



Universidade Estadual de Campinas

Instituto de Química

Departamento de Química Orgânica

**Estudos visando a síntese enantio e
diastereosseletiva de um análogo do resíduo *N*-
terminal de nikkomicinas B**

Tese de Doutorado

Cíntia Duarte de Freitas Milagre

Orientador: Prof. Dr. José Augusto Rosário Rodrigues

Campinas, 10 de abril de 2007.

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE
QUÍMICA DA UNICAMP**

M59s

Milagre, Cíntia Duarte de Freitas.
Estudos visando a síntese enantio e
diastereosseletiva de um análogo do resíduo N-terminal
de nikkomininas B / Cíntia Duarte de Freitas Milagre. --
Campinas, SP: [s.n], 2007.

Orientador: José Augusto Rosário Rodrigues.

Doutorado - Universidade Estadual de Campinas,
Instituto de Química.

1. Biocatálise. 2. *Electrospray*. 3. Beta-cetoéster.
I. Rodrigues, José Augusto Rosário. II. Universidade
Estadual de Campinas. Instituto de Química. III. Título.

Título em inglês: Studies towards enantio and diastereoselective synthesis of N-terminal residue of nikkomycin B analogue

Palavras-chaves em inglês: Biocatalysis, Electrospray, Beta-Ketoester

Área de concentração: Química Orgânica

Titulação: Doutor em Ciências

Banca examinadora: José Augusto Rosário Rodrigues (orientador), Antônio Cláudio Herrera Braga (IQ/UNICAMP), Maria da Graça Nascimento (DQ/UFSC), Leandro Helgueira Andrade (IQ/USP)

Data de defesa: 10/04/2007

Para Humberto
com carinho e admiração

“Os químicos são uma estranha classe de mortais, impelidos por um impulso quase insano a procurar seus prazeres em meio a fumaça e vapor, fuligens e chamas, venenos e pobreza, e no entanto, entre todos esses males, tenho a impressão de viver tão agradavelmente que preferiria morrer a trocar de lugar com o rei da Pérsia”.

Johann Joachim Becher (1667)

“Toda a nossa ciência, comparada com a realidade, é primitiva e infantil e, no entanto é a coisa mais preciosa que temos”.

Albert Einstein (1879 – 1955)

Agradecimentos

Ao Prof. Dr. José Augusto Rosário Rodrigues, pela orientação, incentivo, confiança, amizade e convívio nestes últimos 6 anos.

Ao Instituto de Química e à Universidade Estadual de Campinas, pela oportunidade e infra-estrutura fundamental à realização deste trabalho.

Ao Humberto pelo companheirismo, cumplicidade e carinho que tornaram esta jornada muito mais agradável.

Ao Prof. Dr. Paulo J. S. Moran, pela amizade, colaboração e proveitosas discussões.

Ao Prof. Dr. Marcos N. Eberlin, e os colegas do Laboratório Thomson Leonardo e Liliam pela colaboração.

À Profa. Dra. Anita J. Marsaioli pela amizade e convivência.

Ao Luiz e Marcelo, alunos de IC, pela amizade e preciosa colaboração no trabalho.

A todos os colegas do Lab, professores e funcionários do IQ e CESET pela convivência e colaboração.

À minha família pelo apoio e incentivo em todos os momentos.

À Tila e Bruce pela companhia e o constante ronronar.

À FUNCAMP-UNICAMP pela bolsa de doutorado.

À FAPESP pelo auxílio financeiro.

À FAEPEX pela concessão de auxílio para participação em Congresso no exterior e do Auxílio-Ponte para finalização desta tese.

Curriculum Vitae

Formação Acadêmica / Titulação

- 2003 - 2007** Doutorado em Química.
Universidade Estadual de Campinas, UNICAMP, Campinas, Brasil.
- 2001 - 2003** Mestrado em Química.
Universidade Estadual de Campinas, UNICAMP, Campinas, Brasil.
- 1996 - 2001** Graduação em Farmácia.
Universidade Federal de Minas Gerais, UFMG, Belo Horizonte, Brasil.

Formação Complementar

- 1997 - 2000** **Iniciação Científica.**
Universidade Federal de Minas Gerais, UFMG, Belo Horizonte, Brasil.
Bolsista CNPq e FAPEMIG
- 2002** Programa de Estágio Docente – PED II: **Auxílio à docência**
Universidade Estadual de Campinas, UNICAMP, Campinas, Brasil.
Bolsista da: Universidade Estadual de Campinas / FUNCAMP.
Disciplina: QA213 – Química II (Engenharia de Alimentos)
- 2003 - 2007** Programa Piloto para Instrutores Graduados – **Docência Plena**
Universidade Estadual de Campinas, UNICAMP, Campinas, Brasil.
Bolsista da: Universidade Estadual de Campinas / FUNCAMP.
Disciplinas: **ST108** – Química Aplicada; ST212 – Química Orgânica Aplicada; QG100 – Química; QG102 – Química Experimental I; QG109 – Química Geral Experimental I; QO422 – Química Orgânica II

Co-orientação concluída

- 2004 -2005** Luiz Fernando Castelhana (IC)
Título do Projeto: *Reduções Microbiológicas de Benzoilacetatos*
Bolsista da: Pró-Reitoria de Pesquisa –PRP/UNICAMP, Bolsa SAE

Atividades de Extensão

- 2005/ 1º sem. Vínculo:** Professor (Docência Plena) **Unidade:** CESET – UNICAMP
Curso de Especialização de Gestão de Efluentes Líquidos Industriais
Nível: Pós-Graduação.

Publicações

Milagre, C. D. F.; Milagre, H. M. S.; Rodrigues, J. A. R.; Santos, L. S.; Eberlin, M. N.; Moran, P. J. S.; Lopes, M. L. A.. *Probing the mechanism of direct Mannich-type α -methylenation of ketoesters via electrospray ionization mass spectrometry*, *Journal of Mass Spectrometry*, **2007**, 42, 000-000 (in press, DOI: 10.1002/jms1173)

Milagre, C. D. F.; Milagre, H. M. S.; Rodrigues, J. A. R.; Santana, M. H. A.; Moran, P. J. S. *Asymmetric bioreduction of ethyl 3-halo-2-oxo-4-phenylbutanoate by *Saccharomyces cerevisiae* immobilized in Ca-alginate beads with double gel layer*. *Organic Process Research & Development*, **2006**, 10 (3), 611-617.

Milagre, C. D. F.; Milagre, H. M. S.; Moran, P. J. S.; Rodrigues, J. A. R. *A Highly Enantioselective chemoenzymatic synthesis of syn-3-amino-2-hydroxy esters: key intermediates for taxol side chain and phenylnorstatine*. *Tetrahedron-Asymmetry*, **2005**, 16, 3099-3106.

Milagre, C. D. F.; Milagre, H. M. S.; Rocha, L. L.; Santos, L. S.; Eberlin, M. N.; Rodrigues, J. A. R. *On-line monitoring of bioreductions via membrane introduction mass spectrometry*. *Bioengineering and Biotechnology*, **2005**, 90 (7), 888-892.

Milagre, C. D. F.; Santana, M. H. A.; Moran, P. J. S.; Milagre, H. M. S.; Rodrigues, J. A. R. *Reduction of ethyl benzoylformate using *Saccharomyces cerevisiae* entrapped in alginate fibers with double gel layers in a continuously operated reactor*. *Enzyme and Microbial Technology*, **2005**, 37, 121-125.

Milagre, C. D. F.; Ursini, C. V., Moran, P. J. S., Rodrigues, J. A. R.. *Diastereo- and enantioselective synthesis of a conagenin skeletal amide moiety*. *Tetrahedron Letters*, **2004**, 45, 3579-3582.

Apresentações Orais em Congresso

2004: Biocatálisis y Biotransformaciones – 1er. Encuentro Regional, Montevideo, Uruguay. “*Redução enantiosseletiva do benzoilacetato de etila: triagem, imobilização e estudo cinético dos biocatalizadores*”.

2006: III Workshop de Biocatálise e II Encuentro Regional de Biocatálisis y Biotransformaciones, São Paulo. “*Microbial Reductions of Benzoylacetates*”.

Prêmios

Trabalho premiado como um dos 6 melhores entre 203 trabalhos apresentados 10th BMOS -10th Brazilian Meeting on Organic Synthesis, **2003**, São Pedro, SP, Brasil.

Resumo

Estudos visando a síntese enantio- e diastereosseletiva de um análogo do resíduo *N*-terminal da nikkomicina B

As nikkomicinas são um grupo de antibióticos nucleosídeos dipeptídeos isoladas como metabólitos secundários de culturas de *Streptomyces* sp. Estes compostos são potentes inibidores da quitina sintetase, a enzima que atua na biossíntese da quitina e, exibem atividades fungicidas, inseticidas e acaricidas. Neste trabalho realizamos a síntese enantio- e diastereosseletiva do esqueleto de um análogo do resíduo *N*-terminal da nikkomicina B que contém três centros assimétricos contíguos através de duas rotas lineares distintas. As etapas chave em ambas as rotas consistiram na redução de compostos carbonílicos mediada por microrganismos e na otimização de reações de α -metilenação direta tipo Mannich para a obtenção de compostos carbonílicos α,β -insaturados. Enquanto a rota A gerou exclusivamente o esqueleto com configuração 3*R*,4*R*,5*S* (98% *ee*, 11,5% de rendimento global em 7 etapas), pela rota B obtivemos o esqueleto com configuração 3*R*,4*R*,5*S* e 3*R*,4*S*,5*R* (razão diastereoisomérica 1:12, 98% *ee*, 20% de rendimento global em 6 etapas).

Abstract

Studies towards enantio- and diastereoselective synthesis of the *N*-terminal residue of Nikkomycin B analogue

Nikkomycins are a group of nucleoside dipeptide antibiotics which have been isolated from *Spretpomyces* sp cultures as a secondary metabolites. These compounds are potent chitin synthetase inhibitors and they exhibit fungicidal, insecticidal and acaricidal activities. Herein we developed an enantio- and diastereoselective synthesis of a Nikkomycin B analogue skeletal, which contains three stereogenic centers, through two linear and distinct routes. The key steps in both routes consisted in carbonyl compounds reduction mediated by microorganisms and optimizations of direct Mannich-type α -methylenation reactions in order to obtain α,β -unsaturated carbonyl compounds. While the route A gave exclusively the skeletal with 3*R*,4*R*,5*S* configuration (99% *ee* and 11.5% global yield under 7 steps) the route B gave the skeletal with 3*R*,4*R*,5*S* and 3*R*,4*S*,5*R* configurations (d.r. 1:12, 98% *ee* and 20% global yield under 5 steps).

Sumário

Lista de Abreviaturas	xxi
Lista de Tabelas	xxiii
Lista de Figuras	xxv
Lista de Esquemas	xxvii
1. Introdução	1
2. Objetivos	14
3. Resultados e discussões	16
3.1. Rota A	16
3.1.1. Bioedução de β -hidroxiésteres	17
3.1.2. Proteção do (S)-(-)-3-hidroxi-3-fenilpropanoato de etila, 2a	34
3.1.3. Hidrólise básica do (S)-(-)-3- <i>t</i> -(butildimetilsilil)oxi-3-fenilpropanoato de etila, 3a	35
3.1.4. Homologação da cadeia carbônica do ácido (S)-(-)-3- <i>t</i> -(butildimetilsilil)-oxi-3-fenilpropanóico, 4a	36
3.1.5. Reações de α -Metilenação	39
3.1.6. Redução de (S)-(-)-4- <i>t</i> -(butildimetilsilil)oxi-2-oxo-3-metileno-4-fenilbutanoato de metila, 6a	47
3.1.7. Conclusões Parciais	55
3.2. Rota B	57
3.2.1. Síntese do 2,4-dioxo-fenilbutanoato de etila, 30	58
3.2.2. Bioedução do 2,4-dioxo-fenilbutanoato de etila, 30	59
3.2.3. α -Metilenação de (R)-(-)-2-hidroxi-4-oxo-4-fenilbutanoato de etila, 25	63
3.2.4. Bioedução de (R)-(-)-2-hidroxi-3-metileno-4-oxo-4-fenilbutanoato de etila, 26	64
3.2.5. Redução de 2-hidroxi-3-metil-4-oxo-4-fenilbutanoato de etila, mistura <i>syn/anti</i> - 31	68

3.2.6. Conclusões Parciais	72
4. Considerações finais	74
5. Parte Experimental	76
5.1. Considerações gerais	76
5.2. Procedimento Experimental e Dados Espectroscópicos dos Compostos Sintetizados e Isolados	82
5.2.1. Procedimento geral para redução com NaBH ₄	82
5.2.2. Procedimento geral para triagem de leveduras	84
5.2.3. Procedimento geral de imobilização em alginato de sódio	84
5.2.4. Procedimento geral para determinação do coeficiente de partição alginato – produtos/substratos	85
5.2.5. Procedimento geral para bioredução mediada por células livres de leveduras	85
5.2.6. Procedimento geral para bioredução mediada por células livres de leveduras com adição de glicose	86
5.2.7. Procedimento geral para bioredução mediada por células livres de leveduras com adição de inibidor	86
5.2.8. Procedimento geral para bioredução de 1a em escala multigramas	87
5.2.9. Procedimento geral para determinação de excessos enantioméricos utilizando Eu(hfc) ₃	88
5.2.10. Procedimento geral para a proteção do β-hidroxiéster (<i>S</i>)- 2a com TBS	90
5.2.11. Procedimento geral para hidrólise básica de (<i>S</i>)- 3a	91
5.2.12. Procedimento geral para a síntese do 2-oxoéster (<i>S</i>)- 5a	92
5.2.13. Procedimento geral para α-metilação	94
5.2.14. Procedimento geral para a síntese de 2-oxo-6-metil-hexanoato de etila 23	97
5.2.15. Procedimento geral para obtenção de α-metiléster e α-metilhidroxiéster via hidrogenação com Pd/C.	98
5.2.16. Procedimento geral para desproteção do TBDMS de 8a com HF-py	99

5.2.17. Procedimento geral para obtenção de 30	101
5.2.18. Procedimento geral para bioedução de 30	102
5.2.19. Procedimento geral para α -metilenação de 25	104
5.2.20. Procedimento geral para bioedução de 26 com levedura	105
5.2.21. Procedimento geral para redução de 31 com $n\text{Bu}_4\text{NBH}_4$	106
5.2.22. Procedimento geral para determinação de configuração absoluta com MPA	107
6. Anexos	109
6.1. Lista de Espectros	109

Lista de Abreviaturas

CCD – cromatografia em camada delgada
CCT – Coleção de Culturas Tropical
CG – cromatografia gasosa
CHS1 – isoforma 1 da quitina sintetase
DCC – 1,3-dicicloexilcarbodiimida
DEPT- Distortionless Enhancement by Polarization Transfer
DMAP – 4-dimetilaminopiridina
DMF – *N,N*-dimetilformamida
DSC – cromatografia em sílica seca (dry silicon chromatography)
EDCI – 1-(3-dimetilaminopropil)-3-etilcarbodiimida
ee – excesso enantiomérico
EM – espectrometria de massas
EtOAc- acetato de etila
ESI-MS(/MS) – espectrometria de massas por ionização e reações de massas em cascata
Eu(hfc)₃ – tris[3-heptafluoropropilhidroximetileno]-(+)-canforato de európio III
massa-masa
IV – infravermelho
K_{cat} – constante catalítica
Km – constante de Michaelis-Menten
K_{iS} - constante de inibição pelo substrato
m/z – coeficiente entre carga e massa
MPA – ácido α -metoxifenilacético
ppm – partes por milhão
q.s.p. – quantidade suficiente para
RMN de ¹H – ressonância magnética nuclear de hidrogênio

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

NOESY – Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy

Ta – temperatura ambiente

TBDMSCl – cloreto de *t*-butildimetilsilila

TMS – tetrametilsilano

UDP-*N*-Glc-Nac – uridina difosfato *N*-acetilglicosamina

Lista de Tabelas

Tabela 1. Estrutura de algumas Nikkomicinas.	3
Tabela 2. Triagem de leveduras para a redução de 1a-1c .	21
Tabela 3. Dados de rotação ótica de 2a-c .	22
Tabela 4. Modificações nas condições reacionais na redução de 1a-c .	24
Tabela 5. Dados de rotação ótica de 3a .	35
Tabela 6. Dados de rotação ótica de 4a .	36
Tabela 7. α -Metilenação de α,β , γ -cetoesteres representativos.	46
Tabela 8. Triagem de leveduras para a redução de (<i>S</i>)- 6a .	48
Tabela 9. Dados de RMN de ^1H da mistura <i>syn/anti</i> - 7a .	50
Tabela 10. Dados de RMN de ^1H de 8a .	53
Tabela 11. Dados de RMN de ^1H de 28 .	54
Tabela 12. Redução de 30 mediada por <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .	60
Tabela 13. Dados de rotação ótica de 25 .	63
Tabela 14. Reações de redução microbiológica de (<i>R</i>)- 26 , utilizando diferentes leveduras.	65
Tabela 15. Dados de RMN de ^1H de 31a e 31b	67
Tabela 16. Dados de RMN de ^1H de 39 e 28	71

Lista de Figuras

Figura 1. Estrutura química das Nikkomicinas Z e X.	1
Figura 2. Estrutura básica das Nikkomicinas.	2
Figura 3. a) Representação esquemática e b) Foto por microscopia eletrônica da parede celular de <i>Candida albicans</i> .	5
Figura 4. Estrutura da Anfotericina B e alguns derivados de azóis.	7
Figura 5. Representação esquemática das funções das isoenzimas da quitina sintetase de <i>Candida albicans</i> .	8
Figura 6. Dimorfismo celular da <i>Candida albicans</i> : dependendo da temperatura e disponibilidade nutricional este microrganismo pode crescer e diferenciar-se como levedura, ou fungo (micélio verdadeiro).	8
Figura 7. Características da biocatálise.	10
Figura 8. Número de processos biocatalíticos em escala industrial.	11
Figura 9. Tipos de biocatalizadores utilizados em escala industrial.	11
Figura 10 Fonte de quiralidade dos produtos de biotransformação industrial.	12
Figura 11. Tipos de enzimas usadas em biotransformações industriais.	13
Figura 12. Alguns produtos derivados do bloco quiral (<i>S</i>)-3-hidroxi-3-fenilpropanoato de etila e derivados.	17
Figura 13. Determinação dos excessos enantioméricos por RMN de ^1H com utilização do tris[3-(heptafluoropropilhidroximetileno)-(+)-canforato de európio III, $(\text{Eu}(\text{hfc})_3)$, reagente de deslocamento químico. a) análise ($\pm$)- 2a ; b) análise do (<i>S</i>)- 2a .	22
Figura 14. Caminhos metabólicos utilizados no metabolismo do doador de elétrons para regeneração dos cofatores.	25
Figura 15. Representação das unidades das cadeias poliméricas de alginato.	28
Figura 16. Representação das cadeias poliméricas de alginato.	29

Figura 17. Mecanismos de gelificação do alginato.	30
Figura 18. Concentração de produtos (2a-c) e substratos (1a-c) na fase aquosa pelo tempo (h). Concentração inicial de produtos e reagentes = 2,5 mmol/L.	31
Figura 19. Representação esquemática do perfil de concentração de substrato em um biocatalisador imobilizado em partícula esférica.	32
Figura 20. Projeto do bioreator	33
Figura 21. Foto do reator utilizado para a bio-redução de 1a em escala multigrama.	33
Figura 22. Espectro de ESI(+)-MS para a reação de α -metilenação de 1a em $t=0$ (a) e $t=12$ min (b).	42
Figura 23 Curso da reação de Mannich do benzoilacetato de etila m/z 193(■) com o íon imínio ao longo do tempo para a formação do aduto aldol intermediário m/z 292 (●).	43
Figura 24. ESI(+)-MS/MS dos intermediários 17 de m/z 118, 18 de m/z 100 e 19 de m/z 292.	44

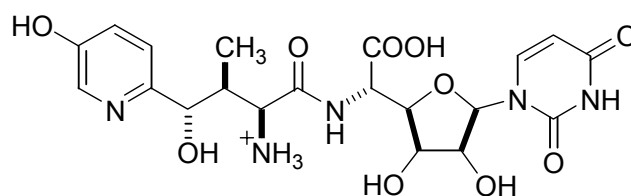
Lista de Esquemas

Esquema 1. Mecanismo de ação das Nikkomicinas.	4
Esquema 2. Análise retrossintética proposta para a obtenção do resíduo <i>N</i> -terminal de análogos da nikkomicina B a partir de β -cetoésteres (rota A).	16
Esquema 3. Representação esquemática simplificada para a bioedução do benzoilacetato de etila 1a e derivados 1b e 1c . A regeneração dos cofatores envolve mais etapas que as mostradas aqui.	18
Esquema 4. Principais reações envolvidas durante a redução de 1a-1c : (i) Redução, (ii) Hidrólise e (iii) Descarboxilação.	19
Esquema 5. Proposta de mecanismo para o aumento da enantiosseletividade na redução assimétrica utilizando células íntegras de leveduras.	27
Esquema 6. Proteção de (<i>S</i>)- 2a utilizando-se <i>t</i> -butildimetilsilício (TBDMS).	34
Esquema 7. Hidrólise básica de (<i>S</i>)- 2a com LiOH.	35
Esquema 8. Homologação da cadeia carbônica de (<i>S</i>)- 4a .	37
Esquema 9. Mecanismo de formação da fosforana 11 .	37
Esquema 10. Proposta de mecanismo para a formação de 2-oxoéster (<i>S</i>)- 5a .	38
Esquema 11. Representação esquemática da α -metilenação direta tipo Mannich do benzoilacetato de etila 1a em um espectrômetro de massas QTrap (e ionização por electrospray).	40
Esquema 12. Proposta para o ciclo catalítico.	45
Esquema 13. Hidrogenação de (<i>S</i>)- 6a catalisada por Pd/C	49
Esquema 14. Hidrogenação de 25 catalisada por Pd/C.	51

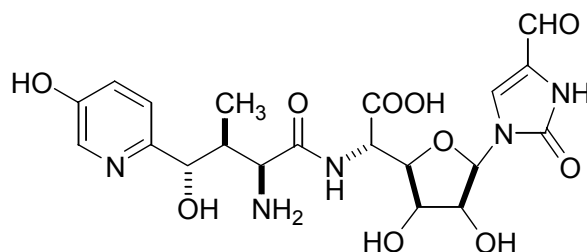
Esquema 15. Possíveis isômeros formados a partir da redução de 7a na forma enólica.	52
Esquema 16. Desproteção de 8a e concomitante lactonização.	54
Esquema 17 Análise retrossintética para a obtenção do resíduo <i>N</i> -terminal de um análogo da nikkomicina B a partir da condensação entre o dietiloxalato e acetofenona (rota B).	57
Esquema 18. Síntese do 2,4-dioxo-fenilbutanoato de etila 31 .	58
Esquema 19. Possíveis enzimas da levedura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> envolvidas nestas etapas: a) álcool desidrogenase, b) piruvato descarboxilase e c) álcool desidrogenase.	61
Esquema 20. Condições de reação para redução de 31	62
Esquema 21. α -metilenação de (<i>R</i>)- 25 .	63
Esquema 22. Redução de (<i>R</i>)- 26 mediada por <i>Rhodotorula glutinis</i> .	67
Esquema 23. Redução de 32 e concomitante lactonização.	69
Esquema 24: Modelo de Cram-quelado	68
Esquema 25. Determinação da configuração relativa de 28 e 39 .	70
Esquema 26. Determinação da configuração absoluta de 39 por RMN de ^1H utilizando (S)-MPA.	71

1. Introdução

As nikkomicinas¹ são uma classe de antibióticos nucleosídeos dipeptídicos isolados como metabólitos secundários de várias culturas de bactérias do gênero *Streptomyces*. Estes compostos foram isolados pela primeira vez em 1972 por König *et al*² como uma mistura de dois isômeros naturais, as nikkomicinas Z e X (Figura 1).



Nikkomicina Z



Nikkomicina X

Figura 1. Estrutura química das Nikkomicinas Z e X.

¹ a) Dahn, U.; Hagenmaier, H.; Höhne, H.; König, W. A.; Wolf, G.; Zähler, H. *Arch. Microbiol.* **1976**, *107*, 143. b) Delzer, J.; Fiedler, H. P.; Muller, H.; Zähler, H.; Rathmann, R.; Ernst, K.; König, W. A. *J. Antibiot.* **1984**, *37*, 80. c) Kobinata, K.; Uramoto, M.; Nishii, M.; Kusakabe, H.; Nakamura, G.; Isono, K. *Agric. Biol. Chem.* **1980**, *44*, 1709.

² Fiedler, H.P.; Kurth, R.; Langhärig, J.; Delzer, J.; Zähler, H. *J. Chem. Tech. Biotechnol.* **1972**, *32*, 271.

Posteriormente, as estruturas de outras nikkomicinas, também isoladas de Streptomicetos, foram divulgadas por este grupo e, atualmente mais de uma dezena delas são conhecidas.³ A estrutura geral das nikkomicinas consiste de duas unidades distintas: (i) um resíduo aminoácido *N*-terminal, e (ii) um resíduo nucleosídeo (Figura 2).

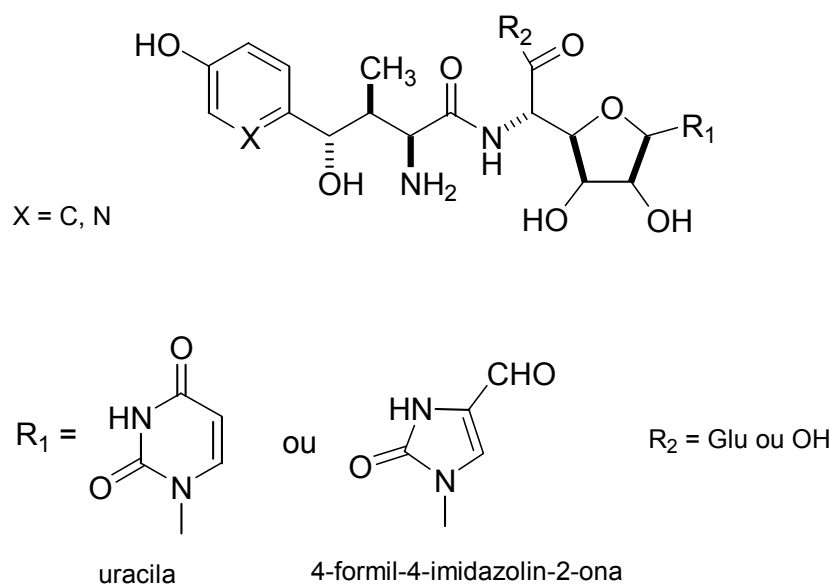
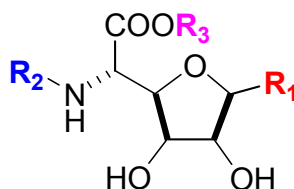


Figura 2. Estrutura básica das Nikkomicinas.

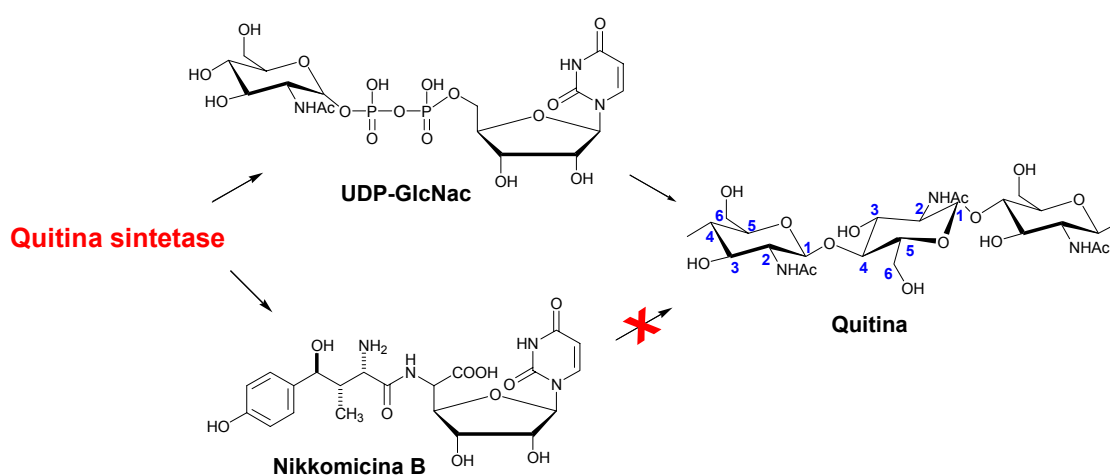
³ a) Lauer, B.; Russwurn, R.; Bormann, C. *Eur. J. Biochem.* **2000**, 267, 1698.

Tabela 1. Estrutura de algumas Nikkomicinas.



Nikkomicina	R ₁	R ₂	R ₃
B			OH
BX			OH
Z			OH
X			OH
J			Glu
I			Glu
N		H	Glu
M		H	Glu
C		H	OH
CX		H	OH

Estes compostos são análogos ao substrato natural uridina difosfato *N*-acetilglicosamina (UDP-*N*-Glc-Nac) e atuam como inibidores competitivos da enzima quitina sintetase⁴ com K_i s de 0,1 - 1 μ M. A quitina sintetase é a enzima responsável pela biossíntese de quitina, um componente essencial da parede celular de fungos, insetos e artrópodes (Esquema 1).



Esquema 1. Mecanismo de ação das Nikkomicinas.

A quitina é um homopolímero linear com ligações β -(1,4) de resíduos *N*-acetilglucosamina (GlcNac), sendo o mais forte entre todos os polímeros biológicos.⁵ Este biopolímero é sintetizado na superfície citoplasmática da membrana plasmática, exsudado perpendicularmente na superfície celular e

⁴ McCarthy, P. J.; Troke, P. F.; Gull, K. J. *Gene. Microbiol.* **1985**, 32, 271.

⁵ Munro, C. A.; Gow, N. A. R. *Medical Mycology* **2001**, 39, Supplement I, 41.

cristalizado no exterior da célula através de inúmeras ligações de hidrogênio antiparalelas gerando α -quitina na forma de microfibrilas (Figura 3).⁶

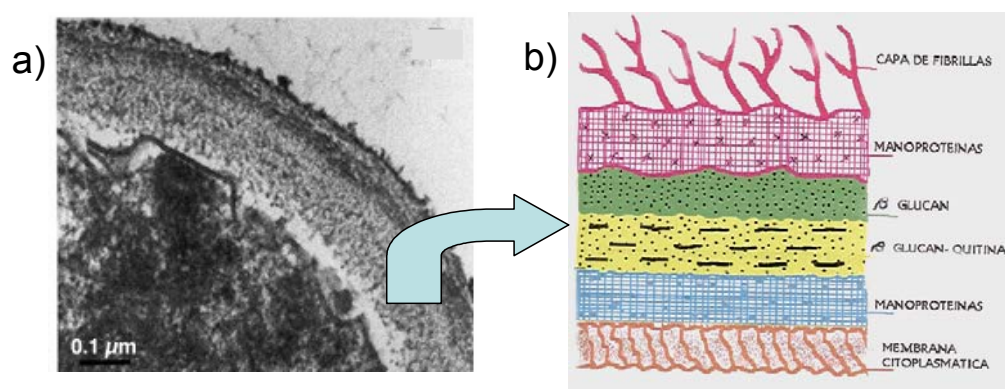


Figura 3. a) Representação esquemática e b) Foto por microscopia eletrônica da parede celular de *Candida albicans*.

Apesar de suas atividades inseticidas e acaricidas, as nikkomicinas têm sido reconhecidas principalmente devido às suas atividades fungicidas em fungos dimórficos e patogênicos para os seres humanos como *Candida albicans*, *Blastomyces dermatitis*, *Coccidioides immitis* e *Histoplasma capsulatum*.⁵ Dentre estes, a *Candida albicans* está entre os mais importantes do ponto de vista clínico por ser um microrganismo oportunista.

As infecções fúngicas oportunistas são responsáveis pela morbidade e mortalidade entre a população com AIDS e imunocomprometida em

⁶ Georgopapadakou, N. H.; Walsh, T. J. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **1996**, 40, 279.

decorrência de quimioterapia contra o câncer e transplantes de órgãos.⁶ O aumento alarmante de indivíduos imunossuprimidos requer o interesse urgente para o desenvolvimento de métodos de diagnóstico rápido e tratamento eficaz destas infecções. Atualmente, a terapia antifúngica consiste primariamente no uso de Anfotericina B (utilizada desde 1956) e derivados de azóis (descobertos no final dos anos 60) (Figura 4). Estes agentes não são ideais uma vez que o tratamento com Anfotericina B está associado a severos efeitos colaterais e os derivados de azóis possuem ação fungistática e não fungicida.⁷ Portanto a terapia empregada atualmente está limitada pela falta de fármacos com toxicidade seletiva, na qual o alvo terapêutico estaria exclusivamente associado com a célula fúngica.

Conseguir fármacos com toxicidade seletiva em se tratando de fungos não é uma tarefa fácil, pois assim como os mamíferos os fungos são seres eucariotos compartilhando entre si várias estruturas celulares e alvos terapêuticos semelhantes. Entretanto, as nikkomicinas mostram-se como uma alternativa extremamente promissora uma vez que a síntese de quitina *per se* não ocorre em vertebrados ou mamíferos,⁸ fazendo com que esta droga apresente toxicidade seletiva e, conseqüentemente melhorando a qualidade de vida das pessoas submetidas a este tratamento pela redução dos efeitos colaterais.

⁷ Debono, M.; Gordee, R. *Annu. Rev. Microbiol.* **1994**, 48, 471.

⁸ Uramoto, M.; Kobinata, K.; Isono, K.; Higashijima, T.; Miyazawa, T.; Jonkins, E. E.; McCloskey, J. A. *Tetrahedron* **1982**, 38, 1599.

A quitina sintetase possui três isoenzimas, ou seja, três enzimas que diferem na sequência de aminoácidos mas que catalizam a mesma reação química.

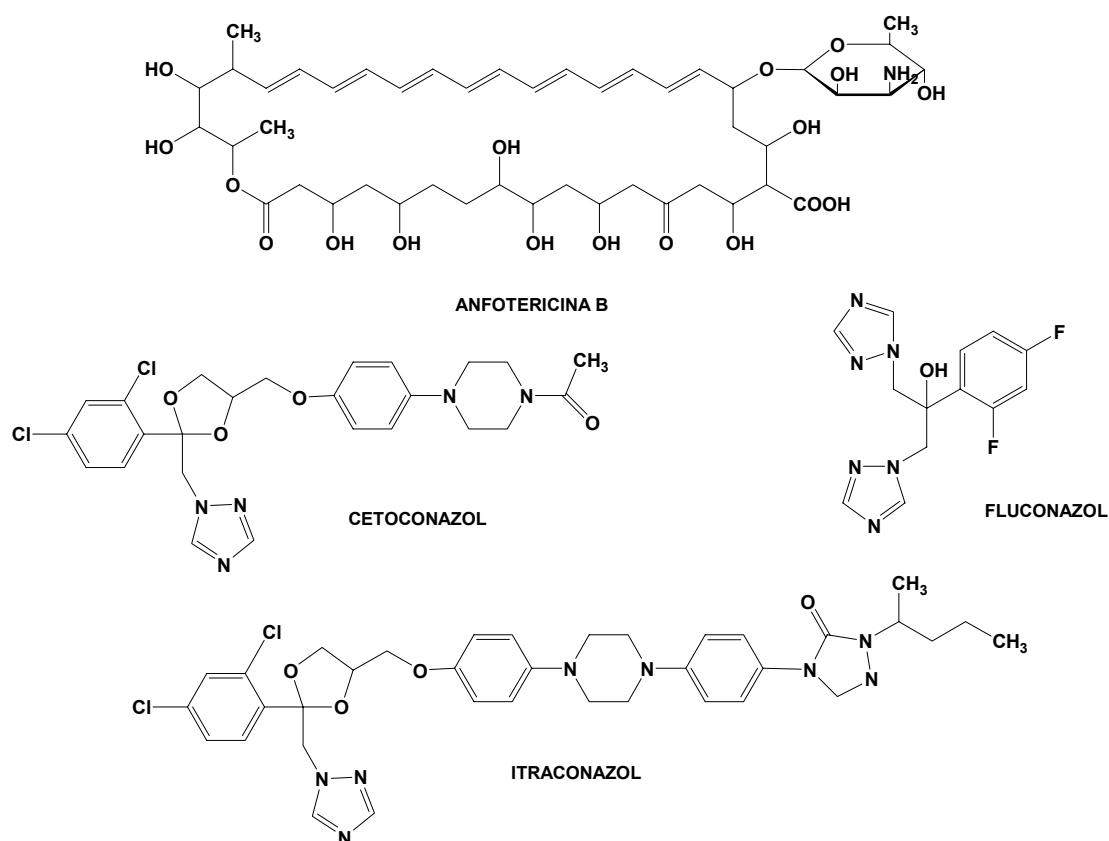


Figura 4. Estrutura da Anfotericina B e alguns derivados de azóis.

O mecanismo de ação das nikkomicinas está relacionado às três isoenzimas da quitina sintetase: (i) *CHS1* que está envolvida nos processos de reparo nos estragos em septos primários e cicatrização do embrião gerado durante a divisão celular, (ii) *CHS2* responsável pela síntese de quitina nos septos primários e (iii) *CHS3* que sintetiza 90% da quitina no processo de cicatrização dos embriões e da parede celular lateral além da quitosana

presente na parede celular dos esporos (Figura 5). Esta inibição na septação e separação dos embriões dos fungos dimórficos leva a célula à morte.⁵

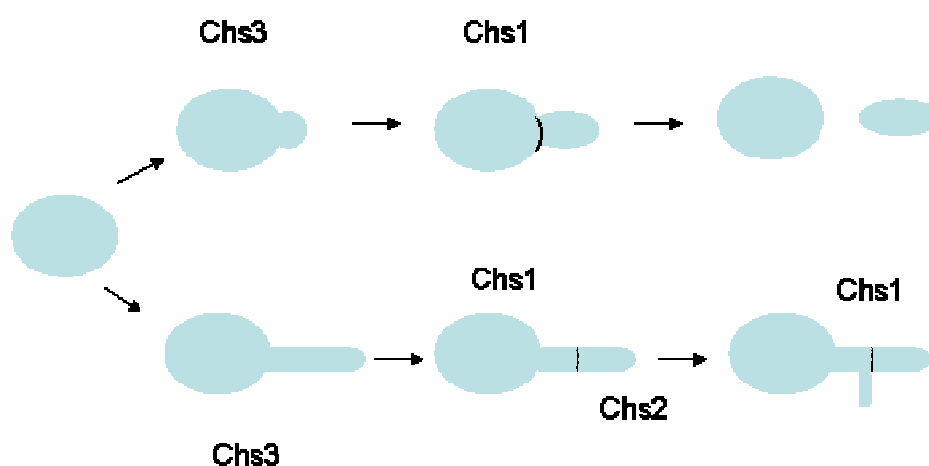


Figura 5. Representação esquemática das funções das isoenzimas da quitina sintetase de *Candida albicans*.

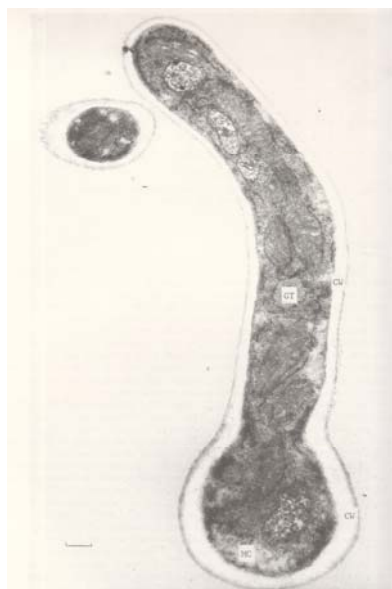


Figura 6. Dimorfismo celular da *Candida albicans*: é a condição na qual este microrganismo pode exibir tanto a forma de levedura quanto de hifa, dependendo das condições do meio de crescimento como temperatura e disponibilidade nutricional.

Tendo em vista a relevância destes compostos, vários métodos de prepará-los tanto na forma racêmica quanto na forma opticamente ativa foram descritos.⁹ Entretanto, a síntese enantiomericamente pura tem sido preconizada pelo FDA (Food and Drug Administration)¹⁰ uma vez que o conhecimento da configuração absoluta do(s) centro(s) estereogênico(s) de uma molécula bioativa, particularmente um fármaco, é indispensável à completa compreensão dos fatores estruturais envolvidos e relacionados com sua atividade. Devido à natureza protéica, os biorreceptores são enantioespecíficos, discriminando antípodas. Dessa forma, os fármacos empregados como misturas racêmicas podem compreender apenas um enantiômero bioativo, denominado eutômero. O outro enantiômero, denominado distômero, pode não apresentar nenhuma atividade relacionada ao eutômero, ou ser reconhecido enantioespecificamente por outro tipo de bioreceptor, apresentando um perfil farmacológico distinto ou propriedades tóxicas.

⁹ a) König, W. A.; Hagenmaier, H.; Keckeisen, A.; Zähler, H. *Liebigs Ann. Chem.* **1979**, 1494. b) König, W. A.; Pfaff, K. P.; Barsch, H. H.; Schmalke, H.; Hagenmaier, H. *Liebigs Ann. Chem.* **1980**, 1728. c) Barret, A. G. M.; Lebold, S. A. *J. Org. Chem.* **1991**, *56*, 4875. d) Akita, H.; Chen, Y. V.; Uchida, K. *Tetrahedron Asymm.* **1995**, *9*, 2131. e) Akita, H.; Takano, Y.; Nedu, K.; Kato, K. *Tetrahedron Asymm.* **2006**, *17*, 1705. f) Hayashi, Y.; Urushima, T.; Shin, M.; Shoji, M. *Tetrahedron*, **2005**, *61*, 11393. g) Bhaket, P.; Stauffer, C. S.; Datta, A. *J. Org. Chem.* **2004**, *69*, 8594. h) Trost, B. M.; Shi, Z. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 3037. i) Kapeller, H.; Griengl, H. *Tetrahedron* **1997**, *53*, 14635. j) Aggarwall, V. K.; Monteiro, N. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. I* **1997**, 2531. k) Dondoni, A.; Franco, S.; Junquera, F.; Merchan, F. L.; Merino, P.; Tejero, T. *J. Org. Chem.* **1997**, *62*, 5497. l) Bloch, R.; Mandville, G.; Ahmar, M. *J. Org. Chem.* **1996**, *61*, 1122. m) Evans, D. A.; Britton, T. C.; Ellman, J. A.; Dorow, R. L. *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 4011. n) Toone, E. J.; Henderson, D. P.; Shelton, M. C.; Cotterill, I. C. *J. Org. Chem.* **1997**, *62*, 7910. o) Merla, B.; Grumbach, H. J.; Risch, N. *Synthesis* **1998**, 1609. p) Ferraris, D.; Young, B.; Cox, C.; Drury, W. J.; Dudding, T.; Lectka, T. *J. Org. Chem.* **1998**, *63*, 6090. q) Palomo, P.; Aizpurua, J. M.; Gracenea, J. J. *J. Org. Chem.* **1999**, *64*, 1693. r) Schaus, J. V.; Jain, N. Panek, J. S. *Tetrahedron* **2000**, *56*, 10263. s) Obi, K.; Uda, J.; Iwase, K.; Sugimoto, O.; Ebisu, H.; Matsuda, A. *Biorg. Med. Chem. Lett.* **2000**, *10*, 1451. t) Mukai, C.; Miyakawa, M.; Hanaoka, M. *Synthesis* **1994**, 165. u) Kapeller, H.; Jary, W. G.; Hayden, W.; Griengl, H. *Tetrahedron Asymm.* **1997**, *8*, 245.

¹⁰ Strauss, U. T.; Felfer, U.; Faber, K. *Tetrahedron Asymmetry* **1999**, *10*, 107.

Aliado às exigências atuais de síntese de moléculas quirais e com o aumento da consciência global da necessidade de preservação dos recursos naturais e respeito por nosso meio ambiente o uso de microrganismos e/ou enzimas isoladas tem-se tornado mais e mais difundido e, em muitos casos os processos químicos industriais têm sido substituídos por processos biocatalíticos.¹¹

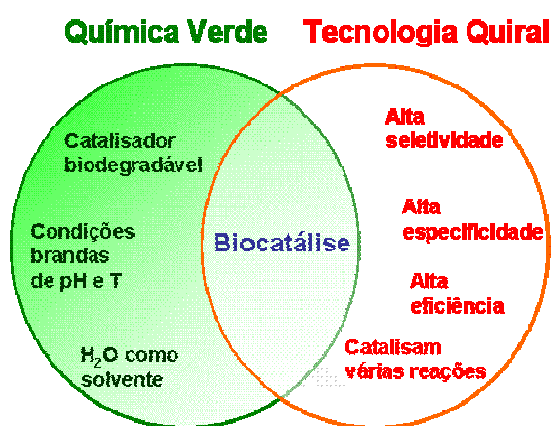


Figura 7. Características da biocatálise.

Vários processos de biotransformação de substâncias orgânicas foram patenteados por indústrias farmacêuticas multinacionais de grande porte, tais como Searle, Upjohn, Schering AG e GBF Braunschewig-Stockheim.¹² Nos últimos anos, um número crescente de livros e artigos de revisão descreve os processos de biotransformação implementados por indústrias, discutindo como esta tecnologia pode ser aplicada em escala industrial.¹³

¹¹ Reymond, J. L. *Enzyme Assays: high throughput screening, genetic selection and fingerprinting*. Wiley-VCH Verlag Gambh & Co. KGaA, Weinheim, Germany, **2006**.

¹² Kulich, K. *Bull. Soc. Chime. France*, **1980**, 1-2, 9.

¹³ a) Cheetham, P. S. J. *Applied Biocatalysis*. Edn 2: Edited by Straathof A. J. J., Adiercreutz P. Amsterdam: Harwood Scientific Publishers; **2000**. b) Liese, A.; Seelbach, K.; Wandrey C. *Industrial*

Consequentemente, o número total de processos de biotransformação que é levado para a escala industrial tem crescido rapidamente com o passar das décadas. Mais de 134 processos empregando tanto enzimas isoladas quanto células microbianas estão sendo comercializadas atualmente como são apresentados nas Figuras 8 e 9.¹⁴

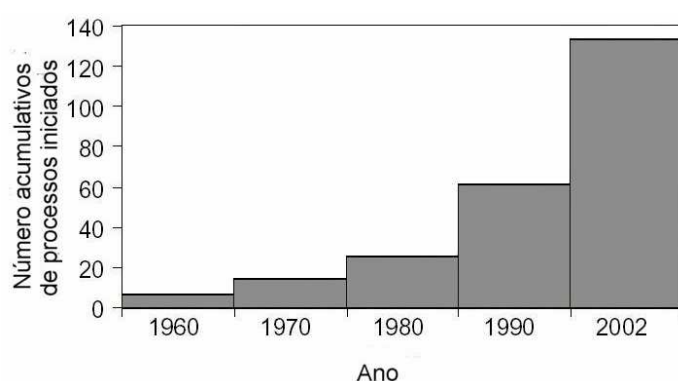


Figura 8. Número de processos biocatalíticos em escala industrial.¹⁴

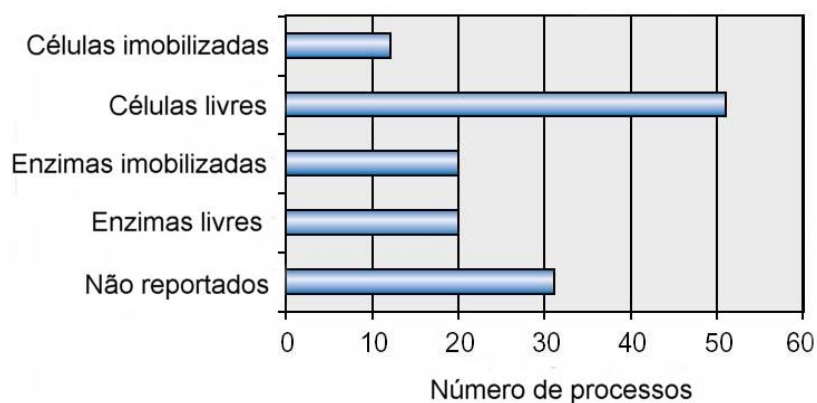


Figura 9. Tipos de biocatalisadores utilizados em escala industrial.¹⁴

Biotransformations. Weinheim, Alemanha: Wiley-VCH: **2000**. c) Faber, K.: *Biotransformations in Organic Chemistry*. Edn 4: Berlin, Alemanha; Springer-Verlag: **2000**. d) Nakamura, K.; Yamanaka, R.; Matsuda, T.; Harada, T. *Tetrahedron: Asym.* **2003**, *14*, 2659. e) Schmid, A.; Dordick, J. S.; Hauer, B.; Kiener, A.; Wubbolts, M.; Witholt, B. *Nature*, **2001**, *409*, 258. f) Zaks, A. *Current Opinion Chem. Biology*. **2001**, *5*, 130.

¹⁴ Straathof, A. J. J.; Panke, S.; Schmid, A. *Current Opinion Biotechnol.* **2002**, *13*, 548.

Os compostos opticamente puros podem ser obtidos de várias maneiras: (i) na grande maioria dos processos industriais a quiralidade é proveniente diretamente do chamado “chiral pool” (aminoácidos, carboidratos, terpenos, alcalóides, etc) no qual estes compostos são transformados por síntese orgânica convencional com retenção ou inversão de configuração levando ao composto desejado opticamente puro, (ii) através da separação de misturas racêmicas por resolução cinética ou recristalização diastereoisomérica e (iii) a partir de síntese assimétrica com a introdução de um centro quiral em um substrato proquiral (Figura 10).

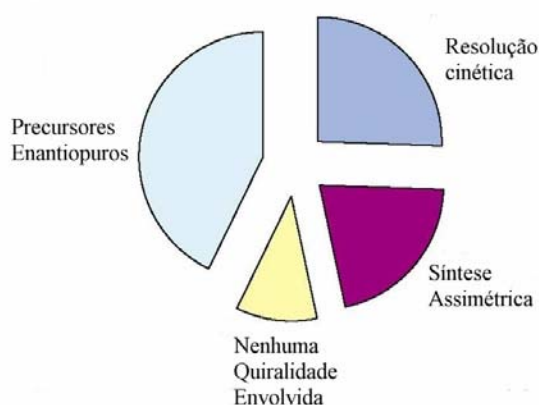


Figura 10 Fonte de quiralidade dos produtos de biotransformação industrial.¹⁴

Dentre estes 134 processos, aproximadamente $\frac{1}{4}$ envolve oxido-redutases (Figura 11).

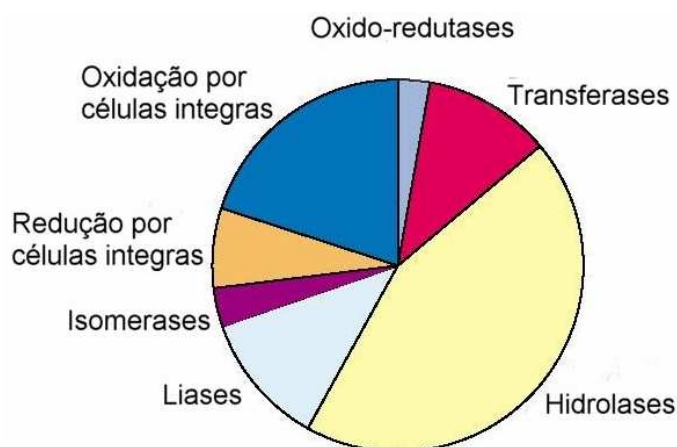


Figura 11. Tipos de enzimas usadas em biotransformações industriais.¹⁴

De maneira geral, os fármacos disponíveis na terapêutica moderna são em sua ampla maioria de origem sintética (cerca de 85%). Se considerarmos ainda aqueles oriundos de processos de semisíntese, como muitos antibióticos obtidos a partir de intermediários homoquiraes, preparados por processos fermentativos, este percentual pode superar os 85% mencionados, em um mercado que em dezembro de 1999 totalizava 354 bilhões de dólares, sendo 13 bilhões a fatia correspondente às vendas de fármacos no Brasil.¹⁵

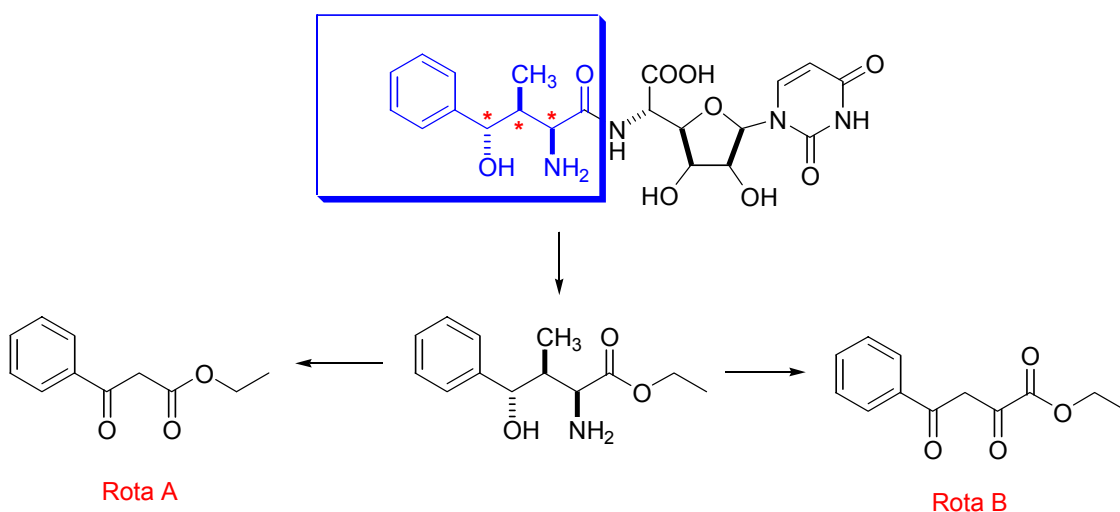
¹⁵ Barreiro, E. J.; Fraga, C. A. M. *Química Medicinal: as bases moleculares de ação dos fármacos*. Artmed Editora, São Paulo, 2002.

2. Objetivos

2.1. Objetivos gerais

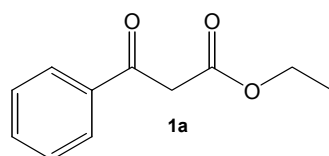
As nikkomicinas têm sido alvo de intensivos estudos em consequência de suas atividades terapêuticas. O resíduo *N*-terminal apresenta três centros estereogênicos consecutivos, um α -amino- β -metil- γ -álcool, e por este motivo sua síntese estereosseletiva apresenta-se como um desafio sintético. Seguindo a tendência atual de incluir pelo menos uma etapa biocatalítica nas rotas sintéticas comerciais, este trabalho tem como objetivo geral:

Realizar um estudo sintético visando obter o resíduo *N*-terminal de um análogo da Nikkomicina B de forma enantio e diastereosseletiva utilizando a biocatálise como ferramenta para a obtenção dos centros estereogênicos através de duas abordagens distintas: Rota A e Rota B.

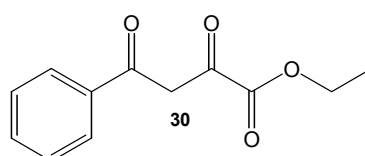


2.2. Objetivos específicos

1) Estudar a redução de α , β e γ -cetoésteres utilizando-se microrganismos da Coleção de Culturas Tropical (CCT) da Fundação André Tosello, além da levedura *Saccharomyces cerevisiae*, disponível comercialmente. Os microrganismos poderão ser utilizados tanto na forma livre quanto imobilizada.

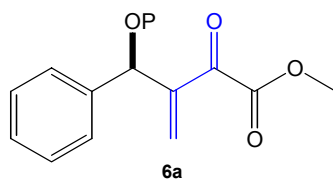


Rota A

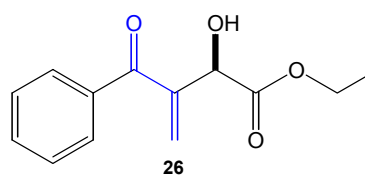


Rota B

2) Aprimorar a metodologia de α -metilenação muito usada no grupo de pesquisa, usando-se uma reação de Mannich com morfolina e formaldeído e estudar a redução dos α -metilenoceto e hidroxiésteres:



Rota A

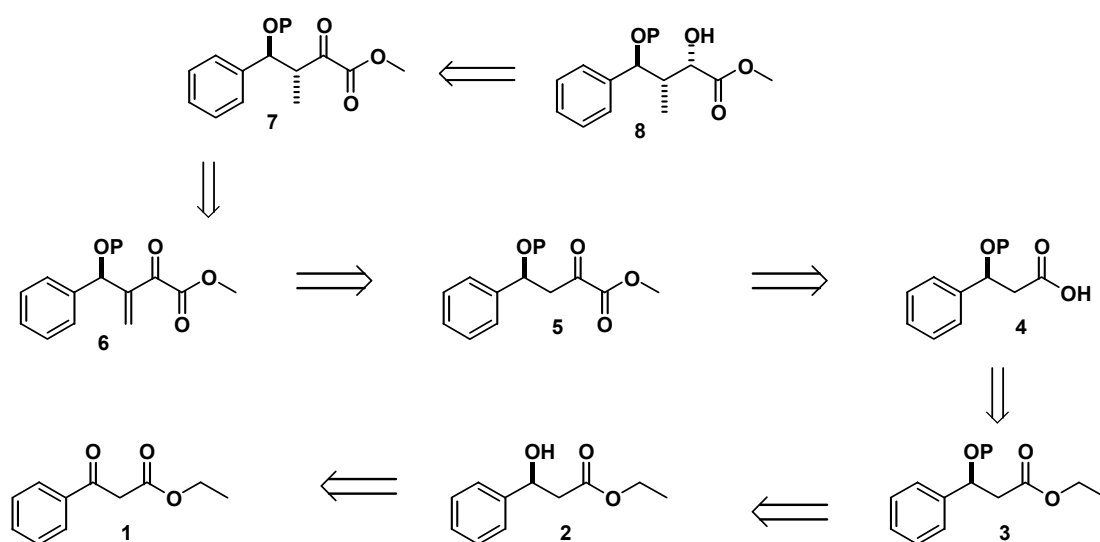


Rota B

3. Resultados e discussões

3.1. Rota A

A análise retrossintética inicialmente proposta para a síntese de um análogo do resíduo *N*-terminal da nikkomicina B (rota A) é mostrada a seguir. O composto **8** seria obtido através de reduções químio e enantiosseletivas a partir do β -metileno- α -cetoéster **6**, que por sua vez originar-se-ia do α -cetoéster **5**. O α -cetoéster **5** seria obtido aplicando-se a metodologia de Wasserman e Ho¹ no β -hidroxiácido **4**, que decorreria de bio-redução do benzoilacetato de etila **1**.



Esquema 2. Análise retrossintética proposta para a obtenção do resíduo *N*-terminal de análogos da nikkomicina B a partir de β -cetoésteres (rota A).

¹ Wasserman, H. H.; Ho, W. B. *J. Org. Chem.* **1994**, 59, 4364.

3.1.1. Bioedução de β -hidroxiésteres

A rota sintética iniciou-se pela bioedução do benzoilacetato de etila **1a**. Aproveitando a disponibilidade dos derivados *p*-nitro e *p*-metoxi-benzoilacetato de etila (**1b** e **1c**, respectivamente) em nosso laboratório e destes serem intermediários chave na síntese de vários compostos com interesses farmacêuticos² (Figura 12), realizamos um estudo comparativo da bioedução de **1a-1c** mediada por células íntegras de microrganismos (Esquema 3).

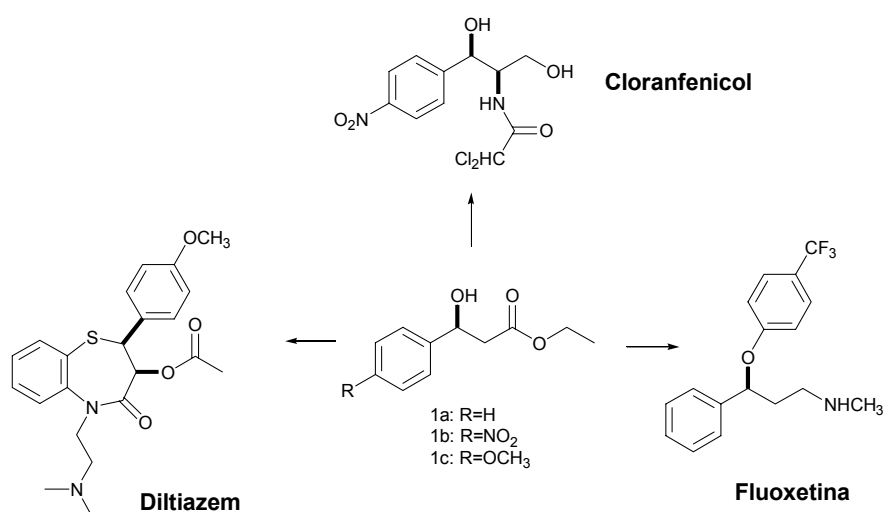
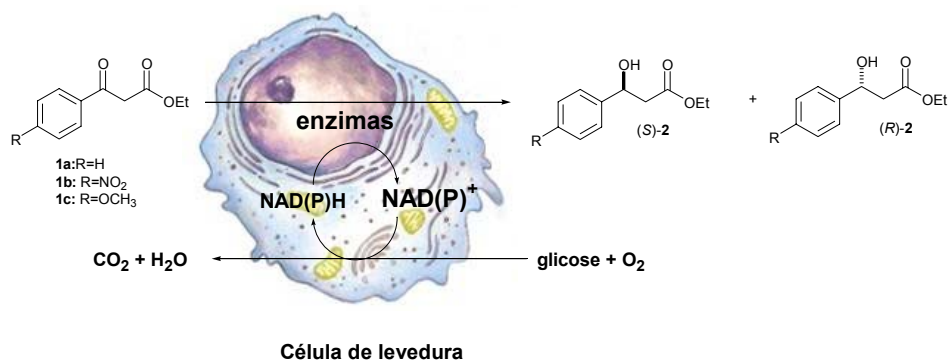


Figura 12. Alguns produtos derivados do bloco quiral (*S*)-3-hidroxi-3-fenilpropanoato de etila e derivados.

² a) Padhi, S. K.; Titu, D.; Pandian, N. G.; Chadha, A. *Tetrahedron* **2006**, 62, 5133. b) Zhang, Z.; Yu, B. *J. Org. Chem.* **2003**, 68, 6309. c) Anand, N.; Kapoor, M.; Koul, S.; Taneja, S. C.; Sharma, R. L.; Qazi, G. N. *Tetrahedron Asymmetry* **2004**, 15, 3131.

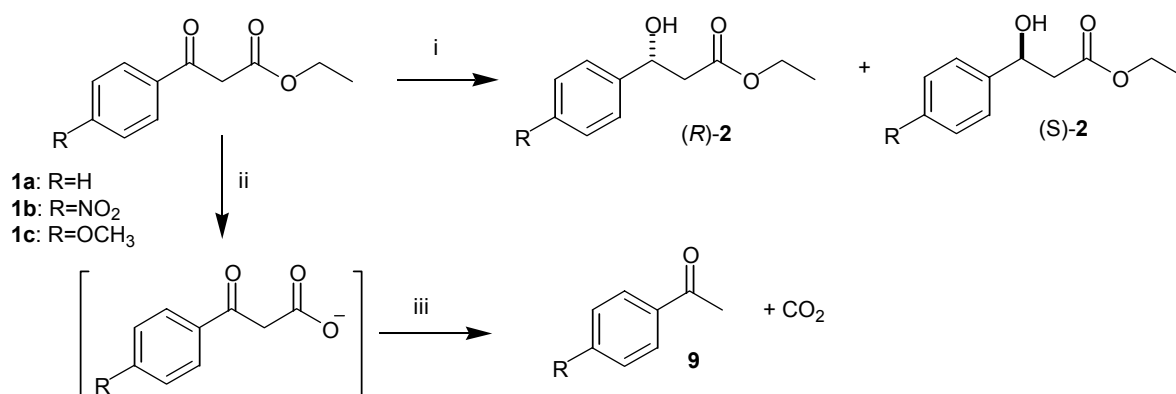


Esquema 3. Representação esquemática simplificada para a bioredução do benzoilacetato de etila **1a** e derivados **1b** e **1c**. A regeneração dos cofatores envolve mais etapas que as mostradas aqui.

A redução enantiosseletiva de β -cetoésteres por microrganismos tem se tornado um método padrão para a síntese de β -hidroxiésteres quirais.³ Porém, os rendimentos descritos na literatura variam de baixo a moderado devido, provavelmente, à degradação do substrato. A formação dos subprodutos indesejados (**9a-c**) na redução de **1a-1c** pode ser racionalizada tanto por competição enzimática,⁴ quanto por decomposição do substrato provocada pelo meio reacional como proposto no Esquema 4.

³ a) Engelking, H.; Pfaller, R.; Wich, G.; Weuster-Botz, D. *Enzyme and Microbial Technology* **2006**, 38, 536. b) Nakamura, K.; Matsuda, T. *Curr. Org. Chem.* **2006**, 10, 1217. c) Ribeiro, J. B.; Ramos, M. C. K. V.; de Aquino Neto, F. R.; Leite, S. G. F.; Antunes, O. A. C. *Catalysis Communications* **2005**, 6, 131. d) Padhi, S. K.; Pandian, N. G.; Chadha, A. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2004**, 29, 25. e) Rodríguez, S.; Kayser, M. M.; Stewart, J. D. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, 123, 1547. f) Chênevert, R.; Fortier, G.; Rhlid, R. B. *Tetrahedron*, **1992**, 48, 6769. g) Bhalerao, U. T.; Chandraprakash, R.; Babu, L.; Fadnavis, N. W. *Synth. Commun.* **1993**, 23, 1201. h) Fadnavis, NW; Bhalerao, UT.; Kumara Vadivel, S. *Tetrahedron Asymmetry* **1997**, 8, 14, 2355. i) Heidlas, I.J; Engel, K.H.; Tressl, R. *Eur. J. Biochem.* **1988**, 172, 633.

⁴ Chin-Joe, I.; Nélisse, P. M.; Straathof, A. J. J.; Pronk, J. T.; Heijnen, J. J. *Biotechnol. Bioeng.* **2000**, 69, 370.



Esquema 4. Principais reações envolvidas durante a redução de **1a-1c**: (i) Redução, (ii) Hidrólise e (iii) Descarboxilação.

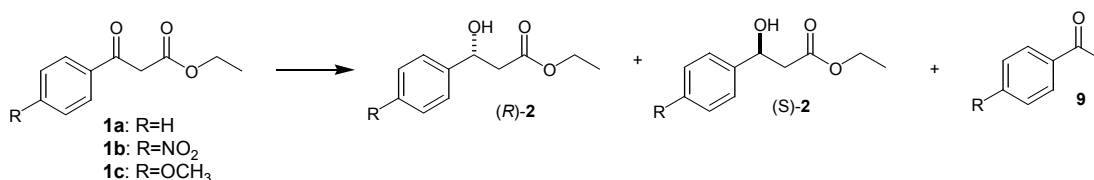
Degradação dos substratos pelo meio reacional

A fim de avaliarmos a estabilidade dos materiais de partida (**1a-1c**) no meio reacional (tampão citrato-fosfato, pH 4,5) foram realizados experimentos controle. A taxa de decomposição pelo meio correspondeu a 20, 32 e 100% para **1a**, **1b** e **1c**, respectivamente em um período de 24 horas. Os únicos subprodutos detectados por CG-EM corresponderam a **9a-9c**. Novos experimentos controle foram realizados em água destilada (pH 6,5) e a taxa de decomposição dos substratos pelo meio diminui em 30%.

Triagem de leveduras

Em seguida foi realizada uma triagem que avaliou o potencial bio redutor de sete leveduras brasileiras da Coleção de Culturas Tropical (CCT) da Fundação André Tosello, para a redução de **1a-1c** e os resultados são apresentados na Tabela 2.

Todas as reações foram realizadas sob condições aeróbias, em água destilada pH 6,5 empregando células livres e sem adição de glicose ou outros doadores de elétrons e acompanhadas por CG-EM. Os excessos enantioméricos foram determinados por RMN de ^1H com utilização do tris[3-(heptafluoropropilhidroximetileno)-(+)-canforato de európio III, ($\text{Eu}(\text{hfc})_3$) como reagente de deslocamento químico na proporção de 1:2 (substrato : $\text{Eu}(\text{hfc})_3$) como apresentado na Figura 13. Os tripletos em 1,50 e 1,63 ppm, ambos com $J=7,3$ Hz, e integrando para 3 hidrogênios cada, referem-se aos H-11 de ($\pm$)-**2a** (Figura 13a). Esta metodologia também foi aplicada para os compostos **2b** e **2c**. As configurações absolutas foram determinadas por medidas de rotação ótica ($[\alpha]_D^{20}$) e comparação destas com a literatura (Tabela 3).¹⁷

Tabela 2. Triagem de leveduras para a redução de **1a-1c**.

Substrato	Leveduras	2		9
		Conversão (%)	<i>ee</i> (%) ^k	Conversão (%)
1a^x	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	60	51	40
	<i>Pichia kluyveri</i> (CCT 3365)	89	66	11
	<i>Pichia stipitis</i> (CCT 2617)	85	60	15
	<i>Pichia canadensis</i> (CCT 2636)	83	62	17
	<i>Rhodotorula minuta</i> (CCT 1751)	13	60	87
	<i>Rhodotorula glutinis</i> (CCT 2182)	10	60	90
	<i>Candida utilis</i> (CCT 3469)	80	59	20
1b^y	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	70	72	30
	<i>Pichia kluyveri</i> (CCT 3365)	97	65	3
	<i>Pichia stipitis</i> (CCT 2617)	98	72	2
	<i>Pichia canadensis</i> (CCT 2636)	98	63	2
	<i>Rhodotorula minuta</i> (CCT 1751)	60	65	30
	<i>Rhodotorula glutinis</i> (CCT 2182)	1	65	99
	<i>Candida utilis</i> (CCT 3469)	97	67	2
1c^z	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	63	69	37
	<i>Pichia kluyveri</i> (CCT 3365)	2	-	98
	<i>Pichia stipitis</i> (CCT 2617)	18	50	82
	<i>Pichia canadensis</i> (CCT 2636)	80	65	20
	<i>Rhodotorula minuta</i> (CCT 1751)	5	-	95
	<i>Rhodotorula glutinis</i> (CCT 2182)	10	40	90
	<i>Candida utilis</i> (CCT 3469)	94	69	6

^x em torno de 24 horas de reação; ^y em torno de 16 horas de reação; ^z em torno de 36 horas de reação; ^k configuração absoluta *S*. Os *ee* foram determinados por RMN de ¹H na presença de (+)-Eu(hfc)₃.

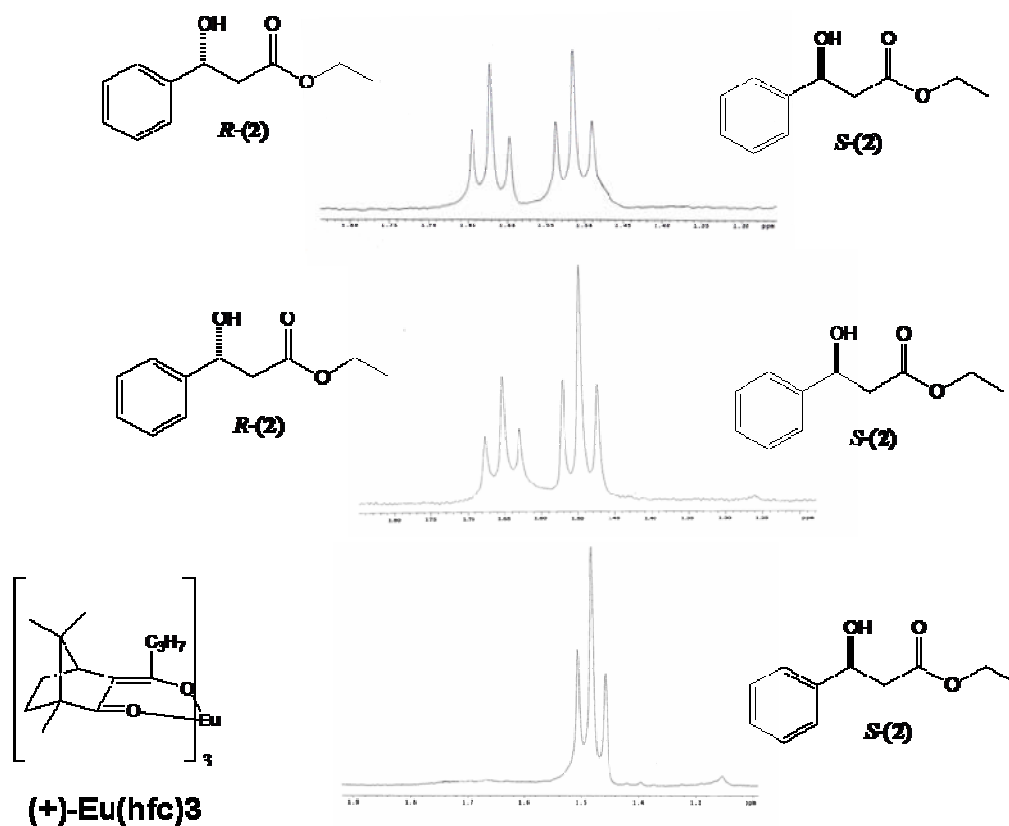


Figura 13. Determinação dos excessos enantioméricos por RMN de ^1H com utilização do tris[3-(heptafluoropropilhidroximetileno)-(+)-canforato de európio III, $(\text{Eu}(\text{hfc})_3)$, reagente de deslocamento químico. **a)** análise ($\pm$)-**2a**; **b)** análise do (*S*)-**2a** com 70% *ee*; **c)** análise do (*S*)-**2a** com 99% *ee*

Tabela 3. Dados de rotação ótica de **2a-c**.

	$[\alpha]_D^{20}$	$[\alpha]_D^{20}$ Lit. ¹⁷	Conf. Absoluta
2a	-20,0 (c 2,05, MeOH)	-50,1(c 1,50, CHCl_3)	<i>S</i>
2b	-12,0 (c 2,03, MeOH)	-59,5(c 1,50, CHCl_3)	<i>S</i>
2c	-33,0 (c 2,04, MeOH)	-43,7(c 0,52, CHCl_3)	<i>S</i>

Influência do substituinte no anel aromático

Durante a bio redução de derivados de benzoilacetato de etila substituídos no anel aromático por grupos doadores e retiradores de elétrons, observou-se que a velocidade destas reações era fortemente afetada por tais substituintes. A influência do substituinte no tempo de reação pode ser racionalizada pelos efeitos de ressonância e indutivos do mesmo em relação ao carbono *para* do anel aromático e conseqüente ativação ou desativação da carbonila benzílica. Grupos retiradores de elétrons na posição *para* do anel aromático deixam a carbonila benzílica ativada (deficiente de elétrons) pela ressonância com o anel aromático favorecendo um ataque nucleofílico pelo hidreto do cofator (NAD(P)H) e, conseqüentemente tornando a reação mais rápida do que a reação com benzoilacetato de etila **1a**. O efeito contrário é observado para grupos doadores de elétrons. Porém, tanto os substituintes atratores quanto os retiradores de elétrons parecem não influenciar a enantiosseletividade da reação.

Atividade enzimática

Um dado importante obtido a partir destes experimentos se refere à atividade enzimática das leveduras testadas. A capacidade hidrolítica das leveduras do gênero *Rhodotorula* mostrou-se muito superior à capacidade redutora para os três substratos utilizados (**1a**, **2a** e **3a**). Este mesmo perfil foi observado para as leveduras do gênero *Pichia* com o substrato **3a**.

A partir desta triagem preliminar selecionamos as leveduras *Pichia kluyveri*, *Pichia stipitis* e *Candida utilis* que forneceram os melhores resultados relativos ao rendimento e *ee* para os substratos **1a**, **1b** e **1c**, respectivamente, para realização de novos experimentos. Tornou-se importante reduzir ao máximo a hidrólise durante o processo de redução. Para isso, nos concentramos em utilizar artifícios para aumentar a atividade redutora em detrimento da atividade hidrolítica. Portanto, a etapa seguinte consistiu em modificações das condições reacionais para otimização do *ee* e principalmente dos rendimentos. Três variáveis foram avaliadas: (i) influência da glicose, (ii) inibidor enzimático e (iii) imobilização do biocatalisador (Tabela 4).

Tabela 4. Modificações nas condições reacionais na redução de **1a-c**.

Substrato	Levedura	Glicose	Inibidor ^a	Imob. ^b	Rend (%) Produto 2	ee (%) ^c	Tempo (h)
1a	<i>Pichia kluyveri</i>	-	-	-	60	66	24
		+	-	-	65	80	24
		-	+	-	67	90	24
		-	-	+	80	70	24
		+	+	+	80	99	24
1b	<i>Pichia stipitis</i>	-	-	-	70	72	16
		+	-	-	70	90	16
		-	+	-	70	99	16
		-	-	+	85	70	16
		+	+	+	90	99	16
1c	<i>Candida utilis</i>	-	-	-	63	69	36
		+	-	-	65	90	36
		-	+	-	65	99	36
		-	-	+	72	71	36
		+	+	+	81	99	36

^a α -cloroacetofenona, ^b esferas de alginato de cálcio, ^c configuração absoluta (*S*); os *ee* foram determinados por RMN de ¹H na presença de (+)-Eu(hfc)₃.

Influência da glicose

Estes experimentos são relativos à adição de glicose, em uma única vez, na proporção de 2:1 em relação à massa celular das leveduras. Em todos os casos, a adição de glicose não exerceu efeito significativo sobre o rendimento, entretanto, observamos aumento considerável no *ee*. Este resultado pode indicar a ativação do sistema de regeneração de cofatores (NAD(P)H) durante a reação.⁵ As enzimas oxidoreduases e neste caso específico, álcool desidrogenases, necessitam de coenzimas como NADH e/ou NADPH para exercer sua atividade catalítica através da transferência do hidreto para a carbonila benzílica do substrato gerando NAD^+ e/ou NADP^+ . Estes cofatores podem ser regenerados na via glicolítica a partir da utilização de glicose (ou outros doadores de elétrons). Os caminhos metabólicos usados no metabolismo da glicose para regeneração dos cofatores são apresentados na Figura 14.

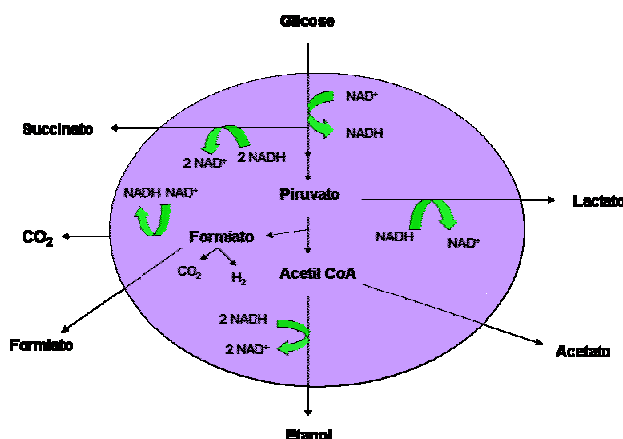


Figura 14. Caminhos metabólicos utilizados no metabolismo da glicose para regeneração dos cofatores.

⁵ (a) Zhao, H., van der Donk, W. A. *Curr. Opin. in Biotechnol.* **2003**, *14*, 583 (b) Chin-Joe, I.; Straathof, A. J. J.; Pronk, J. T.; Heijnen, J. J. *Biotechnol. Bioeng.* **2001**, *75* (1), 29.

Influência do inibidor

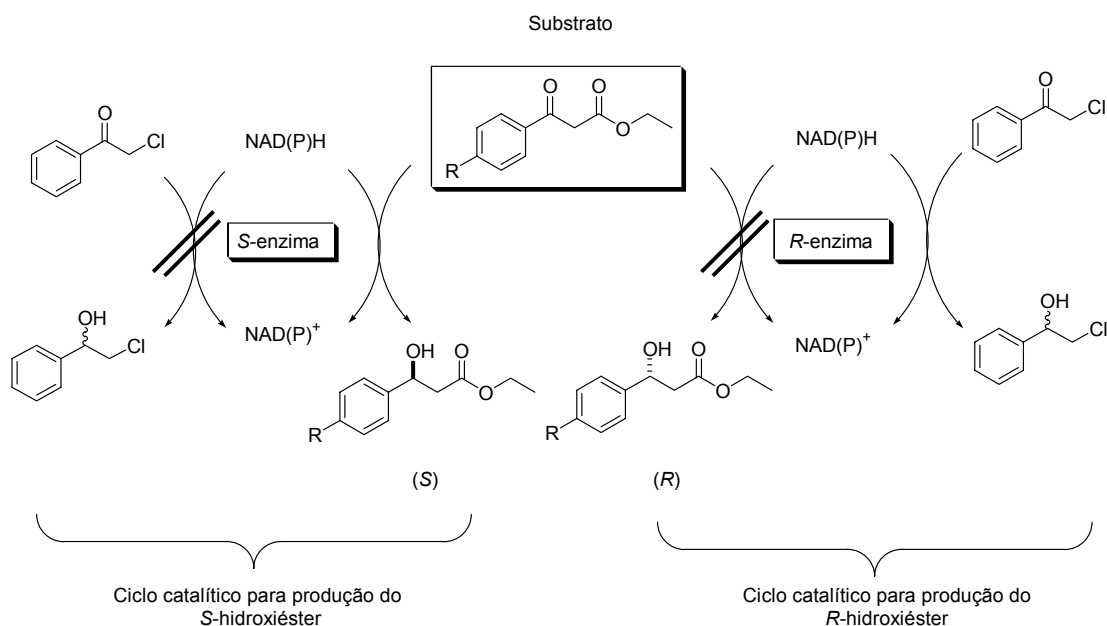
Estes experimentos são relativos à adição de α -cloroacetofenona (cloreto de fenacila), em uma única vez, na proporção de 0,008 : 1 em relação à massa celular das leveduras.

Quando as leveduras foram pré incubadas com de α -cloroacetofenona, houve um aumento considerável no *ee* para todos os substratos estudados e apenas um pequeno aumento no rendimento foi observado. Uma explicação para este aumento no *ee* baseia-se no mecanismo de inibição competitiva, na qual a α -cloroacetofenona estaria inativando a(s) enzima(s) que produziria(m) o isômero (*R*) do produto (Esquema 5).⁶ Vários compostos (álcoois alílicos e compostos carbonílicos α,β -insaturados) são descritos como inibidores enzimáticos para as enzimas de *Saccharomyces cerevisiae* através de mecanismos de inibição não competitiva.⁷

Outra possibilidade para o aumento na enantiosseletividade seria através de uma inibição alostérica. O mecanismo de inibição da α -cloroacetofenona com as leveduras testadas não foi avaliado neste trabalho.

⁶ Dao, D. H.; Okamura, M.; Akasaka, T.; Kawai, Y.; Hida, K.; Ohno, A. *Tetrahedron Asymmetry* **1998**, *9*, 2725.

⁷ (a) Nakamura, K.; Inoue, K.; Ushio, K.; Oka, S.; Ohno, A. *Chem. Lett.* **1987**, 679. (b) Nakamura, K.; Kawai, Y.; Nakajima, N.; Ohno, A. *J. Org. Chem.* **1991**, *56*, 4778. (c) Sorrilha, A. E. P. M.; Marques, M.; Joeke, I.; Moran, P. J. S.; Rodrigues, J. A. R. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1992**, *2*, 191. (d) Kawai, Y.; Takanobe, K.; Ohno, A. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1995**, *68*, 285. (e) Siqueira Filho, E. P.; Rodrigues, J. A. R.; Moran, P. J. S. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2001**, *15*, 23.



Esquema 5. Proposta de mecanismo para o aumento da enantiosseletividade na redução assimétrica utilizando células íntegras de leveduras.

Influência da imobilização em alginato de cálcio

A imobilização de células em alginato é um dos métodos mais simples de imobilização. Os alginatos são disponíveis comercialmente como alginato de sódio, e têm sido utilizados por mais de 70 anos nas indústrias farmacêuticas e alimentícia como filmes, géis e agentes emulsificantes. A imobilização em alginato de cálcio é conhecida por ser um método rápido, não tóxico, barato e versátil.⁸

⁸ a) Nilsson, K. *Trends Biotechnol.* **1987**, 5, 73. b) Palmieri, G.; Giardina, P.; Desderio, B.; Marzullo, L.; Giamberini, M.; Sannia, G. *Enzyme Microb. Technol.* **1994**, 16, 151. c) Park, H. J.; Khang, Y. H. *Enzyme Microb. Technol.* **1995**, 17, 408. d) Hong, Y. H.; Lee, .W.; Lee, S.J.; Choe, E. A.; Kim, S. B.; Lee, Y.

O alginato é um polissacarídeo encontrado em muitas espécies de algas marinhas, entre elas a *Macrocystis pyrifera*, nas quais é um importante constituinte da parede celular. É formado por um copolímero linear de unidades de ácidos β -D-(1 $\rightarrow$ 4) manopirano silurônico (**M**) e ácido α -L-(1 $\rightarrow$ 4) gulopirano silurônico (**G**) como é apresentado na Figura 15.

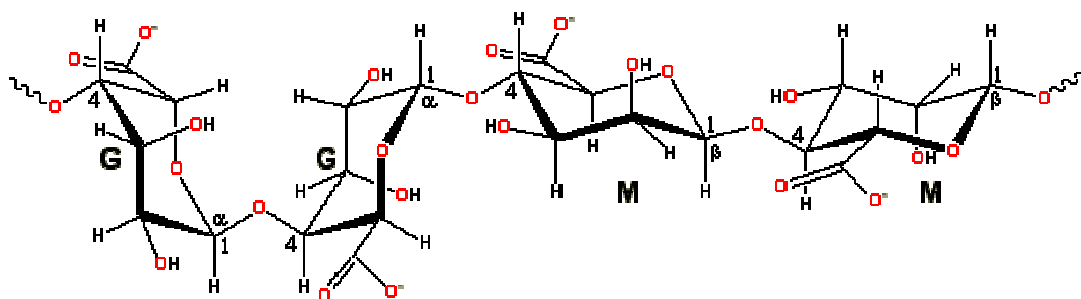


Figura 15. Representação das unidades das cadeias poliméricas de alginato.

A composição destes dois ácidos pode variar de acordo com a fonte. Os monômeros são arranjados ao longo da cadeia polimérica como homopolímeros de **M** e **G** ou copolímeros de **M** e **G**⁹ (Figura 16).

H.; Cheigh C. I.; Pyun, W. R. *Biotechnology Letters* **2007**, 29 (4), 569. e) Domínguez, A.; Gómez, J.; Lorenzo, M.; Sanromán, A. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **2007**, 23 (3), 367. f) Tümtürk, H.; Şahin, F.; Demirel, G. *Bioprocess and Biosystems Engineering* **2007**, 30 (2), 141. g) Reyes, Rivas-Ruiz, I.; Domínguez-Espinosa, R.; Solís, S. *Biochem. Eng. J.* **2006**, 32 (1), 43.

⁹ Moraes, A. M. Dissertação de Mestrado do Programa de Pós Graduação em Engenharia Química da Faculdade de Engenharia Química da UNICAMP, Campinas, **2004**.

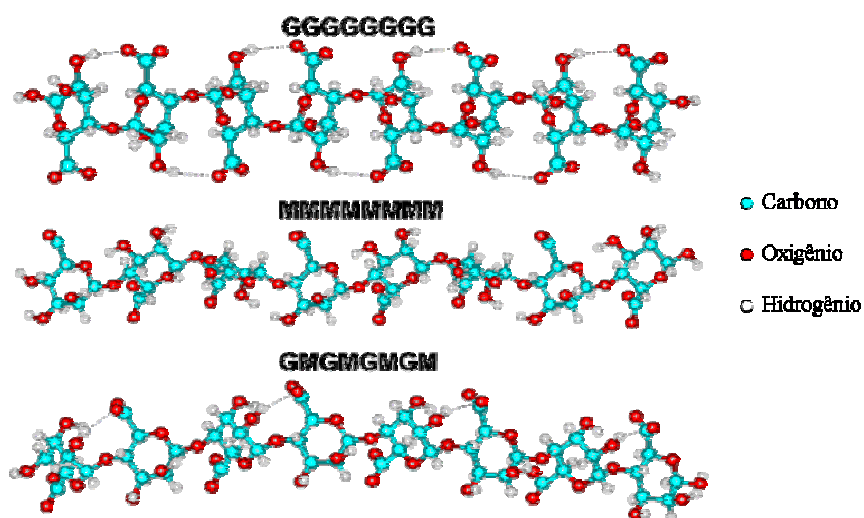


Figura 16. Representação das cadeias poliméricas de alginato¹⁰.

Este polissacarídeo forma sais hidrossolúveis com cátions monovalentes e amins de baixo peso molecular. A gelificação deste polímero, cujo princípio pode ser observado na Figura 17, ocorre quando uma solução de seu sal hidrossolúvel, normalmente o alginato de sódio, é tratado com cátions bivalentes como o Ca^{2+} , processando-se a troca do Na^+ pelo Ca^{2+} , o que provoca o surgimento de ligações cruzadas entre as estruturas lineares alinhadas do alginato. As moléculas do polissacarídeo formam uma rede polimérica que precipita como uma matriz gelatinosa rígida e termoestável, contendo cerca de 60% de água em seu interior.

¹⁰ <http://www.martin.chaplin.btinternet.co.uk/hyalg.html>

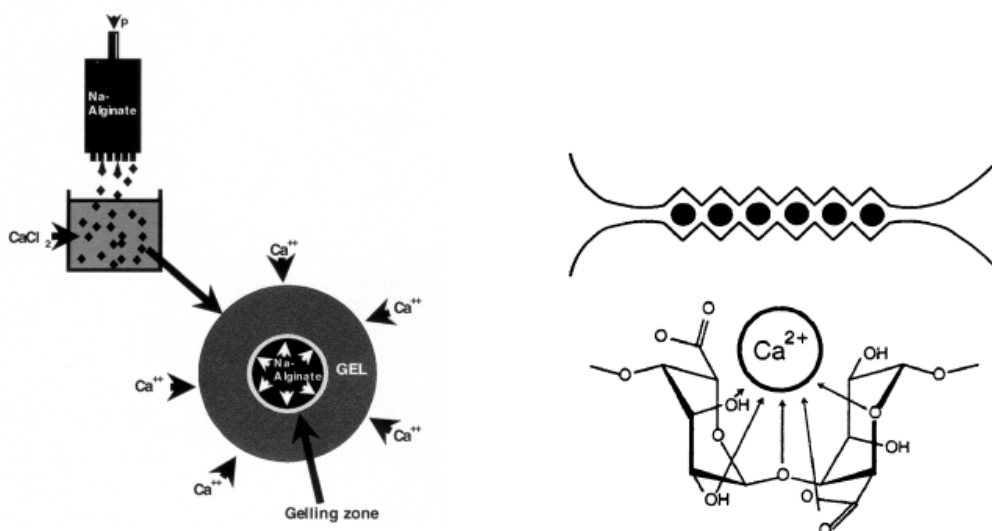


Figura 17. Mecanismos de gelificação do alginato.

Antes de iniciarmos as reações de bioedução com células imobilizadas em alginato avaliamos a afinidade (coeficiente de partição) entre produtos e reagentes pela matriz de alginato. Os experimentos para determinação do coeficiente de partição foram realizados utilizando-se esferas de alginato de cálcio sem células em meio aquoso. O coeficiente de partição foi determinado por GC-EM a partir da análise de produtos e reagentes (em diferentes concentrações) na fase aquosa como exemplificado na Figura 18.

Conforme apresentado na Figura 18 verificamos que a afinidade dos substratos **1a-c** pelo gel é maior que pela fase aquosa e quando se trata dos produtos **2a-c** a situação inversa é observada. Estes dados comprovam que esta metodologia é adequada para a reação em questão, pois os substratos apresentam uma maior afinidade pelo gel se deslocando para as esferas de

alginato assim que são adicionados durante a reação e a medida que os produtos são formados eles se deslocam para o meio reacional pois apresentam uma maior afinidade pela água.

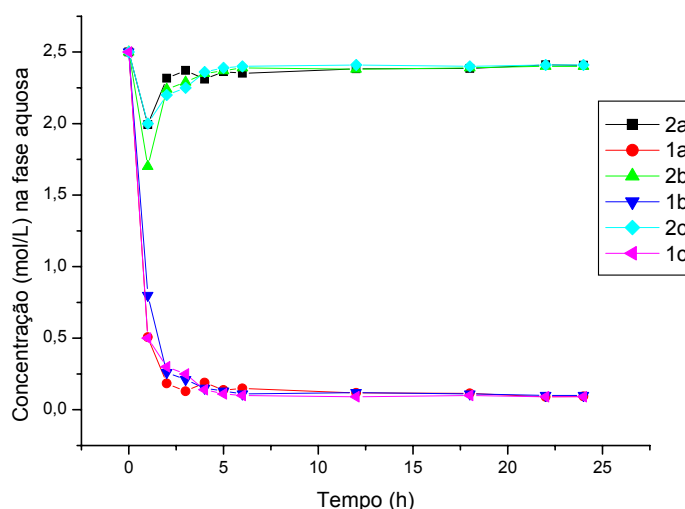


Figura 18. Concentração de produtos (**2a-c**) e substratos (**1a-c**) na fase aquosa pelo tempo (h). Concentração inicial de produtos e reagentes = 2,5 mmol/L.

A imobilização dos biocatalisadores em alginato provocou um aumento considerável no rendimento das três reações (60-85%) e quase não exerceu influência sobre o *ee*. O aumento no rendimento pode ser explicado por três fatores: (i) facilidade de separação do biocatalisador do meio e extração produto, (ii) baixa afinidade dos produtos **2a-2c** pelo alginato, ou seja, coeficiente de partição baixo (Figura 18) e (iii) diminuição da decomposição do substrato (Figura 19).

Quando a bioredução é realizada utilizando-se células livres, a concentração de substrato, glicose e oxigênio ao redor das células é

praticamente a mesma do meio reacional. Entretanto, durante a bio redução com células imobilizadas espera-se que a concentração destes componentes seja menor na fase sólida (esferas de alginato) onde a reação realmente acontece, devido aos fenômenos de transferência de massa (Figura 19).

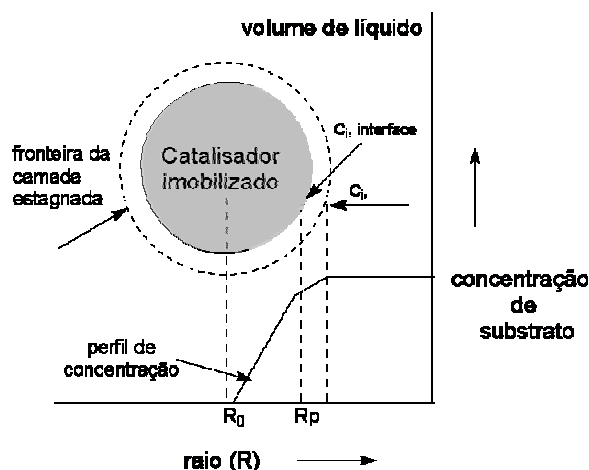


Figura 19. Representação esquemática do perfil de concentração de substrato em um biocatalisador imobilizado em partícula esférica.

A menor concentração de substrato nas esferas favorece a quimiosseletividade, uma vez que as enzimas com maior afinidade (K_{cat}/K_m) reagirão preferencialmente. Acreditamos que este fenômeno de transporte de massas seja o responsável pela diminuição da taxa de hidrólise enzimática evitando a formação dos subprodutos **9a-9c**.

A partir destes resultados, a reação com o substrato **1a** foi realizada em escala multigrama para que (*S*)-**2a** fosse produzido em quantidade suficiente para a continuação da rota sintética. A reação foi realizada em um

reator tipo tanque (400 mL de volume útil) encamisado (30 °C) e com agitação mecânica.

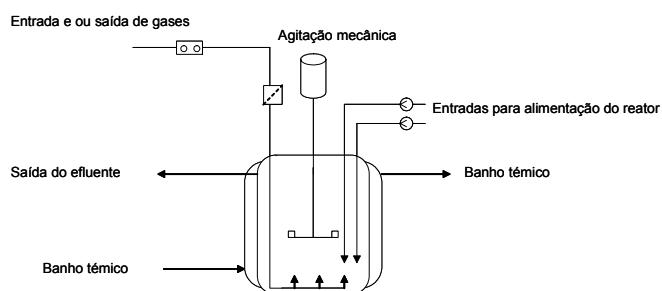


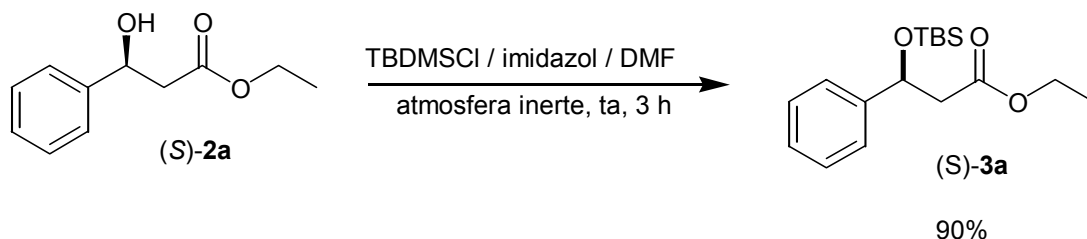
Figura 20. Projeto do bioreator

Para cada batelada foram utilizados 23 g de *Pichia kluyveri* imobilizada em alginato de cálcio, 6 g de glicose, 40 mg de α -cloroacetofenona e 1,0 g de **1a**. Os bons rendimentos e *ee* (76% e 99%, respectivamente) obtidos demonstram a aplicabilidade deste processo para bioeduções em larga escala. Produzimos 9,0 g de (*S*)-(-)-**2a** (Figura 21).



Figura 21. Foto do reator utilizado para a bioedução de **1a** em escala multigrama.

3.1.2. Proteção do (*S*)-(-)-3-hidroxi-3-fenilpropanoato de etila, **2a**



Esquema 6. Proteção de (*S*)-**2a** utilizando-se *t*-butildimetilsilício (TBDMS).

A próxima etapa requer a proteção do álcool quiral, pois os β -hidroxiésteres são susceptíveis a reações retroaldol em condições básicas e podem ser re-oxidados durante ozonólise (etapas posteriores).

O derivado de silício (TBDMSCl, cloreto de *t*-butildimetilsilila) foi escolhido como grupo de proteção para o hidroxiéster (*S*)-**2a** por sua estabilidade a inúmeras reações orgânicas e pela facilidade de introdução e remoção deste grupo em condições que são inertes às outras funções.¹¹

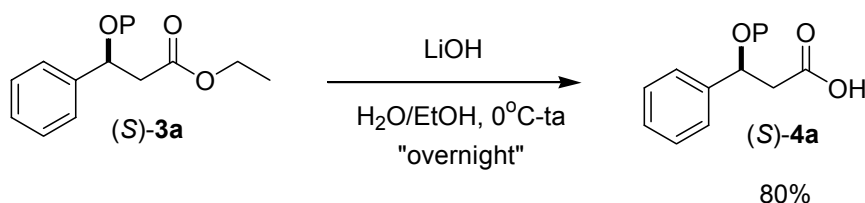
O uso de imidazol como catalisador e DMF como solvente provaram ser efetivos resultando na conversão do hidroxiéster (*S*)-**2a** ao éter *t*-butildimetilsilílico (*S*)-**3a** com alto rendimento (90%), em condições brandas e com manutenção da integridade estereoquímica da molécula.

¹¹ a) Greene, TW.; Wuts, PGM. *Protective Groups in Organic Synthesis* **1991**, 2ª edição, John Wiley & Sons, Nova York. b) Corey, EJ.; Venkateswarlu, A. *J. Am. Chem. Soc.* **1972**, 94, 6190. c) Nicolaou, K. C.; Webber, S. E. *Synthesis*, **1986**, 453.

Tabela 5. Dados de rotação ótica de **3a**.

	$[\alpha]_D^{20}$	Conf. Absoluta
3a	-26,7 (c 1,02, MeOH)	<i>S</i>
Lit. ¹²	-50,4 (c 2,00, CH ₂ Cl ₂)	<i>S</i>

3.1.3. Hidrólise básica do (*S*)-(-)-3-*t*-(butildimetilsilil)oxi-3-fenilpropanoato de etila, **3a**

**Esquema 7.** Hidrólise básica de (*S*)-**2a** com LiOH.

A hidrólise foi realizada através da adição de uma solução aquosa de LiOH a uma solução alcoólica de (*S*)-**3a**, a 0°C com retorno gradual a temperatura ambiente, fornecendo (*S*)-**4a** com 80% de rendimento e manutenção da estereoquímica da molécula. A purificação de (*S*)-**4a** foi realizada durante a elaboração da reação através de uma extração ácido-base (extração reativa).

¹² Manzocchi, Ada; *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1* **1987**, 12, P2753.

Tabela 6. Dados de rotação ótica de **4a**.

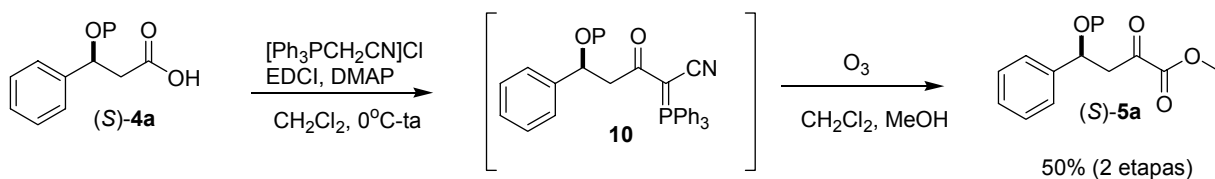
	$[\alpha]_D^{20}$	Conf. Absoluta
4a	-16,8 (c 0,90, MeOH)	<i>S</i>
Lit.²⁷	-55,0 (c 2,00, CH ₂ Cl ₂)	<i>S</i>

3.1.4. Homologação da cadeia carbônica do ácido (*S*)-(-)-3-*t*-(butildimetilsilil)-oxi-3-fenilpropanóico, **4a**

Existem muitos métodos conhecidos para a conversão de ácidos carboxílicos a 2-oxoésteres.¹³ Entretanto, era necessário uma estratégia que mantivesse a integridade estereoquímica da molécula. Assim, foi utilizada a metodologia proposta Wasserman e Ho¹⁶ e generalizada por Willis e colaboradores¹⁴ que envolve a ozonólise de β-cetocianofosforanos. O tratamento de ácido carboxílicos com (cianometileno)trifenilfosforanos na presença de 1-(3-dimetilaminopropil)-3-etilcarbodiimida (EDCI) e 4-dimetilaminopiridina (DMAP) seguido de ozonólise em metanol/diclorometano levou ao 2-oxoéster desejado (*S*)-(-)- **5a** (Esquema 8).

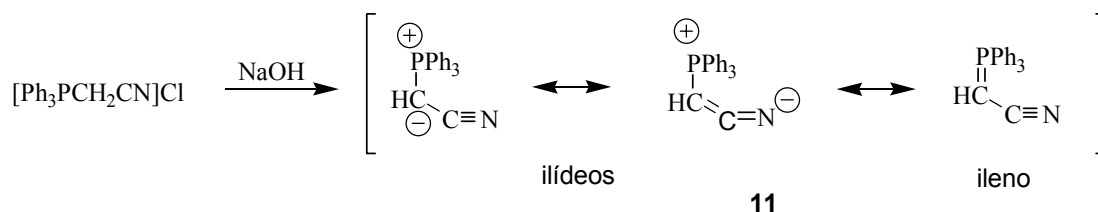
¹³ Para revisão de síntese de 2-oxoésteres veja: a) Kovacs, L. *Recl. Trav. Chim. Pays-Bas*, **1993**, 112, 471
b) Cooper, A.J.L.; Ginos, J.Z.; Meister, A. *Chem. Rev.*, **1983**, 83, 321.

¹⁴ Willis, C.L.; Bhalay, G.; Clough, S.; McLaren, L.; Sutherland, A. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, **2000**, 901-910.



Esquema 8. Homologação da cadeia carbônica de (S)-4a.

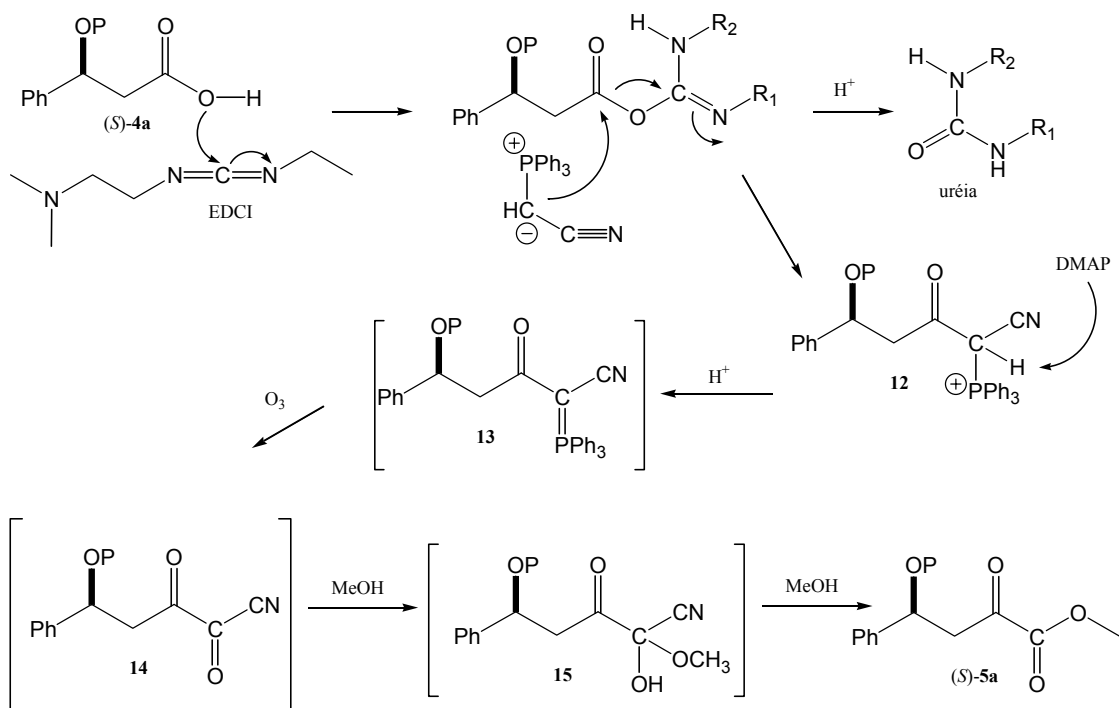
O uso de fosforanas em reações de acoplamento com ácido carboxílicos é uma estratégia bastante versátil para a formação de α -cetoésteres. A fosforana **11** é facilmente obtida pela desidrohalogenação de um sal de fósforo (Esquema 9) e tem sido amplamente utilizada em reações de Wittig com aldeídos ou cetonas para formar nitrilas α,β -insaturadas.



Esquema 9. Mecanismo de formação da fosforana **11**.

Provavelmente, o mecanismo da adição nucleofílica do oxigênio do ácido carboxílico (S)-4a à carbodiimida (EDCI) envolve a formação de uma isouréia (Esquema 10). A carbonila do ácido carboxílico sofre ataque nucleofílico da fosforana **11**, deslocando o derivado de isouréia, com

formação do fosfônio **12** que sofre eliminação gerando a cetocianoilida **13** (Esquema 10).



Esquema 10. Proposta de mecanismo para a formação de 2-oxoéster (*S*)-**5a**.

A cetocianoilida **13** é submetida a ozonólise (-78°C) formando a dicetonitrila vicinal **14** altamente eletrofílica que pode ser trapeada por reação nucleofílica a fim de gerar a diceto-nitrila **15** que é instável e se decompõe com o aumento da temperatura formando o α-cetoéster (*S*)-**5a**, como ilustrado no Esquema 10.

Esta estratégia foi realizada com sucesso fornecendo o 2-oxoéster (*S*)-(-)-**5a** com 50% de rendimento após as duas etapas (formação da cetocianoilida **13** e posterior ozonólise). A configuração absoluta de (*S*)-**5a** foi determinada baseado na medida de rotação ótica ($[\alpha]_D^{20} = -48,0$, *c* 1,50, MeOH) e correlação ao material de partida (*S*)-(-)-**4a** ($[\alpha]_D^{20} = -16,8$, *c* 0,90, MeOH).

3.1.5. Reações de α -Metilenação

As reações de α -metilenação usando reações tipo Mannich têm sido muito estudadas em nosso grupo.¹⁵ A α -metilenação *via* acetato de morfolínio apresenta a vantagem de formar *in situ* o íon imínio a partir da condensação do formaldeído com a morfolina.¹⁶ A reação do íon imínio com a forma enólica da cetona resulta na base de Mannich.¹⁷ A eliminação da morfolina regenera o catalisador e produz o α -metilenocetéster desejado (Esquema 12, página 45).

Entretanto, em trabalho anterior,¹⁸ observamos que o controle da temperatura e presença de água eram fatores cruciais para o bom andamento da reação, mas mesmo tendo cuidados com estas variáveis, as taxas de conversão máxima eram em torno de 85%, com recuperação do material de

¹⁵ Rodrigues, J. A. R.; Siqueira, E. P. F.; Mancilha, M.; Moran, P. J. S. *Synthetic Comm.* **2003**, 33, 331.

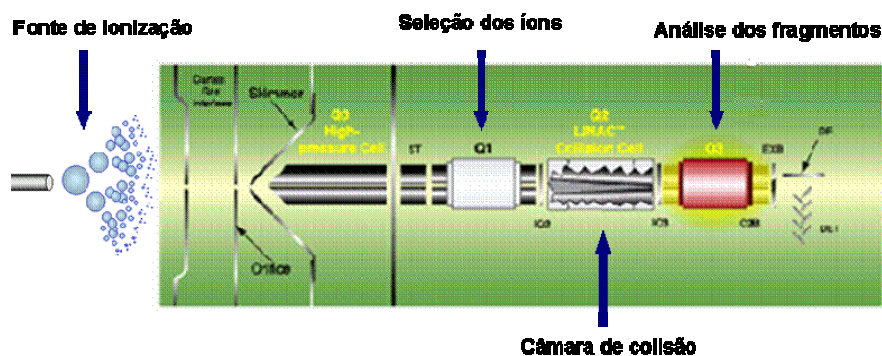
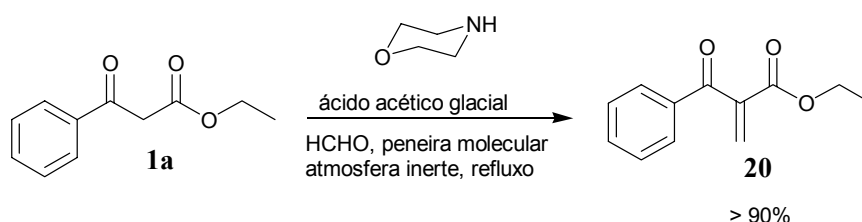
¹⁶ Kim, M. Y.; Lim, G. J.; Lim, J. I.; Kim, D. S.; Kim, I. Y.; Yang, J. S. *Heterocycles* **1997**, 45, 2041.

¹⁷ March, J. *Advanced Organic Chemistry: reactions, mechanisms and structures*, **1992**, 4^a ed., John Wiley & Sons, Nova York.

¹⁸ Milagre, C. D. F. Dissertação de Mestrado, **2003**, Instituto de Química, UNICAMP.

partida. Assim, o objetivo desta parte do projeto consistiu em aprimorar as reações de α -metilação de α -cetoésteres para a síntese dos α -metilenocetoésteres **6a** e **26** que são intermediários da rota A e B, respectivamente, e estender esta metodologia para β e γ -cetoésteres para futuros estudos sobre a quimio e estereosseletividade de sua bio-redução, através de um estudo mecanístico do ciclo catalítico via ionização por electrospray-MS/MS (ESI-MS(/MS)).

A reação a partir de **1a** foi utilizada como modelo e monitorada via experimentos de ESI-MS(/MS) utilizando um Q-trap na tentativa de interceptar intermediários iônicos e coletar informações mecanísticas.



Esquema 11. Representação esquemática da α -metilação direta tipo Mannich do benzoilacetato de etila **1a** em um espectrômetro de massas QTrap (ionização por electrospray).

As espécies catiônicas resultantes do equilíbrio da troca de prótons com ácido acético foram interceptadas utilizando ESI-MS(/MS) no modo positivo. A técnica de ionização ESI tem sido uma técnica muito apropriada para realização de estudos mecanísticos devido a sua habilidade de transferir os íons diretamente da solução para a fase gasosa com eficiência e suavidade (não há dissociação) e sem induzir reações laterais indesejadas.¹⁹ A composição dos íons gerados na fase gasosa é a mesma dos íons gerados em solução.²⁰ O espectro de ESI(+)-MS coletado para esta reação é mecanisticamente esclarecedor (Figura 22). Assim que a mistura reacional foi analisada por ESI(+)-MS detectou-se ambos reagentes: morfolina em sua forma protonada $[16 + H]^+$ m/z 88 e o benzoilacetato de etila **1a** em suas formas protonada e sodiada, $[1a + H]^+$ m/z 193 e $[1a + Na]^+$ m/z 215, além do dímero da forma protonada $[(1a)_2 + H]^+$ m/z 407. Ambos reagentes foram também detectados na forma de um aduto (com próton ligado) $[1a + 16 + H]^+$ m/z 280. Além dos reagentes, dois intermediários catiônicos chave também foram detectados: **17** m/z 118 e o íon imínio **18** m/z 100 (até então

¹⁹ (a) Whitehouse, C. M.; Dreyer, R. N.; Yamashita, M.; Fenn, J. B. *Anal. Chem.* **1985**, *57*, 675. (b) Fenn, J. B.; Mann, M.; Meng, C. K.; Wong, S. F.; Whitehouse, C. M. *Science* **1989**, *246*, 64. (c) Cole, R. B. *Electrospray Ionization Mass Spectrometry*; Wiley: New York, 1997. (d) Cooks, R. G.; Zhang, D. X.; Koch, K. J.; Gozzo, F. C.; Eberlin, M. N. *Anal. Chem.* **2001**, *73*, 3646. (e) Takats, Z.; Nanita, S. C.; Cooks, R. G. *Angew. Chem.* **2003**, *42*, 3521. (f) Eberlin, M. N.; Gozzo, F. C.; Consorti, C. S.; Dupont, J. *Chem. Eur. J.* **2004**, in press; (d) Tomazela, D. M.; Gozzo, F. C.; Ebeling, G.; M. N.; Dupont, J.; Eberlin, M. N. *Inorg. Chim. Acta* **2004**, *357*, 2349. (g) da Silveira Neto, B. A.; Ebeling, G.; Gonçalves, R. S.; Gozzo, F. C.; Eberlin, M. N.; Dupont, J. *Syntheses* **2004**, 1155. (h) Pereira, R. M. S.; Paula, V. I.; Buffon, R.; Tomazela, D. M.; Eberlin, M. N. *Inorg. Chim. Acta* **2004**, *357*, 2100.

²⁰ (d) Cooks, R. G.; Zhang, D. X.; Koch, K. J.; Gozzo, F. C.; Eberlin, M. N. *Anal. Chem.* **2001**, *73*, 3646. (e) Takats, Z.; Nanita, S. C.; Cooks, R. G. *Angew. Chem.* **2003**, *42*, 3521. (f) Eberlin, M. N.; Gozzo, F. C.; Consorti, C. S.; Dupont, J. *Chem. Eur. J.* **2004**, in press; (d) Tomazela, D. M.; Gozzo, F. C.; Ebeling, G.; M. N.; Dupont, J.; Eberlin, M. N. *Inorg. Chim. Acta* **2004**, *357*, 2349. (g) da Silveira Neto, B. A.; Ebeling, G.; Gonçalves, R. S.; Gozzo, F. C.; Eberlin, M. N.; Dupont, J. *Syntheses* **2004**, 1155. (h) Pereira, R. M. S.; Paula, V. I.; Buffon, R.; Tomazela, D. M.; Eberlin, M. N. *Inorg. Chim. Acta* **2004**, *357*, 2100.

tínhamos apenas evidências cinéticas da formação deste intermediário imínio nas reações de Mannich).²¹

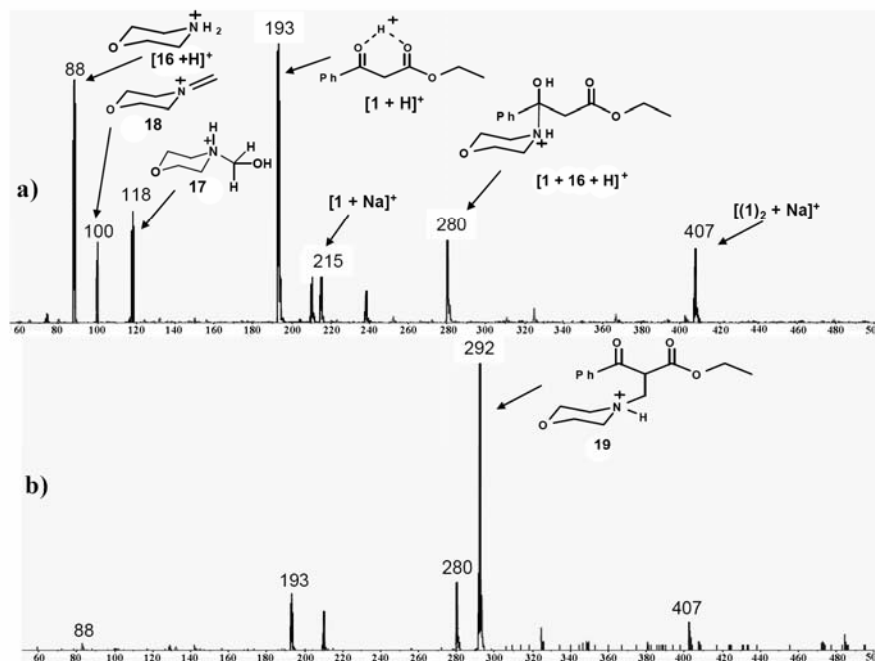


Figura 22. Espectro de ESI(+)-MS para a reação de α -metilação de **1a** em $t=0$ (a) e $t=12$ min (b).

O monitoramento por ESI(+)-MS mostrou que a composição da solução reacional muda consideravelmente com o tempo. Após 12 minutos, ESI(+)-MS detectou outro intermediário chave: o aduto aldol **19** em sua forma protonada m/z 292, além de uma diminuição considerável na intensidade do sinal de todos os outros íons detectados antes (Figura 22b).

Como a Figura 23 exemplifica, o ESI(+)-MS foi capaz de monitorar continuamente a reação de α -metilação de **1a** através do consumo de **1a**

²¹ Benkovic, J.J.; Benkovic, P.A. and Confort, D.R. *J. Am. Chem. Soc.* **1969**, *91*, 1860.

($[1a + H]^+$ m/z 193) e a formação do produto final **20** via seu precursor aldol (preceding) $[19 + H]^+$ m/z 292, apesar de termos observado um elevado número de compostos diméricos no estágio inicial da reação.

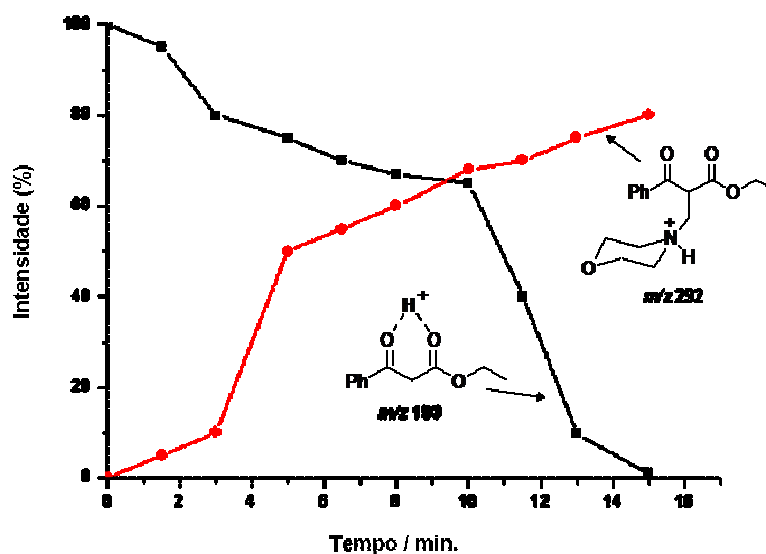


Figura 23 Curso da reação de Mannich do benzoilacetato de etila m/z 193(■) com o íon imínio ao longo do tempo para a formação do aduto aldol intermediário m/z 292 (●).

Os intermediários catiônicos transferidos para a fase gasosa e detectados por ESI(+)-MS foram então selecionados individualmente através de suas massas por um quadrupolo Q1 para dissociação induzida por colisão (CID – collision induced dissociation) com nitrogênio em um quadrupolo q2, e foram estruturalmente caracterizados por análise de espectrometria de massa em cascata (MS/MS). O íon imínio **18** m/z 100 perdeu uma molécula neutra de 30 Da (provavelmente formaldeído) para formar um fragmento

iãoico de m/z 70 (Figura 24a). O intermediário **17** m/z 118 (Figura 24b) sofreu uma retroadição gerando a morfolina protonada [**16** + H]⁺ de m/z 88. O intermediário **19** de m/z 292 dissociou-se através de uma reação retroaldol formando o intermediário **18** de m/z 100 além de uma perda de morfolina neutra (**16**) para formar o fragmento iônico minoritário [**20** + H]⁺ de m/z 205. Veja que, este processo na fase gasosa induzido por colisão é análogo àquele ocorrido com **19** em solução na etapa final de formação do produto **20**, o α -metilenocetoéster.

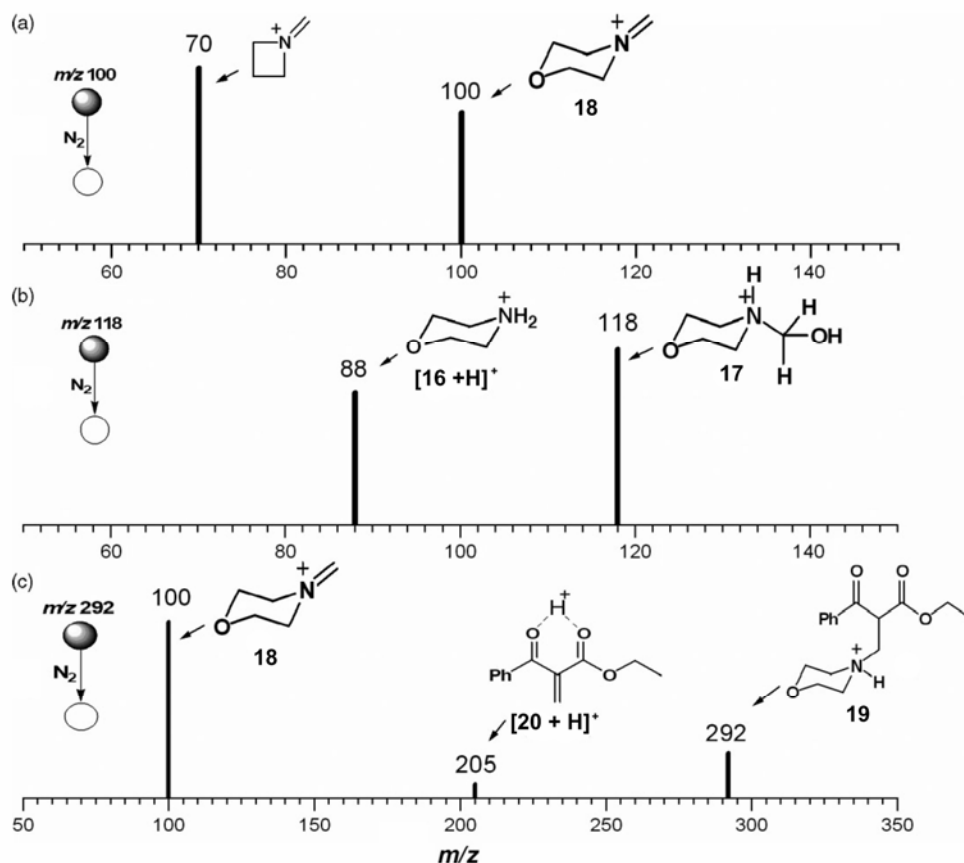
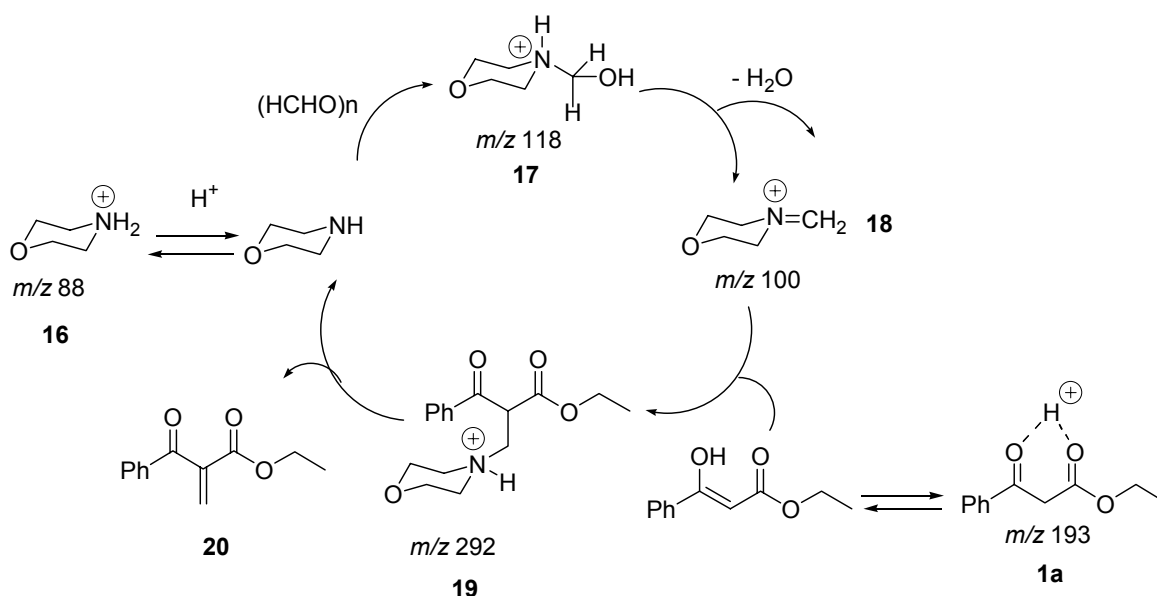


Figura 24. ESI(+)-MS/MS dos intermediários **17** de m/z 118, **18** de m/z 100 e **19** de m/z 292.

O esquema 12 apresenta o ciclo catalítico para a α -metilenação direta tipo Mannich de **1a** formando o α -metilenocetoéster **20** na presença de **16**. Este ciclo é baseado em interpretações mecanísticas prévias mas agora mostra autênticamente a formação dos intermediários catiônicos **17**, **18** e **19** detectados e caracterizados por ESI(+)-MS(/MS).

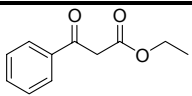
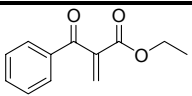
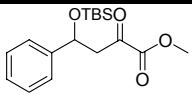
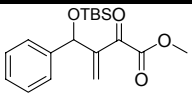
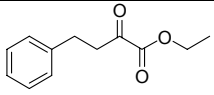
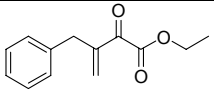
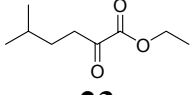
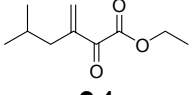
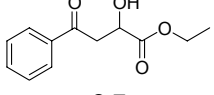
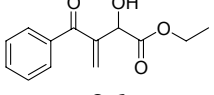


Esquema 12. Proposta para o ciclo catalítico.

Baseado nos dados de ESI(+)-MS(/MS) e esperando favorecer a formação dos intermediários **17** e **18**, repetimos a reação de **1a** utilizando um excesso de paraformaldeído de 9:1 além de condições reacionais anidras (atmosfera inerte e peneira molecular para remoção eficiente da água liberada por **17**). Esta nova condição de reação promoveu a conversão total de **1a** em **20** em rendimento superior a 90%.

A partir deste experimento confirmamos a nossa proposta inicial para o ciclo catalítico ilustrada no Esquema 12, e racionalizamos a obrigatoriedade da realização desta reação em condições anidras e excesso de paraformaldeído quando os substratos são ésteres. Esta metodologia mostrou-se eficiente para todas as moléculas testadas **5a**, **21**, **23** e **25**, gerando produtos com grande interesse sintético como **6a** (intermediário da rota A), **26** (intermediário da rota B), **22** (intermediário para a síntese da fenilnorstatina).

Tabela 7. α -Metilação de α,β,γ -cetoésteres representativos.

Entrada	Substrato	Produto	Condições	Rendimento (%)
1	 1a	 20	70°C 1,5 horas	90
2	 5a	 6a	70°C 2,0 horas	85
3	 21	 22	70°C 1,5 horas	95
4	 23	 24	55°C 2,0 horas	85
5	 25	 26	75°C 4,0 horas	80

A temperatura deve ser mais baixa para compostos alifáticos.

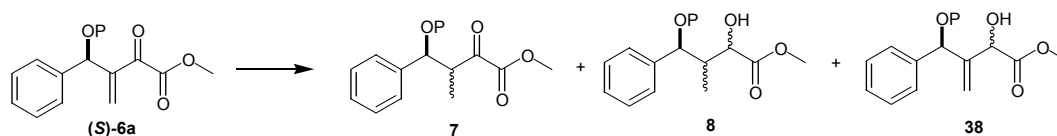
O composto **6a** gerado a partir de (*S*)-**5a** apresenta $[\alpha]_D^{20} = -56,0$, c 0,92, MeOH. Este valor foi comparado com a literatura para o composto (*S*)-**4a** e a partir desta correlação atribuiu-se a configuração *S* para o carbono 2 de **6a**.

3.1.6. Redução de (*S*)-(-)-4-*t*-(butildimetilsilil)oxi-2-oxo-3-metileno-4-fenilbutanoato de metila, **6a**

A próxima etapa consistiu em investigar a quimio, enantio e diastereosseletividade da redução do sistema α,β -insaturado de (*S*)-**6a** mediada por leveduras. Estas reações foram realizadas com as células em crescimento, em meio de cultura YM e foram acompanhadas por CG-EM durante um período de 5 dias. Os resultados são apresentados na Tabela 8.

Infelizmente, nas condições utilizadas nenhuma levedura foi capaz de reduzir (*S*)-**6a** provavelmente devido ao grande impedimento estérico provocado pelo grupo protetor TBDMS dificultando ou impedindo a interação entre o substrato e o sítio ativo da(s) enzima(s).

Neste ponto, promovemos a modificação da rota proposta substituindo as reações de biocatálise por catálise química convencional. O segundo e terceiro centros estereogênicos foram criados através da redução de (*S*)-**6a** através de hidrogenação catalisada por Pd/C a 1 atm.

Tabela 8. Triagem de leveduras para a redução de (S)-6a.

Leveduras	7	8	38
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	-	-	-
<i>Pichia kluyveri</i> (CCT 3365)	-	-	-
<i>Pichia stipitis</i> (CCT 2617)	-	-	-
<i>Pichia canadensis</i> (CCT 2636)	-	-	-
<i>Rhodotorula minuta</i> (CCT 1751)	-	-	-
<i>Rhodotorula glutinis</i> (CCT 2182)	-	-	-

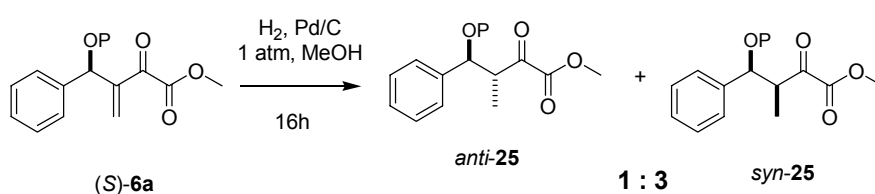
Condições de reação: meio de cultura YM, 28°C, agitação orbital.

A hidrogenação catalítica heterogênea ocorre na superfície do catalisador metálico através da adsorção do hidrogênio gasoso e coordenação do sistema α,β -insaturado e do grupo fenila à superfície do metal e é passível de estereocontrole, sendo a face menos impedida do substrato a atacada preferencialmente pela molécula de hidrogênio.²² O método envolve a adição *syn* de hidrogênio à molécula orgânica. O paládio é o catalisador indicado para redução preferencial de alcenos, mas também é capaz de catalisar redução cetonas (Pd: C=C > C=O > C>Ar)²³. Geralmente, quanto mais substituído for o alceno, menos efetiva é sua adsorção pelo

²² Costa, P.; Pilli, R. A.; Pinheiro, S.; Vasconcellos, M. *Substâncias Carboniladas e derivados*, 2003, Ed. Bookman.

catalisador e, portanto, mais difícil a redução da ligação dupla. Isto significa que grupos vinílicos são facilmente reduzidos, especialmente grupos metilênicos *exo*.²³

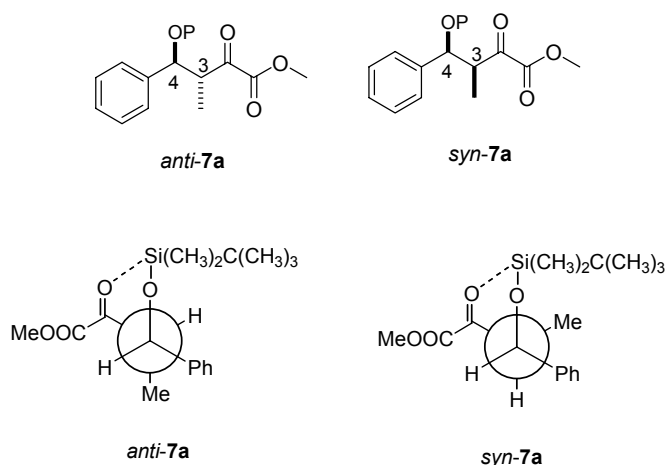
A hidrogenação de (*S*)-(-)-**6a** gerou os diastereoisômeros **7a** *anti* e *syn* na proporção de 1:3, respectivamente com *ee* > 99% e 45 % de rendimento, em 16 horas de reação (Esquema 13).



Esquema 13. Hidrogenação de (*S*)-**6a** catalisada por Pd/C.

A configuração relativa dos compostos *anti*-**7a** e *syn*-**7a** foi determinada baseada na análise dos deslocamentos químicos e das constantes de acoplamento no espectro de RMN de ¹H (Tabela 9). Os *ee* foram determinados por HPLC.

²³ Rylander, P.N. *Catalytic Hydrogenation in Organic Synthesis* **1979**, Academic Press: New York

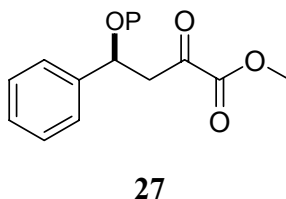
Tabela 9. Dados de RMN de ^1H da mistura *syn/anti-7a*.

	δ (ppm) H-4	$J_{3,4}$ (Hz)
<i>anti</i>	5,01 (d)	9,5
<i>syn</i>	5,20 (d)	5,5

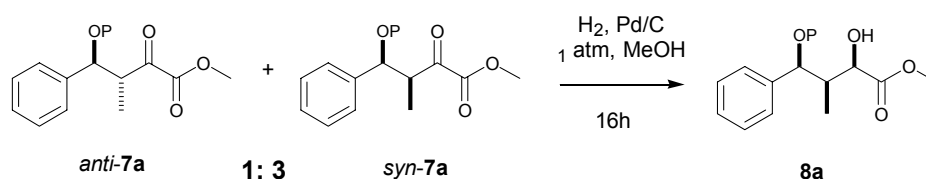
A configuração absoluta do carbono 4 de **7a**, proveniente de material de partida enantiomericamente puro e de configuração absoluta definida, foi determinada como *S*. Assim, estabelecemos uma correlação entre os novos centros formados com aquele de configuração conhecida de forma a definir a estereoquímica de *syn-7a* e *anti-7a*. Desta forma atribuímos a configuração *S* para o C-3 de *syn-7a* e *R* para o C-3 de *anti-7a*. Portanto, os compostos possuem a seguinte configuração: (3*S*,4*S*)-(*syn-7a*) e (3*R*,4*S*)-(*anti-7a*).

Grupos carbonilados também podem ser reduzidos a álcoois secundários por hidrogênio molecular em presença de um catalisador metálico. Entretanto, o grupo carbonila é bem menos reativo frente ao hidrogênio do que as olefinas. Utilizamos o modelo **27** para verificar a

seletividade da redução da carbonila e observamos que a mesma não é reduzida nestas condições reacionais. Recuperamos o material de partida (**27**) quantitativamente.



Entretanto, após 15 horas de reação observamos a redução da mistura de isômeros *syn* e *anti-7a* altamente diastereo e enantiosseletiva, com formação exclusiva do produto **8a**, conforme apresentado no Esquema 14.

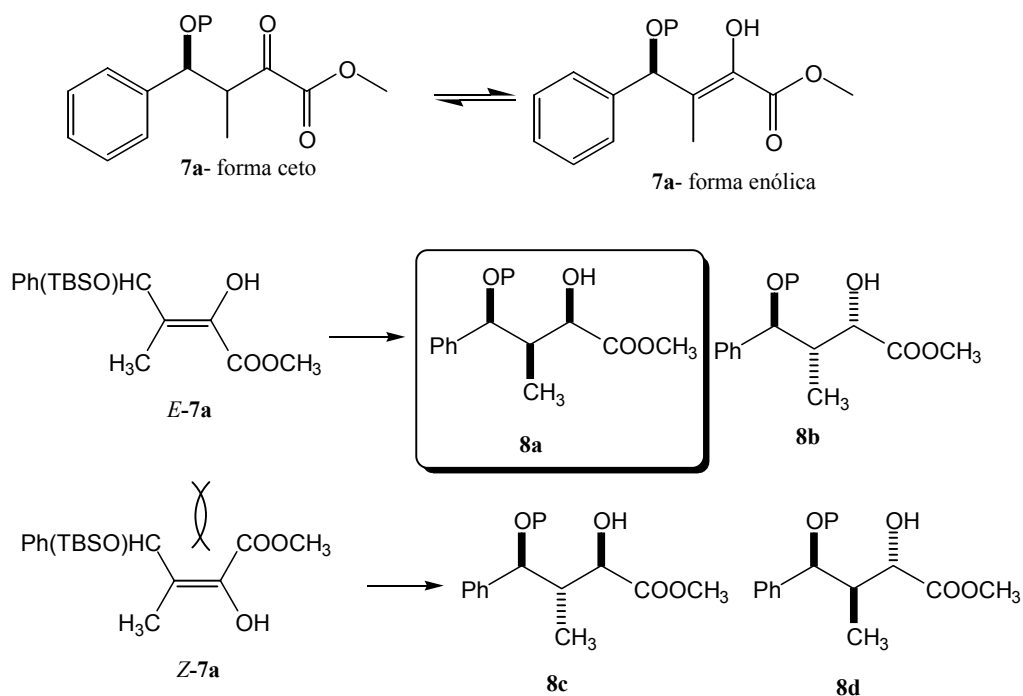


Esquema 14. Hidrogenação de **25** catalisada por Pd/C.

Sugerimos que a alta enantio e diastereosseletividade obtida para a formação de **8a** seja proveniente do equilíbrio ceto-enólico favorecido pelo uso de metanol como solvente levando a epimerização de C-3 de **7a** e conseqüente reação de **7a** na forma enólica (Esquema 15).²⁴ A escolha do

²⁴ a) Singh, U. K.; Vannice, M. A. *Appl. Catal. A: General* **2001**, 213, 1. b) Wolfson, A.; Vankelecom, I. F. J.; Geresch, S.; Jacobs, P. A. *J. Mol. Catal. A: Chemical* **2003**, 198, 39. c) Maki, S.; Harada, Y.; Matsui, R.; Okawa, M.; Hirano, T.; Niwa, H.; Koizumi, M.; Nishiki, Y.; Furuta, T.; Inoue, H.; Iwakura, C. *Tetrahedron Lett.* **2001**, 42, 8323. d) Nitta, Y.; Kubota, T.; Okamoto, Y. *J. Mol. Catal. A: Chemical* **2004**, 212, 155.

solvente é um fator importante, pois em trabalho anterior utilizando acetato de etila em lugar de metanol não observamos a epimerização de C-3 e por consequência a não houve redução de **7a**.²⁵



Esquema 15. Possíveis isômeros formados a partir da redução de **7a** na forma enólica.

Em sua forma enólica **7a** pode apresentar-se sob a forma dos dois isômeros geométricos *Z* e *E*. Entretanto, sabe-se que nas reações onde o paládio é o catalisador há essencialmente o controle termodinâmico e não cinético.²⁶ Ou seja, o composto *Z*-**7a** provavelmente não é formado porque é

²⁵ Milagre, C. D. F.; Ursini, C. V.; Moran, P. J. S.; Rodrigues, J. A. R. *Tetrahedron Letters* **2004**, 45, 3579.

²⁶ Smith, M.B. *Organic Synthesis* **1994**, McGraw-Hill, Inc.

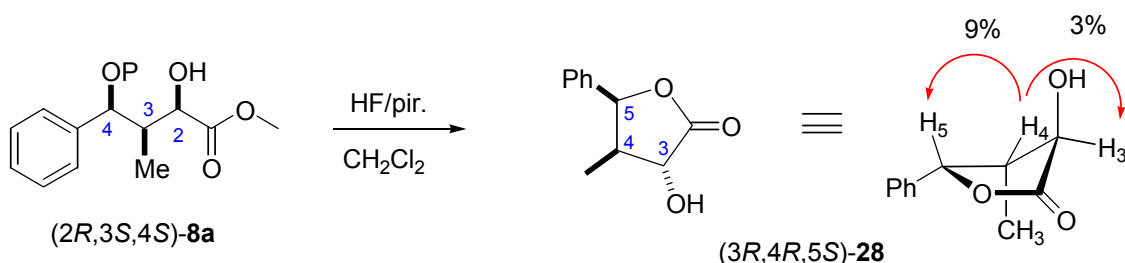
desfavorável energeticamente devido ao grande impedimento estérico entre os grupos OTBDMS e COOMe. A partir dessa proposição elimina-se a formação dos compostos **8c–8d** provenientes de *Z*-**7a**. A partir de *E*-**7a** poderiam ser formados os compostos **8a** e **8b**. Como na hidrogenação catalítica heterogênea a adição de H₂ ocorre de forma sinistêrea (pela mesma face), os hidrogênios estariam sendo direcionados para um ataque pela face menos impedida da molécula, ou seja, a face *si* justificando a formação exclusiva do composto **8a**. A elevada diastereosseletividade obtida demonstra que o grupo TBDMS serve não apenas como um grupo protetor efetivo, mas também como um grupo diretor extremamente eficiente. A estereoquímica relativa de **8a** foi determinada através dos deslocamentos químicos e das constantes de acoplamento nos espectros de RMN de ¹H (Tabela 10).

Tabela 10. Dados de RMN de ¹H de **8a**.

H	δ (ppm)	<i>J</i> (Hz)
2	3,05 (d)	4,4
4	4,90 (d)	7,3

Para confirmação destes resultados e determinação da configuração absoluta realizamos a desproteção de **8a** e concomitante lactonização com HF-piridina em CH₂Cl₂ levando a formação de **28** (Esquema 16). A partir da análise das constantes de acoplamento extraídas do espectro de RMN de ¹H

além das interações espaciais observadas pelo incremento de nOe no experimento de NOESY1D pôde-se estabelecer a estereoquímica relativa 2,3-*syn*-3,4-*syn*. Dessa forma, a relação 3,4-*anti*-4,5-*syn* estabelecida para a lactona **28** deu suporte à confirmação da estereoquímica relativa de **8a** proposta como 2,3-*syn*-3,4-*syn*. A configuração absoluta de **28** foi determinada a partir de (-)-**8a** como 2*R*,3*S*,4*S*. Estes dados estão concordantes com a literatura.²⁷



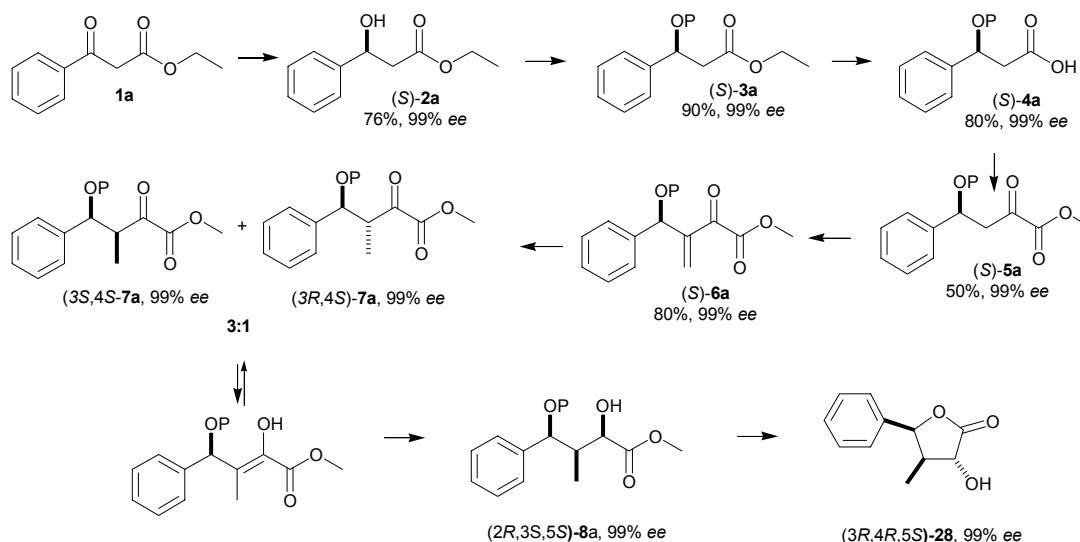
Esquema 16. Desproteção de **8a** e concomitante lactonização.

Tabela 11. Dados de RMN de ^1H de **28**.

H	δ (ppm)	<i>J</i> (Hz)	Lit. ⁴²	
			δ (ppm)	<i>J</i> (Hz)
3	4,20 (d)	9,9	4,24 (d)	9,9
5	5,62 (d)	8,1	5,63 (d)	8,1

²⁷ Matsubara, R.; Vital, P. Nakamura, Y.; Kiyohara, H.; Kobayashi, S. *Tetrahedron* **2004**, 60, 9769.

3.1.7. Conclusões Parciais

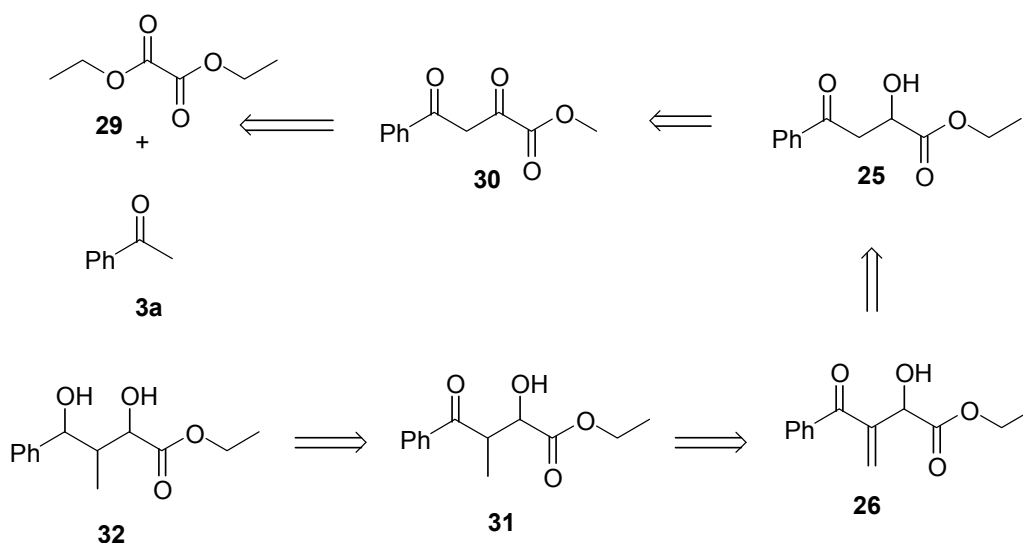


Conseguimos sintetizar o esqueleto do resíduo *N*-terminal de um análogo da Nikkomicina B contendo 3 centros quirais contíguos de forma altamente estereosseletiva. As etapas chave envolveram a bio-redução do benzoilacetato de etila e neste ponto investigamos também a bio-redução dos derivados *p*-nitro e *p*-metoxibenzoilacetato de etila, gerando assim o primeiro centro estereogênico da molécula com configuração *S* e em escala multigramas. As etapas de proteção da hidroxila quiral, hidrólise do éster e homologação da cadeia carbônica foram bem sucedidas e a integridade estereoquímica da molécula foi preservada conforme comparação com os padrões racêmicos sintetizados anteriormente.³³ Obtivemos sucesso com os estudos mecanísticos envolvendo a otimização da reação de α -metilação para α , β , e γ -cetoésteres. Esta metodologia tem sido utilizada pelo grupo na

realização de estudos sobre bioeduções de compostos carbonílicos α,β -insaturados. As tentativas de promover a redução do α -metilenocetoéster utilizando leveduras foram improdutivas, entretanto a redução catalisada por Pd/C foi extremamente estereosseletiva gerando um único isômero do α -hidroxi- β -metil- γ -hidroxi-fenilbutanoato de etila que sofreu ciclização espontânea durante a etapa de desproteção do TBDMS gerando a lactona **28** com configuração *2R,3R,4S*. O grupo protetor TBDMS e a escolha de metanol como solvente exerceram papel fundamental na etapa de hidrogenação catalítica.

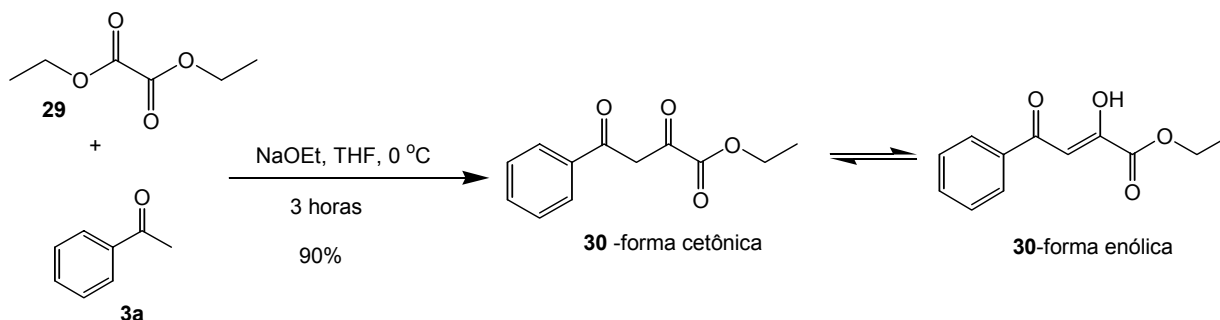
3.2. Rota B

Uma segunda estratégia para a obtenção do resíduo *N*-terminal da nikkomicina B (Rota B) pode ser visualizada pela análise retrossintética a seguir (Esquema 17). Nesta nova abordagem o composto **32** seria obtido a partir de redução quimio e enantiosseletiva do β -metileno- α -cetoéster **26**, que por sua vez originar-se-ia do α -hidroxiéster **25**. O α -hidroxiéster **25** seria obtido através de redução de **30** que é proveniente da condensação do dietiloxalato **29** e acetofenona **3a**.



Esquema 17 Análise retrossintética para a obtenção do resíduo *N*-terminal de um análogo da nikkomicina B a partir da condensação entre o dietiloxalato e acetofenona (rota B).

3.2.1. Síntese do 2,4-dioxo-fenilbutanoato de etila, **30**



Esquema 18. Síntese do 2,4-dioxo-fenilbutanoato de etila **30**.

A síntese de α,γ -dioxoésteres a partir da condensação de Claisen entre cetonas e ésteres está bem documentada na literatura.²⁸ O 2,4-dioxo-fenilbutirato de etila **30** foi sintetizado a partir da adição de uma solução de etóxido de sódio recém preparada a uma solução de dietiloxalato **29** e acetofenona **3a** em THF. Esta reação foi escalonada sem problemas e o composto **30** (10,0 g) foi isolado em 92% de rendimento como um sólido amarelo de baixo ponto de fusão (35-37°C).

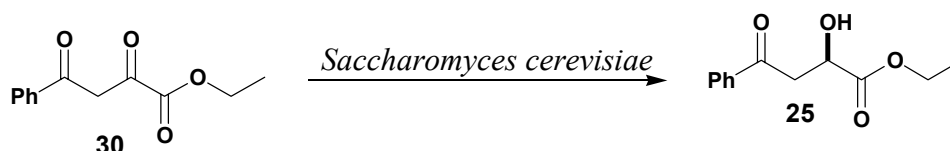
Embora representemos **30** por uma única estrutura, este composto pode ser constituído por uma mistura de tautômeros em equilíbrio (forma cetônica, e forma enólica que é estabilizada por ligação de hidrogênio intramolecular devido à presença do grupo carbonila na posição β) conforme

²⁸ a) Fadnavis, N. W.; Radhika, K. *Tetrahedron Asymmetry* **2004**, *15*, 3443. b) Chang, C. Y.; Yang, T. K. *Tetrahedron Asymmetry* **2003**, *14*, 2239. d) Jiang, X. H.; Song, L. D.; Long, Y. Q. *J. Org. Chem.* **2003**, *68*, 7555. c) Blaser, H. U.; Burkhardt, S.; Kirner, H. J.; Mossner, T.; Studer, M. *Synthesis*, **2003**, 1679. d) Indolese, P. H.; Studer, M.; Jallet, H. P.; Siegrist, U.; Blaser, H. U. *Tetrahedron* **2000**, *56*, 6497. e) Studer, M.; Herold, P.; Indolese, A. Burkhardt, S. Ciba Speciality Chemicals Holding, Inc. Switzerland, PCT Int. Appl. WO 9950223, **1999**; *Chem. Abstr.* **1999**, *131*, 243073.

apresentado no Esquema 18. Fadnavis *et al* ao sintetizarem **30** o caracterizaram na forma cetônica enquanto Blazer *et al* descreveram completa enolização segundo seus espectros de RMN. Comparando-se os dados atribuídos a **30** da literatura⁴³ com os nossos espectros no IV e de RMN de ¹H e RMN de ¹³C pudemos observar que a enolização de C-2 de **30** é parcial com presença das duas formas.

3.2.2. Biorredução do 2,4-dioxo-fenilbutanoato de etila, **30**

Uma das etapas chave desta rota sintética é, sem dúvida, a redução quimio e enantiosseletiva de **30**. Tanto as metodologias baseadas em hidrogenação enantiosseletiva empregando catalisadores de Pt modificados, quanto biocatálise em solventes orgânicos mostraram-se quimio e estereosseletivas.⁴³ Entretanto, enquanto a hidrogenação catalítica fornece bons rendimentos e *ee* (>98%, >88%, respectivamente), os rendimentos da biocatálise são modestos (50-60%) e os *ee* variam entre 70-90%. Neste contexto, seria interessante desenvolver uma rota biocatalítica mais limpa e ambientalmente “segura” como alternativa às rotas envolvendo catalisadores metálicos ou biocatalisadores em solventes orgânicos. Estes resultados são apresentados na Tabela 12.

Tabela 12. Redução de **30** mediada por *Saccharomyces cerevisiae*.

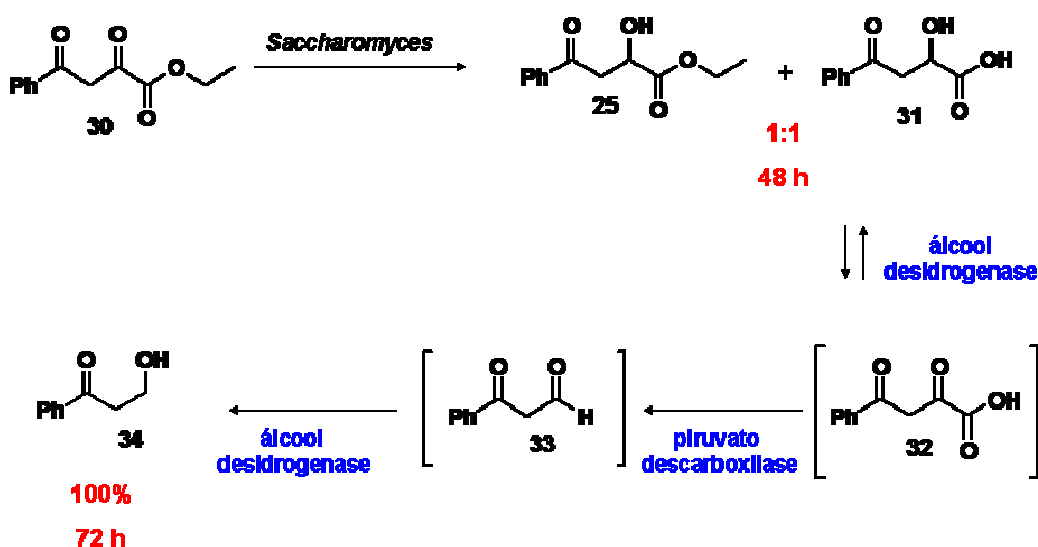
Suporte	Solvente	Inibidor	25 (%)	ee (%)
-	Tampão pH 4,5	-	10	60
alginato	Tampão pH 4,5	-	15	75
-	H ₂ O destilada pH 6,5	-	18	60
alginato	H ₂ O destilada pH 6,5	-	17	72
-	H ₂ O destilada pH 6,5	+	20	90
-	H ₂ O : Éter etílico 10%	+	65	99
-	H ₂ O : Éter etílico 30%	+	43	96
-	H ₂ O : Éter etílico 50%	+	39	95
-	H ₂ O : Éter etílico 70%	+	25	95
-	Éter etílico	+	20	93

Os ee foram determinados por HPLC. Em todos os casos houve adição de glicose.

As reações de redução foram realizadas utilizando *Saccharomyces cerevisiae* liofilizado devido à comodidade por ser disponível comercialmente. As reações em meio aquoso, tanto em tampão pH 4,5 quanto em água destilada pH 6,5, com células livres e imobilizadas em alginato forneceram resultados insatisfatórios em relação ao rendimento e ee. A pré incubação das células com α -cloroacetofenona (inibidor enzimático específico para S- álcool desidrogenase)²¹ resultou em aumento considerável apenas do ee. O rendimento baixo poderia ser justificado pela baixa solubilidade de **30** em água e formação de vários subprodutos segundo os dados de CG-EM. Assim realizamos novos experimentos adicionando éter

etílico ao meio e variamos a proporção entre a água e o solvente orgânico, mas ainda assim os rendimentos mantiveram-se baixos a moderados.

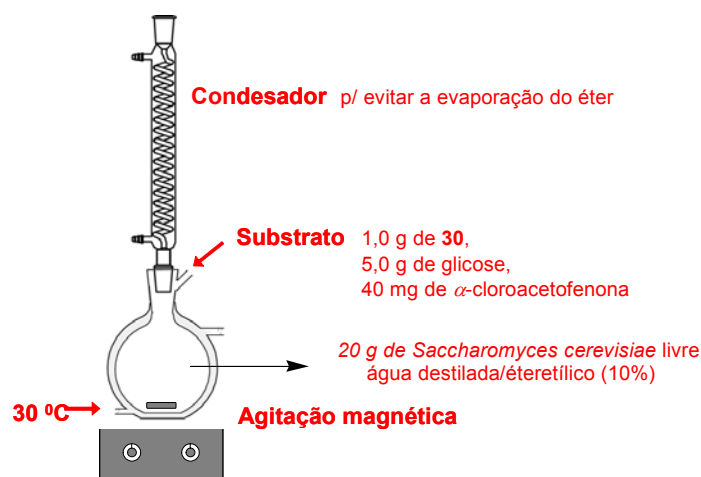
Durante a realização deste estudo, Fadnavis *et al*⁴³ publicaram a redução de **30** com excelentes *ee* e rendimento. Seus estudos concluíram que durante a redução de **30** ocorria uma hidrólise substancial (40-54%) do produto **25** ao ácido carboxílico correspondente **31** (Esquema 19) justificando os baixos rendimentos. Observações similares foram relatadas por Nakamura *et al*.²⁹



Esquema 19. Possíveis enzimas da levedura *Saccharomyces cerevisiae* envolvidas nestas etapas: a) álcool desidrogenase, b) piruvato descarboxilase e c) álcool desidrogenase.

²⁹ a) Nakamura, K.; Kondo, S.; Kawai, Y.; Ohno, A. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1993**, 66, 2738. b) Nakamura, K.; Kondo, S.; Nakajima, N.; Ohno, A. *Tetrahedron* **1995**, 51, 687.

Baseado nestas informações, o óleo obtido como produto da redução foi submetido a esterificação com solução etanólica de HCl a temperatura ambiente por aproximadamente 10 horas (overnight). Após este período a reação foi lavada com solução saturada de NaCl e extraída com acetato de etila fornecendo produto **25** em 80% de rendimento isolado e 98% de *ee* (Esquema 20). Em nossas análises por CG-EM não havíamos detectado a presença de **31** provavelmente devido a sua alta solubilidade em água e ineficiente extração da fase aquosa. Porém, um pico referente ao álcool **34** (Esquema 19) começava a aparecer em torno de 40 horas de reação.



Esquema 20. Condições de reação para redução de **30**

Quando a reação foi mantida por tempo superior a 3 dias, observou-se a descarboxilação de **31** formando **34**, como sugerido no Esquema 19. A produção de **34** não foi objetivo de nosso trabalho, e este composto foi considerado um subproduto da reação. Entretanto, a sua síntese, “em um

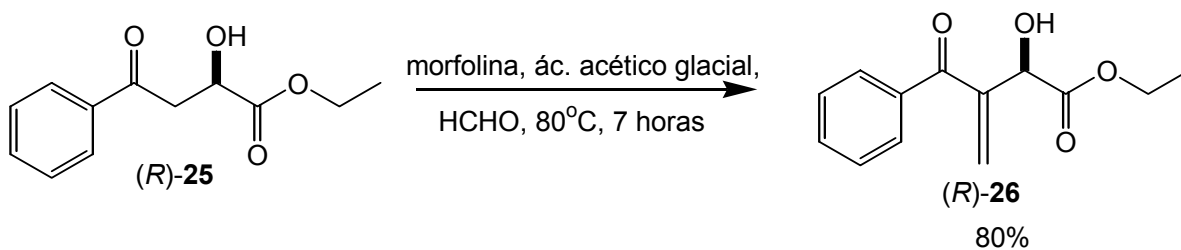
pote” com rendimento superior a 90% é uma alternativa interessante uma vez que **34** é um intermediário na síntese do 1-fenil-1,3-propanodiol, um bloco construtor quiral importante na síntese de fármacos como a Tomoxetina e Fluoxetina.^{43a}

Os excessos enantioméricos de **25** foram determinados por HPLC e a configuração absoluta foi determinada através da comparação do $[\alpha]_D^{20}$ com a literatura.⁴⁸ A partir desta comparação atribuiu-se a configuração *R* para o carbono 2 de **25**.

Tabela 13. Dados de rotação ótica de **25**.

	$[\alpha]_D^{20}$	Conf. Absoluta
25	-5,5 (c 1,0, CHCl ₃)	<i>R</i>
Lit. ²⁷	-5,4 (c 1,0, CHCl ₃)	<i>R</i>

3.2.3. α -Metilação de (*R*)-(-)-2-hidroxi-4-oxo-4-fenilbutanoato de etila, **25**



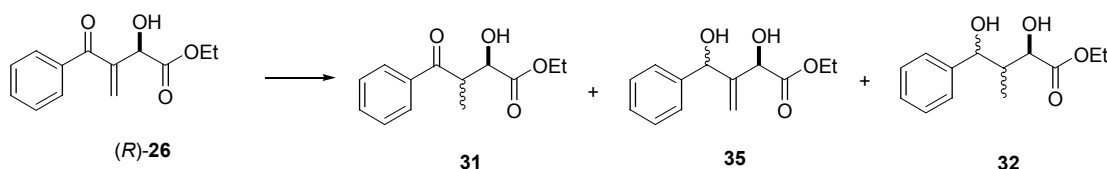
Esquema 21. α -metilação de (*R*)-**25**.

Em seguida realizamos a α -metilenação de (*R*)-**25** para obtenção de (*R*)-**26**, através de α -metilenação direta via acetato de morfolínio, conforme descrito e discutido anteriormente (pág. 39). A estereoquímica da molécula foi preservada. A configuração absoluta de **26** foi determinada como sendo *R* através de medida de rotação ótica $[\alpha]_D^{20} = -21,0$ (c 2,4, MeOH) e por correlação ao material de partida (*R*)-**25** $[\alpha]_D^{20} = -5,5$, c 1,0, CHCl₃).

3.2.4. Bioedução de (*R*)-(-)-2-hidroxi-3-metileno-4-oxo-4-fenilbutanoato de etila, **26**

O composto (*R*)-**26** possui dois grupos passíveis de serem reduzidos. A ligação dupla metilênica em geral é reduzida mais facilmente do que a carbonila, mas é esperado a redução das duas funções.³⁰ Nosso objetivo nesta etapa do trabalho foi avaliar a quimio, diastereo e enantiosseletividade de algumas leveduras na redução deste composto carbonílico α - β -insaturado. Os resultados são apresentados na Tabela 14.

³⁰ Siqueira Filho, E. P.; Rodrigues, J. A. R.; Moran, P. J. S. *Tetrahedron Asymm.* **2001**, *12*, 847-852.

Tabela 14. Reações de redução microbiológica de (R)-26, utilizando diferentes leveduras.

Levedura ^a	Rend. (%)	31 <i>anti:syn</i> ^b	31 <i>ee</i> (%)		35 e/ou 32	Tempo (h)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	-	-	-	-	-	48
<i>Candida parapsilosis</i>	73	77 : 23	99	99	-	24
<i>Trichosporum cutaneum</i>	75	74 : 26	97	97	-	30
<i>Rhodotorula glutinis</i>	76	85 : 15	>99	99	-	24
<i>Geotrichum candidum</i>	70	48 : 52	95	90	-	36

a) Células em crescimento, meio de cultura YM, 0,4 mmol (100 mg) de substrato/ 1mL de etano, agitação orbital, 28 °C; b) Os excessos diastereoisoméricos e enantioméricos foram determinados por HPLC.

Os resultados apresentados na Tabela 14 sugerem a presença de eno redutases, enzimas que reduzem seletivamente C=C na presença de outros grupos passíveis de sofrerem redução como as carbonilas, no sistema enzimático destas leveduras. Dados da literatura³¹ mostram que estas enzimas estão envolvidas na biossíntese de ácidos graxos. Para que as ligações duplas sejam efetivamente reduzidas por eno redutase elas devem ser ativadas por algum grupo retirador de elétrons a fim de torná-las susceptíveis a um ataque nucleofílico do cofator NADH.

³¹ a) Simon, H.; White, H.; Lebertz, H.; Thanos, I. *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **1987**, 26, 785. b) Simon, H. *Indian J. Chem.* **1993**, 32B, 170.

Analisando a Tabela 14, verificamos que a levedura *Saccharomyces cerevisiae* foi incapaz de realizar qualquer biotransformação de (*R*)-**26** nas condições reacionais utilizadas. Apesar da levedura *Geotrichum candidum* apresentar boa enantiosseletividade, não foi observada nenhuma diastereosseletividade. As leveduras *Candida parapsilosis*, *Trichosporum cutaneum* e especialmente *Rhodotorula glutinis* apresentaram boa enantio e diastereosseletividade fornecendo o produto *anti*-(2*R*,3*S*)-**31** predominantemente.

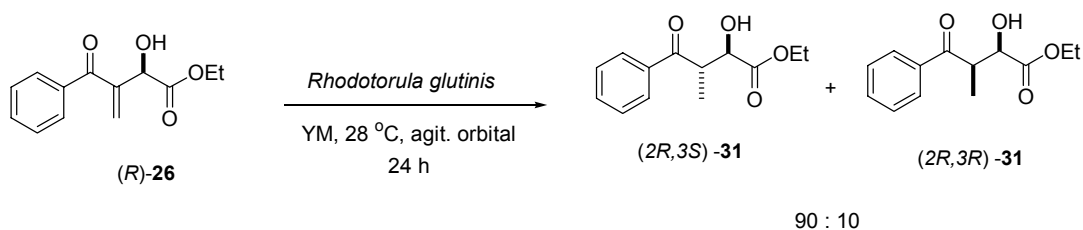
Sabe-se que cetonas α,β -insaturadas são geralmente reduzidas em duas etapas: primeiro a redução da ligação dupla seguida por uma etapa lenta de redução da carbonila.³² Somente em casos raros, quando a ressonância das cetonas α,β -insaturadas é desestabilizada por grupos retiradores de elétrons (principalmente halogênios) ligados a ligação dupla, ocorre a redução da carbonila em primeiro lugar,³³ justificando a não formação de **35**.

A redução de carbonilas por leveduras ocorre via doação de hidreto dos cofatores para a molécula em questão. No composto **26** a carbonila benzílica não está tão ativada justificando assim a ausência de **32**. Nas condições utilizadas não foi observado a formação dos produtos **35** e/ou **32**.

A bio redução de (*R*)-**26** foi repetida em maior escala utilizando-se a levedura *Rhodotorula glutinis* e obtivemos **31** em proporção diastereoisomérica de 90:10 em favor do isômero *anti*.

³² Faber, K. Biotransformations in Organic Chemistry, 4th Edition, Springer-Verlag, Berlin, **2000**.

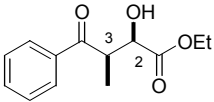
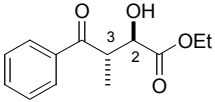
³³ a) Kergomard, A.; Renard, M. F.; Veschambre, H. *J. Org. Chem.* **1982**, 47, 792. b) Sih, C. J.; Heather, J. B.; Sood, R.; Price, P.; Peruzzotti, G.; Lee, H. F. H.; Lee, S. S. *J. Am. Chem. Soc.* **1975**, 97, 865.



Esquema 22. Redução de $(R)\text{-26}$ mediada por *Rhodotorula glutinis*.

A configuração relativa dos compostos *syn*-**31** e *anti*-**31** foi determinada através da análise dos dados de RMN de ^1H . Os deslocamentos químicos e as constantes de acoplamento estão consistentes com os dados da literatura.⁴² Os excessos diastereoisoméricos e enantioméricos foram determinados por HPLC.

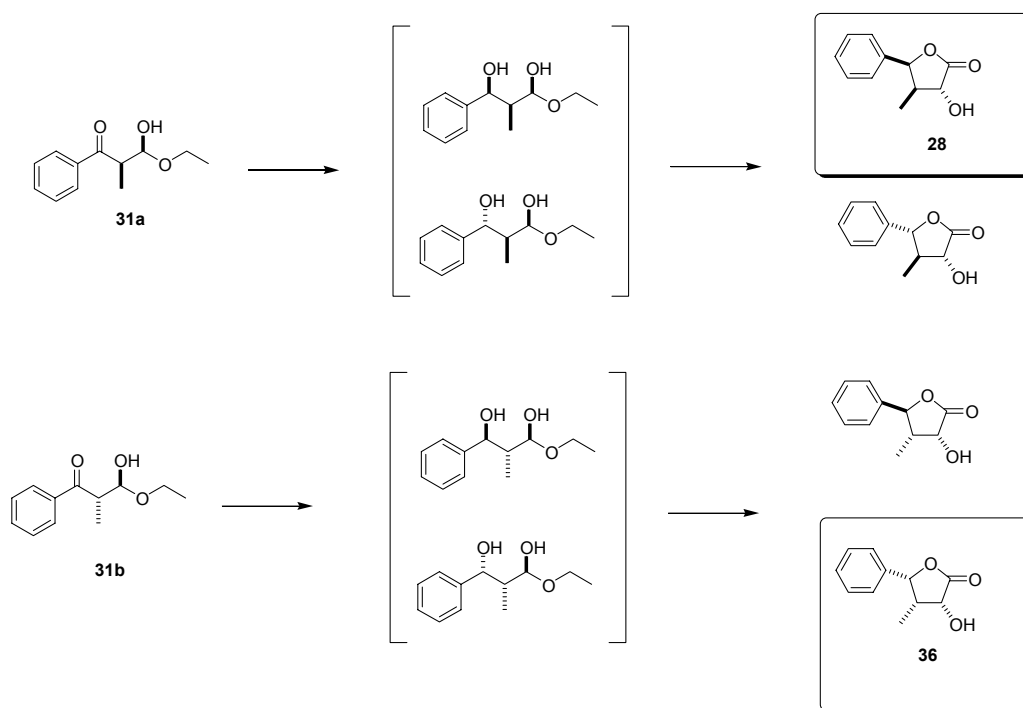
Tabela 15. Dados de RMN de ^1H de **31a** e **31b**.

	 31a		 31b	
	δ (ppm) H-2	$J_{2,3}$ (Hz)	Lit. ⁴²	
	δ (ppm) H-2	$J_{2,3}$ (Hz)	δ (ppm) H-2	$J_{2,3}$ (Hz)
<i>syn</i>	3,21 (d)	4,4	3,28 (d)	4,2
<i>anti</i>	3,56 (d)	8,7	3,61 (d)	8,3

A configuração absoluta do carbono 2 de **31** foi determinada anteriormente como *R*. Sendo **31a** o diastereoisômero *syn* atribuímos a configuração *R* para o carbono 3. O mesmo procedimento foi realizado com o composto **31b**. Portanto, os compostos possuem a seguinte configuração absoluta: (2*R*,3*R*)-2-hidroxi-3-metil-4-oxo-fenilbutanoato de etila (*syn*-**31**) e (2*R*,3*S*)-2-hidroxi-3-metil-4-oxo-fenilbutanoato de etila (*anti*-**31**).

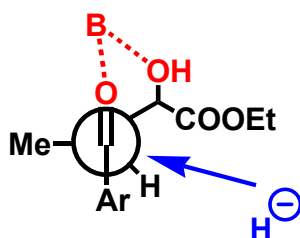
3.2.5. Redução de 2-hidroxi-3-metil-4-oxo-4-fenilbutanoato de etila, mistura *syn/anti*-**31**

Como a carbonila benzílica de **31** não foi reduzida pelas leveduras testadas nestas condições experimentais, alteramos nossa estratégia e realizamos uma redução química com nBu_4NBH_4 . Sabe-se que γ -hidroxiésteres lactonizam-se facilmente em meio ácido, devido à formação favorável do anel de cinco membros.³⁹ A redução da cetona de **31** (*de* = 90:10 *anti:syn*, e *ee* 99%) com nBu_4NBH_4 em etanol provocou ciclização da molécula fornecendo uma apenas as lactonas **36** (sólido branco) e **28** (óleo amarelado) mantendo a razão diastereoisomérica de 92:8 (*anti:syn*) em relação ao material de partida **31** (Esquema 23).



Esquema 23. Redução de **31** e concomitante lactonização.

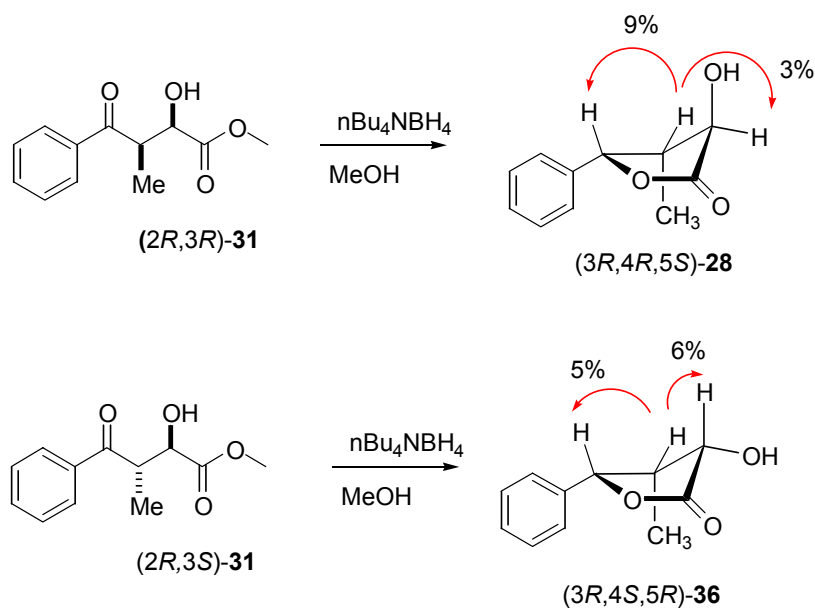
Esta elevada seletividade 1,3-*anti* na redução mediada por $n\text{Bu}_4\text{NBH}_4$ fornecendo os produtos anti-Felkin pode ser explicada pelo modelo de Cram-quelado devido à presença do substituinte (OH) na posição β (Esquema 24).



Esquema 24: Modelo de Cram-quelado

Os valores das constantes de acoplamento e deslocamentos químicos extraídas do espectro de RMN de ^1H da lactona **28** além do tempo de retenção no CG-EM e os dados de RMN de ^{13}C são coincidentes com os dados obtidos para a lactona **8a** gerada na Rota A e com a literatura. Assim, pôde-se estabelecer a configuração de **28** como *2R,3R,4S*.

A configuração relativa de **36** foi determinada como *3,4-syn-4,5-syn* a partir da análise das constantes de acoplamento extraídas do espectro de RMN de ^1H além das interações espaciais observadas pelo incremento de *nOe* no experimento de NOESY1D e comparação com a literatura.⁴²

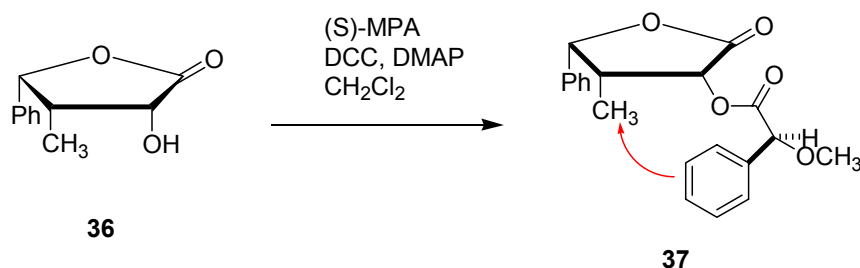


Esquema 25. Determinação da configuração relativa de **28** e **36**.

Tabela 16. Dados de RMN de ^1H de **36** e **28**.

H	δ (ppm) 39	J (Hz)	δ (ppm) 28	J (Hz)
3	4,79 (d)	6,6	4,20 (d)	9,9
4	2,98-3,02 (m)	-	2,70-2,92 (m)	-
5	5,57 (d)	4,8	5,62 (d)	8,1

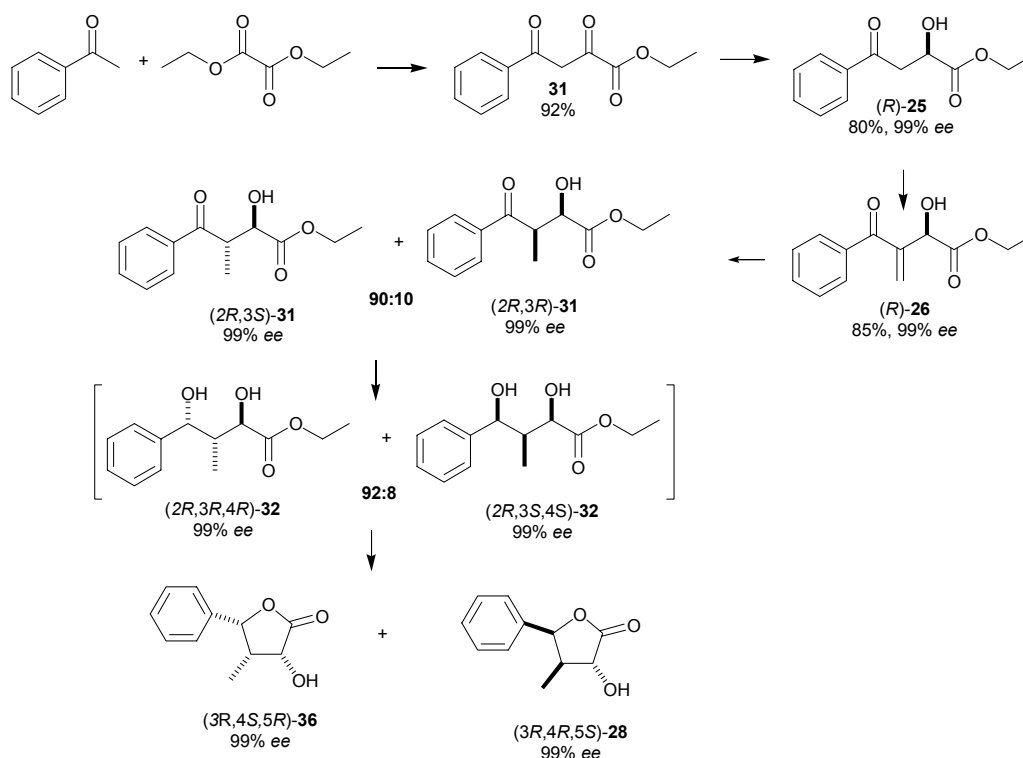
A configuração absoluta de **36** foi determinada utilizando a o auxiliar quiral (*S*)-MPA (ácido α -metoxifenilacético)³⁴ e comparação destes dados com a literatura. O efeito anisotrópico do anel aromático do (*S*)-MPA sobre a metila foi observado pela diferença de 0,61 ppm no deslocamento do sinal da metila em direção ao TMS comprovando que os mesmos estão sinperiplanar. Assim, pôde-se determinar a configurações absoluta de **36** como (3*R*,4*S*,5*R*).



Esquema 26. Determinação da configuração absoluta de **36** por RMN de ^1H utilizando (*S*)-MPA.

³⁴ Para uma revisão sobre determinação de configuração absoluta através de RMN veja: Rigueria, R.; Seco, J. M.; Quiñoá, E. *Chem. Rev.* **2004**, *104*, 17-117.

3.2.6. Conclusões Parciais



Assim como na rota A, conseguimos sintetizar com êxito o esqueleto do resíduo *N*-terminal de um análogo da Nikkomicina B contendo 3 centros quirais contíguos de forma altamente estereosseletiva. Enquanto naquela rota obtivemos exclusivamente a lactona com configuração 3*R*,4*R*,5*S*, nesta alternativa obtivemos as lactonas 3*R*,4*R*,5*S* e 3*R*,4*S*,5*R* nas proporções de 2 : 98, respectivamente. As etapas chave envolveram as reduções químico e enantiosseletivas (i) do 2,4-dioxofenilbutanoato de etila **26** que foi realizada com sucesso utilizando a levedura *Saccharomyces cerevisiae* livre em sistema bifásico (água-éter etílico) e (ii) do β-metileno-α-hidroxi-4-oxo éster

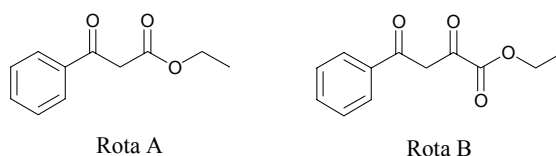
31 que foi reduzido com razão diastereoisomérica 9:1 (*anti:syn*) e ee > 99% com a levedura *Rhodotorula glutinis*. A etapa seguinte envolvendo a redução da carbonila benzílica de **31** com nBu₄NBH₄ e forneceu os produtos anti-Felkin com manutenção da razão diastereoisomérica do material de partida e ee > 99%. A formação das lactonas **36** e **28** ocorreram simultaneamente à redução de **31** devido à ciclização favorável do anel de 5 membros.

4. Considerações finais

Este trabalho de doutorado foi baseado no desenvolvimento e aplicação de metodologias para a obtenção de moléculas dotadas de centros estereogênicos, que além de representarem um grande desafio sintético, são intermediários importantes na síntese de vários compostos com atividade biológica destacada.

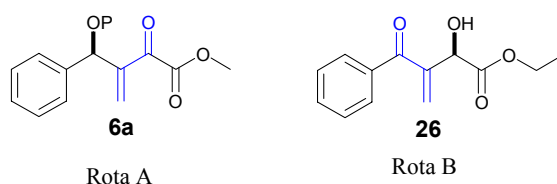
A síntese enantio e diastereosseletiva do esqueleto de um análogo do resíduo *N*-terminal da nikkomicina B foi realizada com êxito através de duas rotas lineares distintas. As rotas utilizadas para a construção dos centros estereogênicos têm alguns pontos em comum como a bio-redução de cetoésteres e compostos carbonílicos α,β -insaturados. Também é um ponto comum a α -metilação de ésteres através de reação tipo Mannich. Mas cada rota apresenta também suas peculiaridades: homologação da cadeia carbônica com manutenção da integridade esteroquímica para a rota A e redução diastereosseletiva utilizando $n\text{BuNBH}_4$ para a rota B.

Em ambas as rotas iniciamos pela bio-redução de carbonilas mediada por leveduras com bons rendimentos e enantiosseletividade. Na primeira abordagem a construção dos centros assimétricos deu-se pela “direita”, ou seja, com a bio-redução da carbonila benzílica enquanto que na segunda abordagem iniciou-se pelo lado contrário, pela “esquerda”, devido à diferença de eletronegatividade entre as carbonilas α e γ .



Os estudos mecanísticos envolvendo a otimização da metodologia de α -metilenação *via* acetato de morfolínio e *p*-formaldeído possibilitaram a sua aplicação para α,β e γ -cetoésteres e está sendo empregada no grupo nos estudos sobre reduções compostos carbonílicos α,β -insaturados.

A etapa envolvendo a bio-redução dos α -metilenocetoésteres mostrou que a relação estrutura-atividade enzimática é fundamental. Na presença do grupo protetor TBDMS **6a** nenhuma levedura exerceu atividade enquanto para o composto **26** todas as leveduras foram capazes de realizar a redução quimiosseletiva da ligação dupla metilênica em graus diferenciados de diastereosseletividade. Entretanto, o grupo TBDMS foi um importante indutor quiral na hidrogenação de **6a** catalisada por Pd/C. Outro fator importante na redução de **6a** foi a escolha do solvente.



Em ambos os casos houve lactonização espontânea das moléculas devido à formação favorável do anel de cinco membros. Obtivemos exclusivamente as lactonas com configurações absolutas (*3R,4R,5S*) e (*3R,4S,5R*). As estratégias sintéticas empregadas para a obtenção destes esqueletos foram efetivas, atingindo o produto desejado com rendimento global (11,5 %, 7 etapas, Rota A) e (22%, 5 etapas, Rota B).

5. Parte Experimental

5.1. Considerações gerais

Espectrometria de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN de ^1H)

Os espectros de RMN de ^1H foram registrados nos espectrômetros Varian Gemini 300P – Varian Instruments ($B_0 = 7,05\text{ T}$), operando a 300,067 MHz.

Os deslocamentos químicos (δ) de hidrogênio foram registrados em ppm utilizando como referência interna tetrametilsilano (TMS, $\delta = 0,00$) e referência externa CDCl_3 ($\delta = 7,27$).

As constantes de acoplamento (J) foram medidas em Hertz (Hz) e os sinais foram caracterizados como: dubleto (d), duplo dubleto (dd), multipletto (m), quarteto (q), singletto (s), singletto largo (sl), tripletto (t). Em todos os casos a primeira sigla está associada à multiplicidade de maior constante de acoplamento.

Espectrometria de Ressonância Magnética Nuclear de Carbono (RMN de ^{13}C)

Os espectros de RMN de ^{13}C foram registrados nos espectrômetros Varian Gemini 300 operando a 76,452 MHz e Varian INOVA-500 operando a 125,696 MHz.

Os sinais de deslocamentos químicos de carbonos foram registrados em ppm, sendo δ 0,00 para o TMS e δ 77,0 para CDCl_3 .

As interpretações dos espectros de RMN de ^{13}C foram realizadas com auxílio da técnica DEPT 135° onde: CH_3/CH = sinal positivo (+), CH_2 = sinal negativo (-) e C_0 = carbono quaternário ausente (intensidade nula) e DEPT 90° onde: CH_3/CH = + e CH_2 e C_0 = intensidade nula.

Cromatografia Gasosa Acoplada ao Espectrômetro de Massas – CG/EM

As análises por CG/EM foram realizadas utilizando-se um cromatógrafo gasoso modelo GC/MS – QP 5000 - Shimadzu acoplado a um detector seletivo de massas cuja fonte de impacto de elétrons opera com energia de ionização a 70 eV e em cromatógrafo Agilent acoplado a um detector seletivo de massas HP 5973 também operando com uma fonte de elétrons com energia de ionização de 70 eV. O espectrômetro de massas operou na faixa de m/z 45-500. Para CG foi utilizada uma coluna capilar de sílica fundida HP-5 MS (30 m x 0,25 mm x 0,25 μm , 5% fenil-metilsiloxano). O cromatógrafo operou com fluxo constante de gás He de 1 mL/min, temperatura do injetor igual a 230 °C e a temperatura da interface igual a 280 °C. As injeções das amostras foram de 1 μL na concentração de 0,5 – 1 mg / mL.

Cromatografia líquida de alta eficiência – CLAE (HPLC)

As análises por HPLC foram realizadas utilizando-se um cromatógrafo Shimadzu LC 20AT e coluna analítica Chiracel OJ-H (Daicel). Os solventes utilizados eram de grau para HPLC. Os comprimentos de onda (λ) foram determinados previamente para cada composto em um espectrofotômetro UV-VIS HP8453.

Espectrometria no Infravermelho - (IV)

Os espectros de absorção na região do infravermelho foram registrados em um espectrofotômetro modelo BOMEN MB-series, com transformada de Fourier, em filmes sobre cela de NaCl (4000 a 400 cm^{-1}).

Rotação Óptica – $[\alpha]_D^{20}$

Os valores de rotação óptica foram determinados em um polarímetro Perkin Elmer modelo 341 com lâmpada de sódio (λ 589 nm, precisão de 0,005°).

Ponto de Fusão

As medidas de ponto de fusão foram realizadas em um equipamento MQPF 301 Microquímica Ind. E com. Ltda.

Análises de ESI(+)-MS

Os experimentos de ESI(+)-MS e ESI(+)-MS/MS no modo positivo foram realizados em um espectrômetro de massas QTrap (Applied Biosystems). Os experimentos de espectrometria de massas em cascata foram realizados através de (i) seleção de massas dos produtos desejados em um Q1, (ii) dissociação por colisão induzida com N₂ em um Q2 e (iii) análise das massas dos fragmentos iônicos gerados por dissociação por colisão induzida (CID) em um ion-trap linear. As condições utilizadas nestes experimentos foram fluxo de N₂ de 20 mL/min, 4500 eV de voltagem do electrospray, 21 eV de potencial de declustering, 10 eV de potencial de entrada e 12 eV de potencial de saída da cela de colisão. Uma microseringa foi utilizada para injetar a solução reacional diretamente na fonte de ESI (electrospray) em um fluxo de 10 µL/min. A dissociação por colisão induzida foi realizada com N₂ com energias variando entre 20 a 35 eV.

Métodos Cromatográficos

As cromatografias em DSC (cromatografia em sílica seca)¹ foram realizadas com sílica gel 230-400 mesh da marca Merck com gradiente de eluição em hexano/acetato de etila.

As placas cromatográficas em camada delgada preparativa (CCDP) foram preparadas com sílica gel G (15 g) e GF₂₅₄ (25 g) da marca Merck com 1 mm de espessura, sobre placas de vidro de 20 X 20 cm.

¹ Harwood, L.M. *Alchimica Acta* **1985**, 18, 25.

Todas as purificações realizadas foram acompanhadas por cromatografia em camada delgada (CCD) em cromatoplasmas de 20 X 20 cm, da marca Merck, sobre suporte de alumínio com filme de sílica gel 60 F₂₅₄.

A detecção nas placas dos compostos com grupos cromóforos foi feita utilizando-se irradiação ultravioleta no equipamento Spectroline model ENF-260C com irradiação no comprimento de onda (λ) de 254 nm.

Microrganismos

Saccharomyces cerevisiae

A levedura *Saccharomyces cerevisiae* foi utilizada na forma liofilizada, disponível comercialmente da marca EMULZINT®.

Os demais microrganismos utilizados neste trabalho pertencem à Coleção de Culturas Tropical (CCT, <http://www.cct.org.br>), da Fundação Tropical “André Tosello”, Parque Taquaral, Campinas, SP.²

Crescimento dos Microrganismos para as Reações de Biocatálise

Meios de Cultura: YM (Yeast medium)

Glicose (2,0 g), extrato de levedura (3,0 g), extrato de malte (3,0 g), peptona bacteriológica (5,0 g) e água destilada q.s.p 1L.

² Coleção de Culturas Tropical – Fundação Tropical de Pesquisa e Tecnologia “André Tosello” – *Catálogo de Linhagens*, 1996, 1ª edição, Campinas, SP, Brasil.

Solução Tampão citrato – fosfato pH 4,5 (0,05M)³

8,82 mL Na₂HPO₄ (0,2M); 11,18 mL ácido cítrico (0,1M); q.s.p. 20 mL

Esterilização

Os meios de cultura foram esterilizados em autoclave Quimis a 120°C e 1,0 Kg/cm², por 15 minutos.

Agitação Orbital

Os experimentos com microrganismos foram realizados em agitação orbital em Incubadora Shaker MA 420, da marca Marconi, a 300 rpm e 30°C.

Outros

As reações em atmosfera inerte foram realizadas sob atmosfera de Ar ou N₂ em vidraria pré-seca em estufa e/ou soprador térmico. As temperaturas são reportadas como temperatura de banhos. DMF foi secada por destilação à pressão reduzida após permanecer sobre BaO e posteriormente estocada em peneira molecular do tipo 4A. MeOH foi seco por destilação sobre Mg metálico e iodo. CH₂Cl₂ foi seco por destilação sobre CaH₂.⁴ THF foi seco por tratamento prévio em alumina básica e KOH, seguido de destilação sobre Na°. As fases orgânicas proveniente da extração das fases aquosas foram secados sobre MgSO₄ e evaporadas à vácuo em rotaevaporador a 40°C ou menos.

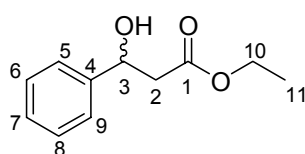
³ Britton, H.T.S. *Hydrogen Ions*, 4th edition, Vol. 1, D. Van Nostrand Co., Princeton, N.Y., 1956.

⁴ Vogel, A.I. *Vogel's Textbook of Practical Organic Chemistry*, 4th ed., Longman, London, 1978.

5.2. Procedimento Experimental e Dados Espectroscópicos dos Compostos Sintetizados e Isolados

5.2.1. Procedimento geral para redução com NaBH₄

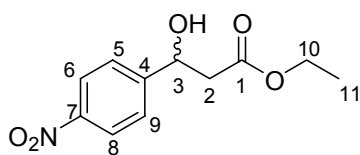
1 mmol de substrato foram solubilizados em 5 mL de etanol e resfriados a 0°C com banho de gelo. A esta solução adicionou-se lentamente 1 mmol (48 mg) de borohidreto de sódio e o sistema permaneceu a 0°C e sob agitação magnética vagarosa. Ao final da redução o solvente foi evaporado em rotaevaporador. O resíduo foi solubilizado em água acidificada (HCl 1M) e extraído com acetate de etila (3 x 5 mL). As fases orgânicas foram combinadas, secas sob sulfato de sódio anidro e evaporadas em rotaevaporador. O resíduo foi purificado por DSC ou CCD dependendo da quantidade, em hexano/EtOAc como eluentes.



(±)-3-hidroxi-3-fenilpropanoato de etila (2a)

FM C₁₁H₁₄O₃; **MM** 194, óleo incolor ligeiramente amarelado; **IV-E01** (filme) $\nu_{\max}$ (cm⁻¹): 3420, 2982, 1727, 1493, 1452, 1370, 1196, 1158; **EM-E02** m/z (%): 194 (M⁺), 120 (14), 107 (100), 88 (24), 79 (66) e 77 (59); **RMN de ¹H-E03** (300,1 MHz, CDCl₃) δ : 1,25 (t, 3H, J = 7,3 Hz, H-11), 2,70 (dd, 2H, J = 4,4 e J = 8,4 Hz, H-2), 4,16 (q, 2H, J = 7,1 Hz, H-10), 5,11 (t, 1H, J = 4,4 Hz, H-3), 7,31 (m, 5H, H-5 a H-9); **RMN de ¹³C-E04** (75,0 MHz, CDCl₃) δ : 14,1 (CH₃, C-11), 43,4

(CH₂, C-2), 60,7 (CH₂, C-10), 70,2 (CH, C-3), 125,5 (CH, C-5 e C-9), 127,5 (CH, C-7), 128,2 (CH, C-6 e C-8), 142,3 (C₀, C-4), 172,1 (C₀, C-1).



(±)-3-hidroxi-3-p-nitrofenilpropanoato de etila

(2b): FM C₁₁H₁₃O₅N; MM 239, óleo amarelo;

IV-E06 (filme) $\nu_{\max}$ (cm⁻¹): 3474, 2987, 1730,

1601, 1521, 1348, 1192, 1105, 1075, 1031, 852, 749, 696; **EM-E07** m/z (%):

239 (M⁺), 222 (27), 210 (5); 165 (12); 150 (100); 134 (), 107 (17); 105 (17);

RMN de ¹H-E08 (300,1 MHz, CDCl₃) δ : 1,27 (t, 3H, J = 7,0 Hz, H-11),

2,95 (dd, 2H, J = 4,4 e 8,8 Hz, H-2); 4,20 (q, 2H, J = 7,0, H-10); 5,24 (t, 1H,

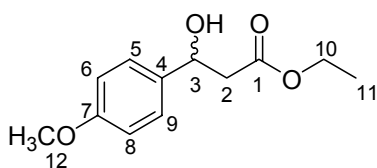
J = 4,4 Hz, H-3); 7,56 (d, 2H, J = 8,4 Hz, H5 e H-9); 8,21 (d, 2H, J = 8,8

Hz, H6 e H-8); **RMN de ¹³C-E09** (75,0 MHz, CDCl₃) δ : 14,7 (CH₃, C-11);

43,5 (CH₂, C-2); 61,8 (CH₂, C-10); 69,9 (CH, C-3); 124,1 (2 CH, C-5 e C-

9); 126,9 (2 CH, C-6 e C-8); 147,8 (C₀, C-7); 150,0 (C₀, C-4), 172,3 (C₀,

C1). HRMS calc. 239.07937 encontrado: 239.07934.



(±)- 3-hidroxi-3-p-metoxifenilpropanoato de etila

(2c): FM C₁₂H₁₆O₄; MM 224, óleo amarelado;

IV-E10 (filme) $\nu_{\max}$ (cm⁻¹): 3475, 2987, 2836,

1731, 1613, 1514, 1302, 1247, 1176, 1034; **EM-E11** m/z (%): 224 (M⁺),

206 (48); 178 (10); 161 (100); 137 (76); 118 (14); 109 (19); 89 (33), 77 (60);

RMN de ¹H-E12 (300,1 MHz, CDCl₃) δ : 1,26 (t, 3H, J = 7,0 Hz, H-11),

2,68 (dd, 2H, J = 4,0 e 9,1 Hz, H-2); 3,80 (s, 3H); 4,17 (q, 2H, J = 7,0 Hz),

5,07 (m, 1H, H-3); 6,88 (d, 2H, J = 8,8 Hz), 7,29 (d, 2H, J = 8,8 Hz, H5 e H-

9); **RMN de ^{13}C -E13** (75,0 MHz, CDCl_3) δ : 14,1 (CH_3 , C-11); 43,3 (CH_2 , C-2); 55,2, 601,8 (CH_2 , C-10); 69,9 (CH , C-3); 113,9 (2 CH , C-5 e C-9); 126,9 (2 CH , C-6 e C-8); 134,7 (C_0 , C-7); 159,2 (C_0 , C-4), 172,4 (C_0 , C1).

5.2.2. Procedimento geral para triagem de leveduras

Os experimentos para triagem de leveduras com os substratos **1a-1c** foram realizados em erlenmeyers de 200 mL contendo 50 mL de tampão citrato-fosfato (pH 4,5; 0,1 mol/L) ou água destilada (pH 6,5) e 5,0 g de massa úmida de leveduras. Os erlenmeyers foram incubados a 30 °C em shaker sob agitação orbital por 16-40 horas.

5.2.3. Procedimento geral de imobilização em alginato de sódio

A uma suspensão de 2,0 g de leveduras solubilizadas em 28,8 mL de água destilada, adicionou-se 28,8 mL de uma solução 2% de alginato de sódio (0,56 g). A mistura acima foi extrudada, em uma solução de CaCl_2 0,2 mol/L. As esferas formadas permaneceram por 40 minutos na solução de CaCl_2 . Após este período as esferas de alginato foram filtradas e lavadas com água destilada para remoção do excesso de CaCl_2 .

5.2.4. Procedimento geral para determinação do coeficiente de partição alginato – produtos/substratos

Foram preparadas esferas de alginato de cálcio, porém sem leveduras, conforme descrito no item 5.2.3 e adicionadas a 250 mL de água destilada (pH 6,5). A esta solução adicionou-se 2,5 mmol de **1a** e 2,5 mmol de **2a**, solubilizados em 3 mL de etanol. Este sistema permaneceu sob agitação orbital, a 30 °C. A fase aquosa (alíquotas de 1,0 mL) foi analisada a cada 1 hora por CG-EM por um período de 24 horas. Este procedimento foi repetido utilizando 5,0 mmol de **1a** e 5,0 mmol de **2a**. O procedimento descrito acima foi utilizado para **1b/2b** e **1c/2c**.

5.2.5. Procedimento geral para bio redução mediada por células livres de leveduras

Em um reator de 100 mL, 5,0 g (biomassa úmida) de leveduras foram suspensas em água destilada (60 mL, pH 6,5) e mantidas sob agitação magnética a 30 °C. Em seguida 0,5 mmol de substrato (**1a** ou **1c**) dissolvidos em 2,0 mL de etanol ou 0,5 mmol de **1b** dissolvidos em 1,0 mL de etanol – 1,0 mL de DMF, foram adicionados e a reação foi monitorada por CG-EM. Ao final da reação a biomassa foi centrifugada e lavada com acetato de etila. A fase aquosa foi extraída com acetato de etila (3 porções de 30 mL). As fases orgânicas foram combinadas, secas sob sulfato de sódio anidro e evaporadas em rotaevaporador. O resíduo foi purificado por DSC em

diferentes polaridades de solvente (hexano/EtOAc): 20% para **2a**, 35% para **2b** e 50% para **2c**.

5.2.6. Procedimento geral para bioedução mediada por células livres de leveduras com adição de glicose

Em um reator de 100 mL, 5,0 g (biomassa úmida) de leveduras foram suspensas em água destilada (60 mL, pH 4,5) e mantidas sob agitação magnética a 30 °C. 1,5 g de glicose foram adicionados e as leveduras foram ativadas por 2 horas. Em seguida 0,5 mmol de substrato (**1a** ou **1c**) dissolvidos em 2,0 mL de etanol ou 0,5 mmol de **1b** dissolvidos em 1,0 mL de etanol – 1,0 mL de DMF, e a reação foi monitorada por CG-EM. O procedimento utilizado para extração e isolamento do produto são os mesmos descritos no item 5.2.5.

5.2.7. Procedimento geral para bioedução mediada por células livres de leveduras com adição de inibidor

Em um reator de 100 mL, 5,0 g (biomassa úmida) de leveduras foram suspensas em água destilada (60 mL, pH 4,5) e mantidas sob agitação magnética a 30 °C. 10 mg de α -cloroacetofenona foram adicionados e as leveduras foram ativadas por 2 horas. Em seguida 0,5 mmol de substrato (**1a** ou **1c**) dissolvidos em 2,0 mL de etanol ou 0,5 mmol de **1b** dissolvidos em 1,0 mL de etanol – 1,0 mL de DMF, e a reação foi monitorada por CG-EM.

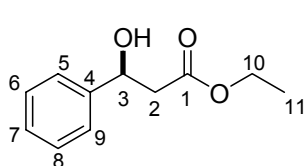
O procedimento utilizado para extração e isolamento do produto são os mesmos descritos no item 5.2.5.

5.2.8. Procedimento geral para bioedução de **1a** em escala multigramas

A uma solução de alginato de sódio (150 mL, 2%) adicionou-se uma suspensão de *Pichia kluyveri* (23 g de massa úmida) solubilizada em água destilada (50 mL). Esta mistura foi extrudada utilizando agulha com diâmetro interno de 0,8 mm em uma solução de CaCl_2 (0,2 mol/L) produzindo esferas com diâmetro médio de 2 mm. Após 30 minutos as esferas foram filtradas e lavadas com água destilada para remoção do excesso de CaCl_2 . Em um reator tipo tanque de 500 mL adicionou-se as esferas de alginato de cálcio, água destilada (300 mL, pH 6,5), glicose (5,0 g), α -cloroacetofenona (40 mg) e esta suspensão foi mantida a 30 °C sob agitação mecânica. Após 2 horas de ativação da levedura o pH do meio foi ajustado com uma solução 10% de NH_4OH e em seguida o substrato **1a** (1,0 g - 5,2 mmol em 3,0 mL de etanol) foi adicionado. A reação foi monitorada por CG-EM e ao final da reação (24 horas) as esferas foram filtradas e lavadas com 50 mL de acetato de etila. A fase aquosa foi extraída com acetato de etila (3 porções). As fases orgânicas foram combinadas, secas sob sulfato de sódio anidro e evaporadas em rotaevaporador. O resíduo foi purificado por DSC com 10% de hexano/EtOA para recuperar **9a** e 20% de hexano/EtOA para recuperar **2a** em 80% de rendimento.

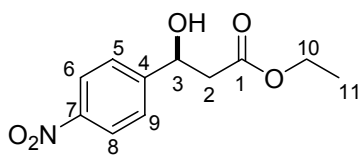
5.2.9 Procedimento geral para determinação de excessos enantioméricos utilizando Eu(hfc)₃

Foram preparadas 5 amostras para RMN contendo em cada uma delas (±)-**2a**, Eu(hfc)₃ e CDCl₃. A proporção entre (±)-**2a** e Eu(hfc)₃ variou de 3:1; 2:1; 1:1; 1:2 e 1:3. A melhor separação dos sinais das metilas (H-11) dos dois enantiômeros foi conseguida com a relação 1:2 (±)-**2a** : Eu(hfc)₃ conforme apresentado no espectro E05. A diferença nos deslocamentos químicos dos CH₃ foi de 0,100 ppm. Este procedimento foi utilizado para **2b** e **2c** e os resultados são coincidentes com **2a**. A partir destes resultados realizamos a determinação dos *ee* com as amostras quirais.



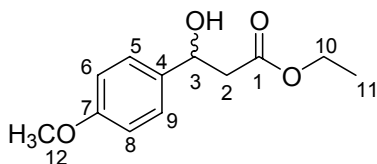
(*S*)-(-)-3-hidroxi-3-fenilpropanoato de etila (**S-2a**)

FM C₁₁H₁₄O₃; *ee* = 99%, $[\alpha]_D^{20} = -20,0$ (c 2,05, MeOH); **Fonte de quiralidade**: redução mediada por *Pichia kluyveri* (CCT 3365); **Configuração absoluta**: (*S*). A caracterização completa foi descrita na página 80 para (±)-**2a**.



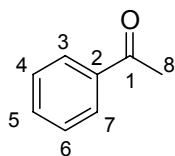
(*S*)-(-)-3-hidroxi-3-*p*-nitrofenilpropanoato de etila

(S-2b): FM C₁₁H₁₃NO₅; *ee* = 99%, $[\alpha]_D^{20} = -12,0$ (c 2,03, MeOH); **Fonte de quiralidade**: redução mediada por *Pichia sitipitis* (CCT 2617); **Configuração absoluta**: (*S*). A caracterização completa foi descrita na página 80 para (±)-**2b**.

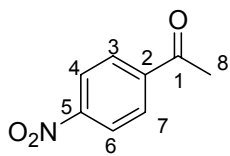


(*S*)-(-)-3-hidroxi-3-*p*-metoxifenilpropanoato de etila (**S-2c**): **FM** C₁₂H₁₄O₄; ee = 99%, [α]_D²⁰ = -33,0 (c 2,04, MeOH); **Fonte de quiralidade**: redução mediada por *Candida utilis* (CCT 3469);

Configuração absoluta: (*S*). A caracterização completa foi descrita na página 81 para ($\pm$)-**2c**.

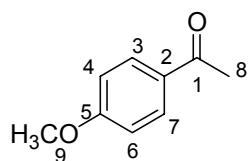


Acetofenona (9a): **FM** C₈H₈O; **MM** 120, óleo incolor; **IV-E14** (filme) $\nu_{\max}$ (cm⁻¹): 1682, 1599, 1582, 1449, 1359, 1266, 955; **EM-E15** *m/z* (%): 120 (M⁺), 105 (85); 77 (100); **RMN de ¹H-E16** (300,1 MHz, CDCl₃) δ : 2,61 (s, 3H, H-8); 7,50 (m, 3H, H-4, H-5 e H-6); 7,95 (d, 2H, *J* = 7,0 Hz, H-3 e H-7); **RMN de ¹³C-E17** (75,0 MHz, CDCl₃) δ : 26,1 (CH₃, C-8), 128,2 (CH, C-4 e C-6), 128,4 (CH, C-3 e C-7), 132,9 (CH, C-5), 136,9 (C₀, C-2), 197,8 (C₀, C-1).



***p*-nitroacetofenona (9b)**: **FM** C₈H₇NO₃; **MM** 165, sólido amarelo, **PF** 78-80 °C; **IV-E18** (filme) $\nu_{\max}$ (cm⁻¹): 3438, 1692, 1607, 1526, 1344, 1259, 1238, 961, 855; **EM-E19** *m/z* (%): 165 (M⁺), 150 (52); 120 (10), 104 (26), 92 (14), 76 (23), 43 (100); **RMN de ¹H-E20** (300,1 MHz, CDCl₃) δ : 2,69 (s, 3H, H-8), 8,12 (d, 2H, *J* = 8.8 Hz, H-4 e H-6), 8,32 (d, 2H, *J* = 8.8 Hz, H-3 e H-7); **RMN de ¹³C-E21**

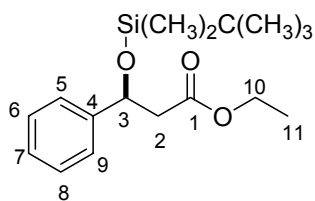
(75,0 MHz, CDCl₃) δ : 27,0 (CH₃, C-8), 123,7 (CH, C-3 e C-7), 129,2 (CH, C-4 e C-5), 141,2 (C₀, C-2), 196,0 (C₀, C-1).



p-metoxiacetofenona (**9c**): **FM** C₉H₁₀O₂; **MM** 150, óleo amarelo, **IV-E22** (filme) ν_{max} (cm⁻¹): 2980, 2841, 1740, 1676, 1576, 1511, 1260, 1173, 1028, 842; **EM-E23** *m/z* (%): 150 (M⁺), 135 (100); 107 (24), 92 (29), 77 (67); **RMN de ¹H-E24** (300,1 MHz, CDCl₃) δ : 2.75 (s, 3H, H-8), 4.06 (s, H-9), 7.14 (m, 2H, H-4 e H-6), 8.12 (d, 2H, *J* = 8.8 Hz, H-3 e H-7); **RMN de ¹³C-E25** (75,0 MHz, CDCl₃) δ : 26.9 (CH₃, C-8), 55.9 (CH₃, C-9), 114.2 (CH, C-3 e C-7), 130.9 (CH, C-4 e C-6), 164.3 (CH₀, C-2); 168.0 (C₀, C-5); 191.2 (C₀, C-1).

5.2.10. Procedimento geral para a proteção do β -hidroxiéster (*S*)-**2a** com TBS

Uma solução de (*S*)-**2a** (2,7 g, 14 mmol) previamente seca em bomba de vácuo por 30 minutos, cloreto de *t*-butildimetilsilila (3,7 g, 24 mmol) e imidazol (2,9 g, 42 mmol) em 15 mL de DMF anidro foi agitada por 3 h a temperatura ambiente e atmosfera de argônio. Em seguida, esta mistura foi dissolvida em hexano destilado (50 mL) e lavada com água (3 porções de 50 mL). A fase orgânica foi secada (MgSO₄) e evaporada. O resíduo foi purificado por DSC (hexano/ETOAc 20%) fornecendo (*S*)-**3a** (2,4 g, 90%).



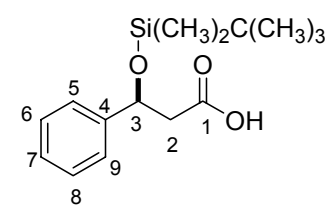
(*S*)-(-)-3-*t*-(butildimetilsilil)oxi-3-fenilpropanoato de etila (**S-3a**): **FM** C₁₇H₂₈O₃Si; **MM** 308, óleo incolor; $[\alpha]_D^{20}$ -26,7 (c 1,02, MeOH), **IV**-E26 (filme) $\nu_{\max}$ (cm⁻¹):

3420, 2957, 2932, 2892, 2858, 1738, 1371, 1258, 1090; **EM**-E27 m/z (%): 251 (24), 293 (4), 181 (11), 117 (18), 103 (35) e 75 (100); **RMN de ¹H**-E28 (300,1 MHz, CDCl₃) δ : -0,09 (s, 3H, CH₃-TBS), 0,02 (s, 3H, CH₃-TBS), 0,86 (s, 9H, *t*-Bu-TBS), 1,25 (t, 3H, J = 7,3 Hz, H-11), 2,54 (dd, 1H, J = 4,0 e J =10,2 Hz, H-2), 2,73 (dd, 1H, J = 4,9 e J =9,1 Hz, H-2), 4,15 (m, 2H, H-10), 5,15 (dd, 1H, J = 4,3 Hz, H-3), 7,30 (m, 5H, H-5 a H-9); **RMN de ¹³C**-E29 (75,0 MHz, CDCl₃) δ : - 4,6 (CH₃, TBS), - 5,1 (CH₃, TBS), 14,3 (CH₃, C-11), 18,1 (C₀, C-14), 25,7 (CH₃, C15-C-17), 46,6 (CH₂, C-2), 60,5 (CH₂, C10), 72,2 (CH, C-3), 125,7 (CH, C-6 e C-8), 127,4 (CH, C-7), 128, 1 (CH, C-5 e C-9), 144,0 (C₀, C-4), 171,0 (C₀,C-1).

5.2.11. Procedimento geral para hidrólise básica de (*S*)-3a

(*S*)-**3a** (2,43 g, 8 mmol) foi dissolvido em etanol (10mL) e resfriado a 0°C. Hidróxido de lítio monohidratado (1,37g, 32 mmol) foi dissolvido em água (5 mL) e adicionado à solução de (*S*)-**3a**, lentamente. Esta mistura foi mantida sob agitação magnética com retorno gradual a temperatura ambiente. Após 15 h, a mistura reacional foi concentrada a vácuo. O resíduo foi tratado com água (10 mL) e hexano (10 mL). A fase aquosa foi acidificada até pH 4,0 e extraída com hexano (3 porções de 10 mL). As fases

orgânicas foram combinadas, secadas (MgSO₄) e evaporada fornecendo (S)-**4a** (1,94 g, 80%). Não houve necessidade de purificação.

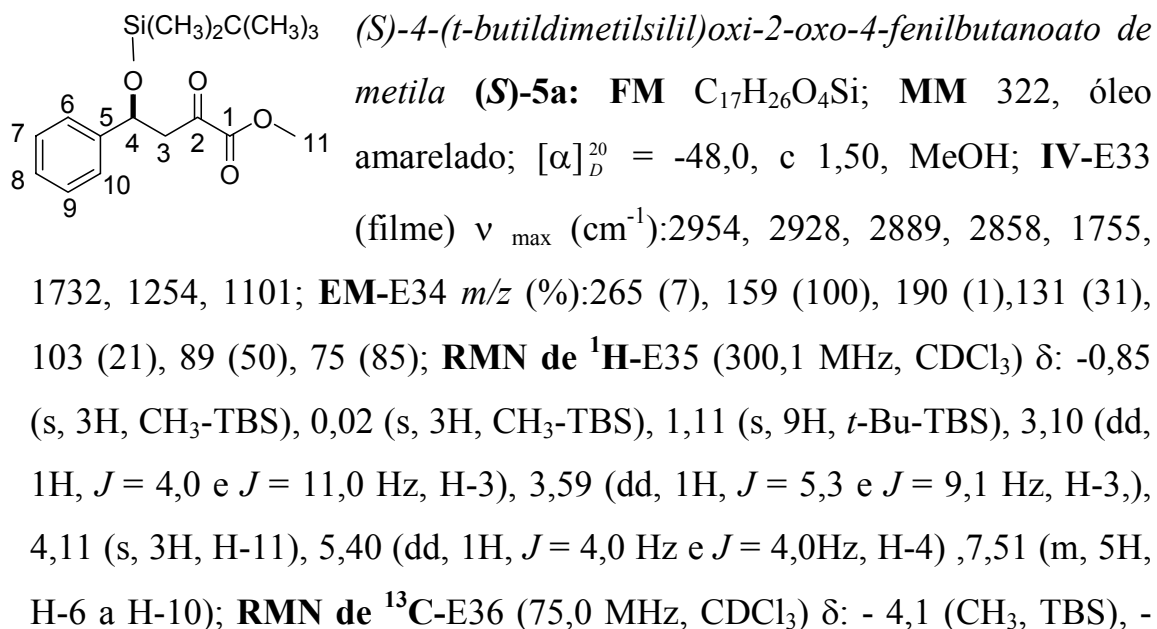
 *Ácido* (S)-(-)-3-t-(butildimetilsilil)oxi-3-fenilpropanóico (**4a**): **FM** C₁₅H₂₃O₃Si; **MM** 279, óleo incolor; $[\alpha]_D^{20} = -16,8$ (c 0,9, MeOH); **IV-E30** (filme) $\nu_{\max}$ (cm⁻¹): 3300-2500, 2952, 2928, 2891, 2856, 1713, 1436, 1364, 1255, 1201, 1165, 1095; **RMN de ¹H-E31** (300,1 MHz, CDCl₃) δ : -0,87 (s, 3H, CH₃-TBS), 0,02 (s, 3H, CH₃-TBS), 1,01 (s, 9H, *t*-Bu-TBS), 2,81 (dd, 1H, H-2, *J* = 4,0 e *J* = 10,9 Hz), 2,99 (dd, 1H, H-2, *J* = 5,8 e *J* = 9,1 Hz), 5,50 (dd, 1H, H-3, *J* = 4,0 Hz e *J* = 4,0 Hz), 7,51 (m, 5H, H-5 a H-9); **RMN de ¹³C-E32** (75,0 MHz, CDCl₃) δ : -4,5 (CH₃, TBS), -5,2 (CH₃, TBS), 18,2 (C₀, C-12), 25,6 (CH₃, C13-C15), 46,0 (CH₂, C-2), 72,0 (CH, C3), 125,7 (CH, C-6 e C-8), 127,5 (CH, C-7), 128,3 (CH, C-5 e C-9), 143,5 (C₀, C-4), 176,7 (C₀, C-1).

5.2.12. Procedimento geral para a síntese do 2-oxoéster (S)-5a

Cloreto de (cianometil)trifenilfosfônio (4,17g, 12 mmol) foi dissolvido em água (25 mL) e diclorometano (25 mL). Hidróxido de sódio (1,26g, 32 mmol) dissolvido em água (6 mL) foi adicionado lentamente à mistura anterior. Após 20 minutos as duas fases foram separadas. A fase orgânica foi secada (MgSO₄) e adicionada a uma solução de (S)-**4a** (1,94 g, 7 mmol), DMAP (0,2 g) e EDCI (2,13 g, 11 mmol) em diclorometano (50 mL) a 0°C

sob atmosfera de argônio. A mistura permaneceu sob agitação magnética, com retorno gradual a temperatura ambiente, por 20h. Lavou-se o meio reacional com H₂O (50 mL). A fase orgânica foi secada com (MgSO₄) e evaporada fornecendo uma pasta amarela.

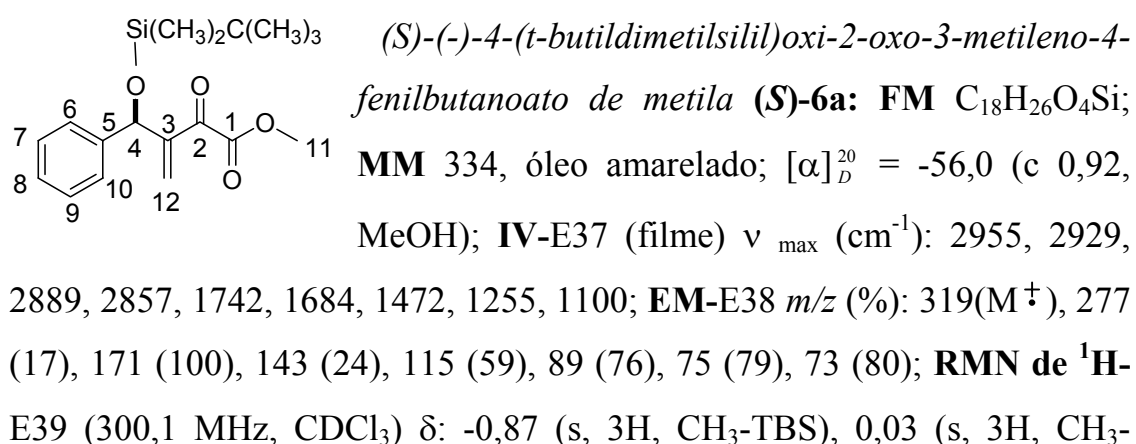
Esta pasta amarela foi dissolvida em diclorometano (10 mL) e metanol (20 mL) e resfriada a -78°C. O ozônio foi então borbulhado até que a solução amarela ficasse cinza-azulada (aproximadamente 2 horas). O excesso de ozônio foi removido com argônio. A mistura reacional foi aquecida gradualmente a temperatura ambiente e evaporada (**Atenção: durante esta etapa há eliminação de HCN sendo necessário portanto que a reação seja realizada em capela evitando-se a inalação deste composto extremamente tóxico**). O resíduo foi purificado por DSC (hexano/ETOAc 25%) fornecendo (*S*)-**5a** (0,87 g, 50% sobre as duas etapas).



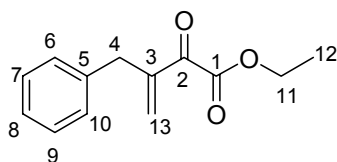
4,6(CH₃, TBS), 18,6 (C₀, C-14), 26,3 (CH₃, C15 a C17), 50,6 (CH₂, C-3), 53,3 (CH₃, C-11), 72,0 (CH, C-4), 126,3 (CH, C-7 e C-9), 128,1 (CH, C-8), 128,8 (CH, C-6 e C-10), 144,1 (C₀, C-5), 161,5 (C₀, C-1), 192,3 (C₀, C-2).

5.2.13. Procedimento geral para α -metilenação

Morfolina (0,0264 g, 0,3 mmol) foi dissolvida em ácido acético glacial (3,5 mL) sob atmosfera de argônio e peneira molecular. Esta solução foi adicionada ao material de partida (1,0 mmol) e aquecida até refluxo sob peneira molecular e atmosfera de argônio. À mistura em refluxo foi adicionado *p*-formaldeído (0,29 g, 9 mmol). É importante que sempre haja *p*-formaldeído em suspensão ao longo da reação. Após 2-8 h o excesso de ácido acético glacial foi destruído utilizando-se NaHCO₃ sólido. A fase aquosa foi extraída com acetato de etila (3 porções de 10 mL). As fases orgânicas foram combinadas, secadas (MgSO₄) e evaporadas. Os produtos foram filtrados em coluna cromatográfica com sílica gel.

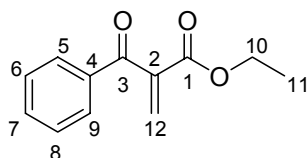


TBS), 0,98 (s, 9H, *t*-Bu-TBS), 3,98 (s, 3H, H11), 5,70 (s, 1H, H4), 6,39 (s, 1H, H-12), 6,61 (s, 1H, H-12), 7,49 (m, 5H, H-6 a H-10); **RMN de ^{13}C -E40** (75,0 MHz, CDCl_3) δ : - 4,6 (CH_3 , C-13), -4,9 (CH_3 , C-14), 18,4 (C_0 , C-15), 25,9 (CH_3 , C16-C18), 52,8 (CH_3 , C-11), 71,5 (CH , C-4), 126,1 (CH , C-6 e C-10), 127,1 (CH , C-8), 128,0 (CH , C-7 e C-9), 131,5 (CH_2 , C-12), 142,3 (C_0 , C-5), 148,3 (C_0 , C-3), 163,7 (C_0 , C-1), 186,7 (C_0 , C-2).



2-oxo-3-metileno-4-fenilbutanoato de etila 22

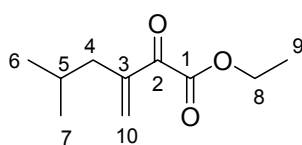
FM $\text{C}_{13}\text{H}_{14}\text{O}_3$; **MM** 246, óleo incolor; **IV-E55** (filme) ν_{max} (cm^{-1}): 3028, 2983, 2905, 1744, 1645, 1602, 1495, 1454, 1369, 1283, 1026, 856, 707; **EM-E56** m/z (%): 218 (5); 189 (6); 145 (41); 117 (100); 115 (82); 91 (42). **RMN de ^1H -E57** (300,1 MHz, CDCl_3) δ : 1,36 (t, 3H, $J = 7,3$ Hz, H-12); 3,64 (s, 2H, H-4); 4,35 (q, 2H, $J = 7,3$ Hz, H-11); 5,96 (t, 1H, $J = 1,5$ Hz, H-13); 6,21 (s, 1H, H-13); 7,24 (m, 5H, H-6 a H-10). **RMN de ^{13}C -E58** (75,0 MHz, CDCl_3) δ : 14,1 (CH_3 , C-12); 35,8 (CH_2 , C-11); 62,2 (CH_2 , C-4); 113,7 (CH , C-8); 128,5 (2 CH , C-6 e C-10); 129,1 (2 CH , C-7 e C-9); 132,9 (CH_2 , C-13); 137,5 (C_0 , C-5); 144,3 (C_0 , C-3); 163,7 (C_0 , C-1); 187,8 (C_0 , C-2).



2-metileno-3-oxo-3-fenilpropanoato de etila 20

FM $\text{C}_{12}\text{H}_{12}\text{O}_3$; **MM** 204, óleo incolor; **IV-E59** (filme) ν_{max} (cm^{-1}): 3528, 2982, 1738, 1683, 1597, 1581,

1450, 1367, 1229, 1041, 968; **EM-E60** m/z (%): 204 (M^+), 175 (7), 158 (7), 105 (100), 77 (44); **RMN de 1H -E61** (300,1 MHz, $CDCl_3$) δ : 1,10 (t, 3H, $J = 7,3$ Hz, H-11); 4,19 (q, 2H, $J = 7,3$ Hz, H-10); 4,32 (s, 2H, H-12), 7,53 (t, 1H, $J = 7,3$ Hz, H-7); 7,45 (d, 2H, $J = 7,3$ Hz, H-6 e H-8); 7,83 (d, 2H, $J = 7,3$ Hz, H-5 e H-9); **RMN de ^{13}C -E62** (75,0 MHz, $CDCl_3$) δ : 13,9 (CH_3 , C-11); 62,0 (CH_2 , C-12); 64,1 (C_0 , C-4); 65,9 (CH_2 , C-10); 128,3 (2 CH, C6 e C-8), 128,5 (2 CH, C-5 e C-9); 133,2 (CH, C-7); 170,9 (C_0 , C-1); 196,8 (C_0 , C-3).



2-oxo-3-metileno-6-metilhexanoato de etila 24

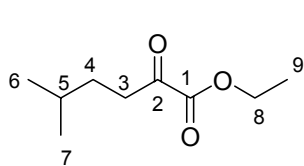
FM $C_{10}H_{16}O_3$; **MM** 184, óleo incolor; **IV-E63** (filme)

ν_{max} (cm^{-1}): 2963, 2924, 2871, 1742, 1683, 1460,

1362, 1255, 1216, 1099, 1036; **EM-E64** m/z (%): 184 (M^+), 141 (12); 111 (24); 93 (22); 55 (100). **RMN de 1H -E65** (300,1 MHz, $CDCl_3$) δ : 0,88 (d, 6H, $J = 3,5$ Hz, H-6 e H-7), 1,34 (t, 3H, $J = 7,3$ Hz, H-9), 1,75 (m, 1H, H-5), 2,22 (d, 2H, $J = 7,3$ Hz, H-4), 4,37 (q, 2H, $J = 7,3$ Hz, H-8), 6,11 (d, 2H, $J = 6,2$ Hz, H-10); **RMN de ^{13}C -E66** (75,0 MHz, $CDCl_3$) δ : 14,4 (CH_3 , C-9); 22,4 (2 CH_3 , C6 e C-7); 28,2 (CH, C-5); 32,5 (CH_2 , C-8), 61,2 (CH_2 , C-4); 132,5 (CH_2 , C-10); 143,8 (C_0 , C-3); 164,2 (C_0 , C-1); 188,7 (C_0 , C-2).

5.3.14. Procedimento geral para a síntese de 2-oxo-6-metil-hexanoato de etila **23**

Adicionou-se Mg⁰ (640 mg, 0,028 mmol), 13 mL de THF anidro e 2 cristais de iodo em um balão sob atmosfera de argônio. Este balão foi aquecido com uma pistola até a sublimação do iodo. Em seguida, adicionou-se lentamente uma solução de brometo de 1-isobutila (3,2 mL; 0,026 mmol) em 13 mL de THF anidro, sob atmosfera de argônio. Esta solução foi mantida por 15 minutos a 40 °C após adição completa do haleto de alquila. A solução acima recém preparada foi adicionada lentamente a uma solução de dietiloxalato (3,6 mL; 0,026 mmol) em 26 mL de THF anidro, à -10 °C e sob atmosfera de argônio, durante 30 minutos. O excesso de dietiloxalato foi destruído utilizando-se solução de HCL 2M. Em seguida adicionou-se água e a fase orgânica foi extraída com acetato de etila. As fases orgânicas foram combinadas, secadas (MgSO₄), evaporadas e purificadas por DSC (hexano/ETOAc 6%) fornecendo um óleo incolor (85% de rendimento).



2-oxo-6-metil-hexanoato de etila **23**: **FM** C₉H₁₆O₃;

MM 172, óleo incolor; **EM** *m/z* (%): 172 (M⁺),

126(14), 99 (100), 81 (92); **IV** (filme) *v*_{max} (cm⁻¹):

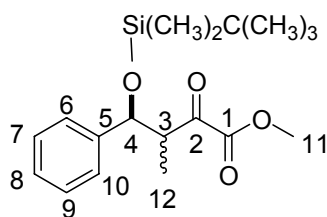
2953, 2934, 2880, 1727, 1723, 1469, 1245, 1070; **RMN de ¹H** (300,1 MHz, CDCl₃) δ: 0,95 (d, 6H, J=2,2 Hz, H-6 e H-7), 1,33 (t, 3H, J=7,3 Hz, H-9), 1,37 (m, 3H, H-4 e H-5), 2,83 (t, 2H, J=4,0 Hz, H-3), 4,35 (q, 2H, J=7,3 Hz, H-8); **RMN de ¹³C** (75,0 MHz, CDCl₃) δ: 14,6 (CH₃, C-9); 22,9 (2 CH₃, C6

e C-7); 28,1 (CH, C-5); 32,3 (CH₂, C-4), 37,9 (CH₂, C-8); 62,9 (CH₂, C-3); 161,7 (C₀, C-1); 195,2 (C₀, C-2).

5.2.15. Procedimento geral para obtenção de α-metiléster e α-metilhidroxiéster via hidrogenação com Pd/C

0,005 mmol de Pd/C (5%) foram dissolvidos em 2 mL de metanol anidro e mantidos sob atmosfera de H₂ (“bexiga”, pressão ambiente) por 30 minutos. Após este período adicionou-se 0,01 mmol de **(S)**-6a em 1 mL de metanol. O sistema foi mantido sob agitação magnética e temperatura ambiente por 16h para obtenção de **(S)**-7a e mais 15 horas para obtenção de **(S)**-8a. A mistura foi filtrada através de um filtro de papel e o solvente evaporado, obtendo-se o produto desejado. O produto foi purificado por coluna cromatográfica (Hex/EtOAc 20%) fornecendo um óleo incolor com 70% de rendimento.

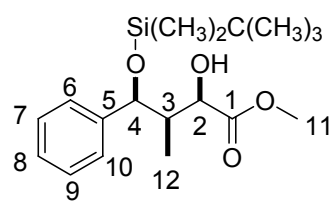
4-(*t*-butildimetilsilil)oxi-



2-oxo-3-metil-4-fenilbutanoato de metila (mistura *syn/anti*) **7a**: **FM** C₁₈H₂₈O₄Si; **MM** 336, óleo incolor; **HPLC** (coluna Quiralcel OJ-H, fase móvel 10% de isopropanol em hexano e 0,1% de ácido

trifluoroacético, λ = 246 nm, fluxo 0,4 mL/min.) tempos de retenção (**(3S,4S)**-7a: 44,2 min; (**(3R,4S)**-7a: 45,1 min.; **IV**-E41 (filme) ν_{max} (cm⁻¹): 2956, 2928, 2886, 2861, 1730, 1472, 1283, 1248, 1090, 1071, 1027; **EM**-E42 m/z (%): 221 (7), 173 (100), 117 (16), 115 (15), 105 (14), 89 (59), 73

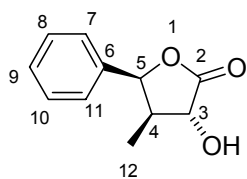
(67), 75 (42), 59 (40); **RMN de ^1H** -E43 e E-45 (300,1 MHz, CDCl_3) **7a-syn** δ : 0,20 (s, 9H, *t*-Bu-TBS), 0,91(s, 6H, 2CH₃-TBS), 1,10 (d, 3H, $J = 6,6$ Hz, H-12), 3,68 (m, 1H, H-3), 3,87 (s, 3H, H-11), 5,03 (d, 1H, $J = 5,1$ Hz, H-4), 7,27 (m, 5H, H6-H10). **7a-anti** δ : 4,11 (s, 3H, H11) e 4,72 (d, 1H, H4, $J=9,2$ Hz); **RMN de ^{13}C** -E44 e E-46 (75,0 MHz, CDCl_3) **7a-syn** δ : -4,5 (2 CH₃, TBS), 12,9 (CH₃, C-12), 26,2 (3 CH₃, *t*-BU-TBS), 53,3 (CH₃, C-11), 50,5 (CH, C-3), 75,5 (CH, C-4), 142,5 (C₀, C-5), 162,0 (C₀, C-1), 195,9 (C₀, C-2). **7a-anti** δ : -4,7 (2 CH₃, TBS), 13,8 (CH₃, C-12), 26,2 (3 CH₃, *t*-BU-TBS), 51,3 (CH₃, C-3), 53,3 (CH, C-11), 79,3 (CH, C-4), 143,2 (C₀, C-5), 164,9 (C₀, C-1), 197,6 (C₀, C-2).


 (2*R*,3*S*,4*S*)-4-(*t*-butildimetilsilil)oxi-2-hidroxi-3-metil-4-fenilbutanoato de metila **8a**: **FM** C₁₈H₃₀O₄Si; **MM** 338, óleo incolor; $[\alpha]_D^{20}$ - 32,4 (c 0,60 MeOH); **IV**-E47 (filme) ν_{max} (cm⁻¹): 3530, 2956, 2929, 2885, 1738, 1410, 1361, 1253, 1125, 1079, 1061; **EM**-E48 m/z (%): 281(10), 221(14), 189(7), 163(34), 129(26), 115 (21), 107(31), 91(31), 75 (100), 73 (86); **RMN de ^1H** -E49 (300,1 MHz, CDCl_3) δ : 0,29 (s, 9H, *t*-Bu-TBS), 1,12 (s, 6H, 2 CH₃-TBS), 1,26 (d, 3H, H-12, $J = 7,0$ Hz), 2,45 (m, 1H, H-3), 3,05 (d, 1H, $J = 4,4$ Hz, H-2), 4,08 (s, 3H, H-11), 4,86 (d, 1H, $J = 8,4$ Hz, H4), 7,59 (m, 5H, H6-H10); **RMN de ^{13}C** -E50 (75,0 MHz, CDCl_3) δ : -4,5 (CH₃, TBS), -3,9 (CH₃, TBS), 10,7 (CH₃, C-12), 26,4 (3 CH₃-*t*-Bu-TBS), 53,0 (CH₃, C-

11), 71,8 (CH, C-4), 77,1 (CH, C-2), 127,4 (2 CH, C-7 e C-9), 127,9 (CH, C-8), 128,5 (2 CH, C-6 e C-10), 143,8 (C₀, C-5), 175,7 (C₀,C-1).

5.2.16. Procedimento geral para desproteção do TBDMS de **8a** com HF-py

A uma solução contendo **8a** (15 mg, 0,04 mmol) e diclorometano anidro (5 mL), sob agitação magnética, atmosfera inerte a 0 °C em um frasco de polietileno, foi adicionado 0,8 mL de solução de HF-piridina. A reação foi mantida sob agitação com retorno gradual da temperatura para a temperatura ambiente e o consumo do material de partida foi acompanhado por CG-EM. Após este período, a reação foi neutralizada pela adição vagarosa de NaHCO₃ sólido. A solução resultante foi evaporada e concentrada sob vácuo. O produto da reação purificado por coluna cromatografia (Hex/EtOAc 15 %) fornecendo **28** em 65% de rendimento.



(3*R*,4*R*,5*S*)-3-hidroxi-4-metil-5-fenil-dihidro-furan-2-ona

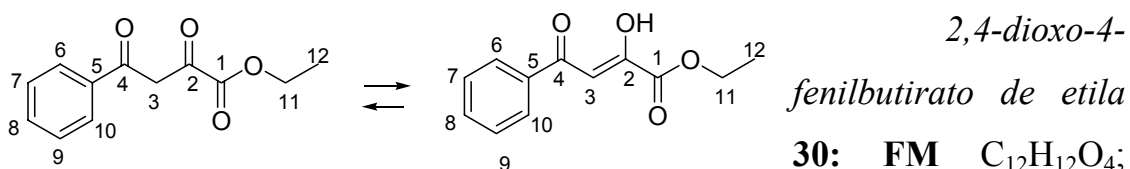
28. F.M. C₁₁H₁₂O₃, **MM** 192, óleo incolor, **IV-E51** (filme) $\nu_{\max}$ (cm⁻¹): 3362, 2970, 1776, 1455, 1334, 1184,

1145, 1096, 991, 897, 755, 701, 464; **EM-E52** m/z (EI): 192 (M⁺), 148 (80) 133 (15), 115 (10), 105 (30), 91 (100), 77 (25). **RMN de ¹H-E53** (300.1 MHz, CDCl₃) δ : 0.87 (d, 3H, H-13, J = 7.0 Hz), 2,75-2,96 (m, 1H, H-2), 4,22 (d, 1H, H-3, J = 9,9 Hz), 5,63 (d, 1H, H-5, J = 8,1 Hz), 7,13 (m, 2H, H-8, H-12), 7.31-7.43 (m, 3H, H-9, H-10, H-11), 7.38-7,45 (m, 2H); **RMN de ¹³C-**

E54 (75,0 MHz, CDCl₃) δ : 13,3 (CH₃, C-12); 42,1 (CH, C-4); 72,2 (CH, C-3); 82,4 (CH, C-5); 125,7 (CH, C-8, C-12); 128,5 (CH, C-9, C-11); 128,6 (CH, C-10); 135,5 (C₀, C-6); 177,5 (C₀, C-2).

5.2.17. Procedimento geral para obtenção de 30

Adicionou-se uma solução de etóxido de sódio recentemente preparada a partir de sódio metálico (0,46g, 0,02 mol) e etanol (10 mL) a 0 °C, a uma solução de acetofenona (1,0g, 0,009 mol) e dietiloxalato (2,7g, 0,02 mol) em THF anidro, sob agitação magnética e atmosfera de argônio. Esta solução permaneceu sob agitação a 0 °C durante 2 h e foi acompanhada por CG-EM. A seguir foi adicionado uma solução gelada de HCl 2M (120 mL) e a mistura reacional foi extraída com acetato de etila. A fase orgânica foi secada com MgSO₄ anidro, filtrada e o solvente evaporado com pressão reduzida. O produto, uma pasta amarela de baixo ponto de fusão (35-37 °C) (92% de rendimento), estava puro o suficiente para ser utilizado nas próximas etapas sem purificação. O composto **30** está em equilíbrio com sua forma enólica como pode ser observado pelos dados espectroscópicos e em concordância com a literatura.⁴²



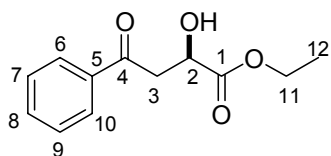
MM 220; PF 34-36 °C; IV-E67 (filme) $\nu_{\max}$ (cm⁻¹): 3125, 2992, 1742, 1600,

1615, 1500, 1468, 1451, 1373, 1277, 1188, 1132, 1016, 769, 706; **EM-E68** m/z (%): 220 (M^+), 192 (3), 147 (100), 105 (38), 120 (5), 91 (5), 77 (20);. **RMN de 1H -E69** (300,1 MHz, $CDCl_3$) δ : 1,42 (t, 3H, $J=7,3$ Hz, H-12), 4,40 (q, 2H, $J=6,9$, H-11); 7,05 (s, 1H, H-3); 7,45-7,62 (m, 3H, H-7, H-8 e H-9), 8,01 (d, 2H, $J=8,0$ Hz, H-6 e H-10); **RMN de ^{13}C -E70** (75,0 MHz, $CDCl_3$) δ : 14,4 (CH_3 , C-12), 63,1 (CH_2 , C-11), 98,4 (CH , C-3), 128 (CH , C-6 e C-10), 129 (CH , C-7 e C-9), 134,2 (CH , C-8), 135,3 (C_0 , C-5), 162,6 (C_0 , C-2), 170,3 (C_0 , C-1), 191,1 (C_0 , C-4).

5.2.18. Procedimento geral para bioedução de 30

20,0 g de *Saccharomyces cerevisiae* liolizado foram suspensos em tampão citrato-fosfato (50 mL, pH 4,5, 45 mL) contendo glicose (5 g). As células foram ativadas por 1,5 h e em seguida adicionou-se éter etílico (200 mL), com adição subsequente de α -cloroacetofenona (150 mg / 10 mL de éter etílico). Esta mistura foi agitada vigorosamente (agitação magnética) a 28 °C por 1,5 h, em um reator encamisado tipo tanque com um condensador acoplado para impedir a evaporação do éter etílico. O substrato **30** (1,1 g, 45 mmol) foi dissolvido em 50 mL de éter etílico e adicionado em seguida. A reação foi acompanhada por CG-EM. Ao final da reação a massa celular foi filtrada em Celite. A fase orgânica foi resfriada e acidificada com solução aquosa de HCl 6M. Em seguida extraiu-se a fase orgânica com acetato de etila (3 x 50 mL). As fases orgânicas foram combinadas, lavadas com salmoura, secada com $MgSO_4$ anidro, e o solvente evaporado com pressão

reduzida, Obteve-se um óleo amarelo viscoso composto pelo hidroxiéster **25** e o ácido carboxílico correspondente **31** na proporção de 1:1. Este óleo foi dissolvido em solução etanólica de HCl (50 mL) e mantido sob agitação magnética a temperatura ambiente até completa esterificação do ácido (*overnight*). Em seguida o etanol foi evaporado e o produto bruto foi purificado por cromatografia em camada delgada eluída com acetato de etila:hexano (25%) originando um sólido branco com baixo ponto de fusão em 80 % de rendimento e 99% de *ee* (análise por HPLC com fase estacionária quiral).



(*R*)-(-)-2-hidroxi-4-oxo-4-fenilbutirato de etila **25**:

FM C₁₂H₁₄O₄; **MM** 222; **PF** 36 a 38 °C; $[\alpha]_D^{20} = -5,5$

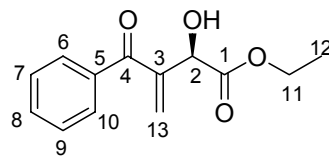
(c 1,0, CHCl₃), lit. $[\alpha]_D^{20} = -5,4$ (c 1,0, CHCl₃) *ee*

99%, **HPLC** (coluna Quiralcel OJ, fase móvel 10% de isopropanol em hexano e 0,1% de ácido trifluoroacético, $\nu = 246$ nm, fluxo 0,7 mL/min.) tempos de retenção **R-25** 29,6 min; **S-25** 27,4 min.; **IV-E71** (filme) $\nu_{\max}$ (cm⁻¹): 3489, 2982, 2919, 1738, 1685, 1597, 1580, 1449, 1368, 1272, 1215, 1100, 1041, 758; **EM-E72** *m/z* (%): 222 (M⁺), 204 (5); 149 (19), 120 (20), 105 (100); 77 (48); **RMN de ¹H-E73** (300,1 MHz, CDCl₃) δ : 1,28 (t, 3H, *J* = 7,1 Hz, H-12), 3,50 (dd, 2H, *J* = 7,0, H-3); 4,30 (q, 2H, *J*=7,1 Hz, H-11), 4,64-4,62 (m, 1H, H-2); 7,40-7,60 (m, 3H, H7, H8 e H-9), 7,95 (d, 2H, *J* = 7,1 Hz, H-6 e H-10); **RMN de ¹³C-E74** (75,0 MHz, CDCl₃) δ : 14,1 (CH₃, C-12), 42,1 (CH₂, C-3), 61,8 (CH₂, C-11), 67,2 (CH, C-2), 128,1 (CH, C-6 e C-

10), 128,7 (CH, C7 e C-9), 128,8 (CH, C-8), 133,5 (C₀, C-5), 173,8 (C₀, C-1), 197,2 (C₀, C-4).

5.2.19. Procedimento geral para α -metilenação de 25

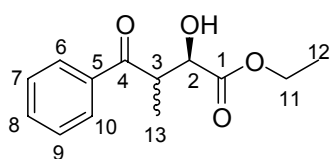
Morfolina (0,3 mmol) foi dissolvida em ácido acético glacial (3,5 mL) sob atmosfera de argônio e peneira molecular. Esta solução foi adicionada ao substrato (1,0 mmol) e aquecida até refluxo sob peneira molecular e atmosfera de argônio. À mistura em refluxo foi adicionado *p*-formaldeído (9,0 mmol). Após 2-4 horas o excesso de ácido acético glacial foi destruído utilizando-se NaHCO₃ sólido. A fase aquosa foi extraída com acetato de etila (3 porções de 10 mL). As fases orgânicas foram combinadas, secadas (MgSO₄) e evaporadas. O resíduo foi purificado por DSC (Hex/EtOAc 70%) fornecendo um óleo amarelado em 85% de rendimento.

 (R)-(-)-2-hidroxi-3-metileno-4-oxofenilbutanoato de etila **26**: **FM** C₁₃H₁₄O₄; **MM** 234; [α]_D²⁰ = - 21,0 (c 2,4, MeOH); **IV-E75** (filme) $\nu_{\max}$ (cm⁻¹): 3489, 2983, 2916, 1739, 1659, 1597, 1448, 1333, 1265, 1098, 982, 735; **EM-E76** *m/z* (%): 234 (M⁺), 222 (1), 205 (6), 161(9) 132 (15), 149 (16), 131 (8), 120 (5), 105 (100), 77 (34); **RMN de ¹H-E77** (300.1 MHz, CDCl₃) δ : 1,26 (t, 3H, *J* = 8.0 Hz, H-12), 4,18 (q, 2H, *J* = 7,0, H-11), 5,34 (s, 1H, H-2), 5,82 (s, 1H, H-13), 6,19 (s, 1H, H-13), 7,40-7,60 (m, 3H, H-7, H-8, e H-9), 7,79 (d, 2H, *J* = 7.0 Hz, H-6 e H-10); **RMN de ¹³C-E78** (75,0 MHz, CDCl₃) δ : 15,2 (CH₃, C-12), 62,3 (CH₂, C-11), 71,7 (CH, C-2), 127,3 (CH₂, C-13), 128,4

(CH, C-8), 128,5 (2 CH, C-6, C-10), 129,6 (2 CH, C-7, C-9), 132,9 (C₀, C-5), 144,9 (C₀, C-3), 172,5 (C₀, C-1), 197,2 (C₀, C-4). **HRMS** 234.04671. C₁₃H₁₄O₄ requer 234.08921.

5.2.20. Procedimento geral para bioedução de 26 com levedura

125 mL de YM foram autoclavados por 15 minutos a 121 °C e 1,5 atm. Após resfriamento foi inoculado 3 mL de suspensão da levedura e este meio permaneceu a 30 °C por 48 horas sob agitação orbital em um shaker. Em seguida adicionou-se 1 mmol do material de partida solubilizado em 1 mL de etanol e a reação prosseguiu sendo acompanhada por CG-MS. Ao final da reação esta suspensão foi centrifugada e a fase aquosa extraída com acetato de etila (3 porções). As fases orgânicas foram combinadas, secadas (MgSO₄) e evaporadas fornecendo um óleo amarelado relativo à mistura de diastereoisômeros *syn* : *anti* em razões diastereoisoméricas variadas conforme a levedura utilizada. O resíduo foi purificado por TLC (Hex/EtOAc 65%).



2-hidroxi-3-metil-4-oxo-4-fenilbutanoato de etila **31**

(mistura *syn/anti*): **FM** C₁₃H₁₆O₄, **MM** 236, **HPLC**

(coluna Quiralcel OJ, fase móvel 20% de

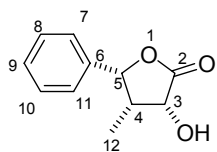
isopropanol em hexano, ν = 254 nm, fluxo 0,4 mL/min.) tempos de retenção (2*R*,3*S*)-**31** 19,9 min; (2*R*,3*S*)-**31** 21,4 min.; **IV-E79** (filme) ν_{max} (cm⁻¹): 3484, 3060, 2981, 2938, 1736, 1683, 1596, 1449, 1368, 1255, 1216, 1129, 1022, 705; **EM-E80** *m/z* (%): 236 (M⁺), 218 (2), 163 (16), 134 (5), 122 (5),

114 (7), 105 (100), 77 (32); **RMN de ^1H *syn* –E81** (300.1 MHz, CDCl_3) δ : 1.26 (t, 3H, H-12, $J = 7,0$ Hz), 1.29 (d, 3H, H-13, $J = 7,0$ Hz), 3.28 (s, 1H, OH), 3.93 (dq, 1H, H-3, $J = 4,2$ e $7,0$ Hz,), 4.25 (q, 2H, H-11, $J = 7,0$ Hz), 4.58 (m, 1H, H-2), 7.40-7.65 (m, 3H), 7.90-8.05 (m, 2H); ***anti* –E83** (CDCl_3) δ : 1.20 (t, 3H, H-12, $J = 7,1$ Hz), 1.36 (d, 3H, H-13, $J = 7,3$ Hz), 3.61 (d, 1H, OH, $J = 8,3$ Hz), 3.98 (dq, 1H, H-3, $J = 4,6$ e $7,3$ Hz,), 4.10-4.25 (m, 2H, H-11), 4.39 (dd, 1H, H-2, $J = 4,6$ e $8,3$ Hz), 7.40-7.65 (m, 3H, H-7, H-8 e H-9), 7.90-8.00 (m, 2H, H-6 e H-10); **RMN de ^{13}C *syn*– E82** (75,0 MHz, CDCl_3) δ : 12,1 (CH_3 , C-12), 14,0 (CH_3 , C-13), 44,3 (CH_2 , C-11), 61,9 (CH, C-3), 71,6 (CH, C-2), 128,4 (CH, C-6 e C-10), 128,7 (CH, C-8), 133,3 (CH, C-7 e C-9), 135,7 (C_0 , C-5), 173,1 (C_0 , C-1), 201,6 (C_0 , C-4); ***anti* –E84** (CDCl_3) δ : 14,0 (CH_3 , C-12), 14,1 (CH_3 , C-13), 44,0 (CH_2 , C-11), 61,5 (CH, C-3), 73,1 (CH, C-2), 128,3 (CH, C-6 e C-10), 128,7 (CH, C-8), 133,4 (CH, C-7 e C-9), 135,9 (C_0 , C-5), 173,1 (C_0 , C-1), 201,6 (C_0 , C-4).

5.2.21. Procedimento geral para redução de 31 com nBu_4NBH_4

1,0 mmol do material de partida foram solubilizados em 2 mL de etanol anidro sob agitação magnética e resfriados a -78°C . Em seguida adicionou-se 1,0 mmol de nBu_4NBH_4 lentamente e a temperatura foi elevada para -23°C . Após 60 minutos adicionou-se 5 mL de acetona e solução saturada de NaHCO_3 para consumir o excesso de nBu_4NBH_4 . A fase aquosa foi extraída com acetato de etila (3 porções de 10 mL). As fases orgânicas foram combinadas, secadas (MgSO_4) e evaporadas. O resíduo foi purificado

por TLC (45 % hexano/EtOAc), fornecendo os diastereoisômeros (3*R*,4*S*,5*R*)-**36** (sólido branco) : (3*R*,4*R*,5*R*)-**28** (óleo incolor) na proporção de 98:2. A estereoquímica relativa de **28** e **36** foram determinadas por análise de RMN de ¹H e NOESY1D e comparação com a literatura.



(3*R*,4*S*,5*R*)-3-hidroxi-4-metil-5-fenil-dihidro-furan-2-ona

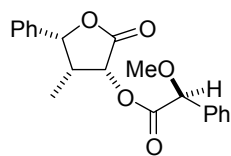
36: FM C₁₁H₁₂O₃; MM 192, sólido branco, PF 150-151 °C, IV-E85 (filme) ν_{max} (cm⁻¹): 3443, 2963, 1758, 1452, 1414,

1294, 1194, 1148, 1051; EM-E86 *m/z* (%): 192 (M⁺), 148 (80) 133 (15), 115 (10), 105 (30), 91 (100), 77 (25). RMN de ¹H-E87 (300.1 MHz, CDCl₃) δ: 0.65 (d, 3H, *J* = 7,3 Hz, H-12), 2,75 (s, 1H, OH), 2,98-3.08 (m, 1H, H-4), 4,79 (d, 1H, *J* = 6,8 Hz, H-5), 5,57 (d, 1H, *J* = 4,6 Hz, H-3), 7,25-7,38 (m, 5H, H_{arom}); RMN de ¹³C-E88 (75,0 MHz, CDCl₃) δ: 7,4 (CH₃, C-12), 41,1 (CH, C-4); 72,1 (CH, C-3); 80,2 (CH, C-5); 125,2 (CH, C-9); 128,2 (CH, C-7 e C-11); 128,6 (CH, C-8 e C-10); 135,1 (C₀, C-6); 177,0 (C₀, C-2).

5.2.22. Procedimento geral para determinação de configuração absoluta com MPA

A uma solução de **36** (10 mg, 0,05 mmol) em CH₂Cl₂ anidro (1,5 mL) foi adicionado DMAP (1 mg, 0,008 mmol) e (*S*)-MPA (4 mg, 0,05 mmol). A mistura foi resfriada a 0 °C em banho de gelo e adicionou-se DCC (10 mg, 0,005 mmol). A reação foi mantida sob agitação magnética com retorno gradual a temperatura ambiente até o consumo de todo o material de partida (aproximadamente 28 horas). Após este período a mistural reacional foi

filtrada para separação da dicicloexiluréia formada e o filtrado foi concentrado sob vácuo e purificado por coluna cromatográfica (20% Hex/EtOAc).



(3*R*,4*S*,5*R*,2'*S*)-(2'-metoxi-2'-fenilacetato) de 4-metil-2-oxo-5-fenil-tetrahidro-furan-3-ila, **37**: **FM** C₁₁H₁₂O₃; **MM** 192, sólido branco, **IV**-E89 (filme) ν_{max} (cm⁻¹): 3445, 2926, 2850, 1798, 1756, 1497, 1455, 1392, 1367, 1165, 1114, 1056, 981, 758; **EM**-E90 m/z (%): 180 (1), 165 (1), 149 (1), 133 (1), 121 (100), 122 (9), 105 (9), 91 (12), 77 (19). **RMN de ¹H**-E91 (300.1 MHz, CDCl₃) δ : 0.10 (d, 3H, J = 7,3 Hz, H-12), 2,96-3.02 (m, 1H, H-4), 3,45 (s, 3H, H-20), 4, 96 (s, 1H, H-14), 5,55 (d, 1H, J = 5,1 Hz, H-5), 5,77 (d, 1H, J = 6,9 Hz, H-3), 7,25-7,45 (m, 10H, H_{arom}).

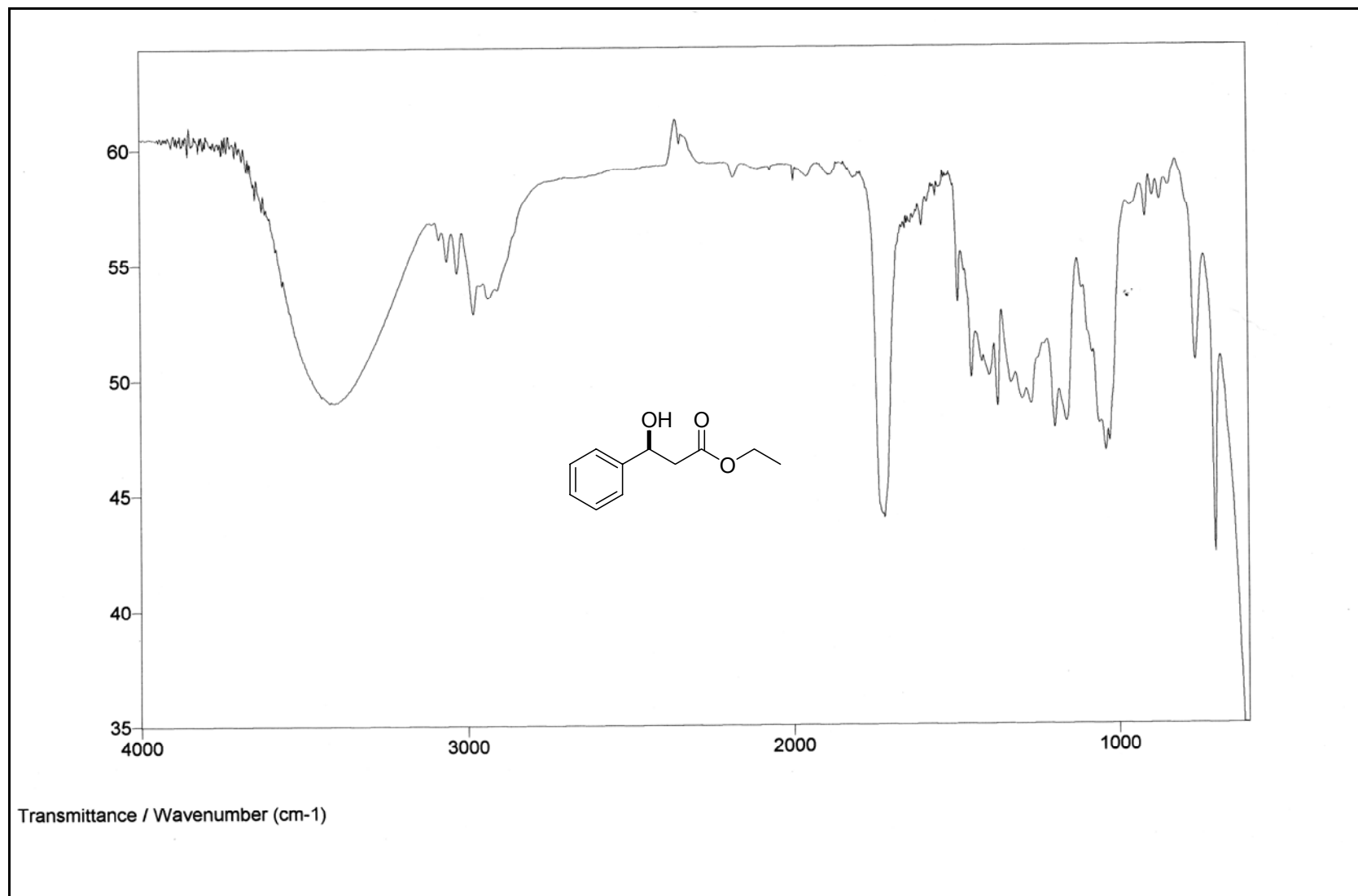
Anexos

Lista de Espectros

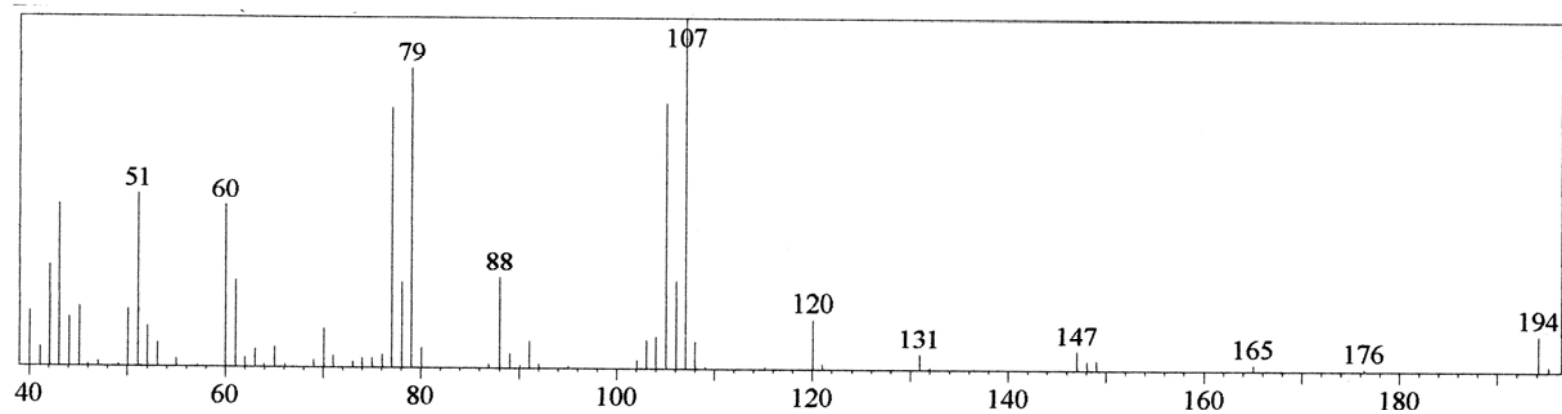
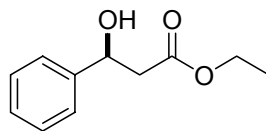
E01. Espectro no IV do (S)-(-)-3-hidroxi-3-fenilpropanoato de etila (S)- 2a	113
E02. Espectro de massas do (S)-(-)-3-hidroxi-3-fenilpropanoato de etila (S)- 2a	114
E03. Espectro de RMN de ^1H de (S)-(-)-3-hidroxi-3-fenilpropanoato de etila (S)- 2a	115
E04. Espectro de RMN de ^{13}C (S)-(-)-3-hidroxi-3-fenilpropanoato de etila (S)- 2a	116
E05. Espectro de RMN de ^1H de ($\pm$)- 2a na presença de (+)-Eu(hfc) ₃	117
E06. Espectro no IV do (S)-(-)-3-hidroxi-3- <i>p</i> -nitrofenilpropanoato de etila (S)- 2b	118
E07. Espectro de massas do (S)-(-)-3-hidroxi-3- <i>p</i> -nitrofenilpropanoato de etila (S)- 2b	119
E08. Espectro de RMN de ^1H de (S)-(-)-3-hidroxi-3- <i>p</i> -nitrofenilpropanoato de etila (S)- 2b	120
E09. Espectro de RMN de ^{13}C de (S)-(-)-3-hidroxi-3- <i>p</i> -nitrofenilpropanoato de etila (S)- 2b	121
E10. Espectro no IV do (S)-(-)-3-hidroxi-3- <i>p</i> -metoxifenilpropanoato de etila (S)- 2c	122
E11. Espectro de massas do (S)-(-)-3-hidroxi-3- <i>p</i> -metoxifenilpropanoato de etila (S)- 2c	123
E12. Espectro de RMN de ^1H de (S)-(-)-3-hidroxi-3- <i>p</i> -metoxifenilpropanoato de etila (S)- 2c	124
E13. Espectro de RMN de ^{13}C de (S)-(-)-3-hidroxi-3- <i>p</i> -metoxifenilpropanoato de etila (S)- 2c	125
E14. Espectro no IV da acetofenona 9a	126
E15. Espectro de massas da acetofenona 9a	127
E16. Espectro de RMN de ^1H da acetofenona 9a	128
E17. Espectro de RMN de ^{13}C da acetofenona 9a	129
E18. Espectro no IV da <i>p</i> -nitroacetofenona 9b	130
E19. Espectro de massas da <i>p</i> -nitroacetofenona 9b	131
E20. Espectro de RMN de ^1H da <i>p</i> -nitroacetofenona 9b	132
E21. Espectro de RMN de ^{13}C da <i>p</i> -nitroacetofenona 9b	133
E22. Espectro no IV da <i>p</i> -metoxiacetofenona 9c	134
E23. Espectro de massas da <i>p</i> -metoxiacetofenona 9c	135

E24. Espectro de RMN de ^1H da <i>p</i> -metoxiacetofenona 9c	136
E25. Espectro de RMN de ^{13}C da <i>p</i> -metoxiacetofenona 9c	137
E26. Espectro no IV de (S)-(-)-3- <i>t</i> -(butildimetilsilil)oxi-3-fenilpropanoato de etila (S)- 3a	138
E27. Espectro de massas de (S)-(-)-3- <i>t</i> -(butildimetilsilil)oxi-3-fenilpropanoato de etila (S)- 3a	139
E28. Espectro de RMN de ^1H de (S)-(-)-3- <i>t</i> -(butildimetilsilil)oxi-3-fenilpropanoato de etila (S)- 3a	140
E29. Espectro de RMN de ^{13}C de (S)-(-)-3- <i>t</i> -(butildimetilsilil)oxi-3-fenilpropanoato de etila (S)- 3a	141
E30. Espectro no IV do ácido (S)-(-)-3- <i>t</i> -(butildimetilsilil)oxi-3-fenilpropanóico (S)- 4a	142
E31. Espectro de RMN de ^1H do ácido (S)-(-)-3- <i>t</i> -(butildimetilsilil)oxi-3-fenilpropanóico (S)- 4a	143
E32. Espectro de RMN de ^{13}C do ácido (S)-(-)-3- <i>t</i> -(butildimetilsilil)oxi-3-fenilpropanóico (S)- 4a	144
E33. Espectro no IV do (S)-4-(<i>t</i> -butildimetilsilil)oxi-2-oxo-4-fenilbutanoato de metila (S)- 5a	145
E34. Espectro de massas de (S)-4-(<i>t</i> -butildimetilsilil)oxi-2-oxo-4-fenilbutanoato de metila (S)- 5a	146
E35. Espectro de RMN de ^1H do (S)-4-(<i>t</i> -butildimetilsilil)oxi-2-oxo-4-fenilbutanoato de metila (S)- 5a	147
E36. Espectro de RMN de ^{13}C do (S)-4-(<i>t</i> -butildimetilsilil)oxi-2-oxo-4-fenilbutanoato de metila (S)- 5a	148
E37. Espectro no IV de (S)-(-)-4-(<i>t</i> -butildimetilsilil)oxi-2-oxo-3-metileno-4-fenilbutanoato de metila (S)- 6a	149
E38. Espectro de massas de (S)-(-)-4-(<i>t</i> -butildimetilsilil)oxi-2-oxo-3-metileno-4-fenilbutanoato de metila (S)- 6a	150
E39. Espectro de RMN de ^1H de (S)-(-)-4-(<i>t</i> -butildimetilsilil)oxi-2-oxo-3-metileno-4-fenilbutanoato de metila (S)- 6a	151
E40. Espectro de RMN de ^{13}C de (S)-(-)-4-(<i>t</i> -butildimetilsilil)oxi-2-oxo-3-metileno-4-fenilbutanoato de metila (S)- 6a	152
E41. Espectro no IV de 4-(<i>t</i> -butildimetilsilil)oxi-3-metil-2-oxo-4-fenilbutanoato de metila 7a	153
E42. Espectro de massas de 4-(<i>t</i> -butildimetilsilil)oxi-3-metil-2-oxo-4-fenilbutanoato de metila 7a	154
E43. Espectro de RMN de ^1H da mistura de isômeros <i>syn</i> e <i>anti</i> de 7a	155
E44. Espectro de RMN de ^{13}C da mistura de isômeros <i>syn</i> e <i>anti</i> de 7a	156
E45. Espectro de RMN de ^1H do (3 <i>S</i> ,4 <i>S</i>)-4-(<i>t</i> -butildimetilsilil)oxi-3-metil-2-oxo-4-fenilbutanoato de metila <i>syn</i> - 7a	157
E46. Espectro de RMN de ^{13}C do (3 <i>S</i> ,4 <i>S</i>)-4-(<i>t</i> -butildimetilsilil)oxi-3-metil-2-oxo-4-fenilbutanoato de metila <i>syn</i> - 7a	158
E47. Espectro no IV de (2 <i>R</i> ,3 <i>S</i> ,4 <i>S</i>)-4-(<i>t</i> -butildimetilsilil)oxi-2-hidroxi-3-metil-4-fenilbutanoato de metila 8a	159

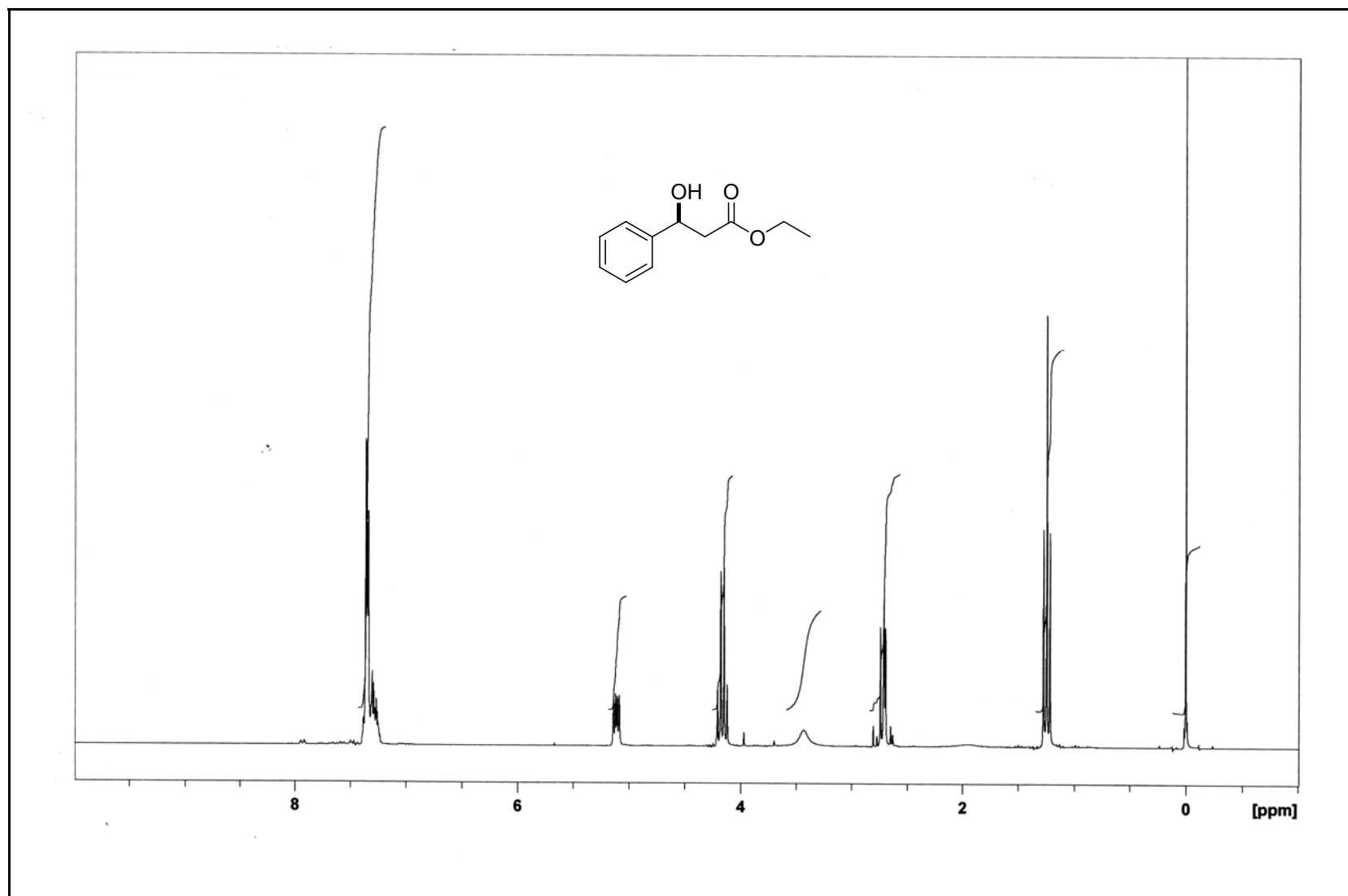
E48. Espectro de massas de (2 <i>R</i> ,3 <i>S</i> ,4 <i>S</i>)-4-(<i>t</i> -butildimetilsilil)oxi-2-hidroxi-3-metil-4-fenilbutanoato de metila 8a	160
E49. Espectro de RMN de ¹ H de (2 <i>R</i> ,3 <i>S</i> ,4 <i>S</i>)-4-(<i>t</i> -butildimetilsilil)oxi-2-hidroxi-3-metil-4-fenilbutanoato de metila 8a	161
E50. Espectro de RMN de ¹³ C de (2 <i>R</i> ,3 <i>S</i> ,4 <i>S</i>)-4-(<i>t</i> -butildimetilsilil)oxi-2-hidroxi-3-metil-4-fenilbutanoato de metila 8a	162
E51. Espectro no IV de (3 <i>R</i> ,4 <i>R</i> ,5 <i>S</i>)-3-hidroxi-4-metil-5-fenil-dihidro-furan-2-ona 28	163
E52. Espectro de massas de (3 <i>R</i> ,4 <i>R</i> ,5 <i>S</i>)-3-hidroxi-4-metil-5-fenil-dihidro-furan-2-ona 28	164
E53. Espectro de RMN de ¹ H de (3 <i>R</i> ,4 <i>R</i> ,5 <i>S</i>)-3-hidroxi-4-metil-5-fenil-dihidro-furan-2-ona 28	165
E54. Espectro de RMN de ¹³ C de (3 <i>R</i> ,4 <i>R</i> ,5 <i>S</i>)-3-hidroxi-4-metil-5-fenil-dihidro-furan-2-ona 28	166
E55. Espectro no IV de 2-oxo-3-metileno-4-fenilbutanoato de etila 22	167
E56. EM de 2-oxo-3-metileno-4-fenilbutanoato de etila 22	168
E57. Espectro de RMN de ¹ H de 2-oxo-3-metileno-4-fenilbutanoato de etila 22	169
E58. Espectro de RMN de ¹³ C de 2-oxo-3-metileno-4-fenilbutanoato de etila 22	170
E59. Espectro no IV de 2-metileno-3-oxo-3-fenilpropanoato de etila 20	171
E60. Espectro de massas de 2-metileno-3-oxo-3-fenilpropanoato de etila 20	172
E61. Espectro de RMN de ¹ H de 2-metileno-3-oxo-3-fenilpropanoato de etila 20	173
E62. Espectro de RMN de ¹³ C de 2-metileno-3-oxo-3-fenilpropanoato de etila 20	174
E63. Espectro no IV do 2-oxo-3-metileno-6-metilhexanoato de etila 24	175
E64. Espectro de massas de 2-oxo-3-metileno-6-metilhexanoato de etila 24	176
E65. Espectro de RMN de ¹ H do 2-oxo-3-metileno-6-metilhexanoato de etila 24	177
E66. Espectro de RMN de ¹³ C do 2-oxo-3-metileno-6-metilhexanoato de etila 24	178
E67. Espectro no IV de 2,4-dioxo-4-fenilbutirato de etila 30	179
E68. Espectro de massas de 2,4-dioxo-4-fenilbutirato de etila 30	180
E69. Espectro de RMN de ¹ H de 2,4-dioxo-4-fenilbutirato de etila 30	181
E70. Espectro de RMN de ¹³ C de 2,4-dioxo-4-fenilbutirato de etila 30	182
E71. Espectro no IV de (<i>R</i>)-(-)-2-hidroxi-4-oxo-4-fenilbutirato de etila (<i>R</i>)- 25	183
E72. Espectro de massas de (<i>R</i>)-(-)-2-hidroxi-4-oxo-4-fenilbutirato de etila (<i>R</i>)- 25	184
E73. Espectro de RMN de ¹ H de (<i>R</i>)-(-)-2-hidroxi-4-oxo-4-fenilbutirato de etila (<i>R</i>)- 25	185
E74. Espectro de RMN de ¹³ C de (<i>R</i>)-(-)-2-hidroxi-4-oxo-4-fenilbutirato de etila (<i>R</i>)- 25	186



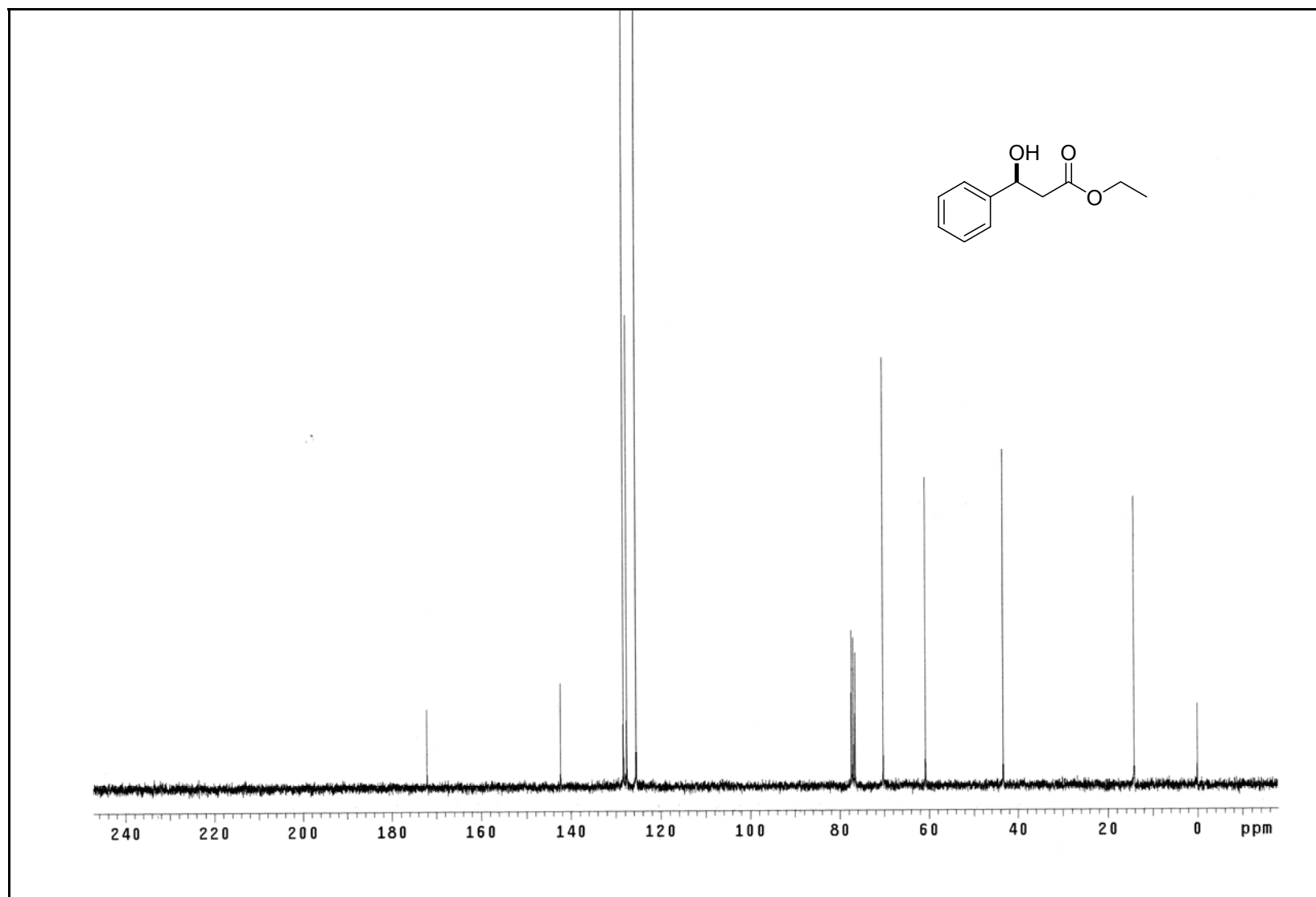
E01. Espectro no IV do (S)-(-)-3-hidroxi-3-fenilpropanoato de etila (**S**)-**2a**



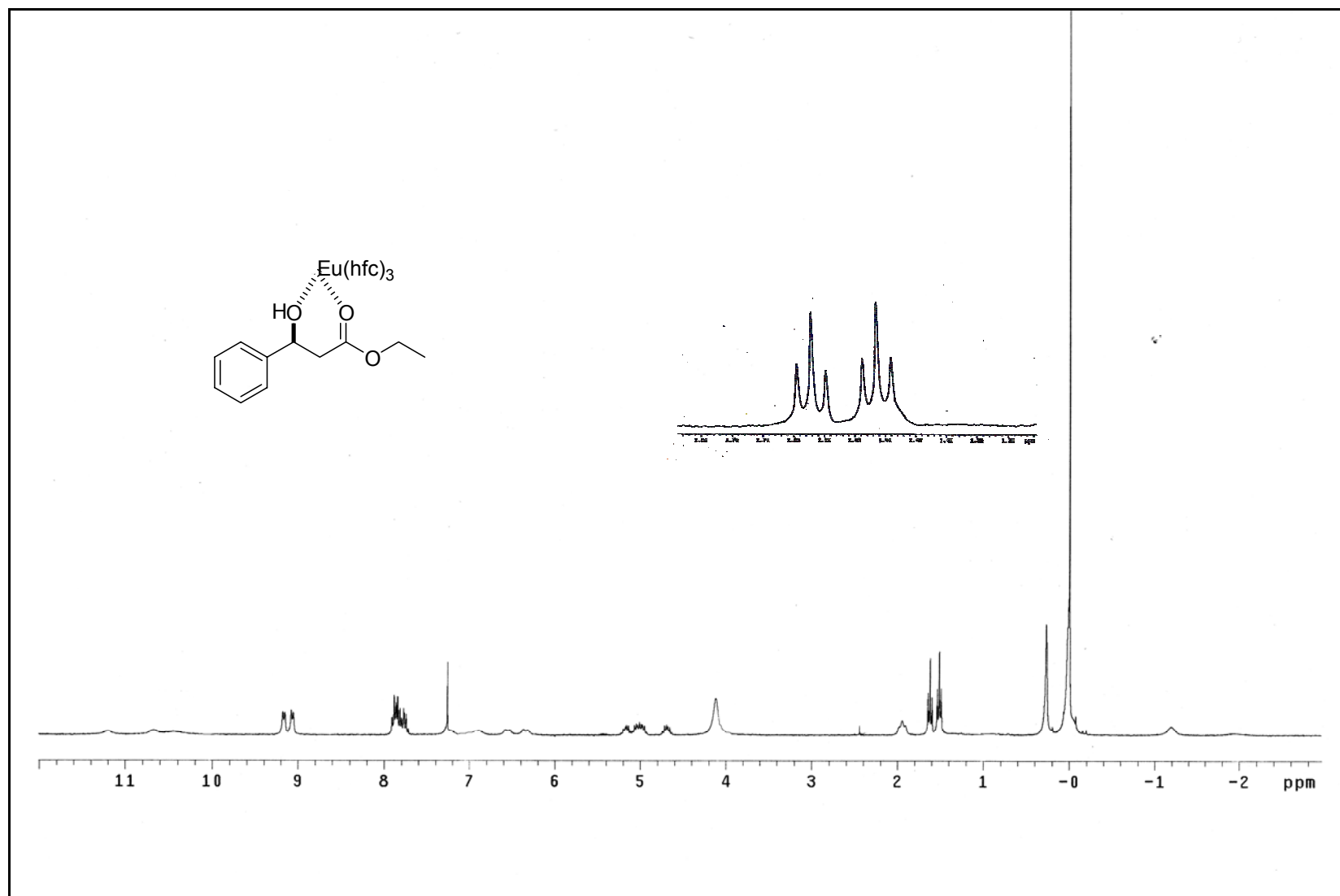
E02. Espectro de massas do (S)-(-)-3-hidroxi-3-fenilpropanoato de etila (**S**)-2a



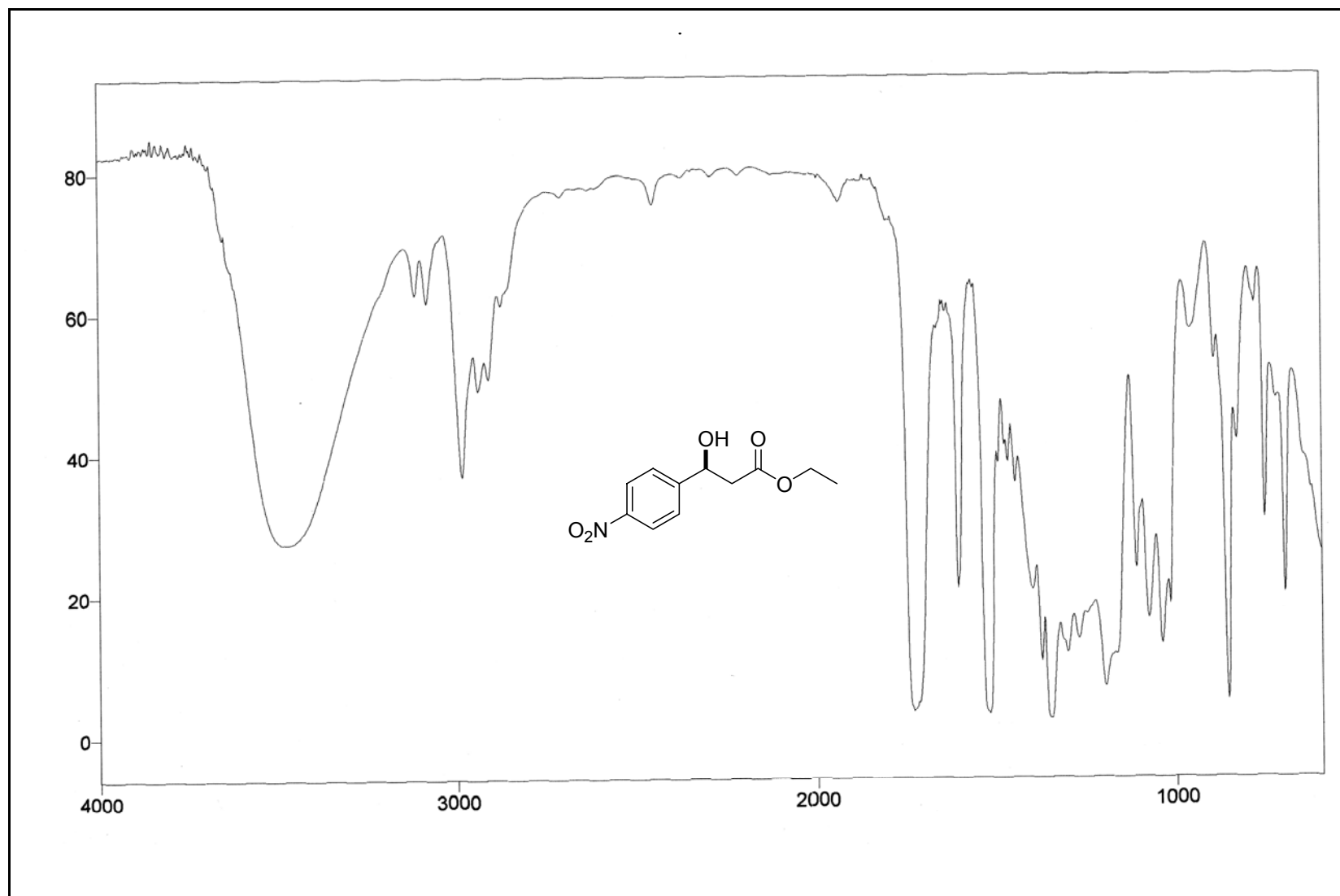
E03. Espectro de RMN de ^1H de (S)-(-)-3-hidroxi-3-fenilpropanoato de etila (**S**)-2a



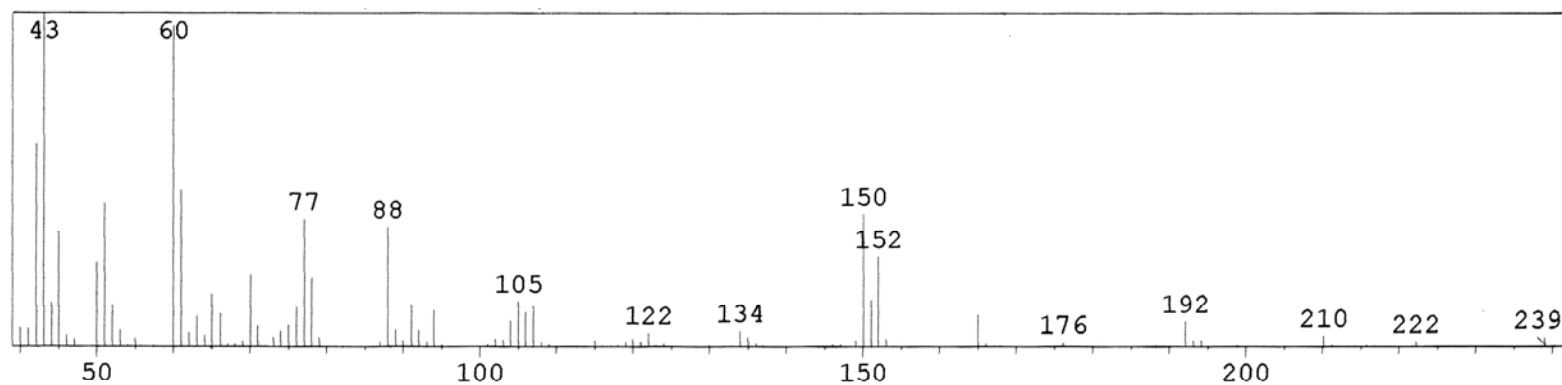
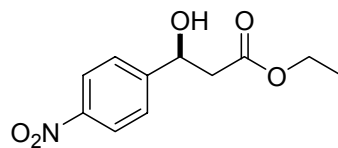
E04. Espectro de RMN de ^{13}C (S)-(-)-3-hidroxi-3-fenilpropanoato de etila (**S**)-2a



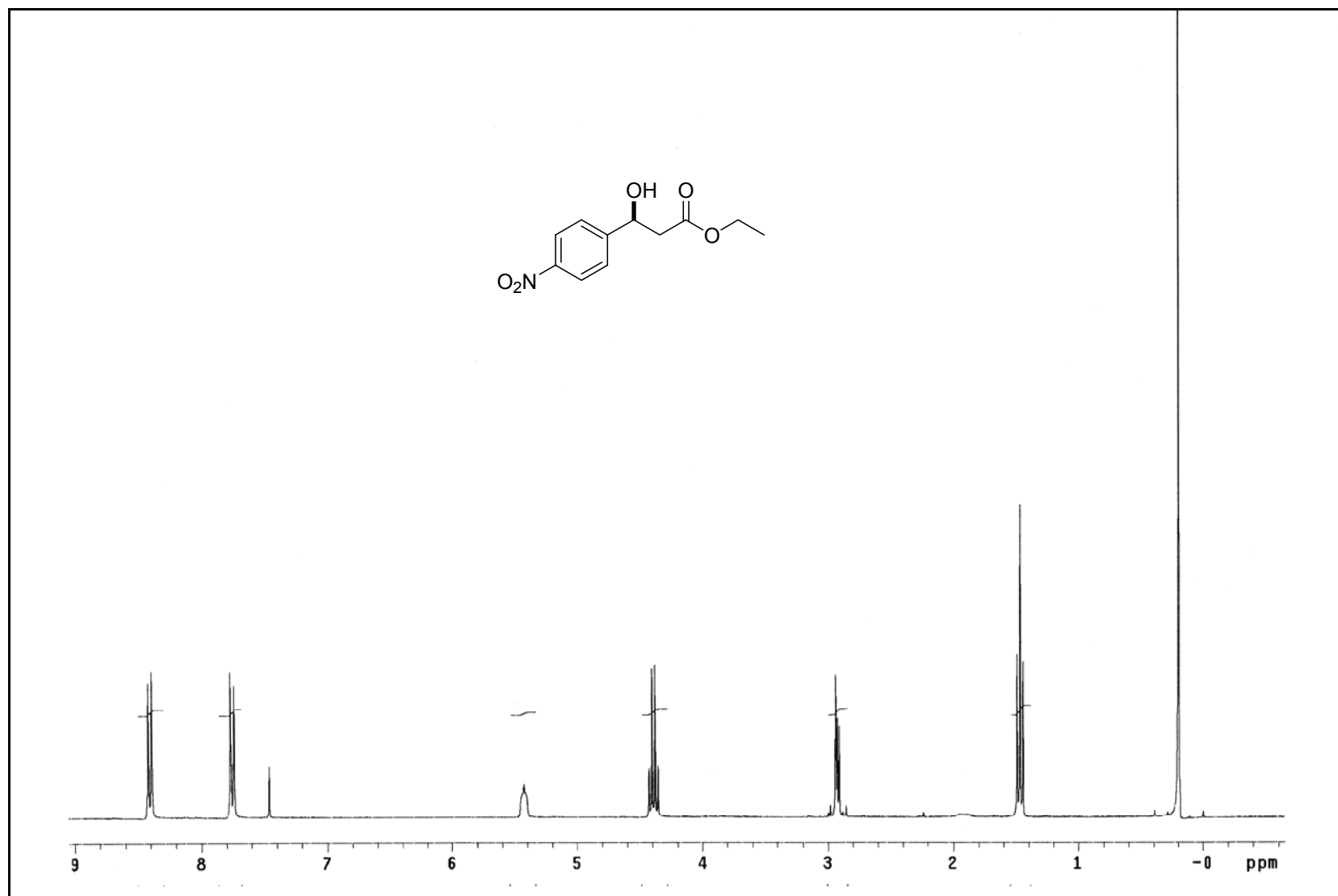
E05. Espectro de RMN de ^1H de **(±)-2a** na presença de $(+)\text{-Eu(hfc)}_3$



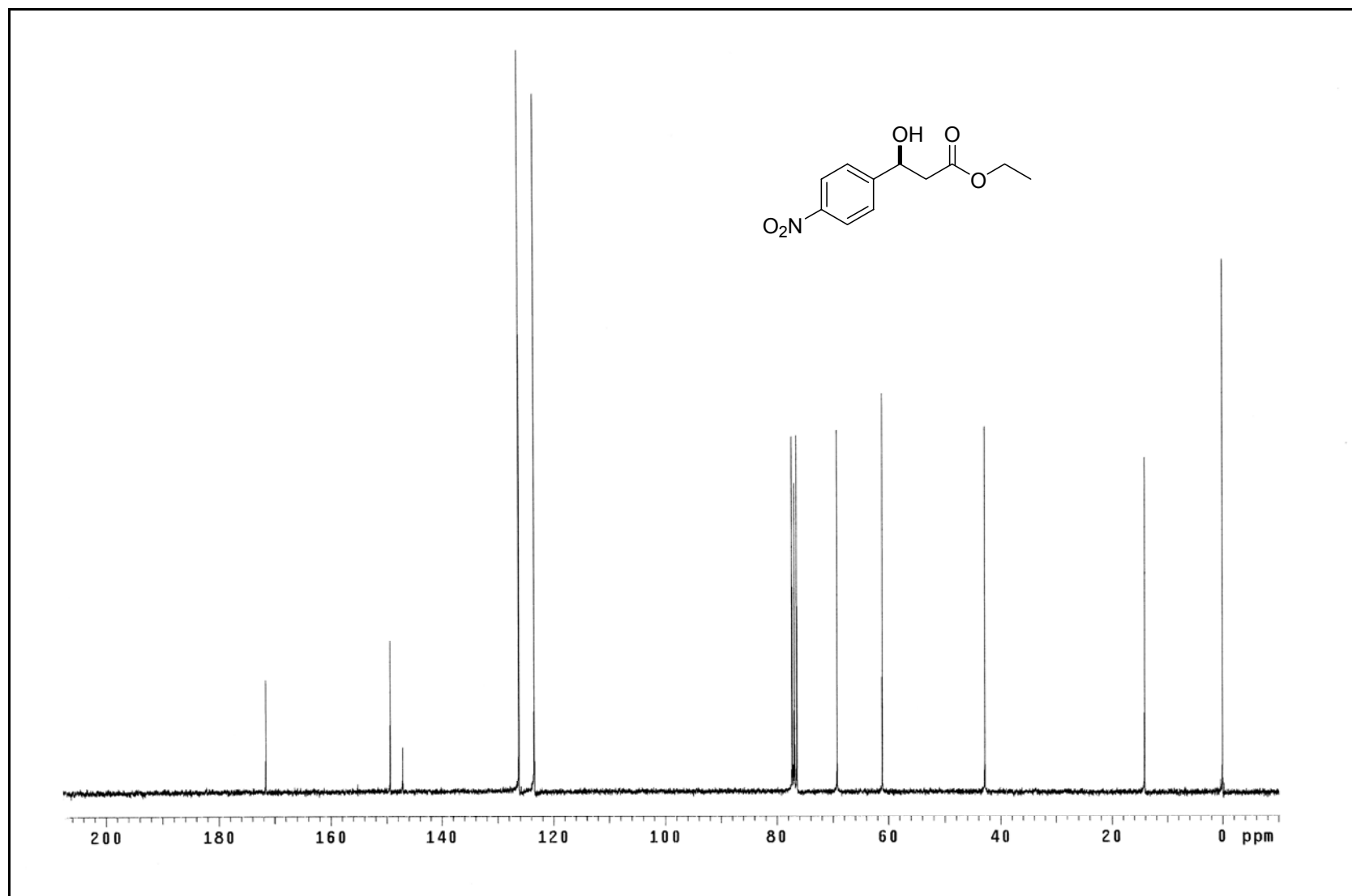
E06. Espectro no IV do (S)-(-)-3-hidroxi-3-*p*-nitrofenilpropanoato de etila (**S**)-**2b**



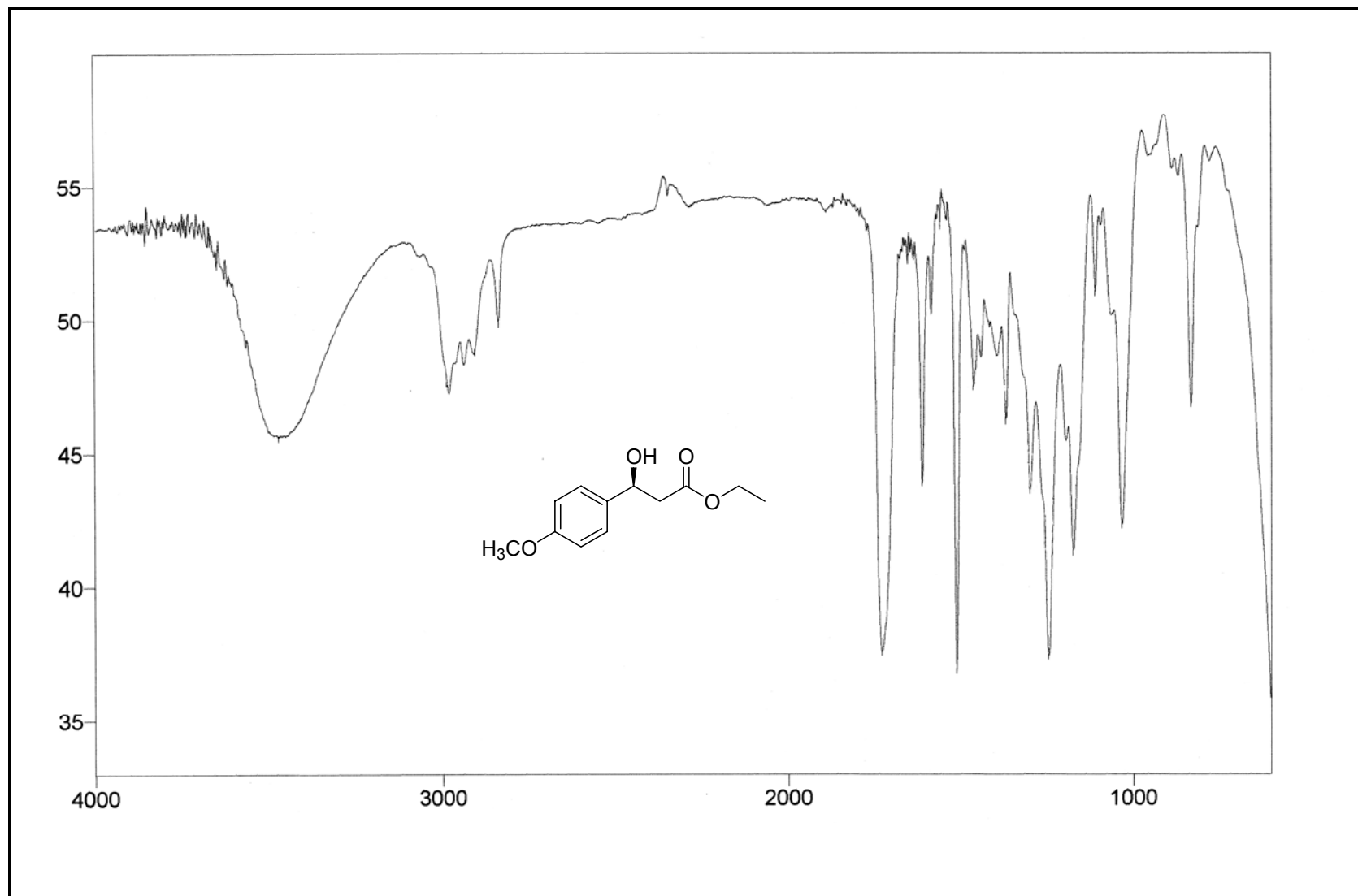
E07. Espectro de massas do (S)-(-)-3-hidroxi-3-*p*-nitrofenilpropanoato de etila (**S**)-**2b**



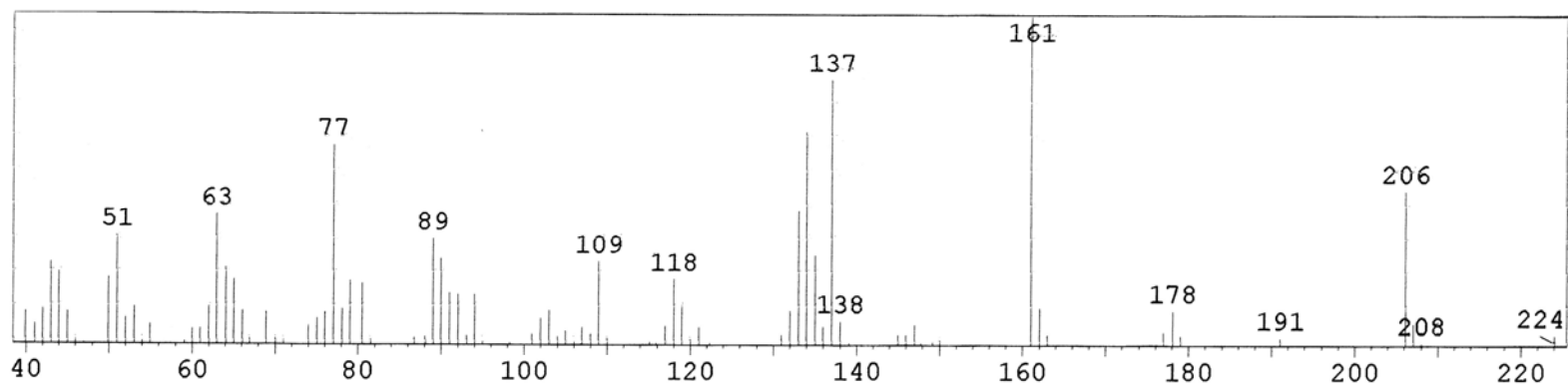
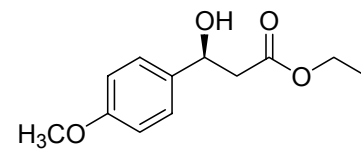
E08. Espectro de RMN de ^1H de (S)-(-)-3-hidroxi-3-*p*-nitrofenilpropanoato de etila (**S**)-2b



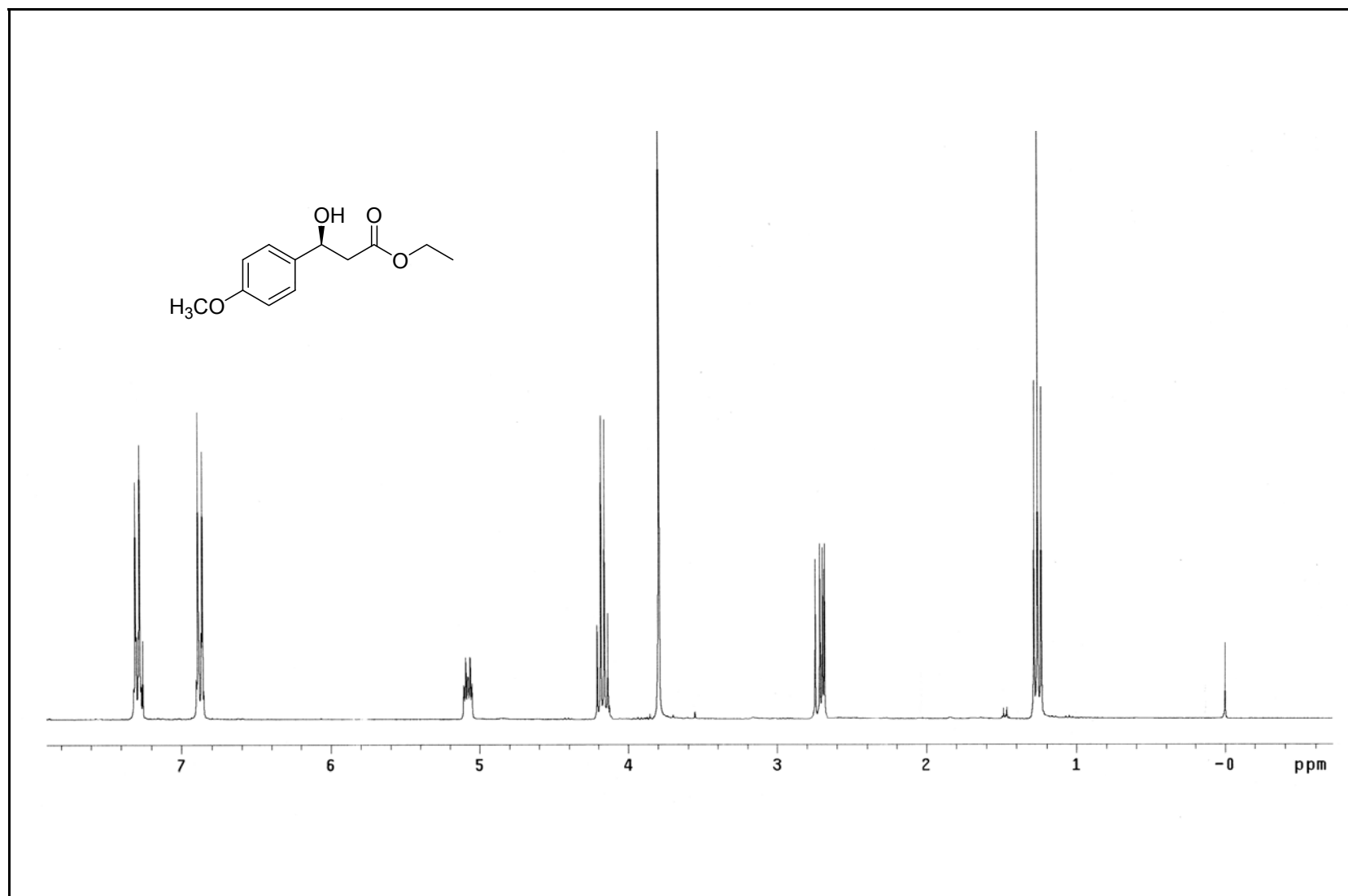
E09 Espectro de RMN de ^{13}C de (S)-(-)-3-hidroxi-3-*p*-nitrofenilpropanoato de etila (S)-2b



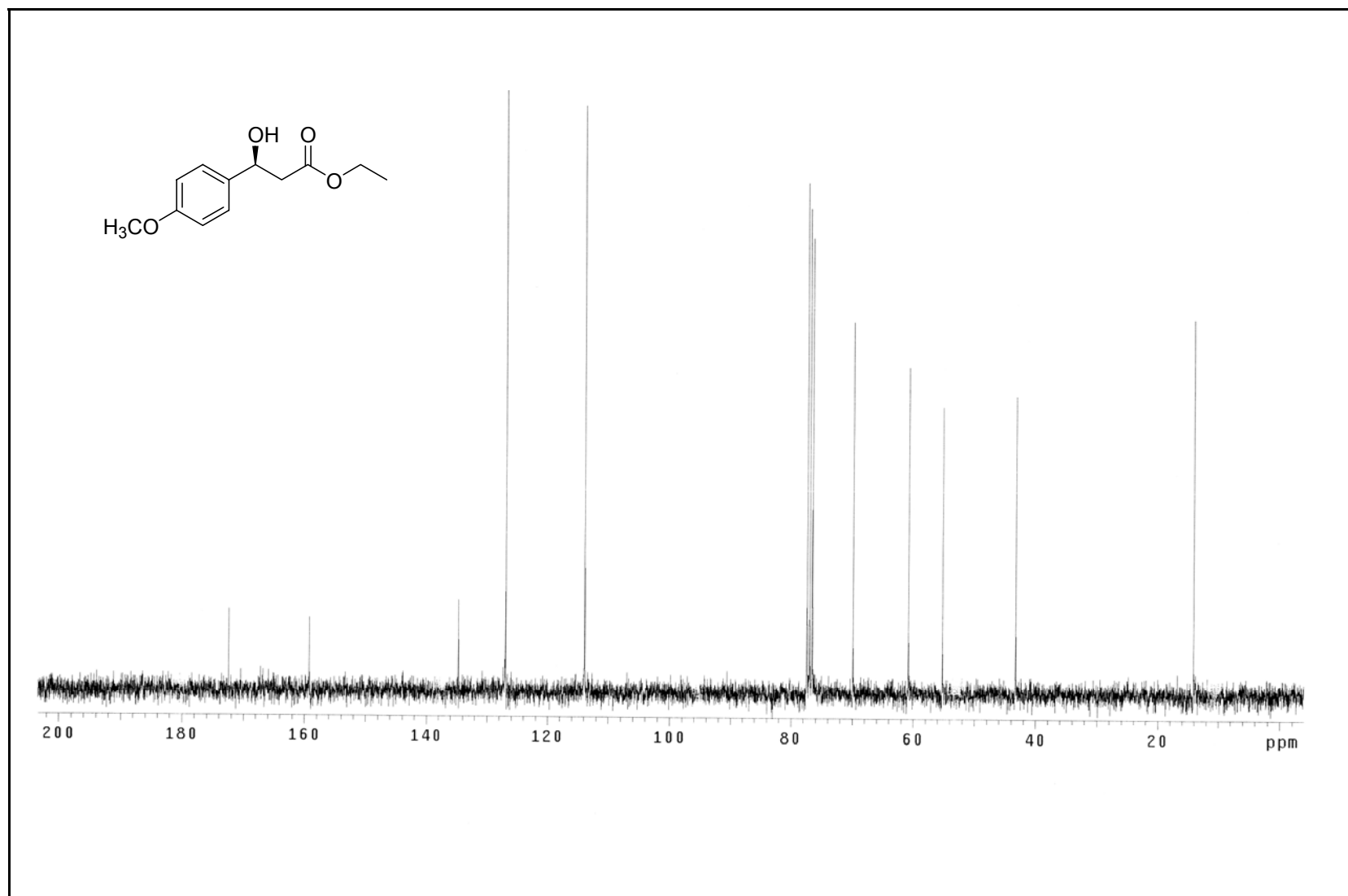
E10. Espectro no IV do (S)-(-)-3-hidroxi-3-*p*-metoxifenilpropanoato de etila (**S**)-**2c**



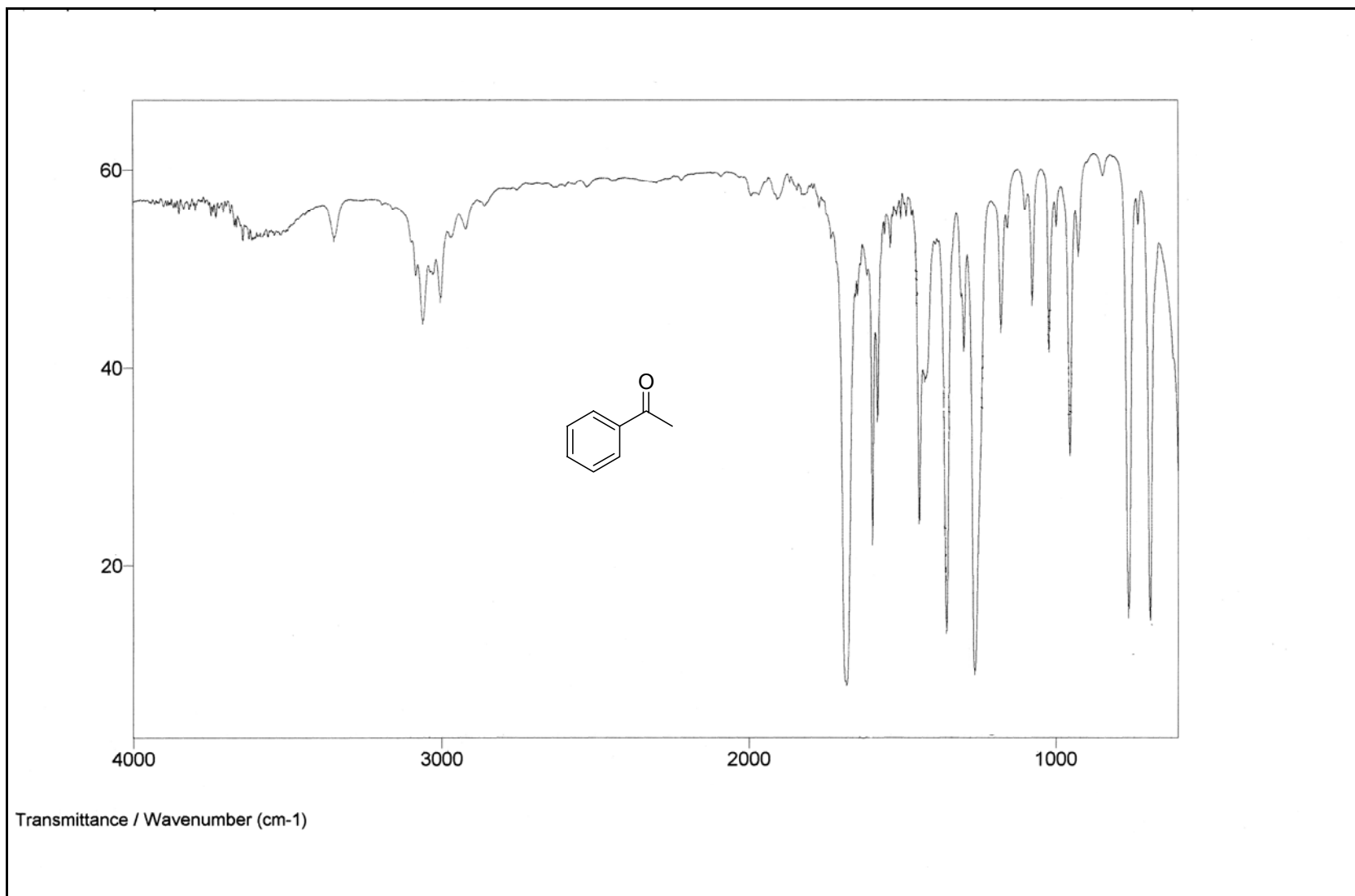
E11. Espectro de massas do (S)-(-)-3-hidroxi-3-*p*-metoxifenilpropanoato de etila (**S**)-2c



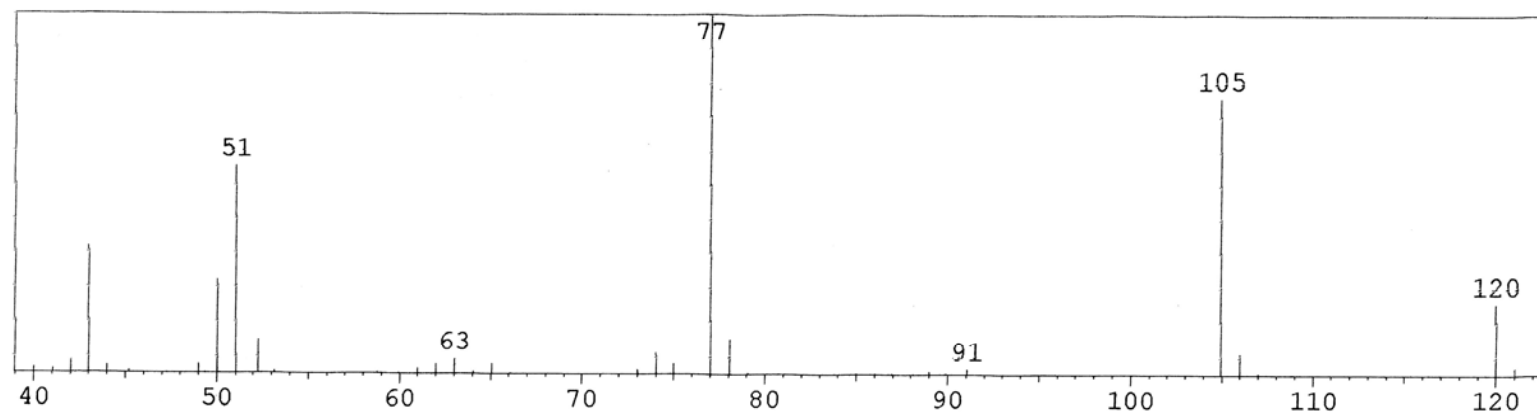
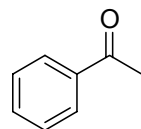
E12. Espectro de RMN de ^1H de (S)-(-)-3-hidroxi-3-*p*-metoxifenilpropanoato de etila (**S**)-**2c**



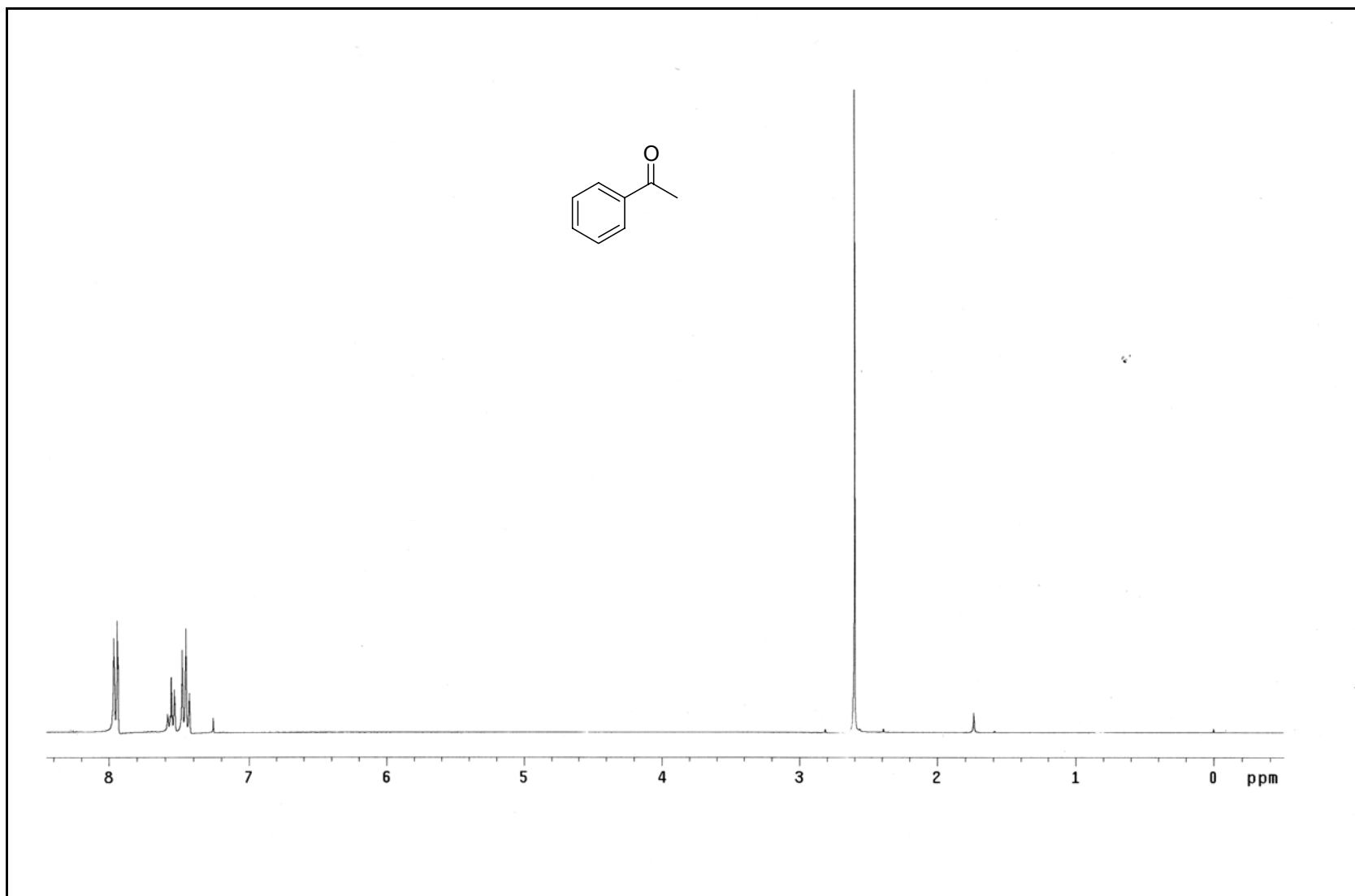
E13. Espectro de RMN de ¹³C de (S)-(-)-3-hidroxi-3-*p*-metoxifenilpropanoato de etila (**S**)-**2c**



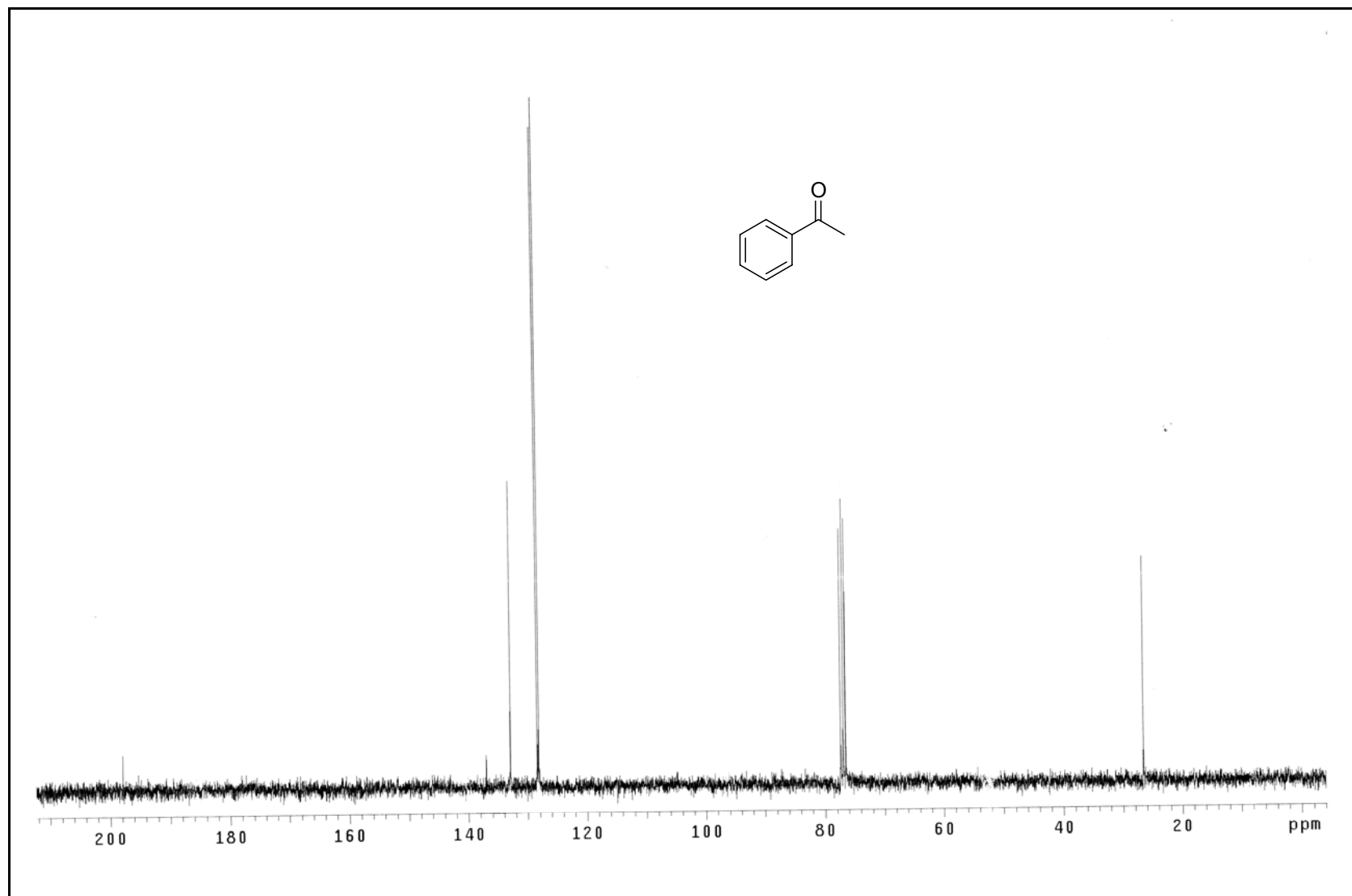
E14. Espectro no IV da acetofenona **9a**



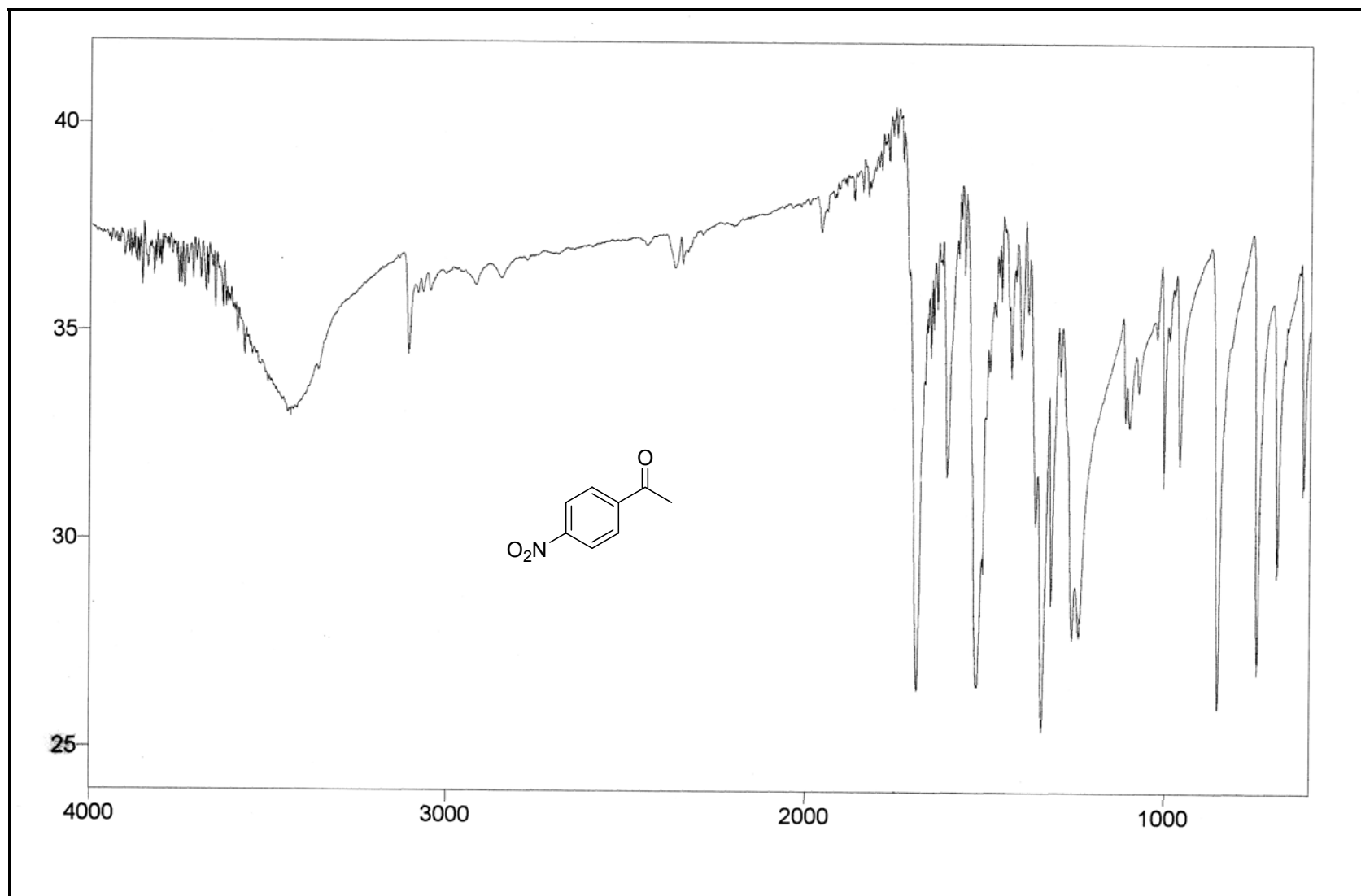
E15. Espectro de massas da acetofenona **9a**



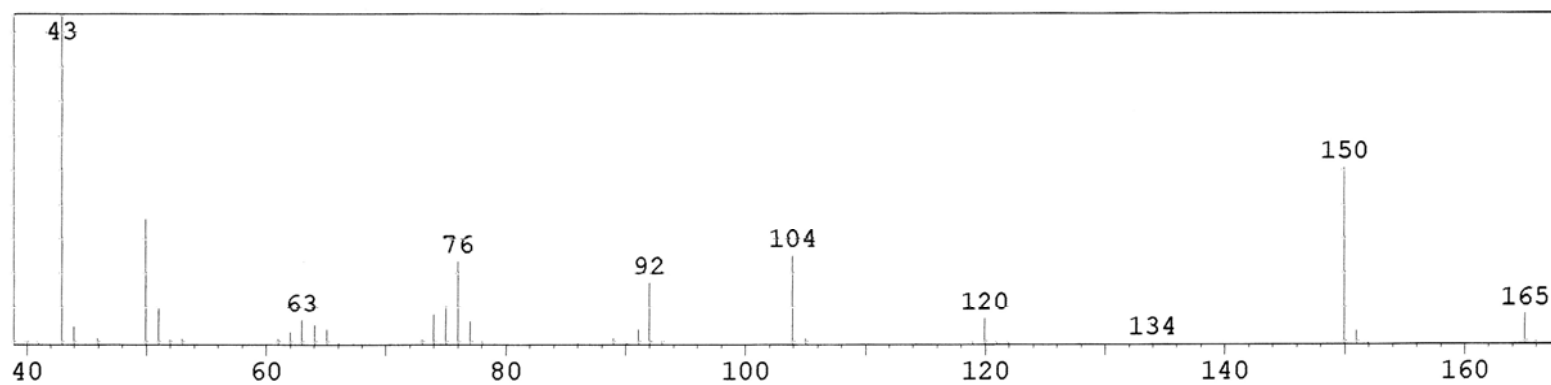
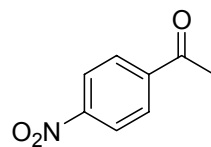
E16. Espectro de RMN de ^1H da acetofenona **9a**



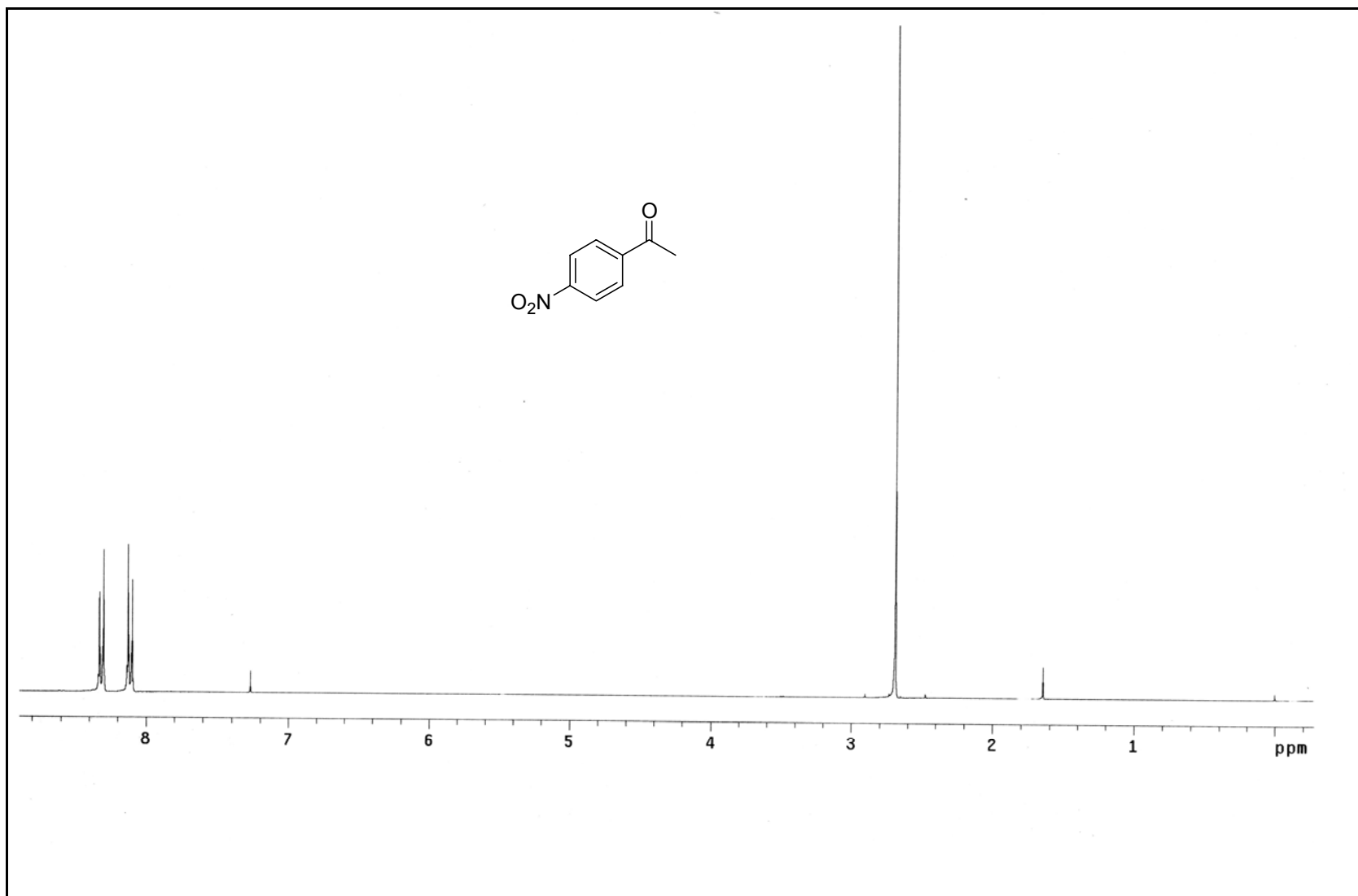
E17. Espectro de RMN de ^{13}C da acetofenona **9a**



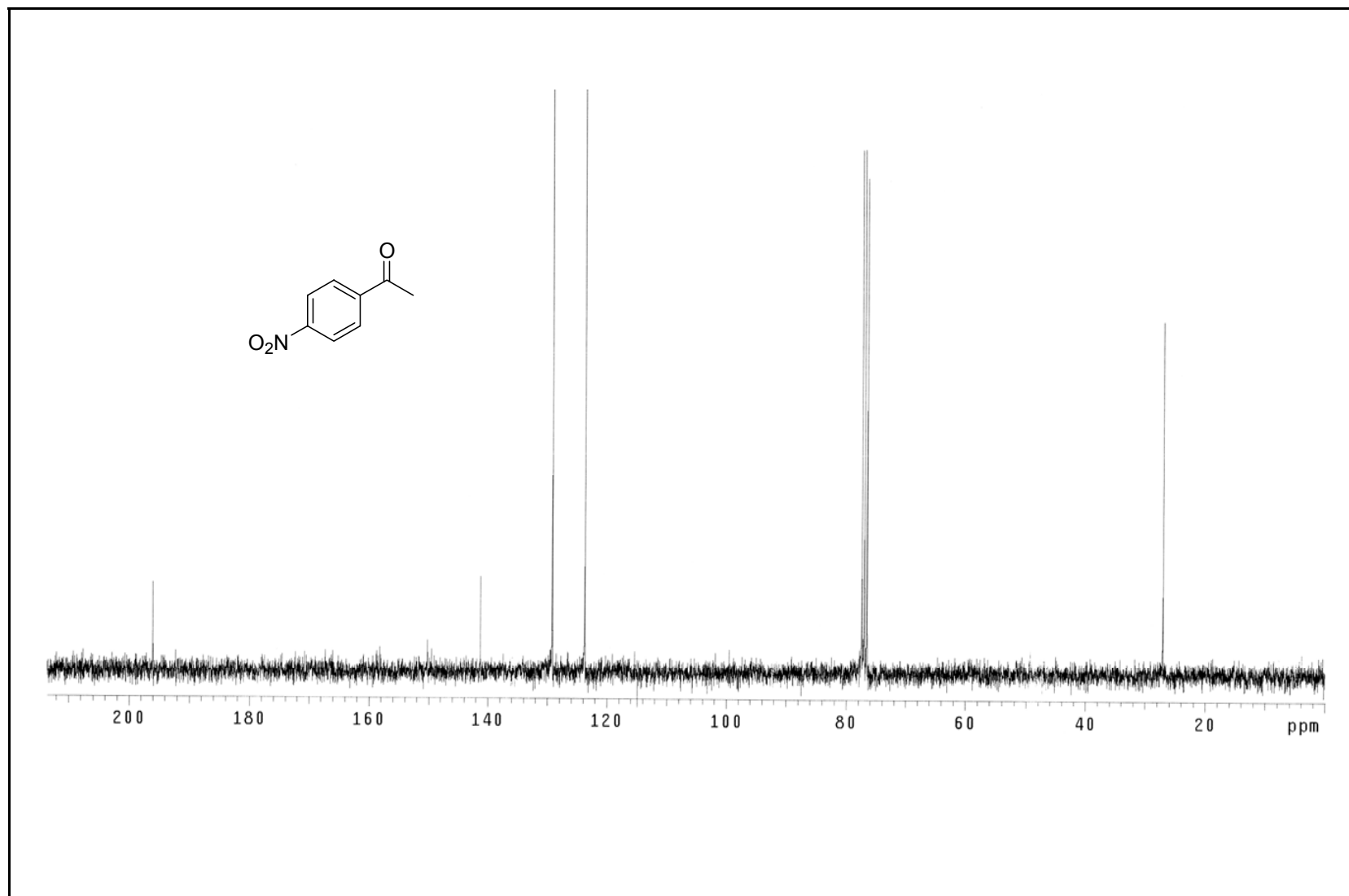
E18. Espectro no IV da *p*-nitroacetofenona **9b**



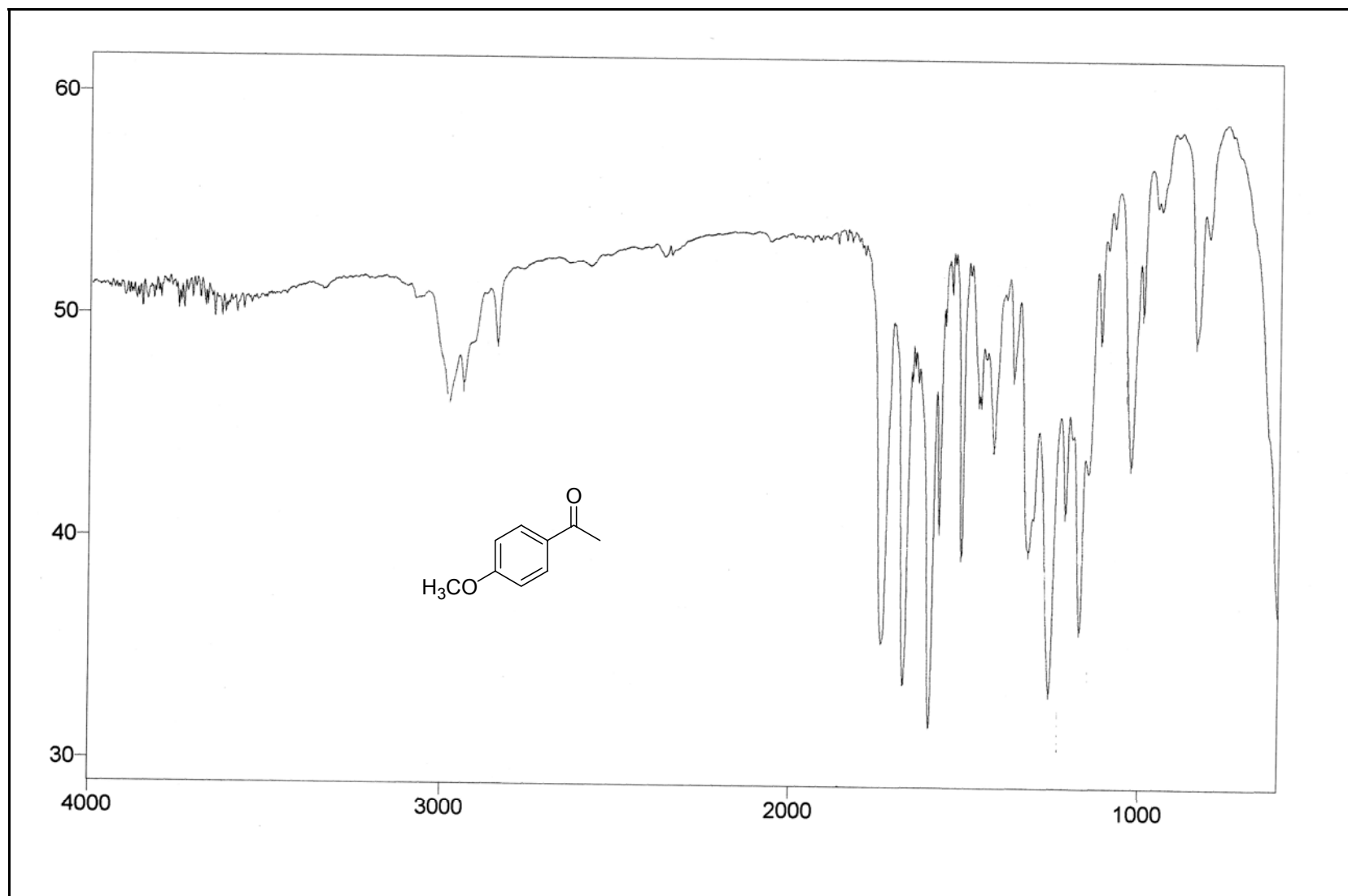
E19. Espectro de massas da *p*-nitroacetofenona **9b**



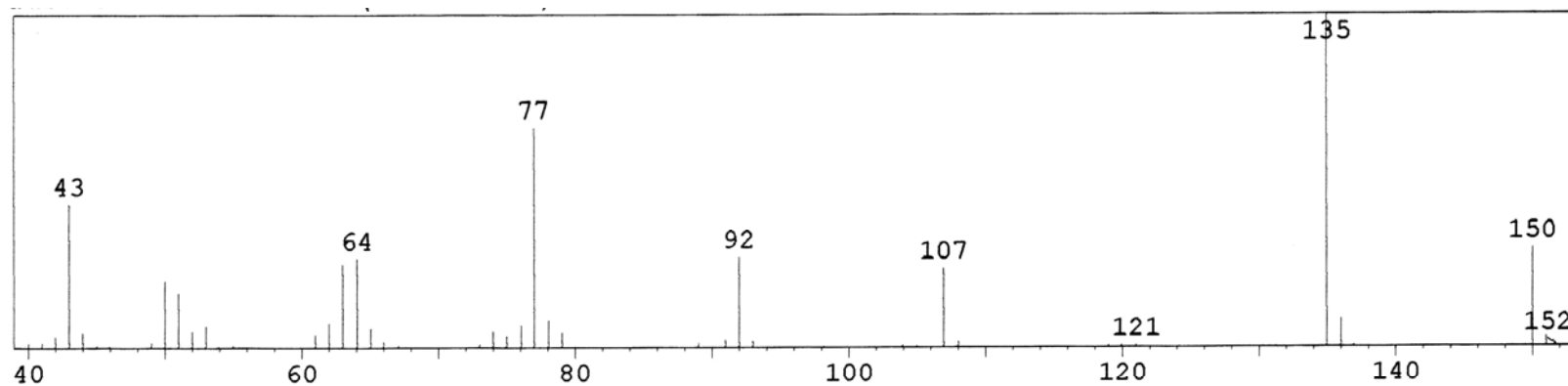
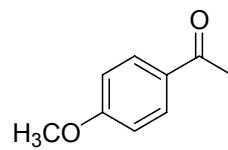
E20. Espectro de RMN de ¹H da *p*-nitroacetofenona **9b**



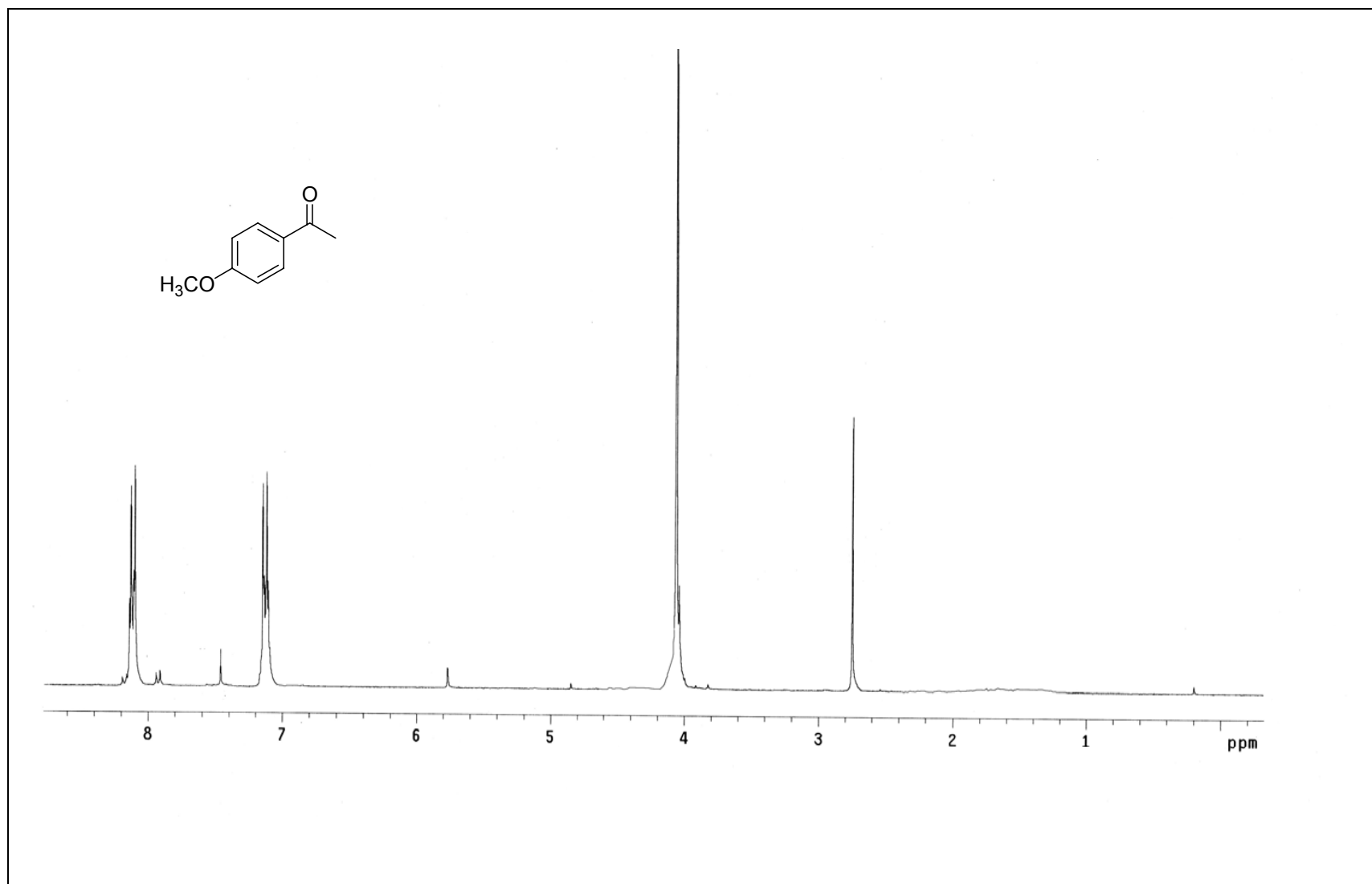
E21. Espectro de RMN de ^{13}C da *p*-nitroacetofenona **9b**



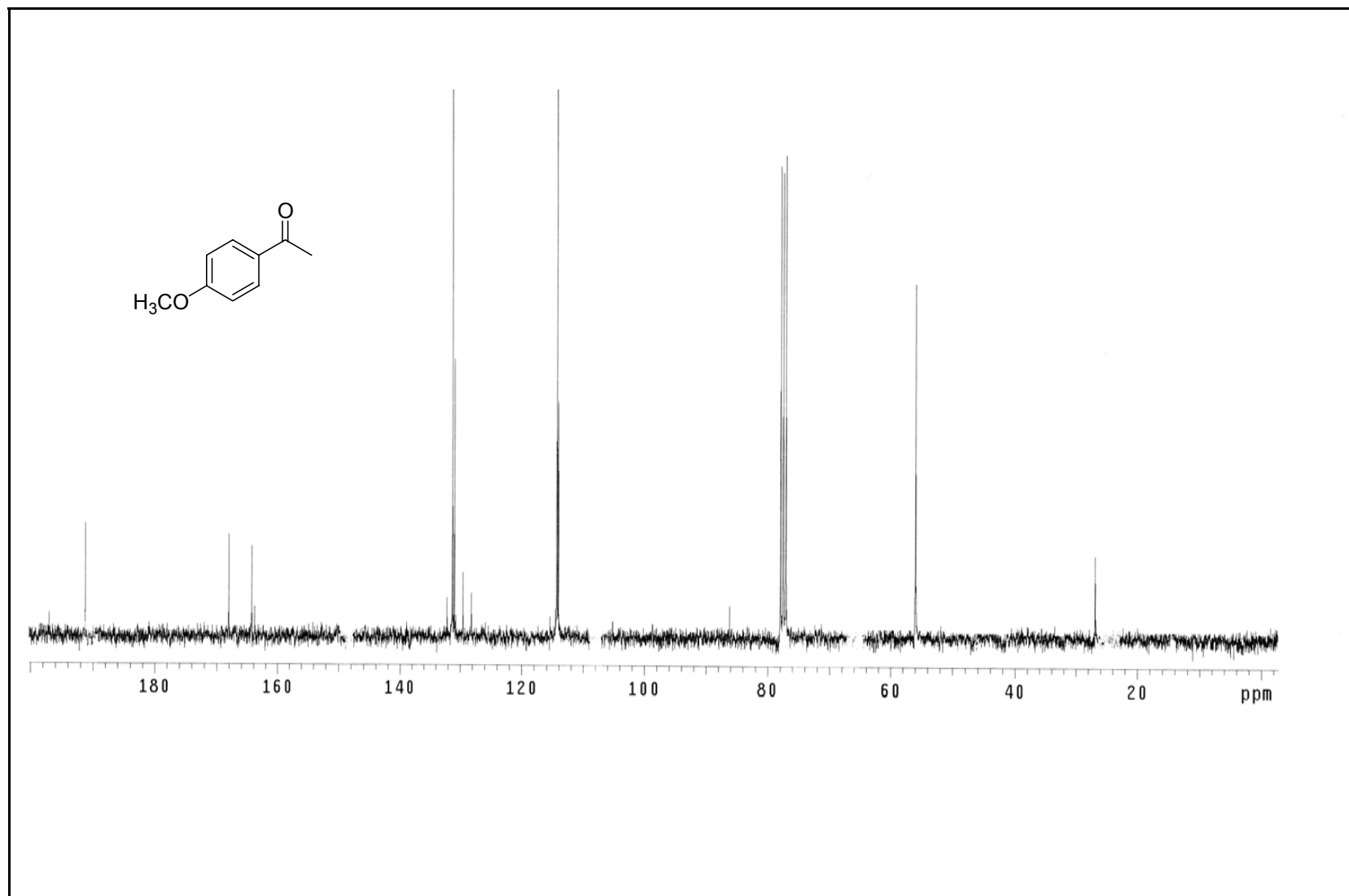
E22. Espectro no IV da *p*-metoxiacetofenona **9c**



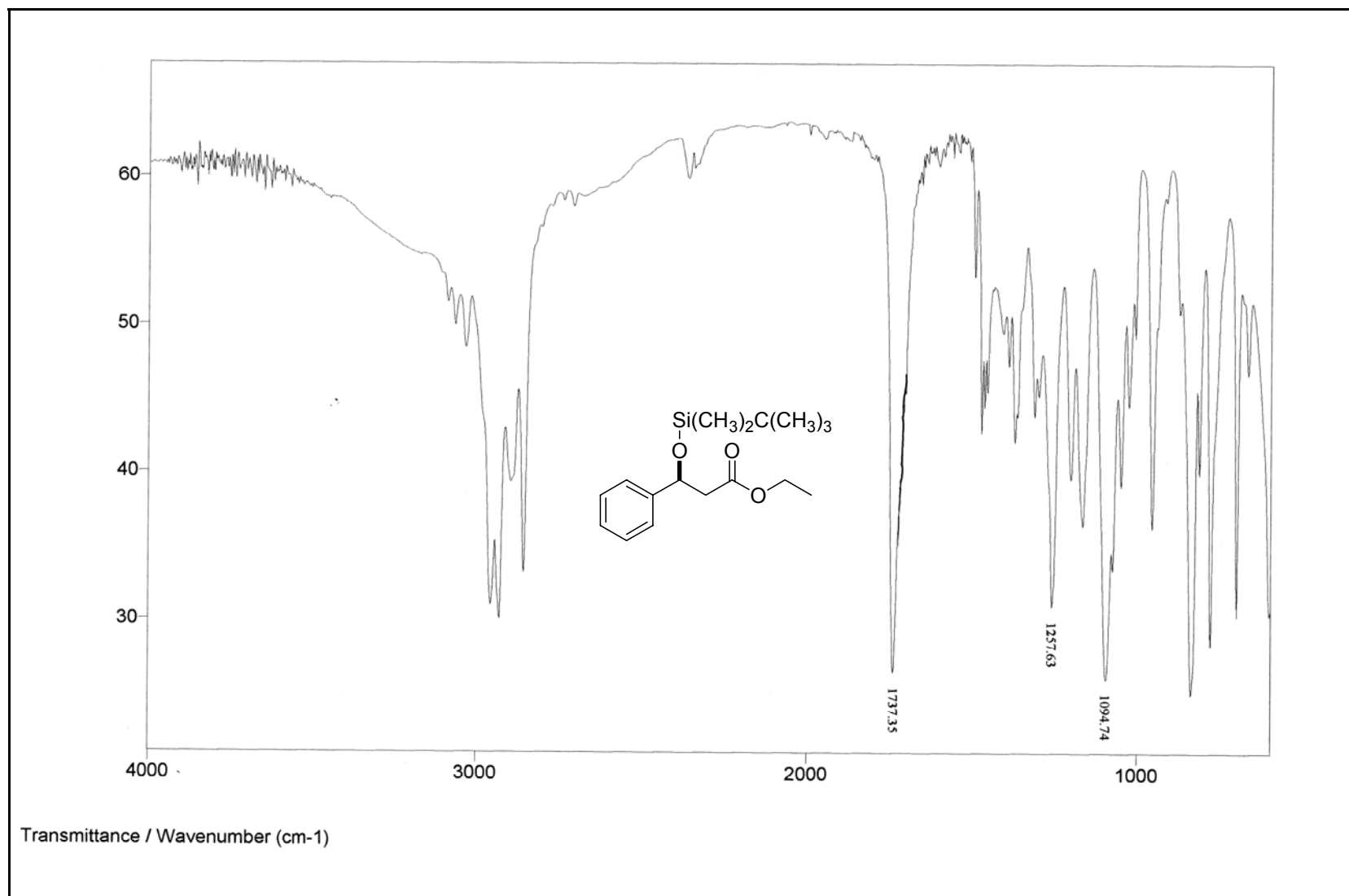
E23. Espectro de massas da *p*-metoxiacetofenona **9c**



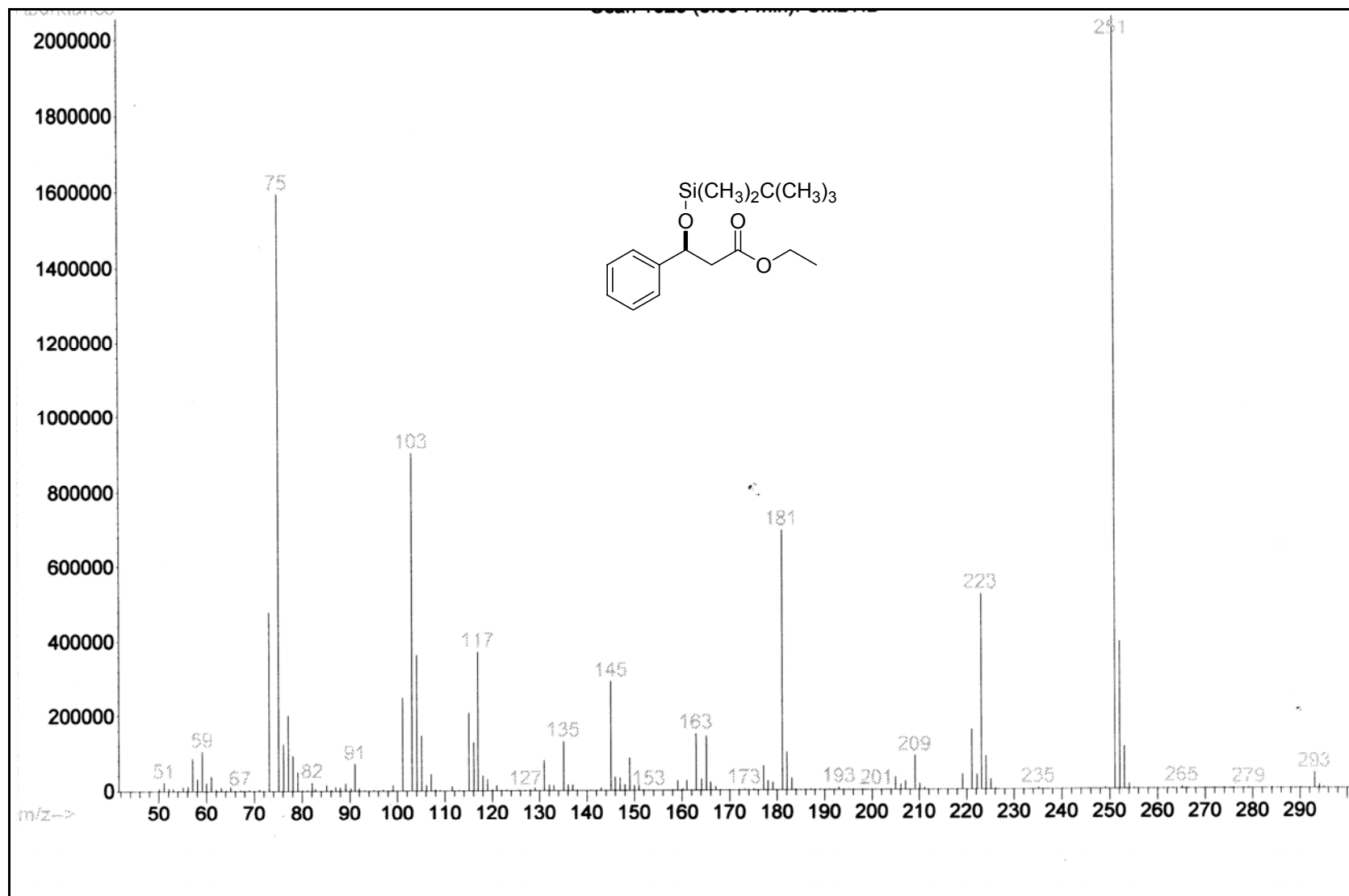
E24. Espectro de RMN de ^1H da *p*-metoxiacetofenona **9c**



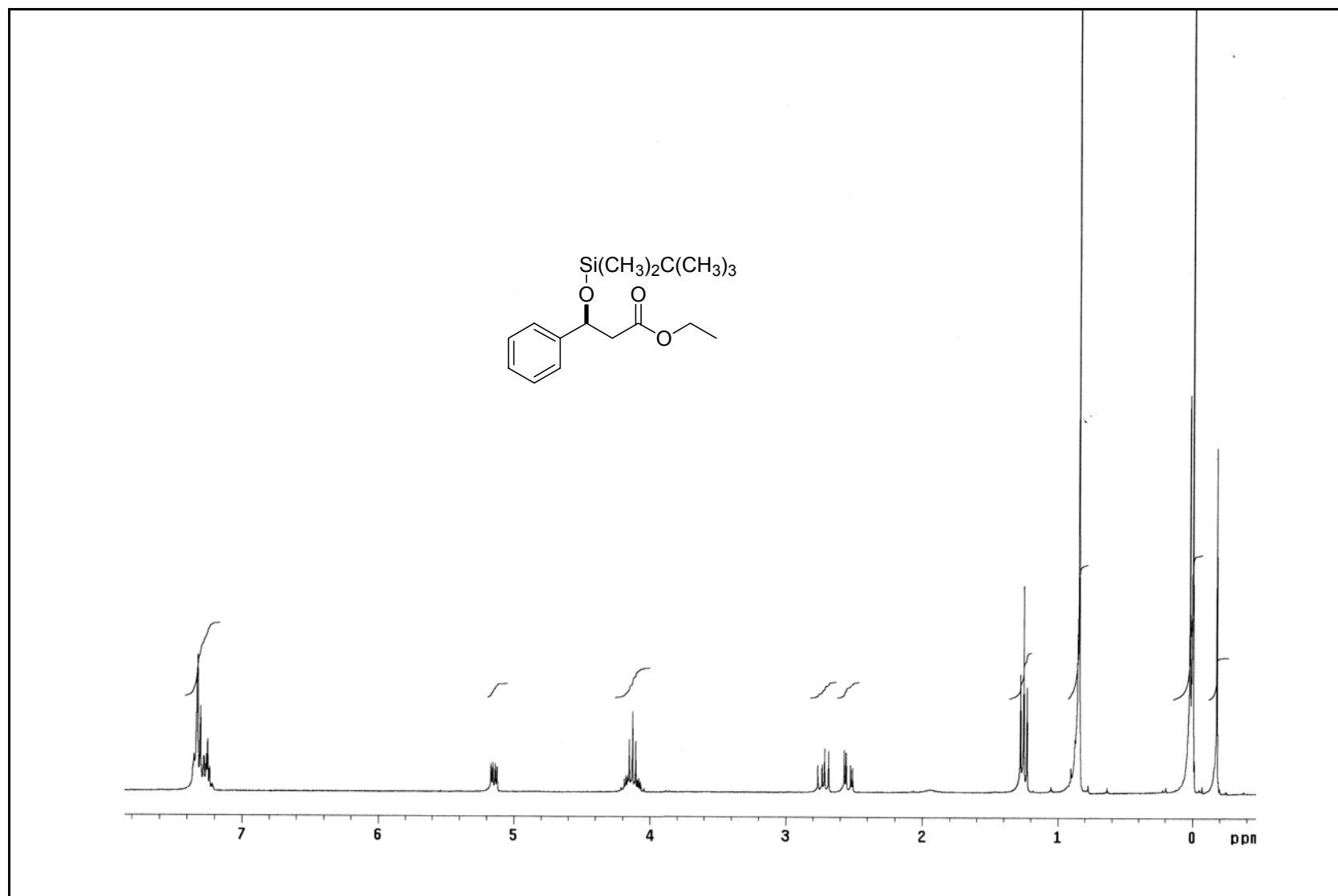
E25. Espectro de RMN de ^{13}C da *p*-metoxiacetofenona **9c**



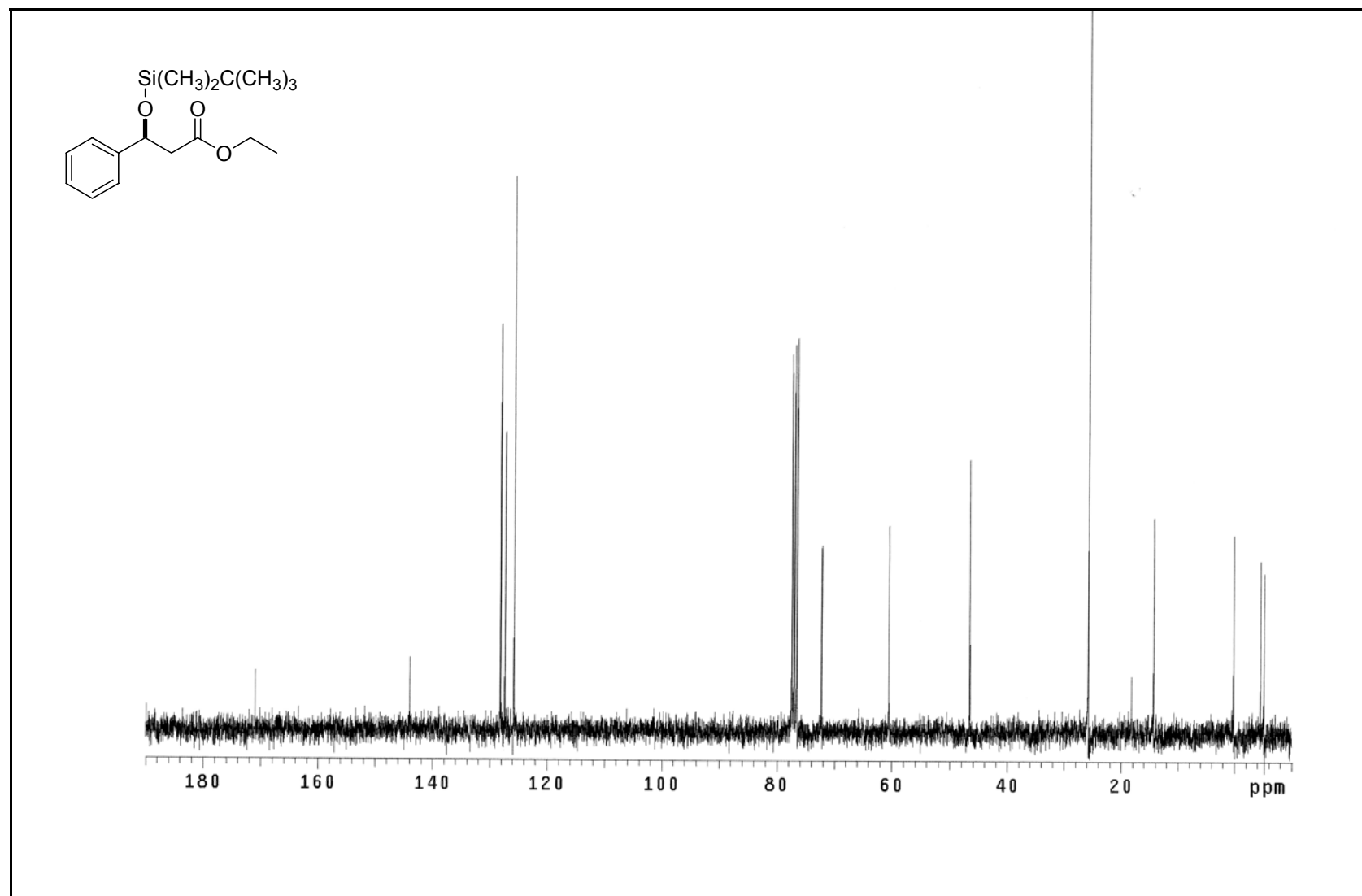
E26. Espectro no IV de (S)-(-)-3-*t*-(butildimetilsilil)oxi-3-fenilpropanoato de etila (**S**)-**3a**



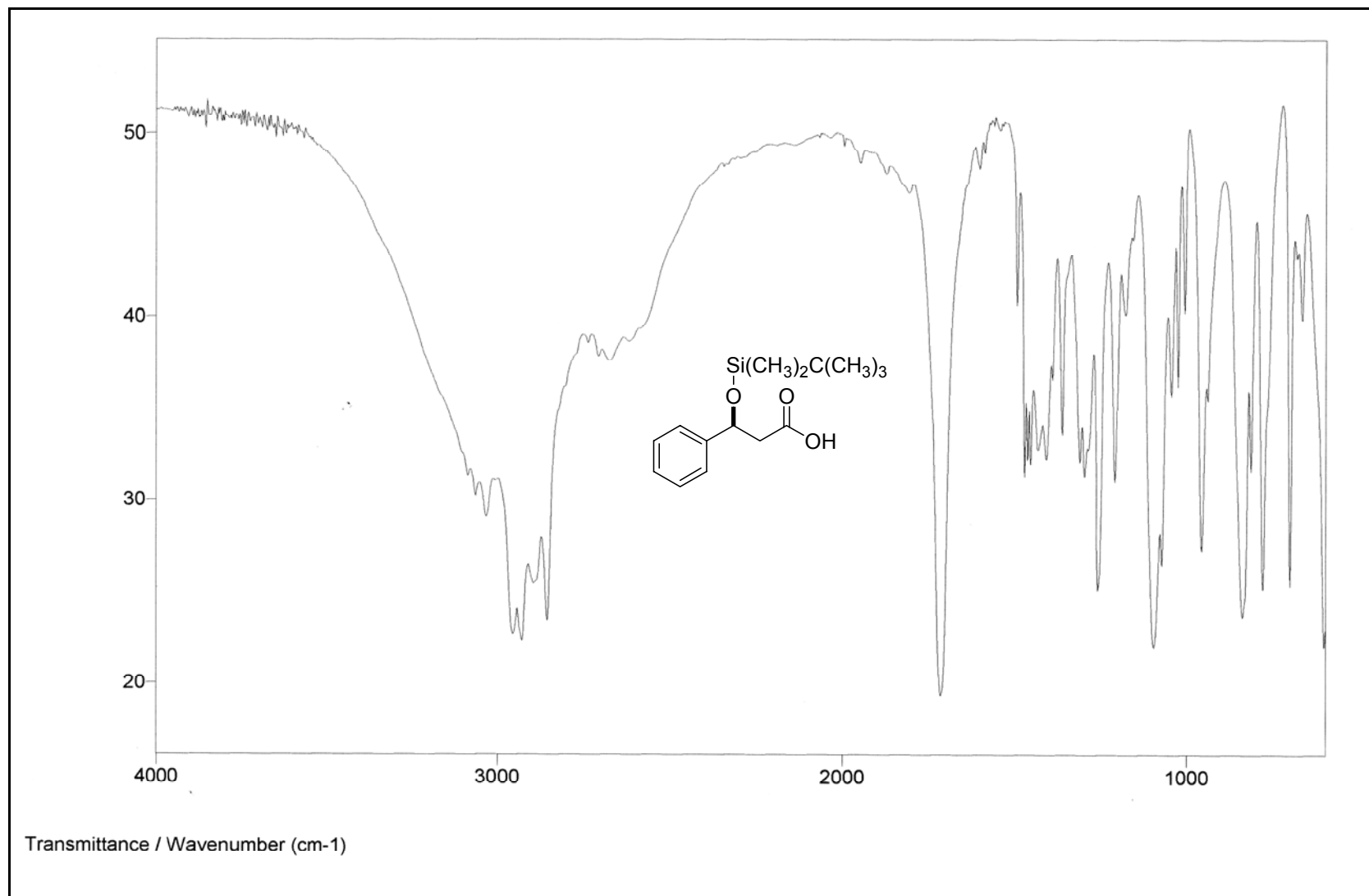
E27. Espectro de massas de (S)-(-)-3-*t*-(butildimetilsilil)oxi-3-fenilpropanoato de etila (**S**)-3a



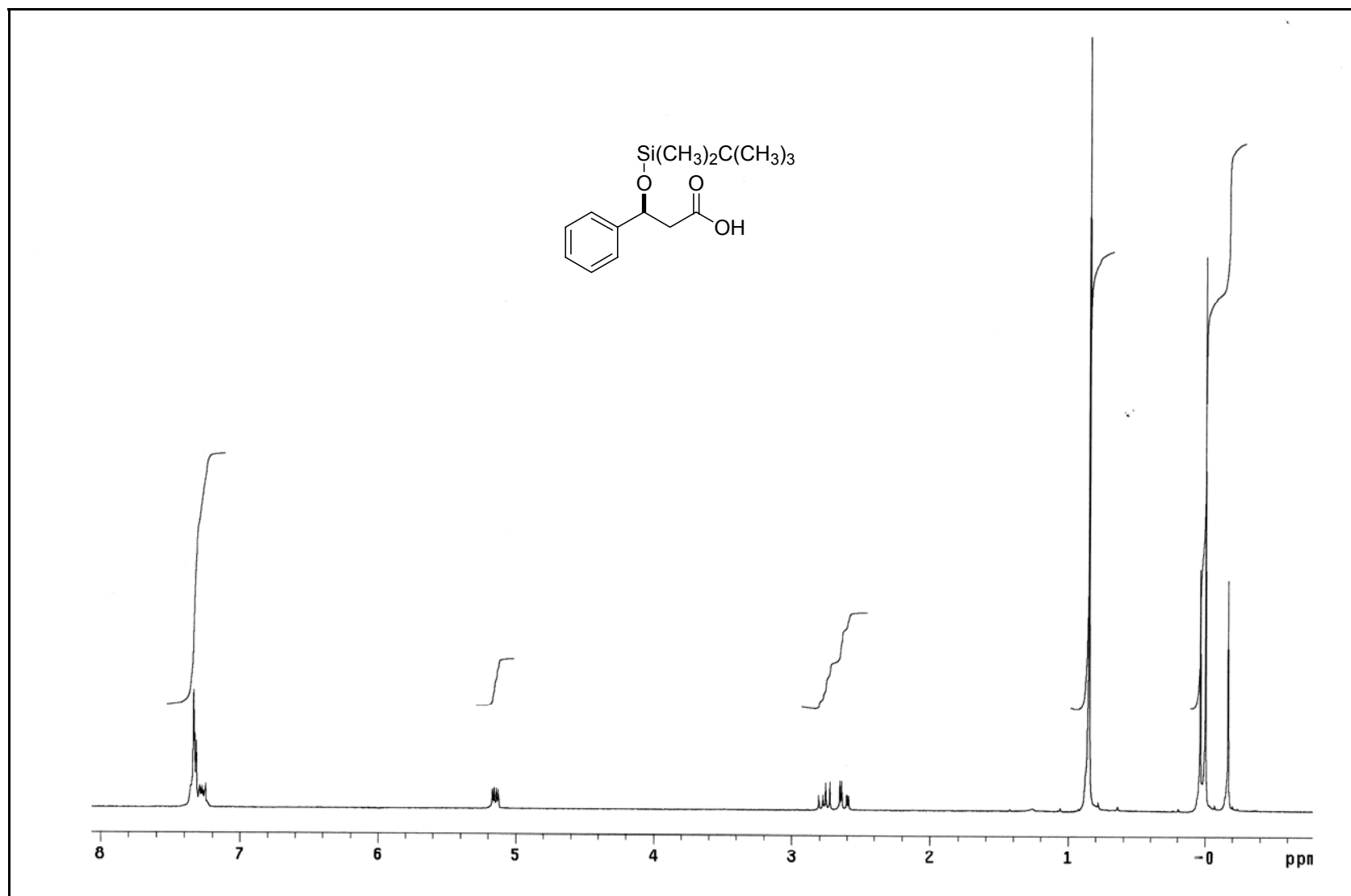
E28. Espectro de RMN de ^1H de (S)-(-)-3-*t*-(butildimetilsilil)oxi-3-fenilpropanoato de etila (**S**)-**3a**



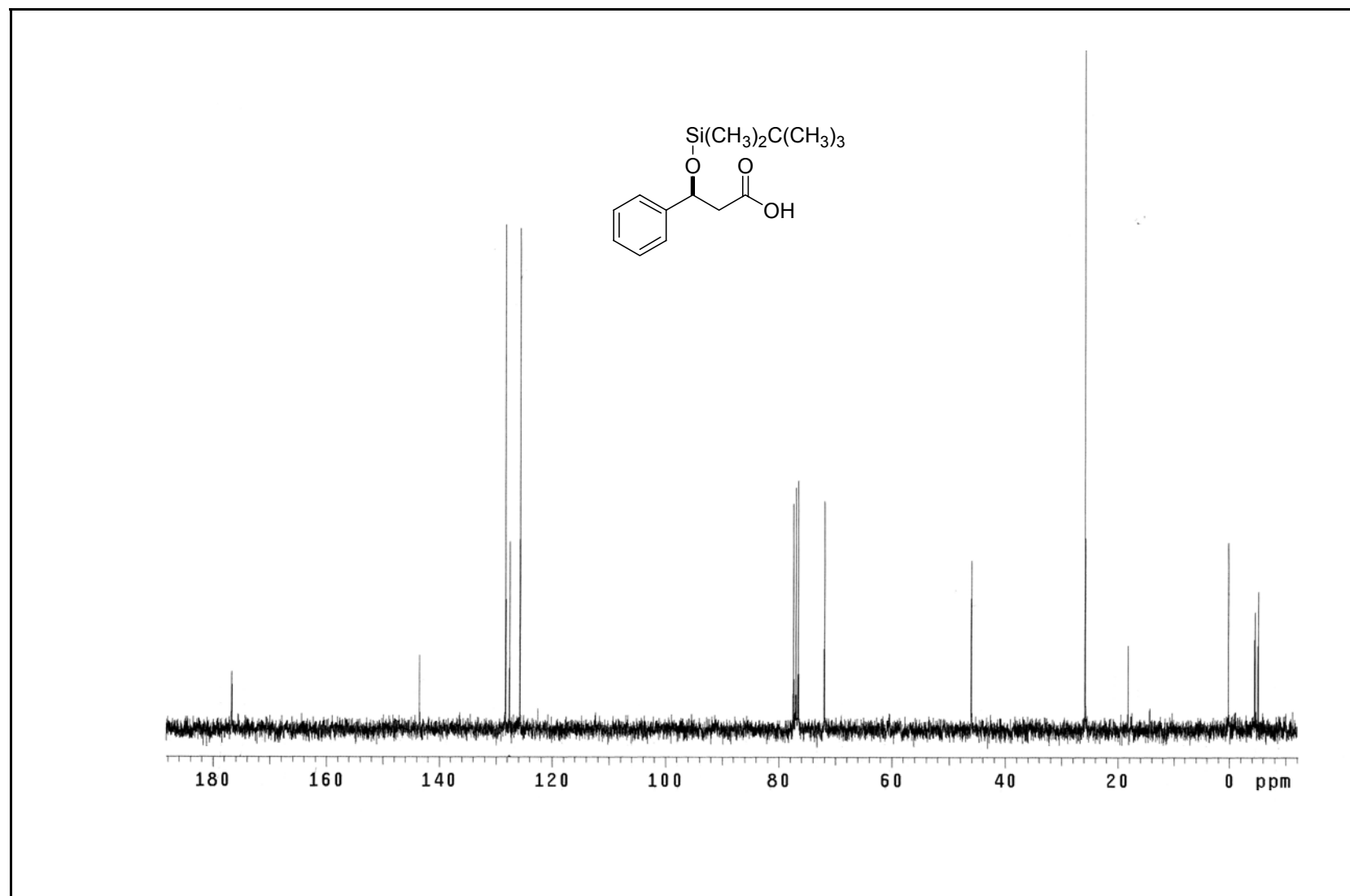
E29 Espectro de RMN de ^{13}C de (S)-(-)-3-*t*-(butyldimethylsilyl)oxi-3-fenilpropanoato de etila (**S**)-**3a**



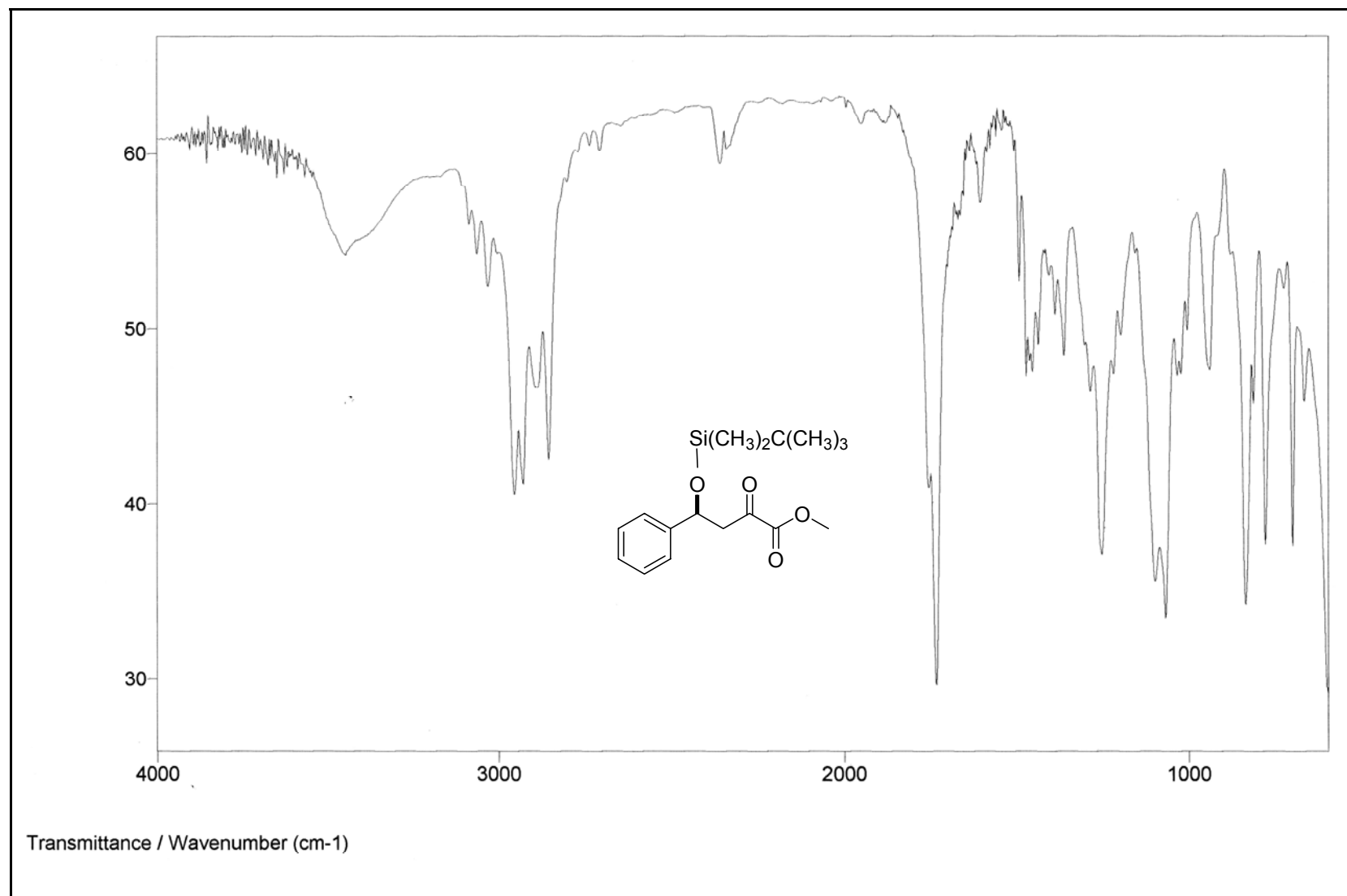
E30. Espectro no IV do ácido (S)-(-)-3-*t*-(butildimetilsilil)oxi-3-fenilpropanóico (**S**)-4a



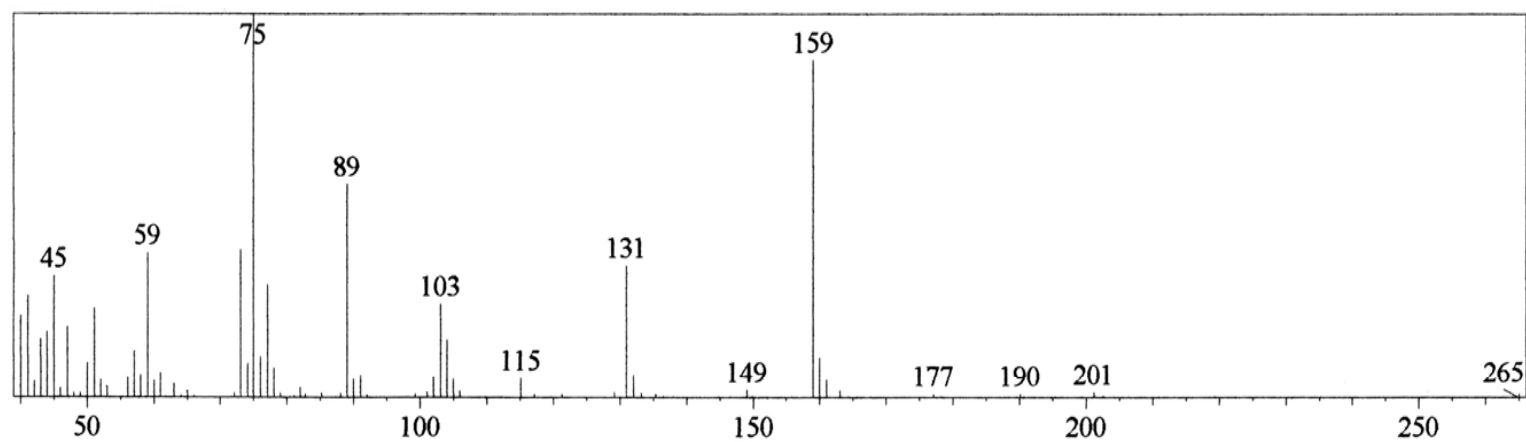
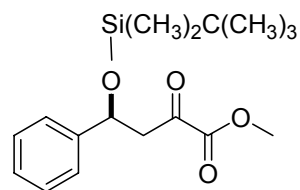
E31. Espectro de RMN de ^1H do ácido (S)-(-)-3-*t*-(butildimetilsilil)oxi-3-fenilpropanóico (**S**)-4a



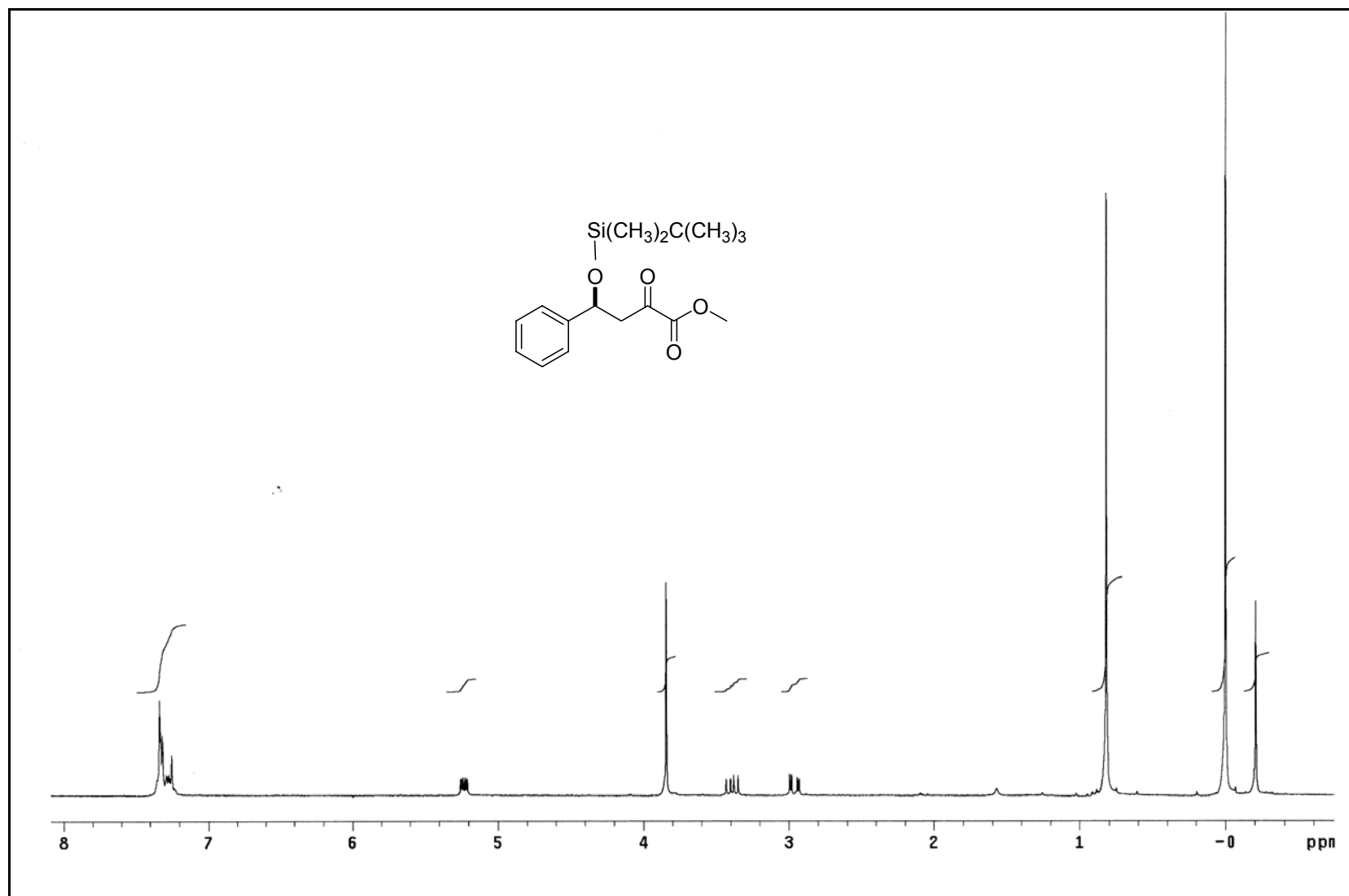
E32. Espectro de RMN de ^{13}C do ácido (S)-(-)-3-*t*-(butildimetilsilil)oxi-3-fenilpropanóico (**S**)-4a



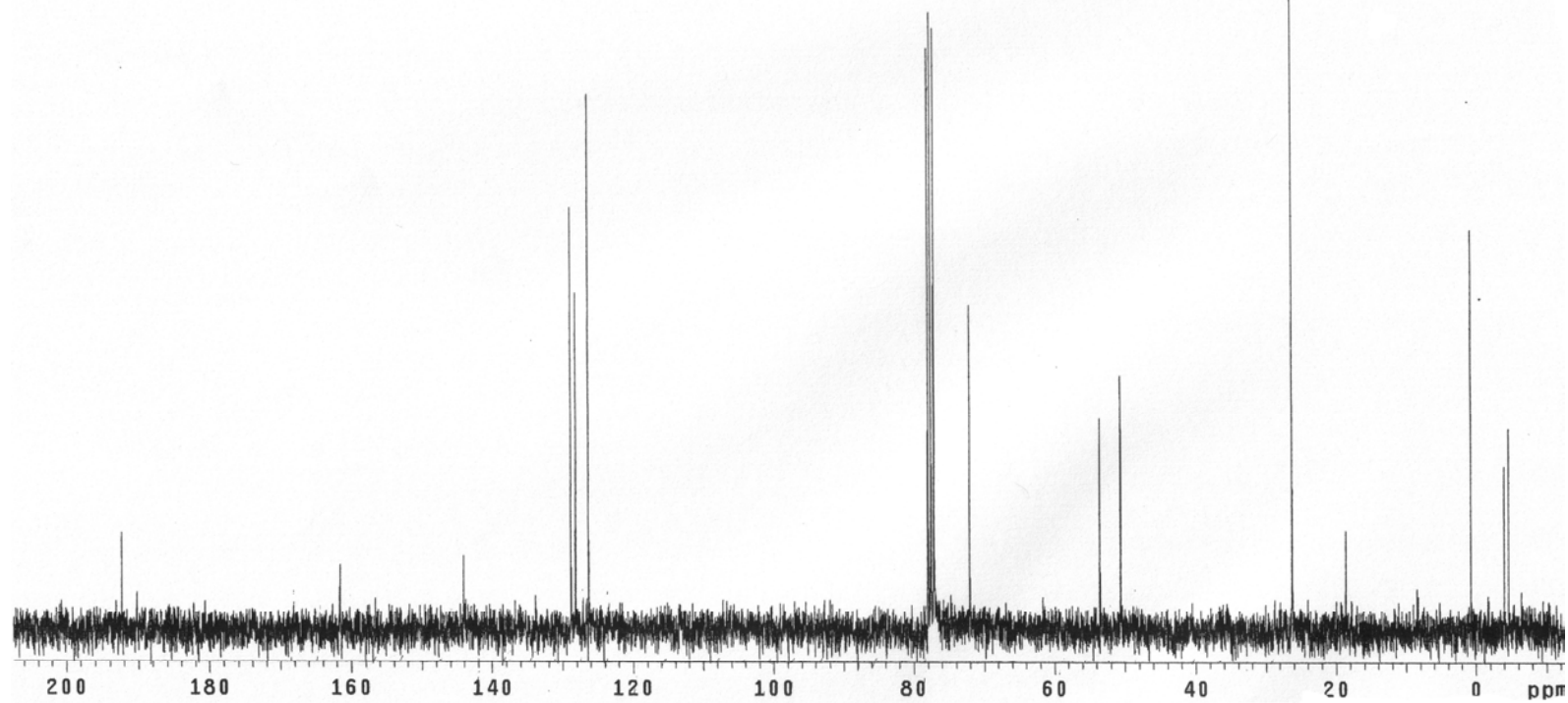
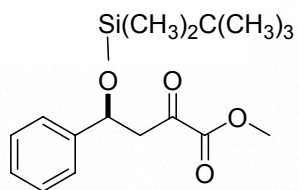
E33. Espectro no IV do (S)-4-(*t*-butildimetilsilil)oxi-2-oxo-4-fenilbutanoato de metila (**S**)-**5a**



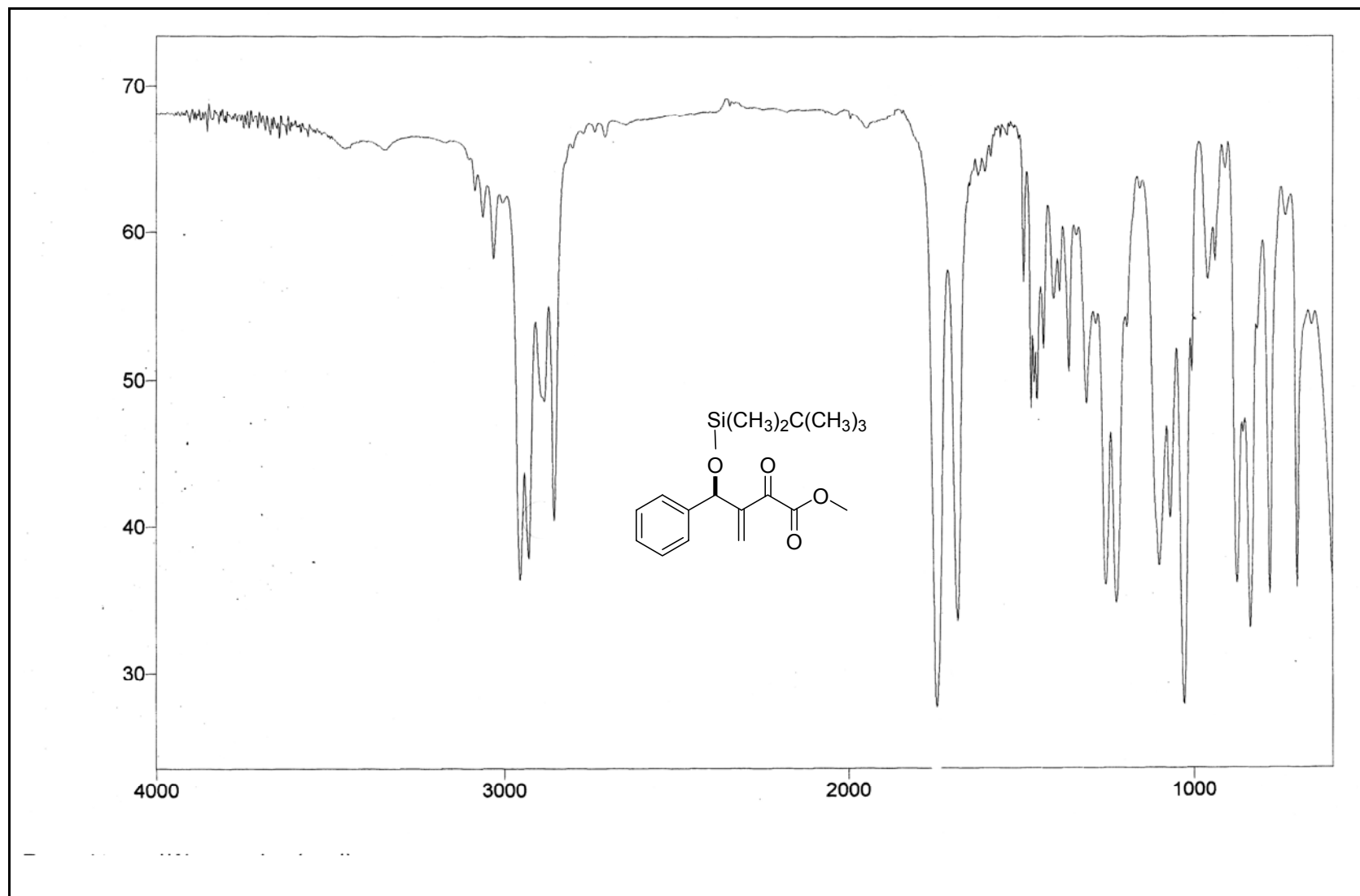
E34. Espectro de massas de (S)-4-(*t*-butildimetilsilil)oxi-2-oxo-4-fenilbutanoato de metila (**S**)-5a



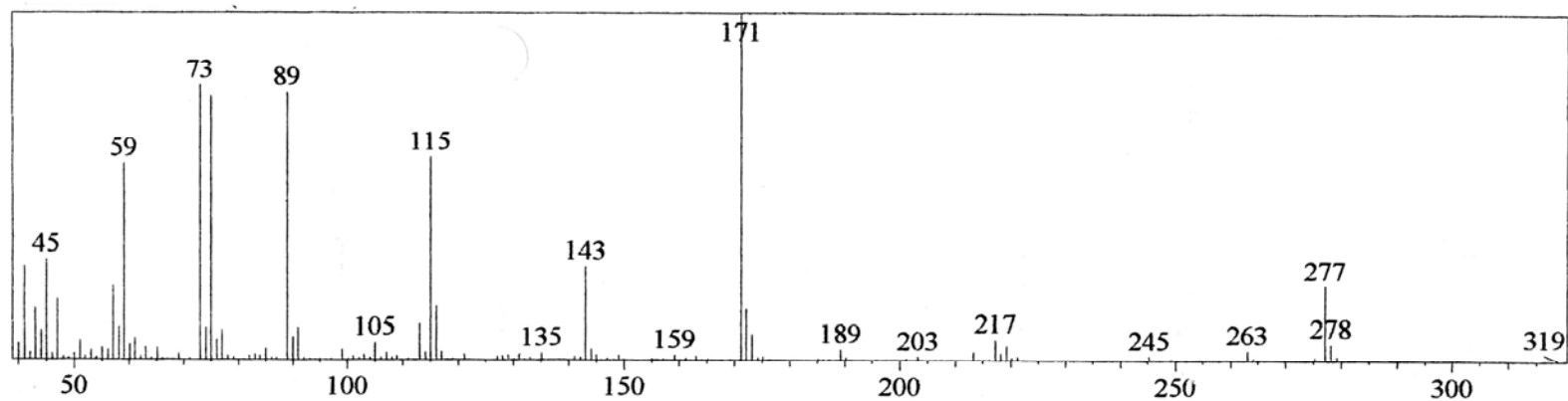
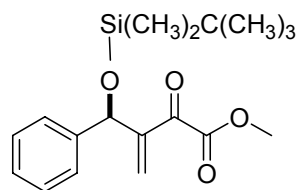
E35. Espectro de RMN de ^1H do (S)-4-(*t*-butildimetilsilil)oxi-2-oxo-4-fenilbutanoato de metila (**S**)-5a



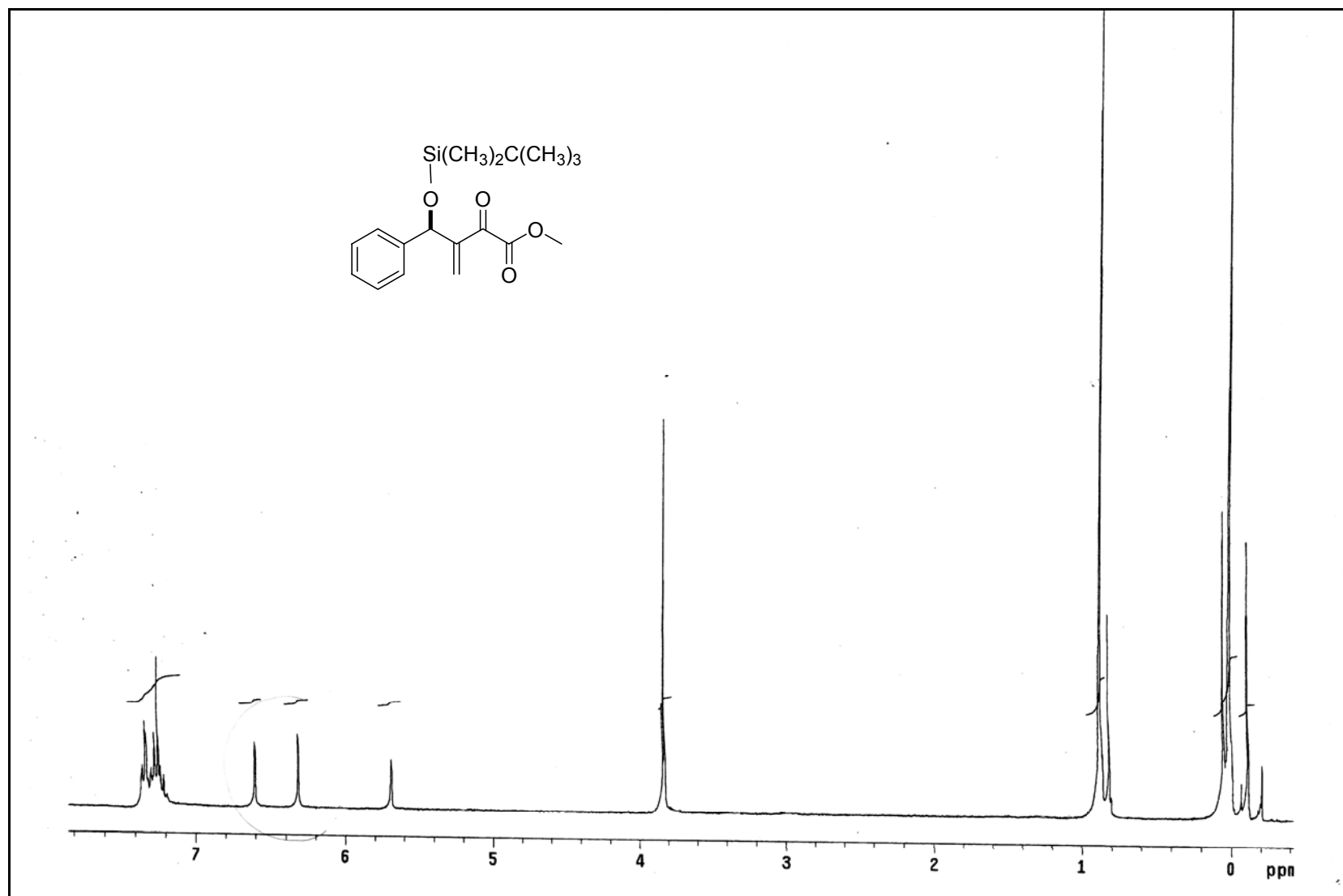
E36. Espectro de RMN de ^{13}C do (S)-4-(*t*-butildimetilsilil)oxi-2-oxo-4-fenilbutanoato de metila (**S**)-5a



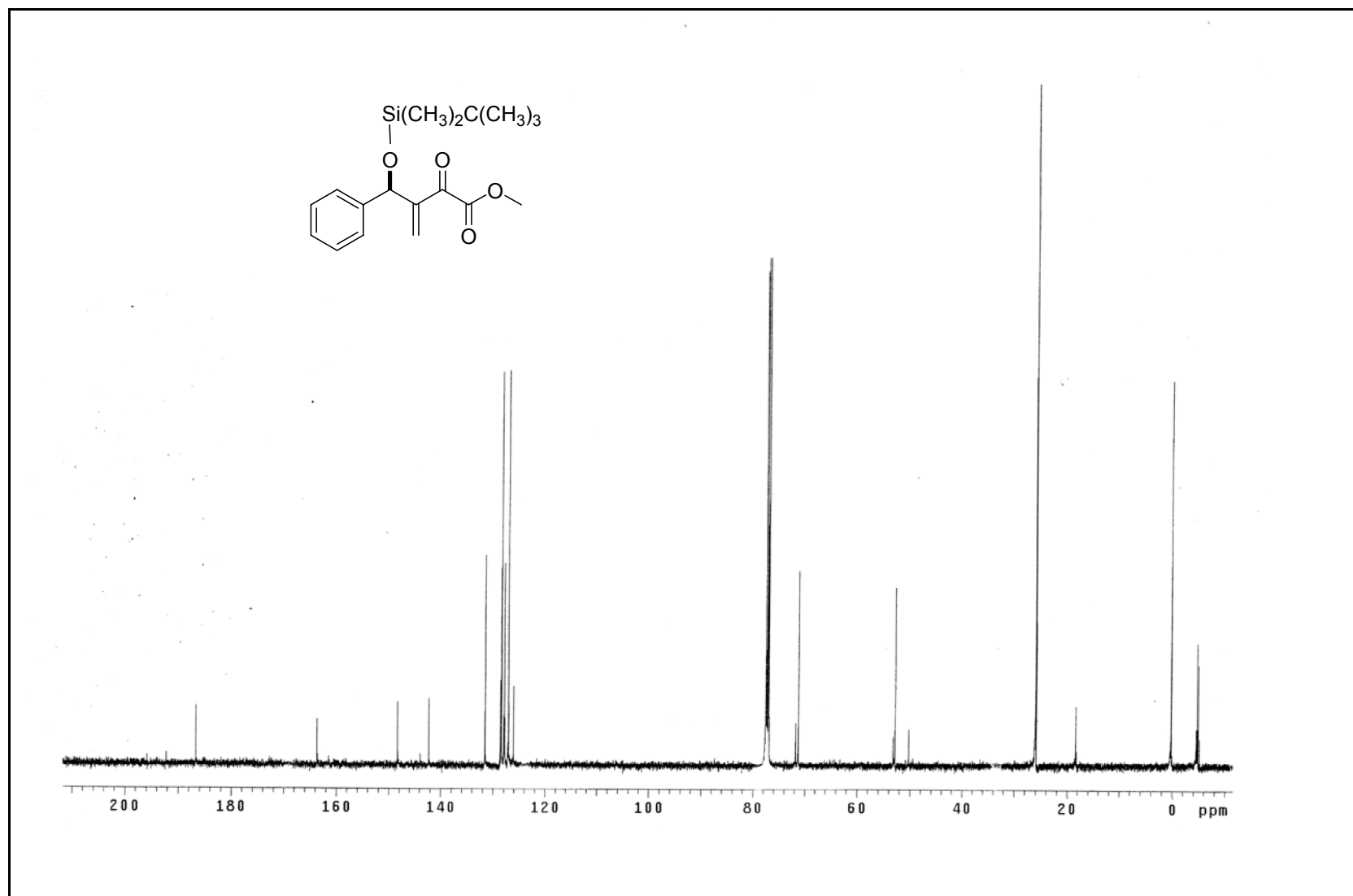
E37. Espectro no IV de (S)-(-)-4-(*t*-butildimetilsilil)oxi-2-oxo-3-metileno-4-fenilbutanoato de metila (**S**)-6a



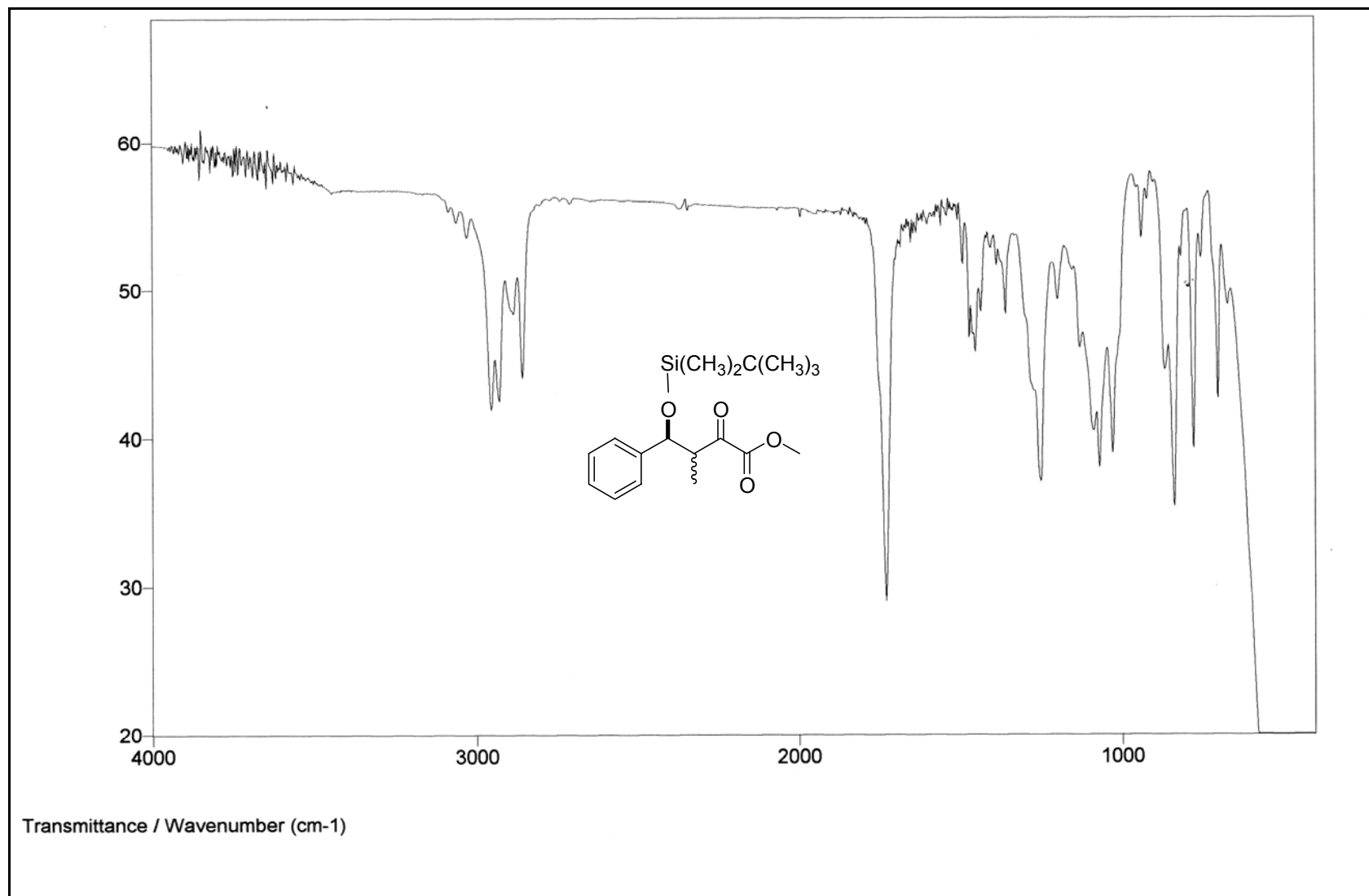
E38. Espectro de massas de (S)-(-)-4-(*t*-butildimetilsilil)oxi-2-oxo-3-metileno-4-fenilbutanoato de metila (**S**)-6a



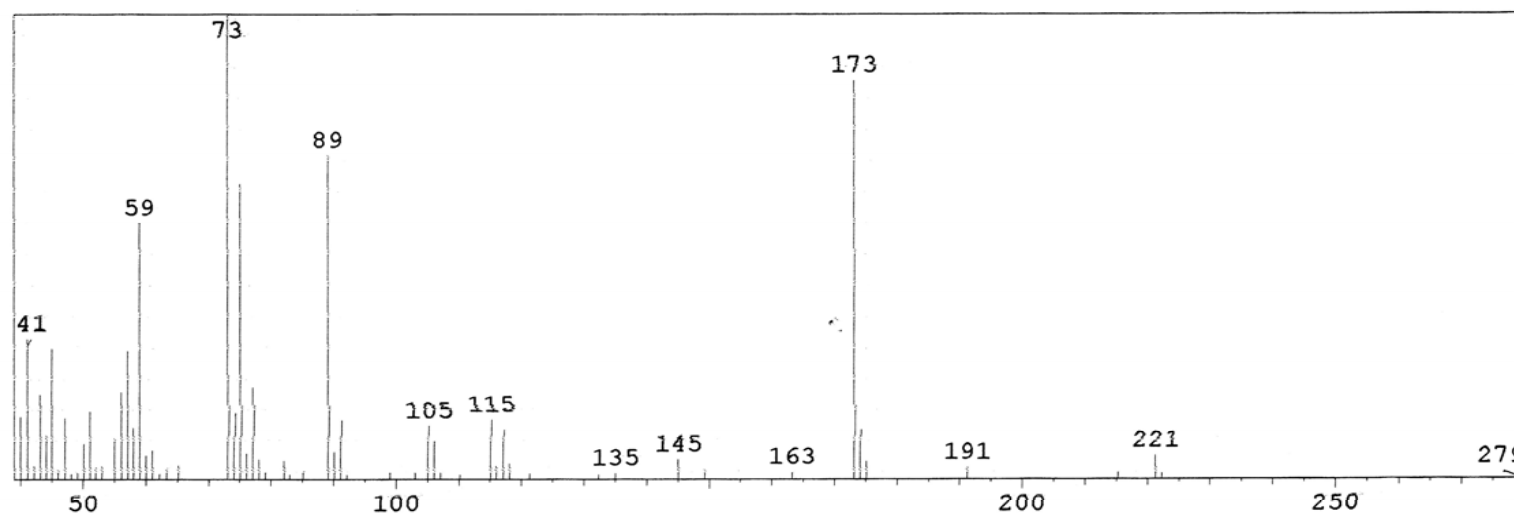
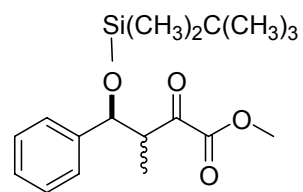
E39. Espectro de RMN de ^1H de (S)-(-)-4-(*t*-butildimetilsilil)oxi-2-oxo-3-metileno-4-fenilbutanoato de metila (**S**)-**6a**



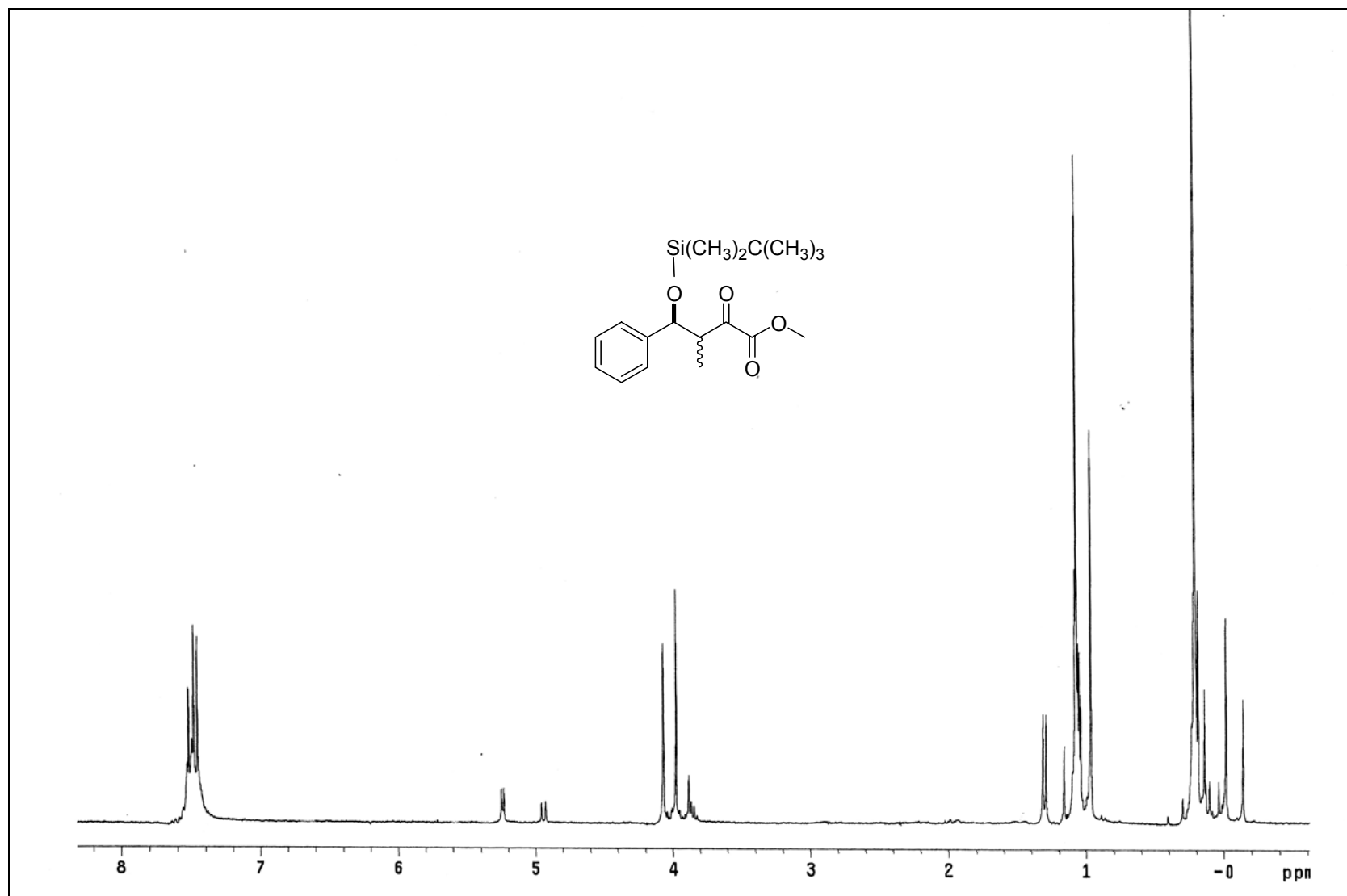
E40. Espectro de RMN de ^{13}C de (S)-(-)-4-(*t*-butildimetilsilil)oxi-2-oxo-3-metileno-4-fenilbutanoato de metila (**S**)-**6a**



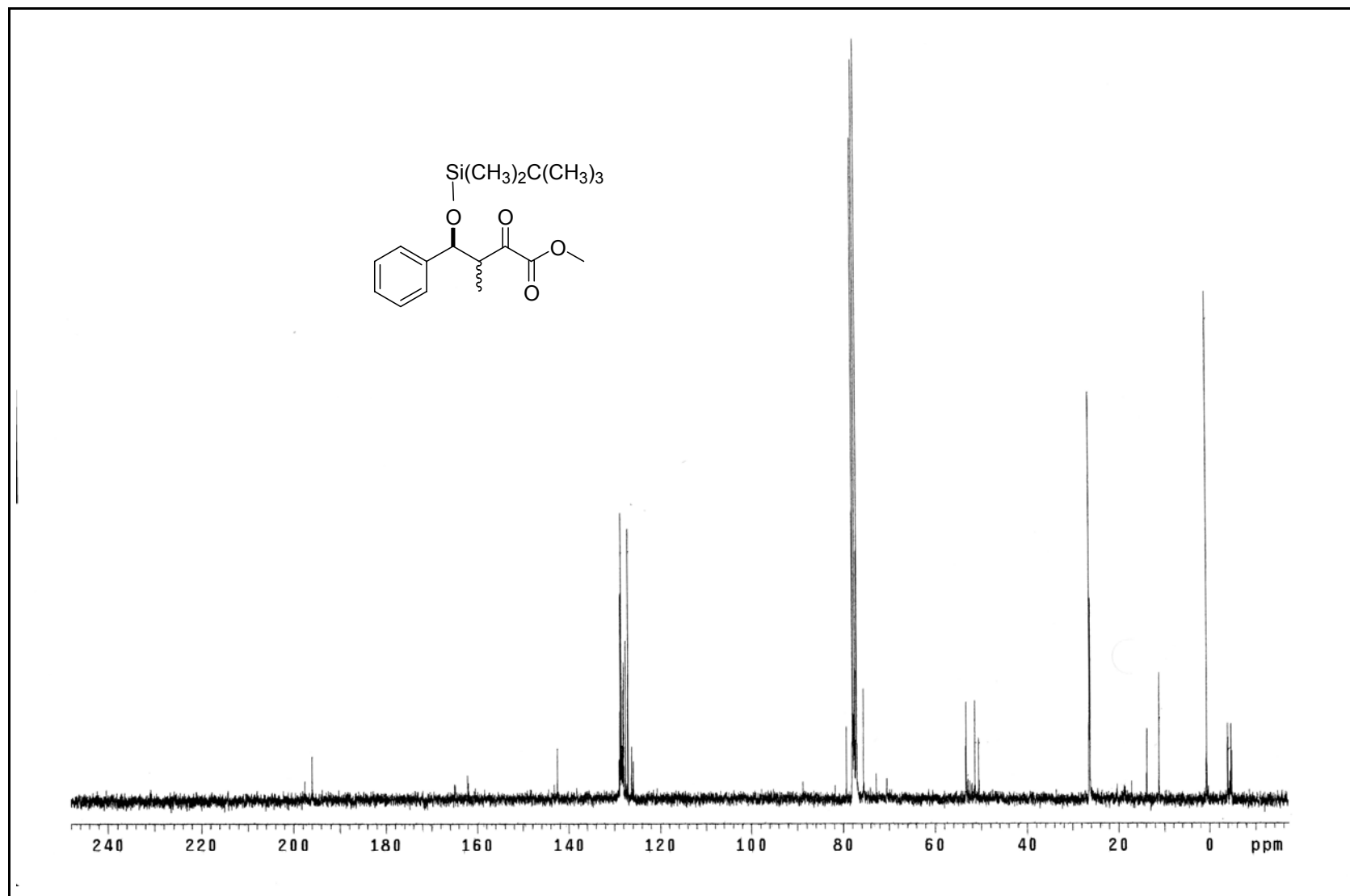
E41. Espectro no IV de 4-(*t*-butildimetilsilil)oxi-3-metil-2-oxo-4-fenilbutanoato de metila **7a**



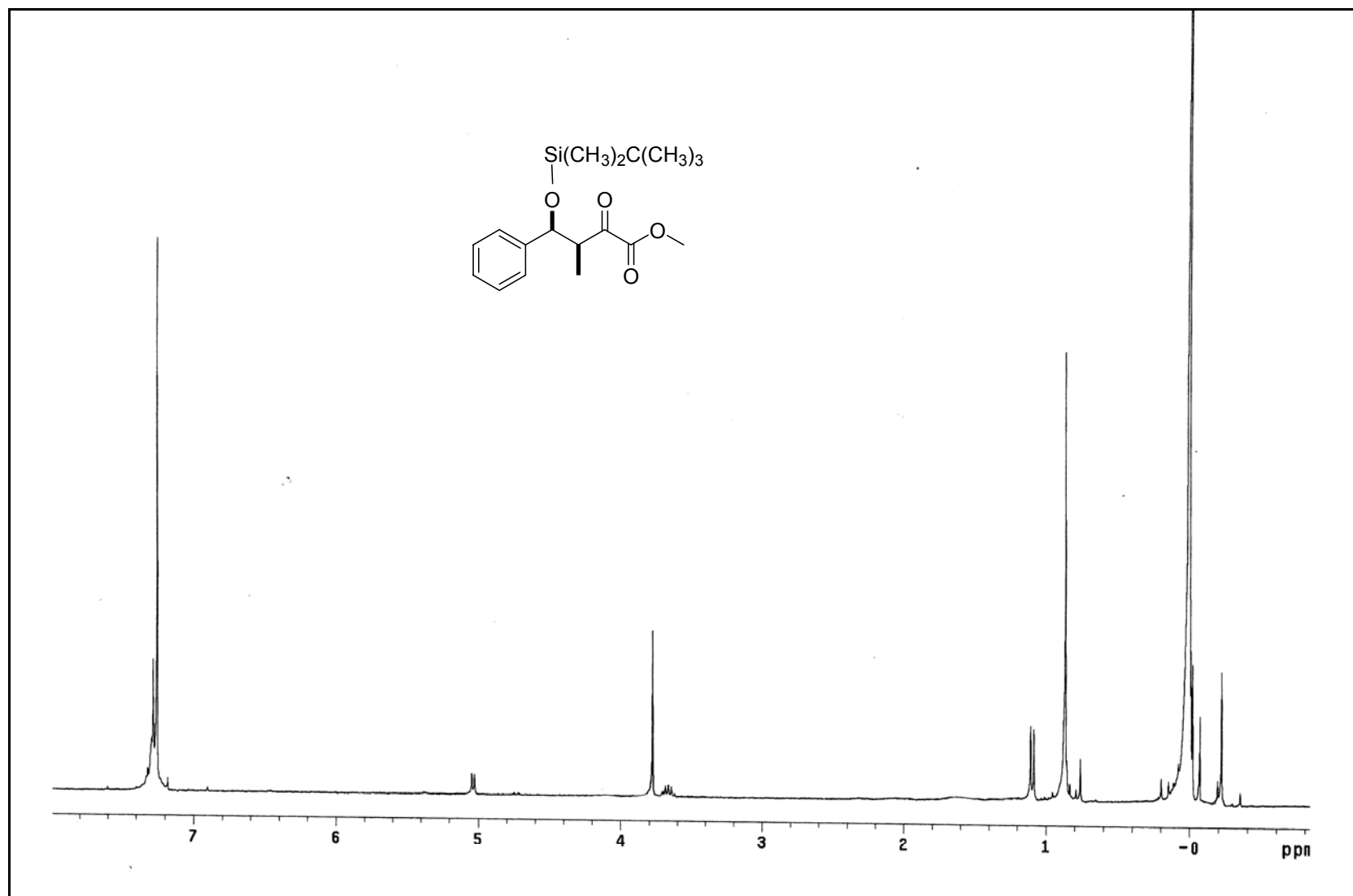
E42. Espectro de massas de 4-(*t*-butildimetilsilil)oxi-3-metil-2-oxo-4-fenilbutanoato de metila **7a**



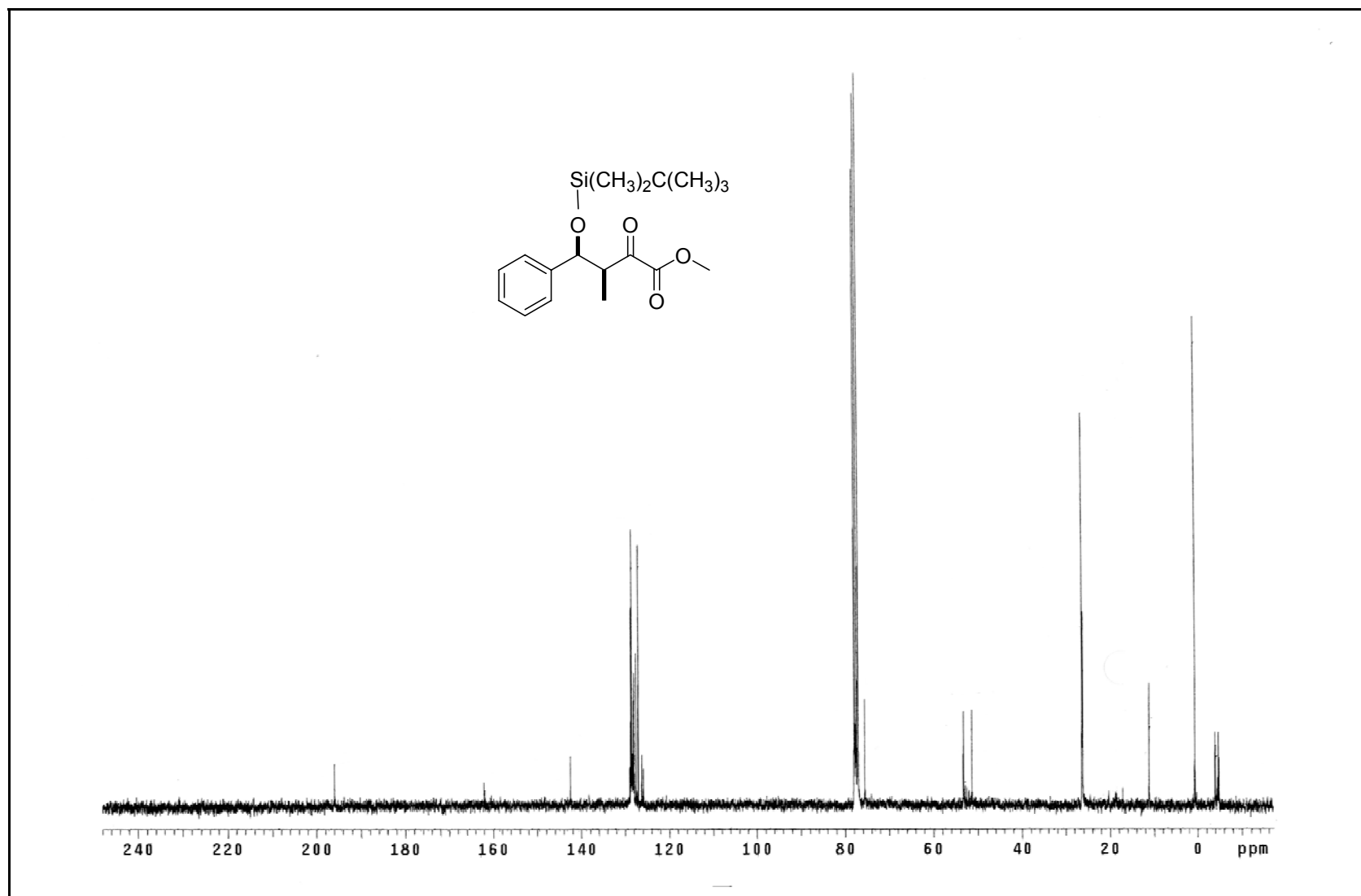
E43. Espectro de RMN de ^1H da mistura de isômeros *syn* e *anti* de **7a**



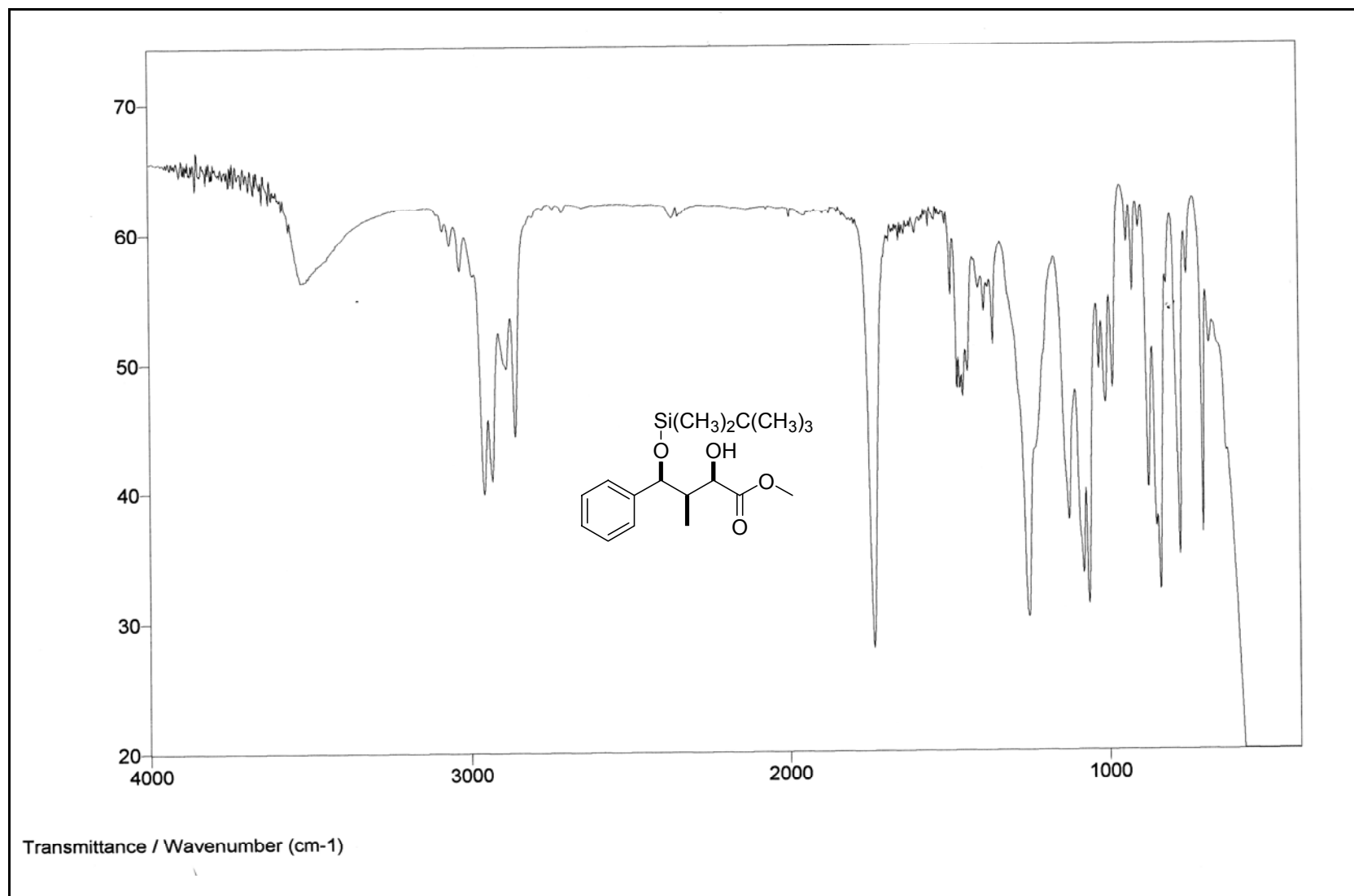
E44. Espectro de RMN de ^{13}C da mistura de isômeros *syn* e *anti* de **7a**



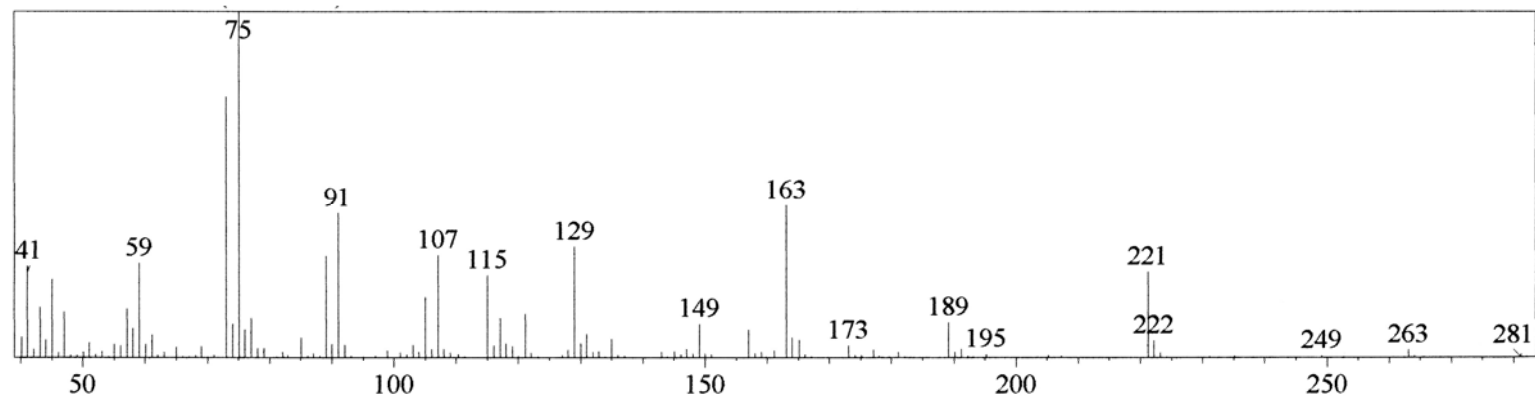
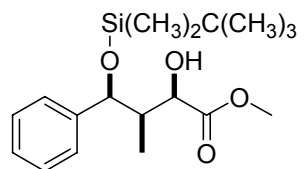
E45. Espectro de RMN de ¹H do (3*S*,4*S*)-4-(*t*-butildimetilsilil)oxi-3-metil-2-oxo-4-fenilbutanoato de metila *syn*-7a



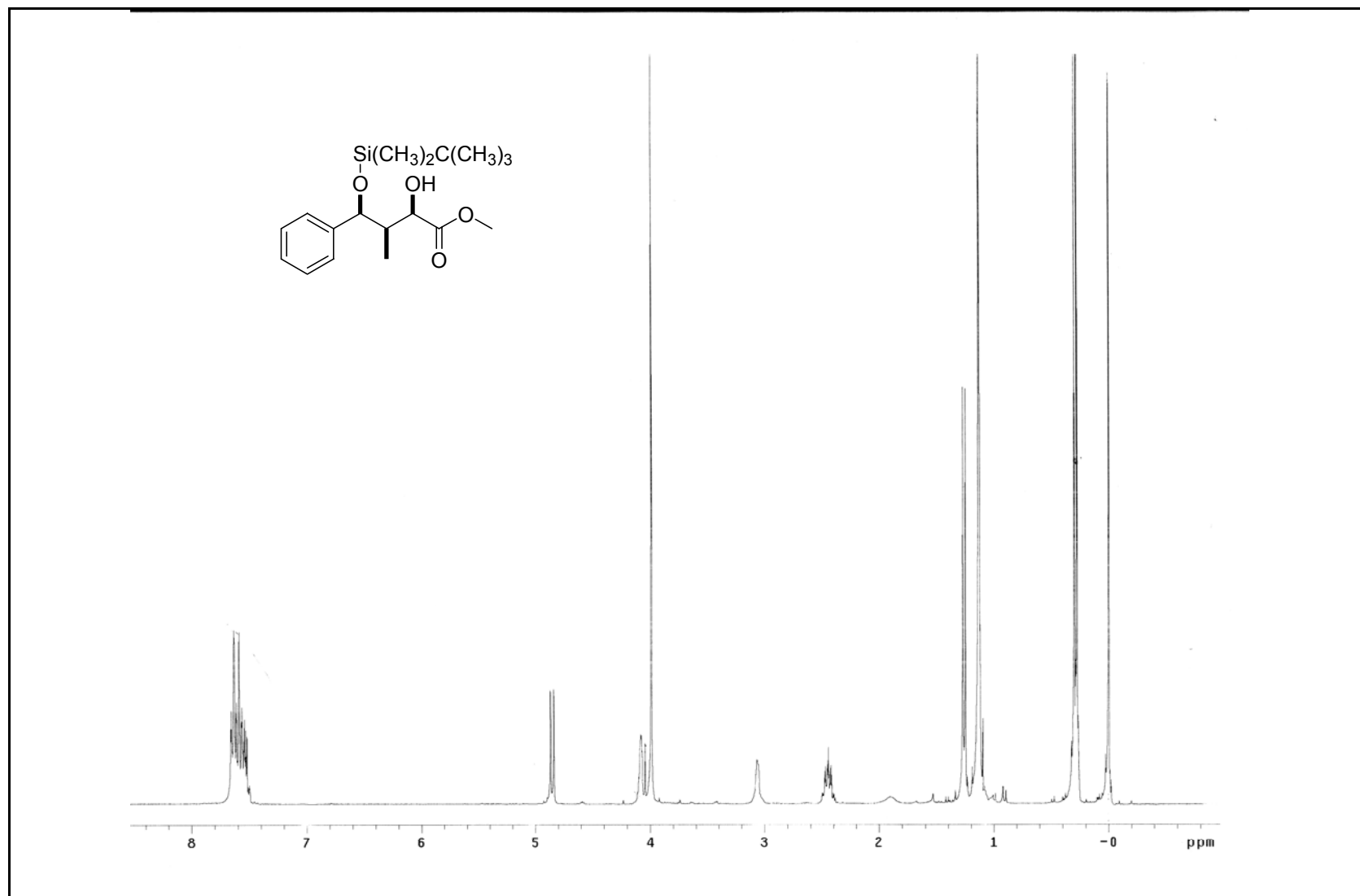
E46. Espectro de RMN de ^{13}C do $(3S,4S)$ -4-(*t*-butildimetilsilil)oxi-3-metil-2-oxo-4-fenilbutanoato de metila *syn*-7a



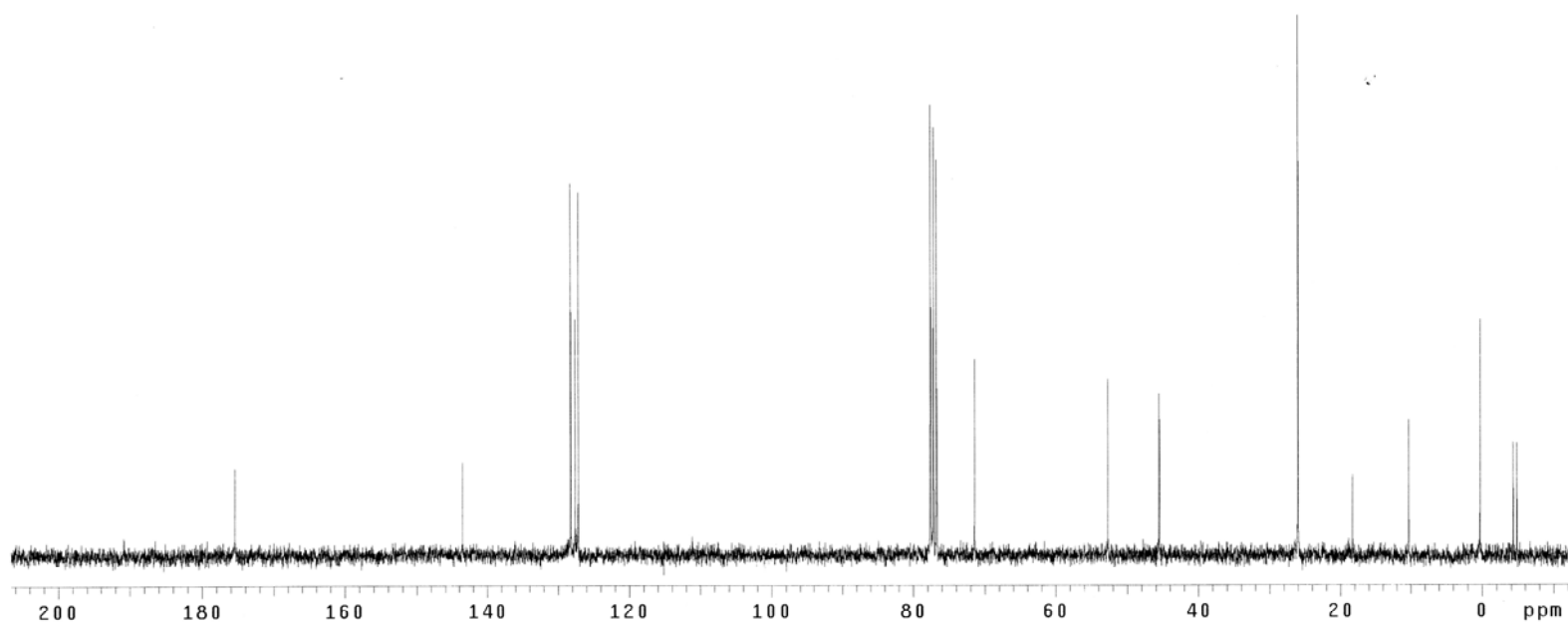
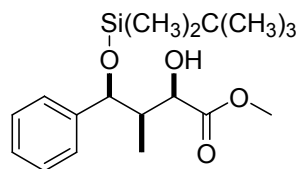
E47. Espectro no IV de (2*R*,3*S*,4*S*)-4-(*t*-butildimetilsilil)oxi-2-hidroxi-3-metil-4-fenilbutanoato de metila **8a**



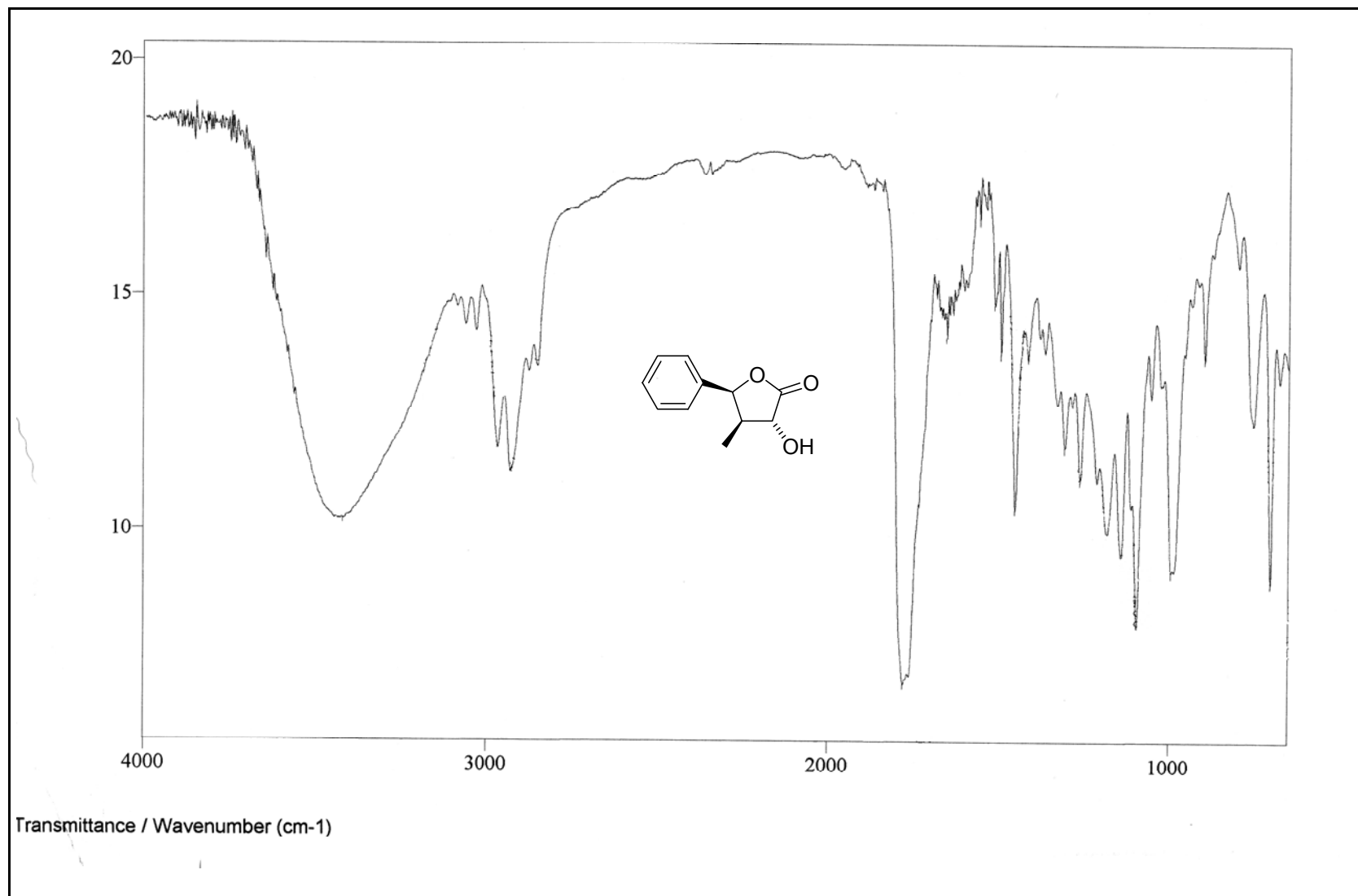
E48. Espectro de massas de (2*R*,3*S*,4*S*)-4-(*t*-butildimetilsilil)oxi-2-hidroxi-3-metil-4-fenilbutanoato de metila **8a**



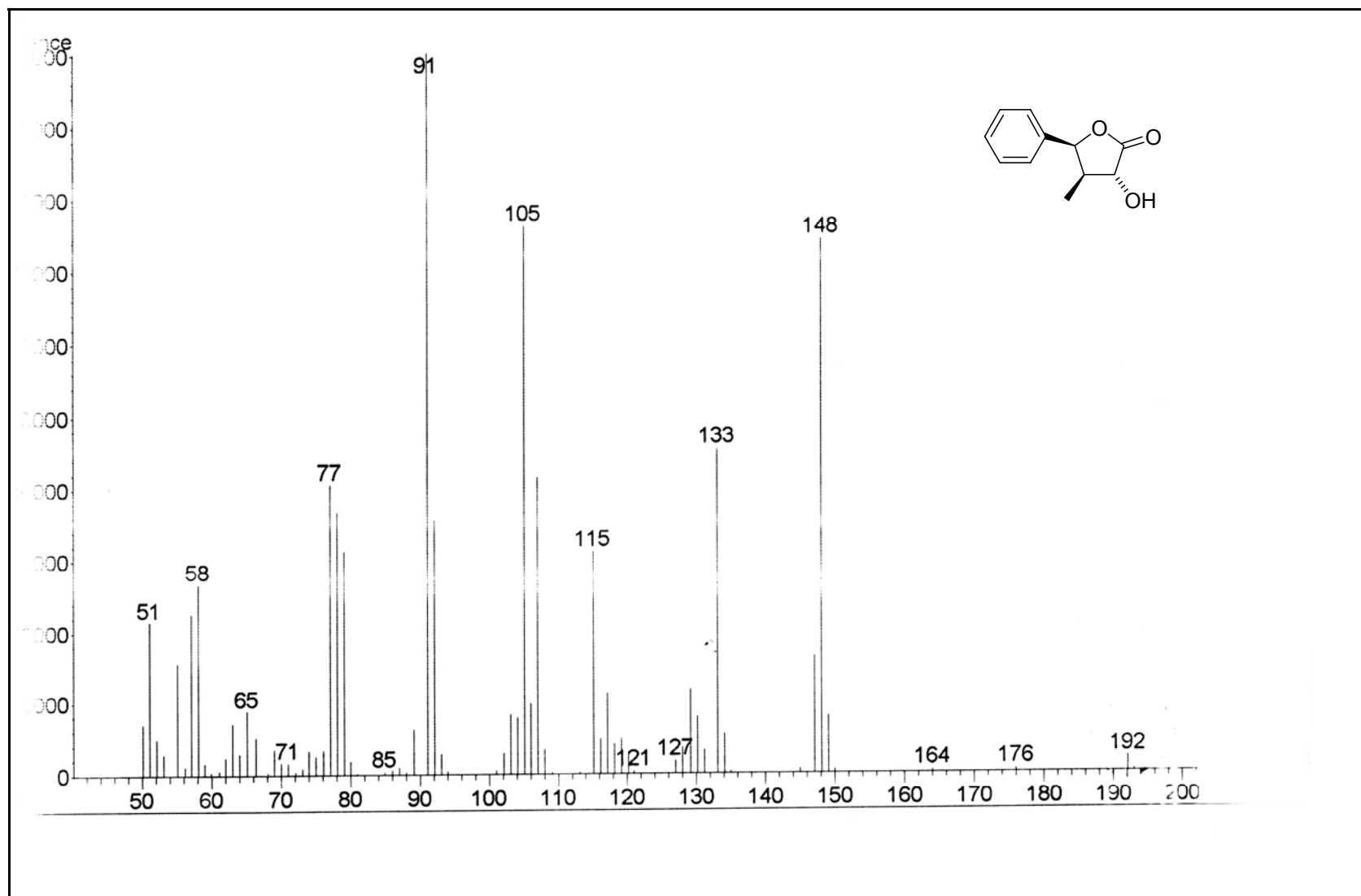
E49. Espectro de RMN de ¹H de (2*R*,3*S*,4*S*)-4-(*t*-butildimetilsilil)oxi-2-hidroxi-3-metil-4-fenilbutanoato de metila **8a**



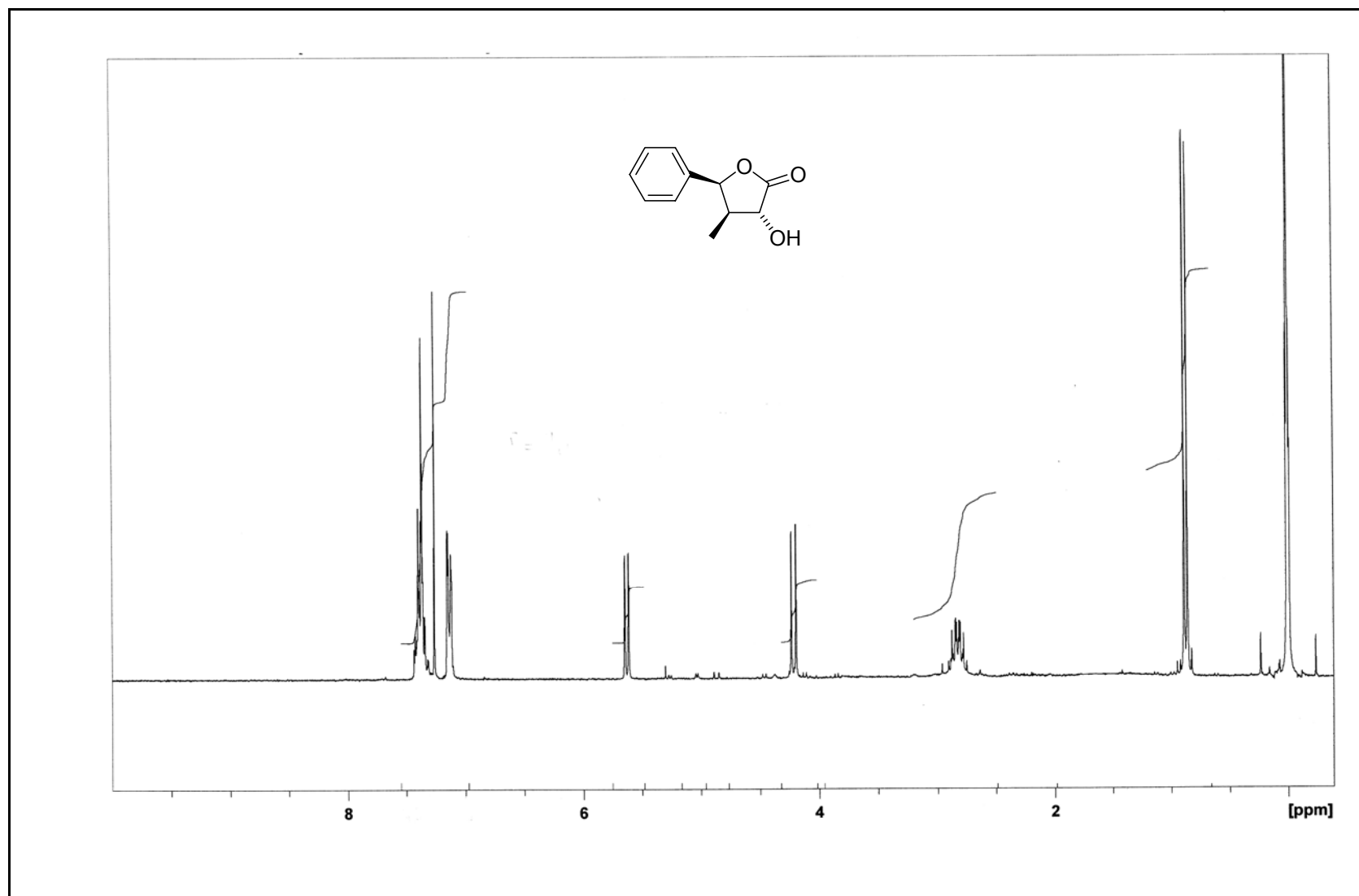
E50. Espectro de RMN de ¹³C de (2R,3S,4S)-4-(*t*-butyldimethylsilyloxy)-2-hidroxi-3-metil-4-fenilbutanoato de metila **8a**



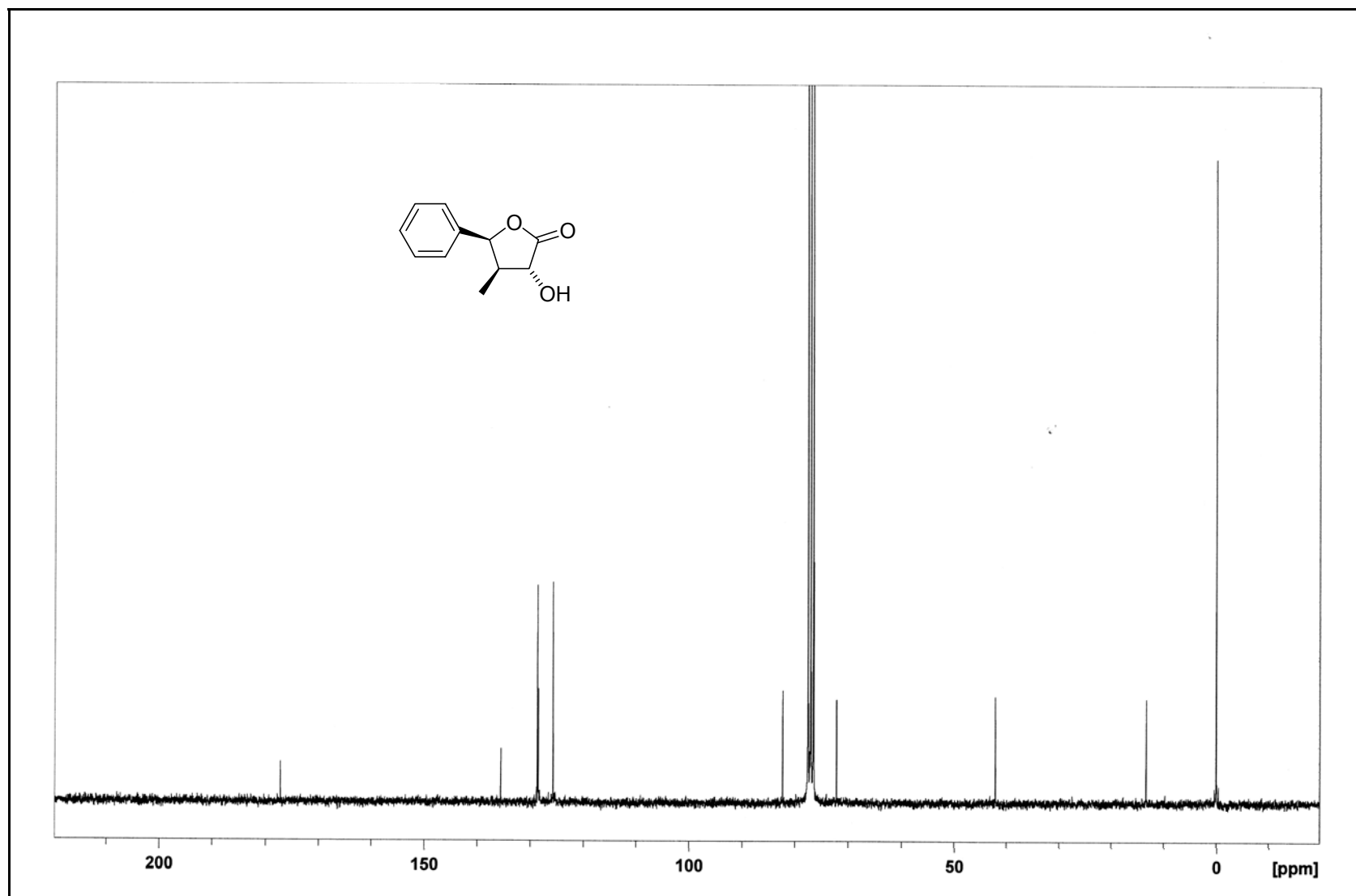
E51. Espectro no IV de (3R,4R,5S)-3-hidroxi-4-metil-5-fenil-dihidro-furan-2-ona **28**



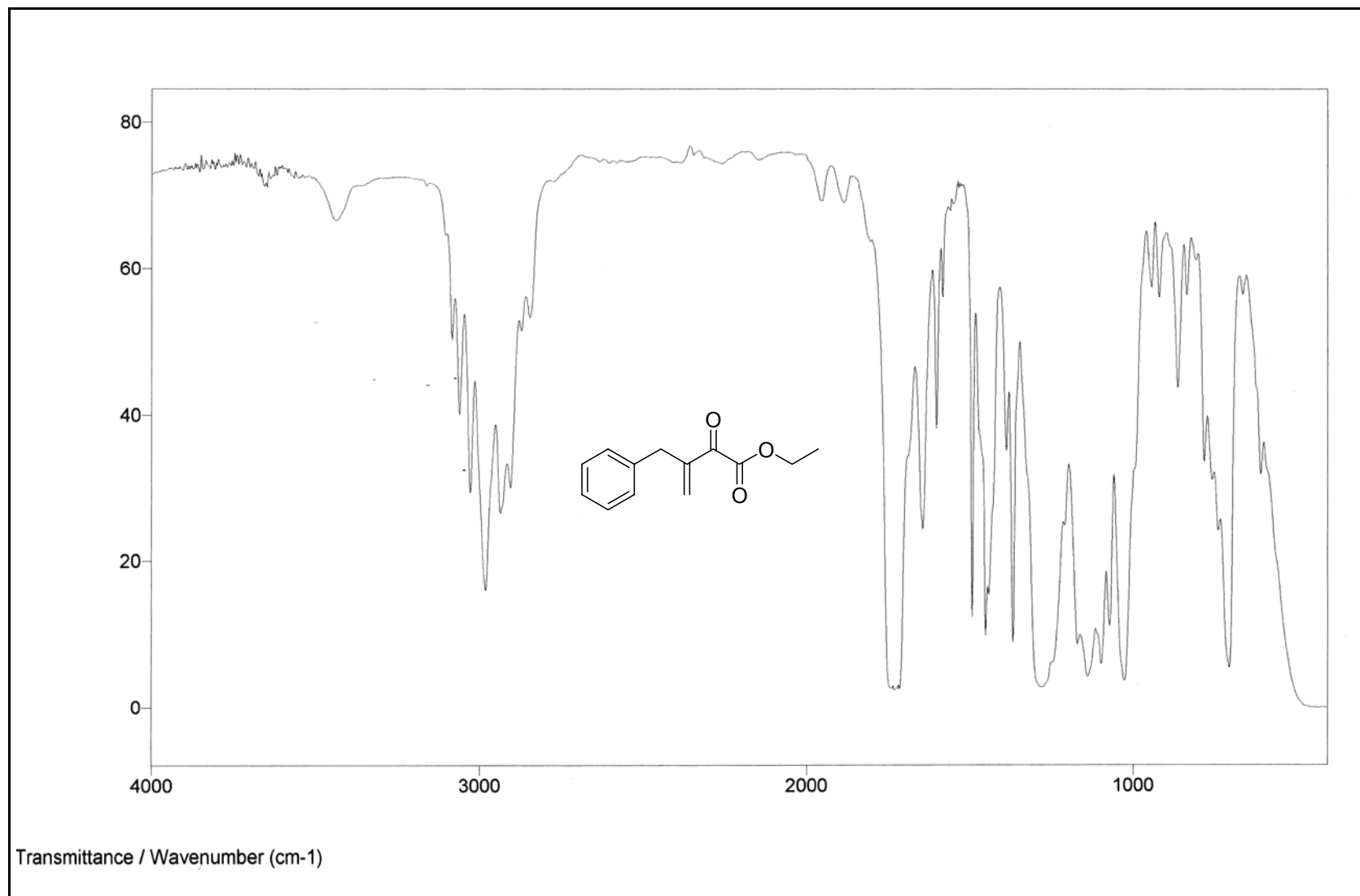
E52. Eespectro de massas de (3R,4R,5S)-3-hidroxi-4-metil-5-fenil-dihidro-furan-2-ona **28**



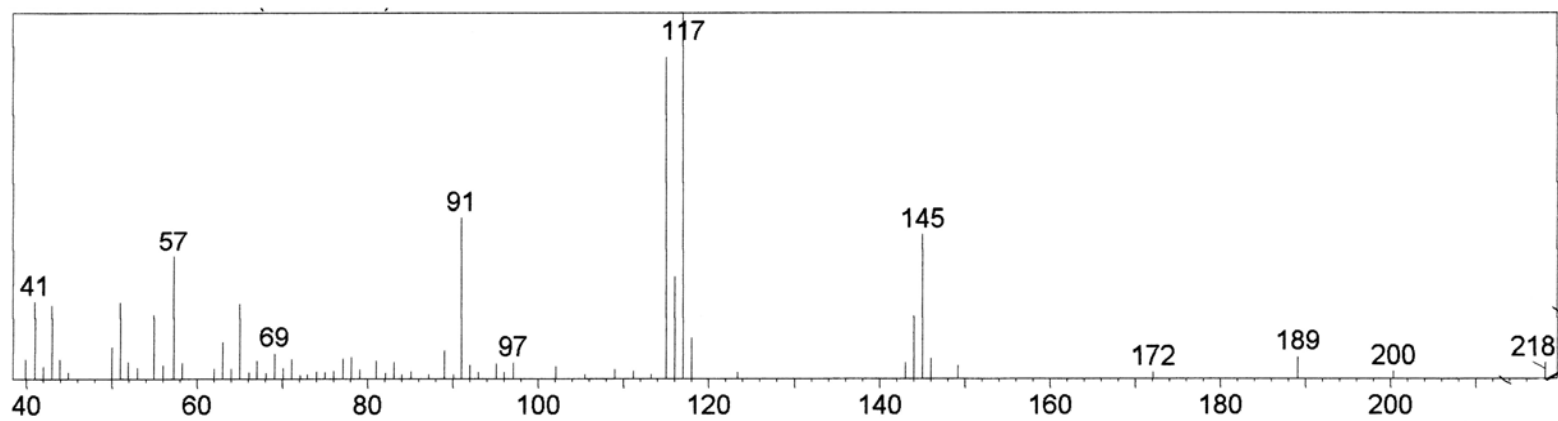
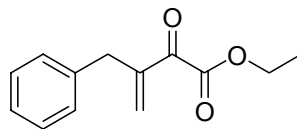
E53. Espectro de RMN de ^1H de (3R,4R,5S)-3-hidroxi-4-metil-5-fenil-dihidro-furan-2-ona **28**



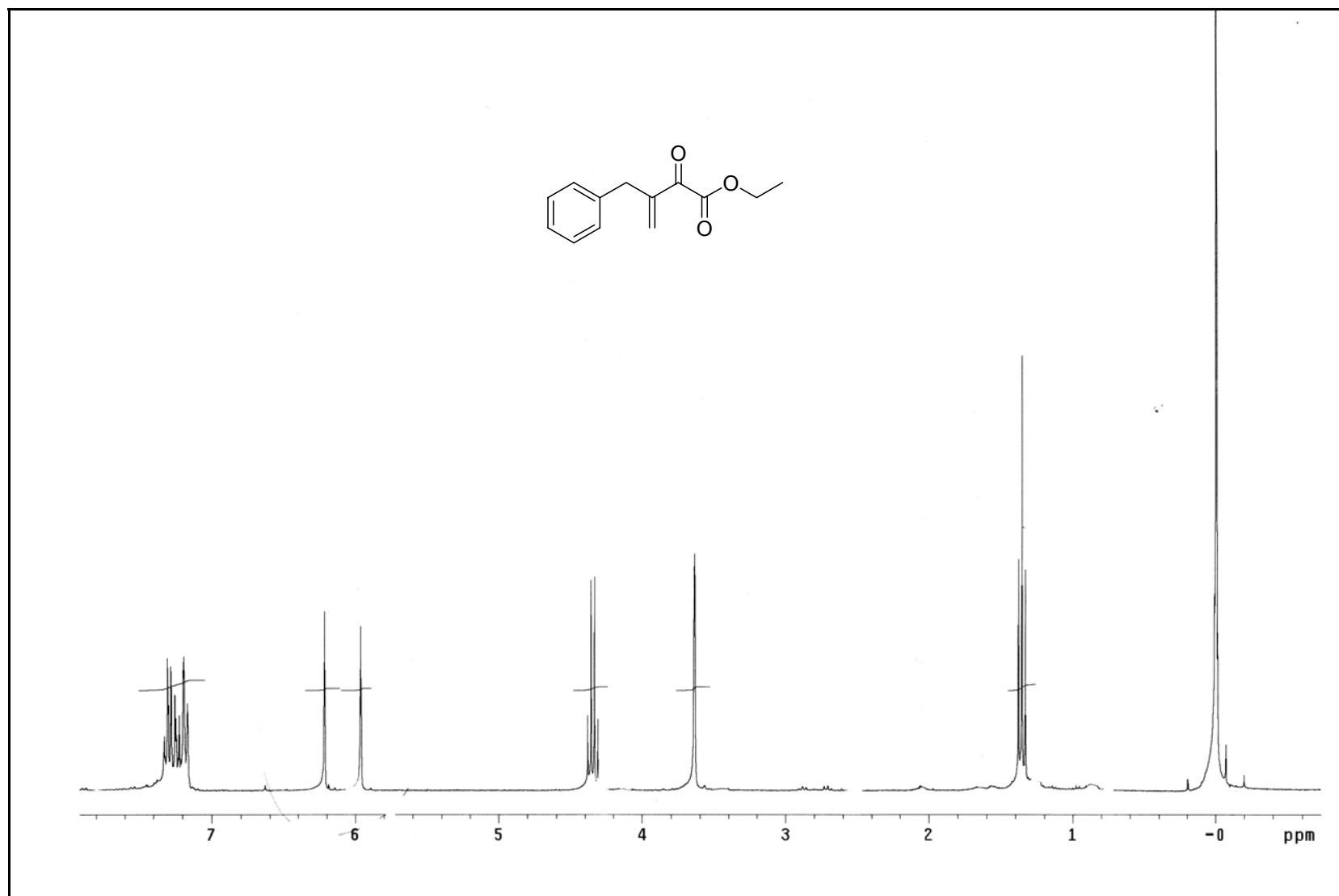
E54. Espectro de RMN de ^{13}C de (3*R*,4*R*,5*S*)-3-hidroxi-4-metil-5-fenil-dihidro-furan-2-ona **28**



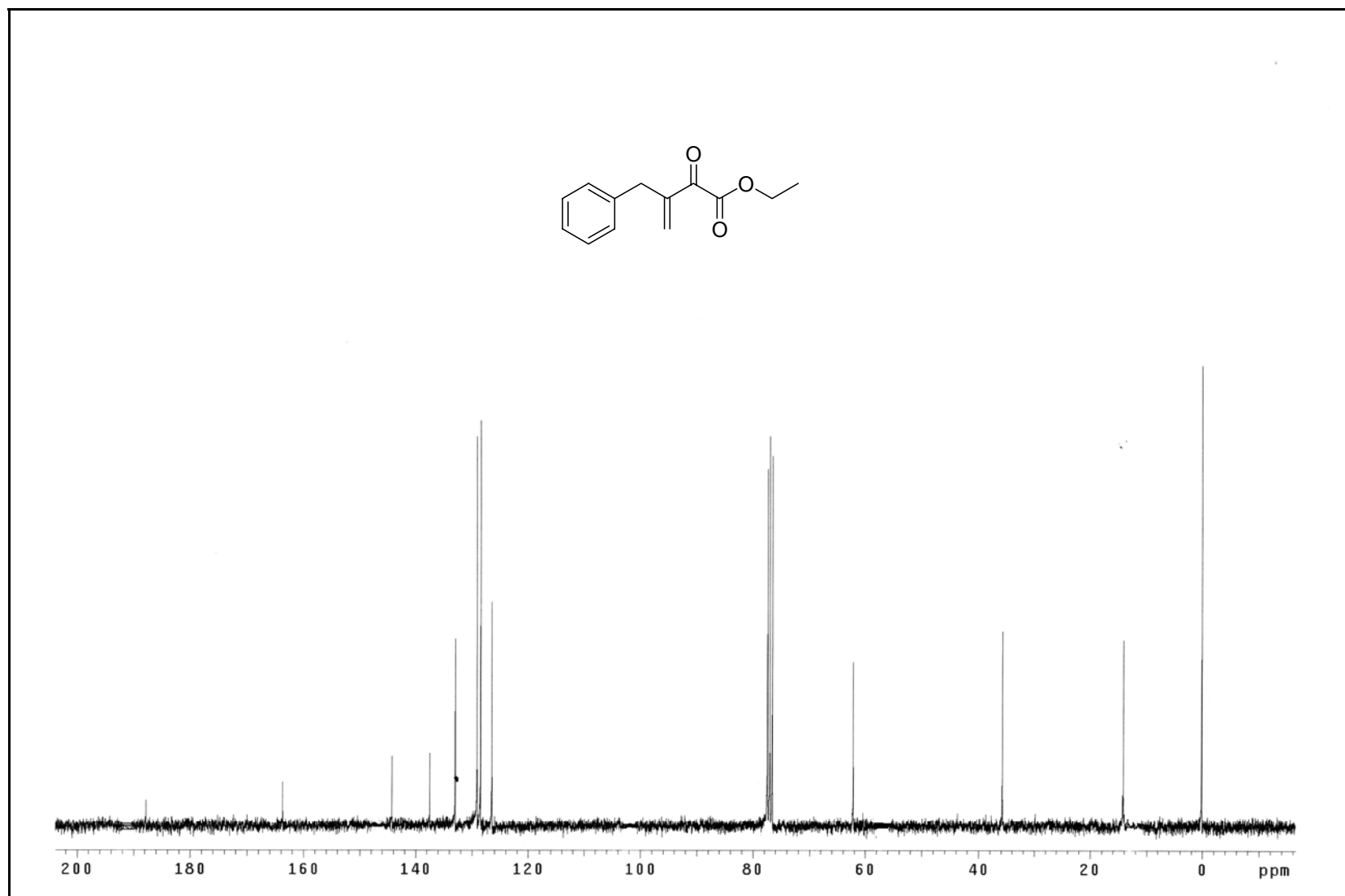
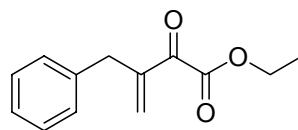
E55. Espectro no IV de 2-oxo-3-metileno-4-fenilbutanoato de etila **22**



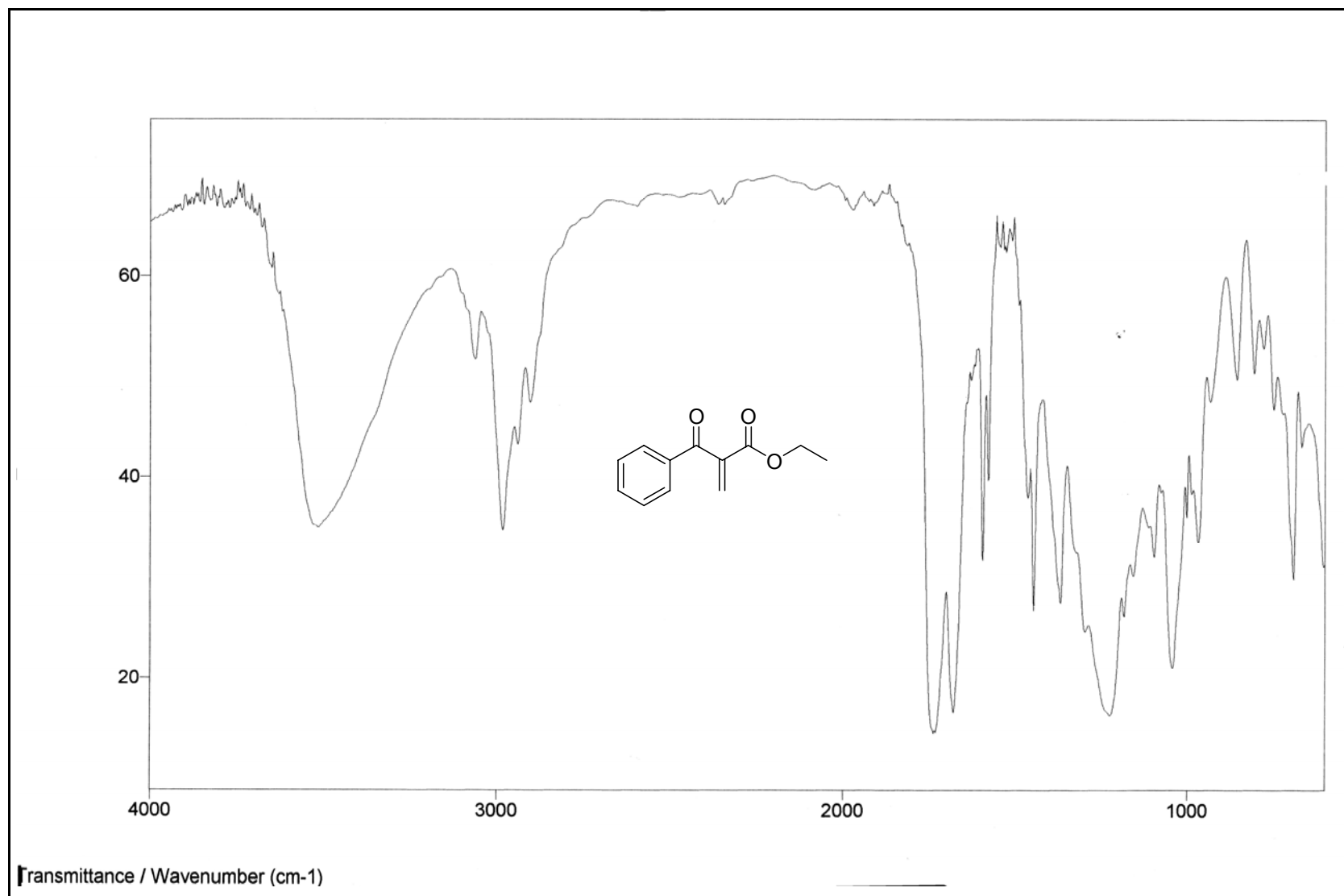
E56. EM de 2-oxo-3-metileno-4-fenilbutanoato de etila **22**



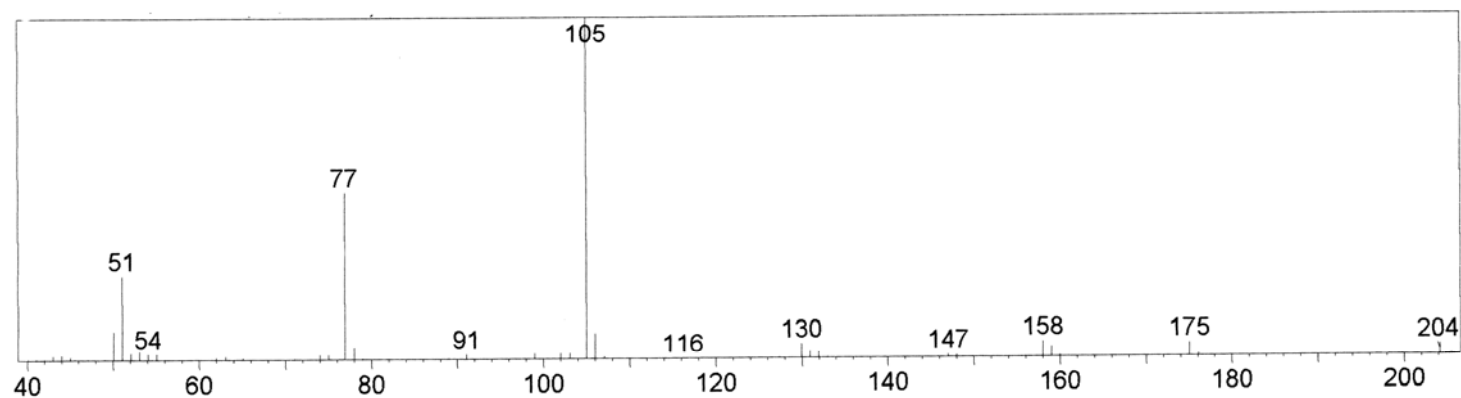
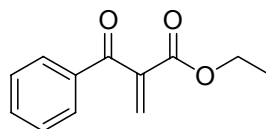
E57. Espectro de RMN de ¹H de 2-oxo-3-metileno-4-fenilbutanoato de etila **22**



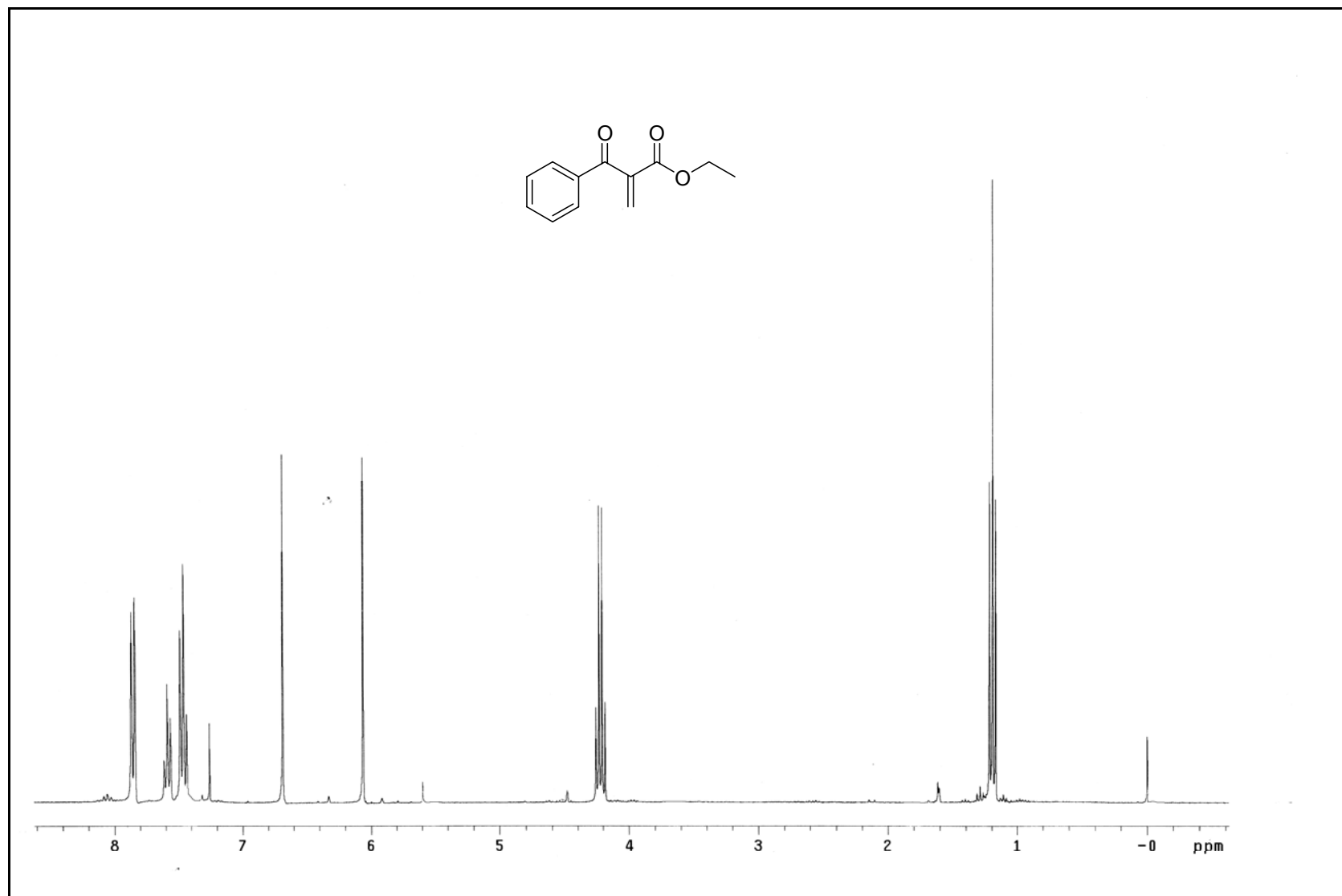
E58. Espectro de RMN de ^{13}C de 2-oxo-3-metileno-4-fenilbutanoato de etila **22**



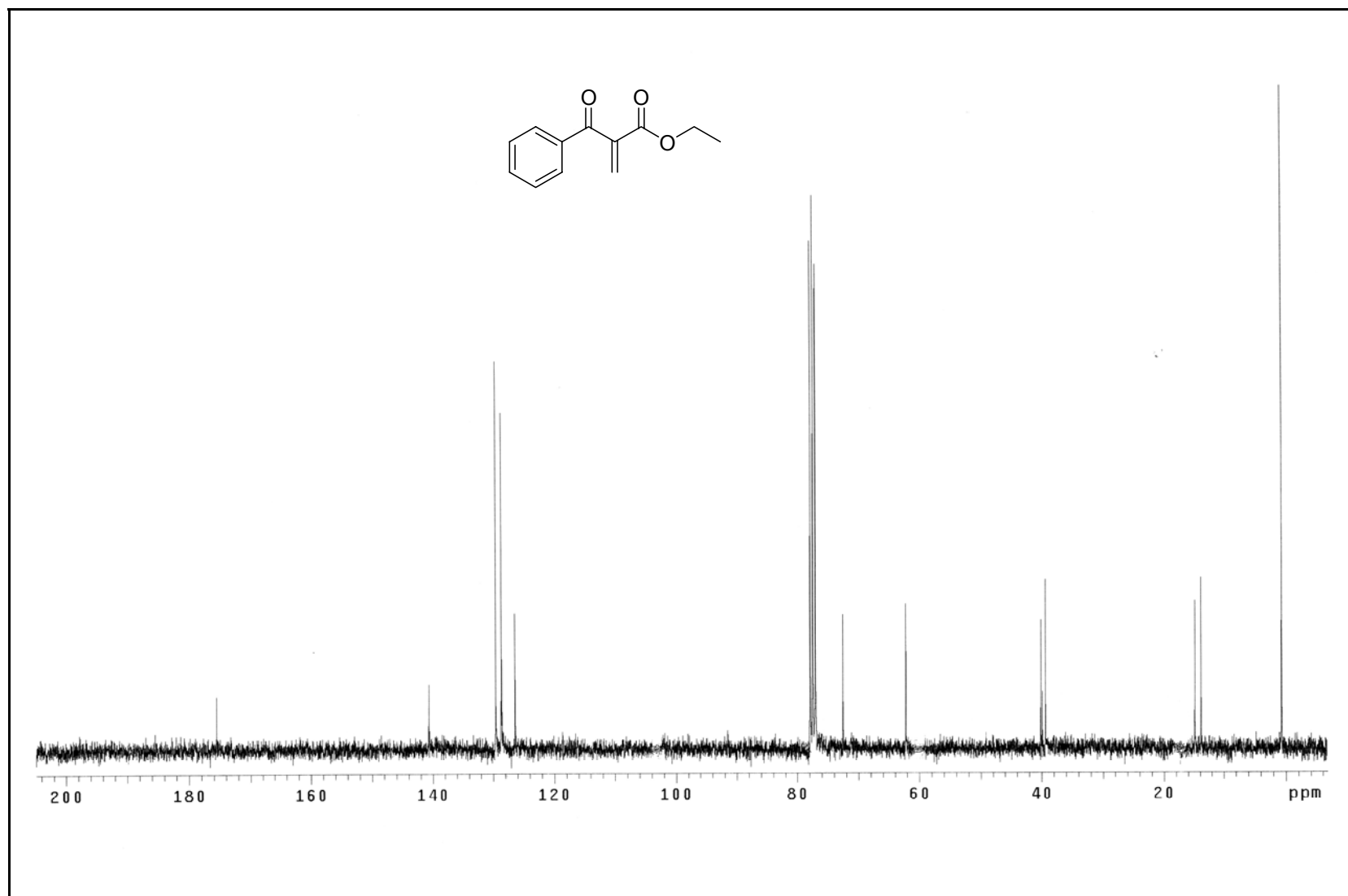
E59. Espectro no IV de 2-metileno-3-oxo-3-fenilpropanoato de etila **20**



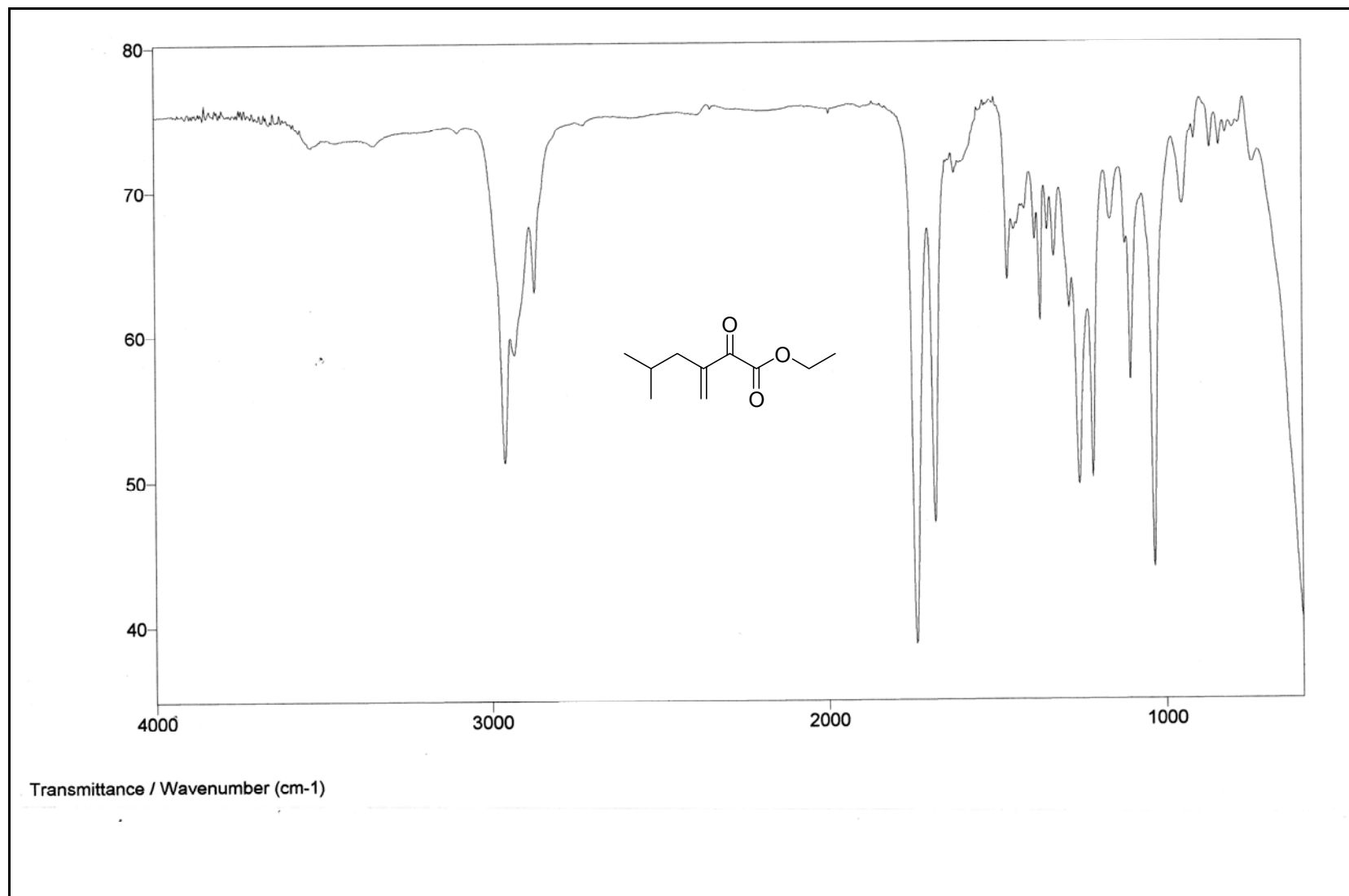
E60. Espectro de massas de 2-metileno-3-oxo-3-fenilpropanoato de etila **20**



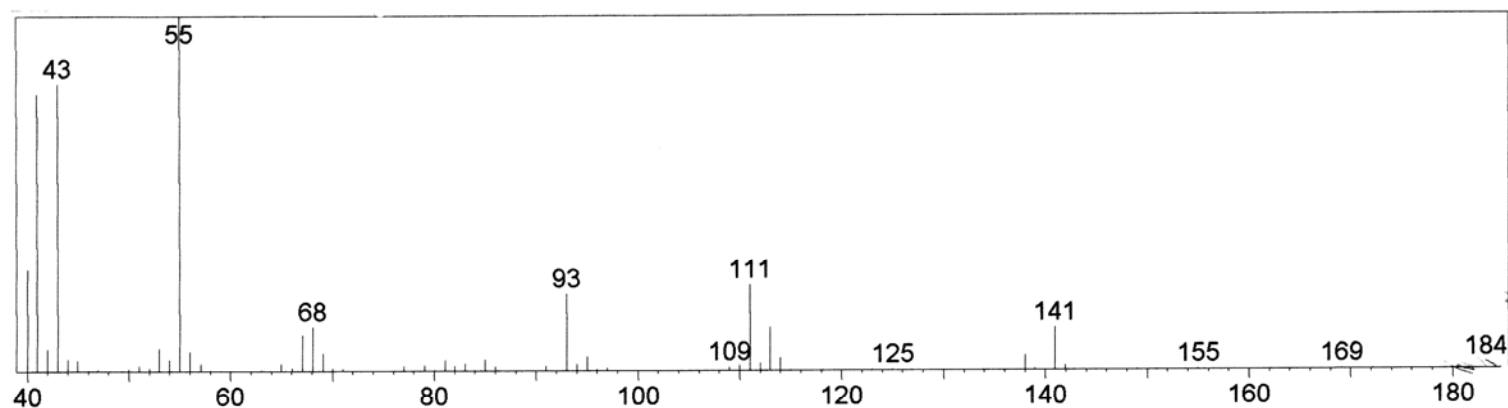
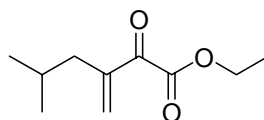
E61. Espectro de RMN de ^1H de 2-metileno-3-oxo-3-fenilpropanoato de etila **20**



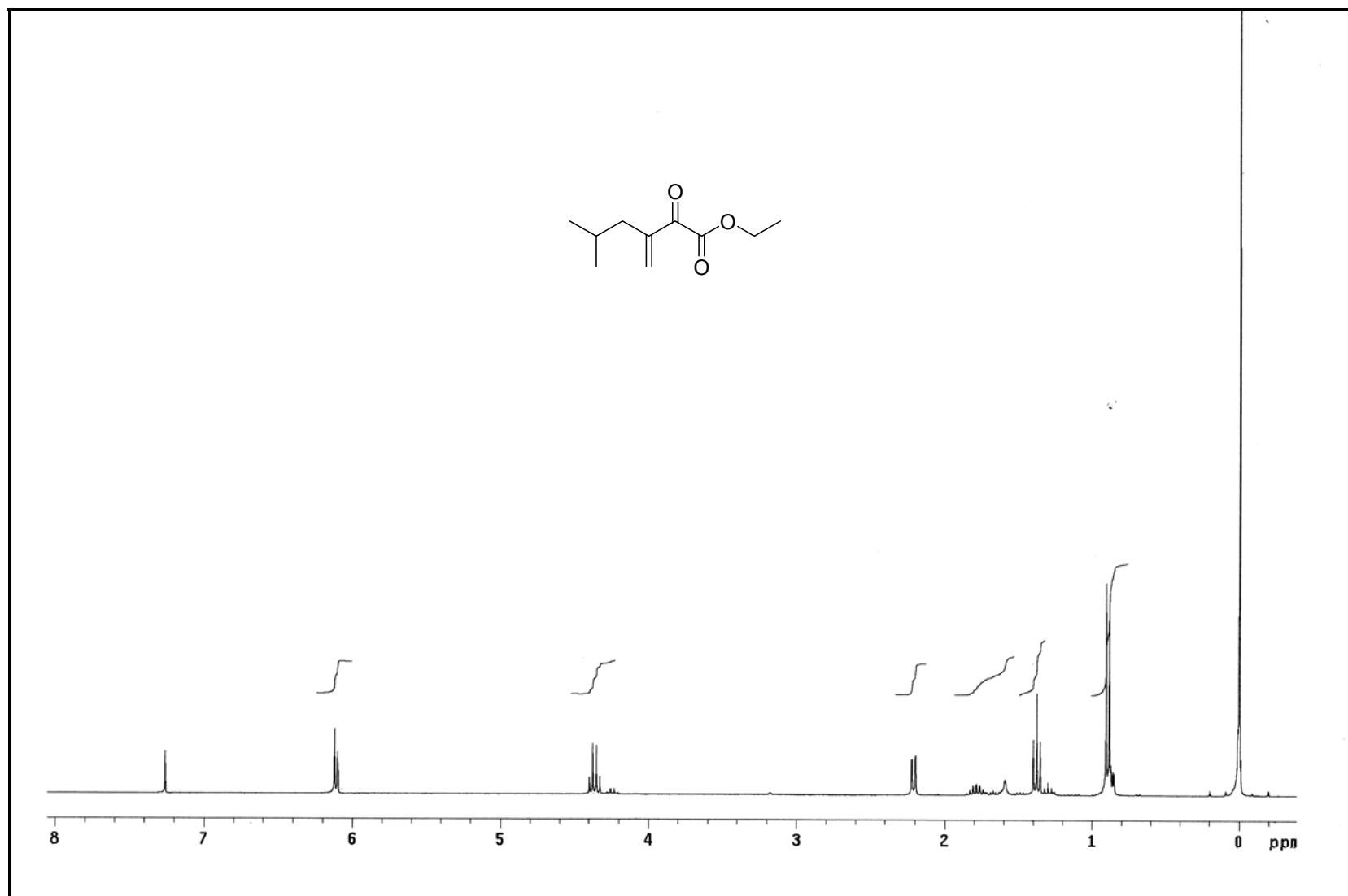
E62. Espectro de RMN de ¹³C de 2-metileno-3-oxo-3-fenilpropanoato de etila **20**



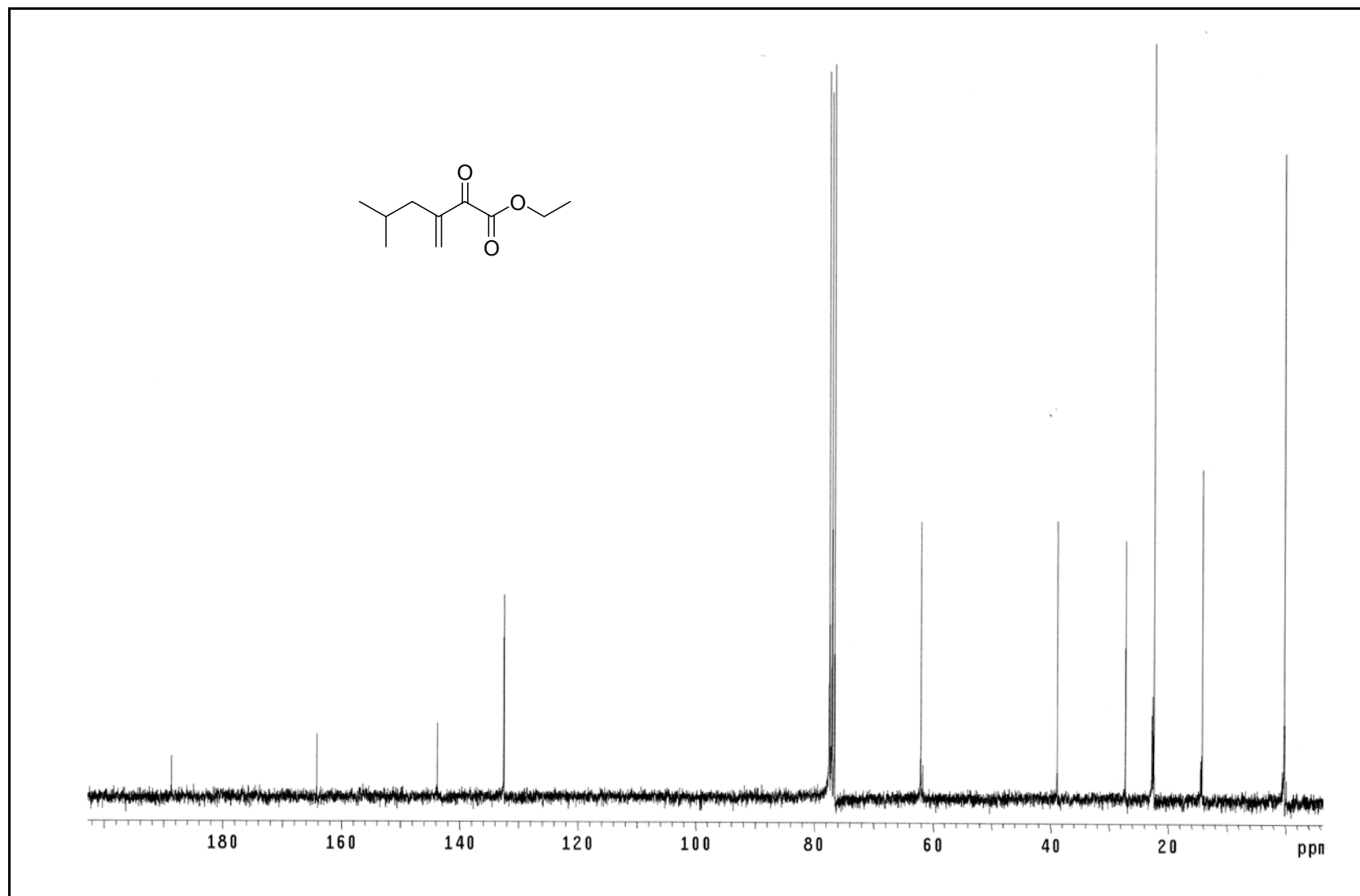
E63. Espectro no IV do 2-oxo-3-metileno-6-metilhexanoato de etila **24**



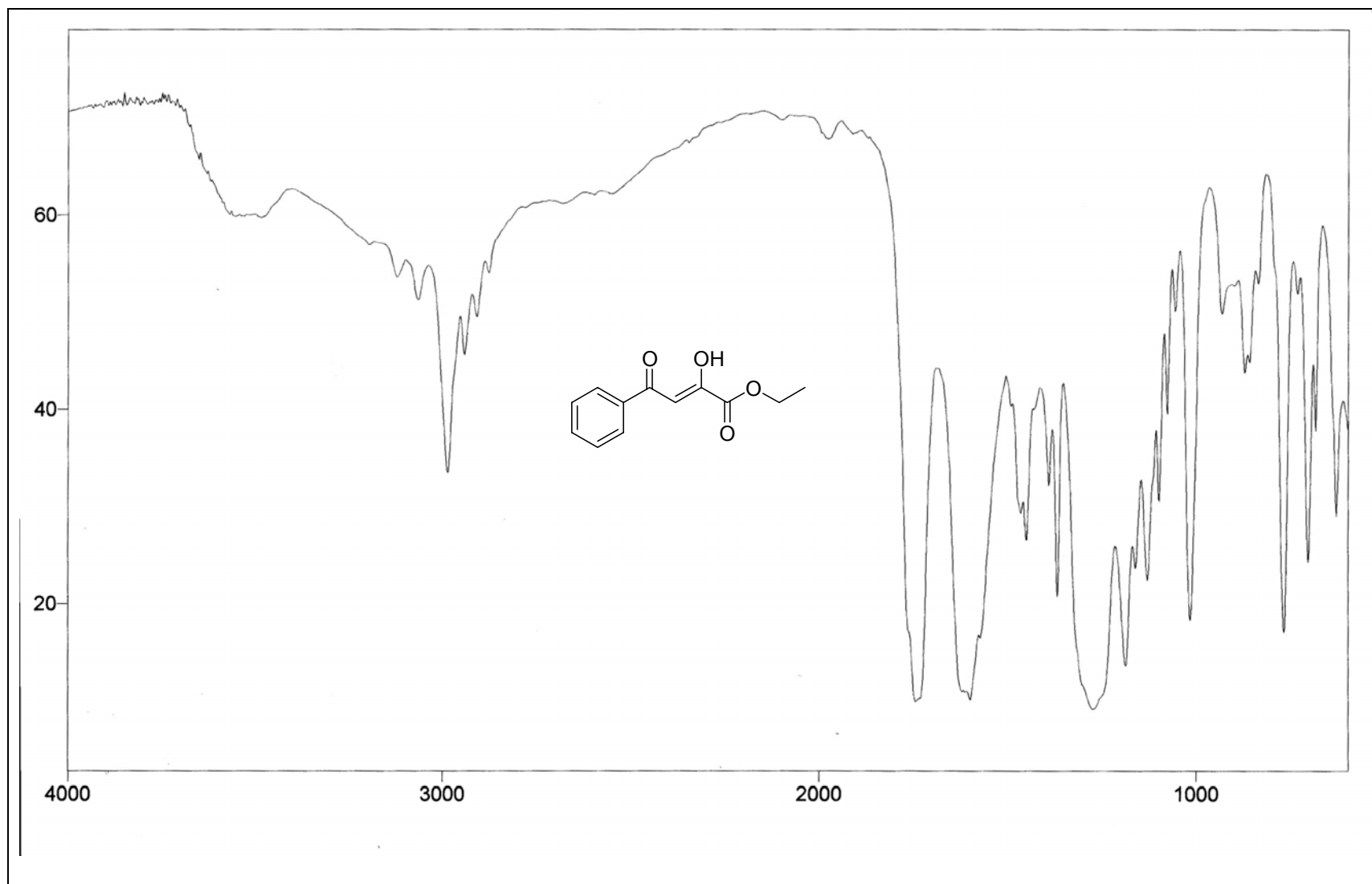
E64. Espectro de massas de 2-oxo-3-metileno-6-metilhexanoato de etila **24**



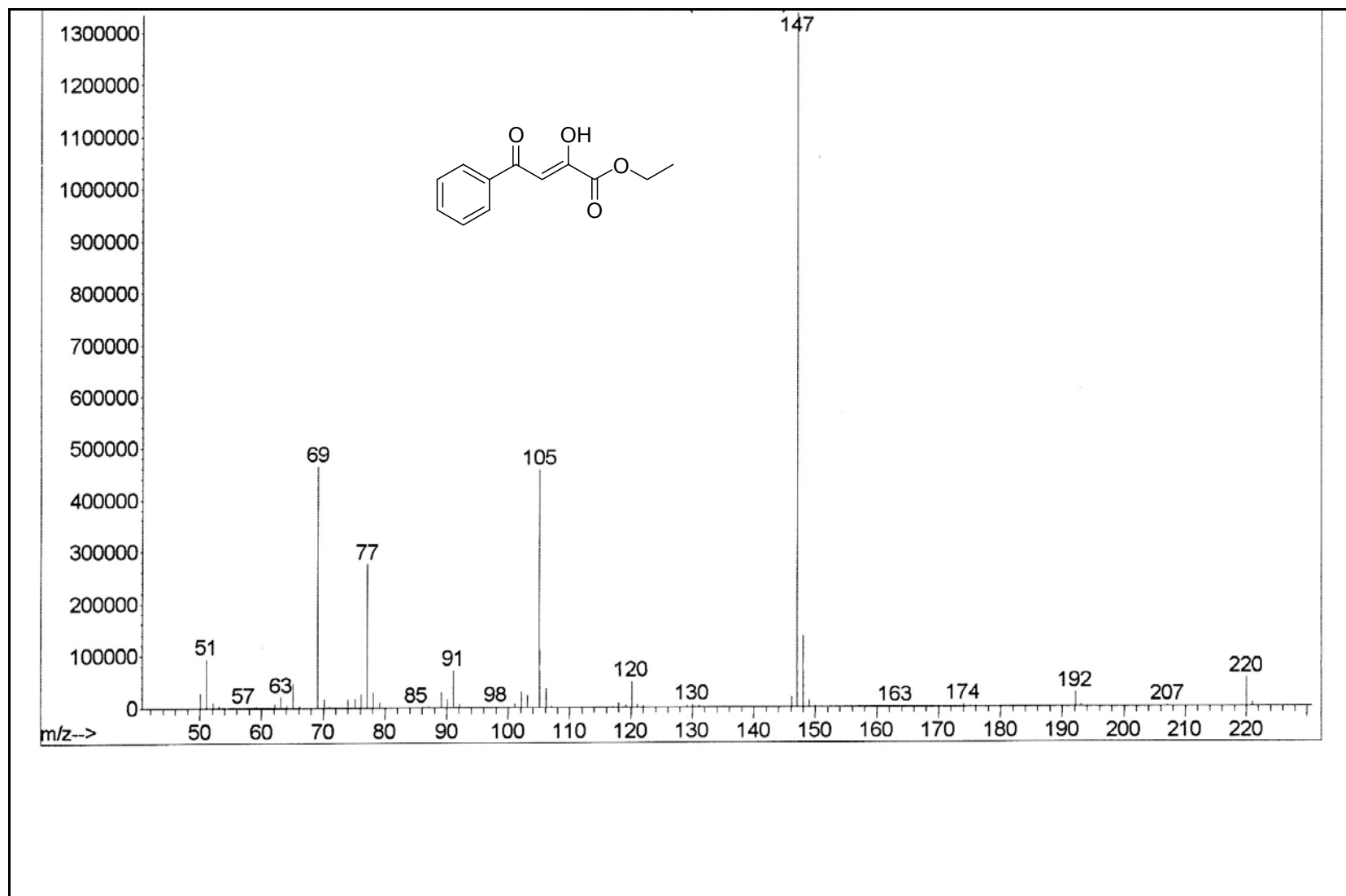
E65. Espectro de RMN de ^1H do 2-oxo-3-metileno-6-metilhexanoato de etila **24**



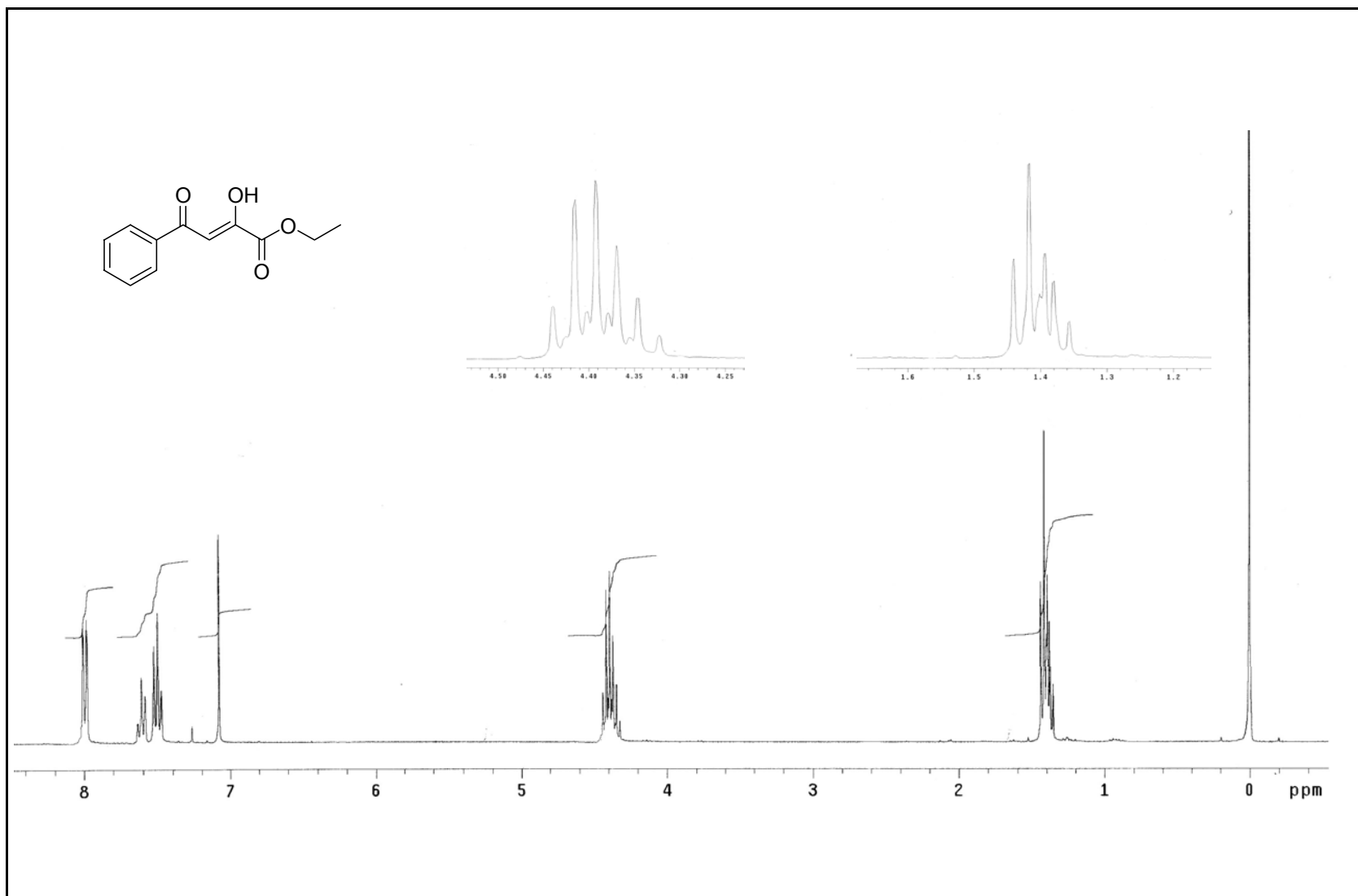
E66. Espectro de RMN de ^{13}C do 2-oxo-3-metileno-6-metilhexanoato de etila **24**



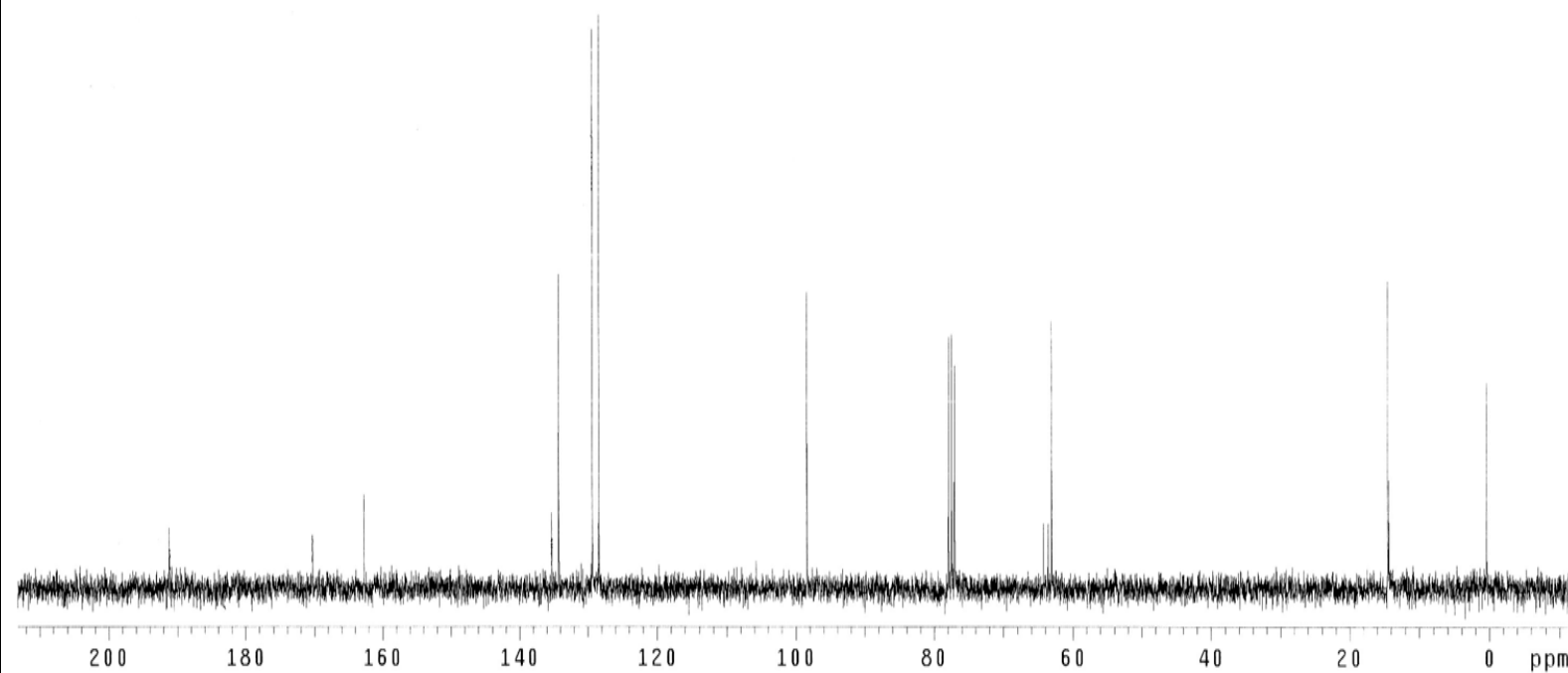
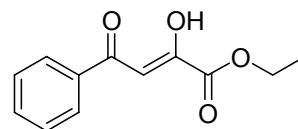
E67. Espectro no IV de 2,4-dioxo-4-fenilbutirato de etila **30**



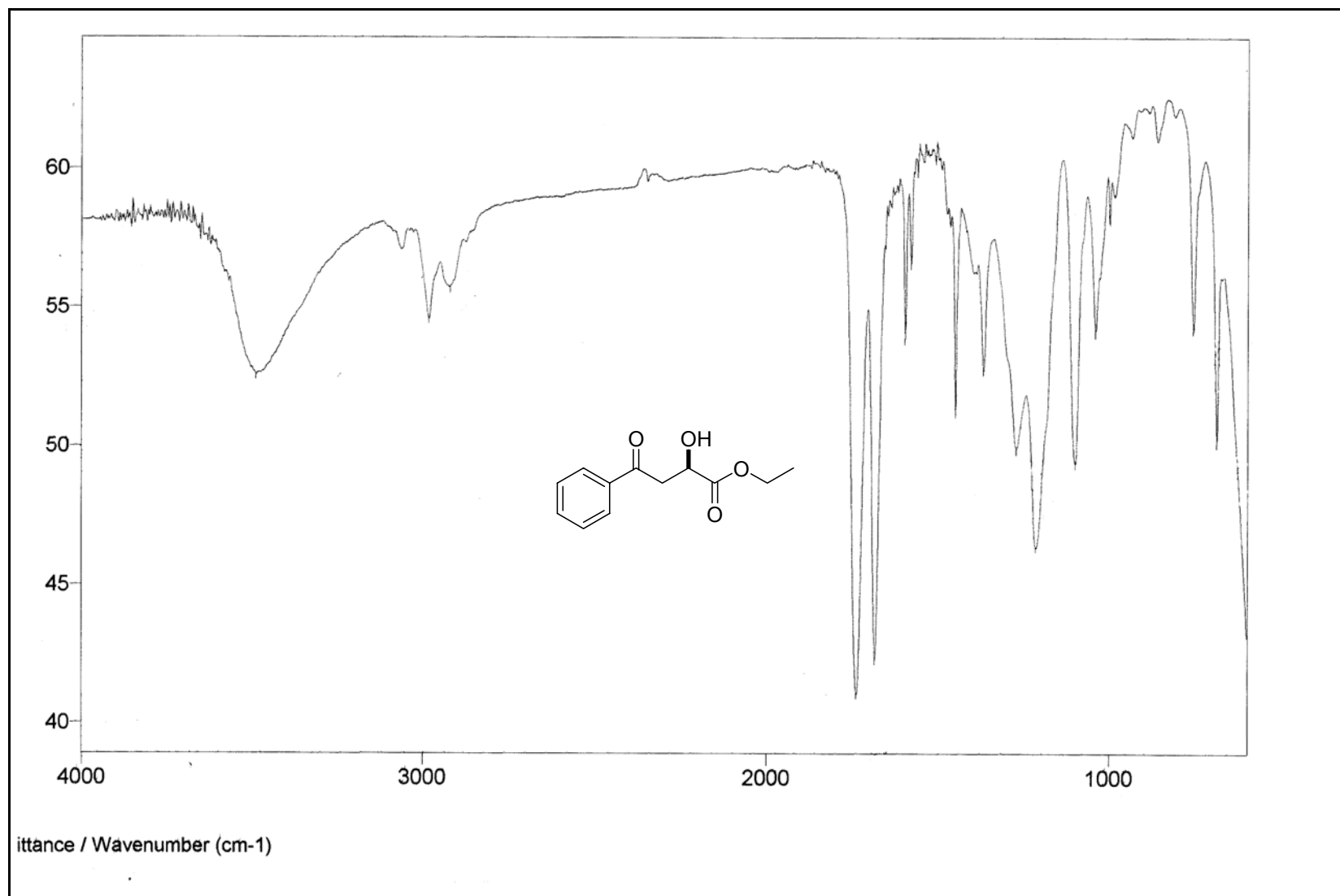
E68. .Espectro de massas de 2,4-dioxo-4-fenilbutirato de etila **30**



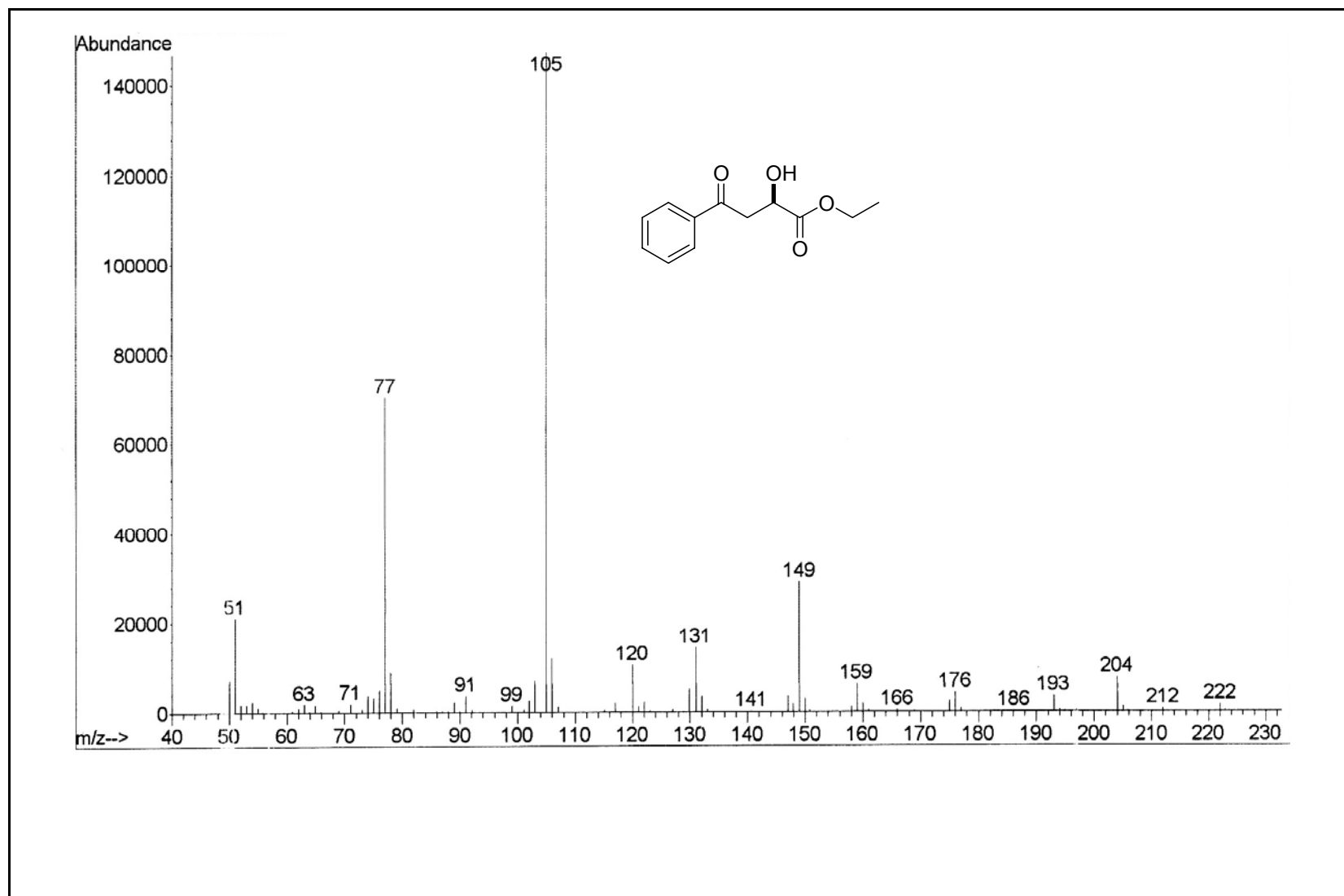
E69. Espectro de RMN de ^1H de 2,4-dioxo-4-fenilbutirato de etila **30**



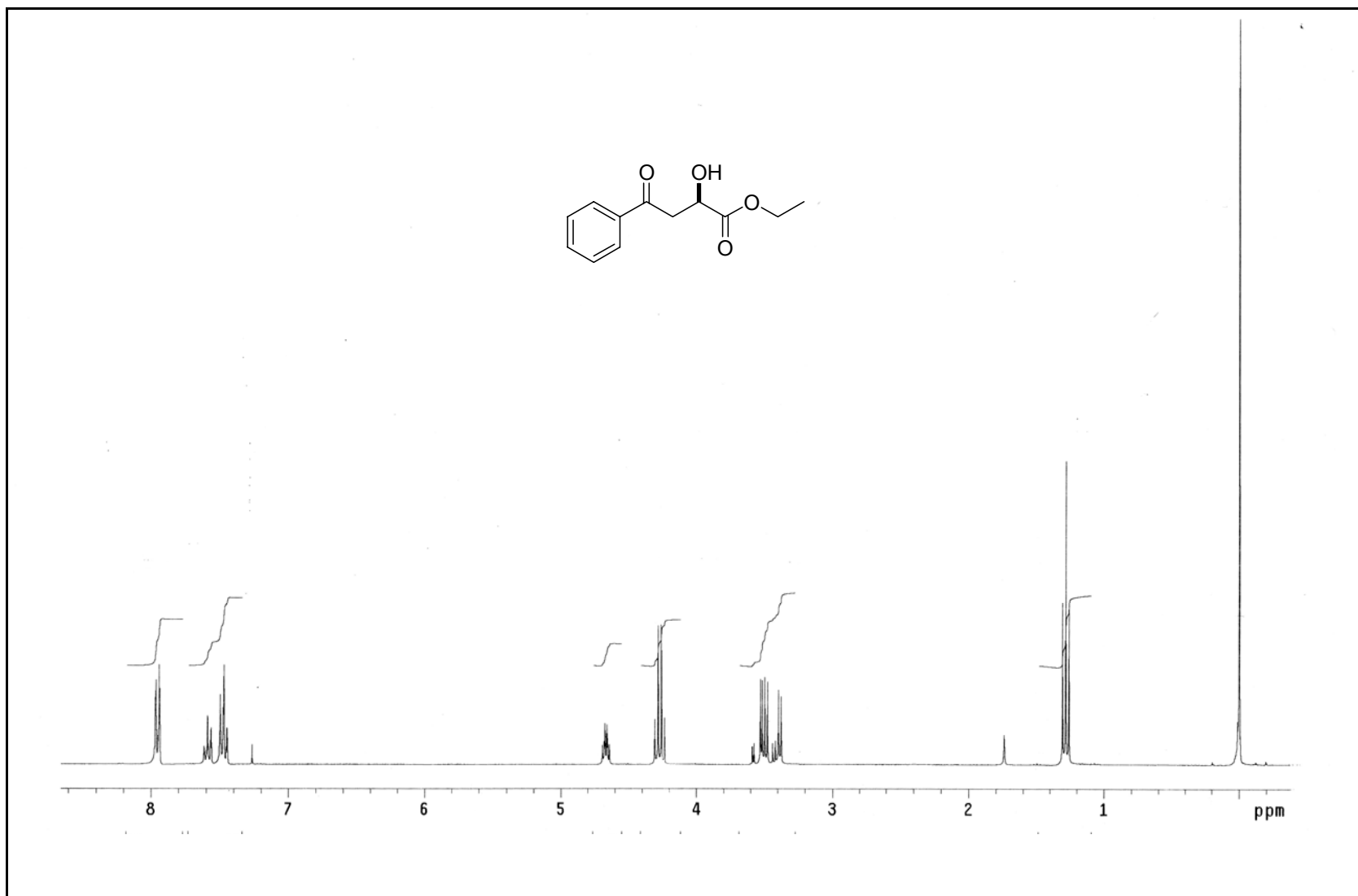
E70. Espectro de RMN de ^{13}C de 2,4-dioxo-4-fenilbutirato de etila **30**



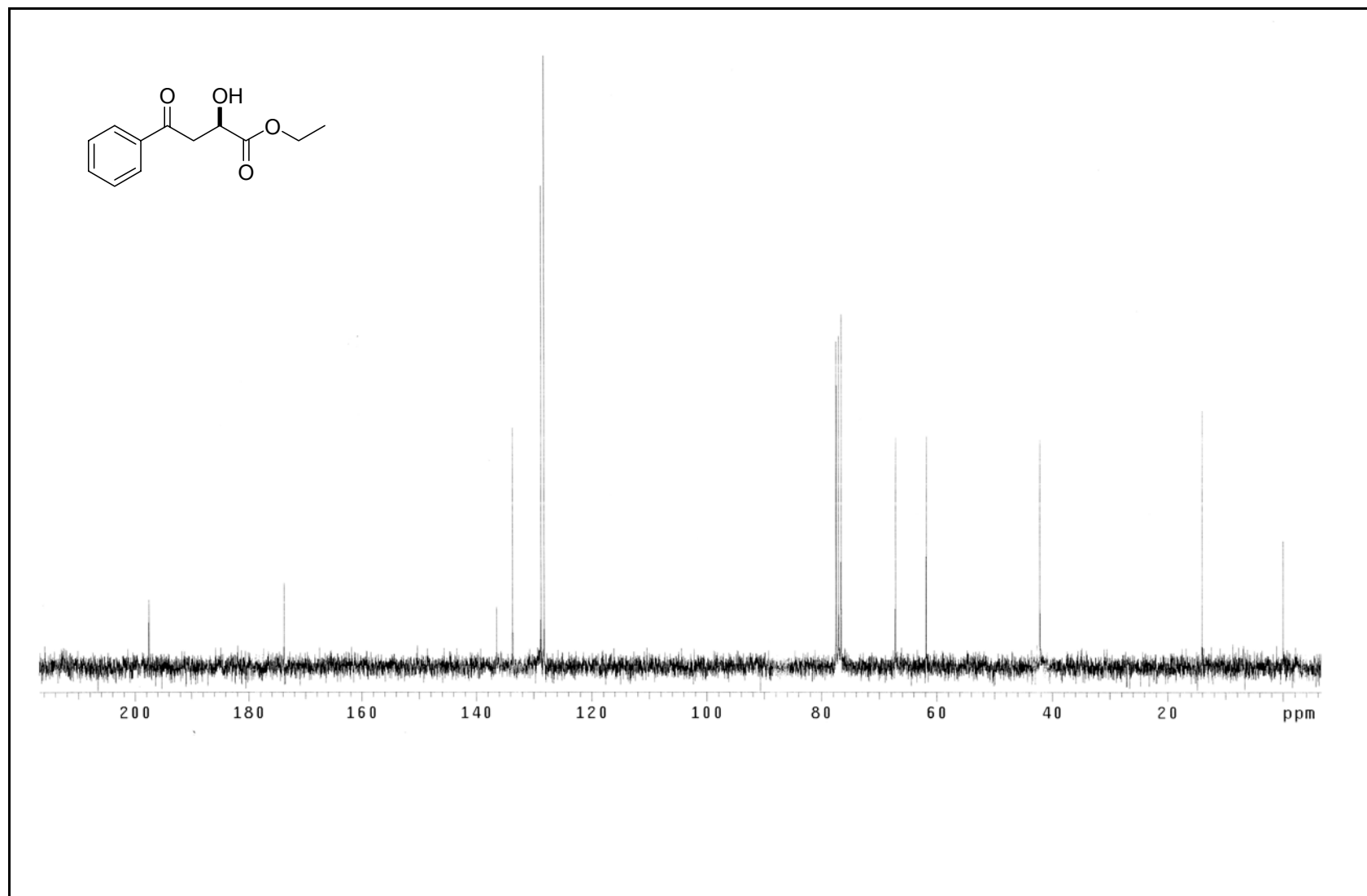
E71. Espectro no IV de *(R)*-(-)-2-hidroxi-4-oxo-4-fenilbutirato de etila (*R*)-25



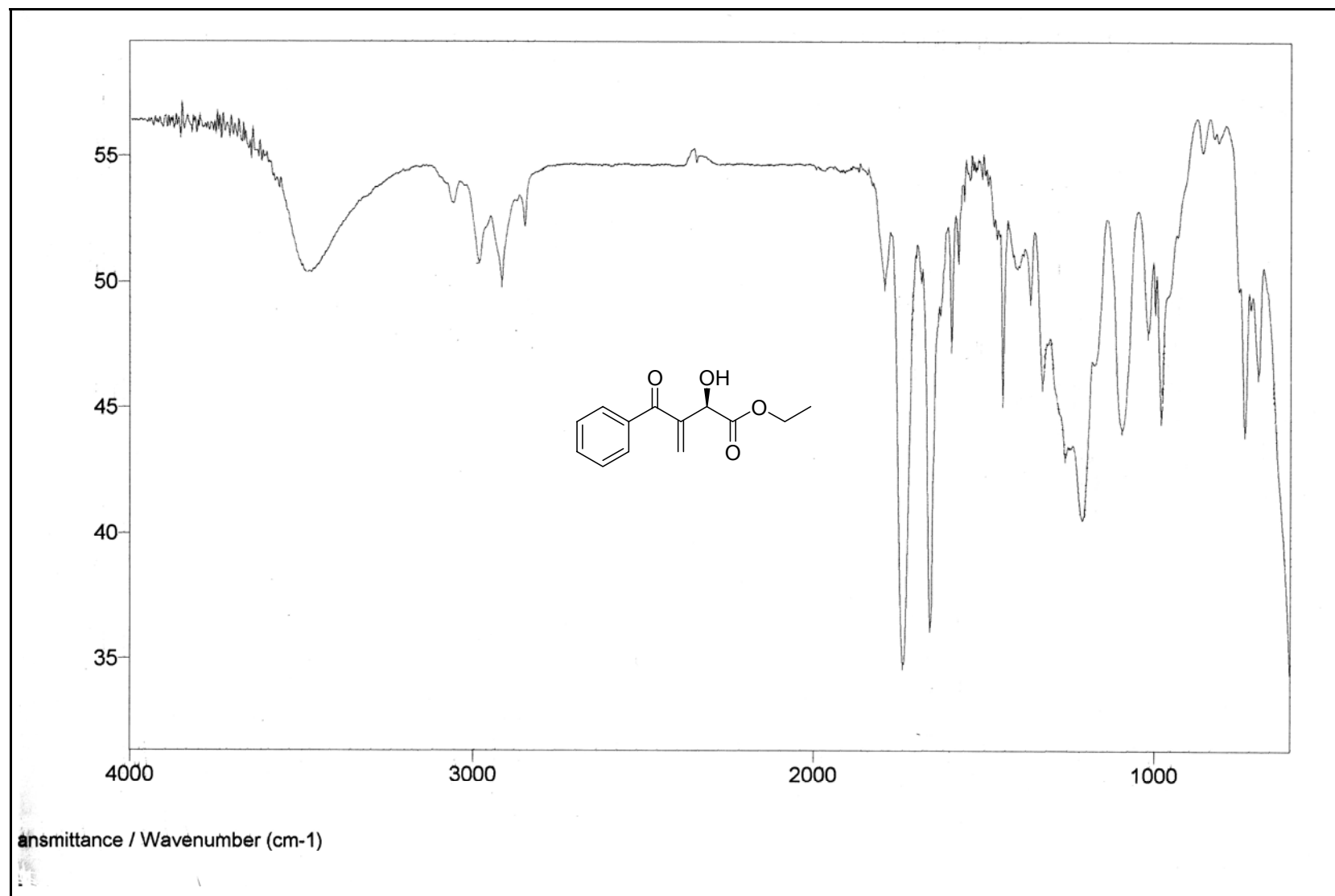
E72. .Espectro de massas de (R)-(-)-2-hidroxi-4-oxo-4-fenilbutirato de etila (**R**)-25



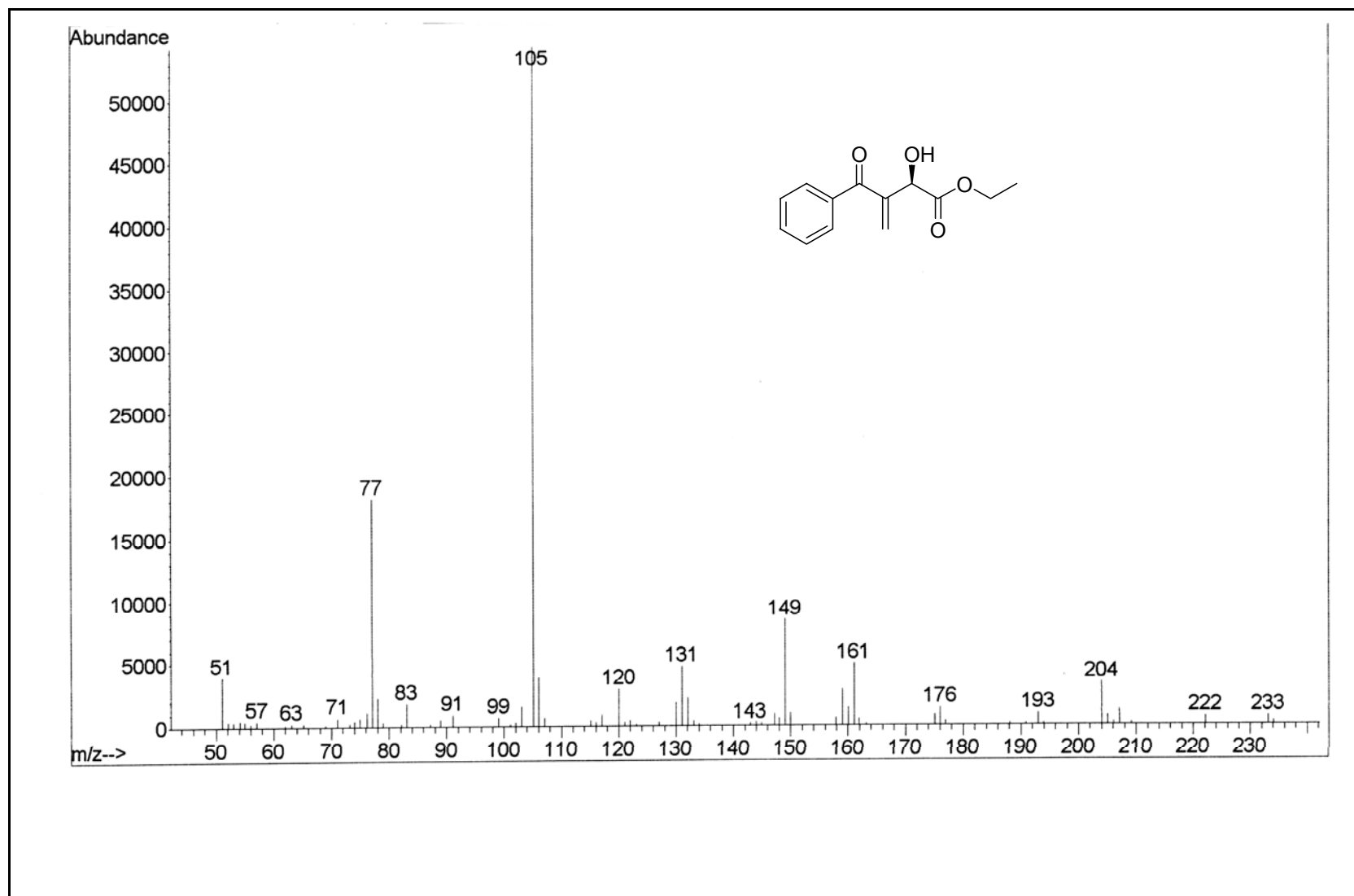
E73. Espectro de RMN de ¹H de (*R*)-(-)-2-hidroxi-4-oxo-4-fenilbutirato de etila (**R**)-25



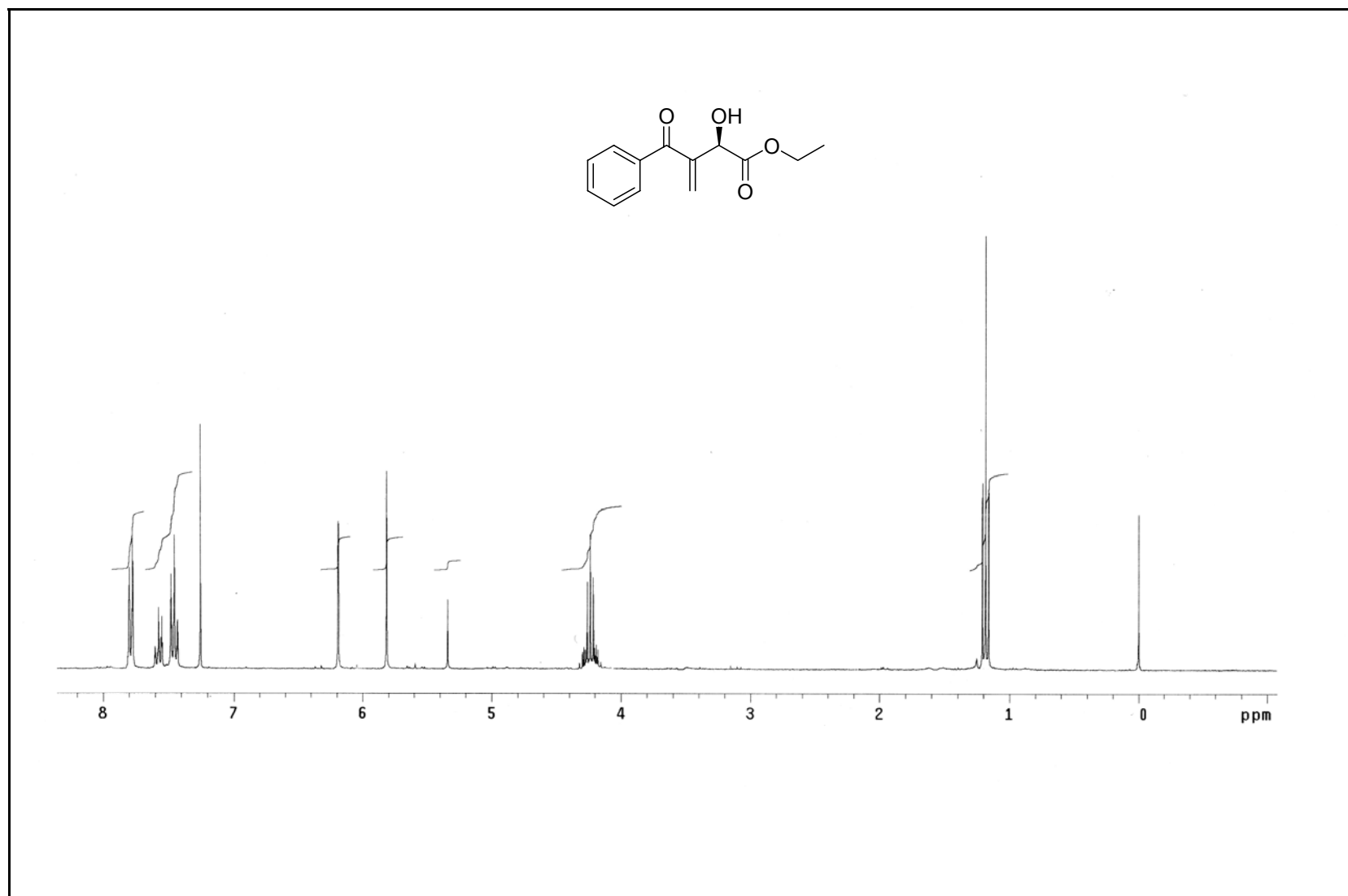
E74. Espectro de RMN de ¹³C de (*R*)-(-)-2-hidroxi-4-oxo-4-fenilbutirato de etila (*R*)-25



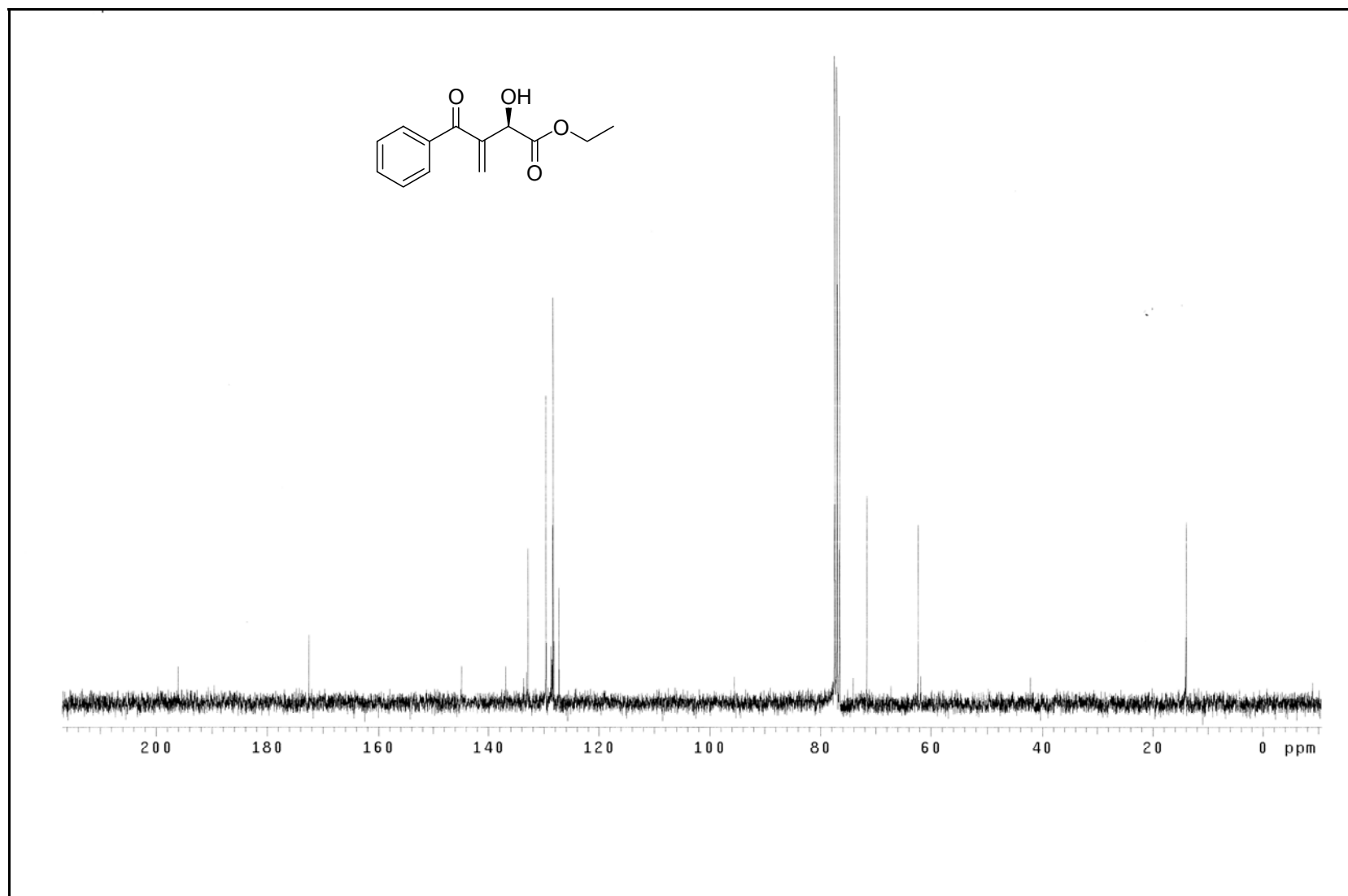
E75. Espectro no IV de (R)-(-)-2-hidroxi-3-metileno-4-oxofenilbutanoato de etila (**R**)-26



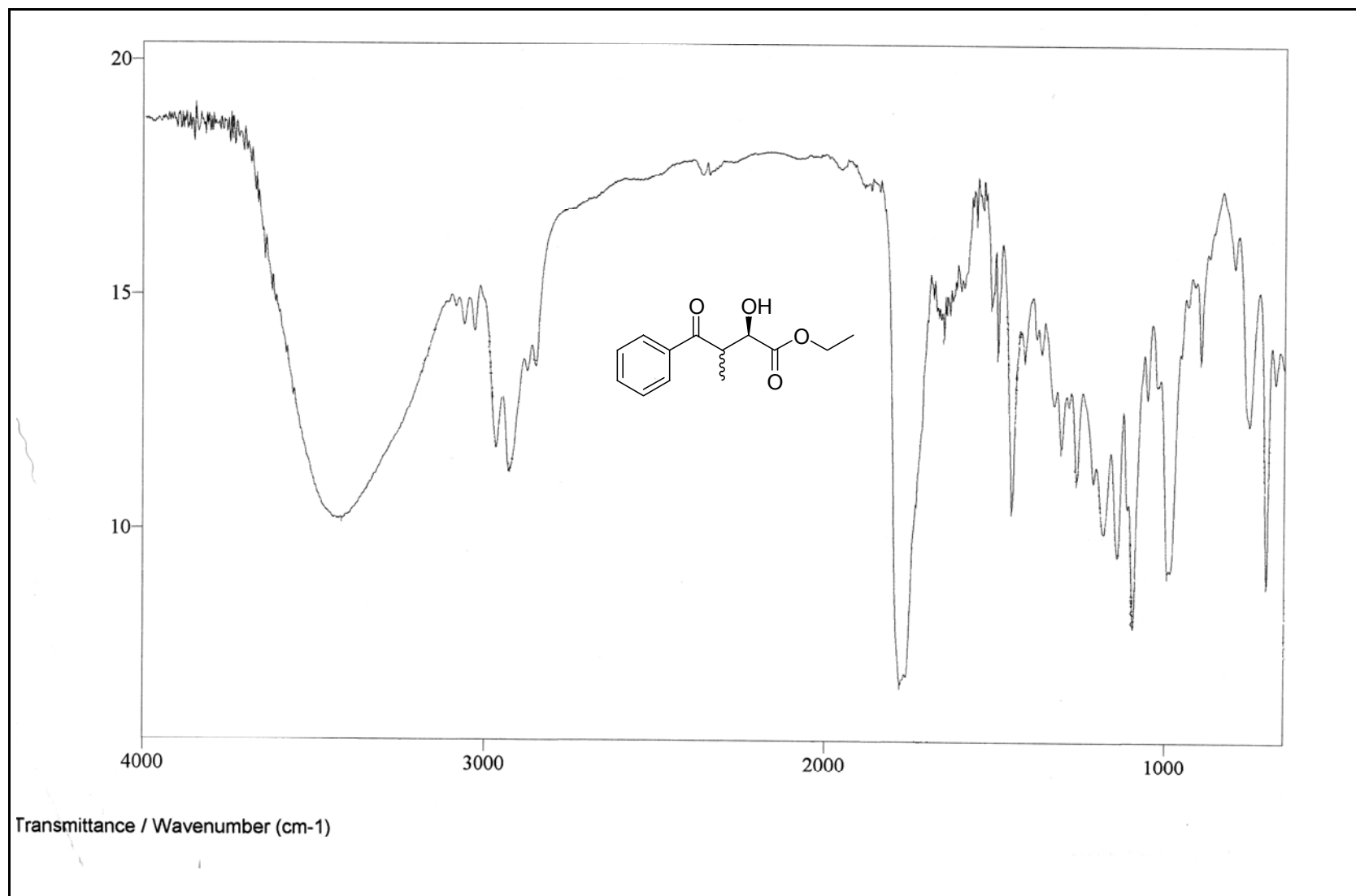
E76. .Espectro de massas de (R)-(-)-2-hidroxi-3-metileno-4-oxofenilbutanoato de etila (**R**)-26



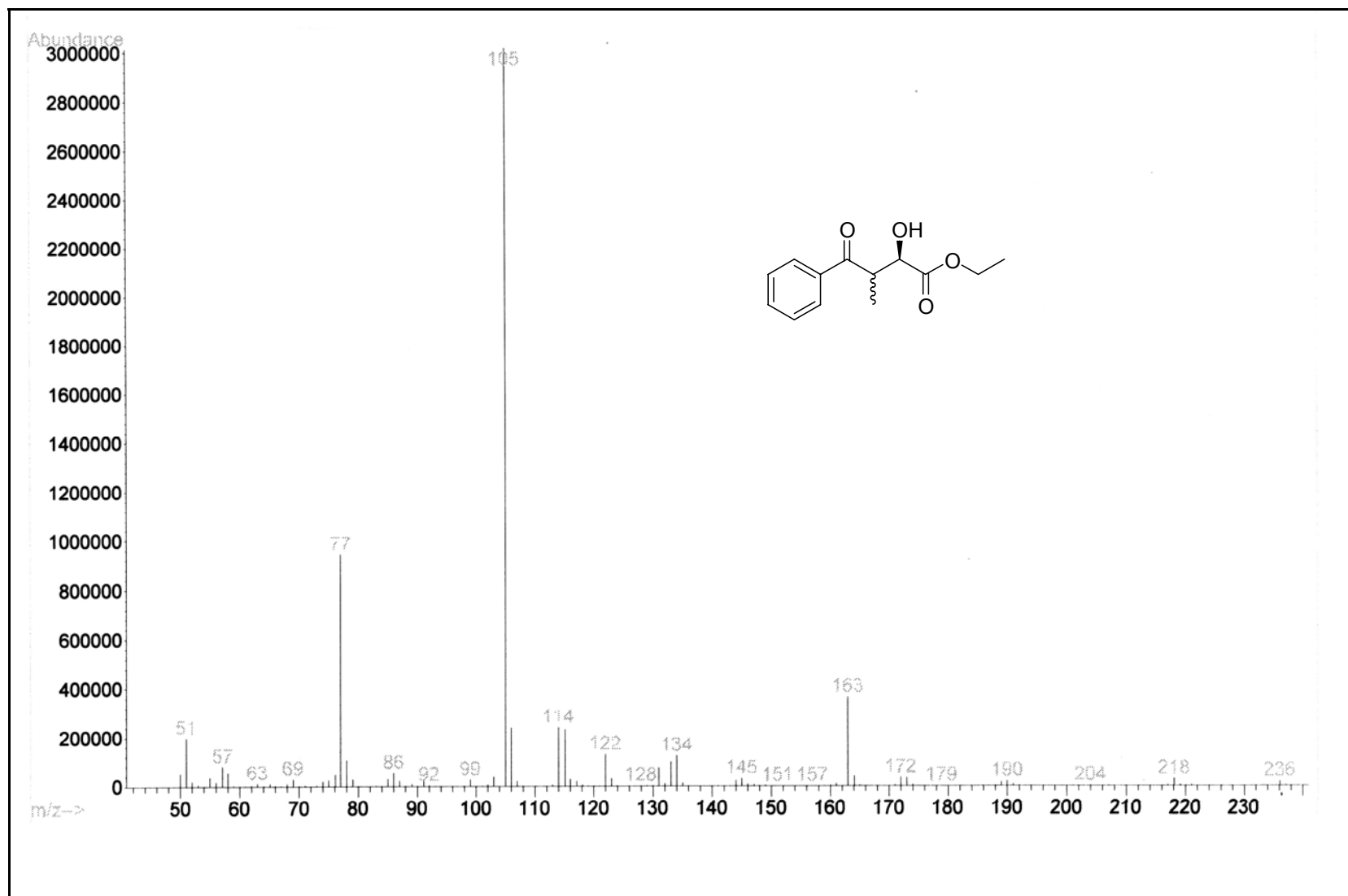
E77. Espectro de RMN de ^1H de (*R*)-(-)-2-hidroxi-3-metileno-4-oxofenilbutanoato de etila (**R**)-26



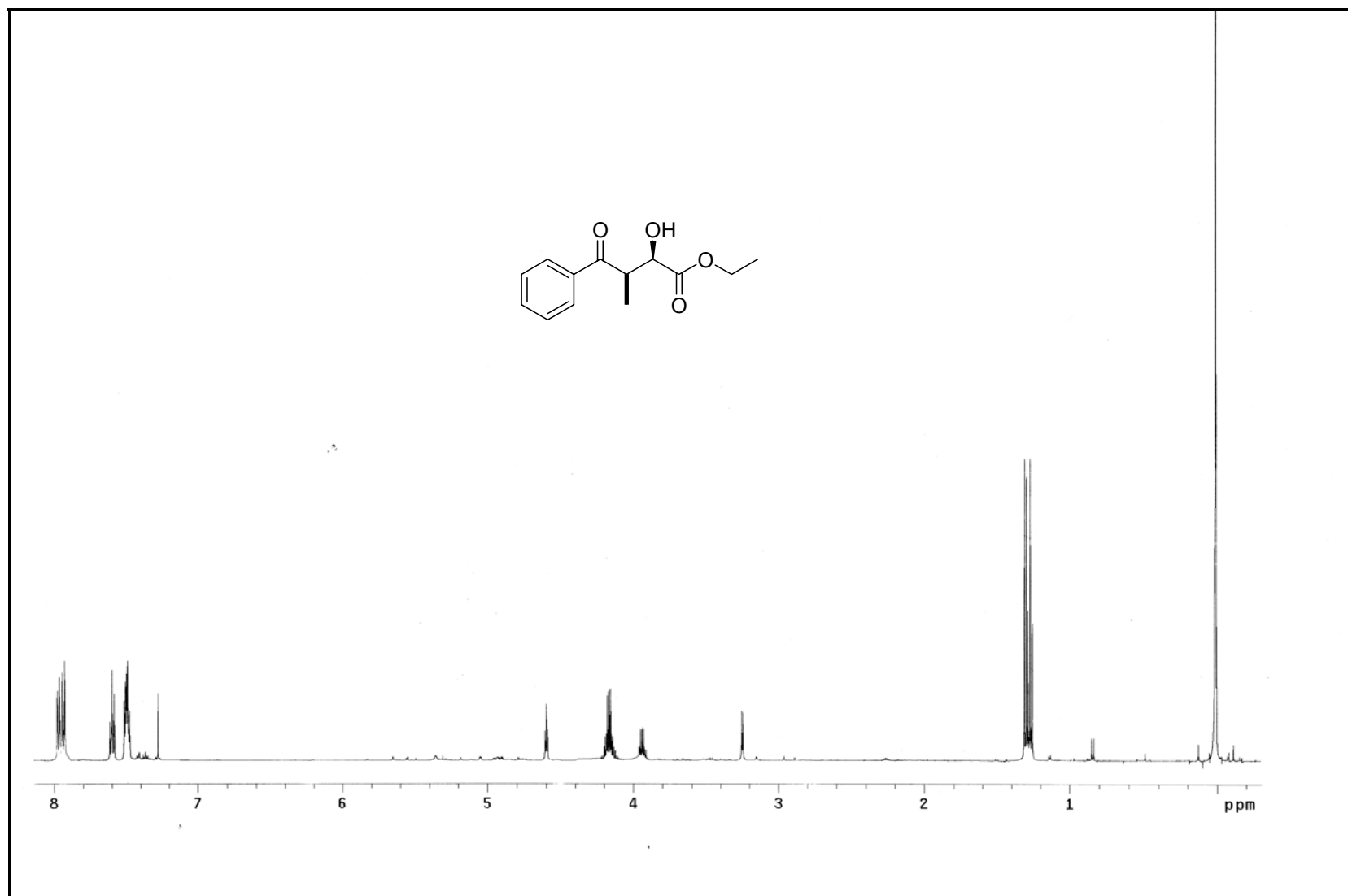
E78. Espectro de RMN de ^{13}C de *(R)*-(-)-2-hidroxi-3-metileno-4-oxofenilbutanoato de etila (*R*)-26



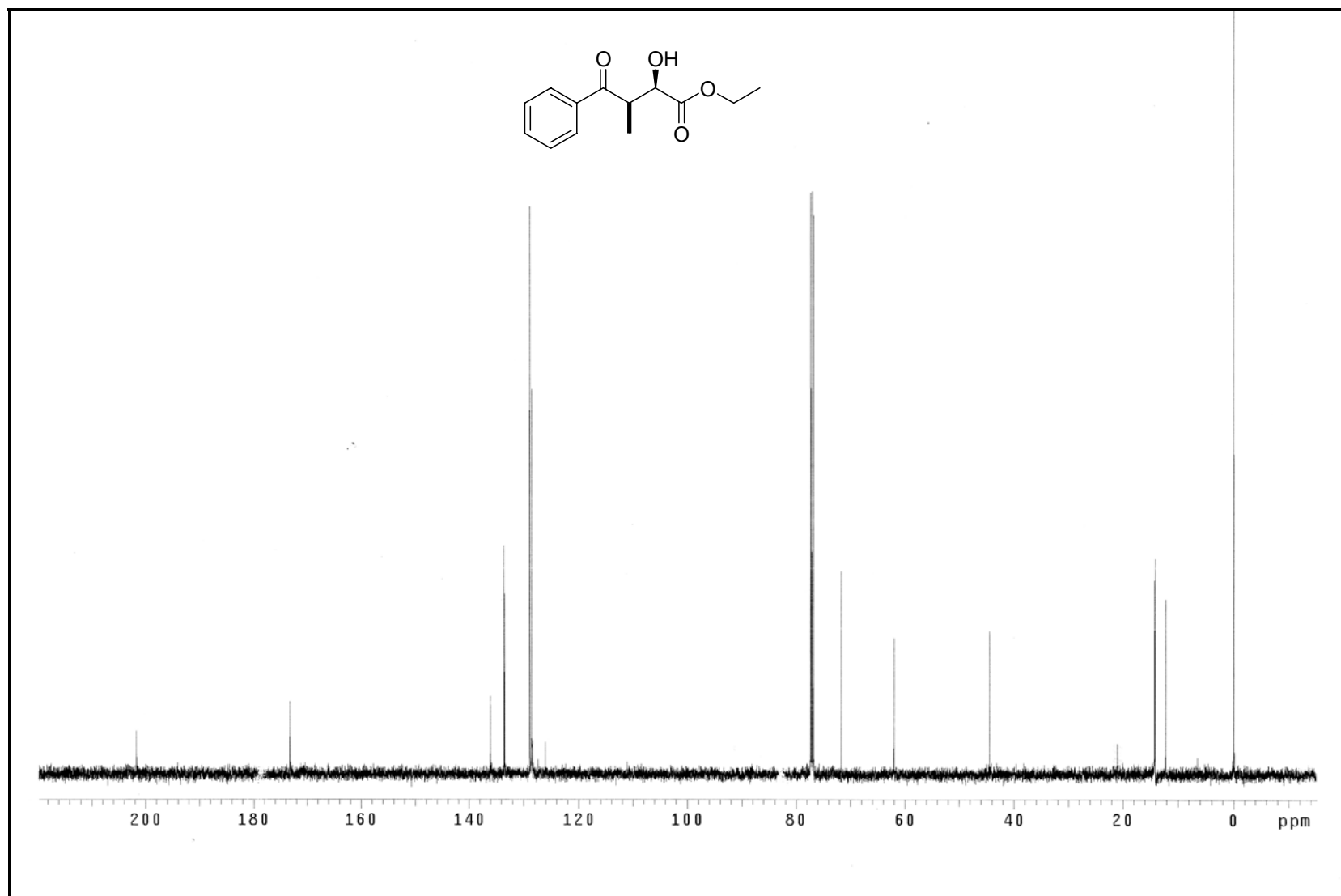
E79. Espectro no IV de (2*R*)-2-hidroxi-3-metil-4-oxo-4-fenilbutanoato de etila **31** (mistura *syn/anti*)



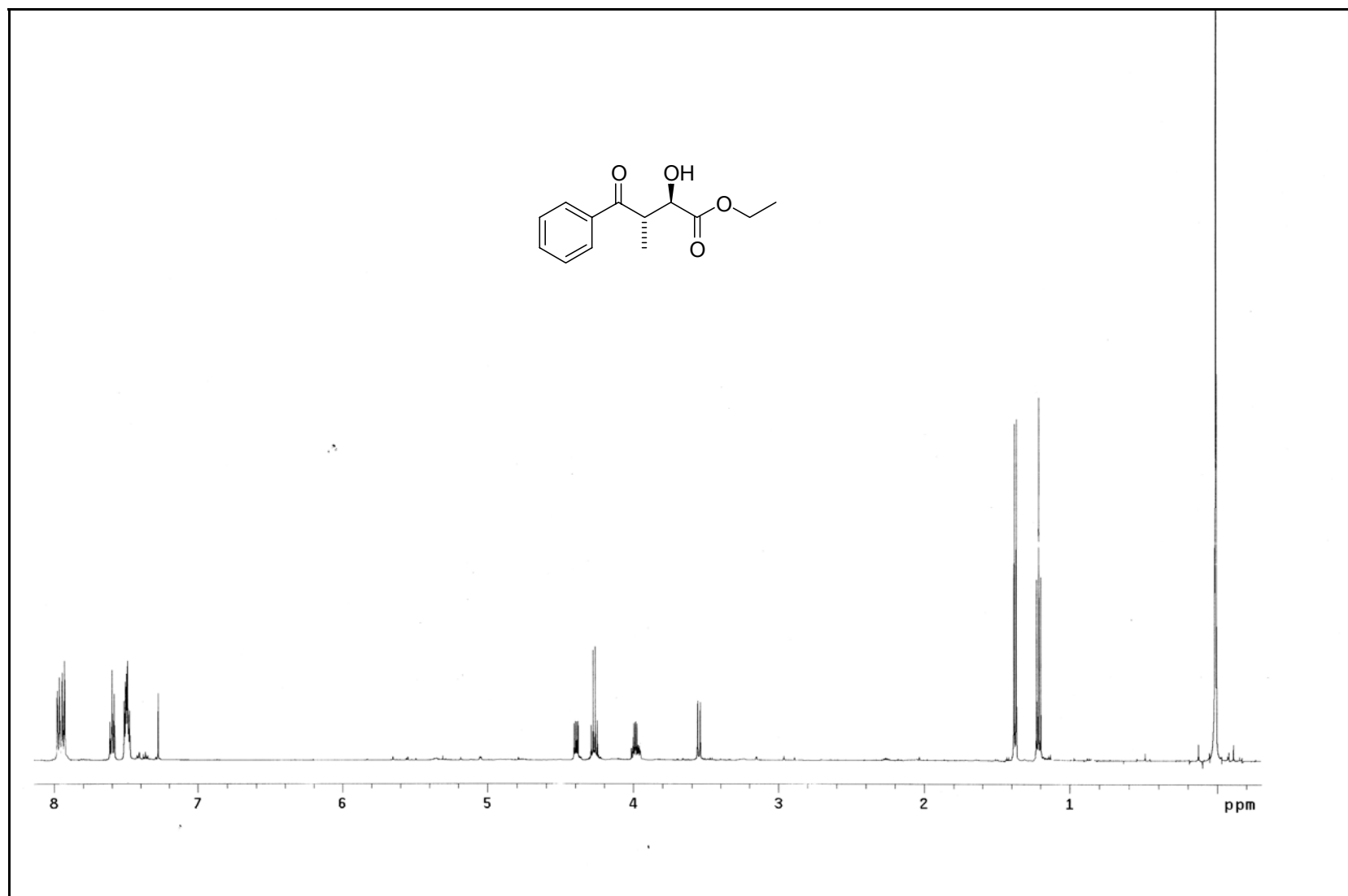
E80. .Espectro de massas de (2R)-2-hidroxi-3-metil-4-oxo-4-fenilbutanoato de etila **32** (mistura *syn/anti*)



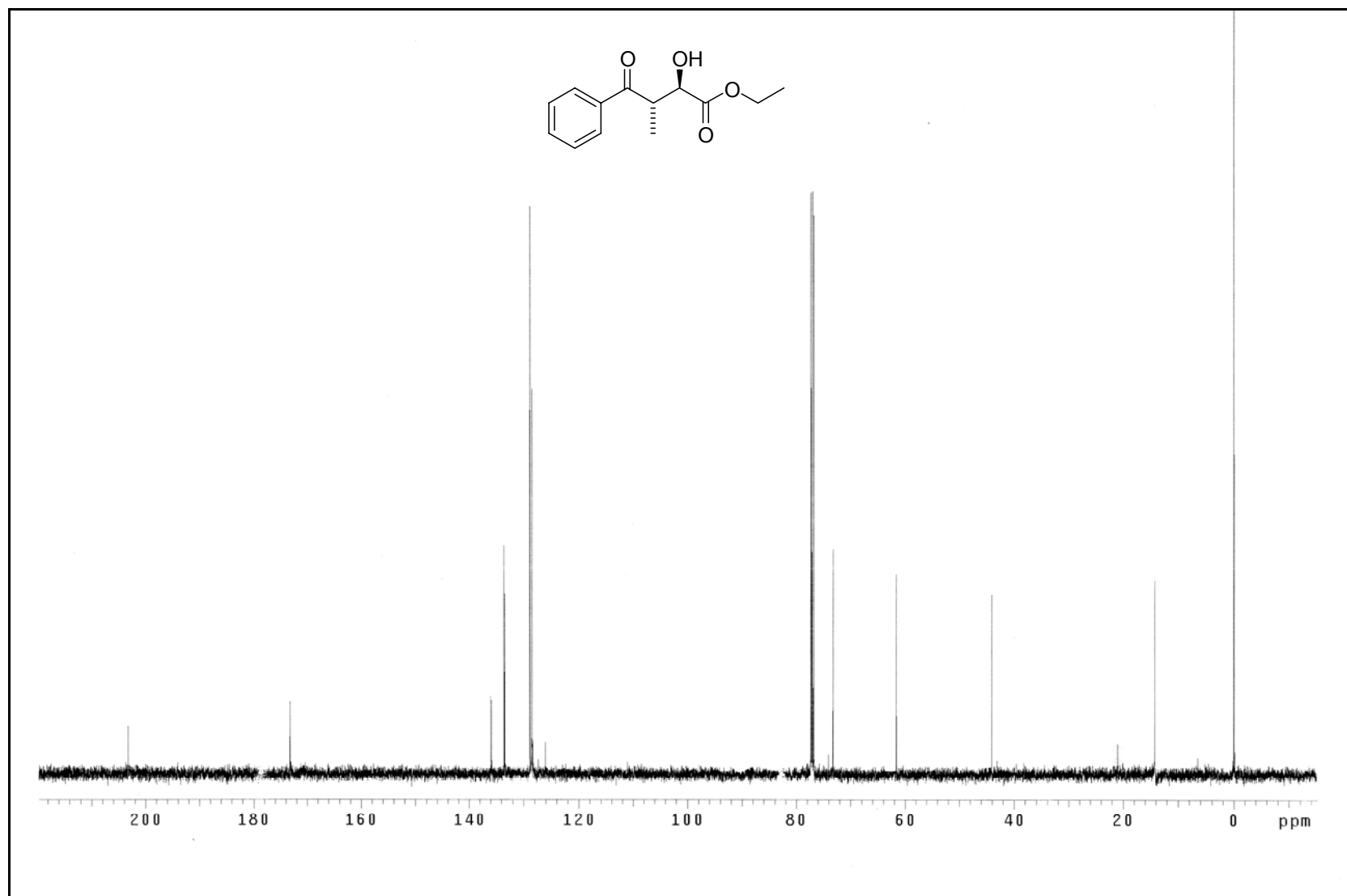
E81. Espectro de RMN de ¹H de (2R,3R)-2-hidroxi-3-metil-4-oxo-4-fenilbutanoato de etila –*syn*-31



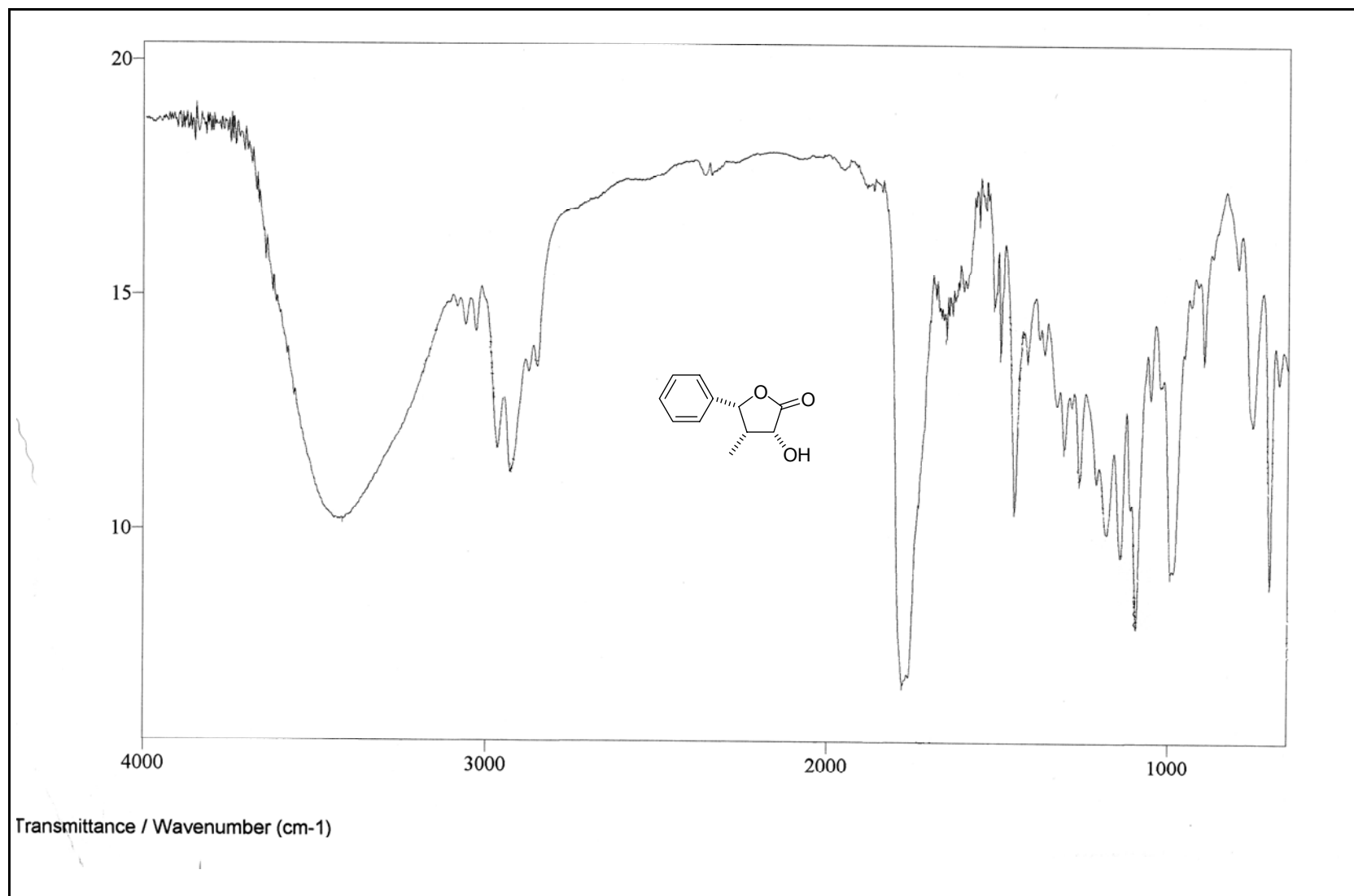
E82. Espectro de RMN de ^{13}C de (2R,3R)-2-hidroxi-3-metil-4-oxo-4-fenilbutanoato de etila – *syn*-31



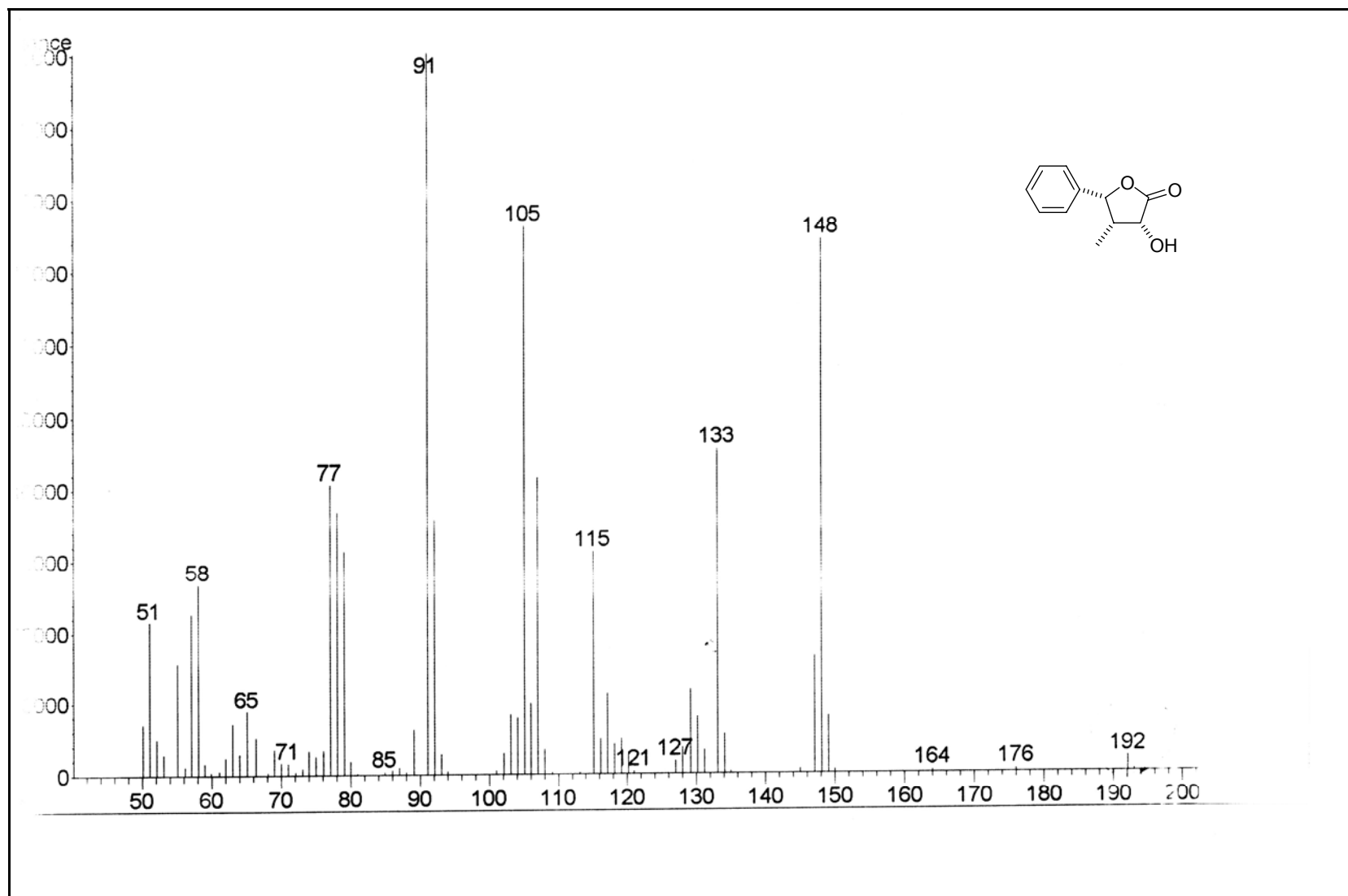
E83. Espectro de RMN de ^1H de (2*R*,3*S*)-2-hidroxi-3-metil-4-oxo-4-fenilbutanoato de etila – *anti*-31



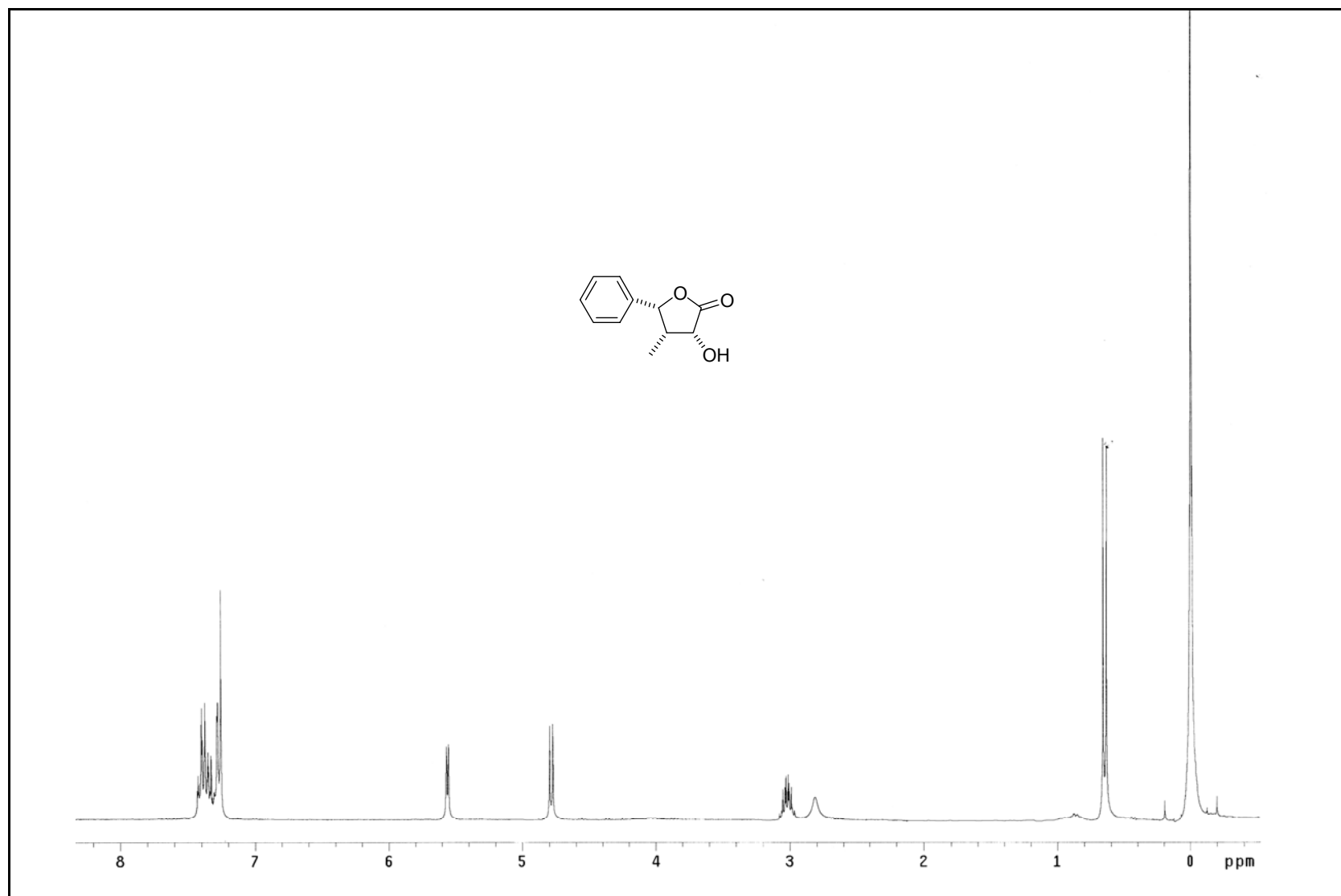
E84. Espectro de RMN de ^{13}C de (2R,3S)-2-hidroxi-3-metil-4-oxo-4-fenilbutanoato de etila – *anti*-31



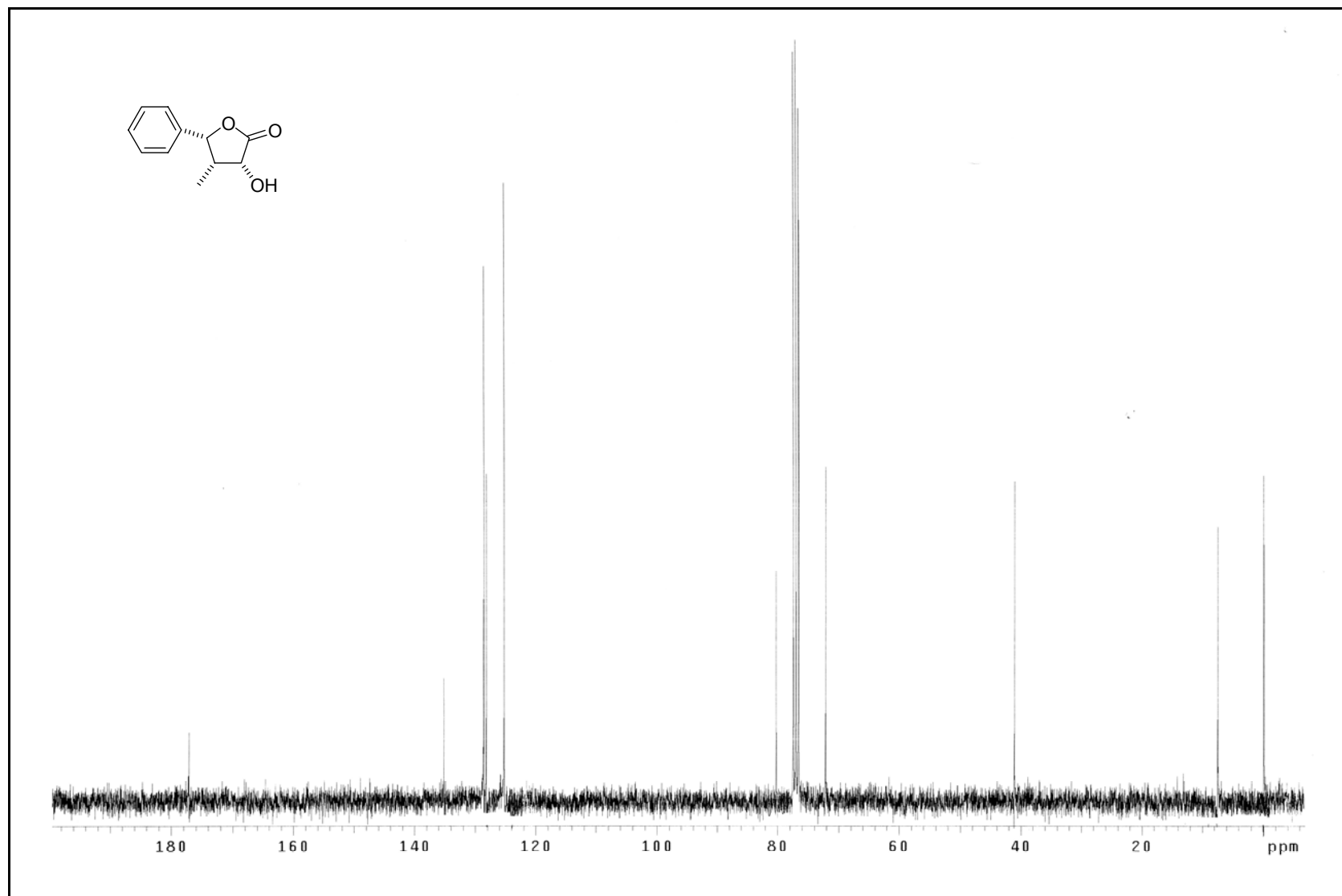
E85. Espectro no IV de (3R,4S,5R)-3-hidroxi-4-metil-5-fenil-dihidro-furan-2-ona **36**



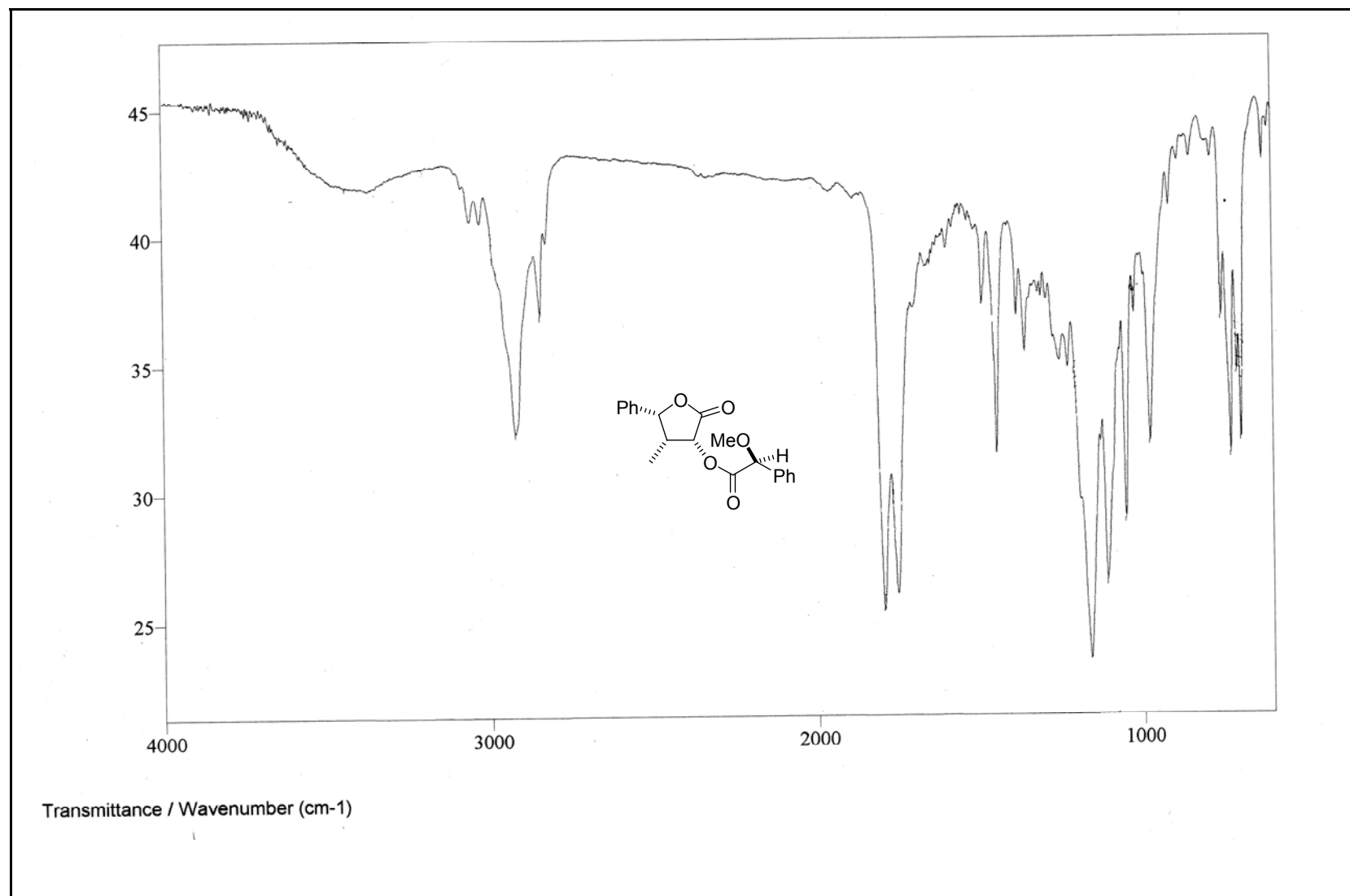
E86. EM de (3R,4S,5R)-3-hidroxi-4-metil-5-fenil-dihidro-furan-2-ona **36**



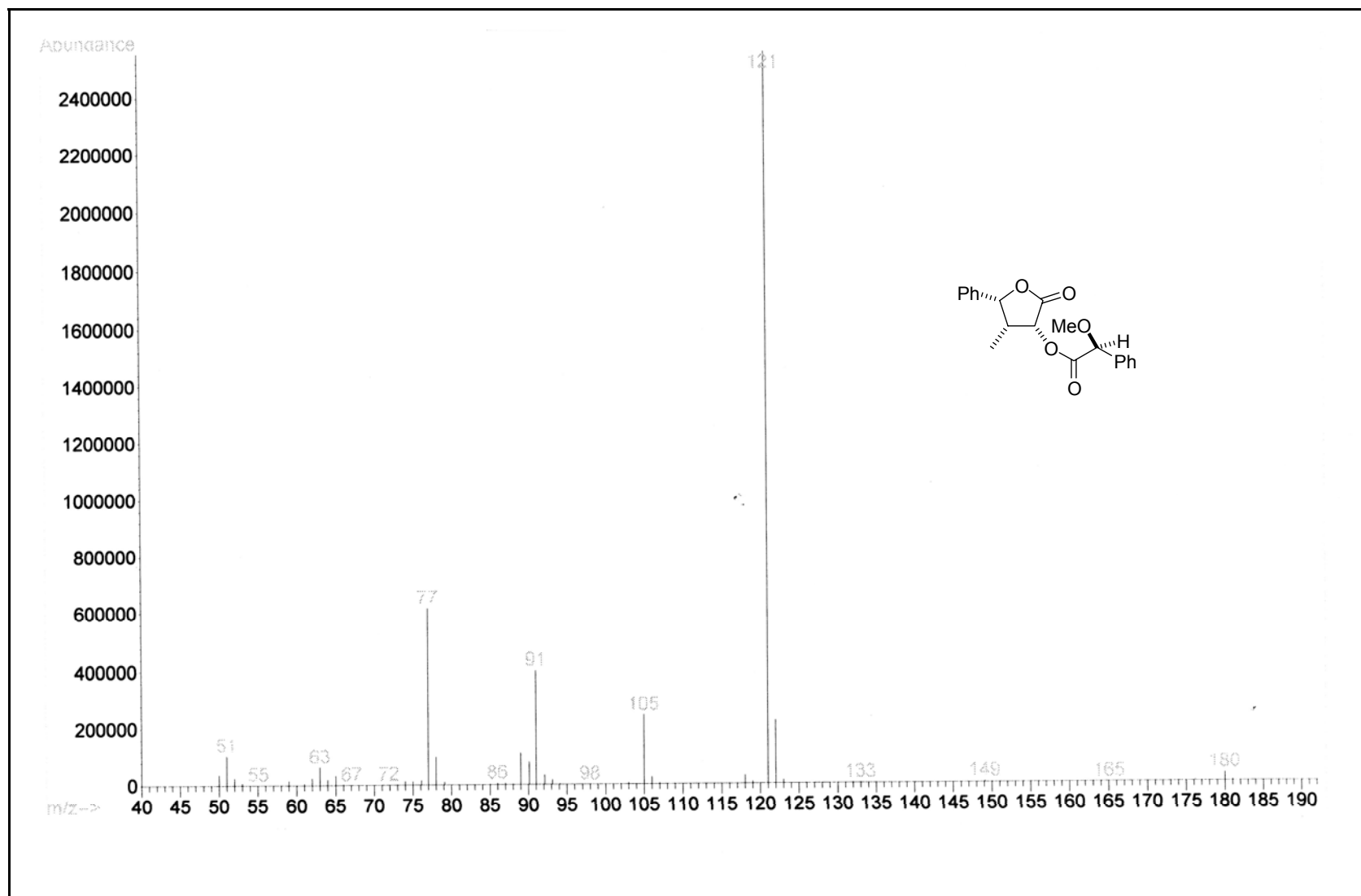
E87. Espectro de RMN de ^1H de 3(3*R*,4*S*,5*R*)-3-hidroxi-4-metil-5-fenil-dihidro-furan-2-ona **36**



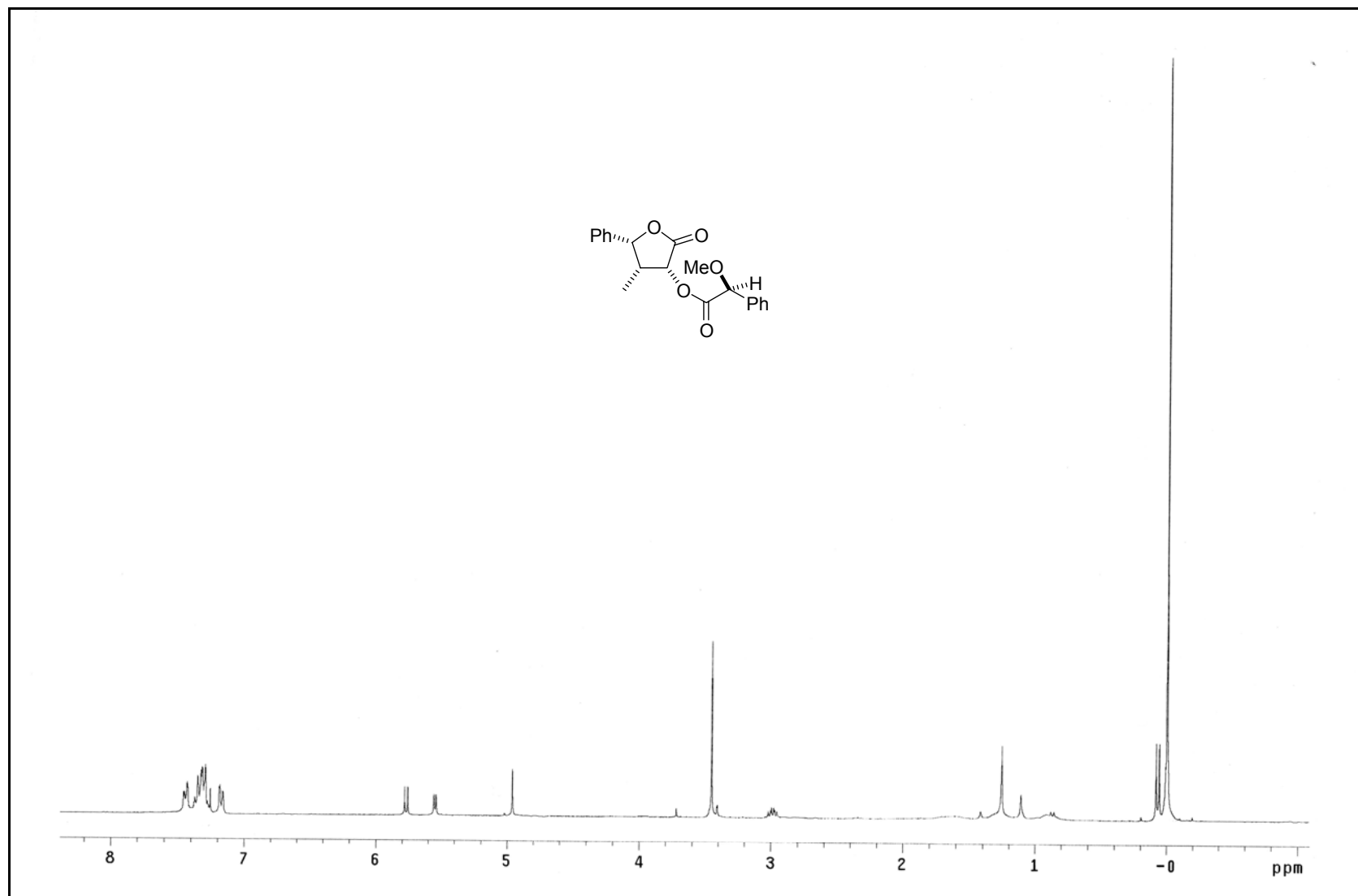
E88. Espectro de RMN de ¹³C de (3R,4S,5R)-3-hidroxi-4-metil-5-fenil-dihidro-furan-2-ona **36**



E89. Espectro no IV de (3*R*,4*S*,5*R*,2'*S*)-(2'-metoxi-2'-fenilacetato) de 4-metil-2-oxo-5-fenil-tetrahidro-furan-3-ila, **37**



E90. Espectro de massas de (3R,4S,5R,2'S)-(2'-metoxi-2'-fenilacetato) de 4-metil-2-oxo-5-fenil-tetrahidro-furan-3-ila, **37**



E91. Espectro de RMN de ¹H de (3*R*,4*S*,5*R*,2'*S*)-(2'-metoxi-2'-fenilacetato) de 4-metil-2-oxo-5-fenil-tetrahidro-furan-3-ila, **37**

E75. Espectro no IV de (R)-(-)-2-hidroxi-3-metileno-4-oxofenilbutanoato de etila (R)- 26	187
E76. .Espectro de massas de (R)-(-)-2-hidroxi-3-metileno-4-oxofenilbutanoato de etila (R)- 26	188
E77. Espectro de RMN de ¹ H de (R)-(-)-2-hidroxi-3-metileno-4-oxofenilbutanoato de etila (R)- 26	189
E78. Espectro de RMN de ¹³ C de (R)-(-)-2-hidroxi-3-metileno-4-oxofenilbutanoato de etila (R)- 26	190
E79. Espectro no IV de (2R)-2-hidroxi-3-metil-4-oxo-4-fenilbutanoato de etila 31 (mistura <i>syn/anti</i>)	191
E80. .Espectro de massas de (2R)-2-hidroxi-3-metil-4-oxo-4-fenilbutanoato de etila 32 (mistura <i>syn/anti</i>)	192
E81. Espectro de RMN de ¹ H de (2R,3R)-2-hidroxi-3-metil-4-oxo-4-fenilbutanoato de etila – <i>syn</i> - 31	193
E82. Espectro de RMN de ¹³ C de (2R,3R)-2-hidroxi-3-metil-4-oxo-4-fenilbutanoato de etila – <i>syn</i> - 31	194
E83. Espectro de RMN de ¹ H de (2R,3S)-2-hidroxi-3-metil-4-oxo-4-fenilbutanoato de etila – <i>anti</i> - 31	195
E84. Espectro de RMN de ¹³ C de (2R,3S)-2-hidroxi-3-metil-4-oxo-4-fenilbutanoato de etila – <i>anti</i> - 31	196
E85. Espectro no IV de (3R,4S,5R)-3-hidroxi-4-metil-5-fenil-dihidro-furan-2-ona 36	197
E86. EM de (3R,4S,5R)-3-hidroxi-4-metil-5-fenil-dihidro-furan-2-ona 36	198
E87.Espectro de RMN de ¹ H de 3(3R,4S,5R)-3-hidroxi-4-metil-5-fenil-dihidro-furan-2-ona 36	199
E88. Espectro de RMN de ¹³ C de (3R,4S,5R)-3-hidroxi-4-metil-5-fenil-dihidro-furan-2-ona 36	200
E89. Espectro no IV de (3R,4S,5R,2'S)-(2'-metoxi-2'-fenilacetato) de 4-metil-2-oxo-5-fenil-tetrahydro-furan-3-ila, 37	201
E90. Espectro de massas de (3R,4S,5R,2'S)-(2'-metoxi-2'-fenilacetato) de 4-metil-2-oxo-5-fenil-tetrahydro-furan-3-ila, 37	202
E91.Espectro de RMN de ¹ H de (3R,4S,5R,2'S)-(2'-metoxi-2'-fenilacetato) de 4-metil-2-oxo-5-fenil-tetrahydro-furan-3-ila, 37	203