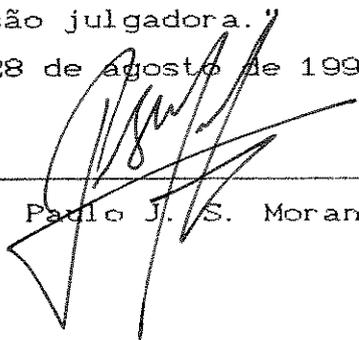


"Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida por Marcia de Carvalho e aprovado pela comissão julgadora."

Campinas, 28 de Agosto de 1992



Prof. Dr. Paulo J. S. Moran

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE QUÍMICA

Título:

REDUÇÃO ENANTIOSSELETIVA DA PROPIOFENONA,
ACETOFENONA E DERIVADOS α -HALOGENADOS
UTILIZANDO-SE FERMENTO DE PÃO

Tese de Mestrado

Marcia de Carvalho^m

Orientador: Paulo José S. Moran^t

Campinas - 1992



Orlando e Leonor sempre acreditaram no meu potencial não medindo esforços para me dar a melhor educação possível. É por isso que eu sei que sem a dedicação e confiança que eles depositaram em mim seria muito difícil ter chegado até aqui. Por tudo isso dedico este trabalho a eles, meus pais.

AGRADECIMENTOS

Agradeço,

À Moran pela orientação e amizade;

À meu marido Valmir que, além de ter sido compreensivo comigo durante as minhas fases de mau humor, teve a paciência de ler todo este trabalho;

À meu sogro Valdemar, a minha sogra Mercedes e aos meus pais pela ajuda financeira nos momentos de atazo da bolsa;

À amiga Eugênia pelas horas que dedicou a discussão sobre assuntos relacionados a este trabalho, bem como pelos momentos de descontração;

À professor José Augusto pelas valiosas informações dadas no desenvolvimento deste trabalho;

À amigo Fontana pela agilidade no reparo e na confecção dos materiais de vidro por mim utilizados;

À todos que direta ou indiretamente ajudaram na realização deste trabalho;

À CNPq pela concessão da bolsa de estudo.

ÍNDICE

ABREVIATURAS	1
RESUMO	3
ABSTRACT	5
CAPÍTULO I - INTRODUÇÃO	7
I.1 - REDUÇÕES ASSIMÉTRICAS - CONSIDERAÇÕES GERAIS	7
I.1.1 - REDUÇÕES ASSIMÉTRICAS DAS α -HALOACETOFENONAS	10
I.1.2 - REDUÇÕES ASSIMÉTRICAS ENZIMÁTICAS	11
I.1.3 - REDUÇÕES ASSIMÉTRICAS MICROBIOLÓGICAS	15
I.1.4 - REGENERAÇÃO DAS COENZIMAS (NADCP)H e NADHD	20
I.2 - ESTEREOSELETIVIDADE EM REDUÇÕES ENZIMÁTICAS OU MICROBIOLÓGICAS	26
I.2.1 - PARÂMETROS QUE INFLUENCIAM NA ESTEREOSELETIVIDADE DAS REDUÇÕES VIA FERMENTO DE PÃO	29
I.2.2 - REGRA DE PRELOG	30
I.3 - MECANISMO GERAL DAS REDUÇÕES	31
I.3.1 - UTILIZAÇÃO DAS REAÇÕES BIOMIMÉTICAS PARA SE INFERIR SOBRE O MECANISMO - TRANSFERÊNCIA DO HIDROGÊNIO	33
I.4 - FERMENTO DE PÃO (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>)	36
I.5 - BIBLIOGRAFIA	40
OBJETIVO	47
CAPÍTULO II - RESULTADOS E DISCUSSÃO	48
II.1 - ESTUDO DA REATIVIDADE DAS CETONAS	48
II.2 - REDUÇÃO DAS α -HALOACETOFENONAS PELOS MÉTODOS (A), (B) E (C)	50
II.2.1 - MECANISMO DAS REDUÇÕES DAS α -HALOACETOFENONAS	53
II.3 - REDUÇÃO DA PROPIOFENONA E DA α -BROMOPROPIOFENONA	55

II.4 -	REDUÇÃO DA ACETOFENONA PELOS MÉTODOS (A), (B) E (C) _____	56
II.4.1 -	ESTUDO DA VARIÇÃO DA ADIÇÃO DE AÇÚCAR _____	58
II.4.1.2 -	REDUÇÃO DA α -CLOROACETOFENONA VIA FERMENTO DE PÃO NA RAZÃO AÇÚCAR/FERMENTO = 0,015 _____	60
II.4.2 -	ESTUDO DA VARIÇÃO DO pH NA BIOTRANSFORMAÇÃO DA ACETOFENONA _____	61
II.4.3 -	BIBLIOGRAFIA _____	64
	CONCLUSÃO _____	66
CAPÍTULO 3 -	PARTE EXPERIMENTAL _____	67
III.1 -	INSTRUMENTAÇÃO _____	67
III.2 -	INFORMAÇÕES GERAIS _____	67
III.3 -	DESCRIÇÃO GERAL DOS PROCEDIMENTOS DE REDUÇÕES MICROBIOLÓGICAS _____	68
III.4 -	REDUÇÃO DA ACETOFENONA _____	69
III.5 -	REDUÇÃO DA α -CLOROACETOFENONA _____	70
III.6 -	REDUÇÃO DA α -BROMOACETOFENONA _____	71
III.7 -	REDUÇÃO DA α -IODOACETOFENONA _____	72
III.8 -	REDUÇÃO DA PROPIOFENONA _____	72
III.9 -	REDUÇÃO DA α -BROMOPROPIOFENONA _____	73
III.10 -	ESTUDO DA REDUÇÃO DA ACETOFENONA COM A VARIÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE AÇÚCAR _____	73
III.10.1 -	REDUÇÃO DA ACETOFENONA PELO MÉTODO A SEM A ADIÇÃO DESULFATO DE ZINCO. (açúcar(g) / fermento(g) = 0,48) _____	73
III.10.2 -	REDUÇÃO DA ACETOFENONA PELO MÉTODO B, PORÉM COM A ADIÇÃO DE 10% DE CARBOIDRATO (açúcar(g) / fermento(g) = 0,03) _____	73
III.10.3 -	REDUÇÃO DA ACETOFENONA PELO MÉTODO B, PORÉM COM A ADIÇÃO DE 1% DE CARBOIDRATO (açúcar(g) / fermento(g) = 0,003) _____	74
III.10.4 -	REDUÇÃO DA ACETOFENONA PELO MÉTODO B, PORÉM COM A ADIÇÃO DE 5,3% DE CARBOIDRATO (açúcar(g) / fermento(g) = 0,015) _____	74

III.10.5 - REDUÇÃO DA ACETOFENONA PELO MÉTODO B, PORÉM COM A ADIÇÃO DE 5,3% DE CARBOIDRATO E ETANOL Caçúcar(g) / fermento(g) = 0,015) _____	74
III.11 - REDUÇÃO DA α -CLOROACETOFENONA PELO MÉTODO B, PORÉM COM A ADIÇÃO DE 5,3% DE CARBOIDRATO Caçúcar(g) / fermento(g) = 0,015) _____	74
III.12 - ESTUDO DA VARIACÃO DO pH AO LONGO DA REDUÇÃO DA ACETOFENONA COM FERMENTO DE PÃO PARA TODAS AS REAÇÕES EM III.4 E III.10 _____	75
III.13 - ESTUDO DA REDUÇÃO DA ACETOFENONA, PELO MÉTODO B, COM O pH CONTROLADO _____	75
III.13.1 - REDUÇÃO DA ACETOFENONA À pH = 3,0 _____	75
III.13.2 - REDUÇÃO DA ACETOFENONA À pH = 4,5 _____	75
III.13.3 - REDUÇÃO DA ACETOFENONA À pH = 6,0 _____	76
III.13.4 - REDUÇÃO DA ACETOFENONA À pH = 8,0 _____	76
III.14 - REDUÇÃO DA α -BROMOACETOFENONA / PLASMÓLISE _____	76
III.15 - REDUÇÃO DA α -IODOACETOFENONA NA PRESENÇA DE m-DINITROBENZENO _____	77
III.16 - ESTABILIDADE DO 2-BROMO-1-FENILETANOL NA SUSPENSÃO DE FERMENTO DE PÃO _____	77
III.17 - SÍNTESE DA 2-BROMO-1-FENILETANOL RACÊMICA _____	78
III.18 - SÍNTESE DA α -IODOACETOFENONA _____	78
III.19 - SÍNTESE DO ÓXIDO DE ESTIRENO A PARTIR DA IODOIDRINA OBTIDA NO EXPERIMENTO RELATADO NO ITEM III.15 _____	79
III.20 - BIBLIOGRAFIA _____	79
ESPECTROS _____	81
RMN ¹ H de 1-feniletanol _____	82
IV de 1-feniletanol _____	83
EM de 1-feniletanol _____	84
RMN ¹ H de 2-cloro-1-feniletanol _____	85
IV de 2-cloro-1-feniletanol _____	86
EM de 2-cloro-1-feniletanol _____	87
RMN ¹ H de 2-bromo-1-feniletanol _____	88
IV de 2-bromo-1-feniletanol _____	89
EM de 2-bromo-1-feniletanol _____	90

RMN ¹ H de 2-iodo-1-feniletanol	91
IV de 2-iodo-1-feniletanol	92
EM de 2-iodo-1-feniletanol	93
RMN ¹ H de 1-fenilpropanol	94
IV de 1-fenilpropanol	95
EM de 1-fenilpropanol	96
RMN ¹ H da α -iodoacetofenona	97
IV da α -iodoacetofenona	98
RMN ¹ H do óxido de estireno	99

ABREVIATURAS

- ADH — álcool desidrogenase
AlDH — aldeído desidrogenase
br s — singlete largo
c — concentração
d — dublete
dd — duplo dublete
ee — excesso enantiomérico
EM — espectroscopia de massas
ENZ — enzima
Et — etil
FDH — formiato desidrogenase
Fig — figura
H₂ase — hidrogenase
IV — espectrofotometria de infra-vermelho
J — constante de acoplamento
m-DNB — meta-dinitrobenzeno
m — multiplete
M⁺ — íon molecular
Me — metil
m/e — massa/carga
NAD⁺ — nicotinamida adenina dinucleotídeo na sua forma oxidada
NADH — nicotinamida adenina dinucleotídeo
NADPH — nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
NADP⁺ — nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato na sua
forma oxidada
p. — página
Ph — fenil

Pr — propil

q — quarteto

RMN¹H — espectroscopia magnética nuclear de próton

s — singleto

S_N2 — substituição nucleofílica de segunda ordem

t — tripleto

Tab — tabela

TMS — tetrametil-silano

RESUMO

Certas enzimas que estão presentes no fermento de pão (*Saccharomyces cerevisiae*) são capazes de reduzir assimetricamente cetonas proquirais à alcoois quirais. Algumas alquil fenil cetonas foram submetidas a reduções deste tipo e os respectivos álcoois exibiram diferentes graus de pureza enantiomérica em função das condições de reação. Este fenômeno foi prontamente observado após a redução da acetofenona por dois métodos diferentes: reações com pH controlado e com variação na concentração de açúcar. No primeiro experimento os rendimentos ópticos variaram desde 8 ((+)-(R)-1-feniletanol até 86% ((-)-(S)) e no segundo desde 4 ((+)-(R)) até 91% ((-)-(S)). Baixos rendimentos sugerem que existem pelo menos duas enzimas competitivas com enantiosseletividades diferentes catalizando a redução em atividades comparáveis. Por outro lado, há um aumento no rendimento óptico quando somente enzimas de mesmas enantiosseletividades mantêm suas atividades catalíticas.

As reduções com fermento de pão das α -haloacetofenonas forneceram haloidrinas opticamente ativas correspondentes. Estas reduções também mostraram um comportamento diferenciado frente a modificações nas condições de reação, tais como adição de açúcar ou de solvente orgânico. Dentre elas a α -cloro e α -fluoracetofenona forneceram os melhores rendimentos ópticos (82 e 97%, respectivamente), em quantidades apreciáveis (74 e 67%, respectivamente). Entretanto, a obtenção da iodoidrina só foi possível quando a reação foi feita em presença de um capturador de radicais, enquanto que na ausência deste foi observado a formação da acetofenona. Considerações mecanísticas foram abordadas para

explicar esse fenômeno. Cetonas como a propiofenona e a α -bromopropiofenona também foram submetidas à biotransformações deste tipo.

Dentre todas as cetonas estudadas as halogenadas exibiram uma maior reatividade frente as não halogenadas sendo consumidas muito mais rapidamente, porém nem sempre fornecendo o produto desejado. Neste caso, as reações laterais prevaleceram sobre a reação principal, abaixando apreciavelmente o rendimento químico. A saber, α -bromoacetofenona e a α -bromopropiofenona apresentaram este comportamento.

ABSTRACT

Baker's yeast, *Saccharomyces cerevisiae*, contains several enzymes in its cells that are able to reduce prochiral ketones to chiral alcohols. Biotransformations of this kind were made with some alkyl phenyl ketones and depending upon the reaction medium the respective products showed different enantiomeric pure grades. This phenomenon was promptly observed when acetophenone was reduced using two different methods: reactions with controlled pH and with variation of the glucose concentration. In the former case, the optical yields ranged from 8 ((+)-(R)-1-phenylethanol) to 86% ((-)-(S)) and, in the later from 4 ((+)-(R)) to 91% ((-)-(S)). Low values suggest there are at least two competitive enzymes having different enantioselectivities working as catalysts with similar activities. On the other hand, if only enzymes with the same enantioselectivities and comparable activities are involved the optical yield is increased.

The α -haloacetophenones reductions by baker's yeast yielded optically active halohydrins. These reductions also exhibited a differential behaviour when the reaction medium conditions were modified, such as by addition of glucose or organic solvent. But the best optical grades were obtained by α -chloro and α -fluoroacetophenone (82 and 97%, respectively) in appreciable quantities (74 and 67%, respectively). Nevertheless, the production of iodohydrin could be observed only when the reaction was run in the presence of radical inhibitor, whereas in its absence the product isolated was acetophenone. Mechanistic considerations were invoked in order to explain this phenomenon.

Biotransformations by baker's yeast were also made with ketones such as propiophenone and α -bromopropiophenone.

All halogenated ketones reacted more rapidly than the non-halogenated ones exhibiting greater reactivity. However the desired product was not always isolated. In these cases, the side reactions took advantage over the main one reducing markedly the chemical yield. Namely, α -bromoacetophenone and α -bromopropiophenone exhibited this behavior.

CAPÍTULO I

INTRODUÇÃO

I.1 - REDUÇÕES ASSIMÉTRICAS - CONSIDERAÇÕES GERAIS

A existência de compostos opticamente ativos foi descoberta em 1848 por Louis Pasteur, quando ele separou pela primeira vez os enantiômeros de uma mistura racêmica; vindo a fundar uma instituição científica quatorze anos mais tarde.^(1,2)

A descoberta de Pasteur funcionou como uma alavanca para que se iniciasse avanços progressivos nessa área sendo, ao longo dos anos, a separação de racematos aceita como uma prática rotineira em escala industrial. Ainda hoje esta técnica é amplamente empregada para a obtenção de compostos enantiomericamente puros.⁽¹⁾

A partir dos anos 60 outra técnica para a obtenção de compostos opticamente ativos ganhou o seu espaço. Esta se baseava na introdução de centros de assimetria em uma molécula proquiral, formando enantiômeros puros. Iniciou-se, então, o desenvolvimento das reações assimétricas.⁽¹⁾ Estas podem ser divididas em três grupos: reações assimétricas enzimáticas, microbiológicas e químicas.⁽³⁾ Este último grupo não será aqui discutido por não fazer parte do assunto desta tese. Os outros dois grupos serão abordados mais adiante.

Indústrias como a farmacêutica e a agroquímica têm interesse direto na síntese de compostos opticamente ativos, a partir dos quais pode-se sintetizar as drogas. Portanto é imprescindível para estes setores conhecer os efeitos biológicos e a disposição frente a um organismo causados por cada um dos enantiômeros presentes numa droga, quando esta é comercializada em

sua forma racêmica.^[1,4] Desde a década passada sabe-se que esses efeitos são frequentemente distintos, uma vez que cada enantiômero é metabolizado por um caminho bioquímico e velocidade diferentes, quando administrados *in vivo*. Isto ocorre porque são enzimas as responsáveis pela degradação dos enantiômeros e estas são estereosseletivas.^[5,6] Como geralmente é um dos enantiômeros, o chamado *eutomer*, que possui uma determinada atividade terapêutica desejada, é importante conhecer o efeito biológico causado pelo outro enantiômero, conhecido como *distomer*, para que uma droga racêmica possa ser administrada sem causar efeitos laterais maléficis, até mesmo teratogênicos, ou minimizar o efeito terapêutico.^[1,4]

TABELA 1
DIFERENÇAS FARMACOLÓGICAS EXISTENTES
ENTRE OS ESTEREOISÔMEROS.

ISOPROTERENOL ^[7]	(R)	β -receptor (processos de vasodilatação)
	(S)	mesmo efeito da forma R, porém 90 vezes menos ativo
CLORANFENICOL ^[8]	(R,R)	bactericida
	(S,S)	inativo
PROPANOLOL ^[8]	(S)	agente β -bloqueador
	(R)	mesmo efeito da forma S, porém 10 vezes menos ativo
ETAMBUTOL ^[8]	(S,S)	tratamento da tuberculose
	(R,R)	causa cegueira
TALIDOMIDA ^[9]	(R)	sedativo
	(S)	teratogênico
NAPROXEN ^[5]	(S)	antiinflamatório
	(R)	mesmo efeito da forma S, porém 11 vezes menos ativo

É sabido que o *distomer* pode ser totalmente inativo ou produzir efeitos adversos indesejados por ser capaz de interagir favoravelmente com outros sítios enzimáticos receptores. Entretanto, mesmo quando o *distomer* é inerte ele pode causar uma diminuição na atividade terapêutica do fármaco. Por vezes ambos enantiômeros apresentam o mesmo efeito biológico, porém apresentando diferenças significativas em suas atividades farmacológicas.^[4,5] A tabela 1 pode melhor ilustrar estas diferenças.

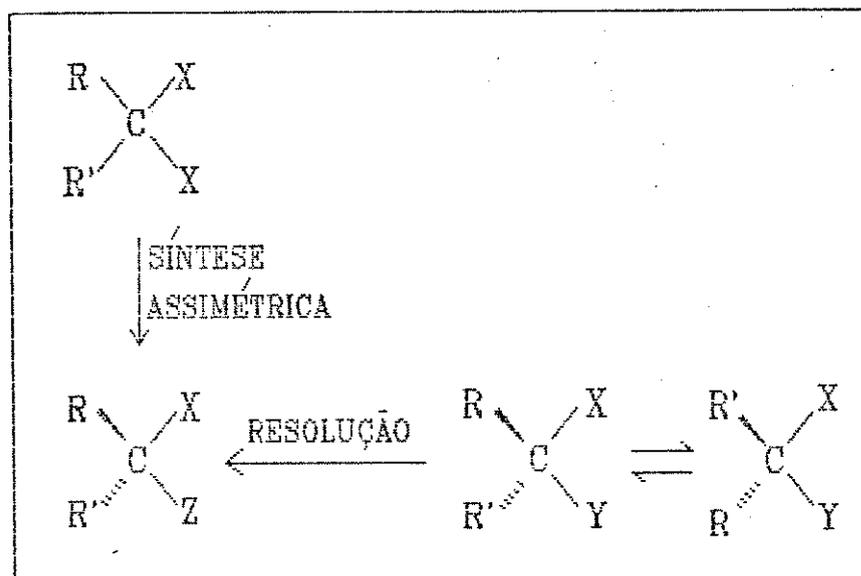


Figura 1: Síntese assimétrica vs Resolução com racemização espontânea.

Por muito tempo a comunidade médica ignorou essa variação na atividade biológica existente entre os enantiômeros, sendo que nos Estados Unidos, em 1980, eram administrados pelo menos 398 drogas em sua forma racêmica.^[5,6] Um argumento frequentemente usado para apoiar tal atitude eram as dificuldades e custos envolvidos na etapa de resolução de um racemato.^[4] Entretanto, muitos estudos surgiram em contraposição a esta atitude, mostrando com clareza as diferenças farmacológicas existentes. Portanto esses estudos defendiam que a administração de drogas enantiomericamente puras possuía um potencial que só

poderia ser benéfico. Essa nova consciência foi a responsável pelo desenvolvimento de novos métodos de sínteses com o fim de se obter um único enantiômero.^[5]

Outro fator que veio estimular o desenvolvimento de novas técnicas é que a resolução implica em uma etapa a mais em uma síntese: a racemização do enantiômero não desejado. Somente quando a racemização é espontânea *in situ* é que o processo se torna economicamente viável e concorrente com a síntese assimétrica (Fig. 1).^[1]

I.1.1 - REDUÇÕES ASSIMÉTRICAS DE α -HALOACETOFENONAS

Devido a alta potencialidade das haloidrinas como intermediários em sínteses de produtos naturais opticamente ativos^[10a] bem como em sínteses de compostos farmacêuticos,^[7] as α -haloacetofenonas têm sido amplamente submetidas à reduções assimétricas por vários meios: a. com reagentes organoborano,^[10] b. pela mistura de hidretos de boro ou alumínio e vários dióis quirais ou aminoálcoois,^[11] c. por reagentes preparados a partir de borano e aminoálcoois quirais,^[12] d. por oxaborolidina,^[13] e. por *Cryptococcus macerans*^[14] e f. pela desidrogenase do fígado do cavalo dependente da nicotinamida adenina dinucleotídeo (NADH/HLADH).^[15]

Uma valiosa aplicação das haloidrinas é que estas podem ser facilmente transformadas em epóxidos opticamente ativos. Estes têm sido amplamente empregados como intermediários em sínteses de fármacos e produtos naturais por serem muito versáteis, uma vez que eles podem ser convertidos para vários outros grupos funcionais. Foi, por exemplo, através de um epóxido que Brown e Pai sintetizaram a ubina em alta pureza óptica.^[10a, 16] Porém, é muito importante a passagem pela haloidrina já que esta é mais adequada no estabelecimento da configuração do carbono benzílico.^[14]

Outras ariletanolaminas, como a ubina, podem ser sintetizadas a partir das haloidrinas, sendo que as mesmas pertencem a uma classe importante de fármacos,^[7] dos quais a

grande maioria são drogas sintéticas análogas ou derivadas das ariletanolaminas naturais.^[17,18] Além disso, até 1989 ainda existiam poucas informações a respeito de métodos de resolução de ariletanolaminas racêmicas e como é sabido que os isômeros destas possuem atividades terapêuticas significativamente diferentes, torna-se evidente a importância no desenvolvimento de técnicas adequadas para a obtenção destes compostos e preferencialmente a obtenção destes em sua forma enantiomérica pura.^[18,19,20]

I.1.2 - REDUÇÕES ASSIMÉTRICAS ENZIMÁTICAS

Metodologias que envolvem enzimas como catalisadores em reações são genericamente chamadas de transformações microbiológicas, biotransformações ou ainda enzimações. Estas biotransformações são potencialmente úteis no preparo de fármacos e aditivos alimentícios, bem como na química fina.^[21]

Os microorganismos possuem várias enzimas, em suas células, que são responsáveis por processos metabólicos e de reprodução celular. São essas enzimas que são isoladas para serem utilizadas em reações enzimáticas, onde elas atuam somente como catalisadores acelerando a velocidade de uma reação em um fator de até 10^{12} . Cada molécula de enzima é capaz de catalisar de 100 à 1000 moléculas por segundo de uma dada reação sendo, portanto, catalisadores de alta eficiência. Existem desde 1984 mais de 800 tipos diferentes destes catalisadores comercialmente disponíveis.^[21,22,23]

Uma característica fundamental das enzimas é que as mesmas são capazes de reconhecerem, através de seus sítios ativos, as diferenças estruturais e estereoquímicas existentes entre substratos quaisquer, o que lhes confere alta estereoespecificidade. Sendo assim, compostos estereoisoméricos ou compostos proquirais contendo grupos ou faces enantiotópicas são distintamente reconhecidos como substratos diferentes. Até mesmo grupos idênticos são geralmente tratados de forma diferenciada pelas enzimas (Fig. 2).^[22,23,24]

As enzimas são também seletivas quanto ao tipo de reação a ser catalisada não produzindo, portanto, produtos laterais indesejados. As transferases, por exemplo, são responsáveis pela transferência de partes de uma molécula para outra, porém nunca serão capazes de catalisarem adições em uma ligação dupla, sendo

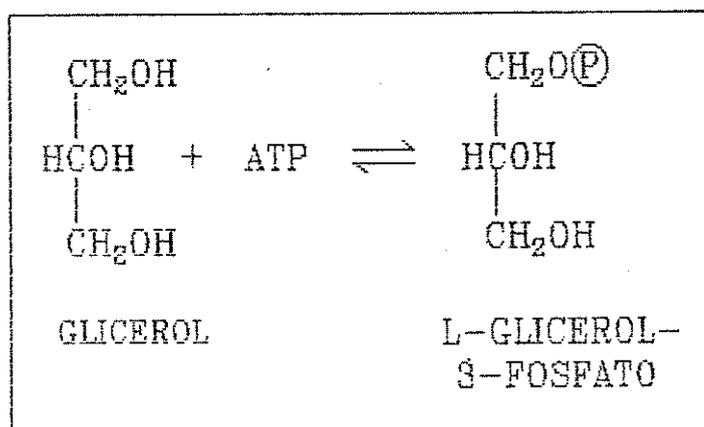


Figura 2: Fosforilação do glicerol pela glicerol quinase.

que este papel cabe as liases. Existem ainda enzimas, as isomerases, que são responsáveis somente por fenômenos de isomerização e também aquelas que são responsáveis pela catálise de reações de óxido-redução. Este último grupo são as oxidoredutases. Da mesma forma existem vários outros grupos de enzimas.^[22,25] Entretanto uma característica é comum a todos os grupos: "os substratos das enzimas são compostos naturais". Esta peculiaridade faz com que reações catalisadas enzimaticamente sejam de particular interesse no preparo de fármacos, bem como no desenvolvimento de compostos agroquímicos e alimentícios.^[26]

Outros parâmetros que estimulam a utilização das enzimas como catalisadores são a sua versatilidade, sendo capazes de catalisarem uma grande variedade de reações, e as condições do meio de reação. Estas condições são atrativas por serem brandas, isto é, temperatura ambiente, pH próximo do neutro e pressão atmosférica. Condições como estas minimizam problemas de rearranjos, isomerização e epimerização, os quais geralmente afligem aqueles que utilizam métodos químicos convencionais; além

de serem convenientes quando se trabalha com substratos instáveis. ^[21,22]

Outras vantagens que as enzimas oferecem é a sua atoxicidade e segurança na manipulação, o que nem sempre ocorre quando se trata de catalisadores químicos convencionais. ^[8]

Porém o trabalho com enzimas isoladas também oferece dificuldades, tais como o custo acentuado de certas enzimas e o custo ainda mais elevado das coenzimas. ^[16,22] Estas são frações não protéicas, que se ligam as enzimas, necessárias para que as mesmas exibam o máximo de sua atividade catalítica. As coenzimas mais comuns são o NAD(H) (nicotinamida adenina dinucleotídeo), NADP(H) (nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato), ATP (adenosina 5'-trifosfato) e coenzima A (de acetilação). ^[16,23]

Um grupo de enzimas que têm sido satisfatoriamente empregadas como catalisadores específicos são as lipases, pois elas não requerem a utilização de coenzimas. ^[5] Entretanto a maioria das reações de interesse na química orgânica, principalmente as que envolvem processos de oxidação ou redução, catalisadas por enzimas necessitam da presença de coenzimas, neste caso o alto preço destas se torna um fator inquietante. Portanto, para que uma reação envolvendo coenzimas seja economicamente viável é necessário a regeneração destas em sua forma ativa *in situ*, através do desenvolvimento de processos capazes de fornecer essa regeneração utilizando reagentes baratos. Desta forma a quantidade de coenzimas a serem adicionadas em um meio reacional deve ser catalítico. ^[22,26] Para se ter uma idéia da importância das lipases e das oxidoredutases em sínteses, estes dois grupos de enzimas eram responsáveis por 90% das comunicações na literatura até 1989. ^[27]

O próprio isolamento e purificação das enzimas dependem de equipamentos adequados e técnicas especializadas, as quais muitas vezes não são comuns a químicos orgânicos sintéticos, tendo estes que aprender técnicas básicas de enzimologia e bioquímica. ^[26, 28]

Uma alternativa para contornar tal situação e baixar o custo é a utilização de extratos enzimáticos brutos, onde há a

presença de várias enzimas. Porém, a seletividade de uma reação feita com extratos brutos fica comprometida, devido a possível presença de enzimas competitivas com preferências estereoseletivas opostas. ^[16,29]

Quanto a estabilidade das enzimas, sendo este um fator importante tanto na sua estocagem quanto na sua utilização, devemos observar vários aspectos:

a. Um segundo aspecto é a pouca estabilidade das enzimas frente à solventes orgânicos, principalmente os polares. ^[8] A perda da estabilidade implica numa menor eficiência catalítica, devido a dispersão dos grupos residuais aminoácidos (hidrofóbicos) que provocam uma drástica mudança conformacional na estrutura enzimática. Uma forma de se contornar este problema está na utilização de meios de reação contendo água/solvente orgânico, onde a enzima é preferencialmente utilizada após sua imobilização em suporte hidrofílico. Esta quando imobilizada forma ligações com o suporte que aumentam a sua estabilidade conformacional. ^[16,29,30]

Outra vantagem que o sistema água/solvente orgânico oferece é a possibilidade de se usar substratos que são pouco solúveis em água. A diminuição de efeitos de inibição enzimática que possam ser causados pelo próprio substrato ou pelo produto, bem como a maior facilidade de se recuperar ambos, também são vantagens oferecidas por esse sistema. ^[30]

b. Outro aspecto é que a estabilidade está diretamente relacionada com a temperatura, pois a temperaturas mais altas pode haver a desnaturação da enzima. Esta quando desnaturada perde a sua integridade estrutural destruindo o sítio ativo com conseqüente perda da atividade catalítica. Porém, há um compromisso entre a temperatura, a estabilidade e a atividade, isto é, com o aumento da temperatura aumenta-se a atividade, entretanto a enzima vai se tornando gradativamente menos estável. Portanto a escolha da temperatura ótima de trabalho vai depender do tempo total de reação requerido. ^[29]

c. A estabilidade também está relacionada com o pH do meio. Este interfere tanto a estabilidade quanto a atividade, sendo que nem sempre o pH bom para a estabilidade coincide com o pH bom para a atividade. ^[29]

Apesar de haver muito o que aprender sobre o comportamento e as características oferecidas pelas enzimas, imobilizada ou livre, em água e em solventes orgânicos, as vantagens obtidas por esses processos enzimáticos fazem desta técnica uma importante metodologia alternativa no preparo de compostos opticamente ativos. Tendo em vista que esforços no sentido de melhorar as características catalíticas vem sendo feitos com sucesso pela engenharia genética, o uso destes catalisadores em sínteses em grande escala parece estar prestes a se tornar uma importante ferramenta. ^[16,30]

I.1.3 - REDUÇÕES ASSIMÉTRICAS MICROBIOLÓGICAS

Nas reduções assimétricas microbiológicas, da mesma forma que nas enzimáticas, são as enzimas as responsáveis pela catálise das reduções. Porém, estas não são isoladas sendo utilizadas as células intactas durante o processo. De um modo geral, as considerações feitas para as reduções por enzimas isoladas são semelhantes aos processos microbiológicos. Porém, como o sistema *in vivo* é muito complexo, é mais difícil estabelecer quais variáveis são críticas e, portanto, responsáveis por mudanças nos resultados obtidos. ^[2,31]

Apesar da complexidade do sistema, processos biológicos deste tipo oferecem vantagens em relação aos processos químicos convencionais. Uma vantagem, que pode ser citada com propriedade, é a introdução de dois centros quirais em uma molécula, inicialmente aquiral, através de uma única etapa de reação. ^[32]

As reduções microbiológicas podem ser feitas de várias maneiras: biotransformações sob condições fermentativas ou com células imobilizadas, biotransformações com células previamente crescidas e processos fermentativos. As biotransformações requerem

a adição de substratos, já os processos fermentativos utilizam como reagente de partida fontes de carbono e nitrogênio. Como resultado os produtos obtidos de fermentações são sempre compostos naturais, enquanto que os obtidos de biotransformações podem ou não serem naturais. Outra diferença entre estes dois processos é que na fermentação as células do microorganismo devem necessariamente estar em crescimento, o que nem sempre é verdade nas biotransformações. Entretanto estes processos nem sempre são fáceis de serem controlados, pois mudanças nas condições de cultura e linhagens podem afetar os resultados.^[2,21,33] A exemplo, Charles J. Sih e colaboradores submeteram um α -ceto-tioacetil a redução com várias linhagens de *Saccharomyces cerevisiae*, e como resultado os valores de rotação específica variaram desde +5,4 a -21,1° (Fig. 3).^[34]

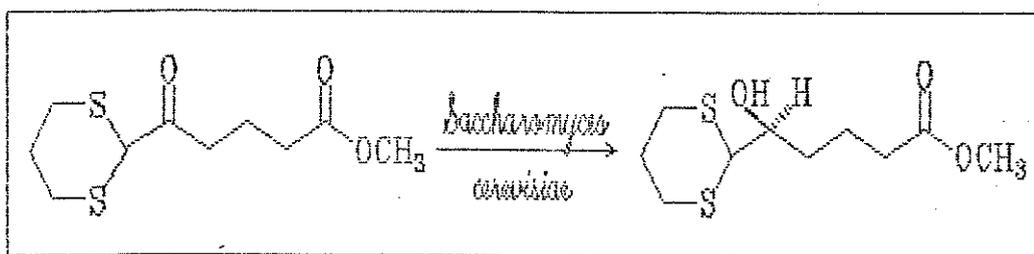


Figura 3: Redução de um α -cetotioacetil com várias linhagens de *Saccharomyces cerevisiae*.

Os microorganismos são uma grande fonte de oxidoredu-tases, uma vez que a redução de cetonas naturais é uma reação comum ao seu metabolismo. Consequentemente estes são capazes de reduzir uma variedade de cetonas não naturais produzindo álcoois quirais com alta pureza óptica.^[21,35] Eles também são capazes de se adaptarem e crescerem em novos ambientes com altas taxas de velocidade não necessitando, em muitos casos, da ajuda de um microbiologista. Estas características são potencialmente úteis no cultivo em larga escala, bem como facilitam a manipulação.^[2,21]

Por outro lado, dentro das células existe todo um complexo enzimático, do qual algumas enzimas podem fornecer produtos laterais não desejados ou tornar o processo apenas parcialmente enantiosseletivo necessitando, então, de um controle estereoquímico.^[33] A baixa enantiosseletividade ocorre quando duas ou mais oxidoredutases com preferências estereoquímicas opostas competem pelo substrato, ou quando a enzima não é capaz de distinguir entre as duas faces enantiotópicas do substrato, mesmo que seja a única a atuar durante o processo.^[36]

Uma forma de minimizar a formação de produtos laterais é a utilização de linhagens selecionadas. Tratamentos químicos ou físicos também podem ser empregados com sucesso, tais como aquecimento, mudanças de pH, ou mesmo a adição de inibidores específicos para desativar enzimas indesejadas. A exemplo, Nakamura^[37] e colaboradores através de tratamento por aquecimento de uma suspensão aquosa de fermento de pão, aumentou significativamente a diastereosseletividade na redução de alguns β -cetoésteres (Fig. 4). Derivatizações químicas no substrato também podem protegê-los de reações laterais.^[21]

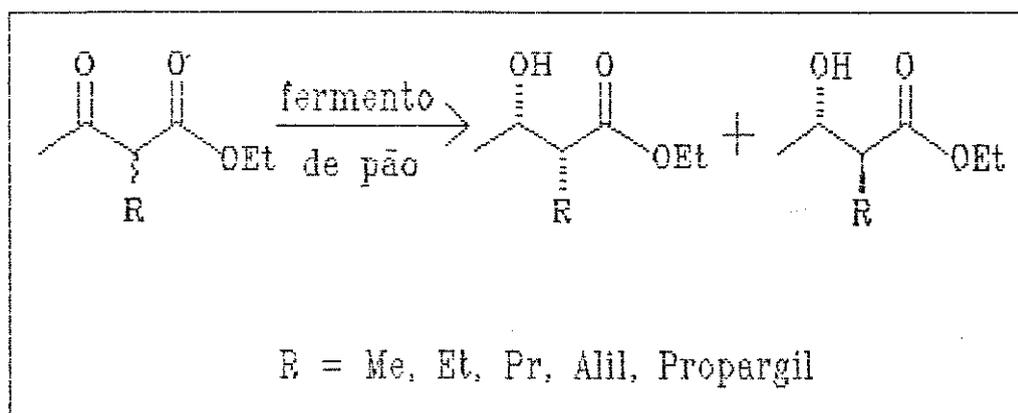


Figura 4: Redução de β -cetoésteres com fermento de pão.

Da mesma forma que nas reações por enzimas isoladas, o substrato ou produto formado não deve funcionar como inibidor do catalisador para que o processo tenha continuidade. Entretanto, quando se trabalha com células inteiras existem outras

características que o substrato deve apresentar, isto é, ele deve ser solúvel no meio e permeável à membrana celular para poder tomar contato com a enzima. Caso este não seja solúvel no meio, ele pode ser previamente dissolvido em solventes orgânicos miscíveis em água. Os solventes geralmente empregados são acetona, dimetilformamida, dimetilsulfóxido e álcoois menores. Modificações químicas no substrato também podem melhorar a sua solubilidade. Por outro lado, pode-se fazer um tratamento nas células a fim de aumentar a permeabilidade do mesmo. Existe ainda a possibilidade de se adicionar um surfactante para ajudar a dispersão do substrato no meio reacional.^[21]

Nas biotransformações o problema de estabilidade enzimática é minimizado, enquanto que nas reduções com enzimas isoladas este é um fator limitante do processo. No entanto, a grande vantagem das reduções com células intactas frente as reduções com enzimas puras é que não precisa a adição de coenzimas, pois estas são regeneradas, até certo ponto, *in situ* pelos próprios microorganismos.^[2,21,33] Em contraste, o isolamento dos produtos é mais tedioso devido a grande quantidade de biomassa envolvida no primeiro processo.^[33]

Em reações biológicas, através da utilização de diferentes microorganismos, também é possível selecionar o enantiômero que se quer produzir. Neste caso, deve-se utilizar microorganismos que possuam enzimas com especificidades de faces enantiotópicas opostas (Fig. 5).^[22,38]

A combinação de reações químicas e biotransformações se mostra uma técnica promissora na síntese de compostos enantiomericamente puros. As biotransformações são as responsáveis pela introdução de um centro quiral numa molécula chave de uma dada síntese total. O primeiro exemplo de sucesso desta combinação foi a síntese da efedrina 1 por Neuberg e Hirsch em 1921.^[21]

Mais recentemente, Kurmar e colaboradores desenvolveram um método de síntese para a obtenção de 3 drogas enantiomericamente puras. Os processos, os quais possuem 5 a 6 etapas, envolvem uma etapa microbiológica e as etapas restantes são reações químicas convencionais. A etapa microbiológica é comum

aos três processos (Fig. 6).^[39]

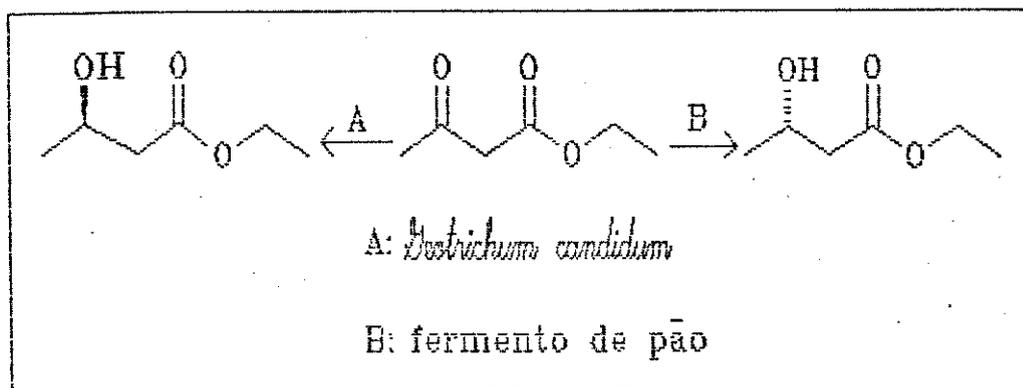


Figura 5: Alteração da estereoespecificidade através da mudança do microorganismo.

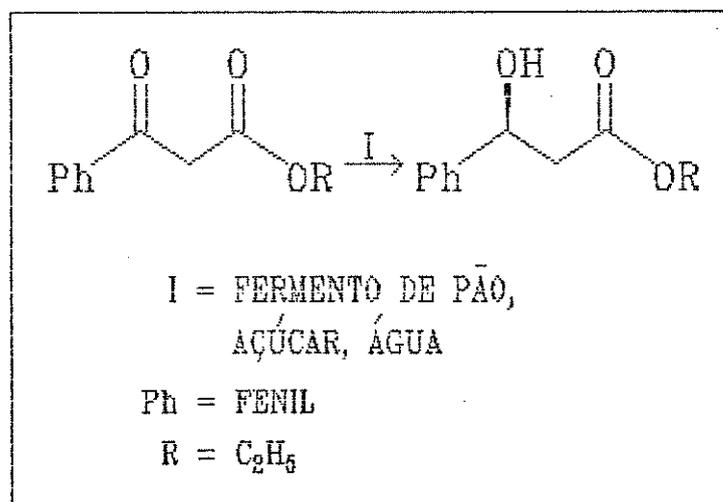
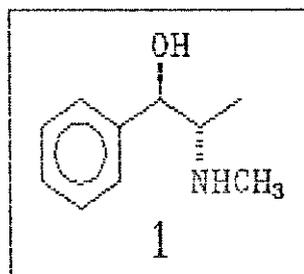


Figura 6: Introdução de um centro quiral numa molécula chave e intermediária na síntese de três drogas através de uma biotransformação.

I.1.4 - REGENERAÇÃO DAS COENZIMAS (NAD(P)H e NADH)

Como foi citado anteriormente, as coenzimas devem ser regeneradas *in situ* por processos simples que envolvam reagentes baratos para que possam ser utilizadas em quantidades catalíticas. Para tal, processos químicos, eletroquímicos ou enzimáticos podem ser empregados, porém através dos processos enzimáticos consegue-se reciclar as coenzimas um número de vezes muito maior do que com processos químicos ou eletroquímicos. Estes últimos dois processos mostram uma seletividade apenas modesta para a regeneração.^[22,26,40]

Vários sistemas para a regeneração dos cofatores têm sido empregados, sendo que todos eles apresentam vantagens e desvantagens. A escolha do sistema mais apropriado para uma determinada reação vai depender, então, de fatores como condições e tempo de reação, disponibilidades de reagentes, qual coenzima está sendo utilizada e a quantidade de produto a ser produzido (larga escala ou escala de laboratório).^[26,40] Os vários sistemas podem ser diferenciados de acordo com a natureza do doador de elétrons para a redução da nicotinamida oxidada.^[39]

Serão citados nesta tese apenas quatro sistemas biológicos para a regeneração da nicotinamida em sua forma reduzida, os quais parecem ser os mais comumente empregados. Porém, somente um destes foi utilizado neste trabalho.

1º sistema - Este é baseado na catálise por três enzimas: álcool desidrogenase (ADH), aldeído desidrogenase (ALDH) e formiato desidrogenase (FDH). Neste sistema o metanol funciona como doador de elétrons, sendo que para cada equivalente de metanol consumido, gera-se três equivalentes de coenzima reduzida (Fig. 7).^[41] As características deste método estão sumarizados na fig. 8.

Este método tem sido mais utilizado em sínteses em larga escala. Para sínteses em escala de laboratório o processo é geralmente iniciado a partir do formiato como doador de elétrons. Neste caso, a única enzima envolvida é a FDH. O custo desta enzima

foi significativamente reduzido por Wandrey e Wichmann através do desenvolvimento de um método de síntese. ^[26,41,42]

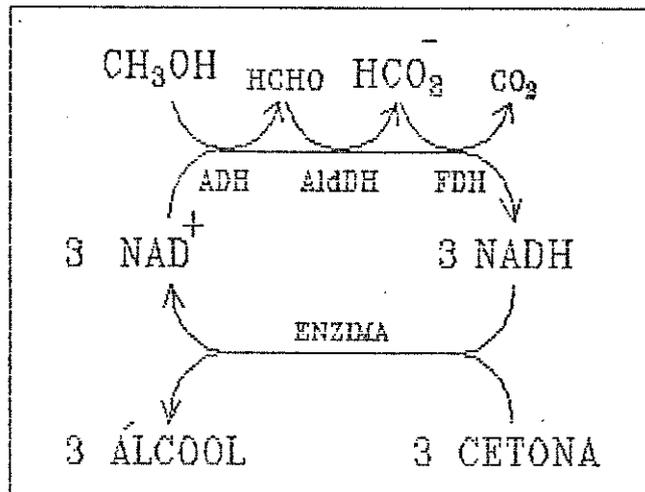


Figura 7: Regeneração da nicotinamida reduzida, utilizando-se formiato / FDH.

VANTAGENS^[40,41]

- o formiato é barato e é um forte agente redutor
- o formiato e o CO₂ são inócuos para a maioria das enzimas
- o CO₂ é de fácil remoção
- as enzimas são comercialmente disponíveis
- FDH é estável, se protegida contra auto-oxidação

DESVANTAGENS^[40,41,43]

- FDH é relativamente cara
- FDH é incapaz de aceitar o NADPH como substrato
- FDH tem baixa atividade específica
- o sistema necessita de três enzimas para operar
- ADH e AlDH são sensíveis a oxidação

Figura 8: Características do sistema formiato / FDH.

2º sistema - Neste sistema gás hidrogênio é borbulhado no meio reacional onde funciona como doador de elétrons. A reação de regeneração da coenzima reduzida é catalisada por uma única enzima: a hidrogenase (H_2ase), fig. 9. [44]

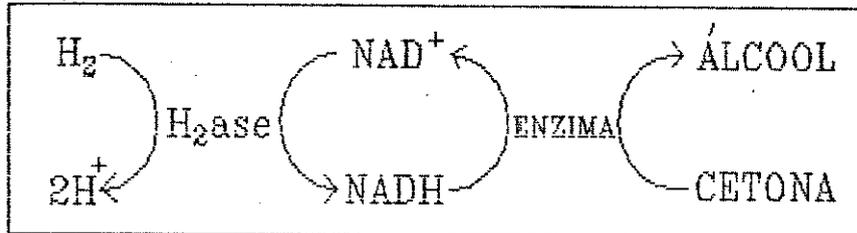


Figura 9: Regeneração da nicotinamida reduzida utilizando-se H_2 e H_2ase .

O uso do hidrogênio oferece a vantagem de ser um forte agente redutor, de ser barato e de seu consumo não fornecer nenhum produto lateral. [44,45] Porém, para reações feitas com fermento de pão este método não pode ser empregado, uma vez que o *Saccharomyces* não apresenta nenhuma hidrogenase em sua célula. [33]

3º sistema - Este é baseado na catálise por duas enzimas: álcool desidrogenase (ADH) e aldeído desidrogenase (ALDH). Estas duas enzimas, além de possuírem alta atividade específica, são capazes de aceitar o NAD^+ e o $NADP^+$ como substratos. Para cada equivalente de etanol consumido, gera-se dois equivalentes de coenzima reduzida, sendo que o etanol funciona como doador de elétrons (Fig. 10). [41]

Este sistema é apenas fracamente redutor e o acetaldeído formado funciona como desativador para muitas enzimas. Desta forma, para melhorar o desempenho deste sistema é necessário que a ALDH esteja em excesso. As características deste método estão sumarizados na fig. 11. [26]

Em reações feitas com fermento de pão a regeneração da coenzima, por esse método, só é efetiva para o $NADH$, pois a enzima

ADH presente no *Saccharomyces* é específica para o NAD^+ .^[41]

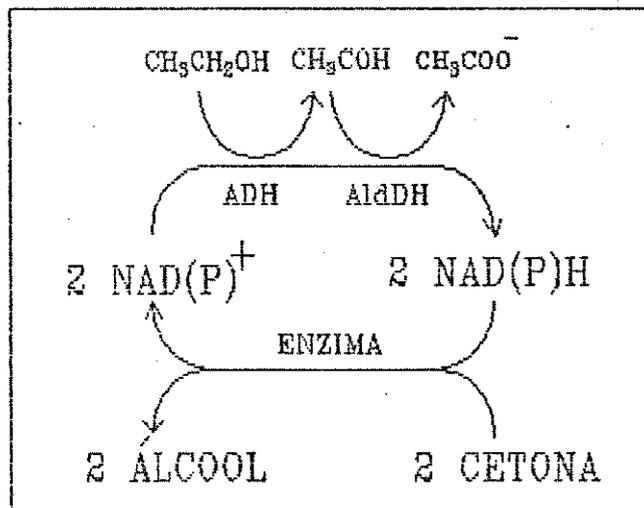


Figura 10: Regeneração da coenzima reduzida utilizando-se etanol / ADH / AldDH.

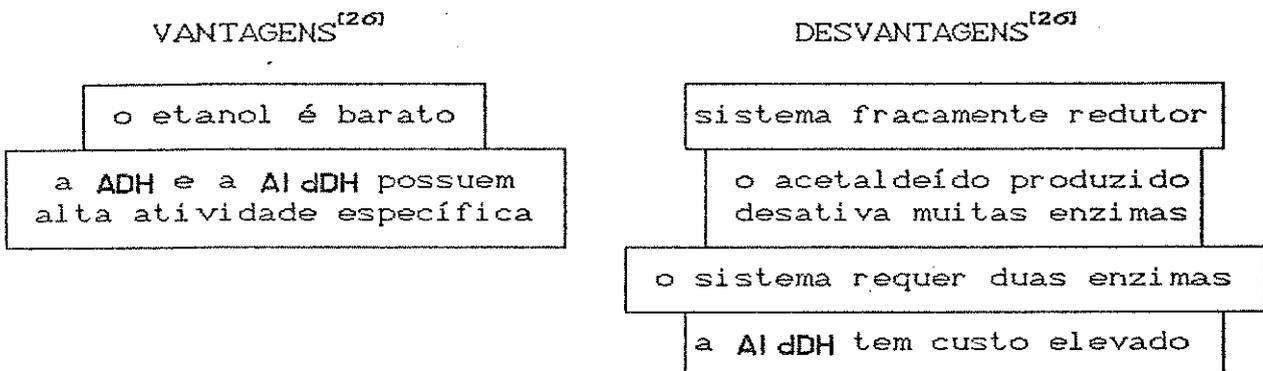


Figura 11: Características do sistema etanol / ADH / AldDH.

4º sistema - Este se baseia na glicose-6-fosfato / glicose-6-fosfato desidrogenase, sendo que o carboidrato funciona como doador de elétrons. Este método funciona tanto para a regeneração do NAD^+ como do NADP^+ , porém o íon fosfato catalisa a decomposição do NADPH formado (Fig.12)^[26,46]

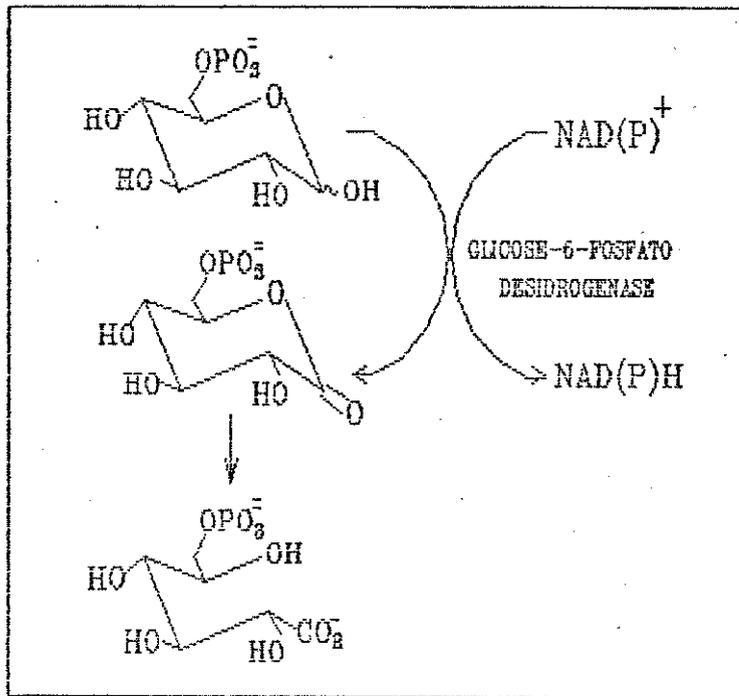


Figura 12: Regeneração da coenzima reduzida utilizando-se glicose-6-fosfato / glicose-6-fosfato desidrogenase.

VANTAGENS^[26,47]

o sistema necessita somente de uma enzima

a glicose-6-fosfato desidrogenase é estável e possui alta atividade específica

o sistema regenera tanto o NAD⁺ como o NADP⁺

a glicose-6-fosfato desidrogenase é de fácil manipulação

a reação é irreverssível

DESVANTAGENS^[26,46]

o íon fosfato catalisa a decomposição do NADPH

a glicose-6-fosfato deve ser utilizada em quantidades estequiométricas

Figura 13: Características do sistema glicose-6-fosfato / glicose-6-fosfato desidrogenase.

Este sistema tem sido largamente utilizado em escala de laboratório. As vantagens e desvantagens oferecidas por este estão sumarizados na figura 13.^[26]

A adição de glicose ou outros carboidratos no meio reacional tem sido frequentemente utilizada como fonte de energia para a regeneração da coenzima reduzida em biotransformações feitas com fermento de pão (Fig.14)^[33,48,49] Porém, estas biotransformações podem ser levadas sem a adição de qualquer carboidrato uma vez que o *S. cerevisiae* possui sacarídeos em suas células, o que lhe confere um certo poder de redução. Estes sacarídeos, a partir da glicose-6-fosfato, regeneram a coenzima via pentose fosfato.^[50]

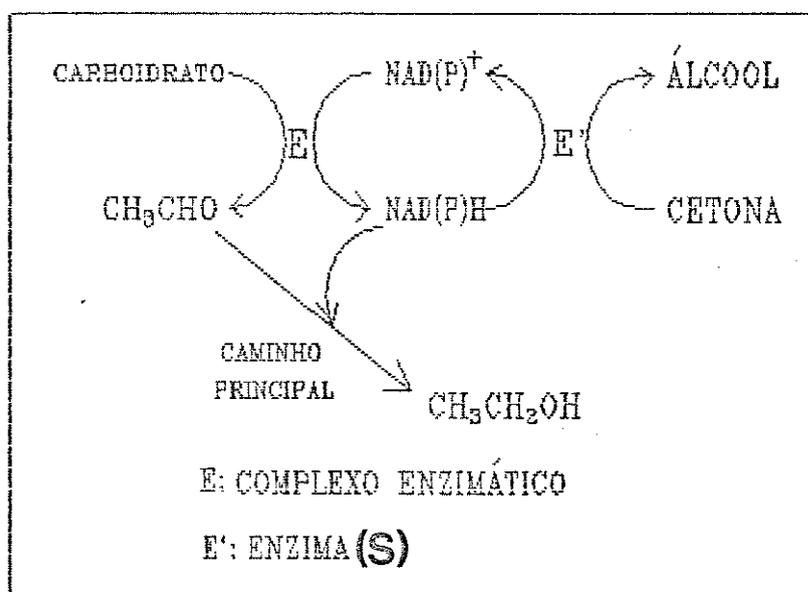


Figura 14: Regeneração da coenzima reduzida pelo complexo enzimático do *Saccharomyces cerevisiae*.

Quando se trabalha com a adição de carboidratos existem algumas desvantagens, a saber:^[51]

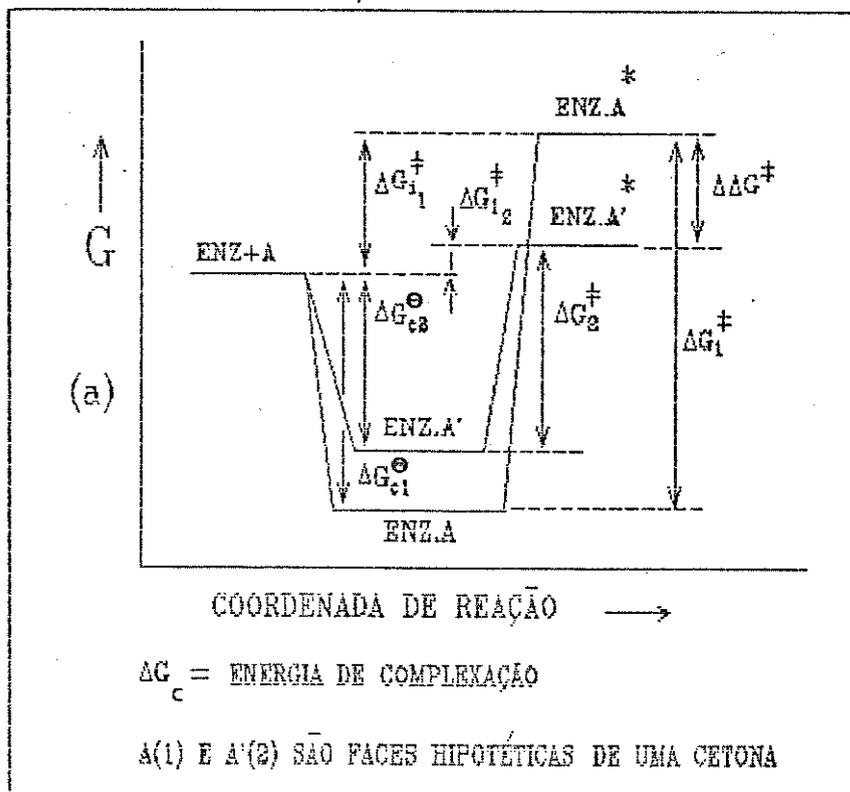
- a. para se obter um melhor rendimento químico é necessário adicionar várias porções de açúcar à suspensão original. A reação leva, frequentemente, mais de 48 horas;
- b. devido a grande quantidade de massa envolvida, o sistema requer um aparato volumoso e o isolamento do produto envolve um trabalho de extração tedioso;
- c. a fermentação alcoólica do açúcar promove a formação de vários produtos laterais e um grande excesso de etanol é obtido.

Por outro lado, existem algumas vantagens na redução feita em ausência de carboidrato:^[51]

- a. consegue-se obter um melhor rendimento químico em apenas algumas horas à, aproximadamente, um dia;
- b. devido a menor quantidade de massa envolvida, o sistema requer um aparato pouco volumoso e o isolamento do produto envolve um trabalho de extração menos tedioso;
- c. não há a formação de grande excesso de etanol.

1.2 - ESTEREOSSELETIVIDADE EM REDUÇÕES ENZIMÁTICAS OU MICROBIOLÓGICAS

Quando um catalisador aquiral se liga a um substrato proquiral, contendo grupos ou faces enantiotópicas ou diastereotópicas, formam-se estados de transição enantioméricos com energias de ativação e velocidades de formação iguais. Neste caso não é observado qualquer seletividade e o produto é obtido como um racemato. Portanto, existem algumas condições que são necessárias para que uma determinada transformação ocorra com estereosseletividade, ou seja, ao substrato proquiral deve-se ligar um catalisador quiral formando estados de transição diastereoisoméricos que, por serem geometricamente diferentes, diferem em energia e velocidade de formação. A decomposição destes fornece enantiômeros em quantidades diferentes.^[52] A magnitude da diferença de energia ($\Delta\Delta G^\ddagger$, fig.15 a) entre os estados de transição determina a estereosseletividade, a qual é geralmente expressa pelo excesso enantiomérico (ee, fig.15 b).^[35]



(b)
$$ee_R = \frac{[R] - [S]}{[R] + [S]}$$

[R] e [S] são quantidades dos enantiômeros

Figura 15: (a) Gráfico hipotético de energia vs coordenada de reação; (b) expressão para o cálculo do ee.

Suponha uma cetona com duas faces enantiotópicas S_i e R_e (Fig.16), a formação de dois estados de transição diastereoisoméricos ocorre porque o catalisador (enzima - oxidoreductase) pode-se ligar, com igual probabilidade, as duas faces do substrato (cetona). Quanto maior a capacidade da enzima em distinguir uma face da outra, maior será a enantiosseletividade obtida. Por outro lado, se a enzima for incapaz de discriminar entre as duas faces nenhuma enantiosseletividade será observada. [35]

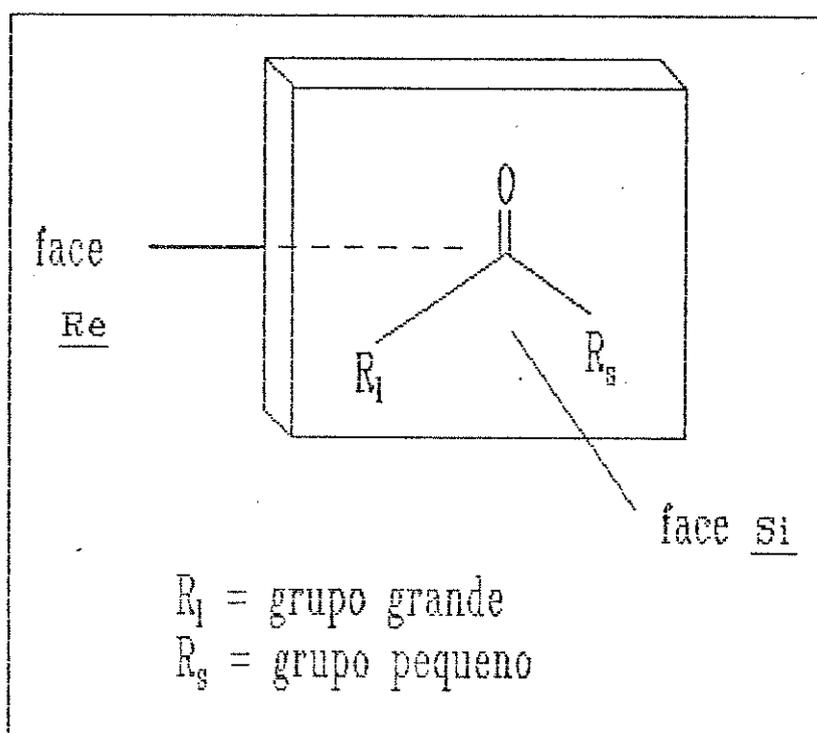


Figura 16: Faces R_e e S_i de uma cetona hipotética.

Essa maior ou menor discriminação entre as faces pela enzima está associada ao volume estérico dos substituintes no carbono benzílico, isto é, os substituintes devem ter tamanhos significativamente diferentes para que a discriminação leve a formação de dois estados de transição distintos, um dos quais deve ser energeticamente mais favorável. Neste caso, os álcoois produzidos apresentarão altos rendimentos ópticos. [31,53]

Quando se trabalha com células intactas, mais especificamente com fermento de pão, os fatores que regem a estereosseletividade são mais complexos, uma vez que uma ou mais oxidoreduktases podem estar envolvidas na reação.^[35] Tem-se que:

- 1º caso: Se apenas uma oxidoreduktase estiver envolvida, o grau de estereosseletividade é uma função da maior ou menor discriminação das faces *Si* e *Re* do substrato; como foi descrito anteriormente, haverá, então, uma competição pelo mesmo sítio ativo da enzima.^[35,54]

- 2º caso: Se houver duas ou mais oxidoreduktases competitivas envolvidas no processo produzindo álcoois de configurações opostas à diferentes velocidades, como resultado será obtido uma baixa estereosseletividade; mesmo que cada uma das enzimas envolvidas estejam trabalhando com alta seletividade.^[35]

No 1º caso a estereosseletividade independe da concentração do substrato no meio reacional, porém no 2º caso mudanças na concentração do substrato podem alterar o curso estereoquímico do processo. Esta é uma forma de diferenciar entre estes dois fenômenos.^[35,54]

Sih e colaboradores verificaram que para reações de redução de β -ceto ésteres com fermento de pão, há uma variação na pureza óptica do álcool obtido em função de mudanças na concentração do substrato. Portanto existem pelo menos duas oxidoreduktases competitivas no fermento atuando como catalisadores.^[55]

I.2.1 - PARÂMETROS QUE INFLUENCIAM NA ESTEREOSELETIVIDADE DAS REDUÇÕES VIA FERMENTO DE PÃO

Na verdade a estereosseletividade de uma dada redução pode ser alterada em função da razão levedura : substrato, bem como pela forma como o mesmo é adicionado, isto é, ele pode ser adicionado puro de uma só vez ou lentamente, ou mesmo dissolvido em solvente orgânico (geralmente etanol).^[56,57]

De um modo geral, os parâmetros que influenciam a estereosseletividade numa redução biológica já foram abordados em

ítens anteriores. São eles: a temperatura^[37], o pH do meio^[29], modificações estruturais no substrato^[21,57], Tamanho da cadeia ao redor da carbonila^[55], imobilização do microorganismo^[58,59] e inibidores específicos, tais como: álcool alílico^[50,60], metil vinil cetona^[61], compostos carbonílicos α,β -insaturados^[62] e cloroacetato de etila^[63]. Estes inibidores são, muitas vezes, chamados de aditivos ou substratos suicidas; e vem sendo utilizados no controle estereoquímico de reduções via fermento de pão. Cada aditivo leva a formação preferencial de um dado estereoisômero.^[60-63]

TABELA 2
VARIACÃO DO EXCESSO ENANTIOMÉRICO EM FUNÇÃO
DA CONCENTRAÇÃO DE GLICOSE NA REDUÇÃO DE
 α -CETOÉSTERES VIA FERMENTO

glicose, g/l	Rq, % ^a	ee, % ^b
0	25	>97
33	29	51
67	18	37
133	24	20
200	28	15

a RQ = rendimento químico;

b ee = excesso enantiomérico.

Como vimos anteriormente, reduções com fermento de pão podem ser feitas na presença ou não de carboidratos. Nakamura e colaboradores verificaram que a concentração de carboidrato adicionado influencia significativamente na estereosseletividade obtida em reduções de α -cetoésteres (Tab.2).^[50]

1.2.2 - REGRA DE PRELOG

Empregando-se oxidoreduases isoladas de *Curvalaria falcata*, Prelog e colaboradores determinaram a estereoquímica de

uma série de álcoois alifáticos obtidos pela redução de cetonas correspondentes. Da observação de seus resultados eles formularam a seguinte regra:

- Se à carbonila de uma cetona forem ligados dois grupos distintos, um grupo grande (G_1) e um grupo pequeno (G_2), a transferência de hidrogênio ocorrerá pela face *Re* formando o produto de redução indicado na fig. 17. ⁽²⁹⁾

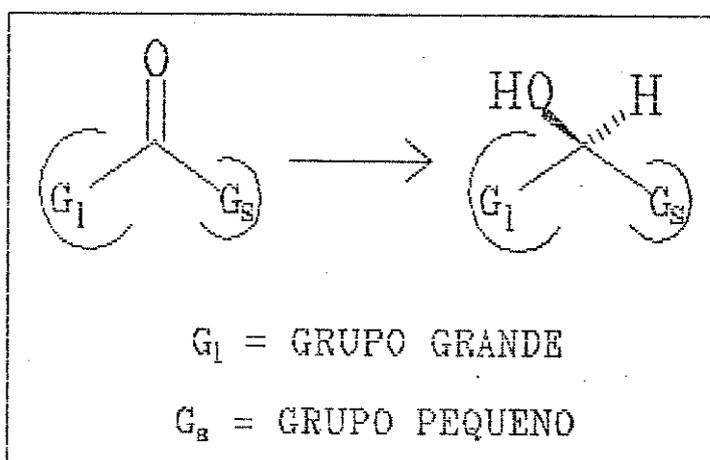


Figura 17: Curso estereoquímico de biotransformações de compostos carbonílicos pela *Curvalaria falcata*.

A regra de Prelog é uma regra empírica e vem sendo utilizada para prever a configuração de produtos de reduções microbiológicas por vários pesquisadores, sendo que em muitos casos a estereoquímica obtida é bem explicada por essa regra. Porém, deve-se tomar cuidado ao aplicá-la a sistemas de células intactas. ^(2,35,64)

I.3 - MECANISMO GERAL DAS REDUÇÕES

Através de estudos cinéticos, entre outros, determinou-se que inicialmente forma-se um complexo binário (ENZ-NAD(P)H). Este, por sua vez, pode complexar as duas faces

enantiotópicas (A e A') do substrato para formar dois complexos ternários (ENZ-NAD(P)H-A e ENZ-NAD(P)H-A'). Em seguida, ocorre a transferência do hidrogênio formando-se outros dois complexos ternários (ENZ-NAD(P)-R e ENZ-NAD(P)-S), os quais se dissociam para formar dois novos complexos binários (ENZ-NAD(P)⁺) e os produtos livres. Finalmente, ocorre a dissociação destes últimos complexos em seus componentes (ENZ + NAD(P)⁺) (Fig. 18).^[29,35]

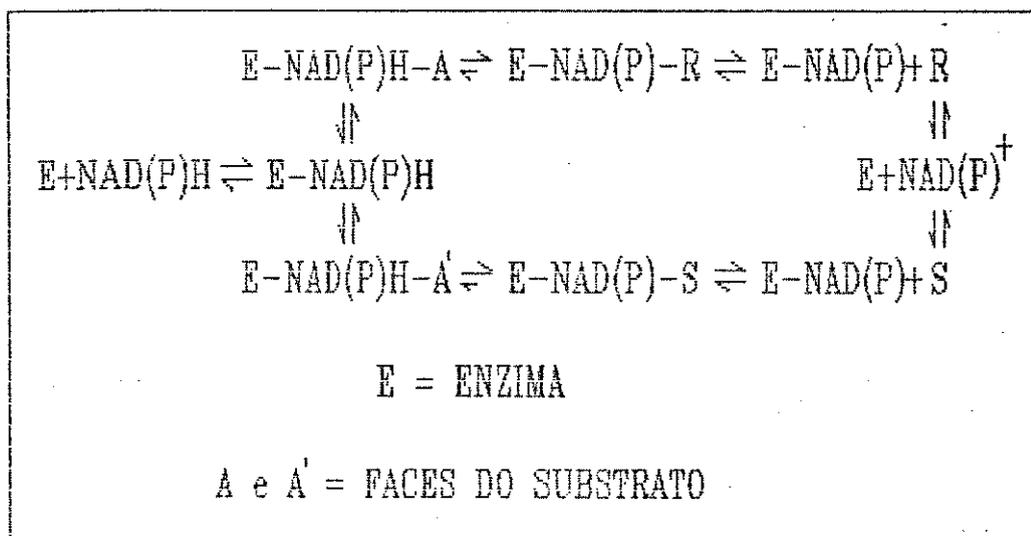


Figura 18: Mecanismo de reação para reduções estereosseletivas com oxidoreduases dependentes de NAD(P)H como coenzimas.

Baseado neste mecanismo, tem-se que uma alta enantiosseletividade só pode ser observada se existir um rápido equilíbrio entre os complexos enzimáticos:



Existem dois hidrogênios (H_A e H_B) no anel diidropiridínico que podem ser transferidos da coenzima para o substrato, sendo que ambos ocupam a quarta posição no anel (Fig. 19). Uma determinada enzima é capaz de ativar exclusivamente o H_A ou o H_B, tornando estes dois hidrogênios enzimaticamente diferentes.^[29, 65]

As desidrogenases que transferem o hidrogênio H_A (pró-R)

são chamadas de A-específica, e as que transferem o H_B (pró-S) são as B-específicas. ^[65]

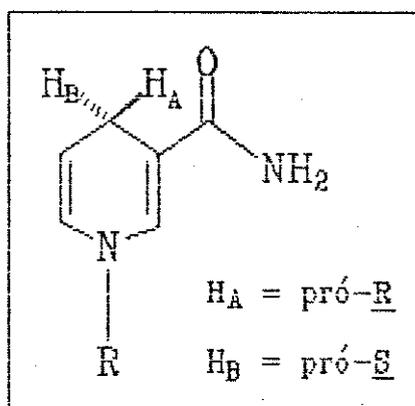


Figura 19: Hidrogênios H_A e H_B que podem ser transferidos do anel diidropiridínico para o substrato.

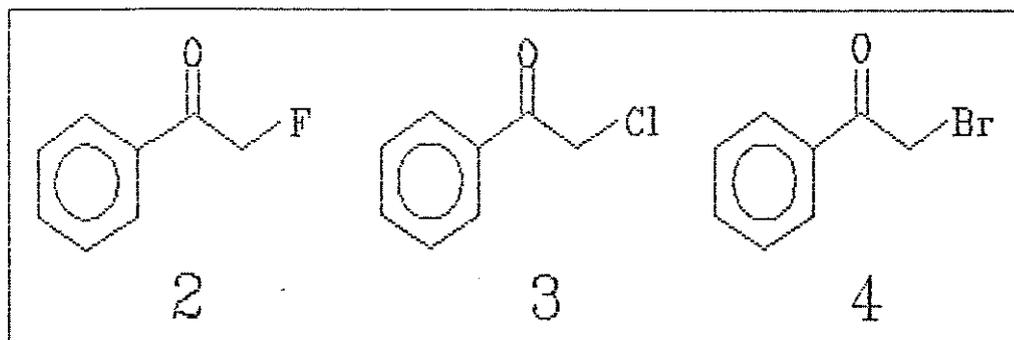
I.3.1 - UTILIZAÇÃO DAS REAÇÕES BIOMIMÉTICAS PARA SE INFERIR SOBRE O MECANISMO - TRANSFERÊNCIA DO HIDROGÊNIO

Diversos estudos têm sido feitos na tentativa de se elucidar o mecanismo pelo qual a coenzima NADH se oxida a NAD^+ , isto é, como ocorre a transferência do hidrogênio da coenzima ao substrato. Para tal, vários substratos já foram submetidos a reações com modelos de NADH em diferentes solventes. Reações deste tipo são chamadas de biomiméticas. ^[66]

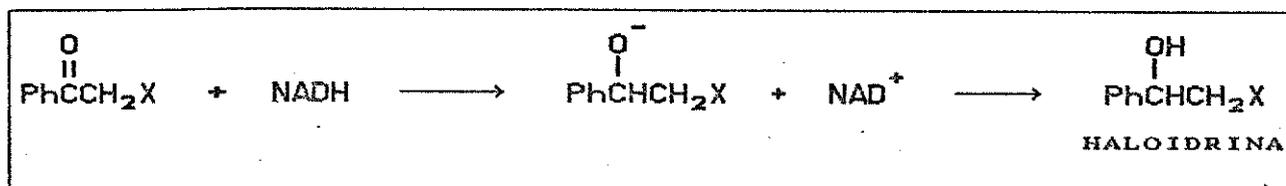
Os estudos, já realizados, estão infraestruturados sobre dados cinéticos, termodinâmicos e espectroscópicos. Porém, nem todos os resultados obtidos indicam o mesmo mecanismo, o que originou uma grande controvérsia a esse respeito. Existe, no entanto, a proposição de três mecanismos principais: (a) simples transferência de hidreto - mecanismo heterolítico ^[67], (b) transferência de elétron, transferência de próton, transferência de elétron ($e^-/H^+/e^-$) - mecanismo homolítico ^[68] e (c) transferência de elétron seguida de transferência de hidrogênio (e^-/H^*) - mecanismo homolítico ^[69].

No entanto, deve-se ter cuidado ao transportar os resultados obtidos das reduções biomiméticas às reduções biológicas, onde as condições de reação são diferentes. A própria escolha do substrato e do solvente podem influenciar o mecanismo, isto é, dependendo da polaridade do solvente e da habilidade do substrato em aceitar elétrons ocorre um determinado mecanismo em detrimento ao outro.^[69b,70] É justamente devido a essas dúvidas que é muito comum ao se ler um artigo sobre esse assunto encontrar a proposição de um mecanismo específico, porém com reservas quanto a este ser conclusivo.^[68c] Um exemplo é o trabalho de Ohno e colaboradores. Estes propuseram o mecanismo homolítico ($e^-/H^+/e^-$) para a redução biomimética da α,α,α -trifluoracetofenona, porém admitem que dependendo da habilidade da cetona em receber elétrons o mecanismo poderia ser alterado para (e^-/H^\bullet).^[68b]

Tendo em vista que esse assunto é polêmico, baseou-se este estudo no trabalho de Tanner e Stein porque eles utilizaram as mesmas α -haloacetofenonas aqui empregadas para se inferir sobre o mecanismo. As cetonas 2, 3 e 4 foram submetidas a reduções com NADH em presença e ausência de uma oxidoreductase. Eles utilizaram a álcool desidrogenase do fígado de cavalo (HLADH). Como resultado observaram que ora obtinham a acetofenona como produto ora a haloidrina correspondente. Propuseram, então, que a acetofenona era obtida via processo radicalar, enquanto que via processo heterolítico obtinha-se a haloidrina (Fig. 20).^[15]



1. PROCESSO HETEROLÍTICO



2. PROCESSO HOMOLÍTICO - RADICALAR

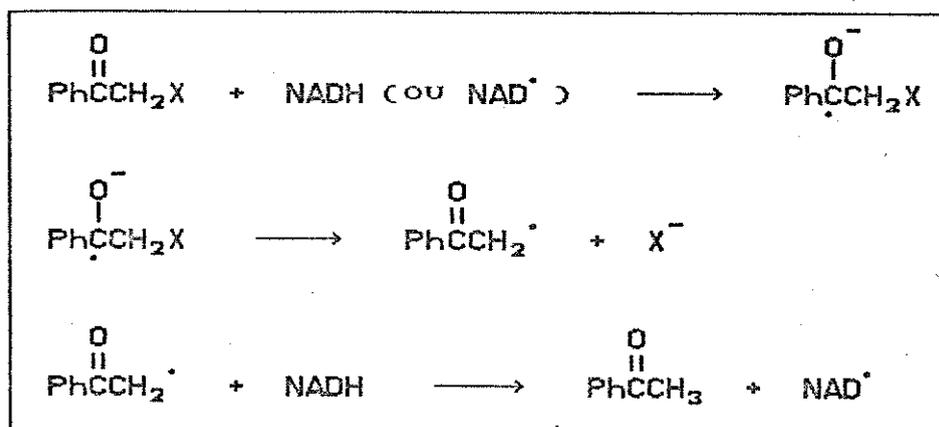


Figura 20: Esquemas dos processos heterolíticos e homolíticos para a redução de α -haloacetofenonas com NADH.

Quando as α -haloacetofenonas foram submetidas a redução com NADH na ausência de HLADH, eles observaram somente a formação de acetofenona. Por outro lado, quando a redução foi feita em presença da enzima, as cetonas 2 e 3 formaram a haloidrina correspondente, enquanto que a cetona 4 forneceu somente a acetofenona. Destes dados, Tanner e Stein concluíram que o NADH é o responsável pelo mecanismo radicalar, enquanto que a presença da enzima é responsável pelo mecanismo com transferência direta de hidreto. Porém, este só é capaz de competir com o mecanismo radicalar se a cetona em questão possuir uma reatividade baixa à moderada. Cetonas altamente reativas reagem preferencialmente via processo radicalar.^[15]

Como as reações feitas com HLADH forneceram o produto heterolítico, Tanner e Stein sugeriram que as reações enzimáticas

devem ocorrer via transferência direta de hidreto.^[15]

Wu e Houk publicaram, num trabalho mais recente, que reações com desidrogenases dependentes de NADH geralmente envolvem transferência direta de hidreto. Este resultado se baseia em cálculos teóricos e experimentais das características geométricas da estrutura de transição destas reações.^[65]

I.4 - FERMENTO DE PÃO (*Saccharomyces cerevisiae*)

O fermento de pão tem-se mostrado uma poderosa ferramenta na obtenção de álcoois quirais, os quais vem sendo utilizados como precursores de compostos naturais biologicamente ativos de grande importância.^[36,74] Um exemplo de seu potencial é a síntese da (+)-Brefeldin A; composto com vasta aplicabilidade na área farmacológica. A síntese total deste contendo uma etapa biológica via fermento de pão diminuiu em 10 etapas a sua síntese convencional.^[72]

A preferência pelo fermento de pão à outros microorganismos pelos químicos orgânicos sintéticos deve-se ao fato deste ser barato, versátil, de fácil manipulação e aquisição e de ser capaz de reduzir uma variedade de cetonas não naturais.^[36,51,60] Outro fator, é que os resultados obtidos em reduções via fermento de pão possuem boa reprodutibilidade desde que as condições de reação sejam rigorosamente controladas. Isto ocorre mesmo quando o fermento é proveniente de diferentes fabricantes.^[36,73] Porém, a redução com fermento de pão nem sempre origina o álcool de configuração desejada num excesso enantiomérico satisfatório. Isto ocorre devido a presença de várias enzimas que podem catalisar a redução surgindo, então, a necessidade de um controle estereoquímico.^[60] Entretanto, devido as vantagens oferecidas pelo fermento de pão, os pesquisadores, de um modo geral, preferem fazer modificações nas condições de reação para melhorar a estereosseletividade ao invés de utilizar outros microorganismos.^[60,74]

As leveduras, de um modo geral, podem crescer a várias faixas de temperatura, porém a maioria das espécies têm um bom

crescimento de 5 a 37°C, sendo que apresentam um crescimento ótimo a 25°C, aproximadamente. Particularmente, para o *S. cerevisiae* a faixa de 28-35°C é onde a velocidade de crescimento é ótima. Temperaturas mais altas (próxima de 40°C) diminuem drasticamente a viabilidade das suas células. ^[75,76]

O pH do meio também influencia no crescimento das leveduras, entretanto a maioria delas são relativamente tolerantes a uma larga faixa de valores de pH. Para a maioria das espécies o pH ótimo para o crescimento varia de 4,5 a 6,5. ^[75]

Outro fator que afeta o crescimento das leveduras é a concentração de etanol no meio, sendo a tolerância ao etanol dependente do gênero e linhagem. Entretanto, o etanol em si parece não ser o responsável pelo efeito nocivo mas sim o metabolismo deste, o qual proporciona a formação de acetaldeído. Portanto, a "tolerância ao etanol" está diretamente associada ao acúmulo de acetaldeído nas células do microorganismo. ^[76,77]

A presença de acetaldeído acima de um certo valor limite causa a inibição de todas as funções celulares e é também, como outros aldeídos, um agente bactericida. Dentre os aldeídos, o formaldeído e o acetaldeído são os mais tóxicos. Este último, quando em excesso, também promove o desequilíbrio nas quantidades de NAD^+ / NADH , o que resulta na inibição dos sistemas responsáveis pelo seu consumo. Felizmente, o *S. cerevisiae* possui uma alta tolerância ao etanol devido a elevada capacidade de difusão do mesmo em suas células, o que evita o acúmulo de acetaldeído. ^[76,77]

Sabe-se que muitas enzimas estão presentes na levedura, sendo que mais de 1600 destas estão catalogadas no *Handbook of Enzymes*. Apesar de várias centenas destas enzimas já terem sido purificadas, infelizmente existem poucos trabalhos onde os resultados com enzimas isoladas são comparados com os obtidos via células intactas, deste modo tem-se, ainda, muito a aprender sobre as condições e atividade específica das reações com fermento de pão. ^[36] Alguns pesquisadores isolaram algumas oxidoredutases visando, justamente, essa intenção. ^[78]

Após o isolamento e purificação das enzimas eles

determinaram algumas características destas tais como: influência do pH e da temperatura, estabilidade térmica, peso molecular, agentes inibidores ou estimulantes e constantes cinéticas, entre outros. Analisando estes dados, eles foram unânimes em concluir que estas variáveis são importantes no controle estereoquímico e no entendimento de como este ocorre.^[78] A exemplo, Nakamura e colaboradores isolaram 4 oxidoredutases e determinaram as suas estabilidades térmicas e as atividades em função do pH e da temperatura, construindo gráficos que dão informações imprescindíveis no controle do curso estereoquímico por mudanças nas condições de reação (Fig. 21,22 e 23).^[79c]

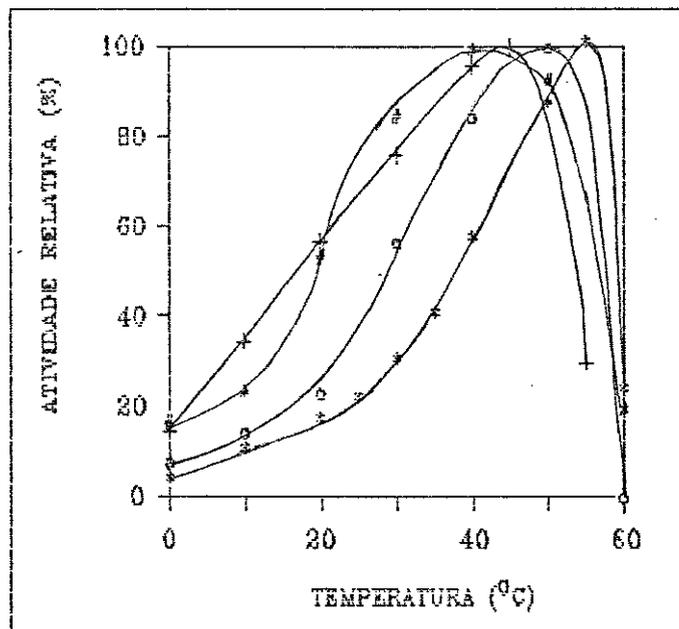


Figura 21: Efeito da temperatura na atividade enzimática.

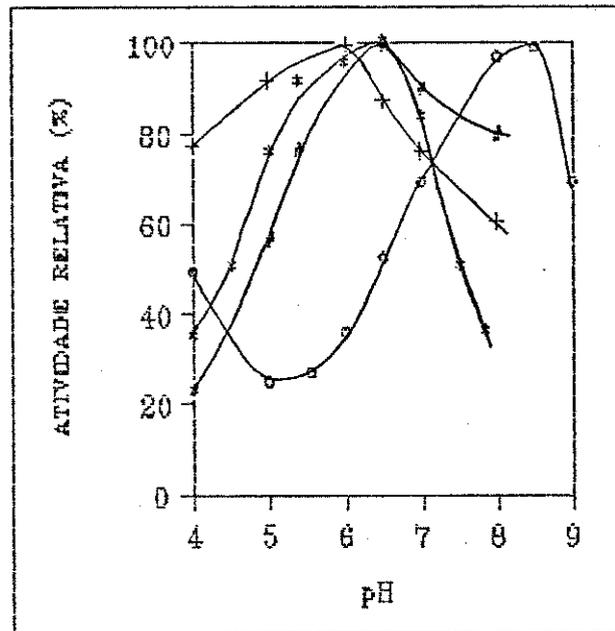


Figura 22: Efeito do pH na atividade enzimática.

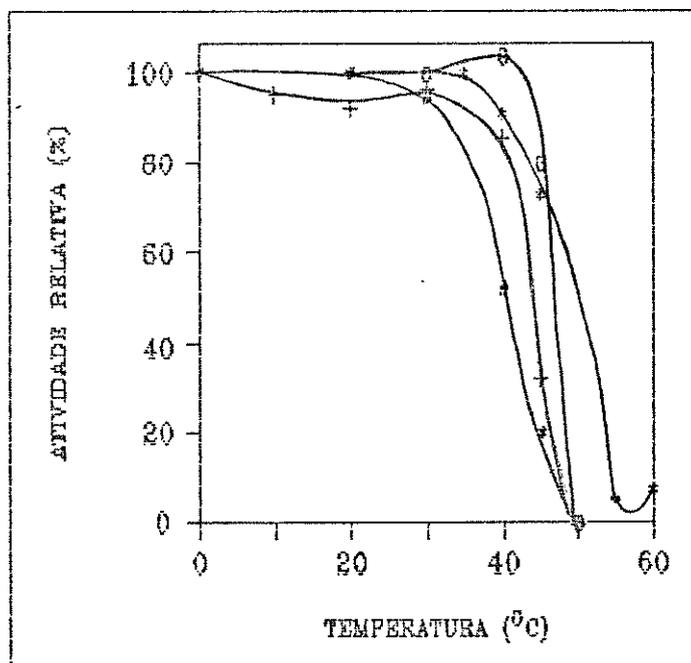


Figura 23: Estabilidade térmica das enzimas.

Outra informação muito interessante é que todas as enzimas

isoladas por estes pesquisadores utilizam preferencialmente o NADPH como coenzima,^[78] sendo que uma delas tem, inclusive, a sua atividade inibida na presença de 0,2 mM de NADH.^[78a]

Resultados como este são muito importantes na escolha do sistema que vai promover a regeneração da coenzima numa biotransformação via fermento de pão. A saber, o sistema formiato/FDH é incapaz de regenerar o NADPH e, portanto, é incapaz de promover uma biotransformação contínua de reduções que utilizem enzimas dependentes desta coenzima.^[40]

É conclusivo, então, a importância dos resultados com enzimas isoladas no entendimento e aprimoramento das reações via células intáctas.^[78] Entretanto, é bom ter em mente que estes resultados podem não ser quantitativamente reprodutíveis aos obtidos *in vivo*, mas sim qualitativamente.^[78c]

I.5 - BIBLIOGRAFIA

- [1] R. Sheldon; *Chem. Ind.*, 212 (1990).
- [2] R. Czuc and B. I. Glänzer; *Chem. Rev.* 91, 49 (1991).
- [3] K. Mori; *Tetrahedron* 45, 3233 (1989).
- [4] J. Hermansson; *J. Chromatography* 298, 67 (1984).
- [5] C. J. Sih, Q.-M. Gu, G. Fülling, S.-H. Wu and D. R. Reddy; *J. Ind. Microbiol.* 29, 221 (1988).
- [6] D. H. Deutsch; *CHEMTECH*, 157 (1991).
- [7] E. J. Corey and J. O. Link; *Tetrahedron Lett.* 31, 601 (1990).
- [8] J. Crosby; *Tetrahedron* 47, 4789 (1991).
- [9] W. H. De Camp; *chirality* 1, 2 (1989).

- (10) a. H. C. Brown and G. G. Pai; *J. Org. Chem.* 48, 1784 (1983).
b. *Ibid* 50, 1384 (1985).
c. H. C. Brown, B. T. Cho and W. S. Park; *Ibid* 53, 1231 (1988).
d. M. Srebnik, P. V. Ramachandran and H. C. Brown, *Ibid* 53, 2916 (1988).
e. H. C. Brown, M. Srebnik and P. V. Ramachandran; *Ibid* 54, 1577 (1989).
- (11) a. K. Soai, T. Yamanoi and H. Hikima; *J. Organomet. Chem.* 290, C23 (1985).
b. H. C. Brown, B. T. Cho and W. S. Park; *J. Org. Chem.* 52, 4020 (1987).
- (12) a. S. Itsuno, M. Nakano, K. Miyazaki, H. Masuda, K. Ito, H. Akira and S. Nakahama; *J. Chem. Soc. Perkin Trans 1*, 2039 (1985).
b. S. Itsuno, M. Nakano, K. Ito, A. Hirao, M. Owa, N. Kanda and S. Nakahama; *Ibid*, 2615 (1985).
c. A. K. Mandal, T. G. Kasar, S. W. Mahajan and D. G. Jawalkar; *Synth. Commun.* 17, 563 (1987).
- (13) a. E. J. Corey, R. K. Bakshi and S. Shibata; *J. Am. Chem. Soc.* 109, 5551 (1987).
b. E. J. Corey, R. K. Bakshi, S. Shibata, C. P. Chen and V. K. Singh; *Ibid* 109, 7925 (1987).
c. E. J. Corey, S. Shibata and R. K. Bakshi; *J. Org. Chem.* 53, 2861 (1988).
- (14) M. Imuta, K. - i. Kawai and H. Ziffer; *J. Org. Chem.* 45, 3352 (1980).
- (15) D. D. Tanner and A. R. Stein; *J. Org. Chem.* 53, 1642 (1988).
- (16) A. Akiyama, M. Bednarski, M. -J. kim, E. S. Simon, H. Waldmann and G. M. Whitesides; *CHEMTECH*, 627 (1988).
- (17) E. Voss; *Am. Prof. Pharm.* 19, 719 (1953).

- [118] a. D. Lednicer and L. A. Mitscher, "The Organic Chemistry of Drug Synthesis", John Wiley and Sons, New York, 1980, vol. 2, cap. 3, p. 36.
b. *Ibid.*, vol. 3, cap. 2, p. 19.
- [119] E. Foelshe, A. Hickel, H. Hönig and P. Seuffer-Wasserthal; *J. Org. Chem.* 55, 1749 (1990).
- [120] C. J. Hawkins and G. T. Klease; *Aust. J. Chem.* 26, 2553 (1973).
- [121] H. Yamada and S. Shimizu; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 27, 622 (1988).
- [122] J. B. Jones; *Tetrahedron* 42, 3351 (1986).
- [123] B. J. Gould; "Handbook of Enzyme Biotechnology", ed. A. Wiseman, John Wiley and Sons, New York, 1975, cap. 1, p. 3.
- [124] A. R. Battersby and J. Staunton; *Tetrahedron* 30, 1707 (1974).
- [125] J. Newell; *Spectrum* 210, 122 (1987).
- [126] G. M. Whitesides, C.-H. Wong and A. Pollak, "Asymmetric reactions and processes in Chemistry", ed. E. L. Eliel and S. Otsuka, Washington, 1982, cap. 15, p.205.
- [127] N. J. Turner; *Nat. Prod. Rep.* 6, 625 (1989).
- [128] G. M. Whitesides and C.-H. Wong; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 24, 617 (1985).
- [129] V. Prelog; *Pure Applied. Chem.* 9, 119 (1964).
- [130] C.-S. Chen and C. J. Sih; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 28, 695 (1989).
- [131] R. MacLeod, H. Prosser, L. Fikentscher, J. Lanyi and H. S. Mosher; *Biochemistry* 3, 838 (1964).
- [132] K. Nakamura, T. Miyai, A. Nagar, S. Oka and A. Ohno; *Bull. Chem. Soc. Jpn.* 62, 1179 (1989).

- [33] H. Simon, J. Bader, H. Günther, S. Neumann and J. Thanos; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 24, 539 (1985).
- [34] Y. Takaishi, Y.-L. Yang, D. DiTullio and C. J. Sih; *Tetrahedron Lett.* 23, 5489 (1982).
- [35] C. J. Sih and C.-S. Chen; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 23, 570 (1984).
- [36] S. Servi; *Synthesis*, 1 (1990).
- [37] K. Nakamura, Y. Kawai and A. Ohno; *Tetrahedron Lett.* 32, 2927 (1991).
- [38] B. Wipf, E. Kupfer, R. Bertazzi and H. G. W. Leuenberger; *Helv. Chim. Acta* 66, 485 (1983).
- [39] A. Kurmar, D. H. Ner and S. Y. Dike; *Tetrahedron Lett.* 32, 1901 (1991).
- [40] Z. Shaked and G. M. Whitesides; *J. Am. Chem. Soc.* 102, 7104 (1980).
- [41] C.-H. Wong and G. M. Whitesides; *J. Org. Chem.* 47, 2816 (1982).
- [42] R. Wichmann and C. Wandrey; *Biotechnol. Bioeng.* 23, 2789 (1981).
- [43] L. G. Lee and G. M. Whitesides; *J. Org. Chem.* 51, 25 (1986).
- [44] K. Otsuka, S. Aono and I. Okura; *Chem. Lett.*; 2089 (1987).
- [45] C.-H. Wong, L. Daniels, W. H. Orme-Johnson and G. M. Whitesides; *J. Am. Chem. Soc.* 103, 6227 (1981).
- [46] C.-H. Wong, J. Gordon, C. L. Cooney and G. M. Whitesides; *J. Org. Chem.* 46, 4676 (1981).
- [47] C.-H. Wong and G. M. Whitesides; *J. Am. Chem. Soc.* 103, 4890 (1981).
- [48] D. Seebach, M. A. Sutter, R. H. Weber and M. F. Züger; *Org. Synth.* 63, 1 (1985).

- [49] T. Kometani, E. Kitatsuji and R. Matsuno; *Chem. Lett.*, 1465 (1989).
- [50] K. Nakamura, K. Inoue, K. Ushio, S. Oka and A. Ohno; *J. Org. Chem.* 53, 2589 (1988).
- [51] M. Bucciarelli, A. Forni, I. Moretti and G. Torre; *Synthesis*, 897 (1983).
- [52] M. N6grádi; "Stereoselective Synthesis", VCH, Federal Republic of Germany, 1987, p.30.
- [53] D. W. Brooks and K. W. Woods; *J. Org. Chem.* 52, 2036 (1987).
- [54] C.-S. Chen, Y. Fujimoto, G. Girdaukas and C. J. Sih; *J. Am. Chem. Soc.* 104, 7294 (1982).
- [55] B.-n. Zhou, A. S. Gopalan, F. VanMiddlesworth, W.-R. Shieh and C. J. Sih; *J. Am. Chem. Soc.* 105, 5925 (1983).
- [56] A. Manzocchi, R. Casati, A. Fiecchi and E. Santaniello; *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I*, 2753 (1987).
- [57] K. Nakamura, K. Ushio, S. Oka and A. Ohno; *Tetrahedron Lett.* 25, 3979 (1984).
- [58] K. Nakamura, M. Higaki, K. Ushio, S. Oka and A. Ohno; *Tetrahedron Lett.* 26, 4213 (1985).
- [59] K. Nakamura, Y. Kawai, S. Oka and A. Ohno; *Tetrahedron Lett.* 30, 2245 (1989).
- [60] K. Nakamura, K. Inoue, K. Ushio, S. Oka and A. Ohno; *Chem. Lett.*, 679 (1987).
- [61] K. Nakamura, Y. Kawai, T. Miyai and A. Ohno; *Tetrahedron Lett.* 31, 3631 (1990).
- [62] K. Nakamura, Y. Kawai, S. Oka and A. Ohno; *Bull. Chem. Soc. Jpn.* 62, 875 (1989).
- [63] K. Nakamura, Y. Kawai and A. Ohno; *Tetrahedron Lett.* 31, 267 (1990).

- [64] A. Manzocchi, A. Fiecchi and E. Santaniello; *J. Org. Chem.* 53, 4405 (1988).
- [65] Y.-D. Wu and K. N. Houk; *J. Am. Chem. Soc.* 113, 2353 (1991).
- [66] A. I. Meyers and T. Oppenlaender; *J. Am. Chem. Soc.* 108, 1989 (1986).
- [67] a. J. W. Verhoeven, W. van Gerresheim, F. M. Martens and S. M. van der Kerk; *Tetrahedron* 42, 975 (1986).
b. A. van Laar, H. J. van Ramesdonk and J. W. Verhoeven; *Recl. Trav. Chim. Pays-Bas* 102, 157 (1983).
- [68] a. A. Ohno, T. Shio, H. Yamamoto and S. Oka; *J. Am. Chem. Soc.* 103, 2045 (1981).
b. A. Ohno, H. Yamamoto and S. Oka; *J. Am. Chem. Soc.* 103, 2041 (1981).
c. L. L. Miller and J. R. Valentine; *J. Am. Chem. Soc.* 110, 3982 (1988).
- [69] a. S. Yasui, K. Nakamura, A. Ohno and S. Oka; *Bull. Chem. Soc. Jpn.* 55, 196 (1982).
b. D. D. Tanner and A. Kharrat; *J. Org. Chem.* 53, 1646 (1988).
- [70] B. W. Carlson, L. L. Miller, P. Neta and J. Grodkowski; *J. Am. Chem. Soc.* 106, 7233 (1984).
- [71] a. J. Bolte, J.-G. Gourcy et H. Veschambre; *Tetrahedron Lett.* 27, 565 (1986).
b. G. Bertolli, G. Fronza, C. Fuganti, P. Grasselli, L. Majori and F. Spreafico; *Tetrahedron Lett.* 22, 965 (1981).
c. T. Fijizawa, H. Hayashi and Y. Kishioka; *Chem. Lett.*, 129 (1987).
d. R. Chênevert and S. Thiboutot; *CAN. J. CHEM.* 64, 1599 (1986).
- [72] K. Nakamura, T. Kitayama, Y. Inoue and A. Ohno; *Bull. Chem. Soc. Jpn.* 63, 91 (1990).

- 1731 B. S. Deol, D. D. Ridley and G. W. Simpson; *Aust. J. Chem.* 29, 2459 (1976).
- 1741 J. Ehrler, F. Giovannini, B. Lamatsch and D. Seebach; *CHIMIA* 40, 172 (1986).
- 1751 S. C. Prescott and C. G. Dunn, "Industrial Microbiology", McGraw-Hill, New York, 1949, p. 35.
- 1761 R. P. Jones, N. Pamment and P. F. Greenfield; *Process Biochem.*, 42 (1981).
- 1771 R. P. Jones; *Enzyme Microb. Technol.* 11, 130 (1989).
- 1781 a. A. Furuichi, H. Akita, H. Matsukura, T. Oishi and K. Horikoshi; *Agric. Biol. Chem.* 49, 2563 (1985).
b. W.-R. Shieh, A. S. Gopalan and C. J. Sih; *J. Am. Chem. Soc.* 107, 2993 (1985).
c. K. Nakamura, Y. Kawai, N. Nakajima and A. Ohno; *J. Org. Chem.* 56, 4778 (1991).
d. K. Nakamura, Y. Kawai, T. Miyai, S. Honda, N. Nakajima and A. Ohno; *Bull. Chem. Soc. Jpn* 64, 1467 (1991).

OBJETIVO

Reduções assimétricas de alquil fenil cetonas via fermento de pão fornecem álcoois opticamente ativos que podem ser usados como precursores de moléculas quirais maiores de grande importância como, por exemplo, as ariletanolaminas. Sendo assim, este trabalho tem como objetivo a redução de algumas cetonas deste tipo por fermento de pão, inclusive as α -halogenadas, visando determinar qual substrato possui um melhor comportamento durante a redução, isto é, qual mantém um melhor compromisso entre os rendimentos químicos e ópticos. É objetivo, também, determinar quanto tempo de reação é requerido. Para tais propostas foram testados e comparados três procedimentos diferentes. Considerações mecanísticas foram abordadas quando necessário.

CAPÍTULO II

RESULTADOS E DISCUSSÃO

II.1 - ESTUDO DA REATIVIDADE DAS CETONAS

Inicialmente foram realizadas biotransformações de algumas cetonas proquirais via fermento de pão para se verificar quanto tempo seria necessário para que a redução ao álcool fosse completa. Estas reduções foram feitas por dois métodos: (A) em presença de açúcar e (B) em ausência de açúcar (vide p. 68 - 69). Para tal, alíquotas foram retiradas do meio reacional e preparadas para análise de RMN¹H. Através da integração e quantidades de prótons referentes a cada pico no espectro foi possível determinar a relação álcool/cetona no tempo em que a alíquota foi retirada, acompanhando-se o progresso da reação (Tab. 1 e 2)

Das tabelas 1 e 2 pode-se observar que a α -cloro 3 e α -bromoacetofenona 4 são substratos mais reativos que a acetofenona 5 e a propiofenona 6 pelos dois métodos. Uma maior reatividade por parte das cetonas halogenadas já era esperado em relação as não halogenadas, uma vez que grupos retiradores de elétrons ao lado da carbonila devem aumentar a reatividade desta.^(1,2) Porém, isto não significa que toda cetona tenha reagido para formar o álcool desejado, pois ela também pode ter sido consumida em reações laterais, como será visto mais adiante. É interessante notar que empregando-se o método B, na tabela 2, o substrato 3 foi totalmente consumido em 2,7 horas de reação, enquanto que o substrato 5 levou 48 horas.

Pode-se observar também que todos os substratos são consumidos mais rapidamente quando a reação é feita na ausência de

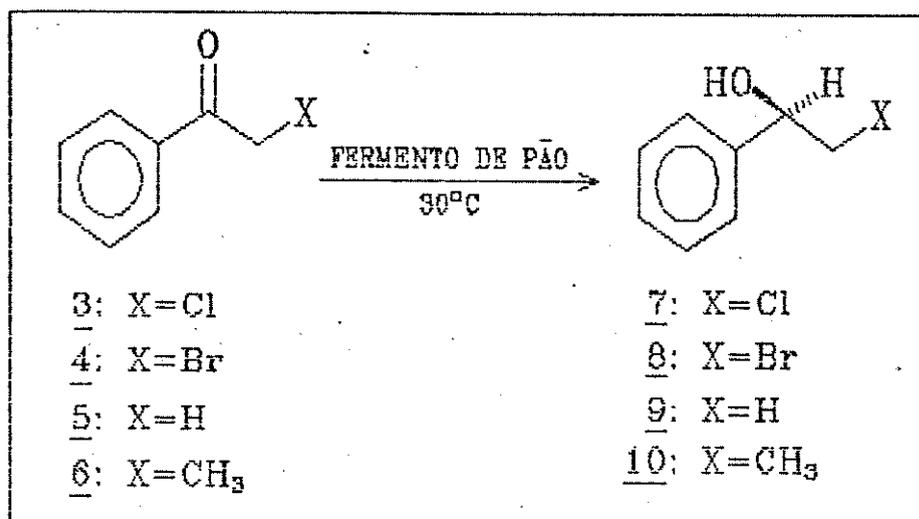


TABELA 2
 RELAÇÃO ÁLCOOL/CETONA MEDIDA DURANTE A REAÇÃO
 DAS CETONAS COM FERMENTO DE PÃO
 UTILIZANDO-SE O MÉTODO B^a

CETONA	Álcool / cetona				
	Tempo de reação /h				
	2,7	4	24	48	72
3	>19	----	>19	----	----
4	1,1	>19	>19	----	----
5	0,35	----	1,7	2,7	----
6	<0,05	----	0,23	0,36	1,4

^a método B: sem adição de açúcar

II.2 - REDUÇÃO DAS α-HALOACETOFENONAS PELOS MÉTODOS (A), (B) E (C)

As α-fluor, α-cloro e α-bromoacetofenonas foram reduzidas por fermento de pão fornecendo como produto de reação as correspondentes (-)-(-R)-2-halo-1-feniletanol obedecendo, portanto, a regra de Prelog levando-se em conta que o grupo -C₆H₅ é maior que o grupo -CH₂X (introdução, p.31).

Os resultados obtidos das biotransformações via fermento

Da tabela 3 pode-se observar que os compostos 2 e 3 apresentaram um rendimento químico sempre superior quando a reação foi feita em ausência de açúcar, apesar do tempo de reação ser menor. Estes resultados concordam com o trabalho de Torre e colaboradores que diz que em reduções feitas sem açúcar consegue-se obter um melhor rendimento químico em menos tempo de reação.⁽⁶⁾

Porém, os rendimentos químicos obtidos na redução do substrato 4 foram sempre muito baixos, independentemente do método empregado. Como somente traços da cetona 4 de partida foram recuperados, suspeitou-se que esta poderia ter sido consumida por reações laterais durante o processo. Entretanto, não podia-se descartar a possibilidade de ser a bromoidrina 8 formada quem estaria sendo consumida por vias laterais. Para descobrir qual das duas hipóteses é a correta, fez-se um experimento no qual um grama de bromoidrina racêmica, previamente preparada, foi adicionada à uma suspensão de fermento de pão em água onde permaneceu por 24 horas. Findo este tempo, recuperou-se 98% da bromoidrina adicionada, demonstrando que deve ser a cetona 4 que é consumida por vias laterais durante o processo

Por outro lado, poder-se-ia imaginar que o substrato 4 é reduzido dentro da célula do microorganismo e, uma vez convertido ao produto, este não teria permeabilidade à membrana celular não podendo ser, posteriormente, extraído durante o processo de extração com clorofórmio. Decidiu-se, então, fazer a plasmólise das células antes do processo de extração. Porém, foi isolado somente 12% do produto 8. Este resultado nos leva a concluir que é, realmente, a cetona de partida quem deve ter sido consumida por reações laterais, como foi dito anteriormente. Apesar do baixo rendimento químico observado nos três métodos empregados, o produto 8 foi isolado em altos rendimentos ópticos.

Com respeito a α -iodoacetofenona 11 é interessante notar que ao invés de ser obtido a iodoidrina 13, foram isolados a cetona 5 e seu respectivo produto de redução 9. Houve, portanto, a substituição do halogênio pelo hidrogênio durante o processo. Esta substituição está relacionada com o mecanismo envolvido na

redução, como será visto no próximo item.

Estes resultados originaram uma publicação em revista internacional.⁽⁵⁾

II.2.1 - MECANISMO DAS REDUÇÕES DAS α -HALOACETOFENONAS

A questão chave quanto ao mecanismo de biotransformações deste tipo é saber como a transferência do hidrogênio entre a coenzima e o substrato ocorre. Como foi citado na introdução, existe uma grande polêmica a esse respeito, por isso eu vou discorrer sobre esse assunto baseando-me nos trabalhos de Tanner^(3,7) e colaboradores por ser esse o que mais se aproxima deste trabalho, uma vez que eles também utilizaram o sistema α -haloacetofenonas para inferir sobre o mecanismo.

Em Síntese, Tanner e colaboradores determinaram que as α -haloacetofenonas podem reagir por dois mecanismos diferentes: (i) mecanismo com transferência direta de hidreto e (ii) mecanismo com transferência de elétron ($e^- / H^+ / e^-$). A representação destes mecanismos já foram apresentadas na introdução (p.35). O mecanismo (i), chamado de heterolítico, fornece como produto a haloidrina; e o mecanismo (ii), chamado de homolítico, fornece como produto a acetofenona. Este segundo mecanismo é radicalar e nele ocorre a perda do halogênio.^(3,7)

Tanner e Chen também investigaram a possibilidade da redução ocorrer por transferência direta de hidreto no carbono 2 via S_N2 ao invés do processo homolítico. Porém, eles descartaram essa hipótese ao observar que as reações eram inibidas quando feitas em presença de pequenas quantidades de um capturador de radicais, no caso o *m*-dinitrobenzeno (*m*-DNB). Por outro lado, os rendimentos químicos das reações eram significativamente superiores quando feitas em presença de um iniciador de radicais (di-*t*-butilperoxioxalato).⁽⁸⁾

Voltando a tabela 3 (p.51), pode-se observar que as reduções dos substratos 2, 3 e 4 forneceram como produtos as respectivas haloidrinas, enquanto que o substrato 11 forneceu a cetona 5 e o álcool 9; este último é provavelmente produto da

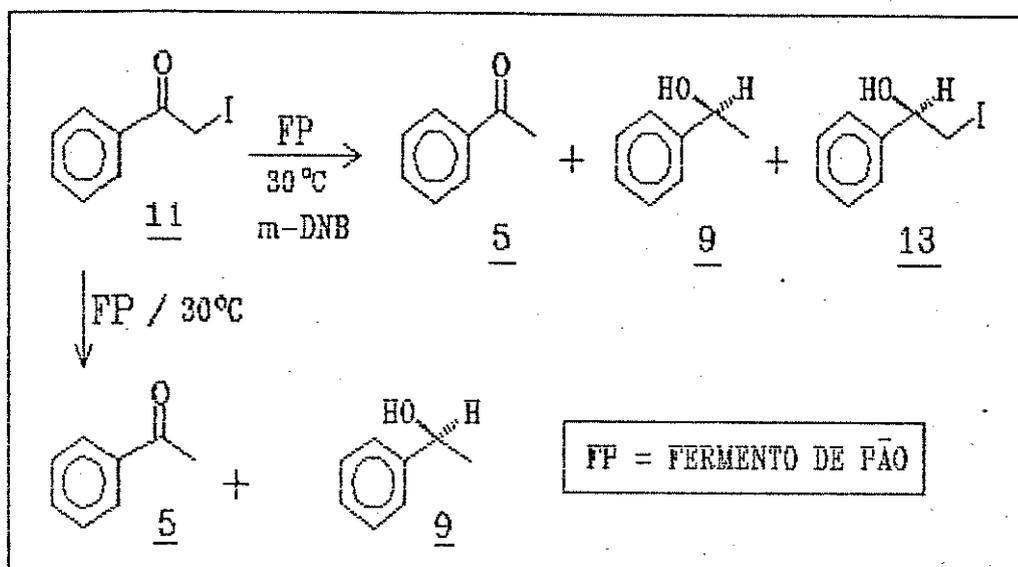


TABELA 4

REDUÇÃO DA α -IODOACETOFENONA VIA FERMENTO DE PÃO
 NA PRESENÇA E AUSÊNCIA DE m-DNB^a

PhCOCH ₂ I	Aditivo	PRODUTOS				
		PhCOCH ₃ / %	PhCHOHCH ₃ / %	PhCHOHCH ₂ I / %	$[\alpha]_D^{25}$	Rendimento óptico / %
11	--	67	32	--	--	--
11	m-DNB	9,2	--	15	-34,0°	87 ^b

a reação feita sem açúcar (método B) num tempo de 24 horas; b calculado com base no valor da rotação específica do derivado óxido de estireno.

redução da acetofenona obtida no próprio meio. Comparando-se estes resultados com os obtidos por Tanner e colaboradores, conclui-se que os substratos 2, 3 e 4 foram reduzidos preferencialmente pelo mecanismo heterolítico. Por outro lado, para investigar se o substrato 11 foi reduzido por processo homolítico ou por uma S_N2, nós fizemos uma nova redução de 11 com fermento de pão em presença de m-DNB. Como resultado não só observamos a diminuição na formação da acetofenona como, também, conseguimos isolar a iodoidrina (Tab.4). Estes dados parecem estar de acordo com o

Da tabela 5 pode-se observar que o rendimento químico caiu significativamente quando o composto 6 foi reduzido em presença de açúcar. Este resultado é semelhante aos obtidos na redução das α -haloacetofenonas, o qual vem de encontro com o trabalho de Torre^[6] e colaboradores. Por outro lado, a rotação específica de 10 é maior quando o método A é empregado.

A redução da α -bromopropiofenona 14 não foi bem sucedida, já que o respectivo produto de redução 15 não foi obtido e a cetona 14 de partida não foi recuperada. Fazendo-se uma analogia com os resultados obtidos das biotransformações da cetona 4, suspeita-se que o substrato 14 tenha sido completamente consumido por reações laterais.

II.4 - REDUÇÃO DA ACETOFENONA 5 PELOS MÉTODOS (A), (B) E (C)

Os resultados obtidos das biotransformações do substrato 5 via fermento de pão pelos métodos A, B e C estão sumarizados na tabela 6.

Da tabela 6, o que chama a atenção nos resultados obtidos é a drástica redução no rendimento óptico quando a reação é feita na ausência de açúcar e de sulfato de zinco, seja pelo método B ou C. Essa grande diferença nos rendimentos ópticos é observada, muitas vezes, quando se trabalha com células intactas onde os fatores que regem a estereosseletividade são muito complexos, uma vez que não se sabe quantas oxidoredutases podem estar envolvidas no processo. Nos experimentos B e C, a perda da estereosseletividade pode estar relacionada com o fato de existirem pelo menos duas enzimas competitivas de preferências estereoquímicas opostas catalisando a redução do substrato 5 nessas condições de reação^[11,12,13]. Entretanto, quando a reação é feita em presença de açúcar e de sulfato de zinco somente a(s) enzima(s) responsável pela produção do álcool (-)-(S)-1-feniletanol consegue manter sua eficiência catalítica.

Como no método A foi adicionado sulfato de zinco, diferentemente do método B, decidiu-se fazer novamente a redução de 5 pelo método A, porém sem a adição de sulfato de zinco para

investigar se este era responsável pelo aumento significativo da enantiosseletividade da reação. Esta hipótese foi levantada por acreditar-se que este aditivo seja fundamental na ligação do substrato ao sítio ativo da enzima, ajudando a controlar o curso estereoquímico do processo.^[14,15] Entretanto, o rendimento óptico obtido desta redução é somente ligeiramente inferior ao obtido quando em presença de sulfato de zinco (Tab. 6, métodos A e A').

Decidiu-se, então, investigar se era o açúcar o responsável pelo aumento da enantiosseletividade. Para tal, fizemos novos experimentos variando-se a proporção de açúcar adicionado em relação a quantidade de fermento e comparamos os resultados.

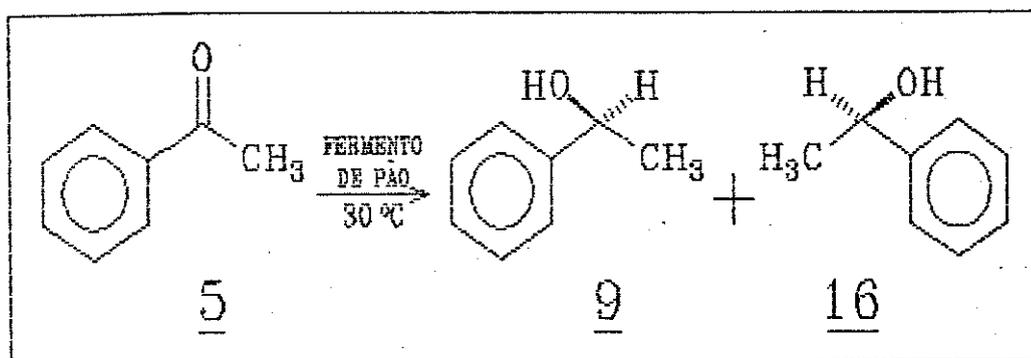


TABELA 6
REDUÇÃO DA ACETOFENONA VIA FERMENTO DE PÃO

a Método	Aditivo	PhCHOHCH ₃			5 PhCOCH ₃ Recuperada / %	
		Rendimento químico / %	[α] _D ²⁵	Rendimento óptico / %		
5	A	ZnSO ₄	20,5	-44,3° (S)	89	46
	A'	---	21	-40,8° (S)	82	50
	B	---	66	+1,50° (R)	3	19
	C	---	50	-1,44° (S)	3	20

a Tempo de reação: 48 horas, Método A: com adição de açúcar, Método B: sem adição de açúcar e método C: substrato dissolvido em etanol, sem adição de açúcar; b Baseado na rotação específica da literatura.^[14]

II.4.1 - ESTUDO DA VARIACÃO DA ADIÇÃO DE AÇÚCAR

Na tabela 7 estão sumarizados os resultados obtidos das biotransformações do substrato 5 via fermento de pão à várias proporções de açúcar. Para facilitar a comparação dos dados obtidos, alguns resultados da tabela 6 estão incluídos.

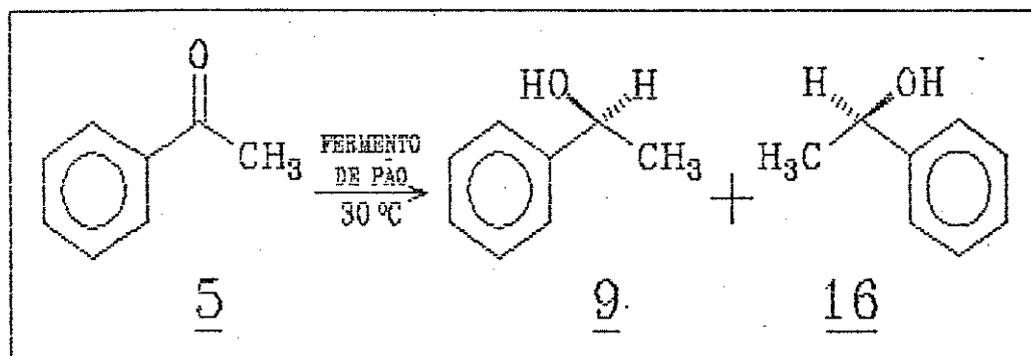


TABELA 7
REDUÇÃO DA ACETOFENONA À VÁRIAS PROPORÇÕES
DA RAZÃO AÇÚCAR/FERMENTO

Método a	Açúcar (Fermento) /g	PhCHOHCH ₃		Rendimento óptico /%	5 PhCOCH ₃ /% Recuperada
		Rendimento químico /%	[α] _D ²⁵		
A	0,48	20,5	-44,3° (S)	89	46
B	0,03	41	-42,9° (S)	87	33
B	0,015	48	-45,2° (S)	91	11,5
B	0,003	60	-6,69° (S)	13,5	0
B	---	66	+1,50° (R)	3	19
C	0,015	45	-31,2° (S)	63	22

a Método A: com adição de açúcar, método B: sem adição de açúcar e método C: substrato dissolvido em etanol, sem adição de açúcar;
b baseado na rotação específica da literatura ^[14].

Analisando-se os resultados da tabela 7 fica evidente que a presença de uma certa quantidade de açúcar no meio reacional é fundamental para que se obtenha um alto rendimento óptico, isto

é, a quantidade de açúcar no meio parece influenciar a enantiosseletividade da reação. Baseando-se nestes resultados, suspeita-se que o açúcar, ou produtos da degradação deste, deve funcionar como substrato suicida inibindo a(s) enzima(s) responsável pela produção do álcool (+)-(R)-1-feniletanol 16 controlando-se, assim, o curso estereoquímico da reação.

Note também que existe um compromisso entre os rendimentos químicos e ópticos, isto é, com a perda da enantiosseletividade aumenta-se o rendimento químico. Esse compromisso vem reforçar a idéia de que existem pelo menos duas enzimas competitivas atuando como catalisadores na redução. Porém, foi com a relação açúcar/fermento em torno de 0,015 que se conseguiu manter um melhor compromisso entre esses rendimentos. Nakamura e colaboradores^[16] obtiveram um resultado semelhante, porém oposto, na redução de β -cetoésteres. Eles observaram uma diminuição na enantiosseletividade da reação em função do aumento na concentração de açúcar no meio reacional. No entanto, os rendimentos químicos se mantiveram aproximadamente constantes (introdução, Tab. 2, p. 30).

É interessante notar que a relação açúcar/fermento igual a 0,015 representa apenas 3% da quantidade de açúcar normalmente adicionada. Nessas condições foi possível obter o melhor rendimento óptico acompanhado de um significativo aumento no rendimento químico. Acredita-se que a alta concentração de açúcar existente neste último experimento, seja a responsável pela queda no rendimento, uma vez que a degradação deste forma acetaldeído e este, por sua vez, reage com a coenzima (NAD(P)H) numa via principal do metabolismo da levedura; coenzima esta necessária a redução da cetona ao álcool. (introdução, Fig. 14, p. 25).

Entretanto, quando a reação foi feita em presença de etanol, mesmo com a razão "ótima" de 0,015 sendo mantida, o grau de pureza do álcool 9 caiu sensivelmente, apesar do rendimento químico se manter aproximadamente constante. Por outro lado, quando a reação foi feita com a razão 0,003 de açúcar por fermento não foi mais possível manter uma boa enantiosseletividade, indicando que há uma concentração mínima de açúcar necessária para

que haja o controle estereoquímico. O gráfico 1 pode melhor ilustrar estes resultados.

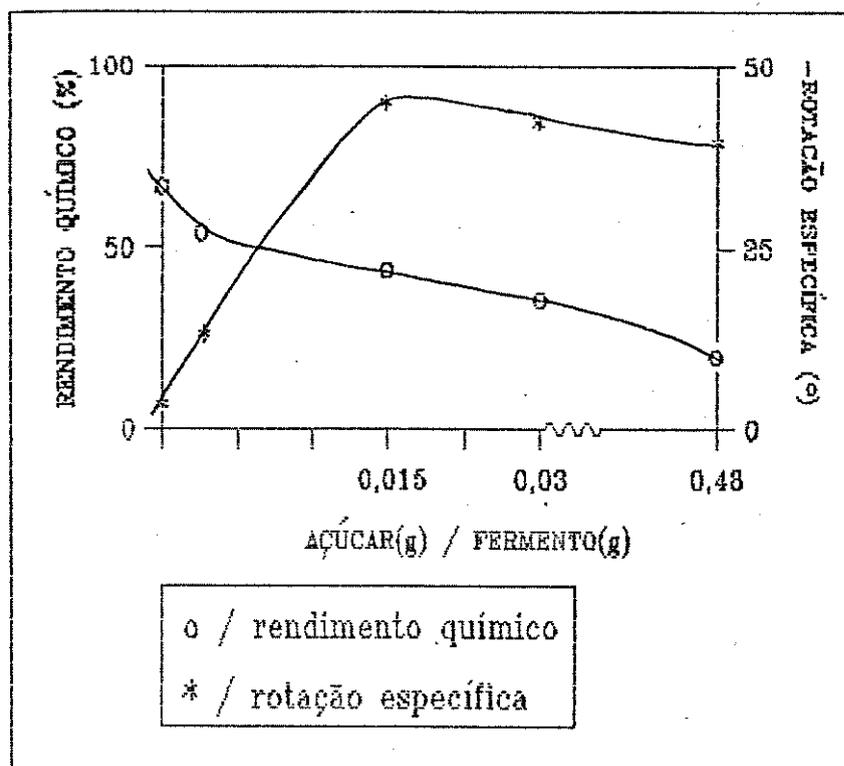


gráfico 1: curvas de rendimento químico e rotação específica vs açúcar / fermento.

II.4.1.2 - REDUÇÃO DA α -CLOROACETOFENONA VIA FERMENTO DE PÃO NA RAZÃO AÇÚCAR/FERMENTO = 0,015

Os resultados obtidos na redução da α -cloroacetofenona com fermento de pão pelos métodos A (rendimento 36%, $[\alpha]_D^{25} -43,3^\circ$) e B (rendimento 74%, $[\alpha]_D^{25} -39,3^\circ$) apresentaram o mesmo padrão de comportamento observado na redução da acetofenona, isto é, a mudança do método A para o B causou um aumento no rendimento químico acompanhado de uma queda na enantiosseletividade. Devido esta semelhança de comportamento a α -cloroacetofenona foi submetida a um experimento utilizando-se a proporção açúcar/fermento otimizada para a redução da acetofenona.

Como resultado observamos que, em relação ao método A, houve um aumento no rendimento químico (59%), porém o grau de

pureza óptica caiu sensivelmente em relação aos dois métodos ($[\alpha]_D^{25} -28,1^\circ$). Desta forma, conclui-se que é necessário um estudo, a parte, da variação do açúcar para a redução da α -cloroacetofenona visando uma possível otimização.

II.4.2 - ESTUDO DA VARIAÇÃO DO pH NA BIOTRANSFORMAÇÃO DA ACETOFENONA

Sabe-se que o pH influencia a atividade catalítica de uma dada enzima podendo aumentá-la, diminuí-la ou mesmo inibi-la completamente.^[17,18] É possível, então, controlar o curso estereoquímico em função do pH. Sonnleitner e colaboradores, estudando a redução de β -cetoésteres pelo *Saccharomyces cerevisiae*, observaram que em pH 2,2 os produtos de redução apresentavam um máximo de pureza óptica (Tab.8).^[19]

TABELA 8
REDUÇÃO DE β -CETOÉSTERES A VÁRIOS VALORES DE pH

pH	ee (%)
---	69
2,2	96
2,3	91
3,0	89
5,0	88

Como a cetona 5 mostrou um comportamento sensivelmente diferenciado perante os três métodos de redução empregados sendo os resultados obtidos fortemente influenciados pela quantidade de açúcar, decidimos investigar se o pH do meio também teria significativa influência no curso estereoquímico da reação. Para tal, a cetona 5 foi submetida a redução microbiológica com fermento de pão em pH controlado e os resultados mostram que o mesmo realmente influencia na estereosseletividade da redução. Os resultados estão sumarizados na tabela 9.

Da tabela 9 note que em pH 4,5 e 8,0 foram observados graus de pureza óptica menores em relação aos obtidos em pH 3,0 e

6,0. Parece que nestes dois últimos valores de pH a(s) enzima(s) que produz o álcool (+)-(R) 16 não conseguiu manter sua eficiência catalítica. Por outro lado, em pH 4,5 houve um aumento significativo na eficiência catalítica desta(s) enzima(s), reduzindo o rendimento óptico de 83-86 à 14%.

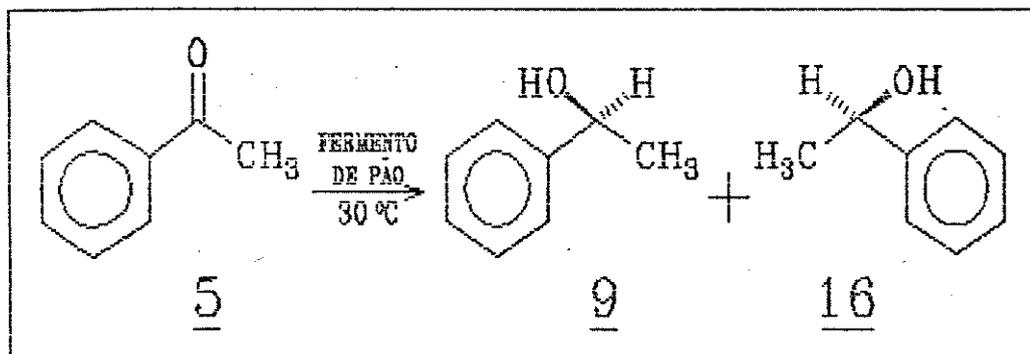


TABELA 9
REDUÇÃO DA ACETOFENONA EM pH CONTROLADO^a

pH	PhCHOHCH ₃			5
	Rendimento químico / %	[α] _D ²⁵	Rendimento ^b óptico / %	PhCOCH ₃ / % Recuperada
3,0	15	-41,1° (S)	83	45
4,5	30	-6,89° (S)	14	26
6,0	25	-42,6° (S)	86	27
8,0	23	+4,05° (R)	8	17

a método sem adição de açúcar em 13 horas de reação; b baseado na rotação específica obtida na literatura^[14]

É interessante notar que, em pH 8,0, as enzimas envolvidas durante o processo conseguiram manter suas eficiências catalíticas aproximadamente iguais, abaixando sensivelmente o rendimento óptico da reação. Por outro lado, poder-se-ia imaginar o contrário, isto é, que as atividades catalíticas das enzimas envolvidas teriam sido diminuídas numa ordem de grandeza aproximadamente iguais. Porém, para que essa hipótese fosse

provável esperar-se-ia observar uma significativa diminuição no rendimento químico, o que não ocorreu. O que pode estar havendo é uma ligeira alternância na atividade da(s) enzima(s)-R vs enzima(s)-S com a variação do pH.

Nakamura e colaboradores puderam observar melhor essa alternância após o isolamento de 4 oxidoreduções, as quais eles submeteram a um estudo de atividade em função do pH. Ao graficarem os dados obtidos eles observaram que a atividade de uma dada enzima pode aumentar ou diminuir de acordo com o pH (introdução, Fig. 22, p.38-39).^[17]

Foram feitos, também, ensaios das reduções do substrato 5 por todos os métodos anteriormente empregados (Tab. 6 e 7), a fim de se verificar o comportamento na variação do pH durante as reações, já que ficou evidenciado que este influencia no curso estereoquímico. Os resultados estão sumarizados na tabela 10.

TABELA 10
 COMPORTAMENTO DO pH DURANTE AS REDUÇÕES DA ACETOFENONA
 COM DIFERENTES PROPORÇÕES DE AÇÚCAR

Método a	Açúcar (Fermento) /g	pH					pH
		Tempo de reação /h					
		0	2	5	21	48	
A	0,48	3,6	3,7	4,2	4,1	4,4	4,0
A'	0,48	3,3	3,7	4,2	4,1	4,3	3,9
A	0,03	3,4	4,6	4,8	4,6	4,6	4,4
A	0,015	3,6	4,7	4,8	4,8	4,7	4,5
A	0,003	4,2	4,9	5,0	4,9	5,0	4,8
B	0	4,7	4,9	5,0	5,1	5,2	5,0
C	0	4,7	5,0	5,1	4,8	4,8	4,9
C	0,015	3,7	5,3	5,4	5,2	5,1	4,9

a método A: com adição de açúcar, método A': com adição de açúcar, porém sem adição de sulfato de zinco, método B: sem adição de açúcar, método c: substrato dissolvido em etanol, sem adição de açúcar.

Desta tabela é interessante notar que quando a reação foi feita na proporção açúcar/fermento = 0,015 o pH variou em torno de 4,5, sendo que o rendimento óptico obtido nestas condições foi de 91% (Tab. 7). Por outro lado, observou-se uma baixa enantiosseletividade quando a reação foi feita sob pH controlado em 4,5 (Tab. 9). Como explicar estes resultados?

Já foi citado anteriormente que é muito difícil discriminar os fatores que regem a estereosseletividade de uma dada reação quando se trabalha com células intactas,^[12] porém parece razoável que quando a reação foi feita em pH controlado, este foi o fator que regeu a enantiosseletividade. Entretanto, quando a reação foi feita com adição de açúcar duas variáveis poderiam estar influenciando: o pH e a presença de açúcar. Nesse caso se o pH fosse o fator determinante esperar-se-ia obter um rendimento óptico menor que 91%. Portanto deve ser a presença de açúcar a responsável pela alta enantiosseletividade observada nestas condições.

Estendendo este raciocínio aos outros experimentos da tabela 10, observa-se que não houve variação significativa no pH do meio reacional durante as reduções (com quantidades de açúcar variadas) e, portanto, nessas condições de reação parece ser a quantidade de açúcar no meio quem rege a estereosseletividade da reação.

II.4.3 - BIBLIOGRAFIA

- [11] M. M. Midland, D. C. McDowell, R. L. Hatch and A. Tramontano; *J. Am. Chem. Soc.* 102, 867 (1980).
- [12] M. M. Midland and S. A. Zderic; *J. Am. Chem. Soc.* 104, 525 (1982).
- [13] D. D. Tanner and A. R. Stein; *J. Org. Chem.* 53, 1642 (1988).
- [14] M. Imuta, K.-i. Kawai and H. Ziffer; *J. Org. Chem.* 45, 3352 (1980).

- [15] M. de Carvalho, M. T. Okamoto, P. J. S. Moran and J. A. R. Rodrigues; *Tetrahedron* 47, 2073 (1991).
- [16] M. Bucciarelli, A. Forni, I. Moretti and G. Torre; *Synthesis*, 897 (1983).
- [17] D. D. Tanner, J. J. Chen, L. Chen and C. Luelo; *J. Am. Chem. Soc.* 113, 8074 (1991).
- [18] D. D. Tanner and J. J. Chen; *J. Org. Chem.* 54, 3842 (1989).
- [19] E. J. Corey, S. Shibata and R. K. Bakshi; *J. Org. Chem.* 53, 2861 (1988).
- [110] S. Colona and R. Fornasier; *J. Chem. Soc. Perkin Trans 1*, 371 (1978).
- [111] H. Simon, J. Bader, H. Günther, S. Neumann and J. Thanos; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 24, 539 (1985).
- [112] C. S. Sih and C.-S. Chen; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 23, 570 (1984).
- [113] B.-n. Zhou, A. S. Gopalan, F. VanMiddlesworth, W.-R. Shieh and C. J. Sih; *J. Am. Chem. Soc.* 105, 5925 (1983).
- [114] R. MacLeod, H. Prosser, L. Fikentscher, J. Lanyi and H. S. Mosher; *Biochemistry* 3, 838 (1964).
- [115] D. D. Tanner and A. Kharrat; *J. Am. Chem. Soc.* 110, 2968 (1988).
- [116] K. Nakamura, K. Inoue, K. Ushio, S. Oka and A. Ohno; *J. Org. Chem.* 53, 2589 (1988).
- [117] K. Nakamura, Y. Kawai, N. Nakajima and A. Ohno; *J. Org. Chem.* 56, 4778 (1991).
- [118] B. J. Gould; "Handbook of Enzyme Biotechnology", ed. A. Wiseman, John Wiley and Sons, New York, 1975, cap.1, p. 3.
- [119] M. Rohner, T. Münch, B. Sonnleitner and A. Fiechter; *Biocatalysis* 3, 37 (1990).

CONCLUSÃO

Quando se trabalha com células intactas, devido a presença de todo um complexo enzimático existente em um microorganismo, é muito difícil estudar o comportamento e levantar considerações sobre os resultados. Porém parece ter ficado evidente que mudanças nas condições de reação, tais como concentração de açúcar, pH do meio e adição de solvente orgânico, podem interferir na estereosseletividade controlando o curso estereoquímico.

Comportamentos deste tipo sugerem a existência de pelo menos duas enzimas competitivas com enantiosseletividades diferentes atuando como catalisadores, os quais puderam ser mais facilmente visualizados na redução da acetofenona.

As α -haloacetofenonas se mostraram um sistema muito útil na diferenciação das proposições mecanísticas existentes para biotransformações deste tipo. Enquanto a α -iodoacetofenona reagiu preferencialmente pelo mecanismo homolítico, as outras cetonas halogenadas preferiram o mecanismo heterolítico.

De todos os resultados obtidos ficou a certeza da grande potencialidade da redução assimétrica microbiológica no preparo de álcoois com altos graus de pureza óptica, os quais podem ser utilizados na construção de moléculas quirais maiores. A α -cloro e α -fluoroacetofenona parecem ser os substratos mais adequados para esse papel, uma vez que forneceram os resultados mais promissores.

CAPÍTULO III

PARTE EXPERIMENTAL

III.1 - INSTRUMENTAÇÃO

Os espectros de RMN^1H foram obtidos nos espectrômetros Bruker AW-80, Varian T-60 e Varian XL-100. Os solventes utilizados foram o tetracloreto de carbono e clorofórmio deuterado. Para referência interna foi utilizado o TMS. Os espectros que foram obtidos utilizando-se o clorofórmio deuterado como solvente apresentam um pico à 1,20 ppm, que corresponde a uma impureza do mesmo.

Os espectros de infravermelho foram obtidos no espectrofotômetro Perkin-Elmer 1430. Para referência foi utilizada a absorção em 1601 cm^{-1} de um filme de poliestireno.

Os espectros de massas foram obtidos no espectrômetro Varian Mat 311A e no espectrômetro Hewlett Packard 9153C acoplado à um cromatógrafo gasoso Hewlett Packard 5890 - série II. Todos os espectros foram obtidos à 70 eV.

As rotações específicas foram obtidas no polarímetro da Carl Zeiss: LEP A2 (373147).

As medidas de pH foram feitas utilizando-se um pH-metro de bolso modelo PS-15 da Corning.

III.2 - INFORMAÇÕES GERAIS

O esquema do extrator contínuo líquido-líquido utilizado para se obter o extrato do meio reacional das reduções microbiológicas com fermento de pão, está esquematizado na figura 1.

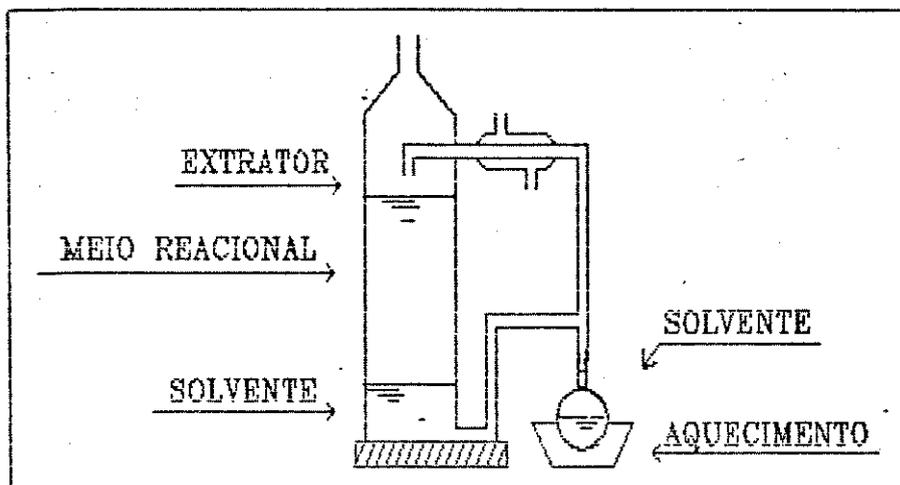


Figura 1: Extrator contínuo líquido-líquido.

As cromatografias em coluna foram realizadas com sílicagel 60 da Merck-Art 7734.

Foi utilizado fermento de pão fresco - Itaiguara.

A procedência dos reagentes utilizados são: α -bromoacetofenona e propiofenona - Aldrich; α -cloroacetofenona, acetofenona e m-dinitrobenzeno - Carlo Erba; α -bromopropiofenona - Merck.

Os solventes comerciais utilizados foram previamente tratados e destilados.

III.3 - DESCRIÇÃO GERAL DOS PROCEDIMENTOS DE REDUÇÕES MICROBIOLÓGICAS

As reduções foram realizadas por 3 métodos:

MÉTODO A - Em um balão de fundo redondo com duas bocas fez-se uma suspensão de fermento de pão comercial fresco (20 g) em água (10 ml). Juntou-se uma solução de açúcar (10 g) em água (38 ml) e em seguida uma solução de sulfato de zinco monohidratado (12,8 mg, 0,071 mmol) em água (1,3 ml). Adaptou-se a uma boca do balão um borbulhador e na outra um agitador mecânico. Após 30 minutos de agitação em banho termostatizado à 30°C, adicionou-se o substrato (1 mmol) à suspensão. Após 24 horas, uma nova suspensão de fermento de pão (7 g) em água (3 ml) e uma solução de açúcar (3 g)

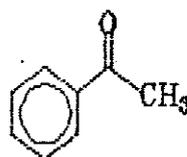
em água (13 ml) foram adicionadas. Terminada a reação o meio reacional foi saturado com cloreto de sódio e os produtos foram extraídos em extrator contínuo líquido-líquido por 48 horas, utilizando-se clorofórmio como solvente (Fig 1). Os produtos foram cromatografados em coluna de sílica gel utilizando-se clorofórmio como eluente. ⁽¹¹⁾

MÉTODO B - Em um balão de fundo redondo com duas bocas fez-se uma suspensão de fermento de pão comercial fresco (35 g) em água (20 ml). Adaptou-se a uma boca do balão um borbulhador e na outra um agitador mecânico. Após 30 minutos de agitação em banho termostaticado à 30°C, adicionou-se o substrato (1 mmol) à suspensão. Terminada a reação os produtos foram extraídos e cromatografados como no método A. ⁽¹²⁾

MÉTODO C - Em um balão de fundo redondo com duas bocas fez-se uma suspensão de fermento de pão comercial fresco (35 g) em água (20 ml). Adaptou-se a uma boca do balão um borbulhador e na outra um agitador mecânico. Após 30 minutos de agitação em banho termostaticado à 30°C, adicionou-se lentamente à suspensão uma solução do substrato (1 mmol) dissolvido em etanol (1,5 ml). Terminada a reação os produtos foram extraídos e cromatografados como no método A. ⁽¹³⁾

A determinação do tempo necessário requerido para a reação de cada substrato com o fermento de pão foi feita retirando-se amostras (alíquotas de 10 ml) do meio reacional em determinados tempos de reação. Essas amostras foram extraídas e submetidas a análise de ressonância magnética nuclear de próton. Dessa forma pôde-se acompanhar o consumo de cetona, bem como a produção de álcool. Posteriormente, as amostras foram adicionadas ao restante da reação para, então, serem isolados os produtos.

III.4 - REDUÇÃO DA ACETOFENONA 5

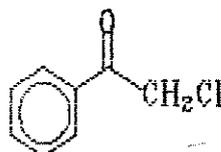


MÉTODO A - Partiu-se de 1,07 g (8,91 mmol) de acetofenona 5 e deixou-se reagir por 48 horas. Após cromatografia recuperou-se 498 mg (4,14 mmol, 46%) da cetona 5 de partida como um óleo e 223mg de (-)-(S)-1-feniletanol 9 (1,83 mmol, 20,5%) também como um óleo. Este apresentou $[\alpha]_D^{25} - 44,3^\circ$ (c. 7,2, C_6H_6) com 89% de rendimento óptico.^[4] RMN¹H (80 MHz, CCl_4) δ 1,3 (d, 3H, J=6,4 Hz, CH_3), 3,4 (br s, 1H, OH), 4,6 (q, 1H, J=6,4 Hz, CH) e 7,1 ppm (s, 5H, Ph); IV (filme) 3350, 3040, 2970, 1500, 765 e 705 cm^{-1} ; EM m/z (%) 122 (M^+ , 47), 107 (100), 105 (13), 91 (13) e 77 (47).

MÉTODO B - Partiu-se de 1,03 g (8,57 mmol) de 5 e deixou-se reagir por 48 horas. Isolou-se 198 mg (1,65 mmol, 19%) da cetona 5 de partida e 687 mg de (+)-(R)-1-feniletanol 16 (5,62 mmol, 66%). Este último apresentou $[\alpha]_D^{25} + 1,50^\circ$ (c. 7,2, C_6H_6) com 3% de rendimento óptico^[4] e foi caracterizado como no método A.

MÉTODO C - Partiu-se de 1,02 g (8,49 mmol) de 5 e deixou-se reagir por 48 horas. Isolou-se 205 mg (1,71 mmol, 20%) da cetona 5 de partida e 521 mg do álcool 9 (4,26 mmol, 50%). Este último apresentou $[\alpha]_D^{25} - 1,44^\circ$ (c. 7,2, C_6H_6) com 3% de rendimento óptico^[4] e foi caracterizado como no método A.

III.5 - REDUÇÃO DA α -CLOROACETOFENONA 3

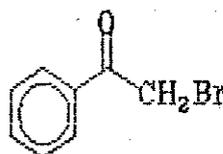


MÉTODO A - Partiu-se de 500 mg (3,23 mmol) de α -cloroacetofenona 3 e deixou-se reagir por 48 horas. Após cromatografia recuperou-se 37,0 mg (0,239 mmol, 7,4%) da cetona 3 de partida como um óleo e 180 mg de (-)-(R)-2-cloro-1-feniletanol 7 (1,15 mmol, 36%) também como um óleo. Este apresentou $[\alpha]_D^{25} - 43,3^\circ$ (c. 1,8, C_6H_{12}) com 90% de rendimento óptico.^[5] RMN¹H (100 MHz, CCl_4) δ 2,9 (br s, 1H, OH), 3,5 (dd, 1H, J=11 e 8 Hz, CH_2), 3,7 (dd, 1H, J=11 e 4 Hz, CH_2), 5,1 (dd, 1H, J=8 e 4 Hz, CH) e 7,8 (s, 5H, Ph); IV (filme) 3390, 3040, 2960, 1495, 760 e 700 cm^{-1} ; EM m/z (%) 156 (M^+ , 6), 121 (0,70), 107 (100), 105 (14) e 77 (8).

MÉTODO B - Partiu-se de 1,00 g (6,47 mmol) de 3 e deixou-se reagir por 24 horas. Após cromatografia isolou-se 749 mg do álcool 7 (4,78 mmol, 74%) como um óleo. Este apresentou $[\alpha]_D^{25} - 39,3^\circ$ (c. 1,8, C_6H_{12}) com 82% de rendimento óptico^[5] e foi caracterizado como no método A.

MÉTODO C - Partiu-se de 1,01 g (6,53 mmol) de 3 e deixou-se reagir por 4 horas. Após cromatografia recuperou-se 46,1 mg (0,298 mmol, 5%) da cetona 3 de partida como um óleo e 863 mg do álcool 7 (5,51 mmol, 84%) também como um óleo. Este apresentou $[\alpha]_D^{25} - 21,1^\circ$ (c. 1,7, C_6H_{12}) com 44% de rendimento óptico^[5] e foi caracterizado como no método A.

III.6 - REDUÇÃO DA α -BROMOACETOFENONA 4



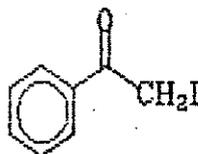
MÉTODO A - Partiu-se de 510 mg (2,56 mmol) de α -bromoacetofenona 4 e deixou-se reagir por 96 horas. Após cromatografia isolou-se 46,6 mg de (-)-(-R)-2-bromo-1-feniletanol 8 (0,232 mmol, 9,1%) como um óleo. Este apresentou $[\alpha]_D^{25} - 38,2^\circ$ (c. 6,3, $CHCl_3$) com 93% de rendimento óptico.^[5] RMN¹H (80 MHz, CCl_4) δ 2,7 (br s, 1H, OH), 3,38 (dd, 1H, J=10,4 e 8,0 Hz, CH_2), 3,56 (dd, 1H, J=10,4 e 4,0 Hz, CH_2), 4,80 (dd, 1H, J=8,0 e 4,0 Hz, CH) e 7,3 (s, 5H, Ph); IV (filme) 3400, 3040, 2960, 1490, 760 e 700 cm^{-1} ; EM m/z (%) 200 - 202 (M^+ , 10), 107 (100), 79 (91) e 77 (67).

MÉTODO B - Partiu-se de 1,07 g (5,38 mmol) de 4 e deixou-se reagir por 24 horas. Após cromatografia isolou-se 83,8 mg do álcool 8 (0,417 mmol, 7,8%) como um óleo. Este apresentou $[\alpha]_D^{25} - 39,7^\circ$ (c. 4,6, $CHCl_3$) com 97% de rendimento óptico^[5] e foi caracterizado como no método A.

MÉTODO C - Partiu-se de 1,06 g (5,33 mmol) de 4 e deixou-se reagir por 4 horas. Após cromatografia recuperou-se traços da cetona 4 de partida e 110 mg do álcool 8 (0,547 mmol, 10%) como um óleo. Este apresentou $[\alpha]_D^{25} - 36,9^\circ$ (c. 5,0, $CHCl_3$) com 90% de rendimento

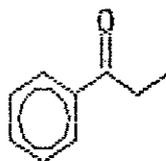
óptico^[5] e foi caracterizado como no método A.

III.7 - REDUÇÃO DA α -IODOACETOFENONA 11



MÉTODO B - Partiu-se de 643 mg (2,61 mmol) de α -iodoacetofenona 11 e deixou-se reagir por 24 horas. Após cromatografia isolou-se 209 mg de acetofenona (1,74 mmol, 67%) como um óleo e 101 mg de (-)-(S)-1-feniletanol (0,827 mmol, 32%) também como um óleo. Este apresentou $[\alpha]_D^{25} - 36,3^\circ$ (c. 1,9, C_6H_6) com 73% de rendimento óptico^[4] e foi caracterizado como em III.4 - método A.

III.8 - REDUÇÃO DA PROPIOFENONA 6

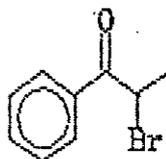


MÉTODO A - Partiu-se de 1,07 g (7,97 mmol) de propiufenona 6 e deixou-se reagir por 72 horas. Após cromatografia recuperou-se 616 mg (4,59 mmol, 58%) da cetona 6 de partida como um óleo e 76,9 mg de (-)-(S)-1-fenilpropanol 10 (0,565 mmol, 7,1%) também como um óleo. Este apresentou $[\alpha]_D^{20} - 37,4^\circ$ (c. 8,0, Et_2O). O valor encontrado na literatura é $[\alpha]_D^{20} + 34,8^\circ$ (c. 8,0 Et_2O) (R)^[6] e não especifica o grau de pureza. RMN¹H (80 MHz, CCl_4) δ 0,8 (t, 3H, J=8,0 Hz, CH_3), 1,6 (m, 2H, CH_2), 2,3 (br s, 1H, OH), 4,4 (t, 1H, J=6,0 Hz, CH) e 7,2 (s, 5H, Ph); IV (filme) 3370, 3040, 2960, 1490, 1455, 755 e 700 cm^{-1} ; EM m/z (%) 136 (M^+ , 11), 108 (21), 107 (93), 79 (100) e 77 (60).

MÉTODO B - Partiu-se de 1g (7,45 mmol) de 6 e deixou-se reagir por 72 horas. Após cromatografia recuperou-se 210 mg (1,57 mmol, 21%) da cetona 6 de partida como um óleo e 267 mg do álcool 10 (1,96 mmol, 26%) também como um óleo. Este apresentou $[\alpha]_D^{20} - 28,9^\circ$ (c.

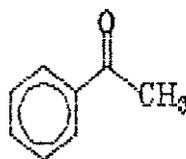
8,1, Et_2O). O valor encontrado na literatura é $[\alpha]_D^{20} + 34,8^\circ$ (c. 8,0 Et_2O) (R)^[6] e não especifica o grau de pureza. O composto 10 foi caracterizado como no método A.

III.9 - REDUÇÃO DA α -BROMOPROPIOFENONA 14



MÉTODO A - Partiu-se de 1,08 g (5,07 mmol) de α -bromopropiufenona 14 e deixou-se reagir por 96 horas. Após cromatografia isolou-se traços de produtos laterais não desejados, não se isolou a bromidrina 15 esperada e o composto de partida não foi recuperado.

III.10 - ESTUDO DA REDUÇÃO DA ACETOFENONA 5 COM A VARIACÃO DA CONCENTRAÇÃO DE AÇÚCAR



III.10.1 - REDUÇÃO DE 5 PELO MÉTODO A SEM A ADIÇÃO DE SULFATO DE ZINCO (açúcar(g) / fermento(g) = 0,48)

Partiu-se de 551 mg (4,59 mmol) de 5 e deixou-se reagir por 48 horas. Isolou-se 275 mg (2,29 mmol, 50%) da cetona 5 de partida e 120 mg de (-)-(S)-1-feniletanol 9 (0,982 mmol, 21%). Este último apresentou $[\alpha]_D^{25} -40,8^\circ$ (c. 7,2, C_6H_6) com 82% de rendimento óptico^[4] e foi caracterizado como em III.4 - método A.

III.10.2 - REDUÇÃO DE 5 PELO MÉTODO B, PORÉM COM A ADIÇÃO DE 10% DE CARBOIDRATO (açúcar(g) / fermento(g) = 0,03)

Partiu-se de 515 mg (4,29 mmol) de 5 e deixou-se reagir

por 48 horas. Isolou-se 168 mg (1,40 mmol, 33%) da cetona 5 de partida e 215 mg do álcool 9 (1,76 mmol, 41%). Este último apresentou $[\alpha]_D^{25} -42,9^\circ$ (c. 7,2, C_6H_6) com 87% de rendimento óptico^[4] e foi caracterizado como em III.4 - método A.

III.10.3 - REDUÇÃO DE 5 PELO MÉTODO B, PORÉM COM A ADIÇÃO DE 1% DE CARBOIDRATO (açúcar(g) / fermento(g) = 0,003)

Partiu-se de 516 mg (4,29 mmol) de 5 e deixou-se reagir por 48 horas. Isolou-se 316 mg do álcool 9 (2,59 mmol, 60%). Este último apresentou $[\alpha]_D^{25} - 6,69^\circ$ (c. 7,2, C_6H_6) com 13,5% de rendimento óptico^[4] e foi caracterizado como em III.4 - método A.

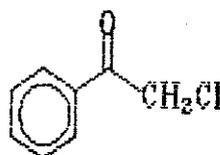
III.10.4 - REDUÇÃO DE 5 PELO MÉTODO B, PORÉM COM A ADIÇÃO DE 5,3% DE CARBOIDRATO (açúcar(g) / fermento(g) = 0,015)

Partiu-se de 529 mg (4,40 mmol) de 5 e deixou-se reagir por 48 horas. Isolou-se 60,8 mg (0,506 mmol, 11,5%) da cetona 5 de partida e 256 mg do álcool 9 (2,10 mmol, 48%). Este último apresentou $[\alpha]_D^{25} -45,2^\circ$ (c. 7,2, C_6H_6) com 91% de rendimento óptico^[4] e foi caracterizado como em III.4 - método A.

III.10.5 - REDUÇÃO DE 5 PELO MÉTODO B, PORÉM COM A ADIÇÃO DE 5,3% DE CARBOIDRATO E ETANOL
(açúcar(g) / fermento(g) = 0,015)

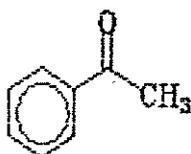
Partiu-se de 526 mg (4,38 mmol) de 5 e deixou-se reagir por 48 horas. Isolou-se 118 mg (0,982 mmol, 22%) da cetona 5 de partida e 241 mg do álcool 9 (1,97 mmol, 45%). Este último apresentou $[\alpha]_D^{25} -31,2^\circ$ (c. 7,2, C_6H_6) com 63% de rendimento óptico^[4] e foi caracterizado como em III.4 - método A.

III.11 - REDUÇÃO DA α -CLOROACETOFENONA 3 PELO MÉTODO B, PORÉM COM A ADIÇÃO DE 5,3% DE CARBOIDRATO
(açúcar(g) / fermento(g) = 0,015)



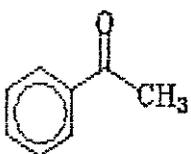
Partiu-se de 531 mg (3,43 mmol) de 3 e deixou-se reagir por 24 horas. Isolou-se 319 mg de (-)-(R)-2-cloro-1-feniletanol 7 (2,04 mmol, 59%). Este apresentou $[\alpha]_D^{25} -28,1^\circ$ (c. 1,7, C_6H_{12}) com 58% de rendimento óptico^[5] e foi caracterizado como em III.5 - método A.

III.12 - ESTUDO DA VARIACÃO DO pH AO LONGO DA REDUÇÃO DA ACETOFENONA 5 COM FERMENTO DE PÃO PARA TODAS AS REAÇÕES EM III.4 E III.10



Preparou-se todos os meios de reação para a cetona 5 em escala reduzida e mediu-se o pH ao longo da redução por 48 horas. Os resultados estão tabelados no capítulo II - p.63.

III.13 - ESTUDO DA REDUÇÃO DA ACETOFENONA 5, PELO MÉTODO B, COM O pH CONTROLADO



III.13.1 - REDUÇÃO DE 5 À pH = 3,0

Partiu-se de 1,01 g (8,41 mmol) de 5 e deixou-se reagir por 13 horas. Durante a reação, através da adição de HCl (1N), foi mantido pH = 3. Isolou-se 453 mg (3,77 mmol, 45%) da cetona 5 de partida e 157 mg de (-)-(S)-1-feniletanol 9 (1,29 mmol, 15%). Este último apresentou $[\alpha]_D^{25} - 41,1^\circ$ (c. 7,2, C_6H_6) com 83% de rendimento óptico^[4] e foi caracterizado como em III.4 - método A.

III.13.2 - REDUÇÃO DE 5 À pH = 4,5

Partiu-se de 1,00 g (8,32 mmol) de 5 e deixou-se reagir

por 13 horas. Durante a reação, através da adição de HCl (1N) ou NaOH (1N), foi mantido pH = 4,5. Isolou-se 264 mg (2,20 mmol, 26%) da cetona 5 de partida e 305 mg do álcool 9 (2,50 mmol, 30%). Este último apresentou $[\alpha]_D^{25} - 6,89^\circ$ (c. 7,1, C_6H_6) com 14% de rendimento óptico^[4] e foi caracterizado como em III.4 - método A.

III.13.3 - REDUÇÃO DE 5 À pH = 6,0

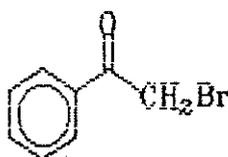
Partiu-se de 1,05 g (8,74 mmol) de 5 e deixou-se reagir por 13 horas. Durante a reação, através da adição de NaOH (1N), foi mantido pH = 6,0. Isolou-se 286 mg (2,38 mmol, 27%) da cetona 5 de partida e 263 mg do álcool 9 (2,15 mmol, 25%). Este último apresentou $[\alpha]_D^{25} - 42,6^\circ$ (c. 7,1, C_6H_6) com 86% de rendimento óptico^[4] e foi caracterizado como em III.4 - método A.

III.13.4 - REDUÇÃO DE 5 À pH = 8,0

Partiu-se de 1,07 g (8,91 mmol) de 5 e deixou-se reagir por 13 horas. Durante a reação, através da adição de NaOH (1N), foi mantido pH = 8,0. Isolou-se 179 mg (1,50 mmol, 17%) da cetona 5 de partida e 251 mg de (+)-(R)-1-feniletanol 16 (2,05 mmol, 23%). Este último apresentou $[\alpha]_D^{25} + 4,05^\circ$ (c. 7,2, C_6H_6) com 8% de rendimento óptico^[4] e foi caracterizado como em III.4 - método A.

Observação: durante a extração da massa bruta foi observado a formação de uma grande quantidade de emulsão. Esta foi parcialmente quebrada através da adição de metanol ao sistema.^[7]

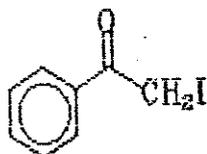
III.14 - REDUÇÃO DA α -BROMOACETOFENONA 4 / PLASMÓLISE



MÉTODO B - Partiu-se de 1,04 g (5,22 mmol) de 4 e deixou-se reagir

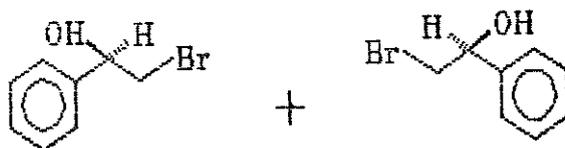
por 24 horas. Antes da extração do meio reacional foi feita a plasmólise adicionando-se uma solução de NaHCO_3 (1,68 g, 20,0 mmol) em água (100 ml). Deixou-se agitando por 16 horas. Após cromatografia isolou-se 122 mg de (-)-(R)-2-bromo-1-feniletanol 8 (0,607 mmol, 12%) como um óleo. Este apresentou $[\alpha]_D^{25} - 29,2^\circ$ (c. 2,5, CHCl_3) com 71% de rendimento óptico^[5] e foi caracterizado como em III.6 - método A.

III.15 - REDUÇÃO DA α -IODOACETOFENONA 11 NA PRESENÇA DE m-DINITROBENZENO



MÉTODO B - Juntou-se 1,56 g (6,34 mmol) de 11 e 218 mg de m-dinitrobenzeno (1,30 mmol). Após 24 horas isolou-se 69,9 mg (0,582 mmol, 9,2%) de acetofenona e 229 mg de (-)-(R)-2-iodo-1-feniletanol 13 (0,923 mmol, 15%) como um óleo. Este último apresentou $[\alpha]_D^{25} - 34,0^\circ$ (c. 2,4, CHCl_3). O valor encontrado na literatura é $[\alpha]_D^{20} +36,3^\circ$ (c. 5,29, CHCl_3) (S).^[6] RMN^1H (80 MHz, CCl_4) δ 2,5 (br s, 1H, OH), 3,25 (dd, 1H, J=8 e 12 Hz, CH_2), 3,45 (dd, 1H, J=4,4 e 12 Hz, CH_2), 4,7 (dd, 1H, J=4,4 e 8 Hz, CH) e 7,25 (s, 5H, Ph). IV (filme) 3380, 3020, 2960, 1490, 760 e 700 cm^{-1} . EM m/z (%) 248 (M^+ , 14), 121 (100), 107 (98), 77 (96) e 43 (56).

III.16 - ESTABILIDADE DO 2-BROMO-1-FENILETANOL NA SUSPENSÃO DE FERMENTO DE PÃO



Adicionou-se 1,00 g de bromidrina racêmica (4,97 mmol) à suspensão de fermento de pão (método B), e deixou-se reagir por

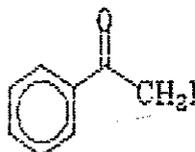
24 horas. Após a extração do meio reacional em extrator líquido - líquido, recuperou-se 979 mg da bromidrina de partida (4,87 mmol, 98%)

III.17 - SÍNTESE DA 2-BROMO-1-FENILETANOL RACÊMICA⁽⁹⁾



Em um balão de fundo redondo (25ml) fez-se uma solução de α -bromoacetofenona (2,07 g, 10,4 mmol) em metanol (7ml). Gotejou-se lentamente uma solução de 107 mg (2,83 mmol) de NaBH_4 em uma mistura de metanol / hidróxido de sódio (0,2 N, 1 ml). Deixou-se reagir por 5 horas sob agitação magnética. Acidificou-se com ácido clorídrico (3N) até pH 4 e evaporou-se o metanol. Extraíu-se com éter, secou-se com sulfato de sódio anidro e evaporou-se o solvente. Obteve-se 1,91 g de bromidrina racêmica (9,50 mmol, 91%). Este foi caracterizado como em III.6 - método A.

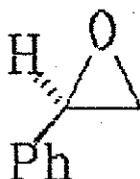
III.18 - SÍNTESE DA α -IODOACETOFENONA 11⁽¹⁰⁾



Em um balão de fundo redondo (flambado) adicionou-se 5,00 g de α -cloroacetofenona (32,3 mmol) e 5,18 g de iodeto de sódio (34,6 mmol), previamente seco em estufa por 2 horas, em acetona anidra (50 ml). Adaptou-se à boca do balão um tubo secante com cloreto de cálcio. Deixou-se reagir por 4 horas sob agitação magnética e sob proteção da luz. Adicionou-se éter e lavou-se o meio reacional duas vezes com solução aquosa de tiosulfato de sódio. O produto foi extraído com cloreto de metileno e seco com sulfato de magnésio. Obteve-se 7,53 g de 11 (30,6 mmol, 95%).

RMN¹H (80 MHz, CCl₄) δ 4,2 (s, 2H, CH₂) e 7,7 (m, 5H, Ph). IV (filme) 3050, 2950, 2920, 1670, 1270, 740, 690 e 580 cm⁻¹.

III.19 - SÍNTESE DO ÓXIDO DE ESTIRENO A PARTIR DA IODOIDRINA OBTIDA NO EXPERIMENTO RELATADO NO ITEM III.15^[11]



Em um balão de fundo redondo adicionou-se 11 ml de NaOH aquoso (2M). Após estabilizar a temperatura em 22°C, juntou-se 200 mg (0,806 mmol) de iodoidrina em 0,8 ml de éter etílico. Deixou-se sob agitação magnética durante 1 hora. Em seguida saturou-se o meio reacional com sulfato de sódio e extraiu-se com pentano (3 X 5 ml). Isolou-se 63,3 mg de óxido de estireno (0,527 mmol, 65%). Este apresentou $[\alpha]_D^{25} + 38,8^\circ$ (c. 3,1, C₈H₈) com 87% de rendimento óptico^[5]. RMN¹H (60 MHz, CCl₄) δ 2,75 (dd, 1H, J=3 e 6 Hz, CH₂), 3,10 (dd, 1H, J=4 e 6 Hz, CH₂), 3,85 (dd, 1H, J=3 e 4 Hz, CH) e 7,40 (s, 5H, Ph). Este espectro confere com o obtido por M. Marques.^[12]

III.20 - BIBLIOGRAFIA

- [11] D. Seebach, M. A. Sutter, R. H. Weber and M. F. Züger; *Org. Synth* 63, 1 (1985).
- [12] M. Bucciarelli, A. Forni, I. Moretti and G. Torre; *Synthesis*, 897 (1983).
- [13] K. Nakamura, K. Ushio, S. Oka and A. Ohno; *Tetrahedron Lett.* 25, 3979 (1984).
- [14] R. MacLeod, H. Prosser, L. Fikentscher, J. Lanyi and H. S. Mosher; *Biochemistry* 3, 838 (1964).

- [5] M. Imuta, K.-i. Kawai and H. Ziffer; *J. Org. Chem.* 45, 3352 (1980).
- [6] S. Colona and R. Fornasier; *J. Chem. Soc. Perkin Trans 1*, 371 (1978).
- [7] D. Seebach, M. A. Sutter, R. H. Weber and M. F. Züger; *Org. Synth. Colletive Vol. VII*, 215 (1990).
- [8] K. Soai, T. Yamanoi and H. Hikima; *J. Organomet.. Chem.* 290, C23 (1985).
- [9] S. W. Chaikin and W. G. Brown; *J. Am. Chem. Soc.* 71, 122 (1949).
- [10] D. J. Pasto and K. Garves; *J. Org. Chem.* 32, 778 (1967).
- [11] E. J. Corey, S. Shibata and R. K. Bakshi; *J. Org. Chem.* 53, 2861 (1988).
- [12] M. Marques; "Síntese de (R) - (-)-Ariletanolaminas via Redução Microbiológica utilizando-se Fermento de Pão na Criação de um Centro Quiral", Tese de Mestrado - UNICAMP, 1990.

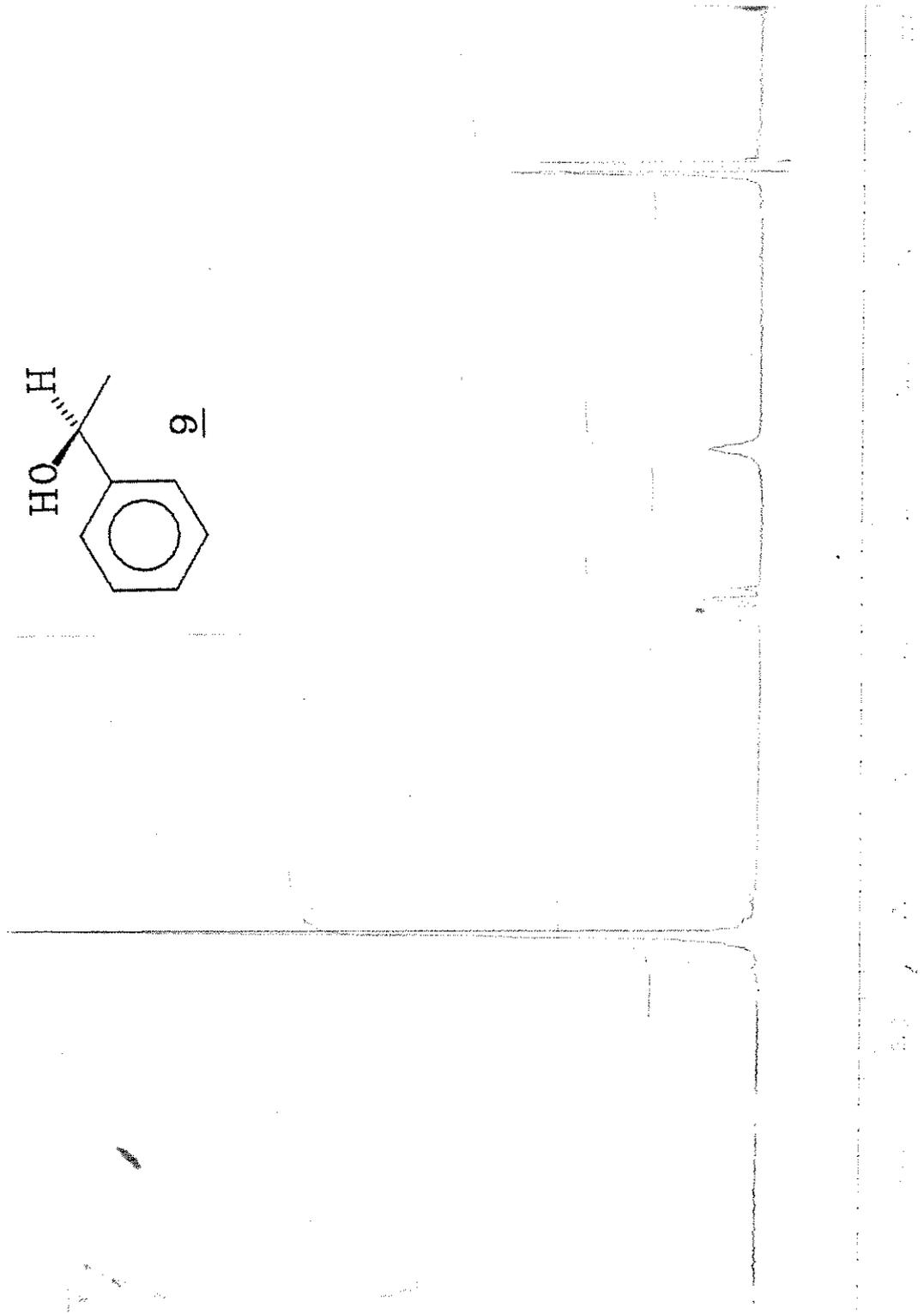
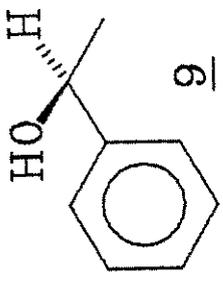
ESPECTROS

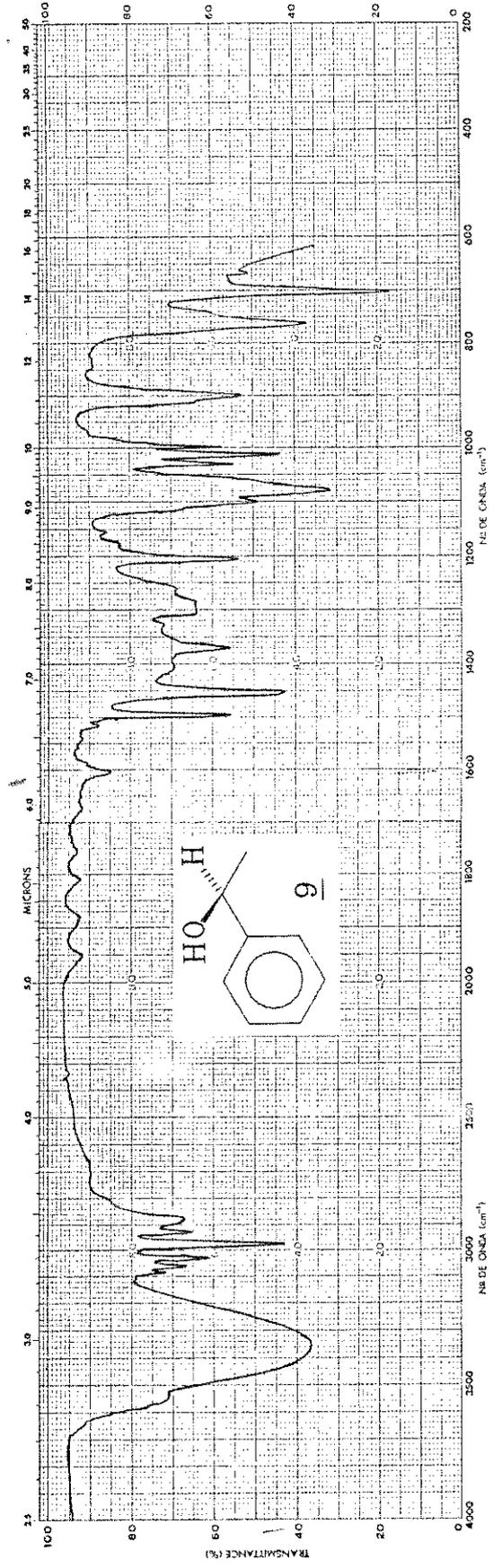
SCHEM 64-80

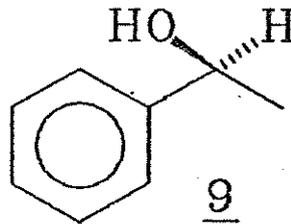
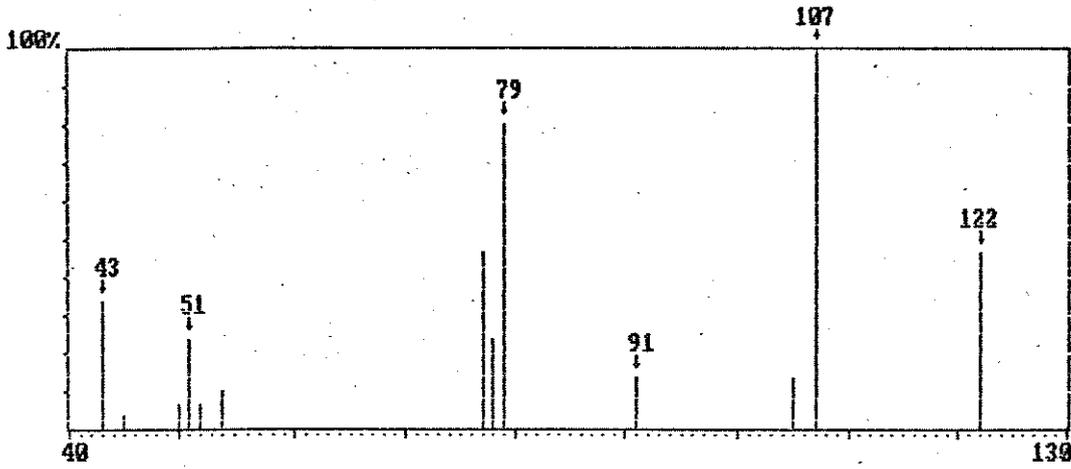
DATE 05-16-52

RECEIVED

250.0
 200.0
 150.0
 100.0
 50.0
 0.0







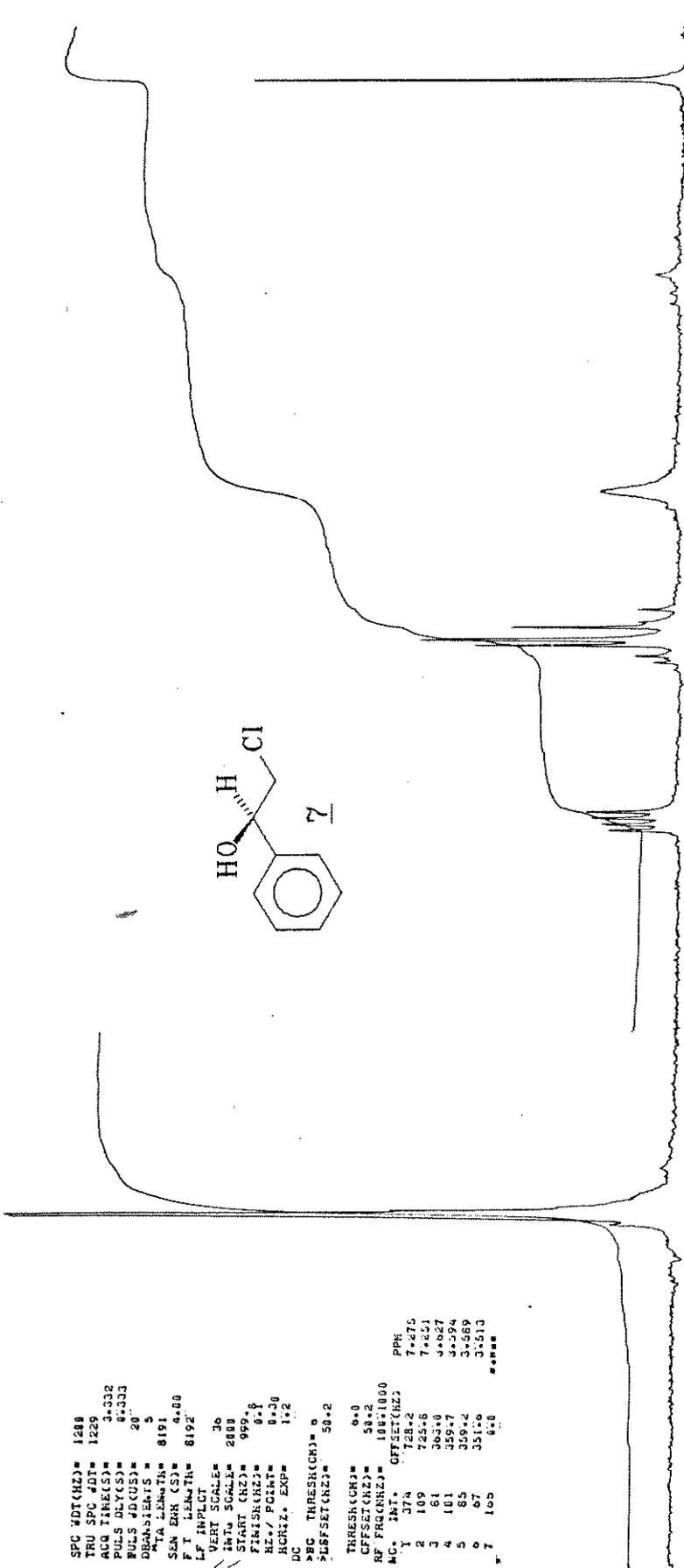
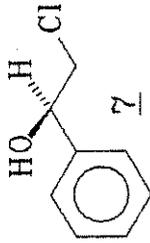
Espectro de Massas

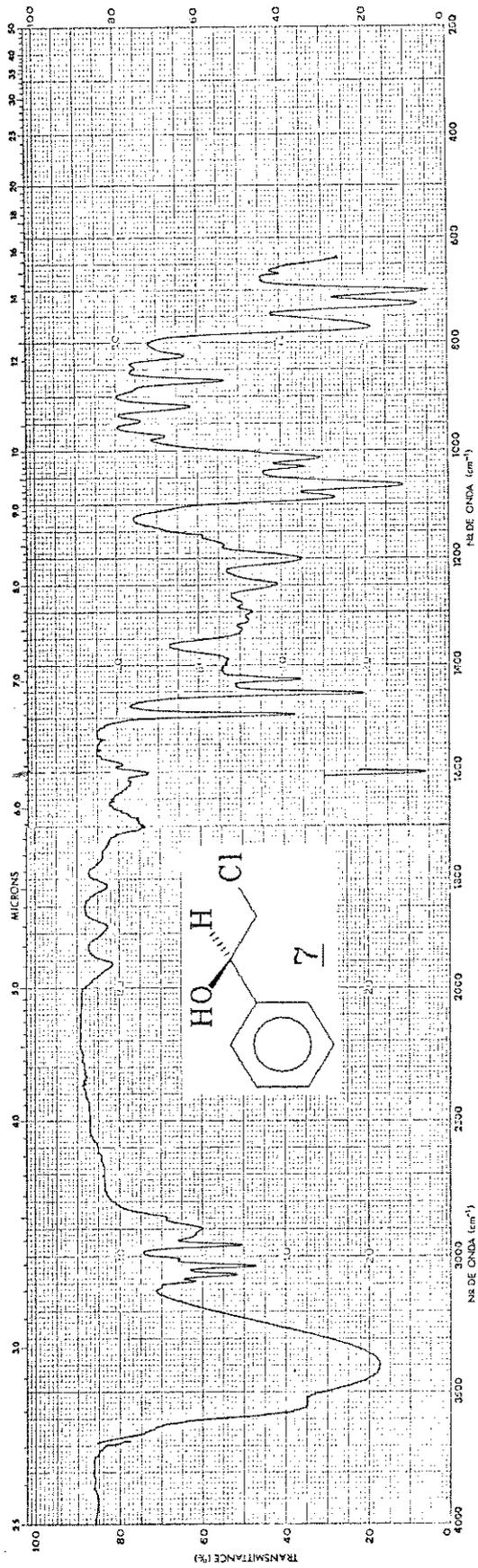
Arquivo:

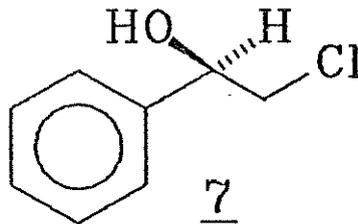
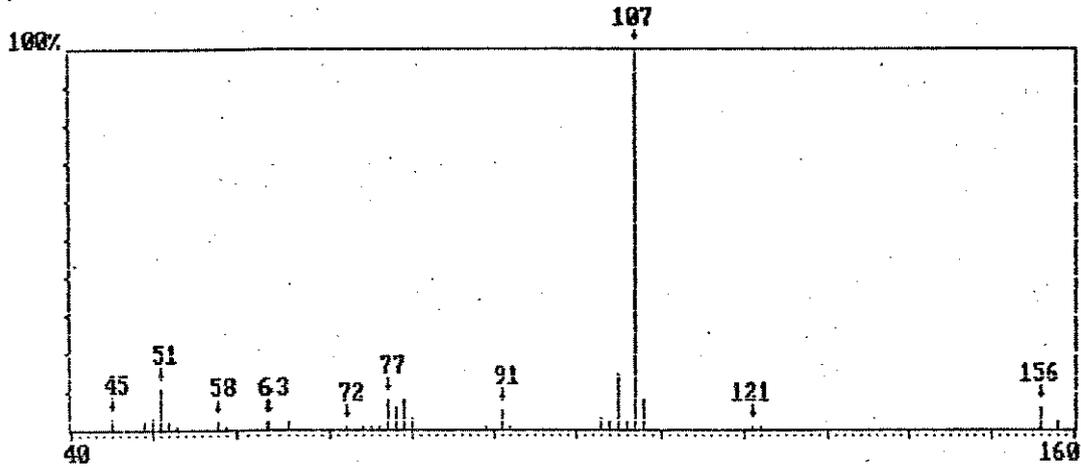
Relacao dos picos

m/z	m/z	Intensidade(%)	m/z	m/z	Intensidade(%)	m/z	m/z	Intensidade(%)
43.00	43.0	33.33	54.00	54.0	10.00	105.00	105.0	13.33
45.00	45.0	3.33	77.00	77.0	46.67	107.00	107.0	100.00
50.00	50.0	6.67	78.00	78.0	23.33	122.00	122.0	46.67
51.00	51.0	23.33	79.00	79.0	80.00			
52.00	52.0	6.67	91.00	91.0	13.33			

SPC WDT(HZ)= 1288
 TRU SPC WDT= 1229
 ACQ TIME(S)= 3.332
 PULS DLY(S)= 0.333
 BULS #DUS)= 20
 DEASIEATS = 5
 VIA LEMATH= 8191
 SEN ERR (CS)= 4.00
 F1 LEATH= 8192
 LF AMPLCT
 VERT SCALE= 30
 H2O SCALE= 2000
 START CRZ)= 999.8
 FIMSKRZ)= 8.8
 REL/ POINT= 0.30
 RCHIZ. EXP= 1.2
 DC THRESH(CM)= 0
 -MS7SET(CRZ)= 50.2
 THRESH(CM)= 0.0
 OFFSET= 58.2
 REF FREQ(CRZ)= 100.1000
 MC. INT. OFFSET(HZ)
 1 178
 2 109
 3 161
 4 101
 5 85
 6 87
 7 165
 PPM
 7.275
 7.551
 4.027
 3.594
 3.569
 3.513
 * * * * *







Espectro de Massas

Arquivo: sete

Relacao dos picos

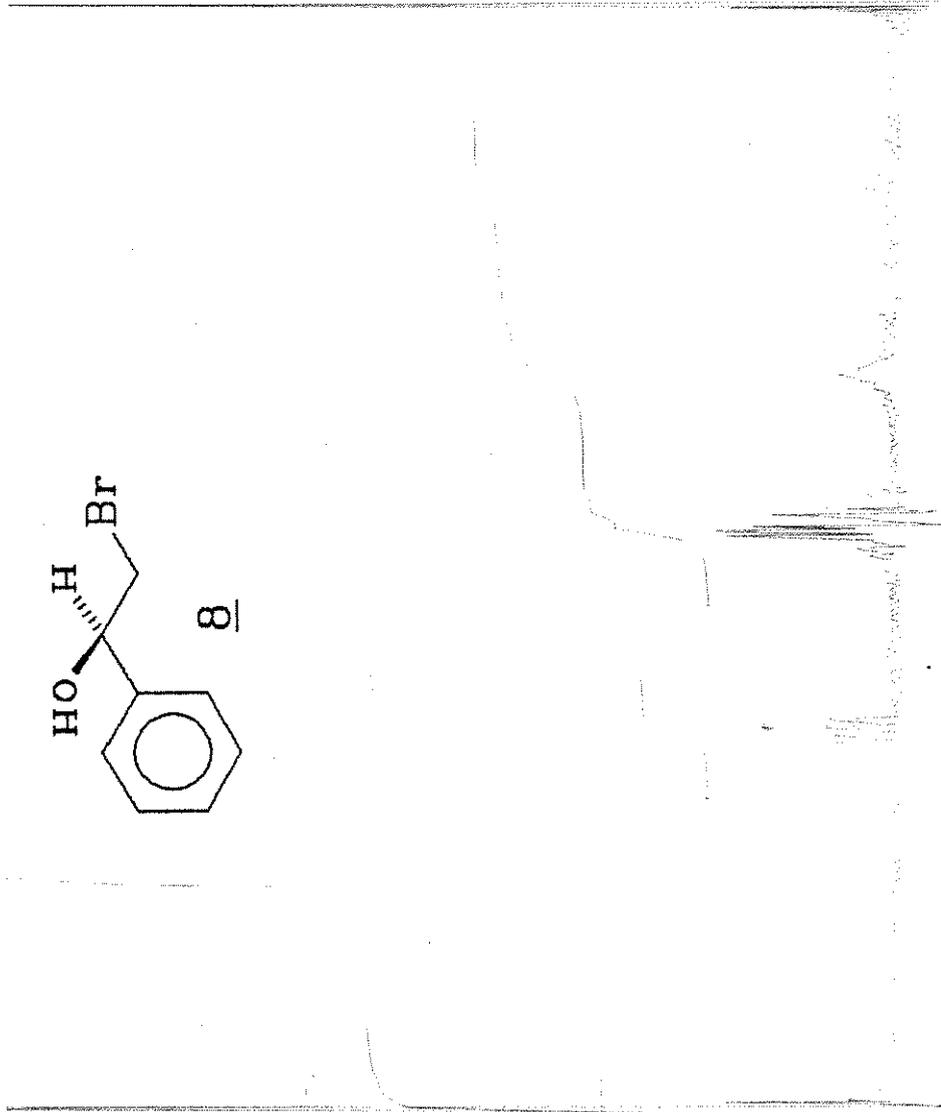
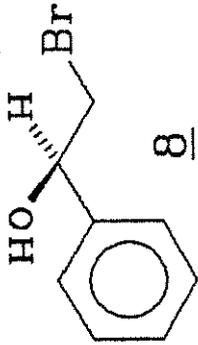
m/z	m/z	Intensidade(em %)	m/z	m/z	Intensidade(em %)	m/z	m/z	Intensidade(em %)
45.00	45.0	3.00	74.00	74.0	0.90	104.00	104.0	2.00
49.00	49.0	2.00	75.00	75.0	1.00	105.00	105.0	14.00
50.00	50.0	3.00	76.00	76.0	1.00	106.00	106.0	2.00
51.00	51.0	11.00	77.00	77.0	8.00	107.00	107.0	100.00
52.00	52.0	2.00	78.00	78.0	6.00	108.00	108.0	8.00
53.00	53.0	1.00	79.00	79.0	8.00	121.00	121.0	0.70
58.00	58.0	2.00	80.00	80.0	3.00	122.00	122.0	0.50
59.00	59.0	1.00	89.00	89.0	0.90	156.00	156.0	6.00
63.00	63.0	2.00	91.00	91.0	5.00	158.00	158.0	2.00
65.00	65.0	2.00	92.00	92.0	1.00			
72.00	72.0	0.90	103.00	103.0	3.00			

070KEP 04-80

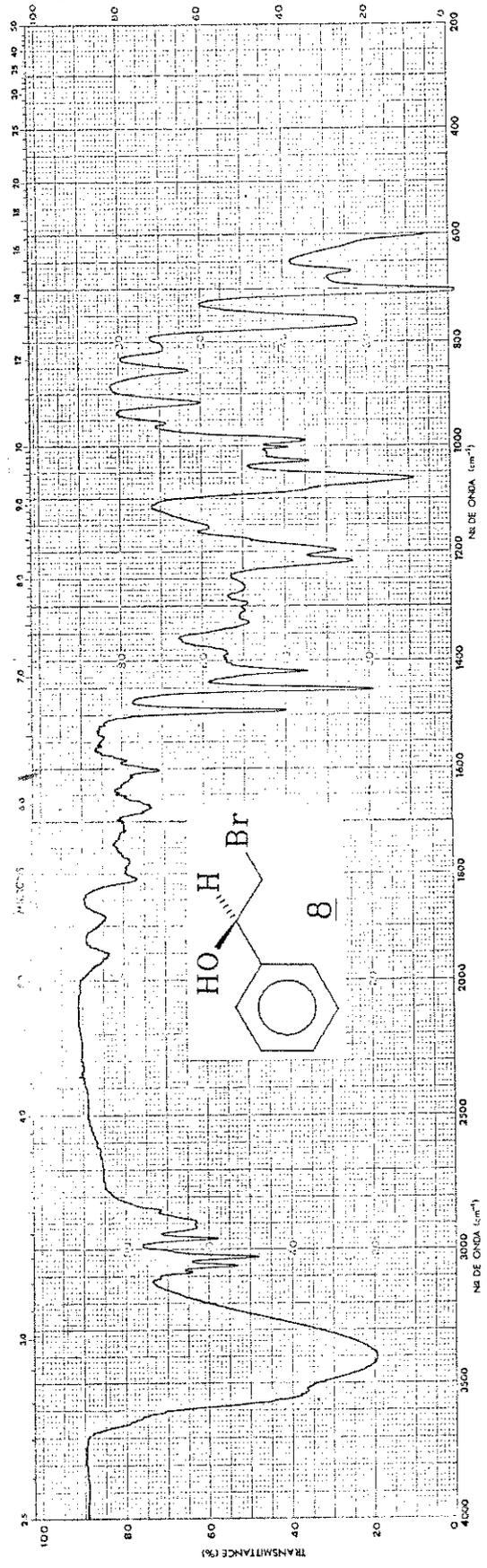
DATE 03-21-80

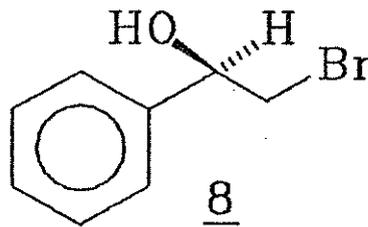
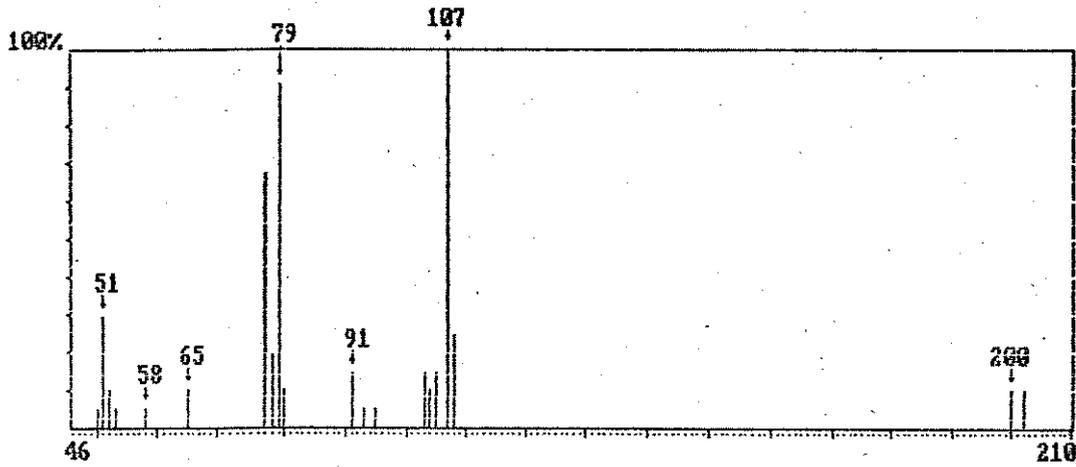
ANALYST
 TIME 350.0 SEC
 070KEP 0343.00
 DATE 03-21-80
 TIME 03:43 PM 03-21-80

1.000
 1.000
 1.000



ANALYST



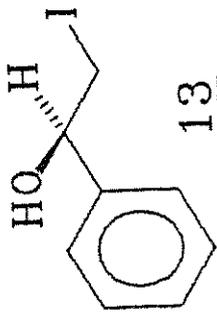


Espectro de Massas

Arquivo: oito

Relacao dos picos

m/z	m/z	Intensidade(em %)	m/z	m/z	Intensidade(em %)	m/z	m/z	Intensidade(em %)
50.00	50.0	5.00	78.00	78.0	19.00	104.00	104.0	10.00
51.00	51.0	29.00	79.00	79.0	91.00	105.00	105.0	14.00
52.00	52.0	10.00	80.00	80.0	10.00	107.00	107.0	100.00
53.00	53.0	5.00	91.00	91.0	14.00	108.00	108.0	24.00
58.00	58.0	5.00	93.00	93.0	5.00	200.00	200.0	10.00
65.00	65.0	10.00	95.00	95.0	5.00	202.00	202.0	10.00
77.00	77.0	67.00	103.00	103.0	14.00			



13

BRUKER 564-89

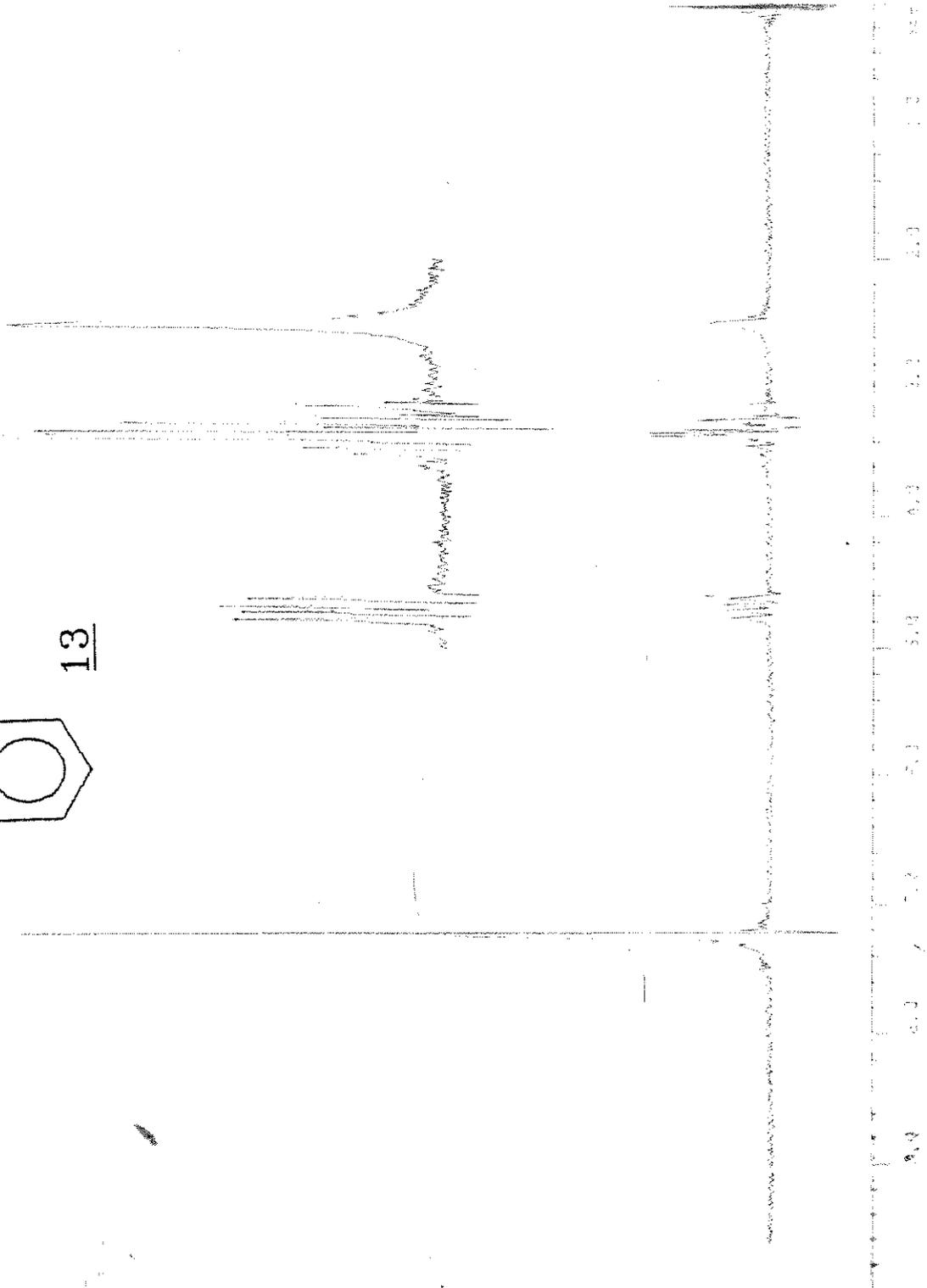
DATE 12-16-99

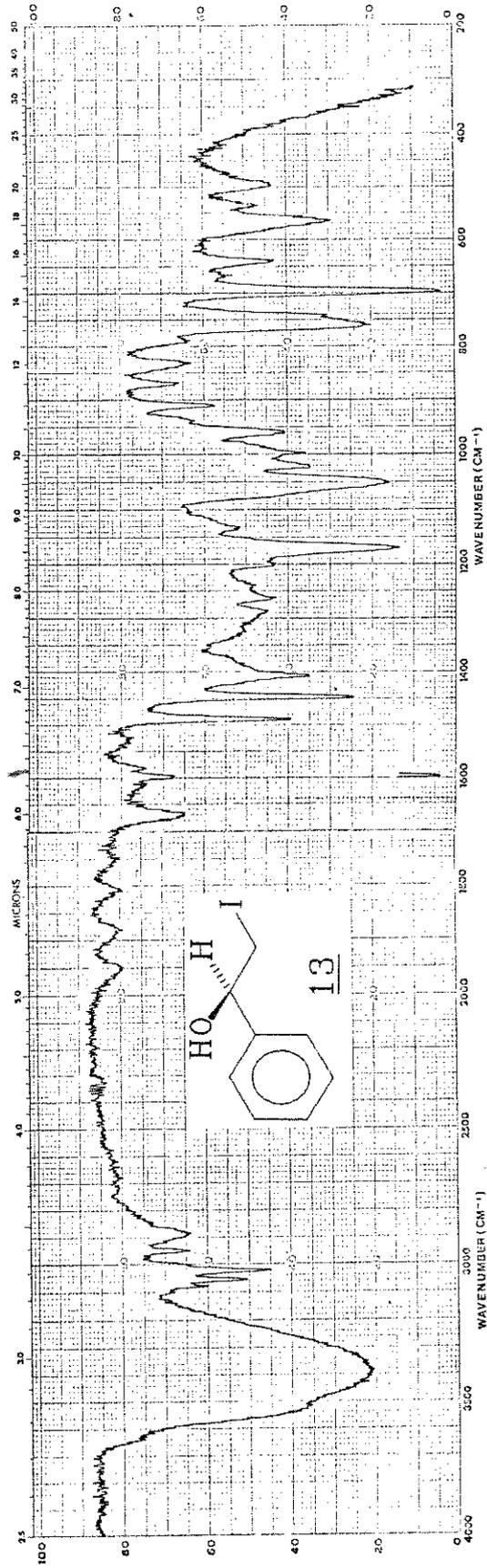
SPECTRUM:

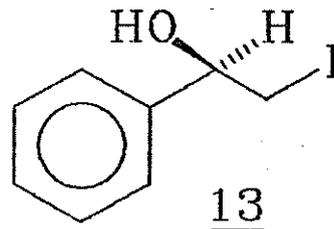
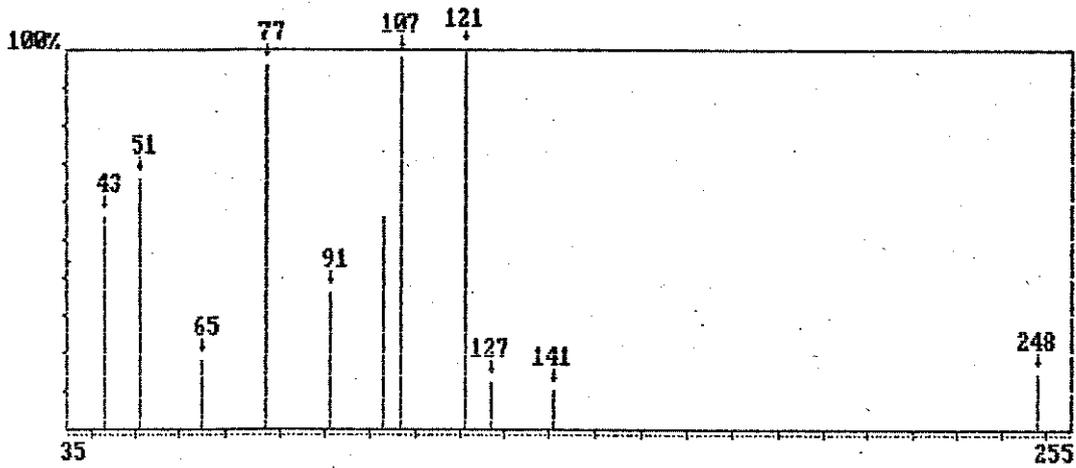
TIME 258.0 SEC
 POWER 19.9 DB
 GAIN 7.4 DB
 LINE WIDTH 0.1 HZ
 SCANS 1

LOCK 48.2 DB
 POWER 27.7 DB
 GAIN

0.00000000







Espectro de Massas

Arquivo: treze

Relacao dos picos

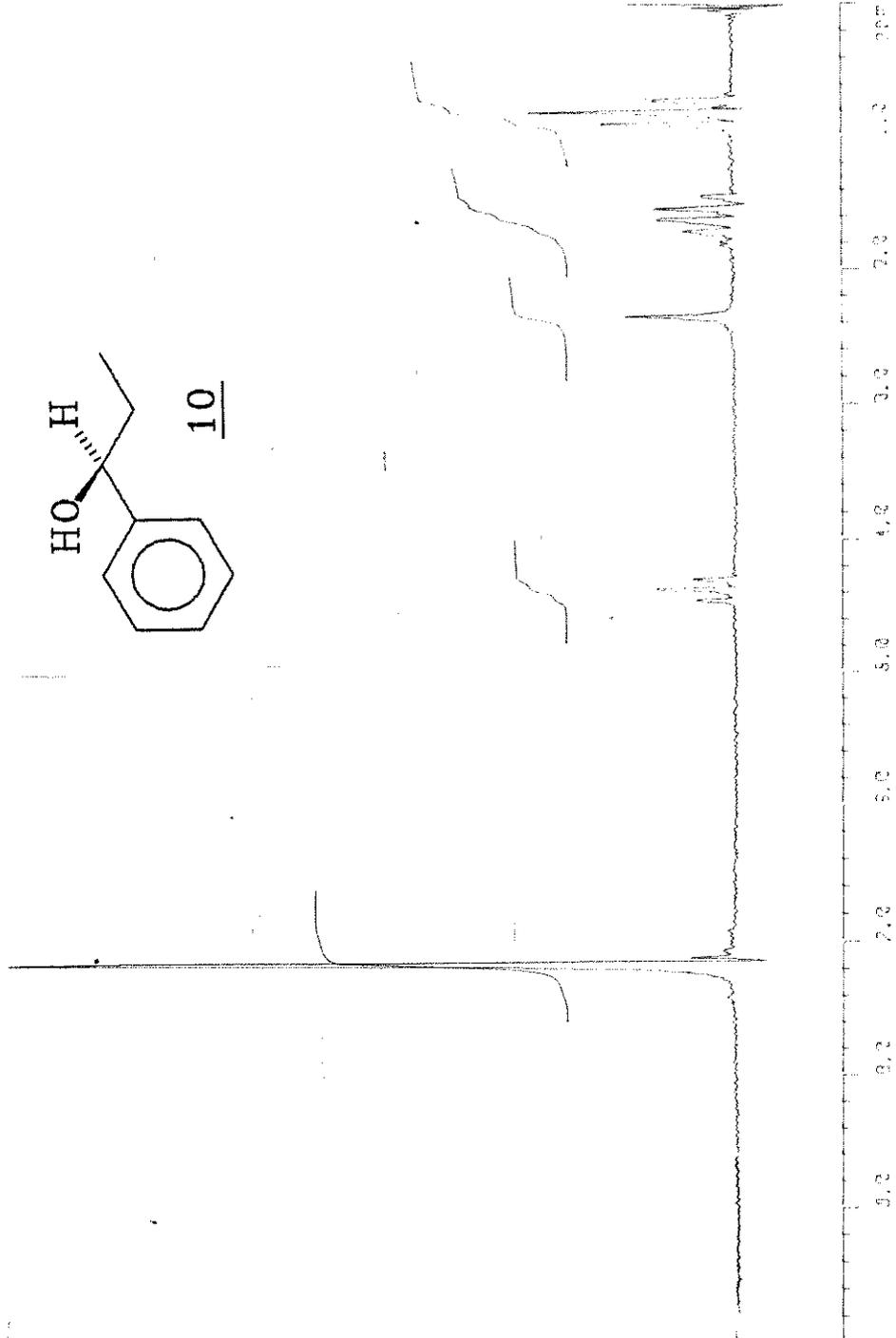
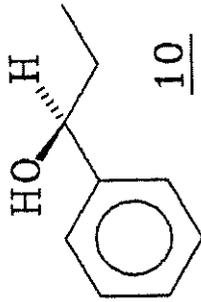
m/z	m/z	Intensidade(em %)	m/z	m/z	Intensidade(em %)	m/z	m/z	Intensidade(em %)
43.00	43.0	56.00	91.00	91.0	36.00	127.00	127.0	12.00
51.00	51.0	66.00	103.00	103.0	56.00	141.00	141.0	10.00
65.00	65.0	18.00	107.00	107.0	98.00	248.00	248.0	14.00
77.00	77.0	96.00	121.00	121.0	100.00			

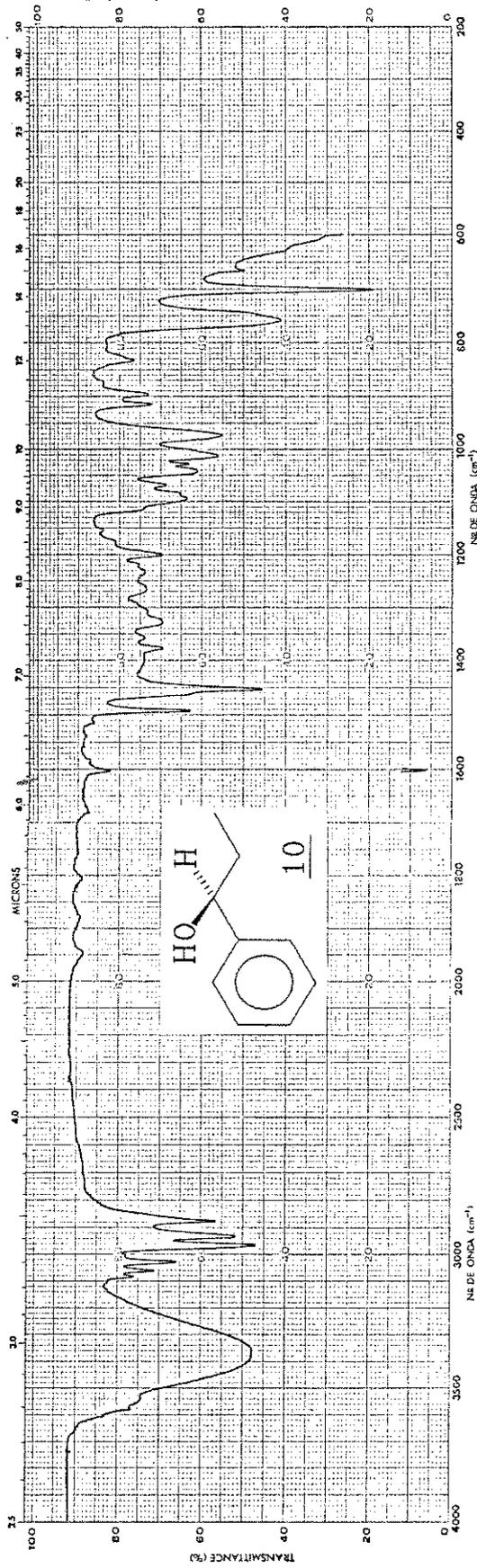
BRUKER AW-80

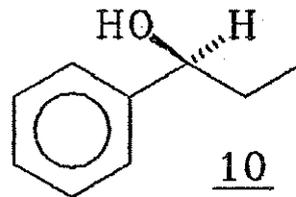
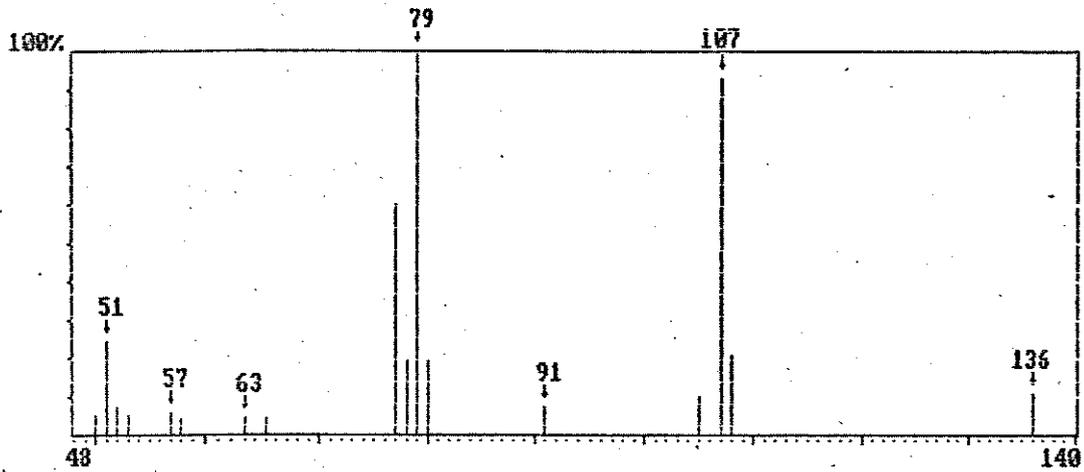
DATE 00-05-88

SPECTRUM:

TIME 250.0 SEC
 POWER 10.0 DB
 PULS 6.0 DB
 LINE BROAD 0.2 HZ
 SCANS 1
 LOCK 48.7 DB
 PULS 14.4 DB







Espectro de Massas

Arquivo: DEZ

Relacao dos picos

m/z	m/z	Intensidade(em %)	m/z	m/z	Intensidade(em %)	m/z	m/z	Intensidade(em %)
50.00	50.0	5.00	63.00	63.0	4.00	91.00	91.0	7.00
51.00	51.0	24.00	65.00	65.0	4.00	105.00	105.0	10.00
52.00	52.0	7.00	77.00	77.0	60.00	107.00	107.0	93.00
53.00	53.0	5.00	78.00	78.0	19.00	108.00	108.0	21.00
57.00	57.0	6.00	79.00	79.0	100.00	136.00	136.0	11.00
58.00	58.0	4.00	80.00	80.0	19.00			

BRUKER AM-80

DATE 01-02-80

SPECTRUM:
TIME 250.0 SEC
POWER 18.0 DB
GAIN 7.0 DB
LINE WIDTH 0.2 HZ
SCANS 1

LOCK
POWER 30.7 DB
GAIN 26.3 DB

43.00 HZ/CM

