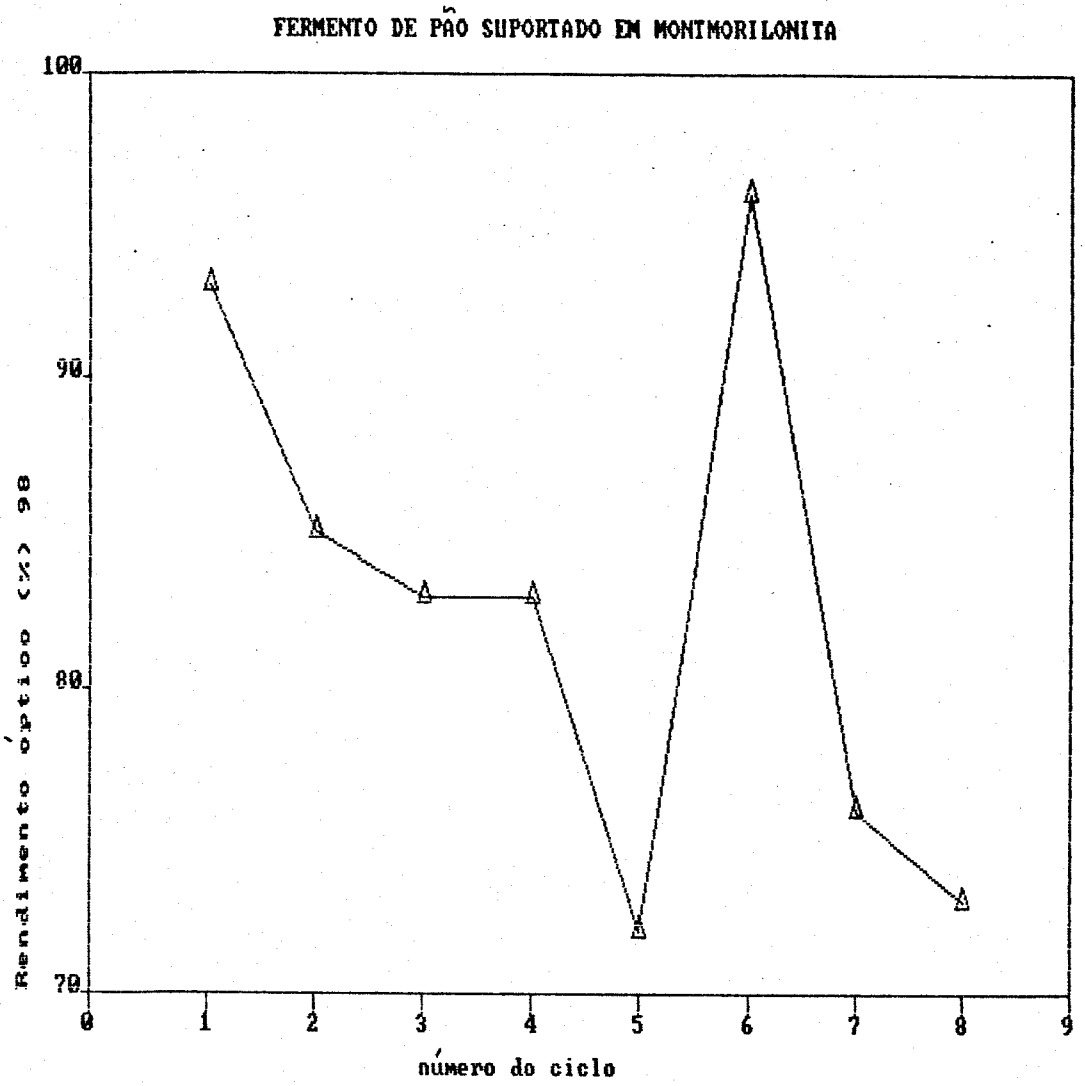
O catalisador foi submetido a 7 reusos (tabela 20) e

observou-se que os valores de rendimentos químicos aumentaram muito em relação aos valores obtidos para as reações feitas em FPI-crisotila (tabela 18). Isto é devido à menor quantidade de água a ser extraída no sistema FPI-K10 (chega a ser *meta*de do volume).

Tabela 20 - Dados referentes aos produtos **98**

	R_Q (%)	$[\alpha]_D$	c (g/100ml)	R_o (%)	R_Q (%) **97**
1ª T	47	- 37,3°	1,25	93	2
2ª T	22	- 33,9°	1,26	85	3
3ª T	25	- 33,1°	1,28	83	2
4ª T	33	- 33,1°	1,28	83	3
5ª T	23	- 28,8°	1,26	72	4
6ª T	30	- 38,4°	1,22	96	4
7ª T	39	- 30,2°	1,27	76	5
8ª T	35	- 29,2°	1,24	73	5

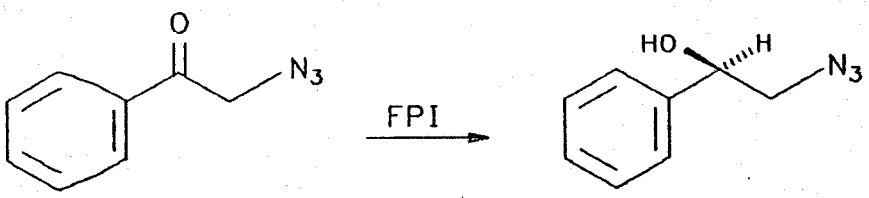
Já os valores de rendimento óptico são menores com K10, mas continuam altos. Estes resultados foram plotados em um gráfico e observou-se que na 5ª reação o valor de R_o cai a 72% e na 6ª sobe para 96%. Isto até agora não é bem compreendido, já que as condições de reação foram as mesmas. Após esta subida, na 7ª e 8ª reações os valores caem novamente. Neste ponto não foi realizada mais nenhuma reação, mas acredita-se que era possível continuar a reduzir, pois Nakamura[30] conseguiu repetir 12 vezes a reação para o mesmo FPI.



2.4.4 - Redução da α-azidoacetofenona **101**

A α-azidoacetofenona **101**, que é um intermediário interessante para a obtenção de fármacos adrenérgicos, foi reduzida microbiologicamente com FPI-K10, e os resultados foram surpreendentes. Este composto havia sido reduzido com FPL por Marques[52], que obteve o álcool **102** com o método 2 e ainda adicionando $ZnSO_4$, um rendimento químico de 12%, com um valor de $[\alpha]_D^{24}$ -69,6° (c 3,01, $CHCl_3$). O que obteve-se com FPI foi um R_Q=36% e $[\alpha]_D^{25}$ -62,7° (c 3,09, $CHCl_3$). No reuso do catalisador obteve-se R_Q=45%, com um $[\alpha]_D^{25}$ -68,3° (c 2,99, $CHCl_3$). Na

literatura[53] encontrada só foi obtido o álcool racêmico, portanto não se pode comparar valores de $[\alpha]_D$.



101 102

Os espectros estão de acordo com a literatura[53]: o IV apresentou uma banda larga em 3390 cm^{-1} relativa ao **OH** do álcool, uma banda intensa em 2090 cm^{-1} relativa ao grupo N_3 e o desaparecimento da banda da carbonila em 1697 cm^{-1}. O RMN^1H apresentou um singleto largo em 2,88 ppm relativo ao **H** do grupo **OH**, um dubleto em 3,22 ppm do grupo CH_2, um duplo dubleto em 4,69 ppm relativo ao **CH** (com J=8 e J=12 Hz) e um singleto em 7,24 ppm do grupo fenila.

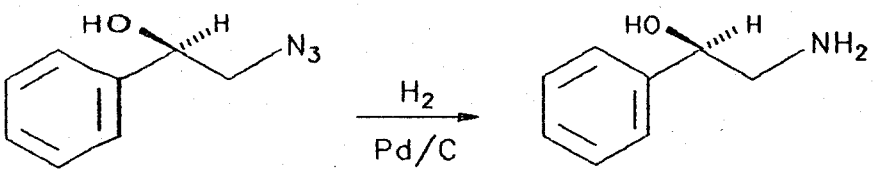
2.5 - Redução catalítica do (-)-(R)-2-azido-1-feniletanol **102**

Para haver meios de se obter informações sobre a pureza óptica dos compostos foi realizada uma redução do grupo azido com H_2-Pd/C e obteve-se o (-)-(R)-2-amino-1-feniletanol **103**. O produto pôde ser cristalizado e obteve-se um R_Q= 93%, com um PF = 54,4 - 55,2°C que é semelhante ao da literatura[54] (55 - 57°C). Os espectros apresentaram: o IV uma banda em 3370 cm^{-1} do NH_2 e uma em 3030 cm^{-1} do **OH**. O de RMN^1H apresentou um multipleto um 2,75 ppm do CH_2, um duplo dubleto em 4,55 (J = 5,6 e 8,0 Hz) do CH e um singleto do fenila em 7,23 ppm. O $[\alpha]_D$ apresentou um valor de -47,3° que de acordo com a literatura[54] (+47,9° para o S), obteve-se um R_o= 99%.

Os resultados do aminoálcool do reuso foram muito bons, porém

um pouco menores: R_q = 85%, PF = 53,4 - 54,6°C e $[\alpha]_D$ -51,5° com R_o = 85%.

A síntese deste composto foi realizada anteriormente por alguns pesquisadores utilizando catalisadores quirais[55a,b,c] e, através de métodos pouco utilizados[54,55d] como reações com compostos com centro quiral.



102 103

CONCLUSÃO

O método utilizado de FPI é muito vantajoso em relação à estabilidade do fermento e facilidade de isolamento dos produtos, economizando-se muito tempo. Os rendimentos são próximos aos obtidos com FPL.

Os argilo-minerais são pouco utilizados para imobilizações de enzimas, e nunca o foram para reduções como neste trabalho. A sua vantagem é que não exige nenhuma técnica especial na imobilização, pois é feita por adsorção.

Apesar da crisotila intumescer muito em água, o que traz algumas desvantagens, ela é de fácil acesso no mercado nacional e, os valores de rendimento óptico e químico foram semelhantes aos obtidos para FPL. Os valores de rendimento óptico, em alguns casos, foram excelentes e maiores do que os obtidos com o fermento livre e com montmorilonita. Este é um reagente comercial e, nos fornece rendimentos químicos maiores que os obtidos para a crisotila, pois a quantidade de água extraída é a metade do volume. A mudança de suporte foi realizada pois a crisotila intumesce demais, apesar de no início ser estudado um método de maximizar a sua expansão.

Todos os compostos reduzidos, com exceção da α-nitroacetofenona, apresentaram resultados muito satisfatórios, e no caso do α-azidoacetofenona, surpreendentes: os valores de rendimento químico foram muito superiores aos esperados.

O reuso do catalisador foi conseguido até 8 vezes com o mesmo fermento, para alguns substratos, e isto é semelhante aos resultados encontrados na literatura para suportes diferentes dos

estudados.

Através da imobilização em crisotila e utilizando-se a α-cloroacetofenona, pode ser feito um controle estereoquímico do produto desejado. Este é o método mais simples e barato para obter-se produtos opticamente puros, na configuração necessária em sínteses mais complexas e de produtos farmacêuticos.

CAPÍTULO 3 - PARTE EXPERIMENTAL

3.1 - Informações Gerais

3.1.1 - Aparelhagem utilizada

- Bruker AW-80, Bruker AC-300P e Varian Modelo Gemini 300 para espectros de RMN^{1}H e RMN^{13}C, utilizando $CDCl_3$ como solvente e TMS (tetrametilsilano) como padrão interno
- Perkin-Elmer 1430 (absorção de 1601 cm^{-1} de um filme de poliestireno para referência) e 1600 séries FTIR para espectros de IV , utilizando cela de cloreto de sódio ou pastilha de brometo de potássio
- Polarímetro da Carl Zeiss, modelo Polamat A com lâmpada de Hg, a 546 nm e Carl Zeiss, modelo 373147 com lâmpada de sódio, a 589 nm
- Espectrômetro de massa Varian 311-A
- HPCG modelo 5988A
- Analisador elementar modelo 2400 CHN, da Perkin-Elmer
- Ultra-som (Sonifier B-12/25 KHz) do tipo "ponta"
- Bomba dosadora peristáltica, da Milan série P-200
- Peneira Tyler 250, abertura 0,062 mm
- pHmetro da Micronal, modelo B375 utilizando-se eletrodo de vidro combinado ao de referência ($Ag^{\circ}/AgCl$)
- Aparelho Reichert para pontos de fusão (placa de aquecimento acoplada e microscópio Metter FP-5)
- Aparelho para destilação tipo *Kugelrohr*, da Aldrich Chemical Co.
- Microscópio metalográfico Carl Zeiss "Iena"

3.1.2 - Observações

Os solventes foram retirados com evaporador rotativo, e tratados de acordo com os procedimentos descritos em Vogel.[56]

Para as separações cromatográficas realizadas em coluna foi utilizada sílica gel (Merk). Nas cromatografias de camada delgada foram utilizadas suspensões de gel de sílica 60 HF_{254} (Merk) em água destilada, distribuídas sobre placa de vidro de 20 x 5 cm e reveladas com lâmpada ultravioleta (254 nm). Nas cromatografias preparativas foram utilizadas suspensões de gel de sílica 60 GF_{254} (Fluka), distribuídas sobre a placa de vidro de 20 x 20 cm e reveladas na mesma lâmpada anterior.

O solvente utilizado para ressonância $CDCl_3$ apresentou um pico de impureza em 1,55 ppm e um pico em 7,26 ppm do $CHCl_3$, que aparecem em todos os espectros. O KBr utilizado para as pastilhas dos IVs continha água e apresenta uma banda larga entre 3.200 e 3.500 cm^{-1}.

A conversão do $[\alpha]_{Hg}$ para $[\alpha]_{Na}$ foi feita utilizando-se as seguintes fórmulas:[57]

$$[\alpha]^{T}_{Hg} = 1,17543\ [\alpha]^{T}_{Na}$$

$$[\alpha]^{T}_{D} = \frac{[\alpha]^{T}_{Na}}{c(g/100\ mL) \times l(dm)}$$

onde:

$[\alpha]^{T}_{D}$ - rotação específica

$[\alpha]^{T}_{Hg}$ - rotação lida no aparelho

c(g/100 mL) - concentração da amostra

l(dm) - comprimento da cela (0,2)

T(°C) - temperatura

3.1.3. Alguns reagentes:

- montmorilonita K10
- fermento da marca Itaiquara
- crisotila bruta obtida da mina de Canabrava em Uruaçú - GO.

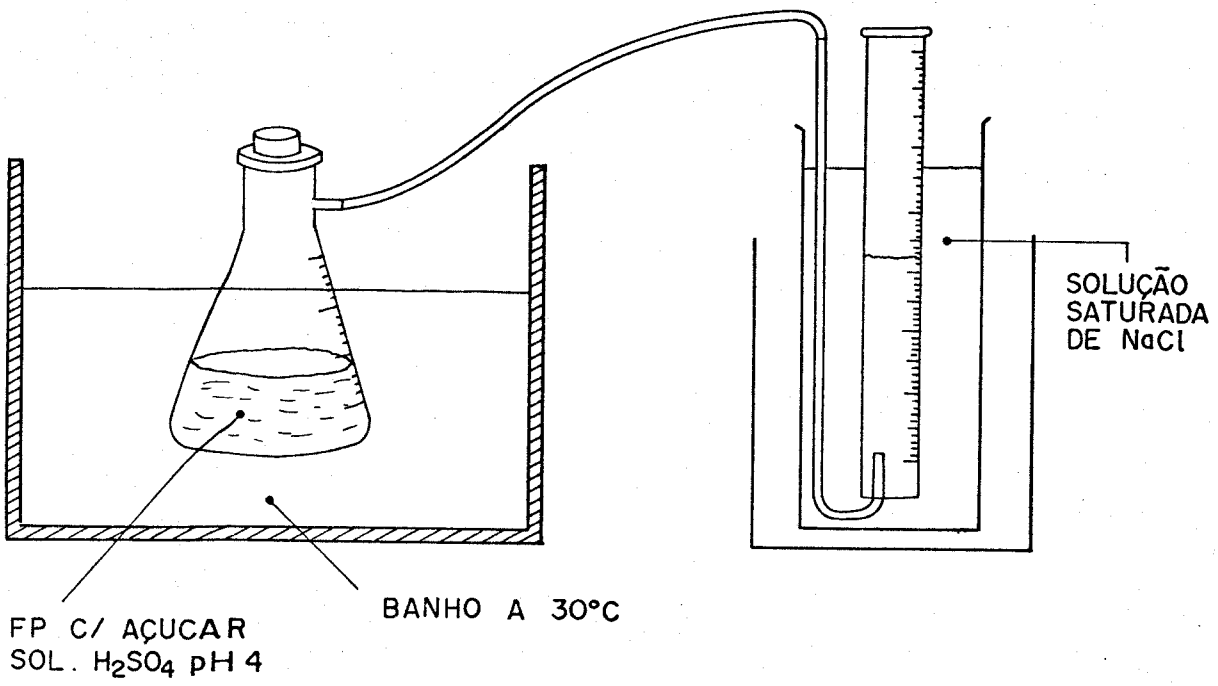


Fig 7 - Sistema de borbulhamento de CO_2

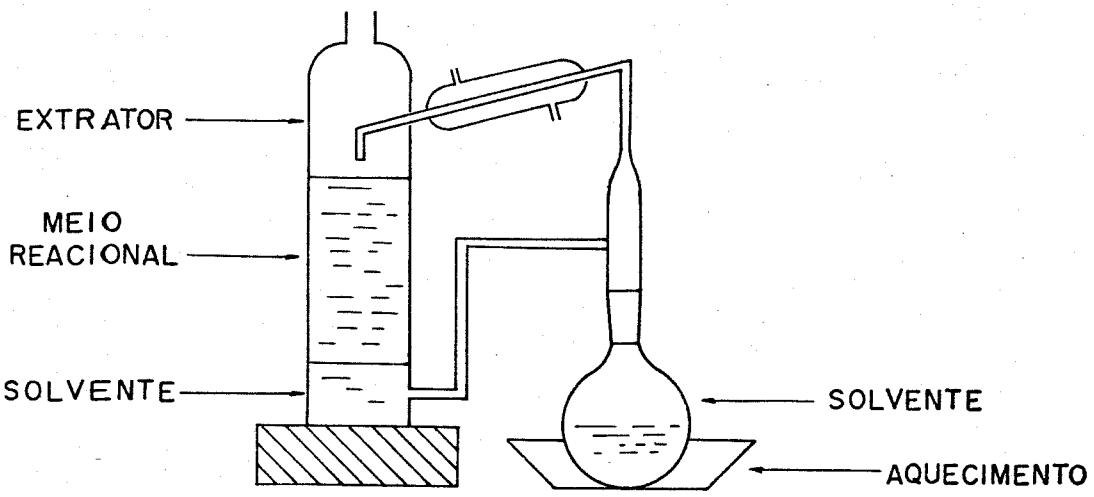


Fig 8 - Extrator contínuo líquido-líquido

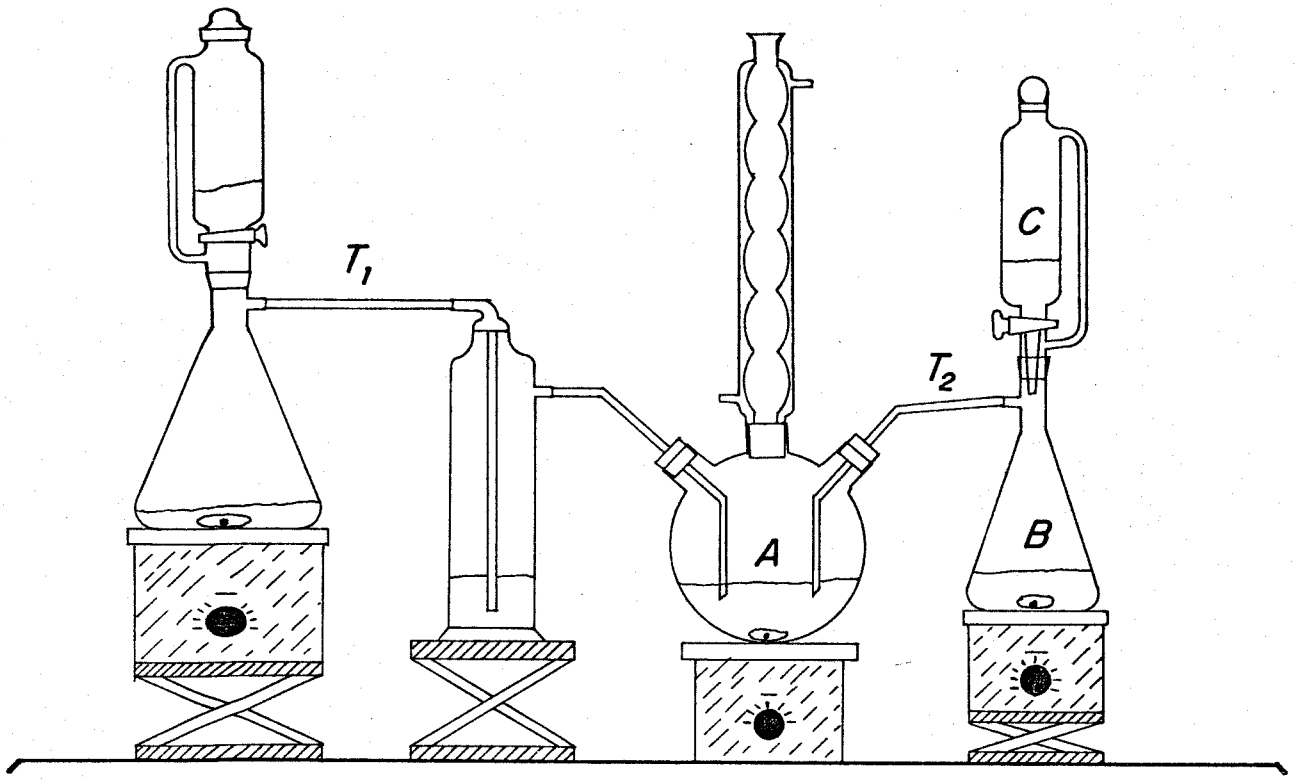


Fig 9 - Geração de gases da reação descrita em 3.2.13

3.2 - Procedimentos Experimentais

3.2.1 - Tratamento da crisotila[24]

3.2.1.1 - Lavagem

Em uma peneira Tyler 250 colocou-se porções de 5 g de crisotila e jateou-se com água de torneira durante 10 minutos. Recolheu-se o material contido na peneira, que foi seco em bandeijas em estufa, a 120°C, por uma noite. Após este período, a crisotila foi desfiada e armazenada em frascos plásticos longe de umidade. A crisotila lavada e seca apresenta uma coloração mais esbranquiçada que a *in natura*.

3.2.1.2 - Tratamento com ultra-som

Preparou-se uma suspensão a 1% de crisotila lavada, colocando-se 5 g de crisotila em um béquer de 600 mL e completou-se o volume até 500 mL com uma solução tampão de ácido acético/acetato de sódio equimolar a $c=3,3x10^{-2}M$ (pH 4,7). Colocou-se o béquer sob efeito de um campo de ultra-som de 25 KHz durante 30 minutos. Agitou-se a suspensão com o auxílio de uma bagueta, 3 vezes observando-se uma mudança na homogeneidade, parecendo que as fibras estavam mais soltas. Filtrou-se em funil de Büchner e lavou-se com bastante água destilada. Recolheu-se o material e colocou-se em placas de petri para secagem em estufa a, 120°C, por uma noite.

3.2.2 - Teste de expansão de crisotila com diversos solventes

Alguns testes com solventes para verificar a expansão da crisotila foram necessários, já que, como descrito no ítem

1.4.1.1, a crisotila deve se expandir bastante, para haver um contato maior de suas fibras (sítios ativos) com o material a ser imobilizado. Também reações com solventes são estudadas, por causa da baixa solubilidade da grande maioria dos substratos em H_2O. Testou-se vários solventes, os mais comumente utilizados em sínteses orgânicas, através de 3 métodos diferentes de agitação:

- com pequena agitação;
- com agitação manual durante 1 minuto;
- sob efeito de um campo de ultra-som de 25 KHz durante 1 minuto.

Os resultados obtidos estão na tabela 14.

Alguns deles (os miscíveis em água) foram testados utilizando-se 10% de solvente em água para verificar a expansão. Os resultados estão na tabela 15.

3.2.3 - Testes de toxidez de alguns solventes para com fermento de pão

Os mesmos solventes utilizados no teste de expansão da crisotila, do ítem 3.2.2, foram agora utilizados, para verificar a toxidez em relação ao fermento de pão. Verificamos que o fermento é extremamente sensível a todos eles, com excessão do etanol, que o fermento só suporta até no máximo 12%. Os resultados obtidos estão na tabela 16.

3.2.4 - Suporte com *Saccharomyces cerevisiae*[24]

Preparou-se uma suspensão a 1% de crisotila tratada colocando-se em um béquer de 3 L 20 g de crisotila seca e 2 L de água destilada. Após 30 minutos de agitação mecânica, adicionou-se 20 g de fermento de pão fresco e deixou-se agitando por 2,5 h.

Filtrou-se o fermento suportado em funil de Büchner e observou-se que a água estava límpida. Armazenou-se o material em geladeira, após secagem ao ar com bastante sucção, até ser utilizado em reações.

3.2.5 - Reação com α-cloroacetofenona 88 (método 1)[58]

Em um balão de 1 L adicionou-se 20 g de FPI e uma quantidade de mínima de água, para que houvesse agitação (350 mL). Deixou-se agitando mecanicamente, por 30 minutos, em banho termostatizado a 30°C. Adicionou-se 0,155 g (1 mmol) da α-cloroacetofenona. A reação ficou em agitação por 24 h. Após este período, filtrou-se em funil de Büchner, e lavou-se com bastante água destilada. Extraiu-se com $CHCl_3$, secou-se com Na_2SO_4 e evaporou-se o solvente. A reação foi realizada em dois balões diferentes. Os produtos foram misturados e purificados com coluna de sílica gel, usando hexano/clorofórmio (85:15) como eluente. O composto, um óleo amarelo claro, do (-)-(R)-2-cloro-1-feniletanol **89**, apresentou:

m_a = 0,210 g (1,34 mmol) - R_a = 67%

m_r = 0,045 g (0,291 mmol) - R_{cr} = 15%

RMN^{1}H ($CDCl_3$): δ (ppm) 2,90 (s l, 1H); 3,57 - 3,84 (m, 2H); 4,89 (dd, 1H; J = 4,8 e 7,6 Hz); 7,31 (s, 5H)

IV (filme) cm^{-1}: 3402,9; 3031,2; 2955,2; 1602,6; 1493,9; 1453,5; 1085,5; 723,8; 698,4

$[\alpha]_D^{25}$ -30,6° (c 1,78; C_6H_{12}) com R_o = 64%

3.2.5.1 - Verificação do tempo mínimo de reação

Montou-se uma reação, de acordo com o procedimento descrito

em 3.2.5, com α-cloroacetofenona **88** e retirou-se alíquotas de 1 em 1 hora até completar 6 h de reação. Extraiu-se com $CHCl_3$ todas as alíquotas, secou-se com Na_2SO_4 e evaporou-se o solvente. No acompanhamento do progresso da reação, feito por RMN^{1}H, observou-se que, após 4 h de reação, a cetona tinha sido toda reduzida para o álcool **89**.

3.2.5.2 - Verificação da quantidade máxima de substrato

Conforme descrito no ítem 3.2.5, montou-se mais 3 reações, a saber que em 20 g de FPI adicionou-se 0,310 g (2,01 mmol), 0,771 g (4,99 mmol) e 0,770 g (4,98 mmol) de α-cloroacetofenona. No acompanhamento feito por RMN^{1}H, após 5 horas de reação, observou-se:

- nas duas reações em que se adicionou 5 mmol do substrato, recuperou-se a cetona **88** sem a presença do álcool **89**.

m_1 = 0,424 g (2,74 mmol) - R_{cr} = 55%

m_2 = 0,545 g (3,52 mmol) - R_{cr} = 71%

- na reação que se adicionou 2 mmol do substrato obteve-se:

m_T = 0,222 g

m_{cr} = 0,0496 g (0,321 mmol) - sólido branco R_{cr} = 16%

m_o = 0,170 g (1,08 mmol) - óleo amarelo R_o = 54%

$[\alpha]_D^{25}$ -35,1° (c 1,71 C_6H_{12}) - R_o = 73%

que foi purificado com cromatografia preparativa, utilizando-se hexano/clorofórmio (1:1) como eluente.

Na reação 1 com 5 mmol de substrato, após a filtração do FPI, adicionou-se 10 g de açúcar e deixou-se agitando por 3 h para verificar se ainda continha atividade fermentativa. Montou-se o sistema de borbulhamento conforme a figura 7, com:

- 3 g de FPI
- 50 mL de solução 12% de açúcar em tampão pH 4,7 (10^{-3} M HAc/Ac^-)

Observou-se que não houve evolução de CO_2 no sistema.

Na reação 2, montou-se o borbulhamento sem agitar com açúcar antes, do mesmo modo descrito anteriormente. Novamente observou-se que não houve evolução de CO_2.

3.2.6 - Reação de diluição

Em um balão de 3 L, colocou-se 100 g de FPI e água (1,5 L) suficiente para agitação. Após 30 minutos, adicionou-se 0,155 g (1 mmol) de α-cloroacetofenona **88** e a mistura reacional permaneceu a 30°C por 24 h com agitação mecânica. Após este período, filtrou-se em funil de Büchner, extraiu-se com $CHCl_3$, secou-se com Na_2SO_4 e evaporou-se o solvente. Através de espectro de RMN^{1}H observou-se que o álcool **89** foi obtido. Após cromatografia preparativa de camada espessa, utilizando-se hexano/clorofórmio (1:1) como eluente:

m_a = 0,0647 g (0,413 mmol) - R_Q = 41%

$[\alpha]_D^{25}$ -32,9° (c 1,71 C_6H_{12}) - R_o = 68%

3.2.7 - Tentativa de reaproveitamento das crisotilas suportadas

3.2.7.1 - Método 1

De um dos FPI recuperado da reação descrita em 3.2.5, montou-se uma nova reação com 0,155 g (1 mmol) de α-cloroacetofenona, que após 5 h de reação não havia reduzido nada da cetona. Isto foi verificado por RMN^{1}H.

m_{cr} = 0,0534 g (0,346 mmol) - R_{cr} = 35%

3.2.7.2 - Adicionando nutriente de cerveja

Com o mesmo FPI reutilizado em 3.2.6.1, montou-se outra reação (conforme descrito em 3.2.5), adicionando-se uma ponta de espátula de nutriente utilizado na fabricação de cervejas, deixando-se agitando por 1 h. Após este período adicionou-se 0,155 g (1 mmol) de α-cloroacetofenona **88** e deixou-se reagir por 20,5 h em banho termostatizado a 30°C. No espectro de RMN^{1}H observou-se que o substrato não reagiu e recuperou-se:

m_{cr} = 0,0655 g (0,424 mmol) - R_{cr} = 42%

3.2.7.3 - Adicionando açúcar

Tomando-se o segundo FPI utilizado na reação 3.2.5, dissolveu-se em um balão de 1 L, 10 g de açúcar em água destilada e, após agitar por 1 h com o FPI, acrescentou-se 0,154 g (1 mmol) de α-cloroacetofenona **88**. A mistura reacional permaneceu durante toda a noite (19 h). Filtrou-se em funil de Büchner, extraiu-se com $CHCl_3$, secou-se com Na_2SO_4 e, através de espectro de RMN^{1}H, observou-se que a cetona não reagiu. A massa recuperada foi:

m_{cr} = 0,0462 g (0,299 mmol) - R_{cr} = 30%

3.2.7.4 - Lavagem do FPI com éter

Uma nova reação com FPI fresco como descrito em 3.2.5 foi feita. Adicionou-se 0,261 g (1,69 mmol) de α-cloroacetofenona que reagiu por 5 h. Após a filtragem em funil de Büchner, lavou-se o FPI com éter para tentar eliminar resíduos de cetona, que poderia não ter reagido. Em seguida, lavou-se com bastante água destilada para eliminar o éter. Armazenou-se o FPI na geladeira com uma solução de **KCl** 2% (300 mL). Após 1 noite, filtrou-se o FPI e

montou-se outra reação com 0,261 g (1,69 mmol) de α-cloroacetofenona 88. Repetiu-se o processo de lavagem, armazenamento e novamente montou-se outra reação, a 3ª. O acompanhamento feito por RMN^{1}H nos forneceu:

- a 1ª reação foi completa, encontrou-se apenas resíduos de cetona

m_T= 0,161 g

- a 2ª e a 3ª reações, a reação não se completou, e recuperou-se as seguintes quantidades de reagente:

m_2= 0,250 g (1,62 mmol) - R_{cr}= 96%

m_3= 0,149 g (0,966 mmol) - R_{cr}= 57%

3.2.8 - Reação com hexano[36]

Em um balão de 1 L montou-se uma reação utilizando 20 g de FPI, 250 mL de hexano, 2,5 g de açúcar e 0,155 g (1 mmol) de α-cloroacetofenona 88. Deixou-se agitando mecanicamente por 24 h a 30°C. O balão foi tampado para evitar evaporação do solvente sem comprometer a agitação. Filtrou-se em funil de Büchner e lavou-se o FPI com hexano. Evaporou-se o solvente. Através de espectro de RMN^{1}H observou-se que a cetona não havia reagido. A massa recuperada foi:

m_{cr}= 0,0243 g (0,157 mmol) - R_{cr}= 16%

3.2.9 - Reação com α-cloroacetofenona (método 2)[31]

Em um balão de 3 L montou-se um meio de cultura com 60 g FPI, 60 g de açúcar e 1,5 L de solução de **KCl** 2%. Após agitação mecânica de 30 minutos, adicionou-se 0,496 g (3,21 mmol) de α-cloroacetofenona. A reação é mantida a 30°C por 24 h. Filtrou-se em funil de Büchner, extraiu-se com $CHCl_3$ e secou-se com Na_2SO_4.

Evaporou-se o solvente e obteve-se um óleo amarelo do álcool **89**, que foi analisado por RMN^{1}H. O produto foi purificado com cromatografia preparativa de camada espessa, utilizando-se hexano/clorofórmio (1:1) como eluente. Os dados referentes ao produto estão na tabela 17.

3.2.9.1 - Reutilização do FPI

Montou-se mais 2 reações utilizando o mesmo procedimento da reação descrita em 3.2.9. Através de acompanhamento por RMN^{1}H observou-se que:

- na 2ª reação obteve-se álcool **89** e cetona **88** na proporção descrita.
- na 3ª reação obteve-se somente cetona **88**.

m_{cr} = 0,114 g (0,738 mmol) - R_{cr} = 23%

A cada novo FPI utilizado, foram feitas várias tentativas de reuso, e, cada bloco de reações com o mesmo FPI nos forneceu resultados diversos. Os compostos foram purificados com cromatografia preparativa de camada espessa, utilizando-se hexano/clorofórmio (1:1) como eluente. Os resultados estão na tabela 17.

3.2.10 - Reação com fermento desidratado (Sigma)

Utilizando-se 20 g de fermento de pão desidratado (pó fino), em um balão de 1 L, adicionou-se 250 mL de água e 0,154 g (1 mmol) de α-cloroacetofenona **88**. Manteve-se a reação a 30°C por 24 h, agitando mecanicamente. Após o término da reação, adicionou-se celite à suspensão reacional e filtrou-se inúmeras vezes em funil de Büchner e, depois, em coluna. Extraiu-se com éter etílico,

secou-se com Na_2SO_4 e evaporou-se o solvente. O resíduo foi analisado por RMN^{1}H e observou-se que a cetona não havia reagido.

m_{cr} = 0,0328 g (0,212 mmol) - R_{cr} = 21%

3.2.11 - Reação com fermento desidratado (Fleischmann)

Em um balão de 1 L adicionou-se 60 g do fermento desidratado (granulado) e água destilada (400 mL). Após 30 minutos acrescentou-se 0,555 g (3,59 mmol) de α-cloroacetofenona **88**. A reação permaneceu por 24 h e, em seguida, saturou-se a mistura reacional com **NaCl**, e esta foi extraída num extrator contínuo líquido-líquido (fig 8) por 40 h utilizando-se $CHCl_3$ como solvente. Secou-se com Na_2SO_4 e evaporou-se o solvente. O produto foi destilado em destilador tipo *Kugelrohr* e obteve-se 0,360 g que, através de espectro de RMN^{1}H, notou-se conter uma mistura de cetona e álcool. Em seguida separou-se os produtos através de cromatografia preparativa de camada espessa, utilizando-se hexano/clorofórmio (1:1) como eluente. Obteve-se então:

m_a = 0,246 g (1,57 mmol) - R_a = 44% - óleo amarelo **89**

m_{cr} = 0,00242 g (0,0156 mmol) - R_{cr} = 0,43% sólido branco **88**

$[\alpha]_D^{25}$ -44,3° (c 1,78, C_6H_{12}) - R_o = 92%

3.2.12. Reação com α-nitroacetofenona **90**

Montou-se reações com α-nitroacetofenona **90** com 40 g de FPI e 0,331 g (2,01 mmol) de substrato. A temperatura permaneceu constante a 30°C em todos os experimentos, mas o tempo foi variado. Os resultados estão abaixo:

	T (h)	resultado
1	4,5	produto não identificado
2	4,5	vestígios de álcool
3	5,5	produto não identificado
4	4,5	produto não identificado
5	3,0	produto não identificado

Não foi possível reproduzir a reação em que se obteve o álcool **91**, e não se pôde obter dados espectrais e medidas de rotação óptica pela pequena quantidade de produto obtido.

3.2.13 - Síntese de 1-fenil-2-oxima-1,2-propanodiona **93**[43]

Em um balão de 3 bocas de 250 mL (frasco A) de fundo redondo adaptou-se: (ver figura 9)

1) um condensador de refluxo de bolas

2) um tubo para liberação de gás **HCl** (T_1)

3) um tubo para liberação de gás CH_3ONO (T_2)

onde os tubos se extendem até mergulhar no líquido.

T_1: introduz-se **HCl** seco produzido pelo método convencional: goteja-se H_2SO_4 de um funil de separação de 250 mL em um kitassato contendo **NaCl** (com agitação magnética). O gás gerado passa por um tubo secante contendo H_2SO_4.

T_2: gerou-se CH_3ONO em um kitassato de 250 mL (frasco B) onde é encaixado um funil de separação de 250 mL (frasco C) e conectado ao balão A pelo tubo T_2.

Adicionou-se em A uma solução de 13,0 g (97,0 mmol) de propiofenona, **92**, em 65 mL de éter etílico.

Em B, uma mistura de 8,04 g (116 mmol) de $NaNO_2$ 95%, 5 mL de

CH_3OH e 4,8 mL de H_2O. No funil C, colocou-se 13 mL de H_2SO_4 diluído resfriado (preparado por adição de um volume de H_2SO_4 concentrado e dois de água).

A agitação magnética em A é começada e, o HCl é introduzido, através de T_1, lentamente. O ácido em C, é introduzido devagar em B e, o CH_3ONO gasoso formado vai através de T_2 à mistura reacional. A solução em A, que era incolor, desenvolve uma cor marrom claro. A velocidade da evolução de CH_3ONO é ajustada para que o éter refluxe devagar.

Ao final da evolução do CH_3ONO, cessa-se a introdução de HCl. A mistura reacional é deixada descansando toda a noite e ao final torna-se marrom. Após este período, deixou-se o frasco aberto, com agitação, para a saída do excesso de HCl. Extraiu-se a solução com NaOH 10%, exaustivamente, até o meio alcalino extraído se tornar incolor, quando agitada a solução etérea. (No início a solução alcalina é de um amarelo muito intenso).

Os extratos alcalinos combinados são vertidos devagar, com agitação, em uma mistura de 120 mL de HCl concentrado e aproximadamente 160 g de gelo. Forma-se, então, um sólido branco de aspecto flocular que é filtrado em funil de Büchner e sucção. Recristalizou-se com tolueno e obteve-se cristais brancos em forma de agulha.

m_p = 15,5 g (95,1 mmol) - R_Q = 98%

PF= 113,1° - 114,6°C

RMN^{1}H ($CDCl_3$): δ (ppm) 2,15 (s, 3H); 7,43 (t, 2H; J = 6,46 e 7,38 Hz); 7,56 (t, 1H; J = 7,38 Hz); 7,86 (d, 2H; J = 6,46 Hz); 8,89 (s, 1H)

RMN^{13}C ($CDCl_3$): δ (ppm) 10,21 (CH_3); 128,42, 130,45, 133,07 e 136,62 (Ph); 157,14 (C=N); 192,20 (C=O)

IV (pastilha) cm^{-1}: 3238,2; 3058,1; 2925,6; 1660,3; 1596,8; 1576,9; 1447,7; 713,1; 693,9

3.2.14 - Síntese de 1-fenil-1,2-propanodiona **94**[44]

Em um sistema adaptado para destilação com arraste a vapor colocou-se: no balão de 500 mL de 2 bocas 13,0 g (79,8 mmol) de 1-fenil-2-oxima-1,2-propanodiona 93 e 240 mL de solução H_2SO_4 10%. A mistura foi destilada, com vapor, até cerca de 1 L do destilado ser coletado. Ao final observou-se uma solução amarelo claro com um óleo amarelo no fundo. Separou-se o óleo da fase aquosa e extraiu-se com éter, até este ficar incolor. Secou-se com Na_2SO_4 e evaporou-se o solvente.

O produto é destilado em destilador tipo *Kugelrohr* para purificação. Obteve-se um óleo amarelo intenso.

m= 10,3 g (69,6 mmol) - R_q = 87%

RMN^{1}H ($CDCl_3$): δ (ppm) 2,48 (s, 3H); 7,22 - 7,66 (m, 3H); 7,86 - 8,02 (m, 2H)

IV (filme) cm^{-1}: 3064,6; 1712,9; 1674,0; 1596,6; 1579,6; 1495,8; 1449,9; 702,9

3.2.15 - Síntese de O-acetil-1-fenil-2-oxima-1,2-propanodiona **95**[58]

A uma solução de 0,502 g (3,08 mmol) de 1-fenil-2-oxima-1,2-propanodiona 93 em 0,3 mL de piridina goteja-se 0,4 mL de anidrido acético a uma velocidade que a temperatura seja mantida entre 90-95°C. A mistura reacional é deixada durante toda a noite em repouso. Após este período destila-se o material volátil sob pressão reduzida. Purificou-se o produto através de uma coluna cromatográfica, eluída com

hexano/CH_2Cl_2 (85:15) e obteve-se um óleo amarelo claro.

m= 0,435 g (2,12 mmol) - R_Q= 69%

RMN^{1}H ($CDCl_3$): δ (ppm) 2,20 (s, 3H); 2,24 (s, 3H); 7,28 - 7,66 (m, 3H); 7,99 - 8,12 (m, 2H)

IV (filme) cm^{-1}: 3065; 1775; 1670; 1595; 1575; 1485; 735; 710

3.2.16 - Síntese de O-benzil-1-fenil-2-oxima-1,2-propanodiona **96**[60]

A um balão de 50 mL de duas bocas, com agitação magnética, adaptou-se um condensador de refluxo e adicionou-se 2,00 g (12,3 mmol) de 1-fenil-2-oxima-1,2-propanodiona **93**, 2,00 g (14,5 mmol) de K_2CO_3, 0,1 g (0,602 mmol) de KI e 6 mL de etanol 95%.

Adicionou-se gota à gota 2 mL (17,4 mmol) de cloreto de benzila destilado, com o auxílio de um funil de adição, com equalizador de pressão. Após terminada a adição, refluxou-se o etanol por 3 h e resfriou-se à temperatura ambiente. Destilou-se o solvente.

Transferiu-se o produto, que era um sólido, com CH_2Cl_2 para um funil de separação e lavou-se com solução NaOH 10% 8 vezes. Secou-se a solução com Na_2SO_4 e evaporou-se o sólvente. Obteve-se um óleo amarelo que foi purificado com uma coluna de sílica gel eluída com hexano/CH_2Cl_2 (9:1).

O composto puro é um óleo amarelo, e:

m= 2,14 g (n= 8,48 mmol) - R_Q= 69%

RMN^{1}H ($CDCl_3$): δ (ppm) 2,14 (s, 3H); 5,22 (s, 2H); 7,35 (s, 5H); 7,29 - 7,37 (t, 2H); 7,46 (t, 1H; J = 6,82 e 7,50 Hz); 7,81 (d, 2H; J = 6,82 Hz)

RMN^{13}C ($CDCl_3$): δ (ppm) 10,81 (CH_3); 77,33 (CH_2); 127,96, 128,34, 128,59, 128,76, 130,89, 132,69, 136,45 e 137,32 (Ph); 155,68

(C=N); 191,34 (C=O)

IV (filme) cm^{-1}: 3031,6; 2933,7; 1661,8; 1597,3; 1571,4; 1505,9; 1447,7; 742,8; 709,2

EM (m/e): 51,00 (19,56%); 65,05 (6,71%); 77,00 (36,84%); 91,15 (100%); 105,05 (18,84%); 132,15 (0,14%); 253,15 (M^+, 0,79%)

AE: C 75,94%; H 5,96%; N 5,28%; O 12,82%

3.2.17 - Reação com 1-fenil-1,2-propanodiona **94** (método 1)

Em um balão de 3 L adicionou-se 100 g de FPI e 1,5 L de água. Após 30 minutos, acrescentou-se 1,03 g (6,95 mmol) de 1-fenil-1,2-propanodiona **94**. A reação permaneceu a 30°C em banho termostatizado por 24 h com agitação mecânica. Após este período, filtrou-se em funil de Büchner, extraiu-se com $CHCl_3$, secou-se com Na_2SO_4 e evaporou-se o solvente. Purificou-se o produto, um óleo amarelo escuro, com cromatografia preparativa de camada espessa eluída com hexano/$CHCl_3$ (1:1), correndo-se 3 vezes a placa. Obteve-se o (-)-(S)-2-hidroxi-1-fenil-1-propanona **97** em maior proporção, mas obteve-se o (-)-(1R,2S)-1-fenilpropano-1,2-diol **98** também.

m_{97}= 0,321 g (2,14 mmol) - R_Q= 31%

RMN ^1H ($CDCl_3$): δ (ppm) 1,44 (d, 3H); 5,10 - 5,20 (m, 1H); 7,31 - 7,65; (m, 3H); 7,90 - 7,94 (m, 2H)

IV (filme) cm^{-1}: 3334,5; 3065,5; 1672,9; 1598,0; 1494,3; 1450,3; 752,0; 706,2

$[\alpha]_D^{25}$ -74,4° (c 2,15 $CHCl_3$) - R_Q= 86%

m_{98}= 0,0522 g (0,343 mmol) - R_Q= 5%

3.2.17.1 - Reuso

A) Repetiu-se a reação descrita em 3.2.16 após o FPI ter permanecido em geladeira por 3 dias em repouso com 100 g de açúcar e 1 L de solução **KCl** 2%. Adiconou-se 1,03 g (6,96 mmol) de cetona e após 24 h de reação obteve-se:

m_{97}= 0,279 g (1,86 mmol) - R_Q= 27%

$[\alpha]_D^{25}$ -65,7° (c 2,05 **$CHCl_3$**) - R_o= 76%

m_{98}= 0,0571 g (0,376 mmol) - R_Q= 5%

B) Repetiu-se a reação descrita em 3.2.17 após o FPI ter permanecido por uma noite em geladeira apenas com água. Após 24 h, ao término da reação, notou-se que a cetona não havia reagido, e obteve-se 8% da cetona adicionada recuperada.

3.2.18 - Reação com 1-fenil-1,2-propanodiona **94** (método 2)

Em um balão de 6 L adicionou-se 100 g FPI, 100 g de açúcar e solução **KCl** 2% (3 L). Após 30 minutos de agitação mecânica a 30°C em banho termostatizado adicionou-se 1,00 g (6,80 mmol) de 1-fenil-1,2-propanodiona **94**. A reação permaneceu por 24 h e, após este período, filtrou-se em funil de Büchner, extraiu-se com **$CHCl_3$** e secou-se com **Na_2SO_4**. O solvente foi retirado por destilação e o produto foi purificado através de cromatografia preparativa de camada espessa, eluída com hexano/clorofórmio (1:1) como solvente. Na tabela 18 estão todos os dados referentes ao produto, que é um óleo amarelo, de (-)-(1R,2S)-1-fenilpropano-1,2-diol **98**:

RMN ^1H (**$CDCl_3$**): δ (ppm) 1,00 (d, 3H; J = 5,80 Hz); 3,01 (s 1, 2H); 3,90 - 3,98 (m, 1H); 4,62 (d, 1H; J = 3,87 Hz); 7,30 (s, 5H)

IV (filme) cm^{-1}: 3383,6; 3062,4; 2979,1; 2931,4; 1604,0; 1548,4; 1493,6; 1451,9; 746,9; 701,6

3.2.18.1 - Reuso do FPI

A reação descrita em 3.2.17 foi repetida mais 3 vezes com o mesmo fermento e em todas elas obteve-se o composto **98**.

Na 5ª tentativa, a reação foi feita em uma coluna e, com auxílio de uma bomba peristáltica, passou-se a solução de **KCl** 2% contendo o substrato dissolvido através do FPI empacotado. A mistura reacional permaneceu por 72 h, já que a reciclagem da solução é muito lenta. Obteve-se composto **98** novamente e os resultados estão na tabela 18.

3.2.19 - Reação com 1-fenil-2-oxima-1,2-propanodiona **93**

Adicionou-se 40 g de FPI em um balão de 1 L, 750 mL de água e deixou-se agitando mecanicamente por 30 minutos a 30°C. Após este período, acrescentou-se 0,331 g (2,03 mmol) de 1-fenil-2-oxima-1,2-propanodiona **93** e deixou-se reagir por 24 h. Ao término da reação, filtrou-se em funil de Büchner, extraiu-se com $CHCl_3$, secou-se com Na_2SO_4 e evaporou-se o solvente. Analisando-se os espectros de RMN^{1}H e IV, observou-se que o substrato não reagiu, recuperando-se:

m_{cr} = 0,323 g (1,98 mmol) - R_{cr} = 98%.

3.2.20 - Reação com O-acetil-1-fenil-2-oxima-1,2-propanodiona **95**

Em um balão de 1 L, adicionou-se 40 g de FPI, 800 mL de água e deixou-se agitando mecanicamente por 30 minutos a 30°C. Em seguida acrescentou-se 0,598 g (2,92 mmol) de O-acetil-1-fenil-2-oxima-1,2-propanodionona **95**. Após 24 h de reação, filtrou-se em funil de Büchner, extraiu-se com $CHCl_3$, secou-se com Na_2SO_4 e evaporou-se o solvente. Através da análise

dos espectros de RMN^{1}H e IV, observou-se que houve uma hidrólise do acetato, produzindo a 1-fenil-2-oxima-1,2-propanodiona **93**. A massa do produto foi:

m= 0,273 g (1,68 mmol) - R_q= 57%

3.2.21 - Reação com O-benzil-1-fenil-2-oxima-1,2-propanodiona **96**

Em um balão de 3 L adicionou-se 60 g de FPI, 60 g de açúcar e 1 L de solução de **KCl** 2%. Após 30 minutos acrescentou-se 0,753 g (2,98 mmol) de substrato e a reação permaneceu por 24 h a 30°C em banho termostatizado com agitação mecânica. Após este intervalo de tempo, filtrou-se a solução em funil de Büchner, extraiu-se com **$CHCl_3$**, secou-se com **Na_2SO_4** e evaporou-se o solvente. Obteve-se o (+)-(R)-O-benzil-1-fenil-1-hidroxi-2-oxima-2-propanona **99**, um óleo amarelo, que foi purificado com cromatografia preparativa de camada espessa, eluída com hexano/**$CHCl_3$** (1:1). O composto foi novamente purificado com cromatografia, eluindo-se com hexano/**$CHCl_3$** e novamente com **$CHCl_3$**.

m= 0,170 g (0,667 mmol) - R_q= 23%

m_{cr} = 0,00822 g (0,0325 mmol) - R_{cr}= 1%

RMN^{1}H (**$CDCl_3$**): δ (ppm) 1,68 (s, 3H); 3,78 (s l, 1H); 5,16 (s, 2H); 5,17 (s, 1H); 7,30 (s, Ph); 7,31 (s, Ph)

IV (filme) cm^{-1}: 3405,7; 3029,9; 2924,6; 1602,4; 1495,1; 1453,1; 746,0; 700,7

EM (m/z): 51,00 (20,40%); 65,00 (11,11%); 77,00 (41,67%); 91,15 (100%), 105,15 (10,91%); 147,05 (14,17%)

$[\alpha]_D^{25}$ +66,4° (c 2,11 **$CHCl_3$**)

3.2.22 - Testes com K10 e alguns solventes

Assim como foram feitos os testes de expansão para a crisotila, citados em 3.2.2, foram necessários fazer testes de emulsão para a montmorilonita, com os mesmos solventes. Os resultados estão na tabela 19.

3.2.23 - Suporte com *Saccharomyces cerevisiae* e K10

Preparou-se uma suspensão de 1% de K10 em água destilada adicionando-se em um béquer de 3 L, 20 g de K10 e 20 g de fermento de pão fresco. Deixou-se agitando por 2,5 h. Filtrou-se o FPI em funil de Büchner e sucção e observou-se que a água estava límpida. Após secagem ao ar, armazenou-se o FPI em geladeira.

3.2.24 - Teste de fermentação para K10 como imobilizante

Montou-se o sistema de fermentação de acordo com a figura 7, utilizando-se 3 g de FPI e 50 mL de solução 12% de açúcar em tampão pH 4,7 (c=3,3x10^{-3}M HAc/Ac^-). Não observou-se evolução de CO_2.

3.2.25 - Reação com K10 como imobilizante e α-cloroacetofenona 88

Em um balão de 1 L adicionou-se 10 g de FPI, 10 g de açúcar e 300 mL de água. Após 1 h de agitação mecânica a 30°C, acrescentou-se 0,155 g (1 mmol) de α-cloroacetofenona **88**. A reação permaneceu por 22 h e após este intervalo de tempo, filtrou-se em funil de Büchner. Extraiu-se com $CHCl_3$, secou-se com Na_2SO_4 e evaporou-se o solvente. Obteve-se um óleo amarelo **89** que foi purificado por cromatografia preparativa de camada espessa, utilizando-se hexano/$CHCl_3$ como eluente (1:1).

m_a = 0,0917 g (0,586 mmol) - R_a = 59%

$[\alpha]_D^{25}$ -29,4° (c 1,73 C_6H_{12}) - R_o = 61%

3.2.25.1 - Reuso

O reuso foi feito como descrito em 3.2.25 e observou-se, por acompanhamento com RMN^{1}H, que a cetona não reagiu.

m_{cr} = 0,0166 g (0,108 mmol) - R_{cr} = 11%

3.2.26 - Reação com 1-fenil-1,2-propanodiona **94** e K10 como imobilizante (método 2)

Em um balão de 3 L adicionou-se 50 g de FPI e 1 L de solução KCl 2%. Após 30 minutos em banho termostatizado a 30°C, acrescentou-se 50 g de açúcar e depois de mais 30 minutos, 0,500 g (3,38 mmol) de 1-fenil-1,2-propanodiona **94**. A cada adição, passados 20 minutos de agitação mecânica, foram feitas medidas de pH com o auxílio de um pHmetro.

pH_1 5,672 (FPI + sol. de KCl 2%)

pH_2 3,633 (FPI + sol. de KCl 2% + açúcar)

pH_3 3,356 (FPI + sol. de KCl 2% + açúcar + substrato)

pH_f 3,694 (ao final da reação, 24 h)

Após 24 h, filtrou-se o produto em funil de Büchner, extraiu-se com $CHCl_3$ e secou-se com Na_2SO_4. Evaporou-se o solvente e o produto obtido foi purificado com cromatografia preparativa de camada espessa, eluindo-se 3 vezes com hexano/clorofórmio (1:1). Obteve-se um óleo amarelo, do (-)-(1R,2S)-1-fenilpropano-1,2-diol **98** e os resultados estão na tabela 20.

3.2.26.1 - Reuso do FPI

Foram feitas 7 reações com o mesmo FPI utilizado no ítem 3.2.26, com o mesmo procedimento experimental, exceto as medidas de pH efetuadas. Os dados referentes aos produtos 98 estão na tabela 20.

3.2.27 - Reação com α-azidoacetofenona **101**

Utilizando-se um balão de 3 L montou-se uma reação com 50 g de FPI, 1 L de solução **KCl** 2% e 50 g de açúcar. Após 30 minutos de agitação mecânica, a 30°C, adicionou-se 0,500 g (3,10 mmol) de substrato. Após 27 h, filtrou-se em funil de Büchner e extaiu-se com **$CHCl_3$**. Secou-se com **Na_2SO_4** e evaporou-se o solvente. Obteve-se um óleo amarelo, do produto (-)-(R)-2-azido-1-feniletanol **102** que foi purificado com cromatografia preparativa de camada espessa, eluída com hexano/**$CHCl_3$** (1:1).

m_a = 0,147 g (0,904 mmol) - R_Q = 36%

RMN^{1}H (**$CDCl_3$**): δ (ppm) 2,88 (s l, 1H); 3,22 (d, 2H); 4,69 (dd, 1H; J = 8 e 12 Hz); 7,24 (s, 5H).

IV (filme) cm^{-1}: 3390; 3020; 2910; 2090; 1595; 1465; 750; 700.

$[\alpha]_D^{25}$ -62,7° (c 3,09, **$CHCl_3$**)

m_{cr} = 0,0926 g (0,575 mmol) - R_{cr} = 18%

3.2.27.1 - Reuso

O mesmo procedimento descrito no ítem 3.2.27 foi repetido. A quantidade adicionada foi de 0,502 g (3,12 mmol) de substrato e o tempo de reação foi 24 h.

m_a = 0,194 g (1,19 mmol) - R_Q = 45%

$[\alpha]_D^{25}$ -68,3° (c 2,99, $CHCl_3$)

m_{cr} = 0,0744 g (0,462 mmol) - R_{cr} = 15%

3.2.28 - Redução do (-)-(R)-2-azido-1-feniletanol **102**[61]

Dissolveu-se 0,147 g (0,904 mmol) em 30 mL $CHCl_3$ anidro obtido no ítem 3.2.27 e quantidade catalítica de Pd/C 10%. Manteve-se a reação sob pressão de hidrogêneo (40 psi) durante 13 h. Filtrou-se em uma coluna de celite e evaporou-se o solvente. Através de cromatografia de camada delgada observou-se que o azido ainda não tinha sido todo consumido. Montou-se novamente a reação, agora com 20 mL de etanol anidro e mantendo-se a reação, por 15 h, sob pressão de hidrogênio. Obteve-se um óleo amarelo, do produto (-)-(R)-2-amino-1-feniletanol **103**:

m_b = 0,119 g (0,871 mmol) - peso do óleo bruto (R_Q = 97%)

Foram feitas cristalizações, com CH_2Cl_2/hexano e obteve-se:

m_p = 0,115 g (0,839 mmol) - R_Q = 93%

PF = 54,4 - 55,2°C

RMN ^1H ($CDCl_3/D_2O$): δ (ppm) 2,75 (m, 2H); 4,55 (dd, 1H; J = 5,6 e 8,0 Hz); 7,23 (s, 5H)

IV (pastilha KBr) cm^{-1}: 3370; 3030; 1590; 1550; 1495; 755; 700

$[\alpha]_D^{25}$ -47,3° (c 2,06, ETOH) - R_o = 99%

3.2.28.1 - Redução do (-)-(R)-2-azido-1-feniletanol do reuso

O mesmo procedimento descrito em 3.2.28 foi seguido, utilizando-se 0,194 g (1,19 mmol) do azido álcool obtido em 3.2.27.1 em 20 mL de metanol anidro por 23 h:

m_b = 0,158 g (1,15 mmol) - R_Q = 97%

Foram feitas cristalizações com CH_2Cl_2/hexano e obteve-se:

m_p = 0,138 g (1,01 mmol) - R_q = 85%

$[\alpha]_D^{25}$ -51,5° (c 2,12, EtOH) - R_o = 93%

PF = 53,4 - 54,6°C

BIBLIOGRAFIA

1. Yamada, H. e Shimizu, S. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 1988, *27*, 622.
2. Sih, C. J. e Chen, C-S. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 1984, *23*, 570.
3. Prelog, V. *Pure Appl. Chem*, 1964, *9*, 119.
4. Simen, H.; Bader, J.; Günther, H.; Neumann, S. e Thanos, J. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 1985, *24*, 539.
5. *Biochemicals Organic Compounds for Research and Diagnost Reagentes*, Sigma Chemical Company, 1991, 712-18.
6. Whitesides, G. M.; Wong, C-H and Pollak, A., *Asymmetric Reaction and Process in Chemistry*, Eliel, E. L. e Otsicka, S., Washington, 1983, p 205.
7. Higo, M.; Owaki, Y. e Kamata, S. *Chem. Lett*, 1987, 2089.
8. Csuk, R. e Glanzer, B. I. *Chem. Rev.*, 1991 *91* , 49.
9. Servi, S. *Synthesis*, 1990, 1.
10. Dumas, J. B. *Ann. Chim. Phys.*, 1874, *5*, 3.
11. Chaleff, R. S. *Pure Appl. Chem.*, 1988, *60*, 821.
12. Kometami, T.; Kitatsuji, E. e Matsuno, R. *Chem. Lett.*, 1989, 1465.
13. Jones, R. P. *Enzyme Microb. Technol.*, 1989, *11*, 130.
14. MacLeod, R.; Prosser, H.; Fiskentscher, L.; Lanyi, J. e Mosher, H. S. *Biochemistry*, 1964, *3*, 838.
15. Zhou, B; Gopalan, A. S.; VanMiddlesworth, F.; Shieh, W-R e Sih, C. J. *J. Am. Chem. Soc*, 1983, *105*, 5925.
16. Manzocchi, A.; Fiecchi, A. e Santaniello, E. *J. Org. Chem.*, 1988, *53*, 4405.

17. Gramatica, P.; Manito, P.; Monti, D. e Speranza, G. *Tetrahedron*, 1988, *44*, 1299.

18. Utaka, M.; Konishi, S. e Takeda, A. *Tetrahedron Lett.*, 1986, *27*, 4737.

19. Kamal, A.; Rao, M. V. e Meshram, H. M. *Tetrahedron Lett.*, 1991, *32*, 2657.

20. Takeshita, M.; Yoshida, S.; Kiya, R.; Higuchi, N. e Kobayashi, Y. *Chem. Pharm. Bull.*, 1989, *37*, 615.

21. Bujons, J.; Guajardo, R. e Kyler, K. S. *J. Am. Chem. Soc.*, 1988, *110*, 604.

22. Spiliotis, V.; Papahatjis, D. e Ragoussis, N. *Tetrahedron Lett.*, 1990, *31*, 1615.

23. McKillop, A. e Young, D. W. *Synthesis*, 1979, 401.

24. Parizotto, O.; *Crisotilas Naturais Brasileiras. Ativação da Superfície e Aplicação na Imobilização de Biocatalisadores*, Tese de Mestrado,1989, I.Q.-UNICAMP.

25. Chibata, I., *Asymmetric Reaction and Process im Chemistry*, Eliel, E. L. e Otsicka, S, Washington, 1983, p 195.

26. Nakamura, K.; Higaki, M.; Ushio, K; Oka, S. e Ohno, A. *Tetrahedron Lett*, 1985, *26*, 4213.

27. Sakai, T.; Nakamura, T.; Fukuda, K.; Amano, E.; Utaka, M. e Takeda, A. *Bull. Chem. Soc. Jpn*, 1986, *59*, 3185.

28. Naoshima, Y. e Hasegawa, H. *Chem. Lett.*, 1987, *12*, 2379.

29. Kawai, M.; Tajima, K.; Mizuno, S.; Niimi, K.; Sugiota, H.; Butsugan, Y.; Kozawa, A.; Asano, T. e Imai, Y. *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, 1988, *61*, 3014.

30. Naoshima, Y.; Nakamura, A.; Nishiyama, T.; Haramaki, T. Mende, M. e Munakata, Y. *Chem. Lett.*, 1989, 1023.

31. Naoshima, Y.; Hasegawa, H.; Nishiyama, T. e Nakamura, A. *Bull. Chem. Soc. Jpn*, 1989, *62*, 608.

32. Naoshima, Y.; Nishyiama, T. e Munakata, Y. *Chem. Lett.*, 1989, 1517.

33. Nakamura, K.; Kawai, Y.; Oka, S. e Ohno, A. *Tetrahedron Lett.*, 1989, *30*, 2245.

34. Utaka, M.; Konishi, S.; Okubo, T.; Tsuboi, S. e Takeda, A. *Tetrahedron Lett.*, 1987, *28*, 1447.

35. Utaka, M.; Konishi, S.; Mizuoka, A.; Ohkudo, T.; Sakai, T.; Tsuboi, S. e Takeda, A. *J. Org. Chem.*, 1989, *54*, 4989.

36. Nakamura, K.; Inoue, K.; Ushio, K.; Oka, S. e Ohno A. *J. Org. Chem.*, 1988, *53*, 2589.

37. Khorami, J. E. e Choquette, D.; *Interpretation of EGA and DTG Analysis of Chrysotile Asbestos, Thermochimica Acta*, 1984, 76, 87.

38. Streib, W. C. in *Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology*, 3rd ed.; John Wiley: N. York, 1978; vol. 3; p 267.

39a. Carvalho, M.; Okamoto, M. T.; Moran, P. J. S. e Rodrigues, J. A. R. *Tetrahedron*, 1991, *47*, 2073.

b. Imuta, M.; Kawai, K. e Ziffer, H. *J. Org. Chem.*, 1980, *45*, 3352.

40. Dunn, C. G. e Reed, G. *Prescott and Dunn's industrial microbiology*, The AVI Publishing Company, INC., Saybrook Connecticut, 1983, p.437.

41. Nakamura, K.; Kawai, Y. e Ohno, A. *Tetrahedron Lett.*, 1990, *31*, 267.

42. Nakamura, K.; Inoue, K.; Ushio, K.; Oka, S. e Ohno, A. *Chem. Lett.*, 1987, 679.

43. Daves, P. *Synthesis*, 1979, 249.

44. Hartung, W. H. e Crossley, F. *Org. Synth*, **Colletive Vol III**, 1955, 20.

45. Hartman, W. W. e Roll, L. J. *Org. Synth*, **Colletive Vol II**, 1955, 363.

46. Ewing, D. E. *Org. Mag. Res.*, **1979**, *12*, 499.

47. Martre, A. M.; Mousset, G.; Rhlid, R. B. e Yeschambre, H. *Tetrahedron Lett.*, **1990**, *31*, 2599.

48. Ohta, H.; Yamada, H. e Tsuchihashi, G. *Chem. Lett.*, **1987**, 2325.

49. Davis, F. A. e Haque, M. S. *J. Org. Chem.*, **1986**, *51*, 4083.

50. Brenelli, E. C. S.; Moran, P. J. S. e Rodrigues, J. A. R. *Synth. Commun.*, **1990**, *20*, 261.

51a. Lin, J. T.; Yamasaki, T. e Kitazume, T. *J. Org Chem.*, **1987**, *52*, 3211.

b. Knupp, G. e Frahm, A. W. *J. Chem. Res.(S)*, **1981**, 164.

52. Marques, M.; *Síntese de (R)-(-)-Ariletanolaminas Via Redução Microbiológica Utilizando-se Fermento de Pão (Saccharomyces cerevisiae) na Criação do Centro Quiral*, Tese de Mestrado, 1990, I.Q.-UNICAMP.

53a. Boyer, J. H.; Krueger, E. e Modler, R. *J. Org. Chem.* **1969**, *34*, 1987.

b. Foelche, E.; Hickel, A.; Honig, H. e Seufer-Wasserthal, P. *J. Org. Chem.*, **1990**, *55*, 1749.

54. Meyers, A. I. e Slade, J. *J. Org Chem*, **1980**, *45*, 2785.

55a. Takeda, H.; Tachinami, T. e Aburatani, M. *Tetrahedron Lett.*, **1989**, *30*, 363.

b. Midland, M. M. e Lee, P. E. *J. Org. Chem.*, **1985**, *50*, 3237.

c. Brown, H. C. e Pai, G. G. *J. Org. Chem.*, **1983**, *48*, 1784.

d. Brussee, J.; Dofferhoff, F.; Kruse, C. G. e Gen, A. V. D. *Tetrahedron*, **1990**, *46*, 1653.

56. Vogel, A. *Vogel's Textbook of Pratical organic chemistry, including qualitative organic chemistry*, Longman Icn., New York, **1978**, p 264.

57a. Allinger, N. L. Cava; M. P.; Johgh, D. C. D.; Johonson, C. R.; Lebel, N. A. e Stevens, C. L. *Química Orgânica*, Guanabara Dois S. A., Rio de Janeiro, **1978**, p. 89.

b. Catálogo de instruções para uso do polarímetro fotoelétrico **Polamat A** (Carl Zeiss).

58. Seebach, D.; Sutter, M. A.; Weber, R. H. e Zuger, M. F. *Org. Synth*, **1984**, *63*, 1.

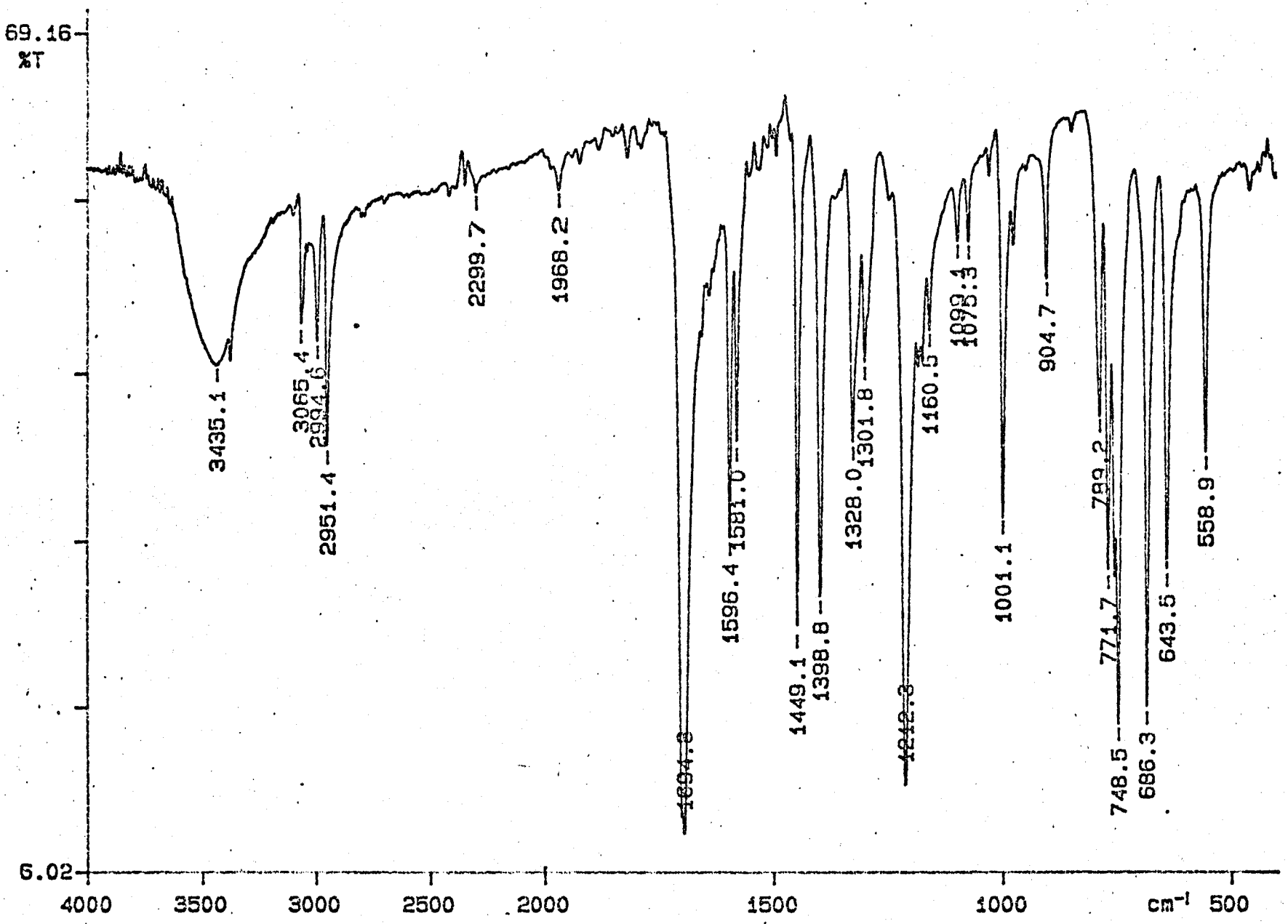
59. Brossi, A.; Dolan, L. A. e Teitel, S. *Org. Synth.* **19** , *56*, 3.

60. Loriot, M. Brown, E e Robin, J. P. *Tetrahedron*, **1983**, *39*, 2795.

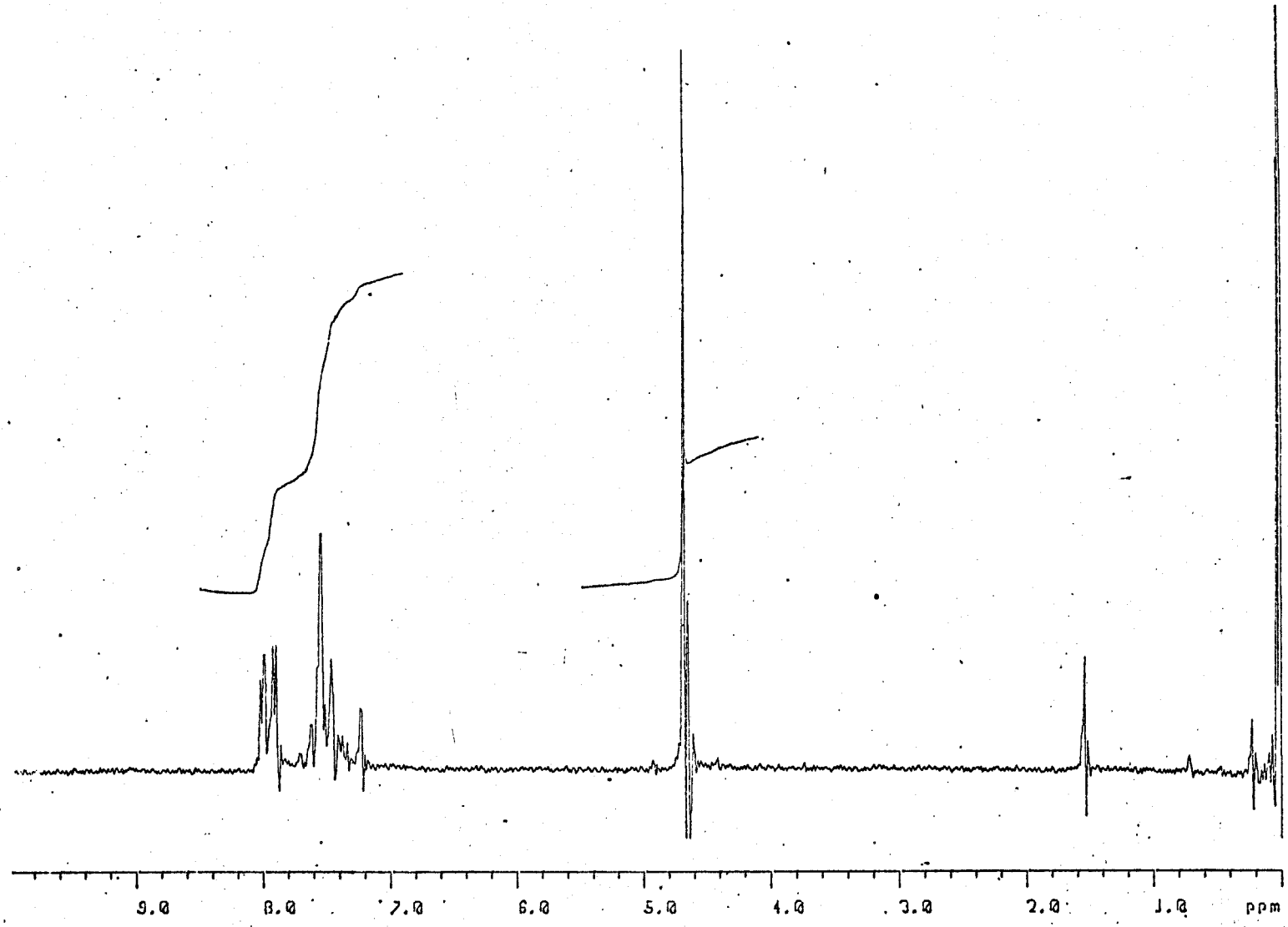
61. Birkofer, L. e Kaiser, W. *Liebigs Ann. Chem.*, **1975**, *2*, 266.

APÊNDICES

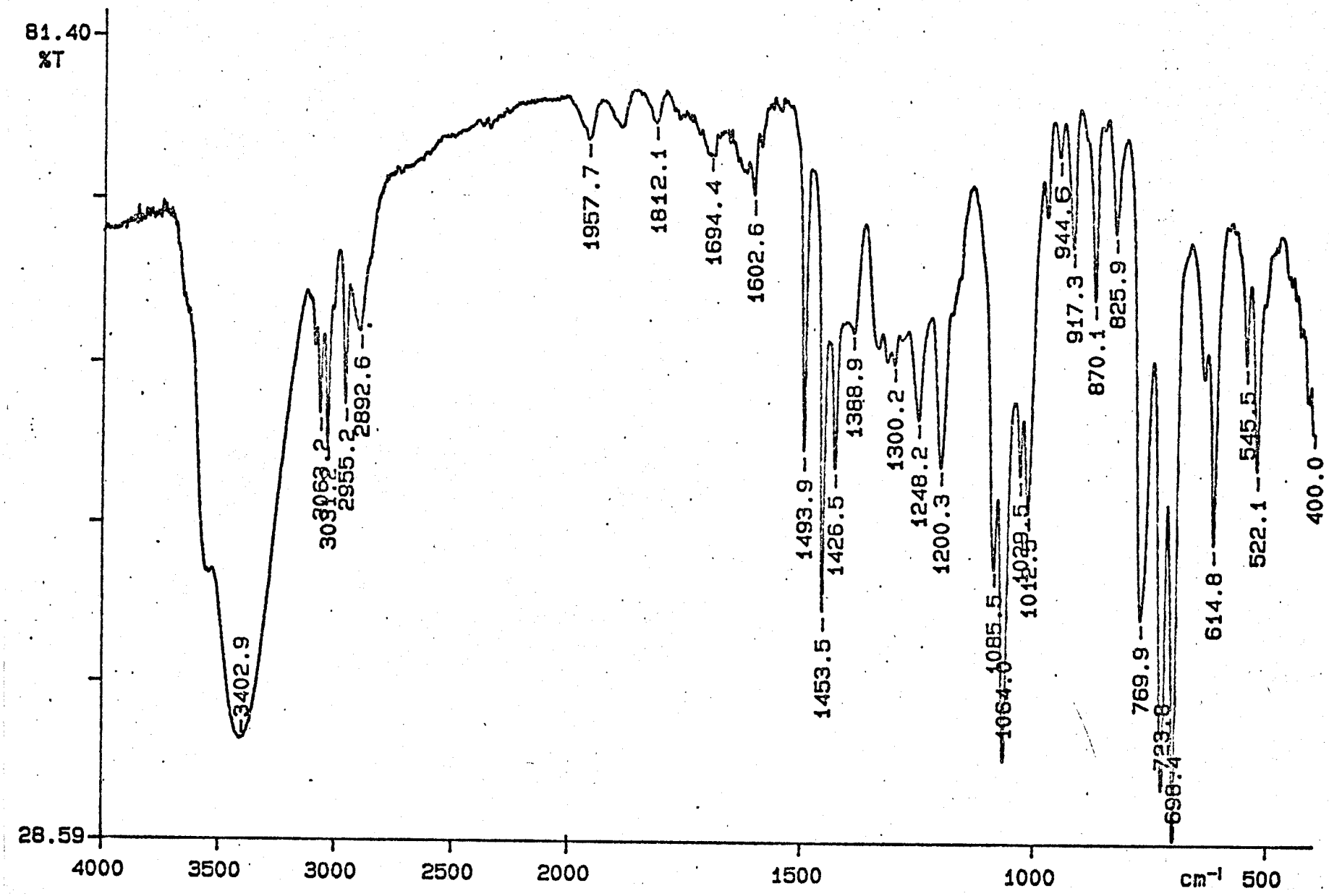
APÊNDICE A - ESPECTROS



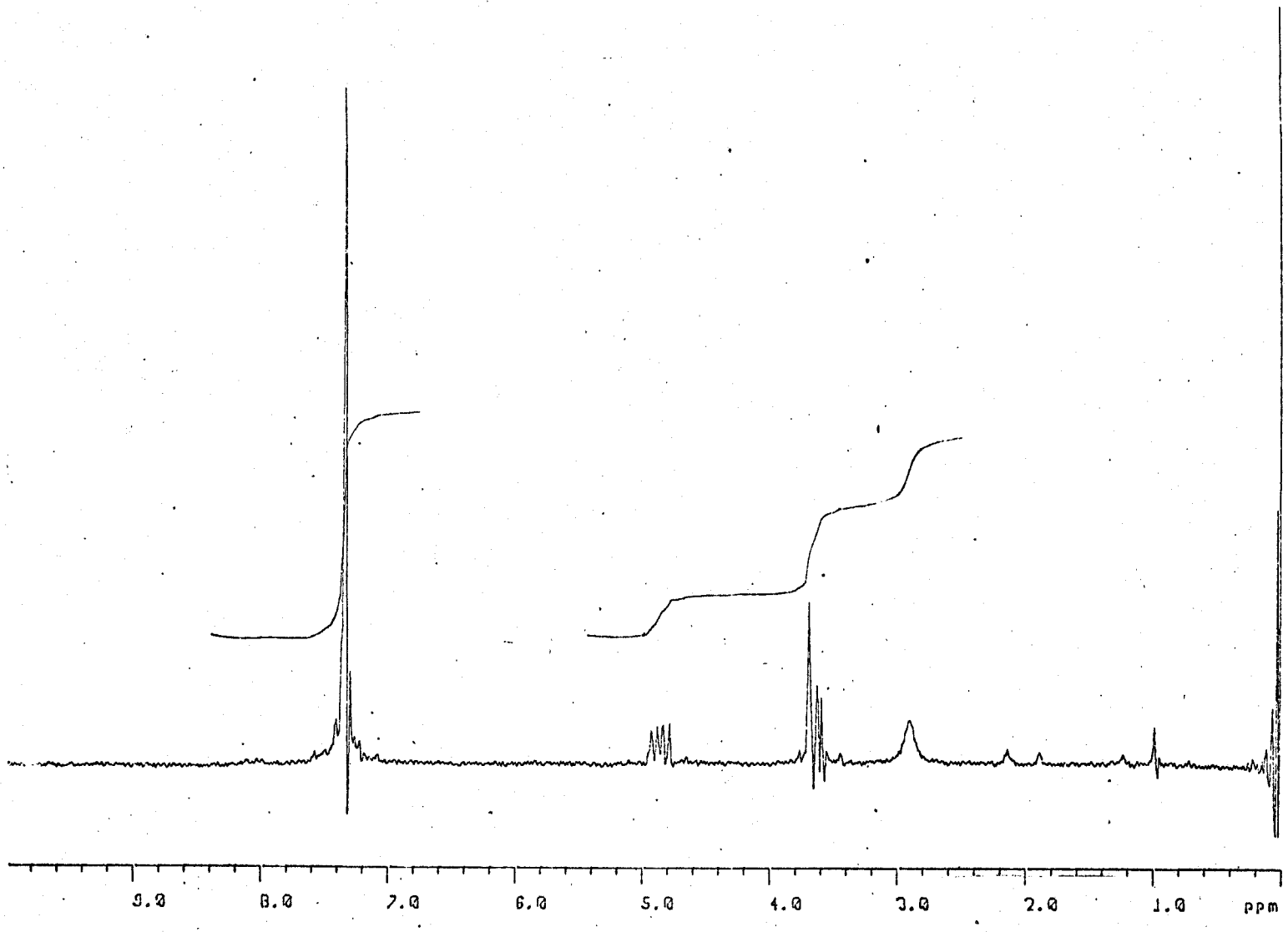
Espectro IV (pastilha KBr, FTIR) - 88



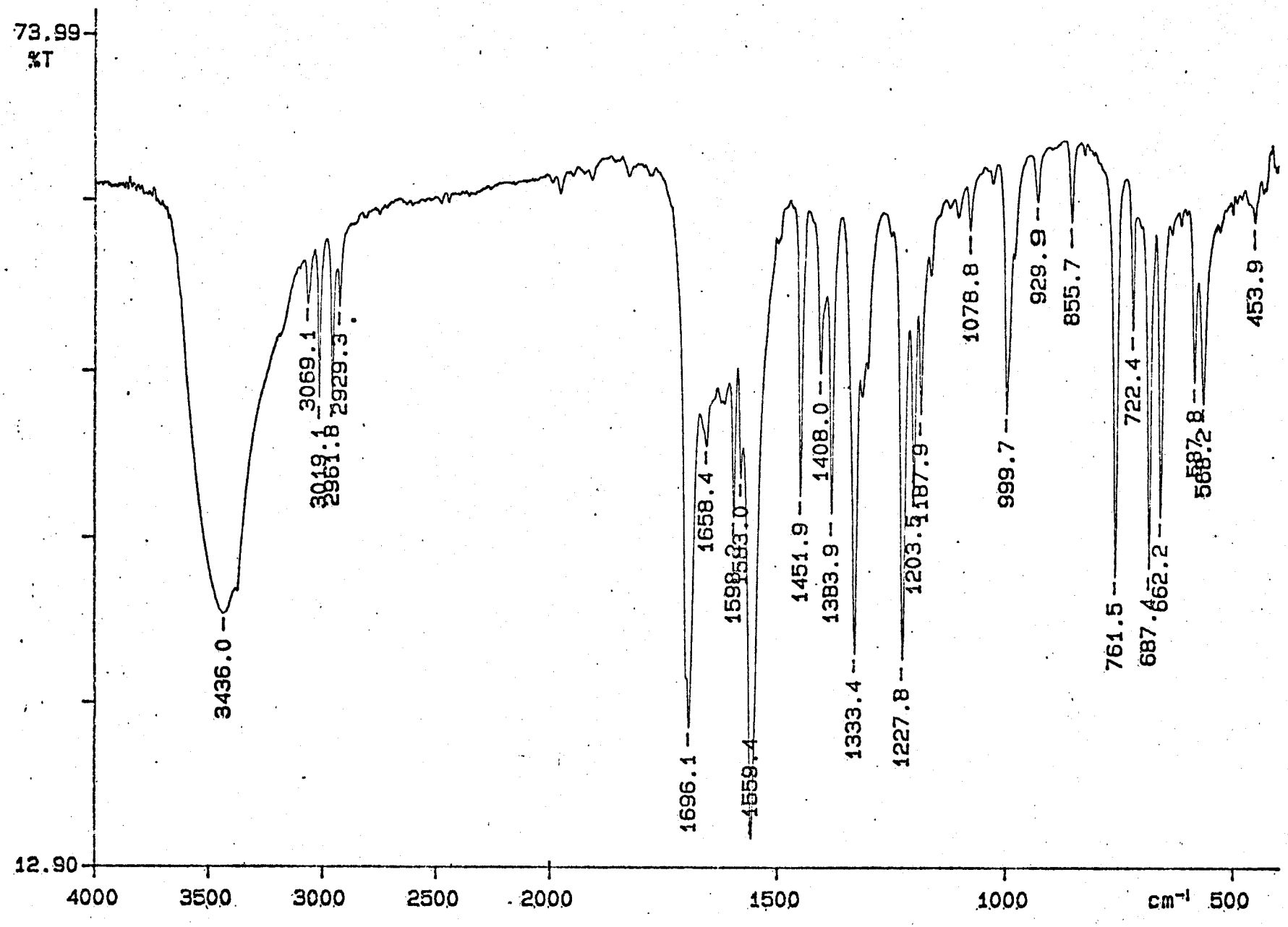
Espectro RMN^{1}H (80 MHz) - 88



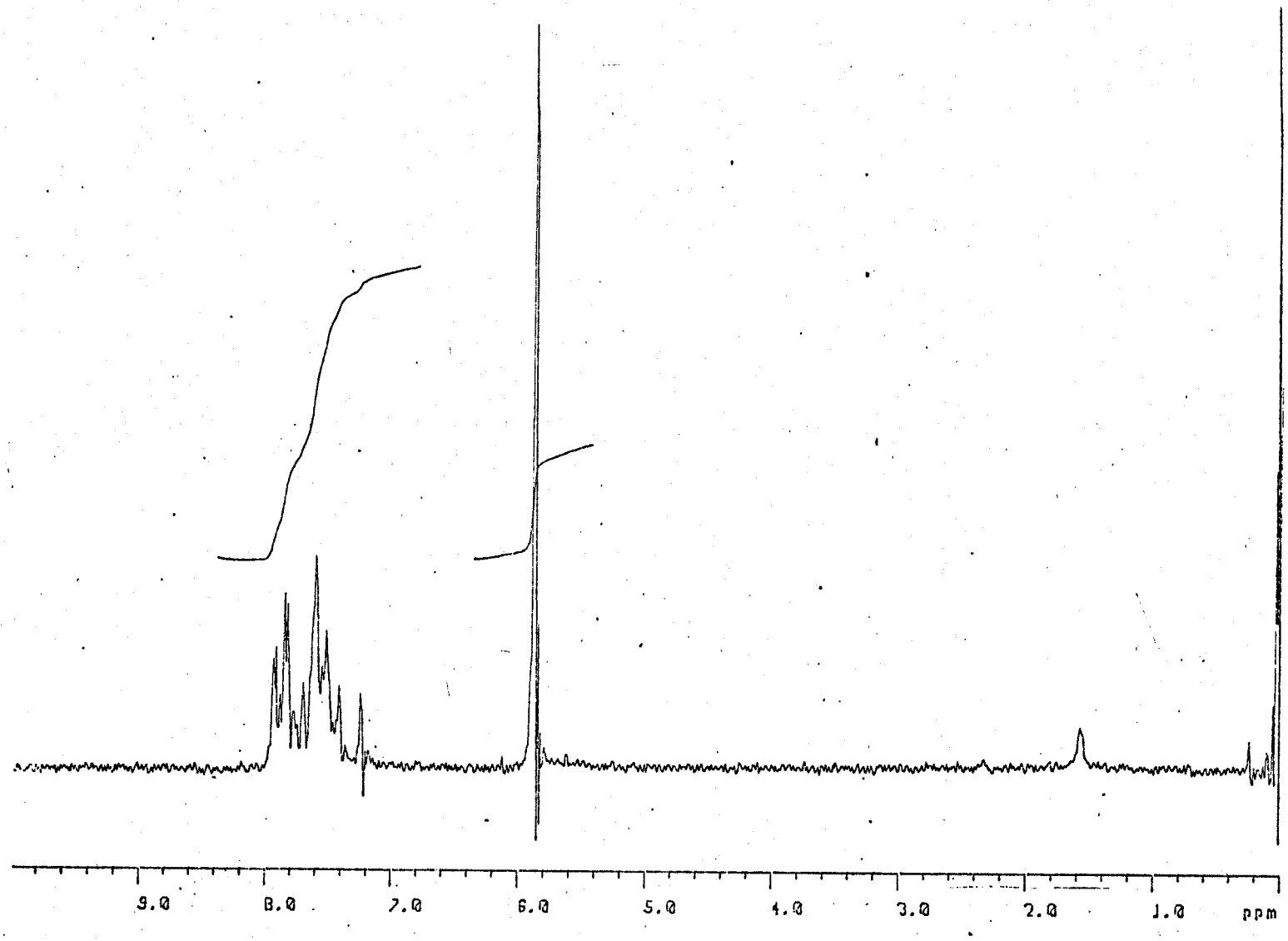
Espectro IV (filme, FTIR) - 89



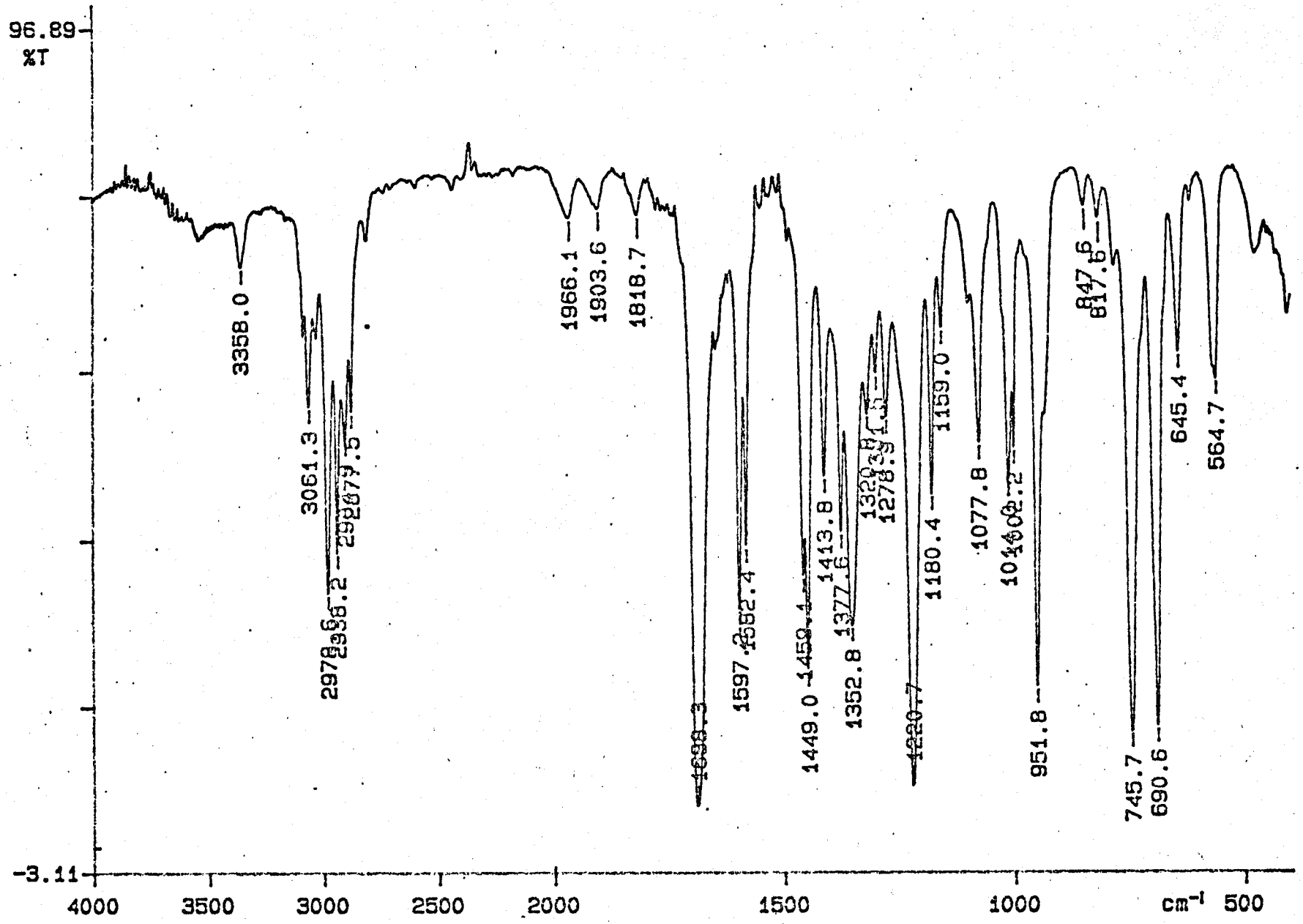
Espectro RMN^{1}H (80 MHz) - 89



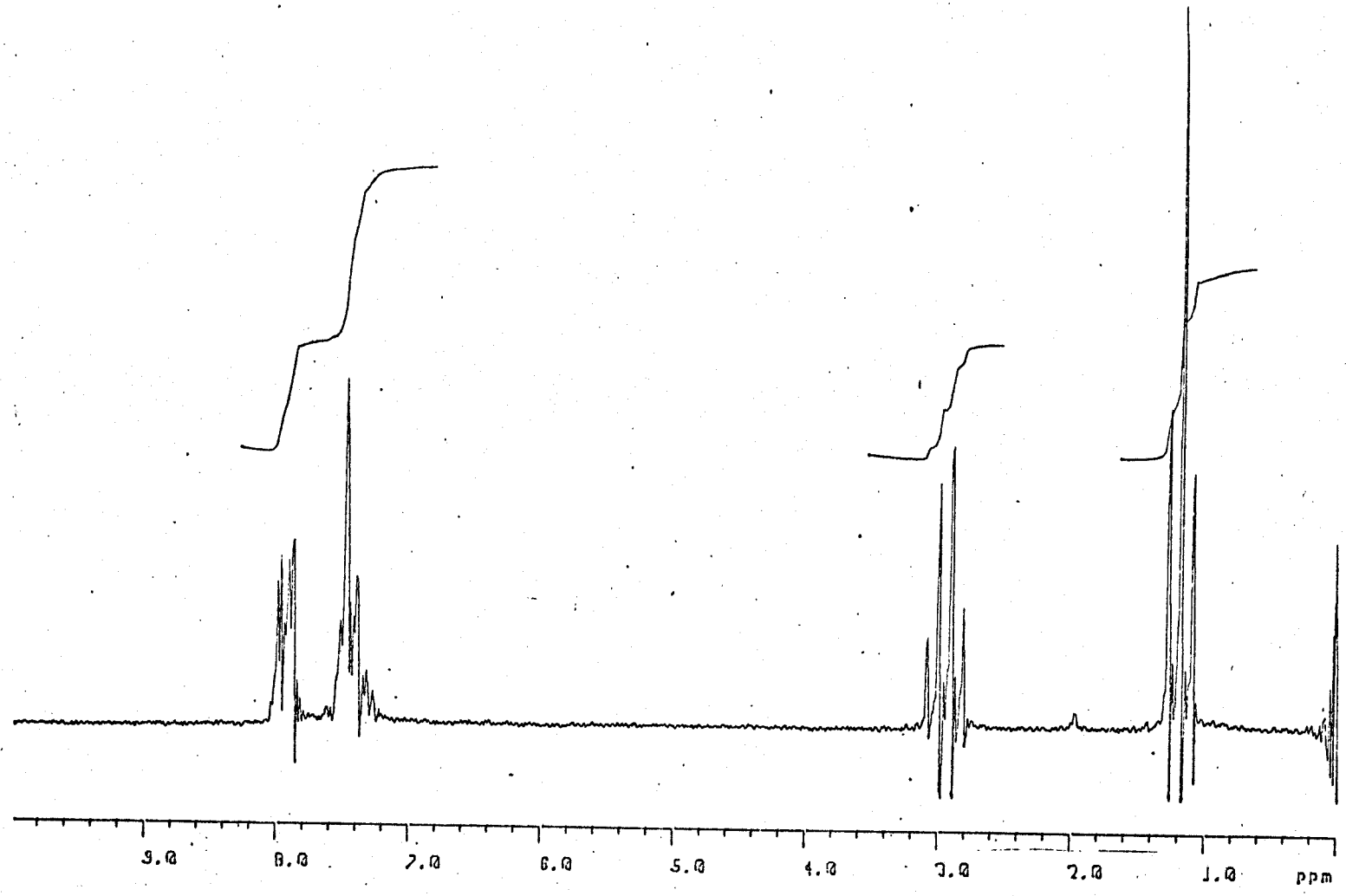
Espectro IV (pastilha de KBr, FTIR) - 90



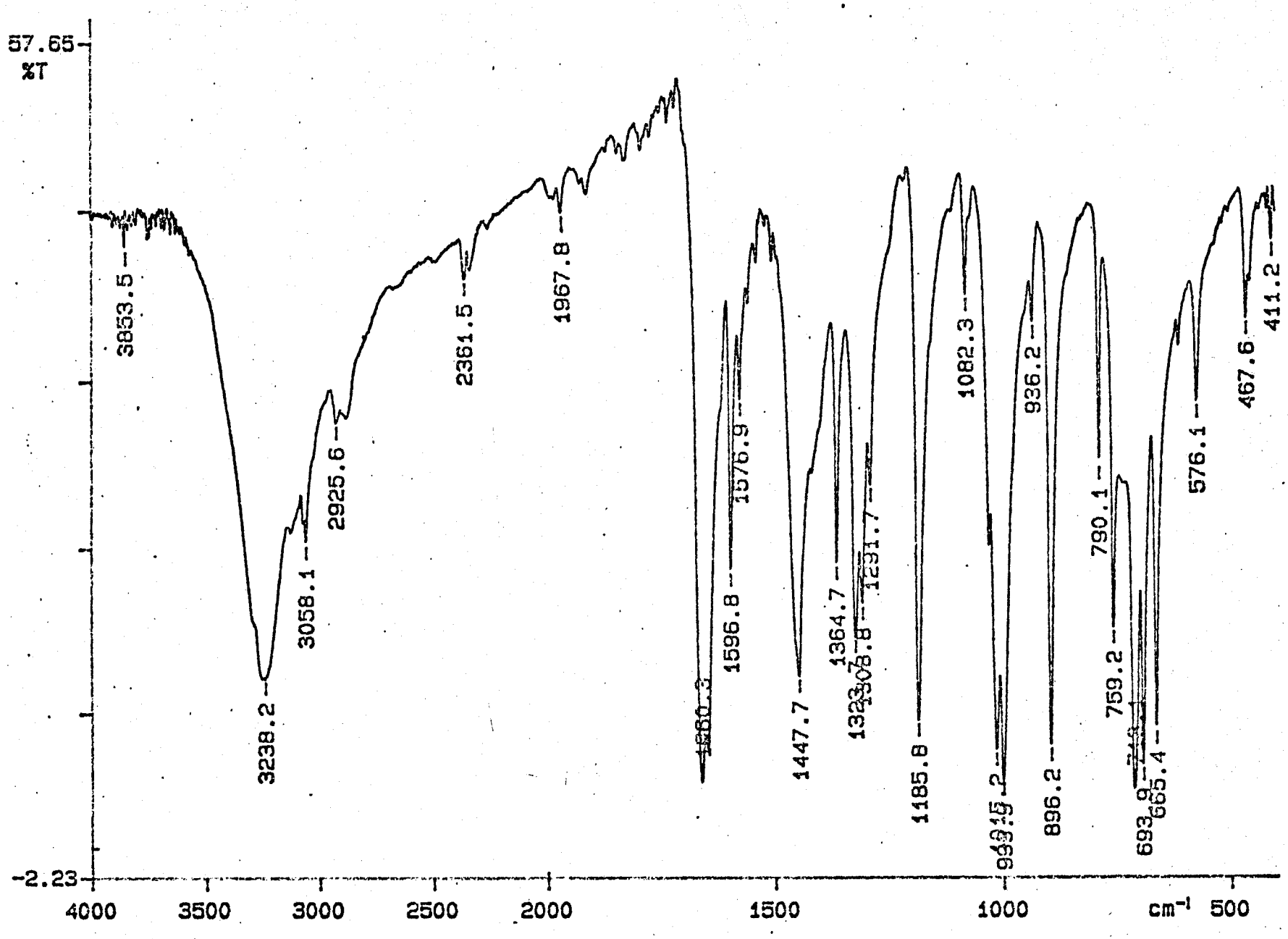
Espectro de RMN^{1}H (80 MHz) - 90



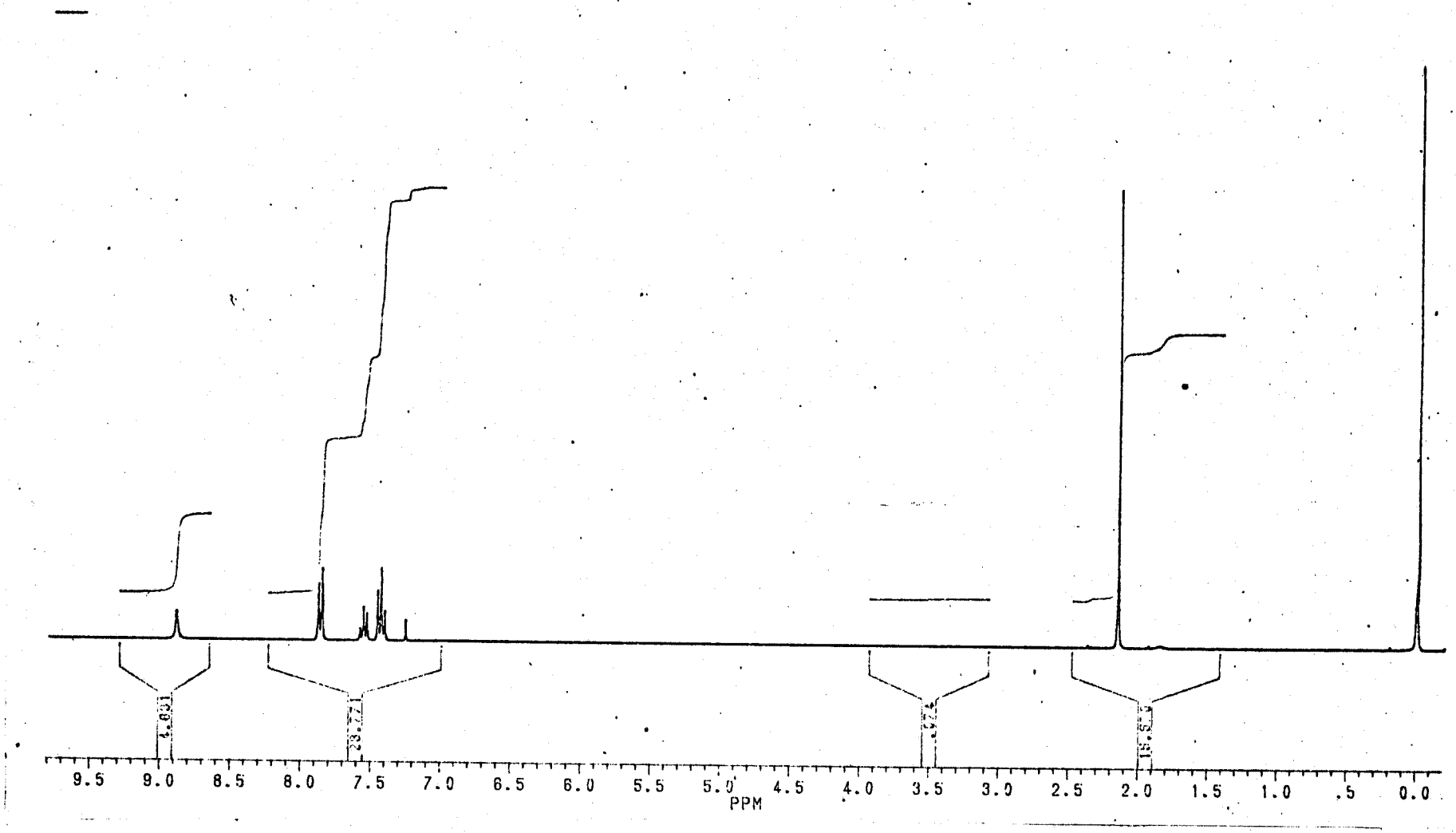
Espectro de IV (filme, FTIR) - 92



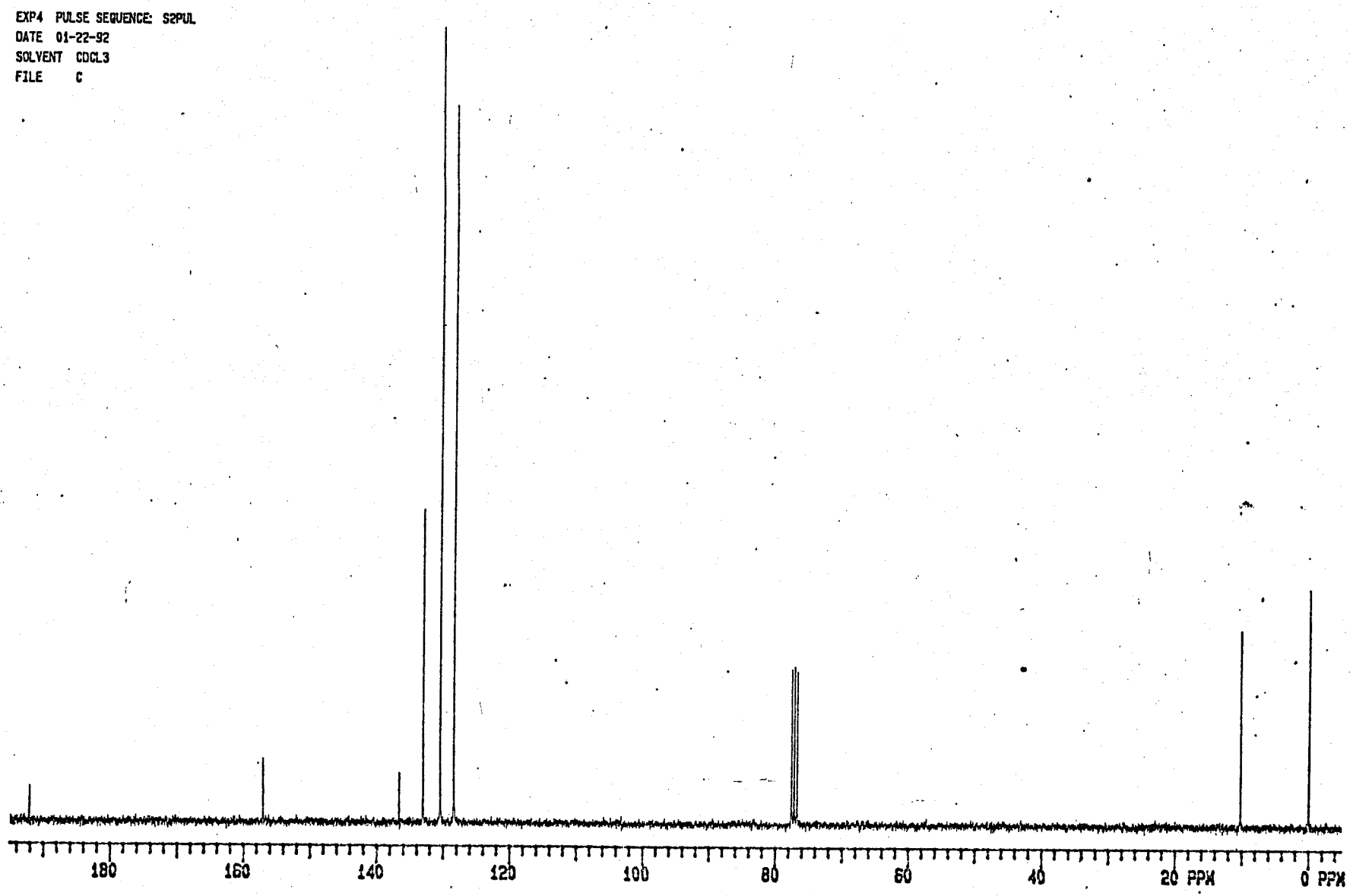
Espectro de RMN^{1}H (80 MHz) - 92



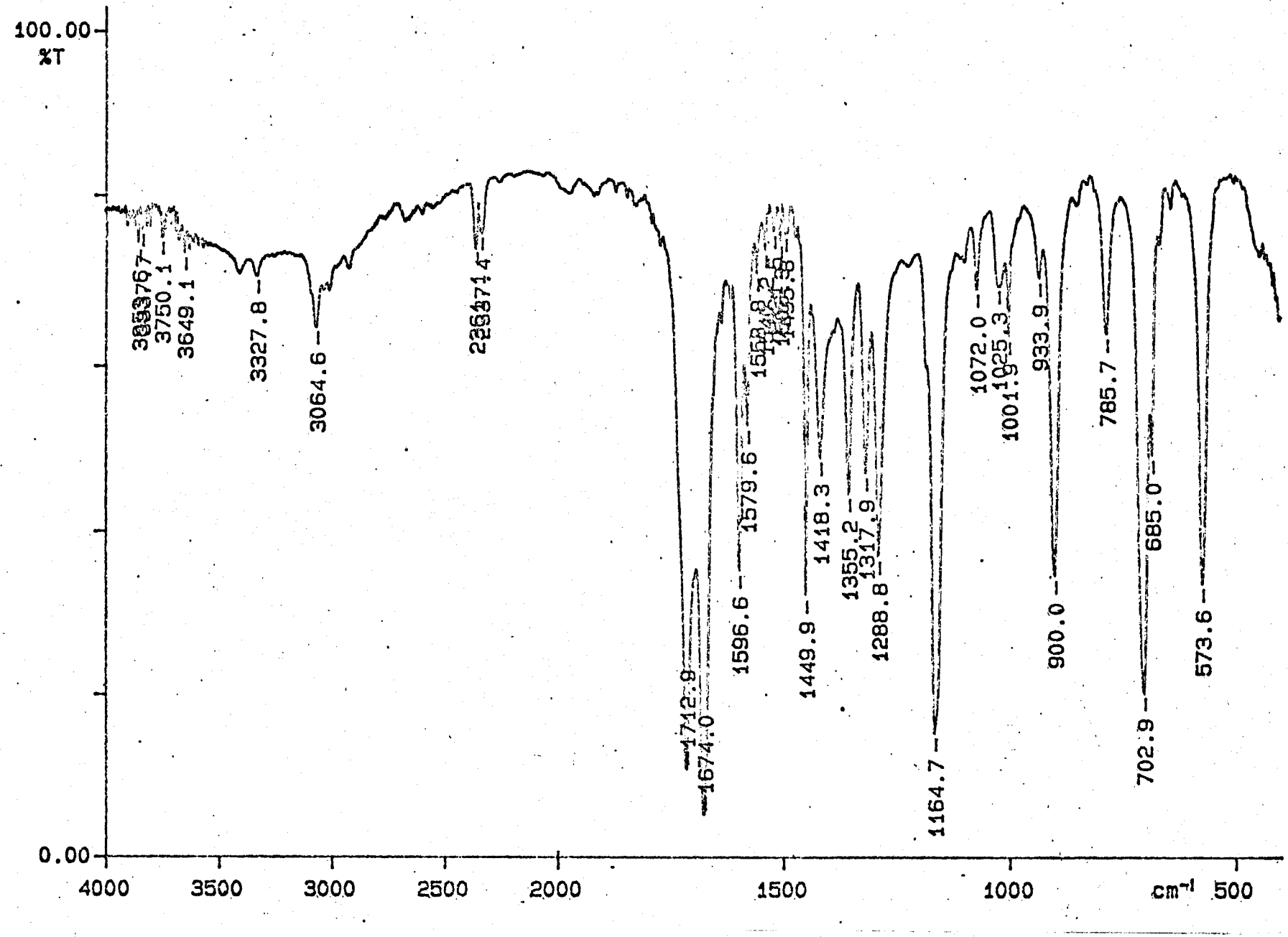
Espectro de IV (pastilha de KBr, FTIR) - 93



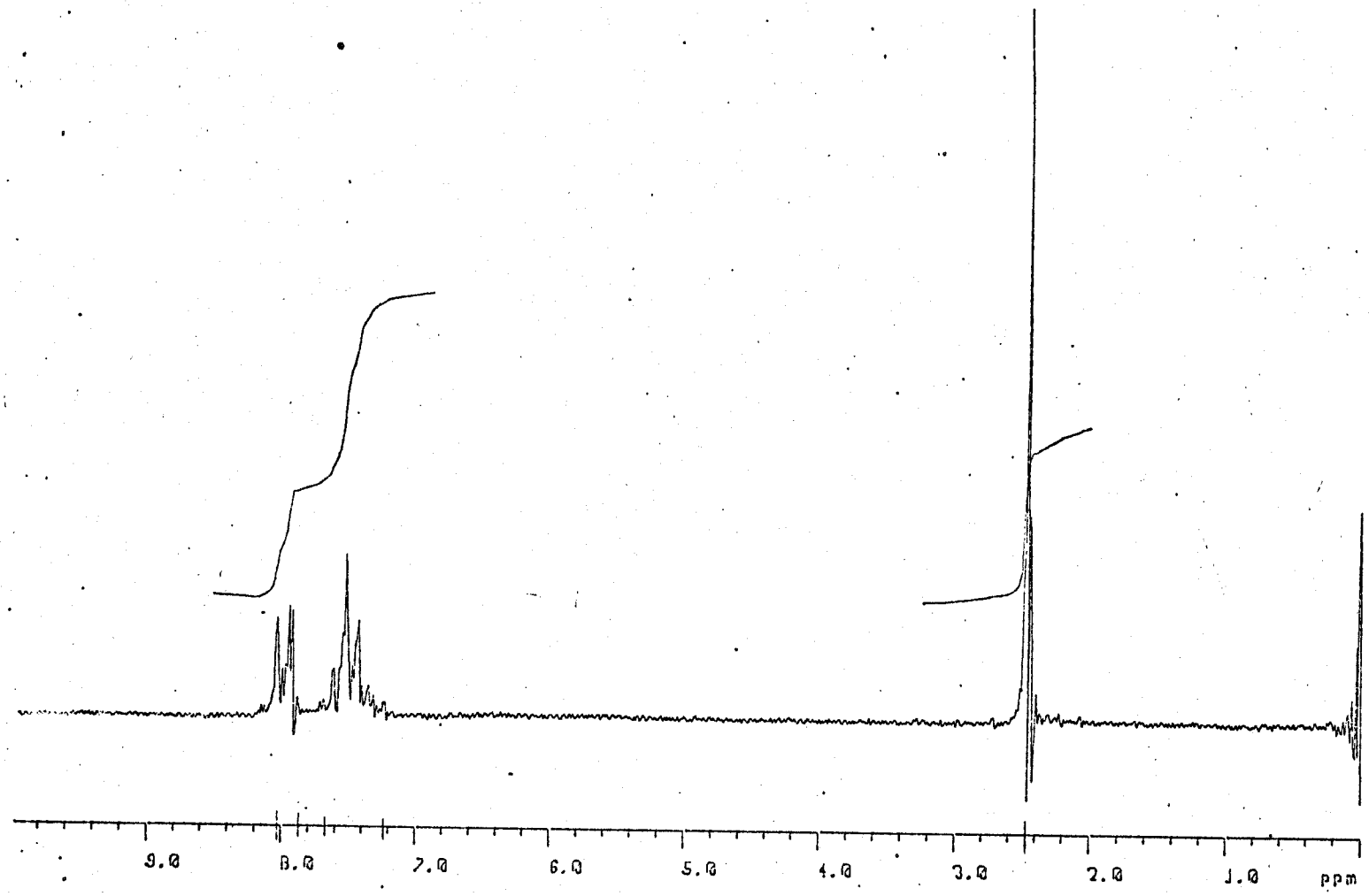
Espectro do RMN^{1}H (300 MHz) - 93



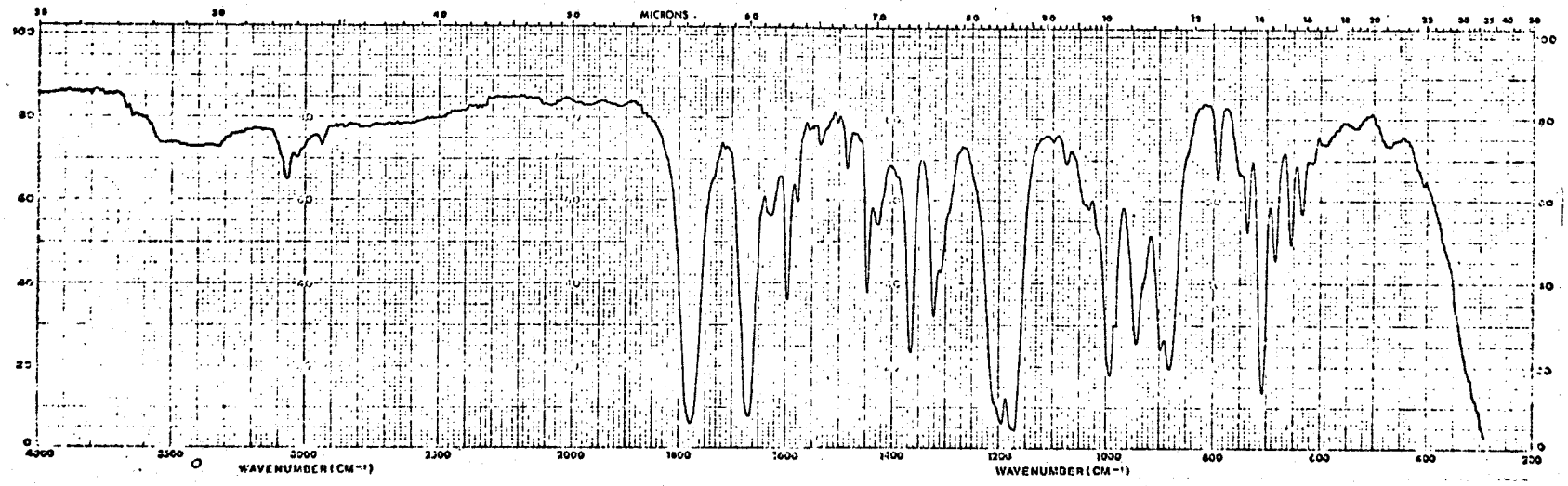
Espectro de RMN^{13}C (300 MHz) - 93



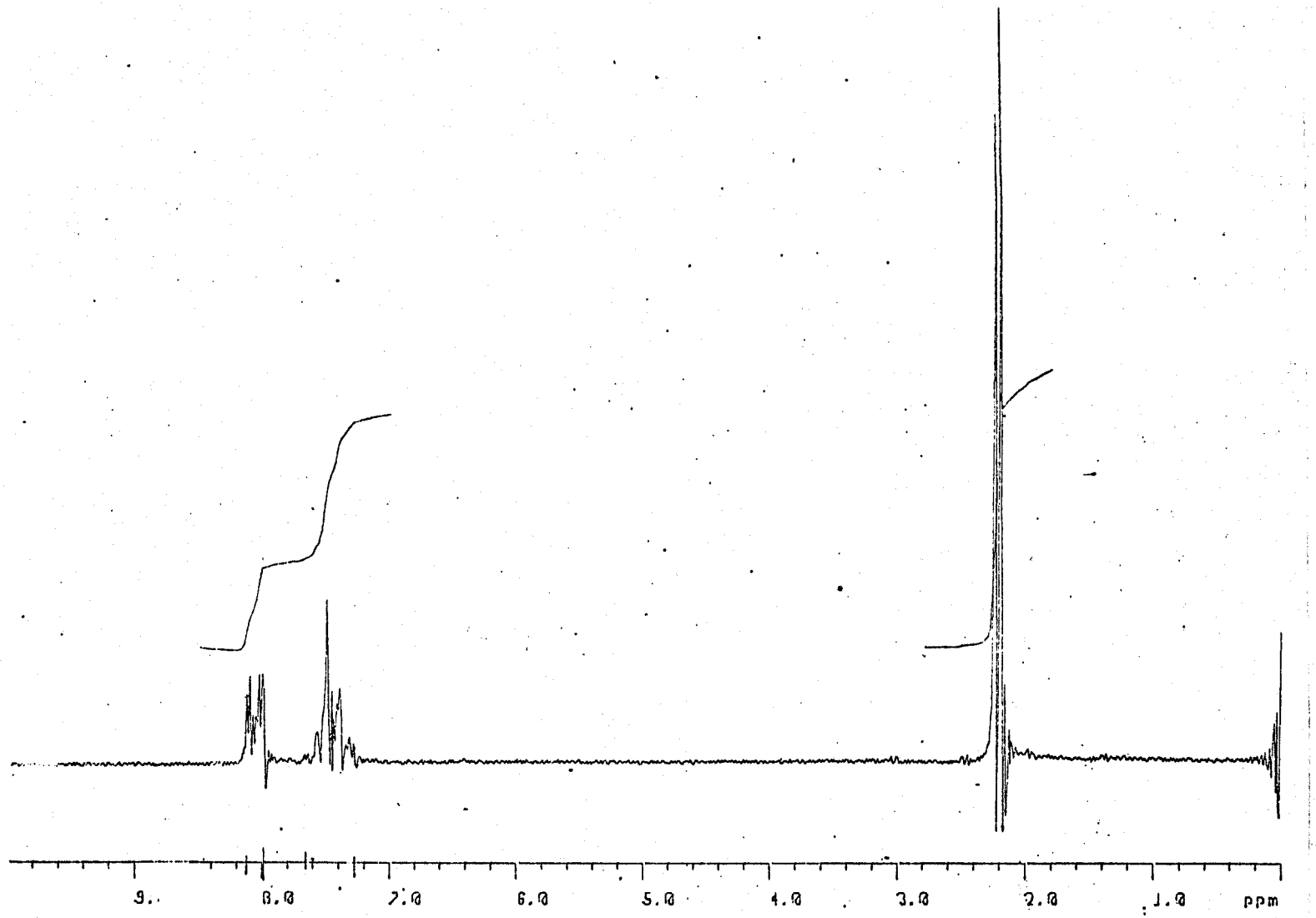
Espectro de IV (filme, FTIR) - 94



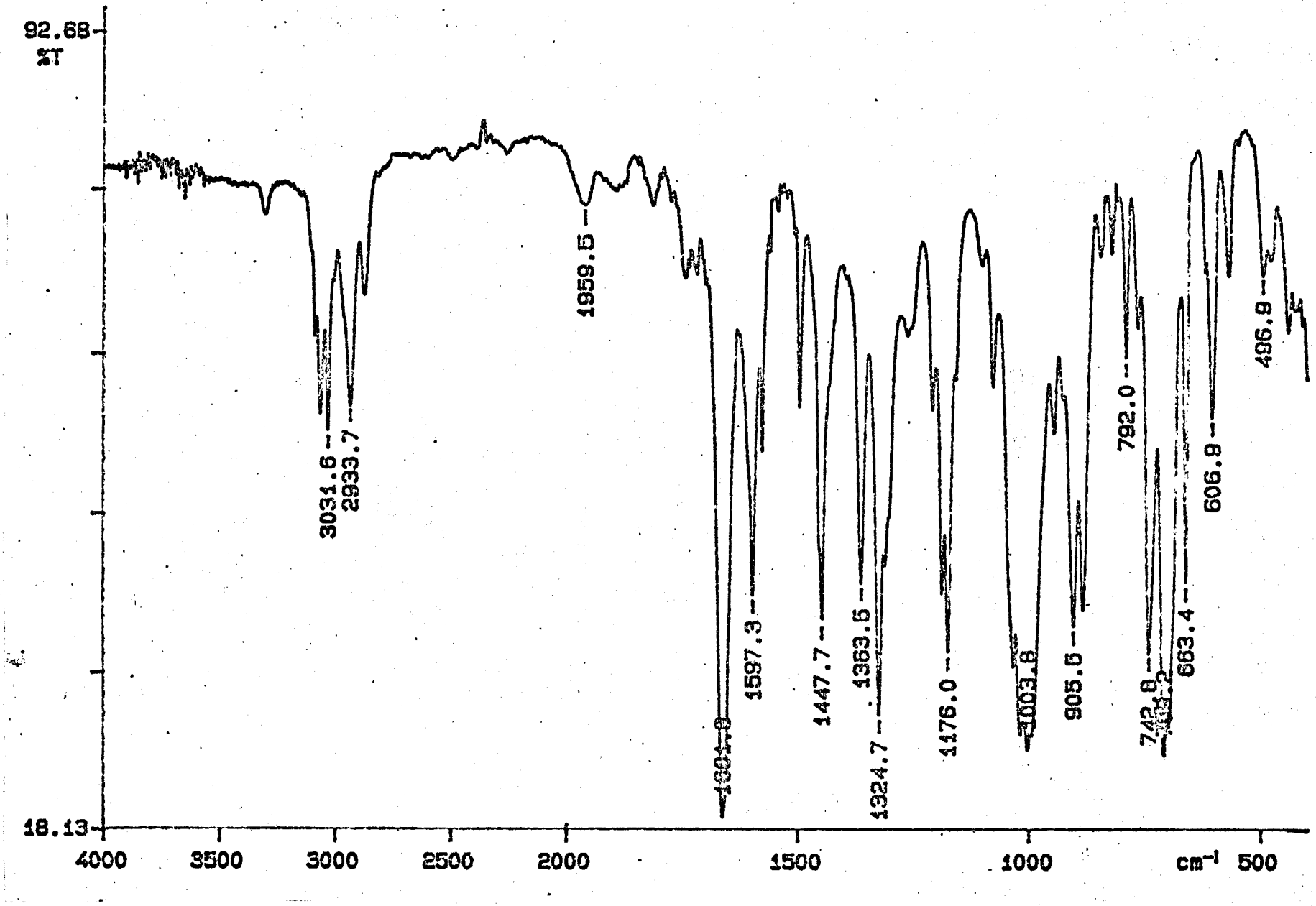
Espectro de RMN^{1}H (80 MHz) - 94



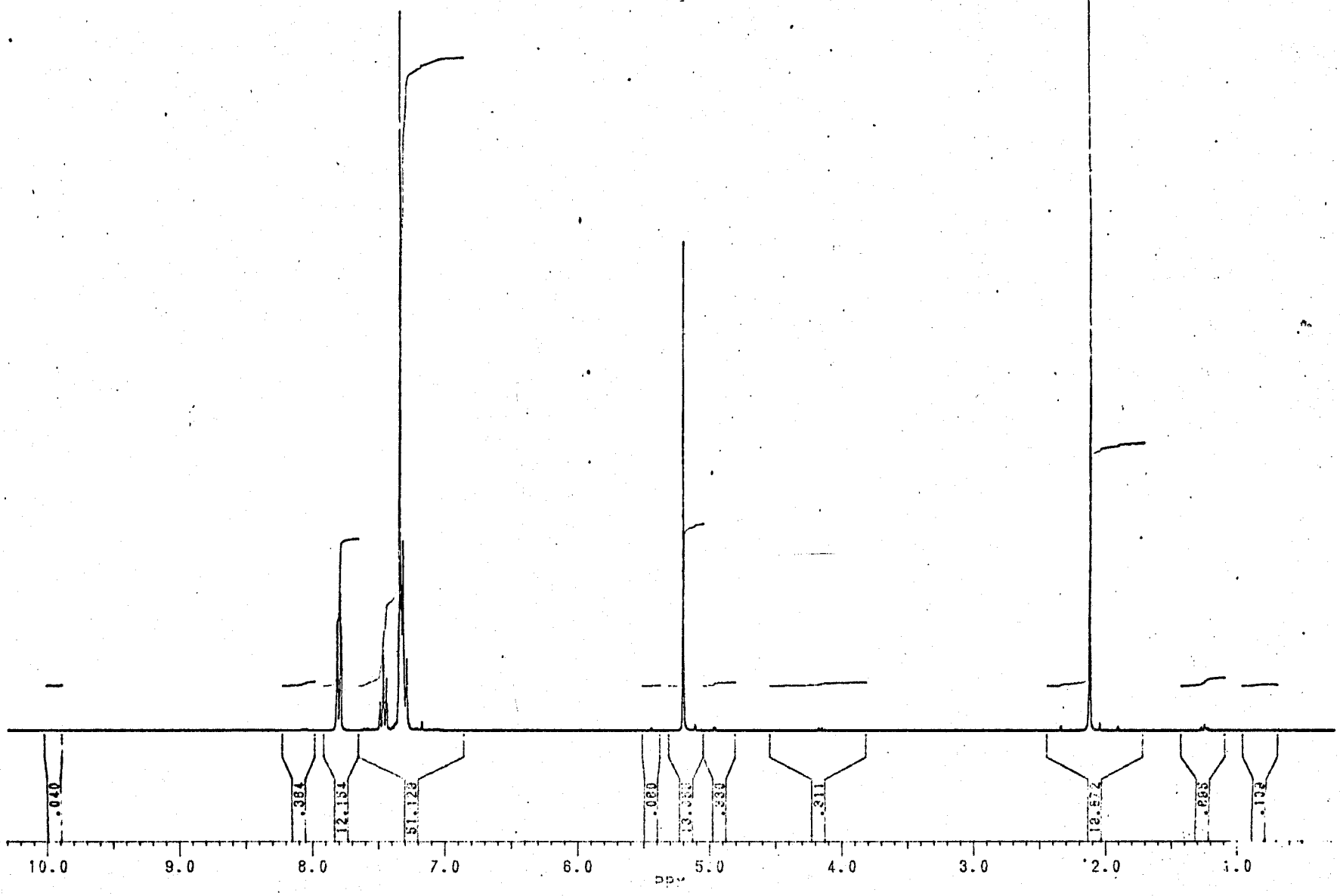
Espectro de IV (filme, Perkin-Elmer) - 95



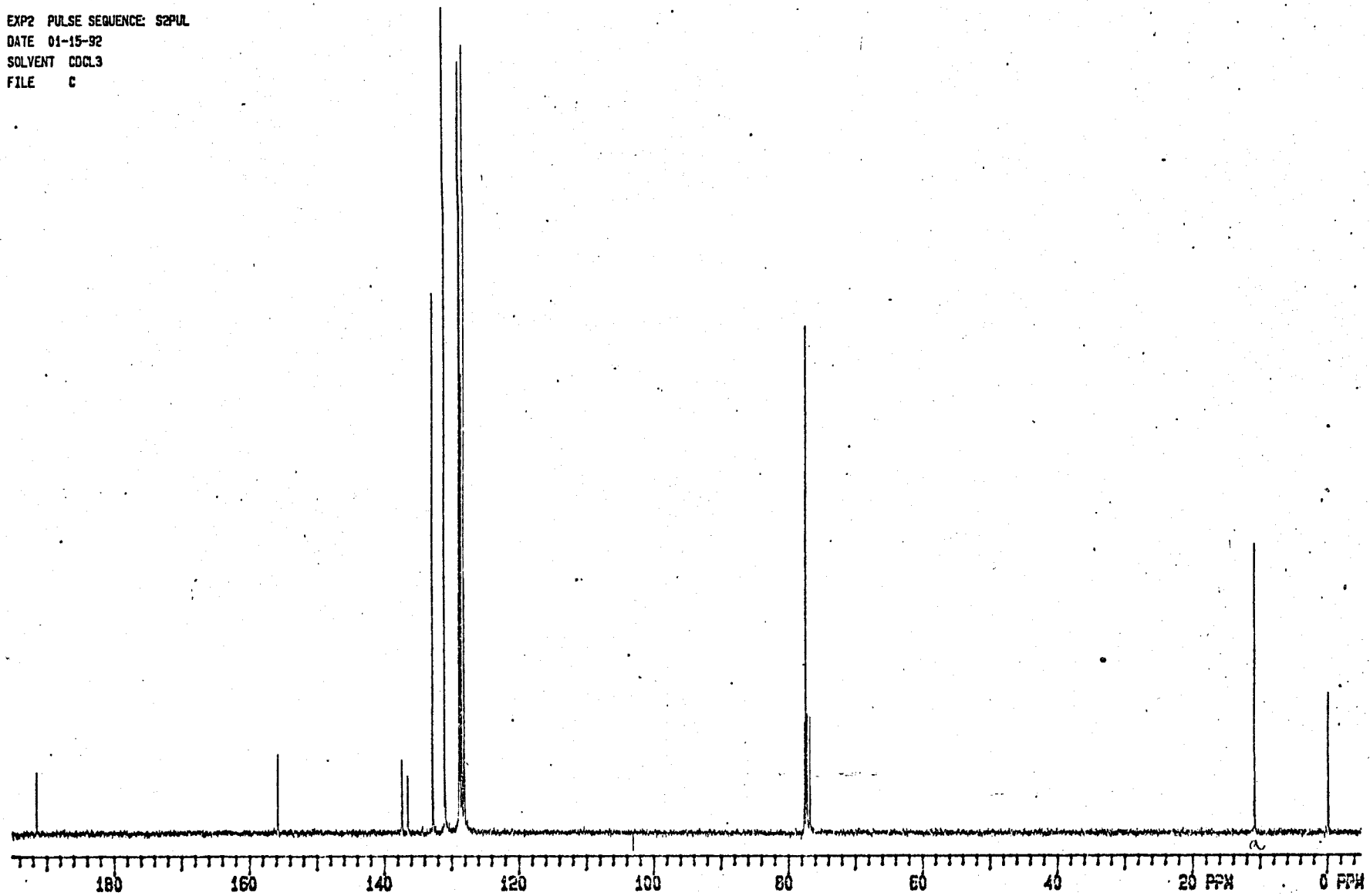
Espectro de RMN^{1}H (80 MHz) - 95



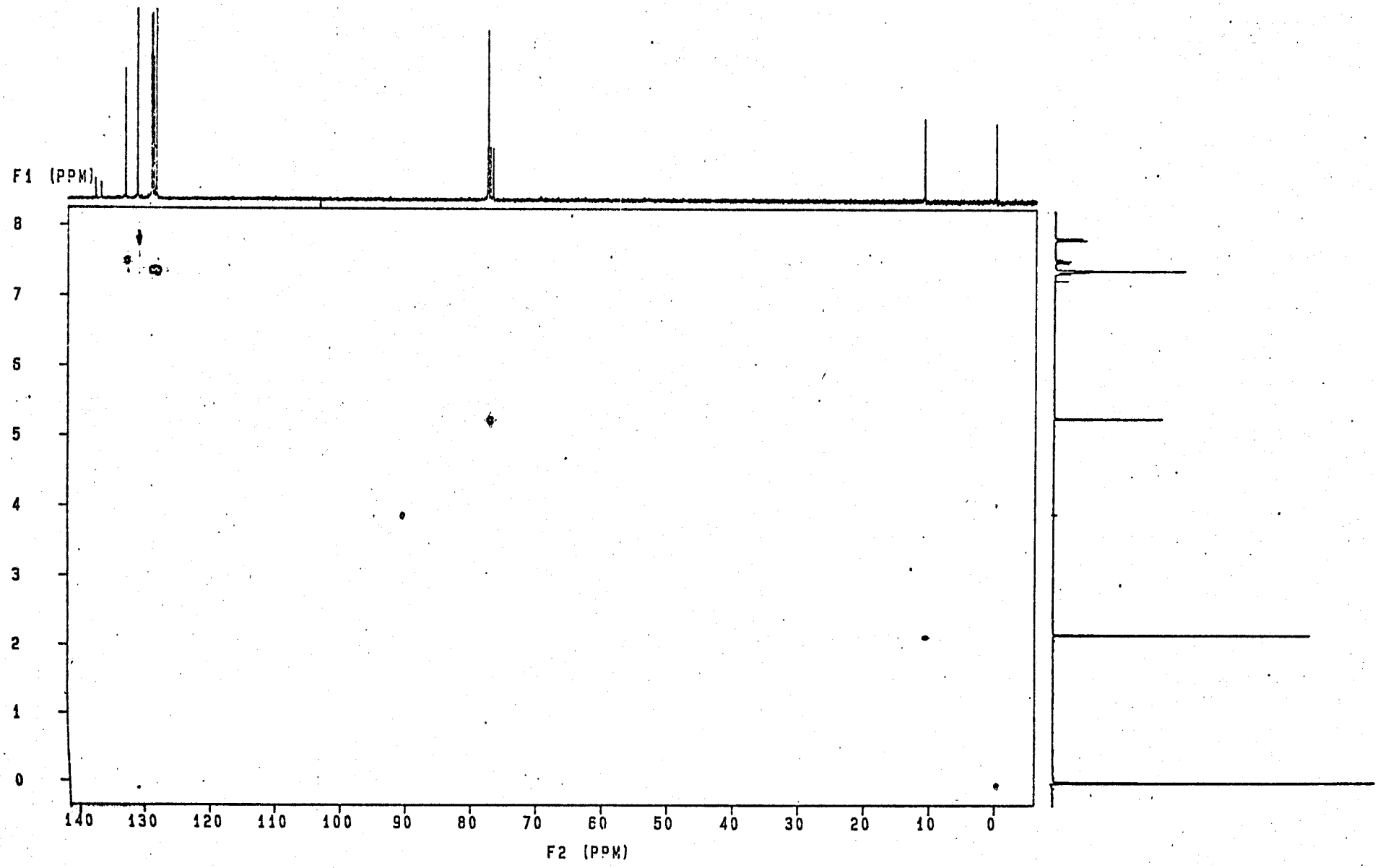
Espectro de IV (filme, FTIR) - 96



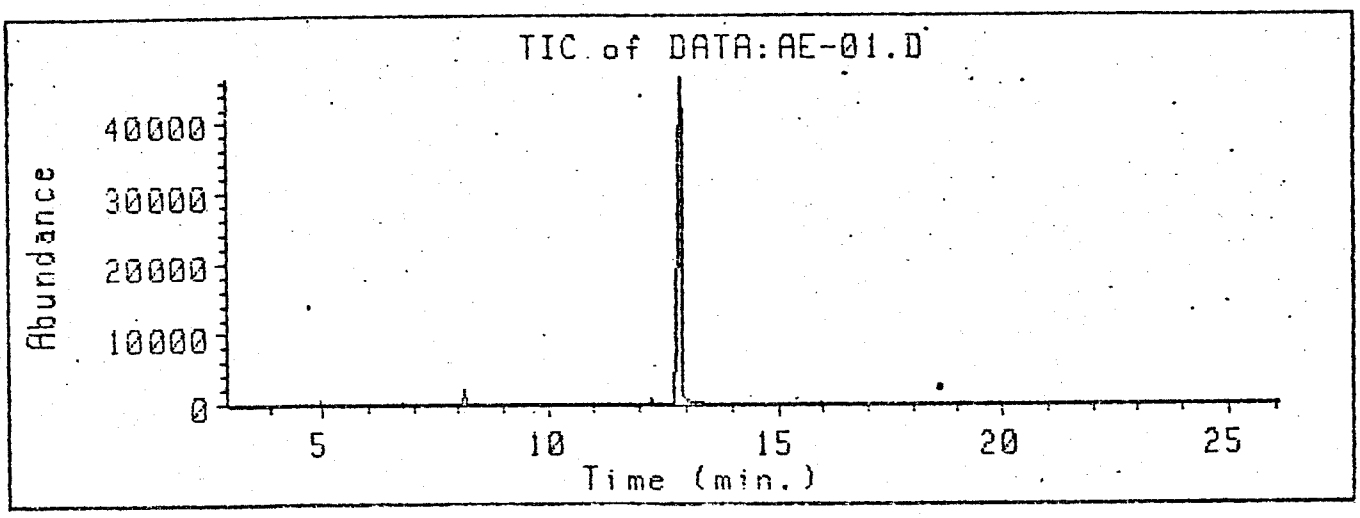
Espectro de RMN^{1}H (300 MHz) - 96

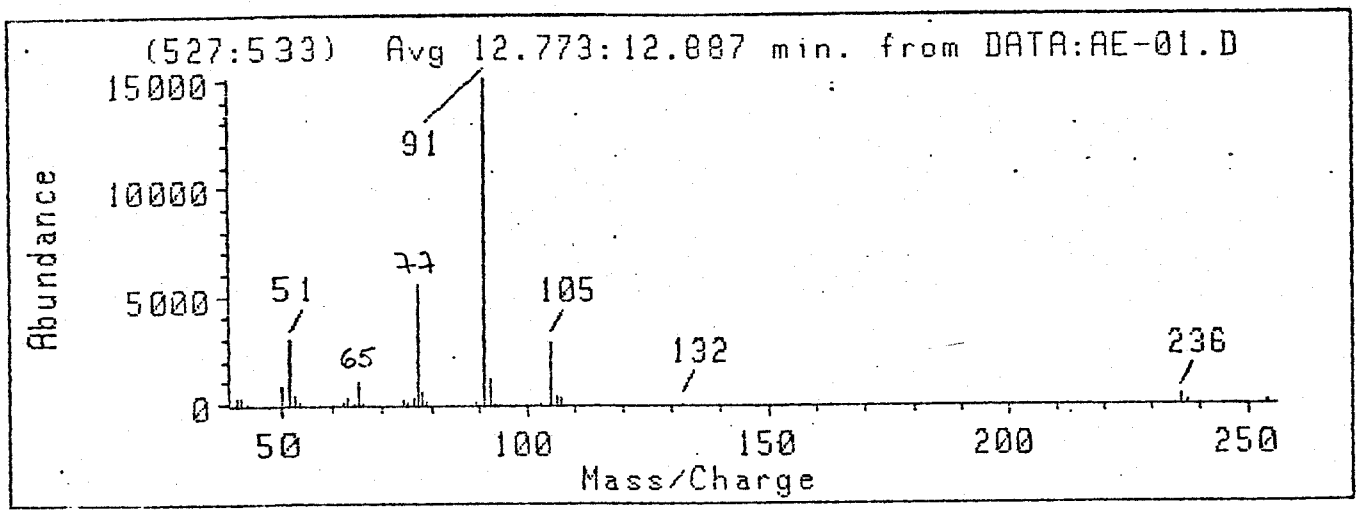


Espectro de RMN^{13}C (300 MHz) - 96

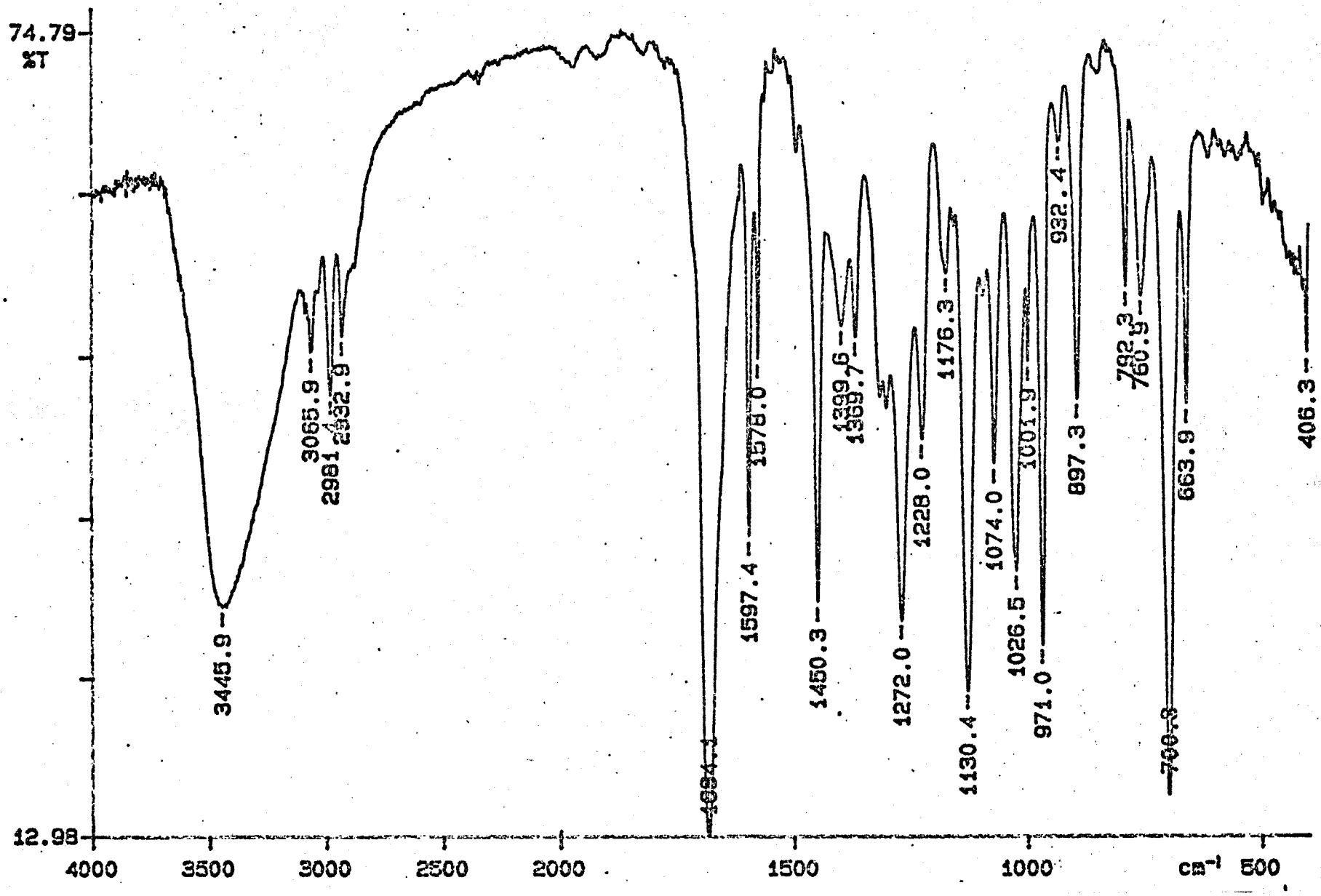


Espectro bidimensional (C-H, 300 MHz) - 96

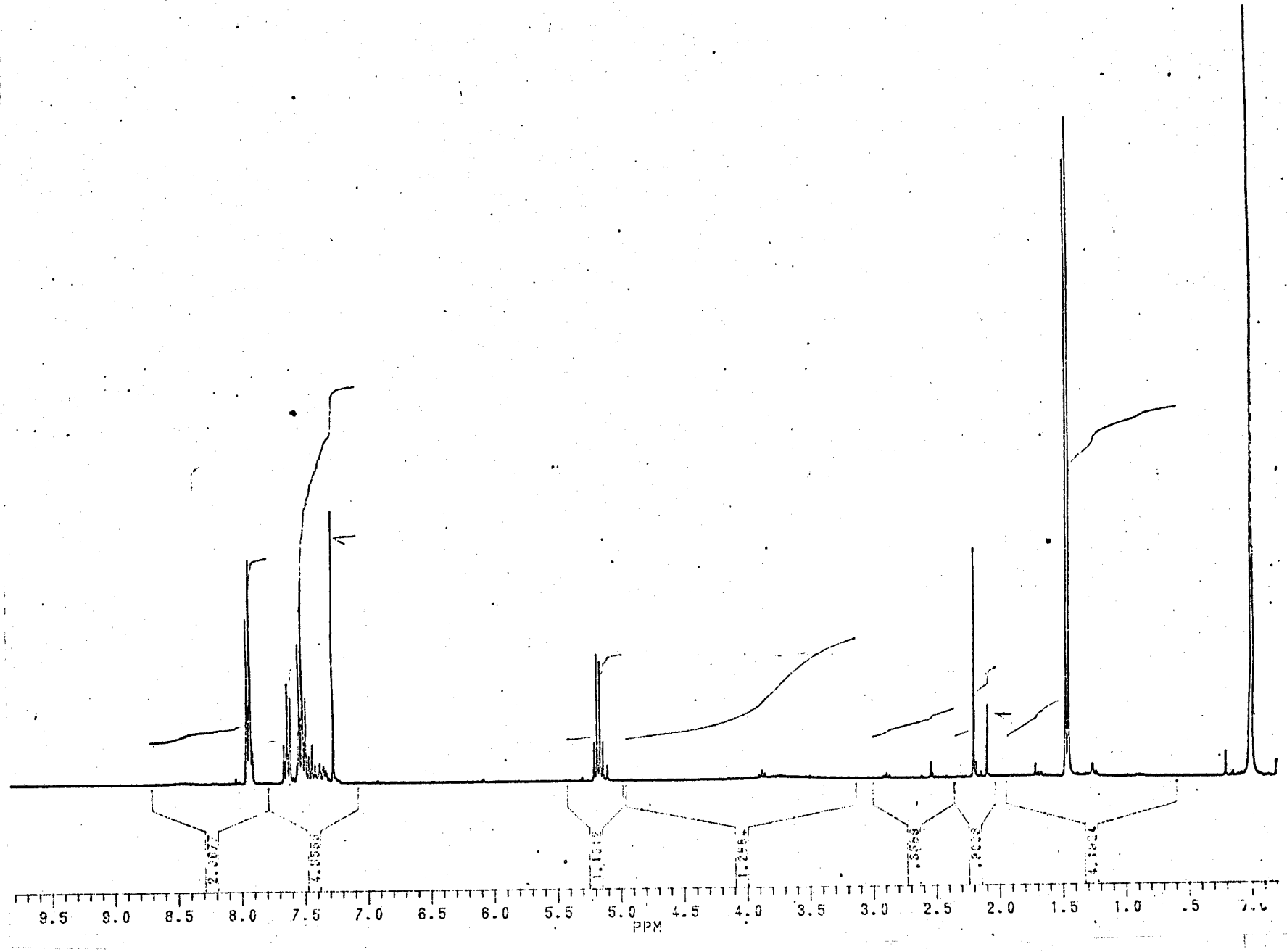




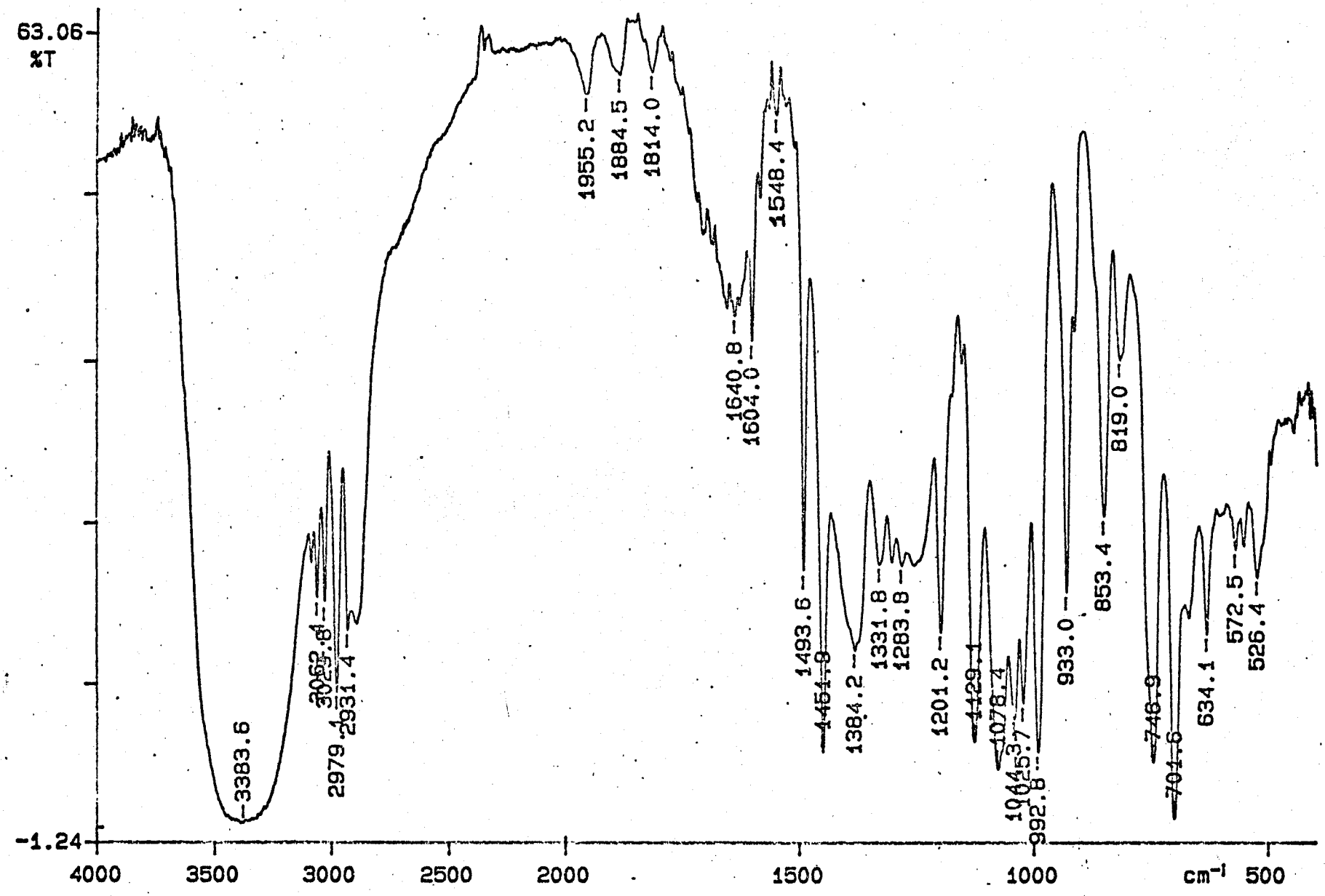
Espectro de massa e cromatograma (GC-EMS) - 96



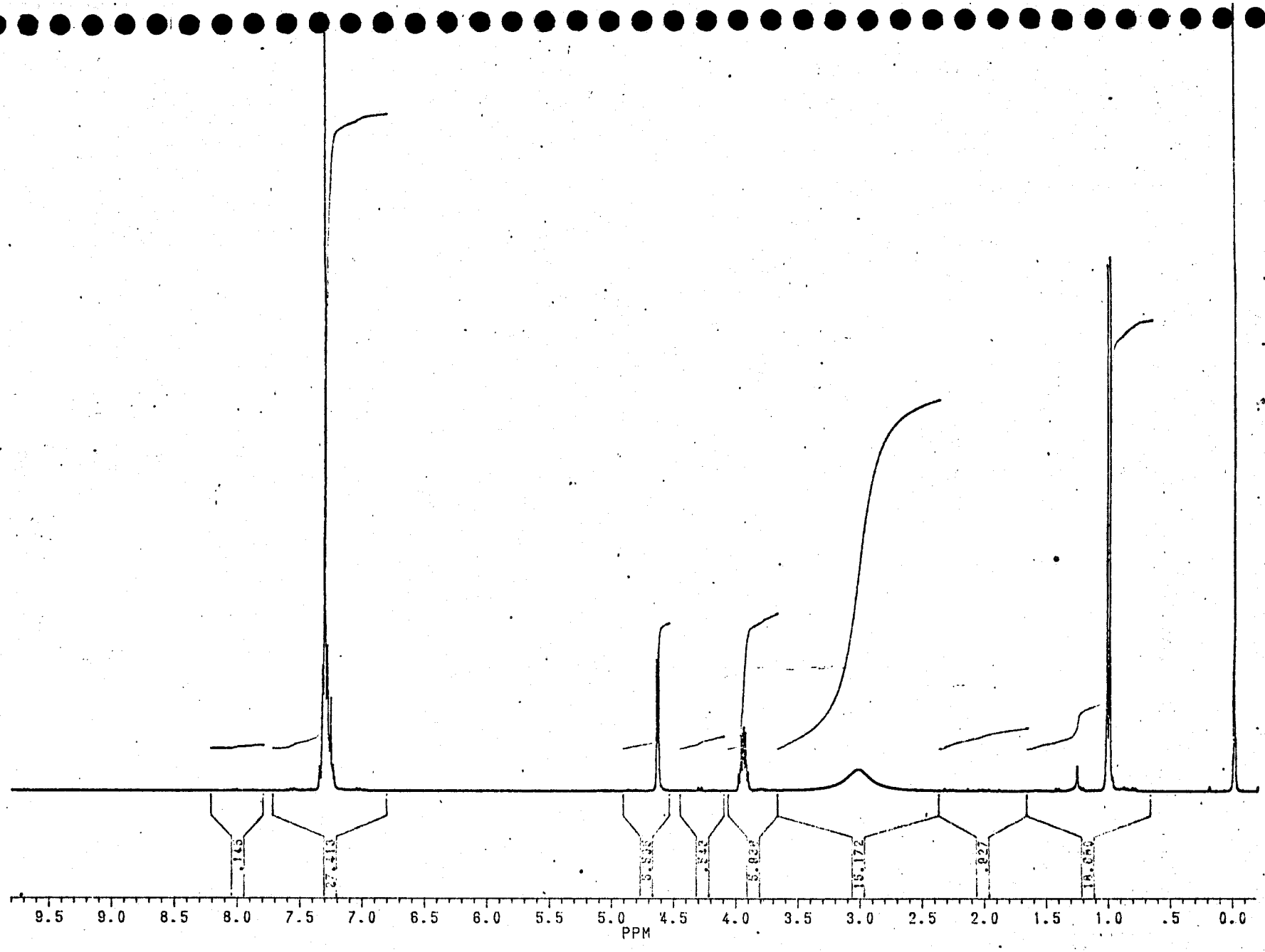
Espectro de IV (filme, FTIR) - 97



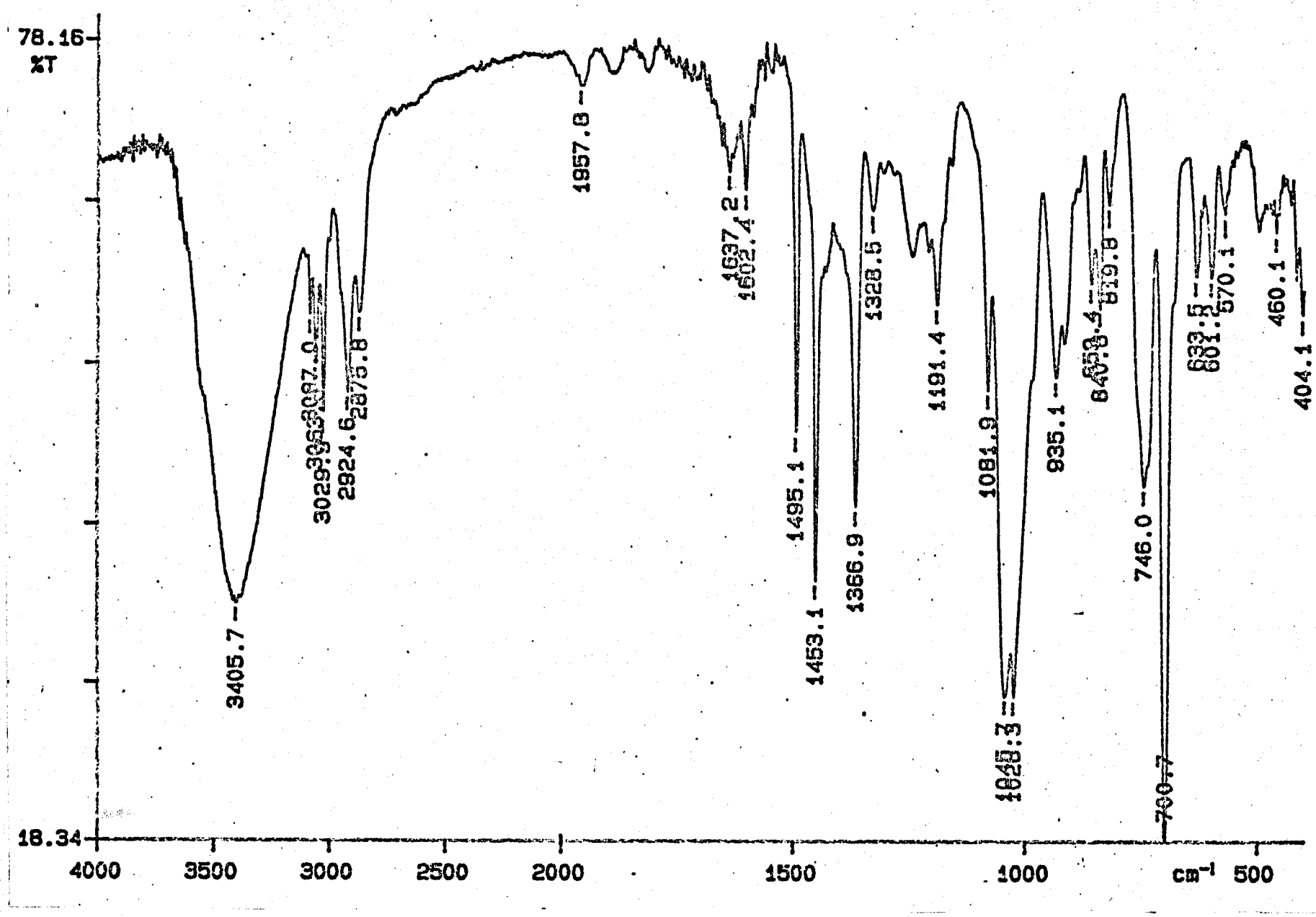
Espectro de RMN^{1}H (300 MHz) - 97



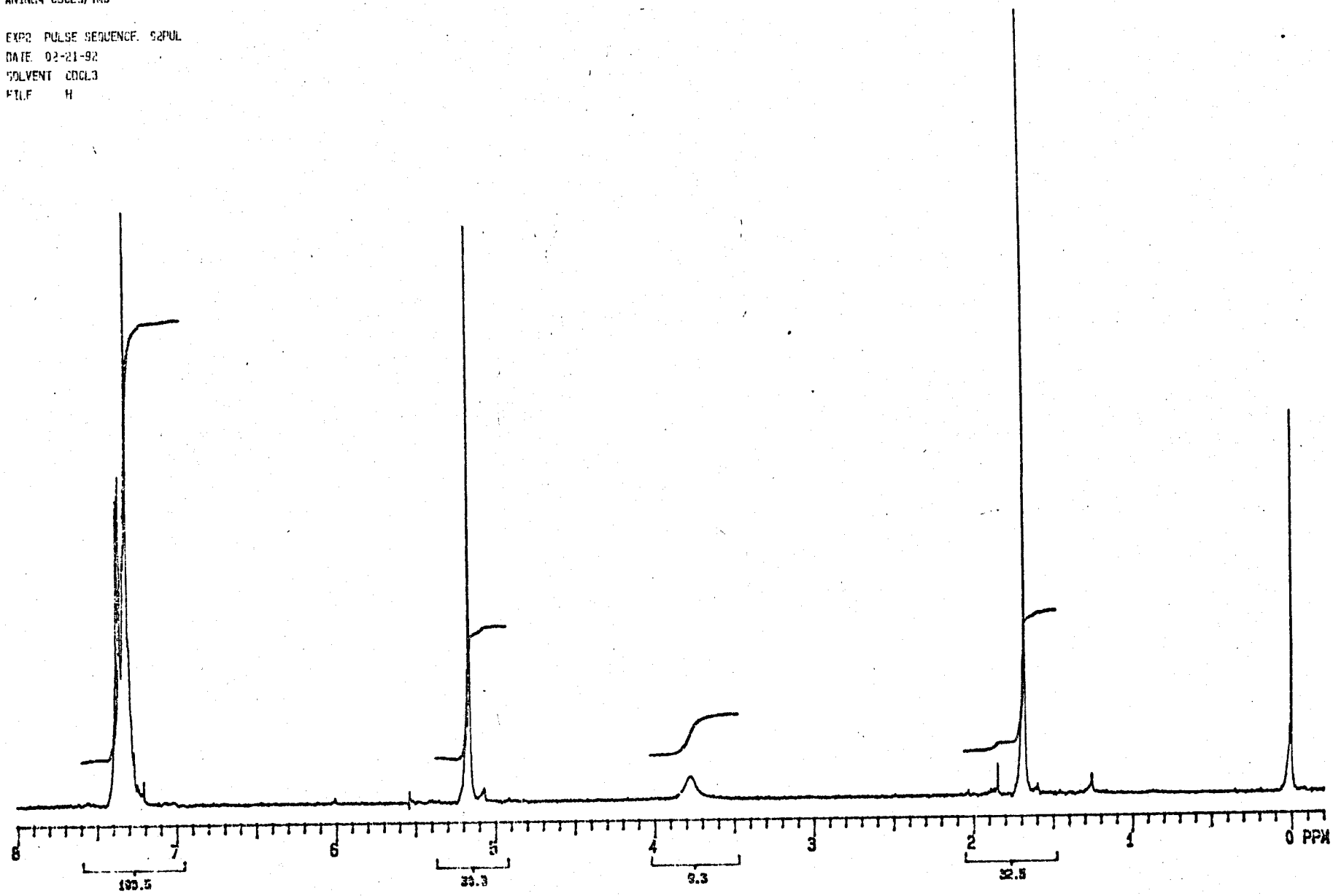
Espectro de IV (filme, FTIR) - 98



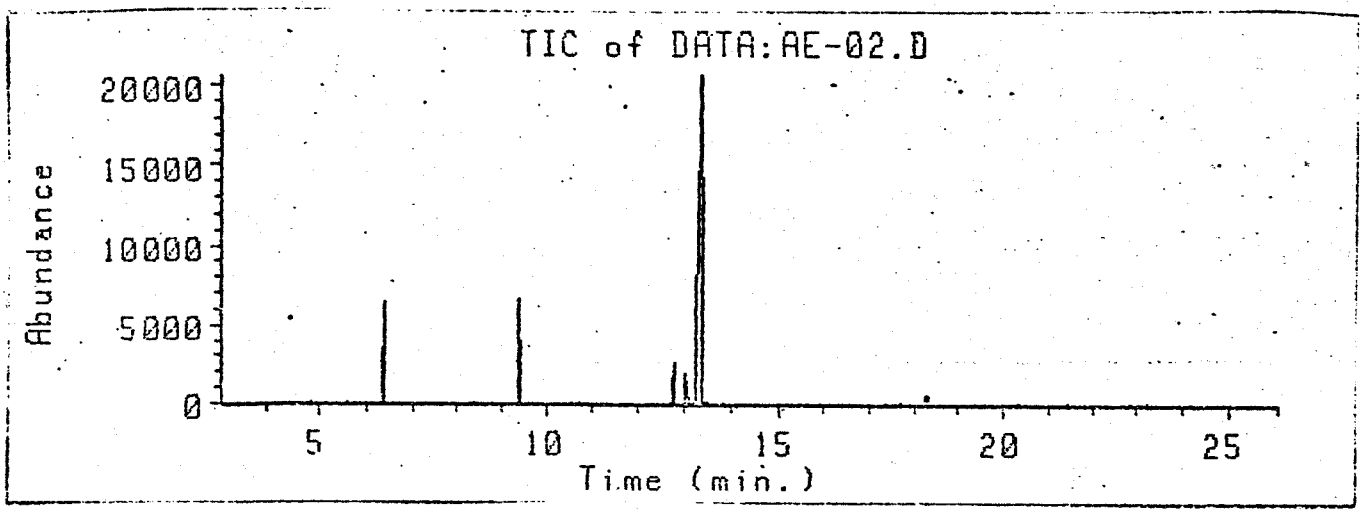
Espectro de RMN^{1}H (300 MHz) - 98

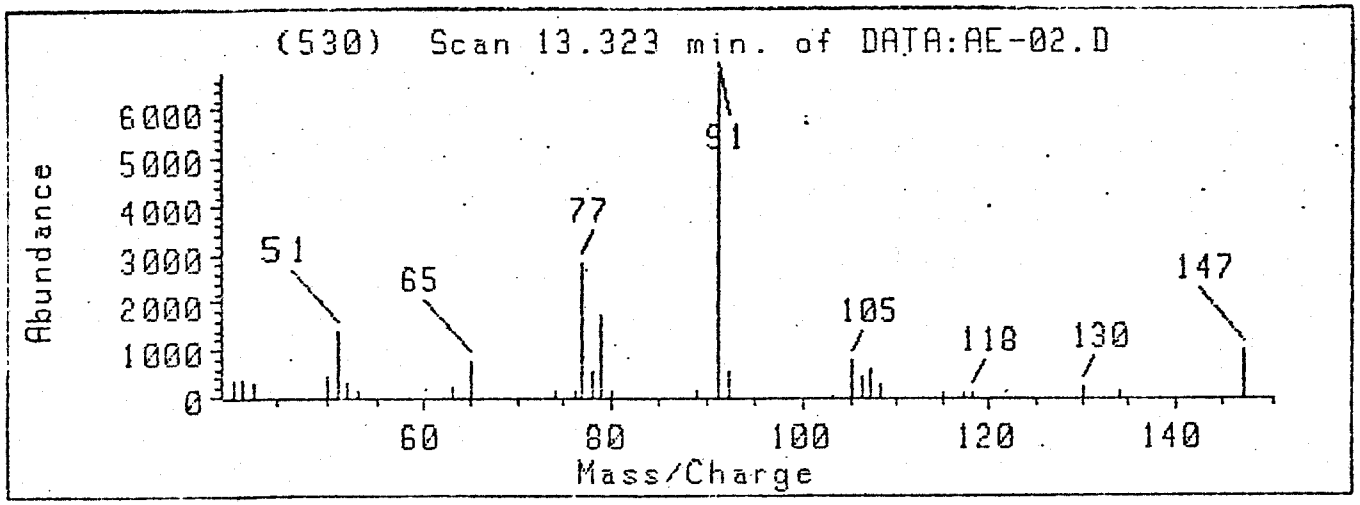


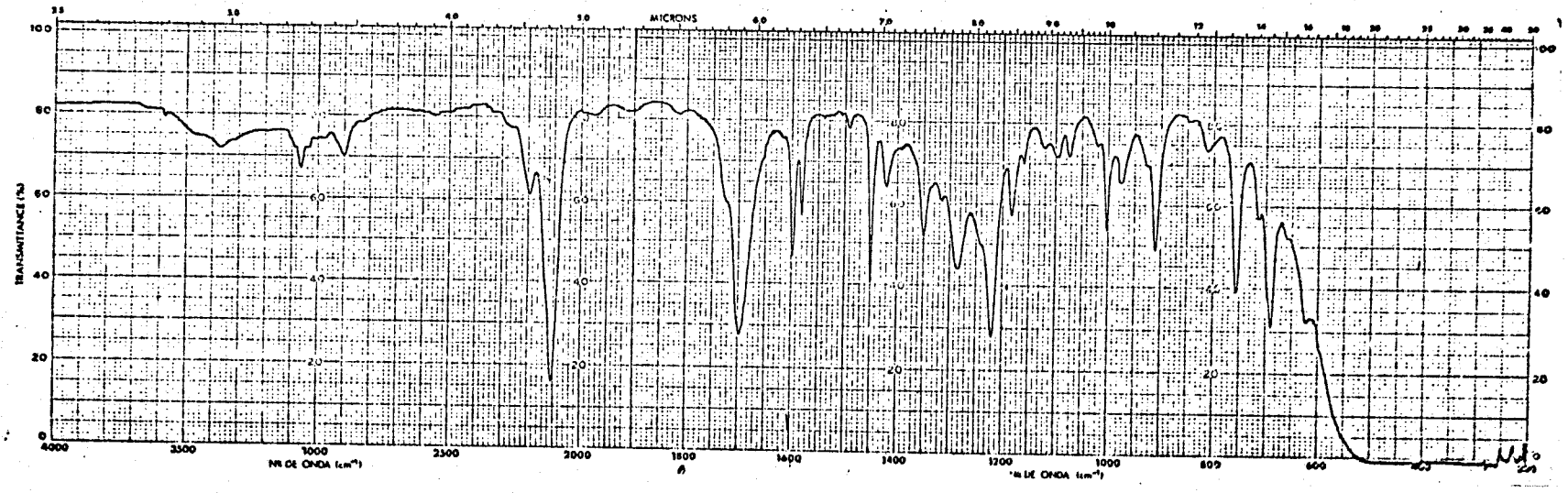
Espectro de IV (filme, FTIR) - 99



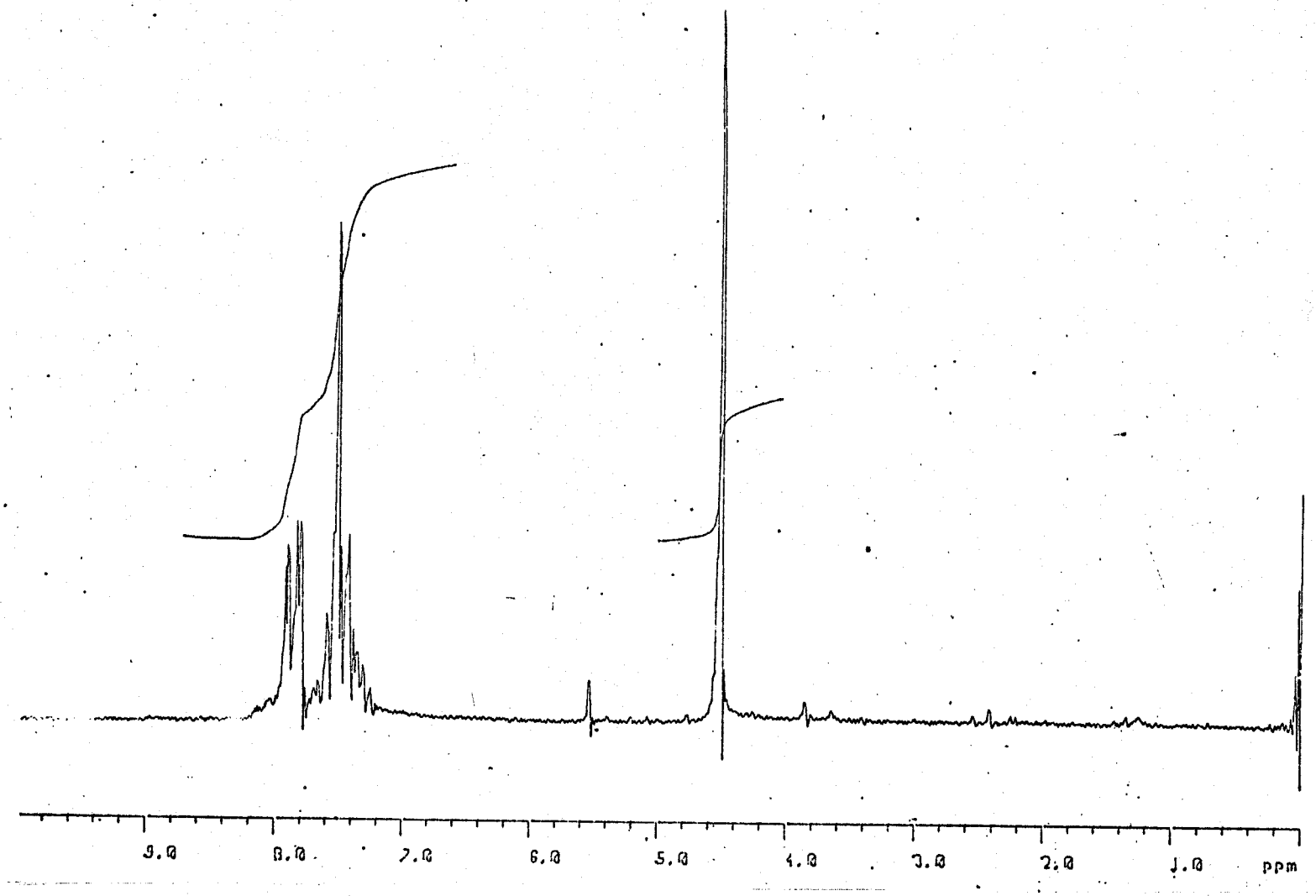
Espectro de RMN^{1}H (300 MHz) - 99


TIC of DATA:AE-02.D
Abundance
20000
15000
10000
5000
0
5
10
15
20
25
Time (min.)

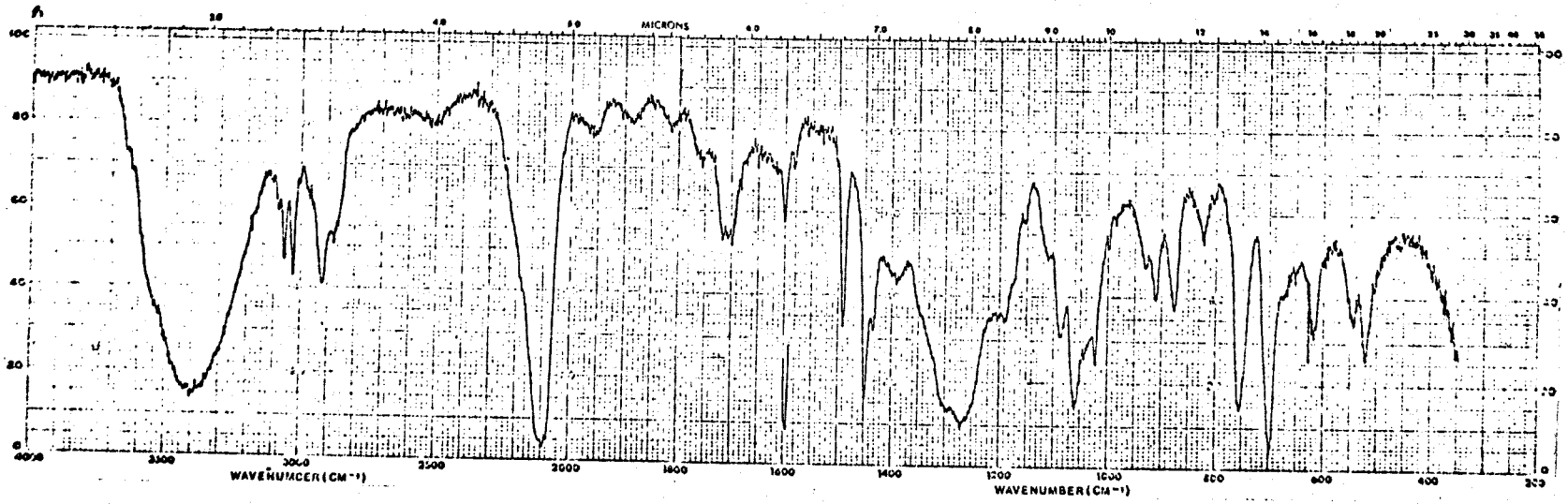

(530) Scan 13.323 min. of DATA:AE-02.D
Abundance
6000
5000
4000
3000
2000
1000
0
51
65
77
91
105
118
130
147
60
80
100
120
140
Mass/Charge



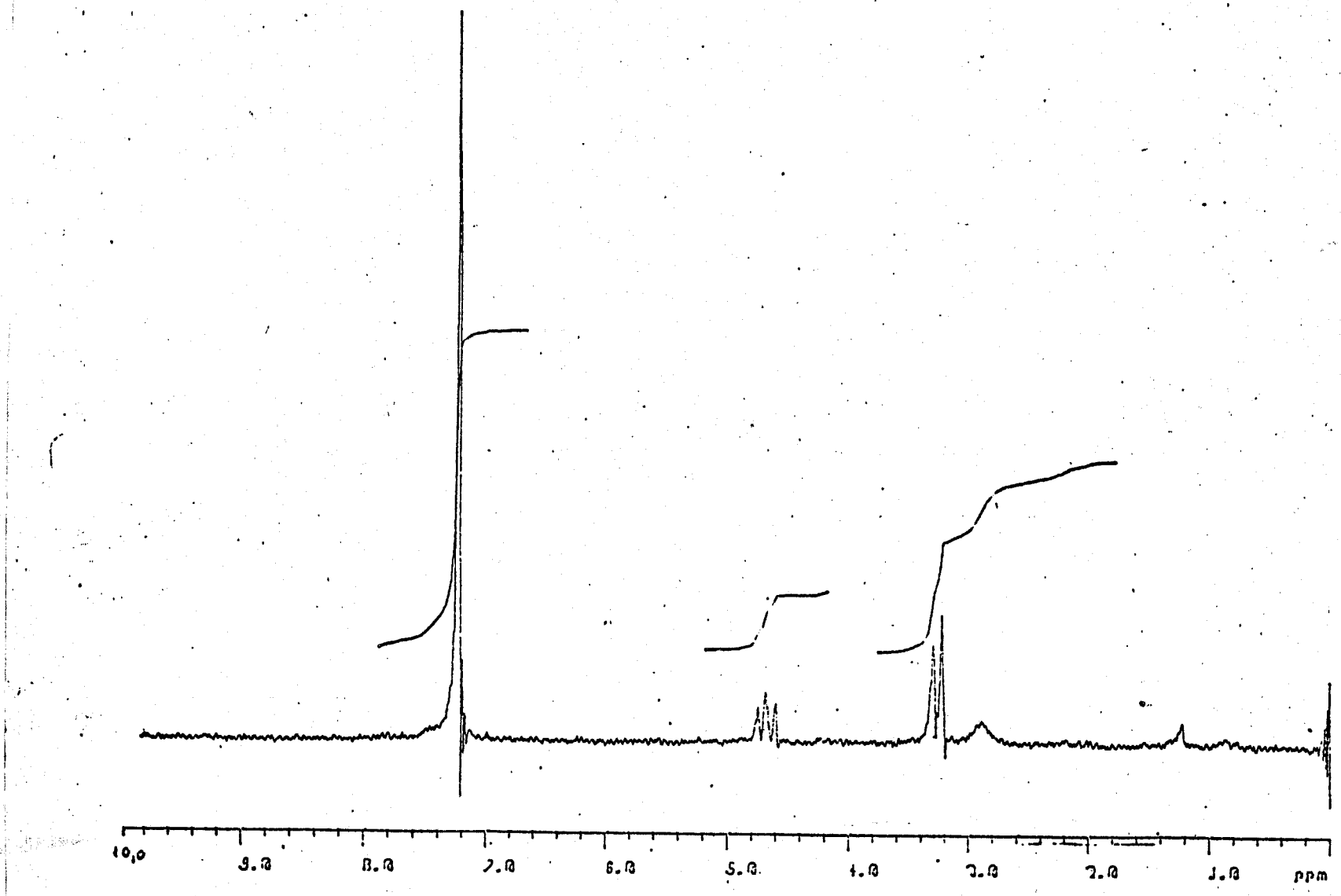
Espectro de IV (filme, Perkin-Elmer) - 101



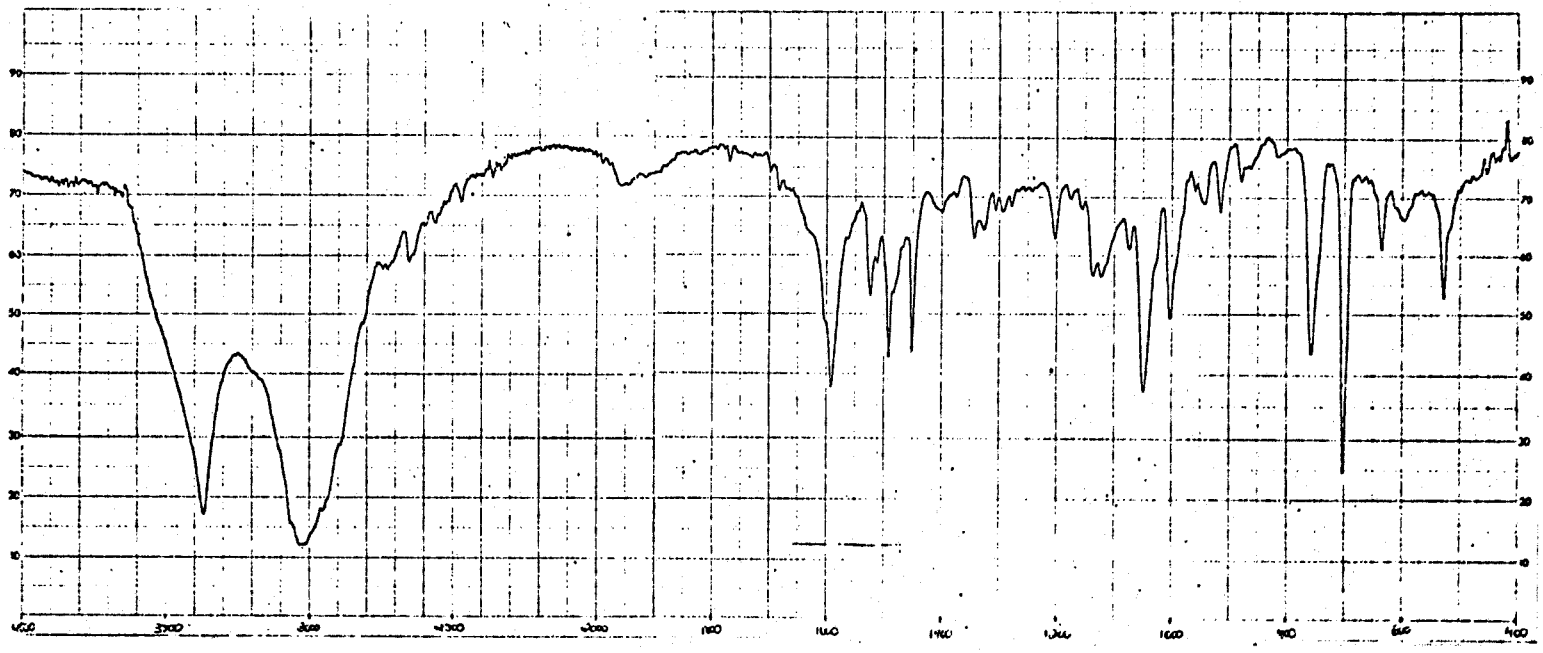
Espectro de RMN^{1}H (80 MHz) - 101



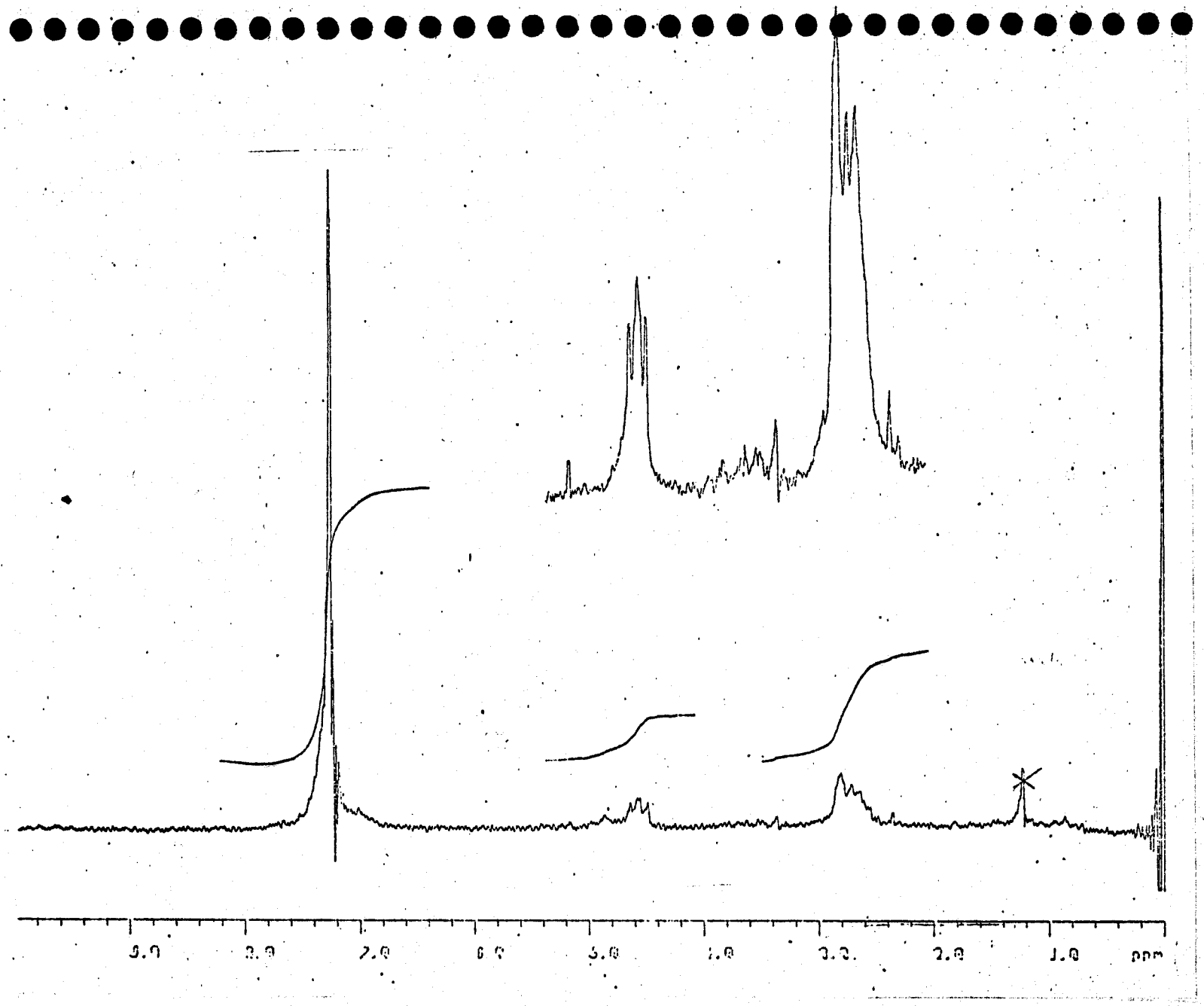
Espectro de IV (filme, Perkin-Elmer) - 102



Espectro de RMN^{1}H (80 MHz) - 102



Espectro de IV (pastilha de KBr, Perkin-Elmer) - 103



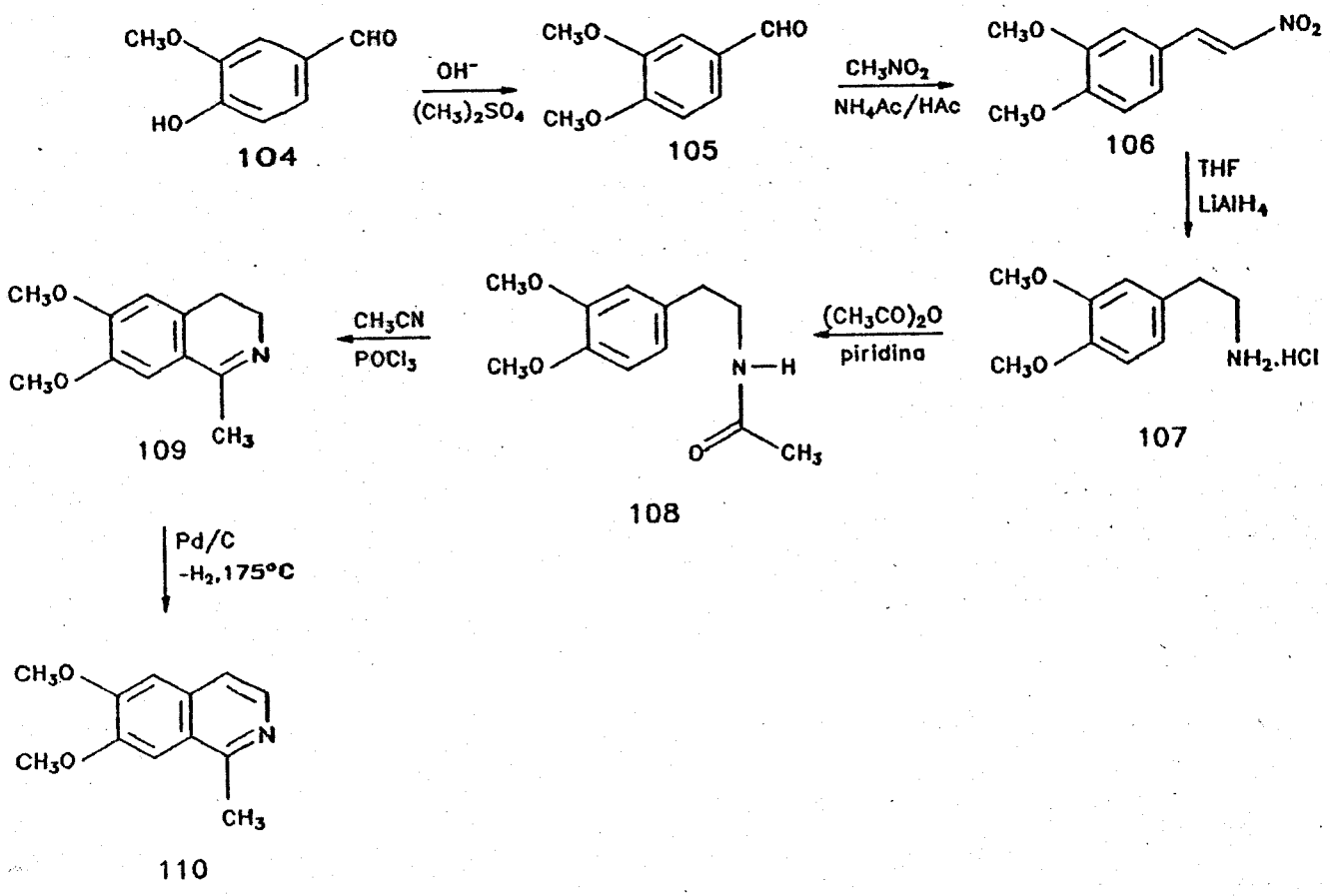
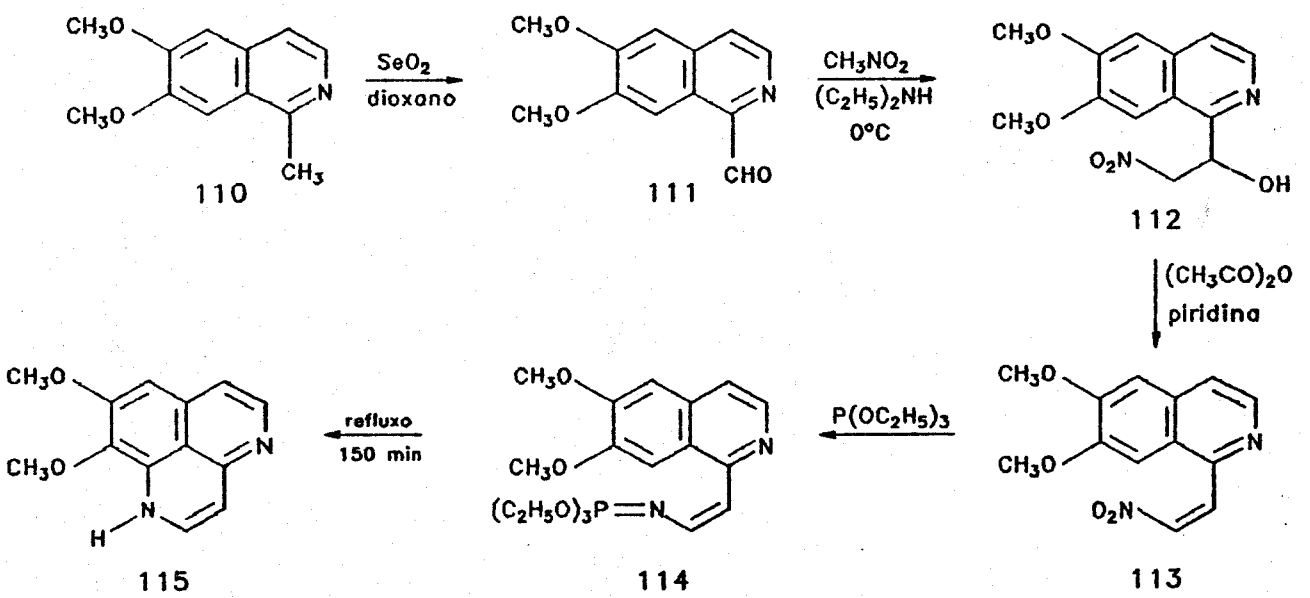
Espectro de RMN^{1}H (80 MHz) - 103

APÊNDICE B - PROJETO DE PESQUISA INICIAL

O trabalho inicialmente idealizado consistiu na síntese da Aaptamina **115**, que é isolada da esponja marinha *Aaptos aaptos*, cuja síntese foi efetuada por vários autores. Dentre eles, o trabalho publicado por Tollari (*J. Chem. Soc. Comm.*, 1987, 150), envolvendo a decomposição do derivado nitrovinílico com trietlifosfito (fornece um intermediário vinilnitreno), dando a Aaptamina. Entretanto, é conhecido que vinilnitrenos do tipo 1 ciclisam preferencialmente no nitrogênio do anel. O objetivo do trabalho era estudar a causa dessa ciclização anômala, além de procurar gerar o intermediário nitreno por diferentes métodos, como por exemplo, através de termólise de uma vinilazida.

Começou-se pela tentativa de reproduzir a síntese de Tollari. A síntese foi prosseguindo muito bem até a obtenção do composto **109**, e o composto **110** foi o mais difícil de ser obtido. A proposta inicial foi realizada, mas não obteve-se sucesso, e procurou-se outros métodos na literatura para a sua obtenção.

A amina **107** é armazenada na forma de cloridrato, por ser muito instável (primária). Nesta etapa, e também nas outras que se seguiram, onde utilizou-se $POCl_3$ e os cloridratos das isoquinolinas **109** e **110**, observou-se uma reação alérgica do meu organismo. Conforme o trabalho foi sendo desenvolvido, a alergia foi se tornando cada vez mais frequente e em maior grau, até que passados 19 meses de trabalho foi necessária a troca de projeto, pois meu organismo não suportava mais.



A continuidade da síntese proposta era a seguinte: