



Universidade Estadual de Campinas
Instituto de Química
Departamento de Química Orgânica



REDUÇÃO ENANTIOSSELETIVA DE α -HALOENONAS UTILIZANDO MICRORGANISMOS EM SISTEMA BIFÁSICO: ÁGUA/LÍQUIDO IÔNICO

DÁVILA DE SOUZA ZAMPIERI

Orientador: Prof. Dr. Paulo José Samenho Moran

Campinas, 24 de março de 2011

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE QUÍMICA DA UNICAMP

Z14r	Zampieri, Dávila de Souza. Redução enantiosseletica de alfa-haloenonas utilizando microrganismos em sistema bifásico: água/líquido iônico / Dávila de Souza Zampieri. -- Campinas, SP: [s.n], 2011. Orientador: Prof. Dr. Paulo José Samenho Moran. Doutorado - Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Química. 1. Biocatálise. 2. Haloidrinas. 3. Líquido iônico. I. Moran, Paulo José Samenho. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Química. III. Título.
------	---

Título em inglês: Enantioselective reduction of α -haloenones using microorganisms in a biphasic system: water/ionic liquid

Palavras-chaves em inglês: Biocatalysis, Haloidryns, Ionic liquid

Área de concentração: Química Orgânica

Titulação: Doutor em Ciências

Banca examinadora: Prof. Dr. Paulo José Samenho Moran (orientador), Profa. Dra. Maria da Graça Nascimento (DQ-UFSC), Prof. Dr. André Luiz Meleiro Porto (USP-IQSC), Prof. Dr. Paulo Mitsuo Imamura (IQ-UNICAMP), Profa. Dra. Ljubica Tasic (IQ-UNICAMP)

Data de defesa: 24/03/2011

*“...Glória, glória perpétua !
Nesse amanhecer da vitória...”
(Rhapsody of Fire)*

AGRADECIMENTOS

Em especial ao professor Dr. Paulo Moran, pela orientação, incentivo, confiança, amizade e convívio. Agradeço por cada dia em que me mostrava como e onde buscar a essência do conhecimento.

Ao Instituto de Química e a Universidade Estadual de Campinas, pela infraestrutura fundamental à realização deste trabalho.

Ao meu marido Arthur pelo amor, carinho, compreensão, paciência, companheirismo e pela ajuda em muitos experimentos.

Aos amigos Rodrigo (irmão do meio), Bruno (irmão caçula), João Carlos, Renan, Michel e amigas, Inês, Juliana Vale, Luciana, Gabriela, Bruna, Tarcila, Juliana Canto, Leila e Ana Vinhal pelas conversas de apoio e momentos de descontração que tornavam o dia de trabalho menos fatigante.

Ao meu querido tio Cavalcante pelo incentivo, carinho, amizade, alegrias, doces, sorrisos e por viajar quase todos os dias comigo.

A minha família do Ceará, Fátima, Deyse, Débora, Isadora, Izabella, Davi (*in memorian*) e Maria (*in memorian*) pelo amor incondicional.

A minha família de São Paulo, Edite e Galdino por me receber sempre de braços abertos em todos os momentos com carinho e Iris pelo apoio dado em muitos momentos, agradeço de coração.

Aos funcionários do IQ, que de forma direta ou indiretamente contribuíram para realização deste trabalho.

Ao professor Marcos Mattos (UFCE) pelo incentivo para fazer meu doutoramento na UNICAMP.

Aos membros da banca, professores Imamura, Ljubica, Graça e André por aceitar o convite tão gentilmente.

Aos professores José Augusto, Rittner, Wanda e Anita pelos conhecimentos transmitidos.

Ao CNPq e a BRASKEM pelo auxílio financeiro concedidos para a realização deste projeto de pesquisa.

Curriculum Vitae

Dávila de Souza Zampieri

Formação Acadêmica / Titulação:

2006 - atual: Doutorado em Ciências

Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Campinas, Brasil

Título: Redução enantiosseletiva de alfa-haloenonas utilizando microrganismo em sistema bifásico: água/líquido iônico

2000 – 2003: Mestrado em Química

Universidade Federal do Ceará (UFC), Fortaleza, Ceará, Brasil

Título: Emprego de Frutas Tropicais como Biocatalisadores em Reações de Hidrólise para Obtenção de Álcoois Quirais

2004 – 2005: Graduação em Licenciatura em Química

Universidade Federal do Ceará (UFC), Fortaleza, Ceará, Brasil

Título: Interdisciplinaridade na Caracterização Química e Importância Econômica dos Halóides

Co-orientação concluída de Iniciação Científica

- 2008 – 2009

Aluno: Bruno Ricardo Silva de Paula

Título: Síntese estereosseletiva do 2-benzil-4-cloro-3-hidroxibutanoato de etila

Bolsista: Pró-Reitoria de Pesquisa – PRP/UNICAMP – SAE

- 2009 – 2010

Aluna: Gabriela de Fátima Rossi Moraes

Título: Síntese enantiosseletiva da estrutura central de alguns inibidores de HIVPR via transformação de enonas substituídas

Bolsista: Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)

Publicações

1. MATTOS, M. C.; WENCESLAU, J. P. S.; ZAMPIERI, D.S. ou SOUZA, D. F.; OLIVEIRA, M. C. F.; LEMOS, T. L. G.; TREVISAN, M. T. S ; SOUZA, A. L. . Novel lapachol derivatives and their antioxidant activity. *Natural Product Communications*, **2006**, 1, 661-664.

Apresentações em congressos

1. ZAMPIERI, D. S., ZAMPIERI, L. A., ALMEIDA, J. C., RODRIGUES, J. A. R., MORAN, P. J. S. Biorredução de (Z)-3-bromo-4-fenil-3-buten-2-ona na presença de hexafluorofosfato de 1-butil-3-metilimidazólio. Cuatro encuentro regional de bicatalisis e biotransformaciones, Montevideo, Uruguai, **2010**.
2. ZAMPIERI, D. S., ALMEIDA, J. C., MORAN, P. J. S., RODRIGUES, J. A. R. Biorredução do 2-benzoilpropenoato de etila em meio aquoso na presença de líquido iônico, Montevideo, **2010**.
3. ZAMPIERI, D. S., ZAMPIERI, L. A. MORAIS, G. F. R., MORAN, P. J. S., RODRIGUES, J. A. R. Reações de hidrólise enzimática realizada por alunos do ensino médio. Sociedade Brasileira de Química. Águas de Lindóia, São Paulo, **2010**.
4. ZAMPIERI, D. S. ZAMPIERI, L. A., MORAN, P. J. S. RODRIGUES, J. A. R. Hidrólise de ésteres utilizando *Musa paradisíaca* L. como biocatalisador. Sociedade Brasileira de Química. Águas de Lindóia, São Paulo, **2010**.
5. RODRIGUES, B. N., ZAMPIERI, D. S., RODRIGUES, J. A. R., MORAN, P. J. S. Desracemização do alfa-tetralol via biocatálise extrativa com células íntegras. Sociedade Brasileira de Química, Águas de Lindóia, São Paulo, **2010**.
6. ALMEIDA, J. C., ZAMPIERI, D. S., RODRIGUES, J. A. R., MORAN, P. J. S. Síntese do 2-cloroacetopropenoato de etila e biorredução mediada por *Saccharomyces cerevisiae* para obtenção de um intermediário na síntese de fármacos. Sociedade Brasileira de Química. Águas de Lindóia, São Paulo, **2010**.
7. LAGO, G. L., ALMEIDA, J.C., ZAMPIERI, D.S., RODRIGUES, J. A. R., MORAN, P. J. S. Biorredução do 2-bromo-3-(4'-clorofenil)-2-propenoato de metila. Sociedade Brasileira de Química. Águas de Lindóia, São Paulo, **2010**.
8. RODRIGUES, B. N., ZAMPIERI, D. S., RODRIGUES, J. A. R., MORAN, P. J. S. Desracemização do alfa-tetralol via biocatálise extrativa com células íntegras.V Workshop de Biocatálise e Biotransformação, Maringá, **2010**.
9. ALMEIDA, J. C., ZAMPIERI, D. S, RODRIGUES, J. A. R., MORAN, P. J. S Estudo do processo de biorredução por *Saccharomyces cerevisiae* de alfa-metileno-beta-cetoésteres. V Workshop de Biocatálise e Biotransformação, Maringá, **2010**.
10. ZAMPIERI, D. S., MORAIS, G. F. R., ZAMPIERI, L. A., DE PAULA, B. R. S., RODRIGUES, J. A. R., MORAN, P. J. S. Biorredução de (Z)-3-halo-4-fenil-3-buten-2-ona mediada por *Pichia stipitis* na presença de DNB. V Workshop de Biocatálise e Biotransformação, Maringá, **2010**.

11. ZAMPIERI, D. S., DE PAULA, B. R. S., MARTINS, R. S., MORAN, P. J. S., RODRIGUES, J. A. R. Preparação de halodrinas via bio-redução de halocetonas utilizando fermento de pão. 32^a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, Fortaleza, **2009**.

12. MARTINS, R. S., ZAMPIERI, D.S., RODRIGUES, J. A. R., MORAN, P. J. S. Síntese de (2S)-2-hidroxifenil)-1-propanona um Sinton quiral de um fármaco com atividade anti-Leishmania. 32^a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, Fortaleza, **2009**.

13. DE PAULA, B. R. S., ZAMPIERI, D. S., RODRIGUES, J. A. R., MORAN, P. J. S. Síntese quimio-enzimática do (2R, 3R)-2-benzil-4-cloro-3-hidroxibutanoato de etila. 32^a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, Fortaleza, **2009**.

14. ZAMPIERI, D. S. ou SOUZA, D. F., MORAIS, G. F. R., RODRIGUES, J. A. R., MORAN, P. J. S. Z/E Isomerism on the Bioreduction of α -halo-beta-phenyl-3-buten-2-ones mediated by *Saccharomyces cerevisiae*. 9th International Symposium on Biocatalysis (Biotrans), Suíça, **2009**.

15. ZAMPIERI, D.S., DE PAULA, B. R. S., MORAIS, G. F. R., RODRIGUES, J. A. R., MORAN, P. J. S. Bioreduction of (Z)-3-halo-4-phenyl-3-buten-2-one. 13th Brazilian Meeting on Organic Synthesis, Águas de São Pedro, São Paulo, **2009**.

16. DE PAULA, B. R. S., ZAMPIERI, D. S. ou SOUZA, D. F., MARTINS, R. S., RODRIGUES, J. A. R., MORAN, P. J. S. Redução estereosseletiva do 2-benzilideno-4-cloroacetoacetato de etila. IV Workshop de Biocatálise e Biotransformação, São Carlos, São Paulo, **2008**.

Apresentação Oral

1. ZAMPIERI, D.S., MORAIS, G. F. R., ZAMPIERI, L. A., DE PAULA, B. R. S., RODRIGUES, J. A. R., MORAN, P. J. S. Biorredução de (Z)-3-halo-4-fenil-3-buten-2-ona mediada por *Pichia stipitis* na presença de DNB. V Workshop de Biocatálise e Biotransformação, Maringá, **2010**.

Prêmios

1. ZAMPIERI, D. S., ZAMPIERI, L. A., ALMEIDA, J. C., RODRIGUES, J. A. R., MORAN, P. J. S. Biorredução de (Z)-3-bromo-4-fenil-3-buten-2-ona na presença de hexafluorofosfato de 1-butil-3-metilimidazólio. Cuatro encuentro regional de biocatálisis e biotransformaciones, Montevideo, Uruguai, **2010**. (Painel escolhido entre os 6 melhores painéis do congresso).

RESUMO

Neste trabalho foi realizado o estudo de biorreduções utilizando microrganismos em sistema bifásico: água/líquido iônico. As reduções de (*Z*)-3-cloro-4-fenil-3-buten-2-ona, (*E*)-3-cloro-4-fenil-3-buten-2-ona e (*Z*)-3-bromo-4-fenil-3-buten-2-ona α -haloenonas foram realizadas em meio aquoso e na presença de hexafluorofosfato de 1-butil-3-metilimidazólio, usando como biocatalisadores *Saccharomyces cerevisiae* CCT 3019, *Pichia stipitis* CCT 2617, *Geotrichum candidum* CCT 1205, *Candida albicans* CCT 0776, *Rhodotorula glutinis* CCT 0783 e *Micrococcus luteus* CCT 2283. Em geral, os resultados obtidos na redução das α -haloenonas catalisadas pelos microrganismos supracitados, em sistema bifásico: água/líquido iônico, foram melhores do que em meio aquoso, obtendo-se aumentos consideráveis nos excessos enantioméricos das correspondentes haloidrinas produzidas atingindo valores de até 97% ee. Esse fato pode ser devido às constantes de partição ($K = 257$ a 316) das α -haloenonas que indicam a presença da maior parte dessas enonas no líquido iônico, classificando essas reações como biocatálise extrativa *in situ*. A determinação da configuração das haloidrinas obtidas juntamente com o monitoramento dos produtos formados durante a biorredução, permitiram a elaboração de uma proposta de mecanismo onde a ligação dupla $C=C$ é reduzida antes da ligação da $C=O$. A utilização de *P. stipitis* como biocatalisador em meio aquoso levou à formação do produto desalogenado 4-fenil-2-butanona após 72 h de reação, porém, com a adição de um inibidor de radicais livres (DNB), foi observado a formação das correspondentes α -halocetonas e haloidrinas. Com base no teste dos halos de inibição dos microrganismos frente às α -haloenonas, conclui-se que as mesmas possuem efeitos inibitórios para os biocatalisadores empregados e a presença do líquido iônico diminui o efeito de inibição. Os resultados da biorredução das α -halo-cicloexenonas e α -halo-ciclopentenonas mostraram que o processo é mais reativo do que com as α -haloenonas supracitados.

ABSTRACT

In this work, the study of enantioselective reduction of α -haloenones using microorganisms was carried out in biphasic system: water/ionic liquid. Therefore, reductions of (*Z*)-3-chloro-4-phenyl-3-buten-2-one, (*E*)-3-chloro-4-phenyl-3-buten-2-one and (*Z*)-3-bromo-4-phenyl-3-buten-2-one were carried out in aqueous medium, and in the presence of 1-butyl-3-methylimidazolium hexafluorophosphate, using as biocatalysts the following microorganisms: *Saccharomyces cerevisiae* CCT 3019, *Pichia stipitis* CCT 2617, *Geotrichum candidum* CCT 1205, *Candida albicans* CCT 0776, *Rhodotorula glutinis* CCT 0783, and *Micrococcus luteus* CCT 2283. In general, the results obtained in the reduction of the α -haloenones catalyzed by those microorganisms in the water/ionic liquid biphasic system were better than in aqueous medium, giving considerable increases in enantiomeric excesses of the corresponding halohydrins, reaching values up to 97% ee. This fact may be due to the constants of partition ($K = 257$ to 316) of α -haloenones that indicate the most quantity of the enones is in the ionic liquid phase, classifying these reactions as *in situ* extractive biocatalysis since the cells are in the water phase. The determination of the halohydrins' configuration, as well as the monitoring of intermediates and products during the reaction allowed the elaboration of a plausible mechanism, where the C=C bond is reduced before the C=O bond. The use of *P. stipitis* as a biocatalyst in aqueous medium gave the dehalogenated product 4-phenyl-2-butanone after 72 hours of reaction. On the other hand, the addition of a radical inhibitor (DNB) to the medium avoids the undesired dehalogenation and thus the corresponding α -haloketones and halohydrins were produced. It was observed that the haloenones have an inhibitory effect to the biocatalysts. This inhibitory effect was decreased in the biphasic system due to the decrease of enones concentration in the aqueous phase. The results for the bioreductions of α -halocyclohexenones and α -halocyclopentenones showed that these substrates are more reactive than the acyclic α -haloenones.

SUMÁRIO

Agradecimentos	vii
Curriculum Vitae	ix
Resumo	xiii
Abstract	xv
Lista de Abreviaturas	xxiii
Lista de Tabelas	xxv
Lista de Figuras	xxvii
Lista de Esquemas	xxxi
Lista de Espectros	xxxv
1. Introdução	3
1.1. Reações de redução biocatalítica	9
1.2. Haloidrinas	18
1.3. Suporte para imobilização (substrato ou enzima)	21
1.4. Co-solventes em biocatálise (Líquidos iônicos)	23
2. Objetivos	31
3. Resultados e discussão	35
3.1. Preparação dos substratos	35
3.2. Reações de biorreduções	37
3.2.1. Biorreduções utilizando fermento de pão	37
3.2.2. Biorreduções utilizando <i>Pichia stipitis</i>	44
3.2.3. Biorreduções utilizando <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , <i>Candida albicans</i> , <i>Geotrichum candidum</i> e <i>Micrococcus luteus</i>	54

3.2.4. Teste de inibição dos microorganismos pelos (Z)-bromo-4-fenil-3-buten-2-ona (Z)- 38 e (Z)-cloro-4-fenil-3-buten-2-ona (Z)- 39	61
3.2.5. Contagem de células viáveis dos microorganismos antes e após as biorreduções utilizando (Z)-bromo-4-fenil-3-buten-2-ona (Z)- 38 e (Z)-cloro-4-fenil-3-buten-2-ona (Z)- 39	63
3.2.6. Determinação da concentração de (Z)-bromo-4-fenil-3-buten-2-ona (Z)- 38 e (Z)-cloro-4-fenil-3-buten-2-ona (Z)- 39 na fase aquosa das reações com líquido iônico	67
3.2.7. Teste para verificar a existência de oxidorredutases extra celulares	69
3.2.8. Biorreduções de α -halocicloexenonas utilizando fermento de pão, <i>Rhodotorula glutinis</i> e <i>Pichia stipitis</i> como biocatalisadores	70
3.2.9. Biorreduções de α -halociclopentenonas utilizando fermento de pão, <i>Rhodotorula glutinis</i> e <i>Pichia stipitis</i> como biocatalisadores	71
4. Parte experimental	77
4.1. Preparação dos Substratos	77
4.1.1. Preparação de 4-fenil-3-buten-2-ona	77
4.1.2. Preparação do 3,4-dibromo-4-fenil-2-butanona	78
4.1.3. Preparação do (Z)-3-bromo-4-fenil-3-buten-2-ona	79
4.1.3.1. Método A	79
4.1.3.2. Método B	80
4.1.4. Preparação do (E)-3-bromo-4-fenil-3-buten-2-ona	80
4.1.4.1. Método A	80
4.1.4.2. Método B	81
4.1.4.3. Método C	81
4.1.4.4. Método D	82
4.1.4.5. Método E	82
4.1.4.6. Método G	83

4.1.5. Propostas para preparação 3-bromo-4-fenil-3-butanona	84
4.1.5.1. Hidrogenação utilizando cloreto de cobre	84
4.1.5.2. Hidrogenação utilizando éster de Hantzsch	85
4.1.6. Preparação do (Z)-3-bromo-4-fenil-3-buten-2-ol	85
4.1.7. Preparação do (Z/E)-3-cloro-4-fenil-3-buten-2-ona	86
4.1.7.1. Método A	86
4.1.7.2. Método B	88
4.1.8. Preparação do (Z)-3-cloro-4-fenil-3-buten-2-ol	88
4.1.9. Preparação do hexafluorofosfato de 1-butil-3-metilimidazólio [BMIM][PF ₆]	89
4.1.10. Preparação do 2-bromo-2-ciclohexen-1-ona	90
4.1.11. Preparação 2-cloro-2-ciclohexen-1-ona	91
4.1.12. Preparação do 2-bromo-2-ciclopenten-1-ona	92
4.1.13. Preparação do 2-cloro-2-ciclopenten-1-ona	93
4.2. Cultivo dos microrganismos em YMA (Yeastextract-maltextract - Agar)	94
4.3. Cultivo dos microrganismos em NA (Nutrient Agar)	95
4.4. Cultivo dos microrganismos em SAB (Sabourau Dextrose Agar)	95
4.5. Cultivo dos microrganismos em YM (Yeast extract-malte xtract)	96
4.6. Reações de biorredução	96
4.6.1. Procedimento geral para a redução com <i>Saccharomyces cerevisiae</i> liofilizado (Fermento de pão)	96
4.6.1.1. Redução de (Z)-3-bromo-4-fenil-3-buten-2-ona (Z)- 38 por <i>Saccharomyces cerevisiae</i> liofilizado	97
4.6.1.2. Redução de (Z)-3-cloro-4-fenil-3-buten-2-ona (Z)- 39 por <i>Saccharomyces cerevisiae</i> liofilizado	98
4.6.1.3. Redução de (E)-3-cloro-4-fenil-3-buten-2-ona (E)- 39 por <i>Saccharomyces cerevisiae</i> liofilizado	98

4.6.2. Determinação da configuração das haloidrinas	101
4.6.2.1. Preparação do 4-fenil-2,3-epoxibutano a partir da haloidrina (S,S)- 44 obtida no experimento descrito no item 4.6.1.1.	101
4.6.2.2. Preparação do 4-fenil-2,3-epoxibutano a partir da haloidrina (S,S)- 45 obtida no experimento descrito no item 4.6.1.2.	102
4.6.2.3. Preparação do 4-fenil-2,3-epoxibutano a partir da haloidrina (2S,3R)- 45 obtida no experimento descrito no item 4.6.1.3.	103
4.7. Procedimento geral para a redução de (Z)- 38 e (Z)- 39 com <i>Pichia stipitis</i> em meio aquoso	103
4.7.1. Procedimento para a redução de (Z)- 38 e (Z)- 39 com <i>Pichia stipitis</i> em meio aquoso por 24 horas	104
4.7.2. Procedimento geral para a redução de (Z)- 38 e (Z)- 39 com <i>Pichia stipitis</i> em meio aquoso com adição de DNB	105
4.7.3. Procedimento para a redução de (Z)- 38 e (Z)- 39 com <i>Pichia stipitis</i> em sistema bifásico	106
4.8. Procedimento para a redução de (Z)- 38 e (Z)- 39 com <i>Geotrichum candidum</i> , <i>Rhotorula glutinis</i> , <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , <i>Micrococcus luteus</i> e <i>Candida albicans</i> em meio aquoso	107
4.9. Procedimento para a redução de (Z)- 38 e (Z)- 39 com <i>Geotrichum candidum</i> , <i>Rhotorula glutinis</i> , <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , <i>Micrococcus luteus</i> e <i>Candida albicans</i> utilizando sistema bifásico	108
4.10. Procedimento geral para a redução de 2-bromo-2-cicloexen-1-ona 51 , 2-cloro-2-cicloexen-1-ona 52 , 2-bromo-2-ciclopenten-1-ona 58 e 2-cloro-2-ciclopenten-1-ona 59 com <i>Rhotorula glutinis</i> , <i>Pichia stipitis</i> e <i>Saccharomyces cerevisiae</i> liofilizado em meio aquoso	110
4.10.1. Redução do 2-bromo-2-cicloexen-1-ona 51 em meio aquoso	110
4.10.2. Redução do 2-cloro-2-cicloexen-1-ona 52 em meio aquoso	111
4.10.3. Redução do 2-bromo-2-ciclopenten-1-ona 58 em meio aquoso	112
4.10.4. Redução do 2-cloro-2-ciclopenten-1-ona 59 em meio aquoso	112

4.11. Procedimento geral para a redução de 2-bromo-2-cicloexen-1-ona 51 , 2-cloro-2-cicloexen-1-ona 52 , 2-bromo-2-ciclopenten-1-ona 58 e 2-cloro-2-ciclopenten-1-ona 59 com <i>Rhotorula glutinis</i> , <i>Pichia stipitis</i> e <i>Saccharomyces cerevisiae</i> liofilizado utilizando sistema bifásico	113
4.11.1. Redução do 2-bromo-2-cicloexen-1-ona 51 em sistema bifásico	113
4.11.2. Redução do 2-cloro-2-cicloexen-1-ona 52 em sistema bifásico	114
4.11.3. Redução do 2-bromo-2-ciclopenten-1-ona 58 em sistema bifásico	114
4.11.4. Redução do 2-cloro-2-ciclopenten-1-ona 59 em sistema bifásico	115
4.12. Teste de inibição das α -haloenonas frente aos microrganismos	115
4.13. Determinação da concentração das α -haloenonas pela absorção das soluções na região do UV-visível	116
4.14. Contagem de células viáveis	122
4.14.1. Semeadura por espalhamento	122
4.15. Análises Instrumentais	123
4.15.1. Espectrometria de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN de ^1H e ^{13}C)	123
4.15.2. Cromatografia Gasosa Acoplada ao Espectrômetro de Massas – CG/EM	124
4.15.2.1 Métodos para determinação das haloenonas, halocetonas, haloidrinas e epóxidos	124
4.15.2.2. Métodos para determinação das ciclohaloenonas, ciclohalocetonas, ciclohaloidrinas	124
4.15.3. Cromatografia Gasosa Acoplada ao Detector por Ionização de Chama – CG/DIC	125
4.15.3.1. Métodos para determinação das haloenonas, halocetonas e haloidrinas	125
4.15.4. Métodos Cromatográficos	125

4.15.5. Espectrofotometria de ultravioleta-vísivel (UV-VIS)	126
4.15.6. Espectrofotometria de infravermelho (IV)	126
4.15.7. Rotação ótica	126
4.15.8. Procedência de reagentes	126
5. Conclusões	129
6. Referências Bibliográficas	133
7. Anexos	139

LISTA DE ABREVIATURAS

CCD – Cromatografia em camada delgada
CCT – Coleção de Culturas Tropical
CG – Cromatografia gasosa
ee – Excesso enantiomérico
LI – Líquido iônico
EM – Espectro de massas
DIC – Detector de ionização de chamas
DNB – *m*-dinitrotolueno
m/z – coeficiente entre carga e massa
RMN ¹H – Ressonância magnética nuclear de hidrogênio
RMN ¹³C – Ressonância magnética nuclear de carbono 13
UV – Ultravioleta
IV – Infravermelho
[BMIM][PF₆] – Hexafluorofosfato de 1-butil-3-metilimidazólio
ppm – Partes por milhão
DMSO-*d*₆ – Dimetilsulfóxido deuterado
CDCl₃ – Clorofórmio deuterado
CC - Cromatografia em coluna
CCDP - Cromatografia de camada delgada preparativa
CGQ - cromatografia gasosa quiral

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Classificação das enzimas.	5
Tabela 2. Redução de cetonas aromáticas 3-8a biocatalisada por <i>L. theobromae</i> utilizando o meio de dextrose de batata a 200 rpm e 28 °C.	11
Tabela 3. Biorredução assimétrica de enonas e inonas catalisadas por <i>R. ruber</i> DM 44541.	13
Tabela 4. Biorredução de enonas utilizando uma redutase isolada do fermento de pão.	16
Tabela 5. Biorredução de α -cloroacetofenona 27 para (S)-(-)-2-cloro-1-feniletanol 28 utilizando células de fungos marinhos.	19
Tabela 6. Biotransformação de α -bromoacetofenona 29 utilizando células de <i>Aspergillus sydowii</i> Ce19.	20
Tabela 7. Resultados da biorredução utilizando fermento de pão com e sem XAD-7 como suporte para os substratos.	39
Tabela 8. Porcentagem das α -haloenonas 38 e 39 , α -halocetonas 40 e 41 e haloidrinas 44 e 45 , presentes no meio após 24 horas de biotransformação mediada por <i>P. stipitis</i> .	48
Tabela 9. Porcentagem de reagente e produtos presentes em 100 mL de 100 mL após 120 horas de biorredução de (Z)-3-bromo-4-fenil-3-buten-2-ona (Z)- 38 mediada por células de microrganismos em crescimento.	55

Tabela 10. Porcentagem de reagente e produtos presentes em 200 mL de meio após 120 horas de biorredução do (Z)-3-bromo-4-fenil-3-buten-2-ona (Z)-**38** mediada por células de microrganismos em crescimento. 57

Tabela 11. Porcentagem de reagente e produtos presentes em 100 mL de meio após 120 horas de biorredução do (Z)-3-cloro-4-fenil-3-buten-2-ona (Z)-**39** mediada por células de microrganismos em crescimento. 58

Tabela 12. Porcentagem de reagente e produtos presentes em 200 mL de meio após 120 horas de biorredução do (Z)-3-cloro-4-fenil-3-buten-2-ona (Z)-**39** mediada por células de microrganismos em crescimento. 60

Tabela 13. Porcentagem de reagente e produtos nas biorreduções de **51** e **52** utilizando *R. glutinis*, *P. stipitis* e fermento de pão. 71

Tabela 14. Porcentagem de reagente e produtos nas biorreduções de **58** e **59** utilizando *R. glutinis*, *P. stipitis* e fermento de pão. 72

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Biocalisadores para redução assimétrica (adaptado).	3
Figura 2. Exemplo esquemático de uma reação de oxidorredução envolvendo a forma oxidada e reduzida da coenzima nicotinamida adenina dinucleotídeo.	6
Figura 3. Reações de redução catalisadas por desidrogenases.	7
Figura 4. Redução enantiosseletiva do 4-cloro-3-oxobutanoato de etila, utilizando álcool desidrogenase de <i>C. parapsilosis</i> IFO 1386 expressa em <i>E. coli</i> .	8
Figura 5. Reciclagem de cofator utilizando duas enzimas.	8
Figura 6. Redução enantiosseletiva do 4-cloro-3-oxobutanoato de etila utilizando carbonil redutase de <i>C. magnoliae</i> e glicose desidrogenase de <i>B. megaterium</i> , ambas as enzimas foram expressas em <i>E. coli</i> .	9
Figura 7. Biorredução de cetonas aromáticas proquirais 3-8a por <i>L. theobromae</i> .	10
Figura 8. Redução assimétrica quimiosseletiva de enonas e inonas utilizando <i>R. ruber</i> DSM 44541 como biocatalisador.	12
Figura 9. Substrato e produtos da biorredução com extrato de levedura e D ₂ O.	14
Figura 10. Substratos utilizados no estudo da biorredução da ligação C=C.	15
Figura 11. Redução enzimática de enonas utilizando deutério como marcador.	17
Figura 12. Disposição dos grupos catalíticos nas reações com redutase.	17
Figura 13. Métodos de imobilização de enzimas (adaptado).	21
Figura 14. Representação ilustrativa de tamanho dos poros (adaptado).	22

Figura 15. Redução quimio e enantiosseletiva de 2-etil-1-fenilprop-2-en-1-ona em XAD-7 mediada por <i>P. stipitis</i> (adaptado).	23
Figura 16. Números de artigos que descrevem a utilização de líquidos iônicos encontrados no "Scopus" no período 12/2002-04/2011.	24
Figura 17. Estruturas de líquidos iônicos (adaptado).	25
Figura 18. Preparação de líquidos iônicos com cátions imidazólicos (adaptado).	26
Figura 19. Redução assimétrica de <i>p</i> -metoxiacetofenona com células de <i>Rhodotorula</i> sp. AS2.2241 em líquido iônico.	27
Figura 20. Conversão de reagente 38 e formação de produtos 40 e 48 durante a reação da redução catalisada por <i>P. stipitis</i> .	45
Figura 21. Conversão de reagente (<i>Z</i>)- 39 e formação de produtos 41 e 48 durante a reação de redução catalisada por <i>P. stipitis</i> .	46
Figura 22. Biorredução de (<i>Z</i>)-3-bromo-4-fenil-3-buten-2-ona (<i>Z</i>)- 38 mediada por <i>P. stipitis</i> , sem e com adição de DNB em 24 horas.	49
Figura 23. Biorredução de (<i>Z</i>)-3-cloro-4-fenil-3-buten-2-ona (<i>Z</i>)- 39 mediada por <i>P. stipitis</i> sem e com adição de DNB em 24 horas.	50
Figura 24. Biorredução de (<i>Z</i>)-3-bromo-4-fenil-3-buten-2-ona (<i>Z</i>)- 38 mediada por <i>P. stipitis</i> com adição de DNB ou líquido iônico.	51
Figura 25. Biorredução de (<i>Z</i>)-3-cloro-4-fenil-3-buten-2-ona (<i>Z</i>)- 39 mediada por <i>P. stipitis</i> com adição de DNB ou líquido iônico.	52
Figura 26. Proposta para o processo da biocatálise extrativa <i>in situ</i> .	54
Figura 27. Representação de Lineweaver-Burk, da ação de duas enzimas.	56
Figura 28. Halos de inibição dos microrganismos provocados pelas α -haloenonas (<i>Z</i>)- 38 e (<i>Z</i>)- 39 .	62
Figura 29. Método de contagem por espalhamento de células viáveis (contagem em placa).	63

Figura 30. Contagem de células viáveis de <i>S. cerevisiae</i> antes da biorredução (A) (na 4ª diluição há 133 colônias ou $1,33 \times 10^6$ células por mL) e depois da biorredução (B), sem células viáveis.	64
Figura 31. Contagem de células viáveis de <i>C. albicans</i> antes da biorredução (A) (na 4ª diluição há 101 colônias ou $1,01 \times 10^6$ células por mL) e depois da biorredução (B), sem células viáveis.	64
Figura 32. Contagem de células viáveis de <i>P. stipitis</i> antes da biorredução (A) (na 4ª diluição há 265 colônias ou $2,65 \times 10^6$ células por mL) e depois da biorredução (B), sem células viáveis.	65
Figura 33. Contagem de células viáveis de <i>R. glutinis</i> antes da biorredução (A) (na 4ª diluição há 138 colônias ou $1,38 \times 10^6$ células por mL) e depois da biorredução (B), sem células viáveis.	65
Figura 34. Contagem de células viáveis de <i>M. luteus</i> antes da biorredução (A) (na 5ª diluição há 151 colônias ou $1,51 \times 10^7$ células por mL) e depois da biorredução (B), sem células viáveis.	66
Figura 35. Contagem de células viáveis de <i>G. candidum</i> antes da biorredução (A) (há 30 colônias ou 3×10^2 células por mL) e depois da biorredução (B), sem células viáveis.	66
Figura 36. Constante de partição para os substratos.	68
Figura 37. Absorbância <i>versus</i> concentração de (Z)-3-bromo-4-fenil-3-buten-2-ona.	68
Figura 38. Absorbância <i>versus</i> concentração de (Z)-3-cloro-4-fenil-3-buten-2-ona.	69
Figura 39. Cromatograma da mistura de diastereoisômeros (Z)- 38 e (E)- 39 , obtidos por CG/EM, conforme condições descritas no item 4.15.2.1.	83
Figura 40. Éster de Hantzsch utilizado.	85
Figura 41. Crescimento no meio YMA de <i>S. cerevisiae</i> , <i>P. stipitis</i> , <i>R. glutinis</i> e <i>C. albicans</i> .	94
Figura 42. Crescimento no meio NA de <i>M. luteus</i> CCT 2283 (ATCC 0147).	95

Figura 43. Crescimento no meio SAB do <i>G. candidum</i> CCT 1205.	96
Figura 44. Cromatogramas de (S,S)- 44 , (S,S)- 45 e (R,S)- 45 , obtidos por CG/DIC com coluna quiral, conforme descrito no item 4.15.3.	100
Figura 45. Cromatogramas de (S,S)- 44 e (S,S)- 45 obtidas nas biorreduções em sistema bifásico, as condições de análise encontram-se descritas no item 4.15.3.	109
Figura 46. Leitura do teste de difusão em disco (halo de inibição).	116
Figura 47. Espectro de absorbância da solução aquosa de (Z)- 38 .	117
Figura 48. Espectro de absorbância da solução aquosa de (Z)- 39 .	117
Figura 49. Espectro de absorbância do líquido iônico.	118
Figura 50. Espectros de absorbância de (Z)- 38 , (Z)- 39 e LI sobrepostos.	118
Figura 51. Espectro de absorbância de UV-vísivel das soluções de (Z)- 38 a várias concentrações.	119
Figura 52. Espectro de absorbância de UV-vísivel das soluções de (Z)- 39 a várias concentrações.	120
Figura 53. Espectro de absorbância de UV-vísivel da fase aquosa contendo (Z)- 38 em 18 horas.	121
Figura 54. Espectro de absorbância de UV-vísivel da fase aquosa contendo (Z)- 39 em 18 horas.	121
Figura 55. Procedimento de contagem de células viáveis por meio de diluições.	123

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1. Biorredução de α -haloenonas para produção de haloidrinas.	35
Esquema 2. Preparação de (Z) e (E)-3-bromo-4-fenil-3-buten-2-ona.	36
Esquema 3. Tentativa de preparação do (E)-3-bromo-4-fenil-3-buten-2-ona.	36
Esquema 4. Preparação de (Z) e (E)-3-cloro-4-fenil-3-buten-2-ona.	37
Esquema 5. Proposta de formação dos produtos de biorredução de (Z)-38 e (Z)-39.	38
Esquema 6. Preparação do epóxido 46 a partir da bromoidrina 44.	40
Esquema 7. Preparação do epóxido 46 a partir da cloroidrina 45.	40
Esquema 8. Preparação do epóxido 47 a partir da cloroidrina 45.	41
Esquema 9. Hidrogenação do (Z)-3-halo-4-fenil-3-buten-2-ona (Z)-38 e (Z)-39.	42
Esquema 10. Tentativa da biorredução dos 3-halo-4-fenil-3-buten-2-ol.	43
Esquema 11. Proposta para redução da ligação C=C das α -haloenonas.	43
Esquema 12. Biorredução com <i>P. stipitis</i> das α -haloenonas.	44
Esquema 13. Produção da cetona desalogenada 48.	45
Esquema 14. Proposta para reação <i>via</i> radicalar <i>versus</i> transferência de hidreto com controle enzimático.	47
Esquema 15. Preparação e biorredução das halocicloexenonas.	70
Esquema 16. Preparação e biorredução das halociclopentenonas	72
Esquema 17. Preparação da 4-fenil-3-buten-2-ona 36.	77

Esquema 18. Preparação do 3,4-dibromo-4-fenil-2-butanona 37 .	78
Esquema 19. Preparação do (Z)-3-bromo-4-fenil-3-buten-2-ona 38 .	79
Esquema 20. Preparação do (E)-3-bromo-4-fenil-3-buten-2-ona.	80
Esquema 21. Hidrogenação do (Z)-3-bromo-4-fenil-3-buten-2-ona utilizando cloreto de cobalto.	84
Esquema 22. Preparação do (Z)-3-bromo-4-fenil-3-buten-2-ol 42 .	85
Esquema 23. Preparação do (Z/E)-3-cloro-4-fenil-3-buten-2-ona 39 .	86
Esquema 24. Preparação do (Z)-3-cloro-4-fenil-3-buten-2-ol 43 .	88
Esquema 25. Preparação do hexafluorofosfato de 1-butil-3-etilimidazólio 65 .	89
Esquema 26. Preparação do 2-bromo-2-cicloexen-1-ona 51 .	90
Esquema 27. Preparação do 2-cloro-2-cicloexen-1-ona 52 .	91
Esquema 28. Preparação do 2-bromo-2-ciclopenten-1-ona 58 .	92
Esquema 29. Preparação do 2-cloro-2-ciclopenten-1-ona 59 .	93
Esquema 30. Preparação da bromoidrina 44 utilizando fermento de pão.	97
Esquema 31. Preparação da cloroidrina (S,S)- 45 utilizando fermento de pão.	98
Esquema 32. Preparação da cloroidrina (S,R)- 45 utilizando fermento de pão.	99
Esquema 33. Preparação do 4-fenil-2,3-epoxibutano 46 a partir de (S,S)- 44 .	101
Esquema 34. Preparação do 4-fenil-2,3-epoxibutano 46 a partir de (S,S)- 45 .	102
Esquema 35. Preparação do 4-fenil-2,3-epoxibutano a partir de (2S,3R)- 45 .	103

Esquema 36. Biorredução de (Z)- 38 e (Z)- 39 com <i>P. stipitis</i> em meio aquoso por 24 horas.	104
Esquema 37. Biorredução de (Z)- 38 e (Z)- 39 com <i>Pichia stipitis</i> em meio aquoso com adição de DNB.	105
Esquema 38. Biorredução utilizando <i>P. stipitis</i> em sistema bifásico.	106
Esquema 39. Biorredução de (Z)- 38 e (Z)- 39 utilizando <i>S. cerevisiae</i> , <i>G. candidum</i> , <i>M. luteus</i> , <i>R. glutinis</i> e <i>C. albicans</i> em meio aquoso.	107
Esquema 40. Biorredução de (Z)- 38 e (Z)- 39 utilizando <i>S. cerevisiae</i> , <i>G. candidum</i> , <i>M. luteus</i> , <i>R. glutinis</i> e <i>C. albicans</i> em sistema bifásico.	108
Esquema 41. Biorredução de 51 utilizando <i>S. cerevisiae</i> , <i>R. glutinis</i> e <i>P. stipitis</i> em meio aquoso.	110
Esquema 42. Biorredução de 52 utilizando <i>S. cerevisiae</i> , <i>R. glutinis</i> e <i>P. stipitis</i> em meio aquoso.	111
Esquema 43. Biorredução de 58 utilizando <i>S. cerevisiae</i> , <i>R. glutinis</i> e <i>P. stipitis</i> em meio aquoso.	112
Esquema 44. Biorredução de 59 utilizando <i>S. cerevisiae</i> , <i>R. glutinis</i> e <i>P. stipitis</i> em meio aquoso.	112
Esquema 45. Biorredução de 51 utilizando <i>S. cerevisiae</i> , <i>R. glutinis</i> e <i>P. stipitis</i> em sistema bifásico.	113
Esquema 46. Biorredução de 52 utilizando <i>S. cerevisiae</i> , <i>R. glutinis</i> e <i>P. stipitis</i> em sistema bifásico.	114
Esquema 47. Biorredução de 58 utilizando <i>S. cerevisiae</i> , <i>R. glutinis</i> e <i>P. stipitis</i> em sistema bifásico.	114
Esquema 48. Biorredução de 59 utilizando <i>S. cerevisiae</i> , <i>R. glutinis</i> e <i>P. stipitis</i> em sistema bifásico.	115

LISTA DE ESPECTROS

E01. Espectro de massas obtido por ionização de elétrons (70 eV) do 4-fenil-3-buten-2-ona 36 .	139
E02. Espectro de Infravermelho (NaCl) do 4-fenil-3-buten-2-ona 36 .	139
E03. Espectro de RMN ^1H (250 MHz, CDCl_3) do 4-fenil-3-buten-2-ona 36 .	140
E04. Espectro de RMN ^{13}C (62.5 MHz, CDCl_3) do 4-fenil-3-buten-2-ona 36 .	140
E05. Espectro de massas obtido por ionização de elétrons (70 eV) do 3,4-dibromo-4-fenil-2-butanona 37 .	141
E06. Espectro de Infravermelho (KBr) do 3,4-dibromo-4-fenil-2-butanona 37 .	141
E07. Espectro de RMN ^1H (250 MHz, CDCl_3) do 3,4-dibromo-4-fenil-2-butanona 37 .	142
E08. Espectro de RMN ^{13}C (62,5 MHz, CDCl_3) do 3,4-dibromo-4-fenil-2-butanona 37 .	142
E09. Espectro de massas obtido por ionização de elétrons (70 eV) do (Z)-3-bromo-4-fenil-3-butan-2-ona (Z)- 38 .	143
E10. Espectro de Infravermelho (NaCl) do (Z)-3-bromo-4-fenil-3-butan-2-ona (Z)- 38 .	143
E11. Espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) do (Z)-3-bromo-4-fenil-3-butan-2-ona (Z)- 38 .	144
E12. Espectro de RMN ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) do (Z)-3-bromo-4-fenil-3-butan-2-ona (Z)- 38 .	144
E13. Espectro de massas obtido por ionização de elétrons (70 eV) do (Z)-3-cloro-4-fenil-3-butan-2-ona (Z)- 39 .	145
E14. Espectro de Infravermelho (NaCl) do (Z)-3-cloro-4-fenil-3-butan-2-ona (Z)- 39 .	145

E15. Espectro de RMN ^1H (250 MHz, CDCl_3) do (<i>Z</i>)-3-cloro-4-fenil-3-butan-2-ona (Z)-39.	146
E16. Espectro de RMN ^{13}C (62.5 MHz, CDCl_3) do (<i>Z</i>)-3-cloro-4-fenil-3-butan-2-ona (Z)-39.	146
E17. Espectro de massas obtido por ionização de elétrons (70 eV) do (<i>E</i>)-3-cloro-4-fenil-3-butan-2-ona (E)-39.	147
E18. Espectro de Infravermelho (NaCl) do (<i>E</i>)-3-cloro-4-fenil-3-butan-2-ona (E)-39.	147
E19. Espectro de RMN ^1H (250 MHz, CDCl_3) do (<i>E</i>)-3-cloro-4-fenil-3-butan-2-ona (E)-39.	148
E20. Espectro de RMN ^{13}C (62. MHz, CDCl_3) do 3-cloro-4-fenil-3-butan-2-ona (E)-39.	148
E21. Espectro de massas obtido por ionização de elétrons (70 eV) do (<i>Z</i>)-3-bromo-4-fenil-3-buten-2-ol 42 .	149
E22. Espectro de Infravermelho (NaCl) do (<i>Z</i>)-bromo-4-fenil-3-buten-2-ol 42 .	149
E23. Espectro de RMN ^1H (250 MHz, CDCl_3) do (<i>Z</i>)-3-bromo-4-fenil-3-buten-2-ol 42 .	150
E24. Espectro de RMN ^{13}C (62.5 MHz, CDCl_3) do (<i>Z</i>)-3-bromo-4-fenil-3-buten-2-ol 42 .	150
E25. Espectro de massas obtido por ionização de elétrons (70 eV) do (<i>Z</i>)-3-cloro-4-fenil-3-buten-2-ol 43 .	151
E26. Espectro de Infravermelho (NaCl) do (<i>Z</i>)-3-cloro-4-fenil-3-buten-2-ol 43 .	151
E27. Espectro de RMN ^1H (250 MHz, CDCl_3) do (<i>Z</i>)-3-cloro-4-fenil-3-buten-2-ol 43 .	152
E28. Espectro de RMN ^{13}C (62.5 MHz, CDCl_3) do (<i>Z</i>)-3-cloro-4-fenil-3-buten-2-ol 43 .	152

E29. Espectro de massas obtido por ionização de elétrons (70 eV) do 3-bromo-4-fenil-2-butanol 44 .	153
E30. Espectro de Infravermelho (NaCl) do 3-bromo-4-fenil-2-butanol 44 .	153
E31. Espectro de RMN ^1H (250 MHz, CDCl_3) do 3-bromo-4-fenil-2-butanol 44 .	154
E32. Espectro de RMN ^{13}C (62.5 MHz, CDCl_3) do 3-bromo-4-fenil-2-butanol 44 .	154
E33. Espectro de massas obtido por ionização de elétrons (70 eV) do 3-cloro-4-fenil-2-butanol (<i>S,S</i>)- 45 .	155
E34. Espectro de Infravermelho (NaCl) do 3-cloro-4-fenil-2-butanol (<i>S,S</i>)- 45 .	155
E35. Espectro de RMN ^1H (250 MHz, CDCl_3) do 3-cloro-4-fenil-2-butanol (<i>S,S</i>)- 45 .	156
E36. Espectro de RMN ^{13}C (62.5 MHz, CDCl_3) do 3-cloro-4-fenil-2-butanol (<i>S,S</i>)- 45 .	156
E37. Espectro de massas obtido por ionização de elétrons (70 eV) do 3-cloro-4-fenil-2-butanol (<i>R,S</i>)- 45 .	157
E38. Espectro de Infravermelho (NaCl) do 3-cloro-4-fenil-2-butanol (<i>R,S</i>)- 45 .	157
E39. Espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) do 3-cloro-4-fenil-3-butan-2-ol (<i>R,S</i>)- 45 .	158
E40. Espectro de RMN ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) do 3-cloro-4-fenil-2-butanol (<i>R,S</i>)- 45 .	158
E41. Espectro de massas obtido por ionização de elétrons (70 eV) do (<i>2S,3R</i>)-4-fenil-2,3-epoxibutano 46 .	159
E42. Espectro de RMN ^1H (250 MHz, CDCl_3) do (<i>2S,3R</i>)-4-fenil-2,3-epoxibutano 46 .	159

E43. Espectro de RMN ^{13}C (62.5 MHz, CDCl_3) do (2 <i>S</i> ,3 <i>R</i>)-4-fenil-2,3-epoxibutano 46 .	160
E44. Espectro de massas obtido por ionização de elétrons (70 eV) do (2 <i>S</i> ,3 <i>S</i>)-4-fenil-2,3-epoxibutano 47 .	160
E45. Espectro de RMN ^1H (250 MHz, CDCl_3) do (2 <i>S</i> ,3 <i>S</i>)-4-fenil-2,3-epoxibutano 47 .	161
E46. Espectro de RMN ^{13}C (62.5 MHz, CDCl_3) do (2 <i>S</i> ,3 <i>S</i>)-4-fenil-2,3-epoxibutano 47 .	161
E47. Espectro de massas obtido por ionização de elétrons (70 eV) do 4-fenil-2-butanona 48 .	162
E48. Espectro de infravermelho (NaCl) do 4-fenil-2-butanona 48 .	162
E49. Espectro de RMN ^1H (250 MHz, CDCl_3) do 4-fenil-2-butanona 48 .	163
E50. Espectro de RMN ^{13}C (62.5 MHz, CDCl_3) do 4-fenil-2-butanona 48 .	163
E51. Espectro de massas (70 eV) do 4-fenil-2-butanol 49 .	164
E52. Espectro de infravermelho (NaCl) do 4-fenil-2-butanol 49 .	164
E53. Espectro de RMN ^1H (250 MHz, CDCl_3) do 4-fenil-2-butanol 49 .	165
E54. Espectro de RMN ^{13}C (62.5 MHz, CDCl_3) do 4-fenil-2-butanol 49 .	165
E55. Espectro de RMN ^1H (250 MHz, DMSO_{d6}) do hexafluorofosfato de 1-butil-3-metilimidazólio 65 .	166
E56. Espectro de RMN ^{13}C (62.5 MHz, DMSO_{d6}) do hexafluorofosfato de 1-butil-3-metilimidazólio 65 .	166
E57. Espectro de massas obtido por ionização de elétrons (70 eV) do 2-bromo-2-cicloexenona 51 .	167
E58. Espectro de infravermelho (NaCl) do 2-bromo-2-cicloexenona 51 .	167
E59. Espectro de RMN ^1H (250 MHz, CDCl_3) do 2-bromo-2-cicloexenona 51 .	168

E60. Espectro de RMN ^{13}C (62.5 MHz, CDCl_3) do 2-bromo-2-cicloexanona 51 .	168
E61. Espectro de massas obtido por ionização de elétrons (70 eV) do 2-cloro-2-cicloexenona 52 .	169
E62. Espectro de infravermelho (NaCl) do 2-cloro-2-cicloexen-1-ona 52 .	169
E63. Espectro de RMN ^1H (250 MHz, CDCl_3) do 2-cloro-2-cicloexen-1-ona 52 .	170
E64. Espectro de RMN ^{13}C (62.5 MHz, CDCl_3) do 2-cloro-2-cicloexenona 52 .	170
E65. Espectro de massas obtido por ionização de elétrons (70 eV) do 2-bromo-2-ciclopentenona 58 .	171
E66. Espectro de Infravermelho (KBr) do 2-bromo-2-ciclopentenona 58 .	171
E67. Espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) do 2-bromo-2-ciclopentenona 58 .	172
E68. Espectro de RMN ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) do 2-bromo-2-ciclopentenona 58 .	172
E69. Espectro de massas obtido por ionização de elétrons (70 eV) do 2-cloro-2-ciclopentenona 59 .	173
E70. Espectro de Infravermelho (KBr) do 2-cloro-2-ciclopentenona 59 .	173
E71. Espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) do 2-cloro-2-ciclopentenona 59 .	174
E72. Espectro de RMN ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) do 2-cloro-2-ciclopentenona 59 .	174
E73. Espectro de massas obtido por ionização de elétrons (70 eV) do 2-bromo-2-cicloexanol 55 .	175
E74. Espectro de massas obtido por ionização de elétrons (70 eV) do 2-cloro-2-cicloexanol 56 .	175

E75. Espectro de massas obtido por ionização de elétrons (70 eV) do 176
2-bromo-2-ciclopentanol **62**.

E76. Espectro de massas obtido por ionização de elétrons (70 eV) do 176
2-cloro-2-ciclopentanol **63**.

INTRODUÇÃO

1. Introdução

Enzimas são catalisadores com excelentes propriedades, como alta seletividade e especificidade, que podem permitir a execução de processos químicos complexos sob condições brandas e ecologicamente corretas.¹ A utilização de enzimas para produção de compostos orgânicos vem crescendo desde a década de 90, como uma alternativa ou complemento à síntese clássica. A biocatálise surgiu com a necessidade de descobrir novos biocatalisadores para a síntese de blocos construtores quirais e de produtos químicos de alto valor agregado, através do aproveitamento da biodiversidade de microrganismos, células de plantas ou de animais existentes na natureza (Figura 1).²

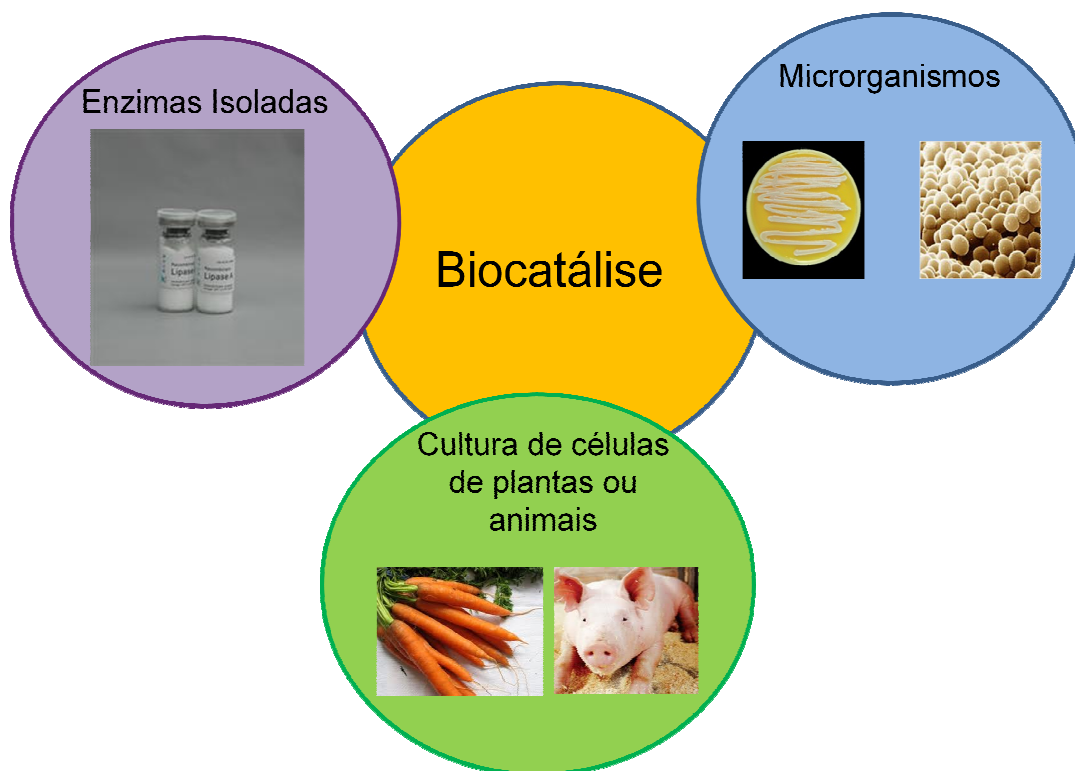


Figura 1. Biocalisadores para redução assimétrica (adaptado).¹

¹Mateo, C., Palomo, J. M., Lorente-Fernandez, G., Guisan, J. M., Lafuente-Fernandez, R. *Enzyme Microb. Technol.*, **2007**, 40, 1451-1463.

²a) K. Nakamura et al., *Tetrahedron: Asymmetry*, **2003**, 14, 2659-2681. b) Wang, W., Zong, M. H., Lou, W. Y. *J. Mol. Catal. B: Enzymatic*, **2009**, 56, 70-76.

A biocatálise, com o uso de células de microrganismos em suspensão, representa uma maneira elegante na obtenção de produtos da química fina. A utilização de células de microrganismos em suspensão têm a vantagem da reciclagem do cofator e/ou coenzima, nas reações que envolvem as oxidoredutases, tornando-se uma vantagem nos processos industriais, pois os mesmos visam bons rendimentos na formação do produto de interesse, preparação simples dos catalisadores e baixo custo, o que não ocorre quando são utilizadas enzimas isoladas que necessitem da adição de cofator. Muitas vezes também é necessária a adição de substratos auxiliares e processos de purificação de enzimas, o que eleva ainda mais o custo da reação.

Os biocatalisadores (enzimas) estão descritos em seis grandes classes (Tabela 1) de acordo com a Comissão de Enzimas (EC) da União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular³ (*International Union of Biochemistry and Molecular Biology* - IUBMB), que é o órgão responsável pela identificação das mesmas. Cada enzima é designada por um código EC (enzyme commission) seguido de quatro números separados por ponto (EC A.B.C.D), onde A é a classe, B é sub-classe, C refere-se aos grupos químicos específicos da reação e D é o número que confirma a identidade única da enzima, por exemplo, a álcool desidrogenase tem o número EC 1.1.1.2.⁴

³<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/> (acessado em 20 de dezembro de 2010).

⁴Voet, D., Voet, J. G., Pratt, C. W. *Fundamentos de Bioquímica*, 2000, p. 284, Artmed editora S.A.

Tabela 1. Classificação das enzimas.

Classes	Enzimas	Classe de reação catalisada	Subclasse
1	Oxidoredutases	Catalisam reações de oxidorreduções, transferência de H, O e elétrons	hidrogenases, oxidases, peroxidases
2	Transferases	Catalisam a transferência de grupos aldeídico, cetônico, acil, açúcar, fosforil ou metil.	transaldolases, transcetolases
3	Lipases	Formação e hidrólise de ésteres	lipases, esterases, peptidases, fosfatases
4	Liases	Catalisam a adição-eliminação de grupos nas ligações C=C, C=N e C=O	fosfatases, descarboxilases
5	Isomerases	Catalisam reações de isomerização	epimerases, racemases
6	Ligases	Catalisam a formação-clivagem de ligações C-O, C-S, C-N e C-C, com concomitante clivagem trifosfato do ATP	sintetases

A alta especificidade das enzimas deve-se à sua conformação tridimensional e sua disposição espacial. O modelo de encaixe induzido considera que o sítio ativo não precisa preexistir sob a conformação geométrica rígida, devendo existir um arranjo espacial específico dos grupamentos R (cadeia lateral) dos aminoácidos, que é induzido pelo contato com o substrato⁵ (Figura 2).

⁵Nelson, D. L., Cox, M. M., Lehninger: *Principles of Biochemistry*, **2000**, 3ª Ed., Worth publishers: New York, cap. 8, pp. 244-292.

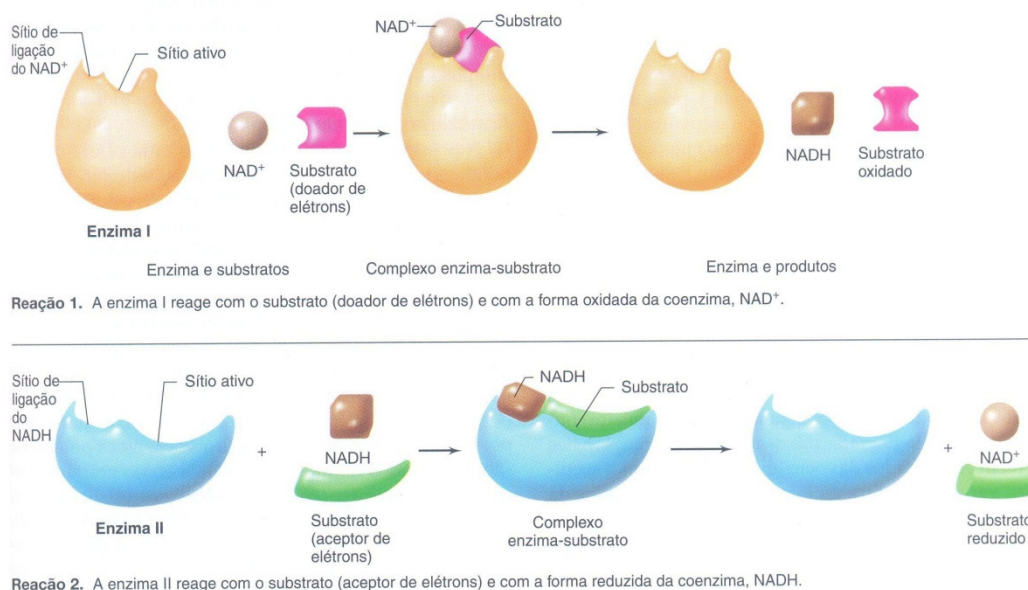


Figura 2. Exemplo esquemático de uma reação de oxidorredução envolvendo a forma oxidada e reduzida da coenzima nicotinamida adenina dinucleotídeo.⁶

As oxidorredutases catalisam reações em sistemas biológicos e estão relacionadas com os processos de respiração e fermentação. As enzimas utilizadas nas reações de oxidorredução encontram-se em três categorias: hidrogenases, oxidases e as oxigenases. Entre essas, as desidrogenases têm sido amplamente usadas em reduções de grupos carbonilas de aldeídos ou cetonas e de ligações duplas de $\text{C}=\text{C}$ (eletronicamente ativadas), já que a redução caminha em direção à formação de um centro estereogênico, com a dessimetrização de compostos carbonílicos proquirais e de ligações duplas $\text{C}=\text{C}$ (Figura 3). Em contraste, o processo reverso correspondente (oxidação de álcoois), que geralmente é de uso limitado, leva à destruição de um centro quiral.⁷

⁶Madigan, M. F., Martinko, J. M., Parker, J. *Microbiologia de BROCK*, **2004**, 10^a Edição, Pearson Education do Brasil, São Paulo, cap. 5, p. 109.

⁷Faber, K. *Biotransformations in Organic Chemistry: A Textbook*. **2004**, 5th Edition, Epringer-Verlag Berlin Heidelberg: New Yourk, cap. 2, pp. 177-180.

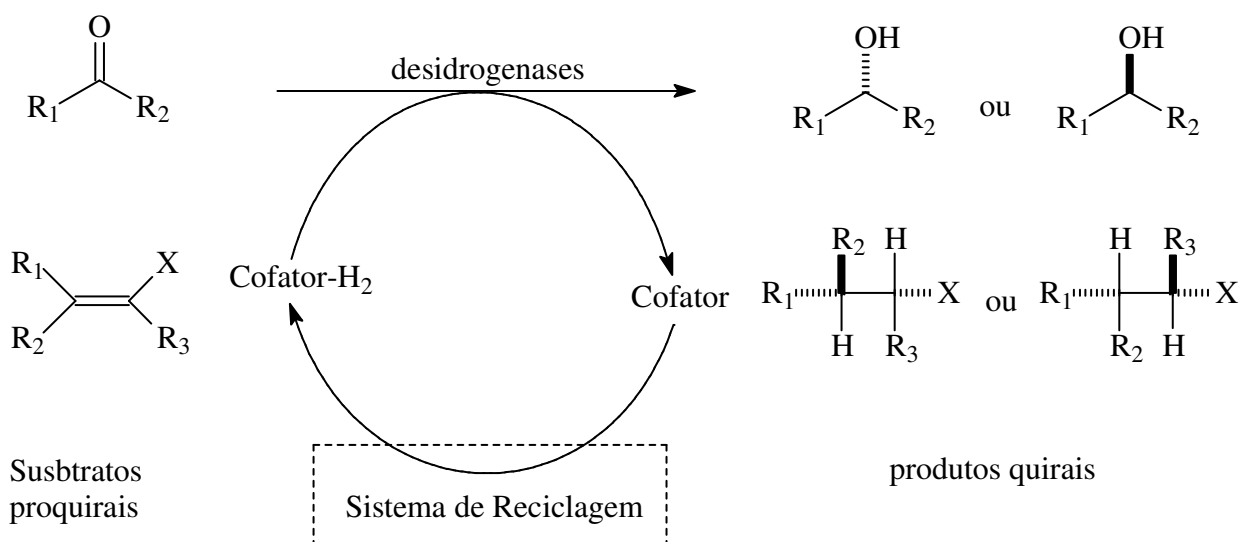


Figura 3. Reações de redução catalisadas por desidrogenases.⁶

No uso de células de microrganismos em suspensão como biocatalisador, o processo de reciclagem de cofator ou coenzima é realizado no próprio meio, ressaltando uma das vantagens de se trabalhar com esse sistema, pois quando se utilizam enzimas isoladas, há necessidade de adição de cofator e/ou coenzima e de substrato auxiliar que participa diretamente no processo de reciclagem do sistema. Na Figura 4, pode-se citar um exemplo de redução enzimática do 4-cloro-3-oxobutanoato de etila utilizando álcool desidrogenase de *Candida parapsilosis* IFO 1386 expressa em *E. coli*, com a adição de 2-propanol como substrato auxiliar, para a regeneração da coenzima adenina dinucleotídeo.

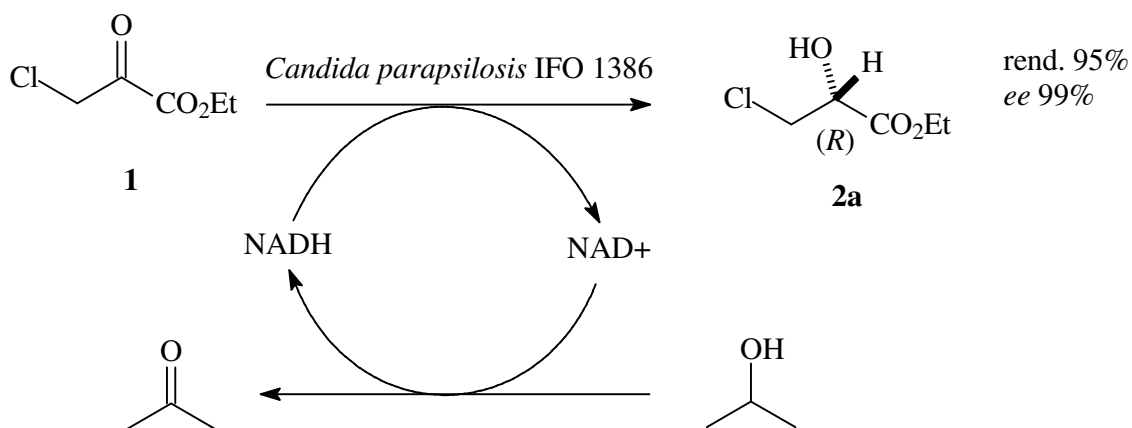


Figura 4. Redução enantiosseletiva do 4-cloro-3-oxobutanoato de etila, utilizando álcool desidrogenase de *C. parapsilosis* IFO 1386 expressa em *E. coli*.^{1a}

Em alguns casos, pode ser necessário adicionar também outra enzima no sistema, o que aumenta o custo no processo (Figura 5).

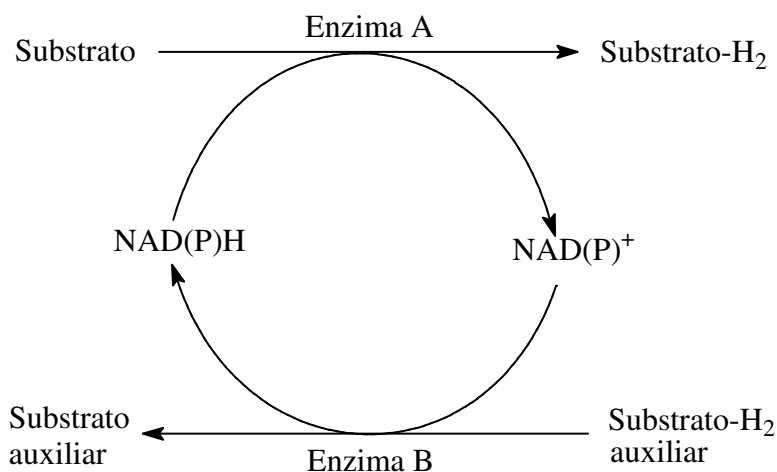


Figura 5. Reciclagem de cofator utilizando duas enzimas.⁶

A utilização de duas enzimas mais o substrato auxiliar, para a regeneração da coenzima, é vista no exemplo da Figura 6, onde o 4-cloro-3-oxobutanoato de etila é reduzido enantiosseletivamente utilizando enzimas provenientes de *Candida magnoliae* e *Bacillus megaterium*, ambas as enzimas foram expressas em *E. coli*.

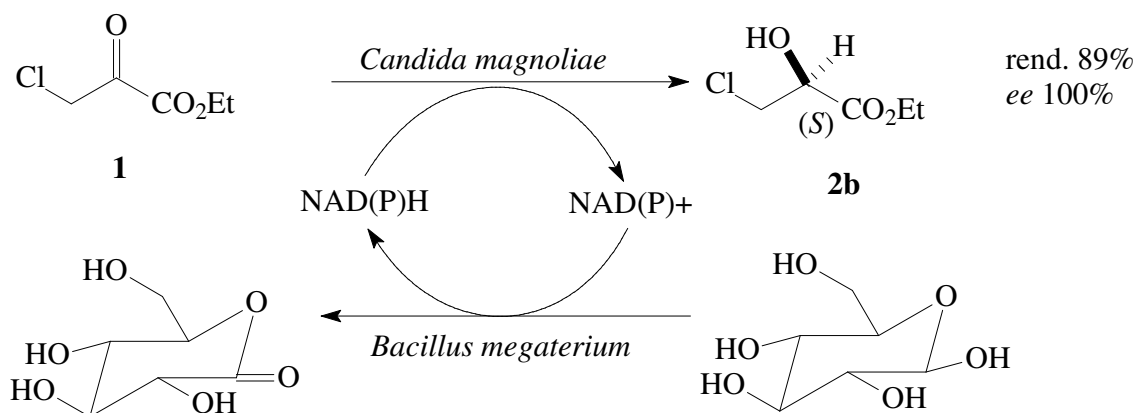


Figura 6. Redução enantiosseletiva do 4-cloro-3-oxobutanoato de etila utilizando carbonil redutase de *C. magnoliae* e glicose desidrogenase de *B. megaterium*, ambas as enzimas foram expressas em *E. coli*.^{2a}

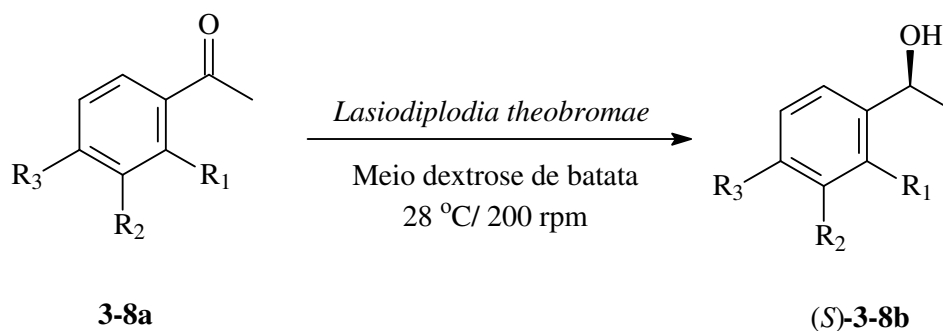
1.1. Reações de redução biocatalítica

A biorredução de cetonas proquirais provavelmente é a biotransformação mais usual para a produção de uma vasta gama de alcoóis oticamente ativos com altos excessos enantioméricos, sob condições reacionais suaves. Alcoóis quirais são de grande interesse, pois muitos desses alcoóis e seus derivados estão relacionados a compostos biologicamente ativos. Além disso, alcoóis enantiomericamente puros são essenciais e versáteis blocos construtores quirais para a preparação de estruturas mais complexas.^{8a}

Barros-Filho^{8b} e colaboradores realizaram a biorredução de acetofenonas substituídas (Figura 7) utilizando células em crescimento de *Lasiodiplodia theobromae*, fungo estudado recentemente como um fitopatógeno responsável pela infecção de várias culturas em áreas tropicais, associado a mais de 500 espécies de plantas. No Brasil, esse fitopatógeno é considerado um problema

^{8a}) Matsuda, T., Yamanaka, R., Nakamura, K. *Tetrahedron: Asymmetry*, **2009**, 20, 513–557. b) Barros-Filho, A. B., Nunes, F. M., de Oliveira, M. C. F., Lemos, T. L. G., de Mattos, M. C., Gonzalo, G., Gotor-Fernández, V., Vicente, G. *J. Mol. Catal. B: Enzymatic.*, **2010**, 65, 37-40.

grave no setor agrícola.⁹ Neste estudo, os excessos enantioméricos de alguns alcoóis obtidos chegaram a $\geq 99\%$. Os resultados das reações estão apresentados na Tabela 2.



3: $\text{R}_1 = \text{R}_2 = \text{R}_3 = \text{H}$

4: $\text{R}_1 = \text{OMe}; \text{R}_2 = \text{H}; \text{R}_3 = \text{H}$

5: $\text{R}_1 = \text{NO}_2; \text{R}_2 = \text{H}; \text{R}_3 = \text{H}$

6: $\text{R}_1 = \text{H}; \text{R}_2 = \text{OMe}; \text{R}_3 = \text{H}$

7: $\text{R}_1 = \text{H}; \text{R}_2 = \text{NO}_2; \text{R}_3 = \text{H}$

8: $\text{R}_1 = \text{H}; \text{R}_2 = \text{H}; \text{R}_3 = \text{NO}_2$

Figura 7. Biorredução de cetonas aromáticas proquirais **3-8a** por *L. theobromae*.^{8b}

⁹Nunes, F. M., de Oliveira, M. C. F., Arriaga, A. M. C., Lemos, T. L. G., Andrade-Neto, M., de Mattos, M. C., Mafezoli, J., Viana, F. M. P., Ferreira, V. M., Rodrigues-Filho, E., Ferreira, A. G. J. *Braz. Chem. Soc.*, **2008**, 19, 478–482.

Tabela 2. Redução de cetonas aromáticas **3-8a** biocatalisada por *L. theobromae* utilizando o meio de dextrose de batata a 200 rpm e 28 °C.

Entrada	Cetona	Tempo (dias)	c (%) ^a	ee (%) ^a	Configuração do álcool
1	3a	1	≥99	97	S
2	3a	3	≥99	≥99	S
3	3a	1	≥99	≥99	S
4	3a	3	≥99	93	S
5	5a	3	≥99	92	S
6	5a	6	≥99	92	S
7	6a	1	91	87	S
8	6a	3	94	84	S
9	7a	1	≥99	45	S
10	7a	3	≥99	43	S
11	7a	6	≥99	38	S
12	8a	1	≥99	42	S
13	8a	3	≥99	35	S

^aConversão (c) e excesso enantiomérico (ee) determinados por HPLC.

van Deursen¹⁰ e colaboradores discutem que a biorredução de cetonas α,β -insaturadas (enonas), ocorre através de dois caminhos diferentes, que envolvem duas classes distintas de oxidorreduções. (i) Por um caminho, a álcool desidrogenase (carbonil redutase) reduz exclusivamente a ligação C=O, deixando a ligação dupla C=C intacta. (ii) Por outro caminho, a enoato redutase mostra absoluta quimiosseletividade, reduzindo apenas a ligação dupla C=C, permanecendo a ligação C=O intacta. Devido à sua ampla disponibilidade e fácil manuseio, o fermento de pão, que possui uma grande quantidade de álcool desidrogenases e enoato redutases, tem sido amplamente utilizado. Como regra geral, o fermento de pão reduz primeiro a ligação dupla C=C das enonas, pela ação das enoato redutases, produzindo cetonas saturadas que, em seguida, são reduzidas a alcoóis saturados (processo lento) pela ação das álcool

desidrogenases.^{5,10} Com base nesses dados, foram realizadas reduções de cetonas α,β -insaturadas, empregando-se células liofilizadas de *Rhodococcus ruber* DSM 44541 em tampão pH 7,4. Adicionando-se 2-propanol como doador de hidrogênio (Figura 8). Os alcoóis obtidos apresentaram excessos enantioméricos $\geq 99\%$, como podem ser vistos na Tabela 3.

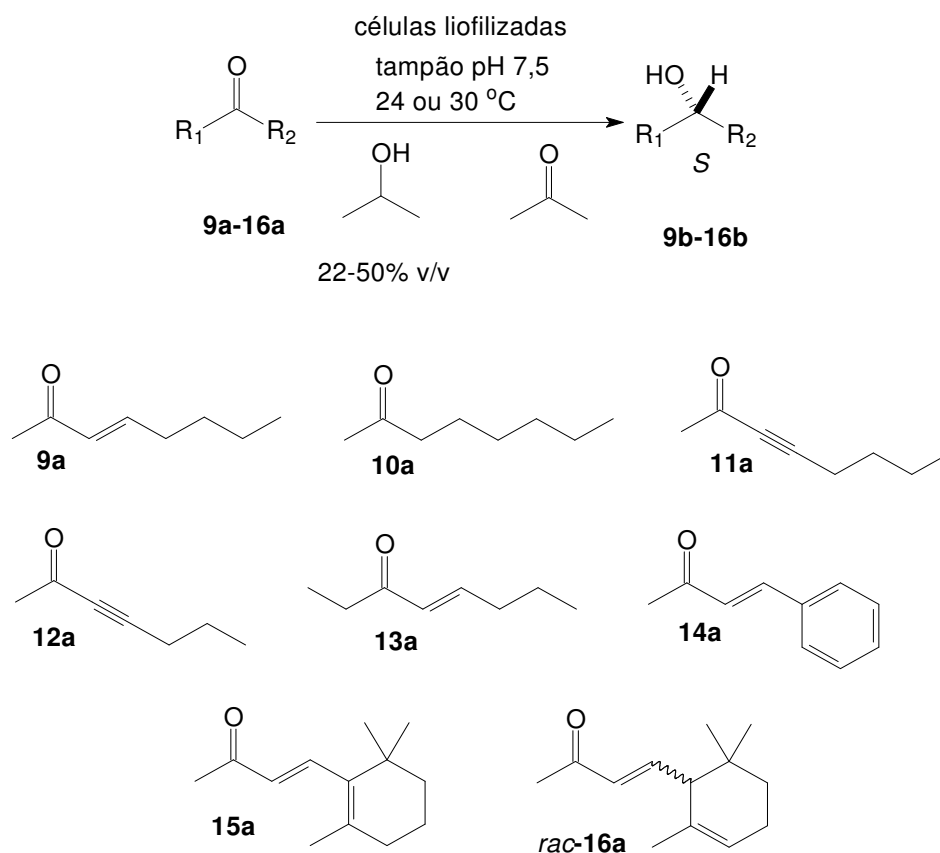


Figura 8. Redução assimétrica quimiosseletiva de enonas e inonas utilizando *R. ruber* DSM 44541 como biocatalisador.¹⁰

¹⁰van Deursen, R., Stampfer, W., Edegger, K., Faber, K., Kroutil, W. *J. Mol. Catal. B: Enzymatic*, **2004**, 31, 159–163.

Tabela 3. Biorredução assimétrica de enonas e inonas catalisadas por *R. ruber* DM 44541.

Substrato	Tempo (h)	2-propanol (% v/v)	Temperatura (°C)	Conversão (%)	ee (%)
9a	22	50	30	67	>99 (S)
9a	20	50	24	26	>99 (S)
10a	22	22	30	92	>99 (S)
11a	20	50	24	92	75 (S)
12a	20	50	24	50	>99 (S)
13a	20	50	24	54	>99 (S)
14a	22	22	30	52	>99 (S)
15a	22	22	30	57	>99 (S)

Fronza¹¹ e colaboradores relataram que 4-(4-hidroxifenil)-2-butanona (cetona da framboesa) **17** ocorre em pequenas quantidades na forma livre ou ligada com β -D-glicosídeo em muitas plantas, e é um dos componentes do sabor de framboesa na fruta. Com modificações *via* síntese da cetona **17**, pôde-se obter várias aplicações para a indústria, no que se refere a novas formulações de aromas e fragrâncias. A forma enantiomérica *R* e *S* do carbinol **18** ocorre também na forma livre ou como glicosídeos em muitas plantas como *Rhododendron maximum*, *Acer nokoense* MAXIM, *Taxus baccata* e *Betula alba*.

A enona **19**, precursor natural de **17**, pode ser obtida pela condensação de 4-hidroxifenilaldeído com a propanona, dois reagentes de fácil disponibilidade. A utilização de fermento de pão para reduzir a enona **19** é considerada uma etapa viável para obtenção de **17**. De maneira semelhante, a cetona **17** é considerada o precursor natural da forma *S* do carbinol **18** que pode ser obtido por resolução enzimática ou extraído da casca de *Betula alba*.

A elucidação do mecanismo de redução enzimática com (300 mg) enona **19** dissolvidos em 1 mL de etanol e adicionados a 150 mL do meio (água deuterada)

¹¹Fronza, G., Fuganti, C., Mendoza, M., Rallo, R., S., Ottolina, G., Joulain, D. *Tetrahedron*, **1996**, 52, 4041-4052.

contendo 30 g do extrato de levedura de pão e 10 g de glicose. Após a biorredução, foi feito RMN de ^2H da mistura de **17** e **18**, obtidos nessas condições, indicando a incorporação de 1 átomo de deutério apenas na posição 3 (α à carbonila), sendo o átomo de hidrogênio do NAD(P)H incorporado na posição 4 (β à carbonila). Figura 9.

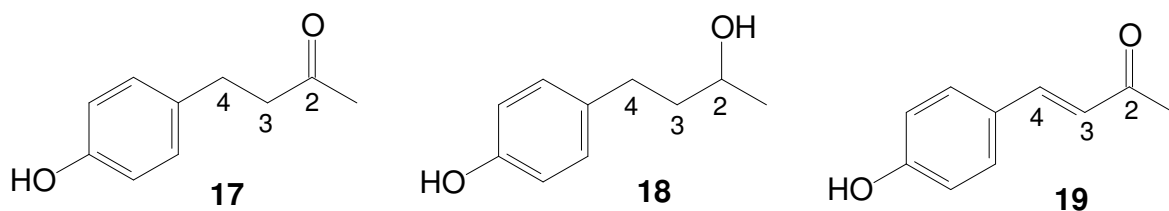


Figura 9. Substrato e produtos da biorredução com extrato de levedura e D_2O .¹⁰

Kawai¹² e colaboradores estudaram também as reduções biocatalíticas de ligações duplas $\text{C}=\text{C}$ e propuseram que as ligações desse tipo necessitam conjugação de um grupo carbonílico ou grupo nitro, como grupos retiradores de elétrons fortes. Assim, se esclareceria a razão das limitações nas reduções das olefinas da Figura 10, que foram submetidas à biorredução mas apenas a enona **20** e a nitroolefina **21** foram transformadas em seus respectivos produtos saturados, embora com apenas 42 % de excesso enantiomérico, enquanto que as demais olefinas, como sulfetos, sulfóxidos, sulfonas, **23**, hidrazonas, oximas **24** e ésteres **22** não formaram o produto esperado.

¹²Kawai, M., Saitou, K., Hayashi, Y., Ohno, A. *Tetrahedron Lett.*, **1998**, 39, 5225-5228.

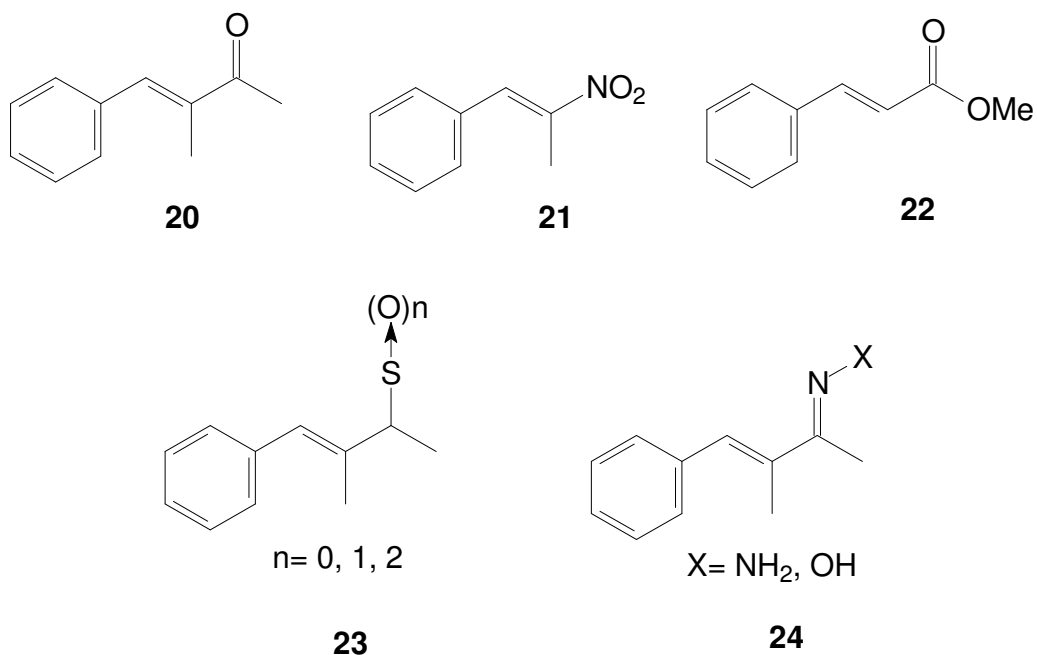
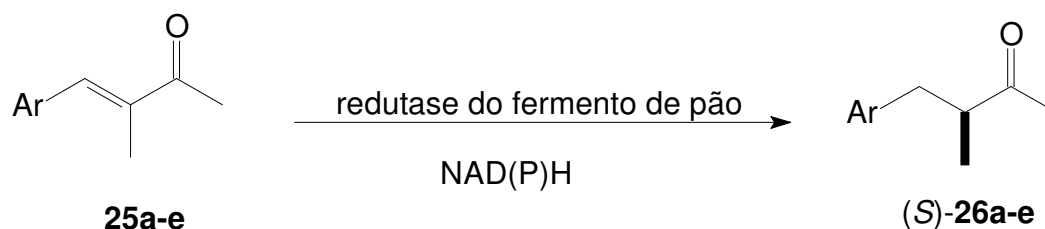


Figura 10. Substratos utilizados no estudo da biorredução da ligação C=C.¹¹

Neste mesmo estudo, para obter mais informações, biorreduções foram realizadas com as enonas **25a-e** utilizando uma redutase isolada do fermento de pão, na presença de NAD(P)H a 35 °C. Após a extração dos produtos, os excessos enantioméricos e as configurações absolutas foram determinadas utilizando coluna quiral (Tabela 4).

Tabela 4. Biorredução de enonas utilizando uma redutase isolada do fermento de pão.



Entrada	Ar	Atividade (% conversão/h)	ee ^a (%)	Configuração
a	Ph	8,3	80 (71)	S
b	3-Cl-C ₆ H ₄	15	>99 (96)	S
c	3-NO ₂ -C ₆ H ₄	32	>99 (>95)	S
d	3-MeO-C ₆ H ₄	9,1	>99 (>95)	S
e	4-MeO-C ₆ H ₄	3,3	68 (61)	S

^aDados com fermento de pão são indicados entre parênteses.

Para elucidar o processo de hidrogenação com essa enzima isolada do fermento de pão, a enona **25a** foi submetida à redução utilizando D₂O. O espectro de RMN de ¹H do produto **26a** indicou um deutério na posição alfa, mostrando que o hidrogênio incorporado na posição beta é proveniente do NAD(P)H e o hidrogênio incorporado na posição alfa é proveniente da água ou de alguns resíduos de aminoácidos.

A redução com fermento de pão de microrganismos, realizada com o deutério como marcador, confirmou que a estereoquímica da adição dos hidrogênios é 100 % do tipo *trans*. Com este estudo, foi possível assumir a organização dos grupos no sítio ativo da redutase com a enona (Figuras 11 e 12).

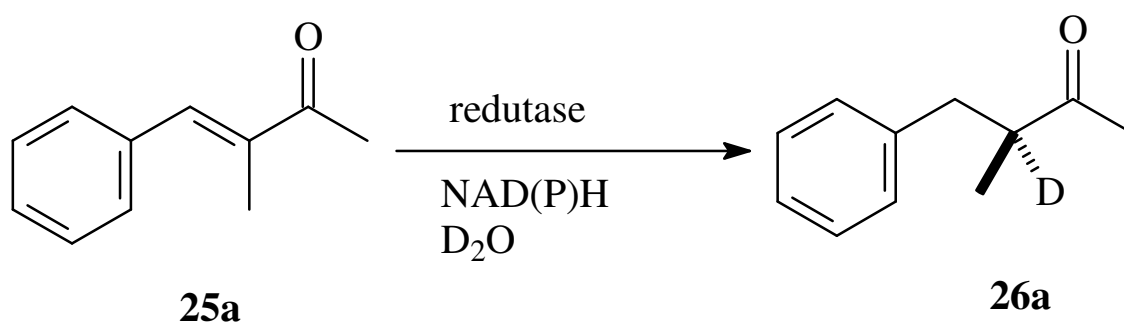


Figura 11. Redução enzimática de enonas utilizando deutério como marcador.¹¹

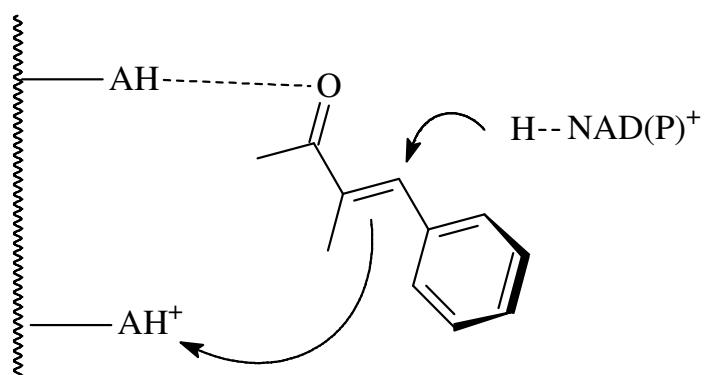


Figura 12. Disposição dos grupos catalíticos nas reações com reductase.¹¹

1.2. Haloidrinas

Haloidrinas são intermediários importantes na síntese de vários produtos farmacêuticos, incluindo β -agonistas e broncodilatadores. Haloidrinas podem ser obtidos a partir de epóxidos, realizando a abertura do anel oxirano com haletos de hidrogênio, porém, esse método tem desvantagens, devido à intolerância ao meio ácido, que leva à formação de produtos indesejáveis. Desta maneira, novos métodos para a sua preparação são de grande interesse, como a utilização da biocatálise. Entretanto, poucos estudos foram realizados sobre redução assimétrica de α -halocetonas e, na maioria dos casos, a enantiosseletividade é moderada. Como exemplo, pode-se citar a α -bromoacetofenona, que foi reduzida para (*R*)-2-bromo-1-feniletanol por *Rhodotorula rubra* com rendimento de 70 % e excesso enantiomérico de 61 %. Outro exemplo é a utilização de *Saccharomyces cerevisiae* na redução enzimática de α -fluoro, α -cloroacetofenonas produzindo as respectivas haloidrinas, com rendimentos químicos e ópticos razoáveis.^{13,14}

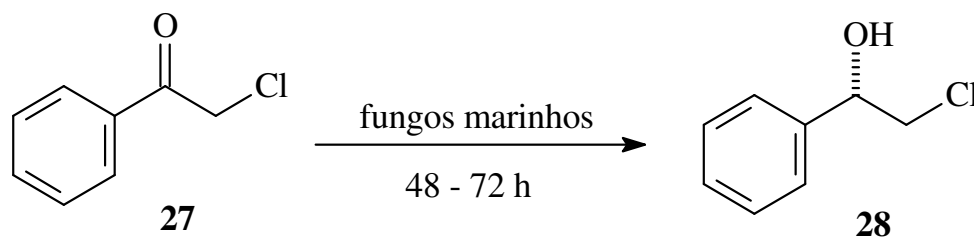
Recentemente, Rocha¹⁵ e colaboradores estudaram a redução assimétrica de α -cloroacetofenona **27** utilizando 7 fungos marinhos, e os resultados são vistos na Tabela 5.

¹³De Carvalho, M., Okamoto, M. T., Moran, P. J. S., Rodrigues, J. A. R. *Tetrahedron*, **1991**, 47, 2073-2080.

¹⁴Aleixo, L. M., De Carvalho, M., Moran, P. J. S., Rodrigues, J. A. R. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **1993**, 3, 1637-1642.

¹⁵Rocha, L. C., Ferreira, H. V., Pimenta, E. F., Berlinck, R. G. S., Seleglim, M. H. R., Javaroti, D. C. D., Sette, L. D., Bonugli, R. C., Porto, A. L. M. *Biotechnol Lett.*, **2009**, 31, 1559-1563.

Tabela 5. Biorredução de α -cloroacetofenona **27** para (S)-(-)-2-cloro-1-feniletanol **28** utilizando células de fungos marinhos.



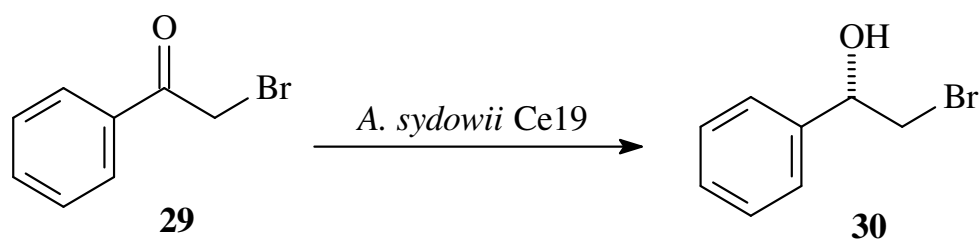
Entrada	Fungos	Tempo de reação	Conteúdo de 27 (%) ^a	Conteúdo de 28 (%) ^a	ee de 28 (%)	Configuração de 28
1	<i>Penicillium miczynskii</i> Ge5	48	5	95 ^b	50	S
2	<i>Trichoderma</i> sp. Ge1	48	70	30	66	S
3	<i>Aspergillus sydowii</i> Ge12	48	77	23	20	S
4	<i>Aspergillus sydowii</i> Ce19	72	22	78	20	S
5	<i>Aspergillus sydowii</i> Ce15	72	12	88	35	S
6	<i>Bionectria</i> sp. Ce5	72	1	99	22	S
7	<i>Penicillium miczynskii</i> Ce16	72	1	99	17	S

Condições de reação: 5 g de micélios, 50 mg (0,32 mmol) de **27**, DMSO (200uL em 100 mL de tampão fosfato de sódio (pH 7) sob agitação orbital (150 rpm) a 32 °C.

^aConcentração determinada por coluna quiral; ^b Rendimento isolado 60 %.

Outro estudo realizado por Rocha¹⁶ e colaboradores foi a redução assimétrica de α -bromoacetofenona **29**, utilizando células de *Aspergillus sydowii* Ce19 crescido em água do mar artificial, com elevada concentração de íons Cl⁻ (1.2 M) e com a utilização de 5 g de células fúngicas (peso úmido) para 50 mg (0,27 mmol) de substrato. A conversão de **29** para 2-bromo-1-feniletanol **30** foi rápida, entretanto, a pureza óptica não passou de 55 % após 3 horas de reação e, ao longo do tempo, esse valor diminui (Tabela 6).

Tabela 6. Biotransformação de α -bromoacetofenona **29** utilizando células de *Aspergillus sydowii* Ce19.



Tempo de reação (h)	Quantidade de 30 (%) ^a	ee de 30 (%) ^a	Configuração de 30
2	100	53	<i>R</i>
4	100	53	<i>R</i>
6	100	55	<i>R</i>
10	100	54	<i>R</i>
24	100	32	<i>R</i>
72	100	22	<i>R</i>
120	100	16	<i>R</i>

Condições de reação: 5 g de micélios, 50 mg (0,25 mmol) de **29**, DMSO (100 μ L) em tampão fosfato de sódio (pH 7) sob agitação orbital (150 rpm) a 32 °C. ^a Concentração determinada por CG/DIC, com coluna quiral.

¹⁶Rocha, L. C., Ferreira, H. V., Pimenta, E. F. Berlinck, R. G. S., Rezende, M. O. O., Landgraf, M. D., Selegim, M. H. R., Sette, L. D., Porto, A. L. M. *Mar. Biotechnol.*, **2010**, 12, 552–557.

1.3. Suporte para imobilização (substrato ou enzima)

A imobilização do biocatalisador é um processo frequentemente utilizado para a otimização do desempenho operacional de uma enzima, principalmente em processos industriais, sendo especialmente útil para o uso em meios não aquosos. O uso de enzimas isoladas como catalisadores eleva relativamente o custo do processo e, portanto, sua recuperação e reutilização permitem que o mesmo torne-se viável.¹ Os métodos de imobilização (Figura 13) podem ser divididos em 3 categorias principais: (i) por ligação não covalente (interação hidrofóbica, interação por ligações de hidrogênio ou interação eletrostática/iônica) ou por ligação covalente (ii) aprisionamento em matrizes poliméricas orgânicas ou inorgânicas e (iii) Ligação cruzada (cross-linking) entre as cadeias das enzimas.¹⁷ Esses métodos também podem ser aplicados para a imobilização do substrato, ao invés da enzima, visto que em muitas vezes o processo de imobilização diminui a atividade catalítica da enzima.

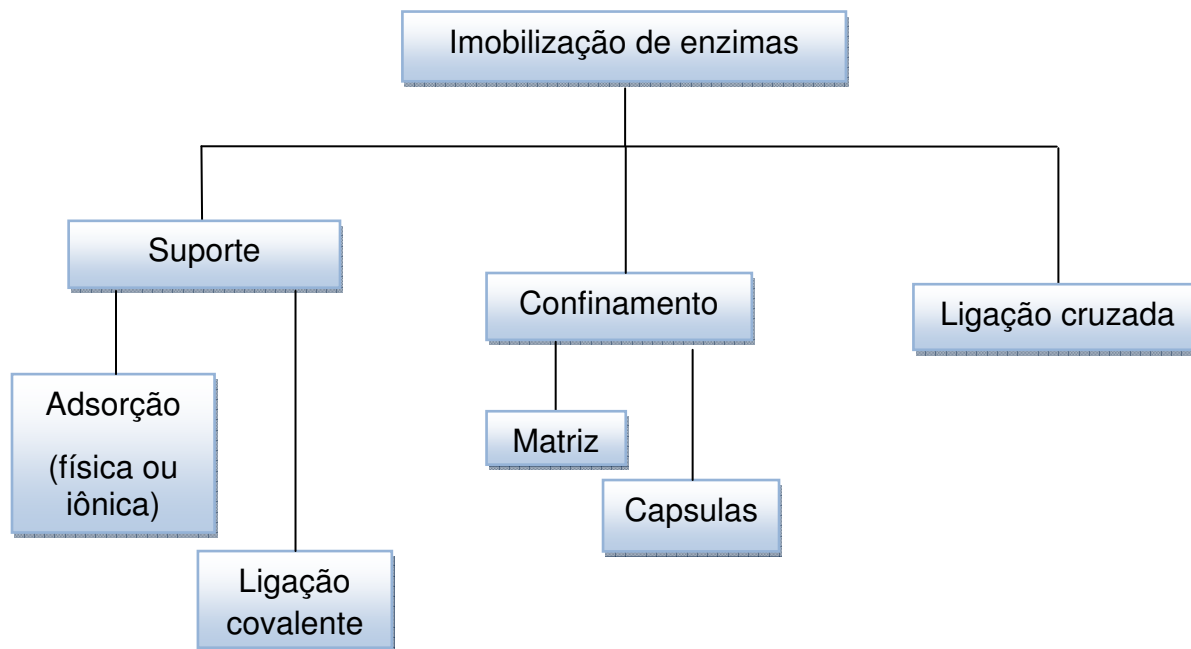


Figura 13. Métodos de imobilização de enzimas (adaptado).¹⁸

¹⁷Sheldon, R. A. *Adv. Synth. Catal.*, **2007**, 349, 1289-1307.

¹⁸a) Dalla-Vecchia, R., Nascimento, M. G., Soldi, V. *Quim. Nova*, **2004**, 4, 623-630. b) Hartmann, M.; Jung, D., *J. Mater. Chem.*, **2010**, 20, 844-857. c) Fernandez-Lafuente, R. *Enzyme Microb. Technol.*, **2009**, 45, 405-418.

A adsorção é uma operação de transferência de massa do tipo sólido fluido, na qual se explora a habilidade de certos sólidos em reter, em suas superfícies, substâncias existentes em soluções líquidas e soluções gasosas. Desta maneira, o componente da fase líquida ou gasosa pode ser separado e/ou purificado. A superfície de um sólido poroso (adsorvente) pode ser classificada em: microporos (diâmetro dos poros menor que 2 nm), mesoporos (diâmetro dos poros maior que 2 nm e menor que 50 nm) e macroporos (diâmetro dos poros maior que 50 nm).¹⁹ (Figura 14).

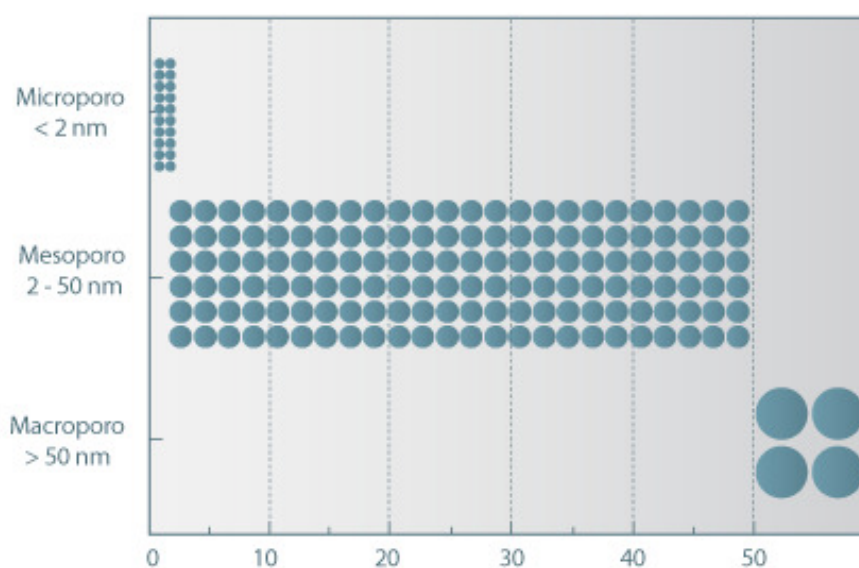


Figura 14. Representação ilustrativa de tamanho dos poros (adaptado).²⁰

A XAD-7 é uma resina polimérica adsorvente, composta por monômeros de éster meta-acrílico, com uma superfície de 450 m²/g e diâmetro médio de poro de 9 nm e que foi desenvolvida para cromatografia em coluna e é moderadamente hidrofílica.²¹ A resina XAD-7 é utilizada como sólido adsorvente tanto de enzimas

¹⁹Pompeu, D. R. *Adsorção de três famílias de compostos fenólicos em resinas sintéticas macroporosas*. 2007. Tese de Mestrado - Programa de Pós-Graduação em Ciências e Tecnologia de Alimentos - Universidade Federal do Pará. Belém.

²⁰http://labvirtual.eq.uc.pt/siteJoomla/index.php?option=com_content&task=view&id=188&Itemid=450 (acessado em 20 de dezembro de 2010).

²¹a) Kallenberg, A., I., Rantwijk, F. V., Sheldon, R. A. *Adv. Synth. Catal.*, **2005**, 347, 905-926. b) Oliveira, M. W., Hilsdorf, A. W. S., Silva, A. F. S., Oliveira, A. F. *Quím. Nova*, **2009**, 5, 1134-1138.

como de substratos, principalmente pela fácil separação e/ou purificação em reações utilizando células em suspensão como biocatalisador.

Conceição e colaboradores utilizaram XAD-7 como suporte de 2-etil-1-fenilprop-2-en-1-ona **31**, na redução quimio e enantiosseletiva mediada por *Pichia stipitis*, produzindo (S)-2-etil-1-fenilprop-2-en-1-ol **32** com 65% de rendimento e 99% de excesso enantiomérico.²² Figura 15.

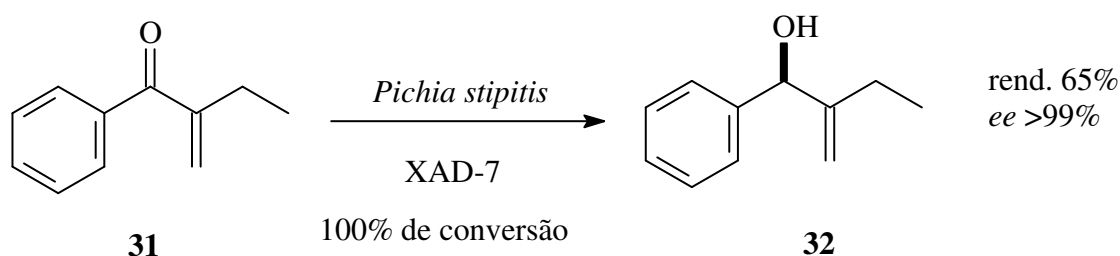


Figura 15. Redução quimio e enantiosseletiva de 2-etil-1-fenilprop-2-en-1-ona em XAD-7 mediada por *P. stipitis* (adaptado).²²

1.4. Co-solventes em biocatálise (Líquidos iônicos)

Para superar a baixa solubilidade de substratos e produtos em meio aquoso, assim como seus efeitos inibitórios, pode-se utilizar processos biocatalíticos bifásicos, como solventes orgânicos imiscíveis em água, entretanto, esses solventes orgânicos podem danificar as membranas celulares de microrganismos (bactérias, fungos e leveduras) e promover a desnaturação da enzima.²³

O efeito tóxico do solvente pode ser devido à toxicidade molecular, resultante da difusão das moléculas de solvente através da membrana citoplasmática, ou seja, toxicidade do contato direto entre o biocatalisador e o solvente orgânico. A presença de solvente orgânico dissolvido na fase aquosa também pode provocar inibição enzimática, desnaturação de proteínas e alteração do DNA e modificação da fluidez da membrana citoplasmática. A toxicidade

²² Conceição, G. J. A. Moran, P. J. S. Rodrigues, J. A. R. *Tetrahedron: Asymmetry*, **2003**, 14, 43-45.

²³ Moniruzzaman, M., Nakashima, K., Kamiya, N., Goto, M. *Biochem. Eng. J.*, **2010**, 48, 295-314.

origina a desorganização da membrana citoplasmática, a perda de metabólitos essenciais e de cofatores, podendo levar à extração de nutrientes, agregação celular e formação de emulsões.²⁴

Considerando esses aspectos, os líquidos iônicos se mostram como uma alternativa (Figura 16). Deste modo, sua utilização tem sido amplamente estudada em biocatálise utilizando sistemas bifásicos.^{25,26}

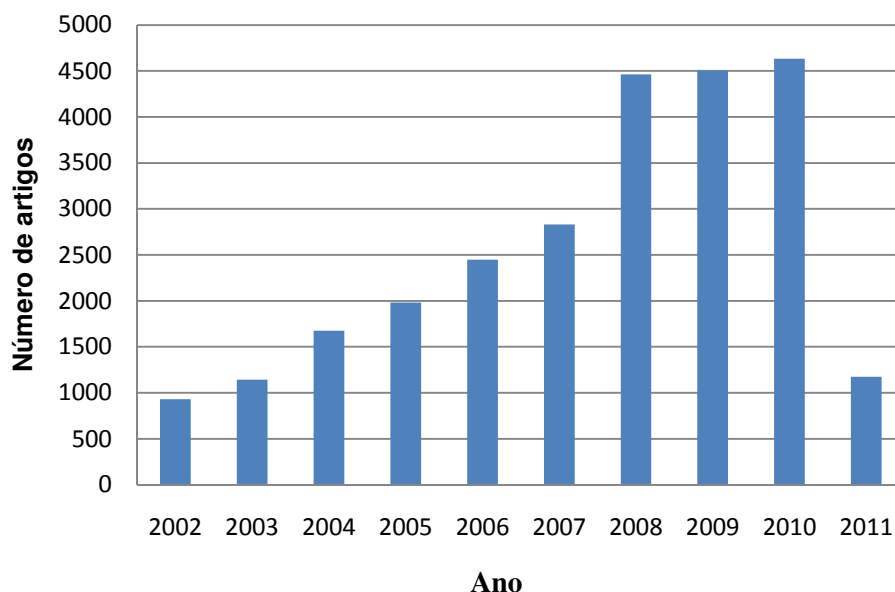


Figura 16. Números de artigos que descrevem a utilização de líquidos iônicos encontrados no "Scopus" no período 12/2002-04/2011.²⁷

Os líquidos iônicos são sais, porém, na temperatura ambiente eles são líquidos. Entre as principais vantagens dos líquidos iônicos destacam-se: possuem baixa pressão de vapor, não são inflamáveis, reduzem a toxicidade do substrato no meio reacional e são facilmente reciclados, o que inclui os líquidos iônicos na

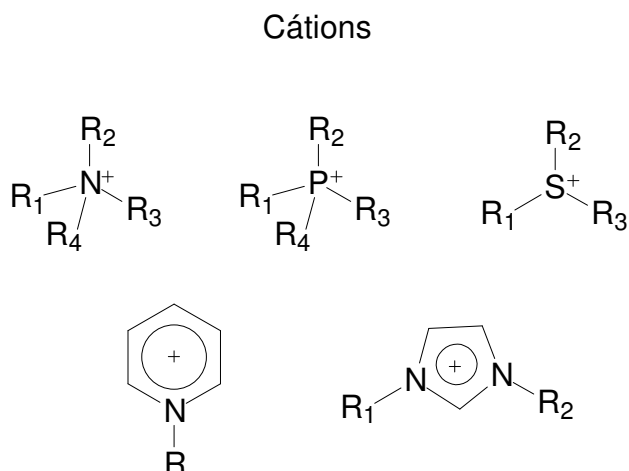
²⁴Baron, A. M. *Preparação e caracterização de lipases imobilizadas para utilização em biocatálise*. **2008**. Tese de doutorado - Programa de Pós-Graduação em Química - Universidade Federal do Paraná. Curitiba.

²⁵Sheldon, R. A., Lau, R. M., Sorgedraeger, M. J., Rantwijk, F. V., Seddon, K. R. *Green Chem.*, **2002**, 4, 147-151.

²⁶Garcia, S. M. P., *Biocatálise em Meios Não Convencionais: Solventes Orgânicos, Fluidos Supercríticos e Líquidos Iônicos*. **2005**. 136 f. Tese de doutorado - Universidade Nova de Lisboa, Faculdade de Ciências e Tecnologia. Lisboa.

²⁷a) www.scopus.com (acessado em 21 de abril 2011); b) Moniruzzaman, M., Nakashima, K., Kamiya, N., Goto, M. *Biochem. Eng. J.*, **2010**, 48, 295-314.

classe dos solventes ambientalmente sustentáveis.²⁸ Os líquidos iônicos exibem propriedades como polaridade e hidrofobicidade, comportamento que pode ser ajustado com a modificação apropriada do cátion e do ânion (Figura 17).^{29,30}



BF_4^- , PF_6^- , SbF_6^- , NO_3^- , CF_3SO_3^- , $(\text{CF}_3\text{SO}_3)_2\text{N}^-$, ArSO_3^- , CF_3CO_2^- , CH_3CO_2^- , Al_2Cl_7^-

Figura 17. Estruturas de líquidos iônicos (adaptado).^{27,28}

A preparação do cátion cloreto de 1-butil-3-metilimidazólio e a escolha do ânion PF_6^- torna o líquido iônico imiscível em meio aquoso, enquanto que a substituição pelo ânion BF_4^- faz o líquido iônico ser miscível em água (Figura 18).

²⁸Sheldon, R. A., *Green Chem.*, **2005**, 7, 267-278.

²⁹Hussain, W., Pollard, D. W., Truppo, M., Lye, G. J. *J. Mol. Catal. B: Enzymatic.*, **2008**, 55, 19-29.

³⁰Cassol, C. C., Ebeling, G., Ferrera, B., Dupont, J. *Adv. Synth. Catal.*, **2006**, 348, 243 – 248.

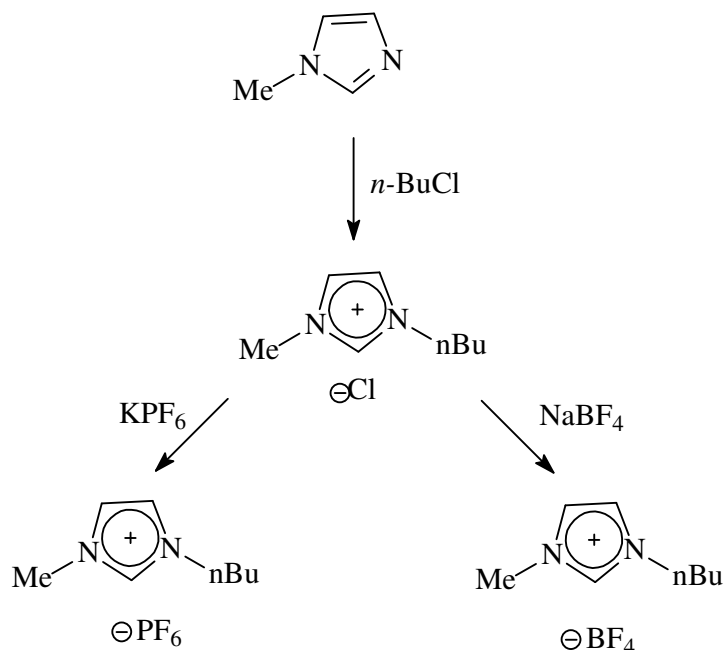


Figura 18. Preparação de líquidos iônicos com cátions imidazólicos (adaptado).²⁸

A toxicidade dos líquidos iônicos ainda hoje é pouco discutida mas Romero e colaboradores³¹ verificaram que, em reações biocatalíticas, a toxicidade está relacionada diretamente com o comprimento do substituinte N-alkila do anel imidazólio, enquanto que o ânion não exerce esse efeito.

Os resultados de estudos de sistemas bifásicos em biocatálise têm se mostrado promissores,³² apresentando resultados como o aumento dos rendimentos e excessos enantioméricos, diminuição do tempo de reação e, em muitos sistemas de reações, apresentam reações quimio, régio e diastereosseletivas.³³ Inúmeros grupos têm estudado o uso de sistema bifásico em biocatálise com células em suspensão de microrganismos, como *Rhodococcus* R312, *Escherichia coli*, *Lactobacillus kefir*, *Sacharomyces cerevisiae*, *Pichia pastoris*, *Bacillus cereus* e *Geotrichum candidum*.^{34,35,36,37}

³¹ Romero, A., Santos, A. Tojo, J. and Rodriguez, A. J. *Hazard. Mater.*, **2008**, 151, 268-273.

³² Sheldon, R., *Chem. Commun.*, **2001**, 23, 2399-2407.

³³ Ranu, B. C., Banerjee, S. J. *Org. Chem.*, **2005**, 70, 4517-4519.

³⁴ Hussain, W., Pollard, D. J., Lye, G. J. *Biocatalysis and Biotransformation*, **2007**, 25, 443-452.

³⁵ Cornmell, R. J., Winder, C. L., Schuler, S., Goodacre, R., Stephens, G. *Green Chem.*, **2008**, 10, 685-691.

³⁶ Gonzalo, G., Lavandera, I., Durchschein, K., Wurm, D., Faber, K. Kroutil, W. *Tetrahedron: Asymmetry*, **2007**, 18, 2541-2546.

Em reações de biocatálise utilizando líquido iônico e células de *Rhodotorula sp* AS2.2241 livres e imobilizadas, observou-se a alta enantiosseletividade (>99), e estabilização das células, mantendo sua atividade acima de 90 % em relação às reações realizadas em tampão.^{38,39} (Figura 19).

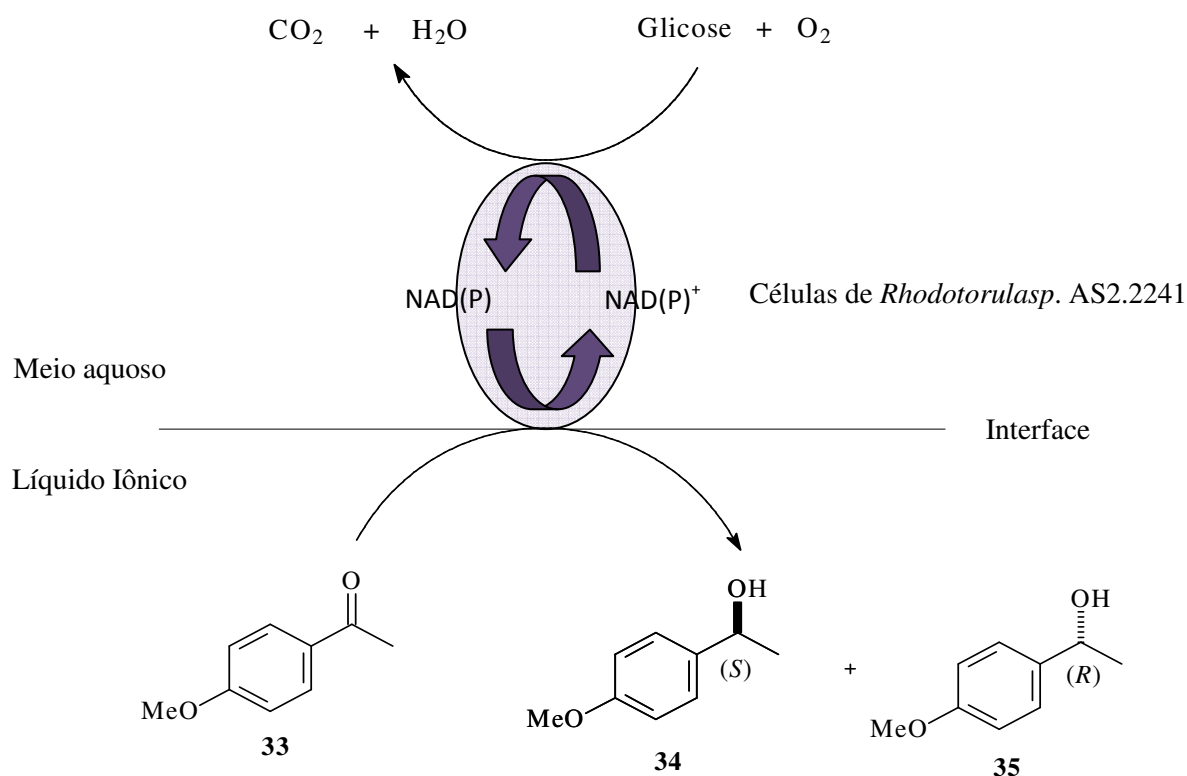


Figura 19. Redução assimétrica de *p*-metoxiacetofenona com células de *Rhodotorula sp.* AS2.2241 em líquido iônico.^{37,38}

Outra levedura bastante conhecida é *Saccharomyces cerevisiae*, o fermento de pão, e são amplos os estudos sobre sua utilização como biocatalisador.^{13,14,40} Howarth⁴¹ estudou a redução de cetonas utilizando hexafluorofosfato de 1-butil-3-metilimidazólio [BMIM][PF₆] como líquido iônico, e os excessos enantioméricos chegaram a 95 %, dependendo da cetona empregada.

³⁷Brautigam, S., Meyer, S. B., Botz, D. W. *Tetrahedron: Asymmetry.*, **2007**, 18, 1883–1887.

³⁸Wang, W., Zong, M. H., Lou, W. Y. *J. Biotech.*, **2009**, 143, 190–197.

³⁹Wang, W., Zong, M. H., Lou, W. Y. *J. Mol. Catal. B: Enzymatic*, **2009**, 56, 70–76.

⁴⁰Acetti, D., Brenna, E., Fuganti, C., Gatti, F. G., Serra, S. *Eur. J. Org. Chem.*, **2010**, 142–151.

⁴¹Howarth, J., James, P., Dai, J. *Tetrahedron Lett.*, **2001**, 42, 7517–7519.

Existem vários relatos sobre a utilização do [BMIM][PF₆] em reações de biocatálise, obtendo-se geralmente resultados satisfatórios.^{42,43}

⁴²Pavlidis, I. V., Tzafestas, K., Stamatis, H. *Biotechnol. J.*, **2010**, 5, 805–812.

⁴³Pilissão, C., Nascimento, M. G., *Tetrahedron: Asymmetry.*, **2006**, 17, 428-433.

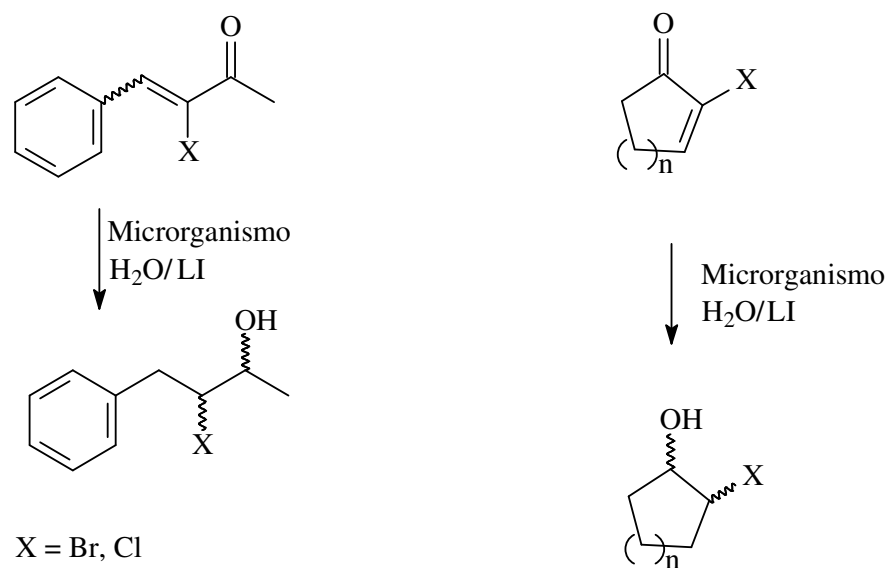
OBJETIVOS

2. Objetivos

Realizar a preparação e caracterização das α -haloenonas para utilização no estudo das reações catalisadas por *Saccharomyces cerevisiae* CCT 3019, *Rhodotorula glutinis* CCT 0783, *Candida albicans* CCT 0776, *Geotrichum candidum* CCT 1205, *Pichia stipitis* CCT 2617 e *Micrococcus luteus* CCT 2283 em sistema bifásico água/líquido iônico, objetivando a obtenção das correspondentes haloidrinas com maiores excessos enantioméricos do que em sistema aquoso.

Verificar a influência das configurações *Z* e *E* das haloenonas nas reduções biocatalisadas por *Saccharomyces cerevisiae*.

Comparar as reações de redução das *Z* e *E* das haloenonas com as halocicloenonas.



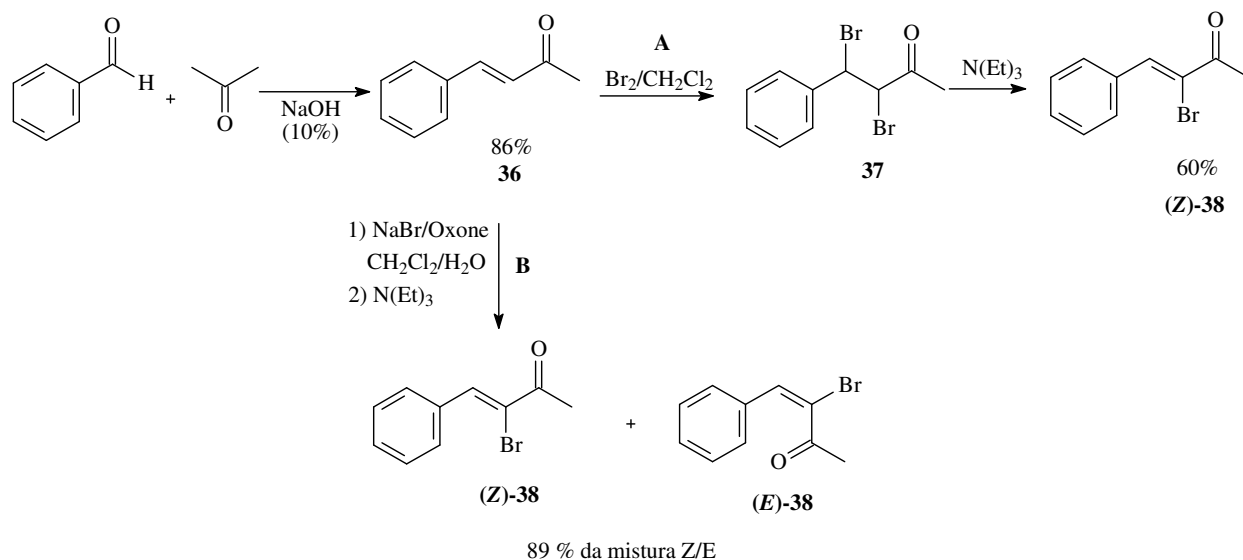
Esquema 1. Biorredução de α -haloenonas para produção de haloidrinas.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

3. Resultados e discussão

3.1. Preparação dos substratos

A síntese dos substratos foi iniciada com a preparação da enona **36**⁴⁴ a partir da condensação aldólica do benzaldeído com acetona, em presença de uma solução de hidróxido de sódio, com rendimento de 86 % (Esquema 2). Com a enona **36** em mãos, a preparação de (*Z*)-**38** e (*E*)-**38** foi realizada através das rotas **A** e **B**. A rota **A** envolveu a bromação de **36** com Br₂ em CH₂Cl₂, obtendo-se 3,4-dibromo-4-fenil-2-butanona **37**, seguida da desidrobromação de **37** promovida pela reação com a trietilamina, fornecendo (*Z*)-**38** com 60 % de rendimento. A rota **B** utiliza o Oxone®, um sal oxidante que, na presença de NaBr como fonte de brometo, promove a bromação de **36**, produzindo **37** e, após adição de trietilamina, ocorre a formação de uma mistura diastereoisomérica *Z/E*-**38** (80:20) com rendimento de 89 %.



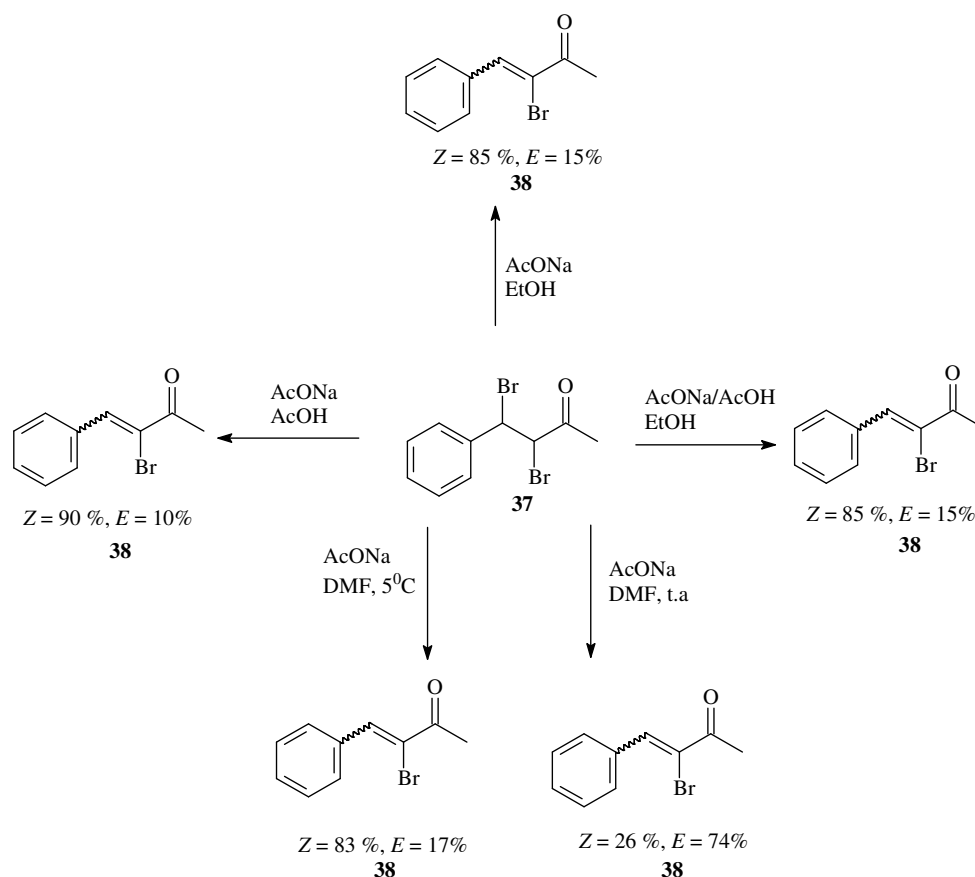
Esquema 2. Preparação de (*Z*) e (*E*)-3-bromo-4-fenil-3-buten-2-ona.

⁴⁴ Furniss, B. S., Hannaford, A. J., Rogers, V., Smith, P. W. G., Tatchell, A. R. *Vogel's: Textbook of practical organic chemistry*, **1978**, 4th edition, Longman, New York, p. 794.

A identificação dos diastereoisômeros (*Z*) e (*E*)-**38** foi feita por comparação dos espectros de RMN ^1H e RMN ^{13}C com os descritos na literatura.⁴⁵

A separação dos diastereoisômeros foi realizada por cromatografia em coluna (CC) utilizando sílica gel e por cromatografia em camada delgada preparativa (CCDP), porém, quando amostras da fração correspondente ao isômero *E* era injetada no CG/EM, este diastereoisômero isomerizava para o diastereoisômero *Z*.

Com base na literatura,⁴⁶ várias reações foram realizadas, com adaptações, buscando preparar o diastereoisômero *E* com bons rendimentos (Esquema 3).



Esquema 3. Tentativa de preparação do (*E*)-3-bromo-4-fenil-3-buten-2-ona.

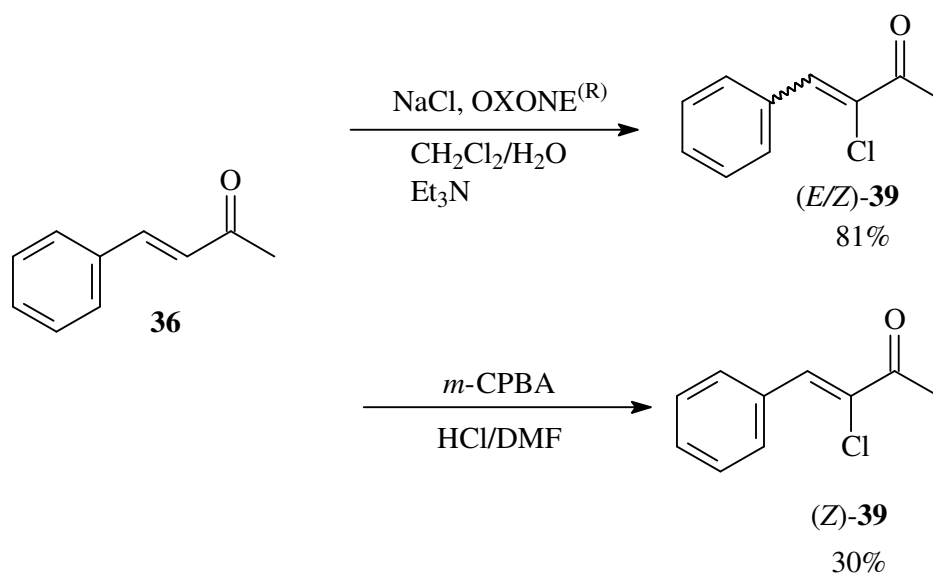
O melhor resultado foi obtido na reação com acetato de sódio em DMF a temperatura ambiente com 24 horas de reação, produzindo 74 % (*E*)-**38** e 26 % de (*Z*)-**38**. Entretanto, devido à isomerização, não foi possível isolar o

⁴⁵ Banks, J. C., Van Mele, D. and Frost, C. G. *Tetrahedron Lett.*, **2006**, 47, 2863-2866.

⁴⁶ Miller, M., L'abbé, G., Hassner, A. *J. Amer. Chem. Soc.*, **1971**, 93:4, 981-985.

diastereoisômero (*E*)-**38** com a pureza necessária e, por esse motivo, as biorreduções foram efetuadas com o diastereoisômero (*Z*)-**38**.

A (*Z*) e (*E*)-3-cloro-4-fenil-3-buten-2-ona **39** (Esquema 4) foi preparada com 81 % de rendimento, com razão *Z/E* (65:35), através da reação da enona **36** com NaCl/Oxone® em CH₂Cl₂/H₂O. A reação da enona **36** com ácido *m*-cloroperbenzóico (*m*-CPBA) em HCl/DMF forneceu apenas (*Z*)-**39**, com 30 % de rendimento.



Esquema 4. Preparação de (*Z*) e (*E*)-3-cloro-4-fenil-3-buten-2-ona.

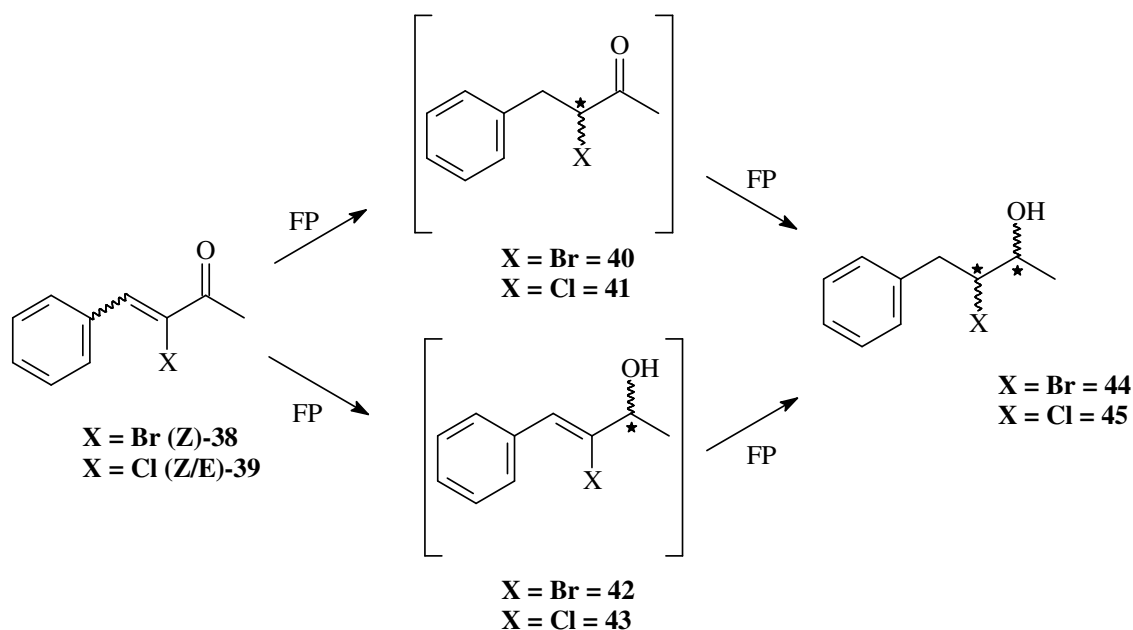
A separação dos diastereoisômeros de **39** foi realizada em CCD, utilizando sílica gel tratada com nitrato de prata 10%, pois não se obtinha separação somente com a sílica gel não tratada. Assim obteve-se 76 % de *Z* e 10 % de *E*.

3.2. Reações de biorreduções

3.2.1. Biorreduções utilizando fermento de pão

Todas as biorreduções foram realizadas com os diastereoisômeros *Z* e *E*, com excessão de (*E*)-**38**, devido à sua fácil isomerização para (*Z*)-**38**.

Inicialmente, as biorreduções de (*Z*)-**38**, (*Z*)-**39** e (*E*)-**39** foram realizadas, separadamente, em suspensão aquosa de fermento de pão liofilizado, sob agitação orbital, com rotação de 200 rpm, por 24 h, a 28 °C. Após esse tempo, análises por CG/EM indicaram o consumo do substrato, sem sinal das haloidrinas correspondentes e com o aparecimento de vários compostos diferentes, provavelmente oriundos da degradação dos substratos e produtos. Num outro procedimento, as reações foram feitas retirando-se alíquotas em intervalos de 10 a 120 minutos de reação. As análises por CG/EM indicaram a formação da bromoidrina **44** com 95 % de rendimento, proveniente de (*Z*)-**38**; a formação da cloroidrina **45** com 86 % de rendimento, proveniente de (*Z*)-**39** e o outro diastereoisômero da haloidrina **45** com 45 % de rendimento proveniente de (*E*)-**39** (Tabela 7). Cabe ressaltar que foi observada a formação de apenas um diastereoisômero para cada reação de biorredução e que não foi observada a formação dos intermediários **42** e **43**, onde ocorre a redução da ligação C=O antes da redução da ligação C=C ou dos intermediários **40** e **41** onde ocorre a redução da ligação C=C antes da redução da ligação C=O, como mostra o Esquema 5.



Esquema 5. Proposta de formação dos produtos de biorredução de (*Z*)-**38** e (*Z*)-**39**.

Paralelamente, as mesmas reações foram realizadas com a utilização da resina XAD-7 como suporte para cada substrato, e a porcentagem de conversão chegou a uma faixa de 84 a 90 %. Os excessos enantioméricos foram determinados utilizando CG/DIC com coluna quiral (Tabela 7). Uma vantagem significativa da utilização de XAD-7 como suporte é a facilidade de extração do produto do meio reacional. Esse protocolo tem sido denominado como biocatálise extrativa *in situ*.²²

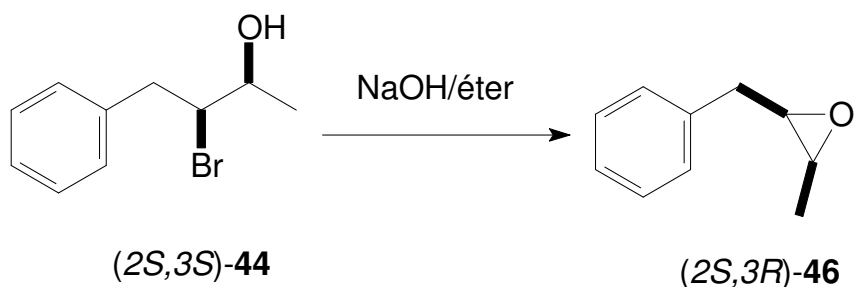
Tabela 7. Resultados da biorredução utilizando fermento de pão com e sem XAD-7 como suporte para os substratos.

substrato	suporte XAD-7	conversão - tempo (minutos)			ee (%)
		haloidrina			
		30 min	60 min	120 min	
(Z)- 38	sem	44	81	95	90
	com	36	72	92	90
(Z)- 39	sem	39	64	86	78
	com	25	68	84	78
(E)- 39	sem	18	30	45	72

A determinação das configurações das haloidrinas obtidas foi realizada através das análises dos espectros de RMN ¹³C e determinação de $[\alpha]_D^{25}$ dos epóxidos correspondentes, comparando-se os dados obtidos com os publicados na literatura.⁴⁷ Portanto, a configuração relativa *cis/trans* é fornecida pelo espectro de RMN ¹³C e, em seguida, a configuração absoluta pelo valor de $[\alpha]_D^{25}$. Os valores publicados de RMN ¹³C (62.5 MHz) de C2 e C3 do epóxido *cis* são de 52,9 ppm e 57,4 ppm enquanto do epóxido *trans* são 54,6 ppm e 59,8 ppm. Os valores de $[\alpha]_D^{25}$ (c 0,4, CHCl₃) dos epóxidos são: -21 para (2*S*, 3*R*); +21 para (2*R*, 3*S*); -27 para (2*S*, 3*S*) e +25 para (2*R*, 3*R*)-4-fenil-2,3-epoxibutano.

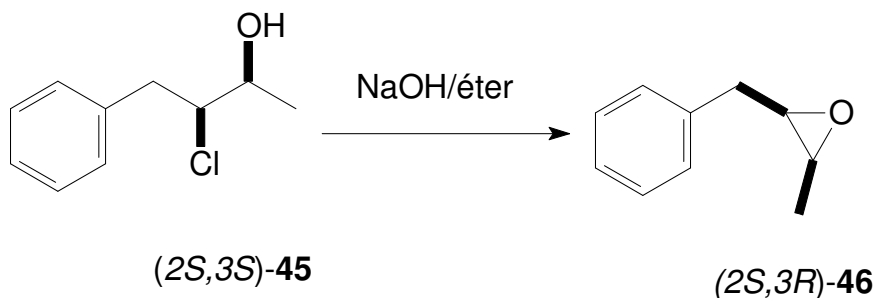
⁴⁷ Besse, P., Renard, M. F., Veschambre, H. *Tetrahedron: Asymmetry.*, **1994**, 5, 1249-1268.

Partindo da bromodrina **44** obteve-se o epóxido **46**, que foi purificado por CCD para efetuar a leitura de rotação ótica, obtendo-se $[\alpha]_D^{25} -16$ (c 1 em CHCl_3). A análise de RMN ^{13}C forneceu valores de $\text{C2} = 52,9$ ppm e $\text{C3} = 57,3$ ppm, indicando que a configuração do epóxido **46** é $(-)-(2S,3R)$ -4-fenil-2,3-epoxibutano e, portanto, a configuração da bromodrina **44** é $(-)-(2S,3S)$ -3-bromo-4-fenil-2-butanol, com $[\alpha]_D^{25} -18$ (Esquema 6).



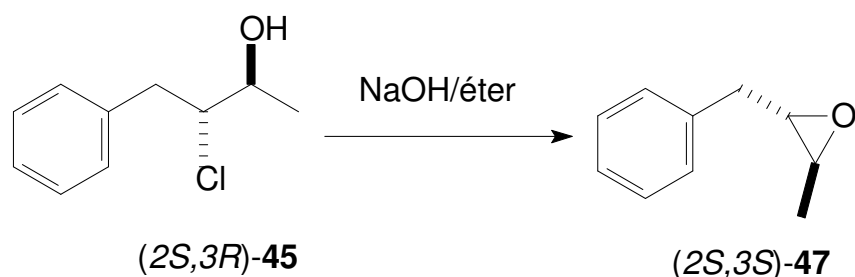
Esquema 6. Preparação do epóxido **46** a partir da bromodrina **44**.

Seguindo o mesmo procedimento, a reação de epoxidação foi realizada utilizando 3-cloro-4-fenil-2-butanol **45**, proveniente da enona $(Z)\text{-39}$, obtendo-se o epóxido **46** de $[\alpha]_D^{25} -18$ (c 1, CHCl_3). A análise de RMN ^{13}C forneceu valores de $\text{C2} = 52,9$ ppm e $\text{C3} = 57,3$ ppm, indicando que a configuração do epóxido é $(-)-(2S,3R)$ -4-fenil-2,3-epóxibutano **46** e, portanto, a configuração da clorodrina **45** é $(-)-(2S,3S)$ -3-cloro-4-fenil-2-butanol com $[\alpha]_D^{25} -19$ (Esquema 7).



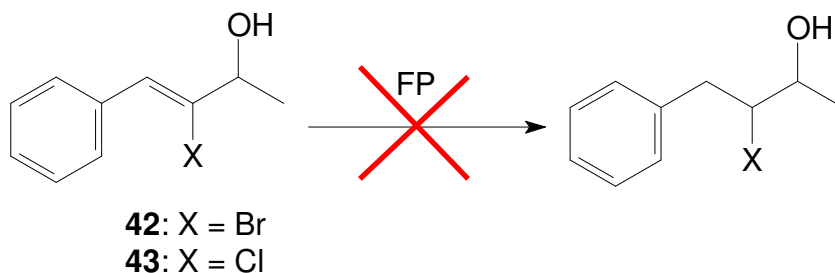
Esquema 7. Preparação do epóxido **46** a partir da clorodrina **45**.

Finalmente a reação de epoxidação foi realizada para cloroidrina proveniente da enona (*E*)-**39**. A determinação de $[\alpha]_D^{25} - 17$ (*c* 1, CHCl₃) e a análise do RMN de ¹³C forneceu os valores de C2 = 54,7 e C3 = 59,9 ppm, indicando que a configuração do epóxido **47** é (-)-(2*S*,3*S*)-4-fenil-2,3-epóxibutano, portanto, a configuração da cloroidrina **45** é (+)-(2*S*,3*R*)-3-cloro-4-fenil-3-butan-2-ol com $[\alpha]_D^{25} + 20$ (Esquema 8).



Esquema 8. Preparação do epóxido **47** a partir da cloroidrina **45**.

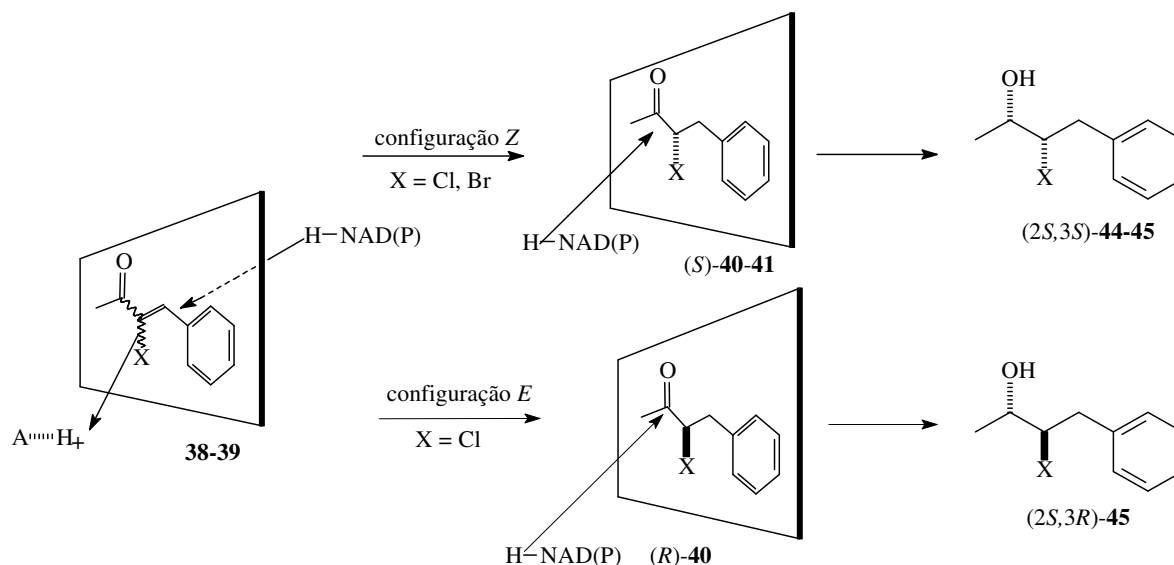
Geralmente, nas biorreduções de enonas, a ligação C=C é reduzida antes da ligação C=O. Com o objetivo de investigar se os compostos **40**, **41**, **42** e **43** seriam possíveis intermediários nas biorreduções das respectivas haloenonas, algumas tentativas de sínteses destes compostos foram realizadas. Partindo-se do composto (*Z*)-**38** e (*Z*)-**39**, foi realizada uma série de reações para a redução da ligação C=C, com o objetivo de preparar a 3-bromo-4-fenil-2-butanona e, então, utilizá-la como padrão do possível intermediário da biorredução de (*Z*)-**38**. Realizando as reações propostas para a referida redução, não foi observada a formação do produto desejado, como pode ser observado no Esquema 8, pois ocorria geralmente a saída do halogênio da molécula. Depois destas tentativas, foi realizada a redução da ligação C=O de (*Z*)-**38** e (*Z*)-**39** com boroidreto de sódio em etanol, obtendo-se os alcoóis **42** com 89 % e **43** com 86 % de rendimento.



Esquema 10. Tentativa da biorredução dos 3-halo-4-fenil-3-buten-2-ol.

O mecanismo de redução da ligação C=C das enonas foi elucidado por Fronza,¹¹ Kawai¹² e seus respectivos col., realizando o estudo do efeito dos substituintes na biorredução de 3-metil-4-aryl-3-buten-2-ona com fermento de pão e utilizando D₂O no meio. Foi estabelecido que a estereoquímica da redução da ligação C=C é uma adição *trans* de hidrogênio. Na redução enzimática, o hidrogênio incorporado na posição β ao grupo carbonila foi transferido do NAD(P)H e o hidrogênio que entra na posição α é proveniente do meio aquoso, ou ainda de algum resíduo de aminoácido.

Aplicando o conceito do mecanismo acima exposto para redução da ligação C=C das α-haloenonas (*Z*)-**38**, (*Z*)-**39** e (*E*)-**39**, é proposto neste estudo um mecanismo similar. Esquema 11.

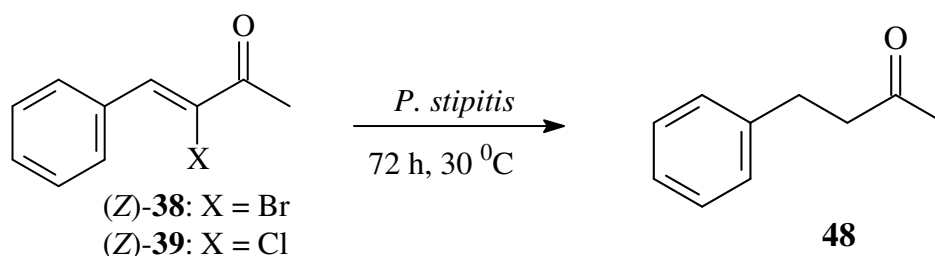


Esquema 11. Proposta para redução da ligação C=C das α-haloenonas.

Percebe-se que, independente da configuração *Z/E*, o hidreto proveniente do NAD(P)H é adicionado ao carbono β somente pelo lado do plano indicado no Esquema 10. Devido ao fato da adição de hidrogênio ser *trans*, a enona de configuração *Z* produzirá o intermediário (*S*) e a enona de configuração *E* produzirá o intermediário (*R*). A etapa seguinte é a redução da ligação C=O, a qual é facilitada pelo Cl e Br ligado ao carbono α , devido à eletronegatividade desses grupos. A transferência do hidreto do NAD(P)H ocorre pela face *Re* da ligação C=O de acordo com a regra de Prelog.⁴⁸ É interessante notar que essa transferência de hidreto é independente da configuração do carbono adjacente, como tem sido observado nas reduções de cetonas alifáticas⁴⁹ e aromáticas.⁵⁰

3.2.2. Biorreduções utilizando *Pichia stipitis*

As biorreduções com as haloenonas (*Z*)-**38** e (*Z*)-**39** mediada por *P. stipitis* foram realizadas utilizando o mesmo protocolo utilizado para o fermento de pão, isto é, 100 mg da enona em 100 mL do meio de cultura, com células em suspensão sob agitação orbital a 200 rpm, por um tempo de 72 h a 30 °C e forneceu a 4-fenil-2-butanona **48** como único produto (Esquema 12).



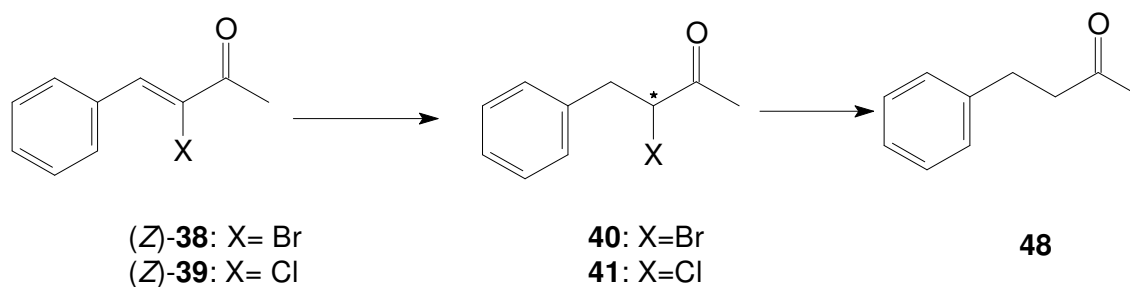
Esquema 12. Biorredução com *P. stipitis* das α -haloenonas.

⁴⁸ Prelog, V. *Pure. Appl. Chem.*, **1964**, 9, 119-130.

⁴⁹ Utaka, M., Konishi, S., Takeda, A. *Tetrahedron Lett.*, **1986**, 27, 4737-4740.

⁵⁰ Moran, P. J. S., Rodrigues, J. A. R., Joeques, I., Brenelli, E. C. S., Leite, R. A. *Biocatalysis*, **1994**, 9, 321-325.

Ao diminuir o tempo de reação para 24 horas foi possível verificar a produção das α -halocetonas **40** e **41**, juntamente com a cetona **48**, ainda obtida como produto majoritário da reação (Esquema 13).



Esquema 13. Produção da cetona desalogenada **48**.

Com a finalidade de otimizar a produção das α -halocetonas **40** e **41**, foi feito um estudo de acompanhamento da reação no intervalo de 3 a 72 horas, para determinar o tempo ideal, como visto nas Figuras 20 e 21.

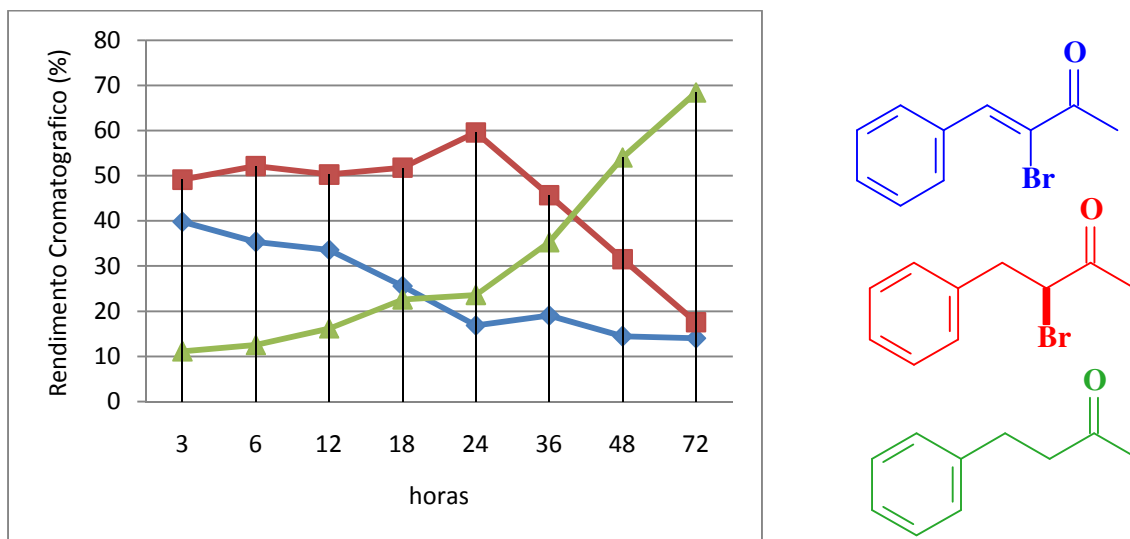


Figura 20. Conversão de reagente **38** e formação de produtos **40** e **48** durante a reação da redução catalisada por *P. stipitis*.

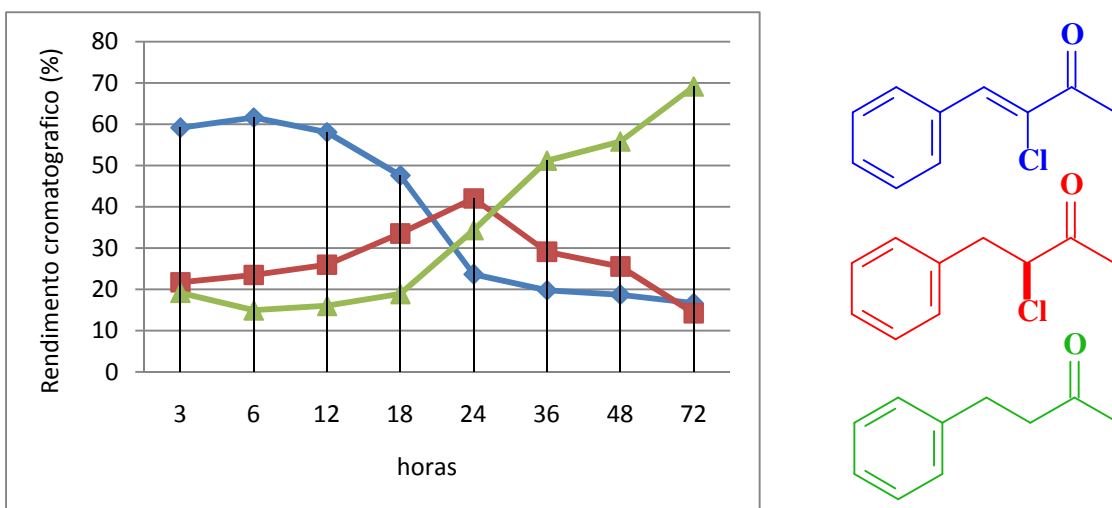
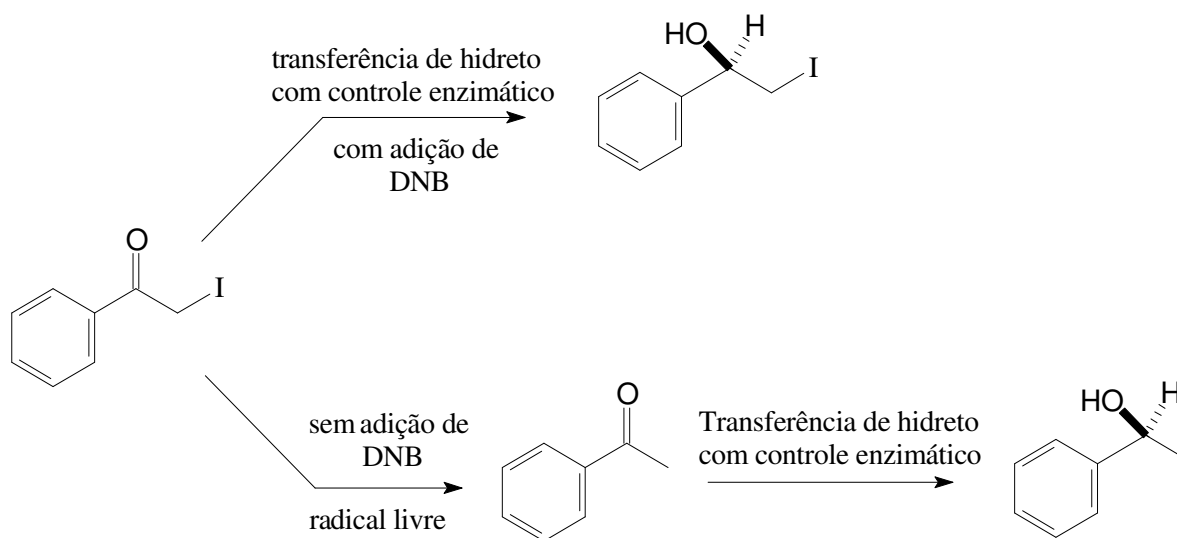


Figura 21. Conversão de reagente (Z)-**39** e formação de produtos **41** e **48** durante a reação de redução catalisada por *P. stipitis*.

Percebe-se que, nas Figuras 20 e 21, as α -halocetonas aumentam suas concentrações até certo valor para, em seguida, diminuir até chegar a baixos valores. Enquanto as α -halocetonas **40** e **41** são consumidas, a cetona **48** é formada como produto final. Este comportamento comprova que as α -halocetonas são intermediários nesse processo de produção da cetona **48** a partir as α -haloenonas (Z)-**38** e (Z)-**39**.

Alguns autores propõem que a desalogenação de α -haloenonas é devido a um mecanismo radicalar.⁵¹ Com o objetivo de eliminar essa reação paralela, um inibidor de radicais livres - *m*-dinitrobenzeno (DNB) - foi utilizado neste trabalho. A adição de DNB já foi utilizada nas biorreduções de α -iodoacetofenona, tendo como efeito a formação de 2-iodo-1-feniletanol, ao invés da produção de acetofenona e 1-feniletanol, como apresentado no Esquema 14.¹⁴

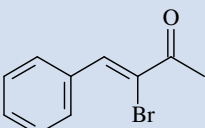
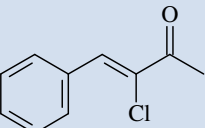
⁵¹ a) Ohno, A., Kito, N. *Chem. Lett.*, **1972**, 369. b) Ohno, A., Yamamoto, H., Oka, S., *J. Am. Chem. Soc.*, **1981**, 103, 2041. c) Tanner, D. D., Chen, J. J., Chen, L., Luelo, C. *J. Am. Chem. Soc.*, **1991**, 114, 8074.



Esquema 14. Proposta para reação *via* radicalar *versus* transferência de hidreto com controle enzimático.

Com o objetivo de verificar se a desalogenação dos intermediários **40** e **41** estava ocorrendo através do mecanismo radicalar, experimentos foram realizados em duplicata com concentrações variadas de DNB no meio (quantidades adicionadas: 0,1; 0,2; 0,5; 0,8; 1; 2; 5; e 8 mg). As análises por CG/EM dos produtos das reações indicaram que os experimentos com 1 e 2 mg de DNB produziram os melhores resultados. Os dados encontram-se na Tabela 8.

Tabela 8. Porcentagem das α -haloenonas **38** e **39**, α -halocetonas **40** e **41** e haloidrinas **44** e **45**, presentes no meio após 24 horas de biotransformação mediada por *P. stipitis*.

Substrato	Meio (mL)	DNB (mg)	α -haloenona recup. (%)	α -halocetona conv. (%) ^a	Haloidrina conv. (%) ^a
 100 mg	100	1	57	5	37
		2	80	1	19
	200	1	6	7	87
		2	18	6	75
 100 mg	100	1	77	23	ND
		2	85	15	ND
	200	1	42	18	38
		2	49	15	33

^aConversão determinada pelas áreas relativas observadas por CG/EM; ND = não detectado.

Os dados dos experimentos de redução da (*Z*)-**38** sem e com DNB foram colocados na Figura 22. Os experimentos escolhidos foram no tempo de 24 horas, com 100 mg de substrato e 1 mg de DNB em 100 mL do meio contendo as células em suspensão de *P. stipitis*. No gráfico, é possível observar que, na reação sem o uso do inibidor ocorre a produção da bromoidrina **44** (roxo) e formação do produto desalogenado **48** (verde), entretanto, na reação com o uso do inibidor não ocorre a formação do produto desalogenado **48** e sim a formação da α -bromocetona **40** (vermelho) e bromoidrina **44** (roxo). A maior quantidade de substrato após 24 horas de reação é um indicativo de que a reação é mais lenta com o uso do inibidor de radicais livres.

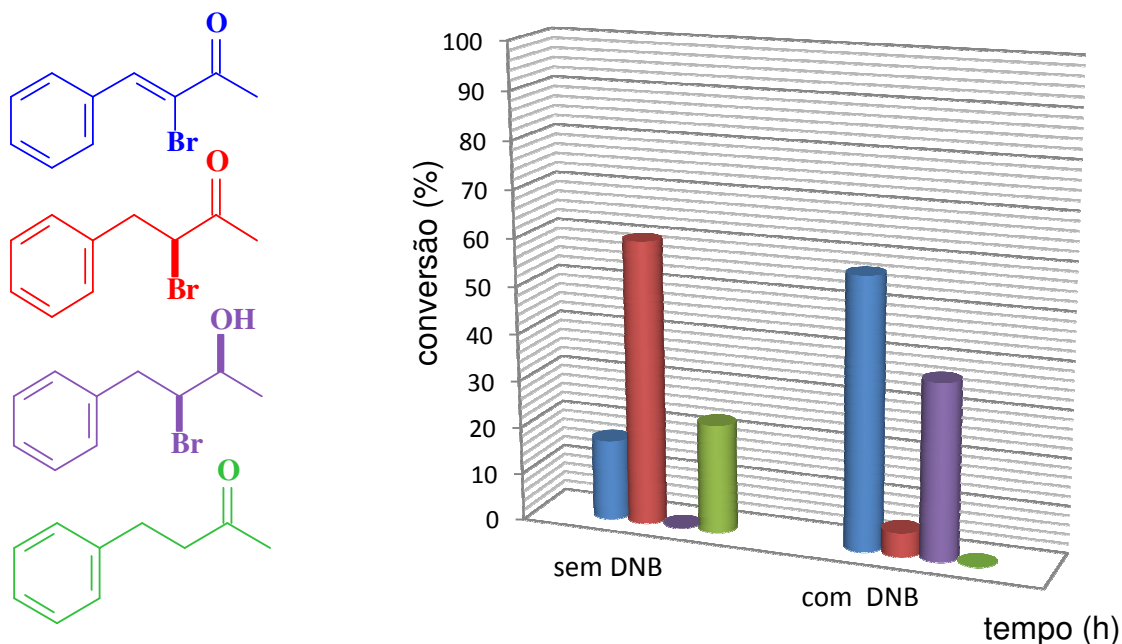


Figura 22. Biorredução de (Z)-3-bromo-4-fenil-3-buten-2-ona (Z)-38 mediada por *P. stipitis*, sem e com adição de DNB em 24 horas.

A Figura 23 apresenta o resultado da biorredução de (Z)-39 com e sem DNB, em 24 horas de reação, 100 mg de substrato e 1 mg de DNB em 100 mL do meio enzimático. Observando-se a figura supracitada é possível verificar que a reação com o uso de inibidor é mais lenta, pois recupera-se uma quantidade considerável de substrato, entretanto, é observado a inibição da formação do produto desalogenado 48 (verde) e a formação da clorocetona 41 (vermelha). Na reação sem o uso do inibidor não é observada a produção da cloroidrina 45 (roxo), mas sim a formação da clorocetona 41 (vermelha) e da cetona 48 (verde).

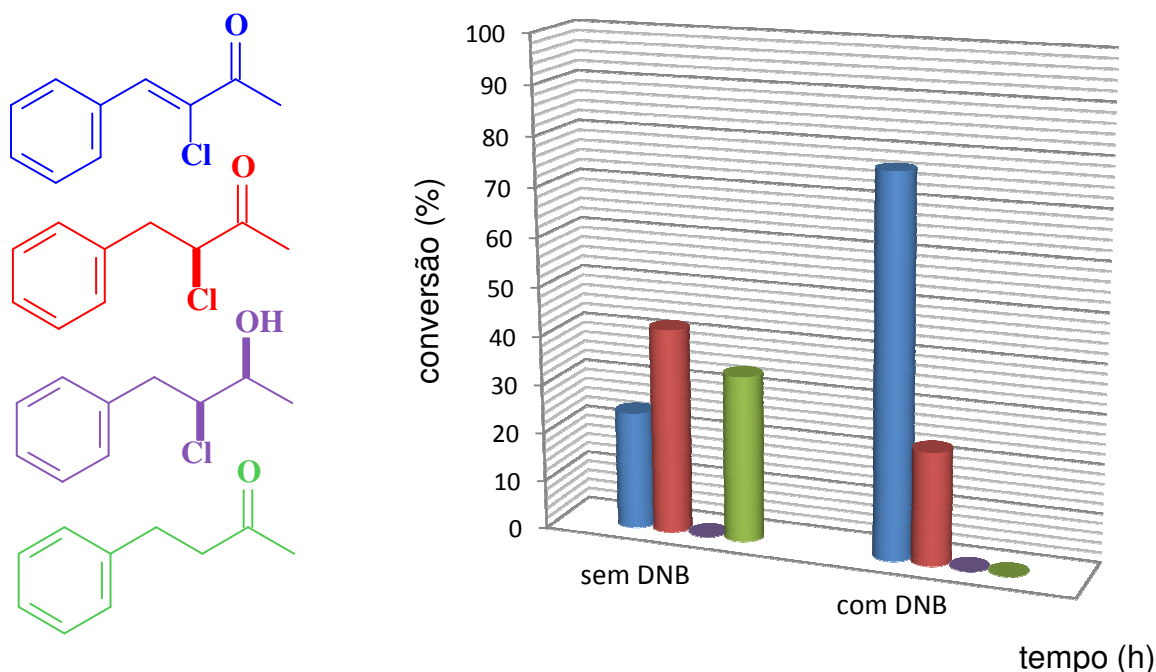


Figura 23. Biorredução de (Z)-3-cloro-4-fenil-3-buten-2-ona (Z)-39 mediada por *P. stipitis* sem e com adição de DNB em 24 horas.

A dificuldade de extração dos produtos do meio reacional sempre foi um problema. A formação de emulsão acarreta a perda de produto com a consequente diminuição do rendimento. Para minimizar estas dificuldades, além de testar as vantagens descritas na literatura, foi sintetizado o hexafluorofosfato de 1-butil-3-metilimidazólio [BMIM][PF₆], um líquido iônico bastante citado por pesquisadores como um ótimo co-solvente em reações de biocatálise.^{1,2} Uma das vantagens mais atrativas deste trabalho é que o [BMIM][PF₆] é imiscível em água, tornando o sistema em bifásico e, uma vez o substrato e/ou produto dissolvido no líquido iônico, existe a possibilidade de diminuição da toxicidade do substrato e/ou produto para o biocatalisador. Através de extrações realizadas tanto na fase do [BMIM][PF₆] quanto na fase aquosa, verificou-se que o substrato e produtos estão em grande parte dissolvidos no líquido iônico, separado do meio aquoso onde encontram-se as células em suspensão.

Realizaram-se experimentos com as α -haloenonas (Z)-38 e (Z)-39 numa quantidade de 100 mg dissolvidos em 1 mL de [BMIM][PF₆], adicionados a 100 mL do meio enzimático com *Pichia stipitis*. Em outro experimento paralelo,

manteve-se a mesma quantidade de substrato e aumentou-se a quantidade do meio para 200 mL. Os dados comparativos das reações com líquido iônico e a reação na presença de DNB são vistos nas Figuras 24 e 25. Surpreendentemente, as reações com a utilização do líquido iônico se comportaram de maneira semelhante às reações realizadas com o DNB pois, ao final da reação, não foi observada a formação do composto desalogenado **48**.

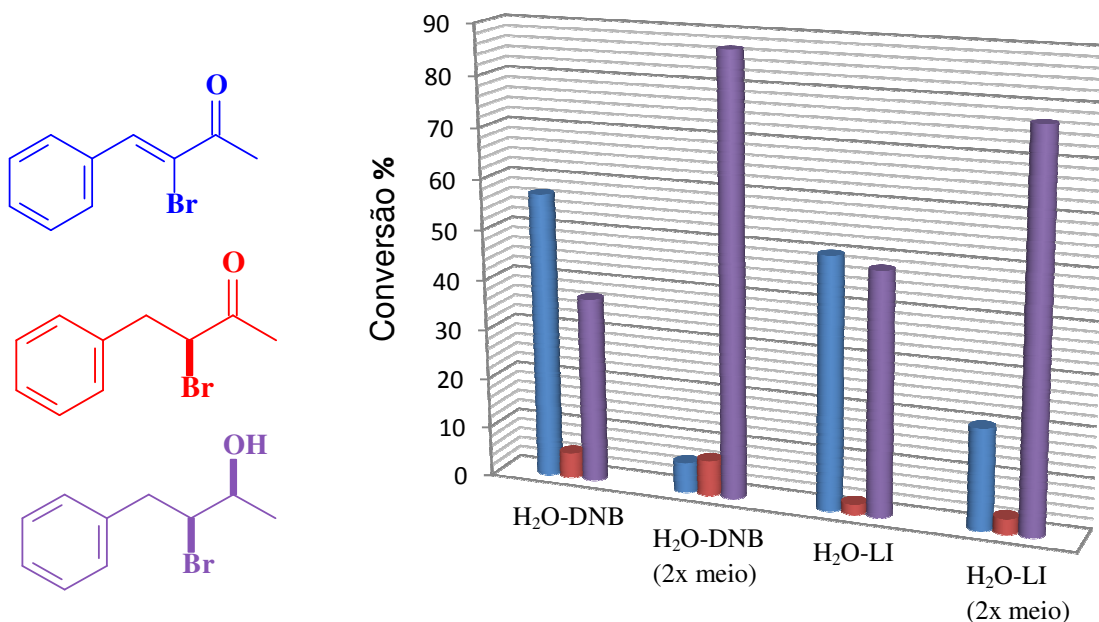


Figura 24. Biorredução de (Z)-3-bromo-4-fenil-3-buten-2-ona (Z)-**38** mediada por *P. stipitis* com adição de DNB ou líquido iônico.

A Figura 24 mostra que, nas condições de 100 mg de substrato e 1 mL de líquido iônico em 100 mL do meio enzimático, a formação da bromoidrina **44** é maior com o uso do líquido iônico do que na reação realizada no meio aquoso com DNB e o excesso enantiomérico da bromoidrina **44**, com o uso do líquido iônico, foi de 98 %, enquanto que na ausência de líquido iônico não passou de 80 %. Quando o volume do meio foi aumentado de 100 mL para 200 mL, mantendo as mesmas quantidades de substrato/líquido iônico, houve maior formação da bromoidrina **44**, sem diminuição dos excessos enantioméricos obtidos no experimento anterior. Além disso, observou-se que a perda na extração do substrato e produtos da reação utilizando [BMIM][PF₆] diminuiu drasticamente para

5%. A configuração da bromoidrina **44** e cloroidrina **45** é 2*S*,3*S* determinada utilizando o mesmo procedimento relatado nas páginas 35 e 36.

A Figura 25 mostra a comparação das reações com α -cloroenona (*Z*)-**39** com o uso de inibidor e de líquido iônico. Nota-se que, semelhante às biorreduções de (*Z*)-**38** na presença de [BMIM][PF₆] ou DNB, as biorreduções de (*Z*)-**39** não apresentaram a formação do composto desalogenado.

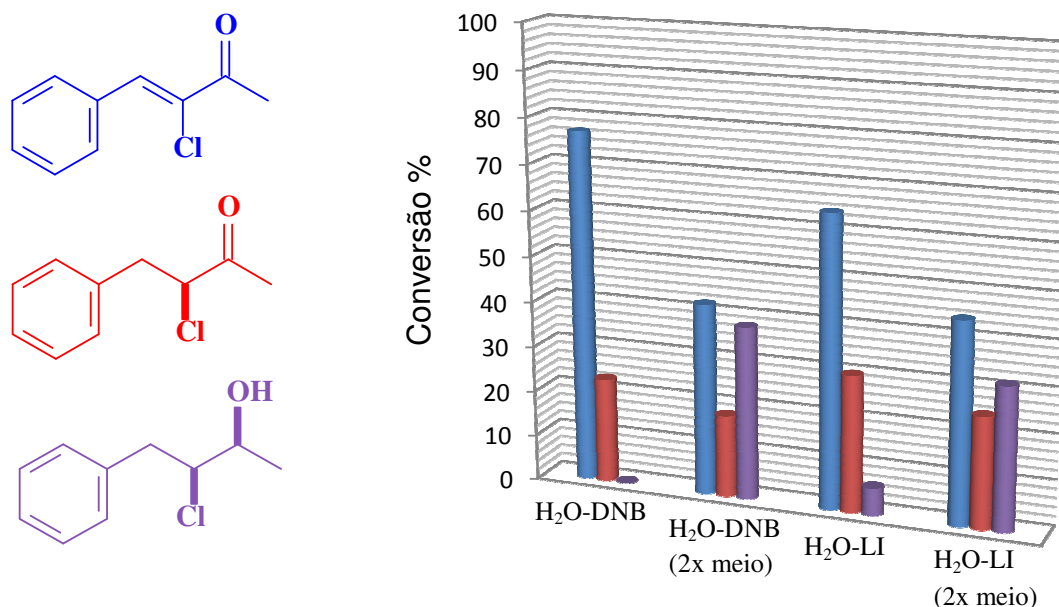


Figura 25. Biorredução de (*Z*)-3-cloro-4-fenil-3-buten-2-ona (*Z*)-**39** mediada por *P. stipitis* com adição de DNB ou líquido iônico.

As reações com (*Z*)-**39** são nitidamente mais lentas em comparação com (*Z*)-**38**. Isso nos leva a propor a questão da toxicidade do cloro na molécula para o biocatalisador. Quando utilizou-se 200 mL do meio, as reações apresentam resultados melhores tanto para a reação na presença do inibidor quanto na reação utilizando o sistema bifásico água/[BMIM][PF₆]. Na reação com o uso do líquido iônico, obteve-se uma quantidade da α -halocetona **40** e **41** (vermelha) maior do que a obtida na presença de DNB. A quantidade de cloroidrina **45** formada (roxo) é semelhante nos dois casos, entretanto, o excesso enantiomérico da cloroidrina em líquido iônico foi de 97% enquanto que, com o uso de DNB, não passou de 75%. A configuração da cloroidrina **45** obtida é 2*S*,3*S*, determinada da mesma maneira que foi descrita anteriormente.

Com a finalidade de verificar a possibilidade do líquido iônico estar agindo como o DNB, isto é, como inibidor de processos radicalares, experimentos foram feitos com (Z)-**38** e (Z)-**39** utilizando células íntegras de *P. stipitis*. Em frascos contendo o meio celular, adicionou-se em alguns frascos 1 mg de DNB e em outros 1 mg de líquido iônico. Esses frascos foram deixados sob agitação orbital a 200 rpm por 30 minutos a 30 °C. Após esse tempo, (Z)-**38** e (Z)-**39** foram adicionados separadamente em frascos distintos e os experimentos foram acompanhados por CG/EM, com alíquotas retiradas de 24 em 24 horas até 72 horas de reação. A formação do produto desalogenado **48** não foi observada nas reações que continham DNB, entretanto, houve a formação do produto desalogenado **48** nas reações que continham o líquido iônico. Conclui-se que o líquido iônico não possui a propriedade de inibidor de processos radicalares, como possui o DNB.

O processo que ocorre nas biorreduções utilizando líquido iônico deve ser semelhante ao processo geralmente proposto quando se utiliza XAD-7 como suporte para o substrato, que é chamado de biocatálise extrativa *in situ*. Nesse processo, o substrato encontra-se particionado e em equilíbrio entre o líquido iônico e a fase aquosa. Quando o substrato se encontra na fase aquosa, ocorre a redução, formando o intermediário que, por sua vez, encontra-se também particionado e em equilíbrio entre a fase aquosa e o líquido iônico, ficando a maior parte no líquido iônico, devido à maior afinidade com o mesmo do que com a água e, assim, evitando reações paralelas e/ou a sua degradação/desalogenação do produto (Figura 26). O intermediário é reduzido formando um produto que, por sua vez, encontra-se também particionado e em equilíbrio entre a fase aquosa e o líquido iônico, ficando a maior parte no líquido iônico.

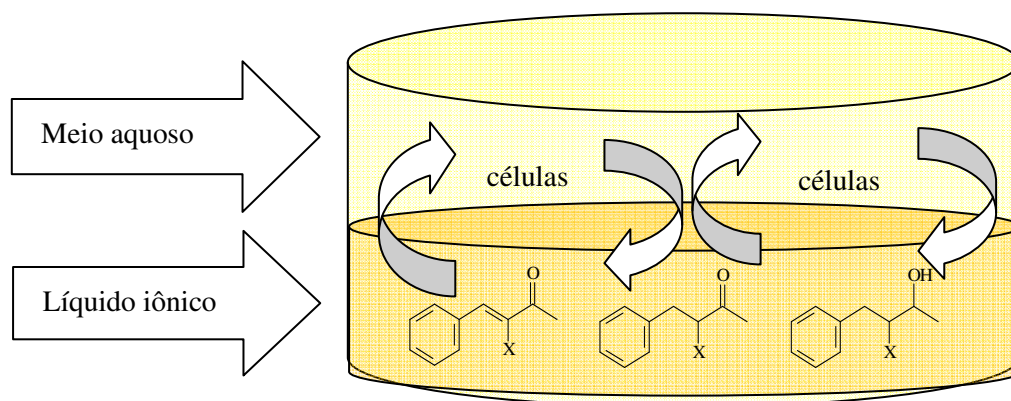


Figura 26. Proposta para o processo da biocatálise extrativa *in situ*.

3.2.3. Biorreduções utilizando *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida albicans*, *Geotrichum candidum* e *Micrococcus luteus*

O estudo sobre a influência do líquido iônico [BMIM][PF₆] nas reações de redução de (Z)-**38** e (Z)-**39** foi estendido aos seguintes microrganismos: *S. cerevisiae*, *R. glutinis*, *C. albicans*, *G. candidum* e *M. luteus*. Após análise por CG/EM, observou-se a formação das haloidrinas **44**, **45** e α -halocetonas **40**, **41**.

As biorreduções de (Z)-**38** mediadas pelos microrganismos acima citados, em sistema bifásico, foram realizadas com 100 mg de (Z)-**38** em 100 mL de meio (Tabela 9) e com 100 mg de (Z)-**38** em 200 mL de meio (Tabela 10), sendo que alíquotas foram retiradas nos intervalos de 24, 48, 72, 96 e 120 horas de reação. A partir de 96 horas não foi verificada alteração na concentração de reagente e produtos.

Tabela 9. Porcentagem de reagente e produtos presentes em 100 mL de meio após 120 horas de biorredução de (Z)-3-bromo-4-fenil-3-buten-2-ona (Z)-**38** mediada por células de microrganismos em crescimento.

microrganismos	sistema	α - bromoenona	α - bromocetona	bromoidrina	
		recup. (%)	conv. (%) ^c	conv. (%) ^c	ee (%) ^d
<i>C. albicans</i> CCT 0776	sem LI ^a	12	36	52 (<i>syn</i>)	65 (S,S)
	com LI ^b	35	25	40 (<i>syn</i>)	80 (S,S)
<i>R. glutinis</i> CCT 0783	sem LI ^a	18	12	45/25 (<i>syn/anti</i>)	70/66 (S,S)/ (S,R)
	com LI ^b	55	20	25 (<i>syn</i>)	92 (S,S)
<i>G. candidum</i> CCT 1205	sem LI ^a	30	-	42/28 (<i>syn/anti</i>)	65/11 (S,S)/ (S,R)
	com LI ^b	45	35	30 (<i>syn</i>)	91 (S,S)
<i>M. luteus</i> CCT 2283	sem LI ^a	48	-	52 (<i>syn</i>)	38 (S,S)
	com LI ^b	58	8	34 (<i>syn</i>)	42 (S,S)
<i>S. cerevisiae</i> CCT 3019	sem LI ^a	5	20	75 (<i>syn</i>)	90 (S,S)
	com LI ^b	36	23	41 (<i>syn</i>)	97 (S,S)

^aCondição reacional: 100 mg de (Z)-**38** dissolvidos em 100 mL de meio com células em crescimento, sob agitação orbital de 200 rpm a 30 °C. ^bCondição reacional: 100 mg de (Z)-**38** dissolvidos em 1 mL de líquido iônico e adicionados a 100 mL de meio com células em crescimento, sob agitação orbital de 400 rpm a 30 °C. ^cConversão determinada pelas áreas relativas observadas por CG/EM. ^dee determinados por CG/DIC com coluna quiral.

Na Tabela 9 nota-se que as reações na presença de [BMIM][PF₆] mostraram melhores resultados, obtendo-se haloidrinas com excessos enantioméricos de 97% quando o biocatalisador utilizado foi *S. cerevisiae*. Com todos os microrganismos foram obtidos resultados satisfatórios, com exceção da biorredução utilizando *M. luteus* como biocatalisador na presença do líquido iônico, com o qual obteve-se 42% de excesso enantiomérico para a bromoidrina formada. Na biorredução sem a presença de líquido iônico, utilizando *G. candidum* e *R. glutinis* como biocatalisadores, foi observada a formação de dois

diastereoisômeros para a haloidrina obtida. Este fato pode estar relacionado com a concentração do substrato no meio onde estão as células, ocorrendo assim uma maior seletividade. Sabe-se que em uma competição de enzimas pelo mesmo substrato a diminuição da concentração do substrato favorece a enzima de menor K_M . Esse fato pode ser melhor visualizado utilizando-se um gráfico duplo recíproco ou de Lineweaver-Burk, onde é exemplificado hipoteticamente a competição entre duas enzimas pelo mesmo substrato (Figura 27).

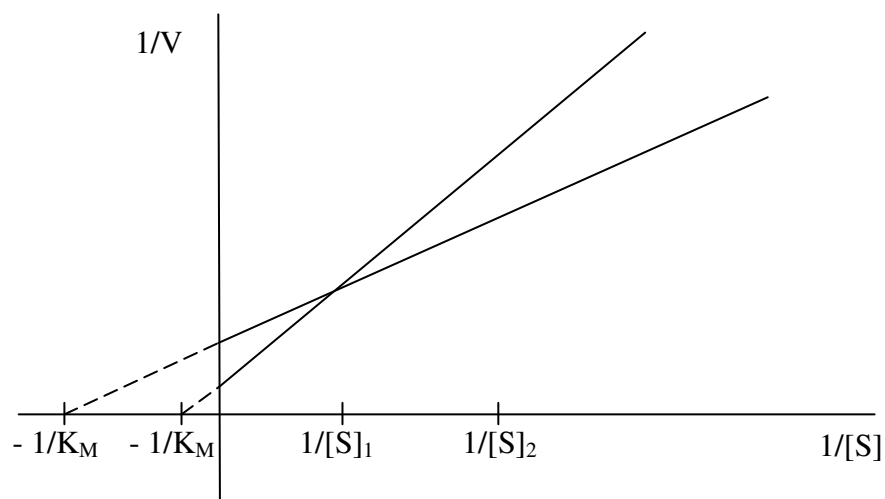


Figura 27. Representação de Lineweaver-Burk, da ação de duas enzimas.

Nota-se nesse gráfico que a diferença de velocidade aumenta em favor da enzima que apresenta um menor K_M , quando a concentração do substrato diminui de $[S]_1$ para $[S]_2$. Isto significa que o ee do produto obtido na $[S]_2$ é maior que o ee obtido na $[S]_1$.

Voltando à interpretação dos resultados obtidos neste trabalho, verifica-se que, em geral, a haloidrina obtida com o sistema água/líquido iônico apresenta ee maior do que o obtido em água. Como no sistema bifásico água/líquido iônico o substrato e o intermediário estão, em sua maior parte, no líquido iônico, a concentração efetiva de substrato e intermediário na fase aquosa é bem menor do que no sistema que utiliza somente água como solvente, favorecendo, portanto, a enzima de menor K_M e, conseqüentemente, o aumento do ee.

Tabela 10. Porcentagem de reagente e produtos presentes em 200 mL de meio após 120 horas de biorredução do (Z)-3-bromo-4-fenil-3-buten-2-ona (Z)-**38** mediada por células de microrganismos em crescimento.

microrganismos	sistema	α -bromoenona	α -bromocetona		bromoidrina
			recup. (%)	conv. (%) ^c	conv. (%) ^c ee (%) ^d
<i>C. albicans</i>	sem LI ^a	21	18	61 (<i>syn</i>)	65 (S,S)
CCT 0776	com LI ^b	32	13	55 (<i>syn</i>)	81 (S,S)
<i>R. glutinis</i>	sem LI ^a	18	9	47/26	70/65
CCT 0783				(<i>syn/anti</i>)	(S,S)/ (S,R)
	com LI ^b	39	14	47 (<i>syn</i>)	92 (S,S)
<i>G. candidum</i>	sem LI ^a	12	13	39/36	65/11
CCT 1205				(<i>syn/anti</i>)	(S,S)/ (S,R)
	com LI ^b	33	15	52 (<i>syn</i>)	91 (S,S)
<i>M. luteus</i>	sem LI ^a	55	5	40 (<i>syn</i>)	38 (S,S)
CCT 2283	com LI ^b	58	-	42 (<i>syn</i>)	42 (S,S)
<i>S. cerevisiae</i>	sem LI ^a	-	26	74 (<i>syn</i>)	90 (S,S)
CCT 3019	com LI ^b	28	10	62 (<i>syn</i>)	97 (S,S)

^aCondição reacional: 100 mg de (Z)-**38** dissolvido em 200 mL de meio com células em crescimento, sob agitação orbital de 200 rpm a 30 °C. ^bCondição reacional: 100 mg de (Z)-**38** dissolvidos em 1 mL de líquido iônico e adicionados a 200 mL de meio com células em crescimento, sob agitação orbital de 400 rpm a 30 °C. ^c Conversão determinada pelas áreas relativas observadas por CG/EM. ^d ee determinados por CG/DIC com coluna quiral.

Na Tabela 10 verifica-se que os excessos enantioméricos não sofrem alteração com o aumento do volume do meio com células em suspensão, porém, há um aumento significativo na produção da bromoidrina, principalmente nas reações em que se utiliza líquido iônico, como no caso da *C. albicans*, que foi de 40% para 55%, *R. glutinis* de 25% para 47%, *G. candidum* de 30% para 52% e *S. cerevisiae* de 41 para 62% de conversão. Esse aumento de rendimento pode ser devido ao maior número de células. Foi observada também a diastereosseletividade das reações com líquido iônico, como visto no experimento

realizado com 100 mL de meio de células de microrganismos em suspensão. O mesmo protocolo foi realizado com (Z)-**39** e os resultados encontram-se nas Tabelas 11 e 12.

Tabela 11. Porcentagem de reagente e produtos presentes em 100 mL de meio após 120 horas de biorredução do (Z)-3-cloro-4-fenil-3-buten-2-ona (Z)-**39** mediada por células de microrganismos em crescimento.

microrganismos	sistema	α - cloroenona	α - clorocetona	cloroidrina	
		recup. (%)	conv. (%) ^c	conv. (%) ^c	ee (%) ^d
<i>C. albicans</i> CCT 0776	sem LI ^a	18	8	42/32 (syn/anti)	79/68 (S,S)/(S,R)
	com LI ^b	41	12	47 (syn)	94 (S,S)
<i>R. glutinis</i> CCT 0783	sem LI ^a	5	30	50/15 (syn/anti)	71/63 (S,S)/(S,R)
	com LI ^b	10	32	58 (syn)	95 (S,S)
<i>G. candidum</i> CCT 1205	sem LI ^a	26	15	35/24 (syn/anti)	67/58 (S,S)/(S,R)
	com LI ^b	38	12	50 (syn)	95 (S,S)
<i>M. luteus</i> CCT 2283	sem LI ^a	73	6	21 (syn)	32 (S,S)
	com LI ^b	93	2	5 (syn)	39 (S,S)
<i>S. cerevisiae</i> CCT 3019	sem LI ^a	19	28	53 (syn)	71 (S,S)
	com LI ^b	21	23	56 (syn)	92 (S,S)

^aCondição reacional: 100 mg de (Z)-**93** dissolvido em 100 mL de meio com células em crescimento, sob agitação orbital de 200 rpm a 30 °C. ^bCondição reacional: 100 mg de (Z)-**39** dissolvidos em 1 mL de líquido iônico e adicionados a 100 mL de meio com células em crescimento, sob agitação orbital de 400 rpm a 30 °C. ^cConversão determinada pelas áreas relativas observadas por CG/EM. ^dee determinados por CG/DIC com coluna quiral.

Na Tabela 11 observa-se que, para as reações realizadas na presença do líquido iônico, foram obtidos bons excessos enantioméricos, obtendo-se 95%

quando os biocatalisadores utilizados foram *Rhodotorula glutinis* e *Geotrichum candidum*. Nas reações sem a presença de líquido iônico, o rendimento foi de 53% quando o biocatalisador utilizado foi o *Saccharomyces cerevisiae*, obtendo-se a cloroidrina com 71% de excesso enantiomérico, enquanto que na presença de líquido iônico a cloroidrina foi obtida com 92% de excesso enantiomético. Nas reações utilizando *Candida albicans*, *Rhodotorula glutinis* e *Geotrichum candidum* sem a presença do líquido iônico foi observado a formação de dois diastereoisômeros, enquanto que, na reação com a utilização do líquido iônico, somente um diastereoisômero foi obtido para a cloroidrina. Este fato também pode estar relacionado com a concentração e polaridade do meio do substrato na fase do líquido iônico, como comentado anteriormente.

Tabela 12. Porcentagem de reagente e produtos presentes em 200 mL de meio após 120 horas de biorredução do (Z)-3-cloro-4-fenil-3-buten-2-ona (Z)-**39** mediada por células de microrganismos em crescimento.

microrganismos	sistema	α -	α -	cloroidrina	
		cloroenona	clorocetona		
		recup. (%)	conv. (%) ^c	conv. (%) ^c	ee (%) ^d
<i>C. albicans</i> CCT 0776	sem LI ^a	22	8	47/23 (syn/anti)	79/68 (S,S)/ (S,R)
	com LI ^b	49	10	41 (syn)	94 (S,S)
<i>R. glutinis</i> CCT 0783	sem LI ^a	-	13	63/24 (syn/anti)	72/63 (S,S)/ (S,R)
	com LI ^b	44	8	48 (syn)	95 (S,S)
<i>G. candidum</i> CCT 1205	sem LI ^a	38	2	44/16 (syn/anti)	67/58 (S,S)/ (S,R)
	com LI ^b	42	5	53 (syn)	95 (S,S)
<i>M. luteus</i> CCT 2283	sem LI ^a	61	6	33 (syn)	32 (S,S)
	com LI ^b	72	10	18 (syn)	39 (S,S)
<i>S. cerevisiae</i> CCT 3019	sem LI ^a	13	20	67 (syn)	71 (S,S)
	com LI ^b	18	21	61 (syn)	92 (S,S)

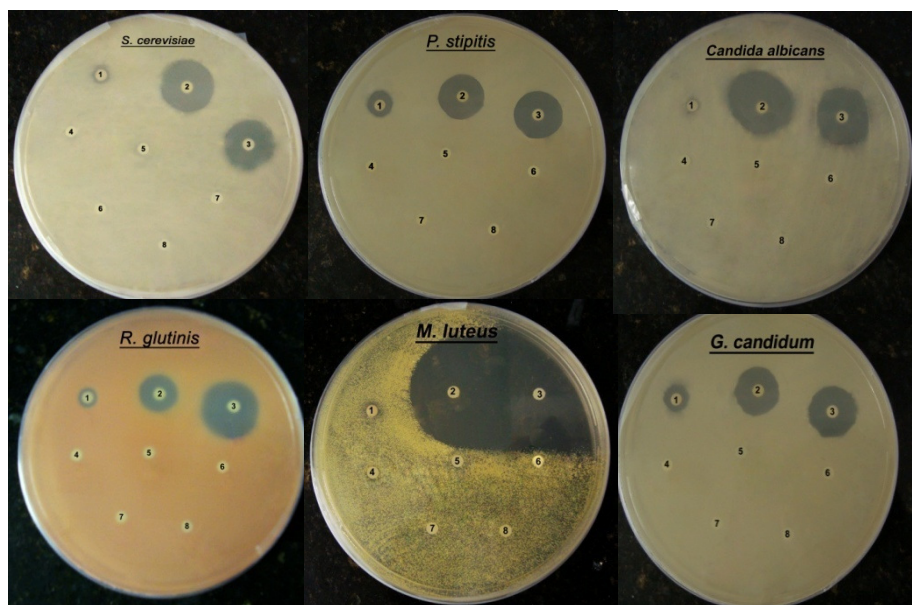
^aCondição reacional: 100 mg de (Z)-**39** dissolvido em 200 mL de meio com células em crescimento, sob agitação orbital de 200 rpm a 30 °C. ^bCondição reacional: 100 mg de (Z)-**39** dissolvidos em 1 mL de líquido iônico adicionados a 200 mL de meio com células em crescimento, sob agitação orbital de 400 rpm a 30 °C. ^cConversão determinada pelas áreas relativas observadas por CG/EM. ^dee determinados por CG/DIC com coluna quiral.

Nota-se nos resultados na Tabela 12 que os excessos enantioméricos permaneceram semelhantes aos do experimento realizado com 100 mL de meio com as células em suspensão. A porcentagem de conversão das cloroidrinas obtidas utilizando um sistema bifásico tiveram um aumento considerável, de 24 %

passou para 41% utilizando a *C. albicans*, com a *R. glutinis* passou de 34 para 48% e com *S. cerevisiae* passou de 56 para 61%. Esse aumento de conversão pode ser devido ao maior número de células. Já com *G. candidum* foi de 50 % para 53%, sendo que nesse caso não houve variação significativa. Nas reações utilizando *M. luteus* os resultados não se mostraram tão eficientes em relação aos demais biocatalisadores. Ao finalizar este tópico, cabe ressaltar a diastereosseletividade obtida nas biorreduções de (Z)-**38** e (Z)-**39** mediadas pelos microrganismos *C. albicans*, *R. glutinis* e *G. candidum* quando realizadas no processo empregando o sistema bifásico: água/líquido iônico.

3.2.4. Teste de inibição dos microrganismos por (Z)-bromo-4-fenil-3-buten-2-ona (Z)-38** e (Z)-cloro-4-fenil-3-buten-2-ona (Z)-**39****

Com o objetivo de verificar a toxicidade das α -haloenonas para os biocatalisadores, foi realizado um teste de inibição em placas de Petri. O procedimento para preparação da placa foi fazer o meio YMA (extrato de malte, extrato de levedura, peptona, glicose e ágar) e, após o endurecimento do meio, foi aplicado e espalhado 100 μ L de uma dispersão do microrganismo e, em seguida, foram colocados os discos feitos com papel de filtro estéreis, contendo 10 μ L de uma solução 1 mg/mL de (Z)-**38**. Separadamente, o mesmo procedimento foi realizado para (Z)-**39**. Após 24 horas a 30 °C, observou-se a formação dos halos de inibição ao redor dos papéis de filtro que continham as enonas. Os outros pontos de aplicação foram com acetato de etila e [BMIM][PF₆], para verificar se os mesmo também possuíam efeitos inibitórios para o biocatalisador. Conclui-se que as α -haloenonas possuem efeito inibidor para os microrganismos utilizados como biocatalisadores. Cabe ressaltar que o procedimento foi realizado para cada biocatalisador separadamente. A Figura 28 mostra o efeito com os 6 microrganismos.



1. 3-oxo-3-fenilpropanoato de etila; 2. (Z)-3-cloro-4-fenil-3-buten-2-ona; 3. (Z)-bromo-4-fenil-3-buten-2-ona; 4. 3-oxo-3-(4-nitrofenil)-propanoato de etila; 5. (E/Z)-2-hidroxiimino-3-(4-nitrofenil)-3-oxopropanoato de etila; 6. E-2-metoxiimino-3-oxopropanoato de etila; 7. AcOEt; 8. [BMIM][PF₆].

Figura 28. Halos de inibição dos microrganismos provocados pelas α -haloenonas (Z)-38 e (Z)-39.

Com o objetivo de verificar se as concentrações de substrato e produtos no meio aquoso poderiam levar à inibição dos microrganismos, experimentos envolvendo o sistema água/líquido iônico foram realizados. Os experimentos consistiam em colocar apenas o líquido iônico no meio com as células em suspensão (branco) e, em paralelo, adicionar o substrato dissolvido em líquido iônico no meio com as células em suspensão. Em seguida, os experimentos foram deixados sob agitação orbital a 30 °C e alíquotas foram retiradas nos intervalos de 4, 12, 24 e 50 horas. Cabe ressaltar que os frascos eram previamente deixados em repouso por 20 minutos antes da retirada da alíquota do meio aquoso. Em seguida, as alíquotas foram aplicadas em papéis de filtro estéreis e colocados na placa de Petri com o microrganismo. Após 24 horas de incubação foi verificado que não houve a formação do halo de inibição em nenhum destes experimentos. Desta maneira, confirmou-se que a maior parte do substrato e produtos

encontram-se no líquido iônico e que a concentração do substrato/produtos na fase aquosa não é suficiente para inibir os microrganismos.

3.2.5. Contagem de células viáveis dos microrganismos antes e após as biorreduções utilizando (Z)-3-bromo-4-fenil-3-buten-2-ona (Z)-38 e (Z)-3-cloro-4-fenil-3-buten-2-ona (Z)-39

Para medir o crescimento populacional celular, o método usual é a contagem microscópica direta. Nesse método são contadas as células vivas e as mortas. Entretanto, se o interesse for avaliar apenas as células vivas, o método utilizado é de contagem de células viáveis, ou seja, são aquelas capazes de se duplicar originando as células filhas (Figura 29).

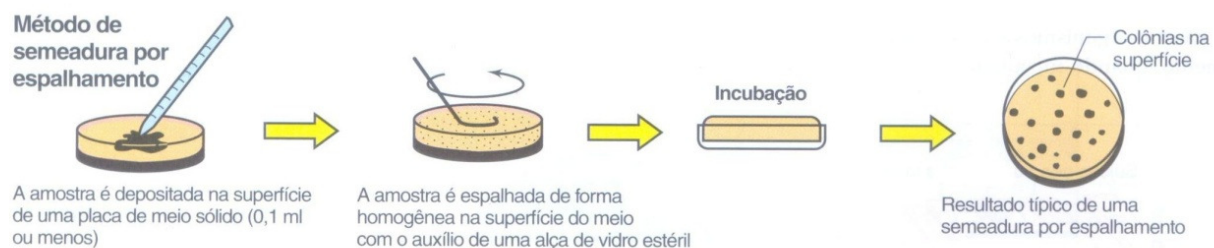


Figura 29. Método de contagem por espalhamento de células viáveis (contagem em placa).

No método de contagem por espalhamento de células viáveis, a dispersão inicial de microrganismos a ser quantificada é diluída 6 vezes, numa proporção de 1:10, para se obter um número apropriado de colônias em placas de Petri, após incubação por 24 h a 30 °C e com de 100 µL de cada diluição sendo espalhados em placas separadamente. As placas com as colônias dos microrganismos, antes e depois das biorreduções, são visualizadas logo abaixo e, com base nos resultados, concluiu-se que as células dos microrganismos não são mais viáveis, tanto em meio aquoso como no sistema bifásico, após os processos de biorreduções dos substratos.

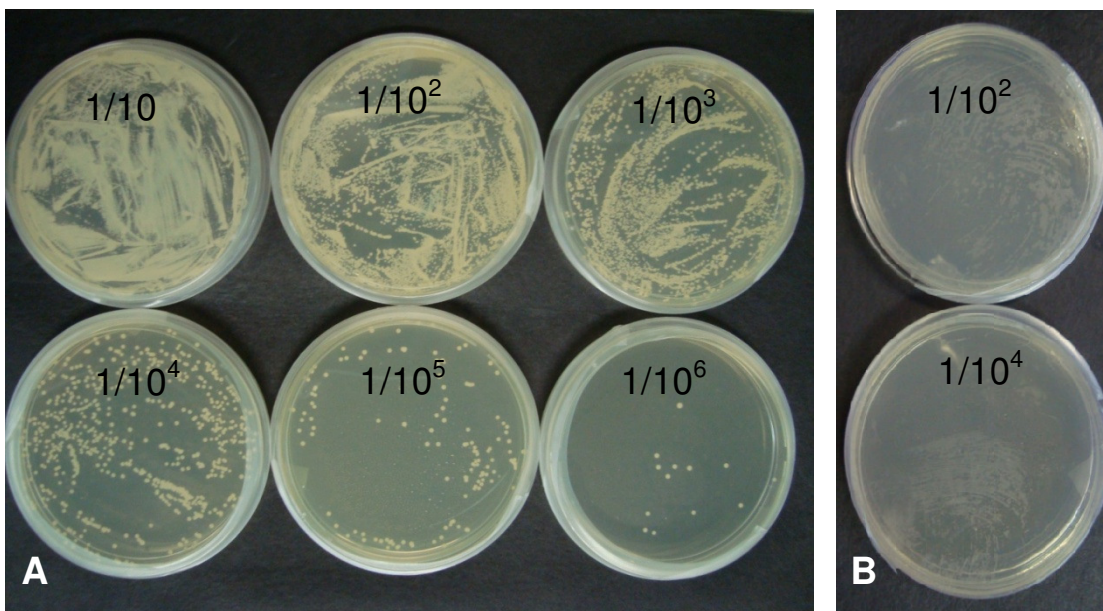


Figura 30. Contagem de células viáveis de *S. cerevisiae* antes da biorredução (A) (na 4^a diluição há 133 colônias ou $1,33 \times 10^6$ células por mL) e depois da biorredução (B), sem células viáveis.

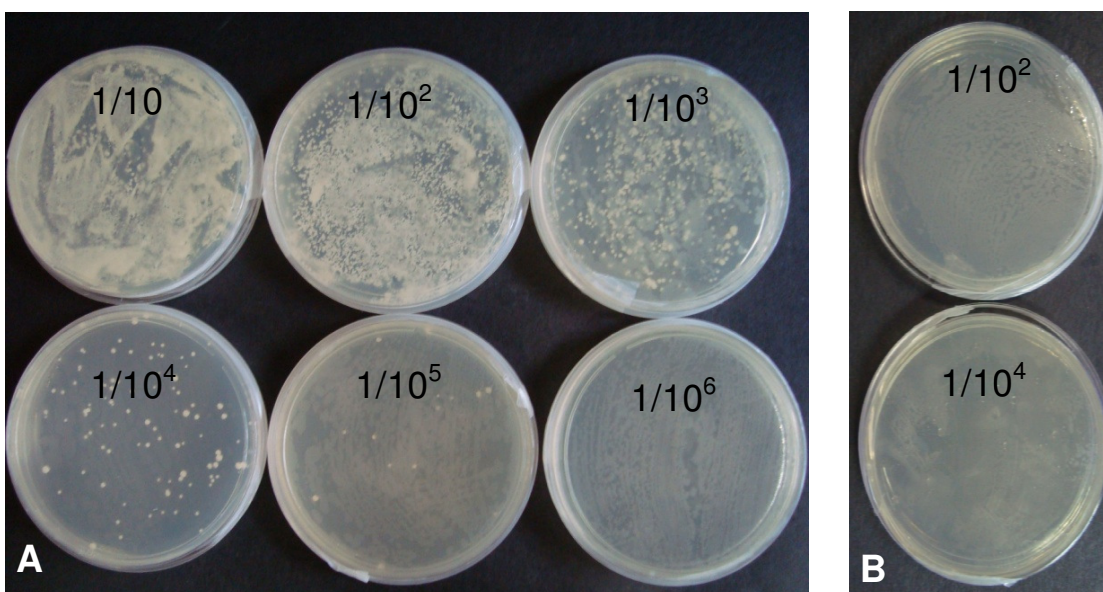


Figura 31. Contagem de células viáveis de *C. albicans* antes da biorredução (A) (na 4^a diluição há 101 colônias ou $1,01 \times 10^6$ células por mL) e depois da biorredução (B), sem células viáveis.

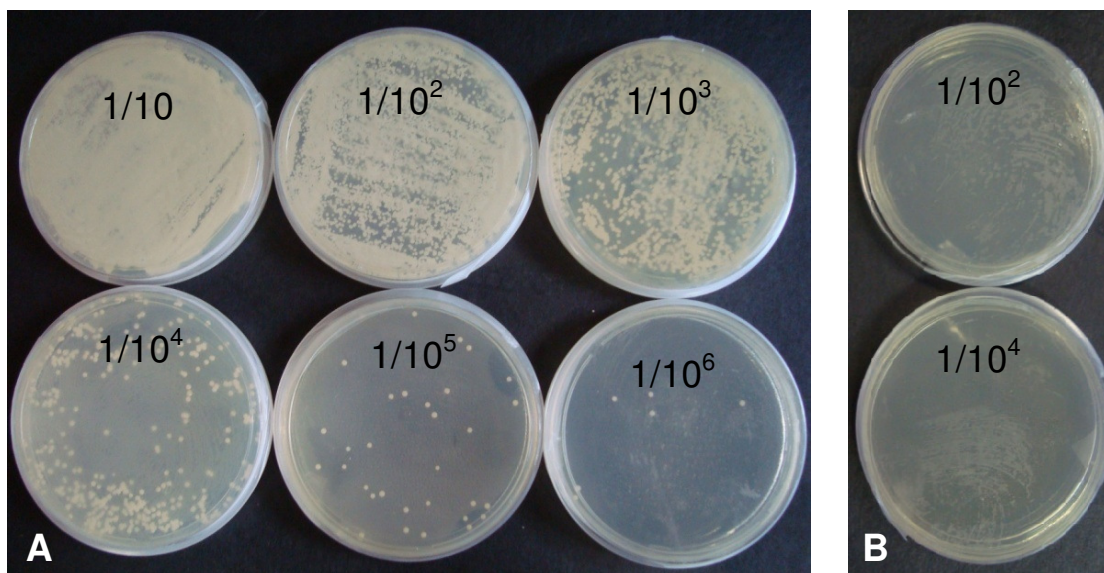


Figura 32. Contagem de células viáveis de *P. stipitis* antes da biorredução (A) (na 4^a diluição há 265 colônias ou $2,65 \times 10^6$ células por mL) e depois da biorredução (B), sem células viáveis.

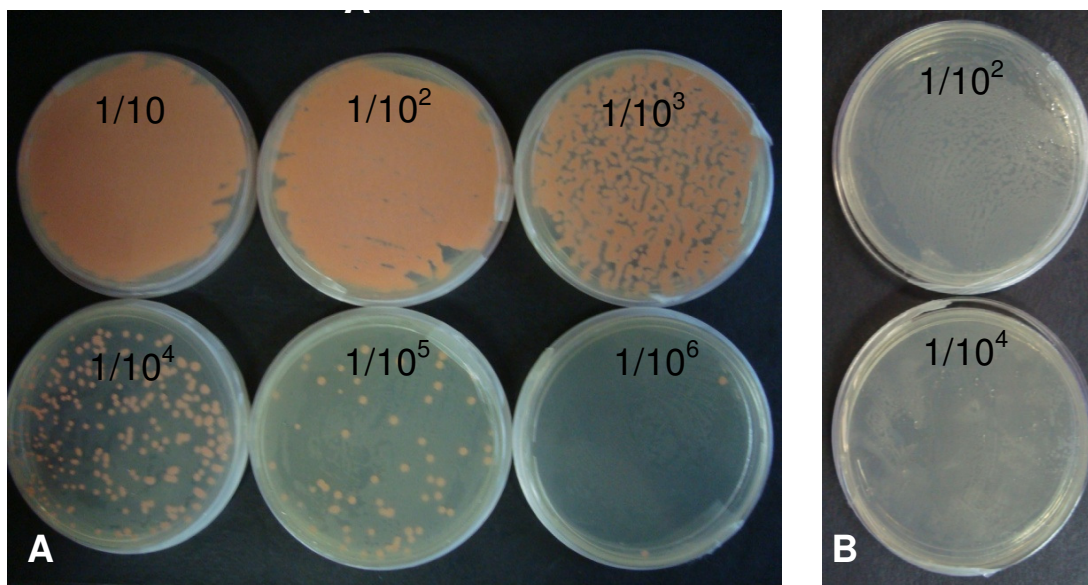


Figura 33. Contagem de células viáveis de *R. glutinis* antes da biorredução (A) (na 4^a diluição há 138 colônias ou $1,38 \times 10^6$ células por mL) e depois da biorredução (B), sem células viáveis.

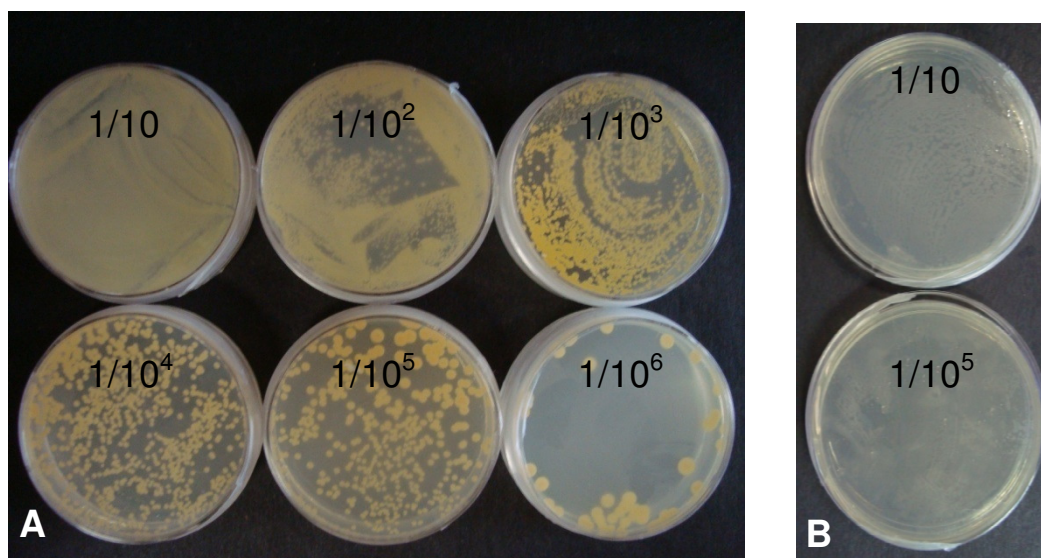


Figura 34. Contagem de células viáveis de *M. luteus* antes da biorredução (A) (na 5^a diluição há 151 colônias ou $1,51 \times 10^7$ células por mL) e depois da biorredução (B), sem células viáveis.

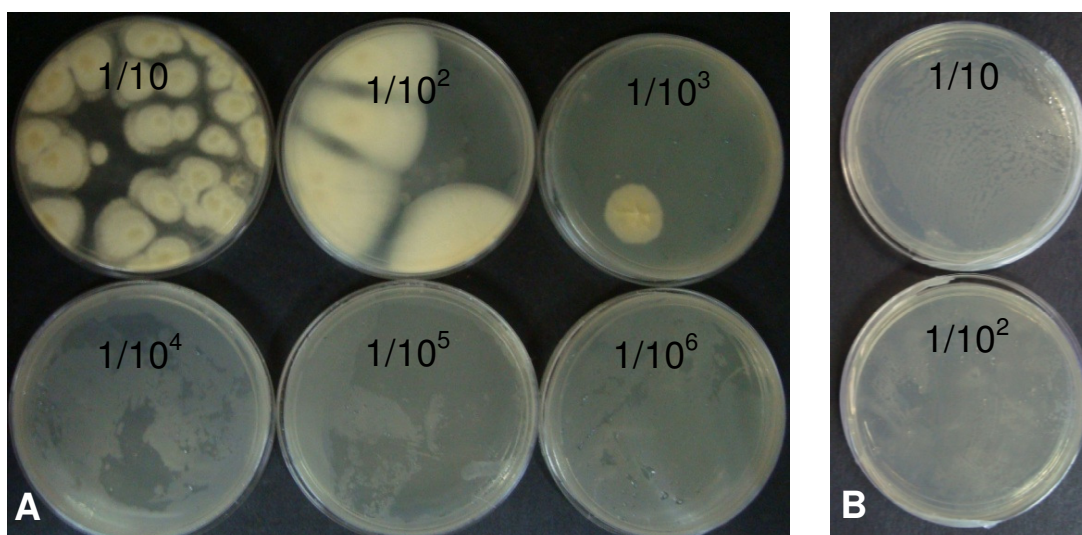


Figura 35. Contagem de células viáveis de *G. candidum* antes da biorredução (A) (há 30 colônias ou 3×10^2 células por mL) e depois da biorredução (B), sem células viáveis.

3.2.6. Determinação da concentração de (Z)-3-bromo-4-fenil-3-buten-2-ona (Z)-38 e (Z)-3-cloro-4-fenil-3-buten-2-ona (Z)-39 na fase aquosa das reações com líquido iônico

Os espectros de absorção na região de UV-Visível foram obtidos para os substratos (Z)-38 (Figura 51, p. 119) e (Z)-39 (Figura 52, p. 120) em solução água/etanol e foram comparados com o espectro da fração aquosa de uma mistura água/[BMIM:PF₆]. Verificou-se que é possível utilizar as bandas de absorção na região de 295 nm para determinar as concentrações dos substratos na fração aquosa de uma mistura substrato/água/[BMIM:PF₆]. Desta maneira, foram construídas curvas de calibração utilizando absorbância (UV-Visível) *versus* concentração para (Z)-38 (Figura 37) e (Z)-39 (Figura 38), partindo de uma concentração inicial de 0,2 mg/ mL em água/EtOH. Em seguida, colocou-se em um erlenmeyer 100 mg de (Z)-38 e, em outro erlenmeyer, 100 mg de (Z)-39, em ambos foi acrescentado 1 mL de líquido iônico e homogeneizou-se a mistura resultante por agitação. Em seguida, foi adicionado 100 mL de água, deixando-os sob agitação orbital por 24 h a 30 °C, seguido assim as condições aplicadas nas biorreduções. Após esse período, retirou-se uma alíquota da fase aquosa, que foi diluída 5 vezes na proporção 1:1 em água, obtendo para (Z)-38 Abs = 0,573 e para (Z)-39 Abs = 0,810. De acordo com as curvas de calibração obtidas, tem-se 0,24 mg/mL de (Z)-38 e 0,28 mg/mL de (Z)-39 no meio aquoso. Comparando-se esses valores com as concentrações iniciais dos substratos nos experimentos de biorredução de (Z)-38 [1 mg/mL] e (Z)-39 [1 mg/mL], verifica-se que há uma redução de pouco mais que 4 vezes nas concentrações iniciais dos substratos quando se utiliza o sistema bifásico. Aplicando-se esses valores na fórmula da constante de partição (Figura 36), obtém-se $K_{(Z)-38} = 316$ e $K_{(Z)-39} = 257$, o que implica em $\log P_{(Z)-38} = 2,50$ e $\log P_{(Z)-39} = 2,41$. Estes valores de $\log P$ estão coerentes com os encontrados com os substratos orgânicos clorados.⁵²

⁵² Pfruender, H., Amidjojo, M., Kragl, U. e Weuster-Botz, D. *Angew. Chem. Int., Ed.*, **2004**, 43, 4529–4531.

$$K_{\text{subs}} = \frac{[\text{subs}]_{\text{LI}}}{[\text{subs}]_{\text{H}_2\text{O}}}$$

Figura 36. Constante de partição para os substratos.

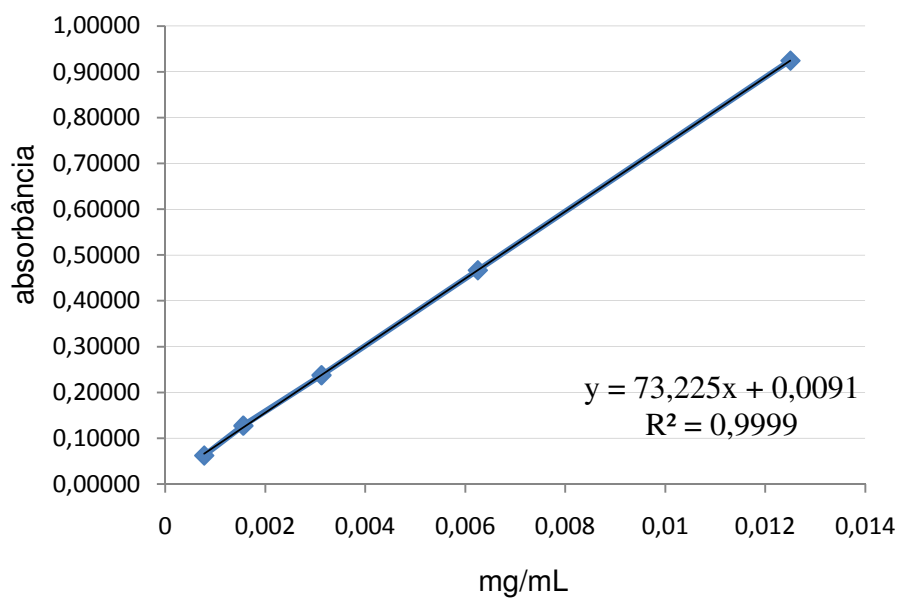


Figura 37. Absorvância *versus* concentração de (Z)-3-bromo-4-fenil-3-buten-2-ona.

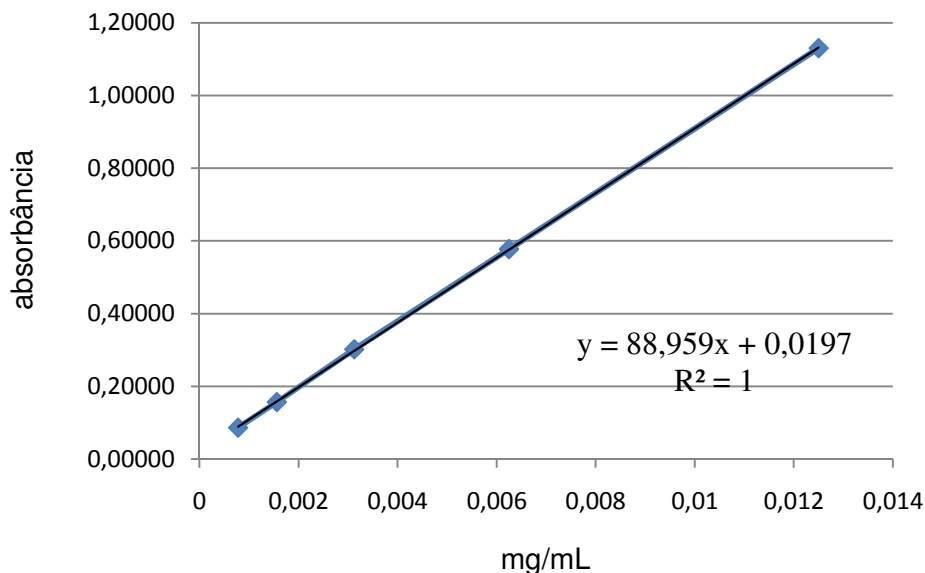


Figura 38. Absorvância *versus* concentração de (Z)-3-cloro-4-fenil-3-buten-2-ona.

3.2.7. Teste para verificar a existência de oxidoredutases extra celulares

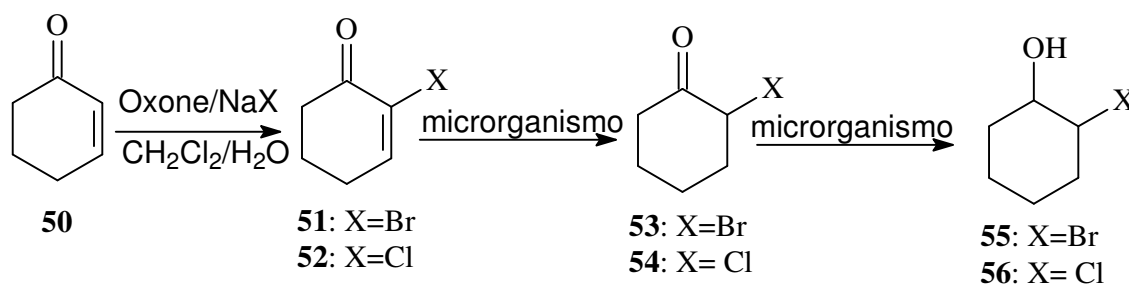
O crescimento celular dos microrganismos (*S. cerevisiae* e *P. stipitis*) foi realizado como descrito no item 4.5., p. 93, em seguida o meio celular foi centrifugado a 5000 rpm por 15 minutos a 18 °C. Depois, 20 mg de (Z)-**38** foi adicionado em 20 mL do sobrenadante em um erlenmeyer e, em outro erlenmeyer, o mesmo experimento foi feito com (Z)-**39**. A mistura reacional foi deixada sob agitação orbital a 30 °C e aliquotas foram retiradas em 24, 48 e 72 horas. Após análise por CG/EM foi observada a presença do substrato inalterado.

As células úmidas (2 g) foram resuspendidas em 20 mL de água destilada e 20 mg dos substratos foram adicionados. Após 24 horas as correspondentes haloidrinas foram produzidas. Conclui-se com estes testes que as oxidoredutases responsáveis pelas reações de reduções estão intracelulares.

3.2.8. Biorreduções de α -halocicloexenonas utilizando fermento de pão, *Rhodotorula glutinis* e *Pichia stipitis* como biocatalisadores

As halocicloexenonas **51** e **52** foram preparadas a partir da 2-cicloexen-1-ona **50**, utilizando Oxone® como sal oxidante, NaX como fonte de brometo ou cloreto, dependendo do sal empregado, e o rendimento das reações foram em torno de 87 %.

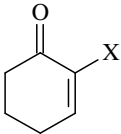
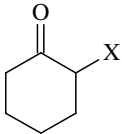
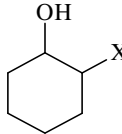
As biorreduções foram feitas com 20 mg dos substratos **51** e **52**, com e sem a presença de líquido iônico, em 20 mL do meio com as células em suspensão (Esquema 15). O tempo de reação para o fermento de pão como biocatalisador foi de 30 minutos a 30 °C e, para os biocatalisadores *R. glutinis* e *P. stipitis*, foi de 24 horas.



Esquema 15. Preparação e biorredução das halocicloexenonas.

Os resultados das biorreduções com 2-bromo-2-cicloexen-1-ona **51** e 2-cloro-2-cicloexen-1-ona **52** estão apresentados na Tabela 13.

Tabela 13. Porcentagem de reagente e produtos nas biorreduções de **51** e **52** utilizando *R. glutinis*, *P. stipitis* e fermento de pão.

microrganismos	sistema						
		(Br)	(Cl)	(Br)	(Cl)	(Br)	(Cl)
		51 (%) ^a	52 (%) ^a	53 (%) ^a	54 (%) ^a	55 (%) ^a	56 (%) ^a
<i>R. glutinis</i> ^b CCT 0783	sem LI	63	65	7	10	19	16
	com LI	10	49	8	6	59	32
<i>P. stipitis</i> ^b CCT 2617	sem LI	93	90	ND	ND	ND	ND
	com LI	79	98	5	2	ND	ND
Fermento de pão ^c	sem LI	ND	ND	ND	2	99	89
	com LI	ND	ND	ND	ND	ND	ND

^aConversão determinada pelas áreas relativas observadas por CG/EM; ^btempo de reação 24 h; ^ctempo de reação 30 min; ND = não detectado.

Nas biorreduções com *R. glutinis*, na presença de líquido iônico, foi observada a formação das ciclohaloidrinas **55** e **56** com 59 % e 32 % de conversão, respectivamente, enquanto que, nas biorreduções utilizando *P. stipitis* em sistema bifásico foi observado apenas a formação de ciclohalocetonas, em pequenas quantidades. Para as reduções utilizando fermento de pão, foram observadas as ciclohaloidrinas **55** com 99 % de conversão e **56** com 98 % de conversão. Portanto, o biocatalisador mais eficiente para redução completa das halocicloenonas **51** e **52**, produzindo as respectivas ciclohaloidrinas **55** e **56**, é o fermento de pão.

3.2.9. Biorreduções de α -halociclopentenonas utilizando fermento de pão, *Rhodotorula glutinis* e *Pichia stipitis* como biocatalisadores

As halocicloexenonas **58** e **59** foram preparadas a partir da ciclopentenona **57**, utilizando Oxone® como sal oxidante, NaX como fonte de brometo ou cloreto,

dependendo do sal empregado, e o rendimento das reações foram em torno de 92%.

As biorreduções foram feitas com 20 mg dos substratos **58** e **59**, com e sem presença de líquido iônico, em 20 mL do meio com as células em suspensão (Esquema 16). O tempo de reação para o fermento de pão como biocatalisador foi de 30 minutos a 30 °C e, para os biocatalisadores *R. glutinis* e *P. stipitis*, foi de 24 horas. Os resultados podem ser vistos na Tabela 14.

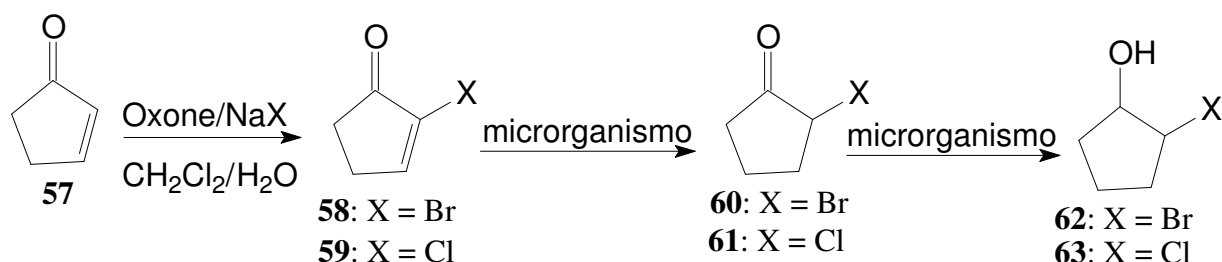


Tabela 14. Porcentagem de reagente e produtos nas biorreduções de **58** e **59** utilizando *R. glutinis*, *P. stipitis* e fermento de pão.

microrganismos	sistema						
		(Br)	(Cl)	(Br)	(Cl)	(Br)	(Cl)
		58 (%)^a	59 (%)^a	60 (%)^a	61 (%)^a	62 (%)^a	63 (%)^a
<i>R. glutinis</i> CCT 0783	sem LI	59	63	11	8	28	23
	com LI	43	39	7	24	47	28
<i>P. stipitis</i> CCT 2617	sem LI	90	89	ND	ND	ND	ND
	com LI	73	95	10	5	7	ND
Fermento de pão	sem LI	ND	ND	ND	2	99	91
	com LI	ND	ND	ND	ND	ND	ND

^aConversão determinada pelas áreas relativas observadas por CG/EM; ^btempo de reação 24 h; ^ctempo de reação 30 min; ND = não detectado.

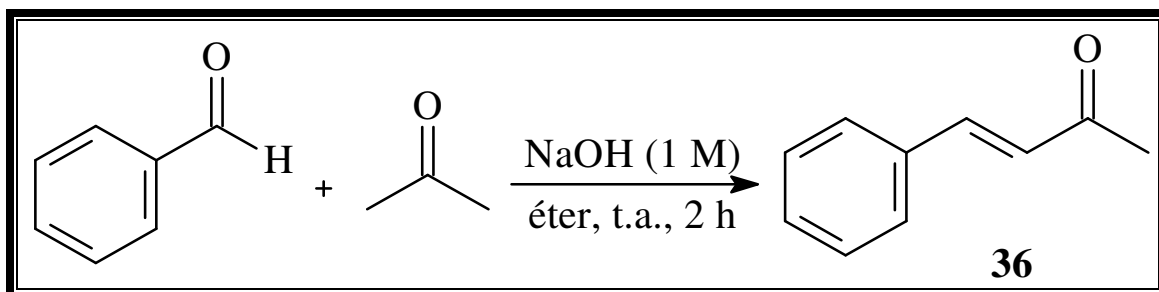
Nas biorreduções utilizando fermento de pão foi observada, por CG/EM, a formação das ciclohaloidrinas **58** com 99 % de conversão e **59** com 91 %, após apenas 30 minutos de reação. Já nas reações com fermento de pão em sistema bifásico, em apenas 10 minutos já não se observava as ciclohaloidrinas nem tão pouco o substrato, obtendo-se vários subprodutos da provável degradação dos mesmos. Para a bio-redução utilizando *R. glutinis* observou-se, por CG/EM, a formação das ciclohaloidrinas **58** com 28 % de conversão e **59** com 23 %. Nas reações com *R. glutinis* em sistema bifásico foram observadas as ciclohaloidrinas **58** com 47 % de conversão e **59** com 28 %. No caso das biorreduções utilizando *P. stipitis*, apenas naquelas realizadas em sistema bifásico foi observada a formação das ciclohalocetonas **60** e **61**, obtendo-se também a ciclohaloidrina **62**, com 7 % de conversão. Portanto, o biocatalisador mais eficiente para a redução completa das halocicloenonas **58** e **59**, produzindo as respectivas ciclohaloidrinas **62** e **63**, é o fermento de pão.

EXPERIMENTAL

4. Experimental

4.1. Preparação dos substratos

4.1.1. Preparação de 4-fenil-3-buten-2-ona

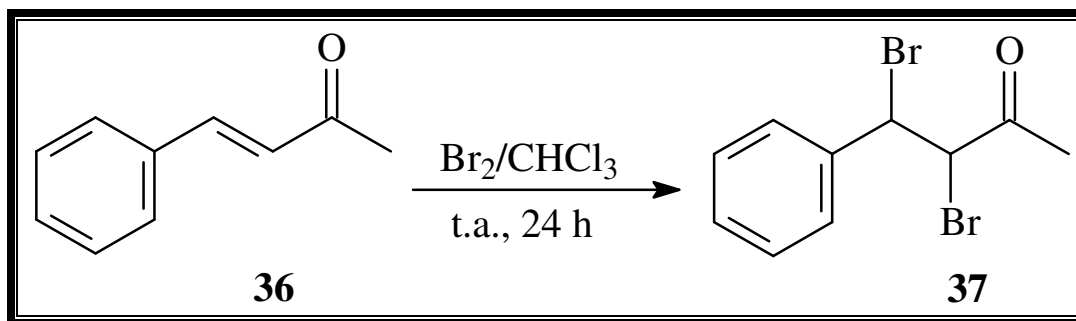


Esquema 17. Preparação da 4-fenil-3-buten-2-ona **36**.

Em um balão de 250 mL foram pesados 42,2 g (0,4 mol) de benzaldeído e 63,8 g (1,1 mol) de acetona. O balão foi colocado em banho de gelo por 30 minutos sob agitação magnética a 0 °C e, logo em seguida, foi adicionado 50 mL de NaOH 1 M, com um funil de adição. A mistura resultante foi mantida sob agitação à temperatura ambiente por 2 horas, observando-se o surgimento da coloração amarela. A mistura reacional foi neutralizada com adição de HCl (5%) e o produto foi extraído com CH₂Cl₂. A fase orgânica foi seca com Na₂SO₄ e o solvente evaporado. O produto foi purificado por recristalização, obtendo-se 125,5 g do produto, com 86% rendimento.

Fórmula molecular: C₁₀H₁₀O; sólido amarelo palha; p.f. 39 °C; CG/EM (IE, 70 eV) m/z (int. relativa): 51 (13); 63 (5); 77 (36); 103 (87); 131 (100); 146 (M⁺, 66); IV (NaCl): 3058; 3000; 1682; 1605; 1576; 1496; 1452; 1418; 1361; 1257; 1192; 985; 549 cm⁻¹; RMN ¹H (CDCl₃, 250 MHz): 2,38 (s, 3H); 6,72 (d, 1H, *J* = 16 Hz); 7,51 (d, 1H, *J* = 16 Hz); 7,38-7,56 (m, 5H) ppm; RMN ¹³C (CDCl₃, 62.5 MHz): 27,51; 127,15; 128,25; 128,96; 130,51; 134,40; 143,44; 198,41 ppm.

4.1.2. Preparação do 3,4-dibromo-4-fenil-2-butanona

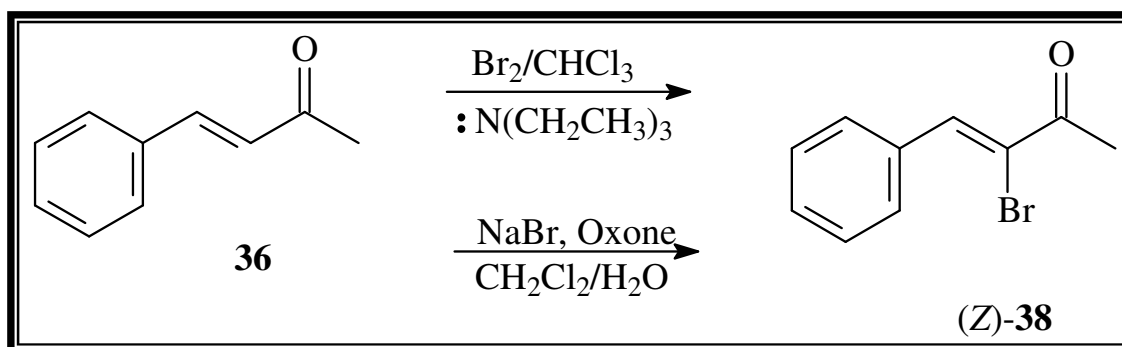


Esquema 18. Preparação do 3,4-dibromo-4-fenil-2-butanona **37**.

Em um balão de 50 mL contendo 1 g (6,8 mmol) de benzalacetona em 5 mL de diclorometano a 10 °C, foi adicionado, lentamente, 2,2 g (27,8 mmol) de Br_2 em 2 mL de diclorometano através de um funil de adição, sob agitação magnética. A solução resultante ficou sob agitação magnética por 24 h. A mistura reacional foi tratada com solução diluída de tiosulfato de sódio e o produto foi extraído com diclorometano. A fase orgânica foi seca com Na_2SO_4 e o solvente foi evaporado. O produto foi purificado por cromatografia em coluna com sílica gel usando como eluente AcOEt/hexano (2:8), obtendo-se 0,8 g do produto, com 80 % de rendimento.

Fórmula Molecular: $\text{C}_{10}\text{H}_{10}\text{BrO}$; sólido branco; p.f. 120 °C; CG/EM (IE, 70 eV) m/z (int. relativa): 51 (1); 77 (18); 91 (38); 104 (35); 117 (15); 131 (7); 145 (20); 224 (M^+ , 98) 226 (97); IV (KBr): 2992; 2903; 1950; 1721; 1494; 1455; 1428; 1376; 1359; 1255; 1206; 1137; 1061; 960; 875; 691; 604 cm^{-1} ; RMN ^1H (250 MHz, CDCl_3): 2,47 (s, 3H); 4,92 (d, 1H, $J = 11$ Hz); 5,31 (d, 1H, $J = 11$ Hz); 7,36-7,31 (m, 5H) ppm; RMN ^{13}C (62.5 MHz, CDCl_3): 26,94; 49,48; 52,79; 128,11; 128,89; 129,35; 137,76; 198,35 ppm.

4.1.3. Preparação do (Z)-3-bromo-4-fenil-3-buten-2-ona



Esquema 19. Preparação do (Z)-3-bromo-4-fenil-3-buten-2-ona **38**.

4.1.3.1. Método A

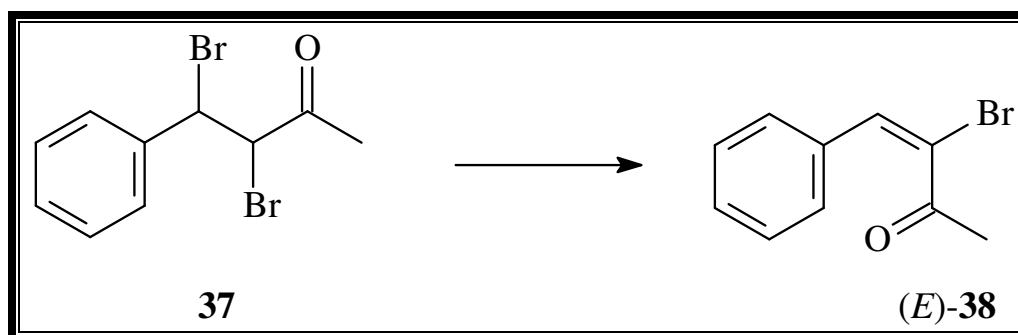
Em um banho de gelo foi colocado um balão de 50 mL, com 1 g (6,8 mmol) da benzalacetona em 10 mL clorofórmio e, então, foram adicionados lentamente, e sob agitação magnética 1,6 mL (5g, 63,2 mmol) de Br_2 . A solução resultante foi deixada sob agitação à temperatura ambiente por 1 h. Em seguida, 5 g (49,5 mmol) de trietilamina foram adicionados à mistura reacional, observando-se a formação de um precipitado, que foi removido por filtração. O filtrado foi lavado com uma solução diluída de ácido clorídrico, até pH 7, a fase orgânica foi seca com Na_2SO_4 e o solvente foi evaporado. O produto foi analisado por cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massas e foi purificado por cromatografia em coluna com sílica gel, utilizando como eluente AcOEt/hexano (1:9), obtendo-se 0,8 g do produto, com 80 % de rendimento.

Fórmula molecular: $\text{C}_{10}\text{H}_9\text{BrO}$; óleo amarelo; CG/EM (IE, 70 eV) m/z (int. relativa): 51 (23); 63 (13); 77 (23); 102 (98); 145 (100); 181 (10); 183 (9); 210 (9); 212 (8); 224 (M^+ , 53); 226 (52); IV (NaCl): 2922; 2855; 1685; 1602; 1480; 1446; 1356; 1219; 1171; 755; 691 cm^{-1} ; RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3): 2,60 (s, 1H); 7,43 - 7,45 (m, 3H); 7,85 - 7,87 (m, 2H); 8,03 (s, 1H) ppm; RMN ^{13}C (62.5 MHz, CDCl_3): 27,02; 123,25; 128,50; 130,42; 130,47; 133,71; 139,92; 193,13 ppm.

4.1.3.2. Método B

Em um balão de 250 mL, imerso em um banho de gelo, foi colocada uma mistura de 102 mL de diclorometano e 20 mL de água, sob agitação magnética. Em seguida, 4,1 g (40 mmol) de NaBr e 25,24 g (40 mmol) de Oxone® foram adicionados, mantendo a agitação por 40 minutos. Em seguida, 3 g (20 mmol) da enona **36** foram adicionados, durante 10 minutos, e a mistura foi deixada sob agitação à temperatura ambiente por 4 h. Após esse período, adicionou-se, com auxílio de um funil de adição, 8,6 mL (30 mmol) de trietilamina e a mistura racional permaneceu sob agitação magnética por mais 1 h. A mistura foi neutralizada com HCl (1M) e a fase aquosa foi extraída com diclorometano e seca com Na₂SO₄ e solvente foi evaporado. O produto foi purificado por cromatografia em coluna com sílica gel, utilizando como eluente AcOEt/hexano (1:9), obtendo-se o produto com 90 % de rendimento. Os espectros de CG/EM, IV, RMN ¹H e RMN ¹³C são semelhantes aos obtidos no método A, indicando a formação do diastereoisômero (*Z*)-**38**, conforme descrito no item 4.1.3.1.

4.1.4. Preparação do (*E*)-3-bromo-4-fenil-3-buten-2-ona



Esquema 20. Preparação do (*E*)-3-bromo-4-fenil-3-buten-2-ona.

4.1.4.1. Método A

Em um balão de 500 mL foram colocados 200 mL de DMF que foi previamente seco, com peneira molecular 4A por 24 horas. Foi acrescentado

0,304 g (1 mmol) de 3,4-dibromo-4-fenil-2-butanona **37** e 0,164 g (2 mmol) de acetato de sódio e a mistura resultante foi deixada sob agitação magnética à temperatura ambiente por 24 horas. Após esse período, a mistura resultante foi tratada com água e éter, lavando-se a fase orgânica exaustivamente com água, para retirar o DMF. A fase orgânica foi seca com Na₂SO₄ e evaporada, obtendo-se 0,290 g (0,95 mmol) do produto, com 95 % de rendimento. O produto foi analisado por cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massas e observou-se a formação do diastereoisômero (*Z*)-**38**, conforme o item 4.1.3.1.

4.1.4.2. Método B

Em um balão de 50 mL com duas bocas foi acrescentado 0,164 g (2 mmol) de acetato de sódio diluído em 3 mL de etanol. Com auxílio de um funil de adição foi adicionado 0,304 g (1 mmol) do substrato, diluído em 2 mL de etanol. O substrato foi adicionado lentamente e a reação foi deixada em refluxo por 1 hora. Após esse período, a mistura resultante foi neutralizada com HCl 5% e o produto foi extraído com acetato de etila. O produto foi analisado por cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massas e observou-se que o produto formado, com 90 % de rendimento, foi o diastereoisômero (*Z*)-**38**, conforme o item 4.1.3.1.

4.1.4.3. Método C

Em um balão de 50 mL com duas bocas foi acrescentado 0,316 g (3,86 mmol) de acetato de sódio e 0,164 g (2 mmol) de ácido acético diluído em 2 mL de etanol. Com auxílio de um funil de adição foi colocado 0,99 g (3,28 mmol) do substrato, diluído em 4 mL de etanol. O substrato foi adicionado lentamente e a reação foi deixada em refluxo por 30 minutos. A mistura resultante foi tratada com uma solução diluída de bicarbonato de sódio e o produto foi extraído com acetato de etila, sendo analisado por cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massas, observando-se que o produto formado foi o diastereoisômero (*Z*)-**38**, com 85 % de rendimento, conforme o item 4.1.3.1.

4.1.4.4. Método D

Em um balão de 50 mL com duas bocas acrescentou-se 3,86 mmol de acetato de sódio, 3,86 mmol de ácido acético e 3,28 mmol do substrato. A reação foi deixada em refluxo por 20 minutos. Após esse tempo, a mistura resultante foi tratada com uma solução diluída de bicarbonato de sódio e o produto foi extraído com acetato de etila, sendo analisado por cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massas. Observou-se que o diastereoisômero (*E*)-**38** foi formado com 15 % de conversão do diastereoisômero (*Z*)-**38** foi formado com 30 % de conversão e 55 % do substrato foi recuperado.

4.1.4.5. Método E

Em um balão de 500 mL foram colocados 200 mL de DMF que foi seco com peneira molecular 4A por 24 horas. Em seguida, foi acrescentado 0,304 g (1 mmol) de 3,4-dibromo-4-fenil-2-butanona **37** e 0,164 g (2 mmol) de acetato de sódio e a mistura reacional foi deixada sob agitação magnética, à temperatura ambiente, por 24 horas. Após esse período, retirou-se uma alíquota, realizando uma extração da mistura com água-éter, lavando a fase orgânica com água para retirar o DMF e então a fase orgânica foi seca com Na₂SO₄ e evaporada. Na análise por cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massas observou-se a formação de (*E*)-**38**, com 74 % e (*Z*)-**38** com 26 % de conversão (Figura 39). Entretanto, após o tratamento da mistura reacional e a purificação por cromatografia em coluna utilizando sílica gel e AcOEt/hexano (2:8), verificou-se por RMN ¹H a presença somente do diastereoisômero (*Z*)-**38**, confirmando a isomerização total do diastereoisômero (*E*)-**38** que foi observado anteriormente por CG/EM, conforme os dados espectrais do item 4.1.3.1.

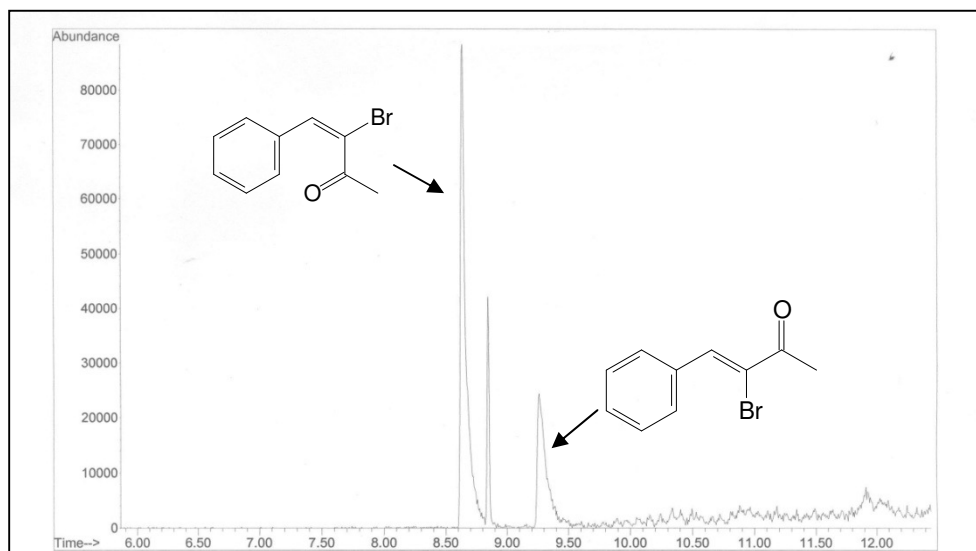


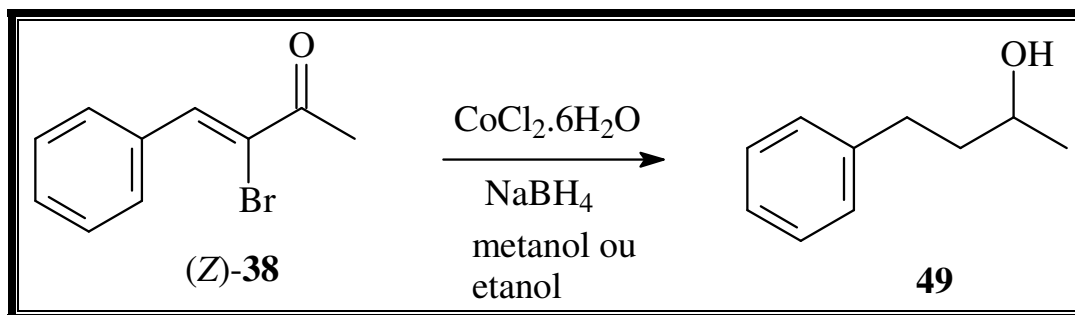
Figura 39. Cromatograma da mistura de diastereoisômeros (*Z*)-**38** e (*E*)-**38**, obtidos por CG/EM, conforme condições descritas no item 4.15.2.1.

4.1.4.6. Método G

Em um balão de 500 mL foram colocados 200 mL de DMF que foi seco previamente com peneira molecular 4A por 24 horas. Em seguida, foi acrescentado 0,304 g (1 mmol) de 3,4-dibromo-4-fenil-2-butanona **37** e 0,656 g (4 mmol) de acetato de sódio e a mistura resultante foi deixada sob agitação magnética em um banho de gelo a 5°C por 6 horas. Após esse período, a mistura reacional foi tratada com água e éter, lavando-se a fase orgânica exaustivamente com água para retirar o DMF. A fase orgânica foi seca com Na₂SO₄ e evaporada. O produto foi analisado por cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massas e observou-se o (*E*)-**38** com 17 % e o (*Z*)-**38** com 83 % de conversão.

4.1.5. Propostas para preparação do 3-bromo-4-fenil-3-butanona

4.1.5.1. Hidrogenação utilizando cloreto de cobalto



Esquema 21. Hidrogenação do (Z)-3-bromo-4-fenil-3-buten-2-ona utilizando cloreto de cobalto.

Em um balão de 50 mL foram adicionados 200 mg (893 μmol) do (Z)-3-bromo-4-fenil-3-buten-2-ona **38** e 41 mg (177 μmol) de $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ em 10 mL de metanol ou etanol. A mistura reacional foi deixada sob agitação magnética por 15 minutos à temperatura ambiente. Após esse período, foi acrescentado 135 mg (3,5 mmol) boroidreto, deixando-se a mistura reacional sob agitação magnética por mais 10 minutos e, em seguida, foi adicionado 17 mL de água destilada. O produto foi extraído com 3 x 17 mL de diclorometano, a fase orgânica foi seca com Na_2SO_4 e o solvente foi evaporado. A análise foi realizada por cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massas, identificando o produto como 4-fenil-2-butanol.

Fórmula molecular: $\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{O}$; óleo incolor; 51(9); 65 (12); 78 (23); 91 (83); 105 (12); 117 (100); 132 (51); 150 (M^+ (9); IV (NaCl): 3363; 3084; 3061; 3026; 2966; 2927; 2860; 1603; 1584; 1495 cm^{-1} ; RMN ^1H (250 MHz, CDCl_3): 1,23 (d, 3H, $J = 12$ Hz); 1,79 (t, 2H, $J_1 = 6,7$ Hz); 2,72 (m, 2H); 3,71 (q, 1H, $J_1 = 14$ Hz); 7,15 - 7,31 (m, 5H) ppm; RMN ^{13}C (62.5 MHz, CDCl_3): 18,39; 23,59; 32,11; 67,49; 125,80; 128,31; 128,43; 142,04 ppm.

4.1.5.2. Hidrogenação utilizando éster de Hantzsch

Em um balão de fundo redondo de 50 mL foram adicionados 0,33 mol de (Z)-3-bromo-4-fenil-3-buten-2-ona **38**, 1,2 mol do éster de Hantzsch e 10 % mol de prolina (quando adicionada), com ou sem atmosfera inerte. A mistura foi deixada sob agitação por 72 horas e alíquotas foram retiradas de 24 em 24 horas. Após análise por cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massas foi verificada a recuperação do substrato inalterado.

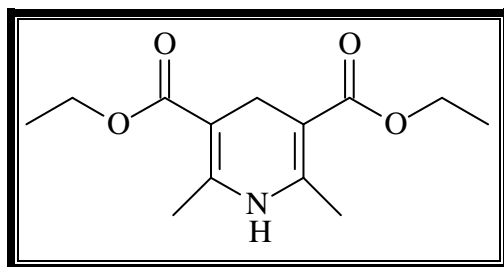
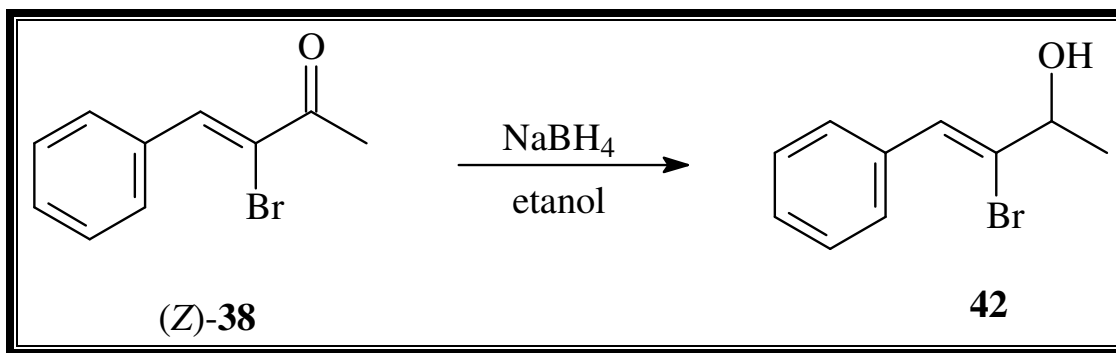


Figura 40. Éster de Hantzsch utilizado.

4.1.6. Preparação do (Z)-3-bromo-4-fenil-3-buten-2-ol

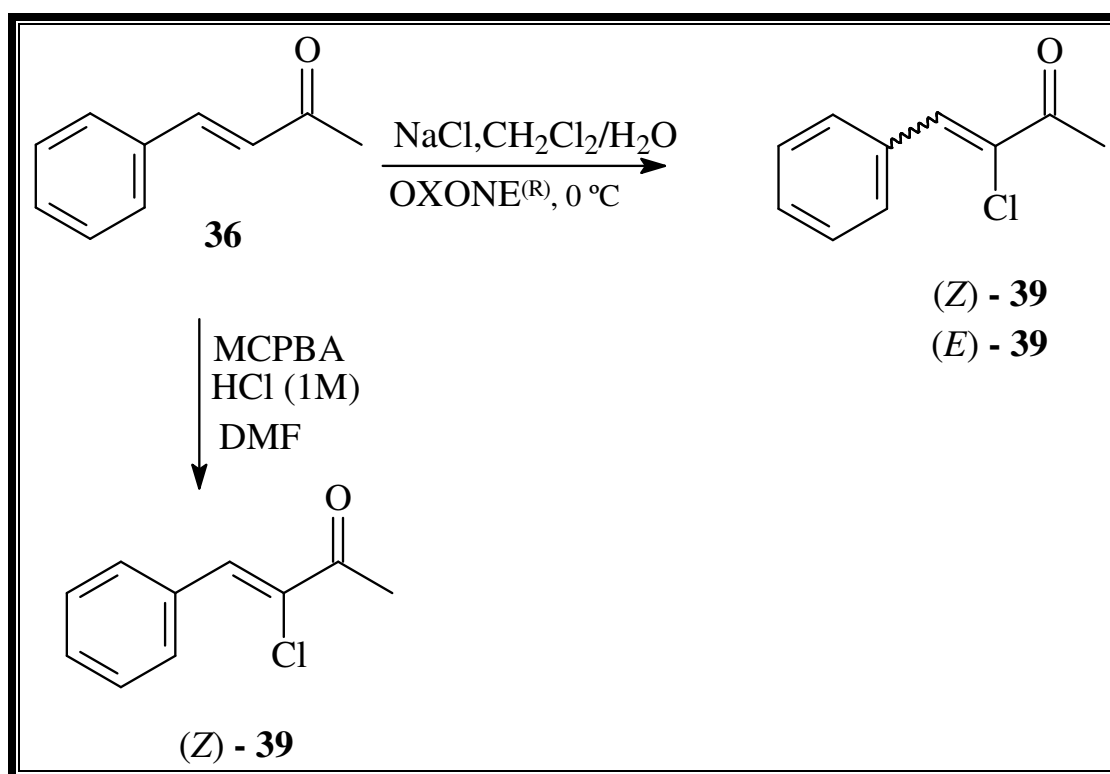


Esquema 22. Preparação do (Z)-3-bromo-4-fenil-3-buten-2-ol **42**.

Em um balão de 50 mL, imerso em um banho de gelo, adicionou-se 0,0126 g (3.3 mmol) de NaBH_4 em 10 mL de etanol. Em seguida, 1 g (6,8 mmol) de (Z)-**38** foi adicionado e a mistura reacional foi deixada sob agitação magnética por 5 h. Solução aquosa de HCl (5%) foi adicionada até neutralizar a mistura reacional. Em seguida a fase orgânica foi seca com Na_2SO_4 e o solvente foi evaporado, obtendo-se 0,95 g do produto, com 95 % de rendimento.

Fórmula molecular: $C_{10}H_{11}BrO$; óleo incolor; CG/EM (IE, 70 eV) m/z (int. relativa): 43 (14); 63 (6); 77 (21); 91 (7); 103 (28); 115 (11); 129 (45); 147 (100); 193(7); 210 (6); 226 (M^{+} , 18); 228 (17); IV (NaCl): 3402; 2923; 2851; 1645; 1446; 1371; 1255; 1133; 1075; 872; 752; 694 cm^{-1} ; RMN 1H (250 MHz, $CDCl_3$): 1,48 (d, 3H, $J = 6$ Hz); 4,50 (q, 1H, $J_1 = 6$ Hz); 7,07 (s, 1H); 7,30 – 7,62 (m, 5H) ppm; RMN ^{13}C (62.5 MHz, $CDCl_3$): 22,48; 73,50; 126,95; 128,27; 128,59; 129,09; 131,39; 135,07 ppm.

4.1.7. Preparação do (Z/E)-3-cloro-4-fenil-3-buten-2-ona



Esquema 23. Preparação do (Z/E)-3-cloro-4-fenil-3-buten-2-ona **39**.

4.1.7.1. Método A

Em um balão de 250 mL, imerso em um banho de gelo, foram colocados uma mistura de 102 mL de diclorometano e 20 mL de água, sob agitação magnética. Foram adicionados 2,4 g (40 mmol) de NaBr e 25,24 g (40 mmol) de

Oxone® , mantendo-se a agitação magnética por 40 minutos. Em seguida, 3 g (20 mmol) da enona **36** foram adicionados, durante 10 minutos, e a mistura foi deixada sob agitação à temperatura ambiente por 4 h. Após esse período, com auxílio de um funil de adição, adicionou-se 8,6 mL (30 mmol) de trietilamina e a mistura reacional permaneceu sob agitação magnética por mais 1 h. Em seguida, a mistura foi neutralizada com HCl (1M), extraída com diclorometano e seca com Na₂SO₄, sendo o solvente evaporado. Os produtos foram purificados por cromatografia de camada delgada preparativa (CCDP) em sílica gel com 10 % de AgNO₃, utilizando como eluente AcOEt/hexano (1:9) e obteve-se 75 % do diastereoisômero (*Z*)-**39**, além de 15 % do diastereoisômero (*E*)-**39**.

Diastereoisômero (*Z*)-**39**:

Fórmula molecular: C₁₀H₉ClO; óleo verde claro; CG/EM (IE, 70eV) m/z (int. relativa): t.r. 8.1 minutos; 51 (14); 63 (6); 75 (15); 102 (55); 115 (5); 129 (20); 137 (24); 145 (28); 165 (25); 179 (M⁺, 99); 181 (39). IV (NaCl) 3353; 3055; 2928; 1686; 1596; 1573; 1491; 1447; 1359; 756; 690 cm⁻¹; RMN ¹H (250 MHz, CDCl₃): 2,56 (s, 3H); 7,41 – 7,43 (m, 3H); 7,75 (s, 1H); 7,83 – 7,87 (m, 2H); RMN ¹³C (62.5 MHz, CDCl₃): 26,8; 128,6; 130,1; 130,3; 130,8; 132,7; 135,6; 193,3 ppm;

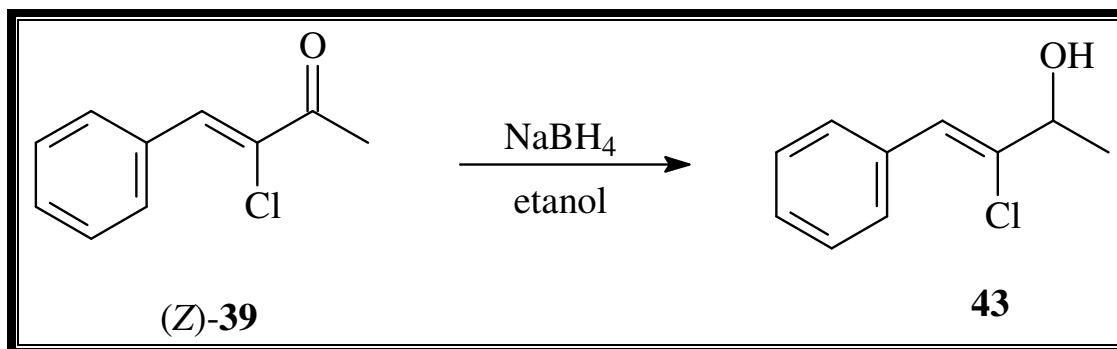
Diastereoisômero (*E*)-**39**:

Fórmula molecular: C₁₀H₉ClO; óleo verde claro, CG/EM (IE, 70eV) m/z (int. relativa): t.r. 7.5 minutos; 51 (25); 63 (5); 75 (12); 102 (38); 115 (9); 129 (16); 145 (22); 165 (25); 179 (M⁺, 99); 181 (39); IV (NaCl) 3353; 3055; 2928; 1686; 1596; 1573; 1491; 1447; 1359; 756; 690 cm⁻¹; RMN ¹H (250 MHz, CDCl₃): 2,27 (s, 3H); 7,17 (s, 1H); 7,27 – 7,37 (m, 5H) ppm; RMN ¹³C (62.5 MHz, CDCl₃): 29,3; 128,6; 128,6; 128,6; 130,5; 133,7; 135,0; 196,4 ppm.

4.1.7.2. Método B

Em um balão de 100 mL, imerso em um banho de gelo, foram colocados 15 mL de HCl (1M) em 50 mL de DMF e 2,58 g (15 mmol) de MCPBA. A mistura reacional foi deixada sob agitação magnética por 6 minutos. Após, 1,46 g (10 mmol) de benzalacetona foram adicionados e a mistura reacional permaneceu sob agitação por 30 minutos. Em seguida, foi adicionada uma solução 1M de bicarbonato de sódio até pH 7 e extraiu-se o produto com éter etílico. Após análise por cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massas, foi observada somente a formação de (Z)-**39**.

4.1.8. Preparação do (Z)-3-cloro-4-fenil-3-buten-2-ol



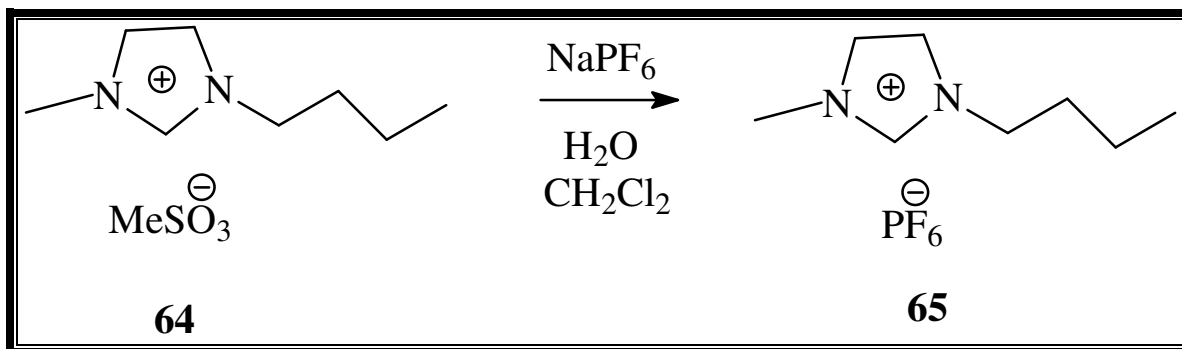
Esquema 24. Preparação do (Z)-3-cloro-4-fenil-3-buten-2-ol **43**.

Em um balão de 50 mL, imerso em um banho de gelo, adicionou-se 0,0126 g (3.3 mmol) de NaBH₄ em 10 mL de etanol. Em seguida, 1 g (5,5 mmol) de (Z)-**39** foi adicionado e a mistura reacional foi deixada sob agitação magnética por 5 h. Solução aquosa de HCl (5%) foi adicionada até neutralizar a mistura reacional. A fase orgânica foi seca com Na₂SO₄ e o solvente foi evaporado, obtendo-se 0,95 g do produto, com 95 % de rendimento.

Fórmula molecular: C₁₀H₁₁BrO; óleo incolor; CG/EM (IE, 70 eV) m/z (int. relativa): 43 (11); 63 (7); 77 (24); 91 (9); 103 (47); 115 (11); 131 (58); 147 (100); 167 (16); 182 (M⁺, 43); 184 (13); IV (NaCl): 3417; 2922; 1737; 1638; 1553; 1466; 1377; 1265; 1179 cm⁻¹; RMN ¹H (250 MHz, CDCl₃): 1,49 (d, 3H, J = 5,7 Hz); 4,54 (q, 1H,

$J_1 = 6$ Hz); 6,78 (s, 1H); 7,29 – 7,64 (m, 5H) ppm; RMN ^{13}C (62.5 MHz, CDCl_3): 21,73; 72,37; 123,75; 128,23; 128,44; 129,24 134,20; 137,05 ppm.

4.1.9. Preparação do hexafluorofosfato de 1-butil-3-metilimidazólio [BMIM][PF₆]

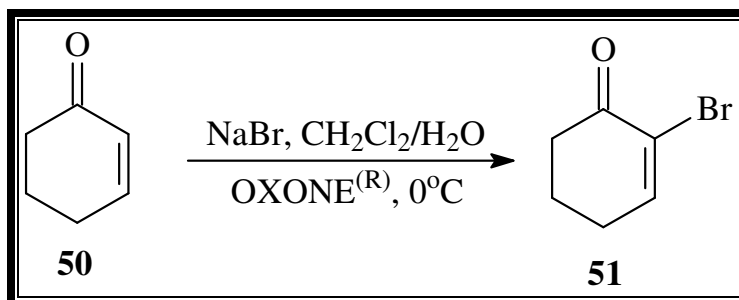


Esquema 25. Preparação do hexafluorofosfato de 1-butil-3-etilimidazólio **65**.

Uma mistura de metanosulfato de 1-butil-3-metilimidazólio 109,9 g (470 mmol), hexafluorofosfato de potássio 90,7 g (493 mmol) e água destilada foi agitada vigorosamente por 30 minutos. A parte superior (fase aquosa) foi separada e descartada. Adicionou-se mais 4,3 g (23 mmol) de hexafluorofosfato de potássio e 40 mL de água destilada e a mistura foi deixada sob agitação magnética por mais 15 minutos. Após esse período, descartou-se a fase aquosa e 100 mL de diclorometano foi adicionado à fase orgânica, que foi seca com Na_2SO_4 e, em seguida, filtrada em uma coluna de alumina básica. O solvente foi evaporado e o líquido iônico foi obtido, produzindo 126,9 g, com 95 % de rendimento.

Fórmula molecular: $[\text{C}_8\text{H}_{12}\text{N}_2][\text{PF}_6]$; líquido viscoso amarelo pardo; RMN ^1H (250 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): 0,87 (t, 3H, $J = 7$ Hz); 1,26 (m, 2H); 1,74 (m, 2H); 3,82 (s, 3H); 4,12 (t, 2H, $J = 7$ Hz); 7, 67 (d, 1H, $J = 1,6$ Hz); 7,51 (d, 1H, $J = 1,7$ Hz); 9,07 (s, 1H) ppm; RMN ^{13}C (62.5 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): 13,23; 18,75; 31,32; 35,71; 48,50; 122,24; 123,59; 136,47 ppm.

4.1.10. Preparação do 2-bromo-2-cicloexen-1-ona

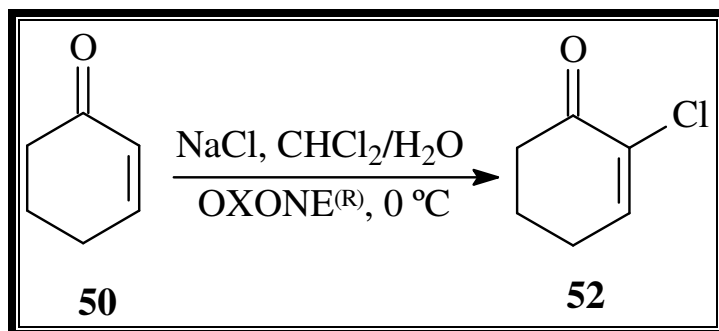


Esquema 26. Preparação do 2-bromo-2-cicloexen-1-ona **51**.

Em um balão de 500 mL, imerso em um banho de gelo, foram colocados 150 mL de diclorometano e 30 mL de água, sendo a mistura deixada sob agitação magnética. Adicionou-se 6,21 g (60 mmol) de NaBr e 36,38 (60 mmol) g de Oxone®, mantendo a agitação por 40 minutos. Em seguida, 5,22 g (30 mmol) da enona **50** foram adicionados durante 10 minutos e a mistura foi deixada sob agitação à temperatura ambiente por 4 h. Após esse período, com auxílio de um funil de adição, adicionou-se 12,6 mL (450 mmol) de trietilamina e a mistura racional permaneceu sob agitação magnética por mais 1 h. Em seguida, a mistura foi neutralizada com HCl (1M) e a fase aquosa foi extraída com diclorometano, que foi seco com sulfato de sódio e o solvente foi evaporado. O produto foi analisado por cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massas, verificando-se que o produto obtido foi o 2-bromo-2-cicloexen-1-ona **51** com 97 % de conversão. A purificação foi realizada por cromatografia em coluna (CC) de sílica gel, utilizando como eluente AcOEt/hexano (3:7), obtendo-se 5,0 g de 2-bromo-2-cicloexen-1-ona **51**.

Fórmula molecular: C₆H₇BrO; sólido marron; p.f. 62 °C; CG/EM (IE, 70 eV) m/z (int. relativa): 55 (34); 67 (83); 95 (12); 107 (5); 118 (35); 132 (25); 146 (100); 174 (M⁺, 99); 176 (98); IV (KBr): 3039; 2941; 2871; 1682; 1597; 1457; 1424; 1407; 1342; 1316; 1158; 1124; 520 cm⁻¹; RMN ¹H (250 MHz, CDCl₃): 2,08 (m, 2H); 2,47 (m, 2H); 2,65 (t, 2H, J = 6 Hz); 7,43 (t, 1H, J = 4 Hz) ppm; RMN ¹³C (62.5 MHz, CDCl₃): 22,66; 28,34; 38,33; 123,89; 151; 11; 191,22 ppm.

4.1.11. Preparação do 2-cloro-2-cicloexen-1-ona

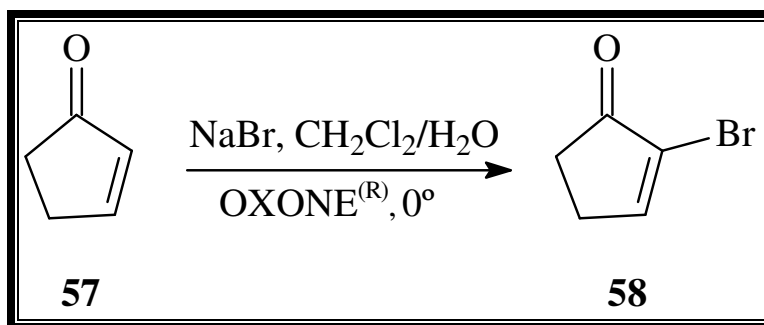


Esquema 27. Preparação do 2-cloro-2-cicloexen-1-ona **52**.

Em um balão de 500 mL, imerso em um banho de gelo, foram colocados 150 mL de diclorometano e 30 mL de água, sendo a mistura deixada sob agitação magnética. Adicionou-se 3,48 g (60 mmol) de NaCl e 36,38 (60 mmol) g de Oxone®, mantendo a agitação por 40 minutos. Em seguida, 3,90 g (30 mmol) da enona **50** foi adicionada, durante 10 minutos, e a mistura foi deixada sob agitação à temperatura ambiente por 4 h. Após esse período, com auxílio de um funil de adição, adicionou-se 12,6 mL (450 mmol) de trietilamina e a mistura reacional permaneceu sob agitação magnética por mais 1 h. Em seguida, a mistura foi neutralizada com HCl (1M), a fase aquosa foi extraída com diclorometano e este foi seco com sulfato de sódio, sendo então o solvente evaporado. O produto foi purificado por cromatografia em coluna com sílica gel, utilizando como eluente AcOEt/hexano (1:9) e obtendo-se 1,8 g do produto, com 90 % de rendimento.

Fórmula molecular: C₆H₇ClO; óleo verde; CG/EM (IE, 70 eV) m/z (int. relativa): 55 (36); 67 (82); 89 (55); 102 (84); 130 (M⁺, 100); 132 (32); IV (NaCl): 1687; 1596; 1447; 1359; 1285; 1231; 1009; 906; 757; 691 cm⁻¹; RMN ¹H (250 MHz, CDCl₃): 2,01 (m, 2H); 2,46 (m, 2H); 2,59 (m, 2H); 7,13 (t, 1H, J = 4,5 Hz) ppm; RMN ¹³C (62.5 MHz, CDCl₃): 22,59; 27,04; 38,48; 132,17; 146,62; 191,50 ppm.

4.1.12. Preparação do 2-bromo-2-ciclopenten-1-ona

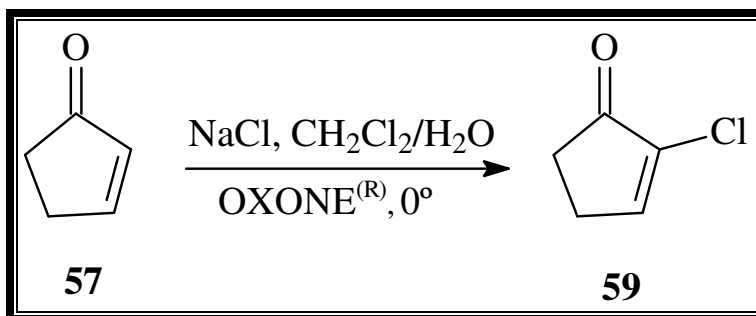


Esquema 28. Preparação do 2-bromo-2-ciclopenten-1-ona **58**.

Em um balão de 500 mL, imerso em um banho de gelo, foram colocados 150 mL de diclorometano e 30 mL de água, sendo a mistura deixada sob agitação magnética. Adicionou-se 6,21 g (60 mmol) de NaBr e 36,38 (60 mmol) g de Oxone®, mantendo a agitação por 40 minutos. Em seguida, 4,80 g (30 mmol) da enona 57 foram adicionados, durante 10 minutos, e a mistura foi deixada sob agitação à temperatura ambiente por 4 h. Após esse período, com auxílio de um funil de adição, adicionou-se 12,6 mL (450 mmol) de trietilamina e a mistura reacional permaneceu sob agitação magnética por mais 1 h. Em seguida, a mistura foi neutralizada com HCl (1M) e a fase aquosa foi extraída com diclorometano, sendo este último seco com Na₂SO₄ e o solvente foi evaporado. O produto foi analisado por cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massas, observando 90 % de conversão. A purificação foi realizada por cromatografia em coluna com sílica gel, utilizando como eluente AcOEt/hexano (2:8), obtendo-se 4,3 g de 2-bromo-2-ciclopenten-1-ona **58**.

Fórmula molecular: C₅H₅BrO; óleo amarelo; CG/EM (IE, 70 eV) m/z (int. relativa): 53 (100); 81 (10); 106 (6); 132 (8); 160 (M⁺, 99); 162 (98); IV (NaCl) 3069; 2923; 2849; 1717; 1589; 1433; 1399; 1290; 1231; 1161; 1031; 936; 746 cm⁻¹; RMN ¹H (250 MHz, CDCl₃): 2,53-2,55 (m, 2H); 2,69-2,72 (m, 2H); 7,79 (t, 1H, J = 3 Hz) ppm; RMN ¹³C (62.5 MHz, CDCl₃): 28,02; 37,96; 126,27; 161,85; 201,86 ppm.

4.1.13. Preparação do 2-cloro-2-ciclopenten-1-ona



Esquema 29. Preparação do 2-cloro-2-ciclopenten-1-ona **59**.

Em um balão de 500 mL, imerso em um banho de gelo, foram colocados 150 mL de diclorometano e 30 mL de água, sendo a mistura deixada sob agitação magnética. Adicionou-se 3,48 g (60 mmol) de NaCl e 36,38 (60 mmol) g de Oxone®, mantendo a agitação por 40 minutos. Em seguida, 3,48 g (30 mmol) da enona **57** foi adicionada, durante 10 minutos, e a mistura foi deixada sob agitação à temperatura ambiente por 4 h. Após esse período, adicionou-se, com auxílio de um funil de adição 12,6 mL (450 mmol) de trietilamina e a mistura reacional permaneceu sob agitação magnética por mais 1 h. Em seguida, a mistura foi neutralizada com HCl (1M), a fase aquosa foi extraída com diclorometano e este foi seco com Na₂SO₄, sendo o solvente foi evaporado. O produto foi analisado por cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massas, observando 92 % de conversão. A purificação foi realizada por cromatografia em coluna com sílica gel, utilizando como eluente AcOEt/hexano (2:8), obtendo-se 3,11 g de 2-cloro-2-ciclopenten-1-ona **59**.

Fórmula molecular: C₅H₅ClO; óleo amarelo; CG/EM (IE, 70 eV) m/z (int. relativa): 53 (88); 62 (8); 73 (5); 88 (45); 116 (M⁺, 99); 118 (32); IV (NaCl) 3040; 2947; 2827; 1667; 1609; 1550; 1530; 1453; 1426; 1389; 1324; 1212; 1125; 763; 732; 705 cm⁻¹; RMN ¹H (250 MHz, CDCl₃): 2,36-2,38 (m, 2H); 2,54-2,56 (m, 2H); 7,61 (t, 1H, J = 3 Hz) ppm; RMN ¹³C (62.5 MHz, CDCl₃): 25,80; 34,05; 134,55; 165,08; 201,27 ppm.

4.2. Cultivo dos microrganismos em YMA (Yeast extract-malt/extract - Agar)

Para o cultivo das linhagens das leveduras *Pichia stipitis* CCT 2617 e *Saccharomyces cerevisiae* CCT 3917, *Candida albicans* CCT 0776 e *Rhodotorula glutinis* CCT 0783, utilizou-se caldo nutriente YM (Yeast extract-malt extract) de marca Merk, de uso geral para o crescimento de leveduras, preparado pela mistura de 3 g de extrato de levedura, 3 g de extrato de malte, 5 g de peptona todas de marca Merk e 10 g de glucose e 20 g de ágar, completando-se com água destilada o volume final para 1 L. A esterilização do meio foi feita por autoclavagem a 121 °C por 15 minutos, depois desse período de tempo o meio foi colocado em placas de Petri, dentro de uma capela de fluxo laminar e, após o endurecimento do meio à temperatura ambiente, o microrganismo foi aplicado com auxílio de uma alça de platina (Figura 41).

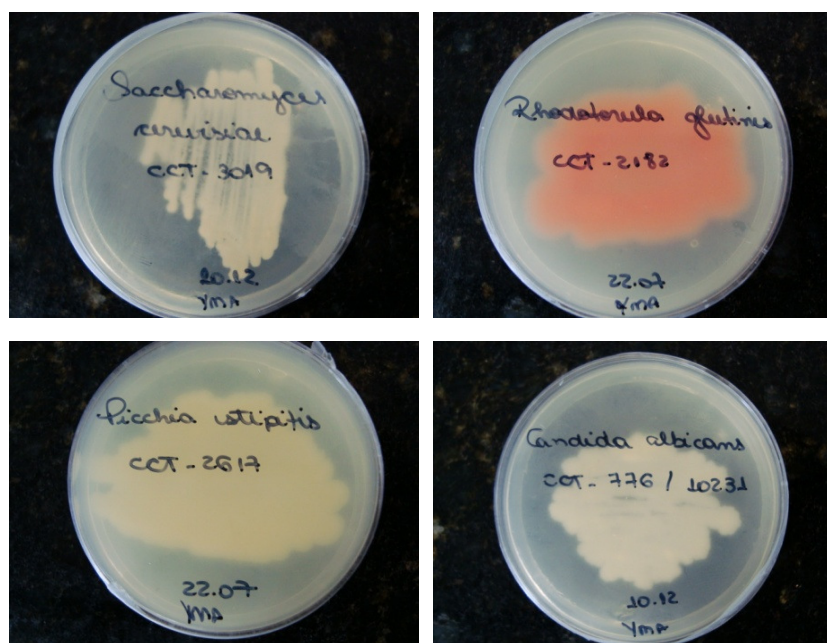


Figura 41. Crescimento no meio YMA de *S. cerevisiae*, *P. stipitis*, *R. glutinis* e *C. albicans*.

4.3. Cultivo dos microrganismos em NA (Nutrient Agar)

Para o cultivo da linhagem da bactéria *Micrococcus luteus* CCT 2283 (ATCC 0147), utilizou-se caldo nutriente Agar NA (Nutrient Agar) de marca OXOID, de uso geral para o crescimento de bactérias, preparado pela mistura de 3 g de extrato de carne, 5 g de peptona e 15 g ágar-ágar, todas de marca OXOID, completando-se o volume final para 1 L de água destilada. A esterilização do meio foi feita por autoclavagem a 121 °C por 15 minutos, depois desse período de tempo o meio foi colocado em placas de Petri, dentro de uma capela de fluxo laminar e, após o endurecimento do mesmo à temperatura ambiente, o microrganismo foi aplicado com auxílio de uma alça de platina (Figura 42).

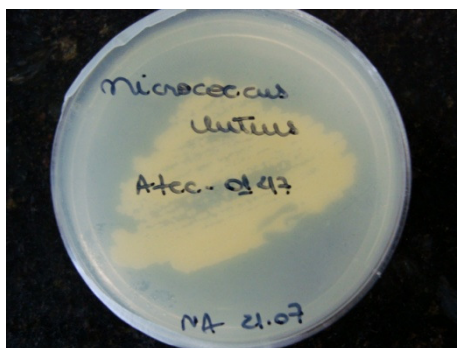


Figura 42. Crescimento no meio NA de *M. luteus* CCT 2283 (ATCC 0147).

4.4. Cultivo dos microrganismos em SAB (Sabourau Dextrose Agar)

Para o cultivo da linhagem do fungo *Geotrichum candidum* CCT 1205, utilizou-se o caldo SAB, marca OXOID, de uso geral para o crescimento de fungos, preparado pela mistura de 10 g de peptona, 40 g de glicose e 15 g ágar-ágar, todas de marca OXOID, completando-se o volume final, com água destilada, para 1 L. A esterilização do meio foi feita por autoclavagem a 121 °C por 15 minutos, depois desse período de tempo o meio foi colocado em placas de Petri dentro de uma capela de fluxo laminar e, após o endurecimento do mesmo à

temperatura ambiente, o microrganismo foi aplicado com auxílio de uma alça de platina (Figura 43).



Figura 43. Crescimento no meio SAB do *G. candidum* CCT 1205.

4.5. Cultivo dos microrganismos em YM (Yeast extract-malt extract)

Para o cultivo das linhagens de leveduras *Pichia stipitis* CCT 2617 e *Saccharomyces cerevisiae* CCT 3917, *Candida albicans* CCT 0776 e *Rhodotorula glutinis* CCT 0783, utilizou-se caldo nutriente YM (Yeast extract-malt extract) de marca Merk, de uso geral para o crescimento de leveduras, preparado pela mistura de 3 g de extrato de levedura, 3 g de extrato de malte, 5 g de peptona todas de marca Merk e 10 g de glucose, completando-se o volume final, com água destilada, para 1 L. A esterilização do meio foi feita por autoclavagem a 121 °C por 15 minutos.

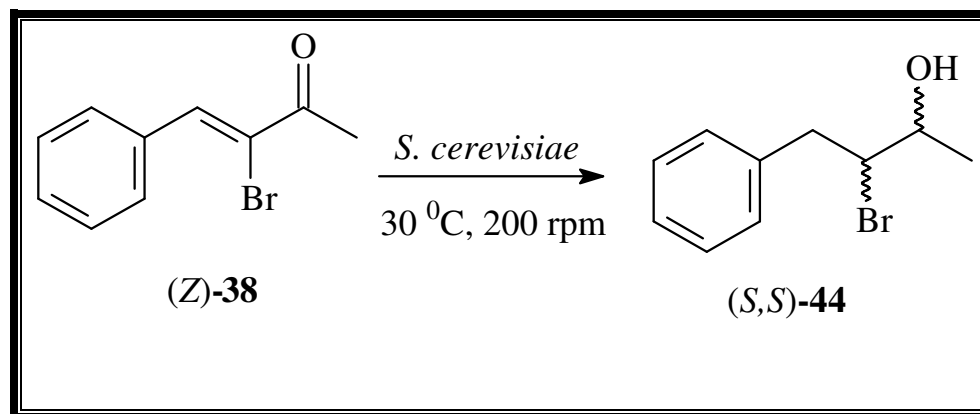
4.6. Reações de biorredução

4.6.1. Procedimento geral para a redução das α -haloenonas com *Saccharomyces cerevisiae* liofilizado (Fermento de pão)

Uma suspensão de 10 g de células desidratadas de *Saccharomyces cerevisiae* (fermento de pão), tipo instantâneo, de marca Emulzint®, em meio aquoso (100 mL), foi produzida com água destilada previamente aquecida 42 °C. Adicionou-se o substrato a ser reduzido (100 mg) dissolvido em 1,0 mL de etanol. A mistura foi mantida em um agitador orbital, sob uma rotação de 200 rpm, à

temperatura de 30 °C. Nessas condições, foram retiradas alíquotas em tempos determinados (de 30 minutos a 2 horas), sendo analisadas por CG/EM. O produto de reação foi extraído em extrator contínuo líquido-líquido por 48 h, com diclorometano.

4.6.1.1. Redução de (Z)-3-bromo-4-fenil-3-buten-2-ona (Z)-38 por *Saccharomyces cerevisiae* liofilizado



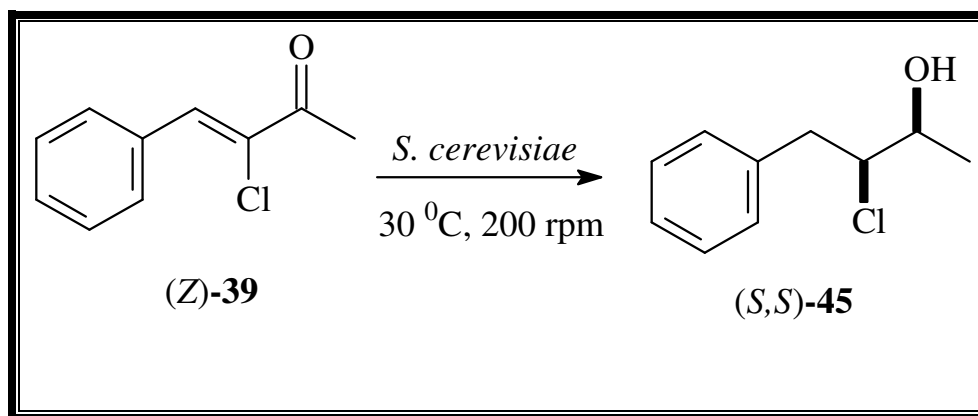
Esquema 30. Preparação da bromoidrina **44** utilizando fermento de pão.

Utilizando o procedimento geral descrito no item 4.6.1. para a redução de (Z)-**38** obteve-se a halodrina 3-bromo-4-fenil-2-butanol **44**, cuja configuração foi determinada como sendo (S,S), conforme experimento descrito no item 4.6.2.1.

(S,S)-**44**= Fórmula molecular: C₁₀H₁₃BrO; óleo amarelo; $[\alpha]_D^{25}$ -18; EM (IE, 70eV) m/z (int. relativa): 51(8); 65 (9); 78 (26); 91 (86); 105 (56); 131 (100); 148 (34); 228(M⁺, 2); 230 (1); IV (NaCl): 3402; 3026; 2978; 2929; 1603; 1492; 1445; 725; 694; 672 cm⁻¹; RMN ¹H (250 MHz, CDCl₃): 1,29 (d, 3H); 3,17 (dd, 1H, J₁ = 14 Hz, J₂ = 8 Hz); 3,37 (dd, 1H, J₁ = 14 Hz, J₂ = 8 Hz); 3,69 - 3,79 (m, 1H); 4,21 (td, 1H, J₁ = 7 Hz, J₂ = 3 Hz); 7,22 – 7,35 (m, 5H) ppm; RMN ¹³C (62.5 MHz, CDCl₃): 22,24; 42,09; 65,56; 68,13; 126,91; 128,57; 129,26; 138,29 ppm.

4.6.1.2. Redução de (Z)-3-cloro-4-fenil-3-buten-2-ona (Z)-39 por *Saccharomyces cerevisiae* liofilizado

Utilizando o procedimento geral descrito no item 4.6.1. para a redução de (Z)-39 obteve-se a halodrina 3-cloro-4-fenil-2-butanol (S,S)-45, cuja configuração foi determinado como sendo (S,S), conforme experimento descrito no item 4.6.2.2.

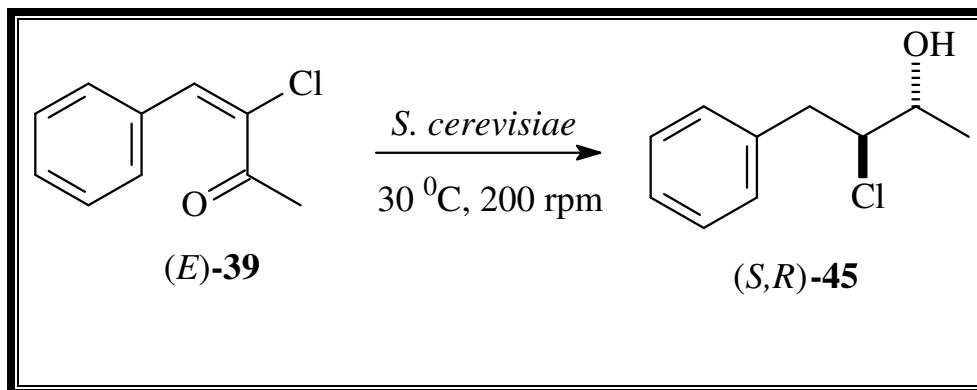


Esquema 31. Preparação da cloroidrina (S,S)-45 utilizando fermento de pão.

(S,S)-45= Fórmula molecular: C₁₀H₁₃ClO; óleo amarelo; $[\alpha]_D^{25}$ -19; EM (IE, 70eV) m/z (int. relativa): 51 (11); 65 (14); 78 (67); 91 (100); 105 (37); 131 (59); 148 (67); 184 (M⁺, 5); 186 (2); IV (NaCl): 3399; 3025; 2978; 2930; 1603; 1494; 1447; 1365; 1260; 1131; 750; 693; RMN ¹H (250 MHz, CDCl₃): 1,30 (d, 3H, *J* = 6 Hz); 3,05 (dd, 1H, *J*₁ = 14 Hz, *J*₂ = 8 Hz); 3,23 (dd, 1H, *J*₁ = 14 Hz, *J*₂ = 8 Hz); 3,89 - 3,96 (m, 1H); 4,05 (td, 1H, *J*₁ = 7 Hz, *J*₂ = 3 Hz); 7,22 – 7,35 (m, 5H) ppm; RMN ¹³C (62.5 MHz, CDCl₃): 20,87; 41,14; 68,46; 69,87; 126,83; 128,50; 129,33; 137,62 ppm.

4.6.1.3. Redução de (E)-3-cloro-4-fenil-3-buten-2-ona (E)-39 por *Saccharomyces cerevisiae* liofilizado

Utilizando o procedimento geral descrito no item 4.6.1. para a redução de (E)-39 obteve-se a halodrina 3-cloro-4-fenil-2-butanol (S,R)-45, cuja configuração foi determinado como sendo (S,R), conforme experimento descrito no item 4.6.2.3.



Esquema 32. Preparação da cloroidrina (*S,R*)-**45** utilizando fermento de pão.

(*S,R*)-**45** = Fórmula molecular: $\text{C}_{10}\text{H}_{13}\text{ClO}$; óleo amarelo; $[\alpha]_D^{25} +20$; EM (IE, 70eV) m/z (int. relativa): 51 (12); 65 (13); 78 (58); 91 (100); 105 (37); 131 (92); 148 (55); 184 (M^{+} , 3); 186 (2); IV (NaCl): 3402; 2923; 2852; 1493; 1454; 1377; 1265; 1115; 1067; 738; 700 cm^{-1} ; RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3): 1,30 (d, 3H, $J = 6\text{ Hz}$); 3,05 (dd, 1H, $J_1 = 14\text{ Hz}$, $J_2 = 8\text{ Hz}$); 3,86 (dd, 1H, $J_1 = 14\text{ Hz}$, $J_2 = 8\text{ Hz}$); 4,02 - 4,06 (m, 1H); 4,05 (td, 1H, $J_1 = 7\text{ Hz}$, $J_2 = 3\text{ Hz}$); 7,23 – 7,31 (m, 5H) ppm; RMN ^{13}C (125 MHz, CDCl_3): 20,92; 41,19; 68,13; 69,92; 126,86; 128,54; 129,36; 137,65 ppm.

Os excessos enantioméricos foram determinados, após a purificação de (*S,S*)-**44**, (*S,S*)-**45** e (*S,R*)-**45**, por cromatografia gasosa com coluna quiral, acoplada ao detector de ionização de chama, conforme condições descritas no item 4.15.3.

As haloidrinas (*S,S*)-**44**, (*S,S*)-**45** e (*R,S*)-**45**, foram purificadas por cromatografia em coluna com sílica gel, utilizando como eluente AcOEt/hexano (1:9). As frações foram analisadas por cromatografia de camada delgada e, em seguida, por cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massas. Os cromatogramas referentes aos excessos enantioméricos encontram-se a seguir.

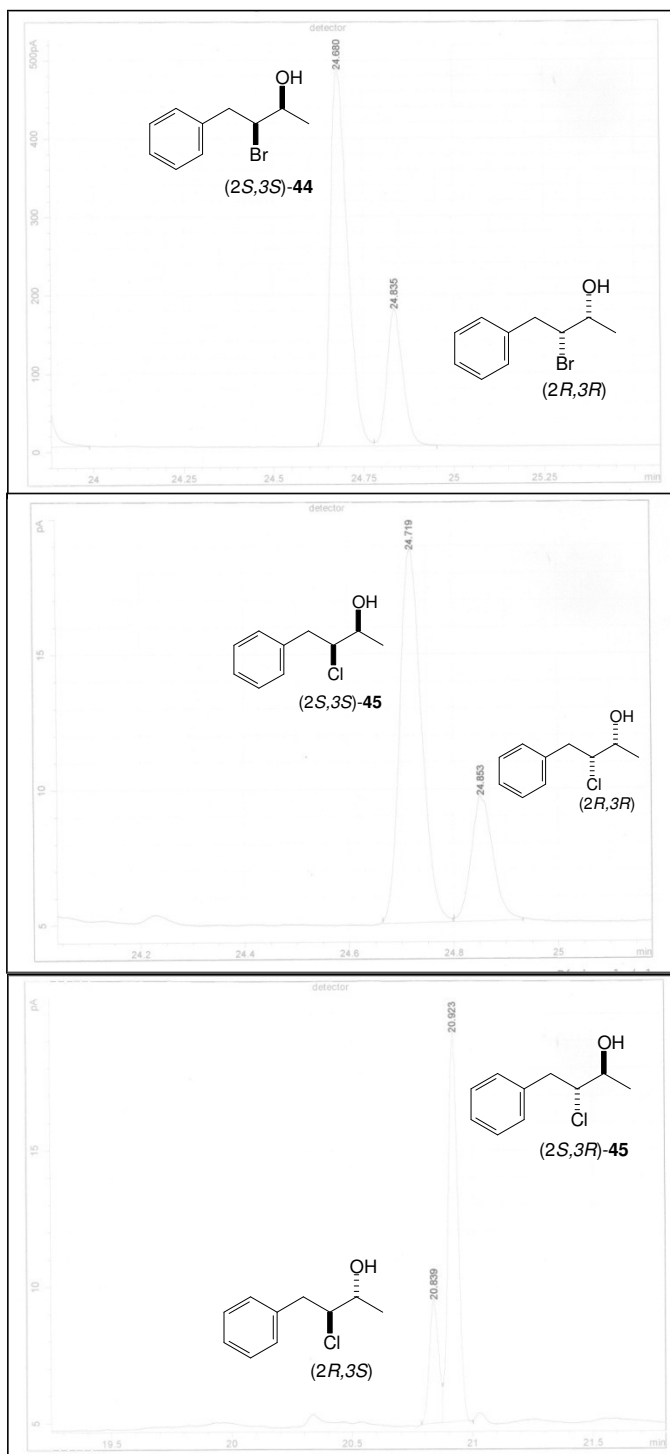
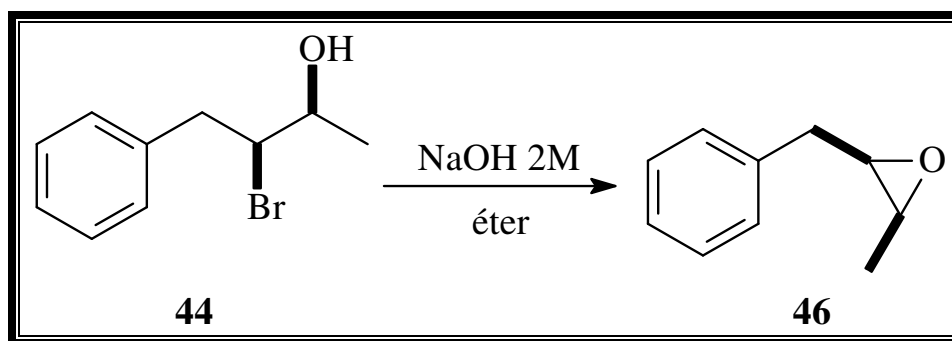


Figura 44. Cromatogramas de (*S,S*)-**44**, (*S,S*)-**45** e (*S,R*)-**45**, obtidos por CG/DIC com coluna quiral, conforme descrito no item 4.15.3.

4.6.2. Determinação da configuração das haloidrinas

A determinação das configurações das haloidrinas obtidas foi realizada através das análises dos espectros de RMN ^{13}C e da medição do $[\alpha]_D^{25}$ dos epóxidos correspondentes, comparando-se os resultados com os dados publicados na literatura.³¹

4.6.2.1. Preparação do 4-fenil-2,3-epoxibutano a partir da haloidrina (*S,S*)-**44** obtida no experimento descrito no item 4.6.1.1.

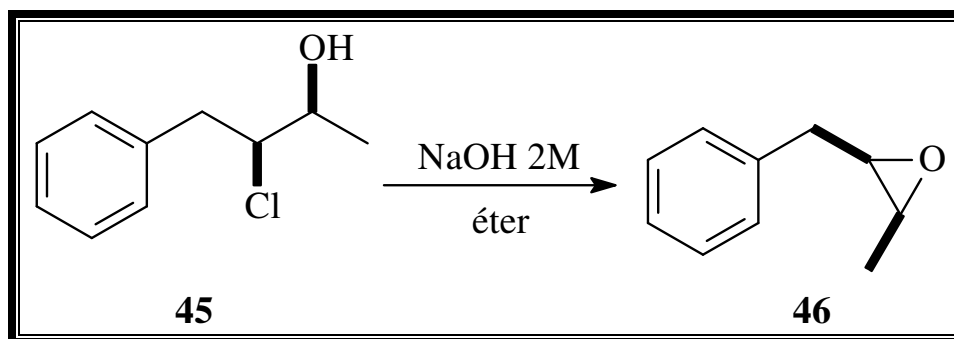


Esquema 33. Preparação do 4-fenil-2,3-epoxibutano **46** a partir de (*S,S*)-**44**.

Em um balão de 50 mL foi adicionado 4,1 mmol da haloidrina em 5 mL de éter etílico, sob agitação magnética e, em seguida, foi acrescentado 1,2 mL de uma solução NaOH 2M, gota a gota, e a mistura permaneceu sob agitação por 6 horas e então a fase aquosa foi extraída com CH₂Cl₂ em um extrator contínuo líquido-líquido por 24 horas. Após purificação por cromatografia em coluna com sílica gel e utilizando como eluente éter/hexano (1:10), obteve-se o produto **46** com 40 % de rendimento.

Fórmula molecular: C₁₀H₁₂O; óleo incolor; $[\alpha]_D^{25}$ -16; EM (IE, 70eV) m/z (int. relativa): 51 (12); 65 (13); 78 (58); 91 (100); 105 (37); 131 (92); 148 (M⁺, 3); RMN ¹H (250 MHz, CDCl₃): 1,41 (d, 3H, *J* = 6 Hz); 2,81 (dd, 1H, *J*₁ = 14 Hz; *J*₂ = 6 Hz); 2,95 (dd, 1H, *J*₁ = 14 Hz; *J*₂ = 6 Hz); 3,13 – 3,18 (m, 2H); 7,08 – 7,36 (m, 5H) ppm; RMN ¹³C (62.5 MHz, CDCl₃): 13,43; 34,01; 52,90 (C-2); 57,31 (C-3); 126,54; 128,62; 129,20; 137,80 ppm.

4.6.2.2. Preparação do 4-fenil-2,3-epoxibutano a partir da haloidrina (*S,S*)-45** obtida no experimento descrito no item 4.6.1.2.**

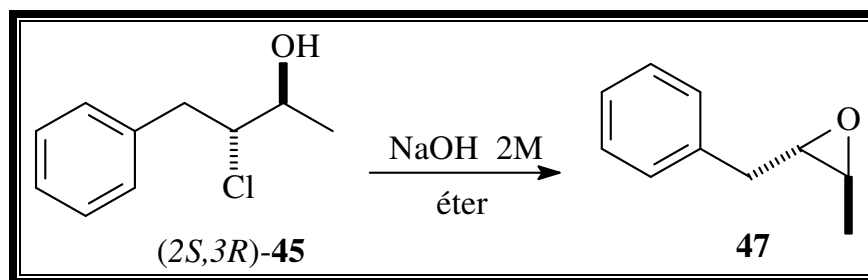


Esquema 34. Preparação do 4-fenil-2,3-epoxibutano **46** a partir de (*S,S*)-**45**.

Em um balão de 50 mL foram adicionados 4,5 mmol da haloidrina em 5 mL de éter etílico, sob agitação magnética e, em seguida, foi acrescentado 1,2 mL de uma solução NaOH 2M gota a gota. A reação foi deixada sob agitação magnética por 6 horas e então a fase aquosa foi extraída com CH₂Cl₂ em um extrator contínuo líquido-líquido por 24 horas. Após purificação por cromatografia em coluna com sílica gel e utilizando como eluente éter/hexano (1:10), obteve-se o produto **46** com 45 % de rendimento.

Fórmula molecular: C₁₀H₁₂O; óleo incolor; $[\alpha]_D^{25}$ -18; EM; RMN ¹H (250 MHz, CDCl₃) e RMN ¹³C (62.5 MHz, CDCl₃) são semelhantes aos descritos no item 4.6.2.1.

4.6.2.3. Preparação do 4-fenil-2,3-epoxibutano a partir da haloidrina (2*S*,3*R*)-**45** obtida no experimento descrito no item 4.6.1.3.



Esquema 35. Preparação do 4-fenil-2,3-epoxibutano a partir de (2*S*,3*R*)-**45**.

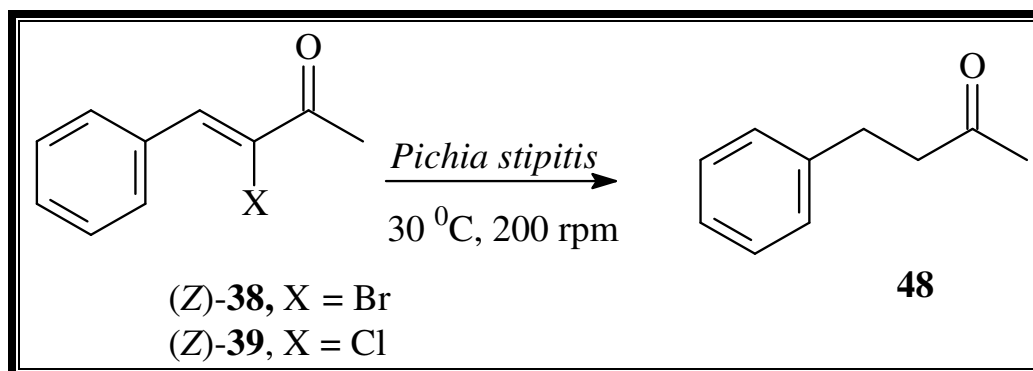
Em um balão de 50 mL foram adicionados 4,5 mmol da haloidrina em 5 mL de éter etílico, sob agitação magnética e, em seguida, foi acrescentado 1,2 mL de uma solução NaOH 2M, gota a gota. A reação foi deixada sob agitação magnética por 6 horas e então a fase aquosa foi extraída com CH₂Cl₂ em um extrator contínuo líquido-líquido por 24 horas. Após purificação por cromatografia em coluna com sílica gel e utilizando como eluente éter/hexano (1:10), obteve-se o produto **47** com 40 % de rendimento.

Fórmula molecular: C₁₀H₁₂O; óleo incolor; $[\alpha]_D^{25}$ - 17; EM (IE, 70eV) *m/z* (int. relativa: 45 (100); 65 (9); 78 (28); 91 (30); 105 (14); 115 (1); 131 (15); 148 (M⁺, 9); RMN ¹H (250 MHz, CDCl₃): 1,81 (d, 3H, *J* = 6 Hz); 2,61 - 2,82 (m, 4H); 7,15-7,31 (m, 5H) ppm; RMN ¹³C (62.5 MHz, CDCl₃): 17,43; 38,01; 54,76 (C-2); 59,91 (C-3); 126,74; 128,64; 128,92; 137,70 ppm.

4.7. Procedimento geral para a redução de (Z)-**38** e (Z)-**39** com *Pichia stipitis* em meio aquoso

Em Erlenmeyers de 250 mL contendo de 100 mL a 200 mL de células pré-cultivadas de *P. stipitis* foram adicionados 100 mg de (Z)-**38** ou (Z)-**39**, solubilizados em 1 mL de etanol. A mistura resultante foi mantida em um agitador orbital, sob uma rotação de 200 rpm, por 3 a 72 horas e à temperatura de 30 °C.

4.7.1. Procedimento para a redução de (Z)-38 e (Z)-39 com *Pichia stipitis* em meio aquoso por 24 horas

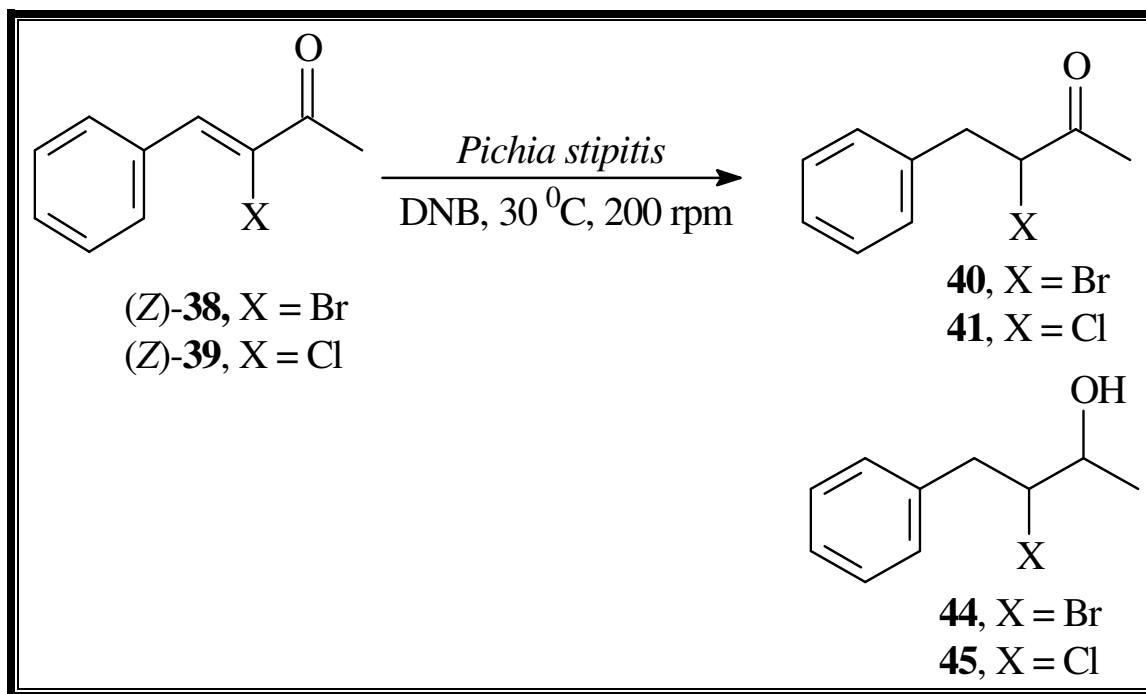


Esquema 36. Biorredução de (Z)-38 e (Z)-39 com *P. stipitis* em meio aquoso por 24 horas.

As reduções de (Z)-38 e (Z)-39 foram realizadas conforme está descrito no item 4.7., usando 100 mL de meio com 24 horas de reação. O produto foi extraído com diclorometano em um extrator contínuo líquido-líquido por 18 horas, sendo o produto purificado por cromatografia em coluna com sílica gel, utilizando como eluente AcOEt/hexano (2:8).

Fórmula molecular: C₁₀H₁₂O; óleo incolor; 51(12); 65 (9); 77 (23); 91 (64); 105; (92); 133 (19); 148 (M⁺, 100); IV (NaCl): 3085; 3062; 3027; 3002; 2922; 1718; 1602; 1583; 1496; 1453; 1408; 1357; 1283; 1228; 1161; 1080; 749; 699 cm⁻¹; RMN ¹H (250 MHz, CDCl₃): 2,14 (s, 3H); 2,77 (t, 2H, J₁ = 8 Hz); 2,91 (t, 2H, J = 8 Hz); 7,16 - 7,31 (m, 5H) ppm; RMN ¹³C (62.5 MHz, CDCl₃): 29,72; 30,07; 45,16; 126,10; 128,49; 148,29; 140,97; 207,95 ppm.

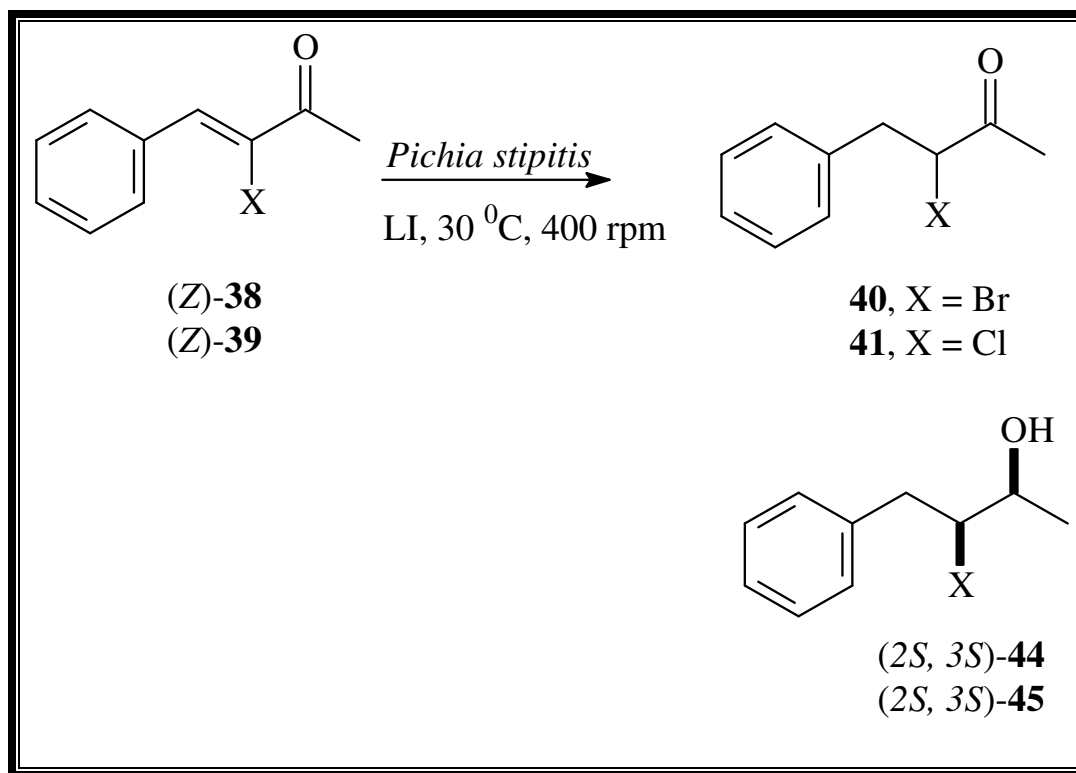
4.7.2. Procedimento geral para a redução de (Z)-38 e (Z)-39 com *Pichia stipitis* em meio aquoso com adição de DNB



Esquema 37. Biorredução de (Z)-38 e (Z)-39 com *Pichia stipitis* em meio aquoso com adição de DNB.

Em Erlenmeyers de 250 mL contendo de 100 mL a 200 mL de células pré-cultivadas de *P. stipitis* acrescentou-se DNB (0,1; 0,2; 0,5; 0,8; 1; 2; 5 ou 8 mg) e essa mistura foi deixada sob agitação orbital por 30 minutos a 30 °C. Então, 100 mg de (Z)-38 ou (Z)-39 solubilizados em 1 mL de etanol foram adicionados em frascos distintos. A mistura novamente foi deixada no agitador orbital, a 200 rpm, por 24 horas à temperatura de 30 °C. O produto foi extraído com diclorometano em um extrator contínuo líquido-líquido por 18 horas. A fase orgânica foi seca com sulfato de sódio e o solvente evaporado. Após análises por cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massas (Tabela 8, p. 45), foi observado que a adição de 1 e 2 mg de DNB forneceram os melhores resultados. Os espectros de RMN ¹H, RMN ¹³C e de massas das haloidrinas são semelhantes aos obtidos no item 4.6.1.1. e 4.6.1.2. enquanto que os intermediários 40 e 41 não foram isolados.

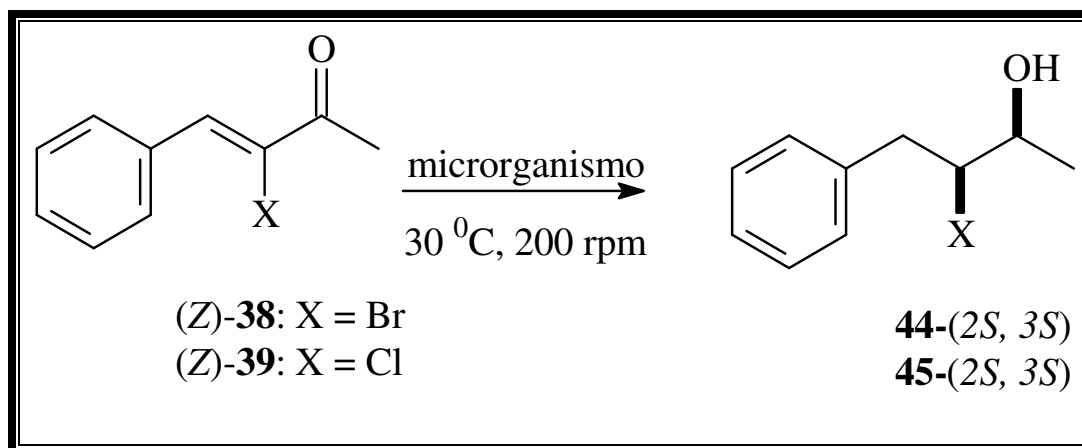
4.7.3. Procedimento para a redução de (Z)-38 e (Z)-39 com *Pichia stipitis* em sistema bifásico



Esquema 38. Biorredução utilizando *P. stipitis* em sistema bifásico.

Em Erlenmeyers de 250 mL contendo de 100 mL a 200 mL de células pré-cultivadas de *P. stipitis* foram adicionados 100 mg do substrato a ser reduzido, solubilizado em 1 mL de líquido iônico. A mistura resultante foi mantida em um agitador orbital sob rotação de 400 rpm por 24 horas à temperatura de 30 °C. Durante a reação foram retiradas alíquotas em tempos determinados (24 a 120 horas) e, após análises por cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massas, observou-se a formação dos intermediários **40** e **41** e das haloidrinas **44** e **45**. O líquido iônico foi separado da fase aquosa e o produto foi extraído com éter diisopropílico (3X5 mL) e a fase orgânica seca com sulfato de sódio anidro. As haloidrinas foram isoladas e seus espectros de RMN ^1H , RMN ^{13}C , massas são semelhantes aos obtidos no item 4.6.1.1. e 4.6.1.2..

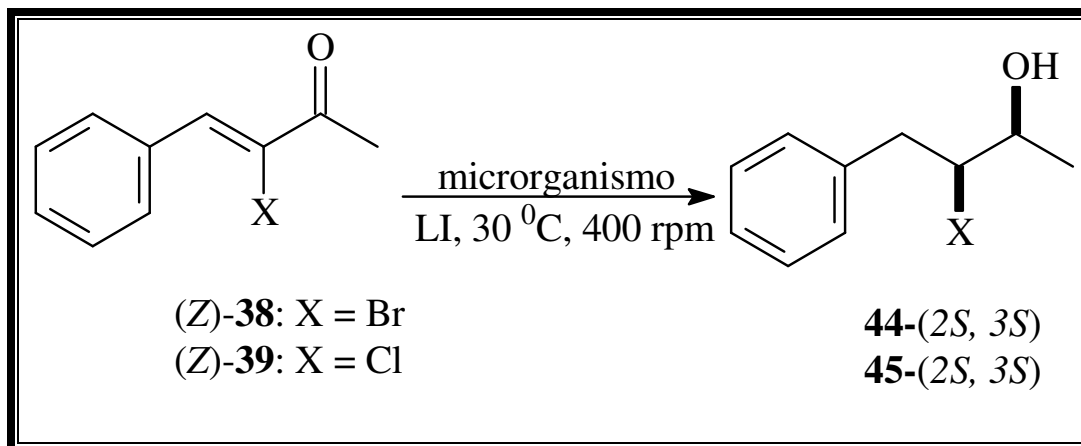
4.8. Procedimento para a redução de (Z)-38 e (Z)-39 com *Geotrichum candidum*, *Rhotorula glutinis*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Micrococcus luteus* e *Candida albicans* em meio aquoso



Esquema 39. Biorredução de (Z)-38 e (Z)-39 utilizando *S. cerevisiae*, *G. candidum*, *M. luteus*, *R. glutinis* e *C. albicans* em meio aquoso.

Foi separado 100 mL de meio com células pré-cultivadas em meio aquoso, adicionou-se o substrato a ser reduzido (100 mg), dissolvido em 1 mL de etanol. A mistura resultante foi mantida em um agitador orbital sob uma rotação de 200 rpm, de 24 até 120 horas, à temperatura de 30 °C. Durante a reação, foram retiradas alíquotas, em tempos determinados previamente, que foram extraídas com acetato de etila e a fase orgânica foi seca com sulfato de sódio anidro. As alíquotas foram analisadas por cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massas e as haloidrinas obtidas têm seus respectivos espectros nos itens 4.6.1.1. e 4.6.1.2.

4.9. Procedimento para a redução de (Z)-38 e (Z)-39 com *Geotrichum candidum*, *Rhotorula glutinis*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Micrococcus luteus* e *Candida albicans* utilizando sistema bifásico



Esquema 40. Biorredução de (Z)-38 e (Z)-39 utilizando *S. cerevisiae*, *G. candidum*, *M. luteus*, *R. glutinis* e *C. albicans* em sistema bifásico.

Foi separado 100 mL de meio com células pré-cultivadas em meio aquoso, adicionou-se o substrato a ser reduzido (100 mg), solubilizado em 1 mL de líquido iônico. A mistura resultante foi mantida em um agitador orbital sob uma rotação de 400 rpm, por 24 até 120 horas, à temperatura de 30 °C. As alíquotas foram extraídas com éter diisopropílico (3X5 mL) e analisadas por cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massas, sendo que as haloidrinas obtidas têm seus respectivos espectros nos itens 4.6.1.1. e 4.6.1.2..

Os excessos enantioméricos das haloidrinas obtidas nas reações em sistema bifásico, (S,S)-44 e (S,S)-45, foram determinados por cromatografia gasosa acoplada ao detector de ionização de chamas, com coluna quiral, conforme condições descritas no item 4.15.3.

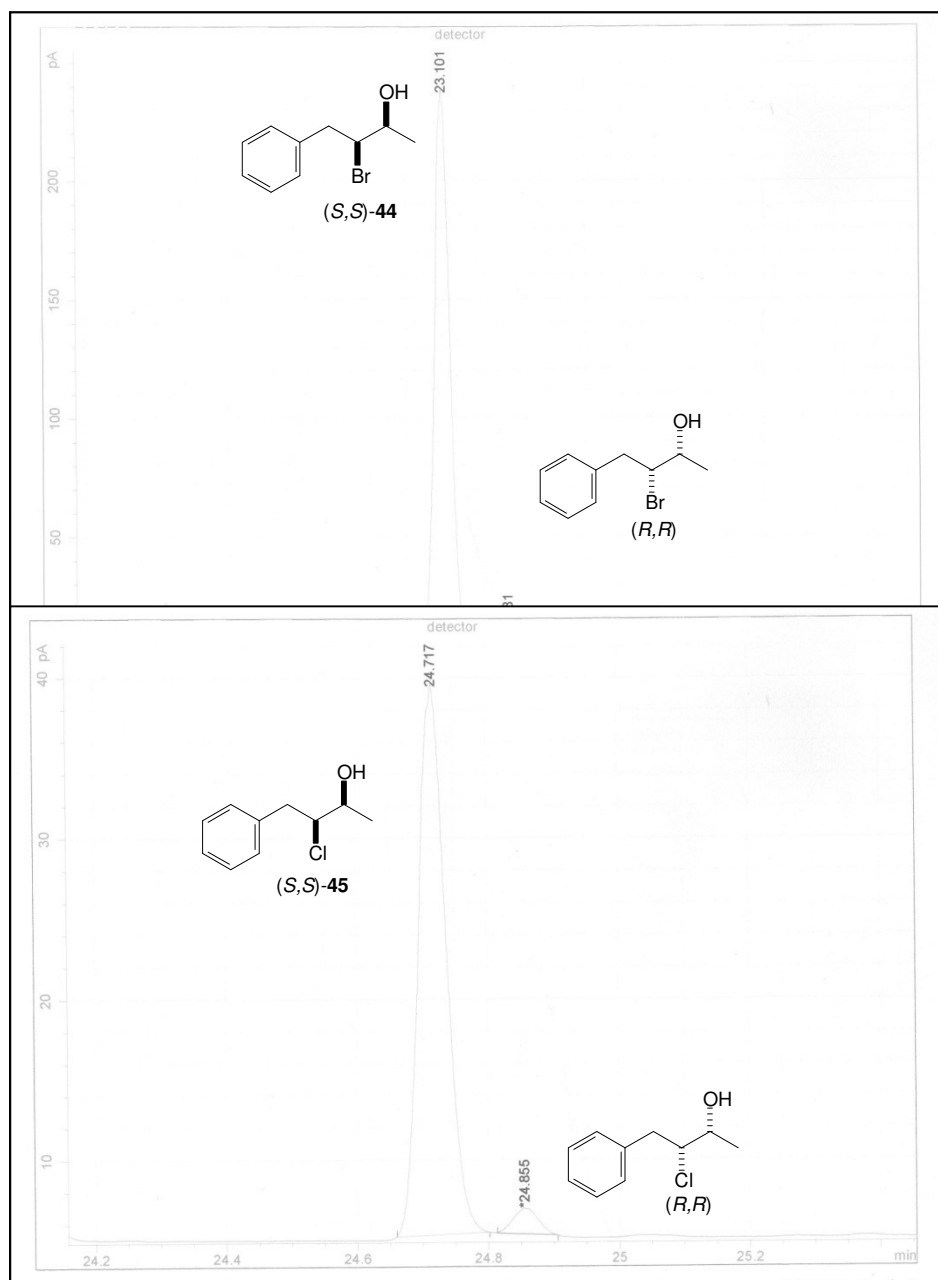
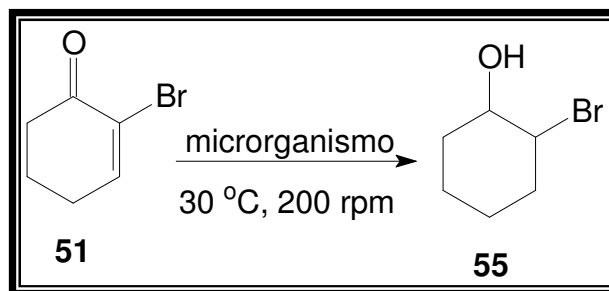


Figura 45. Cromatogramas de (S,S)-44 e (S,S)-45 obtidas nas biorreduções em sistema bifásico.

4.10. Procedimento geral para a redução de 2-bromo-2-cicloexen-1-ona **51**, 2-cloro-2-cicloexen-1-ona **52**, 2-bromo-2-ciclopenten-1-ona **58** e 2-cloro-2-ciclopenten-1-ona **59** com *Rhotorula glutinis*, *Pichia stipitis* e *Saccharomyces cerevisiae* liofilizado, em meio aquoso

Em Erlenmeyers de 125 mL contendo de 20 mL de células pré-cultivadas de *R. glutinis*, *P. stipitis* e *S. cerevisiae* foram adicionados 20 mg do substrato a ser reduzido, solubilizado em 1 mL de etanol. A mistura resultante foi mantida sob agitação orbital a 200 rpm por 24 horas à temperatura de 30 °C. Os produtos foram extraídos com diclorometano em extrator contínuo líquido-líquido por 18 horas e a fase orgânica foi seca com sulfato de sódio anidro. Após, foram realizadas análises por cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massas e observada a formação das haloidrinas **55**, **56**, **62** e **63**. Não foi possível realizar as análises por RMN ^1H e ^{13}C por não terem sido obtidos os produtos purificados.

4.10.1. Redução do 2-bromo-2-cicloexen-1-ona **51** em meio aquoso

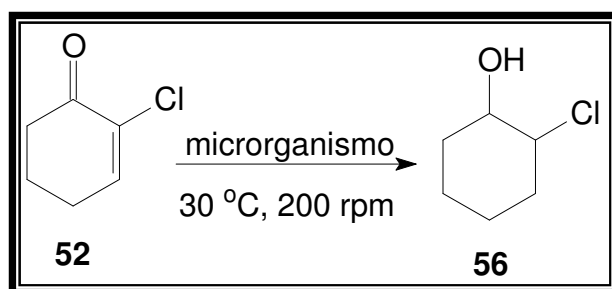


Esquema 41. Biorredução de **51** utilizando *S. cerevisiae*, *R. glutinis* e *P. stipitis* em meio aquoso.

Utilizando o procedimento descrito no item 4.10. para a redução de **51**, obteve-se a haloidrina 2-bromo-cicloexanol **55** que foi analisada por cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massas. Os dados referentes aos experimentos estão apresentados na Tabela 13, p. 69.

Fórmula molecular: $C_6H_{11}BrO$; CG/EM (IE, 70 eV) m/z (int. relativa): 55 (60); 69 (22); 81 (100); 98 (29); 134 (5); 178 (M^+ , 3); 180 (2).

4.10.2. Redução do 2-cloro-2-cicloexen-1-ona **52** em meio aquoso

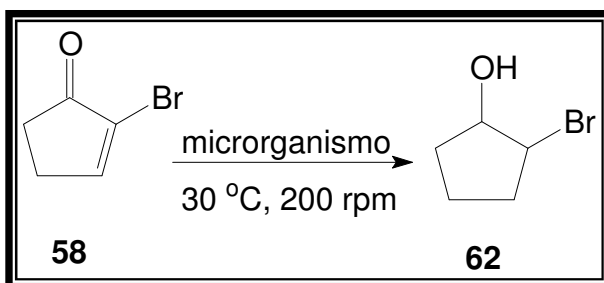


Esquema 42. Biorredução de **52** utilizando *S. cerevisiae*, *R. glutinis* e *P. stipitis* em meio aquoso.

Utilizando o procedimento descrito no item 4.10. para a redução de **52**, obteve-se a haloidrina 2-cloro-cicloexanol **56** que foi analisada por cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massas. Os dados referentes aos experimentos estão apresentados na Tabela 13, p. 69.

Fórmula molecular: $C_6H_{11}ClO$; CG/EM (IE, 70 eV) m/z (int. relativa): 57 (100); 69 (8); 80 (41); 88 (17); 96 (10); 106 (1); 116 (5); 134 (M^+ , 12); 136 (5).

4.10.3. Redução do 2-bromo-2-ciclopenten-1-ona **58** em meio aquoso

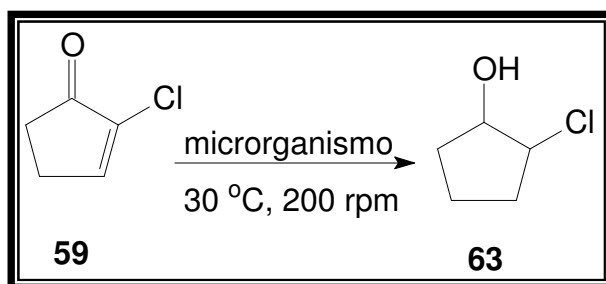


Esquema 43. Biorredução de **58** utilizando *S. cerevisiae*, *R. glutinis* e *P. stipitis* em meio aquoso.

Utilizando o procedimento descrito no item 4.10. para a redução de **58**, obteve-se a halodrina 2-bromo-ciclopentanol **62** que foi analisada por cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massas. Os dados referentes aos experimentos estão apresentados na Tabela 14, p. 71.

Fórmula molecular: C_5H_9BrO ; CG/EM (IE, 70 eV) m/z (int. relativa): 57 (100); 67 (23); 85 (20); 136 (2); 146 (1); 164 (M^+ , 13); 166 (2).

4.10.4. Redução do 2-cloro-2-ciclopenten-1-ona **59** em meio aquoso



Esquema 44. Biorredução de **59** utilizando *S. cerevisiae*, *R. glutinis* e *P. stipitis* em meio aquoso.

Utilizando o procedimento descrito no item 4.10. para a redução de **59**, obteve-se a halodrina 2-cloro-ciclopentanol **63** que foi analisada por cromatografia

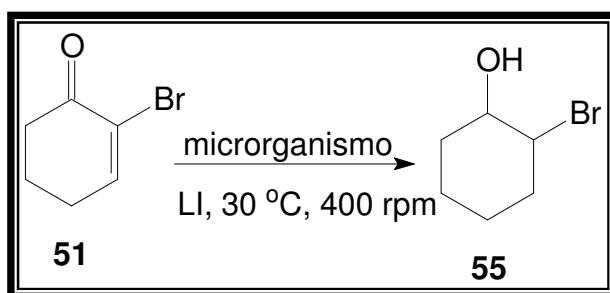
gasosa acoplada ao espectrômetro de massas. Os dados referentes aos experimentos estão apresentados na Tabela 14, p. 71.

Fórmula molecular: $C_5H_{11}ClO$; CG/EM (IE, 70 eV) m/z (int. relativa): 57 (100); 67 (16); 75 (1); 83 (3); 91 (3); 102 (13); 120 (M^{+} , 7); 122 (3).

4.11. Procedimento geral para a redução de 2-bromo-2-cicloexen-1-ona **51**, 2-cloro-2-cicloexen-1-ona **52**, 2-bromo-2-ciclopenten-1-ona **58** e 2-cloro-2-ciclopenten-1-ona **59** com *Rhorotorula glutinis*, *Pichia stipitis* e *Saccharomyces cerevisiae* liofilizado utilizando sistema bifásico

Em Erlenmeyers de 125 mL contendo de 20 mL de células pré-cultivadas de *R. glutinis*, *P. stipitis* e *S. cerevisiae* foram adicionados 20 mg do substrato a ser reduzido, dissolvidos em 1 mL de LI. A mistura resultante foi mantida sob agitação orbital a 400 rpm por 24 horas e à temperatura de 30 °C. O líquido iônico foi separado da fase aquosa e o produto foi extraído com éter diisopropílico (3X5 mL), sendo a fase orgânica seca com sulfato de sódio anidro. Foram realizadas análises por cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massas e observada a formação das haloidrinas **55**, **56**, **62** e **63**. Não foi possível realizar as análises por RMN 1H e ^{13}C por não terem sido obtidos os produtos purificados.

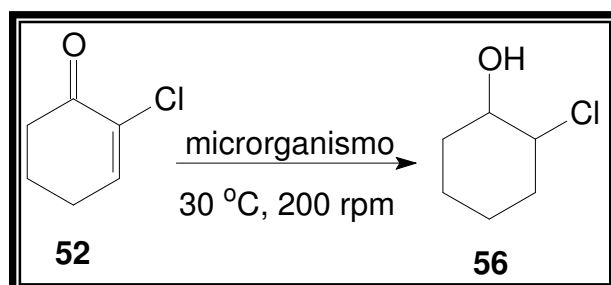
4.11.1. Redução do 2-bromo-2-cicloexen-1-ona **51** em sistema bifásico



Esquema 45. Biorredução de **51** utilizando *S. cerevisiae*, *R. glutinis* e *P. stipitis* em sistema bifásico.

Utilizando o procedimento descrito no item 4.11. para a redução de **51**, obteve-se a haloidrina 2-bromo-cicloexanol **55** que foi analisada por cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massas, conforme descrito no item 4.10.1. Os dados referentes aos experimentos estão na Tabela 13, p. 69.

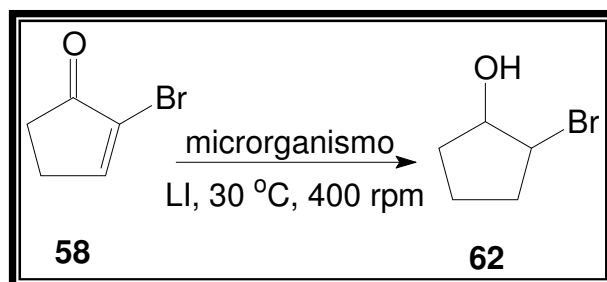
4.11.2. Redução do 2-cloro-2-cicloexen-1-ona **52** em sistema bifásico



Esquema 46. Biorredução de **52** utilizando *S. cerevisiae*, *R. glutinis* e *P. stipitis* em sistema bifásico.

Utilizando o procedimento descrito no item 4.11. para a redução de **52**, obteve-se a haloidrina 2-bromo-cicloexanol **56** que foi analisada por cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massas, conforme descrito no item 4.10.2. Os dados referentes aos experimentos estão na Tabela 13, p. 69.

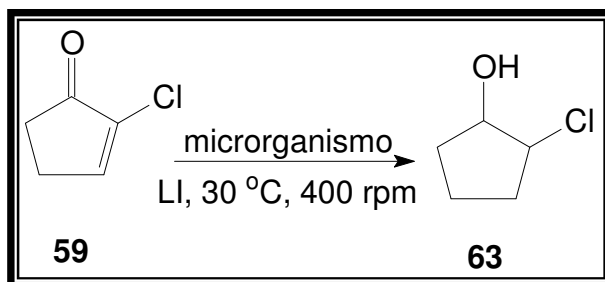
4.11.3. Redução do 2-bromo-2-ciclopenten-1-ona **58** em sistema bifásico



Esquema 47. Biorredução de **58** utilizando *S. cerevisiae*, *R. glutinis* e *P. stipitis* em sistema bifásico.

Utilizando o procedimento descrito no item 4.10. para a redução de **58**, obteve-se a haloidrina 2-bromo-ciclopentanol **62** que foi analisada por cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massas, conforme descrito no item 4.10.3. Os dados referentes aos experimentos estão na Tabela 14, p. 71.

4.11.4. Redução do 2-cloro-2-ciclopenten-1-ona **59** em sistema bifásico



Esquema 48. Biorredução de **59** utilizando *S. cerevisiae*, *R. glutinis* e *P. stipitis* em sistema bifásico.

Utilizando o procedimento descrito no item 4.10. para a redução de **59**, obteve-se a haloidrina 2-cloro-ciclopentanol **63** que foi analisada por cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massas, conforme descrito no item 4.10.4. Os dados referentes aos experimentos estão na Tabela 14, p. 71.

4.12. Teste de inibição das α -haloenonas frente aos microrganismos

Foram preparadas placas de Petri com o meio YMA, como descrito no item 4.5. Os meios contendo os microrganismos foram previamente inoculados por um período de 24 horas, em 10 mL de meio YM (item 4.5.) e, em uma capela de fluxo laminar, foram aplicados e espalhados, com auxílio de uma alça de Drigalski, 100 μ L de uma dispersão de cada microrganismo, em placas distintas e, em seguida, foram colocados 8 discos feitos com papel de filtro estéreis contendo 10 μ L de uma solução 1 mg/mL (concentração de trabalho) do composto a ser analisado, em acetato de etila, na seguinte ordem : **(1)** 3-oxo-3-fenilpropanoato de etila; **(2)**

(*Z*)-3-cloro-4-fenil-3-buten-2-ona; **(3)** (*Z*)-bromo-4-fenil-3-buten-2-ona; **(4)** 3-oxo-3-(4-nitrofenil)-propanoato de etila; **(5)** (*E/Z*)-2-hidroxiimino-3-(4-nitrofenil)-3-oxopropanoato de etila; **(6)** *E*-2-metoxiimino-3-oxopropanoato de etila; **(7)** AcOEt; **(8)** [BMIM][PF₆]. As placas foram mantidas por 24 horas de incubação a 30 °C (Figura 46).

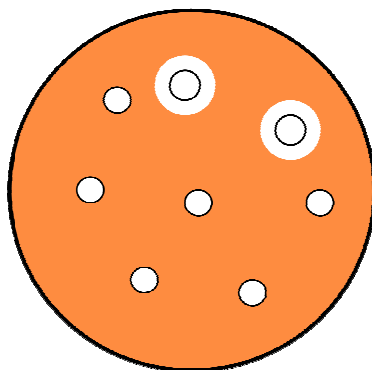


Figura 46. Leitura do teste de difusão em disco (halo de inibição).

4.13. Determinação da concentração das α -haloenonas pela absorção das soluções na região do UV-visível

Os espectros de absorção na região do UV-vísível das soluções aquosas (2 mg/mL) de (*Z*)-**38** (Figura 47), (*Z*)-**39** (Figura 48) e LI (Figura 49), foram obtidos. Verificou-se que as soluções de (*Z*)-**38** e (*Z*)-**39** absorviam no comprimento de onda próximo à região de 295 nm, enquanto que o mesmo não acontece com o LI (Figura 50). Portanto, esse comprimento de onda foi escolhido para se determinar a concentração de (*Z*)-**38** e (*Z*)-**39** na fase aquosa, através de curvas de calibração de absorbância *versus* concentração.

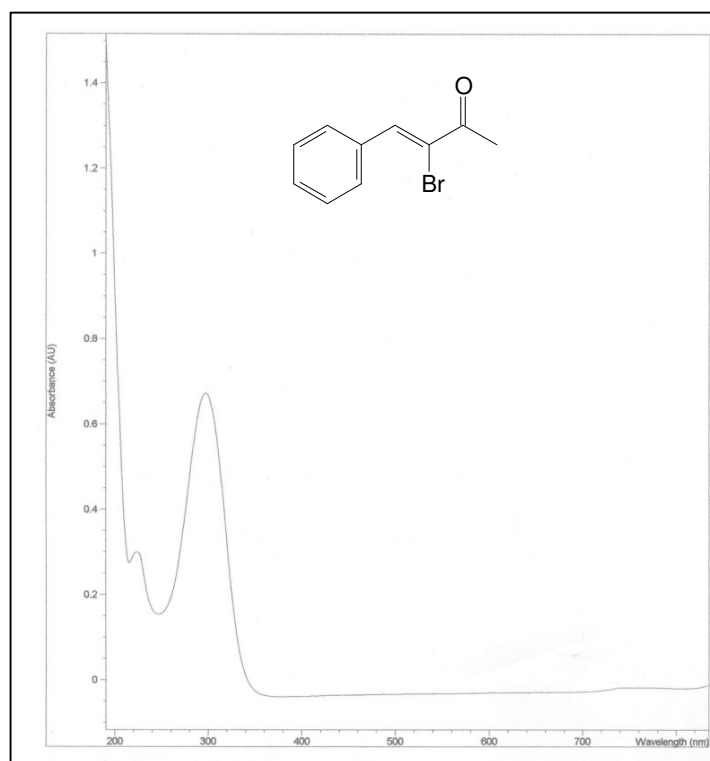


Figura 47. Espectro de absorbância da solução aquosa de (Z)-38.

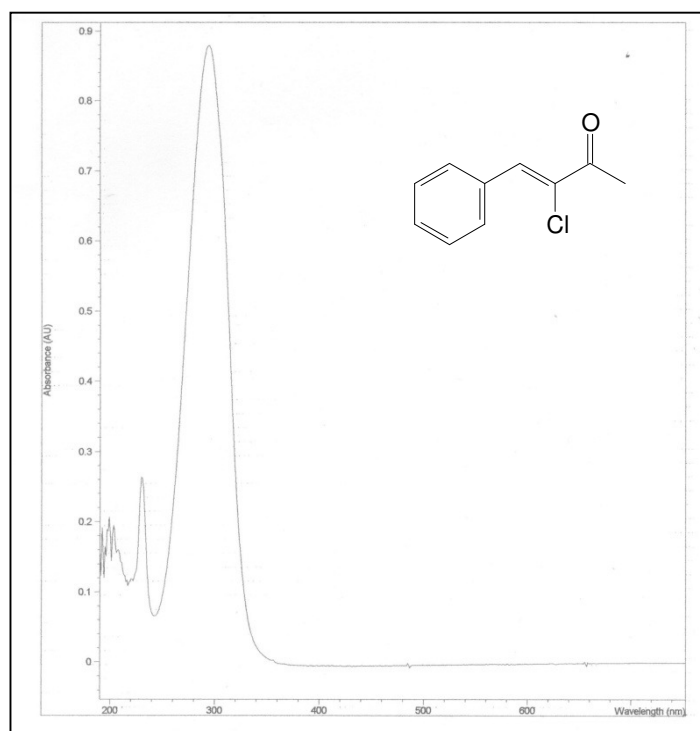


Figura 48. Espectro de absorbância da solução aquosa de (Z)-39.

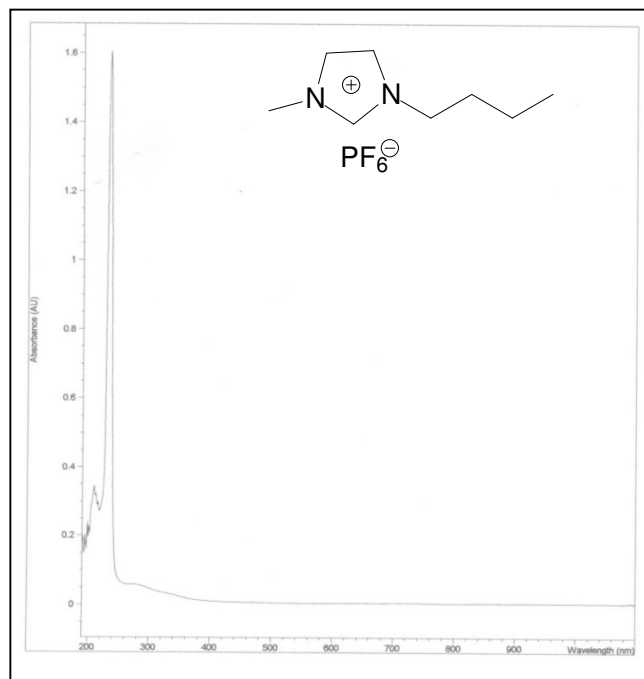


Figura 49. Espectro de absorbância do líquido iônico.

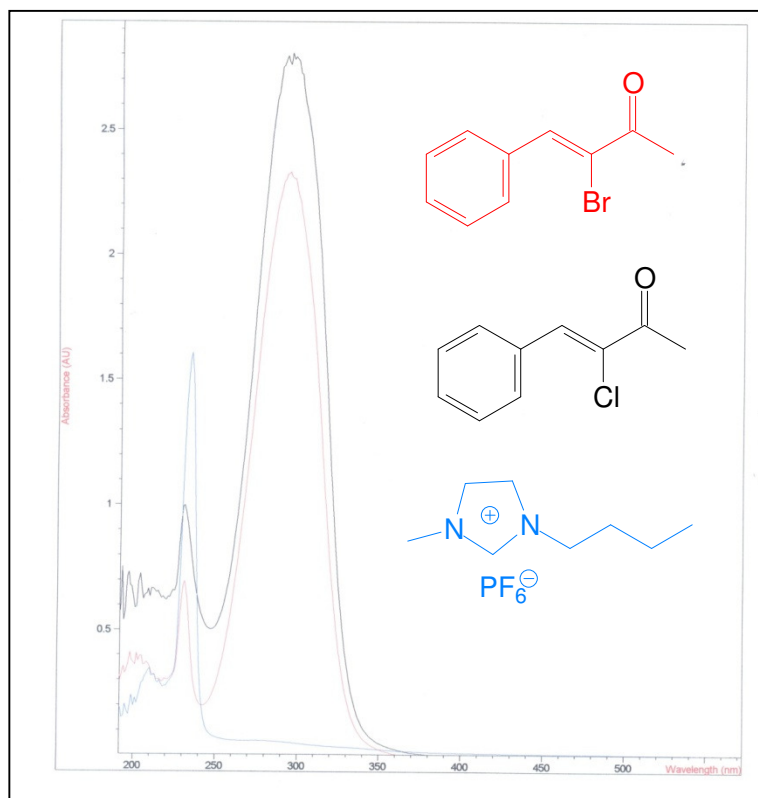


Figura 50. Espectros de absorbância de (Z)-**38**, (Z)-**39** e LI, sobrepostos.

Os dados para a construção das curvas de calibração para (Z)-**38** (Figura 51) e (Z)-**39** (Figura 52) foram construídas a partir de soluções-padrão preparadas em um balão volumétrico de 50 mL, com concentração inicial de 0,2 mg/mL (água/etanol 1:1) para cada composto separadamente e esta solução mãe foi diluída (1:1), sucessivamente, com água/etanol (1:1) até que fosse atingida a condição de linearidade (absorbância < 1).

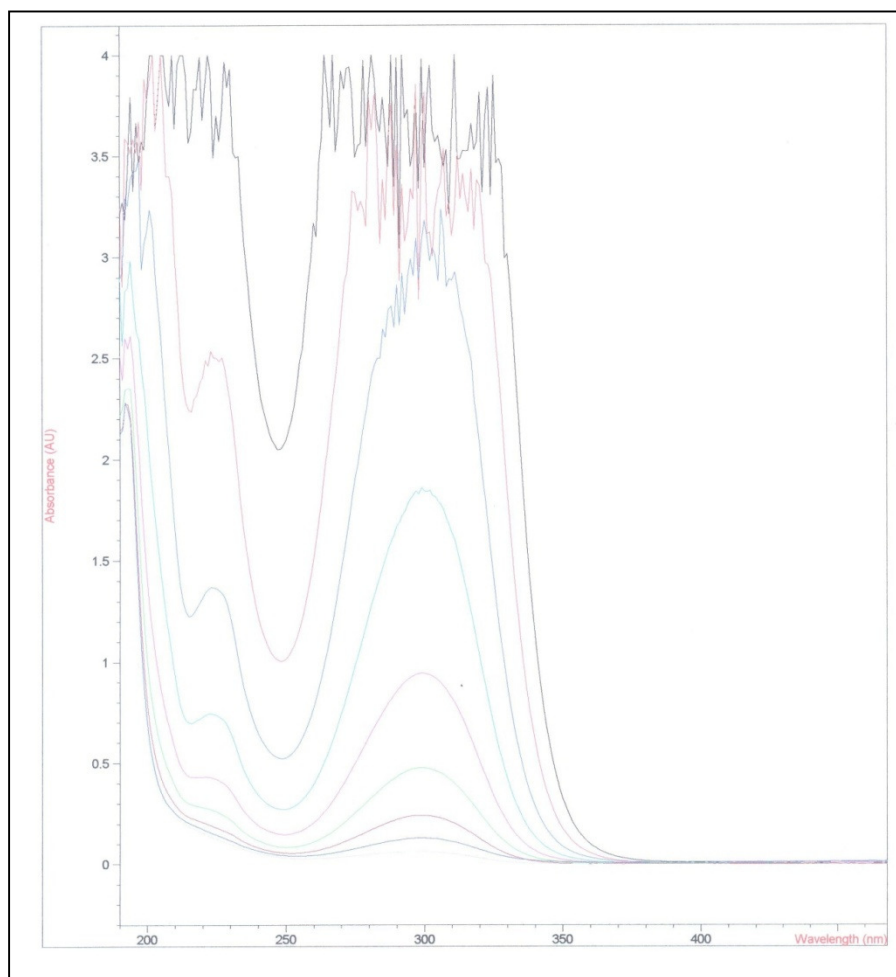


Figura 51. Espectro de absorbância de UV-vísivel das soluções de (Z)-**38** a várias concentrações.

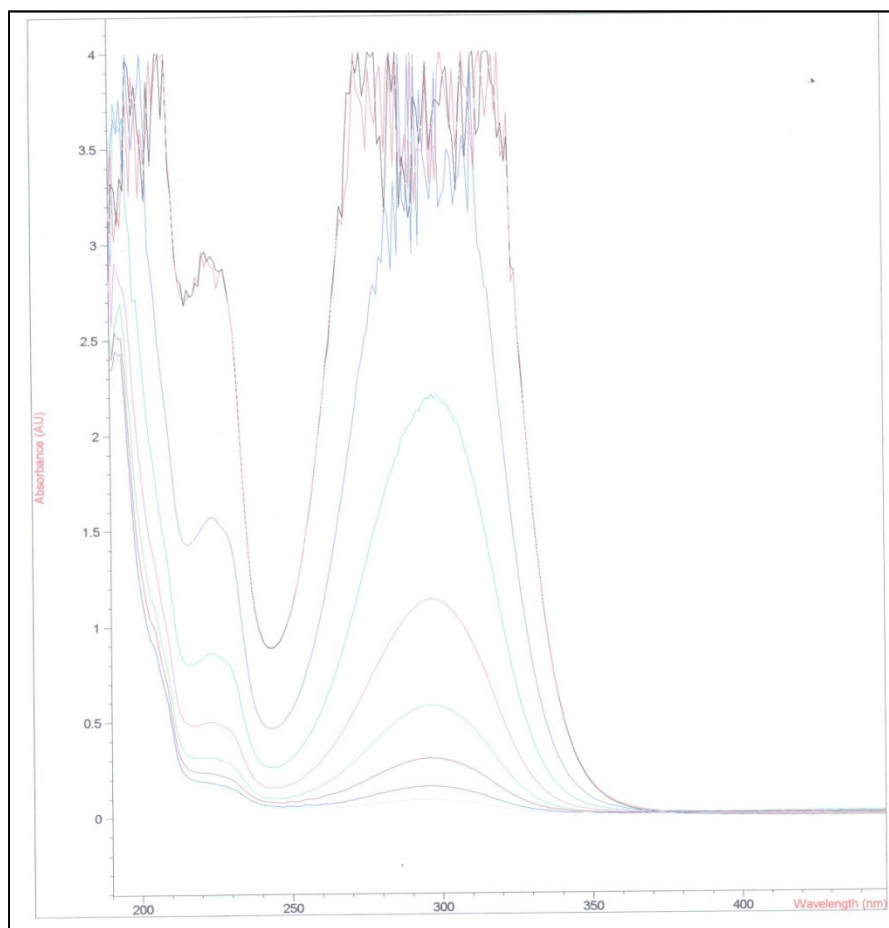


Figura 52. Espectro de absorbância de UV-vísivel das soluções de (Z)-**39** a várias concentrações.

A determinação das concentrações de (Z)-**38** (Figura 53) e (Z)-**39** (Figura 54) na fase aquosa em sistema bifásico foi efetuada simulando os experimentos de biorredução. Os experimentos foram realizados separadamente, pesando 100 mg de substrato, dissolvidos em 1 mL de líquido iônico, em cada erlenmeyer de 250 mL e adicionou-se 100 mL de água. A mistura foi mantida sob agitação orbital de 400 rpm a 30 °C por 24 horas. Após esse período, foi retirada uma alíquota da fase aquosa e determinada a absorbância no UV-vísivel, efetuando 5 diluições (1:1) para cada amostra, a fim de se determinar corretamente as concentrações de (Z)-**38** e (Z)-**39** nas curvas de calibração.

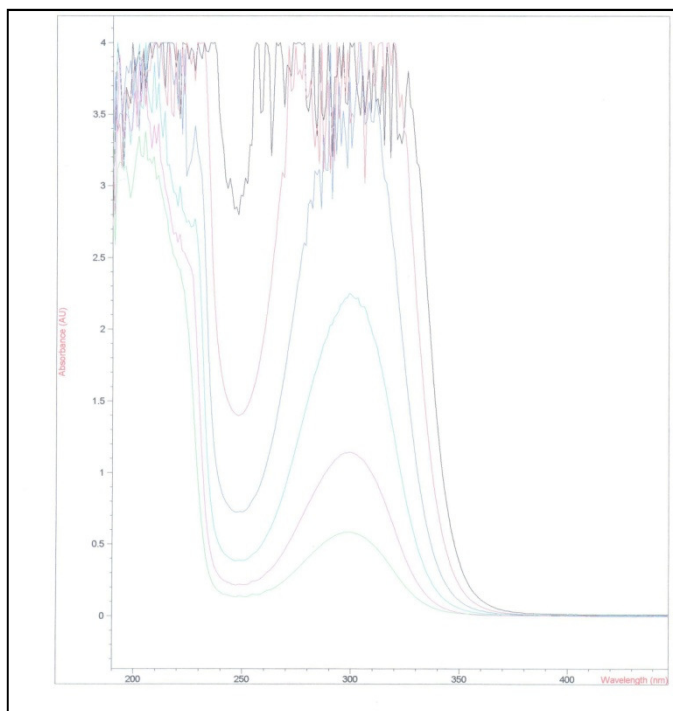


Figura 53. Espectro de absorbância de UV-vísivel da fase aquosa contendo (Z)-38 em 18 horas.

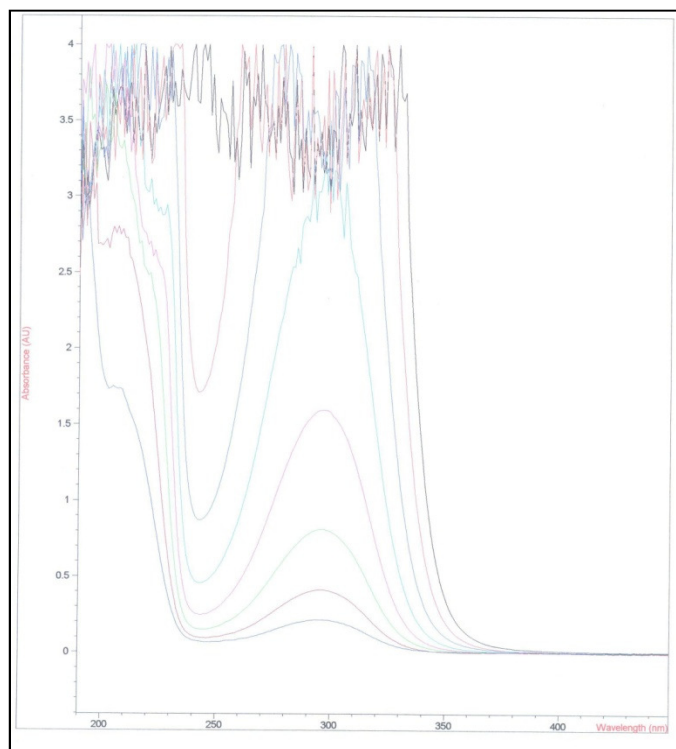


Figura 54. Espectro de absorbância de UV-vísivel da fase aquosa contendo (Z)-39 em 18 horas.

4.14. Contagem de células viáveis

4.14.1. Semeadura por espalhamento

O método de contagem de células viáveis é realizado para quantificar certa amostra por meio de diluições, para que se obtenha um número apropriado de colônias. Desta maneira, em 10 mL de meio YM (solução original), foram cultivadas células dos microrganismos por um período de 24 horas a 30 °C. Foram preparados 6 tubos Falcon contendo 9 mL do mesmo meio de incubação estéril (YM). A seguir, dentro de uma capela de fluxo laminar, foram abertos todos os tubos e, no tubo de número 1, foi colocado 1 mL da solução original, resultando na primeira diluição com um volume final de 10 mL. No tubo número 2 foi adicionado 1 mL proveniente do tubo número 1 e assim, sucessivamente, foram realizadas seis diluições. Após as devidas diluições, para cada tubo Falcon foram previamente preparadas placas de Petri contendo o meio YMA e, em cada placa, aplicou-se 100 µL, que foram espalhados com o auxílio de uma alça de Drigalski. As placas de Petri foram incubadas por 24 horas a 30 °C. A Figura 55 ilustra de forma explicativa o procedimento realizado.

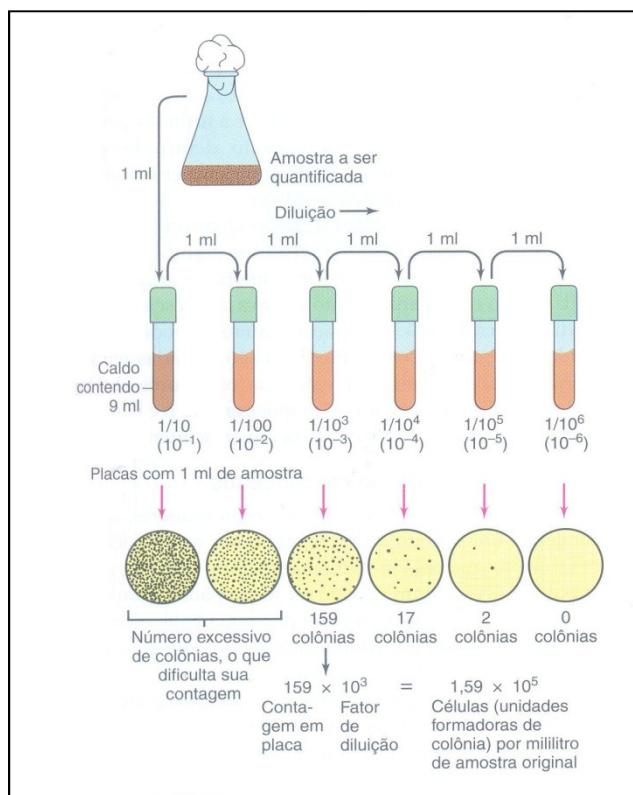


Figura 55. Procedimento de contagem de células viáveis por meio de diluições.

4.15. Análises Instrumentais

4.15.1. Espectrometria de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN de ^1H e ^{13}C)

Os espectros de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) foram obtidos nos espectrômetros Bruker 250 Advance II (250 MHz para ^1H e 62,5 MHz para ^{13}C) e Varian INOVA 500 (500 MHz para ^1H e 125 MHz para ^{13}C). Os deslocamentos químicos (δ) de hidrogênio foram registrados em ppm, utilizando como referência o tetrametilsilano (TMS, $\delta = 0,00$ para ^1H) e os deslocamentos químicos (δ) de carbono foram registrados em ppm, utilizando como referência o clorofórmio deuterado (CDCl_3 , $\delta = 77,00$). Para o DMSO deuterado os deslocamentos químicos (δ) de hidrogênio foram registrados em ppm, utilizando como referência o tripleto em $\delta = 2,55$ para ^1H e os deslocamentos químicos (δ) de carbono foram registrados em ppm, utilizando como referência o quinteto em $\delta = 39,50$. As

análises foram efetuadas pesando-se de 15 a 20 mg das amostras e estas foram diluídas em 0,5 mL do solvente deuterado.

4.15.2. Cromatografia Gasosa Acoplada ao Espectrômetro de Massas – CG/EM

As análises por CG/EM foram realizadas em um cromatógrafo gasoso modelo GC/MS-QP 5000- Shimadzu acoplado a um detector de massas contendo uma fonte de ionização por impacto de elétrons com energia de ionização de 70 eV e/ou em outro cromatógrafo, um Agilent acoplado a detector de massas HP 5973, também operando com uma fonte de ionização por impacto de elétrons com energia de ionização de 70 eV. Foi utilizada uma coluna capilar HP-5 MS (30m x 0,25mm x 0,25µm, 5% fenilsiloxano). O cromatógrafo operou com fluxo constante de He (1mL/min), temperatura do injetor a 230^oC e detector a 280 ^oC.

4.15.2.1 Métodos para determinação das haloenonas, halocetonas, haloidrinas e epóxidos

M1 - rampa: 80 °C/3 min (30 °C/min) a 290 °C/3 min

M2 - rampa: 80 °C/3 min (25 °C/min) a 290 °C/3 min

M3 - rampa: 80 °C/3 min (20 °C/min) a 290 °C/3 min

4.15.2.2. Métodos para determinação das ciclohaloenonas, ciclohalocetonas, ciclohaloidrinas

M4 - rampa: 50°C/3 min (40 °C/min) a 290 °C/3 min

M5 - rampa: 50°C/3 min (30 °C/min) a 290 °C/3 min

4.15.3. Cromatografia Gasosa Acoplada ao Detector por Ionização de Chama – CG/DIC

As análises por CG/DIC foram realizadas em um cromatógrafo gasoso modelo Agilent Technologies 6850, utilizando uma coluna capilar quiral Hidrodex (30m x 0,25mm x 0,25 μ m). O cromatógrafo operou com fluxo constante de H₂ (1mL/min), temperatura do injetor a 200^oC e detector a 220 ^oC.

4.15.3.1. Métodos para determinação das haloenonas, halocetonas e haloidrinas

M6 - rampa: 80 ^oC (0,5 ^oC/ mim), 180 ^oC/5 min

M7 - rampa: 80 ^oC (1 ^oC/ mim), 180 ^oC/5 min

M8 - rampa: 80 ^oC (2 ^oC/ mim), 180 ^oC/5 min

M9 - rampa: 80 ^oC (2 ^oC/ mim), 150 ^oC (30 ^oC/ mim), 180 ^oC/5 min

4.15.4. Métodos Cromatográficos

As cromatografias em coluna para os substratos orgânicos foram realizadas com sílica gel flash 230-400 mesh Merck com gradiente de eluição hexano/acetato de etila.

As placas cromatográficas em camada delgada preparativa (CCDP) foram preparadas com sílica gel G (15g) Merck com 1 mm de espessura, sobre placas de vidro de 20 X 20 cm.

As placas cromatográficas em camada delgada preparativa (CCDP) foram preparadas com sílica gel G (15g) Merck com 10 % de AgNO₃, sobre placas de vidro de 20 X 20 cm, com espessura de 1 mm.

Todas as reações e purificações foram acompanhadas por cromatografia em camada delgada (CCD) através de cromoplasmas de 3 cm X 4 cm Merck, suportada em alumínio com filme de sílica gel 60 F₂₅₄.

A detecção dos compostos nas placas cromatográficas foi realizada utilizando-se irradiação ultravioleta no equipamento Spectroline modelo ENF-260C, com irradiação no comprimento de onda (λ) 254 nm.

A revelação das placas de CCD foi realizada com uma solução de ácido sulfúrico em metanol.

4.15.5. Espectrofotometria no ultravioleta-vísivel (UV-VIS)

Os espectros no ultravioleta foram obtidos em um espectrofotômetro Agilent, modelo 8453 com arranjo de diodos.

4.15.6. Espectrofotometria no infravermelho (IV)

Os espectros no infravermelho foram obtidos em um aparelho Bomem MB-series FTIR-Hartmann & Braun Michelson, na região de 400 a 4400 cm^{-1} , utilizando partilhas de KBr e NaCl.

4.15.7. Rotação ótica

A determinação dos valores de $[\alpha]_D^{25}$ foram obtidos em um polarímetro 341 Pelkin Elmer, utilizando celas de 1 cm de caminho óptico, sendo as concentrações expressas em g/100 mL.

4.15.8. Procedência de reagentes

Os solventes e reagentes utilizados foram adquiridos comercialmente das marcas Synth®, Aldrich® e Merck®.

CONCLUSÕES

5. Conclusões

As biorreduções de (Z)-**38** e (Z)-**39** utilizando fermento de pão como biocatalisador foram bem sucedidas, levando à formação das haloidrinas correspondentes com rendimentos de 85 e 75 % e excessos enantioméricos de 89 e 77 %. A determinação da configuração das haloidrinas obtidas, juntamente com as respostas de alguns testes realizados, permitiu a elaboração de uma proposta de mecanismo, onde a ligação C=C é reduzida antes da redução da ligação C=O.

A utilização de *P. stipitis* como biocatalisador em meio aquoso levou à formação do produto desalogenado 4-fenil-2-butanona após 72 horas de reação. A mistura reacional foi então analisada em função do tempo e verificou-se que as α -halocetonas são formadas como intermediários. A adição de DNB, utilizado como inibidor de processos radicalares, inibiu a formação do produto desalogenado e produziu as correspondentes α -halocetonas e haloidrinas.

Para as reações com a utilização do líquido iônico, os resultados mostraram-se surpreendentes, obtendo-se 77 e 30 % de rendimento e excessos enantioméricos de 98 e 96 % para as haloidrinas **44** e **45** respectivamente. Experimentos realizados levaram a concluir que o efeito do líquido iônico não é o de inibir processos radicalares, como faz o DNB, e sim semelhante ao processo quando se utiliza XAD-7 como suporte para o substrato e produtos, que é chamado de biocatálise extrativa *in situ*.

As biorreduções com *C. albicans*, *G. candidum*, *M. luteus*, *R. glutinis* e *S. cerevisiae* em sistema bifásico formaram haloidrinas com excessos enantioméricos de até 97 %.

Com base no teste dos halos de inibição dos microrganismos, provocados por (Z)-**38** e (Z)-**39**, conclui-se que os mesmos possuem efeitos inibitórios para os biocatalisadores empregados e que a presença do líquido iônico diminui drasticamente a concentração do substrato na fase aquosa, diminuindo assim o efeito de inibição.

As biorreduções das α -halo-ciclohexenonas **51**, **52** e α -halo-ciclopentenonas **58**, **59** são mais reativas que as α -haloenonas (Z)-**38** e (Z)-**39**. Quando utilizou-se

fermento de pão como biocatalisador em meio aquoso obteve-se ciclohaloidrinas com até 99 % de conversão.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

6. Referências bibliográficas

- ¹Mateo, C., Palomo, J. M., Lorente-Fernandez, G., Guisan, J. M., Lafuente-Fernandez, R. *Enzyme Microb. Technol.*, **2007**, 40, 1451-1463.
- ²a) K. Nakamura et al., *Tetrahedron: Asymmetry*, **2003**, 14, 2659–2681. b) Wang, W., Zong, M. H., Lou, W. Y. *J. Mol. Catal. B: Enzymatic*, **2009**, 56, 70–76.
- ³<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/> (acessado em 20 de dezembro de 2010).
- ⁴Voet, D., Voet, J. G., Pratt, C. W. *Fundamentos de Bioquímica*, **2000**, p. 284, Artmed editora S.A.
- ⁵Nelson, D. L., Cox, M. M., Lehninger: *Principles of Biochemistry*, **2000**, 3^a Ed., Worth publishers: New York, cap. 8, pp. 244-292.
- ⁶Madigan, M. F., Martinko, J. M., Parker, J. *Microbiologia de BROCK*, **2004**, 10^a Edição, Pearson Education do Brasil, São Paulo, cap. 5, p. 109.
- ⁷Faber, K. *Biotransformations in Organic Chemistry: A Textbook*. **2004**, 5th Edition, Epringer-Verlag Berlin Heidelberg: New Yourk, cap. 2, pp. 177-180.
- ⁸a) Matsuda, T., Yamanaka, R., Nakamura, K. *Tetrahedron: Asymmetry*, **2009**, 20, 513–557. b) Barros-Filho, A. B., Nunes, F. M., de Oliveira, M. C. F., Lemos, T. L. G., de Mattos, M. C., Gonzalo, G., Gotor-Fernández, V., Vicente, G. *J. Mol. Catal. B: Enzymatic.*, **2010**, 65, 37-40.
- ⁹Nunes, F. M., de Oliveira, M. C. F., Arriaga, A. M. C., Lemos, T. L. G., Andrade-Neto, M., de Mattos, M. C., Mafezoli, J., Viana, F. M. P., Ferreira, V. M., Rodrigues-Filho, E., Ferreira, A. G. *J. Braz. Chem. Soc.*, **2008**, 19, 478–482.
- ¹⁰van Deursen, R., Stampfer, W., Edegger, K., Faber, K., Kroutil, W. *J. Mol. Catal. B: Enzymatic*, **2004**, 31, 159–163.
- ¹¹Fronza, G., Fuganti, C., Mendoza, M., Rallo, R., S., Ottolina, G., Joulain, D. *Tetrahedron*, **1996**, 52, 4041-4052.
- ¹²Kawai, M., Saitou, K., Hayashi, Y., Ohno, A. *Tetrahedron Lett.*, **1998**, 39, 5225-5228.
- ¹³De Carvalho, M., Okamoto, M. T., Moran, P. J. S., Rodrigues, J. A. R. *Tetrahedron*, **1991**, 47, 2073-2080.
- ¹⁴Aleixo, L. M., De Carvalho, M., Moran, P. J. S., Rodrigues, J. A. R. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **1993**, 3, 1637–1642.

- ¹⁵Rocha, L. C., Ferreira, H. V., Pimenta, E. F., Berlinck, R. G. S., Seleguim, M. H. R., Javaroti, D. C. D., Sette, L. D., Bonugli, R. C., Porto, A. L. M. *Biotechnol Lett.*, **2009**, *31*, 1559–1563
- ¹⁶Rocha, L. C., Ferreira, H. V., Pimenta, E. F., Berlinck, R. G. S., Rezende, M. O. O., Landgraf, M. D., Seleguim, M. H. R., Sette, L. D., Porto, A. L. M. *Mar. Biotechnol.*, **2010**, *12*, 552–557.
- ¹⁷Sheldon, R. A. *Adv. Synth. Catal.*, **2007**, *349*, 1289-1307.
- ¹⁸ a) Dalla-Vecchia, R., Nascimento, M. G., Soldi, V. *Quim. Nova*, **2004**, *4*, 623-630. b) Hartmann, M.; Jung, D., *J. Mater. Chem.*, **2010**, *20*, 844-857. c) Fernandez-Lafuente, R. *Enzyme Microb. Technol.*, **2009**, *45*, 405–418.
- ¹⁹Pompeu, D. R. *Adsorção de três famílias de compostos fenólicos em resinas sintéticas macroporosas*. **2007**. Tese de Mestrado - Programa de Pós-Graduação em Ciências e Tecnologia de Alimentos - Universidade Federal do Pará. Belém.
- ²⁰http://labvirtual.eq.uc.pt/siteJoomla/index.php?option=com_content&task=view&id=188&Itemid=450 (acessado em 20 de dezembro de 2010).
- ²¹a) Kallenberg, A., I., Rantwijk, F. V., Sheldon, R. A. *Adv. Synth. Catal.*, **2005**, *347*, 905-926. b) Oliveira, M. W., Hilsdorf, A. W. S., Silva, A. F. S., Oliveira, A. F. *Quím. Nova*, **2009**, *5*, 1134-1138.
- ²² Conceição, G. J. A. Moran, P. J. S. Rodrigues, J. A. R. *Tetrahedron: Asymmetry*, **2003**, *14*, 43-45.
- ²³Moniruzzaman, M., Nakashima, K., Kamiya, N., Goto, M. *Biochem. Eng. J.*, **2010**, *48*, 295-314.
- ²⁴Baron, A. M. *Preparação e caracterização de lipases imobilizadas para utilização em biocatálise*. **2008**. Tese de doutorado - Programa de Pós-Graduação em Química - Universidade Federal do Paraná. Curitiba.
- ²⁵Sheldon, R. A., Lau, R. M., Sorgedraeger, M. J., Rantwijk, F. V., Seddon, K. R. *Green Chem.*, **2002**, *4*, 147-151.
- ²⁶Garcia, S. M. P., *Biocatálise em Meios Não Convencionais: Solventes Orgânicos, Fluidos Supercríticos e Líquidos Iônicos*. **2005**. 136 f. Tese de doutorado - Universidade Nova de Lisboa, Faculdade de Ciências e Tecnologia. Lisboa.
- ²⁷a) www.scopus.com (acessado em 21 de abril 2011); b) Moniruzzaman, M., Nakashima, K., Kamiya, N., Goto, M. *Biochem. Eng. J.*, **2010**, *48*, 295–314.
- ²⁸Sheldon, R. A., *Green Chem.*, **2005**, *7*, 267-278.

- ²⁹Hussain, W., Pollard, D. W., Truppo, M., Lye, G. J. *J. Mol. Catal. B: Enzymatic.*, **2008**, *55*, 19-29.
- ³⁰Cassol, C. C., Ebeling, G., Ferrera, B., Dupont, J. *Adv. Synth. Catal.*, **2006**, *348*, 243 – 248.
- ³¹Romero, A., Santos, A. Tojo, J. and Rodriguez, A. *J. Hazard. Mater.*, **2008**, *151*, 268-273.
- ³²Sheldon, R., *Chem. Commun.*, **2001**, *23*, 2399–2407.
- ³³Ranu, B. C., Banerjee, S. *J. Org. Chem.*, **2005**, *70*, 4517-4519.
- ³⁴Hussain, W., Pollard, D. J., Lye, G. J. *Biocatalysis and Biotransformation*, **2007**, *25*, 443-452.
- ³⁵Cornmell, R. J., Winder, C. L., Schuler, S., Goodacre, R., Stephens, G. *Green Chem.*, **2008**, *10*, 685–691.
- ³⁶Gonzalo, G., Lavandera, I., Durchschein, K., Wurm, D., Faber, K. Kroutil, W. *Tetrahedron: Asymmetry.*, **2007**, *18*, 2541–2546.
- ³⁷Brautigam, S., Meyer, S. B., Botz, D. W. *Tetrahedron: Asymmetry.*, **2007**, *18*, 1883–1887.
- ³⁸Wang, W., Zong, M. H., Lou, W. Y. *J. Biotech.*, **2009**, *143*, 190–197.
- ³⁹Wang, W., Zong, M. H., Lou, W. Y. *J. Mol. Catal. B: Enzymatic*, **2009**, *56*, 70–76.
- ⁴⁰Acetti, D., Brenna, E., Fuganti, C., Gatti, F. G., Serra, S. *Eur. J. Org. Chem.*, **2010**, 142–151.
- ⁴¹Howarth, J., James, P., Dai, J. *Tetrahedron Lett.*, **2001**, *42*, 7517–7519.
- ⁴²Pavlidis, I. V., Tzafestas, K., Stamatis, H. *Biotechnol. J.*, **2010**, *5*, 805–812.
- ⁴³Pilissão, C., Nascimento, M. G., *Tetrahedron: Asymmetry.*, **2006**, *17*, 428-433.
- ⁴⁴Furniss, B. S., Hannaford, A. J., Rogers, V., Smith, P. W. G., Tatchell, A. R. *Vogel's: Textbook of practical organic chemistry*, **1978**, 4th edition, Longman, New York, p. 794.
- ⁴⁵Banks, J. C., Van Mele, D. and Frost, C. G. *Tetrahedron Lett.*, **2006**, *47*, 2863-2866.
- ⁴⁶Miller, M., L'abbé, G., Hassner, A. *J. Amer. Chem. Soc.*, **1971**, *93*:4, 981-985.

⁴⁷Besse, P., Renard, M. F., Veschambre, H. *Tetrahedron: Asymmetry.*, **1994**, *5*, 1249-1268.

⁴⁸Prelog, V. *Pure. Appl. Chem.*, **1964**, *9*, 119-130.

⁴⁹Utaka, M., Konishi, S., Takeda, A. *Tetrahedron Lett.*, **1986**, *27*, 4737-4740.

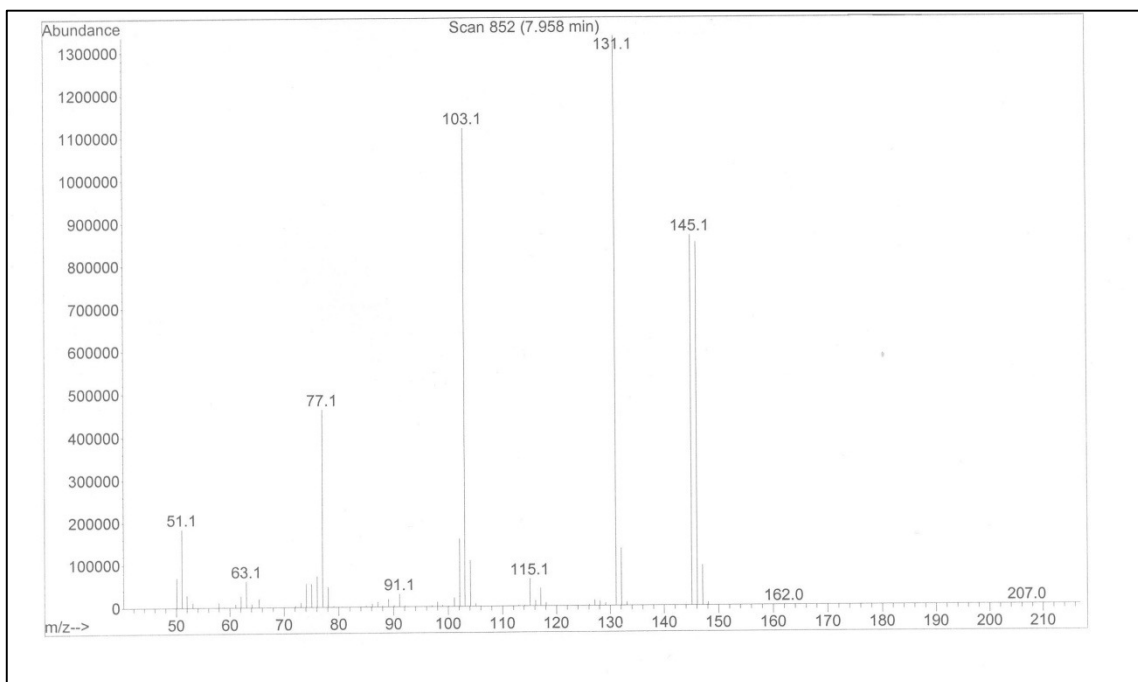
⁵⁰ Moran, P., J., S., Rodrigues, J., A., R., Joeke, I., Brenelli, E., C., S., Leite, R. A. *Biocatalysis*, **1994**, *9*, 321-325.

⁵¹a) Ohno, A., Kito, N. *Chem. Lett.*, **1972**, 369. b) Ohno, A., Yamamoto, H., Oka, S., *J. Am. Chem. Soc.*, **1981**, *103*, 2041. c) Tanner, D. D., Chen, J. J., Chen, L., Luelo, C. *J. Am. Chem. Soc.*, **1991**, *114*, 8074.

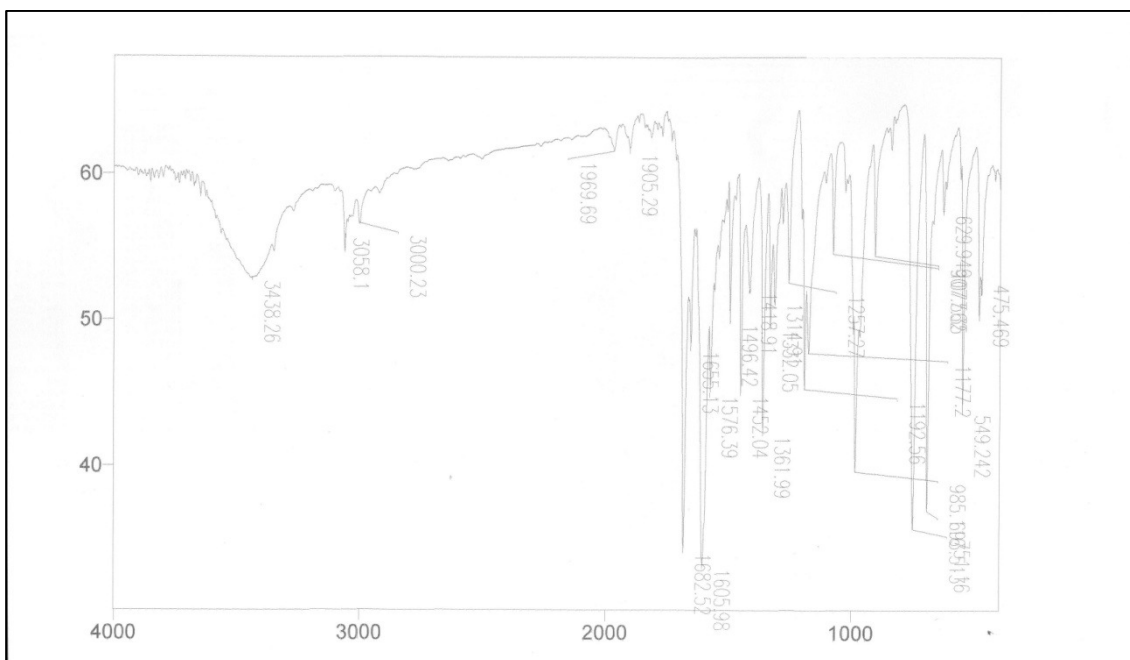
⁵²Pfander, H., Amidjojo, M., Kragl, U. e Weuster-Botz, D. *Angew. Chem. Int., Ed.*, **2004**, *43*, 4529 –4531.

ANEXOS

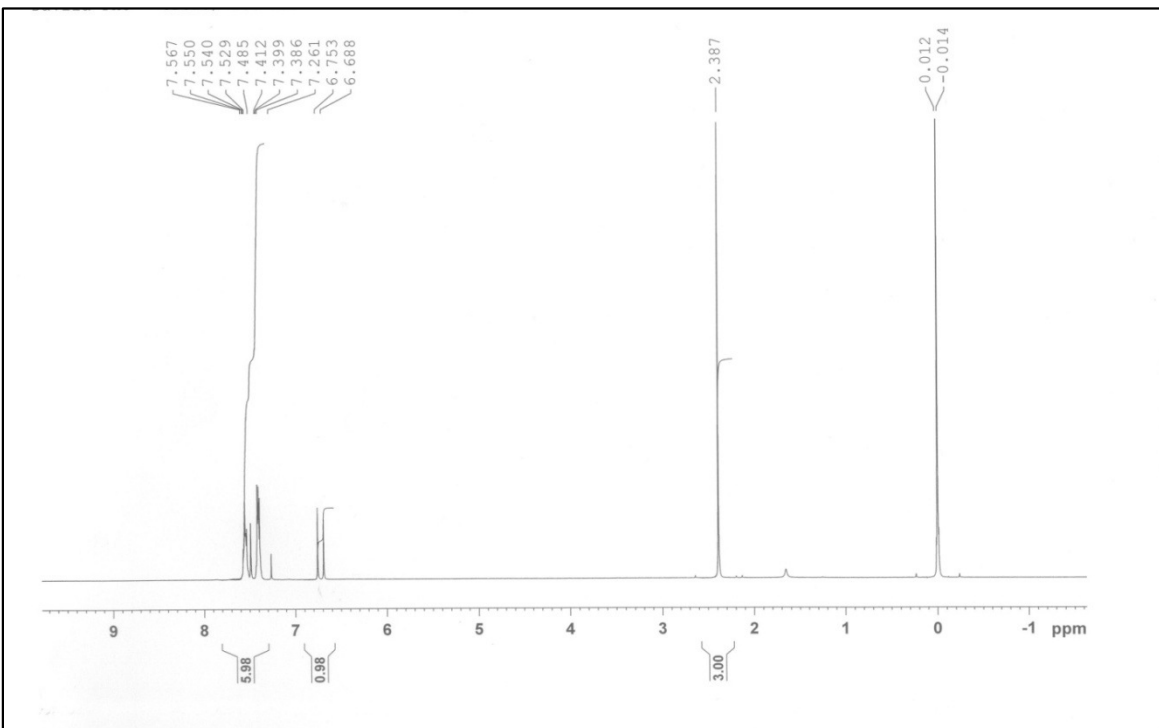
7. Anexos



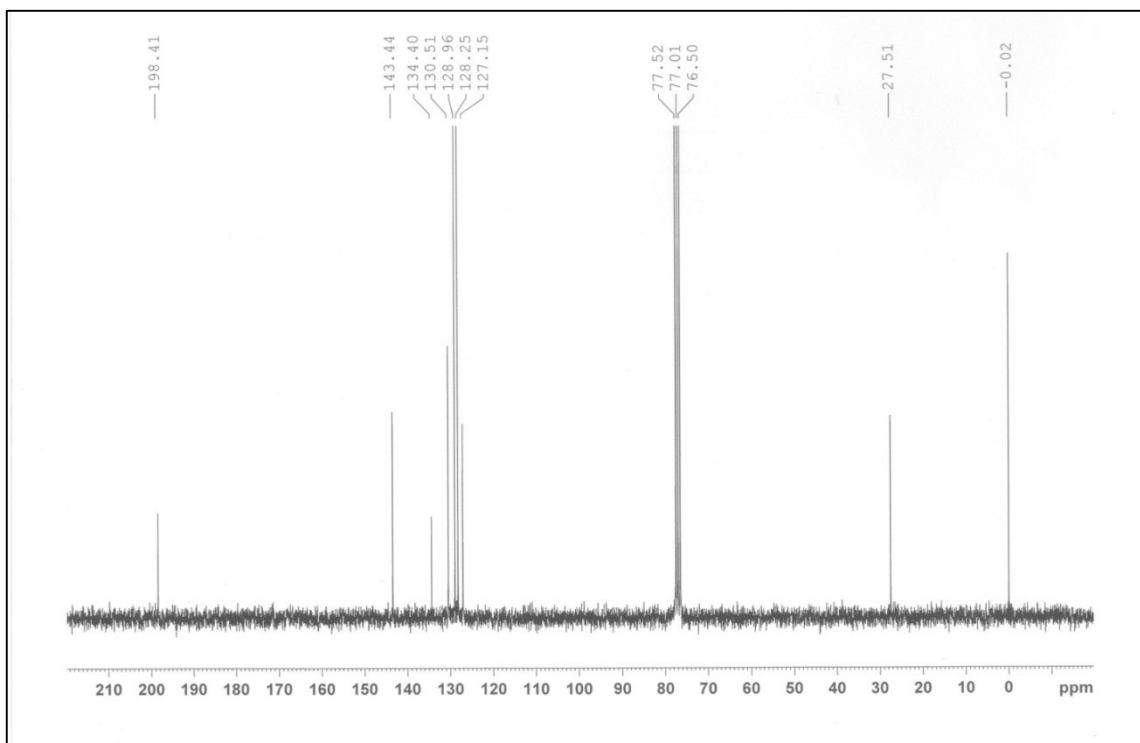
E01. Espectro de massas obtido por ionização de elétrons (70 eV) do 4-fenil-3-buten-2-ona **36**.



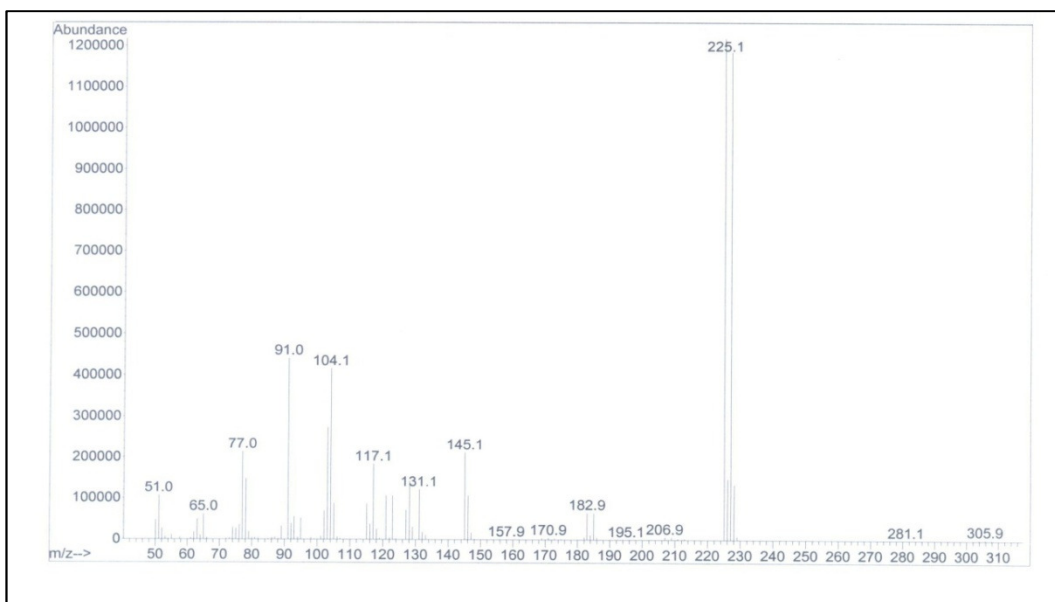
E02. Espectro de Infravermelho (NaCl) do 4-fenil-3-buten-2-ona **36**.



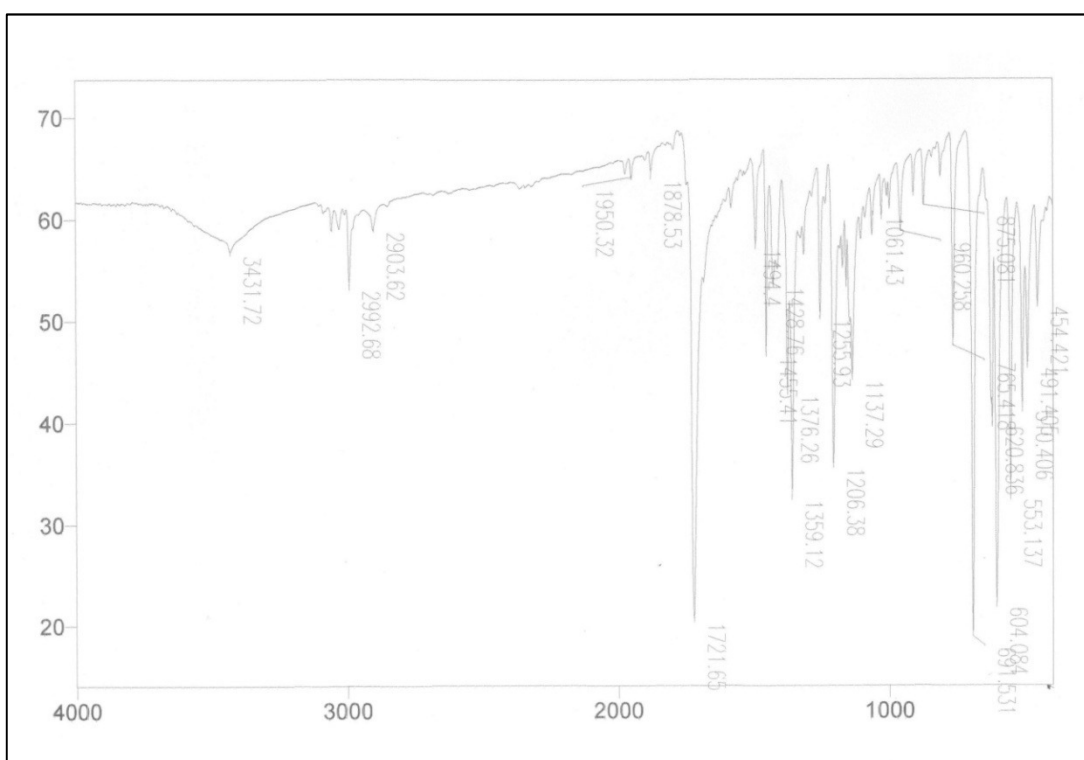
E03. Espectro de RMN ¹H (250 MHz, CDCl₃) do 4-fenil-3-buten-2-ona **36**.



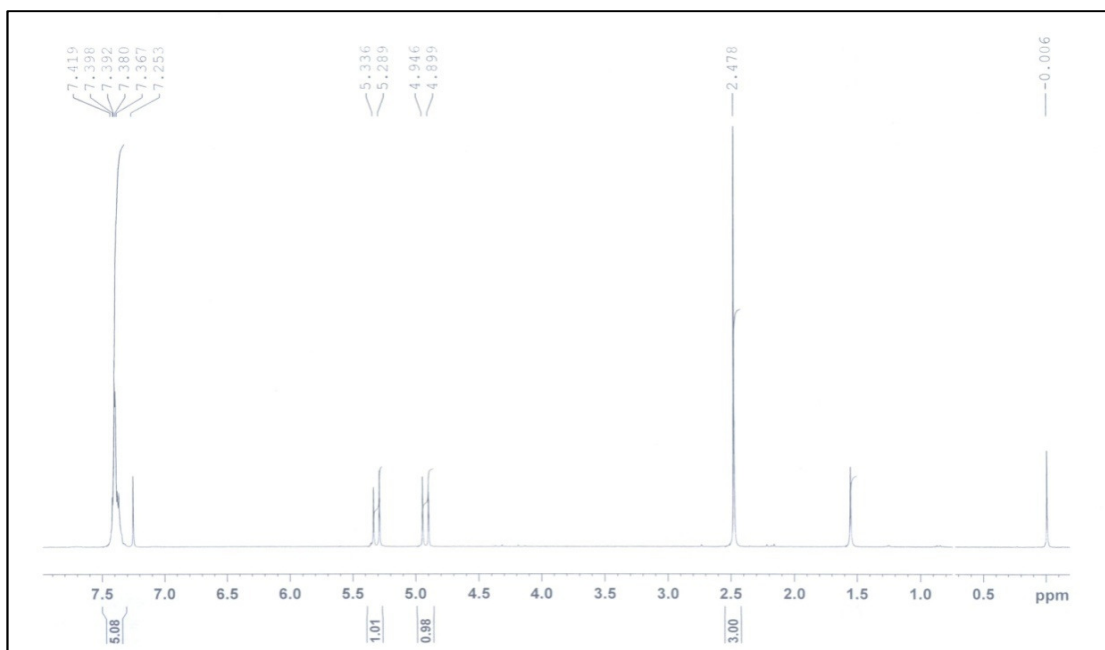
E04. Espectro de RMN ¹³C (62.5 MHz, CDCl₃) do 4-fenil-3-buten-2-ona **36**.



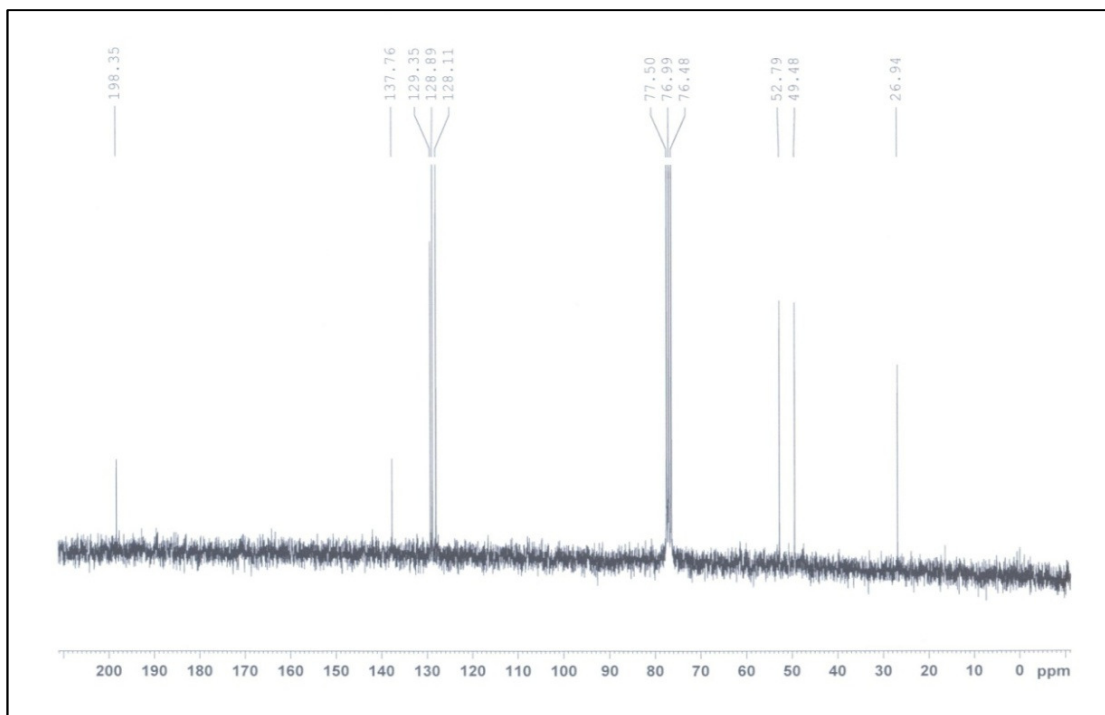
E05. Espectro de massas obtido por ionização de elétrons (70 eV) do 3,4-dibromo-4-fenil-2-butanona **37**.



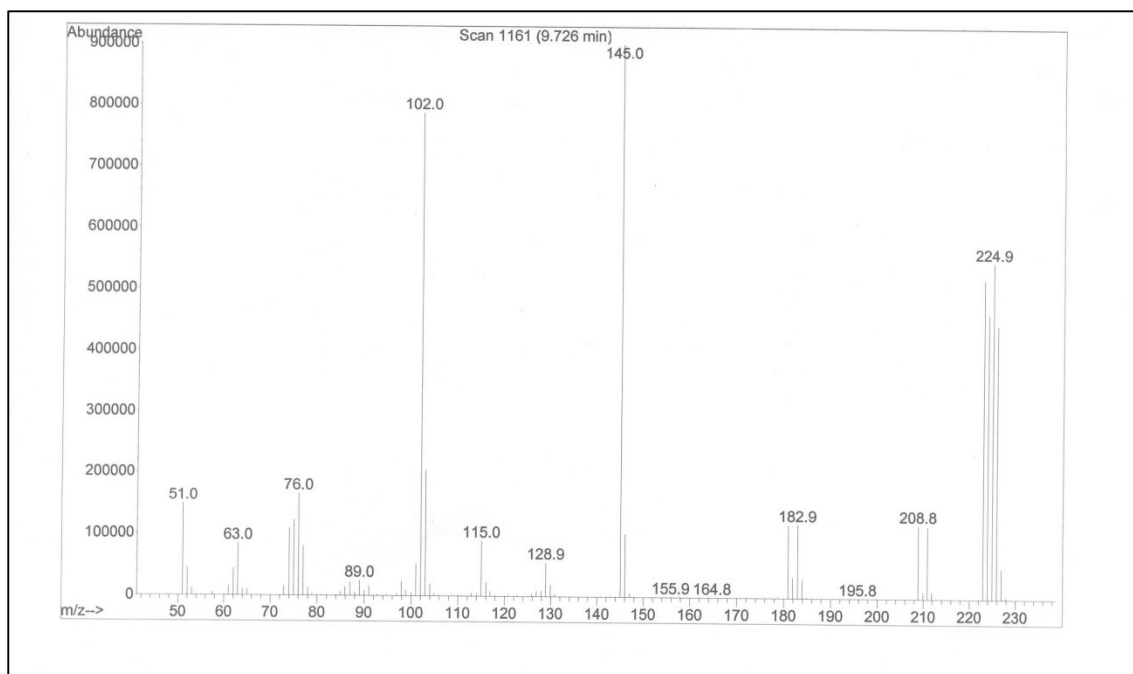
E06. Espectro de Infravermelho (KBr) do 3,4-dibromo-4-fenil-2-butanona **37**.



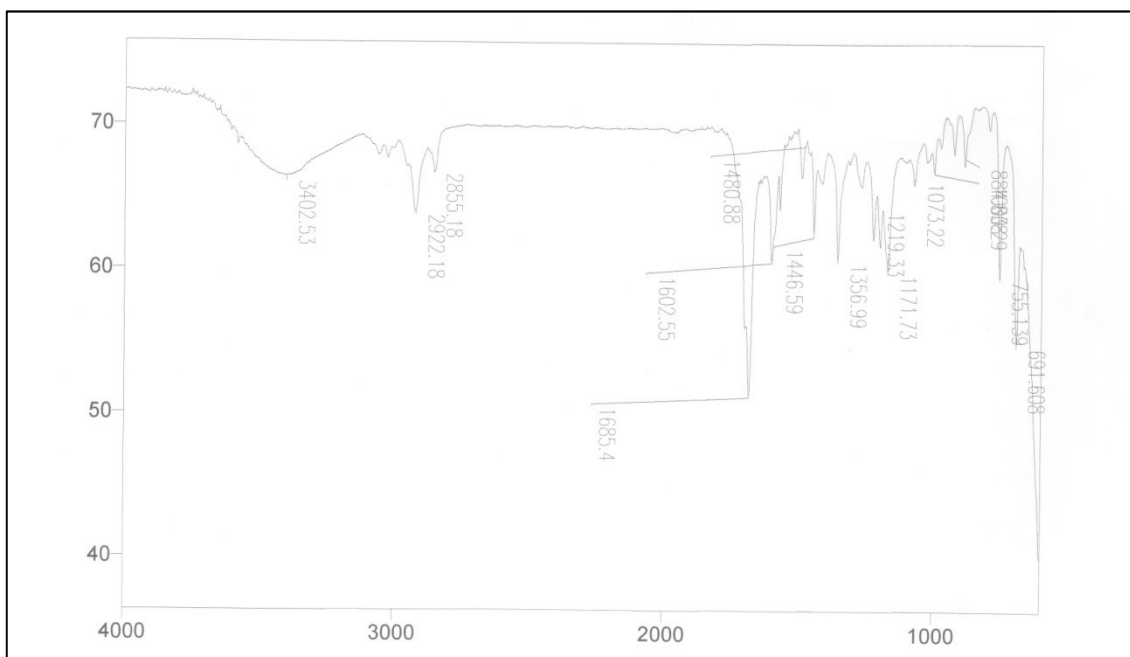
E07. Espectro de RMN ¹H (250 MHz, CDCl₃) do 3,4-dibromo-4-fenil-2-butanona **37**.



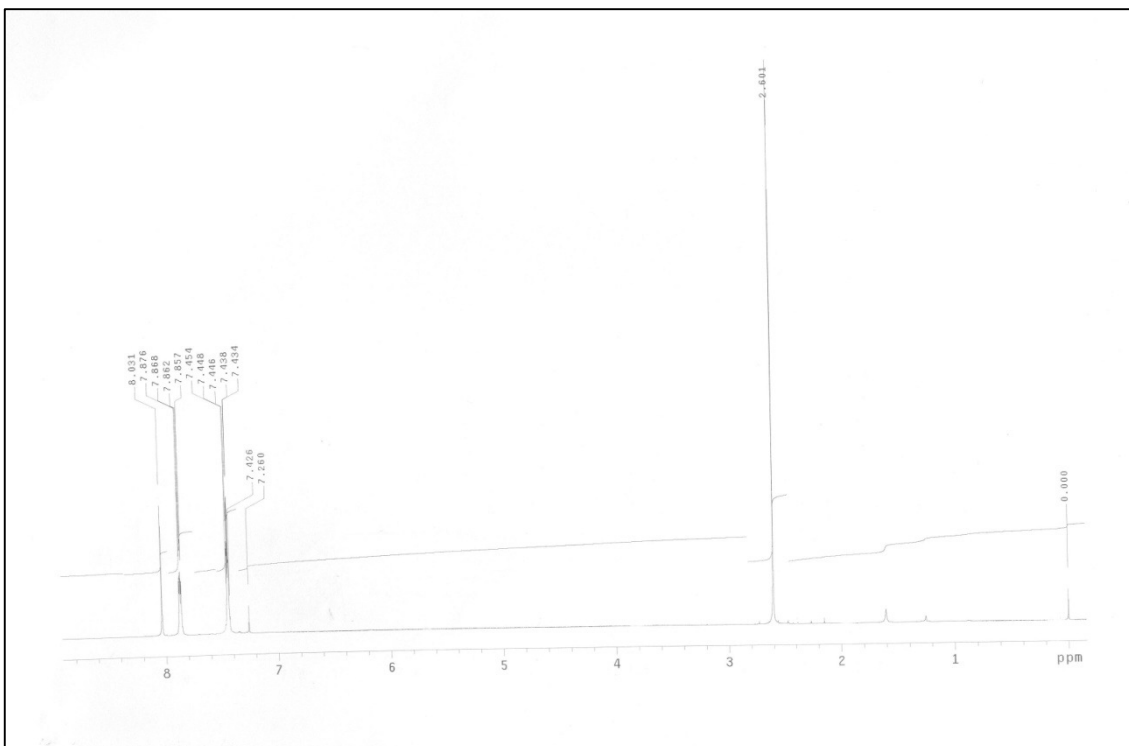
E08. Espectro de RMN ¹³C (62.5 MHz, CDCl₃) do 3,4-dibromo-4-fenil-2-butanona **37**.



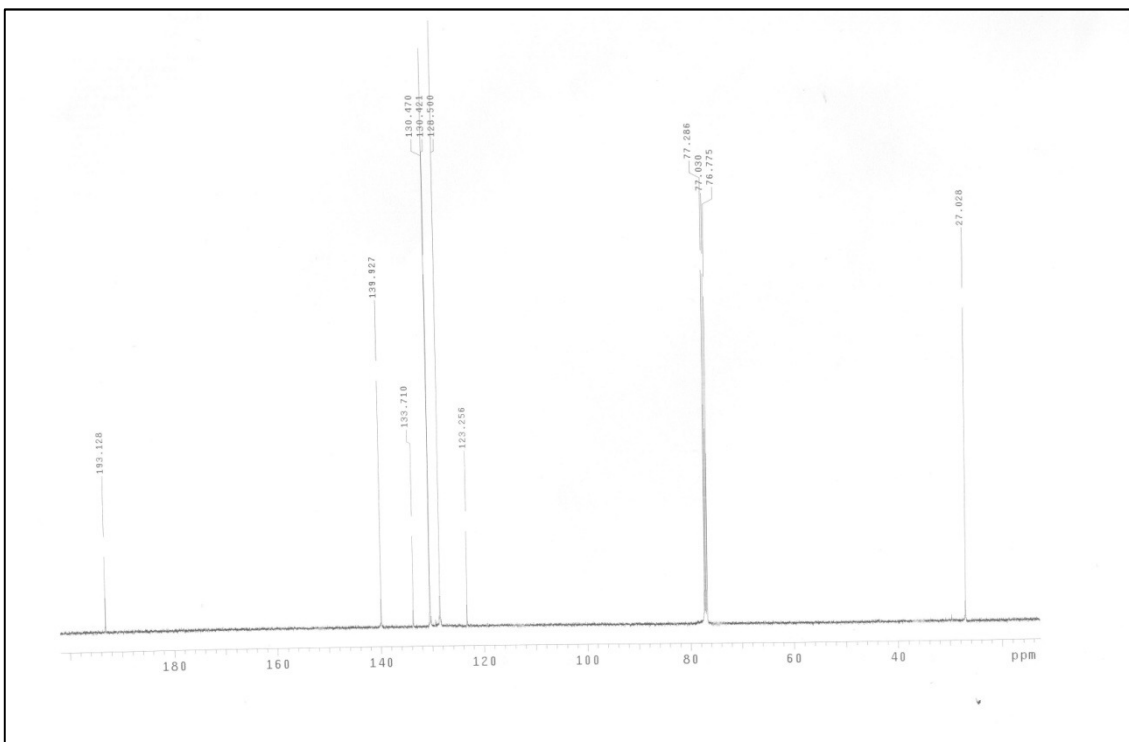
E09. Espectro de massas obtido por ionização de elétrons (70 eV) do (Z)-3-bromo-4-fenil-3-butan-2-ona (**Z**-38).



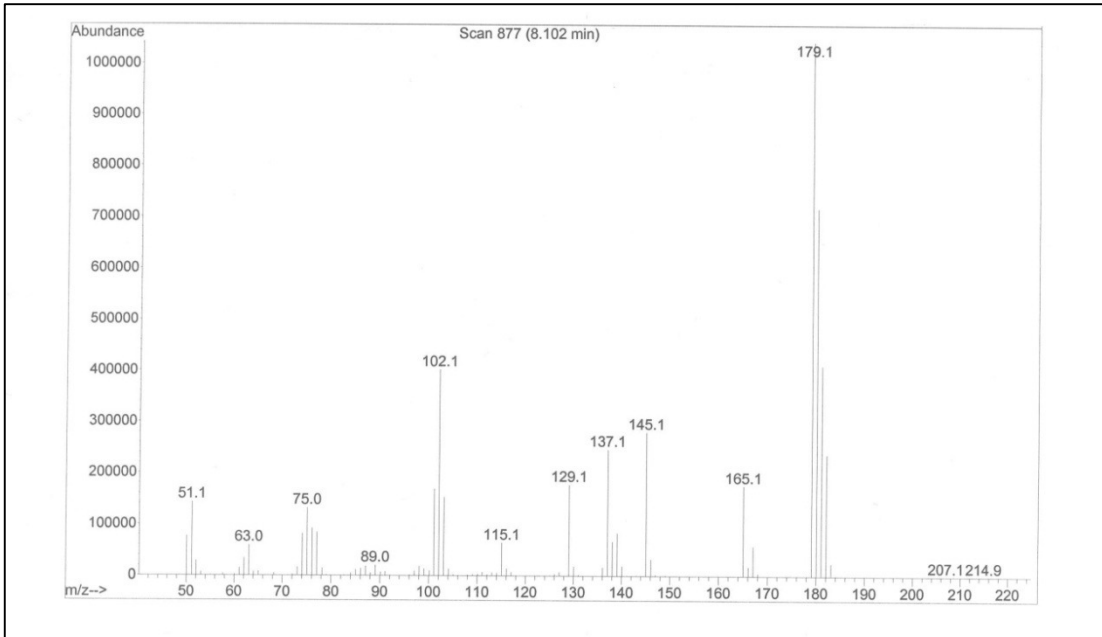
E10. Espectro de Infravermelho (NaCl) do (Z)-3-bromo-4-fenil-3-butan-2-ona (**Z**-38).



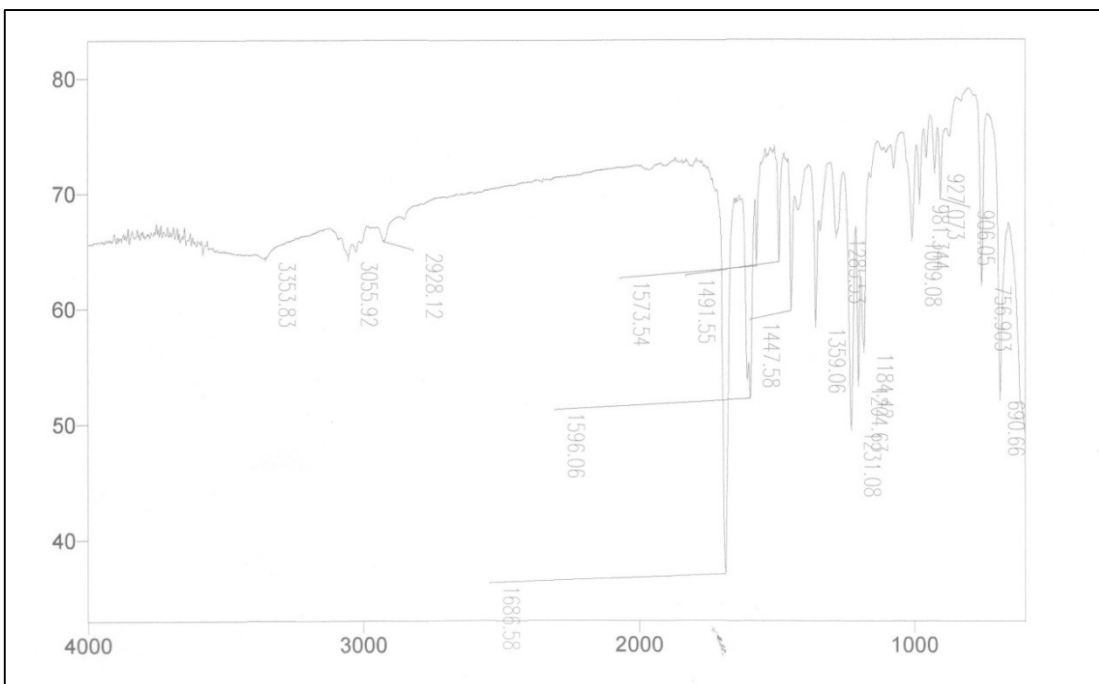
E11. Espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) do (Z)-3-bromo-4-fenil-3-butan-2-ona (Z)-38.



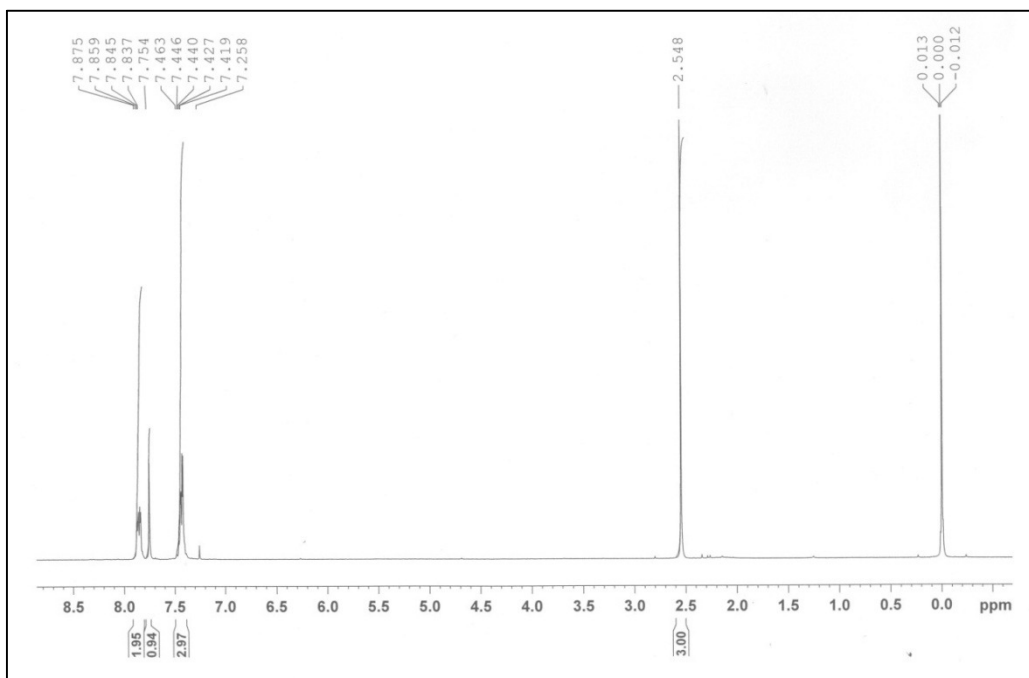
E12. Espectro de RMN ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) do (Z)-3-bromo-4-fenil-3-butan-2-ona (Z)-38.



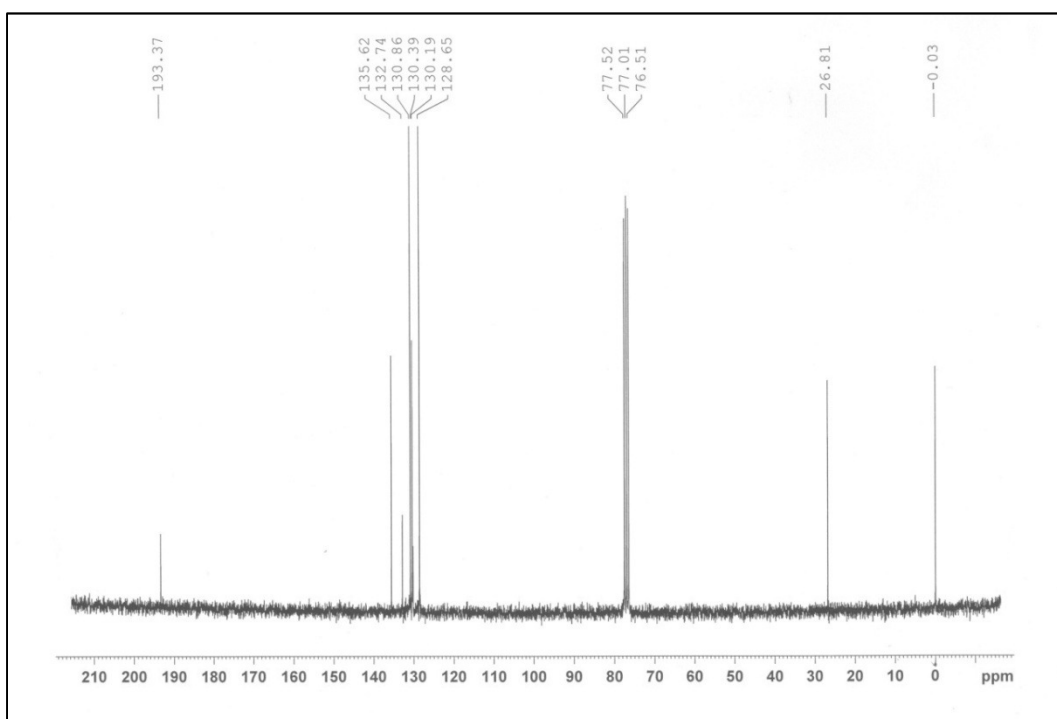
E13. Espectro de massas obtido por ionização de elétrons (70 eV) do (Z)-3-cloro-4-fenil-3-butan-2-ona (**Z**)-39.



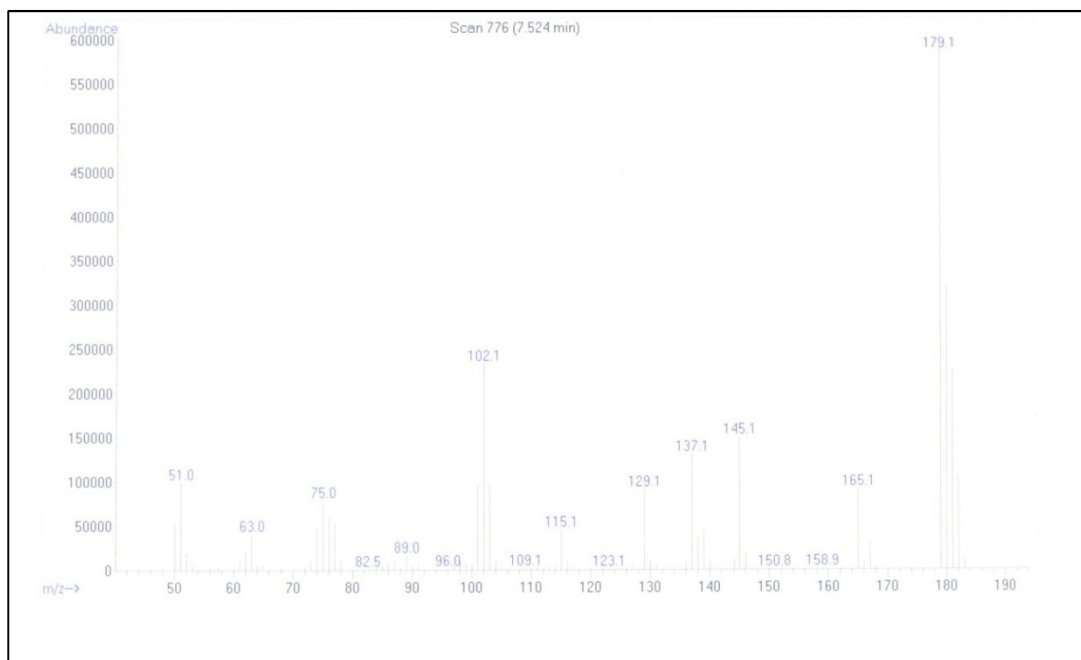
E14. Espectro de Infravermelho (NaCl) do (Z)-3-cloro-4-fenil-3-butan-2-ona (**Z**)-39.



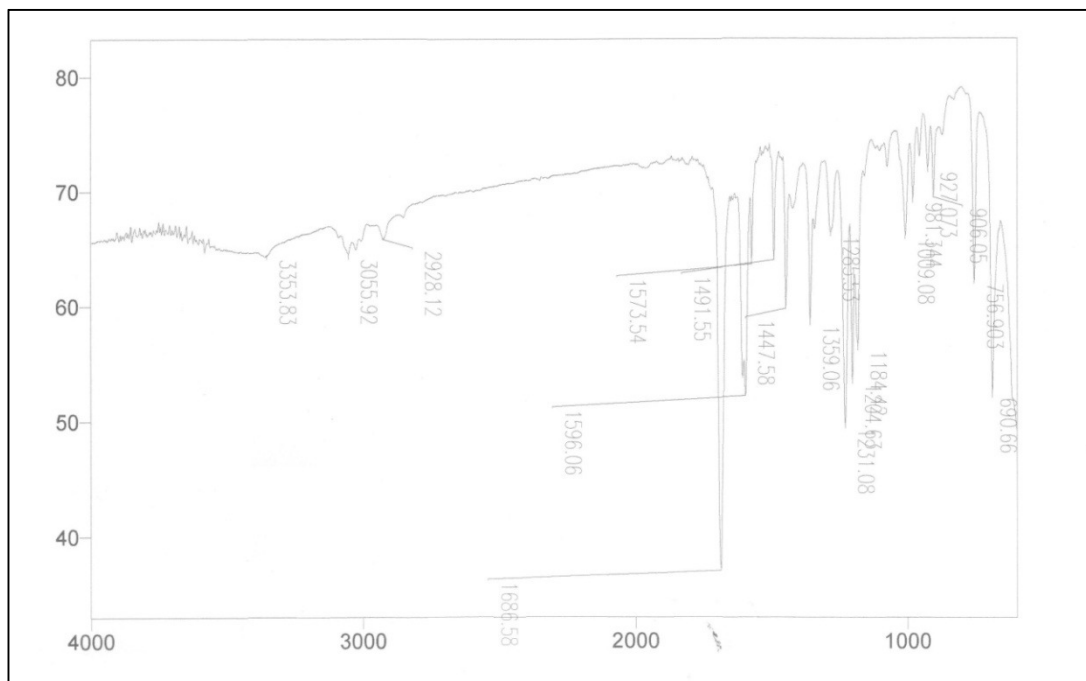
E15. Espectro de RMN ¹H (250 MHz, CDCl₃) do (Z)-3-cloro-4-fenil-3-butan-2-ona
(Z)-39.



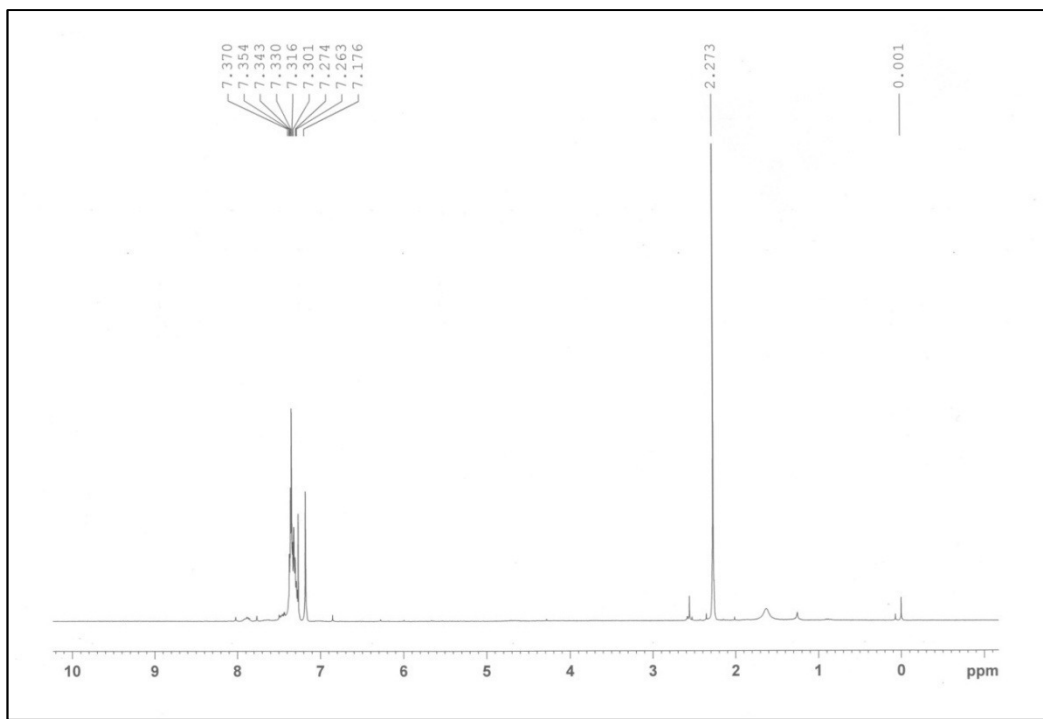
E16. Espectro de RMN ¹³C (62.5 MHz, CDCl₃) do (Z)-3-cloro-4-fenil-3-butan-2-ona
(Z)-39.



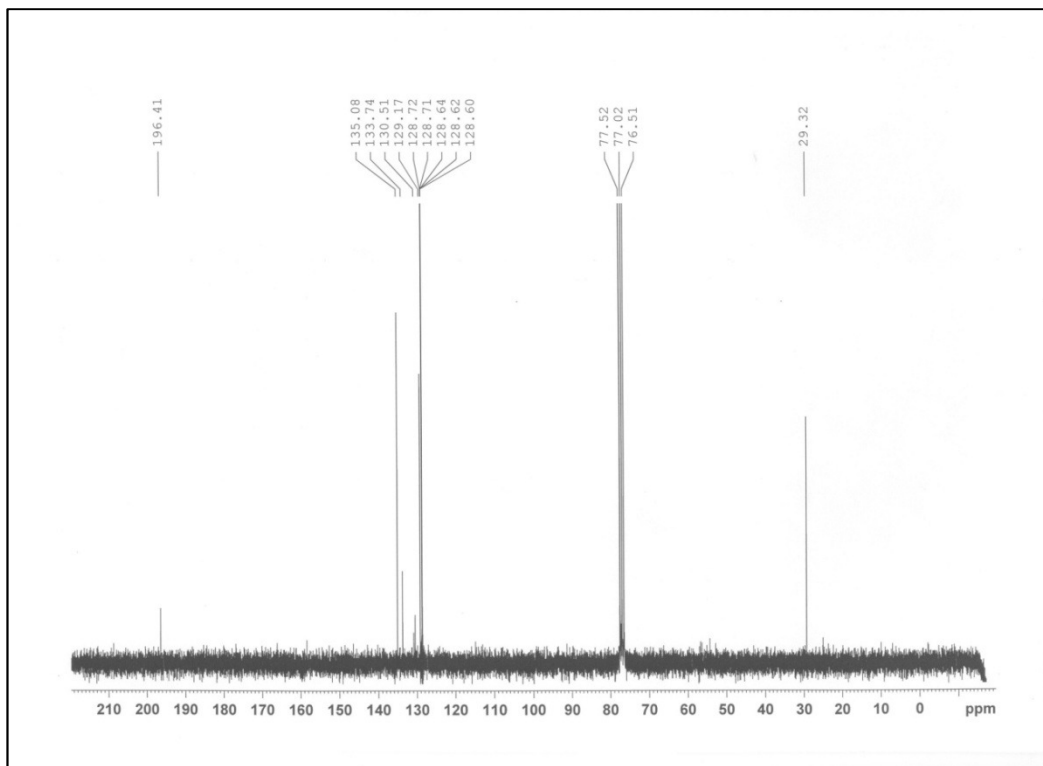
E17. Espectro de massas obtido por ionização de elétrons (70 eV) do (*E*)-3-cloro-4-fenil-3-butan-2-ona **(E)-39**.



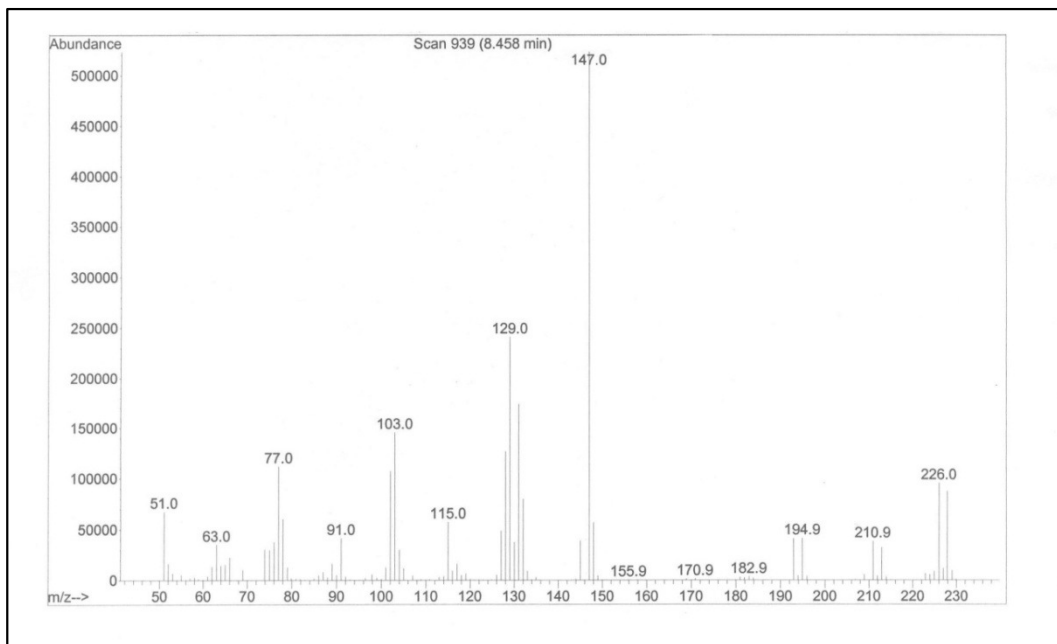
E18. Espectro de Infravermelho (NaCl) do (*E*)-3-cloro-4-fenil-3-butan-2-ona **(E)-39**.



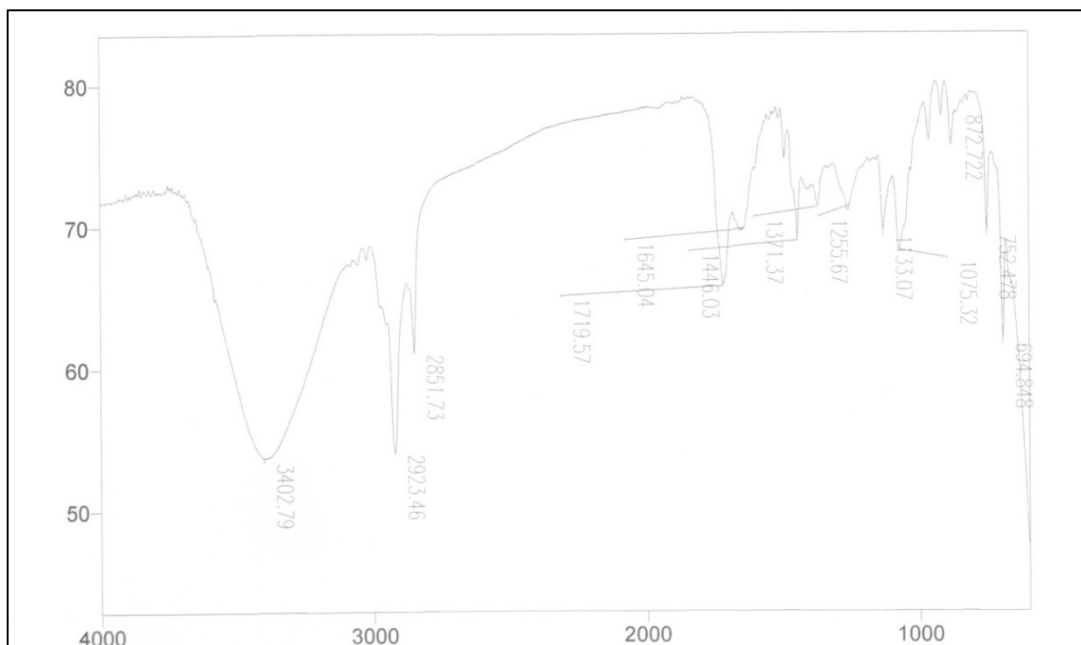
E19. Espectro de RMN ^1H (250 MHz, CDCl_3) do (*E*)-3-cloro-4-fenil-3-butan-2-ona (**E**-39).



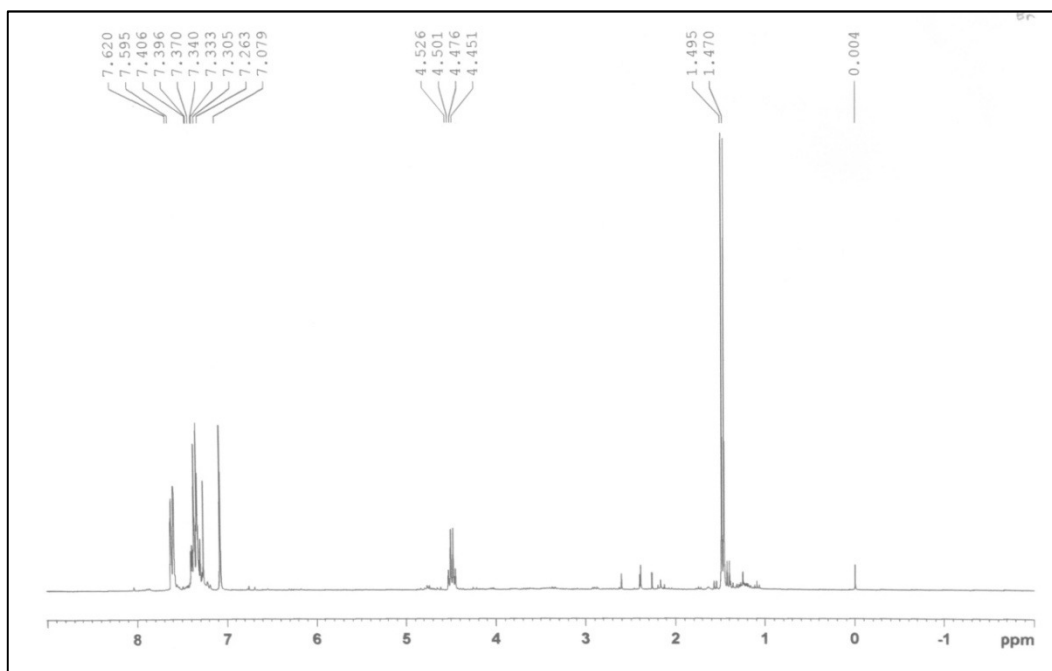
E20. Espectro de RMN ^{13}C (62. MHz, CDCl_3) do 3-cloro-4-fenil-3-butan-2-ona (**E**-39).



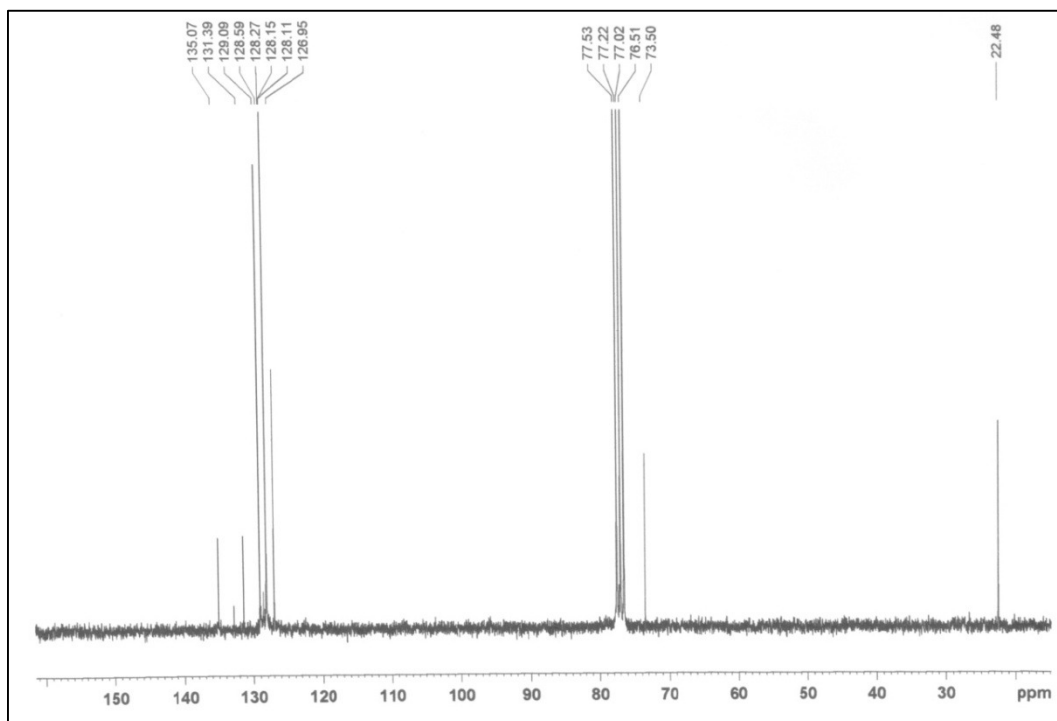
E21. Espectro de massas obtido por ionização de elétrons (70 eV) do (Z)-3-bromo-4-fenil-3-buten-2-ol **42**.



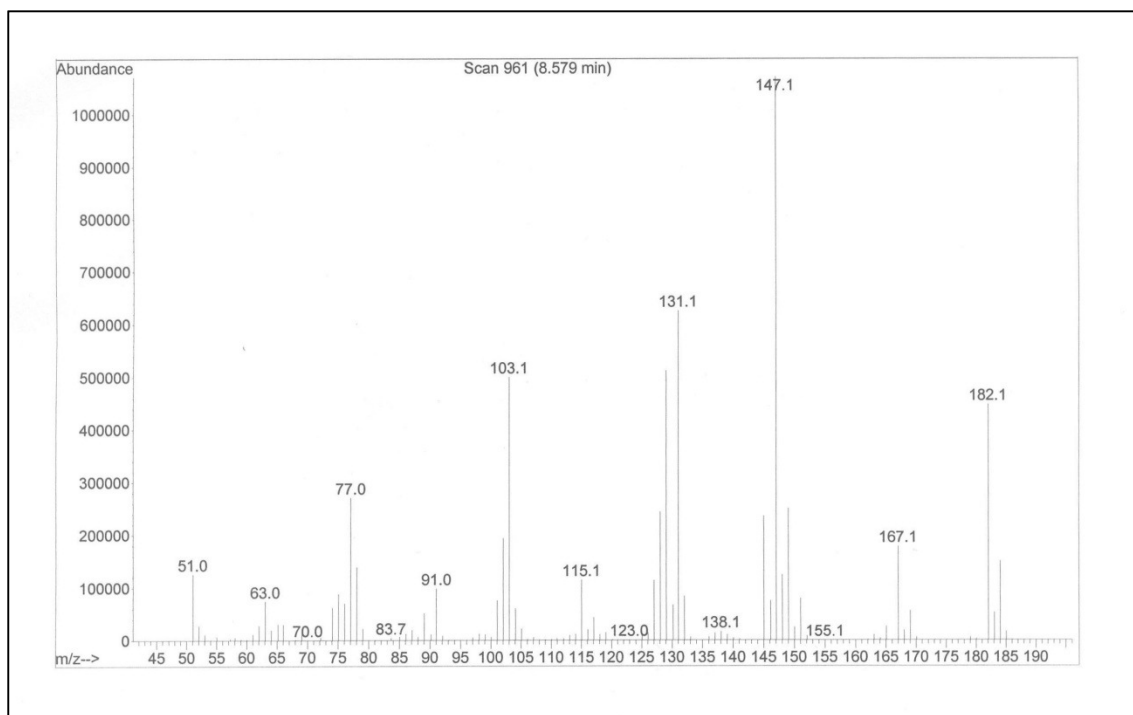
E22. Espectro de Infravermelho (NaCl) do (Z)-3-bromo-4-fenil-3-buten-2-ol **42**.



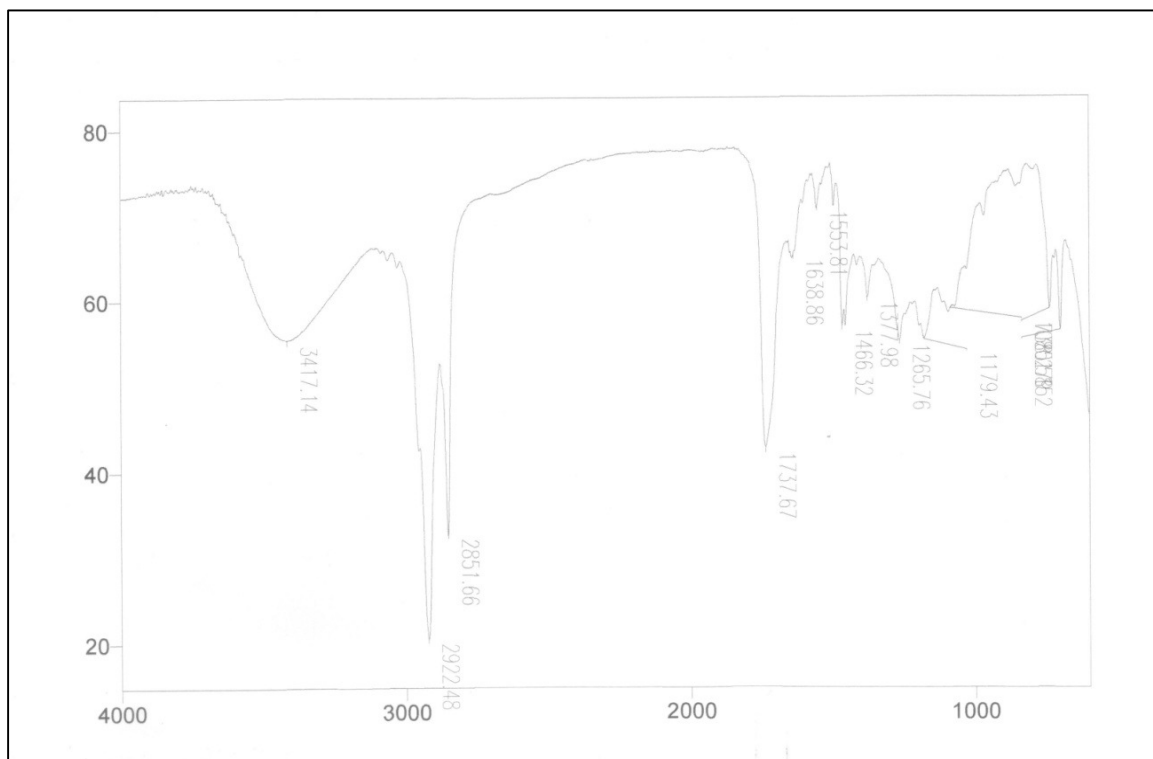
E23. Espectro de RMN ^1H (250 MHz, CDCl_3) do (Z)-3-bromo-4-fenil-3-buten-2-ol
42.



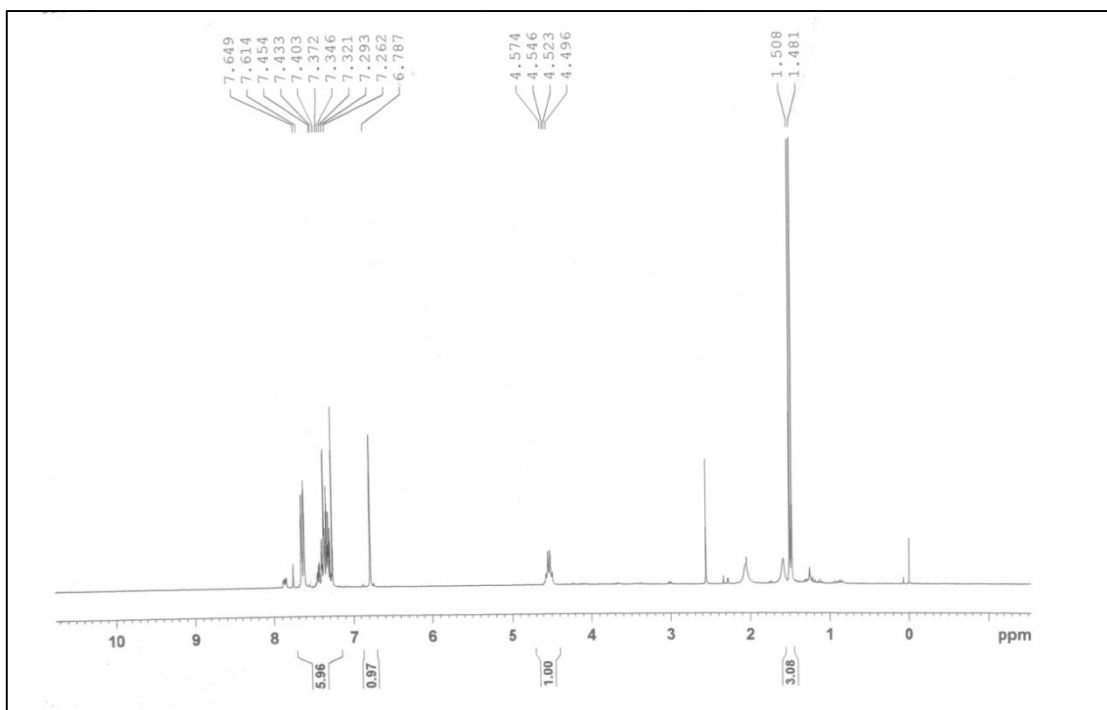
E24. Espectro de RMN ^{13}C (62.5 MHz, CDCl_3) do (Z)-3-bromo-4-fenil-3-buten-2-ol
42.



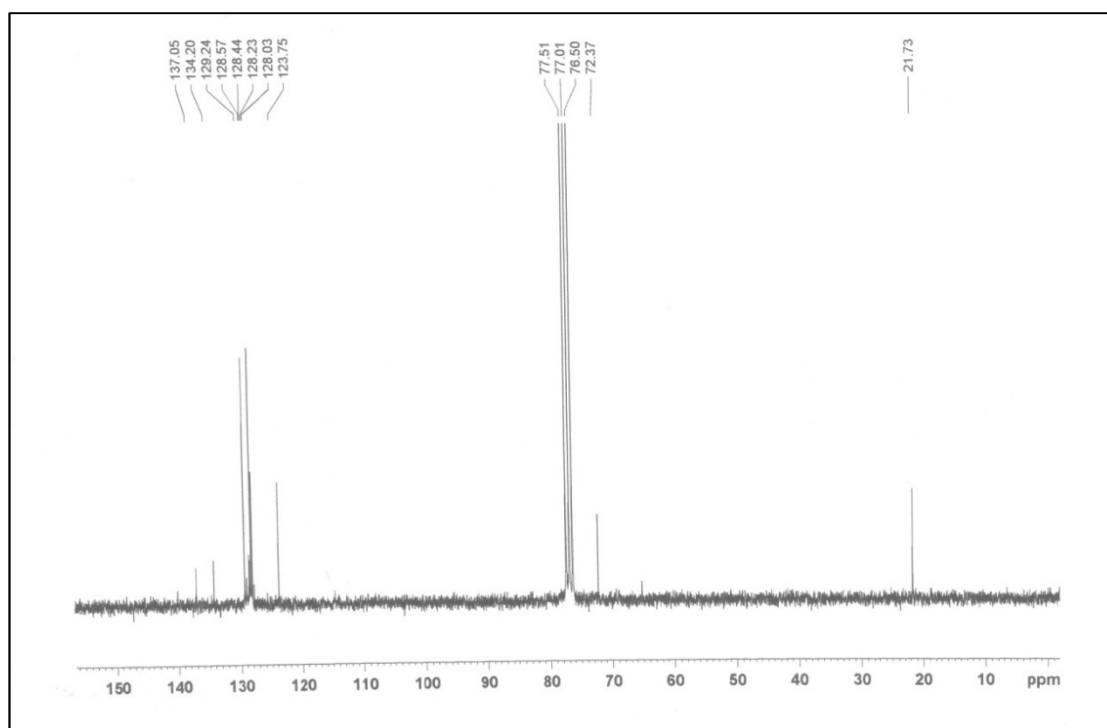
E25. Espectro de massas obtido por ionização de elétrons (70 eV) do (Z)-3-cloro-4-fenil-3-buten-2-ol **43**.



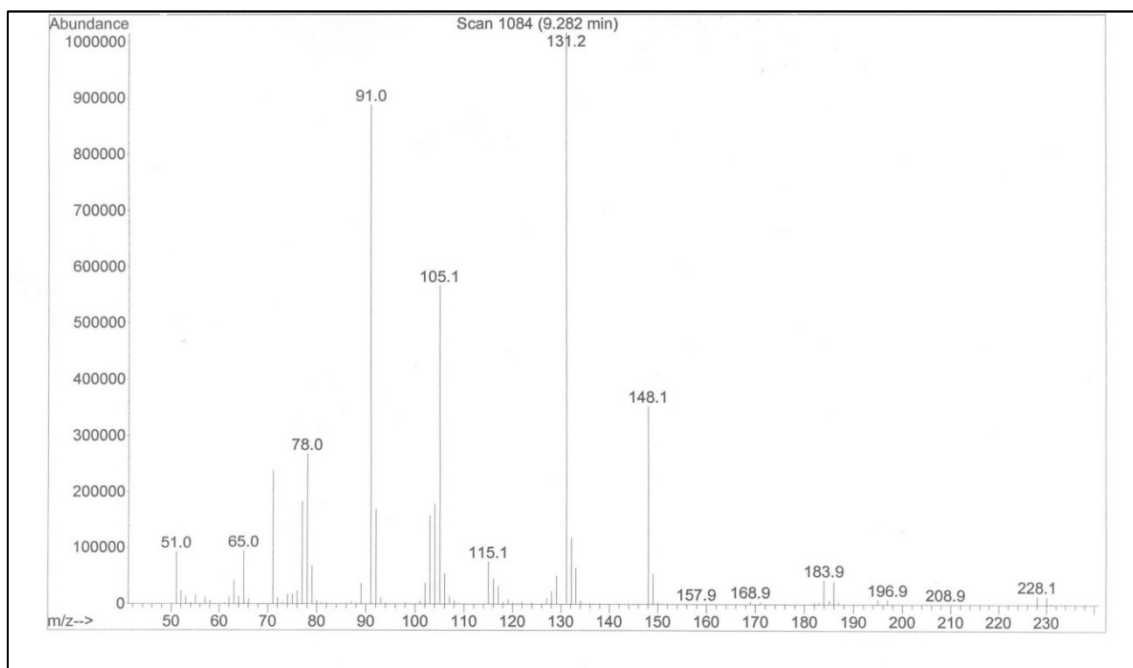
E26. Espectro de Infravermelho (NaCl) do (Z)-3-cloro-4-fenil-3-buten-2-ol **43**.



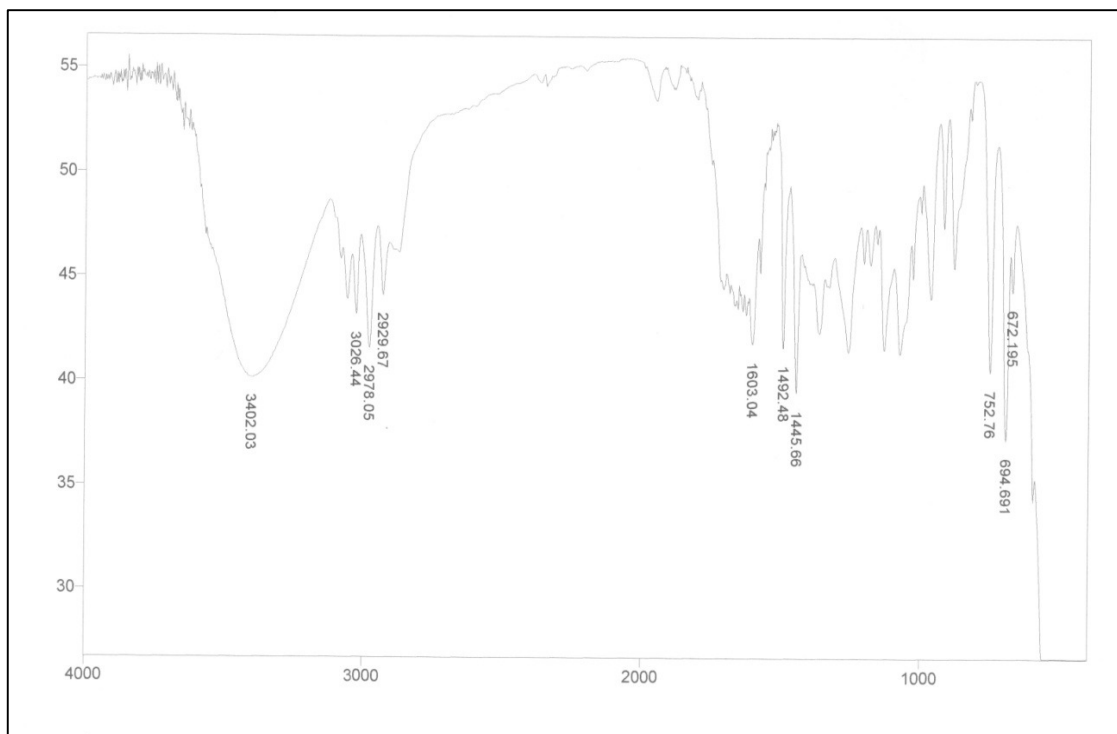
E27. Espectro de RMN ¹H (250 MHz, CDCl₃) do (Z)-3-cloro-4-fenil-3-buten-2-ol **43**.



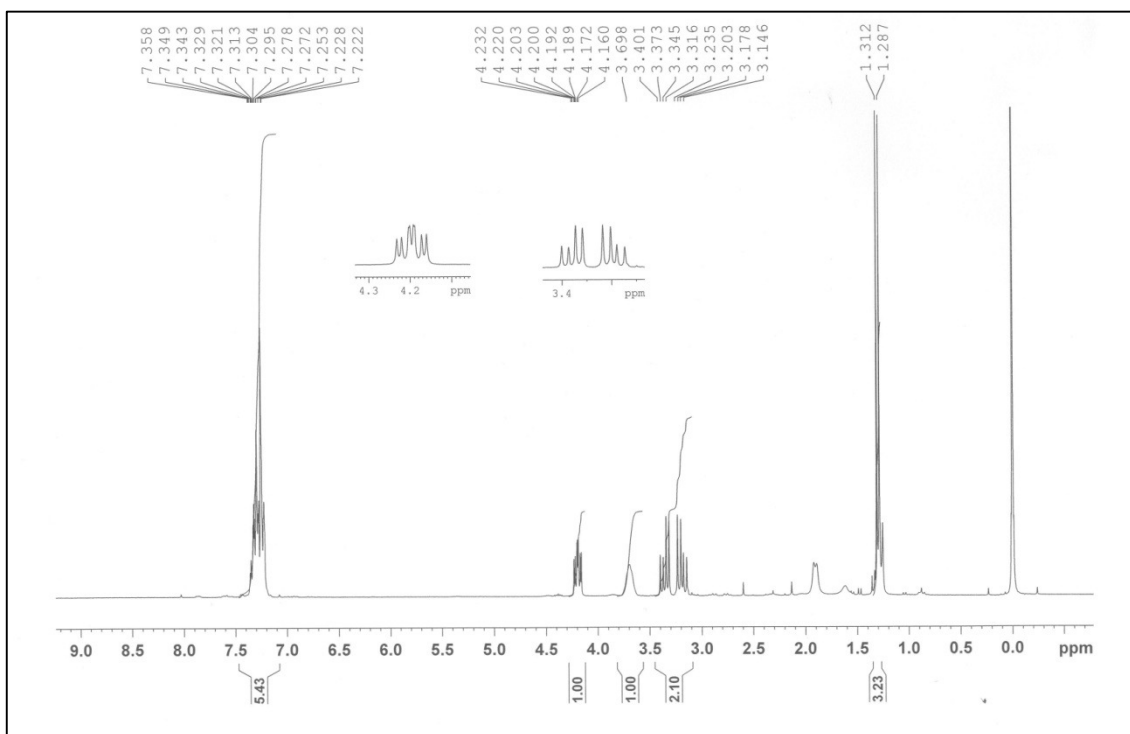
E28. Espectro de RMN ¹³C (62.5 MHz, CDCl₃) do (Z)-3-cloro-4-fenil-3-buten-2-ol **43**.



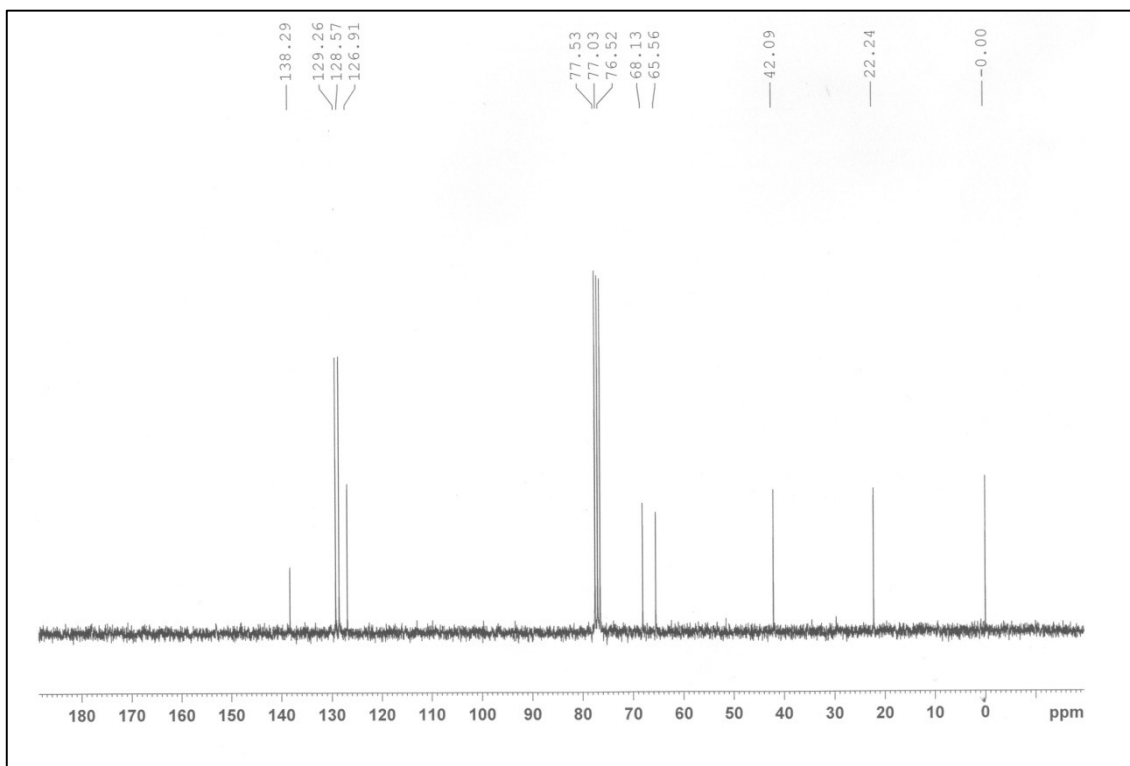
E29. Espectro de massas obtido por ionização de elétrons (70 eV) do 3-bromo-4-fenil-2-butanol **44**.



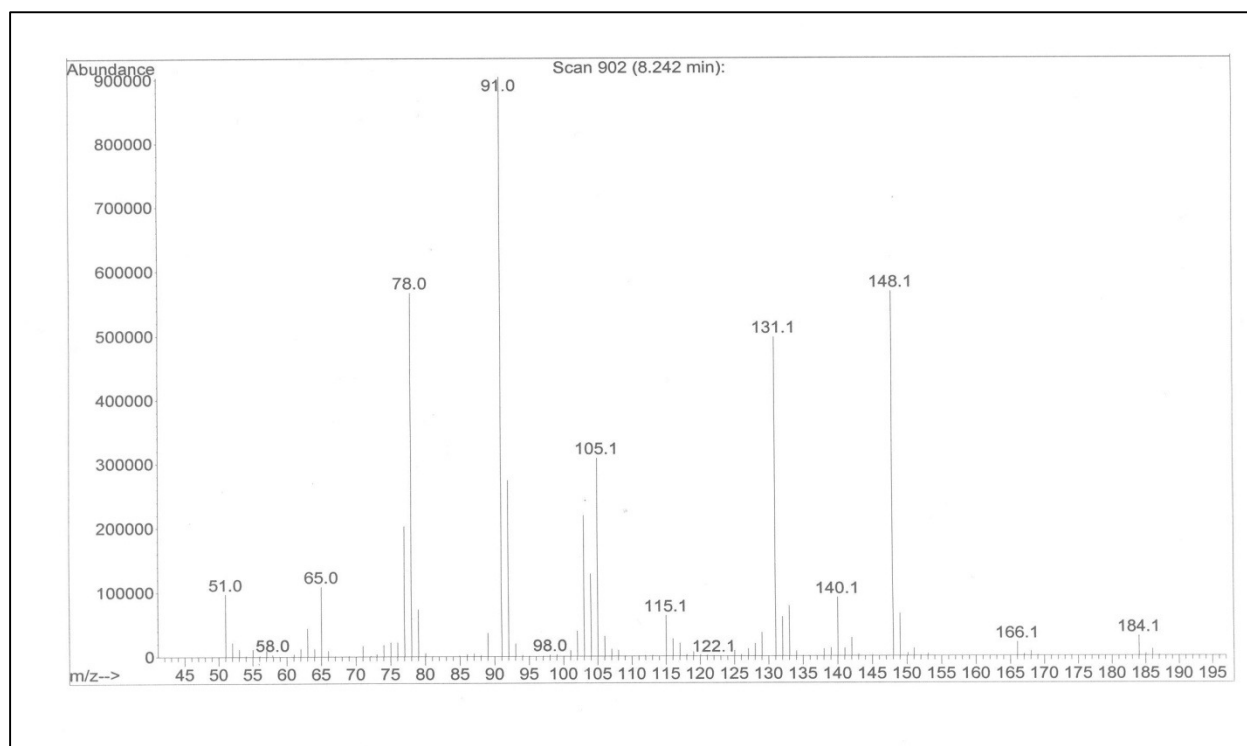
E30. Espectro de Infravermelho (NaCl) do 3-bromo-4-fenil-2-butanol **44**.



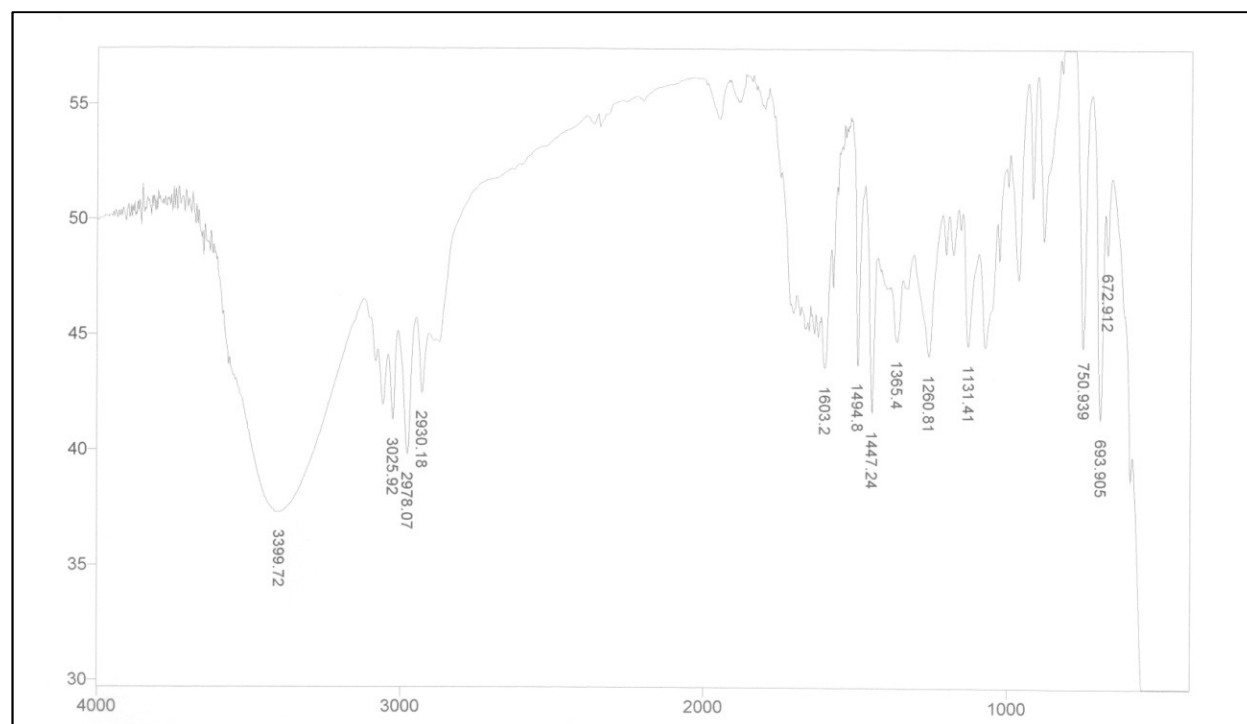
E31. Espectro de RMN ¹H (250 MHz, CDCl₃) do 3-bromo-4-fenil-2-butanol **44**.



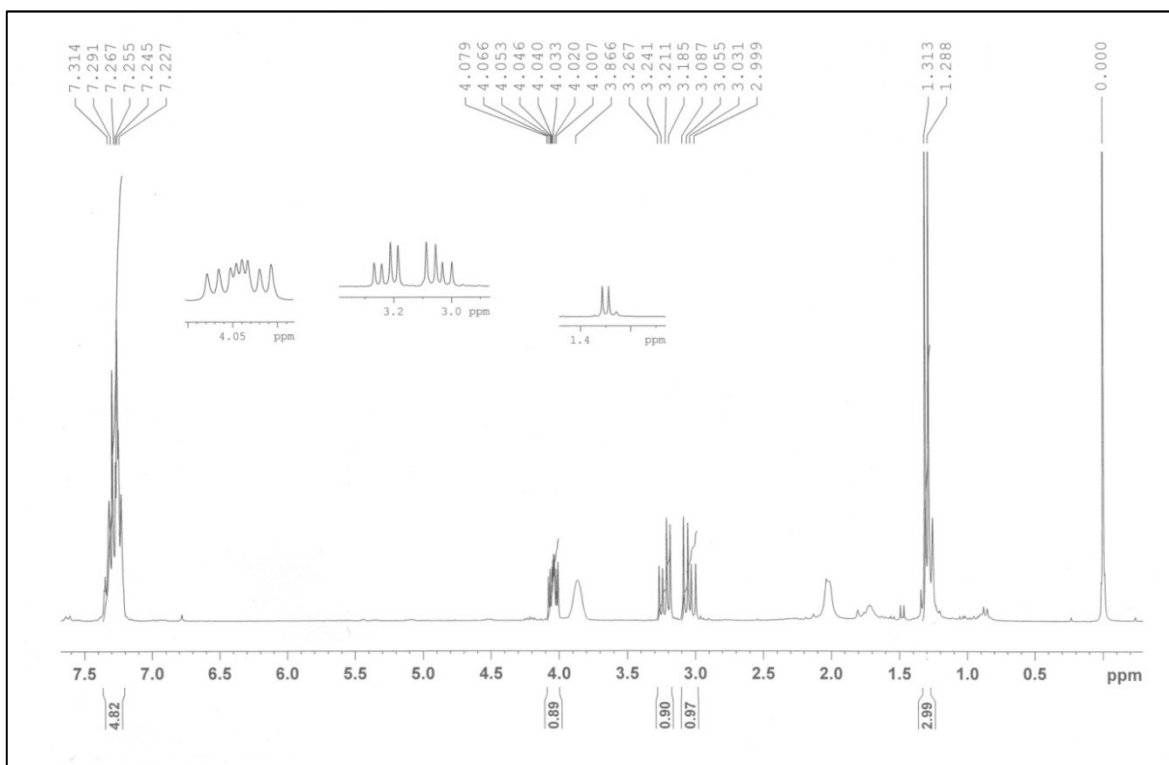
E32. Espectro de RMN ¹³C (62.5 MHz, CDCl₃) do 3-bromo-4-fenil-2-butanol **44**.



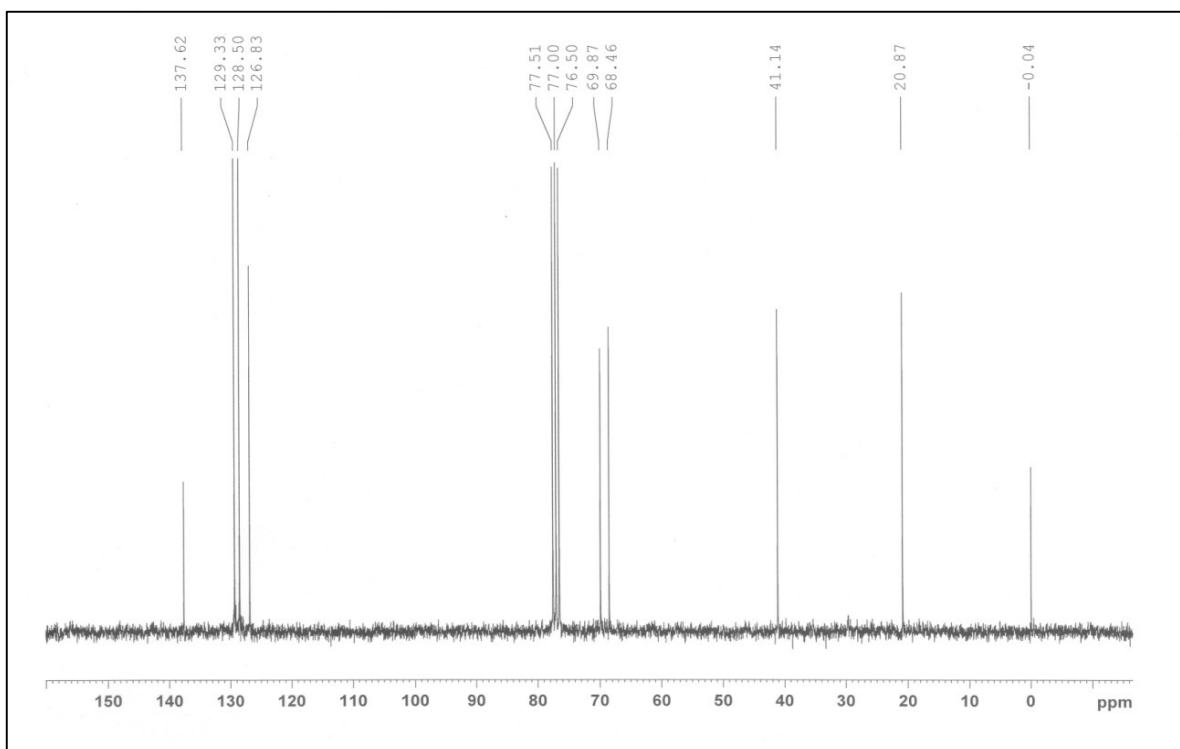
E33. Espectro de massas obtido por ionização de elétrons (70 eV) do 3-cloro-4-fenil-2-butanol (*S,S*)-**45**.



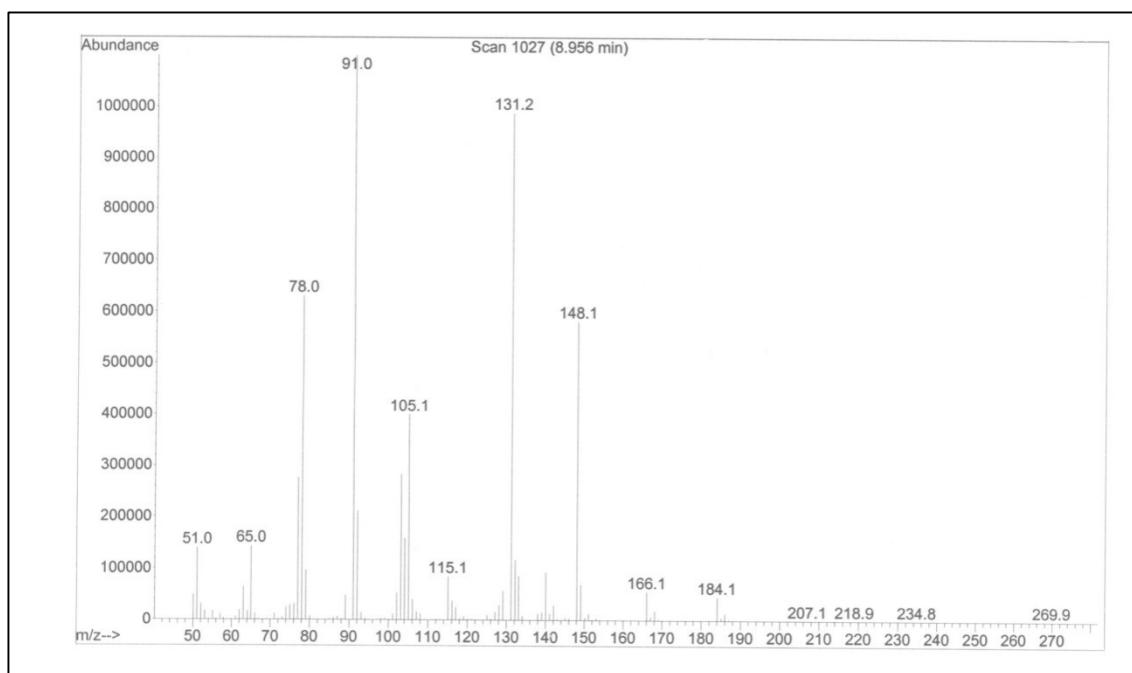
E34. Espectro de Infravermelho (NaCl) do 3-cloro-4-fenil-2-butanol (*S,S*)-**45**.



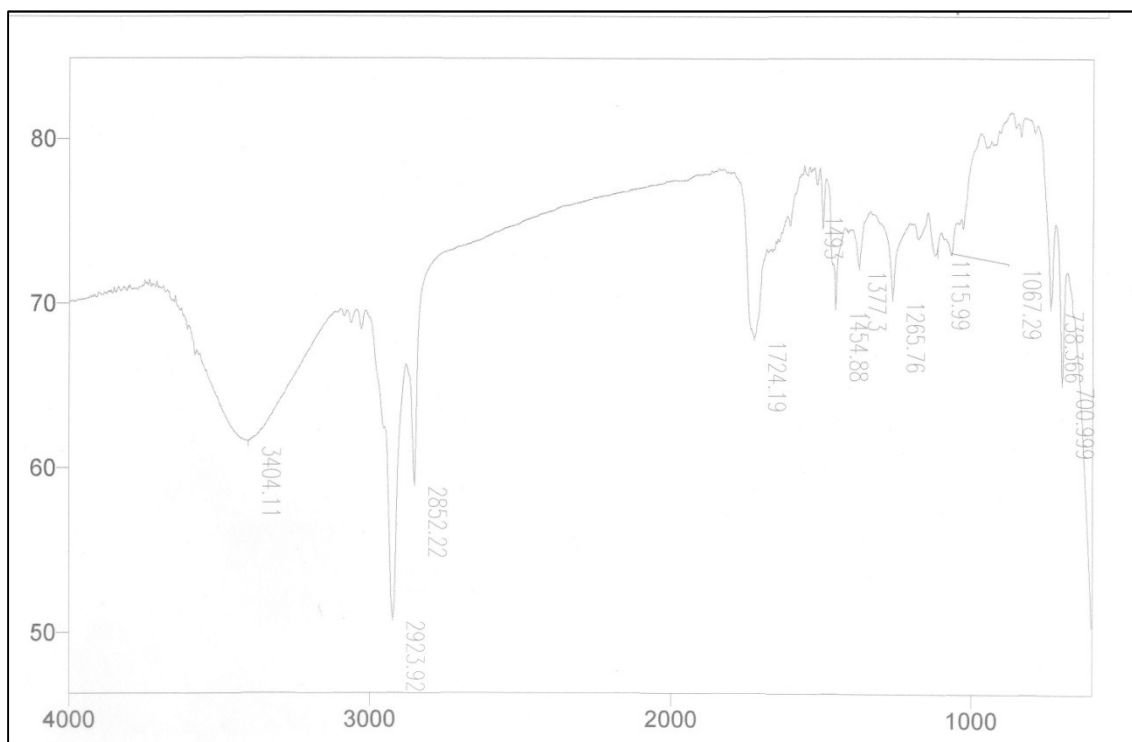
E35. Espectro de RMN ¹H (250 MHz, CDCl₃) do 3-cloro-4-fenil-2-butanol (*S,S*)-**45**.



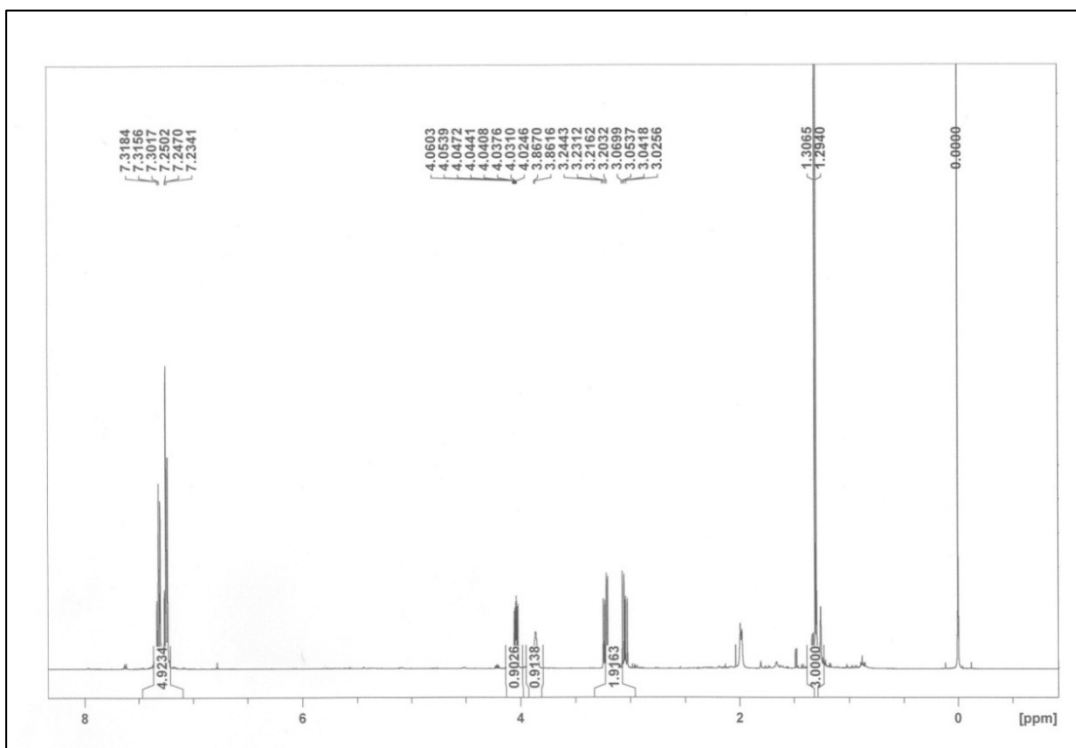
E36. Espectro de RMN ¹³C (62.5 MHz, CDCl₃) do 3-cloro-4-fenil-2-butanol (*S,S*)-**45**.



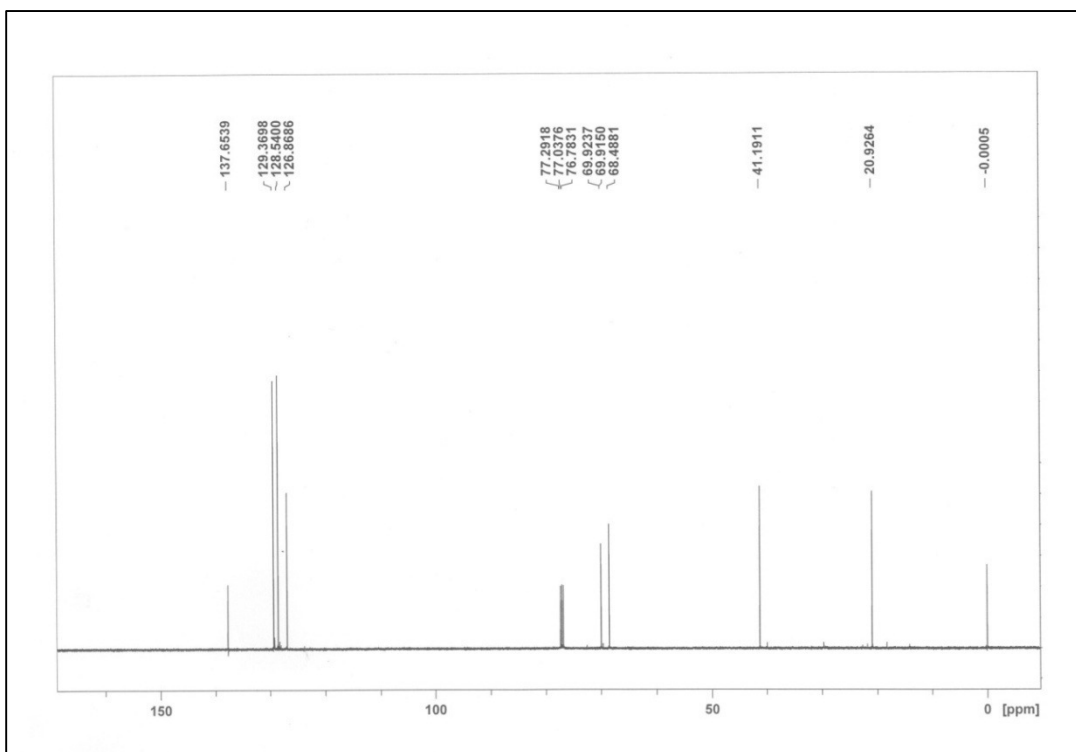
E37. Espectro de massas obtido por ionização de elétrons (70 eV) do 3-cloro-4-fenil-2-butanol (*R,S*)-**45**.



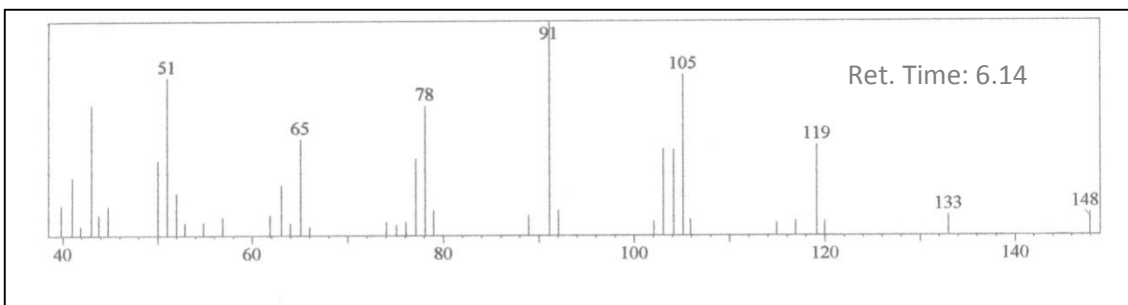
E38. Espectro de Infravermelho (NaCl) do 3-cloro-4-fenil-2-butanol (*R,S*)-**45**.



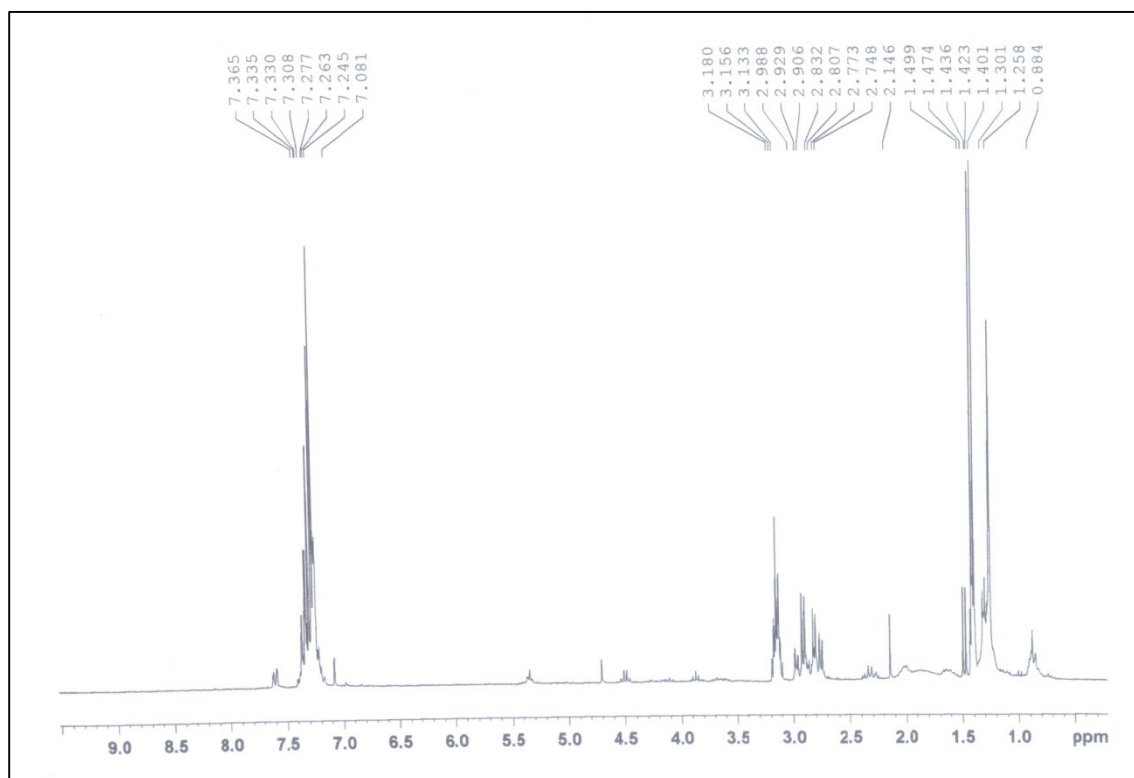
E39. Espectro de RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃) do 3-cloro-4-fenil-2-butanol (*R,S*)-45.



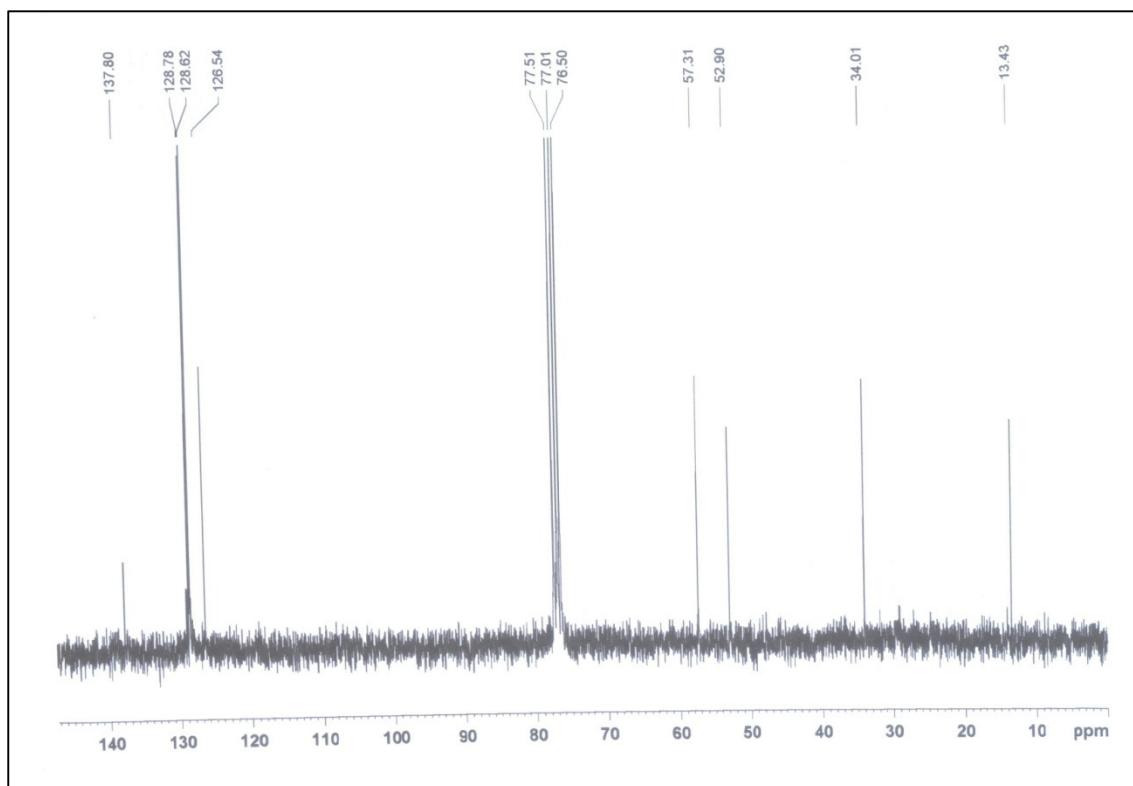
E40. Espectro de RMN ¹³C (125 MHz, CDCl₃) do 3-cloro-4-fenil-2-butanol (*R,S*)-45.



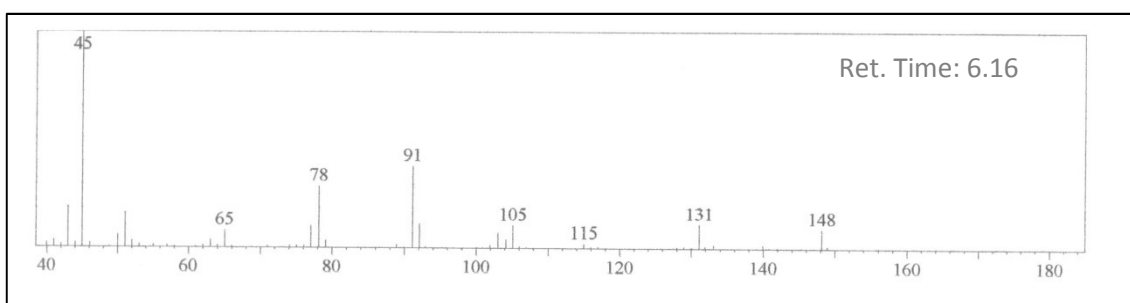
E41. Espectro de massas obtido por ionização de elétrons (70 eV) do (2S,3R)-4-fenil-2,3-epoxibutane **46**.



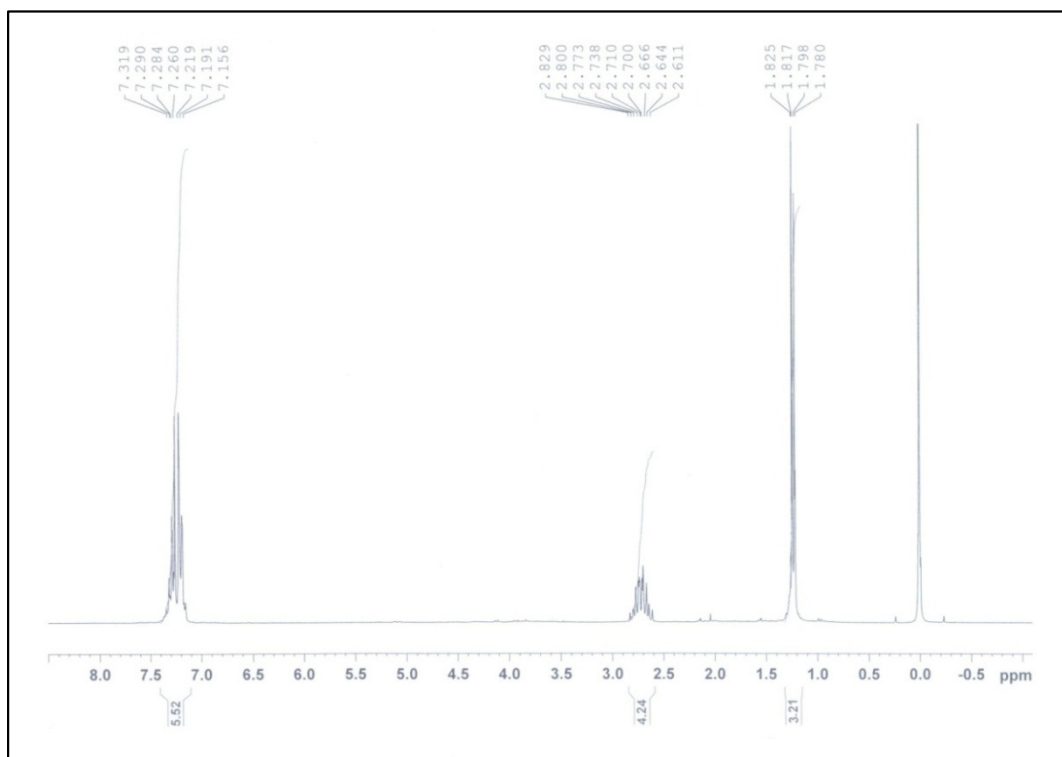
E42. Espectro de RMN ¹H (250 MHz, CDCl₃) do (2S,3R)-4-fenil-2,3-epoxibutane **46**.



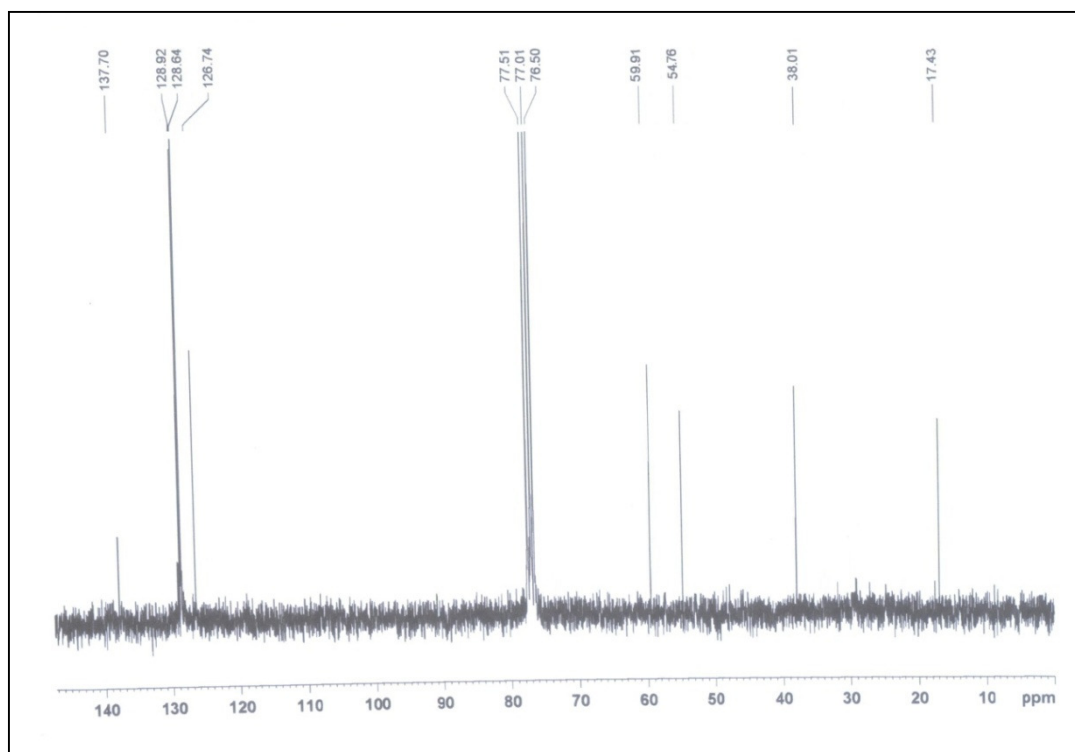
E43. Espectro de RMN ^{13}C (62.5 MHz, CDCl_3) do (2S,3R)-4-fenil-2,3-epoxibutane **46**.



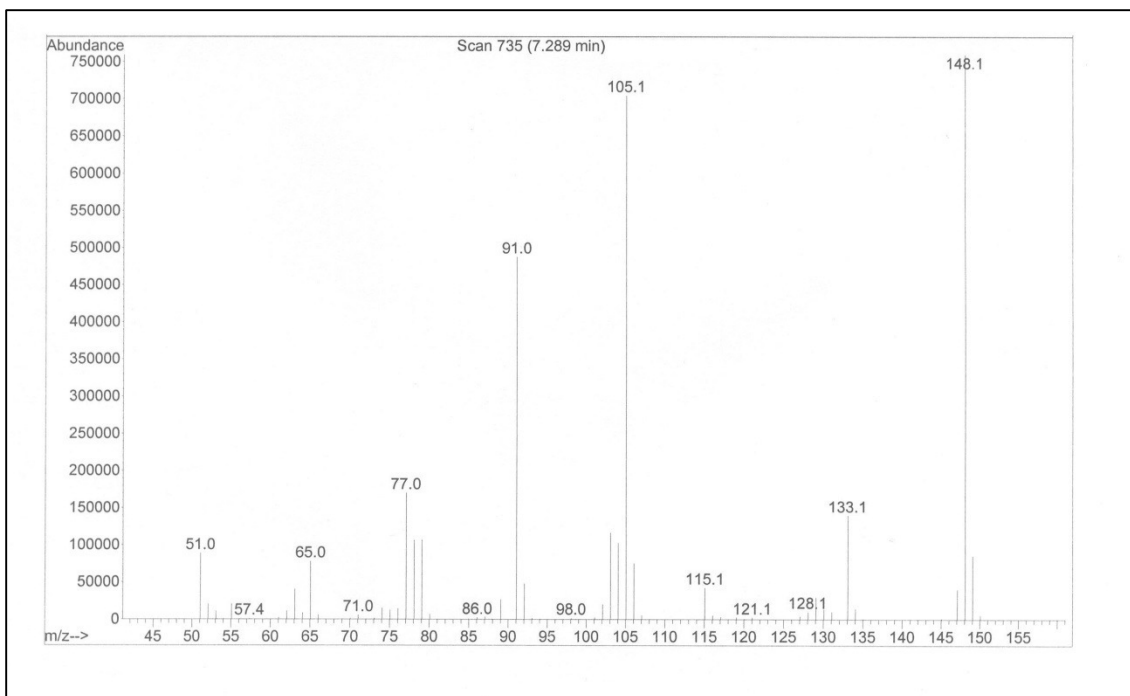
E44. Espectro de massas obtido por ionização de elétrons (70 eV) do (2S,3S)-4-fenil-2,3-epoxibutano **47**.



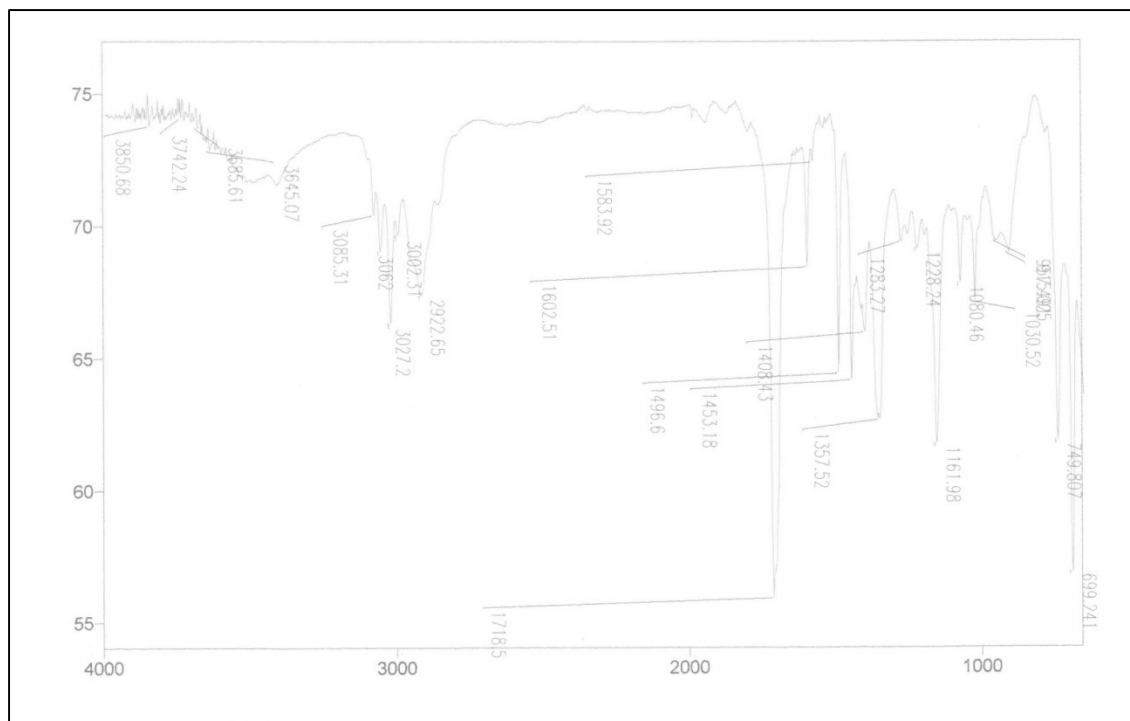
E45. Espectro de RMN ^1H (250 MHz, CDCl_3) do (2S,3S)-4-fenil-2,3-epoxibutane **47**.



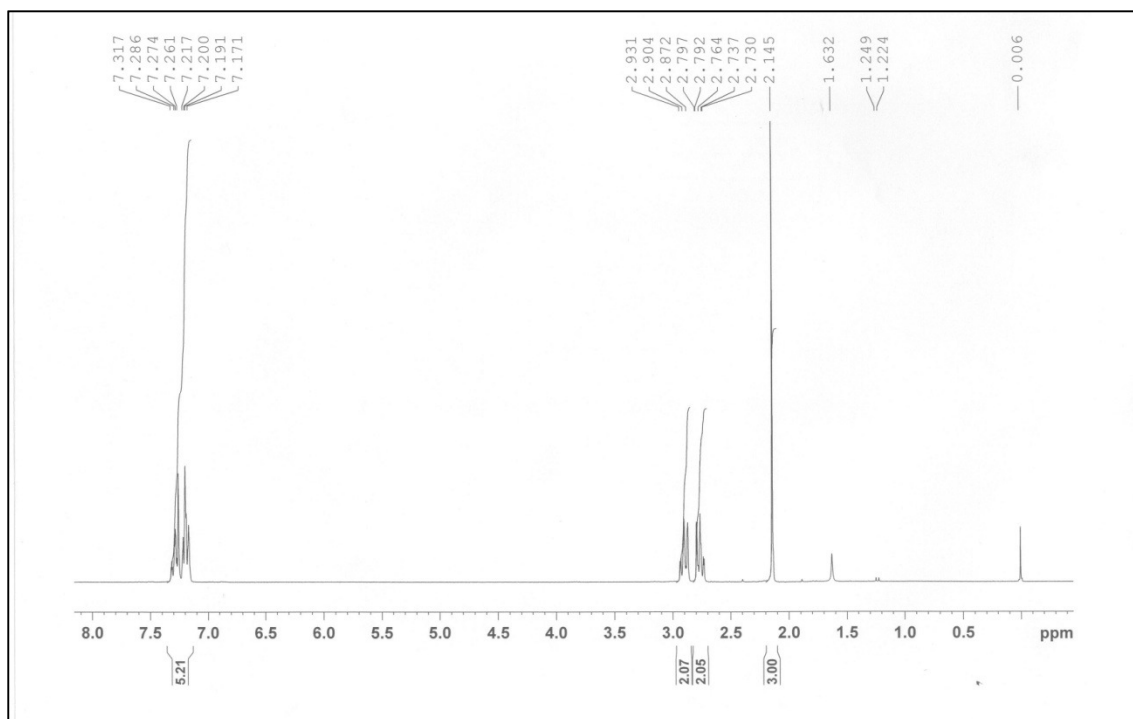
E46. Espectro de RMN ^{13}C (62.5 MHz, CDCl_3) do (2S,3S)-4-fenil-2,3-epoxibutane **47**.



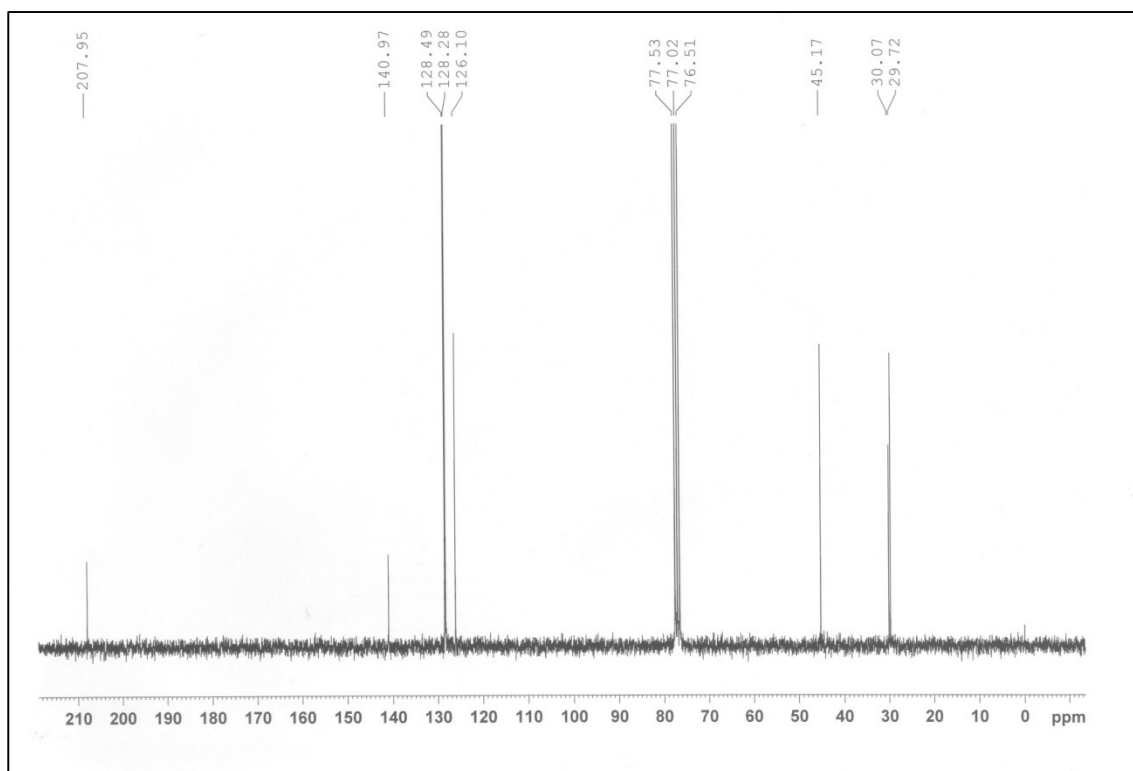
E47. Espectro de massas obtido por ionização de elétrons (70 eV) do 4-fenil-2-butanona **48**.



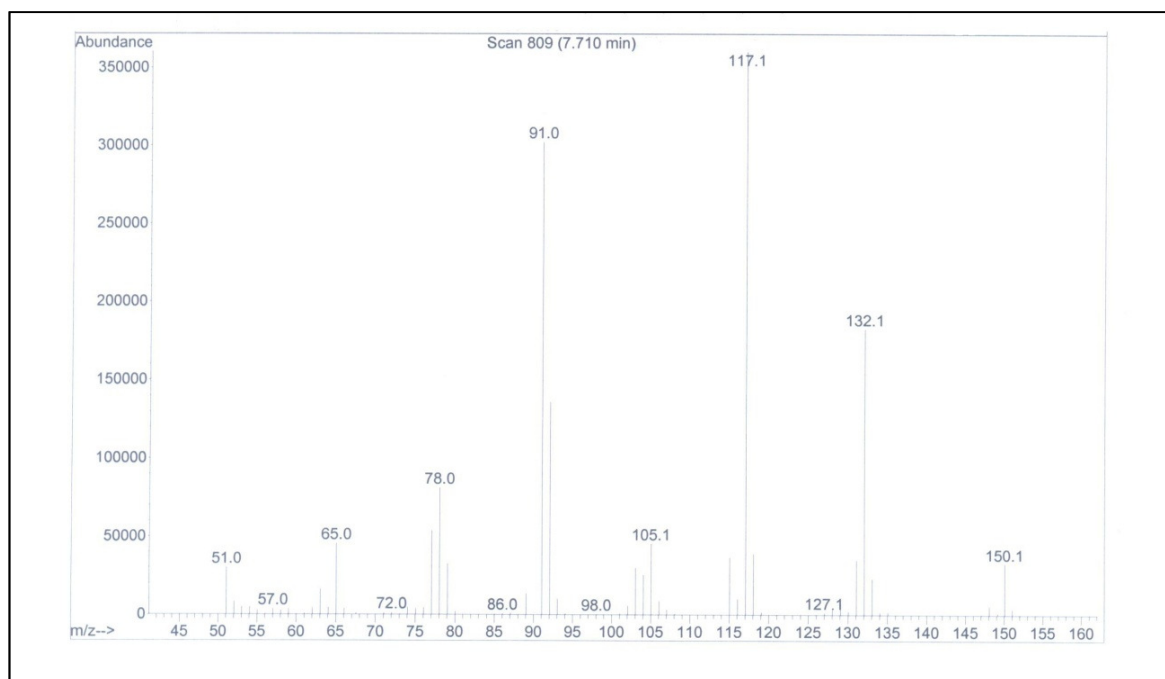
E48. Espectro de infravermelho (NaCl) do 4-fenil-2-butanona **48**.



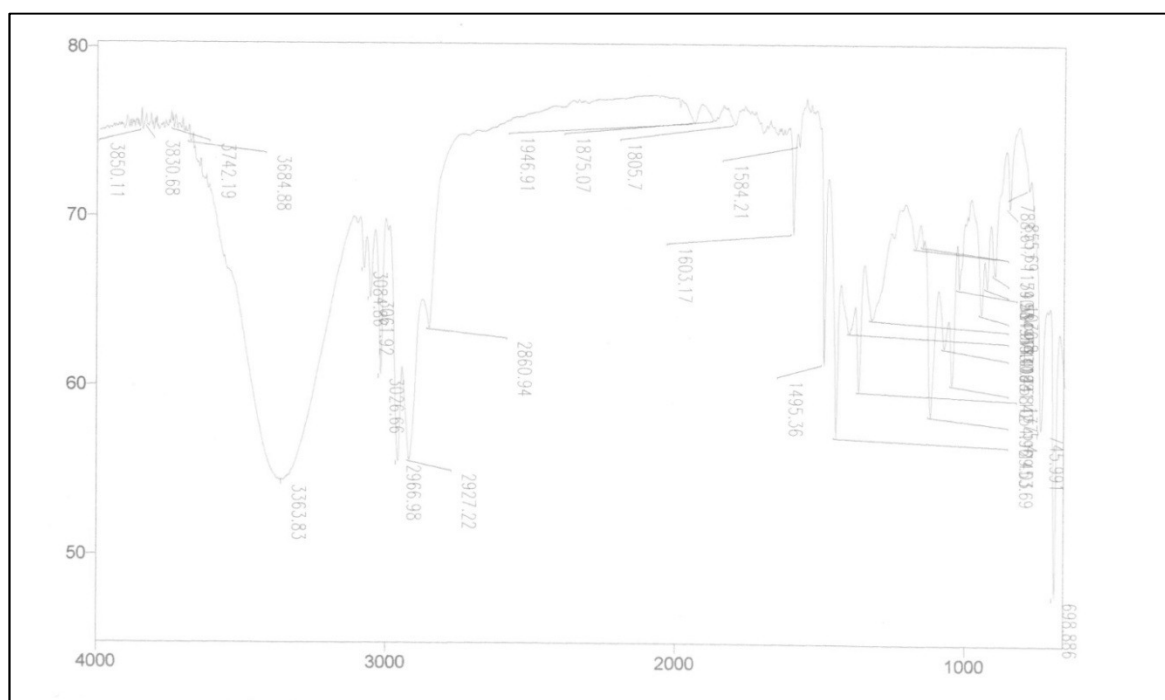
E49. Espectro de RMN ¹H (250 MHz, CDCl₃) do 4-fenil-2-butanona **48**.



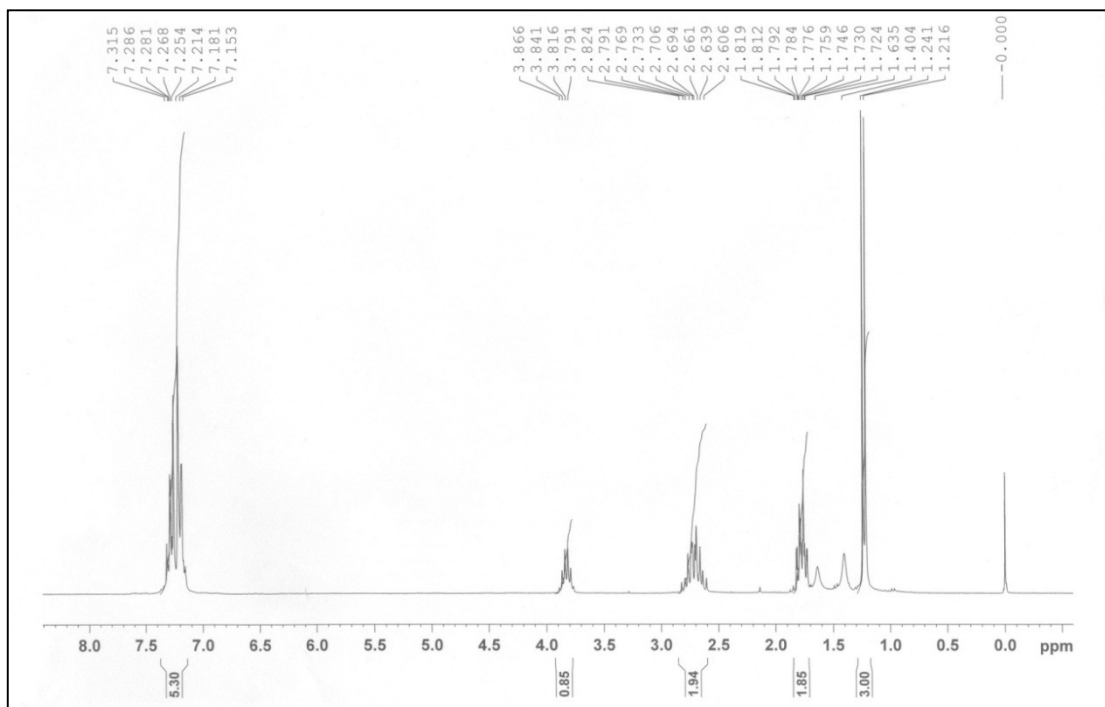
E50. Espectro de RMN ¹³C (62.5 MHz, CDCl₃) do 4-fenil-2-butanona **48**.



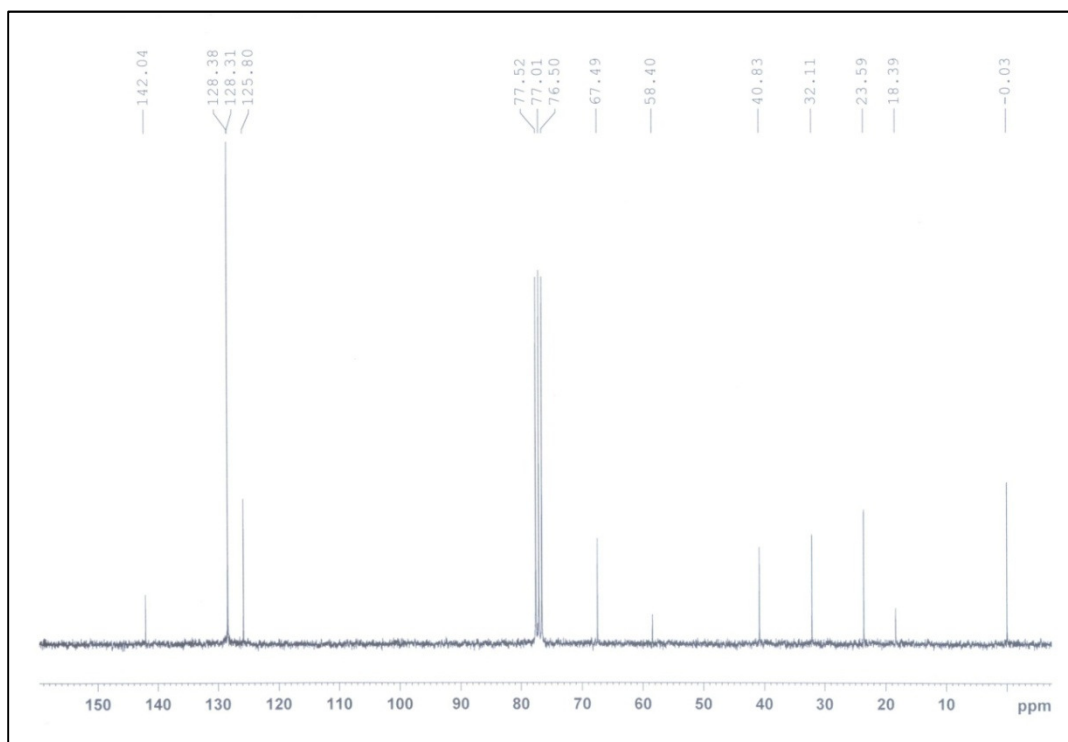
E51. Espectro de massas (70 eV) do 4-fenil-2-butanol **49**.



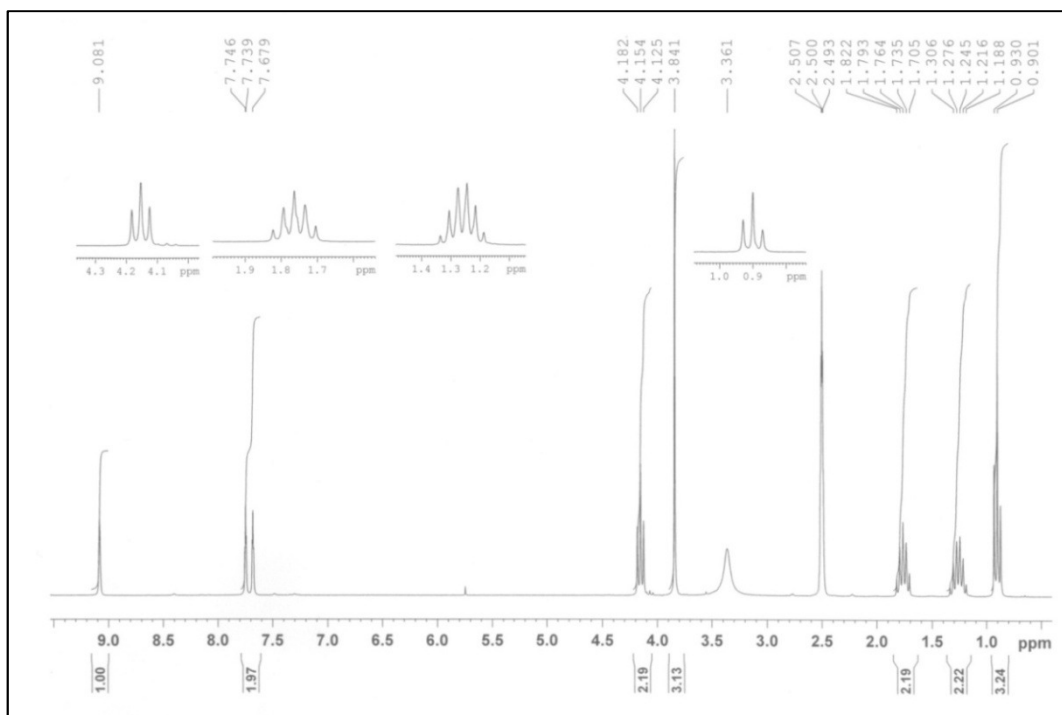
E52. Espectro de infravermelho (NaCl) do 4-fenil-2-butanol **49**.



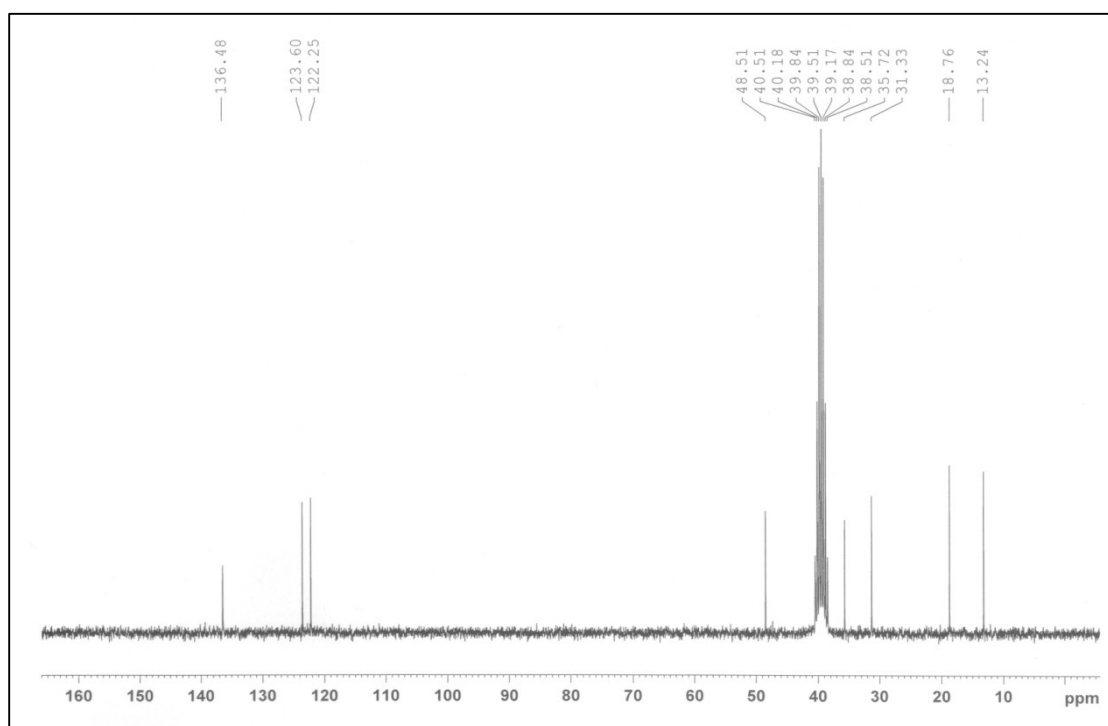
E53. Espectro de RMN ^1H (250 MHz, CDCl_3) do 4-fenil-2-butanol **49**.



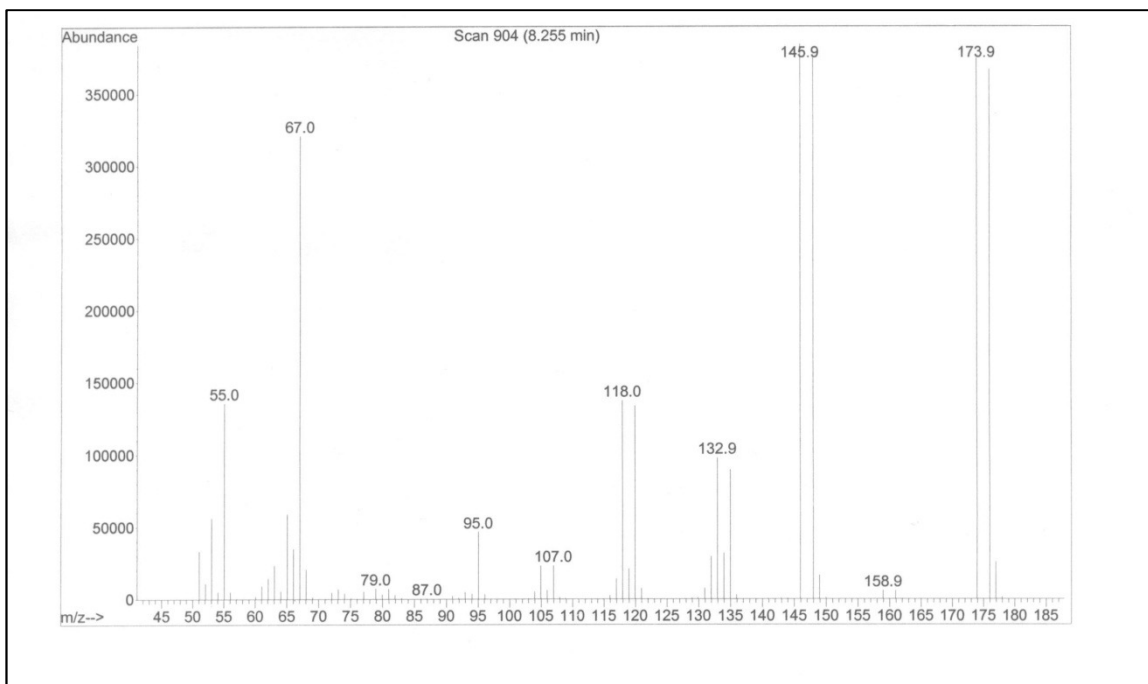
E54. Espectro de RMN ^{13}C (62.5 MHz, CDCl_3) do 4-fenil-2-butanol **49**.



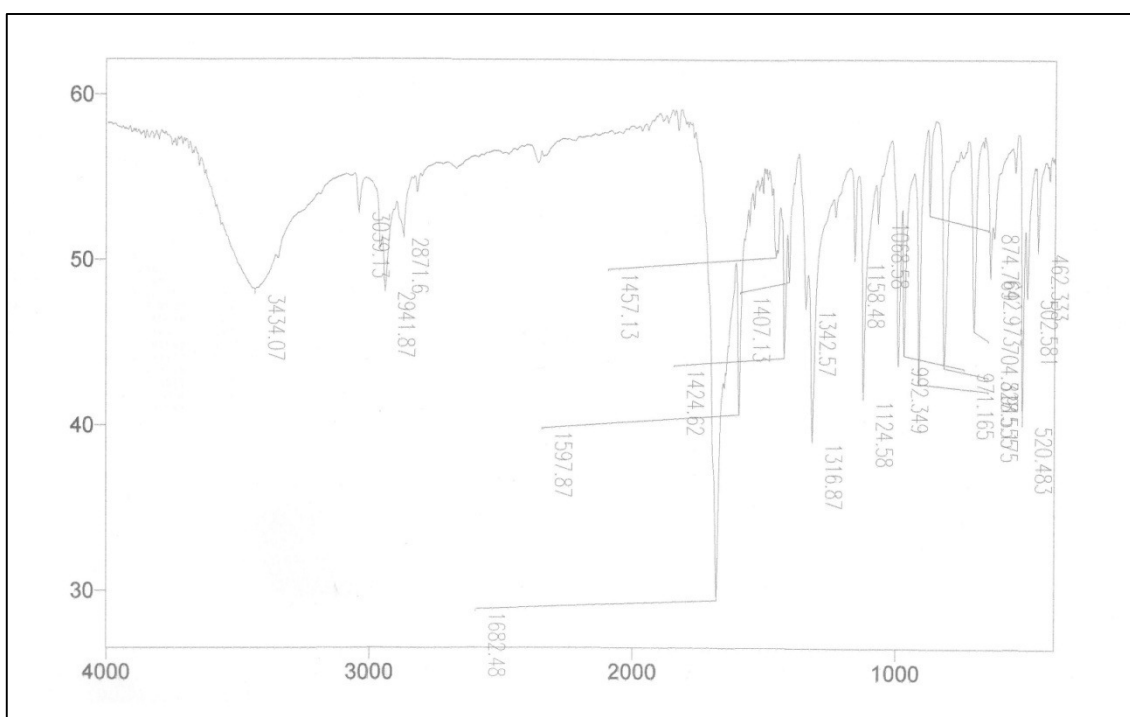
E55. Espectro de RMN ¹H (250 MHz, DMSO-*d*₆) do hexafluorofosfato de 1-butil-3-metilimidazólio **65**.



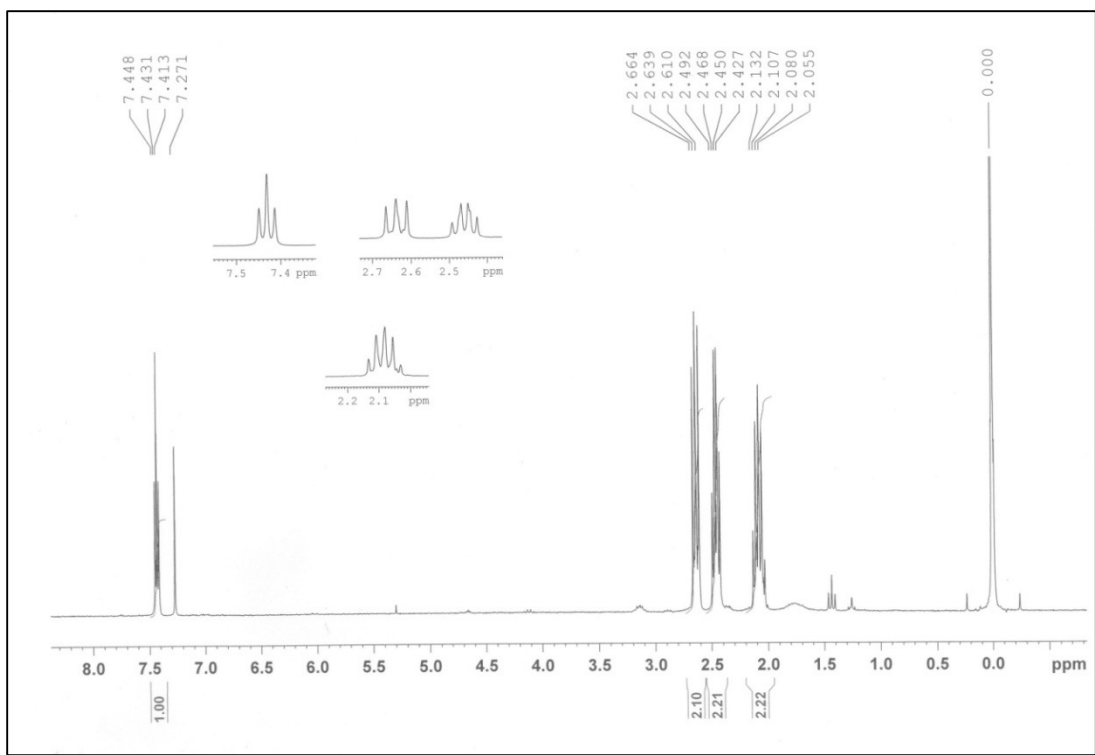
E56. Espectro de RMN ¹³C (62. MHz, DMSO-*d*₆) do hefluorofosfato de 1-butil-3-metilimidazólio **65**.



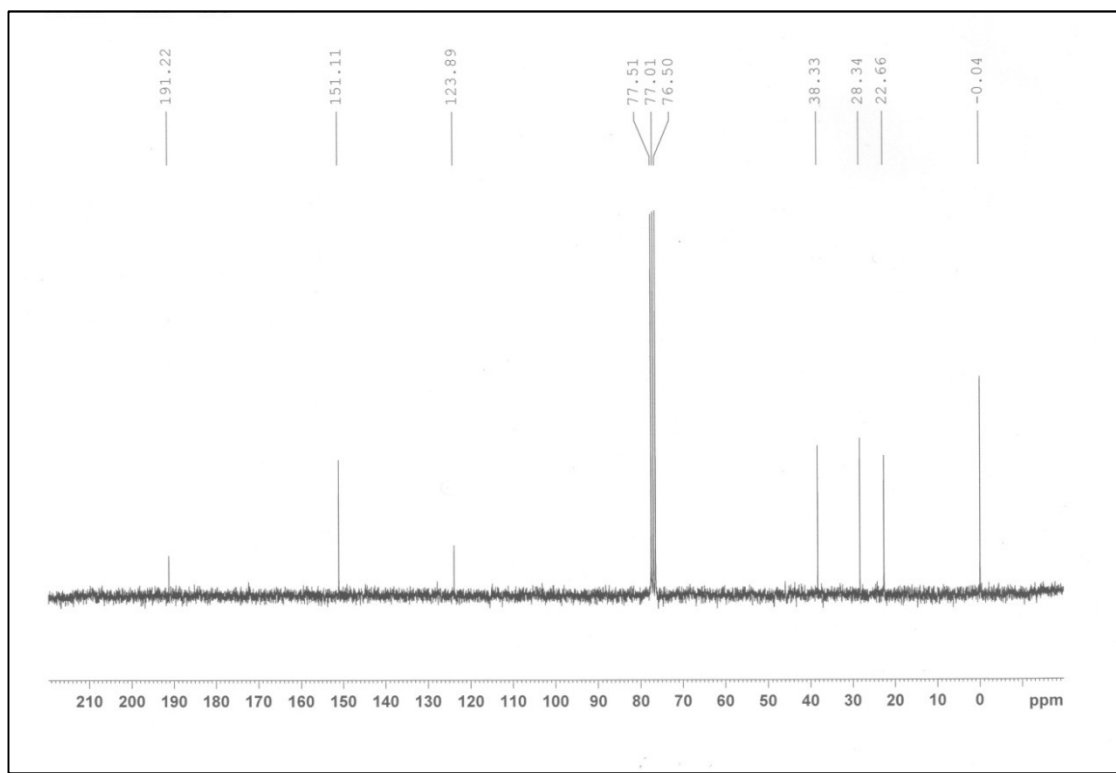
E57. Espectro de massas obtido por ionização de elétrons (70 eV) do 2-bromo-2-cicloexenona **51**.



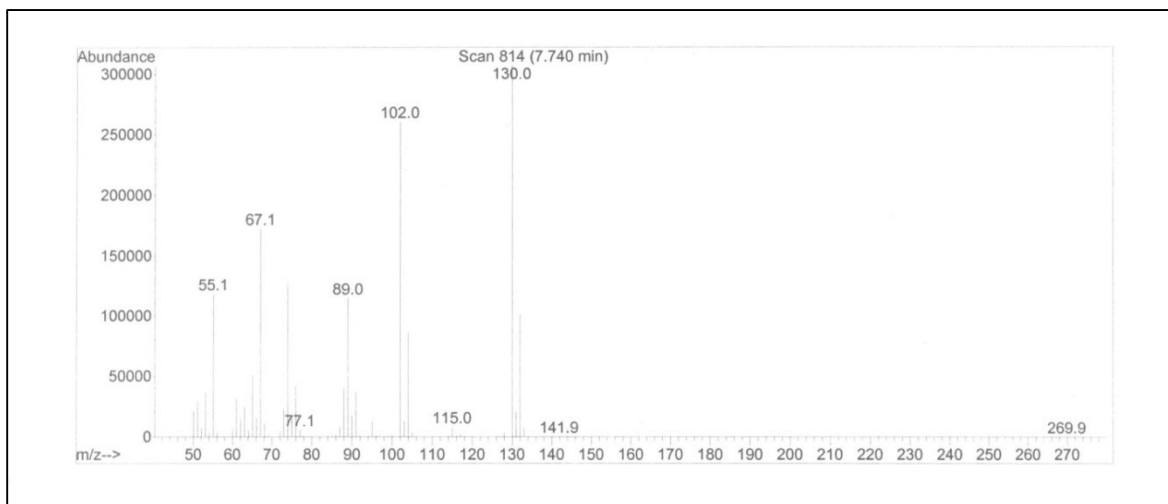
E58. Espectro de infravermelho (KBr) do 2-bromo-2-cicloexen-1-ona **51**.



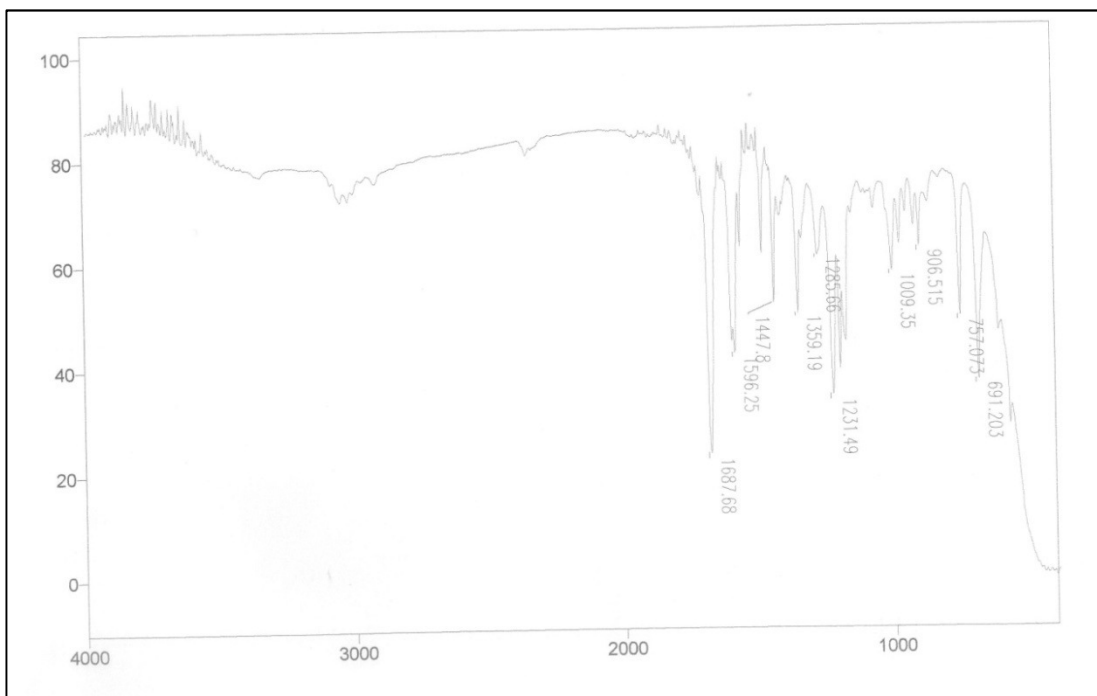
E59. Espectro de RMN ¹H (250 MHz, CDCl₃) do 2-bromo-2-cicloexenona **51**.



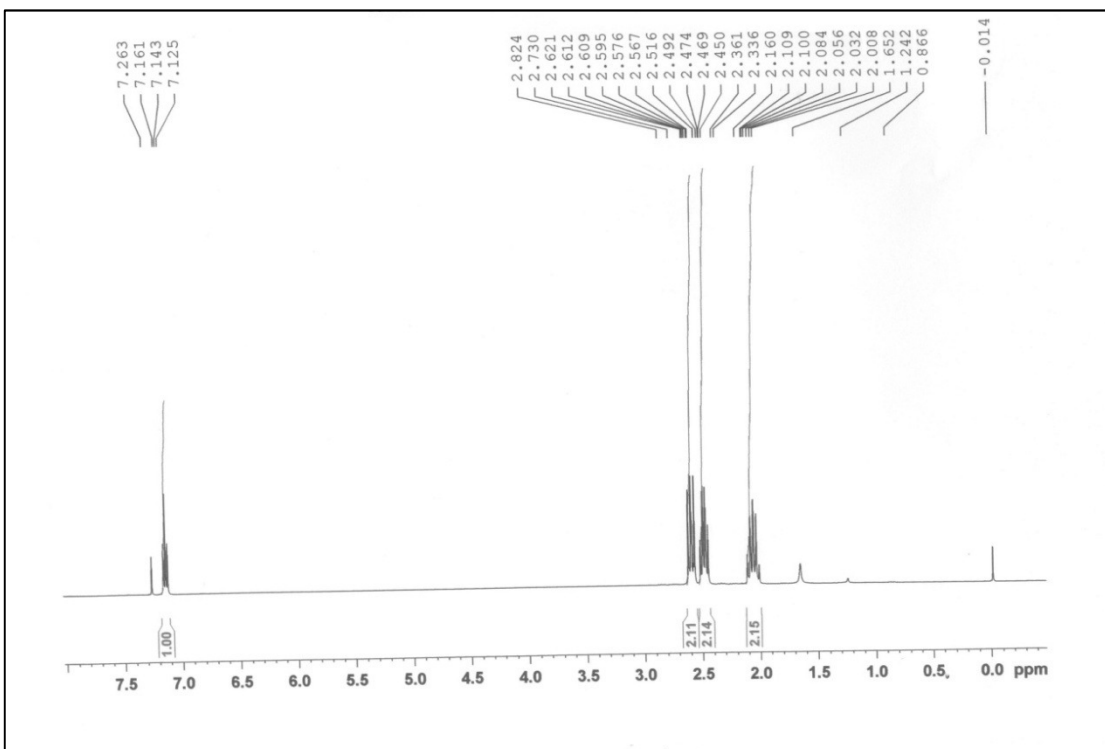
E60. Espectro de RMN ¹³C (62.5 MHz, CDCl₃) do 2-bromo-2-cicloexenona **51**.



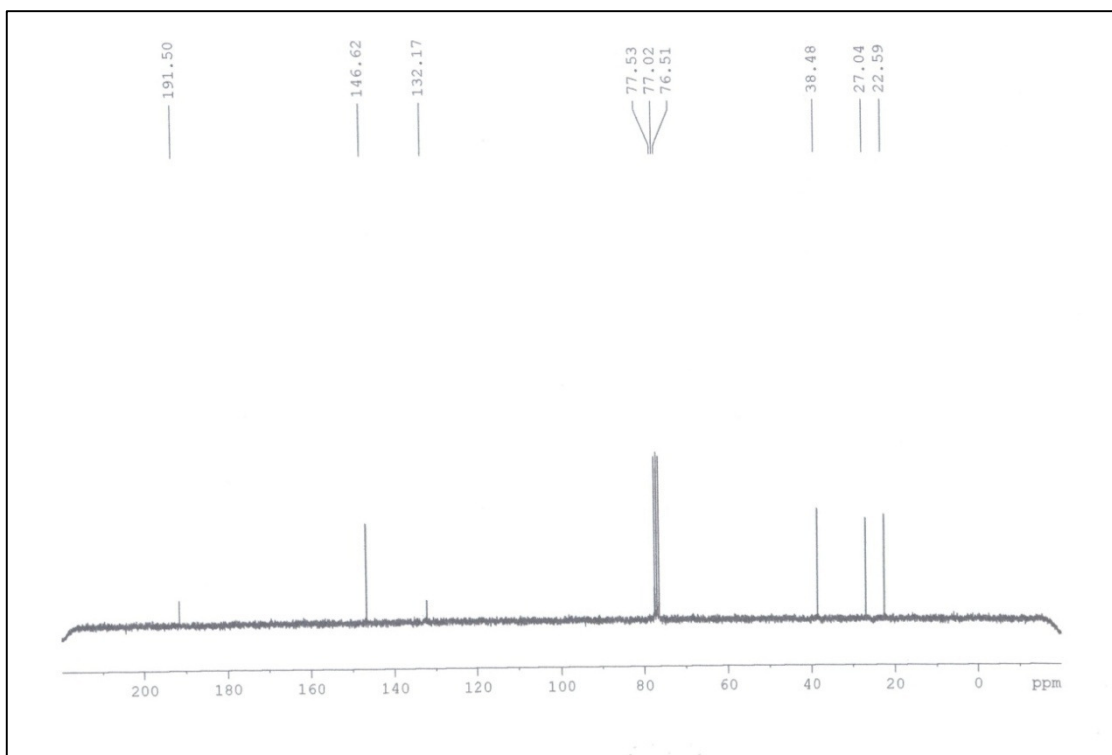
E61. Espectro de massas obtido por ionização de elétrons (70 eV) do 2-cloro-2-cicloexenona **52**.



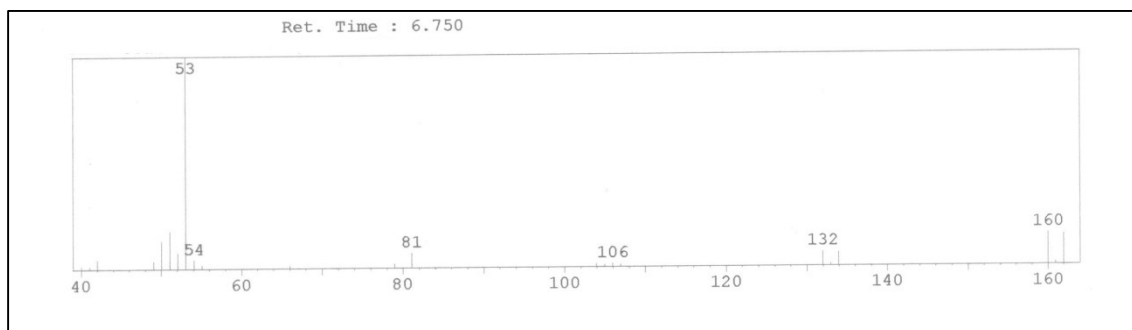
E62. Espectro de infravermelho (NaCl) do 2-cloro-2-cicloexen-1-ona **52**.



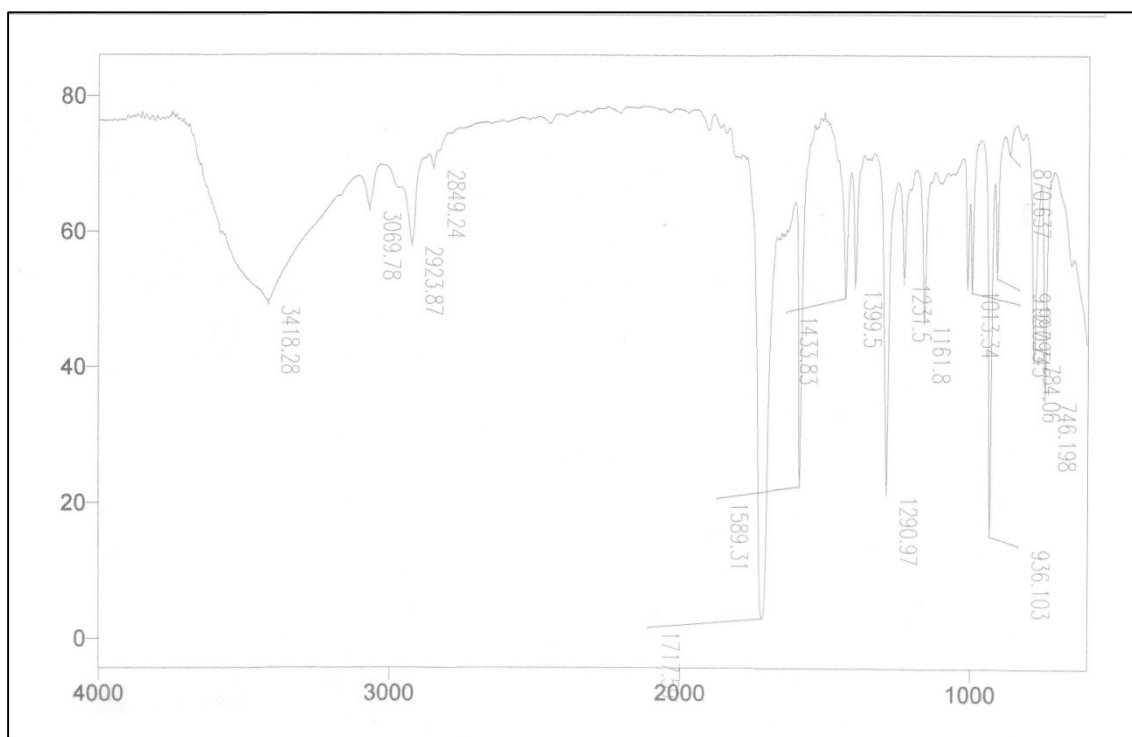
E63. Espectro de RMN ¹H (250 MHz, CDCl₃) do 2-cloro-2-cicloexen-1-ona **52**.



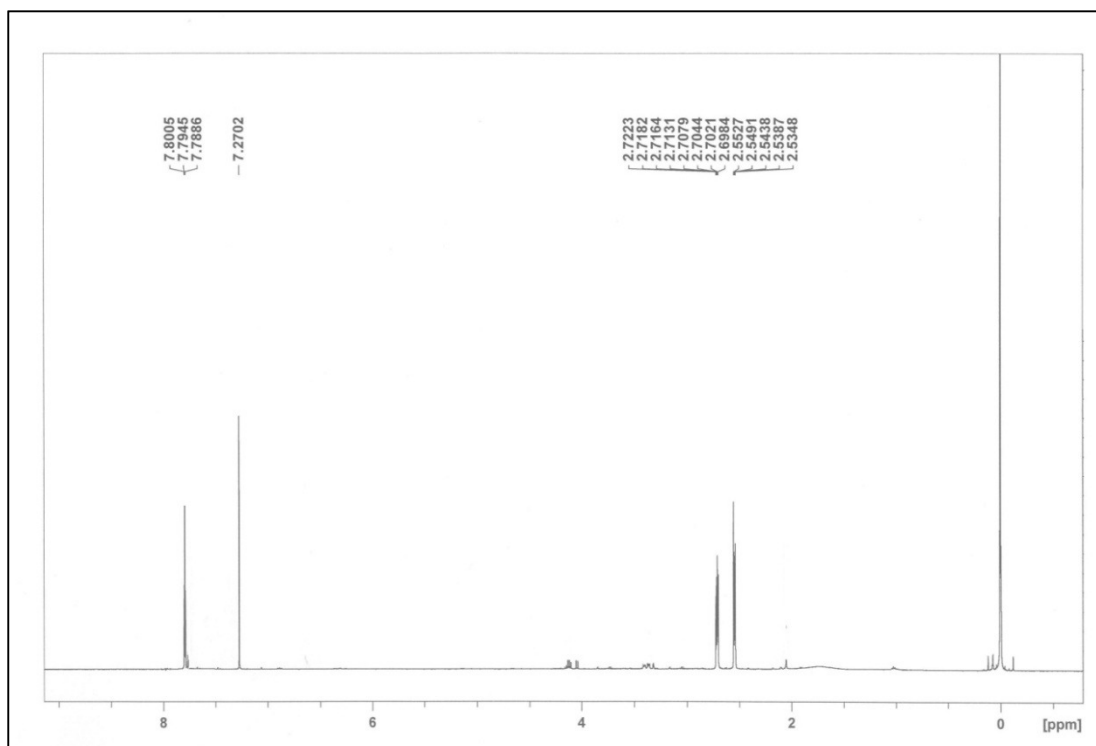
E64. Espectro de RMN ¹³C (62.5 MHz, CDCl₃) do 2-cloro-2-cicloexenona **52**.



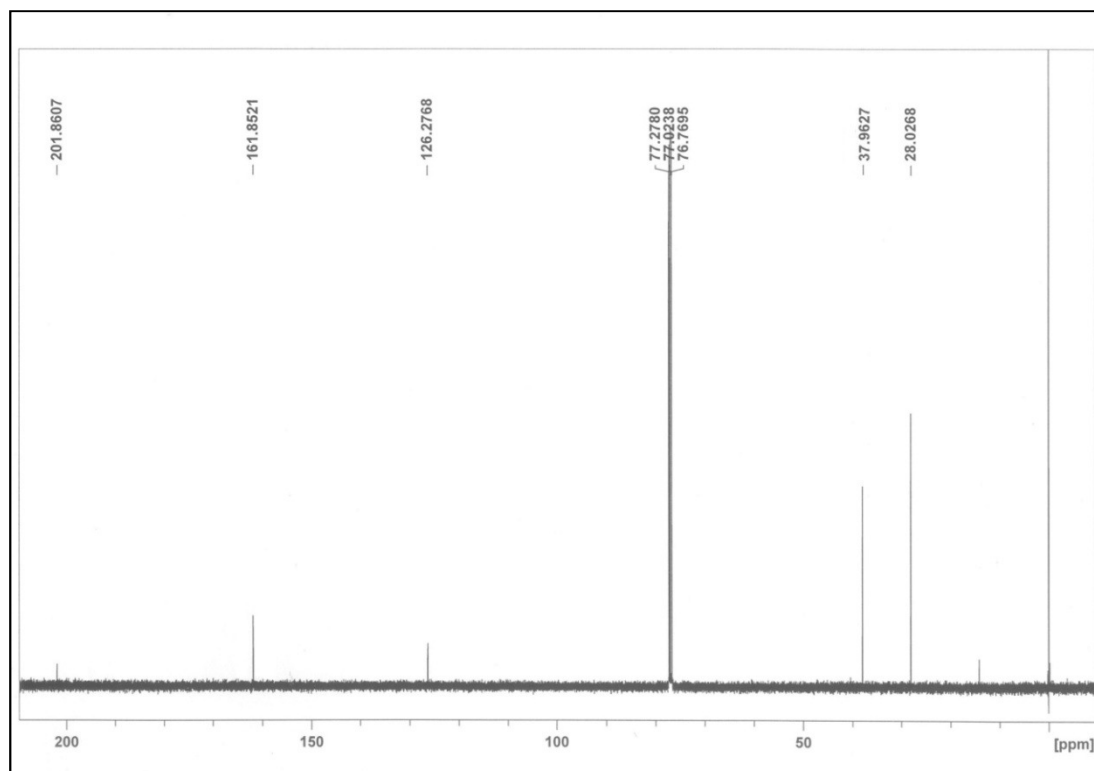
E65. Espectro de massas obtido por ionização de elétrons (70 eV) do 2-bromo-2-ciclopentenona **58**.



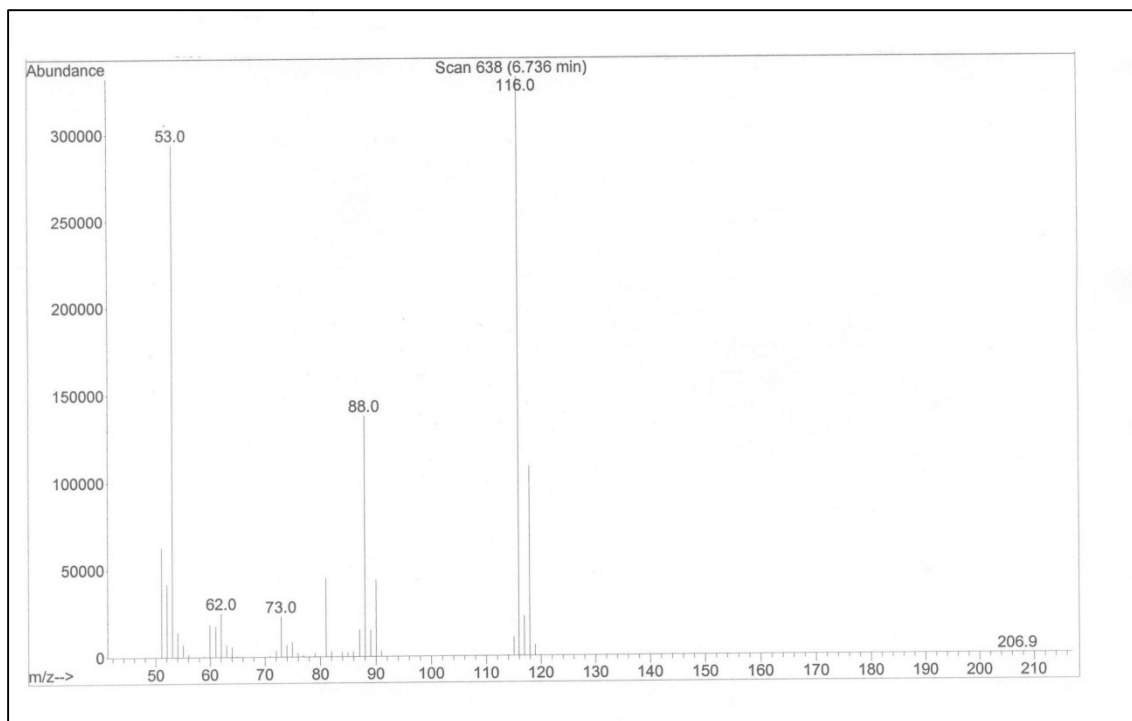
E66. Espectro de Infravermelho (KBr) do 2-bromo-2-ciclopentenona **58**.



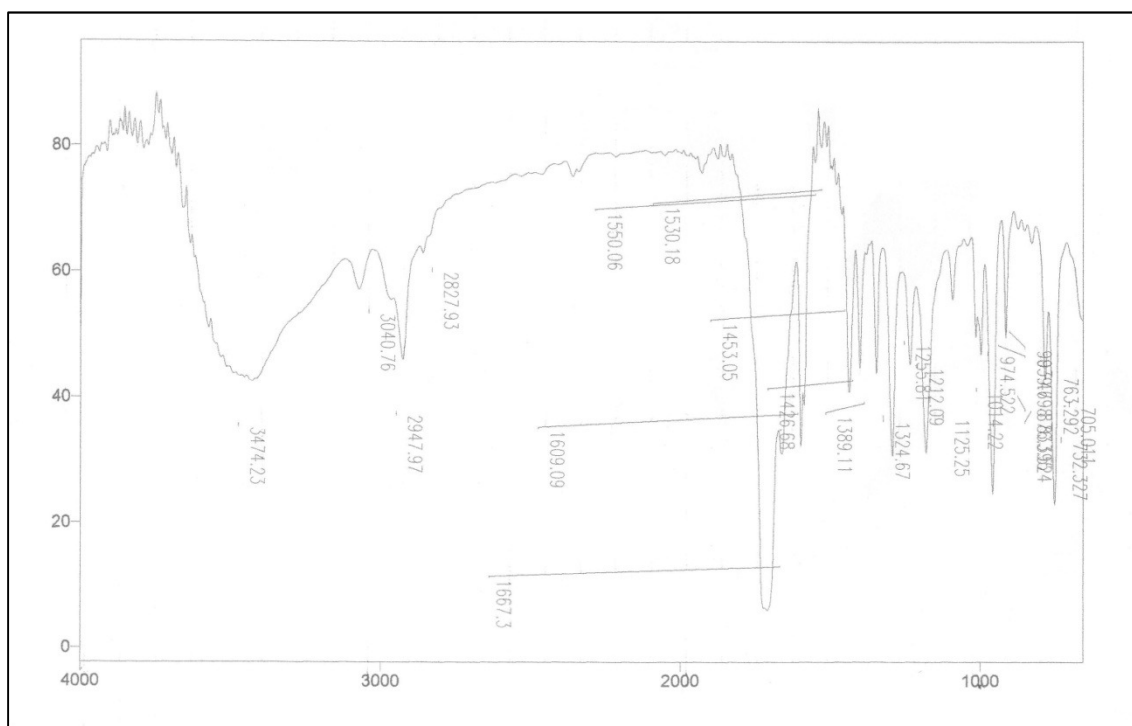
E67. Espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) do 2-bromo-2-ciclopentenona **58**.



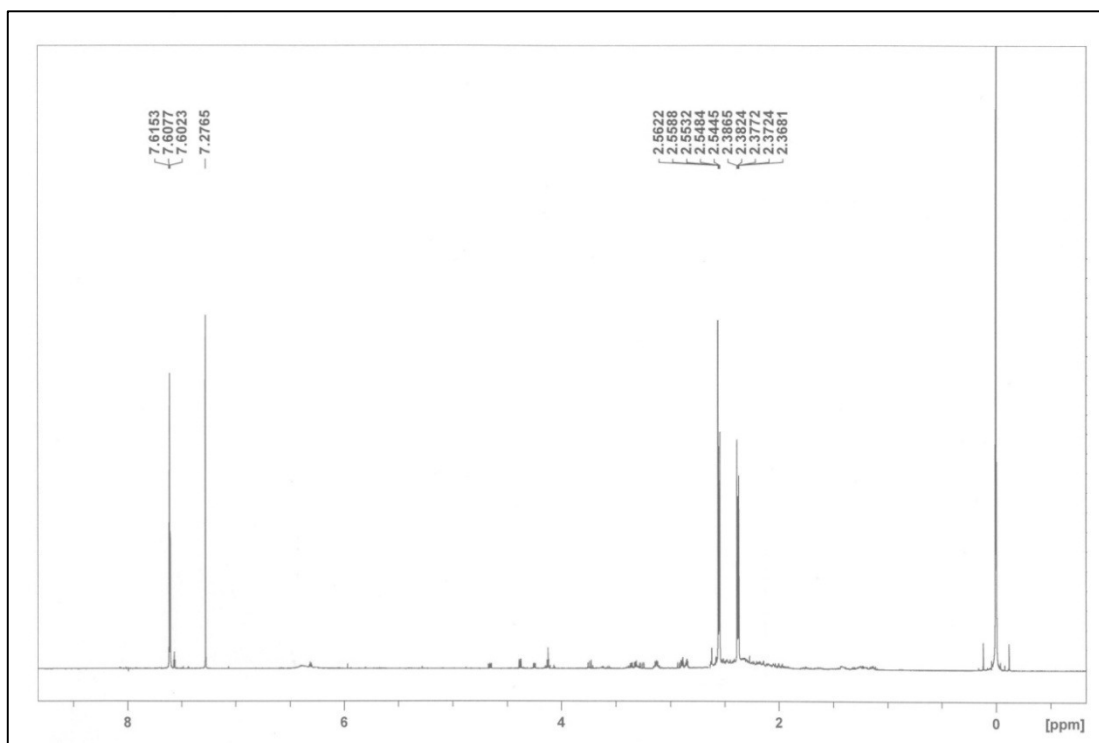
E68. Espectro de RMN ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) do 2-bromo-2-ciclopentenona **58**.



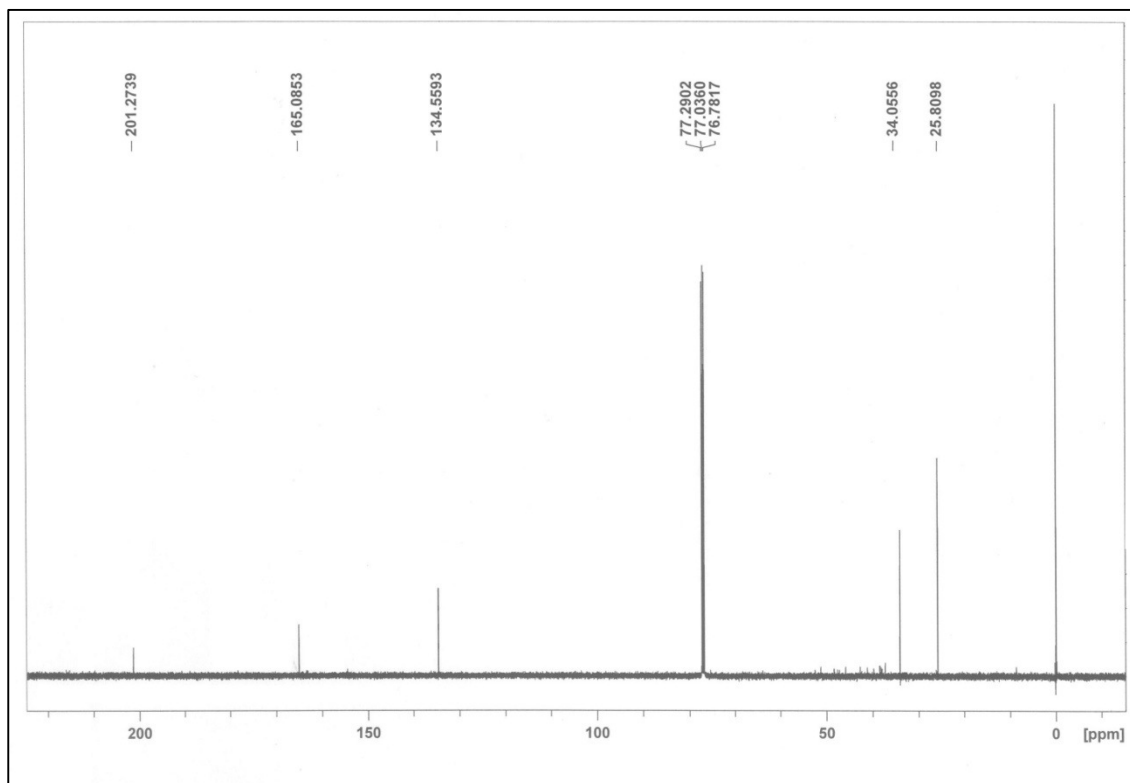
E69. Espectro de massas obtido por ionização de elétrons (70 eV) do 2-cloro-2-ciclopentenona **59**.



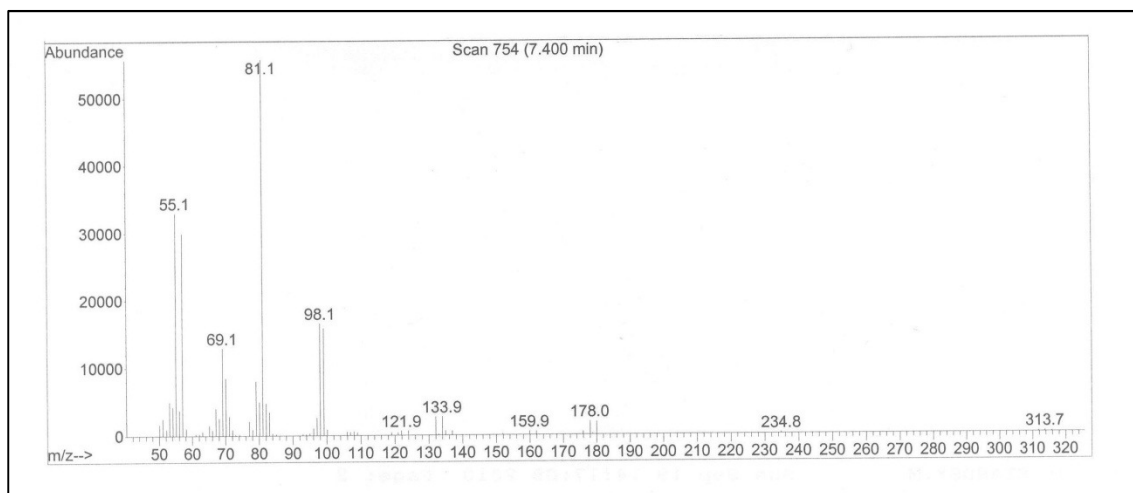
E70. Espectro de Infravermelho (KBr) do 2-cloro-2-ciclopentenona **59**.



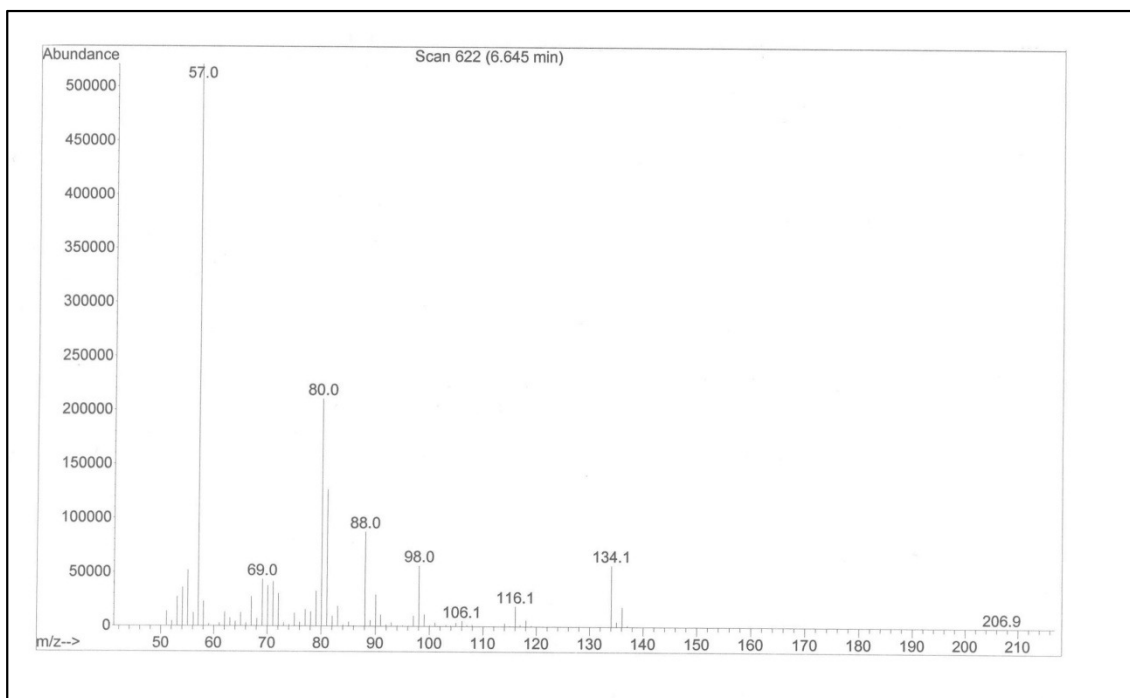
E71. Espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) do 2-cloro-2-ciclopentenona **59**.



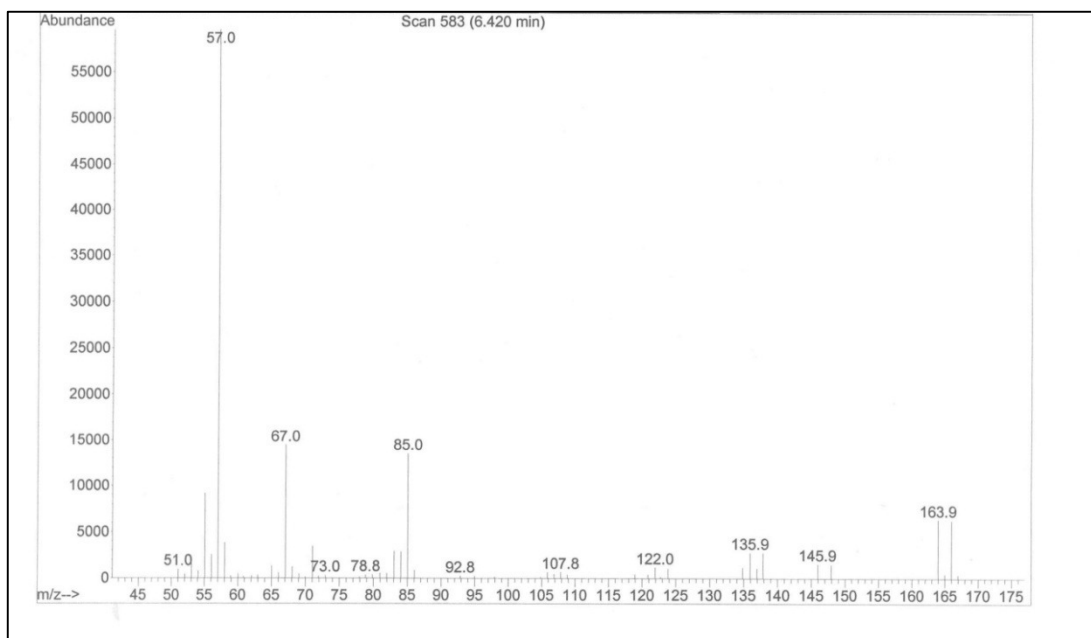
E72. Espectro de RMN ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) do 2-cloro-2-ciclopentenona **59**.



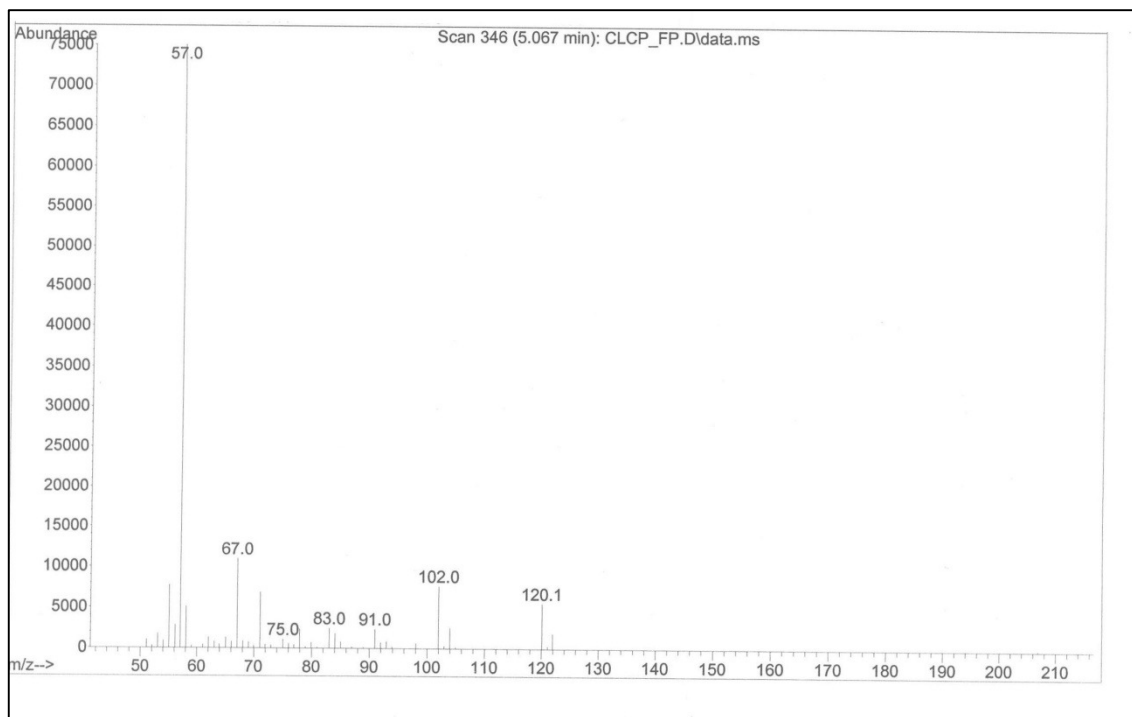
E73. Espectro de massas obtido por ionização de elétrons (70 eV) do 2-bromo-2-cicloexanol **55**.



E74. Espectro de massas obtido por ionização de elétrons (70 eV) do 2-cloro-2-cicloexanol **56**.



E75. Espectro de massas obtido por ionização de elétrons (70 eV) do 2-bromo-2-ciclopentanol **62**.



E76. Espectro de massas obtido por ionização de elétrons (70 eV) do 2-cloro-2-ciclopentanol **63**.

