

Universidade Estadual de Campinas

Instituto de Química



UNICAMP

Síntese Biocatalítica de β -Amino- α -Hidroxiácidos.

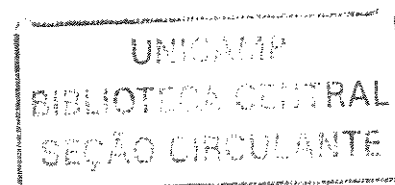
Aplicações na Síntese de Heterociclos Quirais

Tese de Doutorado

Humberto Márcio Santos Milagre

Orientador: Prof. Dr. José Augusto Rosário Rodrigues

Campinas, 2005 ✓



Nº CHAMADA 7/UNICAMP
M589s
 V. EX
 TOMBO BC/ 65158
 PROC. 16-P-00586-05
 C. 1 D. 15
 PREÇO 11,00
 DATA 03/08/05
 Nº CRD

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
 BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE QUÍMICA
 UNICAMP

360429

M589s

Milagre, Humberto Márcio Santos.

Síntese biocatalítica de β -amino- α -hidroxiácidos.
 Aplicações na síntese de heterociclos quirais. /
 Humberto Márcio Santos Milagre. — Campinas, SP:
 [s.n], 2005.

Orientador: José Augusto Rosário Rodrigues.

Tese — Universidade Estadual de Campinas,
 Instituto de Química.

1. Beta-amino-hidróxi-ácidos. 2. Biocatálise.
 3. Saccharomyces cerevisiae. 4. Alginato de cálcio.
 I. Rodrigues, José Augusto Rosário. II. Instituto de
 Química. III. Título.

“Um homem herdou um campo onde havia um acúmulo de pedras antigas, partes de um edifício bem antigo. Algumas das pedras já haviam sido usadas na construção da casa onde ele agora morava, não longe da casa velha de seus ancestrais.

Ele tomou algumas das pedras restantes e construiu uma torre. Mas seus amigos ao chegarem, perceberam imediatamente (sem se darem ao trabalho de subir os degraus) que estas pedras haviam pertencido a uma construção mais antiga. Assim derrubaram a torre, não sem muito esforço, para procurar entalhes e inscrições ocultas, ou para descobrir onde os longínquos antepassados do homem haviam obtido seu material de construção. Alguns suspeitando que houvessem um depósito de carvão no subsolo, começaram a procura-lo, e se esqueceram até mesmo das pedras. Todos diziam: ‘Esta torre é extremamente interessante!’ Mas também diziam (depois de a terem derrubado): ‘Em que desordem ela está!’ E até mesmo os descendentes do homem, que deveriam considerar as suas intenções, murmuravam: ‘É um camarada tão esquisito! Imagine, usar essas velhas pedras só para construir uma torre sem sentido! Por que não restaurou a antiga casa? Ele não tinha senso de proporção.’ Mas do alto daquela torre, o homem pudera contemplar o mar.”

J. R. R. Tolkien

Para Cíntia

Agradecimentos

Ao Prof. Dr. José Augusto Rosário Rodrigues, pela orientação, incentivo, confiança e amizade.

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

À Cíntia pelo carinho e atenção que foram indispensáveis à realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Paulo J. S. Moran, pela amizade, colaboração e proveitosas discussões ao final da tarde.

À Profa. Dra. Maria Helena A. Santana pelo incentivo, colaboração e amizade.

Ao Prof. Dr. Marcos N. Eberlin, ao Leo e à Liliam pela colaboração.

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

Ao Prof. Dr. Angelo Cortelazzo pelo preparo das lâminas para microscopia.

Aos amigos e colegas de laboratório, especialmente ao Ezequias, Paulinho, José Luiz, Carlão, Juliana, Marcelo, e D. Alice.

Aos funcionários do Instituto de Química, em especial ao Marcos da vidraria.

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

Aos meus grandes amigos e companheiros Abel (*in memoriam*), Bruce e Tila.

Ao meu grande amigo Rochel que sempre esteve presente mesmo que à distância.

À D. Dirce e Sr. Roger que me acolheram de braços abertos e pelos momentos de descontração junto aos amigos.

À todas às pedras que apareceram em meu caminho que tiveram um papel importante no meu amadurecimento pessoal.

À CAPES e FAPESP pela bolsa e auxílio financeiro.

Curriculum Vitae

Formação Acadêmica/Titulação

- 2001 - 2005 Doutorado em Química.
Universidade Estadual de Campinas, UNICAMP, Campinas, Brasil
- 1999 - 2000 Mestrado em Química.
Universidade Federal de Minas Gerais, UFMG, Belo Horizonte, Brasil
- 1993 - 1998 Graduação em Química.
Universidade Federal de Minas Gerais, UFMG, Belo Horizonte, Brasil

Formação complementar

- 1995 - 1998 Extensão universitária em Iniciação Científica.
Universidade Federal de Minas Gerais, UFMG, Belo Horizonte, Brasil
Bolsista CNPq e FAPEMIG
- 2003 - 2004 Extensão universitária em Programa de Estágio Docente.
Universidade Estadual de Campinas, UNICAMP, Campinas, Brasil, Ano de obtenção: 2004
Bolsista do(a): Universidade Estadual de Campinas

Artigos publicados em periódicos

1. Milagre, H. M. S., Milagre, C. D. F., Rocha, L. L., Santos, L. S., Eberlin, M. N., Rodrigues, J. Augusto R. On-line Monitoring of Bioreductions via Membrane Introduction Mass Spectrometry. **Bioengineering and Biotechnology**, 2005. (*in press*)
2. Milagre, H. M. S., Santana, M. H. A., Moran, P. J. S., Milagre, C. D. F., Rodrigues, J. Augusto 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. (*in press*)
3. Rocha, W. R., Milagre, H. M. S., Almeida, W. B. On the isomerization of beta-pinene: a theoretical study. **Journal of Molecular Structure Theochem**, v.544, p.213 - 220, 2001.

Trabalhos publicados em anais de congressos internacionais

1. Milagre, H. M. S., Milagre, C. D. F., Rodrigues, J. Augusto R., Santana, M. H. A., Moran, P. J. S. Reduction of ethyl benzoylformate using *Saccharomyces cerevisiae* entrapped in alginate fibers with double gel layers in a continuously operated reactor In: 12th International Biotechnology Symposium, 2004, Santiago. Apresentação oral.
12th International Biotechnology Symposium, 2004.
2. Milagre, H. M. S., Milagre, C. D. F., Moran, P. J. S., Santana, M. H. A., Rodrigues, J. Augusto R. Redução enantio- e diastereoselectiva de beta-halo-alfa-cetoésteres mediada por *Saccharomyces cerevisiae* In: Biocatálisis y Biotransformaciones 2004, 2004, Montevideo.
Biocatálisis y Biotransformaciones, 2004.
3. Milagre, H. M. S., Milagre, C. D. F., Rodrigues, J. Augusto R., Santana, M. H. A., Moran, P. J. S. Redução de Benzoilformiato de etila em reator de fluxo contínuo utilizando *Saccharomyces cerevisiae* imobilizado em fibras de alginato de duas camadas In: XXVI Congresso LatinoAmericano de Química e Sociedade Brasileira de Química, 2004, Salvador.
XXVI Congresso LatinoAmericano de Química e Sociedade Brasileira de Química, 2004.

4. Milagre, H. M. S., Rodrigues, J. Augusto R., Moran, P. J. S.
Chemoenzymatic Synthesis of Phenylnorstatine In: 10th Brazilian Meeting on Organic Synthesis, 2003, São Pedro.
10th Brazilian Meeting on Organic Synthesis, 2003.

Trabalhos publicados em anais congressos nacionais

1. Milagre, H. M. S., Milagre, C. D. F., Rodrigues, J. Augusto R., Eberlin, M. N.
Monitoramento de Reações de Biocatálise Promovidas por *Saccharomyces cerevisiae* utilizando a Técnica MIMS In: II Workshop de Biocatálise, 2004, Campinas.
II Workshop de Biocatálise, 2004.
2. Milagre, H. M. S., Rodrigues, J. Augusto R., Moran, P. J. S.
Efeitos do pH e da imobilização na diastereosseletividade da redução de beta-bromo-alfa-ceto éster mediada por *Saccharomyces cerevisiae*. In: 25 Reunial Anual da Sociedade Brasileira de Química-2002, 2002, Poços de Caldas.
25 Reunial Anual da Sociedade Brasileira de Química-2002. , 2002.
3. Milagre, H. M. S., Takahashi, J. A.
Estudo da hidrólise enzimática do esteviosídeo In: 2 Semana da Pós-graduação-UFMG-2000, 2000, Belo Horizonte.
2 Semana da Pós-graduação-UFMG, 2000.
4. Milagre, H. M. S., Takahashi, J. A.
Uso de reagentes biológicos na hidrólise de glicosídeos. In: 14 Reunião Regional da Sociedade Brasileira de Química, 2000, Uberlândia.
14 Reunião Regional da Sociedade Brasileira de Química, 2000.
5. Milagre, H. M. S., Almeida, W. B., Rocha, W. R.
Estudo teórico da reação de isomerização do beta-pineno In: Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 1999, Poços de Caldas.
22 Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 1999.
6. Milagre, H. M. S., Almeida, W. B., Rocha, W. R.
Efeito do solvente sobre a estabilidade e mecanismo da reação de isomerização $\text{cis-Pt(PH}_3)_2\text{(Cl)(SnCl}_3\text{)} \rightarrow \text{trans-Pt(PH}_3)_2\text{(Cl)(SnCl}_3\text{)}$ In: Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 1998, Poços de Caldas.
21 Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 1998.

Resumo

Síntese Biocatalítica de β -Amino- α -Hidroxiácidos. Aplicações na Síntese de Heterociclos Quirais

β -amino- α -hidróxi-ácidos homoquirais são componentes cruciais em uma variedade de compostos com importantes atividades farmacológicas. Neste trabalho desenvolvemos um estudo sintético visando o desenvolvimento de uma metodologia de aplicação geral para a sua síntese. Estudamos principalmente a bio redução de α -ceto-ésteres utilizando diferentes microrganismos tendo como substituinte no carbono vizinho à cetona grupos que poderiam levar a substituintes nitrogenados. Os microrganismos foram utilizados, tanto na forma livre quanto imobilizada. Foi sintetizado um derivado da fenilnorstatina obtendo-se um bom rendimento global (54%) e excelente ee (96%). Criamos para isto, uma nova metodologia para a redução de β -halo- α -ceto-ésteres.

O protocolo proposto para a síntese de β -amino- α -hidróxi-ésteres a partir de α -ceto-ésteres é eficiente, além de gerar como intermediários sintéticos 2,3-epóxi-ésteres e 2-oxazolininas que são heterociclos de grande interesse sintético.

Paralelamente, desenvolvemos uma metodologia de bio redução em reator de fluxo contínuo mediada por *Saccharomyces cerevisiae* que apresentou excelente estabilidade, alto rendimento químico e ee.

Utilizamos também a técnica MIMS (Membrane Introduction Mass Spectrometry) para o monitoramento de reações de bio redução. As análises foram realizadas em tempo real para os diferentes processos de bio redução em fluxo contínuo. Esta técnica mostrou-se adequada e eficiente para o monitoramento destas reações.

Abstract

Biocatalytic Synthesis of β -amino- α -hydroxy acids.

Application in the Synthesis of Chiral Heterocycles

Homochiral β -amino- α -hydroxy acids are key components of many compounds with important pharmacological activities.

In this work, we have performed a synthetic study in order to develop a general methodology to synthesize these compounds. We have specially investigated the bioreductions of α -ketoesters (with an α -carbonyl R group that could lead to nitrogenated substituents) using different microorganisms in both a free and immobilized forms. We developed a new methodology for β -halo- α -ketoesters reduction so that a phenylnorstatine derivative could be obtained with good global yield (54%) and excellent *ee* (96%). The proposed protocol was efficiently used in the synthesis of other β -amino- α -hydroxyesters. We have synthesized different chiral heterocycles, such as oxazoline and epoxide, which were obtained as intermediates in β -amino- α -hydroxy acids synthesis.

In parallel, we developed a bioreduction process protocol mediated by *Saccharomyces cerevisiae* in a continuously operated bioreactor. Good stability, high yield and high *ee* were obtained.

We also used MIMS (Membrane Introduction Mass Spectrometry) technique to monitor bioreduction reactions. MIMS is a technique suitable for rapid *on line* and real time monitoring of bioreduction reactions.

Lista de espectros	xv
Capítulo 1 Redução do benzoilformiato de etila mediada por <i>Saccharomyces cerevisiae</i> imobilizado em fibras de duas camadas de alginato de cálcio em um reator de fluxo contínuo	1
1.1 Introdução	1
1.1.1 Desenvolvimento da biocatálise	1
1.1.2 Imobilização de biocatalisadores	4
1.1.3 Imobilização de biocatalisadores em alginato de cálcio	5
1.1.4 Reatores para reações de biocatálise	9
1.1.5 Reatores de leito fixo (“ <i>Packed-bed-reactor</i> ”)	11
1.1.6 Reatores de leito fluidizado	12
1.1.7 Outras configurações de reator	12
1.1.8 Variáveis relevantes em processos contínuos	12
1.2 Objetivos	14
1.3. Resultados e Discussão	15
1.3.1 Configuração do reator	15
1.3.2 Imobilização da levedura <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	16
1.3.3 Influência da concentração do benzoilformiato de etila 1	17
1.3.4 Influência da taxa de diluição	18
1.3.5 Biorredução de 1 em fluxo contínuo	23
1.4 Conclusão	23
Capítulo 2 Monitoramento “ <i>on-line</i> ” de biorreduções utilizando Espectrometria de Massas por Introdução <i>via</i> Membrana.	24
2.1. Introdução	24
2.2 Objetivos	29
2.3 Resultados e Discussões	30
2.3.1 Sistema reacional	30
2.3.2 Monitoramento das reações de biorredução.	31
2.3.2.1 Monitoramento da biorredução do 2-oxo-4-fenilbutanoato de etila 3.	31
2.3.2.2 Monitoramento da biorredução da 1-benzoilacetona 5.	33
2.3.2.4 Monitoramento da biorredução do acetoacetato de etila 11.	38
2.4 Conclusões	41
Capítulo 3 Síntese Biocatalítica de β -Amino- α -Hidroxiácidos. Aplicações na Síntese de Heterociclos Quirais	42
3.1. Introdução	42
3.2 Objetivos	47
3.3. Resultados e Discussões	48
3.3.1 Biorredução de 3-bromo-2-oxo-4-fenilbutirato de etila 23	48
3.3.1.1 Determinação da configuração absoluta e relativa de 3-bromo-2-hidróxi-4-fenilbutirato de etila 24a e 24b.	52
3.3.1.2 Estudo cinético da biorredução de 3-bromo-2-oxo-4-fenilbutirato de etila 23.	54

3.3.2 Síntese da Fenilnorstatina 13	70
3.3.3 Síntese de β -amino- α -hidroxi-ésteres	79
3. 4 Conclusões	86
4 Considerações finais	87
5 Parte experimental	89
5.1 Considerações gerais	89
5.2 Bioedução em reator de fluxo contínuo	94
5.2.1 Imobilização da levedura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> em fios de duas camadas	94
5.2.2 Redução do benzoilformiato de etila 1 em reator de fluxo contínuo.	94
5.3 Monitoramento “on-line” de bioeduções utilizando Espectrometria de Massas por Introdução <i>via</i> Membrana.	95
5.4 Síntese do 3-bromo-2-oxo-fenilbutanoato de etila 23	96
5.5 Redução Biocatalítica de 3-bromo-2-oxo-fenilbutanoato de etila 23	97
5.5.1 Procedimento geral para as bioeduções de 23 por diferentes microorganismos.	97
5.5.2 Redução biocatalítica de 25 com <i>Saccharomyces cerevisiae</i> imobilizado em alginato de cálcio	99
5.5.2.1 Imobilização de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> em alginato de cálcio	99
5.5.2.2 Redução de 23 com <i>Saccharomyces cerevisiae</i> imobilizado em alginato de cálcio com adição de glicose em pH 4,0	100
5.5.3 Redução biocatalítica de 23 com <i>Saccharomyces cerevisiae</i> imobilizado em κ -Carragena	100
5.5.3.1 Imobilização de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> em κ -Carragena	100
5.5.3.2 Redução de 23 com <i>Saccharomyces cerevisiae</i> imobilizado em κ -Carragena com adição de glicose em pH 4,0	101
5.5.4 Redução biocatalítica de 23 com <i>Saccharomyces cerevisiae</i> imobilizado em Lenticats®	102
5.5.4.1 Imobilização de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> em Lenticats®	102
5.5.4.2 Redução de 23 com <i>Saccharomyces cerevisiae</i> imobilizado em Lenticats®	102
5.5.5 Redução de 23 com <i>Saccharomyces cerevisiae</i> imobilizado esferas de 2 camadas de alginato de cálcio	103
5.5.5.1 Imobilização de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> imobilizado esferas de 2 camadas de alginato de cálcio	103
5.5.5.2 Redução de 23 com <i>Saccharomyces cerevisiae</i> imobilizado em esferas de duas camadas de alginato de cálcio com adição de glicose em pH 4,0	103
5.6 Determinação da configuração absoluta de 3-bromo-2-hidróxi-fenilbutanoato de etila 24a	104
5.7 Determinação da configuração absoluta de 3-bromo-2-hidróxi-fenilbutanoato de etila 24b	105
5.8 Síntese de 3-cloro-2-oxo-fenilbutanoato de etila 27	106
5.9 Bioedução de 3-cloro-2-oxo-fenilbutanoatoto de etila 27	107
5.10 Azidação de 3-bromo-2-hidróxi-fenilbutirato de etila 24a	109

5.10.1 Método 1	109
5.10.2 Método 2	110
5.10.3 Método 3	110
5.10.4 Método 4	111
5.10.5 Método 5	111
5.10.5.1 Preparo de LiN_3	112
5.10.6 Método 6	112
5.10.6.1 Preparo de TBAN_3	113
5.10.7 Método 7	113
5.11 Proteção de de 3-bromo-2-hidróxi-fenilbutanoato de etila 24a	114
5.12 Azidação de 3-bromo-2-carbetoxi-fenilbutanoato de etila 30	115
5.12.1 Método 1	115
5.12.2 Método 2	115
5.13 Síntese de (2 <i>R</i> , 3 <i>R</i>)-4-fenil-2,3-oxiranobutanoato de etila 29	116
5.13.1 Método 1	116
5.13.2 Método 2	117
5.13.3 Método 3	117
5.13.4 Método 4	118
5.13.5 Método 5	118
5.14 Síntese de (2 <i>R</i> , 3 <i>S</i>) 3-azido-2-hidróxi-fenilbutanoato de etila 28	119
5.14.1 Método 1	119
5.14.2 Método 2	120
5.15 Síntese de (4 <i>S</i> , 5 <i>R</i>)-4-benzil-2-metil-2-oxazolina-5-carboxilato de etila 32	120
5.16 Síntese de (2 <i>R</i> , 3 <i>S</i>)-4-fenil-2-hidroxi-3-acetilamino-butanoato de etila 33	121
5.17 Síntese de 3-bromo-2-oxo-fenilpropionato de etila 37	123
5.18 Síntese de 2-oxo-6-metil-hexanoato de etila 35	124
5.19 Síntese de 3-bromo-2-oxo-5-metil-hexanoato de etila 38	125
5.20 Síntese de 2-oxo-heptanoato de etila 36	126
5.21 Síntese de 3-bromo-2-oxo-heptanoato de etila 39	127
5.22 Síntese de (2 <i>S</i> , 3 <i>S</i>)-3-bromo-2-hidroxi-fenilpropanoato de etila 40	128
5.23 Síntese de (4 <i>R</i> , 3 <i>R</i>)-fenil-2,3-oxiranofenilpropanoato de etila 43	129
5.24 Síntese de 3-fenil-2-metil-2-oxazolina-5-carboxilato de etila 44	130
5.25 Síntese de 4-fenil-2-hidroxi-3-acetilamino-propionato de etila 45	131
5.26 Bioedução de 3-bromo-2-oxo-5-metil-hexanoato de etila 38	132
5.27 Determinação da configuração absoluta de 3-bromo-2-hidroxi-5-metil-hexanoato de etila 41a	134
5.28 Determinação da configuração absoluta de 3-bromo-2-hidroxi-5-metil-hexanoato de etila 41b	135
5.29 Síntese de (2 <i>R</i> , 3 <i>R</i>)-5-metil-2,3-oxirano-hexanoato de etila 48	136
5.30 Síntese de (4 <i>S</i> , 5 <i>R</i>)-4-isopropil-2-metil-2-oxazolina-5-carboxilato de etila 49	138
5.30 Síntese de (2 <i>S</i> , 3 <i>S</i>)-3-acetilamino-2-hidroxi-5-metilpentanoato de etila 50	139
5.32 Bioedução de 3-bromo-2-oxo-heptanoato de etila 39	140
5.33 Determinação da configuração absoluta de 3-bromo-2-hidroxi-heptanoato de etila 42a	142
5.34 Determinação da configuração absoluta de 3-bromo-2-hidroxi-heptanoato de etila 42b	143

Lista de Espectros

E01. Espectro de RMN de de ^1H de madelato de etila 2	146
E02. Espectro no IV de madelato de etila 2	147
E03. Espectro de massas de madelato de etila 2	148
E04. Espectro de RMN de ^1H de 3-bromo-2-oxo-fenilbutanoato de etila 23	149
E05. Espectro de RMN de ^{13}C de 3-bromo-2-oxo-fenilbutanoato de etila 23	150
E06. Espectro no IV (filme) de 3-bromo-2-oxo-fenilbutanoato de etila 23	151
E07. Espectro de massas de 3-bromo-2-oxo-fenilbutanoato de etila 23	152
E08. Espectro de RMN de ^1H de (2 <i>S</i> ,3 <i>S</i>)-3-bromo-2-hidróxi-fenilbutirato de etila 24a	153
E09. Espectro de RMN de ^{13}C de (2 <i>S</i> ,3 <i>S</i>)-3-bromo-2-hidróxi-fenilbutirato de etila 24a	154
E10. Espectro no IV de (2 <i>S</i> ,3 <i>S</i>)-3-bromo-2-hidróxi-fenilbutirato de etila 24a	155
E11. Espectro Massas de (2 <i>S</i> ,3 <i>S</i>)-3-bromo-2-hidróxi-fenilbutirato de etila 24a	156
E12. Espectro de RMN de ^1H de (2 <i>S</i> , 3 <i>R</i>)-3-bromo-2-hidróxi-fenilbutanoato de etila 24b	157
E13. Espectro de RMN de ^1H de (2 <i>S</i> , 3 <i>R</i>)-3-bromo-2-hidróxi-fenilbutanoato de etila 24b	158
E14. Espectro no IV de (2 <i>S</i> , 3 <i>R</i>)-3-bromo-2-hidróxi-fenilbutanoato de etila 24b	159
E15. Espectro massas de (2 <i>S</i> , 3 <i>R</i>)-3-bromo-2-hidróxi-fenilbutanoato de etila 24b	160
E16. Espectro de RMN de ^1H de (<i>R</i>)-2-hidroxi-4-fenilbutanoato de etila 26	161
E17. Espectro de RMN de ^{13}C de (<i>R</i>)-2-hidroxi-4-fenilbutanoato de etila 26	162
E18. Espectro no IV de (<i>R</i>)-2-hidroxi-4-fenilbutanoato de etila 26	163
E19. Espectro de RMN de ^1H de 3-cloro-2-oxo-fenilbutanoato de etila 27	164
E20. Espectro de RMN de ^{13}C de 3-cloro-2-oxo-fenilbutanoato de etila 27	165
E21. Espectro no IV de 3-cloro-2-oxo-fenilbutanoato de etila 27	166
E22. Espectro de massas de 3-cloro-2-oxo-fenilbutanoato de etila 27	167
E23. Espectro de RMN de ^1H de (2 <i>S</i> ,3 <i>S</i>) 3-cloro-2-hidróxi-fenilbutirato de etila 25a	168
E24. Espectro de RMN de ^{13}C de (2 <i>S</i> ,3 <i>S</i>) 3-cloro-2-hidróxi-fenilbutirato de etila 25a	169
E25. Espectro no IV de (2 <i>S</i> ,3 <i>S</i>) 3-cloro-2-hidróxi-fenilbutirato de etila 25a	170
E26. Espectro de massas de (2 <i>S</i> ,3 <i>S</i>) 3-cloro-2-hidróxi-fenilbutirato de etila 25a	171
E27. Espectro de RMN de ^1H de (2 <i>S</i> ,3 <i>R</i>) 3-cloro-2-hidróxi-fenilbutanoato de etila 25b	172
E28. Espectro de RMN de ^{13}C de (2 <i>S</i> ,3 <i>R</i>) 3-cloro-2-hidróxi-fenilbutanoato de etila 25b	173
E29. Espectro no IV de (2 <i>S</i> ,3 <i>R</i>) 3-cloro-2-hidróxi-fenilbutanoato de etila 25b	174

E30. Espectro de massas de (2 <i>S</i> ,3 <i>R</i>) 3-cloro-2-hidróxi-fenilbutanoato de etila 25b	175
E31. Espectro de RMN de ¹ H de (2 <i>S</i> ,3 <i>s</i>) 3-bromo-2-carbetoxi-fenilbutanoato de etila 30	176
E32. Espectro de RMN de ¹³ C de (2 <i>S</i> ,3 <i>s</i>) 3-bromo-2-carbetoxi-fenilbutanoato de etila 30	177
E33. Espectro no IV de (2 <i>S</i> ,3 <i>s</i>) 3-bromo-2-carbetoxi-fenilbutanoato de etila 30	178
E34. Espectro de massas de (2 <i>S</i> ,3 <i>s</i>) 3-bromo-2-carbetoxi-fenilbutanoato de etila 30	179
E35. Espectro de RMN de ¹ H de (2 <i>R</i> , 3 <i>R</i>)-4-fenil-2,3-oxiranobutanoato de etila 29	180
E36. Espectro de RMN de ¹³ C de (2 <i>R</i> , 3 <i>R</i>)-4-fenil-2,3-oxiranobutanoato de etila 29	181
E37. Espectro no IV de (2 <i>R</i> , 3 <i>R</i>)-4-fenil-2,3-oxiranobutanoato de etila 29	182
E38. Espectro de massas de (2 <i>R</i> , 3 <i>R</i>)-4-fenil-2,3-oxiranobutanoato de etila 29	183
E39. Espectro de RMN de ¹ H de (2 <i>R</i> , 3 <i>S</i>) 3-azido-2-hidróxi-fenilbutanoato de etila 28	184
E40. Espectro de RMN de ¹³ C de (2 <i>R</i> , 3 <i>S</i>) 3-azido-2-hidróxi-fenilbutanoato de etila 28	185
E41. Espectro no IV de (2 <i>R</i> , 3 <i>S</i>) 3-azido-2-hidróxi-fenilbutanoato de etila 28	186
E42. Espectro de massas de (2 <i>R</i> , 3 <i>S</i>) 3-azido-2-hidróxi-fenilbutanoato de etila 28	187
E43. Espectro de RMN de ¹ H de (4 <i>S</i> ,5 <i>R</i>)-4-benzil-2-metil-2-oxazolina-5-carboxilato de etila 32	188
E44. Espectro de RMN de ¹³ C de (4 <i>S</i> ,5 <i>R</i>)-4-benzil-2-metil-2-oxazolina-5-carboxilato de etila 32	189
E45. Espectro no IV de (4 <i>S</i> ,5 <i>R</i>)-4-benzil-2-metil-2-oxazolina-5-carboxilato de etila 32	190
E46. Espectro de massas de (4 <i>S</i> ,5 <i>R</i>)-4-benzil-2-metil-2-oxazolina-5-carboxilato de etila 32	191
E47. Espectro de RMN de ¹ H (2 <i>R</i> , 3 <i>S</i>)4-fenil-2-hidroxi-3-acetilamino-butanoato de etila 33	192
E48. Espectro de RMN de ¹³ C (2 <i>R</i> , 3 <i>S</i>)4-fenil-2-hidroxi-3-acetilamino-butanoato de etila 33	193
E49. Espectro no IV (2 <i>R</i> , 3 <i>S</i>)4-fenil-2-hidroxi-3-acetilamino-butanoato de etila 33	194
E50. Espectro de massas (2 <i>R</i> , 3 <i>S</i>)4-fenil-2-hidroxi-3-acetilamino-butanoato de etila 33	195
E51. Espectro de RMN de ¹ H de 3-bromo-2-oxo-fenilpropionato de etila 37	196
E52. Espectro de RMN de ¹³ C de 3-bromo-2-oxo-fenilpropionato de etila 37	197
E53. Espectro no IV de 3-bromo-2-oxo-fenilpropionato de etila 37	198
E54. Espectro de massas de 3-bromo-2-oxo-fenilpropionato de etila 37	199
E55. Espectro de RMN de ¹ H de 2-oxo-6-metil-hexanoato de etila 35	200

E56. Espectro de RMN de ^{13}C de 2-oxo-6-metil-hexanoato de etila 35	201
E57. Espectro no IV de 2-oxo-6-metil-hexanoato de etila 35	202
E58. Espectro de massas de 2-oxo-6-metil-hexanoato de etila 35	203
E59. Espectro de RMN de ^1H de 3-bromo-2-oxo-5-metil-hexanoato de etila 38	204
E60. Espectro de RMN de ^{13}C de 3-bromo-2-oxo-5-metil-hexanoato de etila 38	205
E61. Espectro no IV de 3-bromo-2-oxo-5-metil-hexanoato de etila 38	206
E62. Espectro de massas de 3-bromo-2-oxo-5-metil-hexanoato de etila 38	207
E63. Espectro de RMN de ^1H de 3-bromo-2-oxo-heptanoato de etila 39	208
E64. Espectro de RMN de ^{13}C de 3-bromo-2-oxo-heptanoato de etila 39	209
E65. Espectro no IV de 3-bromo-2-oxo-heptanoato de etila 39	210
E66. Espectro de massas de 3-bromo-2-oxo-heptanoato de etila 39	211
E67. Espectro de RMN de ^1H de (2 <i>S</i> , 3 <i>S</i>)-3-bromo-2-hidroxi-fenilpropanoato de etila 40	212
E68. Espectro de RMN de ^{13}C de (2 <i>S</i> , 3 <i>S</i>)-3-bromo-2-hidroxi-fenilpropanoato de etila 40	213
E69. Espectro no IV de (2 <i>S</i> , 3 <i>S</i>)-3-bromo-2-hidroxi-fenilpropanoato de etila 40	214
E70. Espectro de massas de (2 <i>S</i> , 3 <i>S</i>)-3-bromo-2-hidroxi-fenilpropanoato de etila 40	215
E71. Espectro de RMN de ^1H de (4 <i>R</i> , 3 <i>R</i>)-fenil-2,3-oxiranofenilpropanoato de etila 43	216
E72. Espectro de RMN de ^{13}C de (4 <i>R</i> , 3 <i>R</i>)-fenil-2,3-oxiranofenilpropanoato de etila 43	217
E73. Espectro no IV de (4 <i>R</i> , 3 <i>R</i>)-fenil-2,3-oxiranofenilpropanoato de etila 43	218
E74. Espectro de massas de (4 <i>R</i> , 3 <i>R</i>)-fenil-2,3-oxiranofenilpropanoato de etila 43	219
E75. Espectro de RMN de ^1H de 3-fenil-2-metil-2-oxazolina-5-carboxilato de etila 44	220
E76. Espectro de RMN de ^{13}C de 3-fenil-2-metil-2-oxazolina-5-carboxilato de etila 44	221
E77. Espectro no IV de 3-fenil-2-metil-2-oxazolina-5-carboxilato de etila 44	222
E78. Espectro de massas de 3-fenil-2-metil-2-oxazolina-5-carboxilato de etila 44	223
E79. Espectro de RMN de ^1H de 4-fenil-2-hidroxi-3-acetilamino-butirato de etila 45	224
E80. Espectro de RMN de ^{13}C de 4-fenil-2-hidroxi-3-acetilamino-butirato de etila 45	225
E81. Espectro no IV de 4-fenil-2-hidroxi-3-acetilamino-butirato de etila 45	226
E82. Espectro de RMN de ^1H de (2 <i>S</i> , 3 <i>S</i>)-3-bromo-2-hidroxi-5-metil-hexanoato de etila 41a	227
E83. Espectro de RMN de ^{13}C de (2 <i>S</i> , 3 <i>S</i>)-3-bromo-2-hidroxi-5-metil-hexanoato	228
E84. Espectro no IV de (2 <i>S</i> , 3 <i>S</i>)-3-bromo-2-hidroxi-5-metil-hexanoato de etila 41a	229
E85. Espectro de massas de (2 <i>S</i> , 3 <i>S</i>)-3-bromo-2-hidroxi-5-metil-hexanoato de etila 41a	230

E86. Espectro de RMN de ^1H de (2 <i>S</i> , 3 <i>R</i>)-3-bromo-2-hidroxi-5-metil-hexanoato de etila 41b	231
E87. Espectro de RMN de ^{13}C de (2 <i>S</i> , 3 <i>R</i>)-3-bromo-2-hidroxi-5-metil-hexanoato de etila 41b	232
E88. Espectro no IV de (2 <i>S</i> , 3 <i>R</i>)-3-bromo-2-hidroxi-5-metil-hexanoato de etila 41b	233
E89. Espectro de massas de (2 <i>S</i> , 3 <i>R</i>)-3-bromo-2-hidroxi-5-metil-hexanoato de etila 41b	234
E90. Espectro de RMN de ^1H de (<i>R</i>)-2-hidroxi-5-metil-hexanoato de etila 51	235
E91. Espectro de RMN de ^{13}C de (<i>R</i>)-2-hidroxi-5-metil-hexanoato de etila 51	236
E92. Espectro no IV de (<i>R</i>)-2-hidroxi-5-metil-hexanoato de etila 51	237
E93. Espectro de RMN de ^1H de (2 <i>R</i> , 3 <i>R</i>)-5-metil-2,3-oxirano-hexanoato de etila 48	238
E94. Espectro de RMN de ^{13}C de (2 <i>R</i> , 3 <i>R</i>)-5-metil-2,3-oxirano-hexanoato de etila 48	239
E95. Espectro no IV de (2 <i>R</i> , 3 <i>R</i>)-5-metil-2,3-oxirano-hexanoato de etila 48	240
E96. Espectro de massas de (2 <i>R</i> , 3 <i>R</i>)-5-metil-2,3-oxirano-hexanoato de etila 48	241
E97. Espectro de RMN de ^1H de (4 <i>S</i> , 5 <i>R</i>)-4-isopropil-2-metil-2-oxazolina-5-carboxilato de etila 49	242
E98. Espectro de RMN de ^{13}C de (4 <i>S</i> , 5 <i>R</i>)-4-isopropil-2-metil-2-oxazolina-5-carboxilato de etila 49	243
E99. Espectro no IV de (4 <i>S</i> , 5 <i>R</i>)-4-isopropil-2-metil-2-oxazolina-5-carboxilato de etila 49	244
E100. Espectro de massas de (4 <i>S</i> , 5 <i>R</i>)-4-isopropil-2-metil-2-oxazolina-5-carboxilato de etila 49	245
E101. Espectro de RMN de ^1H de (2 <i>S</i> , 3 <i>S</i>)-3-acetilamino-2-hidroxi-5-metilpentanoato de etila 50	246
E102. Espectro de RMN de ^{13}C de (2 <i>S</i> , 3 <i>S</i>)-3-acetilamino-2-hidroxi-5-metilpentanoato de etila 50	247
E103. Espectro no IV de (2 <i>S</i> , 3 <i>S</i>)-3-acetilamino-2-hidroxi-5-metilpentanoato de etila 50	248
E104. Espectro de massas de (2 <i>S</i> , 3 <i>S</i>)-3-acetilamino-2-hidroxi-5-metilpentanoato de etila 50	249
E105. Espectro de RMN de ^1H de (2 <i>S</i> , 3 <i>S</i>)-3-bromo-2-hidroxi-heptanoato de etila 42a	250
E106. Espectro de RMN de ^{13}C de (2 <i>S</i> , 3 <i>S</i>)-3-bromo-2-hidroxi-heptanoato de etila 42a	251
E107. Espectro no IV de (2 <i>S</i> , 3 <i>S</i>)-3-bromo-2-hidroxi-heptanoato de etila 42a	252
E108. Espectro de massas de (2 <i>S</i> , 3 <i>S</i>)-3-bromo-2-hidroxi-heptanoato de etila	253

E109. Espectro de RMN de ^1H de (2 <i>S</i> , 3 <i>R</i>)-3-bromo-2-hidroxi-heptanoato de etila 42b	254
E110. Espectro de RMN de ^{13}C de (2 <i>S</i> , 3 <i>R</i>)-3-bromo-2-hidroxi-heptanoato de etila 42b	255
E111. Espectro no IV de (2 <i>S</i> , 3 <i>R</i>)-3-bromo-2-hidroxi-heptanoato de etila 42b	256
E112. Espectro de massas de (2 <i>S</i> , 3 <i>R</i>)-3-bromo-2-hidroxi-heptanoato de etila 42b	257
E113. Espectro de RMN de DE ^1H de (<i>R</i>)-2-hidroxi-heptanoato de etila 52	258
E114. Espectro de RMN de ^{13}C de (<i>R</i>)-2-hidroxi-heptanoato de etila 52	259
E115. Espectro no IV de (<i>R</i>)-2-hidroxi-heptanoato de etila 52	560
E116. Espectro de massas de (<i>R</i>)-2-hidroxi-heptanoato de etila 52	261

Capítulo 1

Redução do benzoilformiato de etila mediada por *Saccharomyces cerevisiae* imobilizado em fibras de duas camadas de alginato de cálcio em um reator de fluxo contínuo¹

1.1 Introdução

1.1.1 Desenvolvimento da biocatálise

A biocatálise tem amadurecido como uma tecnologia padrão na indústria de química fina, e isto pode ser comprovado pelo número de processos de biotransformação utilizados em escala comercial. Nos últimos anos, um número crescente de livros e artigos de revisão descreve os processos de biotransformação industrial, discutindo como esta tecnologia pode ser aplicada em escala industrial^{2,3,4,5,6,7}. O número total de processos de biotransformação que é levado para a escala industrial cresce rapidamente com o passar das décadas como é apresentado na **Figura 1.1**⁸.

¹ Milagre, H. M. S.; Milagre C. D. F.; Moran, P. J. S.; Santana, M. H. A.; Rodrigues, J. A. R. *Enzyme and Microb. Technol.* **2005**, *in press*.

² Cheetham, P. S. J.: Case studies in the application of biocatalysts for the production of (bio)chemicals. In *Applied Biocatalysis*, edn 2. Edited por Straathof A. J. J., Adiercreutz P. Amsterdam: Harwood Scientific Publishers; **2000**.

³ Liese, A.; Seelbach, K.; Wandrey C.: *Industrial Biotransformations*. Weinheim, Alemanha: Wiley-VCH: **2000**.

⁴ Faber, K.: *Biotransformations in Organic Chemistry*. Edn 4: Berlin, Alemanha; Springer-Verlag; **2000**.

⁵ Nakamura, K.; Yamanaka, R.; Matsuda, T.; Harada, T. *Tetrahedron: Asym.* **2003**, *14*, 2659-2681.

⁶ Schmid, A.; Dordick, J. S.; Hauer, B.; Kiener, A.; Wubbolts, M.; Witholt, B. *Nature*, **2001**, *409*, 258-268.

⁷ Zaks, A. *Current Opinion Chem.. Biology*. **2001**, *5*, 130-136.

⁸ Straathof, A. J. J.; Panke, S.; Schmid, A. *Current Opinion Biotechnol.* **2002**, *13*, 548-556.

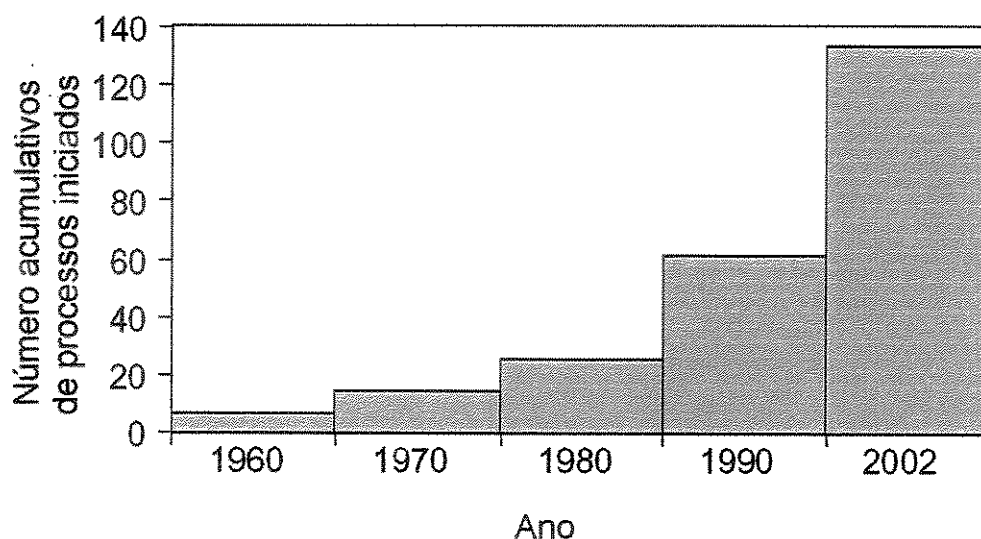


Figura 1.1. Número cumulativo de processos que tem sido iniciados em escala industrial⁸.

Na grande maioria destes processos a quiralidade é proveniente diretamente do precursor enantiomericamente puro (**Figura 1.2**). Quando a pureza enantiomérica ocorre através do processo de biotransformação, tanto a resolução cinética quanto a síntese assimétrica são os caminhos escolhidos.

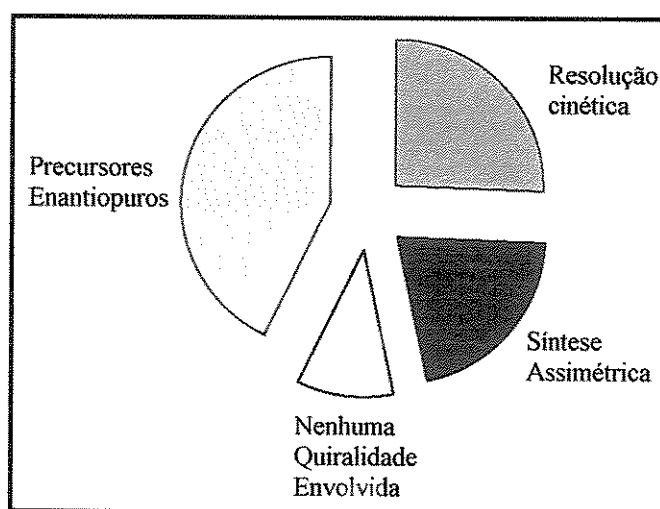


Figura 1.2. Fonte de quiralidade dos produtos de biotransformação industrial⁸.

A maioria das pesquisas realizadas envolve enzimas hidrolíticas; somente um quarto dos estudos envolve oxidoreduções como é apresentado na Figura 1.3.

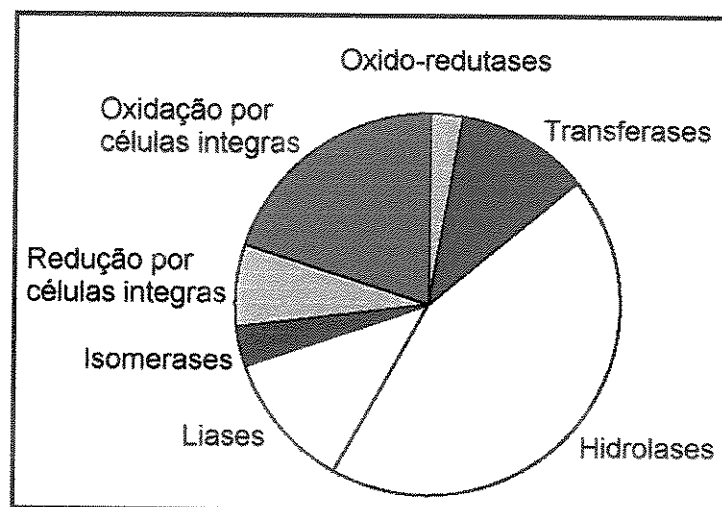


Figura 1.3. Tipos de enzimas usadas em biotransformações industriais⁸.

A produção de compostos enantiomericamente puros é de grande importância para a indústria de química fina e farmacêutica em particular, e muitos destes compostos podem ser obtidos por transformações enzimáticas ou microbianas do substrato. A hidrólise assimétrica de ésteres catalisada por lipases, e a redução assimétrica mediada por *Saccharomyces cerevisiae*, são estudadas extensivamente devido a sua facilidade de produção e condições experimentais brandas.

A levedura *Saccharomyces cerevisiae* é um biocatalisador com uma grande gama de aplicações^{5,9,10}. Este biocatalisador é barato e disponível comercialmente por ser utilizado na indústria panificadora. Esta levedura não é tóxica ou patogênica e de fácil manuseio. O sistema de enzimas do *Saccharomyces cerevisiae* tem sido bastante estudado, especialmente as álcool

⁹ Czuk, R.; Glanzer, B. I. *Chem. Rev.* 1991, 91, 49.

¹⁰ D'Arrigo, P.; Pedrocchi-Fantoni, G.; Servi, S. *Adv. Appl. Microbiol.* 1997, 44, 81.

desidrogenases, que possuem como cofatores NADH e/ou NADPH. As enzimas álcool desidrogenases catalisam reações de oxiredução, muitas vezes gerando produtos com elevados *ee*¹⁰.

O *Saccharomyces cerevisiae* é muito utilizado na redução enantiosseletiva de cetonas¹⁰. Algumas aplicações industriais desta reação tem sido citadas na literatura^{11,12}.

Entretanto, este método não tem sido utilizado para produção de álcoois em escala industrial devido às baixas concentrações de reagentes requeridos e o tedioso processo de isolamento de produtos. Alguns trabalhos recentes, utilizando processos biocatalíticos, tem tentado “driblar” estas desvantagens^{13,14,15,16,17}. Um dos caminhos é o uso de células imobilizadas para a redução enantiosseletiva de cetonas¹⁸.

1.1.2 Imobilização de biocatalisadores

Diversos métodos para a imobilização de microrganismos foram desenvolvidos¹⁹, atendendo aos mais diversos tipos de processos biocatalíticos. Os principais métodos de imobilização para células/enzimas, estão ilustrados na **Figura 1.4**.

¹¹ Keppler, J. G. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **1977**, *54*, 474.

¹² Crocq, V.; Masson, C.; Richard, C.; Lemaitre G.; Lenay, J.; Vivat, M.; Buendia, J.; Prat, D. *Organic Process Research and Development* **1997**, *1*, 2.

¹³ Chin-Joe, I.; Haberland, J.; Straathof, A. J. J.; Jongejan, J. A.; Liese, A.; Heijnen, J. J. *Enzyme and Microb. Technol.*, **2002**, *31*, 665-672.

¹⁴ Liese, A.; Kragl, U.; Kierkels, H.; Schulze, B. *Enzyme Microb. Technol.*, **2002**, *30*, 673-681.

¹⁵ Goubet, I.; Maugard, T.; Lamare, S.; Legoy, M. D. *Enzyme Microb. Technol.* **2002**, *31*, 425-430.

¹⁶ Wendhausen Jr, R.; Moran, P. J. S.; Joekes, I.; Rodrigues, J. A. R. *J. Mol. Cat. B: Enz.* **1998**, *5*, 69-73.

¹⁷ Kometani, T.; Yoshii, H.; Matsuno, R. *J. Mol. Cat. B: Enz.* **1996**, *1*, 45-52.

¹⁸ Buque, E. M.; Chin-Joe, I.; Straathof, A. J. J.; Jongejan, J. A.; Heijnen, J. J. *Enzyme Microb. Technol.* **2002**, *31*, 656-664.

¹⁹ Park, J. K.; Chang, H. N. *Biotechnol. Adv.* **2000**, *18*, 303-319.

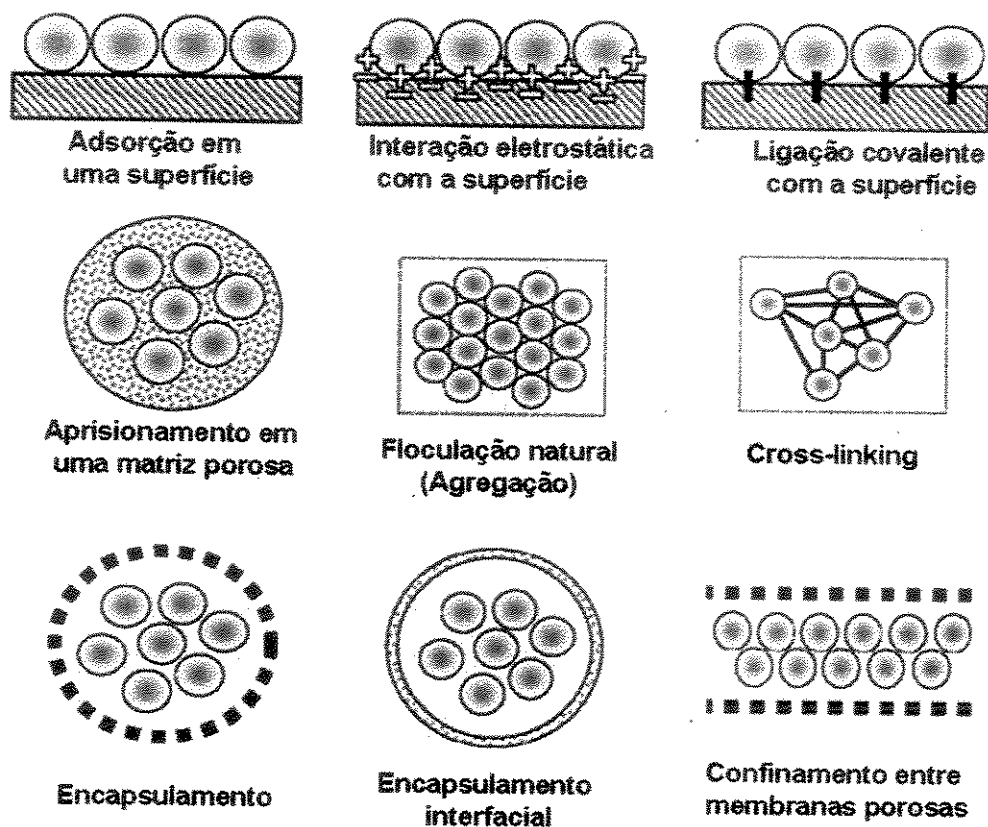


Figura 1.4. Principais métodos de imobilização.

Um dos métodos em que a imobilização do biocatalisador ocorre em condições extremamente brandas, é o encapsulamento em géis ionotrópicos como o alginato de cálcio²⁰.

1.1.3 Imobilização de biocatalisadores em alginato de cálcio

A imobilização de células e/ou enzimas em alginato é um dos métodos mais simples de imobilização. Os alginatos são disponíveis comercialmente como alginato de sódio, e tem sido utilizado por mais de 70 anos nas indústrias farmacêuticas e alimentícia como filmes, géis e agentes

²⁰ Kierstan, M.; Bucke, C. *Biotechnol. and Bioeng.* 1977, 19, 387-397.

emulsificantes. A imobilização em alginato de cálcio é conhecida por ser um método rápido, não tóxico, barato e versátil^{21,22,23}.

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 1.5**.

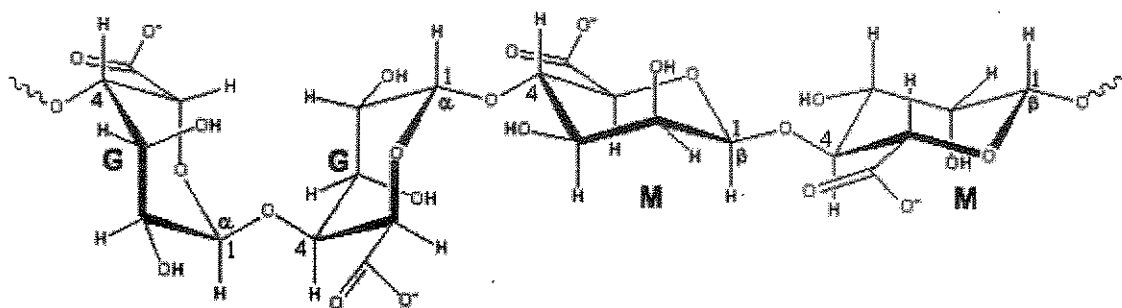


Figura 1.5. Representação das unidades das cadeias poliméricas de alginato.

A composição destes dois ácidos pode variar de acordo com a fonte. Os monômeros são arranjados ao longo da cadeia polimérica como segmentos alternados de M, G e copolímeros de M e G²⁴ (**Figura 1.6**).

²¹ Nilsson, K. *Trends Biotechnol.* **1987**, 5, 73-78.

²² Palmieri, G.; Giardina, P.; Desderio, B.; Marzullo, L.; Giamberini, M.; Sannia, G. *Enzyme Microb. Technol.* **1994**, 16, 151-158.

²³ Park, H. J.; Khang, Y. H. *Enzyme Microb. Technol.* **1995**, 17, 408-412.

²⁴ Moraes, A. M. Dissertação de Mestrado do Programa de Pós Graduação em Engenharia Química da Faculdade de Engenharia Química da UNICAMP, Campinas, 1991.

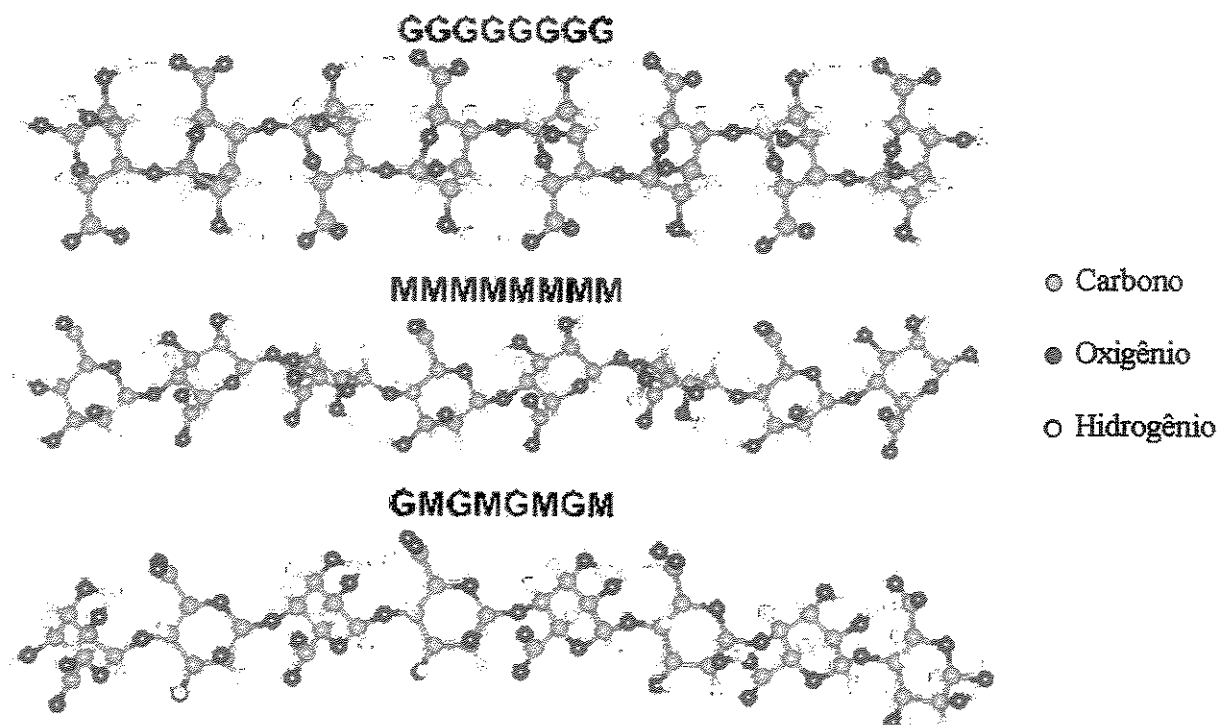


Figura 1.6. Representação das cadeias poliméricas de alginato²⁵.

Este polissacarídeo forma sais hidrossolúveis com cátions monovalentes e aminas de baixo peso molecular. A gelificação deste polímero, cujo princípio pode ser observado na **Figura 1.7**, 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.

²⁵ <http://www.martin.chaplin.btinternet.co.uk/hyalg.html>

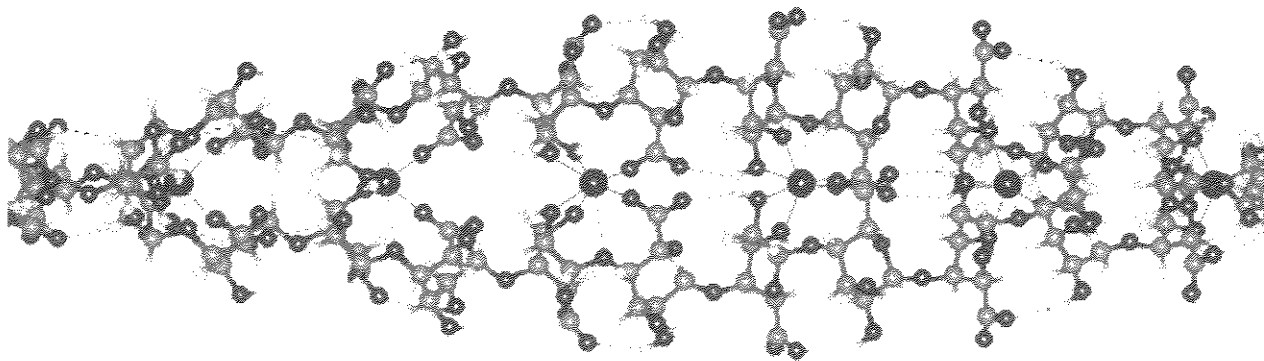


Figura 1.7. Representação do gel hidrofílico alginato de cálcio²⁵.

As moléculas do polissacarídeo formam uma rede polimérica que precipita como uma matriz gelatinosa rígida e termooestável, contendo cerca de 60% de água em seu interior, a qual pode ser observada na **Figura 1.8**.

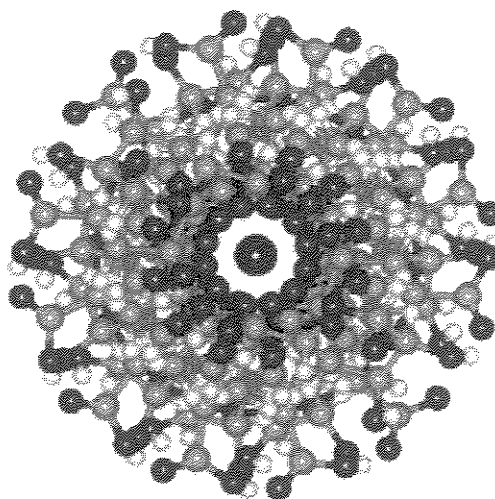


Figura 1.8. Representação da rede polimérica de alginato de cálcio²⁵

A imobilização de microrganismos apresenta algumas desvantagens e uma das principais é o lixiviamento de células para o meio de reação. No caso do alginato, nas esferas (**Figura 1.9**) formados pelo método de imobilização convencional, as células estão homogeneamente distribuídas tanto na superfície quanto no interior das mesmas no estágio inicial, porém as células

da superfície e as próximas da superfície podem sair do suporte após o uso prolongado do mesmo, devido ao crescimento celular.

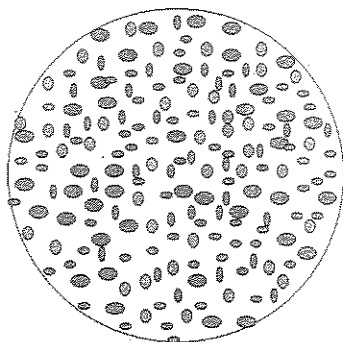


Figura 1.9. Representação de um corte transversal nas esferas de alginato.

Tanaka e colaboradores²⁶ desenvolveram um método de imobilização que previne a liberação de células de *Saccharomyces sp* para o meio de reação durante um processo de fermentação. Neste método, utilizaram-se fios de duas camadas superpostas de alginato, onde as células ficam restritas apenas na camada interna destes fios, evitando assim a perda celular e contato com inibidores.

1.1.4 Reatores para reações de biocatálise

Nos últimos anos, boa parte das pesquisas sobre células imobilizadas têm se centrado sobre técnicas de imobilização e caracterização do sistema imobilizado. Mais recentemente, com a possibilidade de aplicação destas técnicas em processos industriais, o “design” de reatores capazes de efetuar o processo tem se tornado fundamental.

²⁶ Tanaka, H.; Irie, S.; Ochi, H. *J. Ferm. Bioeng.* **1989**, 68, 216-219.

A escolha do tipo de reator bem como do suporte a ser utilizado depende de muitos fatores como é apresentado na **Figura 1.10**.

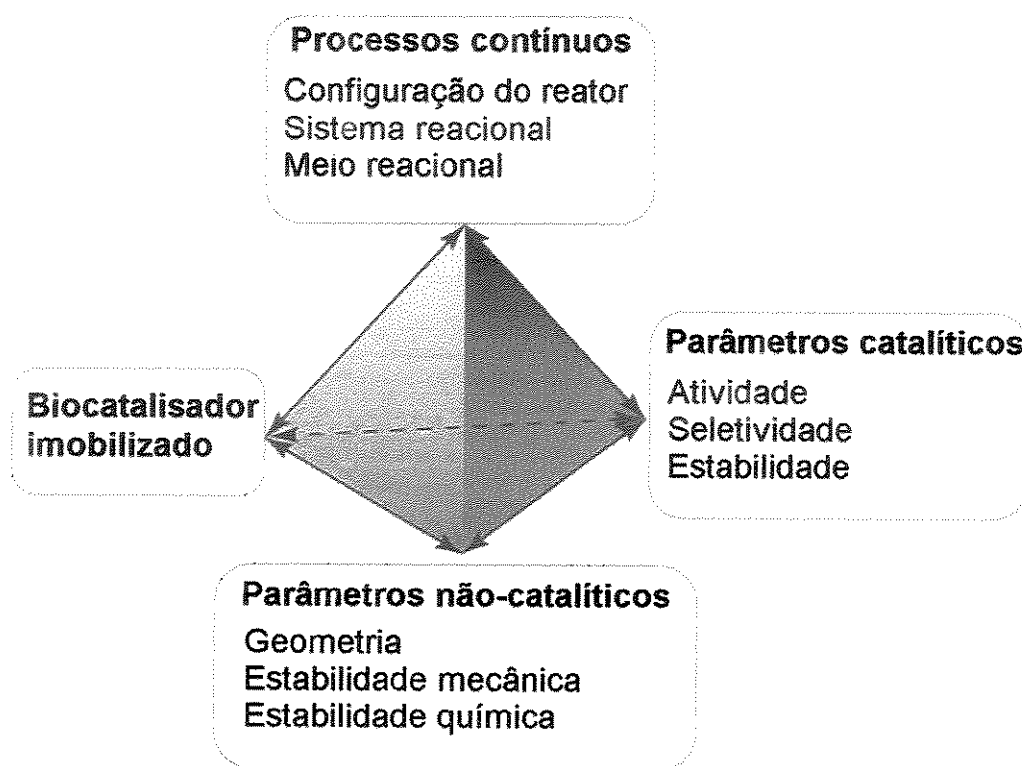


Figura 1.10. Fatores que influenciam o desenvolvimento de processos catalíticos com o uso de biocatalisadores imobilizados.

A maioria dos reatores atualmente em estudo para células imobilizadas são sistemas contínuos em coluna tais como os de leito fixo e fluidizado. Na realidade tais sistemas impõem que o microrganismo esteja imobilizado, para prevenir o lixiviamento de células sob altas taxas de diluição impostas a estes processos. Em menor grau outros reatores como os de tanque agitado e membrana tem sido estudados.

1.1.5 Reatores de leito fixo (“*Packed-bed-reactor*”)

A configuração deste tipo de reator é muito estudada para o uso de células imobilizadas (**Figura 1.11a**)²⁷. O reator consiste em um tubo, usualmente vertical recheado com as partículas do biocatalisador. O meio pode ser alimentado tanto pela parte de cima como a de baixo da coluna e forma-se então, uma fase líquida entre as partículas. Neste tipo de reator as partículas do biocatalisador imobilizado sofrem menos danos quando comparados aos reatores de tanque agitado. Um dos problemas normalmente encontrados neste tipo de reator é a dificuldade de difusão do substrato, podendo levar a formação de caminhos preferenciais através do recheio (o que é indesejável).

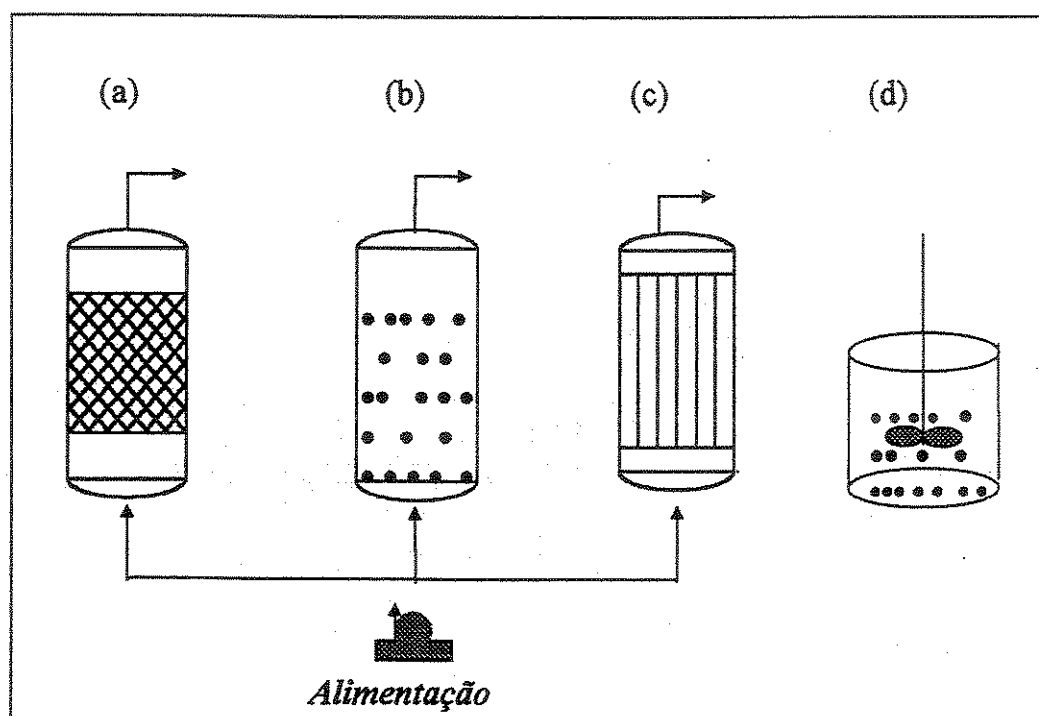


Figura 1.11. Diferentes configurações de reatores: a) leito fixo, b) leito fluidizado, c) membrana, d) tanque agitado.

²⁷ Lothar, A. M. *Rev. Microbiol.* 1995, 26, 151-159.

1.1.6 Reatores de leito fluidizado

Nestes reatores, partículas do suporte contendo as células imobilizadas são mantidas em suspensão pela própria vazão de alimentação ou por gases borbulhados em seu interior (**Figura 1.11b**). A vantagem deste sistema sobre o sistema de leito fixo é a facilidade de retirada dos gases e menores problemas com a difusão do substrato. Entretanto, possui uma menor capacidade de manter uma alta densidade celular.

1.1.7 Outras configurações de reator

Outros reatores são os reatores de membrana que mantêm as células separadas por membranas de porosidade controlada, ou por sistemas de ultrafiltração (**Figura 1.11c**) e o tanque agitado que pode operar em sistema de batelada ou contínuo (**Figura 1.11d**).

1.1.8 Variáveis relevantes em processos contínuos

Vazão (E) – é o volume de efluente medido na saída do reator por unidade de tempo.

$$E = \frac{\text{Volume}}{\text{Tempo}}$$

Volume útil (V_u) – é o volume efetivamente aproveitável de um reator para que ocorra a reação.

Tempo de residência (T_r) – é o tempo gasto pelo substrato para atravessar o reator desde o momento que entra até o momento em que sai. É dado pela razão entre o volume útil e a vazão.

$$T_r = \frac{V_u}{E}$$

Taxa de diluição (T_d) – é o inverso do tempo de residência no reator. É normalmente expressa em unidades como h^{-1} , min^{-1} , dia^{-1} .

$$T_d = \frac{E}{V_u}$$

Produtividade (P) – é a velocidade de formação do produto por unidade de tempo.

$$P = \frac{\text{Concentração do produto (mmol/L)}}{\text{Tempo de residência (h)}}$$

Velocidade específica (μ) – é definida como a formação do produto por unidade de tempo e massa de células adicionadas.

$$\mu = \frac{\text{Concentração do produto (mmol)}}{\text{Massa celular (g)} \times \text{Tempo de residência (h)}}$$

Extensão da reação – A extensão da reação representa a porcentagem de substrato que foi transformado em produto e não apenas a quantidade de substrato consumido.

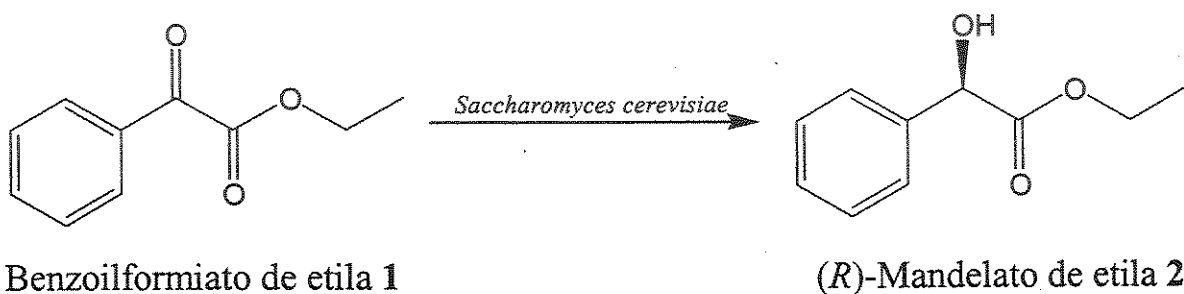
$$\text{Extensão da reação}_{t=t} (\%) = \frac{\text{produto}_{t=t}}{\text{Substrato}_{t=0} - \text{produto}_{t=t}} \times 100$$

Grau de conversão (ξ) – O grau de conversão representa a porcentagem de substrato que foi convertido em produto.

$$\xi_{t=t} (\%) = \frac{\text{Substrato}_{t=0} - \text{produto}_{t=t}}{\text{Substrato}_{t=0}} \times 100$$

1.2 Objetivos

Estudo da bioredução do benzoilformiato de etila **1** mediada pela levedura *Saccharomyces cerevisiae* imobilizada em fios de duas camadas superpostas de alginato em reator de fluxo contínuo no estado estacionário, de modo a determinar a sua performance (excesso enantiomérico e produtividade) e estabilidade operacional (atividade redutora) para a possibilidade de produção industrial de um processo de bioredução contínuo.



1.3. Resultados e Discussão

Para o estudo de bioredução de 1 mediada pela levedura *Saccharomyces cerevisiae* em fluxo contínuo, optamos por utilizar o método de imobilização desenvolvido por Tanaka e colaboradores²⁶ em um reator em coluna. Os fios de alginato de cálcio foram empacotados dentro do reator, e se mostraram bem estáveis durante todo o processo. A levedura *Saccharomyces cerevisiae* foi obtida comercialmente na forma liofilizada, marca EMULZINT®.

O substrato escolhido para a bioredução foi o benzoilformiato de etila 1 devido à forma ácida do produto da redução, ácido mandélico, apresentar propriedades bacteriostáticas e ser utilizado no tratamento de infecções do trato urinário²⁸ e empregado na determinação de configuração absoluta de substâncias por RMN de ¹H²⁹. Este substrato também foi utilizado em experimentos em fluxo contínuo mediado por *Saccharomyces cerevisiae*¹⁶. O sistema descrito na literatura a levedura foi imobilizada em crisotila e utilizou-se também um reator em coluna, e deste modo pudemos comparar a eficiência de nosso reator.

1.3.1 Configuração do reator

Para o estudo da bioredução de 1 mediada pela levedura *Saccharomyces cerevisiae* em fluxo contínuo, optamos utilizar o método de imobilização descrito acima, em um reator em coluna encamisado, e com fluxo vertical ascendente (plug-flow)³⁰ como está representado na **Figura 1.12**.

²⁸ Brittain, H. G. Analytical profiles of drugs substances and excipients. New Jersey:Academic Press, 2002. P.179.

²⁹ Trost, B. M.; Belletire, J. L.; Godleski, S.; McDougal, P. G.; Balkovec, J. M.; Bladwin, J. J.; Christy, M. E.; Ponticello, G. S.; Varga, S. L.; Spriger, J. P. *J. Org. Chem.* 1986, 51, 2370.

³⁰ Doran, M. P. *Bioprocess Engineering Principles*, 3rd edition, Academic Press, 1998, 333.

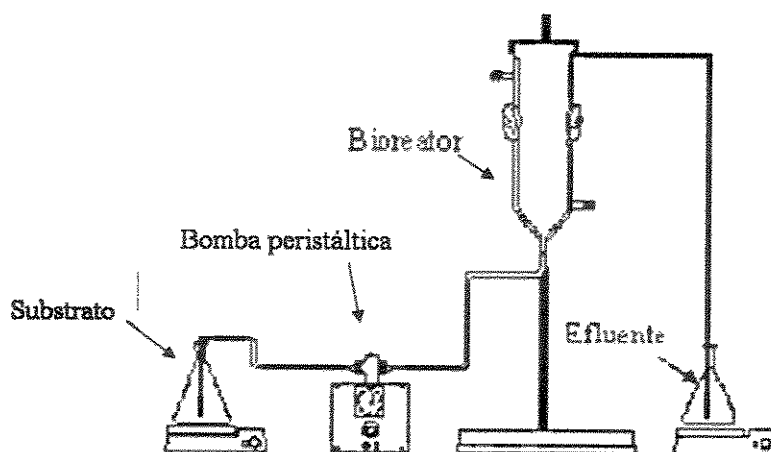


Figura 1.12. Representação esquemática do sistema utilizado para a redução de 1.

1.3.2 Imobilização da levedura *Saccharomyces cerevisiae*

A imobilização da levedura foi realizada segundo o procedimento descrito por Tanaka ²⁶. Na Figura 1.13 está representada esquematicamente a preparação das fibras de alginato.

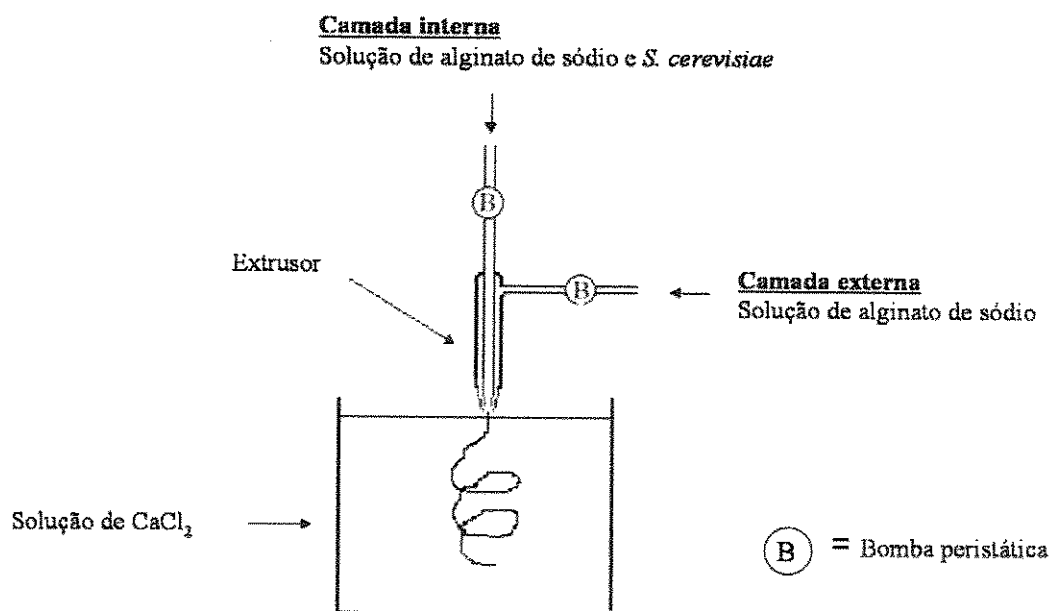


Figura 1.13. Representação esquemática do sistema de imobilização da levedura *Saccharomyces cerevisiae* em fibras de duas camadas de alginato de cálcio.

A levedura após o processo de imobilização fica encapsulada em fios de duas camadas superpostas de alginato (diâmetro = 3,0 mm), nas quais as células ficam restritas apenas na camada interna destes fios como está representado na **Figura 1.14**.

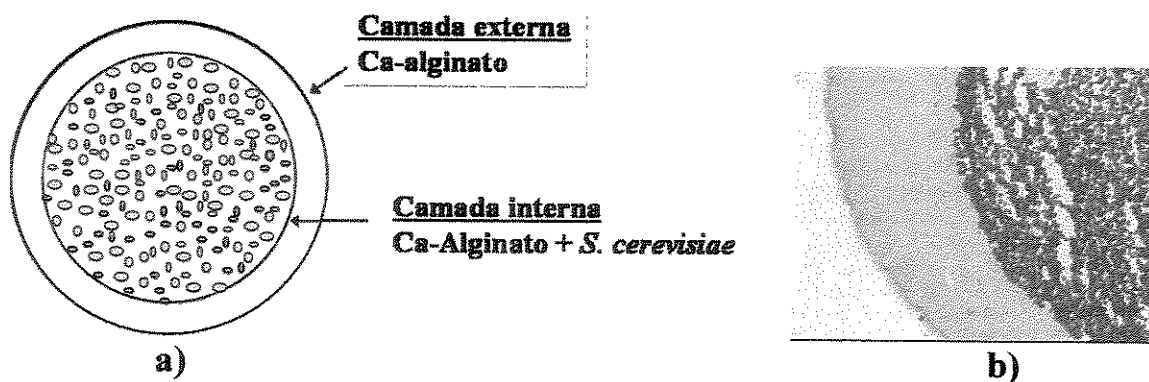


Figura 1.14. a) Representação esquemática de um corte transversal dos fios de duas camadas de alginato. b) Microfotografia do corte transversal de um fio apresentado neste trabalho.

1.3.3 Influência da concentração do benzoilformiato de etila 1

Primeiramente, avaliou-se o efeito da variação da concentração do substrato para a otimização das condições operacionais do reator. Para esta avaliação foi utilizado um fluxo de alimentação do reator de 102 mL/h, e os resultados estão apresentados na **Figura 1.14**. Verificou-se que na concentração de 1,1 mmol/L de **1** obteve-se uma melhor produtividade e *ee* de 2. A partir da concentração de substrato otimizada, selecionou-se a melhor taxa de diluição para o reator.

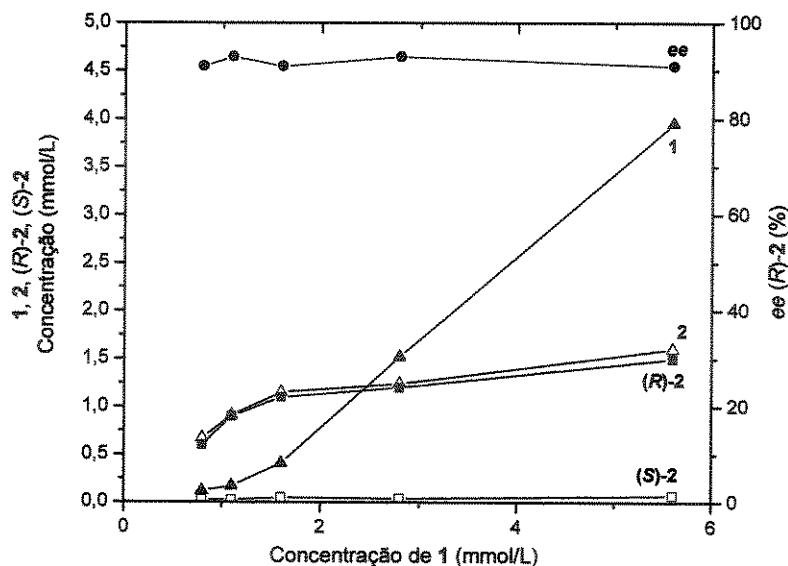


Figura 1.14. Redução contínua de 1 a 2 mediada por *Saccharomyces cerevisiae* e variação do excesso enantiomérico de (*R*)-2 pela mudança de concentração de 1 com taxa de diluição de $1,3 \cdot 10^{-3} \text{ h}^{-1}$ a 30°C (*ee* (●), 1 (▲), 2 (Δ), (*R*)-2 (■), (*S*)-2 (□)).

Os *ee* foram determinados por análise por cromatografia gasosa CG-FID e estão apresentado na **Figura 1.15**.

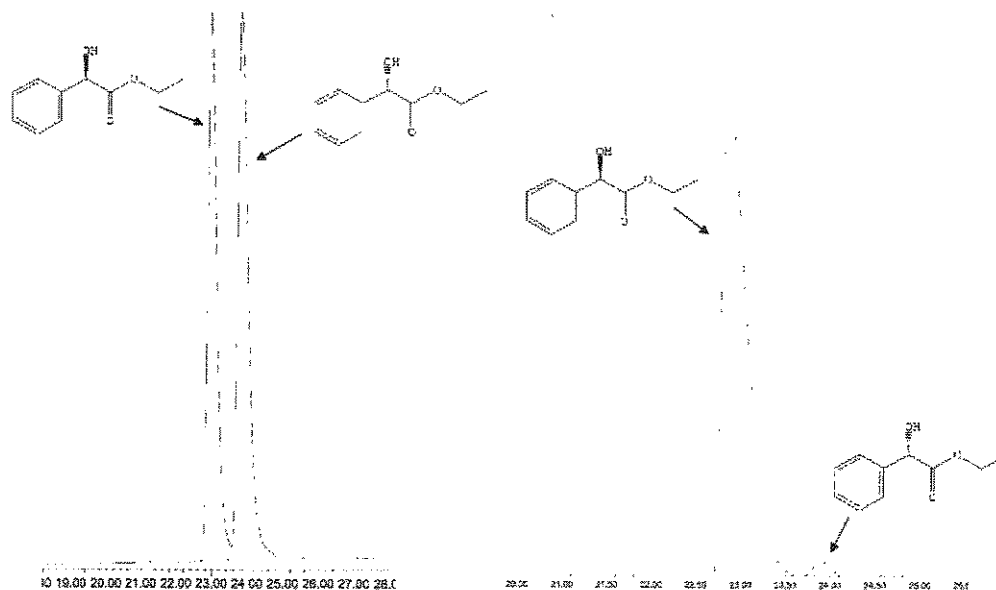


Figura 1.15. Determinação do *ee* por análise cromatográfica. a) análise de (±)-2; b) análise do (*R*)-2.

1.3.4 Influência da taxa de diluição

Na **Tabela 1** (pág. 20) estão apresentados os diversos parâmetros da reação em função da taxa de diluição. Um dos resultados mais interessantes desta tabela é o valor da extensão da redução.

A extensão da redução representa a porcentagem de substrato que foi realmente reduzido e não apenas a quantidade de substrato consumido, pois o substrato poderia estar sendo consumido por reações paralelas. Os valores são elevados (92 – 98 %).

O melhor resultado obtido foi utilizando uma taxa de diluição de $1,3 \times 10^{-3} \text{ h}^{-1}$, onde foram obtidos os melhores parâmetros de operação. Todos estes experimentos foram realizados durante 24 horas em fluxo contínuo, a 30 °C e em nenhuma das condições verificou-se o rompimento dos fios de alginato.

Tabela 1. Variação dos parâmetros de operação do reator em função da taxa de diluição.

Fluxo (mL/h)	T. diluição (10^{-3} h^{-1})	Fluxo de 1 (mmol/L h)	Tr (h)	Rend. (%)	Ext. da redução (%)	Grau de conversão (%)	Prod. de 2 (mmol/L h)	Velocidade específica de 2 (mmol/gdw h)	Velocidade específica de 1 (mmol/gdw h)	(R)-2 (mmol/L)	(S)-2 (mmol/L)	ee (%)
90	1.1	0.10	0.90	82.3	97	85	0.09	0.018	0.036	0.86	0.04	92
102	1.3	0.11	0.80	82.7	98	85	0.12	0.024	0.042	0.88	0.03	92
132	1.6	0.15	0.60	76.1	97	79	0.19	0.038	0.086	0.80	0.04	92
240	3.0	0.27	0.34	59.8	94	64	0.47	0.090	0.24	0.63	0.03	91
384	4.7	0.43	0.21	42.5	92	46	0.87	0.170	0.56	0.45	0.02	91

1.3.5 Biorredução de 1 em fluxo contínuo

Após a otimização das condições operacionais do reator, o sistema de fluxo contínuo foi utilizado durante 22 dias com uma taxa de diluição de $1,3 \times 10^{-3} \text{ h}^{-1}$, concentração de 1,1 mmol/L e temperatura de 30° C. O efluente produzido a cada 24 horas foi extraído e o produto purificado. No gráfico da **Figura 1.16** (pág. 22), está apresentado a performance do reator durante este período. A performance foi excelente durante um período de oito dias, onde obtivemos um rendimento de 82 % e um excesso enantiomérico de 92%. Após este período a biorredução perdeu seletividade, o excesso enantiomérico caiu bruscamente e posteriormente manteve-se constante em 33%.

Esta perda de seletividade é comum em reatores de fluxo contínuo^{17,18} utilizando a levedura *Saccharomyces cerevisiae* obtida comercialmente, pois esta levedura não está livre de outros microrganismos competitivos e por isto, não é recomendado utilizá-la em sistemas de fluxo contínuo durante um período superior a sete dias. Estes microrganismos competitivos presentes no fermento de pão comercial podem aumentar sua massa celular e diminuir assim a atividade da levedura *Saccharomyces cerevisiae*.

Um fator interessante em nosso sistema foi que apenas a seletividade caiu bruscamente enquanto a atividade manteve-se basicamente constante. Sugerimos que esteja ocorrendo uma mudança no metabolismo da célula que pode ser explicado pela cinética de balanceamento celular³¹. *Um microrganismo exposto por muito tempo a um determinado substrato pode sofrer modificações metabólicas a fim de manter a sua sobrevivência. Esta mudança de metabolismo é acompanhada por uma queda brusca de*

³¹ Bailey, J. E.; Ollis, D. F. *Biochemical Engineering Fundamentals*, second edition, McGraw-Hill, 1992, 383.

seletividade e posterior estabilização da mesma em um patamar inferior, o que é semelhante ao ocorrido em nosso sistema.

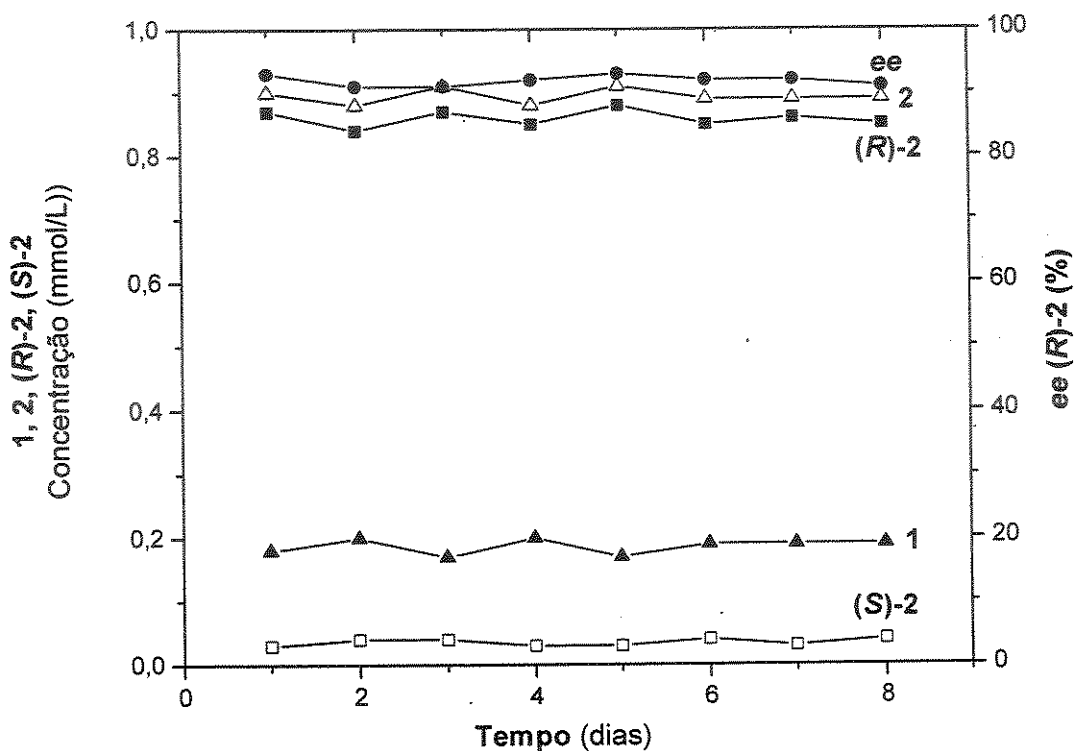


Figura 1.16. Estabilidade operacional da bioredução de 1 durante o período de 8 dias utilizando taxa de diluição de $1,3 \cdot 10^{-3} \text{ h}^{-1}$ e concentração de 1 de 1,1 mmol/L a 30 °C (ee (●), 1 (▲), 2 (Δ), (R)-2 (■), (S)-2 (□)).

1.4 Conclusão

O reator utilizando células da levedura *Saccharomyces cerevisiae* imobilizadas em fios de alginato de duas camadas apresentou excelente estabilidade durante o período de 8 dias. Obteve-se um elevado rendimento químico e excessos enantioméricos. A produtividade obtida foi superior aos sistemas anteriormente desenvolvido por nosso grupo de pesquisa¹⁶. A principal vantagem deste sistema é a estabilidade do biocatalisador frente à concentração de substrato, pois a produtividade obtida é superior ao descrito anteriormente¹⁶ utilizando-se uma quantidade seis vezes menor de massa celular.

Este trabalho é o primeiro exemplo de bio redução utilizando levedura imobilizada em fibras de duas camadas de alginato de cálcio.

Capítulo 2

Monitoramento “on-line” de bio reduções utilizando Espectrometria de Massas por Introdução *via* Membrana³².

2.1. Introdução

A espectrometria de massas por introdução *via* membrana, (Membrane Introduction Mass Spectrometry - MIMS)³³, é uma das técnicas mais simples, rápidas e sensíveis disponíveis para a determinação de compostos orgânicos voláteis³⁴ e semivoláteis³⁵ em água, bem como em outras matrizes como ar³⁶ e solo³⁷.

A técnica MIMS está se desenvolvendo rapidamente e apresenta elevado potencial de utilização em química, com um número crescente de aplicações em química ambiental, bioquímica e no monitoramento de processos químicos e biológicos. Esta técnica pode ser aplicada para o monitoramento de processos químicos em tempo real e em *in-situ*, tais como: (a) produtos majoritários, metabólitos voláteis e metabólitos instáveis ou reativos produzidos por microorganismos durante ao processo de fermentação³⁸;

³² Milagre, H. M. S., Milagre, C. D. F., Rocha, L. L., Santos, L. S., Eberlin, M. N., Rodrigues, J. Augusto R.. *Bioeng. and Biotechnol.* **2004**. (in press)

³³ Johnson, R. C.; Cooks, R. G.; Allen, T. M.; Cisper, M. E.; Hemberger, P. H. *Mass Spectrom Rev*, **2000** *19*, 1-37.

³⁴ Alberici, R. M.; Zampronio, C. G.; Poppi, R. J.; Eberlin, M. N. *Analyst* **2002**, *127*, 230-234.

³⁵ Mendes, M. A.; Eberlin, M. N. *Analyst* **2000**, *125*, 21-24.

³⁶ Riter, L. S.; Takats, Z.; Cooks, R. G. *Analyst* **2001**, *126*, 1980-1984.

³⁷ Kostianen, R.; Kotiaho, T.; Mattila, I.; Mansikka, T.; Ojala, M.; Ketola, R. A. *Anal Chem*, **1998**, *70*, 3028-3032.

³⁸ Hayward, M. J.; Kotiaho, T.; Lister, A. K.; Cooks, R. G.; Austin, G. D.; Narayan, R.; Tsao, G. T. *Anal Chem* **1990**, *62*, 1798-1804.

- (b) conversão de cloro a cloraminas, uma reação ambiental relevante durante o processo de tratamento de água³⁹;
- (c) cloração de fenol e compostos relacionados, modelos de ácidos húmicos, por hipoclorito de sódio⁴⁰;
- (d) oxidação de derivados de benzeno pelo reagente de Fenton⁴¹;
- (e) Fotólise de aril-metil-éster em solução aquosa e em solução metanólica⁴²;
- (f) Hidrólise da epicloroidrina, um composto representativo na indústria de polímeros⁴³;
- (g) hidro-desclorinação catalítica de cloretos aromáticos, um importante processo para tratar compostos organoclorados⁴⁴.

Na verdade, quando alguém se refere ao uso da técnica MIMS em um experimento qualquer, deve-se pensar em uma análise feita por um espectrômetro de massas (EM) onde a particularidade está na forma como a amostra é introduzida no mesmo.

A espectrometria de massas por introdução via membrana é uma técnica analítica na qual uma membrana semipermeável faz interface entre a amostra e o vácuo do espectrômetro de massas (**Figura 2.1**).

³⁹ Kotiaho, T.; Hayward, M. J.; Cooks, R. G. *Anal Chem* **1991**, *63*, 1794-1801.

⁴⁰ Rios, R. V. R. A.; Da Rocha, L. L.; Vieira, T. G.; Augusti, R.; Lago, R. M. *J Mass Spectrom* **2000**, *35*, 618-624.

⁴¹ Augusti, R.; Dias, A. O.; Rocha, L. L.; Lago, R. M. *J Phys Chem A* **1998**, *102*, 10723-10727.

⁴² Wong, P. S. H.; Srinivasan, N.; Kasthurikrishnan, N.; Cooks, R. G.; Pincock, J. A.; Grossert, J. S. *J Org Chem* **1996**, *61*, 6627-6632.

⁴³ Johnson, R. C.; Koch, K.; Cooks, R. G. *Ind Eng Chem Res* **1999**, *38*, 343-351.

⁴⁴ Lago, R. M.; Nagem, N. F.; Dalmázio, I.; Augusti, R. *Mass Spectrom* **2003**, *17*, 1507-1510.

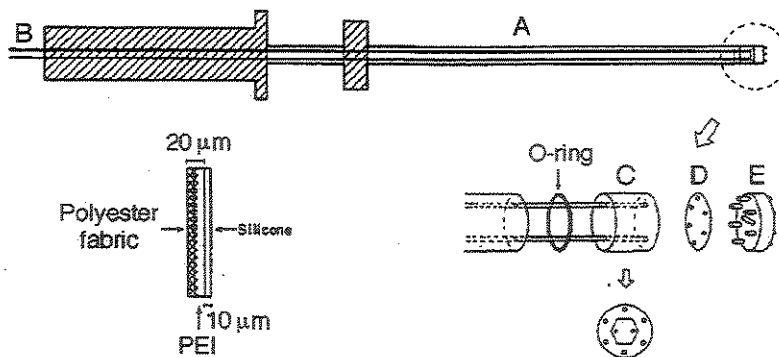


Figura 2.1. Representação esquemática da sonda de membrana onde se destacam: (A) o corpo da sonda de membrana, (B) tubos de circulação da amostra, (C) cilindro de fixação da membrana, (D) membrana e (E) suporte vazado para a fixação da membrana.

Em linhas gerais, MIMS se baseia na passagem seletiva de um analito, geralmente dissolvido em água, por uma membrana semipermeável (tipicamente de silicone) o qual é então conduzido até a fonte do espectrômetro de massas (**Figura 2.2**). O processo conhecido como pervaporação provoca um enriquecimento do analito e pode ser dividido em três etapas:

- 1- adsorção do analito à superfície da membrana;
- 2- difusão deste ao longo da espessura da membrana;
- 3- dessorção da superfície da membrana na região de vácuo.

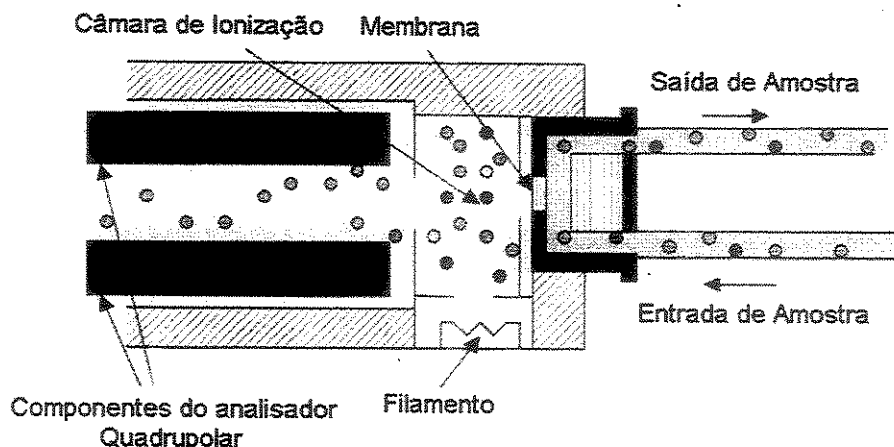


Figura 2.2. Esquema geral de MIMS utilizando Ionização por Elétrons (EI) para ionizar os analitos que permeiam através de uma membrana planar de silicone.

Uma vez na região de vácuo, o analito chega até a fonte podendo ser ionizado tanto por ionização por elétrons (EI), como por ionização química (CI).

Este fato acarreta limites de detecção menores para os analitos, chegando a níveis de ngL^{-1} para analitos em água e a níveis de ngm^{-3} para analitos em ar. Outras vantagens importantes oferecidas por MIMS são (i) o método é rápido, (ii) não é necessário um pré-tratamento da amostra (como extrações, derivatizações, etc), (iii) o custo por amostra é baixo, (iv) solventes não são utilizados, (v) mais importante, MIMS pode ser utilizada para monitoramento contínuo em longo prazo de processos ambientais, bioquímicos e químicos e (vi) permite fácil interfaceamento do mesmo em qualquer espectrômetro de massas (setoriais, quadrupolares e por armadilha de íons).⁴⁵

⁴⁵ (a) Kotiaho, T.; Lauritsen, F. R.; Choudhury, T. K.; Cooks, R. G.; Tsao, G. T. *Anal. Chem.* **1991**, *63*(18), 875A. (b) Ketola, R. A.; Kotiaho, T.; Cisneros, M. E.; Allen, T. M. *J. Mass Spectrom* **2002**, *37*, 457-476.

A capacidade de uma performance rápida e direta (sem extração ou tratamento da amostra) e análise quantitativa de compostos orgânicos voláteis e semivoláteis em uma variedade de matrizes, apresenta a técnica MIMS como uma ferramenta de aplicação para o monitoramento de reações de biocatálise.

2.2 Objetivos

Aplicação da técnica MIMS no monitoramento *on-line* de reagentes, intermediários e produtos de reações de bioedução (Figura 2.3) mediadas pela levedura *Saccharomyces cerevisiae* imobilizada em esferas de alginato em reator de fluxo contínuo.

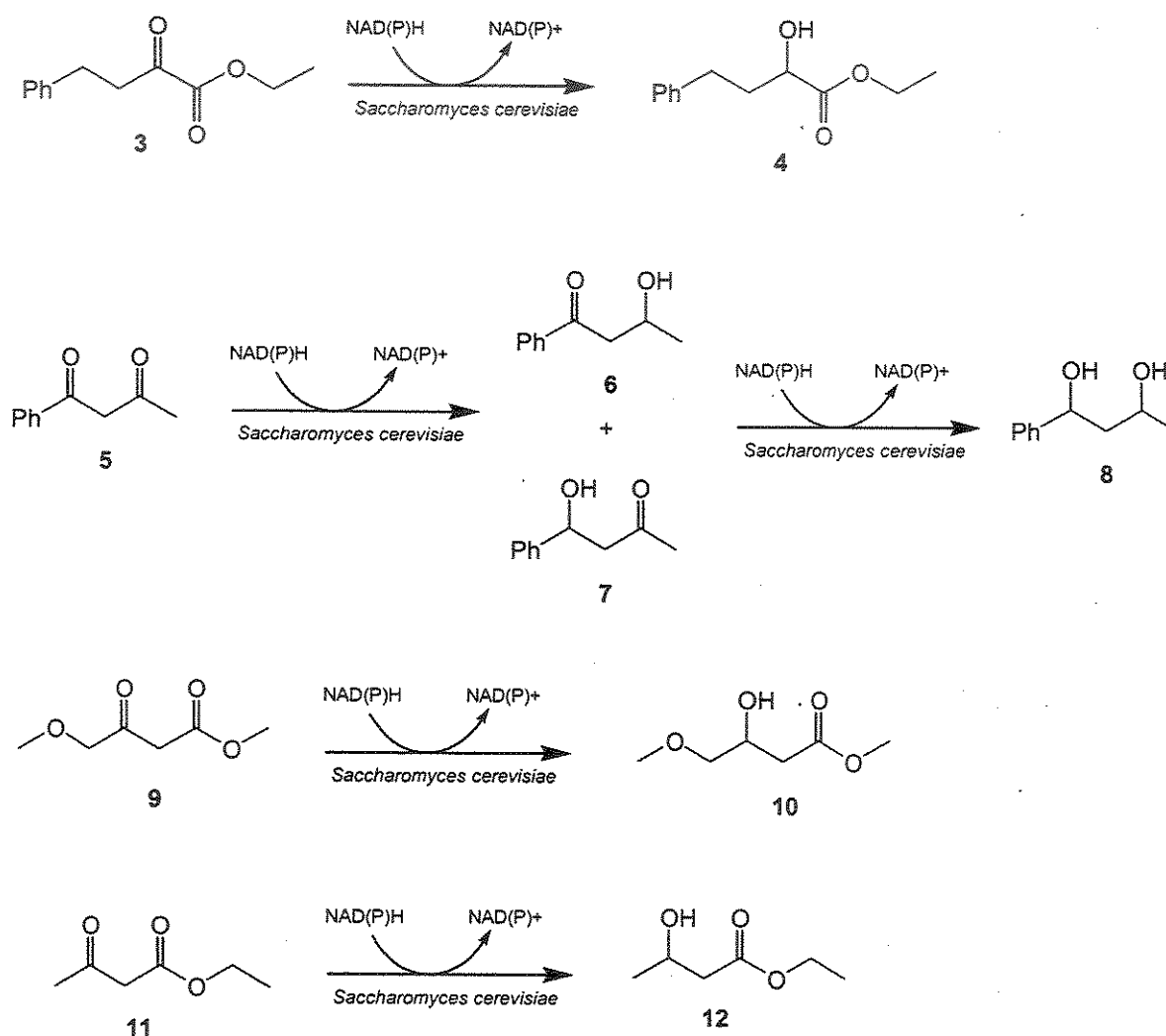


Figura 2.3. Reações de bioedução mediadas pela levedura *Saccharomyces cerevisiae*.

2.3 Resultados e Discussões

2.3.1 Sistema reacional

Para realizar o monitoramento da bioreduções por MIMS a levedura *Saccharomyces cerevisiae* foi imobilizada em alginato de cálcio. A imobilização do biocatalisador em alginato é condição imprescindível para o monitoramento por MIMS, que neste tipo de imobilização evita-se a perda de células para o meio evitando que a membrana fique obstruída. A levedura foi imobilizada em esferas de alginato de cálcio e empacotadas em um reator tubular tipo *PLUG-FLOW* em fluxo contínuo (**Figura 2.4**). O substrato e o meio nutriente foram bombeados através de uma bomba peristáltica para o reator em fluxo ascendente. O efluente do reator foi diluído em água através de um T, e então direcionado para a sonda.

Utilizou-se o modo de monitoramento SIM (monitoramento de íon seletivo) pelas razões massa/carga (m/z), características do substrato e dos produtos de interesse produzidos durante a reação. As razões massa/carga (m/z) foram selecionadas de acordo com os sinais presentes nos respectivos espectros de massas de substratos e produtos obtidos por EI (Ionização por elétrons) a 70 eV. O modo SRIM (monitoramento seletivo da “razão íon-abundância”) também foi utilizado quando os espectros de massa do substrato e produto não apresentaram íons característicos.

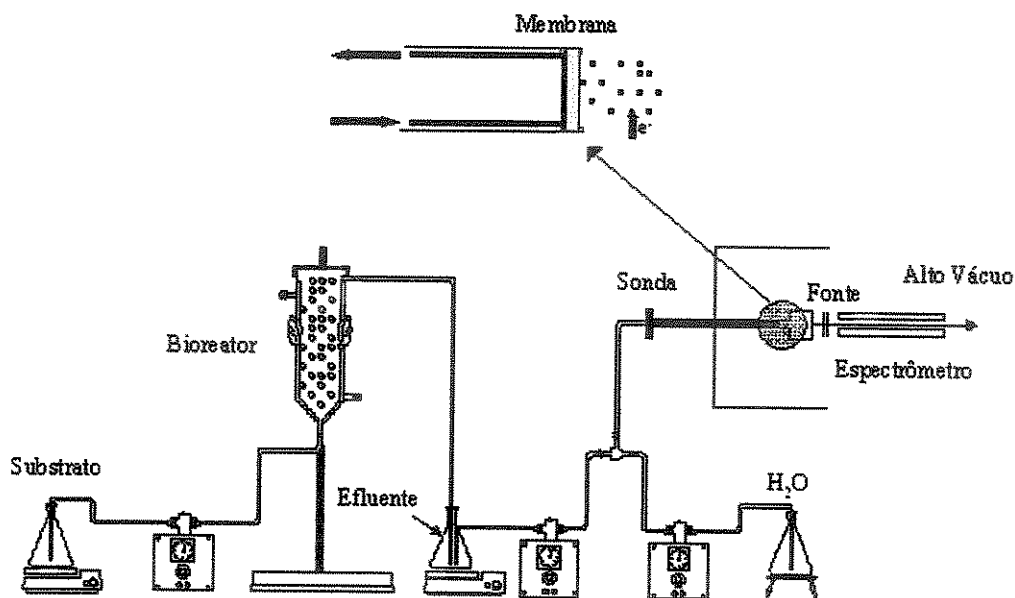


Figura 2.4. Representação esquemática do sistema utilizado para o monitoramento das reações de bio-redução.

2.3.2 Monitoramento das reações de bio-redução.

2.3.2.1 Monitoramento da bio-redução do 2-oxo-4-fenilbutanoato de etila 3.

Para o monitoramento das bio-reduções, primeiramente selecionamos os fragmentos característicos, tanto para o substrato quanto para o produto. Para o monitoramento da bio-redução do 2-oxo-4-fenilbutanoato de etila 3, foram selecionados os íons m/z 133, 188 e 206 para 3 e m/z 117 e 208 para 4 (Figura 2.5).



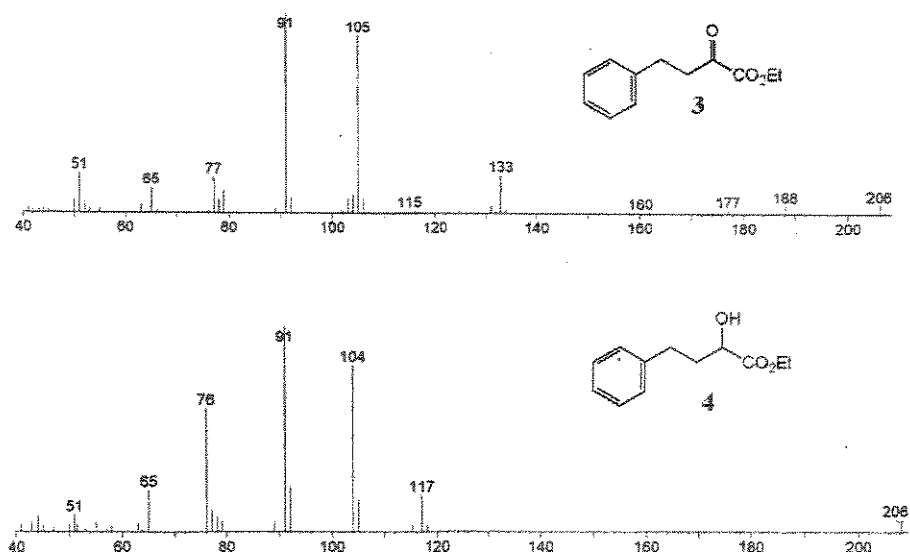


Figura 2.5 Espectros de massas de 3 e 4.

Durante a bioredução de 3, o monitoramento por MIMS não apresentou nenhum íon 3^+ de m/z 206 (também nenhum outro fragmento característico m/z 133 e 188), indicando a alta efetividade do processo de redução e redução quantitativa de 3. O íon de m/z 208 possuía baixa intensidade e confundia-se com a linha de base, mas em contrapartida o sinal de m/z 117 (outro íon característico) era intenso.

O produto de bioredução 4 foi então monitorado por MIMS via monitoramento do íon seletivo (SIM) do fragmento característico m/z 117 (Figura 2.6).

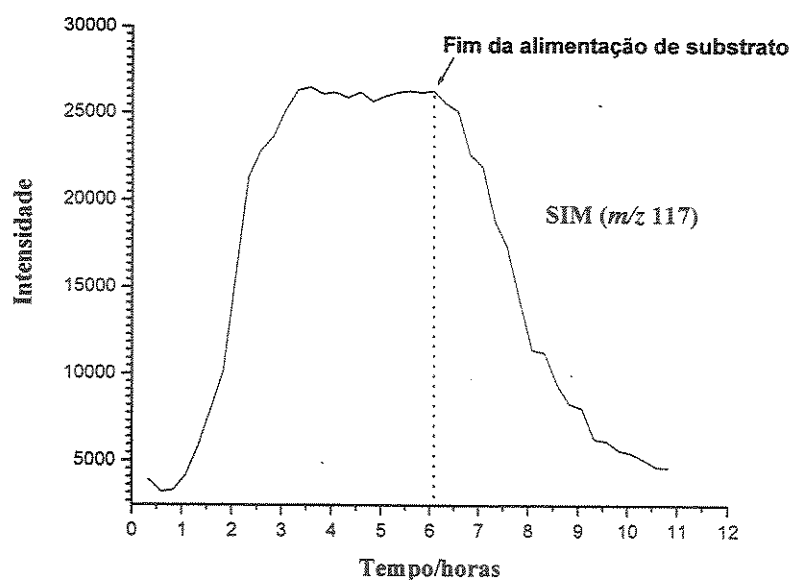


Figura 2.6. Bioedução de **3** monitorada por MIMS via SIM do fragmento característico m/z 117 de **4**⁺.

A **Figura 2.6** apresenta o aumento, estabilização e a queda da concentração de **4**. A estabilização ocorre quando o sistema atinge o equilíbrio do estado estacionário. Este equilíbrio é atingido no sistema após 3 horas de alimentação do substrato. A queda da concentração ocorre quando interrompemos a alimentação do substrato, e apenas água é bombeada para o reator para a sua limpeza.

2.3.2.2 Monitoramento da bioedução da 1-benzoilacetona **5**.

A bioedução da β -dicetona **5** também foi monitorada por MIMS. A bioedução de **5** foi um desafio para o monitoramento por MIMS utilizando espectrometria de massas por ionização por impacto de elétrons (EI 70 eV),

pois os espectros de massa de **6** e **7** são muito similares, apresentando o mesmo conjunto de íons (**Figura 2.7**).

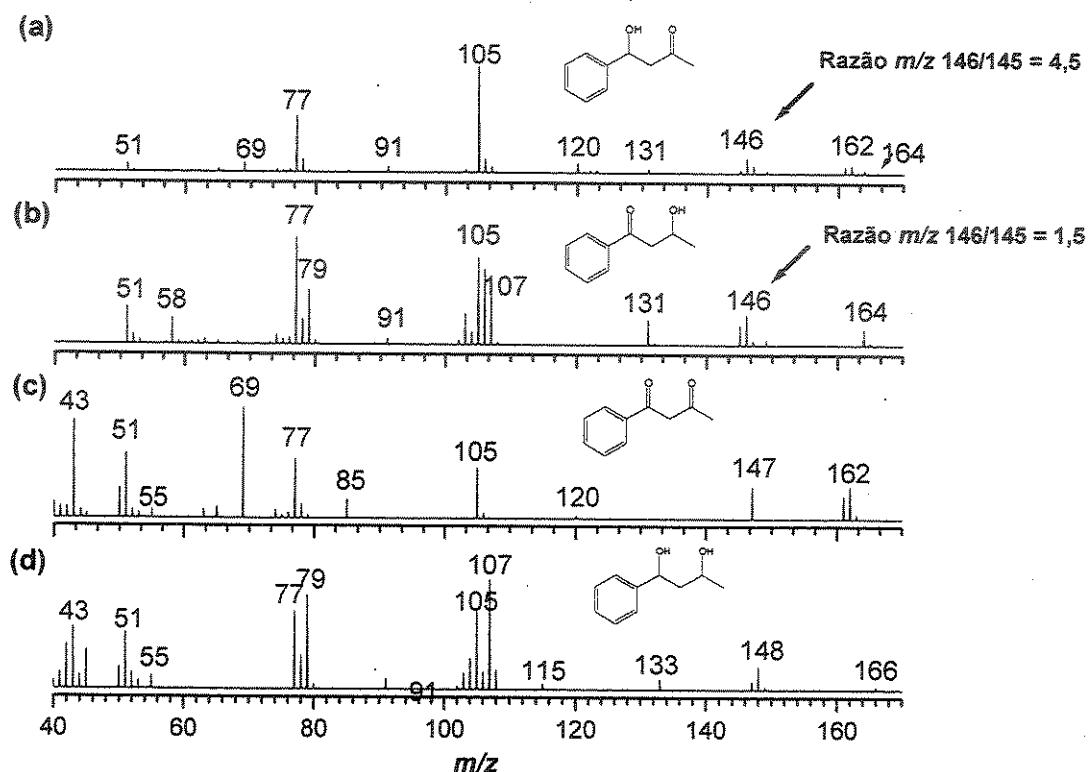
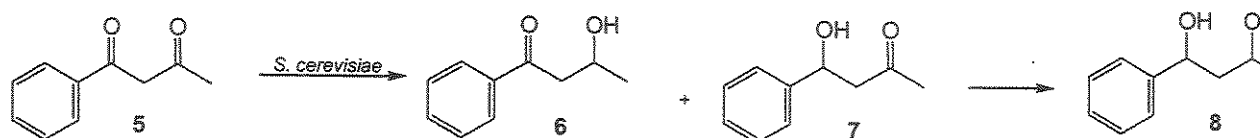
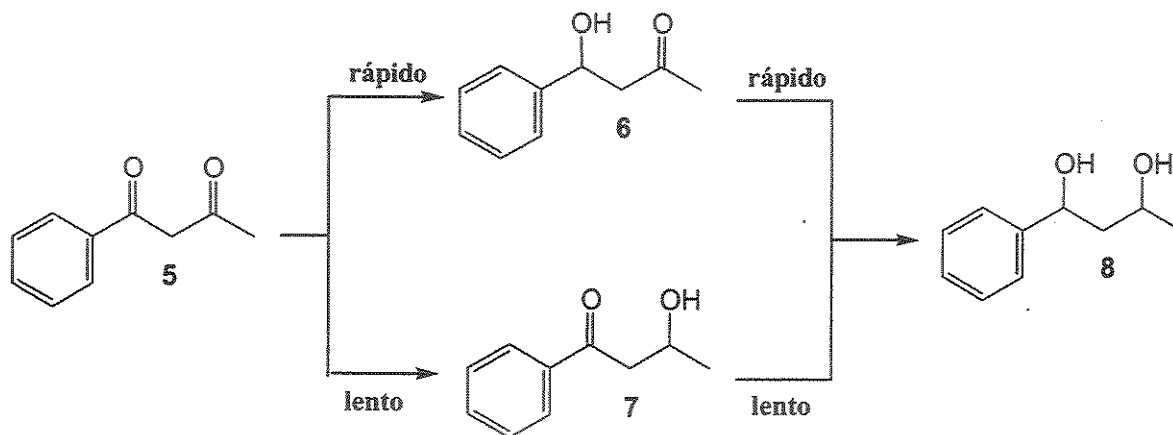


Figura 2.7 (a) Espectros de massas de **7**; (b) Espectros de massas de **6**; (c) Espectros de massas de **5**; (d) Espectros de massas de **8**.

Entretanto, o produto final **8** apresenta o íon característico m/z 148, que foi monitorado por MIMS via SIM e os intermediários isobáricos **6** e **7** que são obtidos da redução parcial de **5** não puderam ser monitorados *via* íon seletivo. Entretanto, após uma análise dos respectivos espectros de massa, verificamos a razão m/z 146: m/z 145 de 1,5 para **6** e 4,5 para **7**. Estas razões

são suficientemente distintas para o monitoramento por MIMS não por via SIM, mas *via* monitoramento seletivo da “razão íon-abundância” (SIRM).



Esquema 2.1. Bioredução de 5 mediada pela levedura *Saccharomyces cerevisiae*.

A **Figura 2.8** apresenta o monitoramento por MIMS da bioredução de 5 usando SIM (m/z 148) para o produto final 8 e SIRM (m/z 146 : m/z 145 razão íon-abundância) para os intermediários 6 e 7. O perfil característico (**Figura 2.8a**) para 7 é observado, com o aumento, estabilização e queda da concentração. Para a **Figura 2.8b**, verificamos que a razão m/z 146 : m/z 145 aumenta quando a bioredução de 5 prossegue. No início esta razão é de 1,5, indicando a predominância de 6. Após 6-8 horas, a razão estabiliza próximo de 4,5, indicando que agora o intermediário 7 é o preponderante. Nós, concluímos que 6 é formado e consumido pela bioredução muito mais rápido que 7. A bioredução de 5 tem sido extensivamente estudada, e diferentes resultados sobre a presença ou não do isômero 6 é reportada. Utilizando-se ressonância magnética nuclear (RMN), 7 é o único isômero detectado^{46,47}. Entretanto, quando a reação é monitorada por técnicas mais sensíveis como

⁴⁶ Ahmad, K.; Koul, S.; Taneja, S. C.; Singh, A. P.; Kapoor, M.; Riyaz-ul-Hassan, Verma, V.; Qazi, G. N. *Tetrahedron Asym.* **2004**, *15*, 1685.

⁴⁷ Chênevert, R.; Thiboutot, S. *Can. J. Chem.* **1986**, *64*, 1599.

cromatografia gasosa CG⁴⁸ ambos os isômeros 6 e 7 são detectados. Fauve⁴⁸ têm apontado que os dois isômeros 6 e 7 são muito difíceis de separar e caracterizar cromatograficamente (TLC, o valores de R_f são quase idênticos e os tempos de retenção no CG são bem próximos). O monitoramento *on-line* com SIRM mostra, entretanto que ambos intermediários 6 e 7 são formados, e mais interessantemente, que 6 é formado e consumido mais rápido que 7. A formação preferencial e bio-redução do intermediário 6 sobre 7, evidenciado em tempo real por MIMS foi confirmado CG-EM *off-line*.

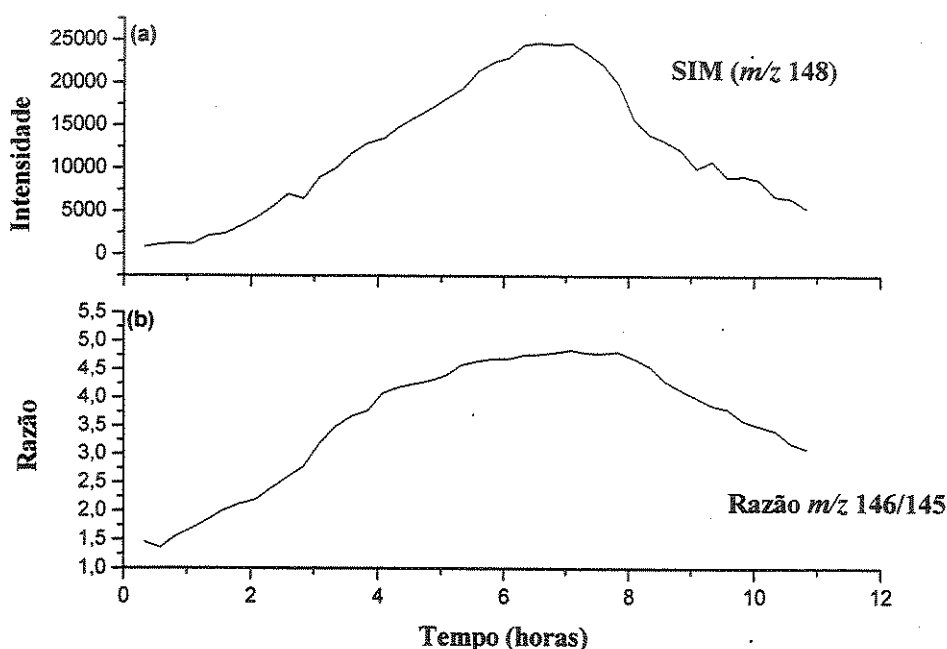


Figura 2.8. a) Monitoramento por MIMS via SIM do 8^+ íon do fragmento característico m/z 148 e Monitoramento por MIMS via “SIRM” da razão da abundância dos íons m/z 145 : m/z 146.

⁴⁸ Fauve, A.; Veschambre, H. *J. Org. Chem.* 1988, 53, 5215.

2.3.2.3 Monitoramento da bioedução do 4-metoxiacetoacetato de metila 9.

Para o monitoramento da bioedução de 9, foram selecionados os íons m/z 101 e 115 para 9 e m/z 71 e 103 para 10 (Figura 2.9). Aqueles que apresentaram maior estabilidade para o monitoramento foram os íons m/z 101 para 9 e m/z 103 para 10. O substrato 9 e o produto de bioedução 10 foram então detectados por MIMS via monitoramento do íon seletivo (SIM) dos fragmentos característicos m/z 101 e 103, respectivamente.

A bioedução de 9 é lenta e este não foi totalmente reduzido, como é apresentado na Figura 2.10.

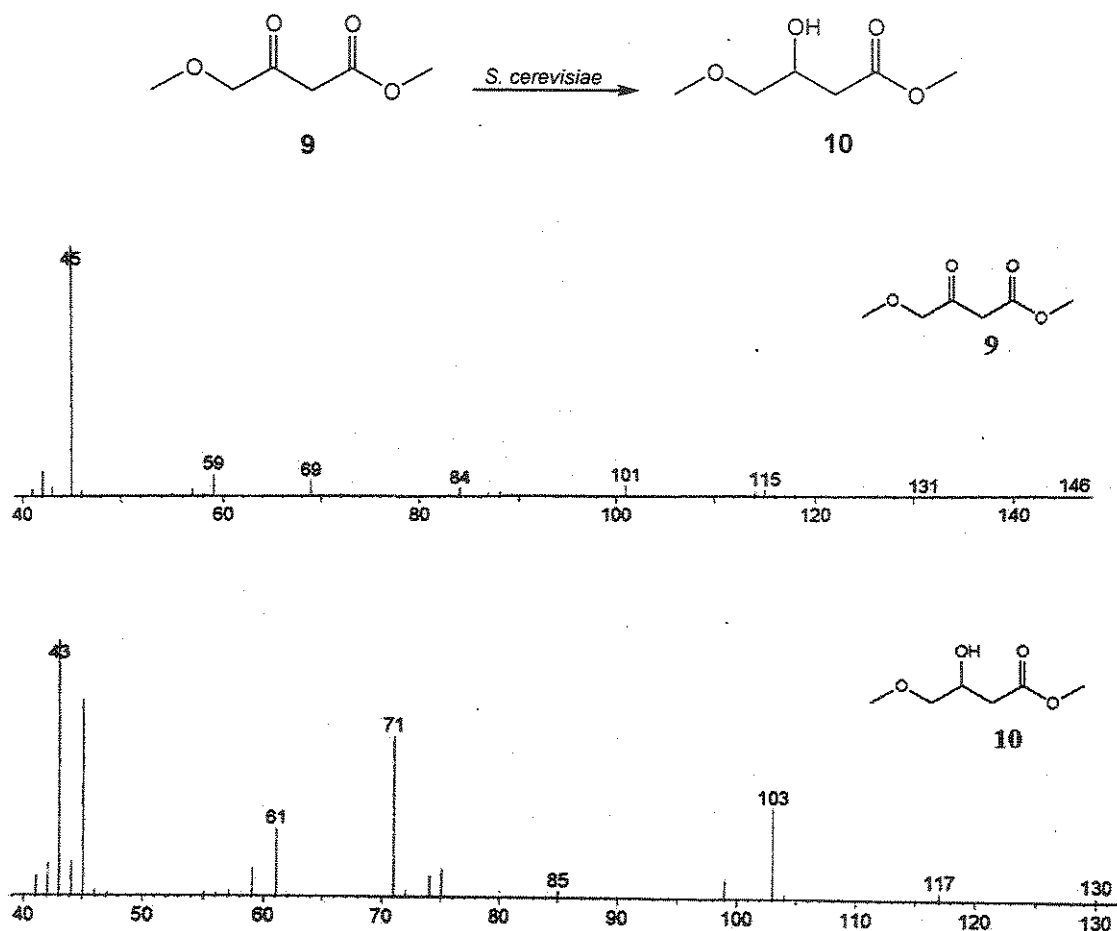


Figura 2.9 – Espectros de massas de 9 e 10.

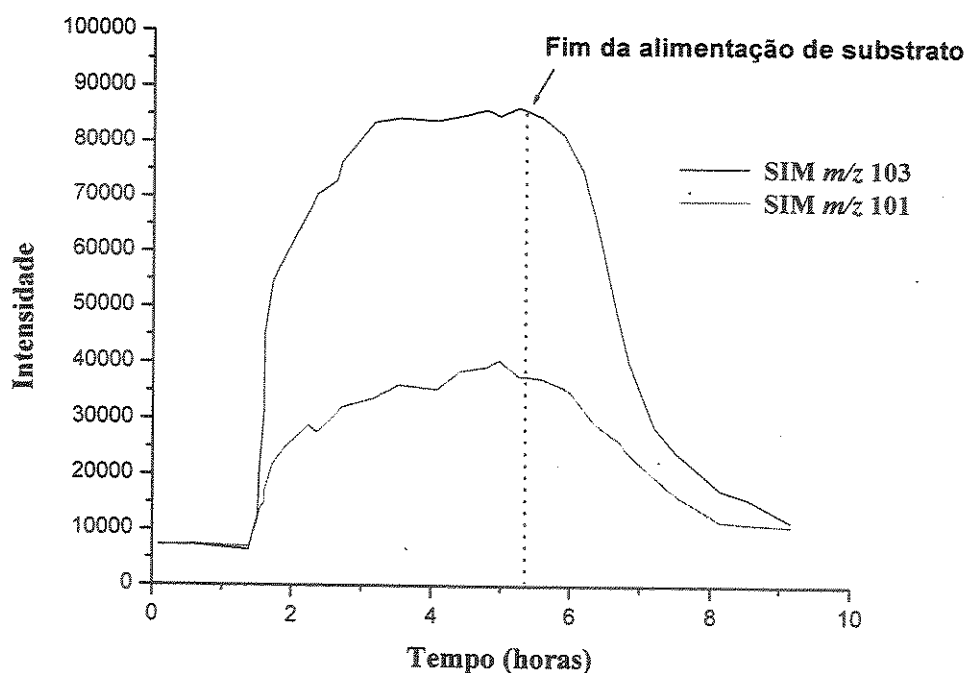


Figura 2.10. Bioredução de 9 monitorada por MIMS via SIM do fragmento característico m/z 101 de 9^+ e m/z 103 de 10^+ .

2.3.2.4 Monitoramento da bioredução do acetoacetato de etila 11.

Para o monitoramento da bioredução de 11 foram selecionados os íons m/z 102 para 11 e m/z 117 para 12 (**Figura 2.11**). A bioredução do acetoacetato de etila (11) foi monitorada por MIMS *via* SIM (**Figura 2.12**) através do fragmento característico m/z 117. Durante a bioredução não foi detectado nenhum sinal de 11^+ de m/z 102.

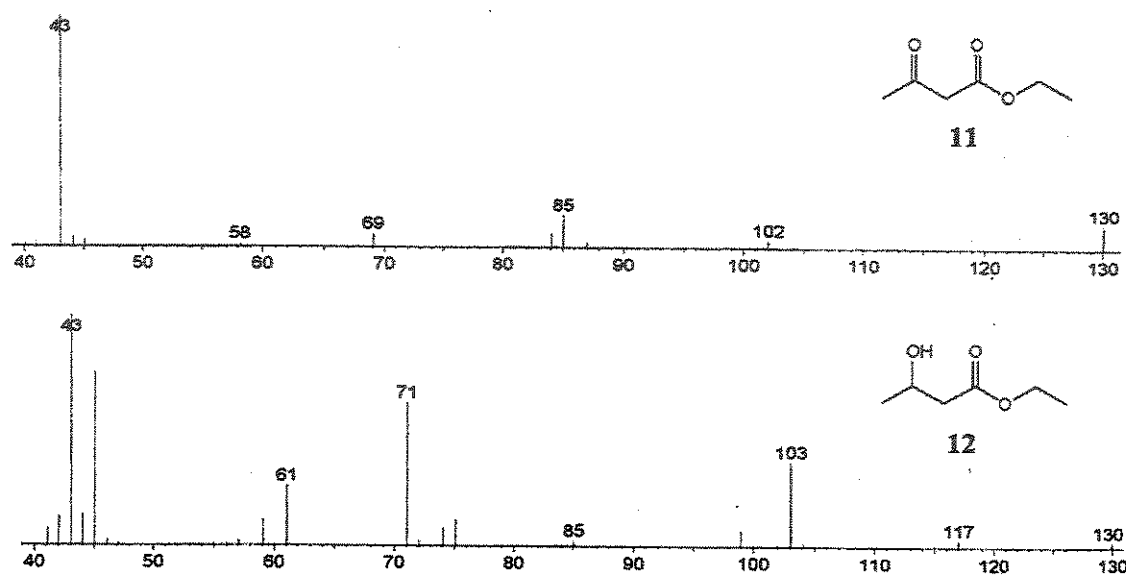
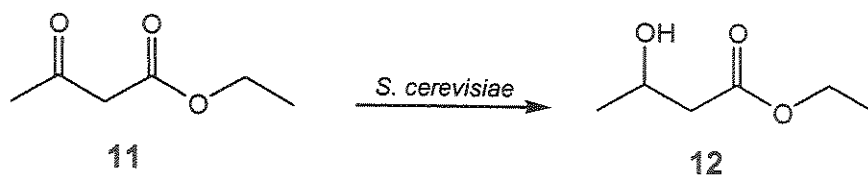


Figura 2.11 – Espectros de massas de 11 e 12.

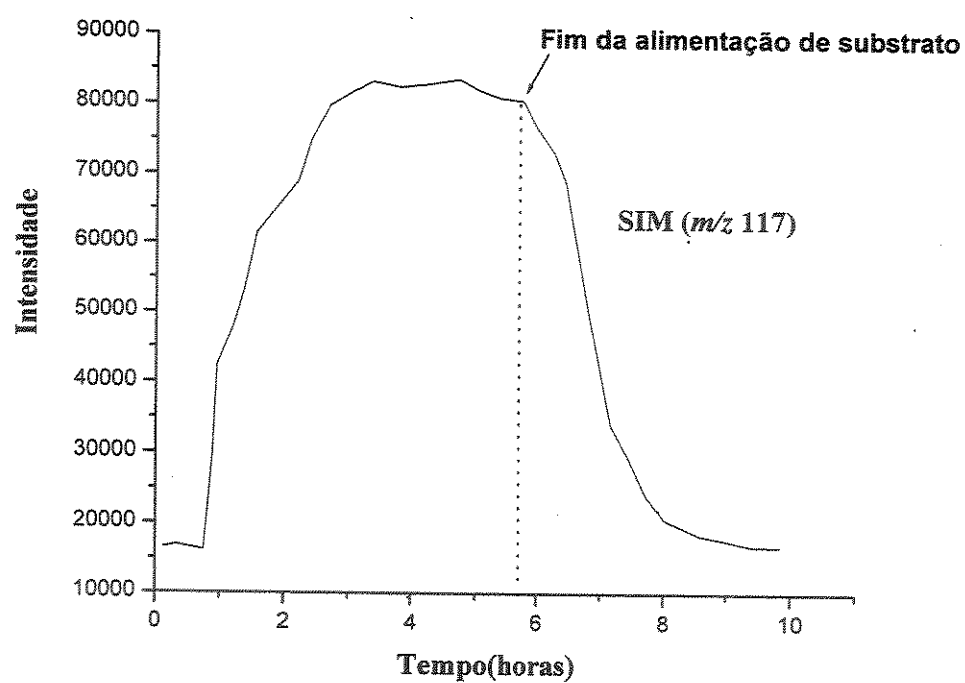


Figura 2.12. Bioredução de 11 monitorada por MIMS via SIM do fragmento característico m/z 117 de 12^+ .

2.4 Conclusões

Os resultados obtidos utilizando-se a técnica MIMS mostram que a técnica é adequada para o monitoramento deste tipo de reação catalisada por uma levedura encapsulada em alginato de cálcio, mesmo em casos mais complicados onde há sinais coincidentes nos espectros de massas das espécies envolvidas.

O monitoramento destas reações visa fornecer informações adicionais que não foram até então, obtidas por técnicas convencionais utilizadas para acompanhar este tipo de reação. Os resultados obtidos podem nos fornecer informações sobre o andamento das reações dentro de um processo onde se necessita apenas saber se houve conversão e o grau de conversão. O mais importante é lembrar que não é necessário nenhum passo de extração do efluente do reator como em técnicas de GC-MS, tornando o processo mais dinâmico na obtenção de informações do processo como um todo.

Capítulo 3

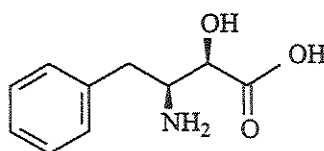
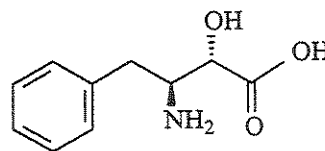
Síntese Biocatalítica de β -Amino- α -Hidroxiácidos.

Aplicações na Síntese de Heterociclos Quirais

3.1. Introdução

β -amino- α -hidroxiácidos homoquirais são componentes cruciais em uma variedade de compostos com importantes atividades terapêuticas. Muitos pseudopeptídeos inibidores de protease, tanto sintéticos quanto naturais, são eficazes devido à sua habilidade de mimetizar o estado de transição da hidrólise peptídica⁴⁹.

A atividade destes compostos reside freqüentemente em um único estereoisômero deste segmento aminoácido. Por exemplo, a fenilnorstatina **13** é o estereoisômero essencial de uma variedade de inibidores de renina^{50,51}, seu α -epímero allofenilnorstatina **14** é um inibidor de HIV protease da classe kynostatina⁵².

**13****14**

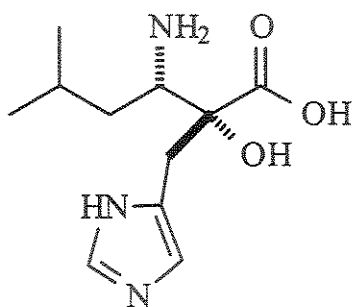
⁴⁹ Bunnage, M. E.; Davies, S. G.; Goodwin, C. J.; Ichihara, O. *Tetrahedron* **1994**, *50*, 3975.

⁵⁰ Iizuka, K.; Kamijo, T.; Harada, H.; Akahane, K.; Kubota, T.; Umeyama, Ishida, T.; Kiso, Y. *J. Med. Chem.* **1990**, *33*, 2707.

⁵¹ Nshizawa, R.; Saino, T.; Takita, T.; Suda, H.; Aoyagi, T.; Umezawa, H. *J. Med. Chem.* **1977**, *20*, 510.

⁵² Bunnage, M. E.; Davies, S. G.; Goodwin, C. J. *Synlett* **1973**, 731.

Além destes aspectos estereoquímicos, a síntese assimétrica de β -amino- α -hidroxi-ácidos pode ser mais complicada devido a requerimentos estruturais mais complexos. Por exemplo, o inibidor de aminopeptidase M leuhistina **15**, contém o grupo α -hidroxi em um centro estereogênico quaternário⁵³.

**15**

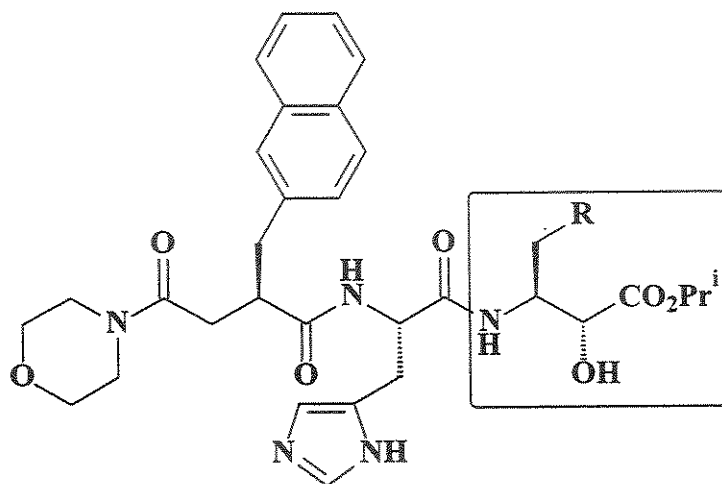
As estimativas do número de pessoas contaminadas pelo vírus HIV excederá à casa dos trinta milhões nos próximos anos. Uma abordagem terapêutica que tem sido de grande importância é a inibição da HIV protease (HIVPR). A enzima protease do vírus é um elemento essencial em seu ciclo de vida, sendo esta a responsável pela montagem e maturação em seu estágio infeccioso⁵⁴. Desta maneira a supressão da protease, por mutação ou inibição química, leva a incapacidade do vírus estabelecer o seu ciclo infeccioso. O vírus da imunodeficiência humana (HIV) codifica uma protease aspártica conhecida por ser essencial para maturação e replicação retroviral. A HIV protease pode reconhecer seqüências Phe-Pro e Tyr-Pro como o sítio de clivagem específica do vírus. Estes aspectos fornecem a base para o *design* racional de drogas HIV proteases seletivas para o tratamento de AIDS⁵⁵. O quimioterápico saquinavir (Invirase[®], Roche[®]), foi o primeiro a ser testado

⁵³ Aigi, T.; Yoshida, S.; Matsuda, T.; Ikeda, T.; Hamada, M.; Takeuchi, T. *J. Antibiotics* 1991, 44, 573.

⁵⁴ West, M. L.; Fairlie, D. P. *Trends Pharmacol. Sci.* 1995, 23, 3999.

⁵⁵ Huff, J. R. *J. Med. Chem.* 1994, 34, 2305.

cl clinicamente em tratamento de aids⁵⁶. O composto **16** apresenta alta atividade anti-HIV.



16 R = Prⁱ: KRI-1230

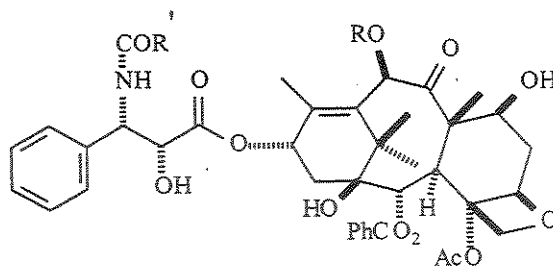
A notável eficácia do agente anticâncer taxol **17** é dependente da presença na cadeia lateral de um derivado β -amino- α -hidroxi-ácido, e uma eficiente síntese estereo-controlada deste importante componente tem sido o objetivo primeiro de muitos pesquisadores⁵⁷. O taxol e seus derivados como o taxotere **18**, que é um agente antineoplásico, atuam promovendo a agregação das tubulinas na formação de microtúbulos estáveis, inibindo a sua despolimerização, o que promove diminuição de tubulina livre. A ligação do taxol aos microtúbulos não altera o número de protofilamentos. *In vitro* mostrou romper a rede de microtúbulos nas células, essencial para as funções celulares vitais durante a intérfase e a mitose^{58,59}.

⁵⁶ Roberts, N. A.; Martin, J. A.; Kirchington, D.; Bradhurst, A. V.; Craig, J. C.; Duncan, I. B.; Galpin, S. A.; Handa, B. K. *Science* **1990**, *248*, 358.

⁵⁷ Nicolaou, K. C.; Dai, W. M.; Guy, R. K. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl* **1994**, *33*, 15.

⁵⁸ Snyder, J. P.; Nevins, N.; Cicero, D. O.; Jansen, J. J. *Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 724.

⁵⁹ Bissery, M. C.; Guénard, D.; Guérite-Voeglele, F.; Lavelle, F. *Cancer Res.* **1991**, *51*, 4845.



17 R = Ac, R' = Ph

18 R = H, R' = Bu^t

Assim como o taxol, epotilonas (A e B), eleuterobina e discodermolideo, são todas conhecidas por compartilhar um único mecanismo molecular de ação⁶⁰. Elas prendem-se aos microtúbulos, que são importantes estruturas do aparato mitótico das células, e deste modo inibem a divisão celular. Como compartilham este mecanismo, presume-se também que possuam o mesmo grupo farmacofórico (parte da estrutura responsável por sua atividade biológica), e provavelmente usam o mesmo sítio para ligar-se à tubulina, a principal proteína estrutural dos microtúbulos.

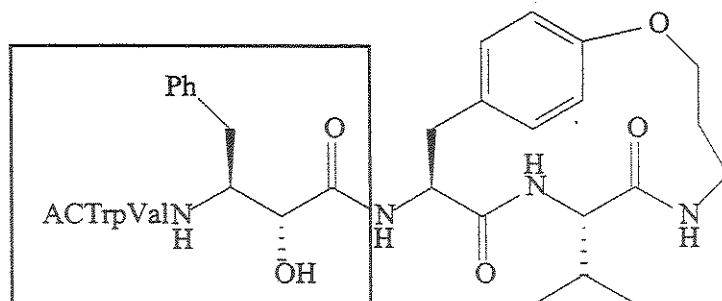
O grupo farmacofórico comum foi descrito⁶¹. No caso do taxol e nonataxel, a predição dos autores deixa de lado todo o núcleo multicíclico da estrutura, mas inclui a cadeia lateral e o substituinte benzoato do anel de 9 membros.

O macrociclo **19**⁶², foi descrito como um potente inibidor de HIV e FIV (Feline Immunodeficiency Vírus) protease. O vírus FIV causa nos gatos uma doença semelhante a AIDS. Este macrociclo contém o segmento fenilnorstatina **13** em sua cadeia lateral e este fragmento é de crucial importância para a sua atividade.

⁶⁰ Nicolaou, K. C.; Roschinger, F.; Vourloumis, D. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1998**, *37*, 2014.

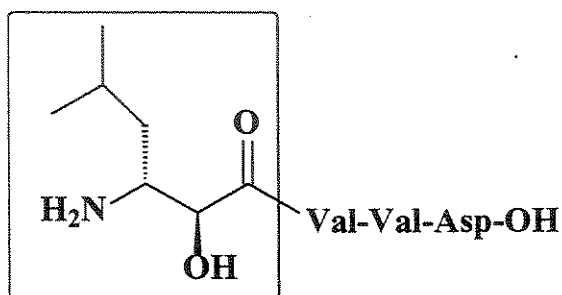
⁶¹ Ojima, I.; Chakravarty, S.; Inoue, T.; Li, S.; He, L.; Horwits, S. D.; Danishefsky, S. J. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1999**, *96*, 4256.

⁶² Mak, C. C.; Brik, A.; Lerner, D. L.; Elder, J. H.; Morris, G. M.; Olson, A. J.; Wong, C. H. *Bio. Med. Chemistry* **2003**, *11*, 2025.

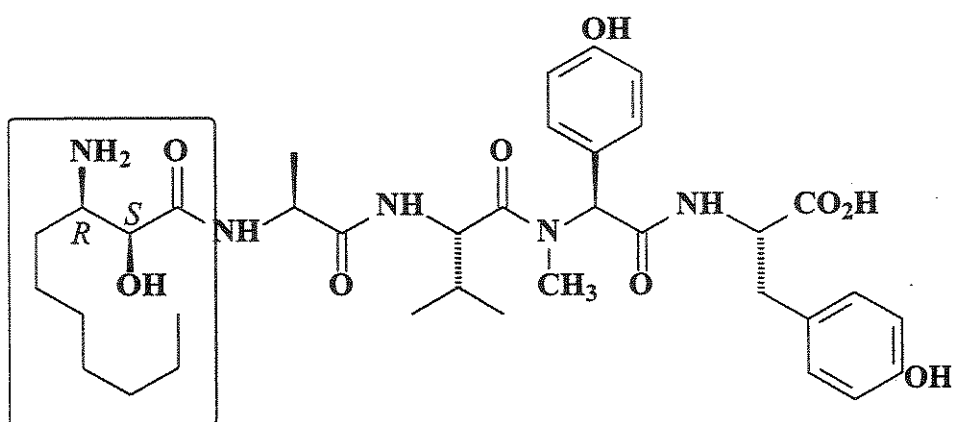


19

A molécula amastatina **20**⁶³ e o produto natural microginina **21**⁶⁴ que foi isolado de culturas frescas de alga *Microcystis aeruginosa* exibem uma atividade inibidora em relação à enzima angiotensina.



20



21

⁶³ Rich, D. H.; Moon, B. J.; Boparai, A. S. *J. Org. Chem.* **1997**, *62*, 2458-2465.

⁶⁴ Okino, T.; Matsuda, H.; Murakami, M.; Yamaguchi, K. *Tetrahedron Lett.* **1993**, *34*, 501-504.

É evidente que a efetiva abordagem sintética de derivados β -amino- α -hidroxi-ácidos com estereoquímica absoluta e relativa definida é de suma importância e como o número de β -amino- α -hidroxi-ácidos continua expandindo, um protocolo para sua síntese é sempre desejável.

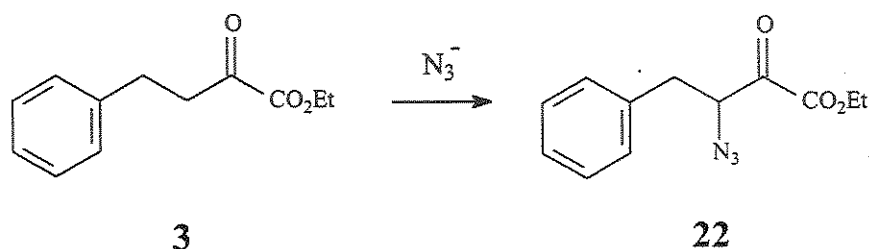
3.2 Objetivos

Tendo em vista a importância de β -amino- α -hidroxiácidos homoquirais e seus derivados como componentes de estruturas complexas de moléculas com comprovadas atividades farmacológicas, pretende-se desenvolver um estudo sintético visando encontrar uma metodologia de aplicação geral, e preferencialmente simples. Foi estudada principalmente a redução de α -ceto-ésteres tendo como substituinte no carbono α à cetona grupos que possam levar a substituintes nitrogenados, visando a preparação de β -amino- α -hidroxiácidos. Nesta etapa chave serão criados dois centros quirais consecutivos, na qual utilizam-se microrganismos disponíveis na coleção da Fundação de Pesquisas André Tosello e a levedura *Saccharomyces cerevisiae*, disponível comercialmente. Os microrganismos poderão ser utilizados, tanto na forma livre quanto imobilizada.

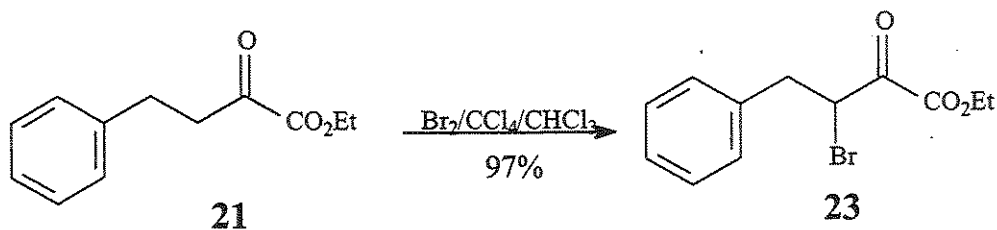
3.3. Resultados e Discussões

3.3.1 Bioedução de 3-bromo-2-oxo-4-fenilbutirato de etila 23

Inicialmente pretendia-se realizar a α -azidação direta de 2-oxo-4-fenilbutirato de etila **3** visando a síntese da Fenilnorstatina **13** e para isto foram utilizadas diferentes metodologias^{65,66,67,68}. O composto 3-azido-2-oxo-4-fenilbutirato de etila **22** foi sintetizado e devido a sua instabilidade não foi possível realizar a sua bioedução.



Como alternativa, realizou-se a α -halogenação de 2-oxo-4-fenilbutirato de etila **3**. O composto 3-bromo-2-oxo-4-fenilbutirato de etila **23** mostrou-se estável possibilitando o estudo da bioedução.



⁶⁵ Hoffman, R. V.; Johnson, M. C.; Okonya, J. F. *J. Org. Chem.* **1997**, *62*, 2458.

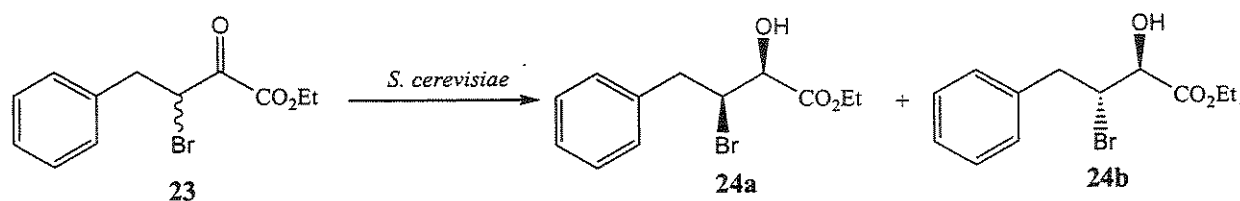
⁶⁶ Fadnavis, N. M.; Vadivel, S. K.; Sharfuddin, M.; Bhalerao, U. T. *Tetrahedron: Asym.* **1997**, *8*, 4003.

⁶⁷ Moriarty, R. M.; Vaid, R. K.; Ravikumar, V. T.; Vaid, B. K. Hopins, T. E. *Tetrahedron* **1988**, *44*, 1603.

⁶⁸ Evans, D. A.; Britton, T. C.; Ellman, J. A.; Dorow, R. L. *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 4011.

A **Tabela 3.1** apresenta a redução biocatalítica de **23** por diferentes microrganismos. Analisando a **Tabela 3.1** observa-se que a diastereosseletividade possui uma relação direta com o pH do meio de reação, pois em pH 4,0 a seletividade é maior quando comparada a pH 7,0.

Nas **entradas 1-4** foi observado uma maior seletividade com relação ao diastereoisômero *anti* **24b**. Nas **entradas 5-10** verificou-se uma pequena seletividade com relação ao diastereoisômero *syn* **24a**. A partir da análise destes resultados, sugerimos que esteja ocorrendo uma resolução cinética dinâmica durante a redução de **23**, onde o pH do meio pode estar exercendo um efeito sobre a taxa de epimerização em C₂ e consequentemente influenciando a razão diastereoisomérica.



Utilizando-se as bactérias *Serratia rubidea* e *Serratia marcescens* (**entradas 11-14**) obtém-se excelente excesso diastereoisomérico e enantiomérico para **24b**, porém o rendimento obtido é baixo para a aplicação em uma rota sintética. Estas bactérias são facilmente contaminadas, mesmo as cepas guardadas em estoque (condições especiais no refrigerador) e sendo sempre necessária a obtenção de novas cepas da Fundação de Pesquisas André Tosello. Este processo é lento e trabalhoso e por isto foi descartado.

A levedura *Saccharomyces cerevisiae* apresentou o resultado mais promissor, pois o tempo de reação é menor e o rendimento é superior quando comparado com as demais reações. Optou-se por otimizar esta reação devido à facilidade de se trabalhar com a levedura *Saccharomyces cerevisiae*, tendo em

vista que a mesma é obtida comercialmente na forma liofilizada e dispensa todo o processo de manuseio e crescimento de culturas microbiológicas.

Tabela 3.1. Redução de 3-bromo-2-oxo-4-fenilbutirato de etila **23** utilizando-se diferentes microrganismos utilizando células em repouso.

	Micorganismo	pH	Rend. (%) ^a	syn:anti ^b	ee (%)	
					syn	anti
1	<i>Rhodotorula minuta</i>	4,0	59	32 : 68	93	>99
2	<i>Rhodotorula minuta</i>	7,0	75	44 : 56	89	94
3	<i>Rhodotorula glutinis</i>	4,0	39	34 : 66	90	>99
4	<i>Rhodotorula glutinis</i>	7,0	50	45 : 55	96	>99
5	<i>Candida utilis</i>	4,0	65	64 : 36	85	89
6	<i>Candida utilis</i>	7,0	62	65 : 35	84	84
7	<i>Pichia canadensis</i>	4,0	48	75 : 25	90	97
8	<i>Pichia canadensis</i>	7,0	65	65 : 35	90	74
9	<i>L. mesenteroides</i>	4,0	55	68 : 32	90	80
10	<i>L. mesenteroides</i>	7,0	48	66 : 34	91	74
11	<i>Serratia rubidea</i> ^c	4,0	4	3 : 97	>99	>99
12	<i>Serratia rubidea</i> ^c	7,0	10	0 : 100	-----	>99
13	<i>Serratia marcescens</i> ^c	4,0	7	0 : 100	----	>99
14	<i>Serratia marcescens</i> ^c	7,0	15	0 : 100	-----	>99
15	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> ^d	4,0	87	69 : 31	83	95
16	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> ^d	7,0	80	64 : 36	78	94

^a O tempo de reação foi de 72 horas. ^b Os excessos diastereoisoméricos e enantioméricos foram determinado por CG/MS. ^c O tempo de reação :96 horas. ^d O tempo de reação foi de 24 horas **Condições reacionais:** 4,0 g de massa celular, 100 mL de uma solução tampão citrato pH 4,0 (0,5 mol/L) e 140 mg de **23**.

Realizou-se assim a bioedução de **23** com a levedura *Saccharomyces cerevisiae* em diferentes condições como mostrado na **Tabela 3.2**. Como suporte para a imobilização utilizou-se os géis hidrofílicos alginato de cálcio e κ -carragena, além do polivinilálcool Lenticats®.

Tabela 3.2. Reduções biocatalíticas de 3-bromo-2-oxo-4-fenilbutirato de etila **23** com a levedura *Saccharomyces cerevisiae*.

	Suporte	pH	Rend. (%) ^a	syn : anti ^b	ee (%)	
					syn	anti
1	Alginato de cálcio	4,0	92	85 : 15	96	>99
2	Alginato de cálcio	7,0	92	62 : 38	87	>99
3	κ -Carragena	4,0	87	75 : 25	92	>99
4	κ -Carragena	7,0	92	64 : 36	84	>99
5	Lenticats®	4,0	79	75 : 25	95	>99
6	Lenticats®	7,0	85	63 : 37	90	>99

^a O tempo de reação: 24 horas. ^b Os excessos diastereoisoméricos e enantioméricos foram determinado por CG/MS. **Condições reacionais:** 1,0 g de *Saccharomyces cerevisiae*, 100 mL de uma solução tampão citrato pH 4,0 (0,5 mol/L) e 140 mg de **23**, 2,0 g de glicose iniciais seguido da adição de 0,4 g de glicose a cada 6 horas.

Analizando a **Tabela 3.2**, verificamos que o diastereoisômero *anti* **24b** sempre apresenta excelente *ee*. Os géis polissacarídeos como o alginato e a κ -carragena, **entrada 3,4**, diminuem a disponibilidade de substrato frente à levedura, pois a imobilização confere o encapsulamento da levedura. Entretanto, constatou-se que a combinação da imobilização em alginato de cálcio e pH 4,0 fornece uma maior seletividade com relação ao diastereoisômero *syn* **24a**, **entrada 1**. Nas **entradas 5 e 6** o Lenticats® foi utilizado como suporte, onde a levedura é imobilizada em polivinilálcool

(PVA). É importante notar que a diastereosseletividade é menor quando comparado ao alginato.

A bioedução de **23** utilizando a levedura *Saccharomyces cerevisiae* imobilizada em alginato de cálcio possui uma alta diastereo- e enantiosseletividade como já foi apresentado. Quando esta reação é reproduzida em uma escala maior verifica-se uma diminuição na seletividade como é apresentado na **Tabela 3.5**.

Tabela 3.5. Reduções de 23 por *Saccharomyces cerevisiae* imobilizado em alginato de cálcio em diferentes condições

Entrada	Tempo (h)	Rendimento (%)	syn / anti	ee (%)		$[\alpha]^{20}_D$	
				syn	anti	syn	anti
1 ^a	24	82	85 / 15	96	99	-16,80	-18,76
2 ^b	24	80	66 / 34	85	99	-14,55	-18,38

Condições reacionais: a) 1,0 g de *Saccharomyces cerevisiae*, 100 mL de uma solução tampão citrato pH 4,0 (0,5 mol/L) e 140 mg de **23**, 2,0 g de glicose e 0,4 g de glicose a cada 6 horas. b) 5,0 g de *Saccharomyces cerevisiae*, 400 mL de uma solução tampão citrato pH 4,0 (0,5 mol/L) e 700 mg de **23**, 8,0 g de glicose e 1,6 g de glicose a cada 6 horas.

3.3.1.1 Determinação da configuração absoluta e relativa de 3-bromo-2-hidróxi-4-fenilbutirato de etila **24a** e **24b**.

A configuração relativa dos compostos **24a** e **24b** foi determinada através da análise dos dados de RMN de ¹H. Os deslocamentos químicos e as

constantes de acoplamento estão condizentes com os dados da literatura⁶⁹. Os compostos **25a** e **25b** foram utilizados como referência⁶⁹.

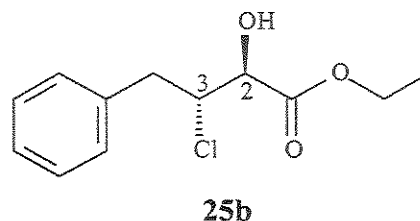
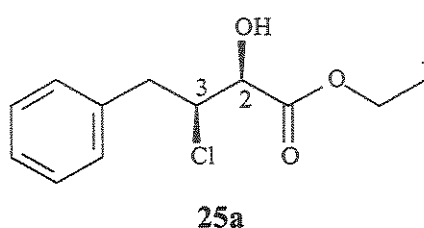
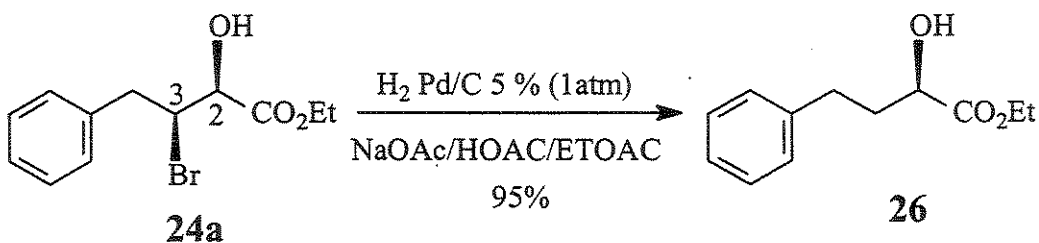


Tabela 3.3. Dados de RMN de ¹H de 24a, 24b, 25a e 25b.

	δ (ppm) H-2	$J_{2,3}$ (Hz)
24a	4,50	1,8
25a	4,44	1,8
24b	4,46	2,6
25b	4,24	2,4

Para a determinação da configuração absoluta o bromo foi retirado através de hidrogenação catalítica. O bromo foi facilmente substituído durante a hidrogenólise⁷⁰.



⁶⁹ Tsuboi, S.; Furutani, H.; Ansari, M. H.; Sakai, T.; Utaoka, M.; Takeda, A. *J. Org. Chem.* **1993**, *58*, 486.

⁷⁰ Sharpless, B.; Fleming, P. R.; *J. Org. Chem.* **1991**, *56*, 2869.

Tabela 3.4. Dados de rotação ótica de 26.

	$[\alpha]^{25}_D$
26	-32,5
26 ⁷¹	-22,1

O composto **26** gerado a partir de **24a** apresenta $[\alpha]^{25}_D = -32,5$. Este valor foi comparado com a literatura para o composto (*R*)-(-)-2-hidroxi-4-fenilbutirato de etila e a partir desta comparação atribuiu-se a configuração *S* para o carbono 2 de **24a**. Sendo **24a** o distereoisômero *syn* atribuímos a configuração *S* para o carbono 3. O mesmo procedimento foi realizado com o composto **24b**. Os compostos possuem a seguinte configuração absoluta: (**2S**, **3S**)-3-bromo-2-hidroxi-4-fenilbutirato de etila (**24a**) e (**2S**, **3R**)-3-bromo-2-hidroxi-4-fenilbutirato de etila (**24b**).

3.3.1.2 Estudo cinético da bioedução de 3-bromo-2-oxo-4-fenilbutirato de etila **23**.

Para verificar os principais fatores que estão afetando esta reação, realizou-se um estudo cinético da mesma.

Para a primeira reação deste estudo (**Reação 1**), utilizou-se a seguinte condição reacional: 1,0 g de fermento de pão liofilizado (livre), 50 mL de uma solução tampão citrato pH 4,0 (0,5 mol/L) e 140 mg (0,5 mmol) de **23**.

Na **Figura 3.1a** pode-se verificar que em 24 horas de reação 60% de **23** foi consumido e que nos instantes iniciais a velocidade da reação é maior. A

⁷¹ Dao, D. H.; Hornes, S.; Okamura, M.; Akasaka, T.; Kawai, Y.; Hida, K.; Ohno, A. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* 1998, 71, 425.

relação diastereoisomérica entre **24a** e **24b** nos instantes iniciais da reação chega a ser de 66/34 (*syn/anti*), e após 7 horas ela diminui, ou seja, à medida que a reação continua a quantidade de **24b** aumenta. O excesso enantiomérico para esta reação também foi acompanhado. Analisando o gráfico da **Figura 3.1b** verifica-se que para o composto **24b** apesar de uma pequena oscilação, o *ee* final da reação é aproximadamente o mesmo desde o início da reação (86%). Para **24a** ocorreu uma queda no excesso enantiomérico de 81% para 70%. Comparando este resultado com o apresentado na **Tabela 3.1** (pág. 50) nota-se que o rendimento e a seletividade diminuem quando a glicose não é adicionada.

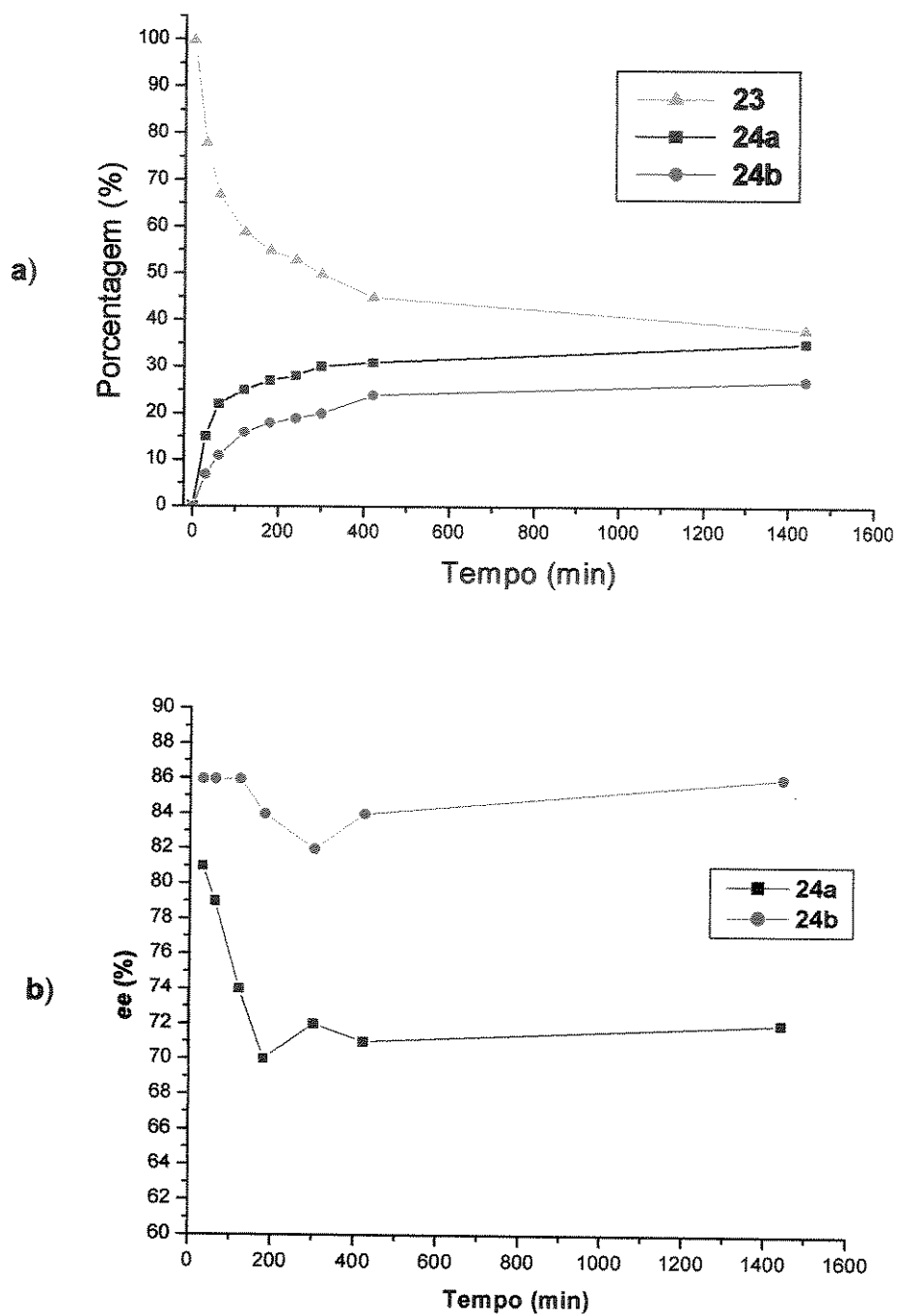


Figura 3.1. a) Monitoramento da bioredução de **23** mediada por *Saccharomyces cerevisiae* (Reação 1). b) Variação do excesso enantiomérico dos diastereoisômeros **24a** e **24b** durante a reação 1.

Analisando estes dados, verificou-se que nos instantes iniciais da reação são obtidos os melhores resultados e sugere-se que isto ocorra porque nestes instantes a quantidade de substrato disponível para a célula é pequena, pois ainda não está totalmente dissolvido no meio. Para comprovar esta hipótese realizou-se a mesma reação com uma quantidade menor de substrato. Então, utilizou-se a seguinte condição reacional (**Reação 2**): 1,0 g de fermento de pão liofilizado, 50 mL de uma solução tampão citrato pH 4,0 (0,5 mol/L) e 40 mg (0,14 mmol) de **23**.

Na **Figura 3.2a** pode-se constatar que em 24 horas de reação cerca de 90% de **23** foi consumido e nos instantes iniciais a velocidade de consumo do material de partida é rápida, em 1 hora de reação foi obtido 60% de conversão. Verificou-se que com uma quantidade de substrato menor, a velocidade da reação também é maior. A relação diastereoisomérica durante esta reação nos instantes iniciais é de 75/25 (*syn/anti*) e após 7 horas ela diminui para 66/34. Os excessos enantioméricos obtidos (**Figura 3.2b**) para esta reação são superiores aos determinados para a **Reação 1**. Para **24b** obteve-se um *ee* variando de 98 a 96 % e para **24a** o *ee* entre 89 e 80 %.

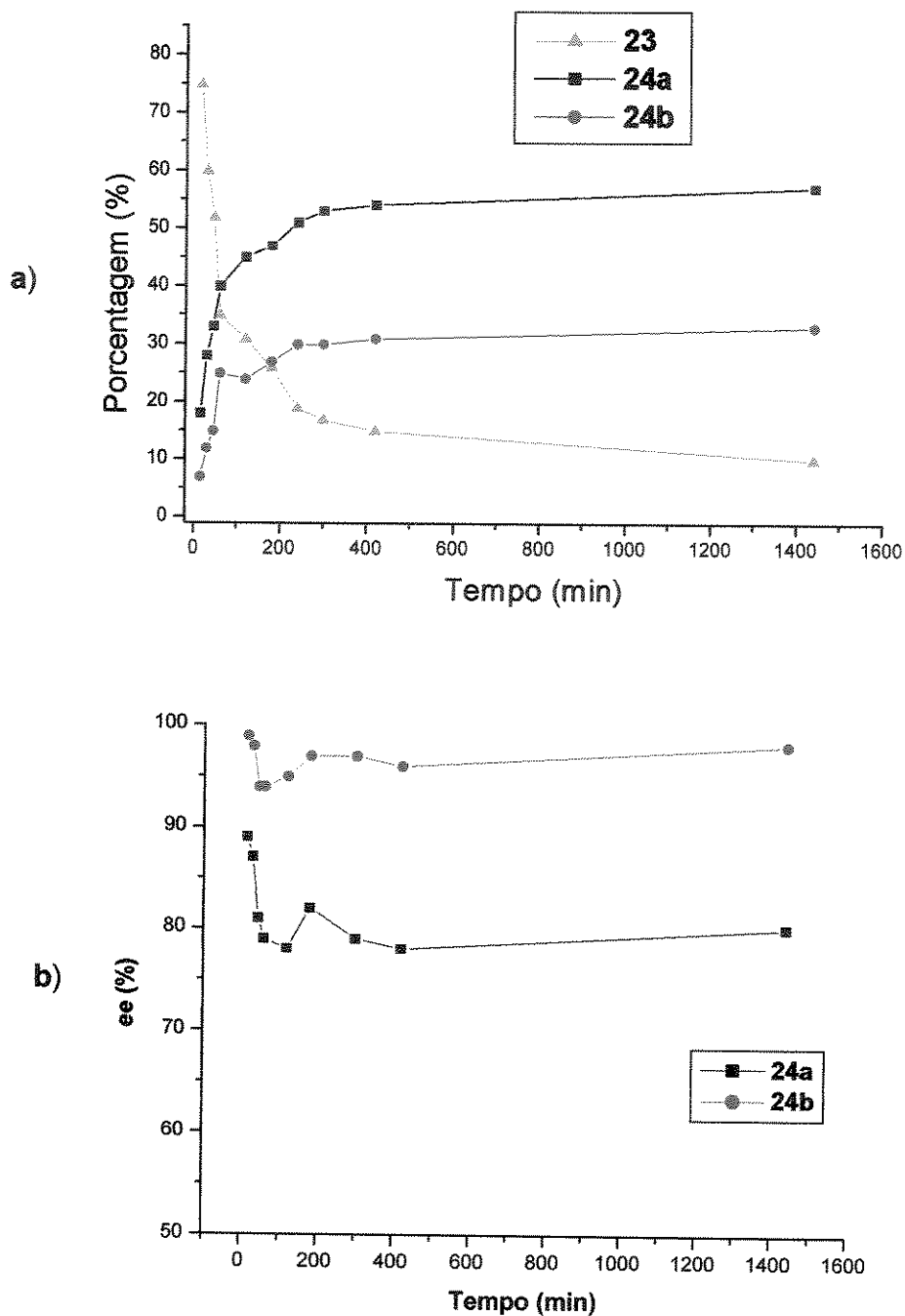
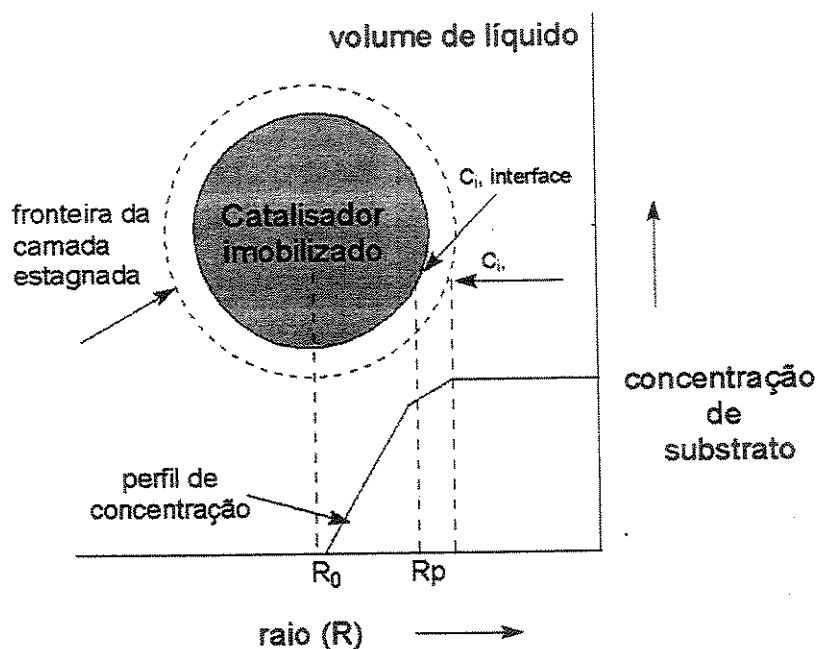


Figura 3.2. a) Monitoramento da bioredução de **23** mediada por *Saccharomyces cerevisiae* (Reação 2). b) Variação do excesso enantiomérico dos diastereoisômeros **24a** e **24b** durante a Reação 2.

Analisando estas duas reações verifica-se que a diastereo- e enantioseletividade desta redução estão diretamente relacionadas à concentração de substrato. Então, para aumentar a seletividade realizou-se uma reação com a levedura imobilizada em alginato de cálcio. Neste tipo de imobilização o biocatalisador fica encapsulado em *esferas* de alginato, assim, gerando uma barreira para o substrato alcançar as células e com isto, cria-se um efeito de partição do substrato para o biocatalisador imobilizado (**Esquema 3.2**). Conseqüentemente, pode-se diminuir a quantidade de substrato disponível, fazendo com que a transferência de massa (substrato) para o biocatalisador seja o fator preponderante nesta reação.



Esquema 3.2. Representação esquemática do perfil de concentração de substrato em um biocatalisador imobilizado em partícula esférica.

Para a **Reação 3**, utilizou-se a seguinte condição reacional: 1,0 g de fermento de pão imobilizado em alginato de cálcio 2,5% (p/v), 50 mL de uma solução tampão citrato pH 4,0 (0,5 mol/L) e 40 mg (0,14 mmol) de **23**.

Na **Figura 3.3a** pode-se verificar que em 2 horas de reação quase todo o material de partida foi consumido. Observa-se que a relação diastereoisomérica durante a **Reação 3** manteve-se em 70/30 (*syn/anti*). Este resultado é superior ao das reações anteriores, pois além de obter uma relação diastereoisomérica melhor esta se mantém basicamente constante do início até o fim da reação. Os excessos enantioméricos de **24a** e **24b** obtidos para esta reação além de serem superiores aos obtidos nas outras reações, estão basicamente constantes durante toda a reação, **Figura 3.3b**. A diastereo- e enantiosseletividade obtidas para a reação com a levedura imobilizada são superiores à da reação com a célula livre, e isto nos indica que o fator governante de nossa reação é a transferência de massa. Pode-se, então, com a levedura imobilizada diminuir a quantidade de substrato disponível para o biocatalisador, e assim, controlar a seletividade da reação.

O consumo de **23** ter sido mais rápido é bem intrigante, pois quando a levedura está imobilizada a quantidade de substrato disponível é menor do que quando ele se encontra na forma livre. A partir deste resultado verificamos que o substrato tem alta afinidade pelo alginato, fazendo com que o substrato tende a ficar dentro ou próximo do biocatalisador. Para comprovar esta hipótese foi realizada a medida do coeficiente de partição conforme apresentado na **Figura 3.4**.

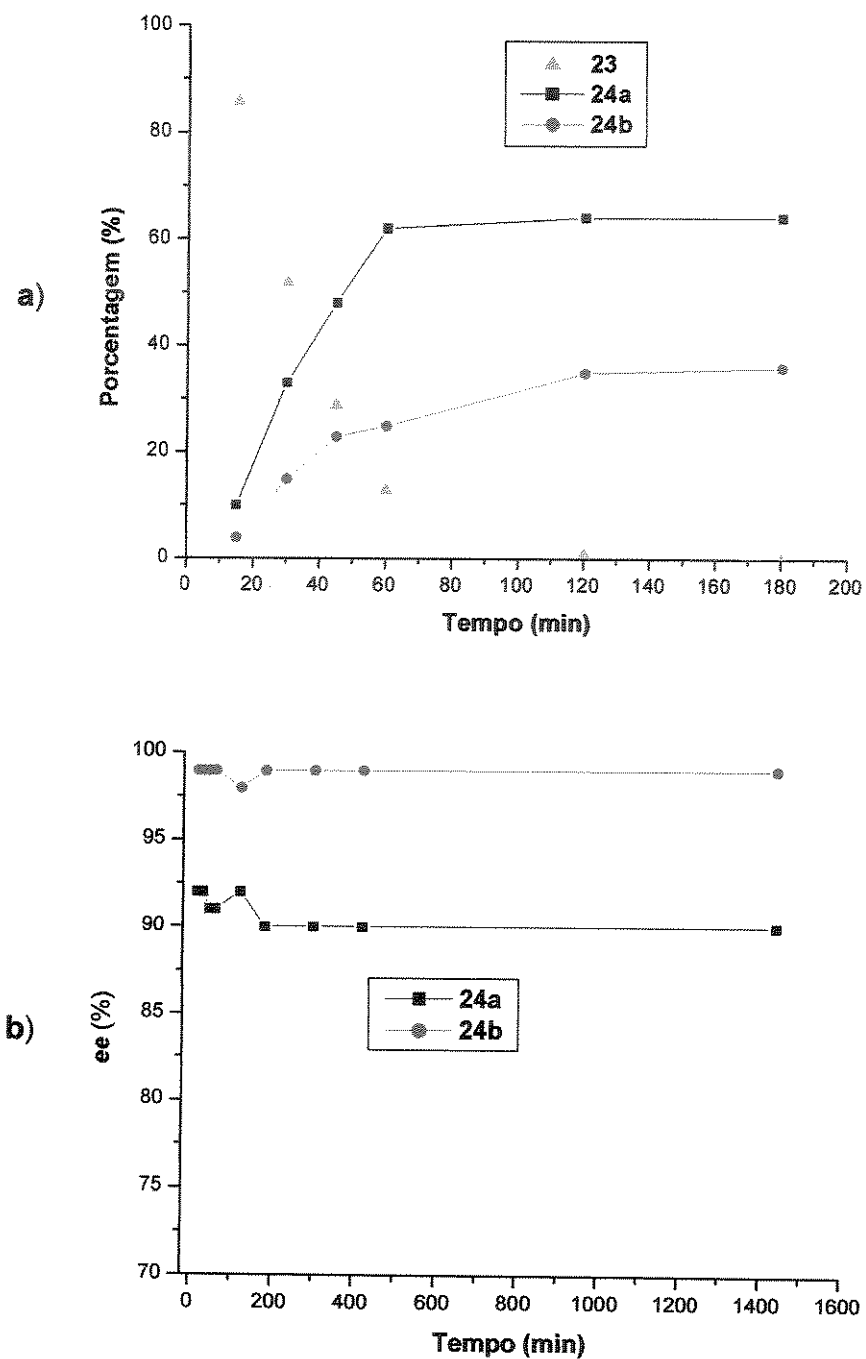


Figura 3.3. a) Bioredução de **23** por *Saccharomyces cerevisiae* imobilizado em alginato de cálcio. b). Variação do excesso enantiomérico dos diastereoisômeros **24a** e **24b** durante a reação com *Saccharomyces cerevisiae* imobilizado em esferas de alginato de cálcio.

A medida do coeficiente de partição **23/24a** nas partículas de alginato de cálcio foram realizadas com as esferas de alginato de diâmetro médio de 3,0 mm. Conforme apresentado na **Figura 3.4** verificamos que a afinidade do substrato **23** pelo gel é maior que pela fase aquosa. Quando se trata do produto **24a** a situação inversa é observada. Estes dados comprovam que esta metodologia é adequada para a reação em questão, pois o substrato apresenta uma maior afinidade pelo hidrogel que pela água.

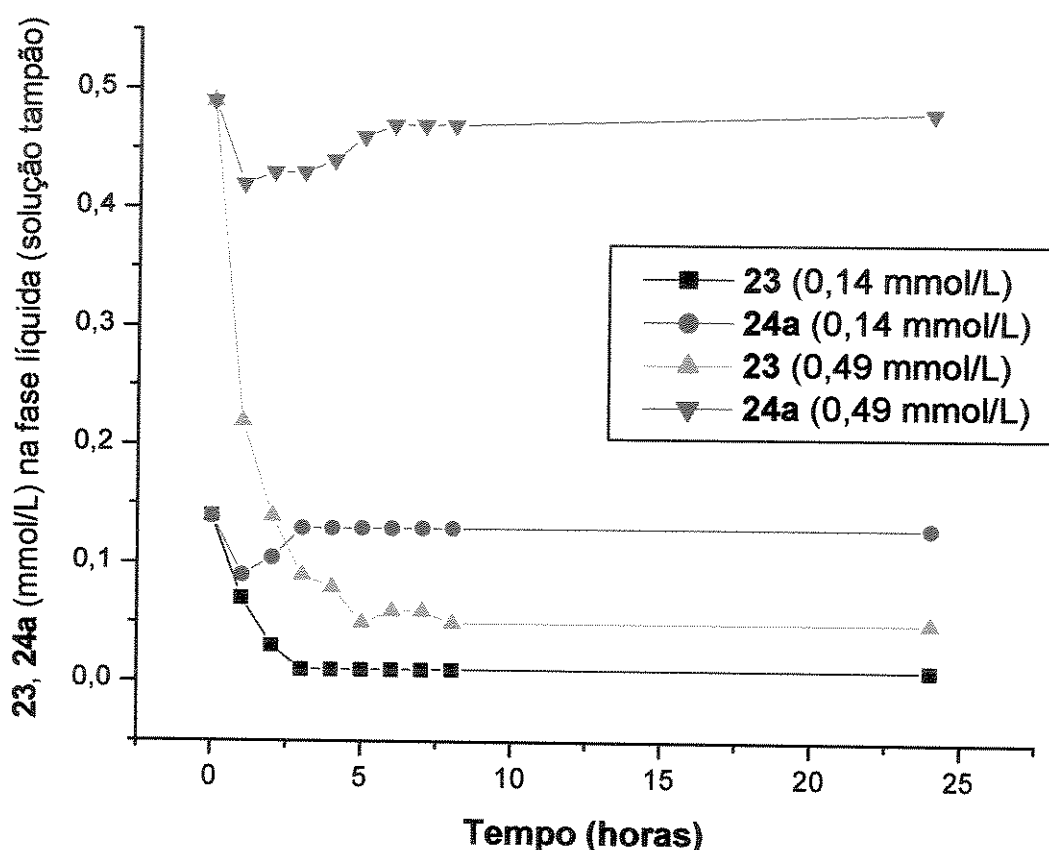


Figura 3.4. Medidas do coeficiente de partição **23/24a** em partículas de alginato de cálcio de 3,0 mm de diâmetro médio sob diferentes concentrações.

Realizou-se, então o monitoramento da reação de bioedução com a seguinte condição reacional: 1,0 g de *Saccharomyces cerevisiae*, 100 mL de uma solução tampão citrato pH 4,0 (0,5 mol/L) e 40 mg de **23**, 2,0 g de glicose iniciais seguido da adição de 0,4 g de glicose iniciais a cada 6 horas.

Na **Figura 3.4a** pode-se verificar que em 2 horas de reação todo o material de partida foi consumido. Observa-se que a relação diastereoisomérica durante a **Reação 3** manteve-se em 75/25 (*syn/anti*). Este resultado é superior ao da reação anterior. Os excessos enantioméricos de **24a** e **24b** estão basicamente constantes durante toda a reação, **Figura 3.4b**.

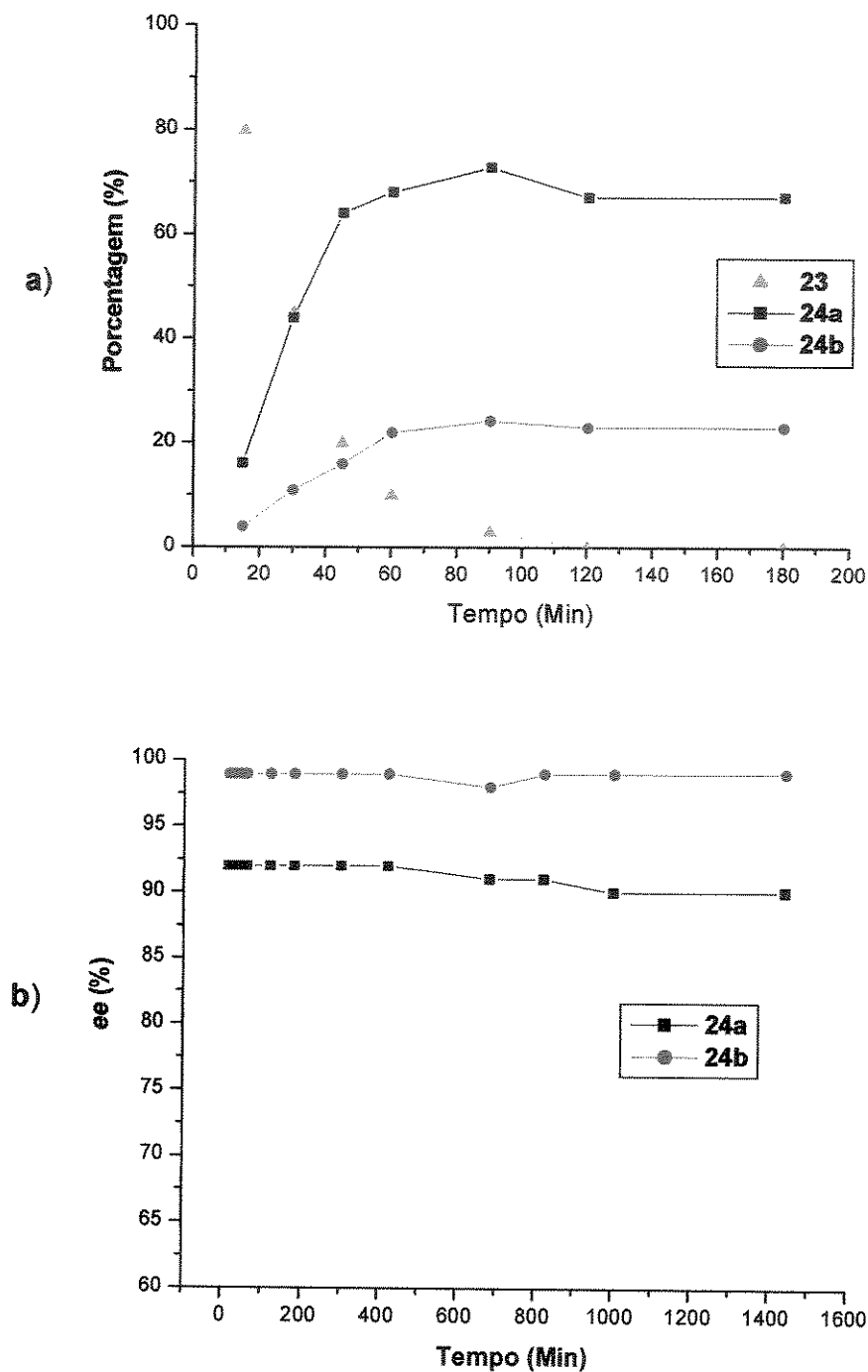


Figura 3.4. a) Biorredução de **23** por *Saccharomyces cerevisiae* imobilizado em alginato de cálcio com adição de glicose. b). Variação do excesso enantiomérico dos diastereoisômeros **24a** e **24b** durante a reação com *Saccharomyces cerevisiae* imobilizado

A partir destes resultados verificou-se que o fator determinante deste sistema é a concentração de substrato disponível ao biocatalisador. Utilizando-se estes dados cinéticos projetamos um bioreator (**Figura 3.5**), e realizou-se uma reação nas mesmas condições anteriores, porém utilizando-se um sistema de imobilização em que a levedura é encapsulada em esferas de duas camadas superpostas de alginato, onde as células ficam restritas na camada interna (**Figura 3.6**).

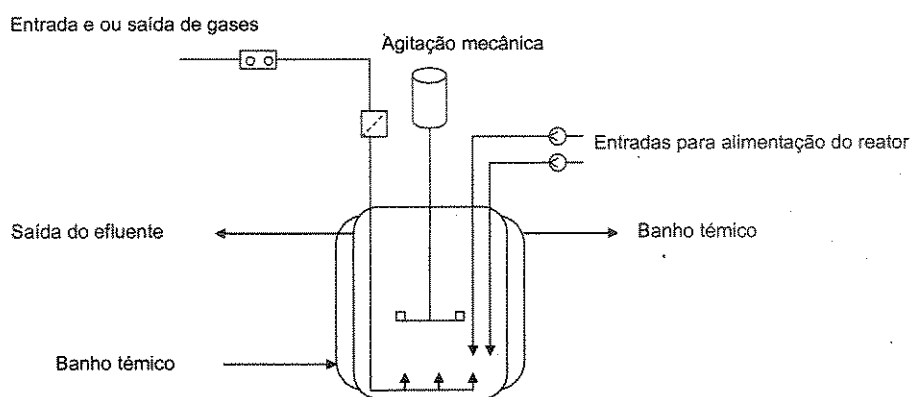
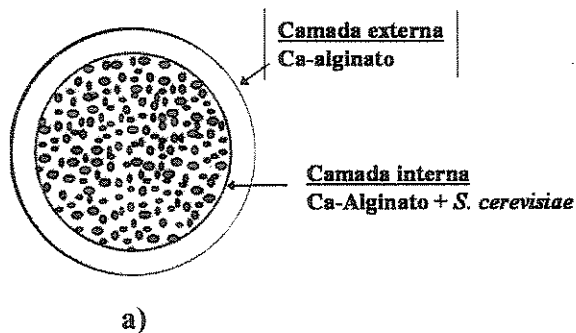
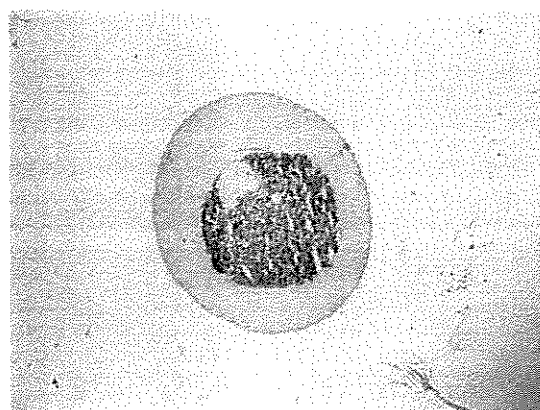


Figura 3.5. Bioreator projetado.



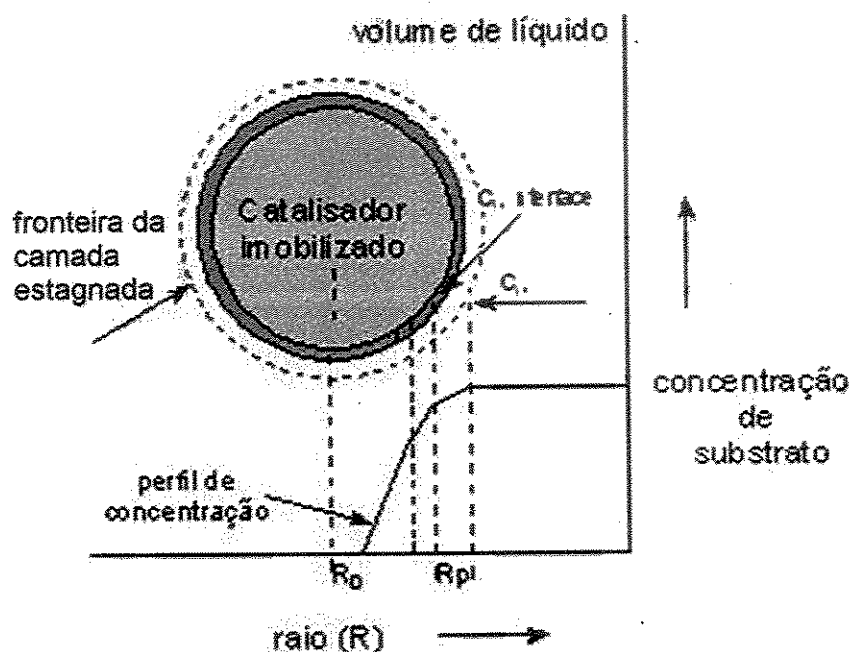
a)



b)

Figura 3.6. a) Representação esquemática de um corte transversal nas esferas de duas camadas de alginato. b) Microfotografia do corte transversal.

Para gerar este tipo de imobilização, utilizou-se o procedimento proposto por Vorlop⁷². Com isto as barreiras para o substrato chegar ao biocatalisador foram aumentadas, fazendo com que **23** seja disponibilizado em pequenas quantidades (**Esquema 3.3**). Utilizando este novo sistema conseguiu-se aumentar a seletividade da reação, onde temos um excesso diaterisomérico de 70% (**Figura 3.6a**) para **24a** e *ee* de 96% (**Figura 3.6b**).



Esquema 3.3. Representação esquemática do perfil de concentração de substrato em um biocatalisador imobilizado em partícula esférica de 2 camadas de alginato.

⁷² Vorlop, K. D.; Steinert, H. N. *Annals New York Academy of Science*, 1987, 501, 212.

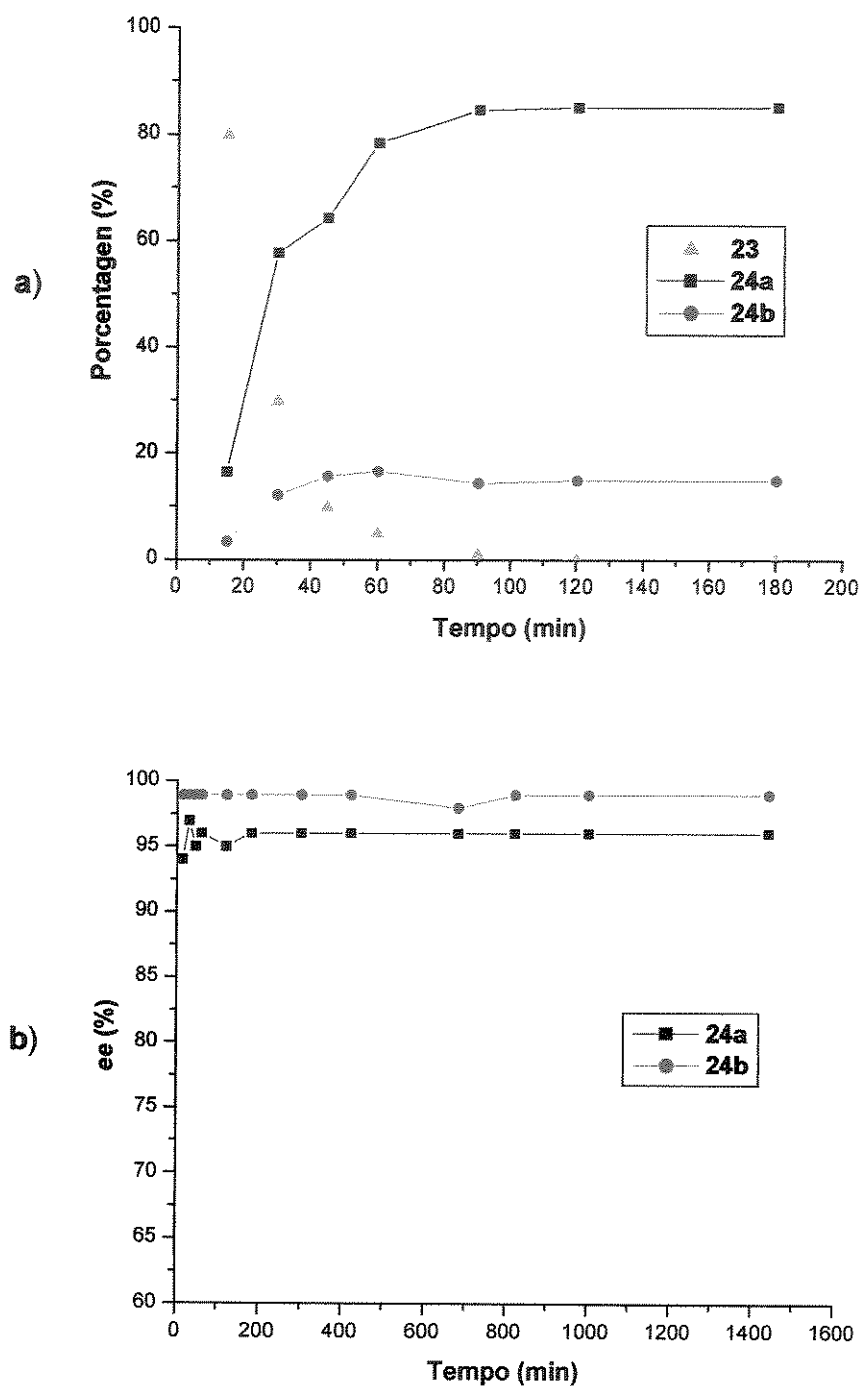
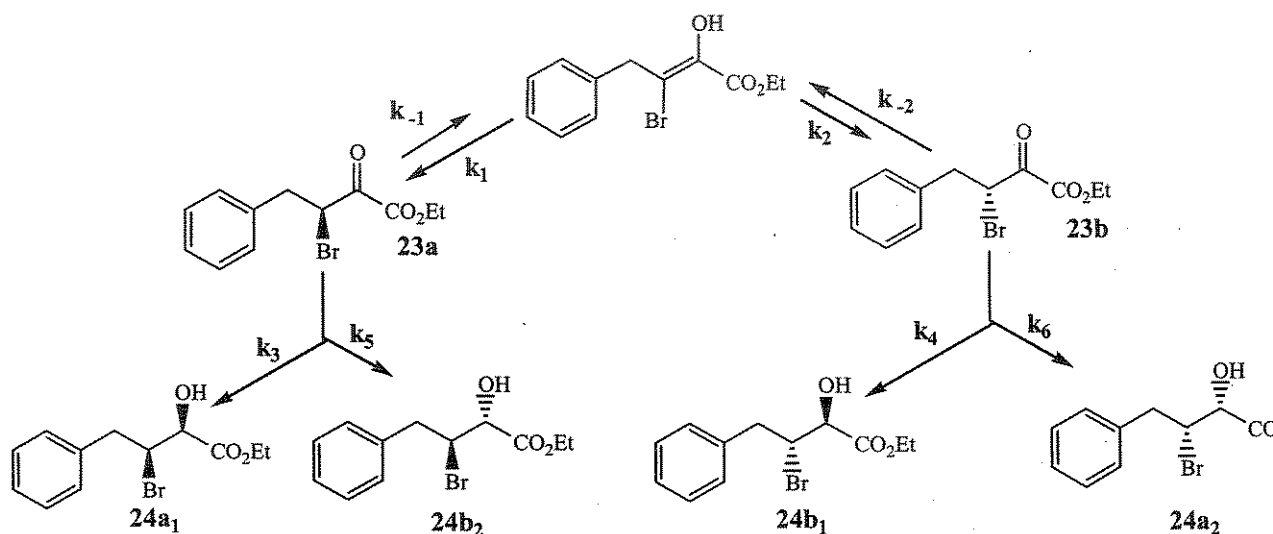


Figura 3.7. a) Biorredução de 23 por *Saccharomyces cerevisiae* imobilizado em duas camadas de alginato de cálcio e com adição de glicose. b). Variação do excesso enantiomérico dos diastereoisômeros 24a e 24b durante a reação com *Saccharomyces cerevisiae* imobilizado

Conforme já havia sido sugerido, acredita-se que durante a bioedução esteja ocorrendo uma resolução cinética dinâmica, como é apresentado no **Esquema 3.4**. Analisando nossos resultados verificamos que a quantidade do diastereoisômero *syn* formado é maior que a quantidade do *anti* indicando ocorrência de uma resolução cinética dinâmica devido a epimerização em C₃. Pode-se afirmar que a velocidade de formação de **24a** é maior do que **24b**. Então sugere-se que **23a** é consumido em uma velocidade maior, e o equilíbrio representado na figura acima esteja mais deslocado para a esquerda, ou seja, k_1 e $k_2 > k_{-1}$ e k_{-2} .



Esquema 3.4. Resolução cinética dinâmica devido a epimerização em C₃ via forma enólica.

Os valores dos excessos enantioméricos para as reações com a levedura livre, indicam que o *ee* de **24a** diminui à medida que a concentração de substrato aumenta. Quando se utiliza uma menor quantidade de substrato (40 mg) obtém-se um *ee* de 80 %. Quando se utiliza uma maior quantidade de substrato, obtém-se um *ee* de 70%. A partir destes resultados sugere-se que $k_3 > k_6$.

Analisando os valores dos excessos enantioméricos para o diastereoisômeros *anti*, verifica-se que o *ee* de **24b** diminui à medida que a concentração de substrato aumenta. Quando se utiliza uma menor quantidade de substrato (40 mg) obtém-se um *ee* de 96%. Quando se utiliza uma maior quantidade de substrato obtém-se um *ee* de 86%. A partir destes resultados sugere-se que $k_4 \gg k_5$.

Comparando estes dados verifica-se que $k_3 > k_4 > k_6 \gg k_5$. Utilizando esta relação entre as constantes de velocidades, pode-se verificar que sempre que este sistema estiver com excesso de substrato todos os enantiômeros possíveis serão obtidos, diminuindo assim os excessos enantio- e diastereoisoméricos.

Para testar a eficácia deste sistema sintetizou-se o composto 3-cloro-2-oxo-fenilbutirato de etila **27** e realizou-se a sua bio-redução comparando o seu resultado com o obtido na redução do mesmo utilizando-se a levedura *Saccharomyces cerevisiae* livre realizado por Tsuboi e colaboradores⁶⁹. Analisando a **Tabela 3.6** verificamos que os resultados por nós obtidos são bem superiores aos da literatura⁶⁹, onde a enantiosseletividade é fator mais discrepante.

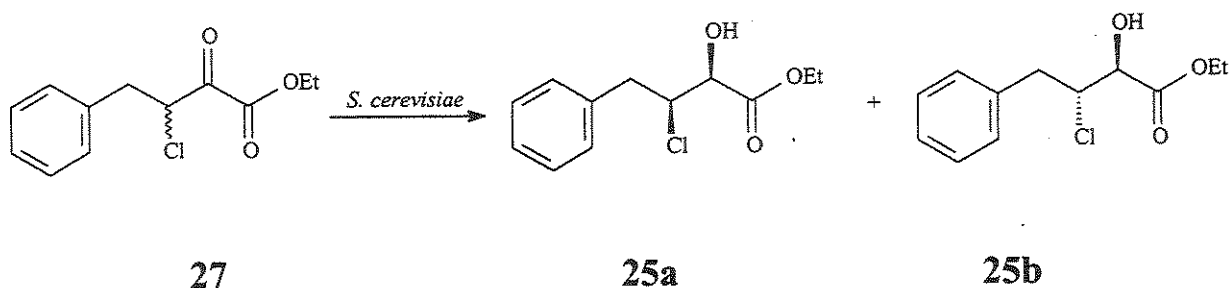


Tabela 3.6. Comparação das bioeduções de **27** mediadas por *Saccharomyces cerevisiae* em diferentes condições.

	Composto	Rend. (%)	syn : anti	ee (%)		[α] ²⁰ _D	
				syn	anti	syn	anti
1 ^a	Lit. ⁶⁹	50	34 : 66	43	95	-16,72	-19,63
2	27	85	30 : 70	85	>99	-35,05	-21,61

a) Condições reacionais: 42,5g de *Saccharomyces cerevisiae*, 300 mL de uma solução tampão citrato pH 7,0 (1,4 mol/L) e 720 mg de **24**, 54,5 g de glicose. b) Condições reacionais: 5,0g de *Saccharomices cerevisiae* imobilizado em esferas de camadas de alginato de cálcio, 400 ml de uma solução tampão citrato pH 4,0 (0,5 mol/L) 630 mg de **24**, 8,0 g de glicose e 1,6 g de glicose a cada 6 horas.

Como pode ser observado na **Tabela 3.6**, a seletividade para a bioedução **27** é inversa com relação a bioedução de **23**. Para a redução de **27** o diastereoisômero preponderante é o *anti*. Esta inversão de seletividade pode estar relacionada diretamente com o substituinte em C₃. Além disto os resultados para a redução de **23** são bem superiores aos obtidos para **27**.

3.3.2 Síntese da Fenilnorstatina 13

Após realizar-se a bioedução de **23**, tentou-se realizar a substituição do bromo por um grupo azido, gerando um grupo equivalente a um grupo amino em C₃. Para a substituição do bromo por um grupo azido em **24a** realizou-se diferentes reações, que estão apresentadas na **Tabela 6**. Em nenhum das

reações foi obtido 3-azido-2-hidroxi-4-fenilbutirato de etila **28**, obtendo-se entretanto o 2,3-epóxi-éster **29**.

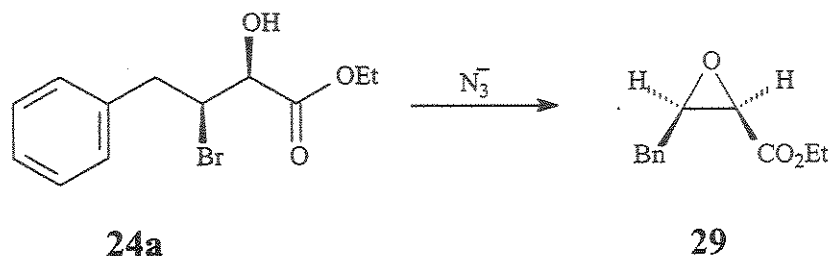


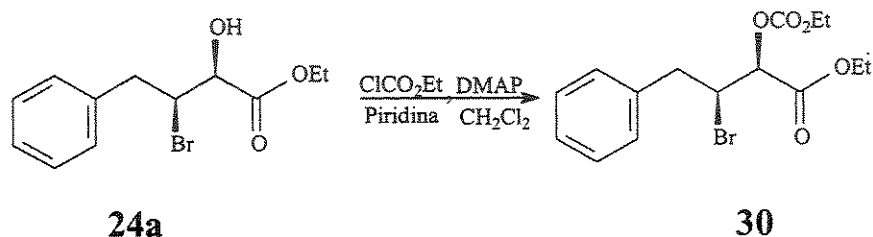
Tabela 3.7. Métodos de azidação de 24a.

Métodos	Azida	Solvente	Temp.	29 (rend. %)
1	NaN ₃	MeOH	25 °C	80
2	NaN ₃	DMSO	10 °C	78
3	NaN ₃	DMSO	50 °C	94
4	NaN ₃	DMF	50 °C	90
5	LiN ₃	DMF	50 °C	97
6	TBAN ₃	DMF	50 °C	92
7	TMSN ₃	CH ₂ Cl ₂	25 °C	-----

Analizando a **Tabela 3.7**, nos **métodos 1-4**, observamos que a 50°C obtivemos um rendimento melhor do que em temperatura inferiores e que a formação do epóxido independe do solvente utilizado. Quando utiliza-se azoteto de lítio (**método 5**) observamos um aumento no rendimento, isto se deve ao fato do azoteto de lítio ter uma solubilidade maior em solventes orgânicos que o azoteto de sódio. O azoteto de lítio e o azoteto de tetrabutylamônio são bastante utilizados em reações de substituição de compostos halogenados, onde o halogênio não está ativado, pois o grupo N₃⁻

estaria mais solubilizado no meio facilitando a substituição. No **métodos 5**, possivelmente a basicidade de N_3^- foi aumentada, levando a um maior rendimento na formação de **29**. No **método 7** utilizando azoteto de trimetilsilano não foi verificada a formação de nenhum produto. Isto pode ser explicado pelo fato de TMSN_3 possuir um caráter básico bem menor que os demais tipos de azotetos. Hoffman⁶⁵ observou a mesma formação do 2,3-epóxi-éster **29** na substituição de 3-[(*p*-nitrobenzenosulfonil)oxi]-2-hidroxi-4-fenilbutirato de etila por NaN_3 em DMF.

Para evitar a formação do 2,3-epóxi-éster, o composto **24a** foi protegido com cloroformiato de etila, gerando **30**.



Foram testadas duas reação de azidação de **30**, utilizando-se NaN_3 em DMF e DMSO à 50 °C e em nenhuma das reações ocorreu a substituição do bromo pelo grupo azido recuperando-se apenas o material de partida.

A partir destes experimentos, propusemos a abertura do epóxido **29** como opção para a formação de **28**. Como um dos objetivos deste trabalho é a obtenção de uma metodologia geral para a síntese de β -amino- α -hidroxi-ácidos (ésteres), optou-se por não utilizar os azotetos para a formação do epóxido, tendo em vista que a substituição do grupo halogenado no composto 3-bromo-2-hidroxi-3-fenilpropionato de etila ocorre sem nenhuma dificuldade⁷³.

Na **Tabela 3.8** estão apresentados os diferentes métodos utilizados para a formação de **29**. O **método 1** apresentou um rendimento baixo. Este método

⁷³ Righi, G.; Rumboldt, G. *J. Org. Chem.* 1993, 61, 3557.

foi otimizado utilizando-se a adição de um catalisador de transferência de fase (**método 2**) e observou-se um aumento no rendimento. Nestes dois métodos observou-se que nenhum material de partida foi recuperado. Supõe-se que pode estar ocorrendo uma reação de hidrólise básica simultaneamente com a epoxidação, onde o 2,3-epoxi-ácido formado esteja na fase aquosa favorecendo a diminuição do rendimento. Utilizando-se NaH e NaOEt (**métodos 3 e 4**) como bases, observa-se um rendimento superior aos **métodos 1 e 2** e recuperação de material de partida. O **método 5** é o mais eficiente para a formação do epóxido **29**, sendo obtido 90% de rendimento.

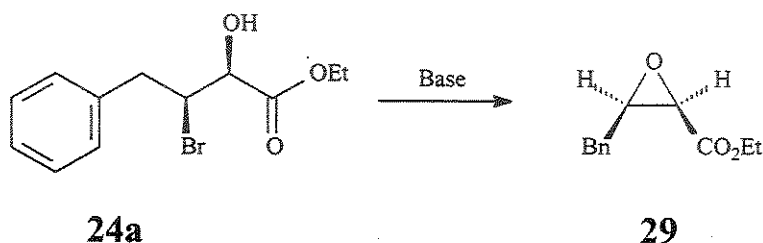


Tabela 3.8. Métodos formação de *cis*-4-fenil-2,3-oxiranobutirato de etila 29.

Método	Base	Solvente	29 (rend. %)	24 a (rend. %)
1	KOH _(aq)	Éter etílico	37	-----
2	KOH _(aq) /TBACl	Benzeno	52	-----
3	NaOEt	EtOH	62	25
4	NaH	Benzeno	60	23
5	K ₂ CO ₃	EtOH	90	5

Com a síntese do 2,3-epóxi ester **29** comprovamos a configuração relativa de **24a**. Os dados de RMN ^1H para **29** foram comparados com os obtidos na literatura⁶⁵. Nesta etapa, então foi obtido o (2*R*,3*R*)-4-fenil-2,3-oxiranobutanoato de etila **29** com 96% de excesso enantiomérico.

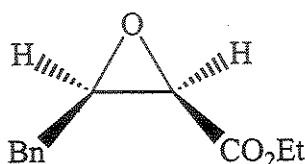
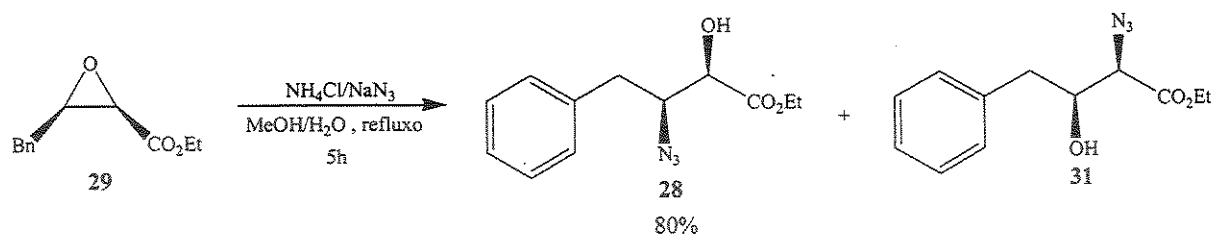


Tabela 3.9. Dados de RMN de ^1H de **29**.

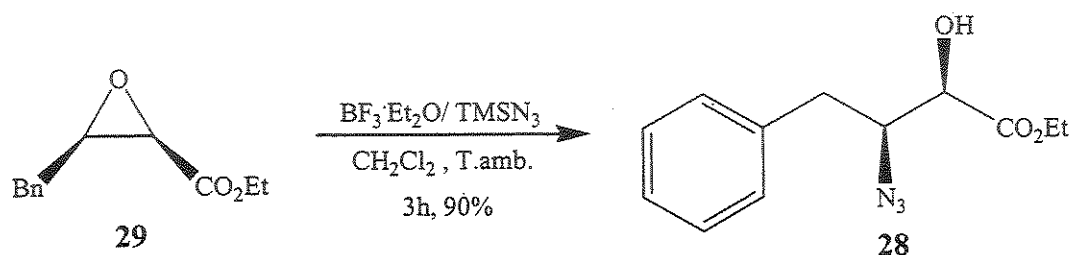
	δ (ppm) H-2	$J_{2,3}$ (Hz)
29	3,58	4,8
Lit ⁶⁵	3,58	4,8

Para a abertura de **29** empregou-se primeiramente uma metodologia que Sharpless⁷⁴ otimizou para a abertura regioseletiva de 2,3-epoxi álcool, utilizando-se $\text{NaN}_3/\text{NH}_4\text{Cl}$ em refluxo de água/dimetoxietano. Esta metodologia foi utilizada com uma pequena modificação, empregando-se etanol/água como solvente. Obteve-se **28** com 80% de rendimento e também um composto de difícil purificação, que a análise por CG/MS sugere ser o composto **31**. Este método apresenta uma boa regioseletividade para a abertura de **29**, em C-3.

⁷⁴ Sharpless, B.; Behrens, C. H. *J. Org. Chem.* 1985, 50, 5696.

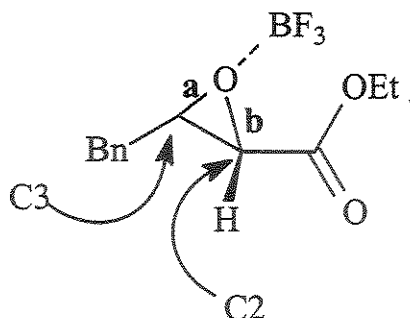


Utilizou-se também TMSN_3 na presença de $\text{BF}_3\cdot\text{Et}_2\text{O}$ para a abertura de **29**, observando-se uma excelente regiosseletividade para esta reação, sendo obtido apenas **28** com 90% de rendimento e 96% de *ee.*



Ainda não está claro que influência o $\text{BF}_3\cdot\text{Et}_2\text{O}$ está exercendo sobre a abertura do epóxido apenas em C_3 . Sugere-se que o efeito exercido seja semelhante ao observado quando outros ácidos de Lewis são utilizados na abertura de 2,3-epóxi-ésteres, amidas⁷⁴ ou alcoóis⁷⁵. Como pode ser observado no **Esquema 3.5** sugere-se que o $\text{BF}_3\cdot\text{Et}_2\text{O}$ esteja coordenado ao 2,3-epóxi-éster de tal forma que os orbitais π da carbonila e a ligação **b** estejam ortogonais entre si, anulando assim o efeito acil do éster em C_2 . A posição C_2 fica menos ativada e o ataque ocorre em C_3 .

⁷⁵ Catasús, M.; Moyano, A.; Pericas, M. A.; Riera, A. *Tetrahedron Lett.* **1999**, 40, 9309.



Esquema 3.5 Abertura regioseletiva de 29.

Comparando estes valores com os fornecidos por Hoffman⁶⁵ (Tabela 3.10), verifica-se que o composto 28 apresenta configuração relativa *syn*.

Tabela 3.10. Dados de RMN de ¹H de 28.

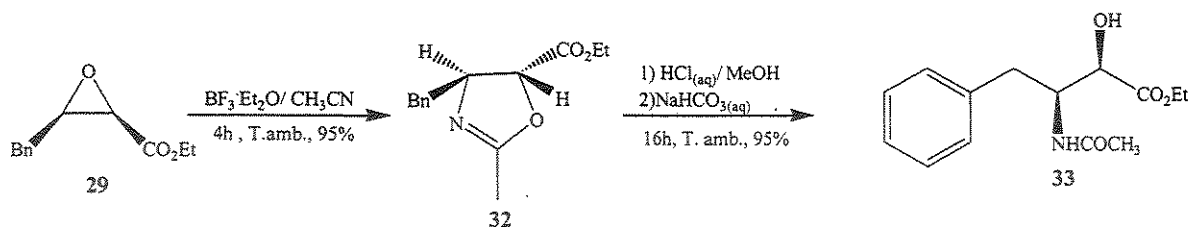
	δ (ppm) H-2	$J_{2,3}$ (Hz)
30	4,10	1,8
Lit ⁶⁵	4,11	2,0

Pode-se concluir que a etapa de abertura do epóxido é bem oportuna, pois a partir de 24a realizamos duas inversões consecutivas em C-3, preservando assim a configuração relativa inicial, além disto utilizando a metodologia sugerida por Pearson⁷⁶ a partir de 28 pode-se obter 13.

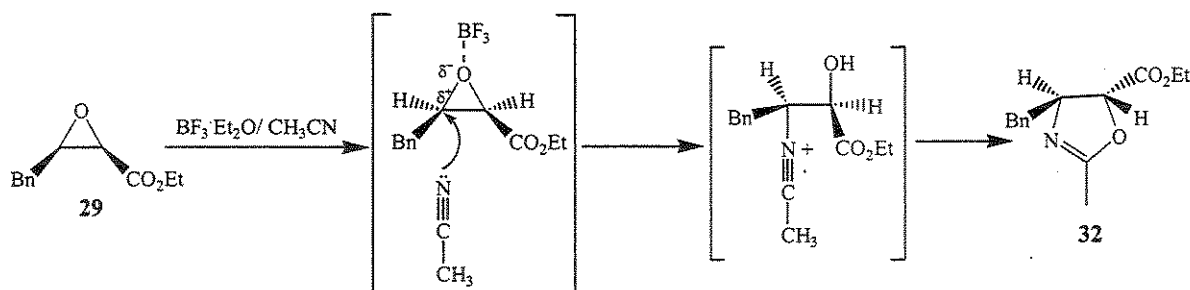
Uma outra alternativa para a obtenção da fenilnorstatina 13 é através da abertura regioseletiva de 29, formando a oxazolina 32. Este procedimento foi proposto por Zwanenburg⁷⁷ e pode gerar β -amino- α -hidroxi-ésteres através da da hidrólise de 32 fornecendo 33.

⁷⁶ Pearson, W. H.; Hines, J. V. *J. Org. Chem.* 1989, 54, 4235.

⁷⁷ Zwanenburg, B.; Thijs, L.; van Diesnst, E.; Legters, J. *Rec. Trav. Chim. Pays-Bas* 1992, 111, 69.



Esta reação ocorre em condições extremamente brandas e com elevado rendimento para **32** (95%), sem perda de enantiosseletividade. É interessante salientar que este protocolo leva a formação de β -amino- α -hidroxi-ésteres pela abertura de 2,3-epóxi-ésteres regioseletivamente. A acetonitrila ataca a posição C-3 do epóxido ativado, como está representado no **Esquema 3.6**, formando um íon nitrilium que leva ao fechamento intramolecular, originando a oxazolina **32**.



Esquema 3.6

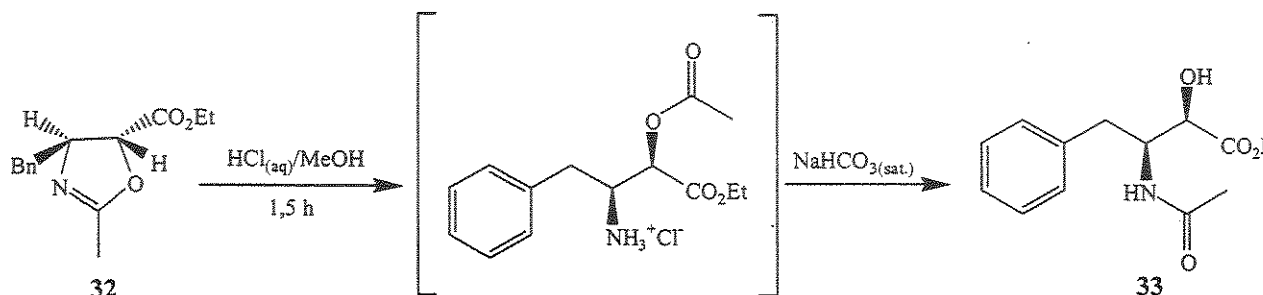
A hidrólise da oxazolina **32** é realizada geralmente em condições extremamente ácidas e nestas condições pode ocorrer perda da enantiosseletividade⁷⁸. Utilizamos uma metodologia mais branda^{79,80} para gerar **33** a partir de **32**. Inicialmente a oxazolina é tratada com HCl (0,5 mol/L)

⁷⁸ Castagnolo, D.; Armaroli, S.; Corelli, F.; Botta, M. *Tetrahedron Asym.* **2004**, *15*, 941.

⁷⁹ Bunnage, M. E.; Davies, S. G.; Goodwin, C. J. *J. Chem. Soc. Perkin Trans 1* **1994**, 2385.

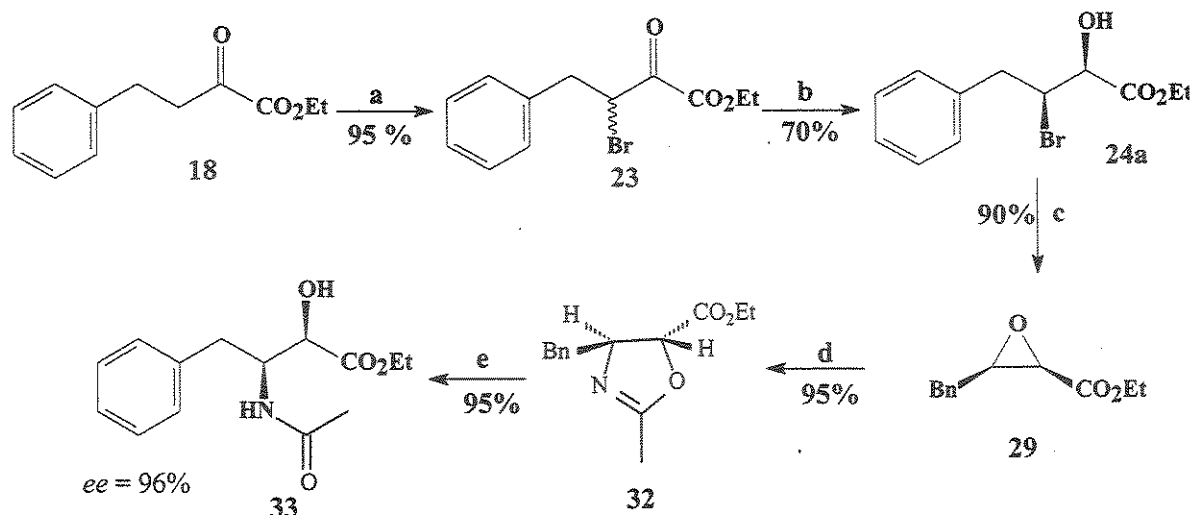
⁸⁰ Ruano, J. L. G.; Paredes, C. G. *Tetrahedron Lett.* **2000**, *41*, 5357.

gerando um intermediário que após o tratamento com uma solução saturada de NaHCO_3 ocorre uma transferência intramolecular gerando **33**.



Esquema 3.7

No **Esquema 3.8** está representada a rota sintética para a síntese do β -amino- α -hidróxi-éster **33** que é um derivado da fenilnorstatina **13**. O composto (2*S*, 3*S*) 3-bromo-2-hidroxi-4-fenilbutirato de etila **24a** obtido por redução biocatalítica com *Saccharomyces cerevisiae* é convertido em **29**, posteriormente realiza-se a abertura regiosseletiva do 2,3-epóxi-éster, obtendo-se **32**. O composto **32** foi hidrolisado, gerando **33**. Obtem-se **33** com um rendimento global de 54 % e uma excelente enantiosseletividade (96% de *ee*).

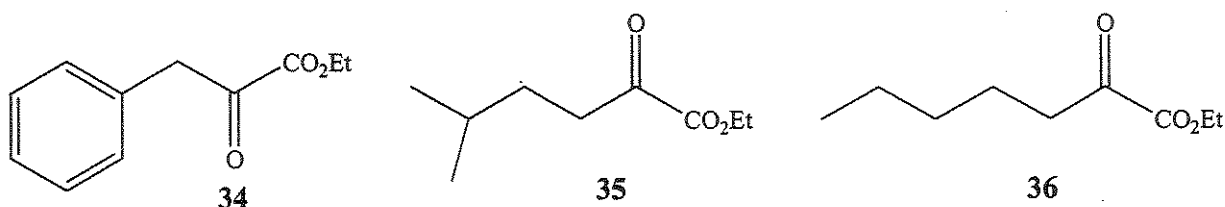


Esquema 3.8. Reagentes e condições: a) Br₂, CCl₄/CHCl₃, T. amb., 1h; b) *Saccharomyces cerevisiae* imobilizado em alginato de cálcio, pH 4.0, 30 °C, 24 h; c) K₂CO₃, EtOH, 12h; d) BF₃•Et₂O, CH₃CN, T. amb., 3 h, e) HCl(aq)/MeOH, NaHCO₃(sat), 16 h.

3.3.3 Síntese de β-amino-α-hidroxi-ésteres

Utilizando a metodologia desenvolvida e otimizada para a síntese de β-amino-α-hidroxi-ésteres (**Esquema 3.8**), estendeu-se esta metodologia para a síntese de outras moléculas.

Primeiramente, foram sintetizados os α-ceto-ésteres **34-36**.



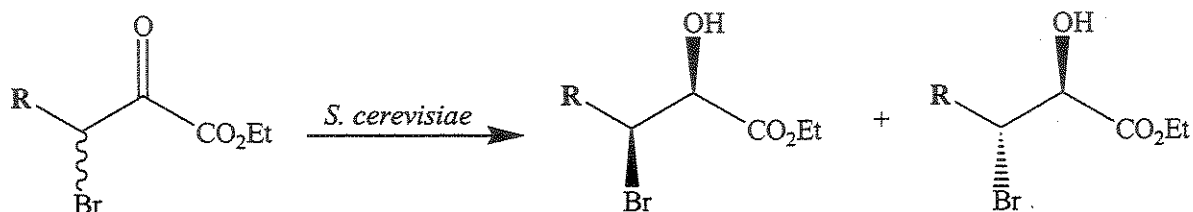
O composto **34** foi obtido através da esterificação do ácido fenilpirúvico, disponível comercialmente.

Os compostos **35** e **36** foram sintetizados através de uma reação de Grignard do 2-bromo-2-metil-propano e do 1-bromo-pentano, respectivamente, com o oxalato de dietila.

Os 3-bromo-2-oxo-ésteres foram sintetizados através da adição de uma solução de $\text{Br}_2/\text{CCl}_4/\text{CHCl}_3$, sendo todos obtidos quantitativamente.

Os compostos **37-39** foram bio-reduzidos pelo método otimizado para **23** e os resultados estão apresentados na **Tabela 3.10**.

Tabela 3.10 . Bio-redução de 3-bromo-2-oxoalcanoatos de etila mediada por *Saccharomyces cerevisiae*.

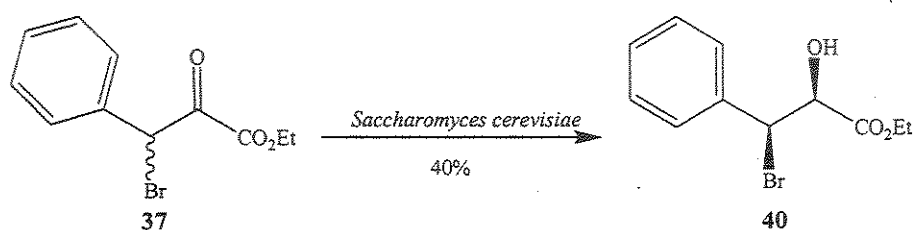


Composto	R	Rend. (%)	syn : anti	ee (%)		$[\alpha]_D^{20}$	
				syn : anti		syn	anti
37^b	C_6H_5	40	100 : 0	> 99	-----	+42,0	-----
38^a	<i>i</i> - C_4H_9	87	90 : 10	> 99	> 99	-15,7	-8,41
39^a	<i>n</i> - C_4H_9	93	75 : 25	> 99	> 99	+7,23	+2,30

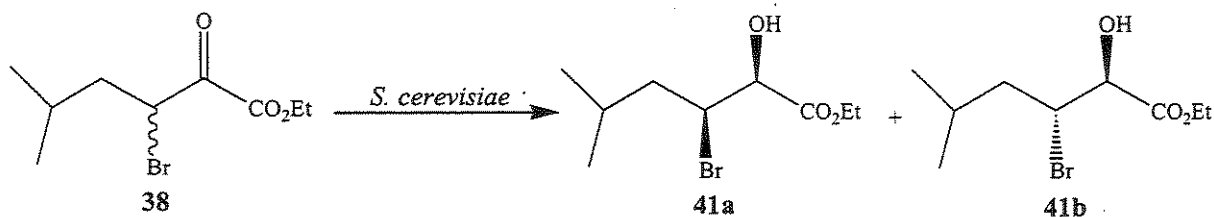
a) Condições reacionais: 5,0g de *Saccharomyces cerevisiae* imobilizado em esferas de camadas de alginato de cálcio, 400 mL de uma solução tampão citrato pH 4,0 (0,5 mol/L) 630 mg de **38** (ou **39**), 8,0 g de glicose iniciais e 1,6 g de glicose a cada 6 horas. b) Condições reacionais: 30,0g de *Saccharomyces cerevisiae* imobilizado em esferas de camadas de alginato de cálcio, 400 mL de uma solução tampão citrato pH 4,0 (0,5 mol/l) 630 mg de **37**, 30,0 g de glicose e 6,0 g de glicose a cada 6 horas.

Analisando a **Tabela 3.10**, verifica-se que todos os produtos foram obtidos com excelente excessos enantioméricos (>99%) e boa diastereosseletividade (50-100%). O diastereoisomero *syn* sempre é preponderante.

Para redução de **37** o procedimento foi modificado, sendo utilizado uma quantidade de célula 6 vezes maior. Esta modificação foi realizada para que a reação fosse mais rápida porque **37** estava sendo destruído ou consumido pela levedura, por isto aumentamos a quantidade de levedura para que a reação ocorresse mais rapidamente de modo evitar a perda de **37**. O rendimento da reação é baixo porém esta redução apresentou excelente diastereo- e enantiosseletividade na formação de **40**. A configuração relativa de **40** foi determinada através de RMN de ^1H em comparação com dados da literatura⁸¹.

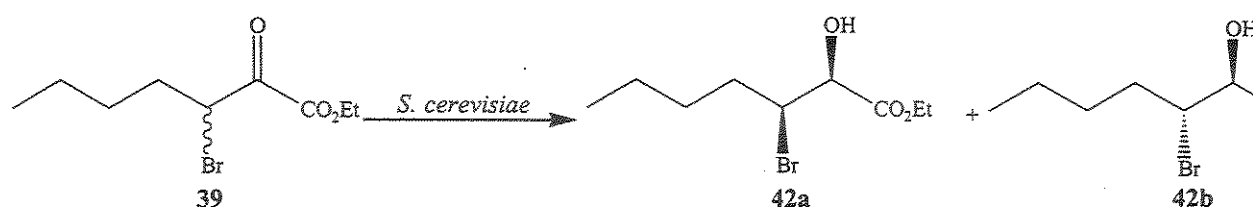


A configuração absoluta e relativa dos produtos da bioredução de **38** foram determinadas do mesmo modo que para **24a** e **24b**. Sendo **41a** o diastereoisômero *syn* atribuímos a configuração *S* para o carbono 3. O mesmo procedimento foi realizado com o composto **41b**. Os compostos possuem a seguinte configuração absoluta: (**2S**, **3S**)-3-bromo-2-hidroxi-hexanoato de etila (**41a**) e (**2S**, **3R**)-3-bromo-2-hidroxi-hexanoato de etila (**41b**).



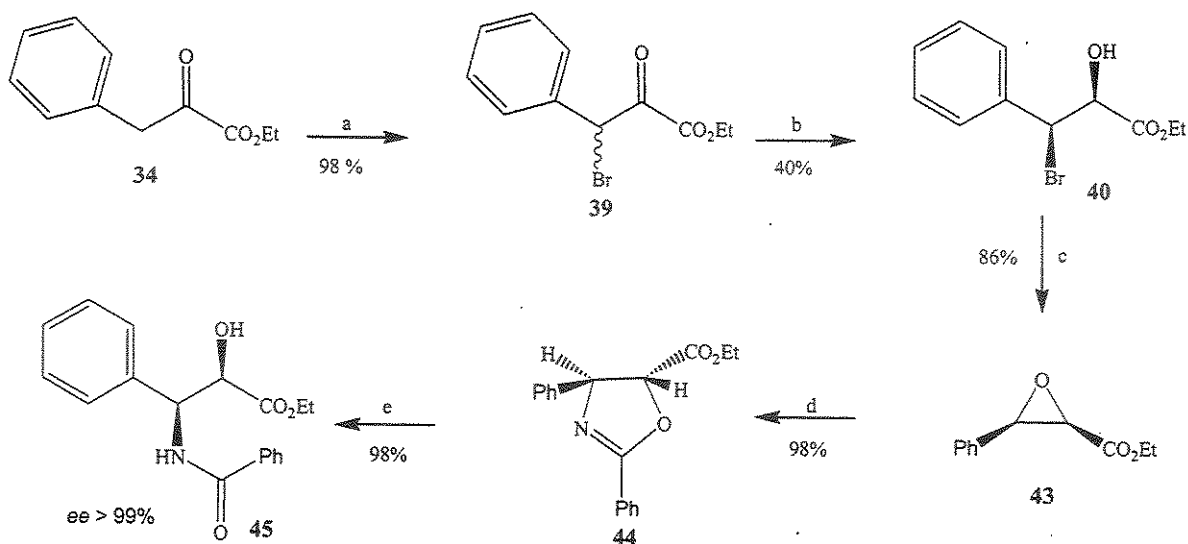
⁸¹ Hamamoto, H.; Mamedov, V. A.; Kitamoto, M.; Hayashi, N.; Tsuboi, S. *Tetrahedron Asym.* **2000**, *11*, 4485.

A configuração absoluta e relativa dos produtos da bio-redução de **39** também foram determinadas do mesmo modo que para **24a** e **24b**. Sendo **42a** o diastereoisômero *syn* atribuímos a configuração *S* para o carbono 3. O mesmo procedimento foi realizado com o composto **42b**. Os compostos possuem a seguinte configuração absoluta: (2*S*, 3*S*)-3-bromo-2-hidroxi-5-metilhexanoato de etila (**42a**) e (2*S*, 3*R*)-3-bromo-2-hidroxi-5-metilhexanoato de etila (**42b**).



A partir de **40** foi obtido (2*R*, 3*S*)-**45** foi sintetizado, utilizando a mesma rota do **Esquema 3.8**, com uma modificação durante a formação da oxazolina **44**, onde utilizou-se a benzonitrila. O composto (2*R*, 3*S*)-**45** foi obtido com 32% de rendimento e com excelente excesso enantiomérico (>99%). A configurações relativa e absoluta foram determinada em comparação com dados da literatura⁸².

⁸² Patel, R. N.; Banerjee, A.; Howell, J. M.; McNamers, C. G.; Brozowski, D.; Mirtakhras, D.; Nanduri, V.; Thottathill, J. K.; Szarka, L. J. *Tetrahedron Asym.* 1993, 4, 2069.



Esquema 3.9 Reagentes e condições: a) Br_2 , $\text{CCl}_4/\text{CHCl}_3$, rt, 1 h; b) *Saccharomyces cerevisiae* imobilizado em alginato de cálcio, pH 4.0, 30 °C, 24 h; c) K_2CO_3 , EtOH, 9h; d) $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$, CH_3CN , T. amb., 4 h, e) $\text{HCl}(\text{aq})/\text{MeOH}$, $\text{NaHCO}_3(\text{sat})$, 16 h.

A configuração relativa e absoluta de **45** foram determinadas por comparação com dados da literatura⁸². Analisando a **Tabela 3.11** comprovamos a configuração relativa de **45** como sendo *syn*.

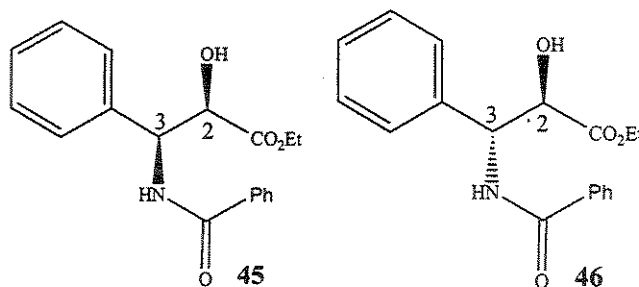


Tabela 3.11. Dados de RMN de ^1H de **45**, **46**.

	δ (ppm) H-2	$J_{2,3}$ (Hz)
45	4,62 (dd)	2,0
45 ⁸²	4,62 (dd)	2,0
46 ⁸²	4,60 (brs)	-----

Analisando a **Tabela 3.12** atribuímos a configuração absoluta como sendo (2*R*, 3*S*)-**45**.

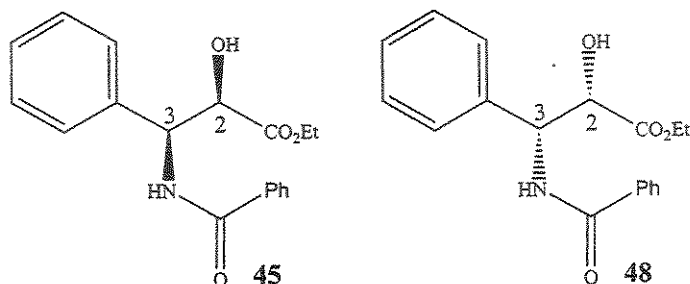
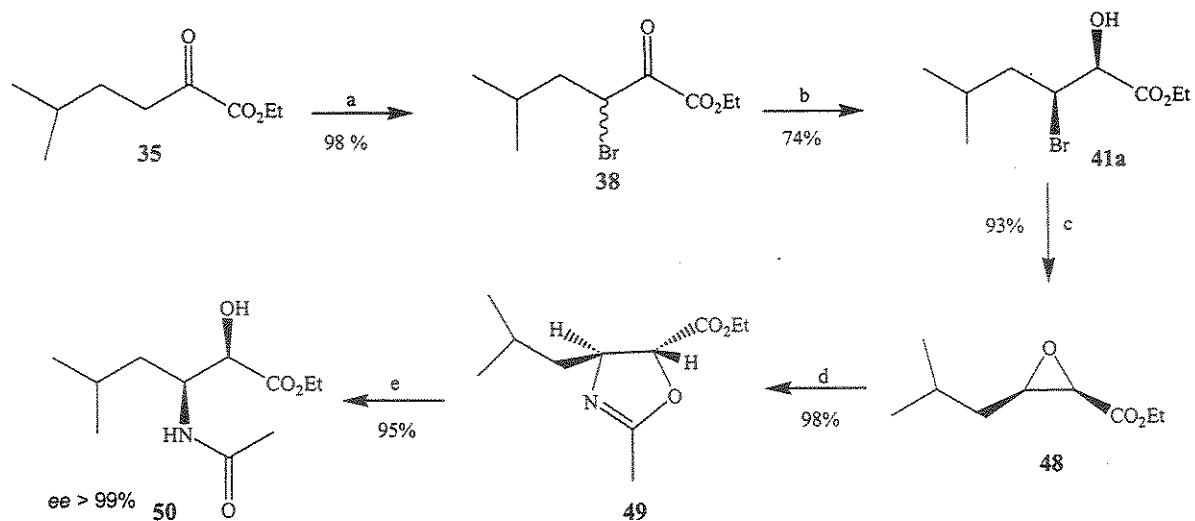


Tabela 3.4. Dados de rotação ótica.

Composto	$[\alpha]_D^{25}$
45	-24,3
45 ⁸³	-21,7
48 ⁸³	+22,1

A síntese do β -amino- α -hidróxi-éster **50**, também foi realizada com está apresentado no **Esquema 3.10**. O β -amino- α -hidróxi-éster **50** foi obtido com 50% de rendimento e excelente *ee* (>99%).



Esquema 3.10. Reagentes e condições: a) Br_2 , $\text{CCl}_4/\text{CHCl}_3$, T. amb., 1 h; b) *Saccharomyces cerevisiae* imobilizado em alginato de cálcio, pH 4.0 (0,5 mol/L), 30 °C, 24 h; c) K_2CO_3 , EtOH, 3 h; d) $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$, CH_3CN , T. amb., 3 h, e) $\text{HCl(aq)}/\text{MeOH}$, $\text{NaHCO}_3(\text{sat})$, 16 h.

3.4 Conclusões

Foram realizadas as sínteses de 3 β -amino- α -hidróxi-ésteres através de um novo protocolo de síntese, onde todos os β -amino- α -hidróxi-ésteres foram obtidos com bons rendimentos (32-50%) e excelentes *ee* (96-100 %). Nesta rota sintética duas etapas foram cruciais:

- 1) A redução enantiosseletiva de 3-bromo-2-oxo-ésteres, onde foi proposta uma nova metodologia para a bio-redução de 3-bromo-2-oxo-ésteres bastante eficiente.
- 2) A abertura regiosseletiva de 2,3 epóxi-ésteres formando 2-oxazolininas e azido álcoois.

O protocolo proposto foi eficiente para a síntese de β -amino- α -hidróxi-ésteres a partir de α -ceto-ésteres e como intermediários desta rota sintética destacam-se os 2,3-epóxi-ésteres e as 2-oxazolininas que são heterociclos de grande interesse sintético.

4 Considerações finais

De uma forma geral, os objetivos propostos neste trabalho foram cumpridos.

Desenvolvemos um bioreator utilizando a levedura *Saccharomyces cerevisiae* imobilizada em fios de duas camadas de alginato de cálcio. Este foi o primeiro trabalho utilizando este tipo de imobilização em reações de biocatálise. Anteriormente esta técnica era utilizada apenas na produção de vinho. A principal vantagem deste método de imobilização é a estabilidade do biocatalisador no reator durante o processo de fluxo contínuo, onde não foi observado o lixiviamento de células para o meio de cultura. A produtividade obtida em nosso processo é superior ao trabalho descrito anteriormente¹⁶, por outros autores, utilizando-se uma quantidade seis vezes menor de massa celular, obtendo-se um elevado rendimento químico (82%) e excessos enantioméricos (92%).

Utilizamos a técnica MIMs para realizar o monitoramento de reações de bioredução catalisada pela levedura encapsulada em alginato de cálcio. O monitoramento em tempo real destas reações, visou fornecer informações adicionais que não foram até então, obtidas por técnicas convencionais utilizadas para acompanhar este tipo de reação. Embora não seja possível observar a conversão dos substratos em produtos, e ao mesmo tempo obter informações importantes sobre o excesso enantiomérico dos produtos formados utilizando-se somente a técnica MIMS, os resultados obtidos podem nos fornecer informações sobre o andamento das reações dentro de um processo que necessita apenas saber se houve conversão e o grau de conversão. O mais importante, é lembrar que não é necessário nenhum passo

de extração do efluente do reator como em técnicas de GC-MS, tornando o processo mais dinâmico na obtenção de informações do processo como um todo.

Foi realizada a síntese de 3 β -amino- α -hidróxi-ésteres através de um novo protocolo de síntese, onde todos os β -amino- α -hidróxi-ésteres são obtidos com bons rendimentos (32-50%) e excelentes *ee* (>96%). Durante a rota sintética, foi realizada a avaliação de diferentes leveduras e bactérias para a redução de 3-bromo-2-oxo-ésteres, o que permitiu selecionar o *Saccharomyces cerevisiae* como o melhor biocatalisador. Propusemos, então uma nova metodologia para a redução enantiosseletiva de 3-bromo-2-oxo-ésteres, na qual foi proposto a modificação da enantio- e diastereosseletividade da redução através transferência de massa para o biocatalisador. Posteriormente realizou-se a abertura regioseletiva de 2,3 epóxi-ésteres levando a 2-oxazolininas e azido álcoois.

O protocolo proposto para a síntese de β -amino- α -hidróxi-ésteres a partir de α -ceto-ésteres é eficiente, além de gerar intermediários sintéticos quirais como 2,3-epóxi-ésteres e 2-oxazolininas que são heterociclos de interesse sintético.

5 Parte experimental

5.1 Considerações gerais

Espectros de Ressonância Magnética Nuclear

Os espectros de RMN de ^1H e ^{13}C foram registrados no espectrômetro Varian® Gemini 300 (300,067 e 75,017 MHz, respectivamente) e Inova 500 (499,883 e 124,971 MHz, respectivamente). Os deslocamentos químicos (δ) de hidrogênio foram registrados em ppm utilizando como referência interna tetrametilsilano (TMS, $\delta = 0,00$). Os deslocamentos químicos de carbono foram registrados em ppm, sendo $\delta = 0,00$ (TMS) e $\delta = 77,0$ (CDCl_3).

Para a análise dos espectros de RMN de ^1H as constantes de acoplamento (J), foram medidas em Hertz (Hz) e os sinais foram caracterizados como dubleto(d), duplo dubleto (dd), tripleto (t), duplo tripleto (dt), quateto (q), duplo quarteto (dq) e multipletto (m). Em todos os casos a primeira sigla está associada à multiplicidade de maior constante de acoplamento.

Cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massas - CG/EM.

As análises por CG/EM foram realizadas em cromatografo gasoso acoplado a um detector seletivo de massas SHIMATZU CGMS - QP500 e um

HP-5973, cuja a fonte de impacto opera com energia de ionização a 70 eV. No SHIMATZU CGMS - QP500 foi utilizado uma coluna capilar de sílica fundida DB-1 e no HP-5973 uma coluna HP-5. O injetor utilizado foi do tipo *Split* e o gás de arraste utilizado foi Hélio de alta pureza. A programação utilizada foi: temperatura inicial 80 °C, velocidade de aquecimento 20 °C por minuto, temperatura final 280 °C, temperatura do injetor 230 °C e temperatura do detector 280 °C. As injeções das amostras foram de 1,0 µL na concentração de 5 - 10 mg.

Os *ee* foram determinados por análise por cromatografia gasosa utilizando uma coluna com fase estacionária: heptakis-(2,6-methyl-pentyl)- β -cyclodextrine) com 25 m x 0.25 mm x 0.25µm. A programação utilizada foi: temperatura inicial 100 °C, velocidade de aquecimento 3 °C por minuto, temperatura final 280 °C, temperatura do injetor 200 °C e temperatura do detector 240 °C. As injeções das amostras foram de 1,0 µL na concentração de 1 - 3 mg/mL.

Espectrometria no infravermelho (IV)

Os espectros de absorção na região do infravermelho foram registrados em um espectrometro BOMEM MB-Series em filmes sobre cela NaCl.

Espectrometria de Massas por Introdução *via* Membrana.

Os experimentos utilizando a sonda de MIMS foram realizados em um espectrômetro de massas Extrel (Pittsburg, PA) adaptado com um quadrupolo

de 3/4" de alta transmissão, utilizando EI com energia de ionização de 70 eV. As alíquotas do efluente contendo os analitos foram bombeadas através da sonda de membrana de silicone [Silastic 500-3, 0,010" de espessura, Dow Corning Co.].

Rotação Óptica – $[\alpha]_D^{20}$

Os valores de rotação óptica foram determinados em um polarímetro LEP A-2 Carl Zeiss e em Mol-341 – PerkinElmer com lâmpada de sódio (λ 589 nm, precisão de 0,005°).

Métodos cromatográficos

As cromatografias em coluna foram realizadas com sílica gel 230 - 400 mesh da marca Merck. O diâmetro e a altura das colunas variaram de acordo com a quantidade de material de partida. A proporção de sílica utilizada foi de aproximadamente 30 vezes o peso da amostra a ser purificada. As eluições dos compostos foram obtidas empregando-se solventes orgânicos em fase isocrática ou em ordem crescente de polaridade.

Todas as purificações realizadas em coluna foram acompanhadas em placa de CCD da marca Merck sobre suporte de alumínio com filme de sílica gel 60 F₂₅₄.

Microrganismos

A levedura *Saccharomyces cerevisiae* foi utilizada na forma liofilizada, marca EMULZINT®. Todos os demais microrganismos utilizados foram adquiridos na Fundação Tropical André Tosello.

Meios de cultura

YM (Yeast medium)

Composição para 1,0 L.

Glicose	2,0 g
Extrato de levedura	0,3 g
Extrato de malte	0,3 g
Peptona bacteriológica	0,5 g
q.s.p. 1,0 L de água destilada.	

BL (Bactéria Láctica)

Composição para 1,0 L.:

Glicose	2,0 g
Extrato de carne	5,0 g
Peptona bacteriológica	5,0 g
K ₂ HPO ₄	2,0 g
q.s.p. 1,0 L de água destilada.	

Esterilização

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

Agitação Orbital

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

Outros

As reações em atmosfera inerte foram realizadas sob atmosfera de Ar 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. 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 secas sobre MgSO₄ e evaporadas à vácuo em rotaevaporador a 35-40°C.

5.2 Biorredução em reator de fluxo contínuo

5.2.1 Imobilização da levedura *Saccharomyces cerevisiae* em fios de duas camadas

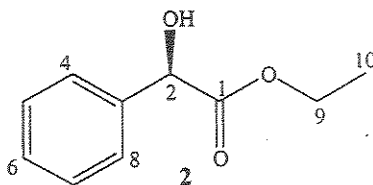
Para a imobilização, utilizou-se para camada interna 60,0 mL de uma solução 2,5 % de alginato de sódio (1,5 g de alginato de sódio e 60,0 mL de água destilada) e 5,0 g de *Saccharomyces cerevisiae* em 15 mL de água destilada. Para a camada externa 25 mL de uma solução 2,0 % de alginato de sódio (4,4 g de alginato e 225 mL de água destilada). Utilizou-se um extrusor de duas camadas para a confecção dos fios. Onde a solução para a camada interna foi bombeada com fluxo de 1,9 mL/min e a camada externa 3,8 mL/min. Os fios foram extrusados em uma solução de cloreto de cálcio 2,0%. Após a sua confecção os fios permaneceram na solução de CaCl_2 por 12,0 horas.

5.2.2 Redução do benzoilformiato de etila 1 em reator de fluxo contínuo.

O reator utilizado possui um volume interno de 195 mL, um volume útil de 81,0 mL. Como este reator foi utilizado em fluxo contínuo por vários dias o meio de cultura que foi bombeado para o reator foi constituído de 0,3 g/L de uréia, 0,02 g/L de MgSO_4 , 1,5 g/L de CaCl_2 e 20,0 mL/L de etanol.

O efluente obtido do reator foi extraído com acetato de etila. As fases orgânicas foram combinadas, secas (MgSO_4) e evaporadas sob pressão

reduzida. A reação foi purificada em coluna de sílica gel (hexano:acetato de etila, 8:2). O produto foi obtido com 82% de rendimento e 92% de *ee*.



óleo incolor. **MM** = 180,20 ($\text{C}_{10}\text{H}_{12}\text{O}_3$). $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -64,0$ (c 2,1 CHCl_3). **IV** (filme) ν_{max} (cm^{-1}) : 3464, 3065, 2984, 2938, 1726, 1604, 1496, 1454, 1369, 1068, 1022 **EM** m/z (%) : 169 (100), 107 (3), 51 (4), 135 (5), 272 (6), 63 (15), 155 (10), 196 (28), 118 (45), 90 (53), 171 (98). **RMN** ^1H (300,1 MHz, CDCl_3) δ : 1,22 (3H, t, $J = 7,3$ Hz, H-10), 4,22 (2H, m, H-9), 5,15 (1H, s, H-2), 7,36 (5H, m, H-4 a H-8).

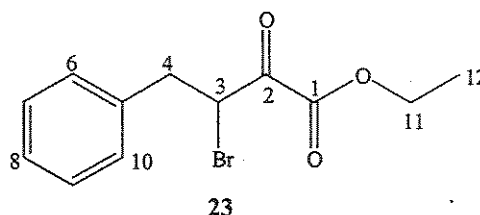
5.3 Monitoramento “on-line” de bio reduções utilizando Espectrometria de Massas por Introdução *via* Membrana.

Nestes experimentos 0,3 mmol dos substratos foram dissolvidos em 400 mL de água contendo 5 % de etanol para completa dissolução do substrato em água. A levedura foi imobilizada em esferas de alginato de cálcio (7,5g de *Saccharomyces cerevisiae* liofilizado em 150,0 mL de uma solução 2,0 % de alginato de sódio. As soluções contendo cada substrato foram mantidas sob agitação constante quando bombeadas para o bioreator (20,0 cm de comprimento e de 7,0 cm de largura) contendo a levedura encapsulada em alginato de cálcio. O efluente do reator foi diluído através de um sistema em T e então introduzidas na sonda. Após os 400 mL de cada substrato terem sido

bombeados através do reator contendo a levedura (após aproximadamente 6 horas), outros 400 mL contendo apenas água e açúcar foram bombeados através do reator para retirar o restante do produto de biotransformação contido em seu interior (por aproximadamente 5 horas).

5.4 Síntese do 3-bromo-2-oxo-fenilbutanoato de etila 23

A uma solução de 2-oxo-4-fenilbutirato de etila **21** (5,0 g em 24,2 mmol) em 7,0 ml de clorofórmio foi adicionado lentamente uma solução de bromo em tetracloreto de carbono (1,06 mol/L) até que esta se tornasse alaranjada. A reação foi acompanhada por CCD e após 3 horas de reação foi adicionada algumas gotas de tiosulfato de sódio, para neutralizar o excesso de bromo. A reação foi extraída com acetato de etila e a fase orgânica foi evaporada sob pressão reduzida. A reação foi purificada em coluna de sílica gel (hexano:acetato de etila, 8:2). Obteve-se um rendimento isolado de 97 %. O produto foi analisado por espectrometria no infravermelho, espectrometria de massas e espectrometria de RMN de ^1H e ^{13}C .



Óleo amarelo. **MM** 285,13 ($\text{C}_{12}\text{H}_{13}\text{BrO}_3$) **IV** (filme) ν_{max} (cm^{-1}) : 3029, 2984, 2944, 1729, 1604, 1497, 1454, 1303, 1068. **EM** m/z (%) : 131 (100), 213 (4), 205 (43), 183 (26), 104 (66), 91 (25), 77 (23), 51 (8). **RMN** ^1H (300,1

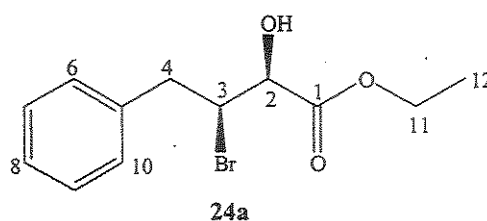
MHz, CDCl_3) δ : 1,35 (3H, t, $J = 7,0$ Hz, H-12), 3,24 (1H, dd, $J = 14,5$ e $7,5$ Hz, H-4), 3,52 (1H, dd, $J = 14,5$ e $7,5$ Hz, H-4), 4,32 (2H, q, $J = 7,0$ Hz, H-11), 5,28 (1H, t, $J = 7,3$, H-3) 7,28 (5H, m, H-6 a H-10). RMN ^{13}C (75,5 MHz, CDCl_3) δ : 13,9 (CH_3 , C-12), 39,1 (CH_2 , C-4), 47,5 (CH_2 , C-3), 63,0 (CH_2 , C-11), 127,0 (CH, C-8), 128,4 (2CH, C-7 e C-9), 129,1 (2CH, C-6 e C-10), 136,1 (C_0 , C-5), 157,7 (C_0 , C-2), 184,8 (C_0 , C-1).

5.5 Redução Biocatalítica de 3-bromo-2-oxo-fenilbutanoato de etila 23

5.5.1 Procedimento geral para as bioeduções de 23 por diferentes microorganismos.

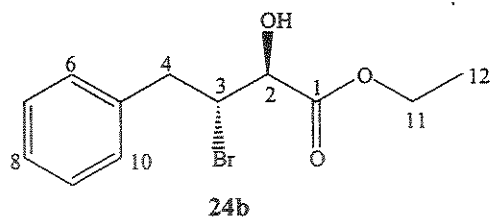
As leveduras foram pré ativadas em meio Ym (50,0mL) em um erlenmeyer de 100,0 mL por 24 horas a 30°C , com exceção da levedura *Saccharomyces cerevisiae* que foi utilizada em sua forma liofilizada disponível comercialmente. As células foram então transferidas para um erlenmeyer de 2,0 L contendo 1,0 L de meio Ym e agitadas em incubadora a 110 rpm, 30°C por 48 horas. As células foram centrifugadas por 30 minutos a 3000 rpm e transferidas para erlenmeyers de 250 mL. As bactérias foram pré ativada em meio BL (50,0mL) em um erlenmeyer de 100,0 mL por 24 horas a 30°C . As células foram então transferidas para um erlenmeyer de 2,0 L contendo 1,0 L de meio BL e agitadas em incubadora a 110 rpm, 30°C por 48 horas. As células foram centrifugadas por 30 minutos a 3000 rpm transferidas para erlenmeyers de 250 mL.

4,0 g de massa celular foram adicionado a 100mL de solução tampão citrato pH 4,0 erlenmeyer de 250 mL e mantida em incubadora de agitação orbital à 30 °C e a 30 rpm. Após 30 minutos adicionou-se 140,0 mg (0,5 mmol) de **23**. A reação foi acompanhada por CCD e CG/EM e após 24 horas extraiu-se a reação com acetato de etila e a fase orgânica foi seca com MgSO₄, filtrada e concentrada à vácuo. Os produtos foram purificados em coluna de sílica gel (hexano/acetato de etila 20%).



(2*S*,3*S*)-3-bromo-2-hidroxi-fenilbutirato de etila 24a

Óleo incolor. **MM** = 287,15 (C₁₂H₁₅BrO₃). $[\alpha]_D^{20} = -16,8$ (c 2,1, CHCl₃). **IV** (filme) $\nu_{\max}$ (cm⁻¹) : 3503, 3066, 3027, 2983, 2929, 1732, 1596, 1499, 1455, 1367, 1256, 1110, 1017, 740, 701. **EM** m/z (%) : 91 (100), 206 (2), 189 (15), 177 (1), 161 (5), 143 (15), 133 (51), 115 (66), 77 (15), 55 (20), 51 (15). **RMN** ¹H (300,1 MHz, CDCl₃) δ : 1,29 (3H, t, J = 7,1 Hz, H-12), 3,32 (2H, m, H-4), 4,14 (1H, m, H-3), 4,26 (2H, m, H-11), 4,50 (1H, td, J = 1,8 e 7,3 Hz, H-2), 7,26 (5H, m, H-6 a H-10). **RMN** ¹³C (75,5 MHz, CDCl₃) δ : 14,8 (CH₃, C-12), 42,4 (CH₂, C-4), 56,9 (CH, C-3), 62,9 (CH₂, C-11), 71,5 (CH, C-2), 127,6 (CH, C-8), 129,1 (2CH, C-7 e C-9), 129,7 (2CH, C-6 e C-10), 138,0 (C₀, C-5), 172,2 (C₀, C-1).



(2*S*, 3*R*)-3-bromo-2-hidróxi-fenilbutanoato de etila 24b

Óleo incolor. **MM** = 287,15 (C₁₂H₁₅BrO₃). $[\alpha]_D^{20} = -18,8$ (c 2,1 CHCl₃). **IV** (filme) $\nu_{\max}$ (cm⁻¹) : 3503, 3066, 3027, 2983, 2929, 1732, 1596, 1499, 1455, 1367, 1256, 1110, 1017, 740, 701. **EM** m/z (%) : 91 (100), 206 (2), 189 (15), 177 (1), 161 (5), 143 (15), 133 (51), 115 (66), 77 (15), 55 (20), 51 (15). **RMN** ¹H (300,1 MHz, CDCl₃) δ : 1,35 (3H, t, J = 7,0 Hz, H-12), 3,30 (2H, m, H-4), 4,24 (2H, q, J = 7,0 Hz, H-11), 4,40 (1H, m, H-3), 4,46 (1H, td, J = 2,6 e 7,0 Hz, H-2), 7,26 (5H, m, H-6 a H-10). **RMN** ¹³C (75,5 MHz, CDCl₃) δ : 14,8 (CH₃, C-12), 41,2 (CH₂, C-4), 56,8 (CH, C-3), 62,9 (CH₂, C-11), 73,8 (CHOH, C-2), 127,5 (CH, C-8), 128,9 (2CH, C-7 e C-9), 129,7 (2CH, C-6 e C-10), 137,9 (C₀, C-5), 171,3 (C₀, C-1).

5.5.2 Redução biocatalítica de 25 com *Saccharomyces cerevisiae* imobilizado em alginato de cálcio

5.5.2.1 Imobilização de *Saccharomyces cerevisiae* em alginato de cálcio

A uma suspensão de 2,0 g de *Saccharomyces cerevisiae* liofilizado em 28,8 mL de água destilada e 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

CaCl₂ 0,2 mol/L. As esferas formadas foram deixadas na solução gelificante por 20 minutos. Filtrou-se e lavou-se as partículas com água destilada estéril.

5.5.2.2 Redução de 23 com *Saccharomyces cerevisiae* imobilizado em alginato de cálcio com adição de glicose em pH 4,0

1,0 g de *Saccharomyces cerevisiae* imobilizado em alginato de cálcio foi adicionado a 100mL de solução tampão fosfato pH 4,0 e 2,0 g de glicose em um erlenmeyer de 250 mL e mantida em incubadora de agitação orbital à 30 °C e a 30 rpm. Após 2,0 horas o pH da reação foi medido e ajustado com uma solução de NH₄OH 10 %, então, adicionou-se 140,0 mg (0,5 mmol) de 23, lentamente durante 10h. A cada 6 h foi adicionado à reação 0,4 g de glicose. A reação foi acompanhada por CCD e CG/EM e após 24 horas extraiu-se a reação com acetato de etila e a fase orgânica foi seca com MgSO₄, filtrada e concentrada à vácuo.

5.5.3 Redução biocatalítica de 23 com *Saccharomyces cerevisiae* imobilizado em κ-Carragena

5.5.3.1 Imobilização de *Saccharomyces cerevisiae* em κ-Carragena

0,8 g de κ-carragena foi adicionada em 20,0 mL de água estilada e aquecida a 85 °C e depois resfriada a 40 °C. Uma suspensão de 2,0 g de

Saccharomyces cerevisiae liofilizado em 12,0 mL de água destilada 40 °C foi adicionada a solução de κ -carragena e mantida a 40 °C. A mistura acima foi extrudada em uma solução de KCl 0,3 mol/L. As esferas formadas foram deixadas na solução gelificante por 20 minutos. Filtrou-se e lavou-se as partículas com água estéril.

5.5.3.2 Redução de 23 com *Saccharomyces cerevisiae* imobilizado em κ -Carragena com adição de glicose em pH 4,0

1,0 g de *Saccharomyces cerevisiae* imobilizado em κ -Carragena foi adicionado a 100mL de solução tampão fosfato pH 4,0 e 2,0 g de glicose em um erlenmeyer de 250 mL e mantivemos em incubadora de agitação orbital à 30 °C e a 30 rpm. Após 2,0 horas o pH da reação foi medido e ajustado com uma solução de NH_4OH 10 %, então, adicionou-se 140,0 mg (0,5 mmol) de 23, lentamente durante 10h. A cada 6 h foi adicionado à reação 0,4 g de glicose. A reação foi acompanhada por CCD e após 24 horas extraiu-se a reação com acetato de etila e a fase orgânica foi seca com MgSO_4 , filtrada e concentrada à vácuo.

5.5.4 Redução biocatalítica de 23 com *Saccharomyces cerevisiae* imobilizado em Lenticats®

5.5.4.1 Imobilização de *Saccharomyces cerevisiae* em Lenticats®

O suporte Lenticats® foi adquirido comercialmente. A uma suspensão de 2,0 g de *Saccharomyces cerevisiae* liofilizado em 12,0 mL de água destilada 40 °C foi adicionada a solução Lenticats® e foi mantida a 40 °C. A mistura acima foi extrudada em um placas de petri formando partículas em forma de lentilhas. As lentilhas formadas foram deixadas na solução estabilizante por 2,0 horas, filtrou-se e lavou-se as partículas com água estéril.

5.5.4.2 Redução de 23 com *Saccharomyces cerevisiae* imobilizado em Lenticats®

1,0 g de *Saccharomyces cerevisiae* imobilizado em Lenticats® foi adicionado a 100mL de solução tampão fosfato pH 4,0 e 2,0 g de glicose em um erlenmeyer de 250 mL e mantida em incubadora de agitação orbital à 30 °C e a 30 rpm. Após 2,0 horas o pH da reação foi medido e ajustado com uma solução de NH₄OH 10 %, então, adicionou-se 140,0 mg (0,5 mmol) de 23, lentamente durante 10h. A cada 6 h foi adicionado à reação 0,4 g de glicose. A reação foi acompanhada por CCD e após 24 horas extraiu-se a reação com acetato de etila e a fase orgânica foi seca com MgSO₄, filtrada e concentrada à vácuo.

5.5.5 Redução de 23 com *Saccharomyces cerevisiae* imobilizado esferas de 2 camadas de alginato de cálcio

5.5.5.1 Imobilização de *Saccharomyces cerevisiae* imobilizado esferas de 2 camadas de alginato de cálcio

A uma suspensão de 2,0 g de *Saccharomyces cerevisiae* liofilizado em 28,8 mL de água destilada e 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 foram deixadas na solução gelificante por 20 minutos. Filtrou-se e lavou-se as partículas com uma pequena quantidade de água destilada estéril. As esferas foram adicionadas novamente em uma solução de alginato de sódio 2% e mantidas sob agitação por 20 minutos. As esferas foram filtradas em uma peneira e lavadas para retirar o excesso de alginato e foram novamente adicionadas em uma nova solução de CaCl_2 0,2 mol/L. As esferas formadas foram deixadas na solução gelificante por 2,0 horas. Filtrou-se e lavou-se as partículas com de água destilada estéril.

5.5.5.2 Redução de 23 com *Saccharomyces cerevisiae* imobilizado em esferas de duas camadas de alginato de cálcio com adição de glicose em pH 4,0

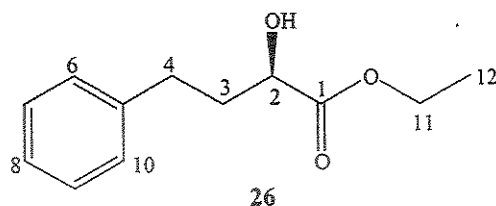
Para as reações de bio redução com a levedura imobilizada em esferas de duas camadas de alginato foi utilizado um reator encamisado tipo tanque agitado de 420,0 mL de volume total. Foram adicionados ao reator 5,0 g de *Saccharomyces cerevisiae* imobilizado em alginato de cálcio, 300mL de

solução tampão fosfato pH 4,0 e 8,0 g. Após 2,0 horas o pH da reação foi medido e ajustado com uma solução de NH_4OH 10 %, então, adicionou-se 630,0 mg de **23**, lentamente durante 10h. A cada 6 h foi adicionado à reação 1,6 g de glicose. A reação foi acompanhada por CCD e CG/EM e após 24 horas extraiu-se a reação com acetato de etila e a fase orgânica foi seca com MgSO_4 , filtrada e concentrada à vácuo.

5.6 Determinação da configuração absoluta de 3-bromo-2-hidróxi-fenilbutanoato de etila **24a**

À uma solução de 182,0 mg (0,7 mmol) de **24a** em 3,0 mL de etanol anidro foram adicionados 57,0 mg (0,7 mmol) de acetato de sódio e (16,0 mg) de Pd/C 5% sob atmosfera de argônio. A mistura foi mantida sob agitação a temperatura ambiente, sendo então purgada e adicionado uma bexiga contendo hidrogênio. A reação foi mantida em agitação por 2,0 horas. Então, a mistura foi filtrada em celite e extraída com acetato de etila (3 x 50,0 mL), a fase orgânica foi lavada com salmoura, seca com MgSO_4 e concentrado sob pressão reduzida gerando um óleo amarelo que foi purificado em coluna de sílica gel (Hexano/acetato de etila 15%) fornecendo 138 mg de **26** (95%). Análise de rotação ótica foi realizada para determinação da configuração absoluta e comparada com a literatura⁷¹.

⁷¹ Dao, D. H.; Hornes, S.; Okamura, M.; Akasaka, T.; Kawai, Y.; Hida, K.; Ohno, A. *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, 1998, 71, 425



(*R*)-2-hidroxi-4-fenilbutanoato de etila 26

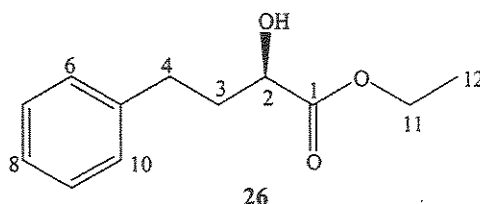
Óleo amarelado. $MM = 208,25$ ($C_{12}H_{16}O_3$). $[\alpha]_D^{20} = -32,5$ (c 2,0, $CHCl_3$). IV (filme) ν_{max} (cm^{-1}): 3450, 3066, 3027, 2983, 2929, 1732, 1591, 1499, 1450, 1367, 1256, 1110. RMN 1H (300,1 MHz, $CDCl_3$) δ : 1,28 (3H, t, $J = 7,0$ Hz, H-12), 1,90-2,18 (2H, m, H-4), 2,77 (2H, m, H-3), 4,20 (2H, q, $J = 7,0$ Hz, H-11), 7,26 (5H, m, H-6 a H-10). RMN ^{13}C (75,5 MHz, $CDCl_3$) δ : 14,2 (CH_3 , C-12), 31,5 (CH_2 , C-4), 36,4 (CH_2 , C-3), 62,2 (CH_2 , C-11), 70,1 (CH, C-2), 128,0 (CH, C-8), 129,0 (2CH, C-7 e C-9), 129,0 (2CH, C-6 e C-10), 141,6 (C_0 , C-5), 175,7 (C_0 , C-1).

5.7 Determinação da configuração absoluta de 3-bromo-2-hidróxi-fenilbutanoato de etila 24b

À uma solução de 182,0 mg (0,7 mmol) de **24b** em 3,0 mL de etanol anidro foram adicionados 57,0 mg (0,7 mmol) de acetato de sódio e (16,0 mg) de Pd/C 5% sob atmosfera de argônio. A mistura foi mantida sob agitação a temperatura ambiente, sendo então purgado e adicionado uma bexiga contendo hidrogênio. A reação foi mantida em agitação por 2,0 horas. Então, a mistura foi filtrada em celite e extraída com acetato de etila (3 x 50,0 mL), a fase orgânica foi lavada com salmoura, seca com $MgSO_4$ e concentrado sob pressão reduzida gerando um óleo amarelo que foi purificado em coluna de

sílica gel (Hexano/acetato de etila 15%) fornecendo 138 mg de **26** (95%). Análise de rotação ótica foi realizada para determinação da configuração absoluta e comparada com a literatura⁷¹.

(R)-2-hidroxi-4-fenilbutanoato de etila 26

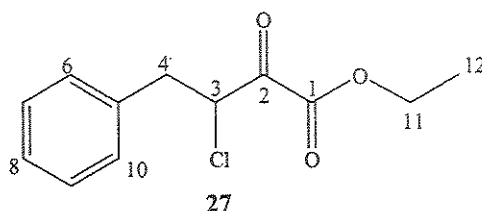


Óleo amarelado. $MM = 208,25$ ($C_{12}H_{16}O_3$). $[\alpha]_D^{20} = -27,8$ (c 1,8, $CHCl_3$). **IV** (filme) ν_{max} (cm^{-1}) : 3450, 3066, 3027, 2983, 2929, 1732, 1591, 1499, 1450, 1367, 1256, 1110. **RMN 1H** (300,1 MHz, $CDCl_3$) δ : 1,28 (3H, t, $J = 7,0$ Hz, H-12), 1,90-2,18 (2H, m, H-4), 2,77 (2H, m, H-3), 4,20 (2H, q, $J = 7,0$ Hz, H-11), 7,26 (5H, m, H-6 a H-10). **RMN ^{13}C** (75,5 MHz, $CDCl_3$) δ : 14,2 (CH_3 , C-12), 31,5 (CH_2 , C-4), 36,4 (CH_2 , C-3), 62,2 (CH_2 , C-11), 70,1 (CH, C-2), 128,0 (CH, C-8), 129,0 (2CH, C-7 e C-9), 129,0 (2CH, C-6 e C-10), 141,6 (C_0 , C-5), 175,7 (C_0 , C-1).

5.8 Síntese de 3-cloro-2-oxo-fenilbutanoato de etila 27

Em um balão de duas bocas sob atmosfera de argônio foram adicionados (0,32g, 2,39 mmol) de $CuCl_2$, (0,05, 1,17 mmol) de $LiCl$ e 5,0 mL de DMF, previamente tratado e seco. À mistura reacional foi adicionado (0,20 g, 0,97 mmol) de **21**. A temperatura foi mantida a $100^\circ C$ por 1,0 h. A reação

foi diluída com gelo, seguida de uma quantidade suficiente de DMF para redissolver o precipitado de CuCl. A reação foi extraída com acetato de etila (3x 25,0 mL) e lavada com água (3x 25,0 mL), seca e evaporada à vácuo. O composto **27** foi obtido com 77% de rendimento (0,18 g).

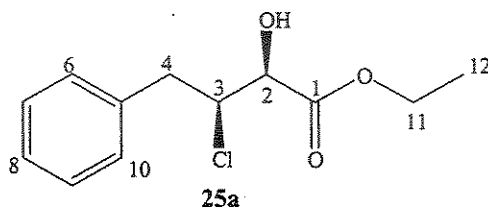


Óleo amarelo. **MM** = 240,70 (C₁₂H₁₃ClO₃). **IV** (filme) ν_{max} (cm⁻¹) : 3060, 3027, 2978, 2929, 1727, 1596, 1499, 1455, 1367, 1250, 1110. **EM** m/z (%) : 131 (100), 240 (1), 205 (44), 177 (1), 167 (5), 139 (63), 103 (95), 77 (32), 65 (5), 51 (10). **RMN** ¹H (300,1 MHz, CDCl₃) δ : 1,36 (3H, t, J = 7,1 Hz, H-12), 3,15 (1H, dd, J = 14,3 e 7,4 Hz, H-4), 3,44 (1H, dd, J = 14,3 e 7,6 Hz, H-4), 4,34 (2H, q, J = 7,1 Hz, H-11), 5,16 (1H, dd, J = 8,1 e 7,6 Hz, H-3), 7,26 (5H, m, H-6 a H-10). **RMN** ¹³C (75,5 MHz, CDCl₃) δ : 14,0 (CH₃, C-12), 38,7 (CH₂, C-4), 58,5 (CH, C-3), 63,1 (CH₂, C-11), 128,4 (CH, C-8), 129,3 (2CH, C-7 e C-9), 129,7 (2CH, C-6 e C-10), 135,4 (C₀, C-5), 160,0 (C₀, C-2), 186,2 (C₀, C-1).

5.9 Bioedução de 3-cloro-2-oxo-fenilbutanoatoto de etila **27**

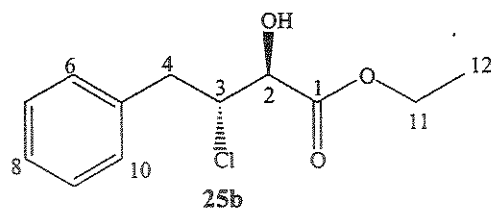
O procedimento é semelhante ao do item **5.5.2.1**. Para as reações de bioedução com a levedura imobilizada em esferas de duas camadas de alginato foi utilizado um reator emcamisado tipo tanque agitado de 420,0 mL

de volume total. Foram adicionados ao reator 5,0 g de *Saccharomyces cerevisiae* imobilizado em alginato de cálcio, 300mL de solução tampão fosfato pH 4,0 e 8,0 g de glicose. Após 2,0 horas o pH da reação foi medido e ajustado com uma solução de NH_4OH 10 %, então, adicionou-se 630,0 mg de 27, lentamente durante 10h. A cada 6 h foi adicionado à reação 1,6 g de glicose. A reação foi acompanhada por CCD e CG/EM e após 24 horas extraiu-se a reação com acetato de etila e a fase orgânica foi seca com MgSO_4 , filtrada e concentrada à vácuo.



(2*S*,3*S*) 3-cloro-2-hidróxi-fenilbutirato de etila 25a

Óleo amarelo. **MM** = 242,70 ($\text{C}_{12}\text{H}_{15}\text{ClO}_3$). $[\alpha]_D^{25} = -35,05$ (c 1,6 CHCl_3). **IV** (filme) ν_{max} (cm^{-1}) : 3469, 3031, 3027, 2917, 2846, 1732, 1603, 1499, 1455, 1367, 1256, 1112, 1021. **EM** m/z (%) : 133 (100), 206 (8), 188 (6), 177 (6), 151 (5), 115 (15), 103 (10), 91 (66), 76 (13), 55 (10), 51 (9). **RMN** ^1H (300,1 MHz, CDCl_3) δ : 1,28 (3H, t, $J = 7,0$ Hz, H-12), 3,32 (2H, m, H-4), 4,14 (1H, m, H-3), 4,25 (2H, q, $J = 7,1$ Hz, H-11), 4,44 (1H, 2dd, $J = 7,4$ e $7,3$ Hz, H-2), 7,31 (5H, m, H-6 a H-10). **RMN** ^{13}C (75,5 MHz, CDCl_3) δ : 14,3 (CH_3 , C-12), 41,0 (CH_2 , C-4), 62,4 (CH , C-3), 63,4 (CH_2 , C-11), 71,2 (CH , C-2), 127,0 (CH , C-8), 128,6 (2CH, C-7 e C-9), 129,3 (2CH, C-6 e C-10), 136,8 (C_0 , C-5), 171,7 (C_0 , C-1).



(2*S*,3*R*) 3-cloro-2-hidróxi-fenilbutanoato de etila **25b**

Óleo amarelo. **MM** = 242,70 (C₁₂H₁₅ClO₃). $[\alpha]_D^{25} = -21,61$ (c 1,8 CHCl₃). **IV** (filme) $\nu_{\max}$ (cm⁻¹) : 3469, 3031, 3027, 2917, 2846, 1732, 1603, 1499, 1455, 1367, 1256, 1112, 1021. **EM** m/z (%) : 133 (100), 206 (8), 188 (6), 177 (6), 151 (5), 115 (15), 103 (10), 91 (66), 76 (13), 55 (10), 51 (9). **RMN** ¹H (300,1 MHz, CDCl₃) δ : 1,34 (3H, t, J = 7,0 Hz, H-12), 3,13 (2H, m, H-4), 4,24 (2H, q, J = 7,1 Hz, H-11), 4,44 (1H, m, H-2), 7,28 (5H, m, H-6 a H-10). **RMN** ¹³C (75,5 MHz, CDCl₃) δ : 14,3 (CH₃, C-12), 40,0 (CH₂, C-4), 62,4 (CH, C-3), 64,1 (CH₂, C-11), 73,6 (CH, C-2), 127,0 (CH, C-8), 128,4 (2CH, C-7 e C-9), 129,2 (2CH, C-6 e C-10), 136,7 (C₀, C-5), 170,9 (C₀, C-1).

5.10 Azidação de 3-bromo-2-hidróxi-fenilbutirato de etila **24a**

5.10.1 Método 1

À uma solução de 100,0 mg (0,35 mmol) de **24a** em 0,1 mL de metanol, sob agitação a 0 °C, foi adicionado 32,0 mg (0,5 mmol) de NaN₃. A reação foi aquecida a 25 °C e mantida sob agitação por uma noite. Então a reação foi diluída com 20,0 mL de água destilada e extraída com acetato de etila (3 x 50,0 mL). A fase orgânica foi lavada com salmoura, seca com MgSO₄, e concentrada sob pressão reduzida e o resíduo foi purificado em

coluna de sílica gel (Hexano/acetato de etila 20%). Após a análise dos produtos obtidos foi verificada apenas a presença de **24a** (material de partida, 5%) e verificou-se a formação do epóxido 4-fenil-2,3-oxiranobutanoato de etila (57,7 mg, 80%) **29**, os dados espectroscópicos deste composto, serão apresentados no item **5.13.1**.

5.10.2 Método 2

À uma solução de 50,0 mg (0,17 mmol) de **24a** em 1,0 mL de DMSO, sob agitação a 10 °C, foi adicionado 16,0 mg (0,25 mmol) de NaN₃. A reação foi mantida sob agitação por 3 horas. A reação foi diluída com 20,0 mL de água destilada e extraída com acetato de etila (3 x 50,0 mL). A fase orgânica foi lavada com salmoura, seca com MgSO₄, e concentrado sob pressão reduzida e o resíduo foi purificado em coluna de sílica gel (Hexano/acetato de etila 20%). Após a análise dos produtos obtidos foi verificada apenas a presença de **24a** (material de partida, 10%) e verificou-se a formação do epóxido 4-fenil-2,3-oxiranobutirato de etila (27,3 mg, 78%) **29**.

5.10.3 Método 3

À uma solução de 50,0 mg (0,17 mmol) de **24a** em 3,0 mL de DMSO, sob agitação a 10 °C, foi adicionado 16,0 mg (0,25 mmol) de NaN₃. A reação foi aquecida até 50 °C e mantida sob agitação por uma noite. Então a reação foi resfriada, diluída com 20,0 mL de água destilada e extraída com acetato de

etila (3 x 50,0 mL). A fase orgânica foi lavada com salmoura, seca com MgSO_4 , e concentrado sob pressão reduzida e o resíduo foi purificado em coluna de sílica gel (Hexano/acetato de etila 20%). Após a análise dos produtos obtidos foi verificada apenas a presença do epóxido *cis*-4-fenil-2,3-oxiranobutanoato de etila (32,9 mg, 94%) **29**.

5.10.4 Método 4

À uma solução de 50 mg (0,17 mmol) de **24a** em 3,0 mL de DMF foi adicionado 16,0 mg (0,25 mmol) de NaN_3 . A reação foi aquecida até 50 °C e mantida sob agitação por uma noite. Então a reação foi resfriada, diluída com 20,0 mL de água destilada e extraída com acetato de etila (3 x 50,0 mL). A fase orgânica foi lavada com salmoura, seca com MgSO_4 , e concentrado sob pressão reduzida e o resíduo foi purificado em coluna de sílica gel (Hexano/acetato de etila 20%). Após a análise dos produtos obtidos foi verificada apenas a presença do epóxido 4-fenil-2,3-oxiranobutanoato de etila (31,5 mg, 90%) **29**.

5.10.5 Método 5

À uma solução de 50,0 mg (0,17 mmol) de **24a** em 3,0 mL de DMF foi adicionado 16,0 mg (0,25 mmol) de LiN_3 . A reação foi aquecida até 50 °C e mantida sob agitação por uma noite. Em seguida a mistura foi resfriada, diluída com 20,0 mL de água destilada e extraída com acetato de etila (3 x 50,0 mL). A fase orgânica foi lavada com salmoura, seca com MgSO_4 e

concentrada sob pressão reduzida. O resíduo foi purificado em coluna de sílica gel (Hexano/acetato de etila 20%). Após a análise dos produtos obtidos verificou-se apenas a presença do epóxido 4-fenil-2,3-oxiranobutanoato de etila (34,0 mg, 97%) **29**.

5.10.5.1 Preparo de LiN_3

Sob um pequeno aquecimento 1,30 g de NaN_3 e 1,41g de $\text{Li}_2\text{SO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ foram dissolvidos em 7,0 mL de água destilada. 35 mL de álcool etílico (96%) foi adicionado e após 10 minutos a reação foi filtrada e o resíduo de Na_2SO_4 e Li_2SO_4 lavado com álcool etílico. O filtrado e as soluções de lavagem foram evaporadas e secas em estufa a 80 °C. O produto cru foi digerido a 35 °C por 2 minutos com 10 mL de álcool etílico (96%) e a solução foi seca novamente como descrito anteriormente. Obteve-se 558,6 mg (57%) do azoteto de lítio.

5.10.6 Método 6

À uma solução de 50,0 mg (0,17 mmol) de **24a** em 0,5 mL de DMF foi adicionado 113 mg (0,4 mmol) de TBAN_3 . A reação foi aquecida até 50 °C e mantida sob agitação por uma noite. Então a reação foi resfriada, diluída com 20,0 mL de água destilada e extraída com acetato de etila (3 x 50,0 mL). A fase orgânica foi lavada com salmoura, seca com MgSO_4 , e concentrada sob pressão reduzida. O resíduo . foi purificado em coluna de sílica gel (Hexano/acetato de etila 20%). Após a análise dos produtos obtidos verificou-

se apenas a presença do epóxido 4-fenil-2,3-oxiranobutanoato de etila (92%)
29.

5.10.6.1 Preparo de TBAN_3

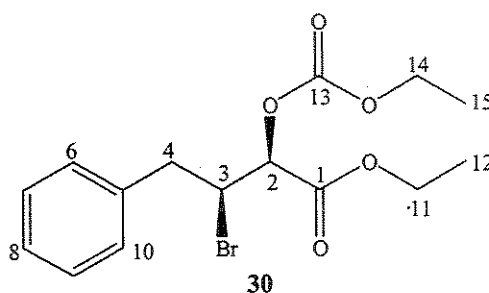
5,0 mL de uma solução 10,0 mol/L de NaOH foram adicionadas em 6,79 g de tetrabutilamônio hidrogênio sulfato em 10,0 mL de H_2O . Uma solução de 2,6 g de NaN_3 em 5,0 mL de H_2O foi adicionado e a azida de tetrabutila amônio foi extraída com diclorometano. O solvente foi evaporado e foi obtido 3,53 g (62%) do azoteto de tetrabutilamônio.

5.10.7 Método 7

À uma solução de 100,0 mg (0,35 mmol) de **24a** em 3,0 mL de CH_2Cl_2 seco, sob atmosfera de argônio, foi adicionado 16,0 mg (0,25 mmol) de TMSN_3 . A reação foi mantida sob agitação magnética a temperatura ambiente por 36 horas. Em seguida a mistura reacional foi lavada com uma solução saturada de bicarbonato de sódio e extraída com acetato de etila. A fase orgânica foi seca com MgSO_4 e evaporada a pressão reduzida. O resíduo foi analisado por CG/MS e verificou-se apenas a presença do material de partida **24a**.

5.11 Proteção de de 3-bromo-2-hidróxi-fenilbutanoato de etila 24a

1,0 mL (10,6 mmol) de cloroformiato de etila, 0,2 mL (2,48 mmol) de piridina e 50,0 mg (0,42 mmol) de DMAP foram dissolvidos em 10,0 mL de CH_2Cl_2 anidro sob atmosfera de argônio e mantidos sob agitação a 0 °C por 15 minutos. Então 500,0 mg (1,7 mmol) de **24a** dissolvido em 10,0 mL de CH_2Cl_2 anidro foram adicionados e a reação foi mantida por 5 horas a temperatura ambiente. A mistura reacional foi lavada com água destilada (2 x 30,0 mL), seca com MgSO_4 e filtrada em sílica gel. O solvente foi evaporado e obteve-se 542,0 mg de **30** (97%).



(2*S*,3*S*) 3-bromo-2-carbetoxi-fenilbutanoato de etila **30**

Óleo amarelo. **MM** = 359,21 ($\text{C}_{15}\text{H}_{19}\text{BrO}_5$). $[\alpha]_D^{20} = -12,0$ (c 1,2 CHCl_3). **IV** (filme) ν_{max} (cm^{-1}) : 3505, 3064, 3030, 2983, 2935, 1751, 1496, 1467, 1372, 1249, 1096, 1034, 749, 702. **EM** m/z (%) : 115 (100), 243 (1), 232 (5), 195 (5), 189 (33), 169 (1), 161 (10), 143 (30), 133 (41), 105 (26), 91 (70), 77 (15), 55 (20), 51 (15). **RMN** ^1H (300,1 MHz, CDCl_3) δ : 1,28 (3H,t, $J = 7,0$ Hz, H-12), 1,39 (3H,t, $J = 7,0$ Hz, H-15) 3,28 (2H, dd, $J = 2,9$ e 7,9 Hz, H-4), 4,31 (4H,m, H-11 e H-14), 4,59 (1H, td, $J = 2,6$ e 8,0 Hz, H-3), 5,01 (1H, d, $J = 2,2$ Hz, H-2), 7,30 (5H, m, H-6 a H-10). **RMN** ^{13}C (75,5 MHz, CDCl_3) δ : 14,2 (CH_3 , C-12), 14,3 (CH_3 , C-15), 41,7 (CH_2 , C-4), 50,5 (CH , C-3), 62,3 (CH_2 ,

C-14), 65,0 (CH₂, C-11), 75,2 (CHOH, C-2), 127,4 (CH, C-8), 128,8 (2CH, C-7 e C-9), 128,9 (2CH, C-6 e C-10), 136,7 (C₀, C-5), 154,1(C₀, C-13), 166,9 (C₀, C-1).

5.12 Azidação de 3-bromo-2-carbetoxi-fenilbutanoato de etila **30**

5.12.1 Método 1

À uma solução de 50,0 mg (0,15mmol) de **30** em 3,0 mL de DMSO, sob agitação a 10 °C, foi adicionado 16,0 mg (0,25 mmol) de NaN₃. A reação foi aquecida até 50 °C e mantida sob agitação por uma noite. Então a reação foi resfriada, diluída com 20,0 mL de água destilada e extraída com acetato de etila (3 x 50,0 mL). A fase orgânica foi lavada com salmoura, seca com MgSO₄, e concentrado sob pressão reduzida. O resíduo foi analisado por CG/MS foi verificou-se apenas a presença do material de partida **30**

5.12.2 Método 2

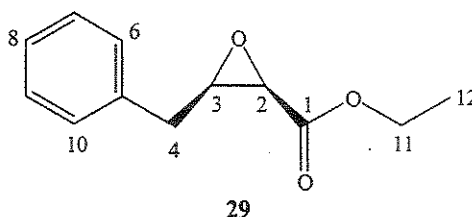
À uma solução de 50 mg (0,15mmol) de **30** em 3,0 mL de DMF foi adicionado 16,0 mg (0,25 mmol) de NaN₃. A reação foi aquecida até 50 °C e mantida sob agitação por uma noite. Então a reação foi resfriada, diluída com 20,0 mL de água destilada e extraída com acetato de etila (3 x 50,0 mL). A fase orgânica foi lavada com salmoura, seca com MgSO₄, e concentrado sob

pressão reduzida . O resíduo foi analisado por CG/MS foi verificou-se apenas a presença do material de partida **30**

5.13 Síntese de (2*R*, 3*R*)-4-fenil-2,3-oxiranobutanoato de etila **29**

5.13.1 Método 1

À uma solução de 100,0 mg (0,35 mmol) **24a** em 2 mL de éter etílico foi adicionado lentamente 2,0 mL de uma solução aquosa de KOH (5%), em banho de gelo foi mantida sob agitação por 3 horas à 25 °C. A reação é então neutralizada com HCl diluído e extraída com acetato de etila (3x 10,0 mL). Em seguida a fase orgânica foi seca com MgSO₄ e concentrada sob pressão reduzida, gerando um óleo amarelo que foi purificado em coluna de sílica gel (Hexano/acetato de etila 20%), sendo obtido o produto com 37% de rendimento (26,6 mg).



Óleo amarelado. **MM** = 206,24 (C₁₂H₁₄O₃). $[\alpha]^{20}_D = +4,2$ (c 0,9, CHCl₃). **IV** (filme) $\nu_{\max}$ (cm⁻¹) : 3458, 3062, 3028, 2930, 1733, 1603, 1496, 1455, 1379, 1253, 1197, 1094, 1031, 701, 697. **EM** m/z (%) : 133 (100), 206 (2), 188 (1), 177 (5), 161 (3), 143 (1 5), 115 (33), 103 (33), 91 (40), 77 (35), 65 (20), 55 (75), 51 (30). **RMN** ¹H (300,1 MHz, CDCl₃) δ : 1,32 (3H, t, J = 7,3 Hz, H-12), 2,90 (1H, dd, J = 6,6 e 14,6 Hz, H-4), 3,10 (1H, dd, J = 6,5 e 14,3 Hz, H-4),

3,38 (1H,td, $J = 6,6$ e $4,8$ Hz, H-3), 3,58 (1H, d, $J = 4,8$ Hz, H-2), 4,30 (2H, q, $J = 7,3$ Hz, H-11), 7,23 (5H, m, H-6 a H-10). **RMN** ^{13}C (75,5 MHz, CDCl_3) δ : 14,3 (CH_3 , C-12), 33,8 (CH_2 , C-4), 52,8 (CH , C-3), 57,7 (CH , C-2), 61,6 (CH_2 , C-11), 126,8 (CH , C-8), 128,7 (2 CH , C-7 e C-9), 128,9 (2 CH , C-6 e C-10), 136,5 (C_0 , C-5), 168,2 (C_0 , C-1).

5.13.2 Método 2

À solução de 100 mg (0,35 mmol) **24a**, cloreto de tetrabutilamônio (1 mg, 1mol %) em 3,0 mL de benzeno foi adicionado lentamente 1,0 mL de uma solução aquosa de KOH (50%) em banho de gelo. Após a adição a mistura reacional foi mantida sob agitação por 1 hora a temperatura ambiente. A reação foi então neutralizada com HCl diluído e extraída com acetato de etila (3x 10,0 mL). A fase orgânica foi seca com MgSO_4 e concentrado sob pressão reduzida gerando um óleo amarelo que foi purificado em coluna de sílica gel (Hexano/acetato de etila 20%). Foi obtido 37,5 mg de **29** (52%).

5.13.3 Método 3

30,0 mg (1,3 mmol) de sódio metálico foi dissolvido, sob atmosfera de argônio, em 5,0 mL de álcool etílico seco. À solução foi adicionada a 287,0 mg (1,0 mmol) de **24a** em banho de gelo. A mistura foi agitada por 7 horas a temperatura ambiente e então adicionada em água destilada à 0°C . Após a acidificação com HCl diluído a reação foi extraída com acetato de etila (3x 10,0 mL), fase orgânica é seca com MgSO_4 e concentrado sob pressão

reduzida gerando um óleo amarelo que foi purificado em coluna de sílica gel (Hexano/acetato de etila 20%). Foi obtido 127,7 mg de **29** (62%).

5.13.4 Método 4

À uma solução de 140,0 mg (0,5 mmol) de **24a** em 2,0 mL de benzeno anidro foi adicionado 60,0 mg (2,5 mmol) de NaH. A mistura foi mantida sob agitação por uma noite a temperatura ambiente. Após filtração o solvente foi evaporado sob vácuo e o resíduo foi dissolvido em água destilada e extraído com acetato de etila (3x 10,0 mL). A fase orgânica foi seca com MgSO₄ e concentrado sob pressão reduzida gerando um óleo amarelo que foi purificado em coluna de sílica gel (Hexano/acetato de etila 20%). Foi obtido 61,8 mg de **29** (60%).

5.13.5 Método 5

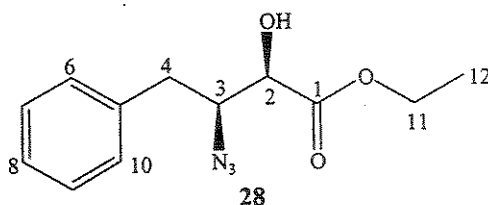
40,0 mg (0,14 mmol) foi adicionado a um balão de 25,0 mL de duas bocas, contendo um tudo dessecante com CaCl₂. Em uma das bocas adicionou-se 5,0 mL de etanol absoluto e 29,0 mg (0,21 mmol) de K₂CO₃. Após 2,5 horas foi adicionado mais (15,0 mg) de K₂CO₃ mantendo a reação por mais 7,0 horas. A mistura reacional foi diluída com acetato de etila (50,0 mL) e de água destilada (50,0 mL) e as fases foram separadas. A fase aquosa foi extraída com acetato de etila (2 x 30,0 mL). As fases orgânicas foram lavadas com salmoura (2 x 20,0 mL), secas com MgSO₄ e concentradas à pressão

reduzida gerando um óleo amarelo que foi purificado em coluna de sílica gel (Hexano/acetato de etila 20%). Obteve-se 25,7 mg de **29** (89%).

5.14 Síntese de (2*R*, 3*S*) 3-azido-2-hidróxi-fenilbutanoato de etila **28**

5.14.1 Método 1

À uma solução de 100,0 mg (0,35 mmol) de **29** em 4,0 mL de álcool etílico e 0,5 mL de água destilada foi adicionado 133,0 mg (2,0 mmol) de NaN₃ e 44,0 mg (0,8 mmol) de NH₄Cl. A mistura foi mantida sob refluxo por 5 horas e então concentrada à pressão reduzida. O resíduo obtido foi purificado em coluna filtrante de sílica gel, sendo o produto obtido com 80 % de rendimento (69,7 mg).



Óleo amarelo. **MM** = 249,27 (C₁₂H₁₅N₃O₃). $[\alpha]_D^{20} = -12,0$ (c 1,8, CHCl₃) **IV** (filme) $\nu_{\max}$ (cm⁻¹) : 3489, 3031, 2990, 2928, 2114, 1743, 1603, 1496, 1450, 1367, 1259, 1114, 1022, 748, 697. **EM** m/z (%) : 91 (100), 221(1), 206 (2), 189 (1), 177 (1), 161 (2), 148 (5), 133 (15), 118 (20), 104 (15), 76 (20), 65 (27), 51 (20). **RMN** ¹H (300,1 MHz, CDCl₃) δ : 1,29 (3H, t, J = 7,2 Hz, H-12), 3,11 (2H, d, J = 8,0 e , H-4), 3,75 (1H, td, J = 1,8 e 7,7 Hz, H-3), 4,10 (1H, dd, J = 1,8 e 7,4 Hz, H-2), 4,28 (2H, m, H-11), 7,25 (5H, m, H-6 a H-10). **RMN**

^{13}C (75,5 MHz, CDCl_3) δ : 14,1 (CH_3 , C-12), 36,2 (CH_2 , C-4), 62,5 (CH_2 , C-11), 64,3 (CH , C-3), 71,4 (CHOH , C-2), 127,1 (CH , C-8), 128,8 (2 CH , C-7 e C-9), 129,4 (2 CH , C-6 e C-10), 136,7 (C_0 , C-5), 172,7 (C_0 , C-1).

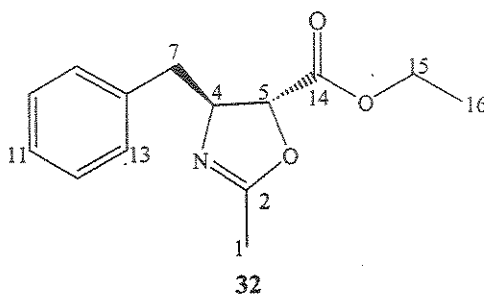
5.14.2 Método 2

À uma solução de 200,0 mg (0,7 mmol) de **29** em 2,0 mL de diclorometano seco, sob atmosfera de argônio, foi adicionado 0,25 mL de $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ e 0,2 mL de azida de trimetilsilano. A reação foi mantida sob agitação a temperatura ambiente por 3 horas. Em seguida reação foi lavada com uma solução saturada de bicarbonato de sódio e extraída com acetato de etila. Após purificação foi obtido 156,9 mg (90%) de **28**.

5.15 Síntese de (4*S*,5*R*)-4-benzil-2-metil-2-oxazolina-5-carboxilato de etila **32**

À uma solução de 45,0 mg (0,15 mmol) de **29** em 0,5 mL de acetonitrila anidra sob atmosfera de argônio foi adicionado 0,1 mL de $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$. A mistura reacional foi mantida sob agitação por 4 horas a temperatura ambiente. O excesso de acetonitrila foi evaporado e o resíduo foi diluído com éter (2,0 mL) e lavado com uma solução saturada de bicarbonato de sódio. As fases orgânicas foram combinadas e secas com MgSO_4 . O resíduo obtido foi purificado em coluna de sílica gel (Hexano/Acteto de etila 15%). O produto

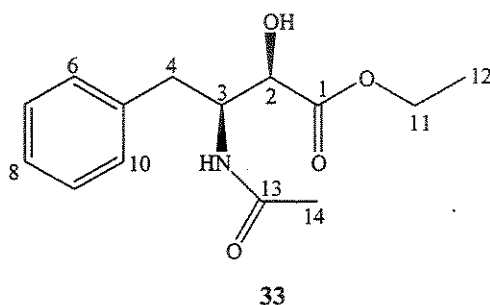
isolado **32** (35,6 mg, 96%) foi analisado por espectrometria no infravermelho, espectrometria de massas, rotação ótica e espectrometria de RMN de ^1H e ^{13}C .



Óleo marron. **MM** = 247,29 ($\text{C}_{14}\text{H}_{17}\text{NO}_3$). $[\alpha] = -14,5$ (c 1,3, CHCl_3). **IV** (filme) ν_{max} (cm^{-1}) : 33346, 2923, 1774, 1759, 1738, 1496, 1455, 1367, 1247, 1220, 701, 698. **EM** m/z (%) : 84 (100), 247 (3), 206 (5), 188 (1), 174 (10), 156 (42), 144 (5), 133 (10), 112 (20), 103 (10), 77 (20), 65 (20), 43 (33). **RMN** ^1H (300,1 MHz, CDCl_3) δ : 1,18 (3H, t, $J = 7,3$ Hz, H-16), 2,02 (3H, s, H-1), 2,84 (1H, dd, $J = 14,0$ e 7,0 Hz, H-7), 3,05 (1H, dd, $J = 14,0$ e 7,0 Hz, H-7), 4,11 (2H, q, $J = 7,0$ Hz H-15), 4,40 (1H, m, H-5), 4,51 (1H, d, $J = 6,6$ Hz, H-5), 7,23 (5H, m, H-9 a H-13). **RMN** ^{13}C (75,5 MHz, CDCl_3) δ : 14,2 (CH_3 , C-16), 14,4 (CH_3 , C-1), 42,0 (CH_2 , C-7), 62,3 (CH_2 , C-15), 72,9 (CH, C-4), 80,7 (CH, C-5), 129,7 (CH, C-11), 128,3 (2CH, C-10 e C-12), 130,1 (2CH, C-9 e C-13), 137,8 (C_0 , C-8), 171,4 (C_0 , C-14).

5.16 Síntese de (2*R*, 3*S*)-4-fenil-2-hidroxi-3-acetilamino-butanoato de etila 33

A 235,0 mg (0,84 mmol) de **32** foi adicionado 10,0 mL de uma solução de HCl (0,5 mol/L) e mantido sob agitação por 1,5 h. À mistura reacional foi adicionado lentamente uma solução NaHCO₃ saturada até que se atinja pH 9,0. A solução resultante é mantida sob agitação por uma noite e então é extraída com diclorometano (3x 20,0 mL). As frações orgânicas foram secas com MgSO₄ e o solvente foi evaporado sob pressão reduzida. O produto foi purificado por recristalização sendo obtido 200,0 mg (95%).

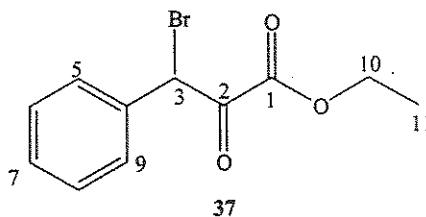


MM = 265,31 (C₁₄H₁₉NO₄). Sólido branco **PF** = 110-114 °C. $[\alpha]_D^{20} = -18,0$ (c 1,3 CHCl₃). **IV** (filme) $\nu_{\max}$ (cm⁻¹) : 3334,6, 2923, 1774, 1759, 1738, 1496, 1455, 1367, 1247, 1220, 701, 698. **EM** m/z (%) : 84 (100), 247 (3), 206 (5), 188 (1), 174 (10), 156 (42), 144 (5), 133 (10), 112 (20), 103 (10), 77 (20), 65 (20), 43 (33). **RMN** ¹H (300,1 MHz, CDCl₃) δ : 1,18 (3H, t, J = 7,3 Hz, H-12), 2,02 (3H, s, H-14), 2,84 (1H, dd, J = 14,0 e 7,0 Hz, H-4), 3,05 (1H, dd, J = 14,0 e 7,0 Hz, H-4), 4,11 (2H, m, H-11), 4,40 (1H, td, J = 6,6 e 7,0 Hz, H-2), 4,51 (1H, d, J = 6,6 Hz, H-2), 5,84 (1H, d, J = 9,1 Hz, NH), 7,23 (5H, m, H-6 a

H-10). RMN ^{13}C (75,5 MHz, CDCl_3) δ : 14,2 (CH_3 , C-12), 14,4 (CH_3 , C-14), 42,0 (CH_2 , C-4), 62,3 (CH_2 , C-11), 72,9 (CH , C-3), 80,7 (CHOH , C-2), 129,7 (CH , C-8), 128,3 (2 CH , C-7 e C-9), 130,1 (2 CH , C-6 e C-10), 137,8 (C_0 , C-5), 171,4 (C_0 , C-1).

5.17 Síntese de 3-bromo-2-oxo-fenilpropionato de etila 37

A uma solução de 1,8 g (1,3 mmol) do ácido fenil piruvico em 50,0 mL de etanol foi adicionado 0,2 mL de ácido sulfúrico concentrado. A mistura foi mantida sob refluxo por 2 horas e o solvente foi evaporado. O resíduo foi parcionado com 10,0 mL de água destilada e extraído com acetato de etila. A fase organica foi seca e evaporada. O produto bruto desta reação foi dissolvido em 4,2 mL de CHCl_3 foi adicionado lentamente uma solução de bromo em tetracloreto de carbono (1,06 mol/L) até que esta se tornasse alaranjada. Após 3 horas de reação e por acompanhamento por CCD foi adicionada algumas gotas de tiosulfato de sódio, para neutralizar o excesso de bromo. A reação foi extraída com acetato de etila e a fase orgânica foi evaporada sob pressão reduzida. A reação foi purificada em coluna de sílica gel (hexano:acetato de etila, 8:2). Obteve-se um rendimento de 95 %. O produto foi analisado por espectrometria no infravermelho, espectrometria de massas e espectrometria de RMN de ^1H e ^{13}C .



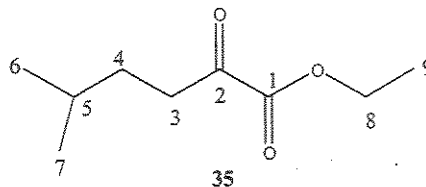
Óleo amarelo. **MM** = 287,15 g/ mol ($C_{11}H_{11}BrO_3$). **IV** (filme) $\nu_{\max}$ (cm^{-1}) : 3474, 3060, 3031, 2978, 2934, 1732, 1606, 1492, 1455, 1369, 1295, 1261, 1237, 1056. **EM** m/z (%) : 169 (100), 107 (3), 51 (4), 135 (5), 272 (6), 63 (15), 155 (10), 196 (28), 118 (45), 90 (53), 171 (98). **RMN** 1H (300,1 MHz, $CDCl_3$) δ : 1,33 (3H, t, $J = 7,3$ Hz, H-11), 4,33 (2H, m, H-11), 6,20 (1H, s, H-3), 7,37 (5H, m, H-5 a H-9). **RMN** ^{13}C (75,5 MHz, $CDCl_3$) δ : 14,5 (CH_3 , C-11), 50,4 (CH, C-3), 63,7 (CH_2 , C-10), 129,4 (CH, C-6 e C-8), 130,0 (2CH, C-5 e C-9), 130,1 (CH, C-7), 133,5 (C_0 , C-4), 160,3 (C_0 , C-1), 184,2 (C_0 , C-2).

5.18 Síntese de 2-oxo-6-metil-hexanoato de etila 35

Adicionou-se Mg^0 (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 alquila (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 brometo de alquila.

A solução do reagente de Grignard foi adicionada lentamente a uma solução de dietiloxalato (3,6 mL; 0,026 mmol) em 26 mL de THF anidro, à $-10^\circ C$ 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 (MgSO_4), evaporadas e purificadas por DSC (hexano/ETOAc 6%) fornecendo um óleo incolor (85% de rendimento).

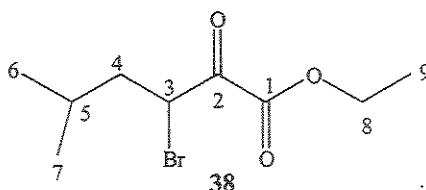


Óleo verde. **MM** = 172,22 g/mol ($\text{C}_{10}\text{H}_{16}\text{O}_3$). **IV** (filme) ν_{max} (cm^{-1}): 2953, 2934, 2880, 1727, 1723, 1469, 1245, 1070. **EM** m/z (%): 172 (2), 126(14), 99 (100), 81 (92). **RMN de ^1H** (300,1 MHz, CDCl_3) δ : 0,95 (d, 6H, $J=2,2$ Hz, H-6 e H-7), 1,33 (t, 3H, $J=7,3$ Hz, H-9), 1,37 (m, 3H, H-4 e H-5), 2,83 (m, 2H, H-3), 4,35 (q, 2H, $J=7,3$ Hz, H-8). **RMN de ^{13}C** (75,0 MHz, CDCl_3) δ : 14,6 (CH_3 , C-9); 22,9 (2 CH_3 , C6 e C-7); 28,1 (CH , C-5); 32,3 (CH_2 , C-4), 37,9 (CH_2 , C-8); 62,9 (CH_2 , C-3); 161,7 (C_0 , C-1); 195,2 (C_0 , C-2).

5.19 Síntese de 3-bromo-2-oxo-5-metil-hexanoato de etila 38

A uma solução de 2-oxo-6-metil-hexanoato de etila **35** (1,0 g, 5,9 mmol) em 1,4 mL de CHCl_3 foi adicionado lentamente uma solução de bromo em tetracloreto de carbono (1,06 mol/L) até que esta se tornasse alaranjada. Após 3 horas de reação e por acompanhamento por CCD foi adicionada algumas gotas de tiosulfato de sódio, para neutralizar o excesso de bromo. A reação foi extraída com acetato de etila e a fase orgânica foi evaporada sob pressão reduzida. A reação foi purificada em coluna de sílica gel (hexano:acetato de etila, 8:2). Obteve-se um rendimento de 95 %. O produto

foi analisado por espectrometria no infravermelho, espectrometria de massas e espectrometria de RMN de ^1H e ^{13}C .



Óleo amarelo. **MM** = 251,12 g/mol ($\text{C}_{10}\text{H}_{15}\text{BrO}_3$). **IV** (filme) ν_{max} (cm^{-1}) : 3491, 2960, 2939, 2876, 1735, 1604, 1470, 1388, 1369, 1304, 1069, 1028, 856. **EM** m/z (%) : 69 (100), 252 (1), 194(2), 81 (3), 135 (3), 149 (8), 177 (9), 171 (13), 98 (15), 55 (52). **RMN ^1H** (300,1 MHz, CDCl_3) δ : 0,95 (3H,d, J = 6,6 Hz, H-6), 0,99 (3H,d, J = 6,6 Hz, H-7), 1,40 (3H, t, J = 7,1 Hz, H-9), 1,91 (3H, m, H-4 e H-5), 4,40 (2H, q, J = 7,0 Hz, H-8), 5,10 (1H, dd, j = 3,1 e 6,5 Hz, H-5). **RMN de ^{13}C** (75,0 MHz, CDCl_3) δ : 13,9 (CH_3 , C-9); 21,4 (CH_3 , C-6), 22,6 (CH_3 , C-7); 26,1 (CH, C-5); 40,3 (CH_2 , C-4), 46,8 (CH_2 , C-3); 62,9 (CH_2 , C-8); 160,3 (C_0 , C-2); 185,5 (C_0 , C-1).

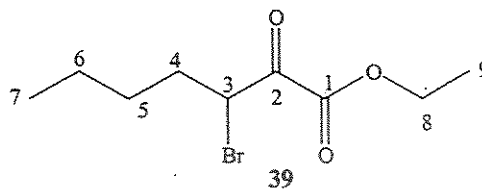
5.20 Síntese de 2-oxo-heptanoato de etila 36

Adicionou-se Mg° (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 do brometo de alquila (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 brometo de alquila.

A solução com o reagente de Grinard 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. O produto foi de difícil purificação e po CG/MS foi verificada a presença apenas de **36** e o dietil oxalato. Este material bruto foi bromado e assim foi possível a purificação do produto formado **39**.

5.21 Síntese de 3-bromo-2-oxo-heptanoato de etila **39**

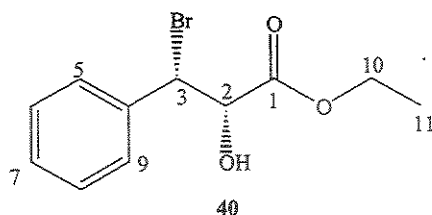
A uma solução de 2-oxo-heptanoato de etila **36** (1,0 g, produto bruto obtido da reação mencionada acima) em 1,4 mL de CHCl₃ foi adicionado lentamente uma solução de bromo em tetracloreto de carbono (1,06 mol/L) até que esta se tornasse alaranjada. Após 3 horas de reação e por acompanhamento por CCD foi adicionada algumas gotas de tiosulfato de sódio, para neutralizar o excesso de bromo. A reação foi extraída com acetato de etila e a fase orgânica foi evaporada sob pressão reduzida. A reação foi purificada em coluna de sílica gel (hexano:acetato de etila, 8:2). Obteve-se um rendimento de quantitativo tendo em vista que o material de partida não estava puro.



Óleo amarelo. **MM** = 251,12 g/mol ($C_{10}H_{15}BrO_3$). **IV** (filme) $\nu_{\max}$ (cm^{-1}) : , 2960, 2931, 2875, 2860, 1754, 1727, 1586, 1465, 1370, 1299, 1275, 1237, 1066, 1030. **EM** m/z (%) : 69 (100), 252 (1), 194(2), 81 (3), 135 (3), 149 (8), 177 (9), 171 (13), 98 (15), 55 (52),. **RMN** 1H (300,1 MHz, $CDCl_3$) δ : 0,93 (3H,t, $J = 7,3$ Hz, H-7), 1,40 (7H, m, H-5, H-6 e H-9), 2,43 (2H, m, H-4), 4,37 (2H, q, $J = 7,2$ Hz, H-8), 5,0,3 (1H, dd, $j = 2,8$ e $6,3$ Hz, H-5). **RMN de** ^{13}C (75,0 MHz, $CDCl_3$) δ : 13,9 (CH_3 , C-9); 14,1 (CH_3 , C-7); 22,1 (CH_2 , C6), 29,3 (CH_2 , C-5); 31,7 (CH_2 , C-4); 48,4 (CH , C-3), 62,9 (CH_2 , C-8); 160,5 (C_0 , C-1); 185,6 (C_0 , C-2).

5.22 Síntese de (2*S*, 3*S*)-3-bromo-2-hidroxi-fenilpropanoato de etila 40

O procedimento é semelhante ao do item 5.5.2.1. Foram adicionados ao reator 30,0 g de *Saccharomyces cerevisiae* imobilizado em alginato de cálcio, 300mL de solução tampão fosfato pH 4,0 e 8,0 g de glicose Após 2,0 horas o pH da reação foi medido e ajustado com uma solução de NH_4OH 10 %, então, adicionou-se 24,2 mmol de **37**, lentamente durante 10h. A cada 6 h foi adicionado à reação 1,6 g de glicose. A reação foi acompanhada por CCD e CG/EM e após 24 horas extraiu-se a reação com acetato de etila e a fase orgânica foi seca com $MgSO_4$, filtrada e concentrada à vácuo.



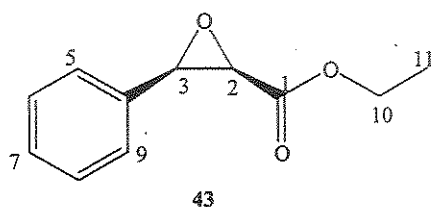
MM = 287,15 g/ mol ($C_{11}H_{11}BrO_3$). Sólido branco **PF** = 84-87 °C. $[\alpha]_D^{20} = +42,0$ (c 1,3 $CHCl_3$). **IV** (filme) ν_{max} (cm^{-1}) : 3503, 2946, 2919, 2890, 1717, 1450, 1361, 1284, 1250, 1025. **EM** m/z (%) : 91 (100), 272 (1), 254 (10), 228 (1), 201 (3), 193 (30), 169 (52), 119 (48), 103 (10), 77 (8), 65 (11), 51 (8). **RMN** 1H (300,1 MHz, $CDCl_3$) δ : 1,33 (3H, t, $J = 7,3$ Hz, H-11), 3,36 (1H, d, $J=7,3$ Hz, H-2), 4,33 (2H, m, H-10), 4,46 (1H, dd, $J=2,2$ e $7,3$ Hz, H-3) 5,37 (1H, d, $J = 2,3$ Hz, H-2), 7,32 (5H, m, H-5 a H-9). **RMN** ^{13}C (75,5 MHz, $CDCl_3$) δ : 14,8 (CH_3 , C-11), 56,3 (CH, C-3), 63,2 (CH_2 , C-10), 74,8 (CH, C-2), 128,9 (CH, C-6 e C-8), 130,0 (2CH, C-5 e C-9), 130,1 (CH, C-7), 133,5 (C_0 , C-4), 160,3 (C_0 , C-1),.

5.23 Síntese de (4*R*, 3*R*)-fenil-2,3-oxiranofenilpropanoato de etila

43

39,3 mg (0,14 mmol) **40** foi adicionado a um balão de 25,0 mL de duas bocas, contendo um tudo dessecante com $CaCl_2$. Em uma das bocas adicionou-se 5,0 mL de etanol absoluto e 29,0 mg (0,21 mmol) de K_2CO_3 . Após 2,5 horas foi adicionado mais (15,0 mg) de K_2CO_3 mantendo a reação por mais 7,0 horas. A mistura reacional foi diluída com acetato de etila (50,0 mL) e de água destilada (50,0 mL) e as fases foram separadas. A fase aquosa foi

extraída com acetato de etila (2 x 30,0 mL). As fases orgânicas foram lavadas com salmoura (2 x 20,0 mL), secas com MgSO_4 e concentradas à pressão reduzida gerando um óleo amarelo que foi purificado em coluna de sílica gel (Hexano/acetato de etila 20%). Obteve-se 86% de **43**.

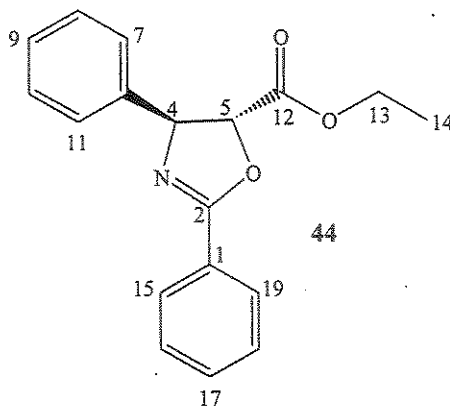


Óleo incolor. $\text{MM} = 192,21 \text{ g/mol}$ ($\text{C}_{11}\text{H}_{12}\text{O}_3$). $[\alpha]_D^{20} = +15,0$ (c 1,8, CHCl_3). **IV** (filme) ν_{max} (cm^{-1}): 3015, 2978, 2951, 2919, 2880, 1733, 1455, 1361, 1046. **EM** m/z (%): 91 (100), 192 (12), 176 (8), 146 (14), 135 (85), 118 (39), 107 (46), 79 (42), 65 (19), 55 (11). **RMN** ^1H (300,1 MHz, CDCl_3) δ : 1,32 (3H, t, $J = 7,3 \text{ Hz}$, H-11), 3,50 (1H, d, $J = 1,5 \text{ Hz}$, H-3), 4,11 (1H, d, $J = 1,5 \text{ Hz}$, H-2), 4,23 (2H, m, H-10) 7,24 (5H, m, H-5 a H-9). **RMN** ^{13}C (75,5 MHz, CDCl_3) δ : 14,6 (CH_3 , C-11), 57,2 (CH , C-3), 58,3 (CH , C-2), 62,2 (CH_2 , C-10), 126,3 (CH , C-6 e C-8), 129,1 (2 CH , C-5 e C-9), 129,4 (CH , C-7), 135,4 (C_0 , C-4), 168,6 (C_0 , C-1),.

5.24 Síntese de 3-fenil-2-metil-2-oxazolina-5-carboxilato de etila **44**

À uma solução de 28,8 mg (0,15 mmol) de **43** em 0,5 mL de benzonitrila anidra sob atmosfera de argônio foi adicionado 0,1 mL de $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$. A mistura reacional foi mantida sob agitação por 4 horas a temperatura ambiente. O excesso de benzonitrila foi evaporado e o resíduo foi diluído com éter (2,0 mL) e lavado com uma solução saturada de bicarbonato

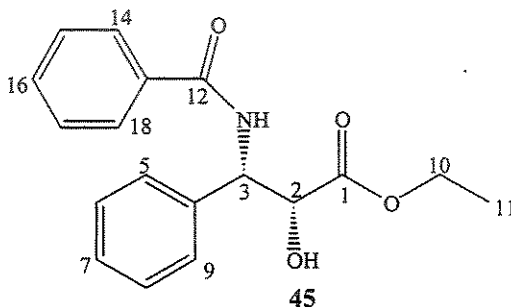
de sódio. As fases orgânicas foram combinadas e secas com MgSO_4 . O resíduo obtido foi purificado em coluna de sílica gel (Hexano/Acteto de etila 15%). O produto isolado **44** (98%) foi analisado por espectrometria no infravermelho, espectrometria de massas, rotação ótica e espectrometria de RMN de ^1H e ^{13}C .



Óleo marron. **MM** = 295,33 g/ mol ($\text{C}_{18}\text{H}_{17}\text{NO}_3$). $[\alpha]^{20}_{\text{D}} = -32,0$ (c 1,0, CHCl_3) **IV** (filme) ν_{max} (cm^{-1}) : 3017, 3005, 2958, 2923, 2222, 1752, 1654, 1455, 1361, 1016, 970. **EM** m/z (%) : 222 (100), 194 (11), 193 (66), 166 (4), 165 (15), 145 (2), 132 (2), 119 (20), 105 (72), 89 (93), 91 (89), 77(70), 65 (50), 51(60). **RMN** ^1H (300,1 MHz, CDCl_3) δ : 1,35 (3H, t, $J = 7,3$ Hz, H-14), 4,33 (2H, m, H-13), 4,88 (1H, d, $J = 6,6$ Hz, H-4), 5,43 (1H, d, $J = 6,6$ Hz, H-5), 7,24 (5H, m, H-7 a H-11 e H-15 a H-19). **RMN** ^{13}C (75,5 MHz, CDCl_3) δ : 14,6 (CH_3 , C-14), 62,3 (CH_2 , C-13), 73,9 (CH, C-4), 75,1 (CH, C-5), 126,9 – 133,1 (CH, C-7, C-8, C-9, C-10, C11, C-15, C-16, C-17, C-18, C-19 e C_0 , C-6), 141,0 (C_0 , C-1), 170,6 (C_0 , C-2), 178,1 (C_0 , C-12).

5.25 Síntese de 4-fenil-2-hidroxi-3-acetilamino-propionato de etila **45**

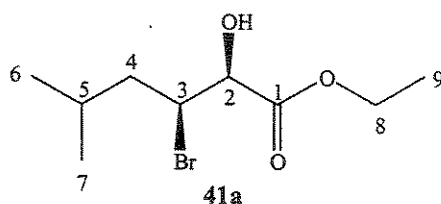
A 263,0 mg (0,84 mmol) de **43** foi adicionado 10,0 mL de uma solução de HCl (0,5 mol/L) e mantido sob agitação por 1,5 h. À mistura reacional foi adicionado lentamente uma solução NaHCO₃ saturada até que se atinja pH 9,0. A solução resultante é mantida sob agitação por uma noite e então é extraída com diclorometano (3x 20,0 mL). As frações orgânicas foram secas com MgSO₄ e o solvente foi evaporado sob pressão reduzida. O produto foi purificado por recristalização.



MM = 313,13 g/ mol (C₁₈H₁₉NO₄). Sólido branco **PF** = 150-153 °C. $[\alpha]_D^{20} = -21,7$ (c 1,0 CHCl₃). **IV** (filme) $\nu_{\max}$ (cm⁻¹) : 3474, 3446, 3005, 2919, 2923, 2807, 1713, 1635, 1450, 1354,. **EM** m/z (%) : 222 (100), 194 (11), 193 (66), 166 (4), 165 (15), 145 (2), 132 (2), 119 (20), 105 (72), 89 (93), 91 (89), 77(70), 65 (50), 51(60). **RMN** ¹H (300,1 MHz, CDCl₃) δ : 1,26 (3H, t, J = 7,3 Hz, H-11), 3,26 (1H, s, H-19), 4,25 (2H, m, H-10), 4,62 (1H, d, J= 1,9 Hz, H-3), 5,74 (1H, dd, J = 2,0 e 9,0 Hz, H-2), 6,98 (1H, d, J=9,0 Hz, H-19), 7,24 (10H, m, H-5 a H-9 e H-14 a H-18). **RMN** ¹³C (75,5 MHz, CDCl₃) δ : 14,7 (CH₃, C-11), 55,2 (CH, C-3), 63,3 (CH₂, C-10), , 73,8 (CH, C-2), 127,3 – 132,1 (CH, C-6, C-8, C-5, C-9, C14, C-15, C-16, C-17 e C-18), 134,6 (C₀, C-4), 139,2 (C₀, C-13), 167,1 (C₀, C-12), 173,3 (C₀, C-1).

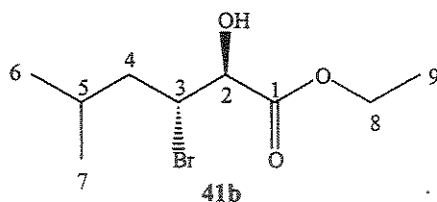
5.26 Bioedução de 3-bromo-2-oxo-5-metil-hexanoato de etila 38

O procedimento é semelhante ao do ítem 5.5.2.1. Foram adicionados ao reator 30,0 g de *Saccharomyces cerevisiae* imobilizado em alginato de cálcio, 300mL de solução tampão fosfato pH 4,0 e 8,0 g de glicose. Após 2,0 horas o pH da reação foi medido e ajustado com uma solução de NH_4OH 10 %, então, adicionou-se 24,2 mmol de 38, lentamente durante 10h. A cada 6 h foi adicionado à reação 1,6 g de glicose. A reação foi acompanhada por CCD e CG/EM e após 24 horas extraiu-se a reação com acetato de etila e a fase orgânica foi seca com MgSO_4 , filtrada e concentrada à vácuo.



Óleo incolor. (2*S*, 3*S*)-3-bromo-2-hidroxi-5-metil-hexanoato de etila 41a

MM = 253,12 g/mol ($\text{C}_{10}\text{H}_{17}\text{BrO}_3$). $[\alpha]_D^{20} = -15,7$ (c 1,5 CHCl_3). **IV** (filme) ν_{max} (cm^{-1}) : 3430, 2958, 2908, 2820, 1733, 1027. **EM** m/z (%) : 81 (100), 181 (21), 173(5), 163 (17), 155 (36), 99 (55), 69 (18), 57 (60). **RMN ^1H** (300,1 MHz, CDCl_3) δ : 0,95 (3H,d, $J = 7,3$ Hz, H-6), 0,99 (3H,d, $J = 7,3$ Hz, H-7), 1,36 (3H, m, H-9), 1,4 -2,3 (3H, m, H-4 e H-5), 3,16 (1H, d, $J=6,0$ Hz, H-3), 4,22 (2H, m, H-2), 4,32 (2H, q, $J = 7,2$ Hz, H-8). **RMN de ^{13}C** (75,0 MHz, CDCl_3) δ : 14,2 (CH_3 , C-9); 21,4 (CH_3 , C-7); 22,6 (CH_2 , C6), 26,1 (CH_2 , C-5); 44,1 (CH_2 , C-4); 55,9 (CH, C-3), 62,4 (CH_2 , C-8); 73,1 (CH, C-2), 171,8 (C_0 , C-1);.



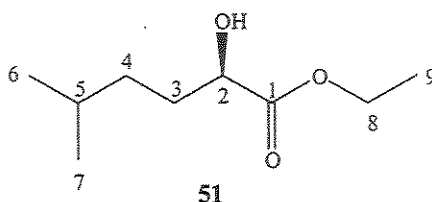
(2*S*, 3*R*)-3-bromo-2-hidroxi-5-metil-hexanoato de etila 41b

Óleo incolor. $MM = 253,12 \text{ g/mol}$ ($C_{10}H_{17}BrO_3$). $[\alpha]_D^{20} = -8,41$ (c 1,7 $CHCl_3$). **IV** (filme) ν_{max} (cm^{-1}): 3430, 2958, 2908, 2820, 1733, 1027. **EM** m/z (%): 81 (100), 181 (21), 173(5), 163 (17), 155 (36), 99 (55), 69 (18), 57 (60). **RMN** 1H (300,1 MHz, $CDCl_3$) δ : 0,95 (3H,d, $J = 7,3 \text{ Hz}$, H-6), 0,99 (3H,d, $J = 7,3 \text{ Hz}$, H-7), 1,36 (3H, m, H-9), 1,4 -2,3 (3H, m, H-4 e H-5), 3,16 (1H, d, $J=6,0 \text{ Hz}$, H-3), 4,22 (2H, m, H-2), 4,32 (2H, q, $J = 7,2 \text{ Hz}$, H-8). **RMN de** ^{13}C (75,0 MHz, $CDCl_3$) δ : 14,2 (CH_3 , C-9); 20,8 (CH_3 , C-7); 23,1 (CH_2 , C6), 26,0 (CH_2 , C-5); 42,4 (CH_2 , C-4); 55,4 (CH, C-3), 62,4 (CH_2 , C-8); 74,6 (CH, C-2), 171,2 (C_0 , C-1);.

5.27 Determinação da configuração absoluta de 3-bromo-2-hidroxi-5-metil-hexanoato de etila 41a

À uma solução de 177,0mg (0,7 mmol) de **41a** em 3,0 mL de etanol anidro foram adicionados 57,0 mg (0,7 mmol) de acetato de sódio e (16,0 mg) de Pd/C 5% sob atmosfera de argônio. A mistura foi mantida sob agitação a temperatura ambiente, sendo então purgada e adicionado uma bexiga contendo hidrogênio. A reação foi mantido em agitação por 2,0 horas. Então, a mistura foi filtrada em celite e extraída com acetato de etila (3 x 50,0 mL), a fase orgânica foi lavada com salmoura, seca com $MgSO_4$ e concentrado sob pressão reduzida gerando um óleo amarelo que foi purificado em coluna de

sílica gel (Hexano/acetato de etila 15%) fornecendo 138 mg de **51** (95%). Análise de rotação ótica foi realizada para determinação da configuração absoluta e comparada com a literatura⁷².



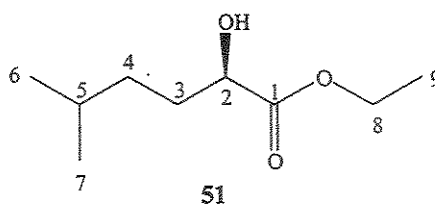
Óleo incolor. **MM** = 174,24 g/mol (C₁₀H₁₈O₃). $[\alpha]_D^{20} = +3,2$ (c 2,0 CHCl₃). **IV** (filme) $\nu_{\max}$ (cm⁻¹): 3450, 2958, 2840, 2780, 1728, 1120. **RMN** ¹H (300,1 MHz, CDCl₃) δ : 0,87 (3H, d, J = 7,3 Hz, H-6), 0,90 (3H, d, J = 7,3 Hz, H-7), 1,30 (3H, m, H-5, H-6 e H-9), 1,4 -1,9 (5H, m, H-3, H-4 e H-5), 4,18 (1H, m, H-5), 4,24 (2H, q, J = 7,2 Hz, H-8). **RMN** de ¹³C (75,0 MHz, CDCl₃) δ : 14,6 (CH₃, C-9); 22,6 (CH₃, C-6 e C-7); 28,2 (CH₂, C-5); 32,6 (CH₂, C-4); 55,4 (CH, C-3), 62,0 (CH₂, C-8); 71,1 (CH, C-2), 175,8 (C=O, C-1).

5.28 Determinação da configuração absoluta de 3-bromo-2-hidroxi-5-metil-hexanoato de etila **41b**

À uma solução de 177,0 mg (0,7 mmol) de **41b** em 3,0 mL de etanol anidro foram adicionados 57,0 mg (0,7 mmol) de acetato de sódio e (16,0 mg) de Pd/C 5% sob atmosfera de argônio. A mistura foi mantida sob agitação a temperatura ambiente, sendo então purgado e adicionado uma bexiga contendo

⁷² Dao, D. H.; Hornes, S.; Okamura, M.; Akasaka, T.; Kawai, Y.; Hida, K.; Ohno, A. *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, 1998, 71, 425

hidrogênio. A reação foi mantida em agitação por 2,0 horas. Então, a mistura foi filtrada em celite e extraída com acetato de etila (3 x 50,0 mL), a fase orgânica foi lavada com salmoura, seca com MgSO_4 e concentrado sob pressão reduzida gerando um óleo amarelo que foi purificado em coluna de sílica gel (Hexano/acetato de etila 15%) fornecendo 138 mg de **51** (95%). Análise de rotação ótica foi realizada para determinação da configuração absoluta e comparada com a literatura⁷².



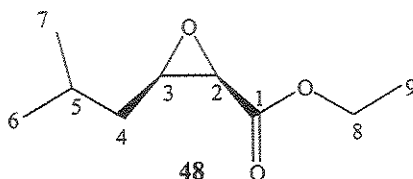
Óleo incolor. $\text{MM} = 174,24 \text{ g/mol}$ ($\text{C}_{10}\text{H}_{18}\text{O}_3$). $[\alpha]_D^{20} = +3,8$ (c 2,0 CHCl_3). **IV** (filme) ν_{max} (cm^{-1}): 3450, 2958, 2840, 2780, 1728, 1120. **RMN ^1H** (300,1 MHz, CDCl_3) δ : 0,87 (3H, d, $J = 7,3 \text{ Hz}$, H-6), 0,90 (3H, d, $J = 7,3 \text{ Hz}$, H-7), 1,30 (3H, m, H-5, H-6 e H-9), 1,4 -1,9 (5H, m, H-3, H-4 e H-5), 4,18 (1H, m, H-5), 4,24 (2H, q, $J = 7,2 \text{ Hz}$, H-8). **RMN de ^{13}C** (75,0 MHz, CDCl_3) δ : 14,6 (CH_3 , C-9); 22,6 (CH_3 , C-6 e C-7); 28,2 (CH_2 , C-5); 32,6 (CH_2 , C-4); 55,4 (CH , C-3), 62,0 (CH_2 , C-8); 71,1 (CH , C-2), 175,8 ($\text{C}_=$, C-1).

5.298 Síntese de (2*R*, 3*R*)-5-metil-2,3-oxirano-hexanoato de etila

48

35,6 mg (0,14 mmol) **41b** foi adicionado a um balão de 25,0 mL de duas bocas, contendo um tudo dessecante com CaCl_2 . Em uma das bocas

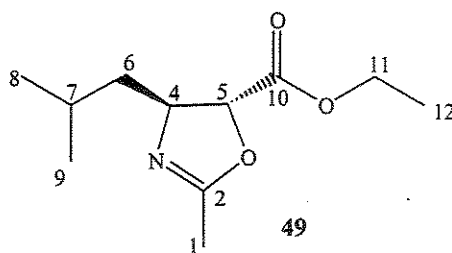
adicionou-se 5,0 mL de etanol absoluto e 29,0 mg (0,21 mmol) de K_2CO_3 . Após 2,5 horas foi adicionado mais (15,0 mg) de K_2CO_3 mantendo a reação por mais 7,0 horas. A mistura reacional foi diluída com acetato de etila (50,0 mL) e de água destilada (50,0 mL) e as fases foram separadas. A fase aquosa foi extraída com acetato de etila (2 x 30,0 mL). As fases orgânicas foram lavadas com salmoura (2 x 20,0 mL), secas com $MgSO_4$ e concentradas à pressão reduzida gerando um óleo amarelo que foi purificado em coluna de sílica gel (Hexano/acetato de etila 20%). Obteve-se 93% de **48**.



Óleo incolor. **MM** = 172,22 g/ mol ($C_9H_{16}O_3$). $[\alpha]_D^{20} = -3,0$ (c 1,0 $CHCl_3$). **IV** (filme) ν_{max} (cm^{-1}) : 2953, 2949, 2920, 1752, 1183, 1016. **EM** m/z (%) : 85 (100), 157 (15), 144(12), 139 (1), 129 (20), 115 (50), 99 (45), 81 (42), 69 (90), 55 (60). **RMN 1H** (300,1 MHz, $CDCl_3$) δ : 0,94 (3H,d, $J = 7,3$ Hz, H-6), 0,99 (3H,d, $J = 7,3$ Hz, H-7), 1,31 (3H, m, H-9), 1,33 -1,87 (3H, m, H-4 e H-5), 3,19 (1H, m, H-3), 3,51 (2H, d, $J=4,7$ Hz, H-2), 4,27 (2H, q, $J = 7,2$ Hz, H-8). **RMN de ^{13}C** (75,0 MHz, $CDCl_3$) δ : 14,6 (CH_3 , C-9); 22,6 (CH_3 , C-7); 23,1 (CH_2 , C6), 26,7 (CH_2 , C-5); 36,2 (CH_2 , C-4); 53,1 (CH , C-3), 53,1 (CH , C-2), 61,8 (CH_2 , C-8); 168,8 (C_0 , C-1).

5.30 Síntese de (4*S*, 5*R*)-4-isopropil-2-metil-2-oxazolina-5-carboxilato de etila 49

À uma solução de 25,8 mg (0,15 mmol) de **48** em 0,5 mL de acetonitrila anidra sob atmosfera de argônio foi adicionado 0,1 mL de $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$. A mistura reacional foi mantida sob agitação por 4 horas a temperatura ambiente. O excesso de acetonitrila foi evaporado e o resíduo foi diluído com éter (2,0 mL) e lavado com uma solução saturada de bicarbonato de sódio. As fases orgânicas foram combinadas e secas com MgSO_4 . O resíduo obtido foi purificado em coluna de sílica gel (Hexano/Acteto de etila 15%). O produto isolado **49** (98%) foi analisado por espectrometria no infravermelho, espectrometria de massas, rotação ótica e espectrometria de RMN de ^1H e ^{13}C .

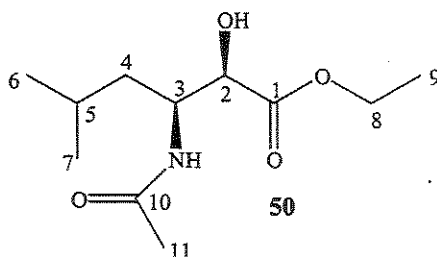


Óleo marrom. **MM** = 213,27 g/ mol ($\text{C}_{11}\text{H}_{19}\text{NO}_3$). $[\alpha]^{20}_{\text{D}} = + 13,0$ (c 1,6 CHCl_3). **IV** (filme) ν_{max} (cm^{-1}): 2963, 2920, 2880, 1808, 1732, 1016. **EM** m/z (%): 156 (100), 213 (1), 198(7), 184 (1), 170 (5), 140 (40), 129 (13), 115 (16), 98 (8), 84 (85), 68 (46), 55 (15). **RMN** ^1H (300,1 MHz, CDCl_3) δ : 0,98 (6H,m, H-8 e H9), 1,30 (3H, t, $J = 7,0$ Hz, H-12), 1,32 -1,99 (3H, m, H-6 e H-7), 2,05 (3H, s, H-1), 4,1 (1H, m, H-4), 4,2 (2H, m, H-11), 4,42 (2H, d, $J = 6,6$ Hz, H-5). **RMN** de ^{13}C (75,0 MHz, CDCl_3) δ : 14,2 (CH_3 , C-12); 14,5 (CH_3 ,

C-8 e C-9); 22,8 (CH₃, C-1), 25,2 (CH₂, C-7); 46,2 (CH₂, C-6); 62,0 (CH₂, C-11); 70,3 (CH, C-4), 81,6 (CH, C-5), 164,1 (C₀, C-2); 171,0 (C₀, C-10).

5.31 Síntese de (2*S*, 3*S*)-3-acetilamino-2-hidroxi-5-metilpentanoato de etila 50

A 178,9,0 mg (0,84 mmol) de **49** foi adicionado 10,0 mL de uma solução de HCl (0,5 mol/L) e mantido sob agitação por 1,5 h. À mistura reacional foi adicionado lentamente uma solução NaHCO₃ saturada até que se atinja pH 9,0. A solução resultante é mantida sob agitação por uma noite e então é extraída com diclorometano (3x 20,0 mL). As frações orgânicas foram secas com MgSO₄ e o solvente foi evaporado sob pressão reduzida. O produto foi purificado por recristalização.

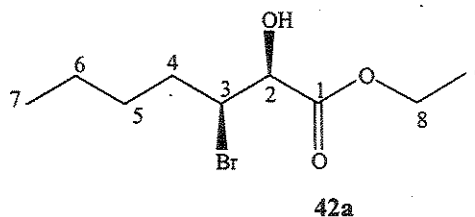


MM = 231,29 g/ mol (C₁₁H₂₁NO₄). **[α]²⁰_D** = - 13,0 (c 1,6 CHCl₃). **IV** (filme) **v_{max}** (cm⁻¹) : 3335, 2991, 2924, 2820, 1810, 1728, 1203. **EM** **m/z** (%) : 86 (100), 216 (1), 207 (1), 198 (1), 174 (3), 158 (10), 128 (60), 116 (9), 60 (10). **RMN ¹H** (300,1 MHz, CDCl₃) **δ** : 0,97 (6H, d, J = 6,7 Hz, H-6 e H7), 1,32 (3H, m, H-9), 1,33 -2,21 (3H, m, H-4 e H-5), 1,97 (3H, s, H-11), 4,18 (1H, d, J = 2,3, H-3), 4,22 (2H, q, J = 7,1 Hz, H-8), 4,44 (2H, m, H-2), 5,63 (1H, d, J =

6,8 Hz, H-12). **RMN de ^{13}C** (75,0 MHz, CDCl_3) δ : 14,1 (CH_3 , C-9); 22,3 (CH_3 , C-6 e C-7); 22,8 (CH_3 , C-11), 24,8 (CH_2 , C-5); 41,1 (CH_2 , C-4); 49,6 (CH , C-3); 62,4 (CH_2 , C-8); 72,2 (CH , C-2), 169,6 (C_0 , C-10); 173,4 (C_0 , C-1).

5.32 Bioedução de 3-bromo-2-oxo-heptanoato de etila 39

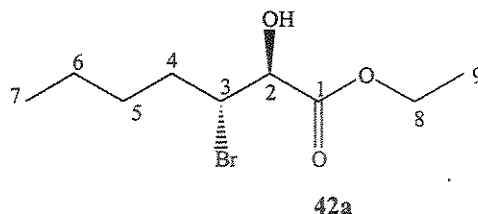
O procedimento é semelhante ao do item 5.5.2.1. Foram adicionados ao reator 30,0 g de *Saccharomyces cerevisiae* imobilizado em alginato de cálcio, 300mL de solução tampão fosfato pH 4,0 e 8,0 g de glicose. Após 2,0 horas o pH da reação foi medido e ajustado com uma solução de NH_4OH 10 %, então, adicionou-se 24,2 mmol de 39, lentamente durante 10h. A cada 6 h foi adicionado à reação 1,6 g de glicose. A reação foi acompanhada por CCD e CG/EM e após 24 horas extraiu-se a reação com acetato de etila e a fase orgânica foi seca com MgSO_4 , filtrada e concentrada à vácuo.



(2*S*, 3*S*)-3-bromo-2-hidroxi-heptanoato de etila 42a

MM = 253,12 g/mol ($\text{C}_{10}\text{H}_{17}\text{BrO}_3$). **IV** (filme) ν_{max} (cm^{-1}) : 3440, 2958, 2908, 2890, 2820, 1737, 1055. **EM** m/z (%) : 81 (100), 207 (2), 181 (30), 163 (18), 155 (52), 127 (15), 99 (35), 75 (12), 57 (61). **RMN ^1H** (300,1 MHz, CDCl_3) δ :

0,93 (3H,t, $J = 7,3$ Hz, H-7), 1,31 (7H, m, H-5, H-6 e H-9), 1,30 -2,00 (4H, m, H-4 e H-6), 4,20 – 4,40 (2H, m, H-2 e H-3), 4,27 (2H, q, $J = 7,2$ Hz, H-8),
RMN de ^{13}C (75,0 MHz, CDCl_3) δ : 13,9 (CH_3 , C-9); 14,1 (CH_3 , C-7); 22,1 (CH_2 , C6), 29,9 (CH_2 , C-5); 35,4 (CH_2 , C-4); 57,5 (CH , C-3), 62,4 (CH_2 , C-8); 72,8 (C_0 , C-2); 171,9 (C_0 , C-1).

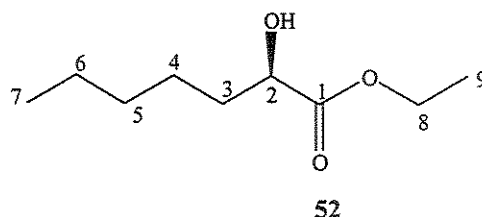


(2S, 3R)-3-bromo-2-hidroxi-heptanoato de etila 42b

MM = 253,12 g/mol ($\text{C}_{10}\text{H}_{17}\text{BrO}_3$). **IV** (filme) ν_{max} (cm^{-1}) : 3440, 2958, 2908, 2890, 2820, 1737, 1055. **EM** m/z (%) : 81 (100), 207 (2), 181 (30), 163 (18), 155 (52), 127 (15), 99 (35), 75 (12), 57 (61). **RMN ^1H** (300,1 MHz, CDCl_3) δ : 0,94 (3H,t, $J = 7,3$ Hz, H-7), 1,35 (7H, m, H-5, H-6 e H-9), 1,30 -2,13 (4H, m, H-4 e H-6), 4,20 – 4,41 (4H, m, H-8, H-2 e H-3). **RMN de ^{13}C** (75,0 MHz, CDCl_3) δ : 13,8 (CH_3 , C-9); 14,2 (CH_3 , C-7); 21,9 (CH_2 , C6), 29,8 (CH_2 , C-5); 33,5 (CH_2 , C-4); 57,2 (CH , C-3), 62,4 (CH_2 , C-8); 74,4 (C_0 , C-2); 171,2 (C_0 , C-1).

5.33 Determinação da configuração absoluta de 3-bromo-2-hidroxi-heptanoato de etila 42a

À uma solução de 177,0mg (0,7 mmol) de **42a** em 3,0 mL de etanol anidro foram adicionados 57,0 mg (0,7 mmol) de acetato de sódio e (16,0 mg) de Pd/C 5% sob atmosfera de argônio. A mistura foi mantida sob agitação a temperatura ambiente, sendo então purgada e adicionado uma bexiga contendo hidrogênio. A reação foi mantida em agitação por 2,0 horas. Então, a mistura foi filtrada em celite e extraída com acetato de etila (3 x 50,0 mL), a fase orgânica foi lavada com salmoura, seca com MgSO_4 e concentrado sob pressão reduzida gerando um óleo amarelo que foi purificado em coluna de sílica gel (Hexano/acetato de etila 15%) fornecendo 138 mg de **52** (95%). Análise de rotação ótica foi realizada para determinação da configuração absoluta e comparada com a literatura⁷³.



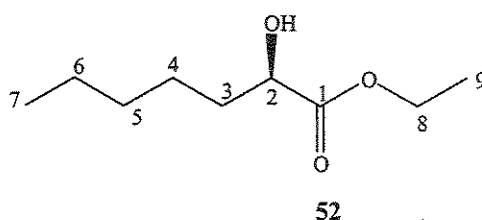
MM = 174,24 g/mol ($\text{C}_{10}\text{H}_{18}\text{O}_3$). **IV** (filme) ν_{max} (cm^{-1}) : 3450, 2958, 2923, 2880, 2823, 1732, 1130, 1055. **EM** m/z (%) : 83 (100), 174 (2), 156 (1), 141 (1), 101 (60), 74 (10), 55 (67). **RMN** ^1H (300,1 MHz, CDCl_3) δ : 0,91 (3H, t, J = 7,3 Hz, H-7), 1,29 (3H, t, J = 7,0 Hz, H-9), 1,20 - 1,80 (4H, m, H-4 e H-6), 4,10 - 4,40 (2H, m, H-2 e H-3), 4,24 (2H, q, J = 7,0 Hz, H-8). **RMN de** ^{13}C

⁷³ Dao, D. H.; Hornes, S.; Okamura, M.; Akasaka, T.; Kawai, Y.; Hida, K.; Ohno, A. *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, 1998, 71, 425

(75,0 MHz, CDCl_3) δ : 13,9 (CH_3 , C-9); 14,2 (CH_3 , C-7); 22,4 (CH_2 , C6), 24,3 (CH_2 , C-5); 31,4 (CH_2 , C-4); 34,4 (CH , C-3), 61,6 (CH_2 , C-8); 70,4 (C_0 , C-2); 175,4 (C_0 , C-1).

5.34 Determinação da configuração absoluta de 3-bromo-2-hidroxi-heptanoato de etila **42b**

À uma solução de 177,0mg (0,7 mmol) de **42b** em 3,0 mL de etanol anidro foram adicionados 57,0 mg (0,7 mmol) de acetato de sódio e (16,0 mg) de Pd/C 5% sob atmosfera de argônio. A mistura foi mantida sob agitação a temperatura ambiente, sendo então purgada e adicionado uma bexiga contendo hidrogênio. A reação foi mantido em agitação por 2,0 horas. Então, a mistura foi filtrada em celite e extraída com acetato de etila (3 x 50,0 mL), a fase orgânica foi lavada com salmoura, seca com MgSO_4 e concentrado sob pressão reduzida gerando um óleo amarelo que foi purificado em coluna de sílica gel (Hexano/acetato de etila 15%) fornecendo 138 mg de **52** (95%). Análise de rotação ótica foi realizada para determinação da configuração absoluta e comparada com a literatura⁷⁴.

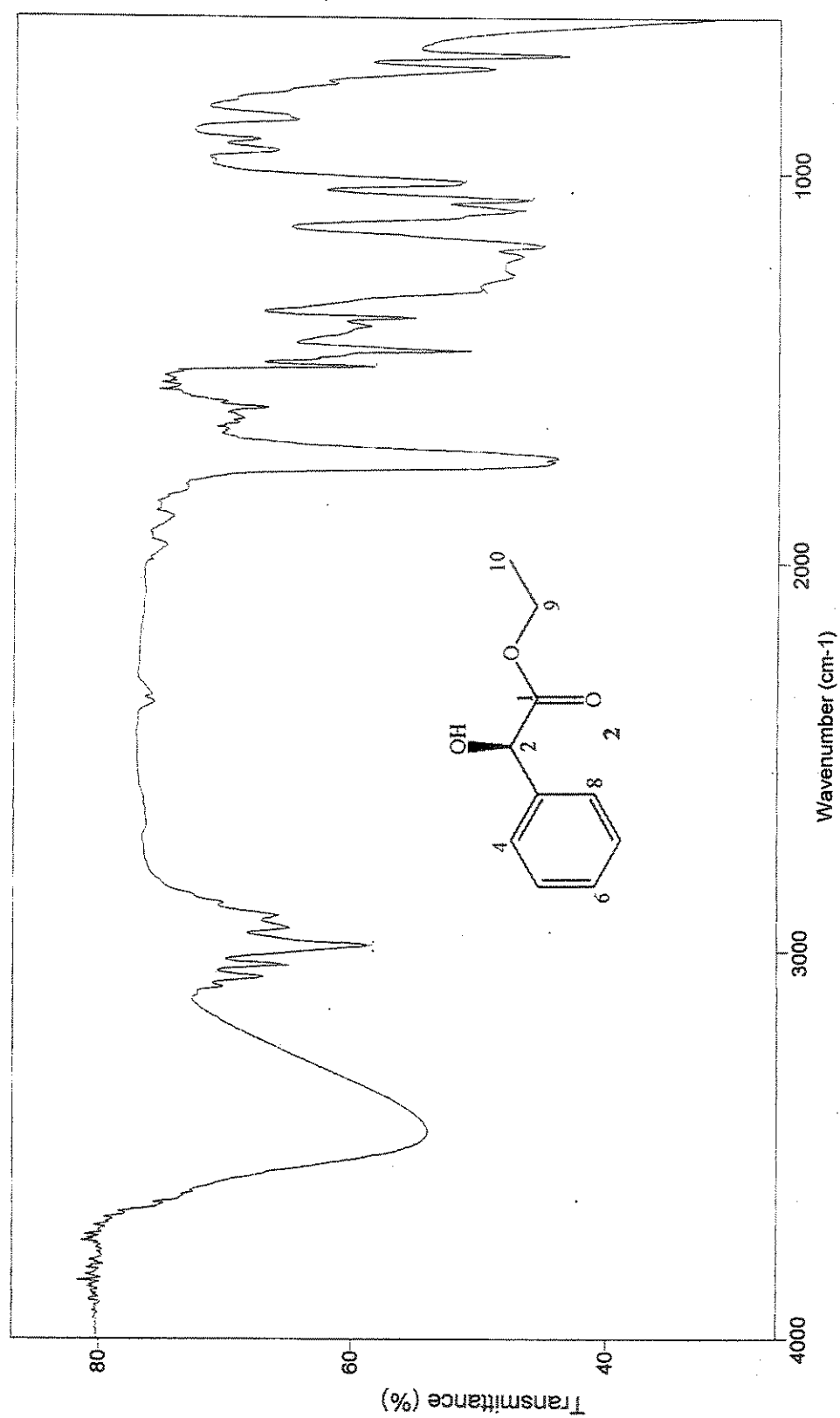


⁷⁴ Dao, D. H.; Hornes, S.; Okamura, M.; Akasaka, T.; Kawai, Y.; Hida, K.; Ohno, A. *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, 1998, 71, 425

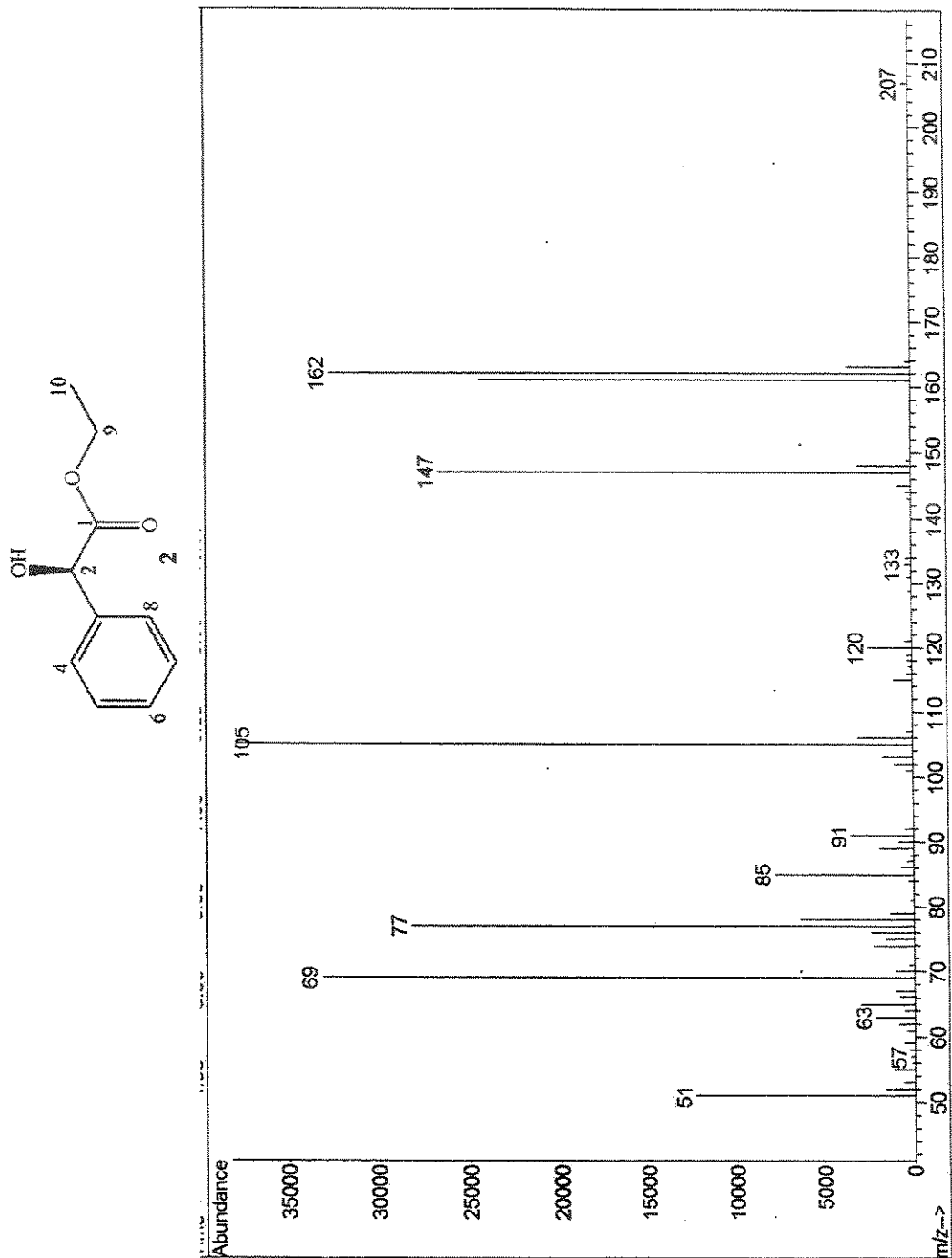
MM = 174,24 g/mol ($C_{10}H_{18}O_3$). **IV** (filme) $\nu_{\max}$ (cm^{-1}) : 3450, 2958, 2923, 2880, 2823, 1732, 1130, 1055. **EM** m/z (%) : 83 (100), 174 (2), 156 (1), 141 (1), 101 (60), 74 (10), 55 (67). **RMN 1H** (300,1 MHz, $CDCl_3$) δ : 0,91 (3H, t, J = 7,3 Hz, H-7), 1,29 (3H, t, J = 7,0 Hz, H-9), 1,20 - 1,80 (4H, m, H-4 e H-6), 4,10 - 4,40 (2H, m, H-2 e H-3), 4,24 (2H, q, J = 7,0 Hz, H-8). **RMN de ^{13}C** (75,0 MHz, $CDCl_3$) δ : 13,9 (CH_3 , C-9); 14,2 (CH_3 , C-7); 22,4 (CH_2 , C6), 24,3 (CH_2 , C-5); 31,4 (CH_2 , C-4); 34,4 (CH, C-3), 61,6 (CH_2 , C-8); 70,4 (C_0 , C-2); 175,4 (C_0 , C-1).

Apêndice - Espectros

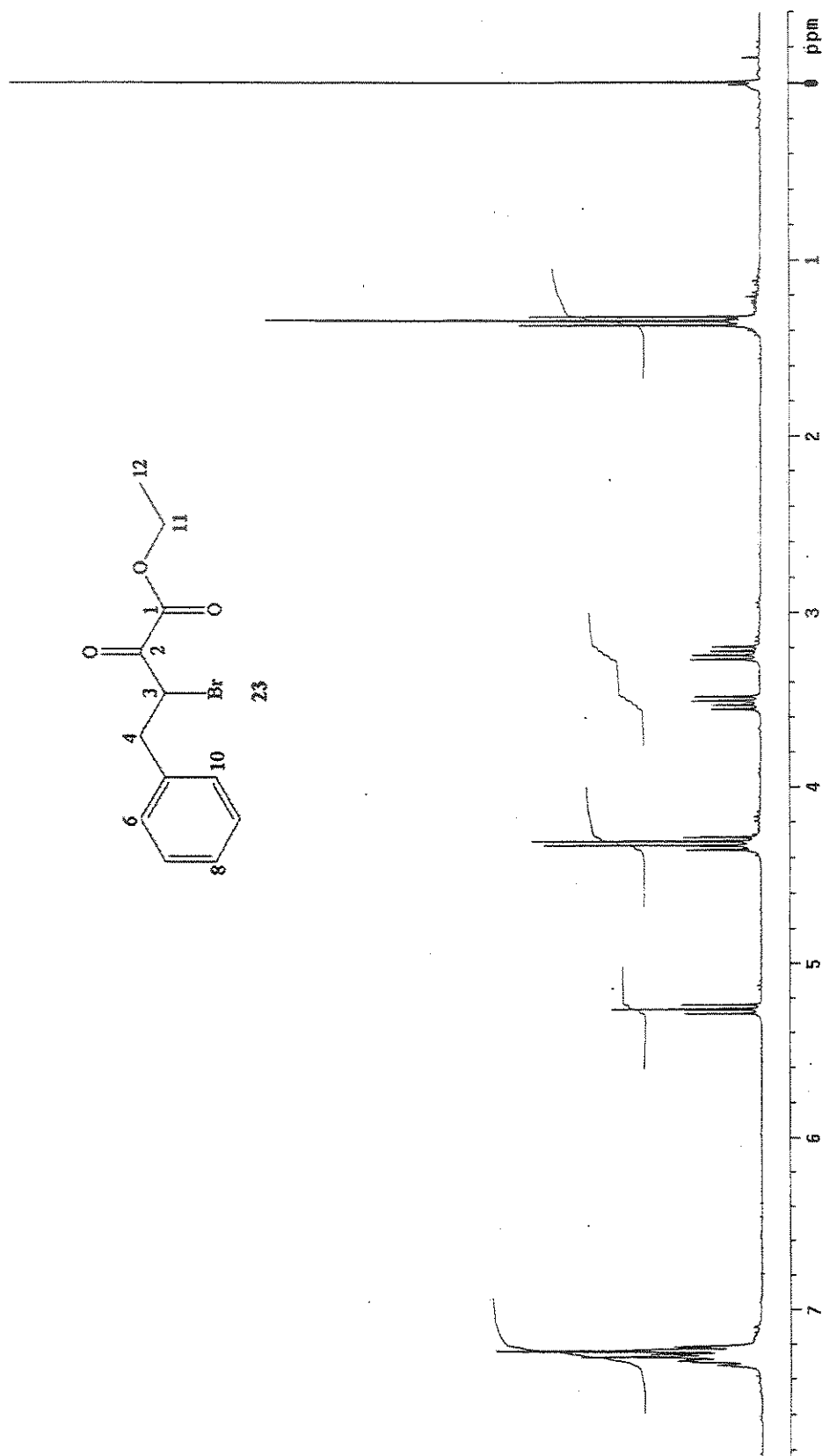
E01. Espectro de RMN de ^1H de madelato de etila 2.

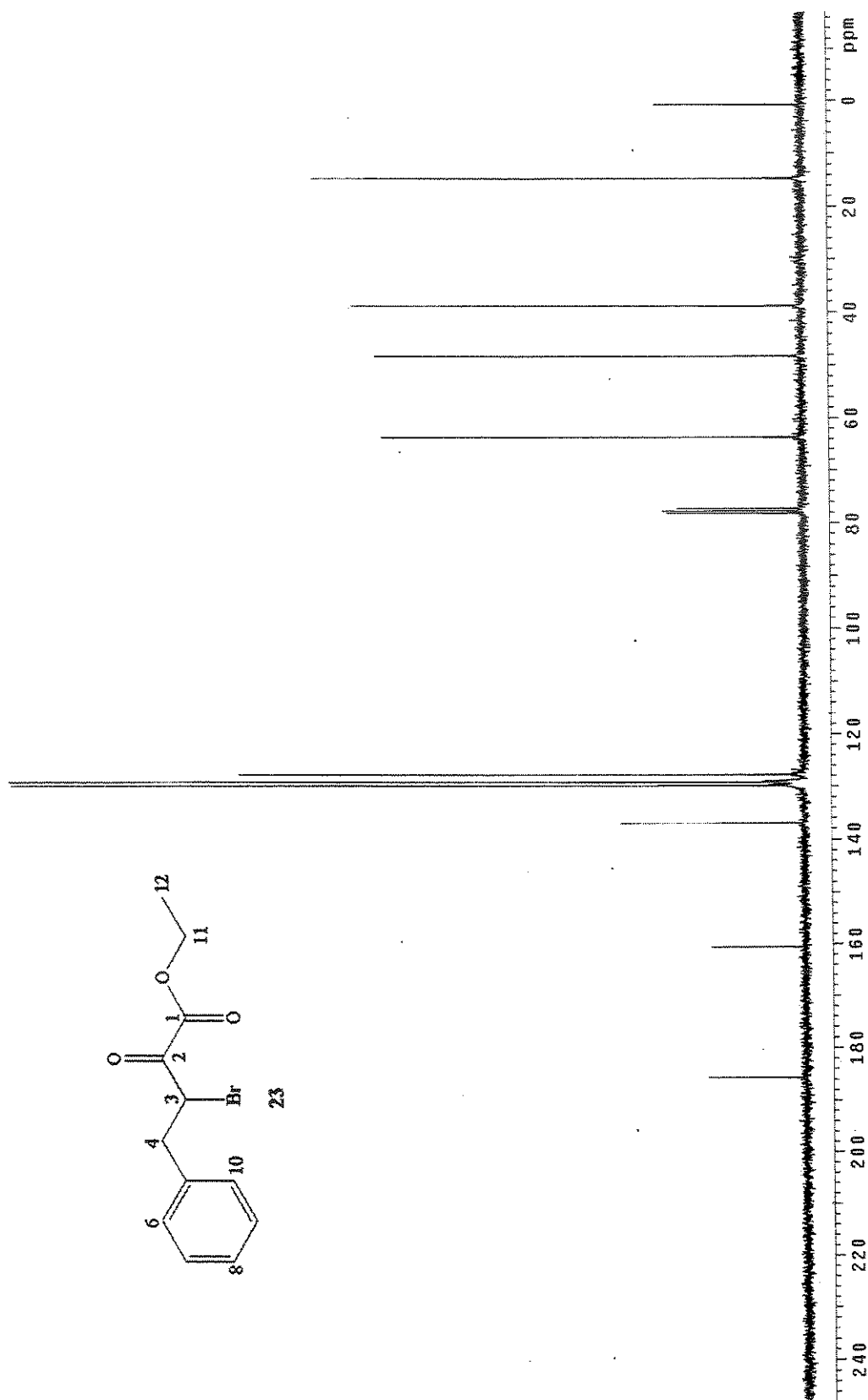


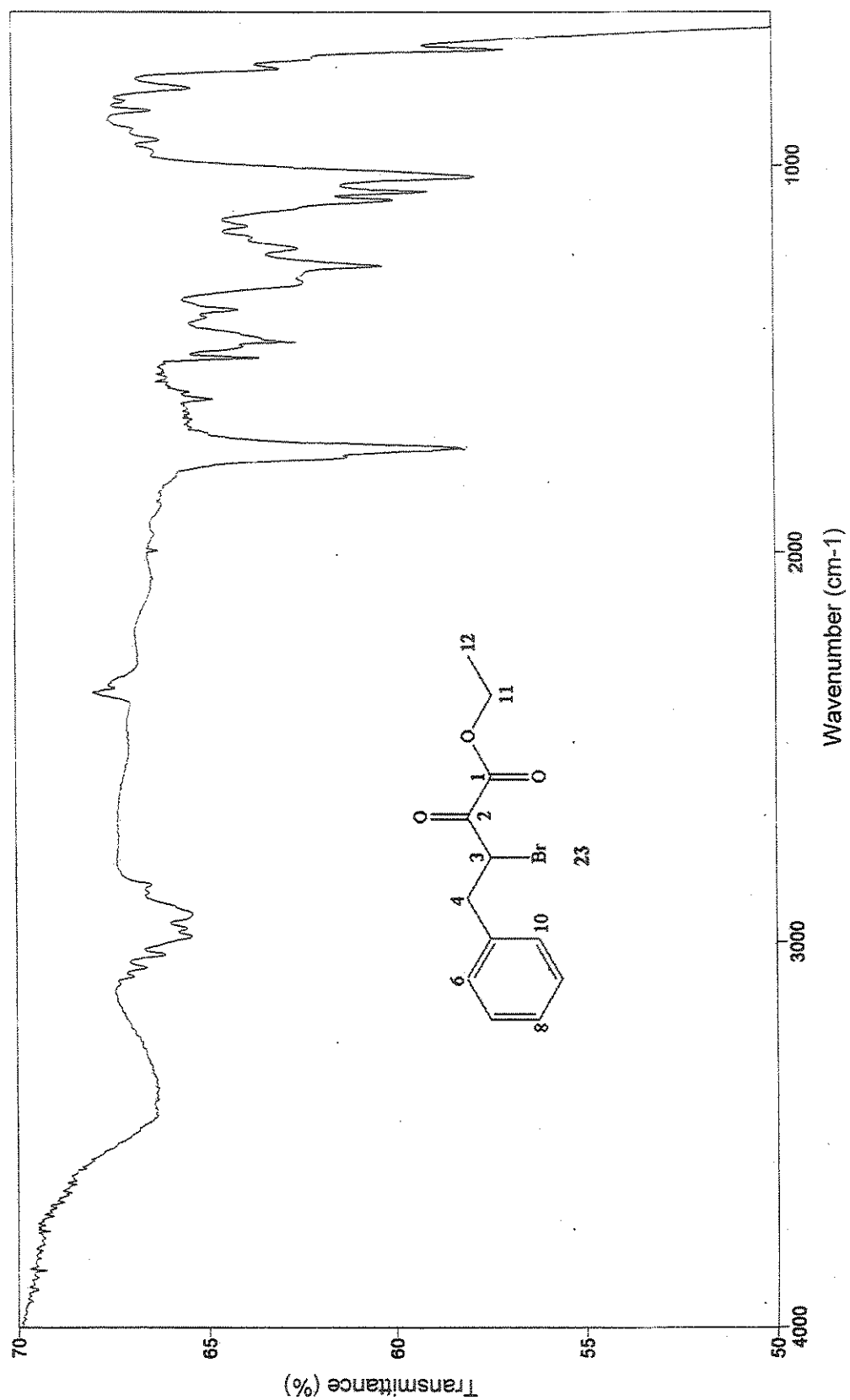
E02. Espectro no IV de madelato de etila 2



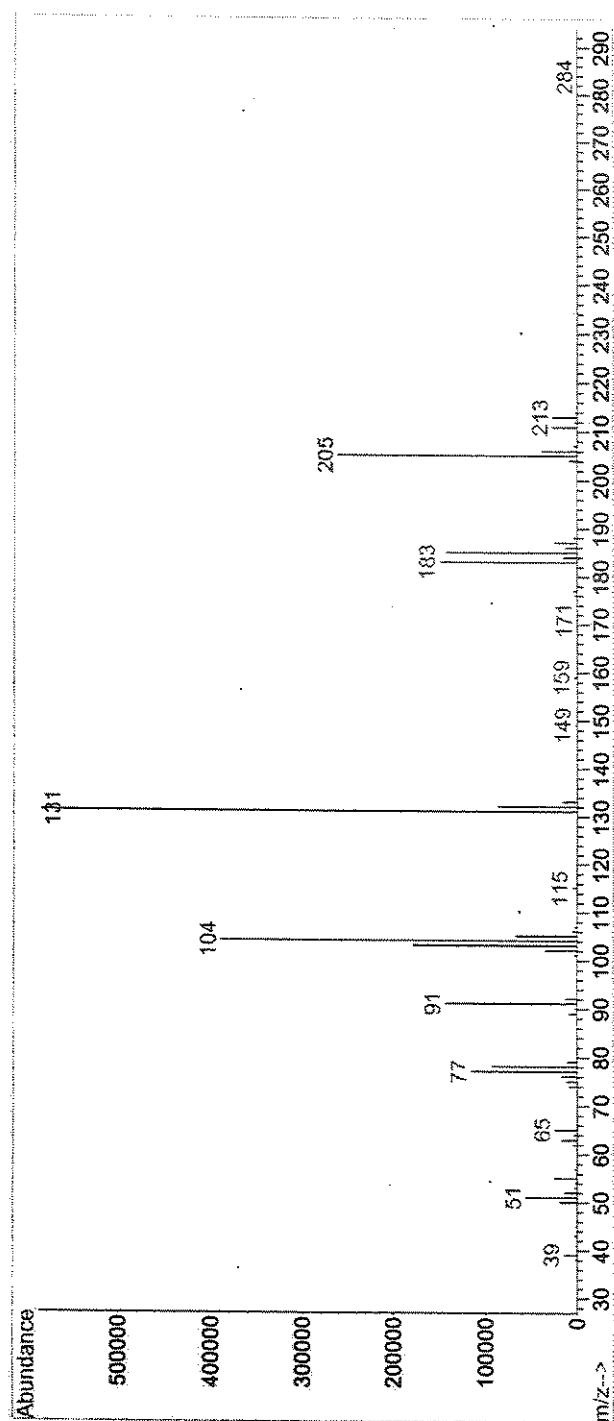
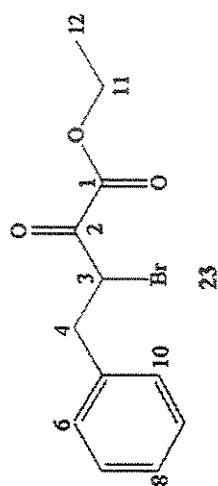
E03. Espectro de massas de madelato de etila 2

E04. Espectro de RMN de ^1H de 3-bromo-2-oxo-fenilbutanoato de etila 23

E05. Espectro de RMN de ^{13}C de 3-bromo-2-oxo-fenilbutanoato de etila 23



E06. Espectro no IV (filme) de 3-bromo-2-oxo-fenilbutanoato de etila 23

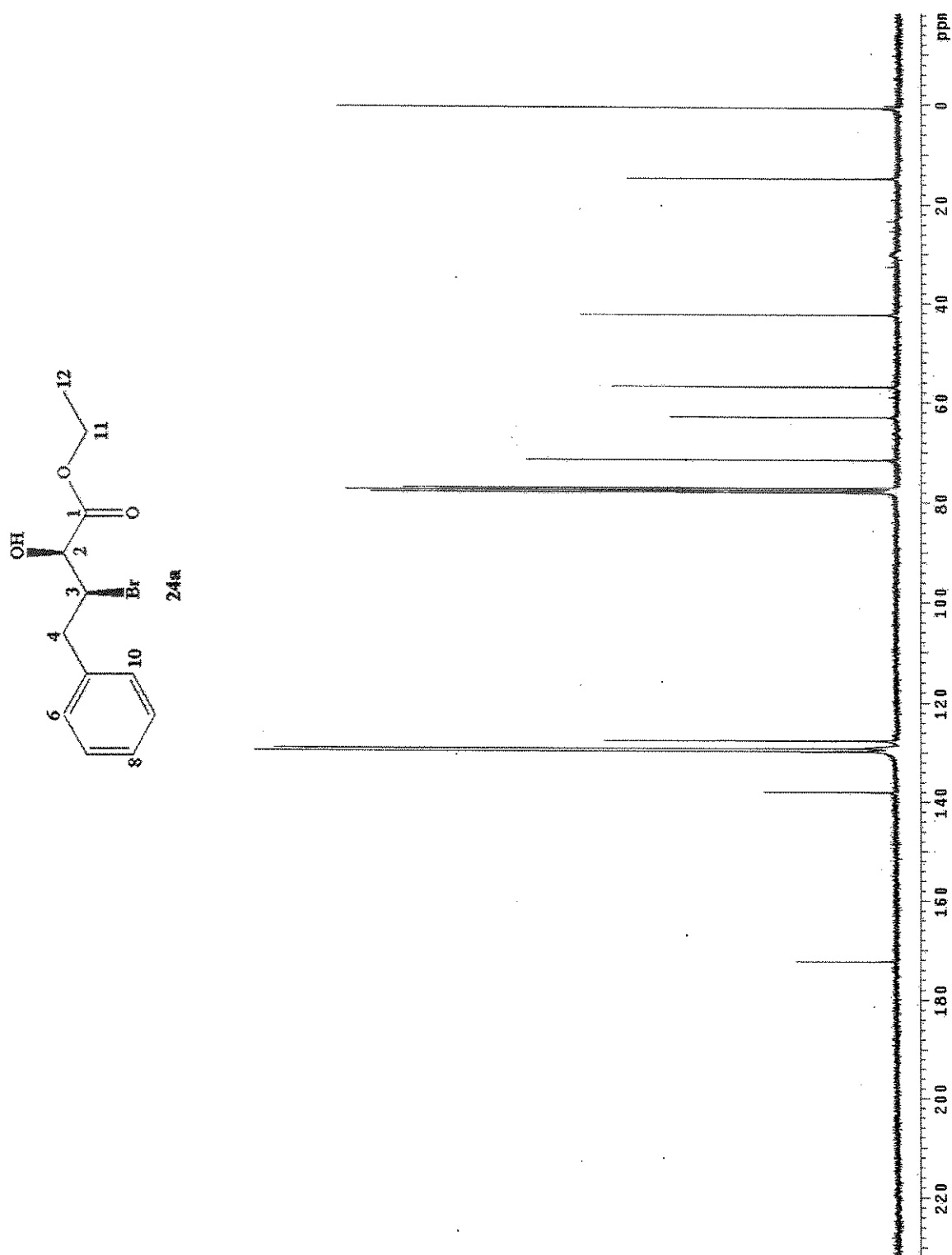


I

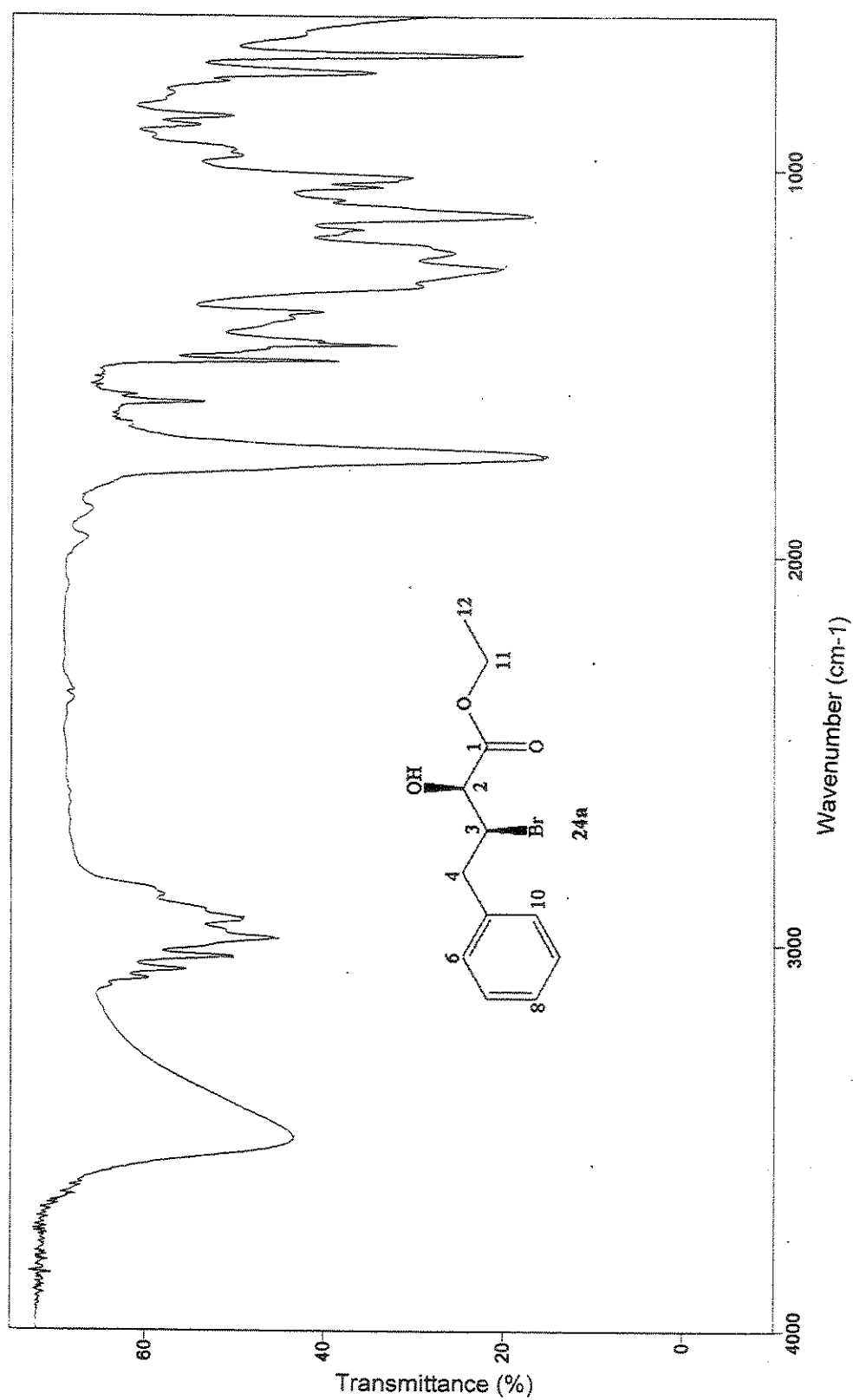
E07. Espectro de massas de 3-bromo-2-oxo-fenilbutanoato de etila **23**



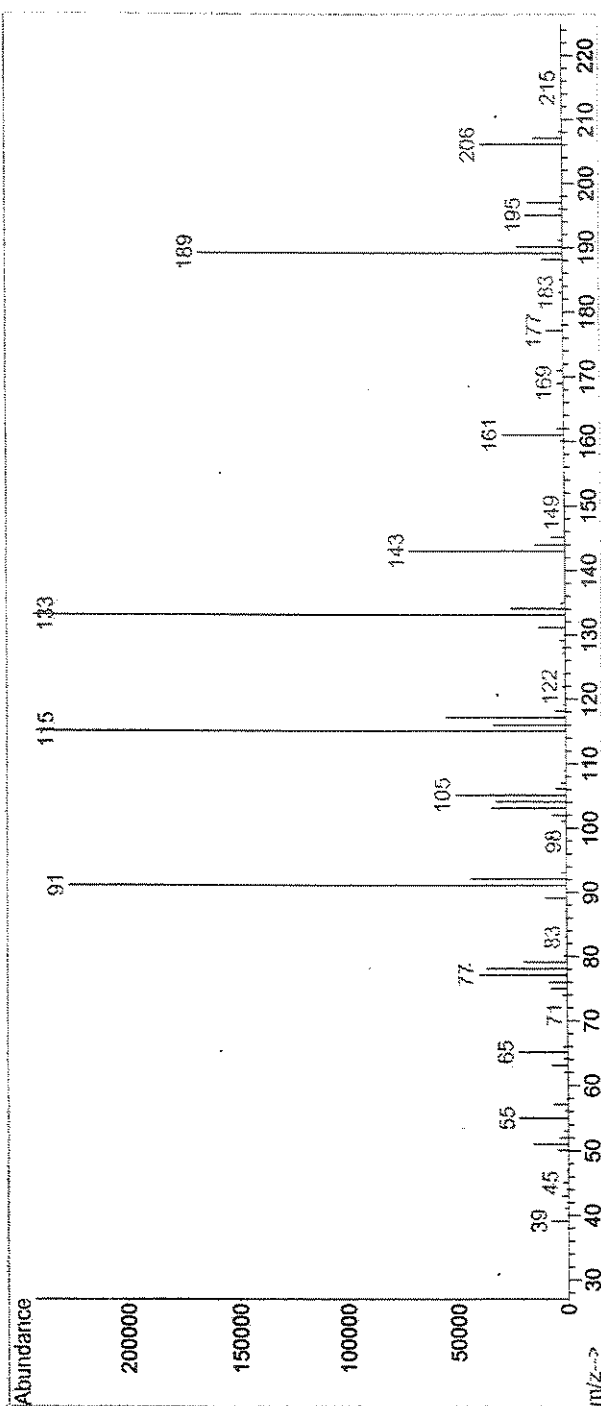
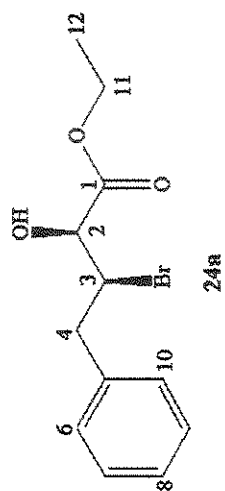
E08. Espectro de RMN de ^1H de (2*S*,3*S*)-3-bromo-2-hidroxi-fenilbutirato de etila **24a**



E09. Espectro de RMN de ^{13}C de (2*S*,3*S*)-3-bromo-2-hidróxi-fenilbutirato de etila 24a



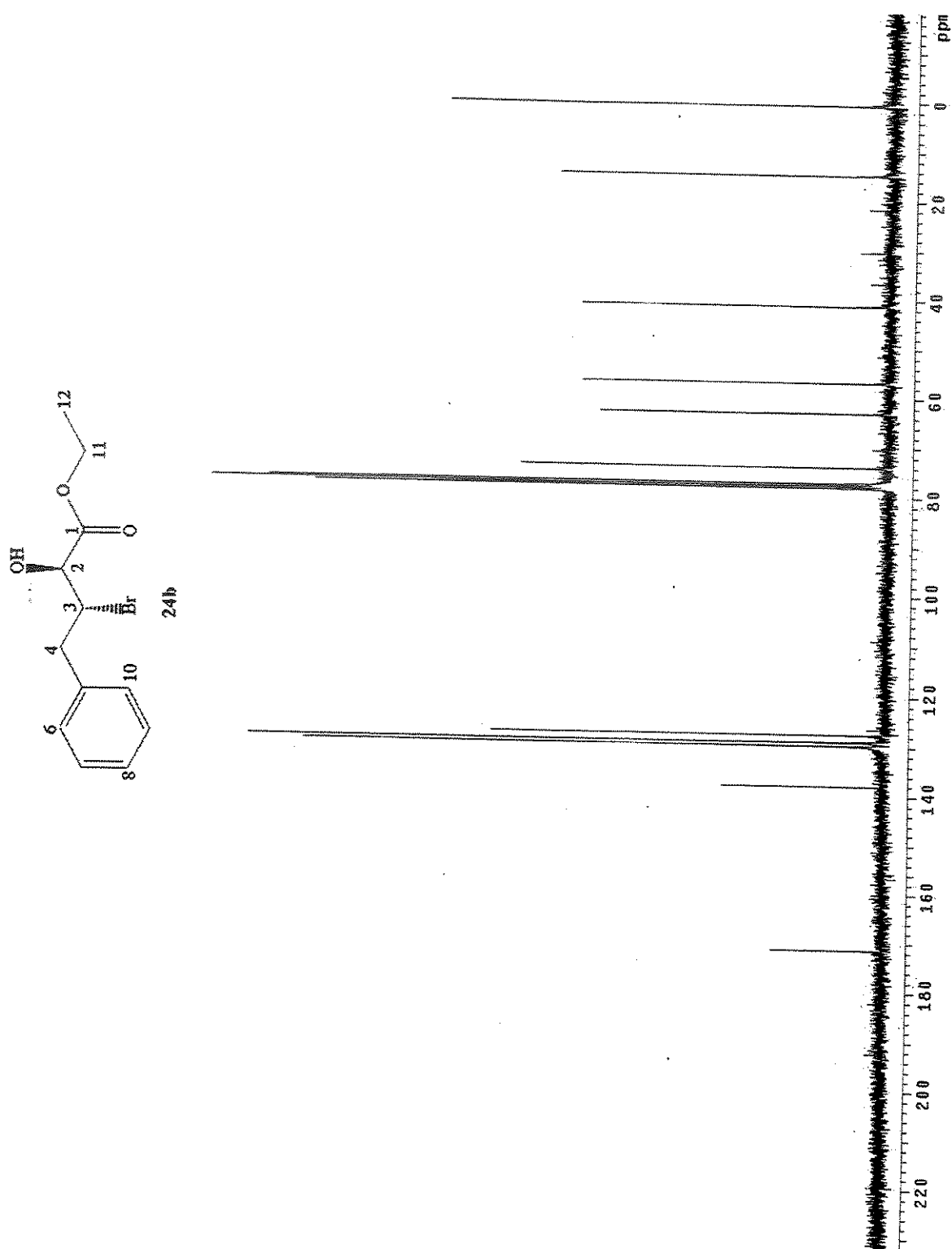
E10. Espectro no IV de (2*S*,3*S*)-3-bromo-2-hidróxi-fenilbutirato de etila **24a**



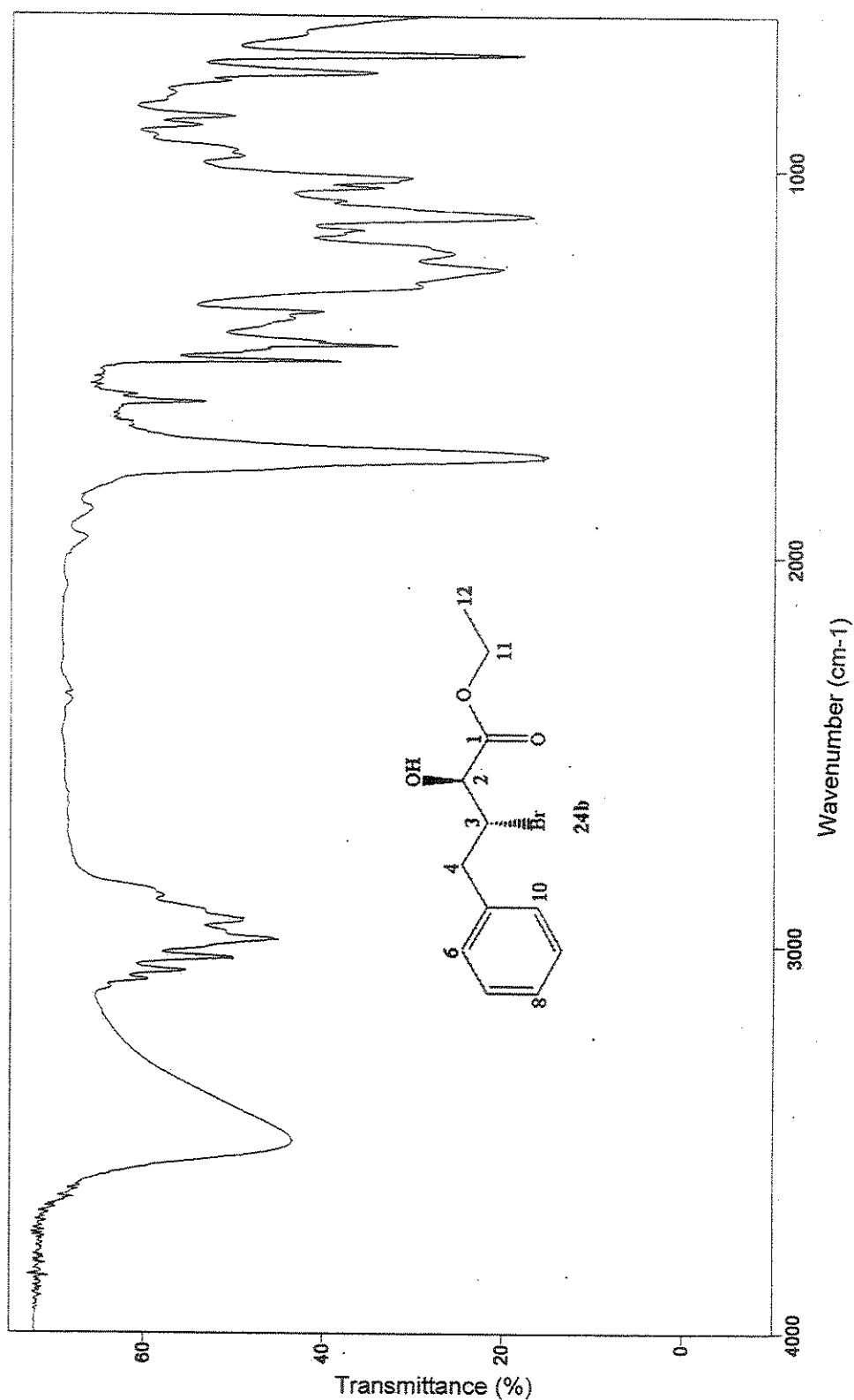
E11. Espectro Massas de (2*S*,3*S*)-3-bromo-2-hidróxi-fenilbutirato de etila **24a**



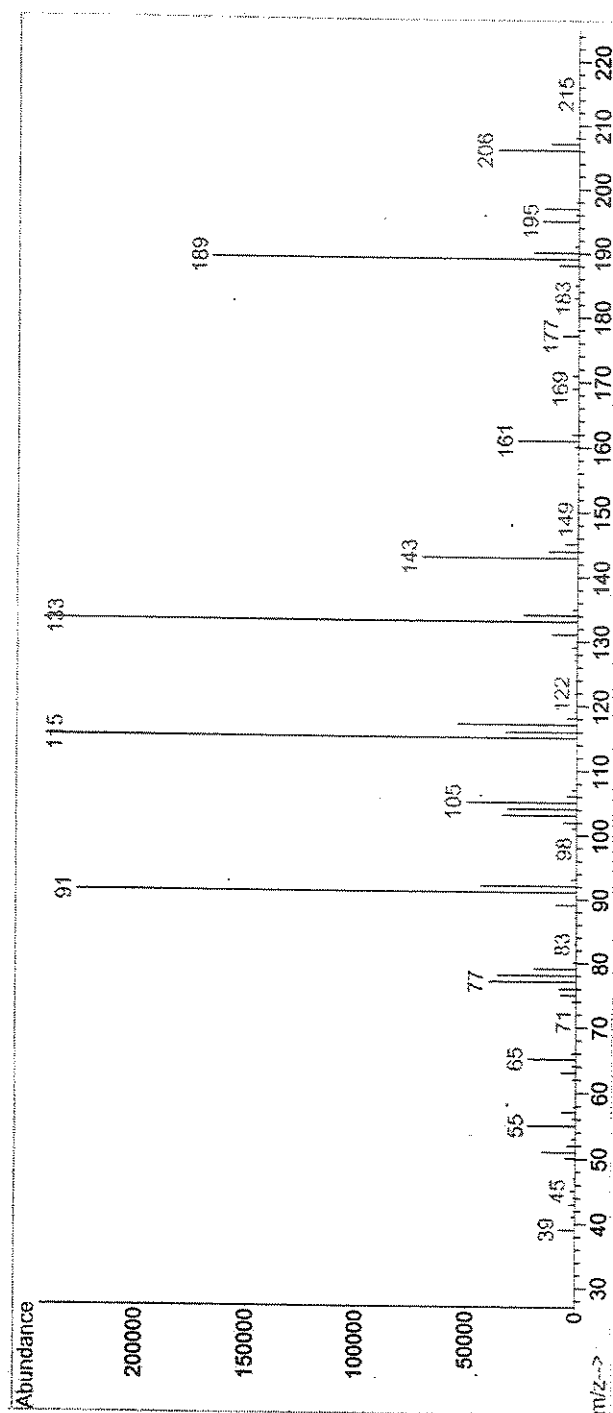
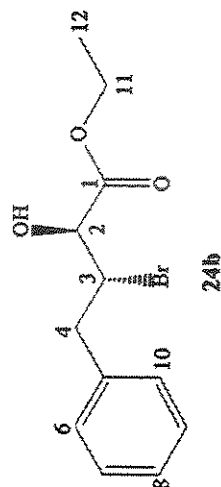
E12. Espectro de RMN de ^1H de (2*S*, 3*R*)-3-bromo-2-hidróxi-fenilbutanoato de etila **24b**



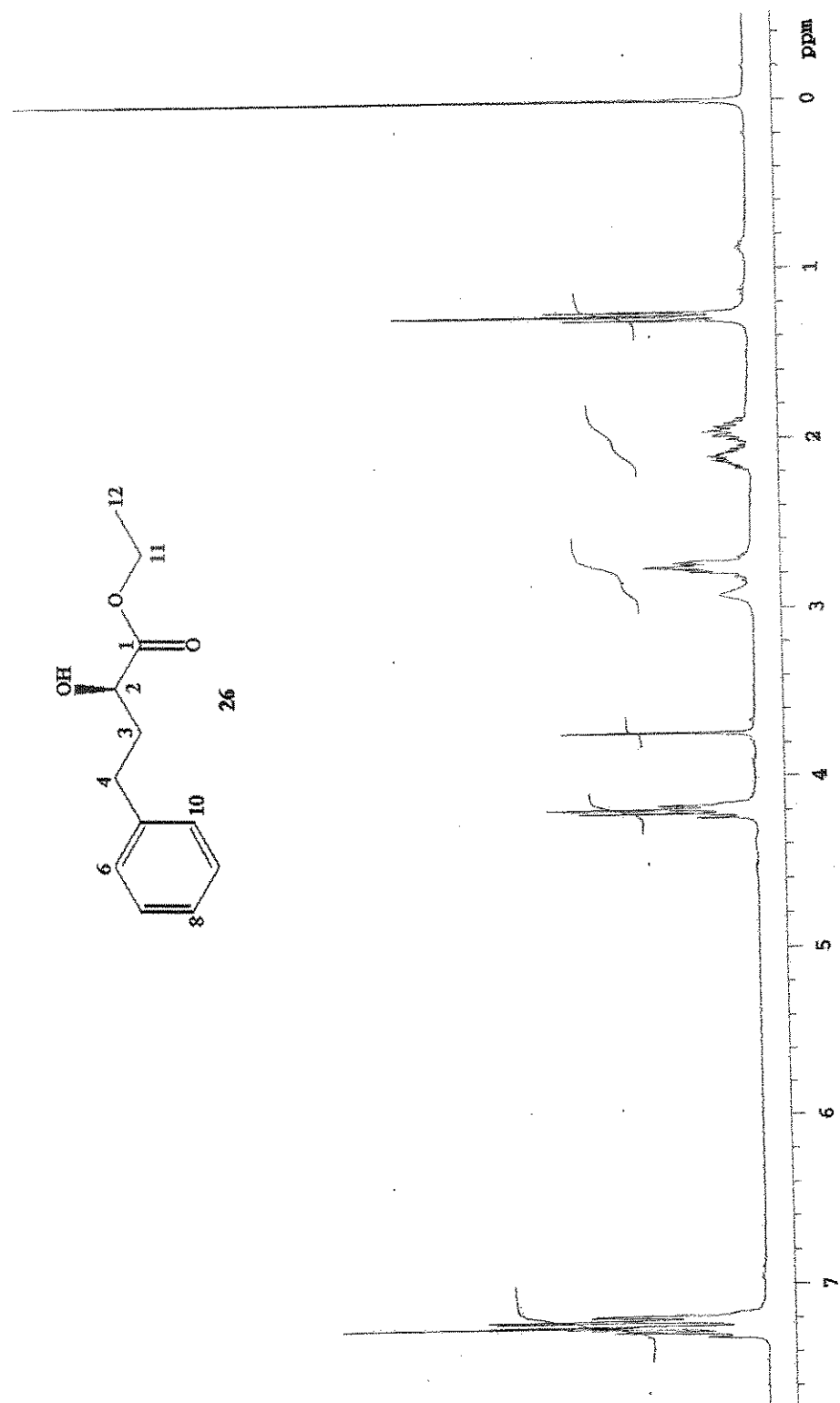
E13. Espectro de RMN de ^1H de (2*S*, 3*R*)-3-bromo-2-hidróxi-fenilbutanoato de etila **24b**

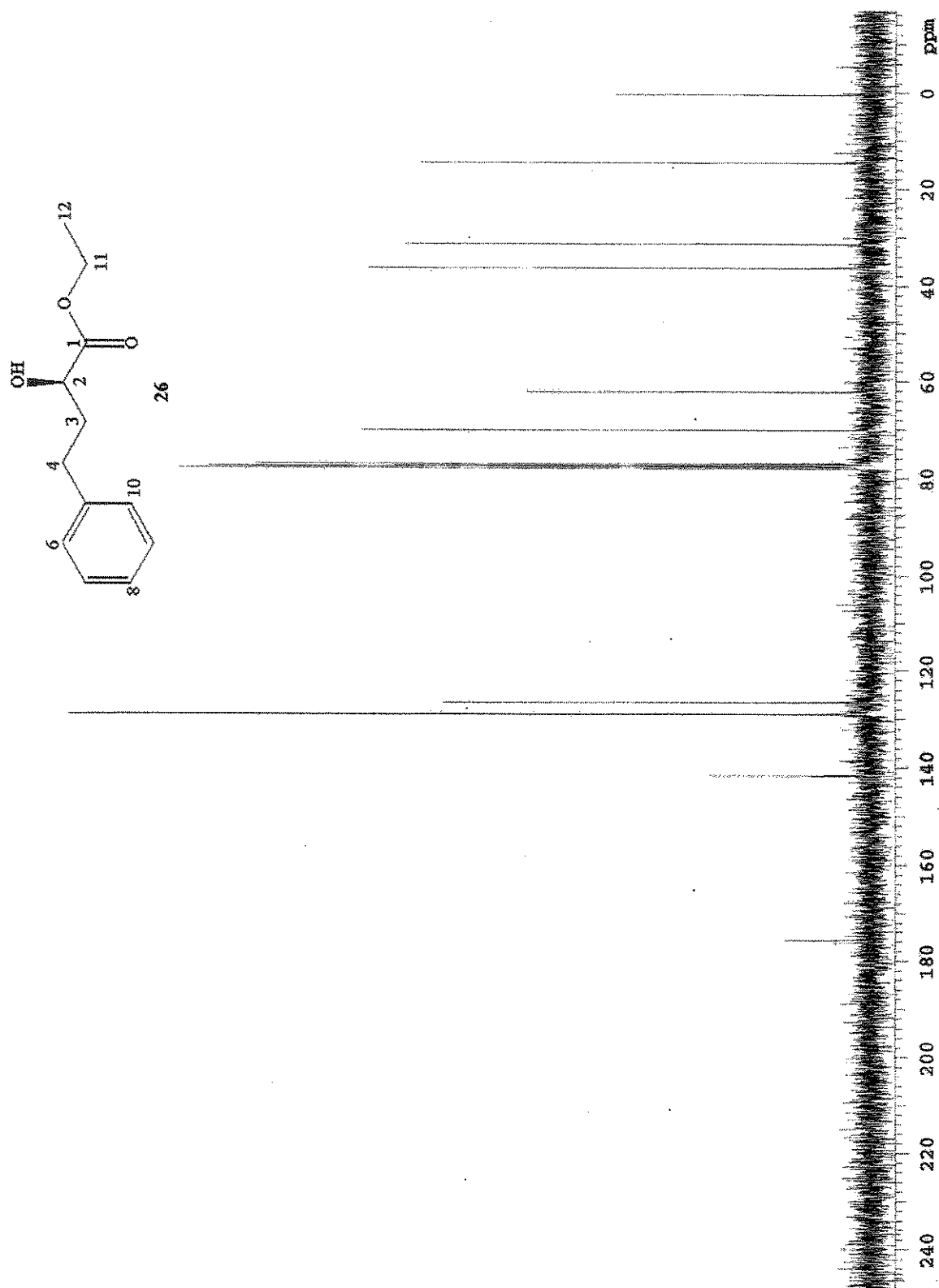


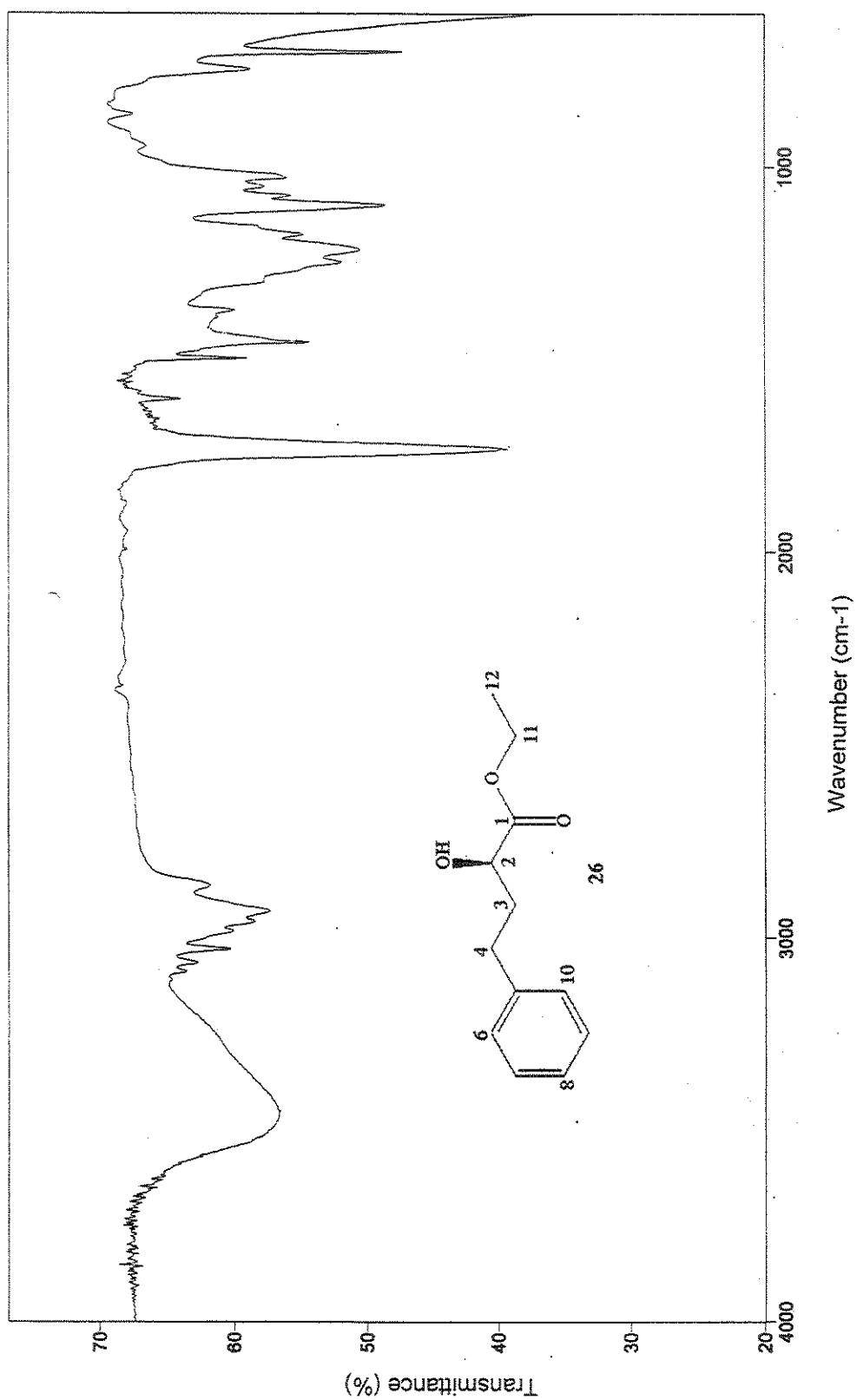
E14. Espectro no IV de (2*S*, 3*R*)-3-bromo-2-hidróxi-fenilbutanoato de etila
24b

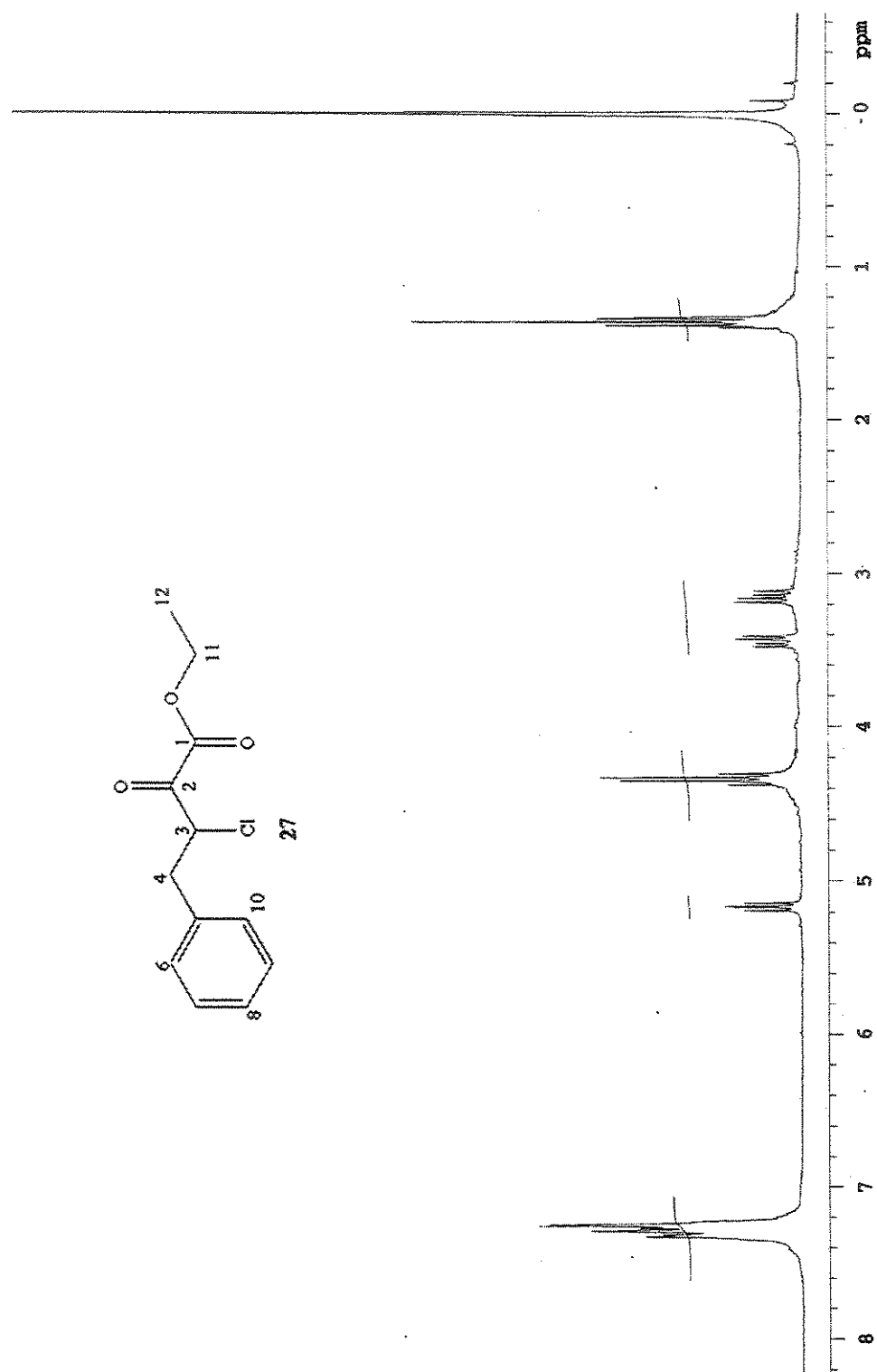


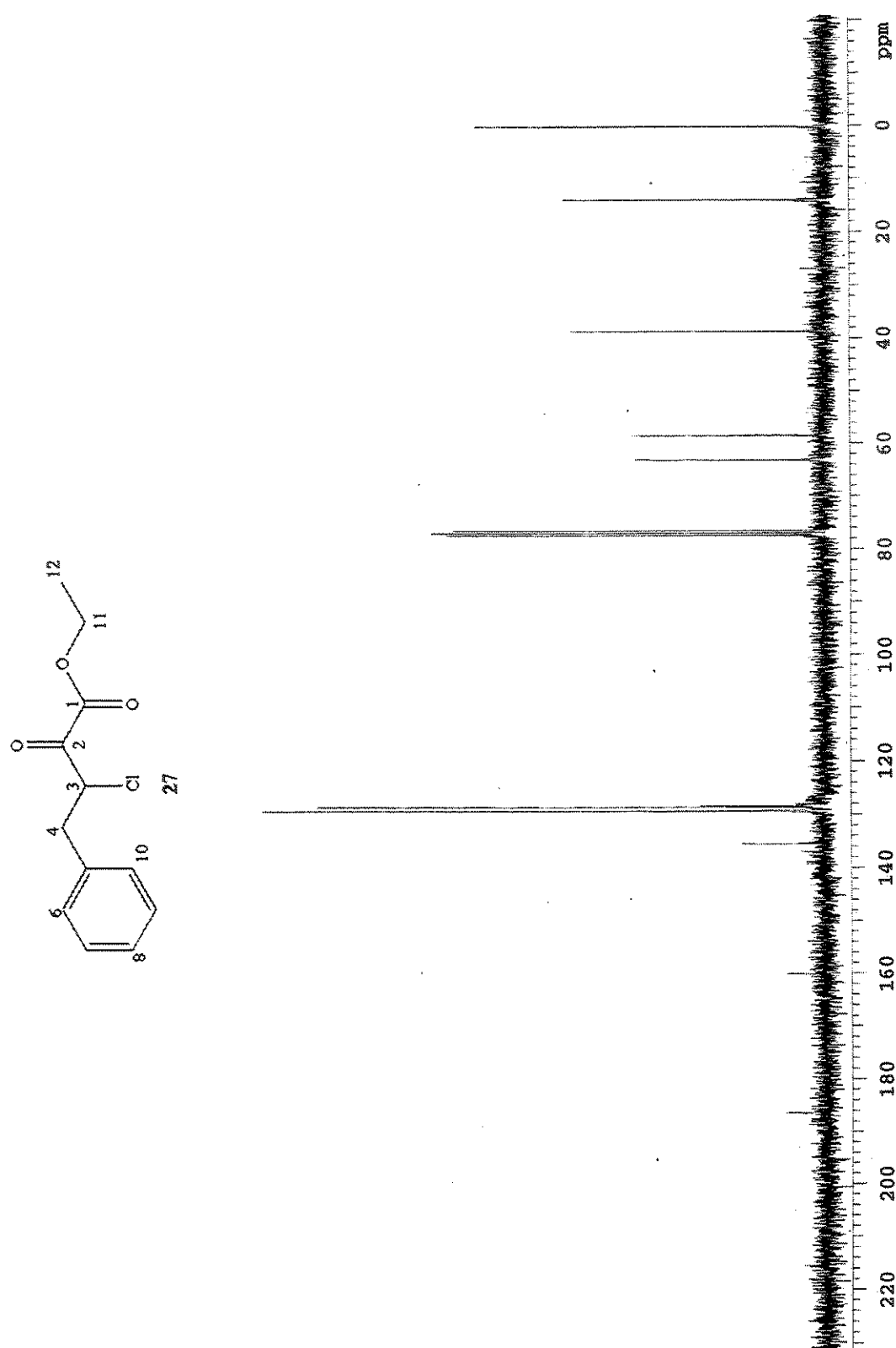
E15. Espectro massas de (2*S*, 3*R*)-3-bromo-2-hidróxi-fenilbutanoato de etila **24b**

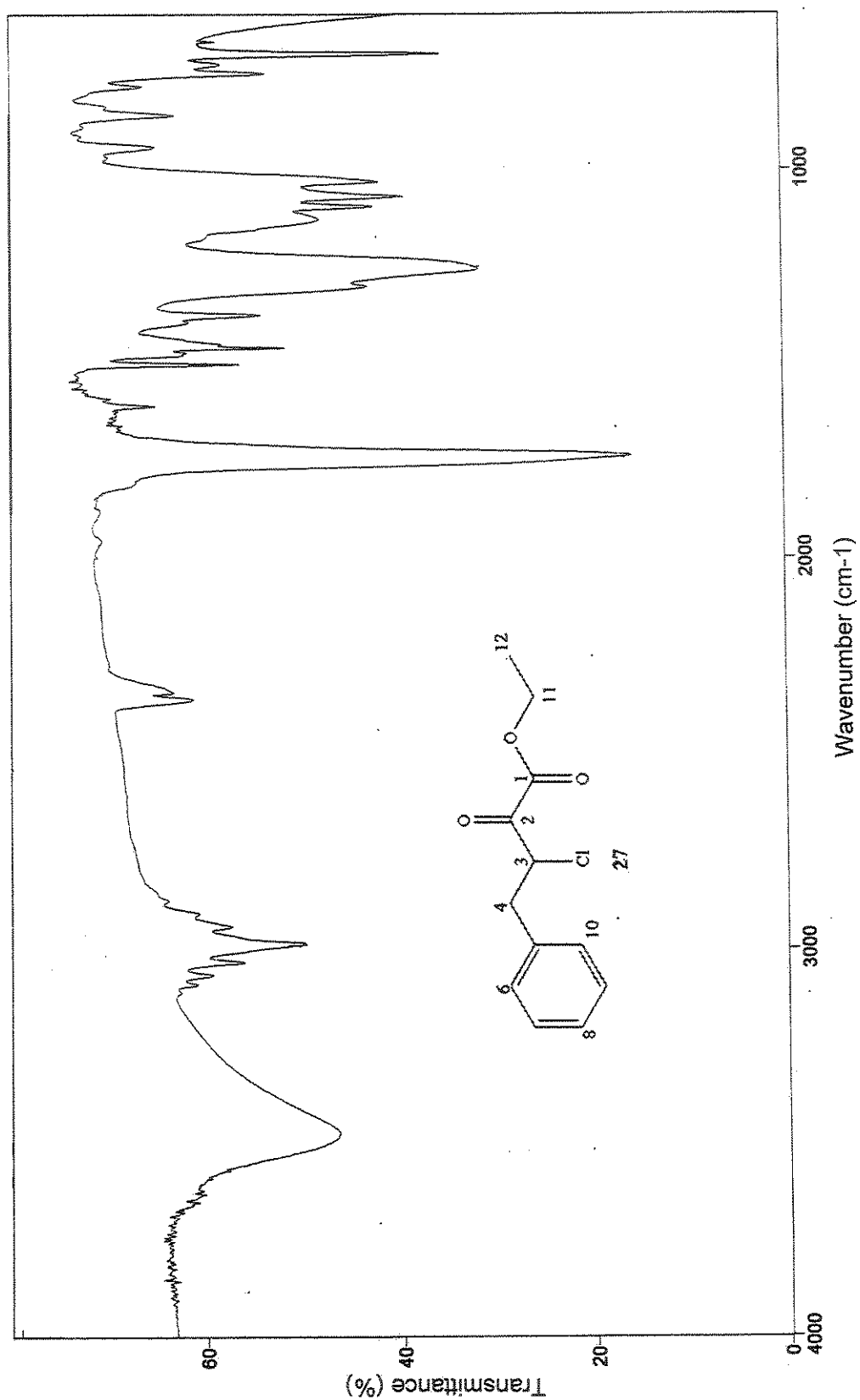
E16. Espectro de RMN de ^1H de (*R*)-2-hidroxi-4-fenilbutanoato de etila **26**

E17. Espectro de RMN de ^{13}C de (*R*)-2-hidroxi-4-fenilbutanoato de etila 26

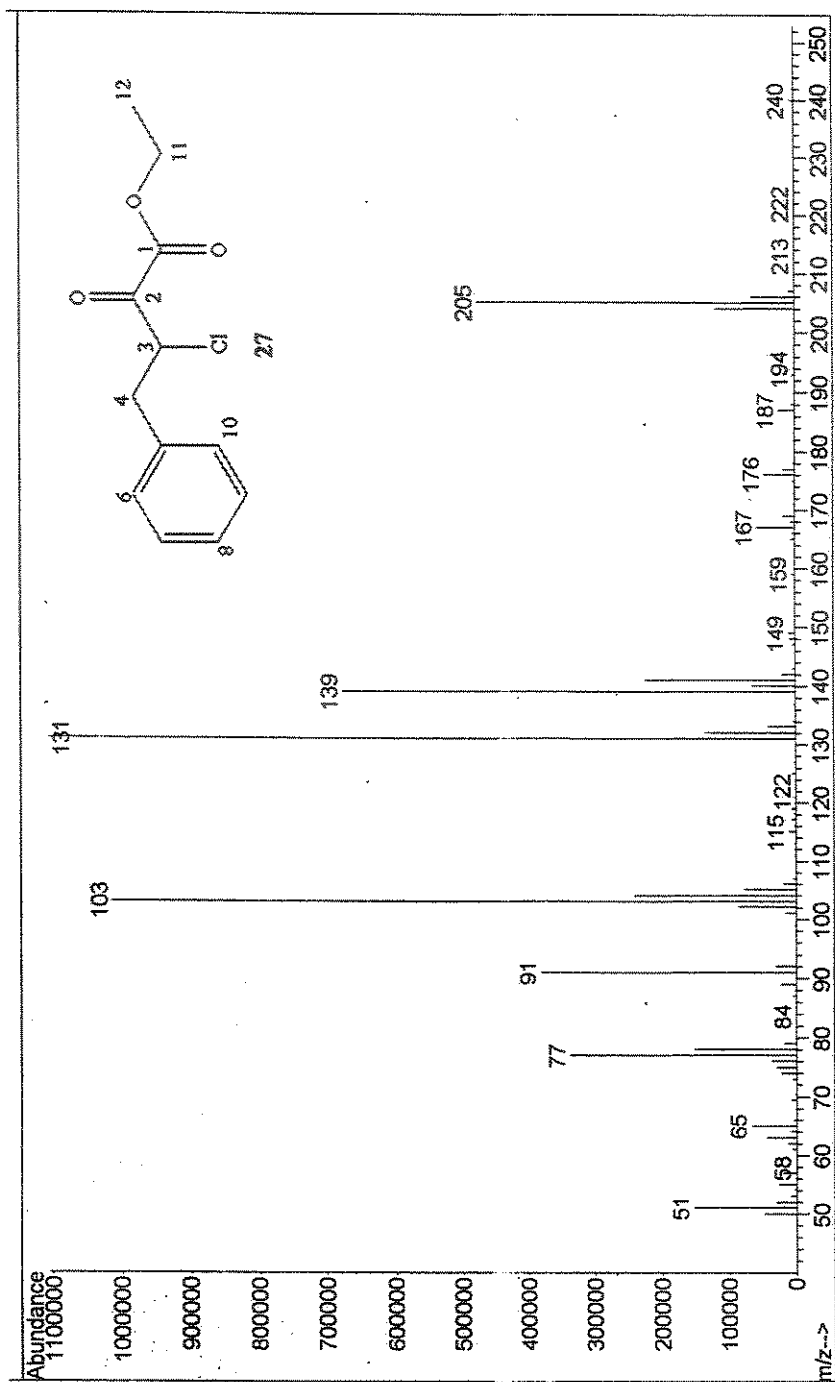
E18. Espectro no IV de (*R*)-2-hidroxi-4-fenilbutanoato de etila 26

E19. Espectro de RMN de ^1H de 3-cloro-2-oxo-fenilbutanoato de etila 27

E20. Espectro de RMN de ^{13}C de 3-cloro-2-oxo-fenilbutanoato de etila 27



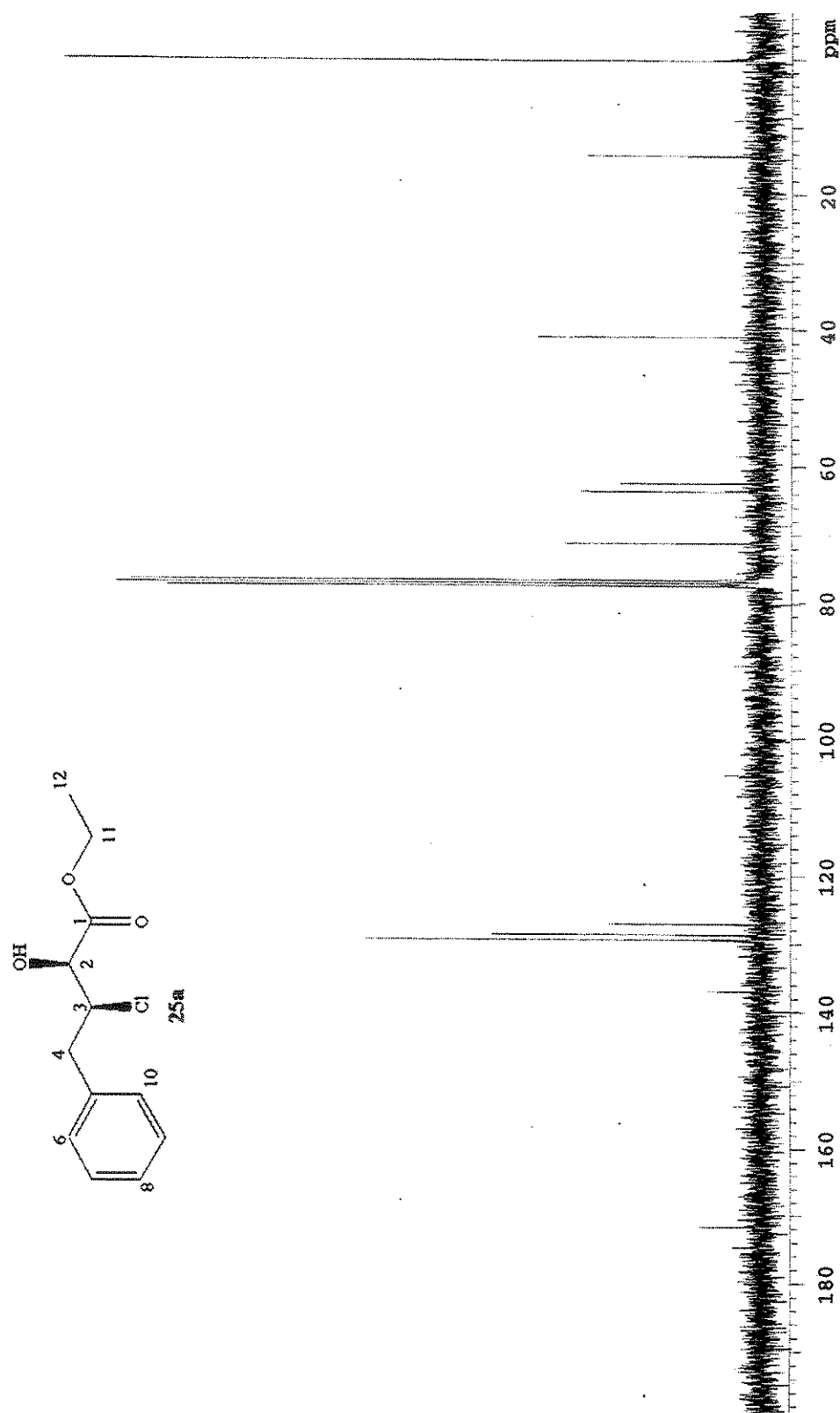
E21. Espectro no IV de 3-cloro-2-oxo-fenilbutanoato de etila 27



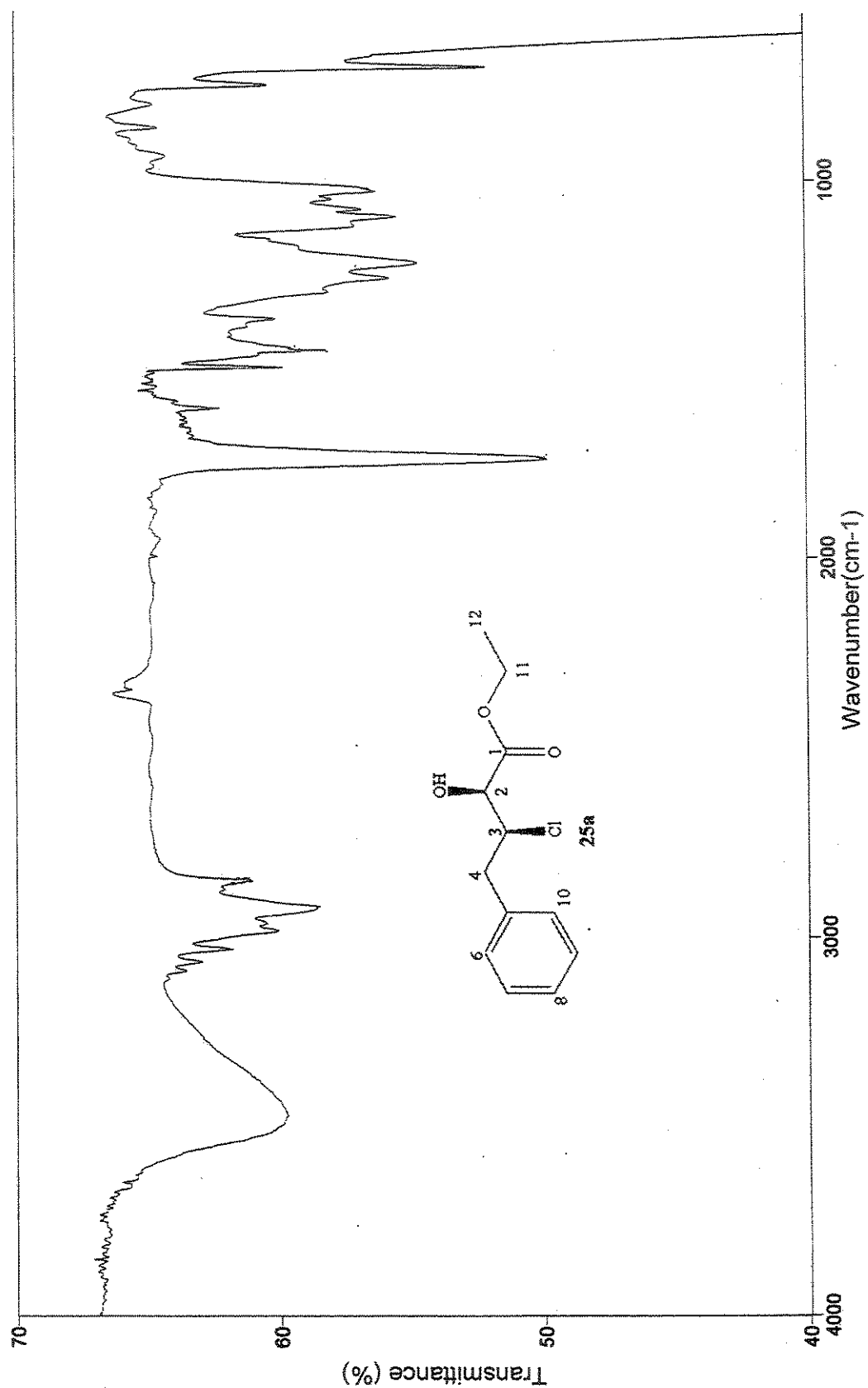
E22. Espectro de massas de 3-cloro-2-oxo-fenilbutanoato de etila 27

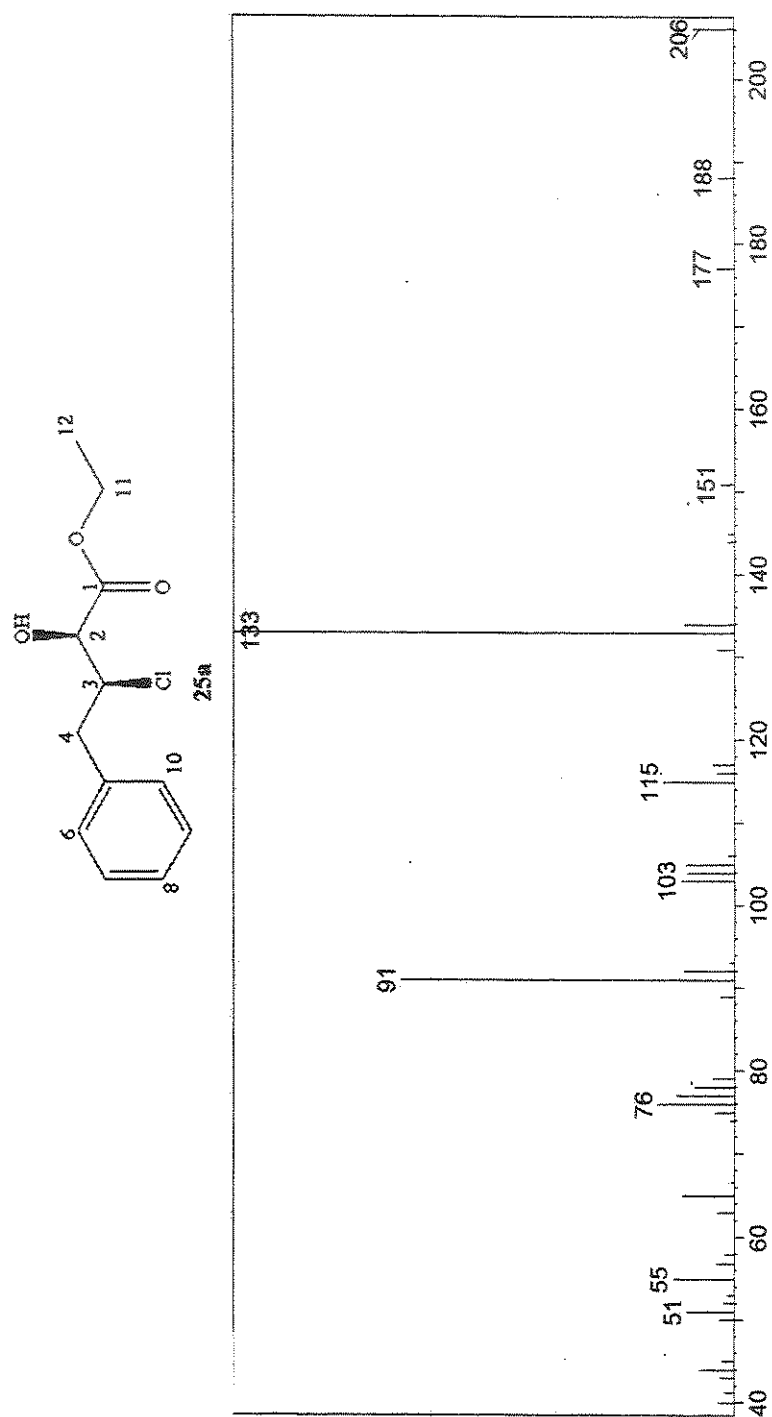


E23. Espectro de RMN de ^1H de (2S,3S) 3-cloro-2-hidróxi-fenilbutirato de etila 25a

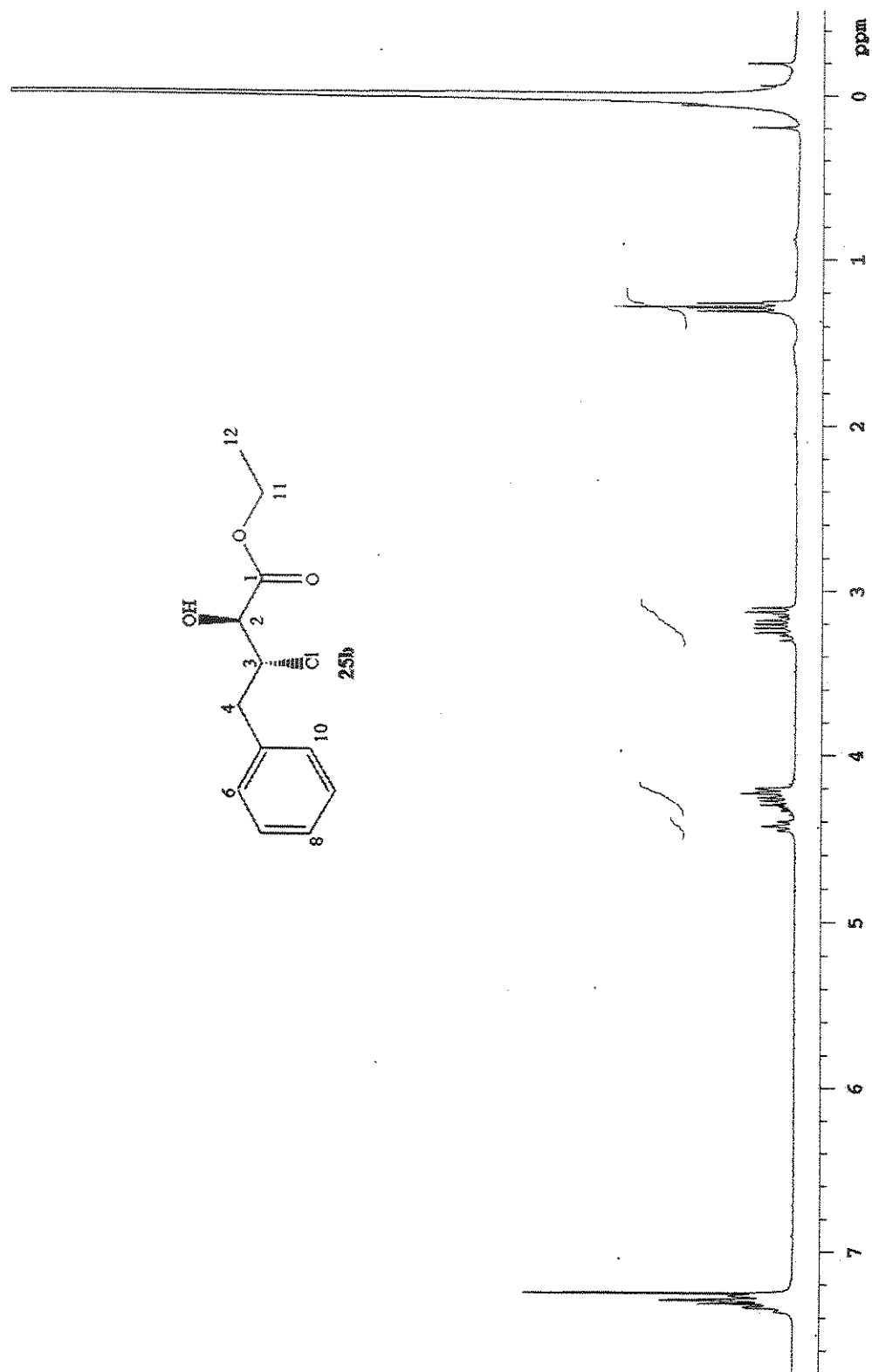


E24. Espectro de RMN de ^{13}C de (2*S*,3*S*) 3-cloro-2-hidróxi-fenilbutirato de etila **25a**

E25. Espectro no IV de (2*S*,3*S*) 3-cloro-2-hidróxi-fenilbutirato de etila **25a**



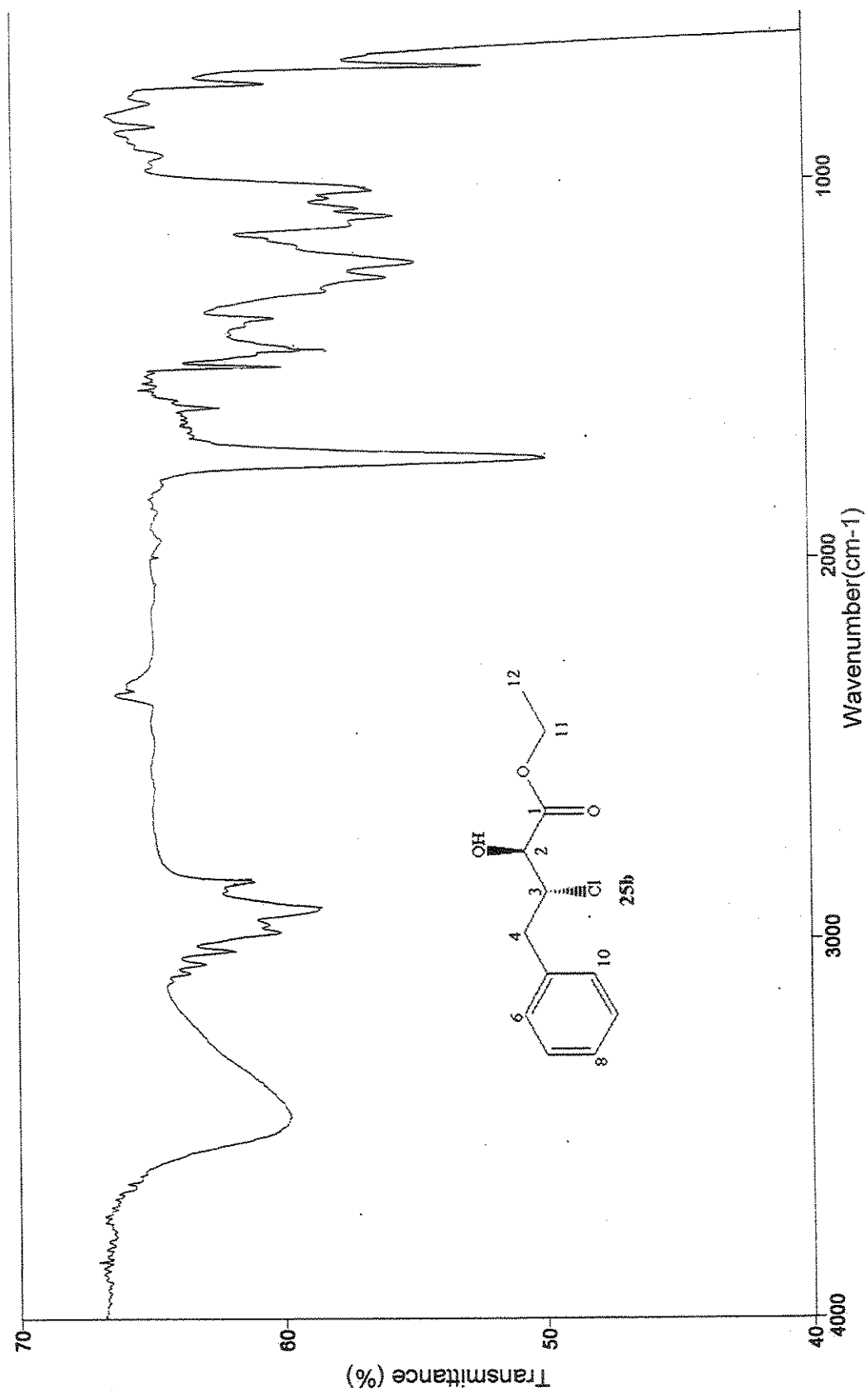
E26. Espectro de massas de (2*S*,3*S*) 3-cloro-2-hidróxi-fenilbutirato de etila 25a

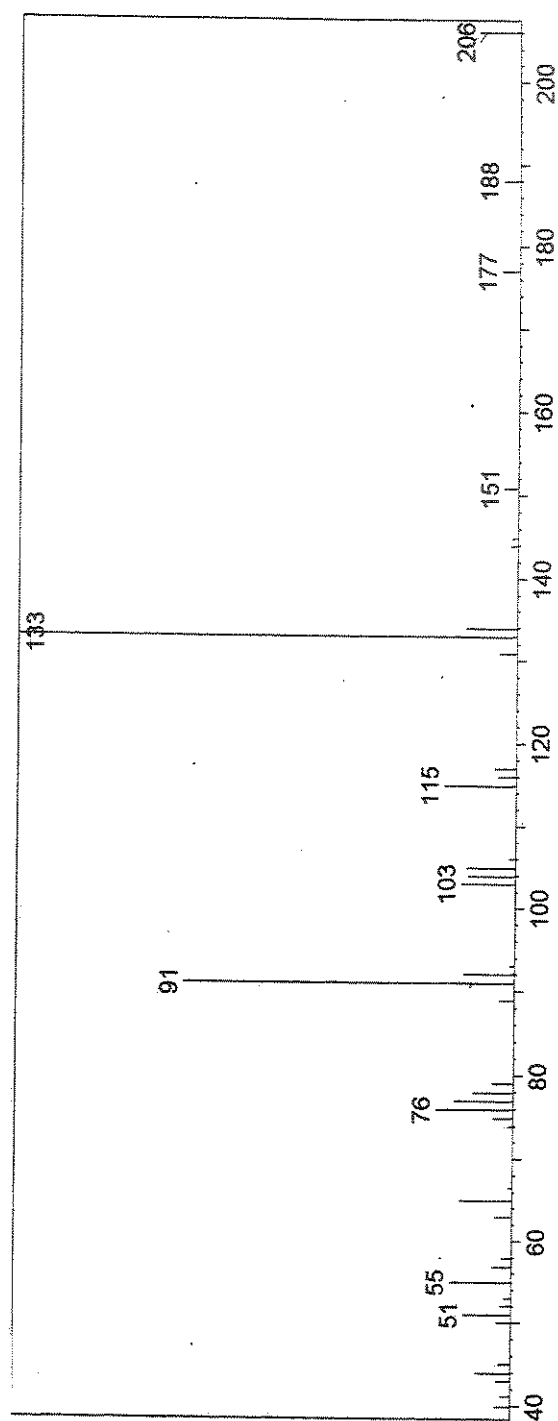
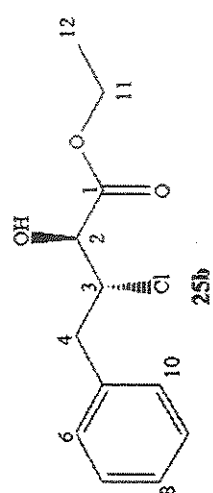


E27. Espectro de RMN de ^1H de (2*S*,3*R*) 3-cloro-2-hidróxi-fenilbutanoato de etila **25b**

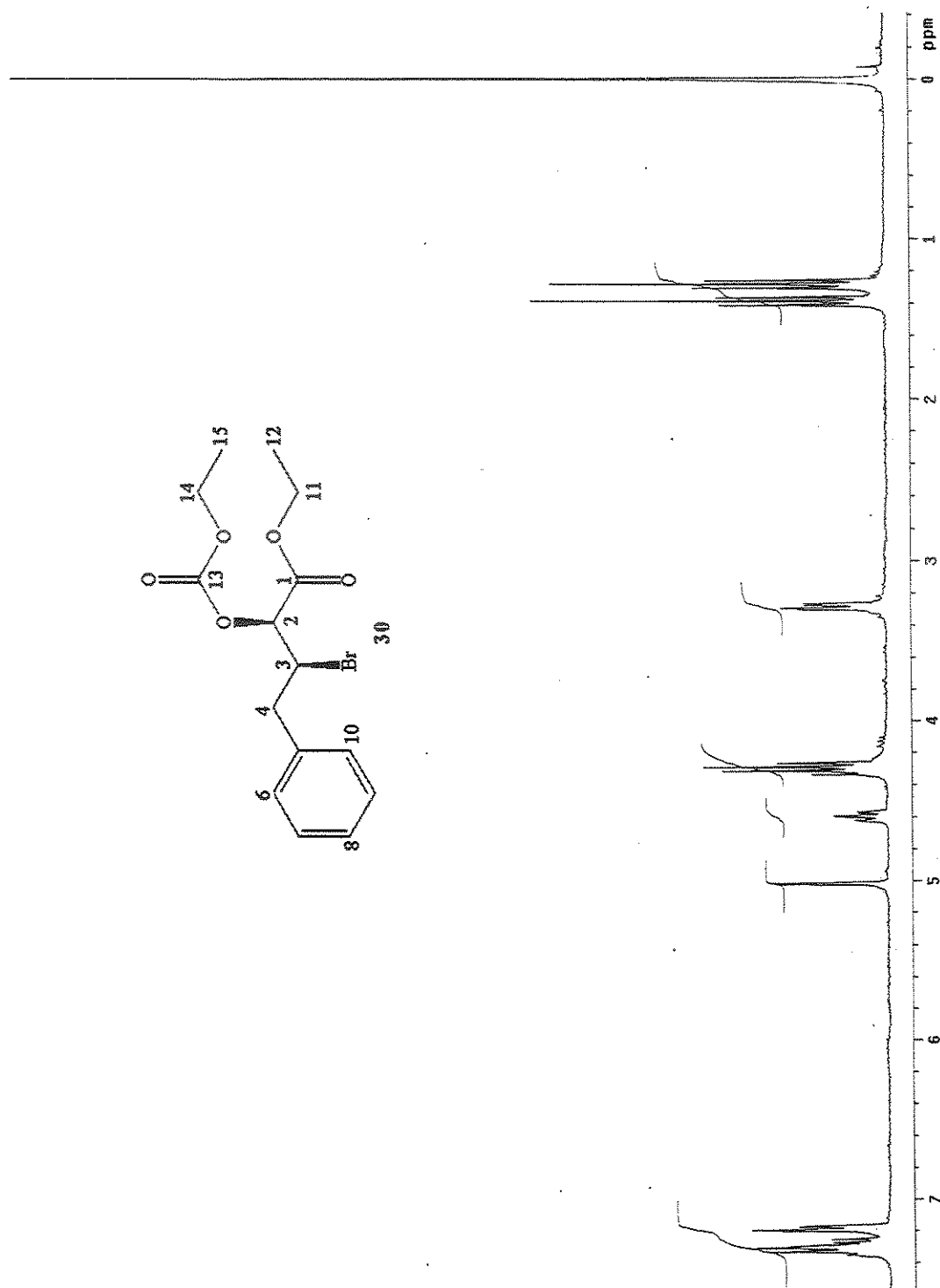


E28. Espectro de RMN de ^{13}C de (2S,3R) 3-cloro-2-hidróxi-fenilbutanoato de etila **25b**

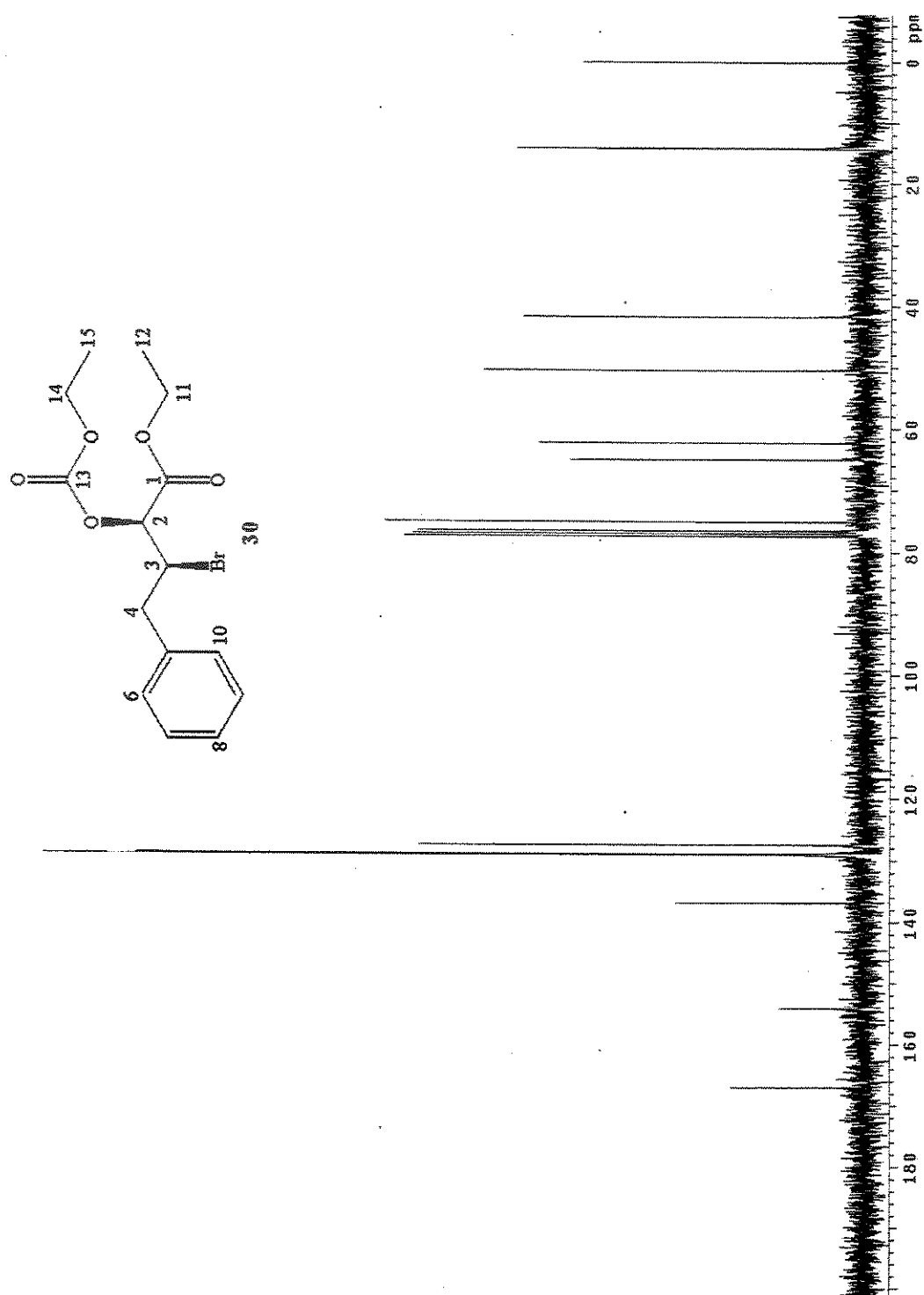
E29. Espectro no IV de (2*S*,3*R*) 3-cloro-2-hidróxi-fenilbutanoato de etila **25b**



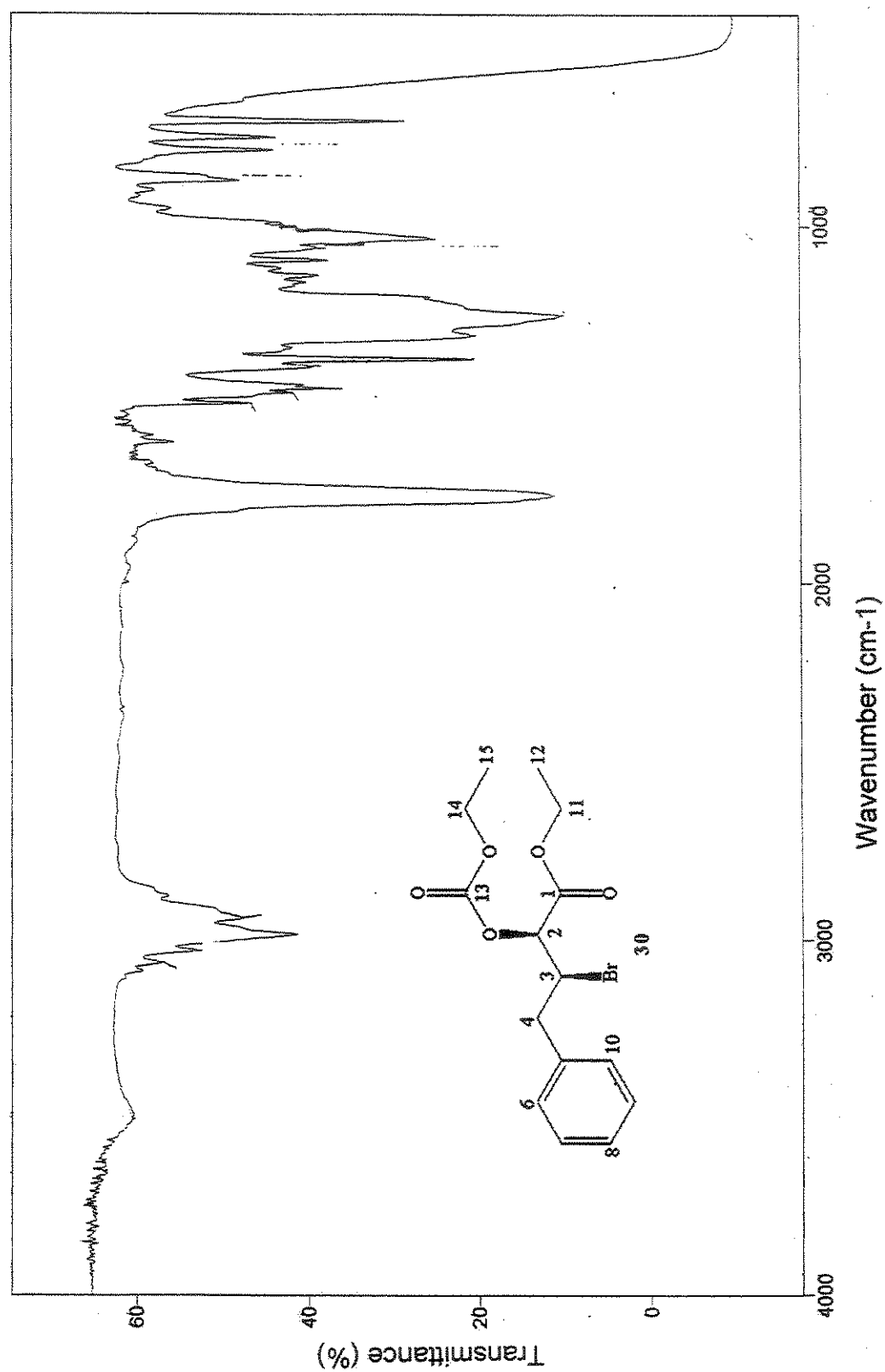
E30. Espectro de massas de (2*S*,3*R*) 3-cloro-2-hidróxi-fenilbutanoato de etila **25b**



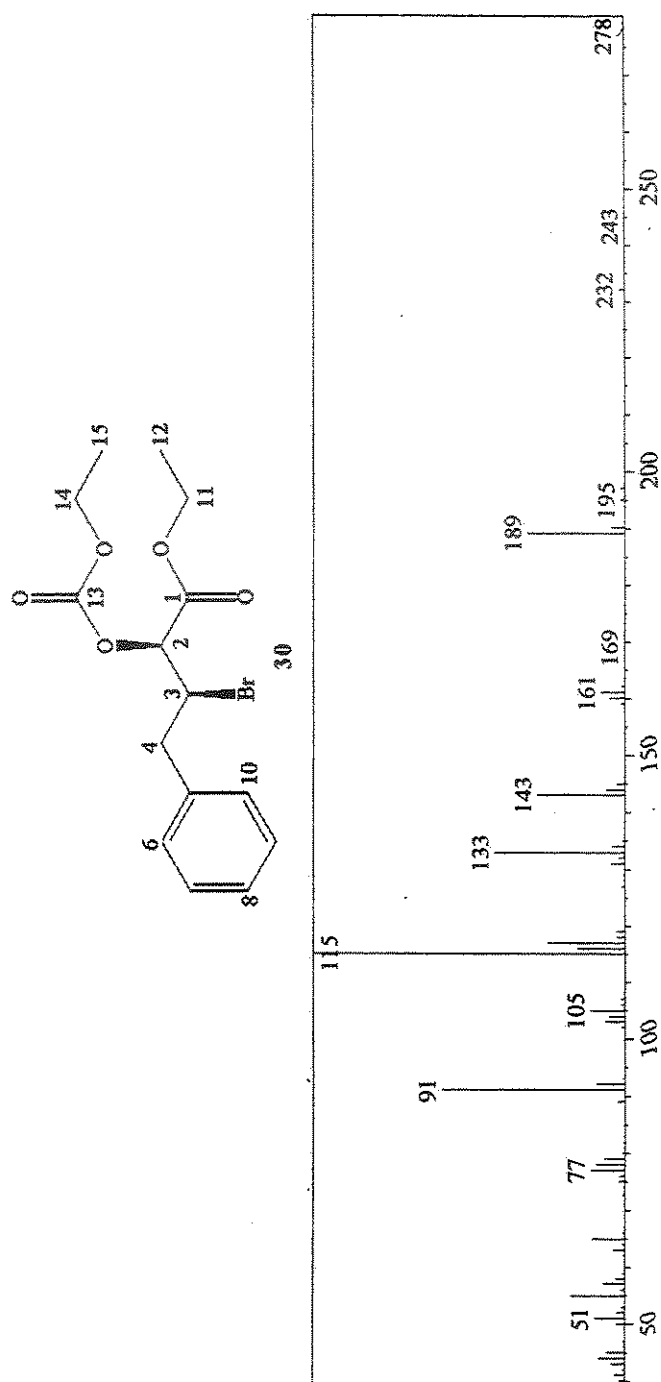
E31. Espectro de RMN de ^1H de (2*S*,3*s*) 3-bromo-2-carbetoxy-fenilbutanoato de etila **30**



E32. Espectro de RMN de ^{13}C de (2*S*,3*S*) 3-bromo-2-carbetoxi-fenilbutanoato de etila 30



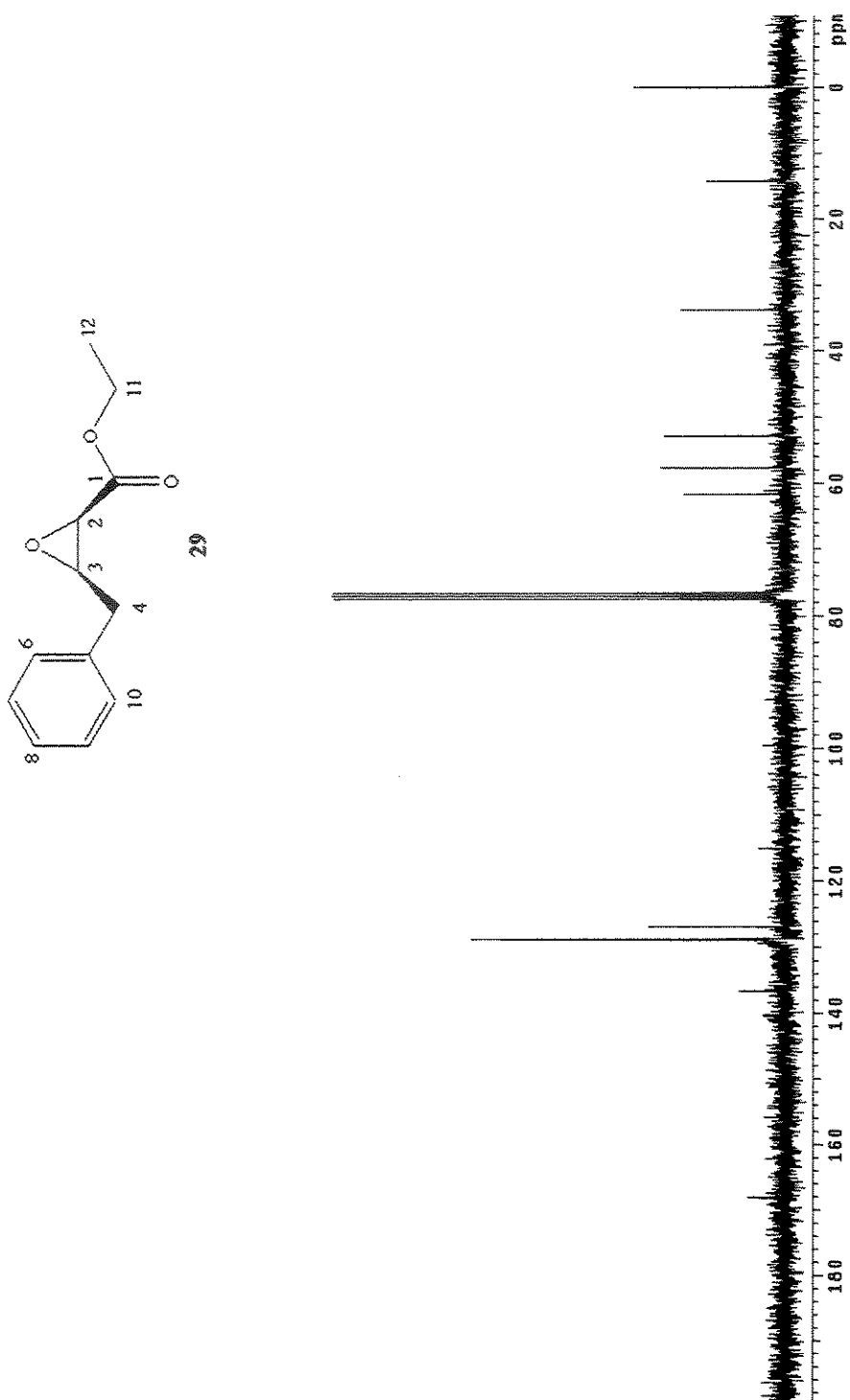
E33. Espectro no IV de (2*S*,3*S*) 3-bromo-2-carbetoxi-fenilbutanoato de etila **30**



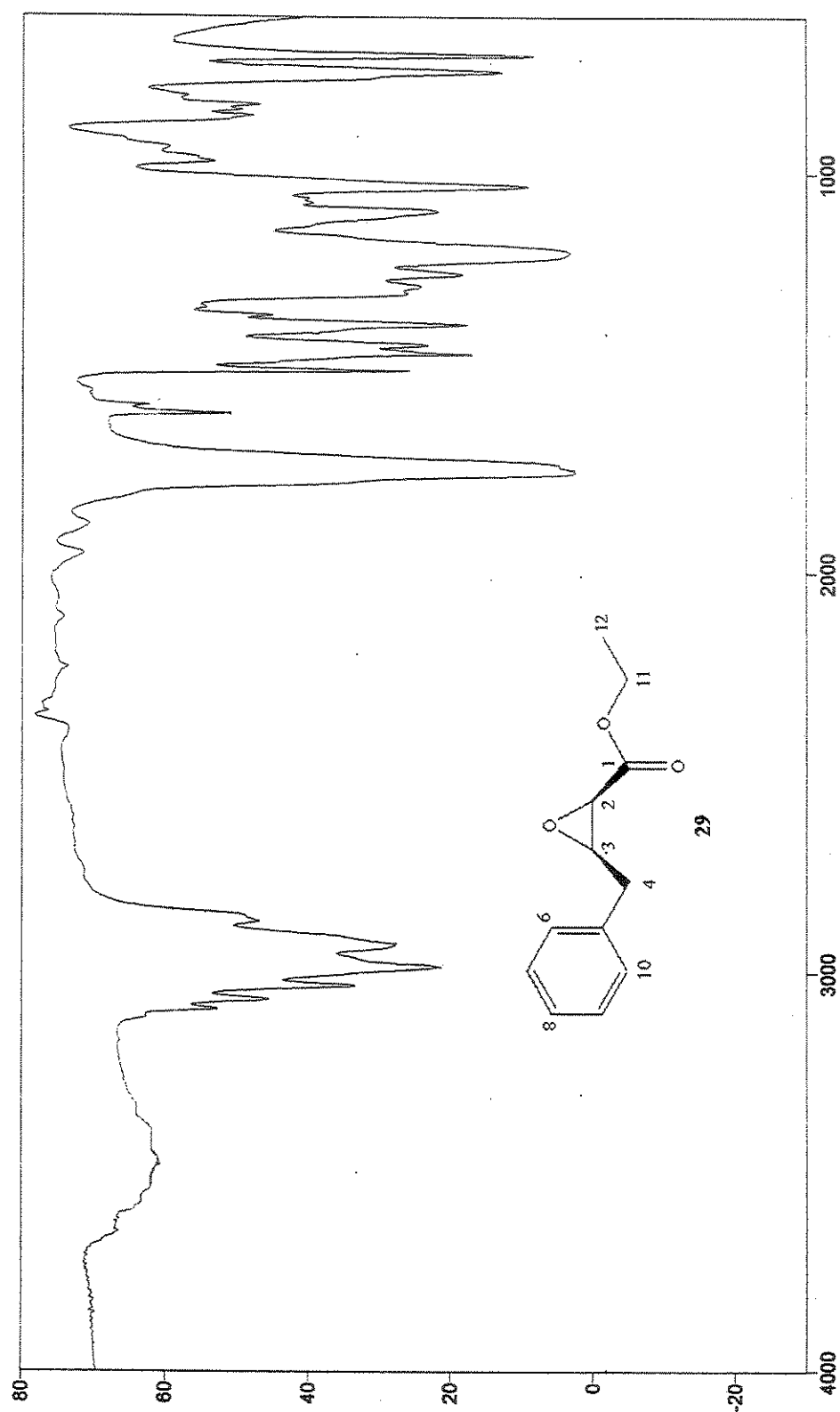
E34. Espectro de massas de (2*S*,3*S*) 3-bromo-2-carbetoxi-fenilbutanoato de etila **30**



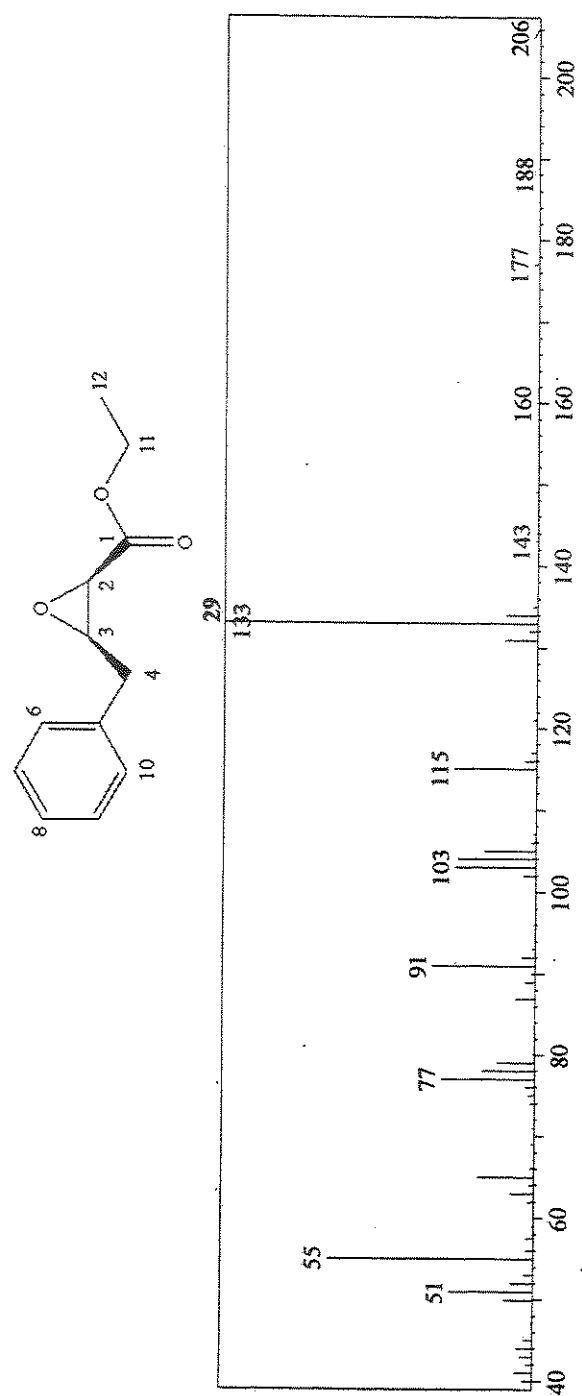
E35. Espectro de RMN de ^1H de (2*R*, 3*R*)-4-fenil-2,3-oxiranobutanoato de etila **29**



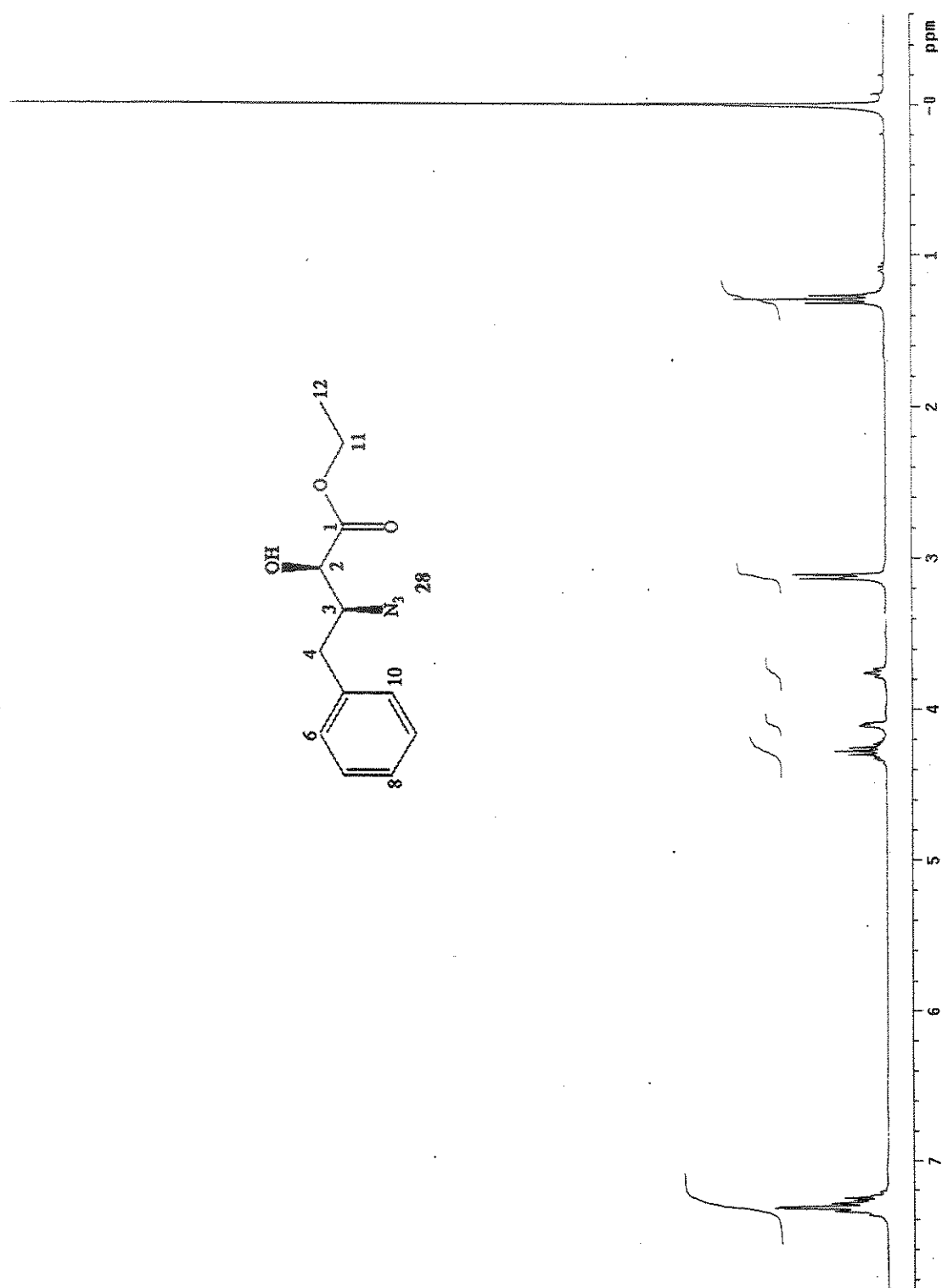
E36. Espectro de RMN de ¹³C de (2*R*, 3*R*)-4-fenil-2,3-oxiranobutanoato de etila **29**



E37. Espectro no IV de (2*R*, 3*R*)-4-fenil-2,3-oxiranobutanoato de etila 29



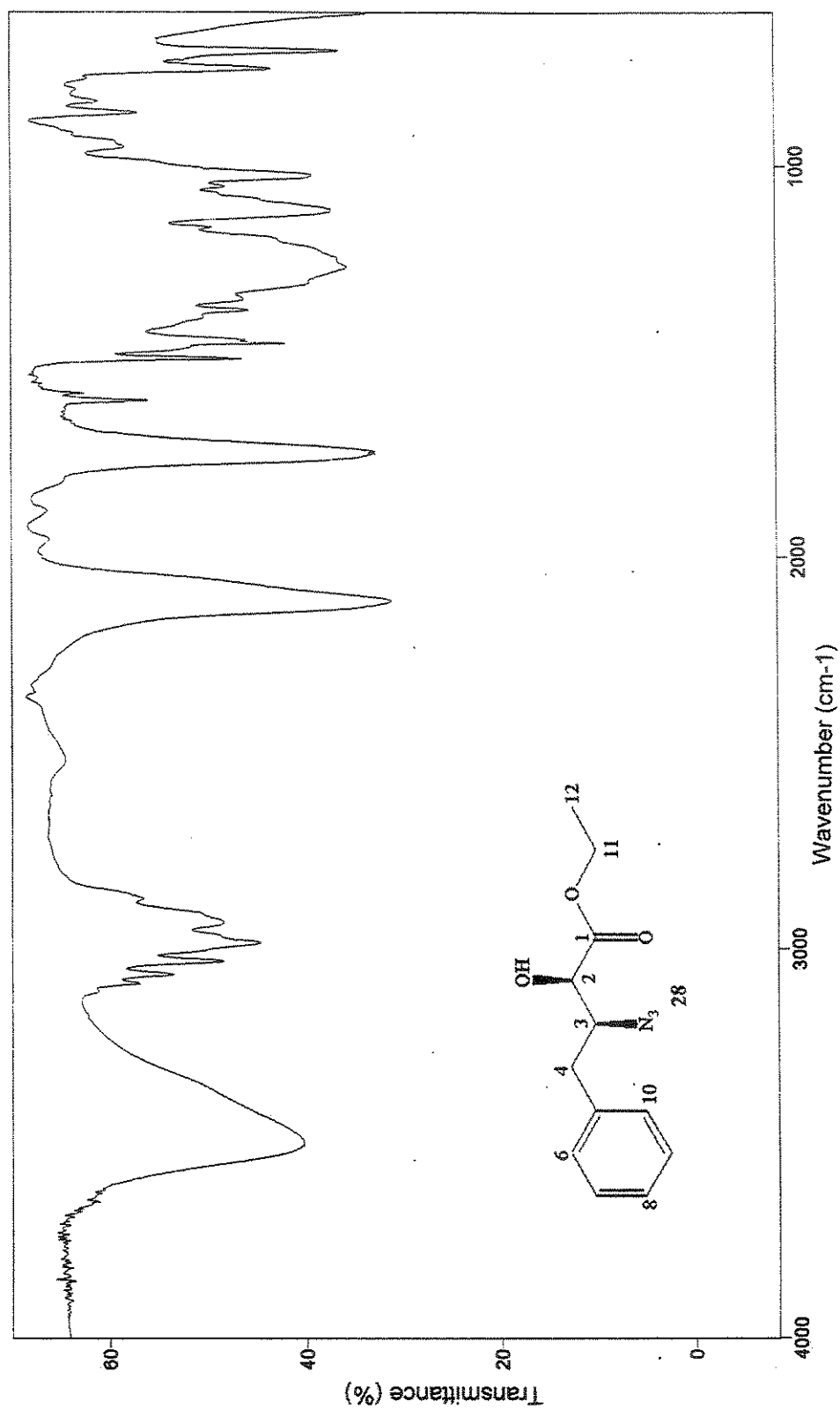
E38. Espectro de massas de (2*R*, 3*R*)-4-fenil-2,3-oxiranobutanoato de etila 29

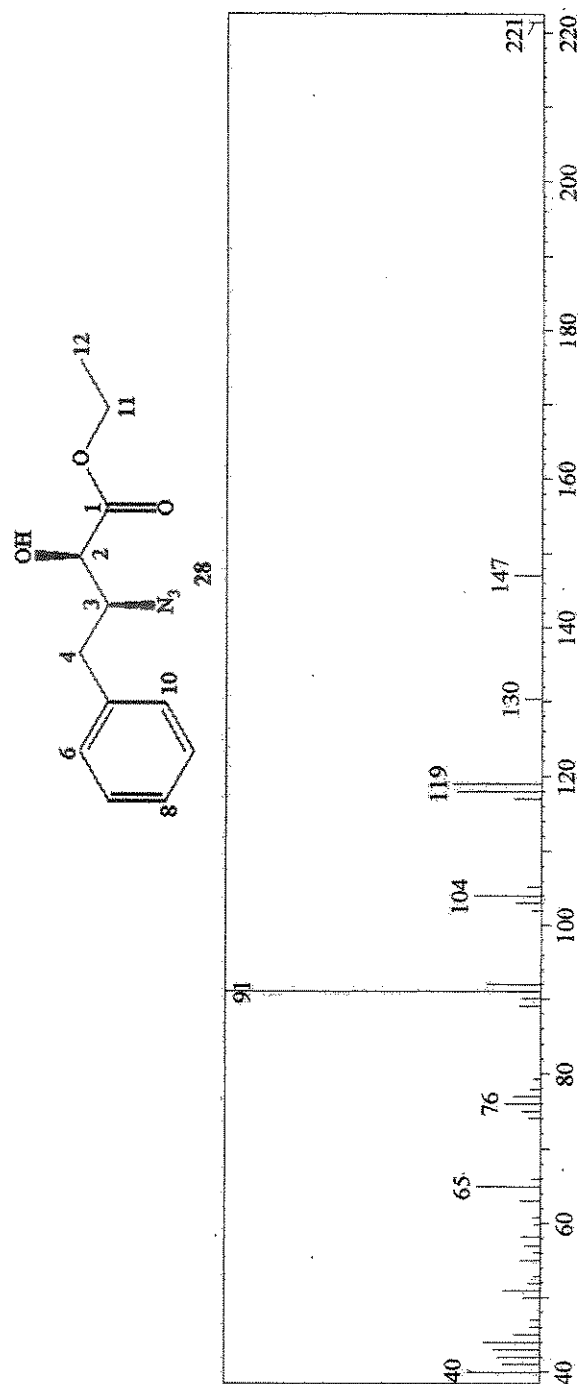


E39. Espectro de RMN de ^1H de (2R, 3S) 3-azido-2-hidróxi-fenilbutanoato de etila 28

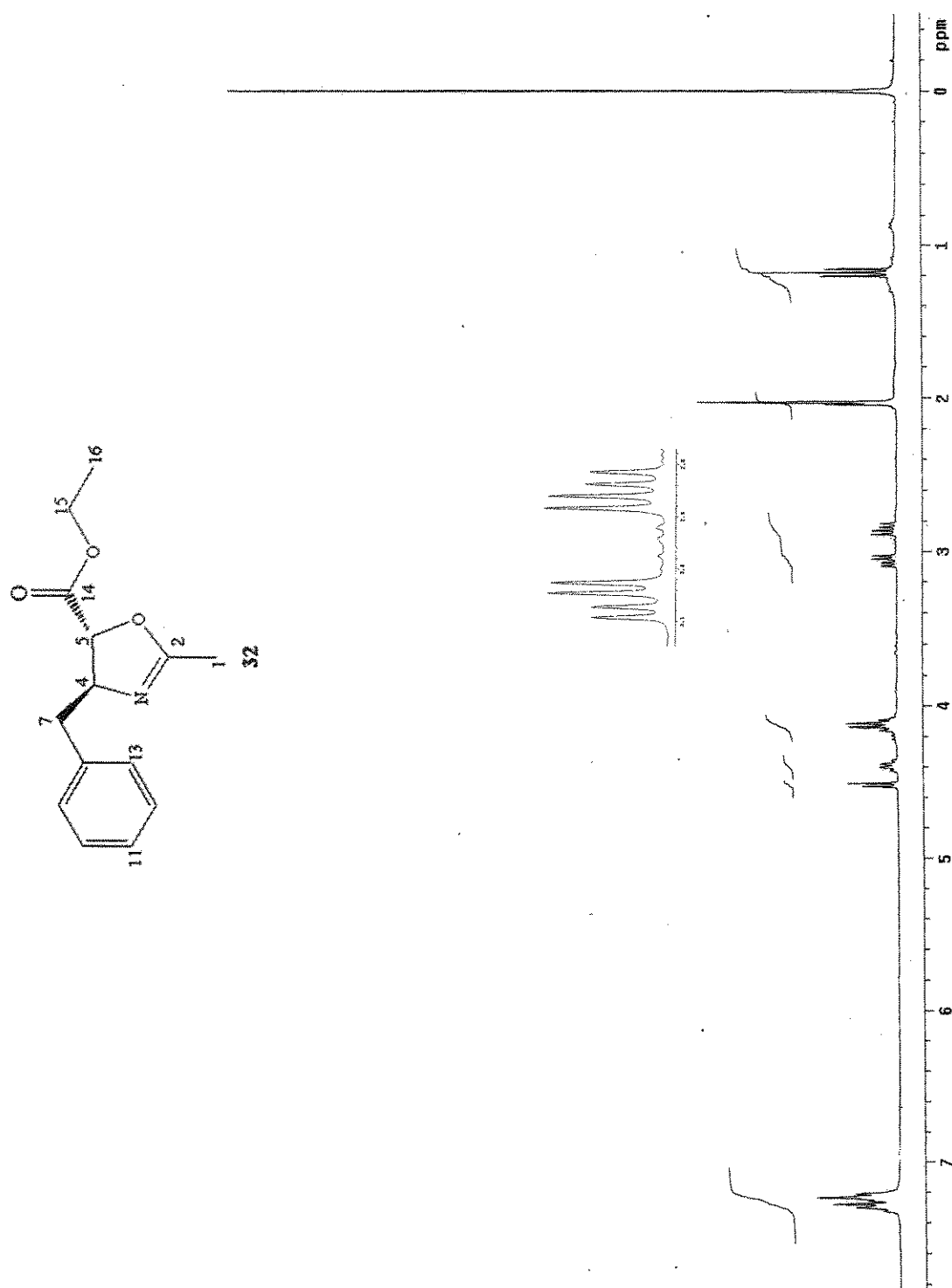


E40. Espectro de RMN de ^{13}C de (2R, 3S) 3-azido-2-hidróxi-fenilbutanoato de etila 28

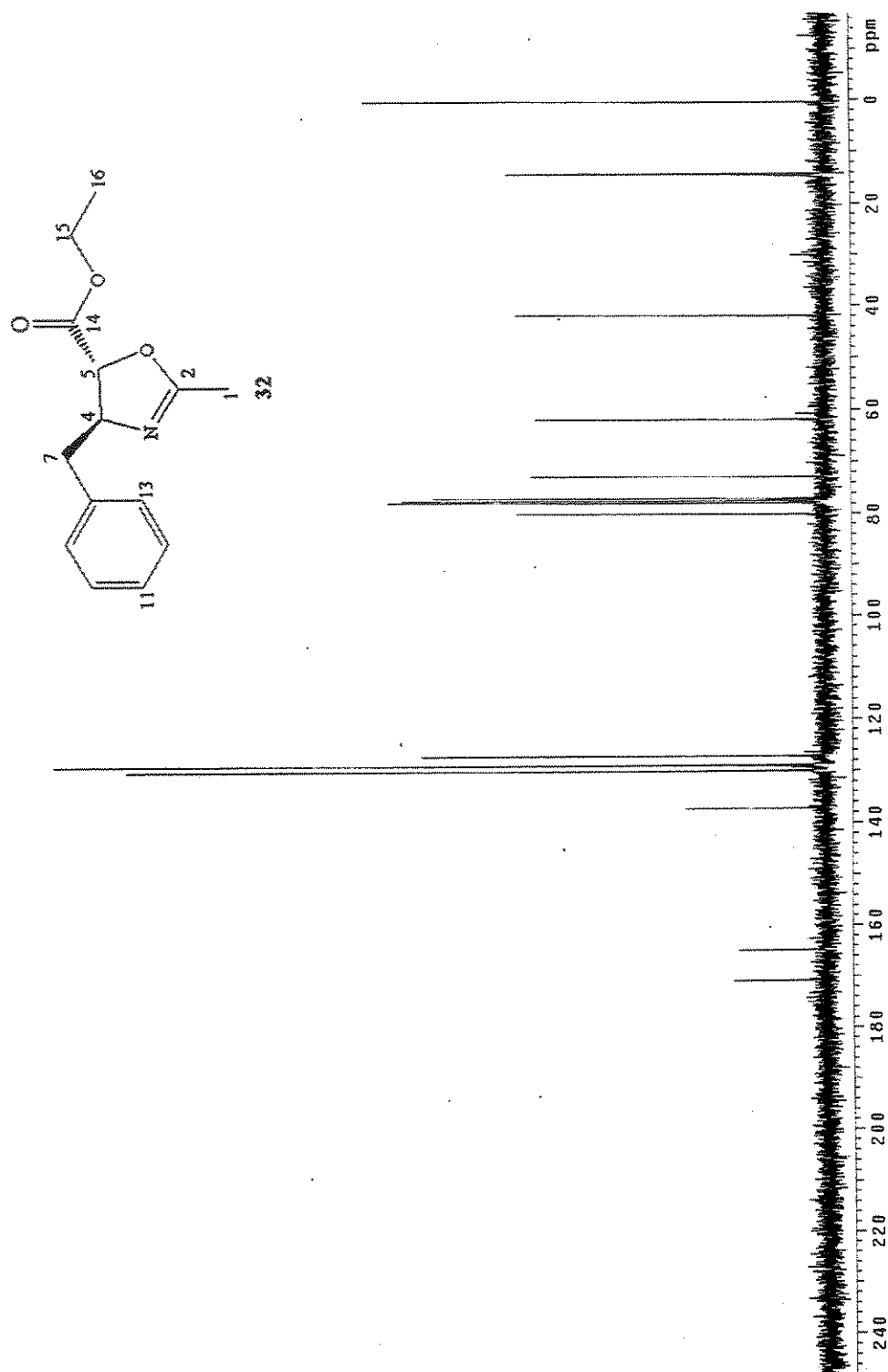
E41. Espectro no IV de (2*R*, 3*S*) 3-azido-2-hidróxi-fenilbutanoato de etila **28**



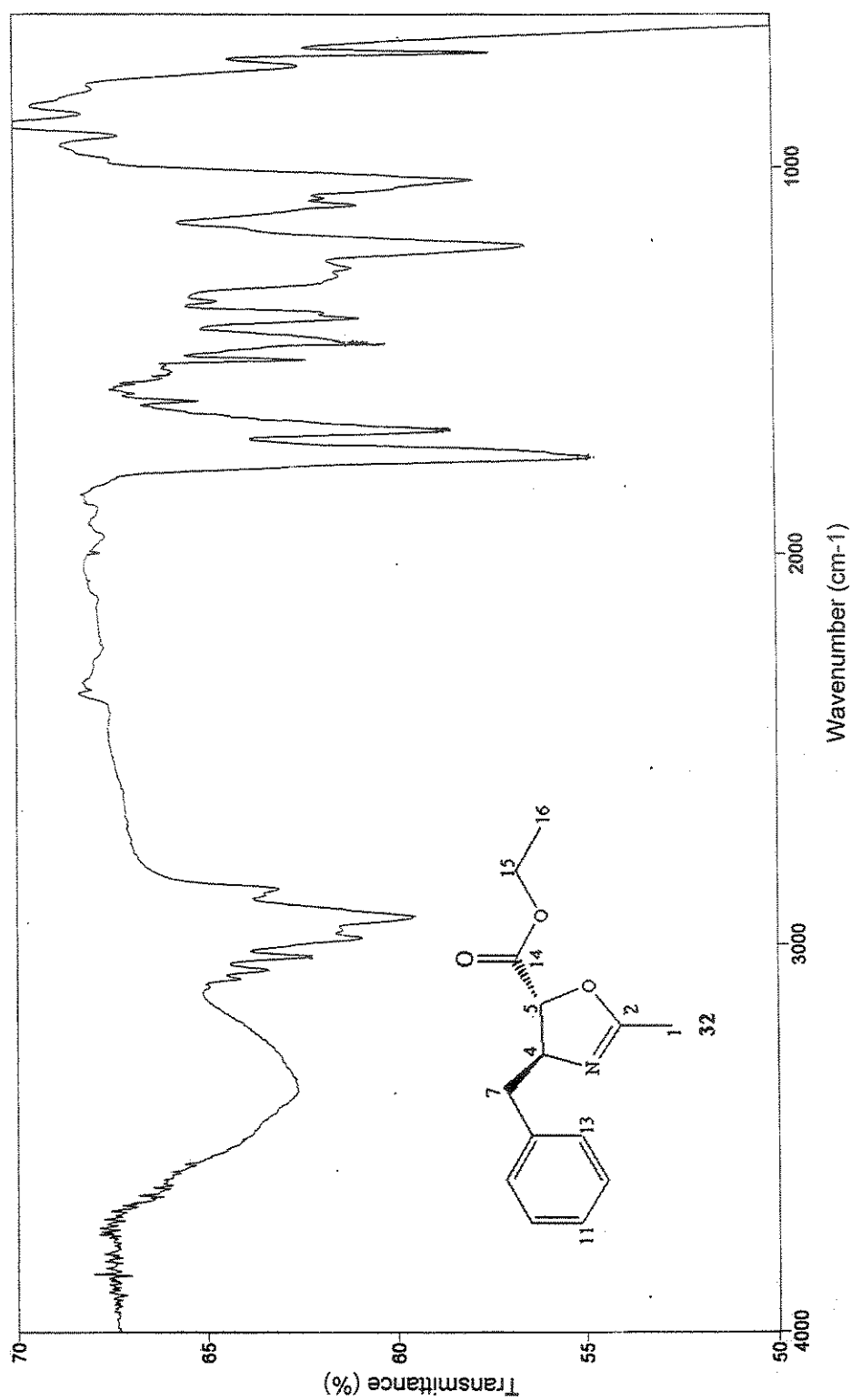
E42. Espectro de masses de (2R, 3S) 3-azido-2-hidróxi-fenilbutanoato de etila
28



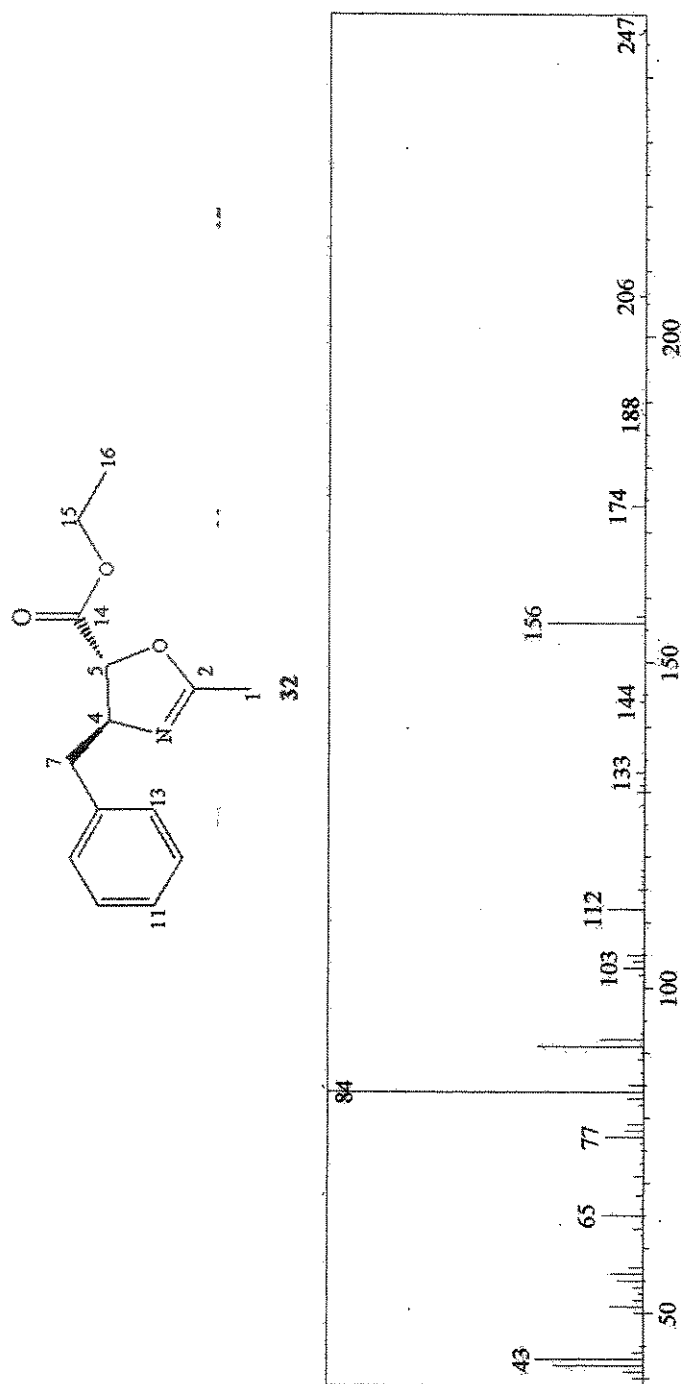
E43. Espectro de RMN de ^1H de (4*S*,5*R*)-4-benzil-2-metil-2-oxazolina-5-carboxilato de etila **32**



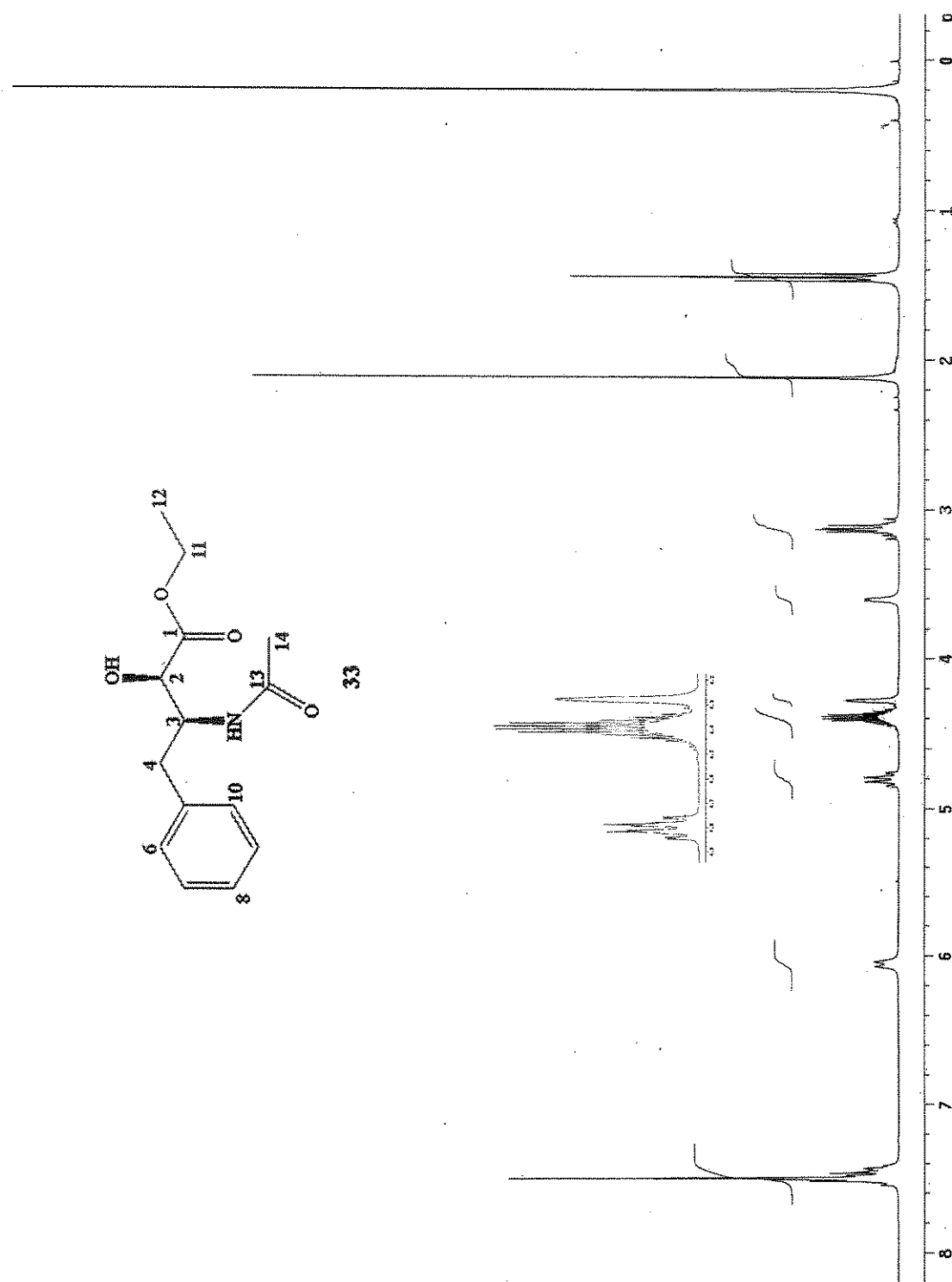
E44. Espectro de RMN de ^{13}C de (4*S*,5*R*)-4-benzil-2-metil-2-oxazolina-5-carboxilato de etila **32**



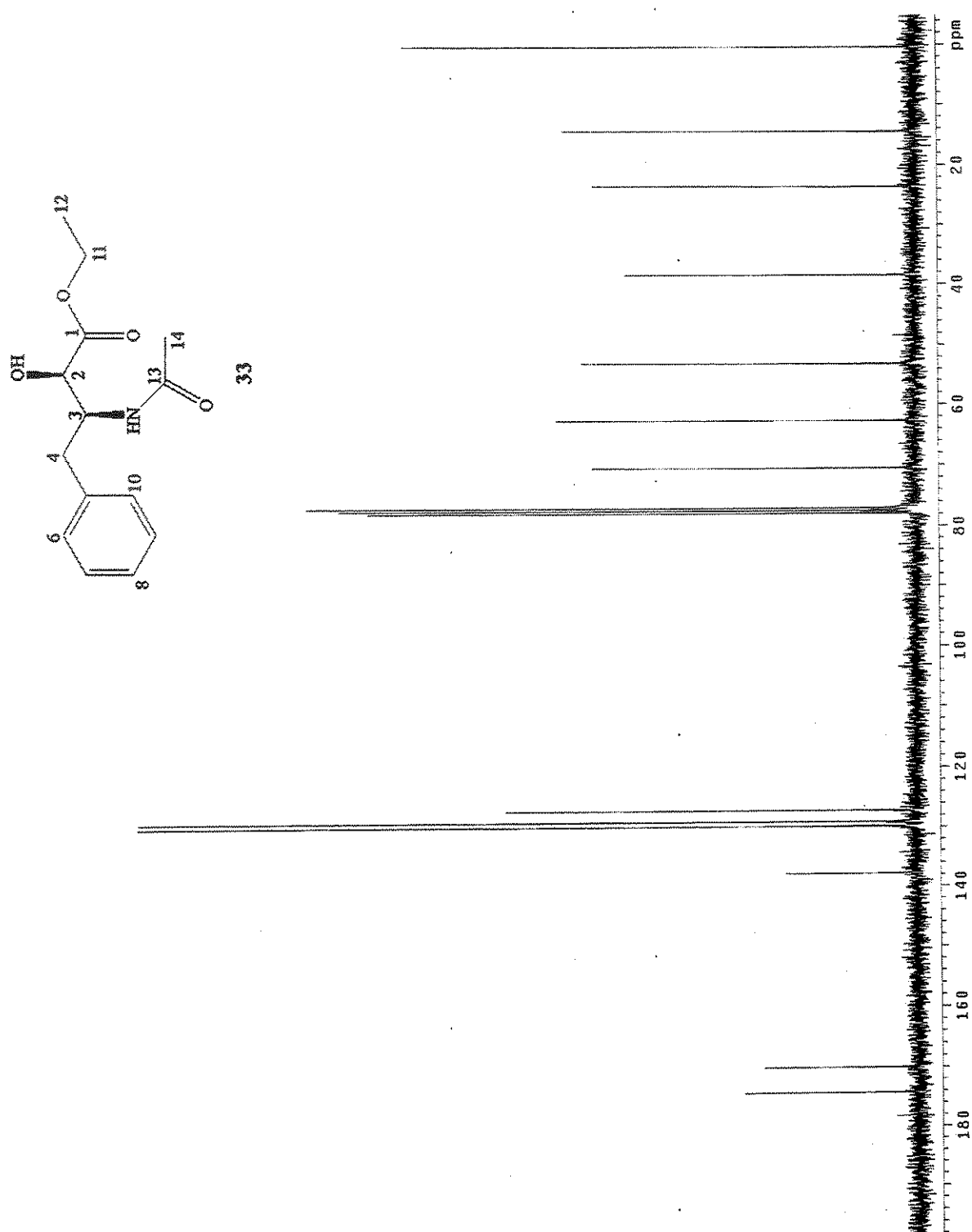
E45. Espectro no IV de (4*S*,5*R*)-4-benzil-2-metil-2-oxazolina-5-carboxilato de etila 32



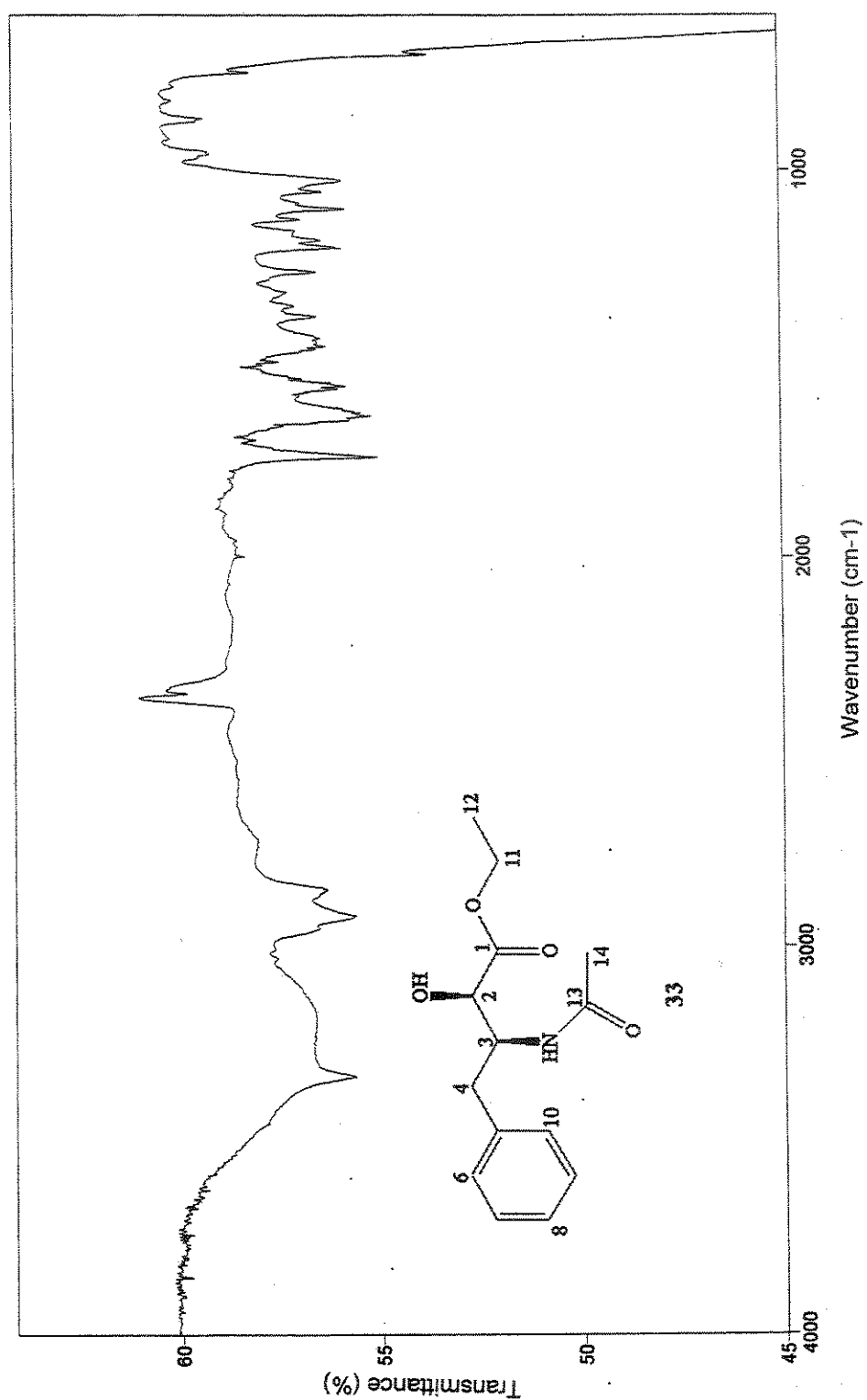
E46. Espectro de massas de (4S,5R)-4-benzil-2-metil-2-oxazolina-5-carboxilato de etila 32



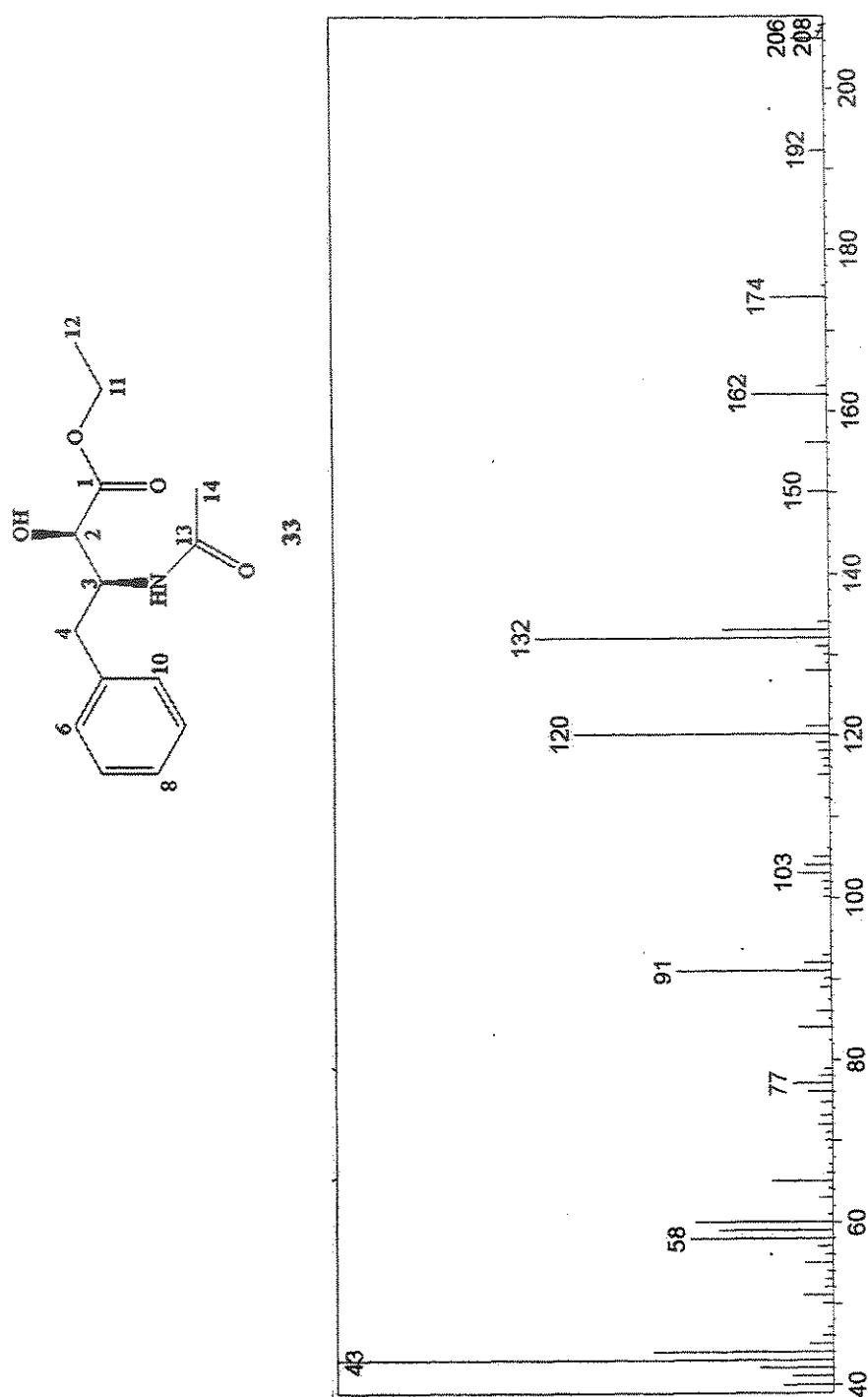
E47. Espectro de RMN de ¹H (2*R*, 3*S*)-4-fenil-2-hidroxi-3-acetilamino-butanoato de etila 33



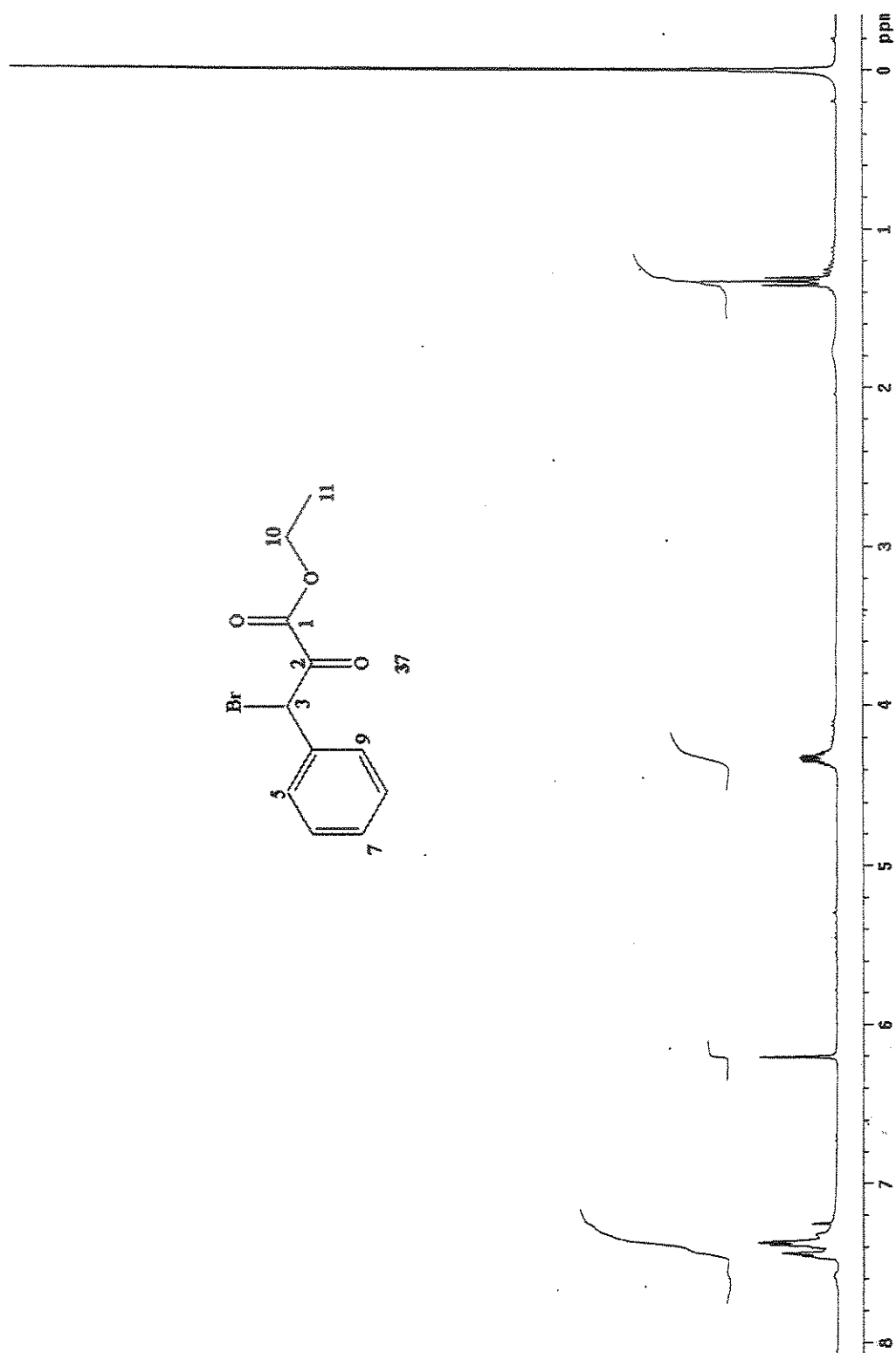
E48. Espectro de RMN de ^{13}C (2*R*, 3*S*)-4-fenil-2-hidroxi-3-acetilamino-butanoato de etila **33**

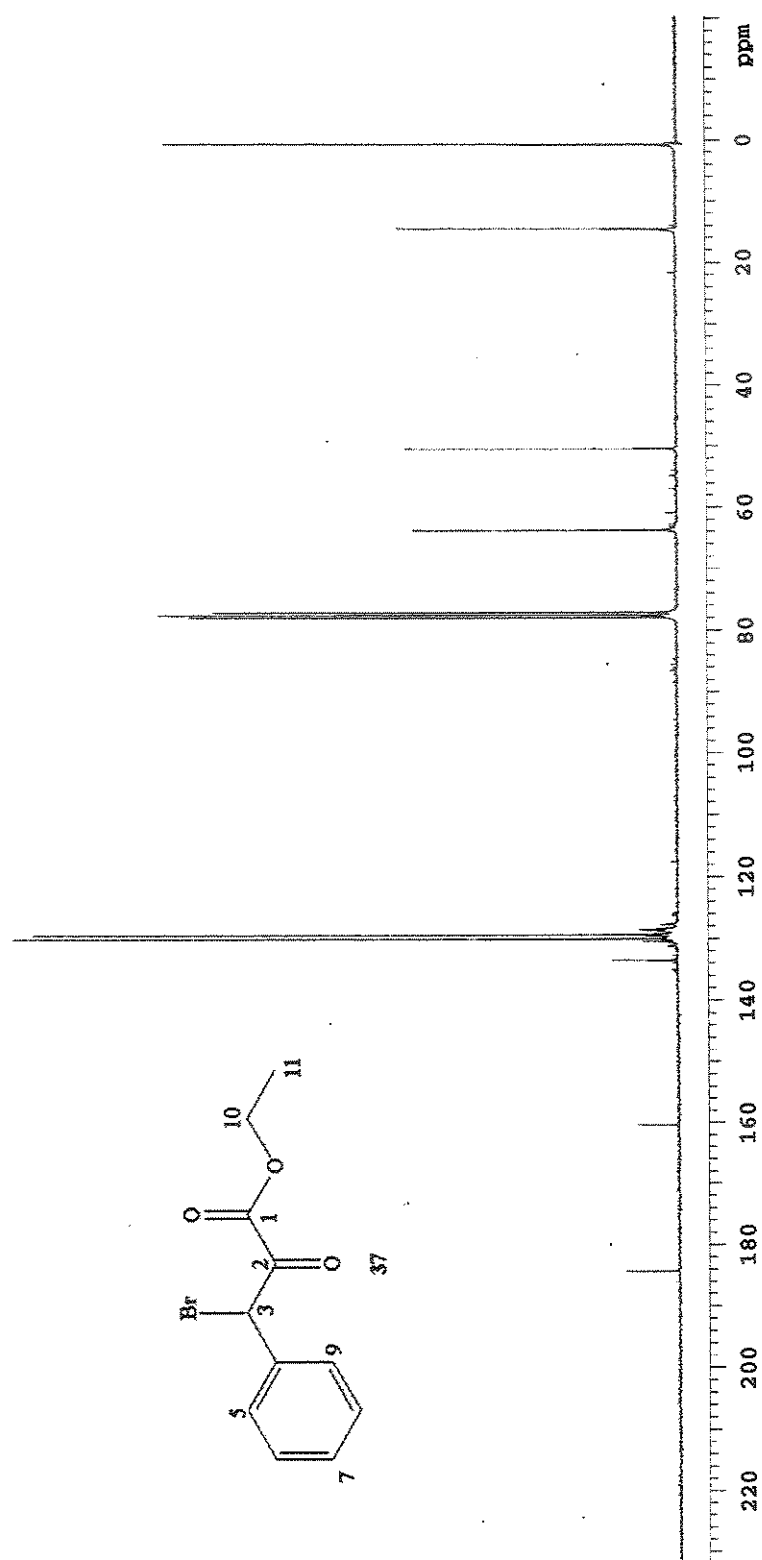


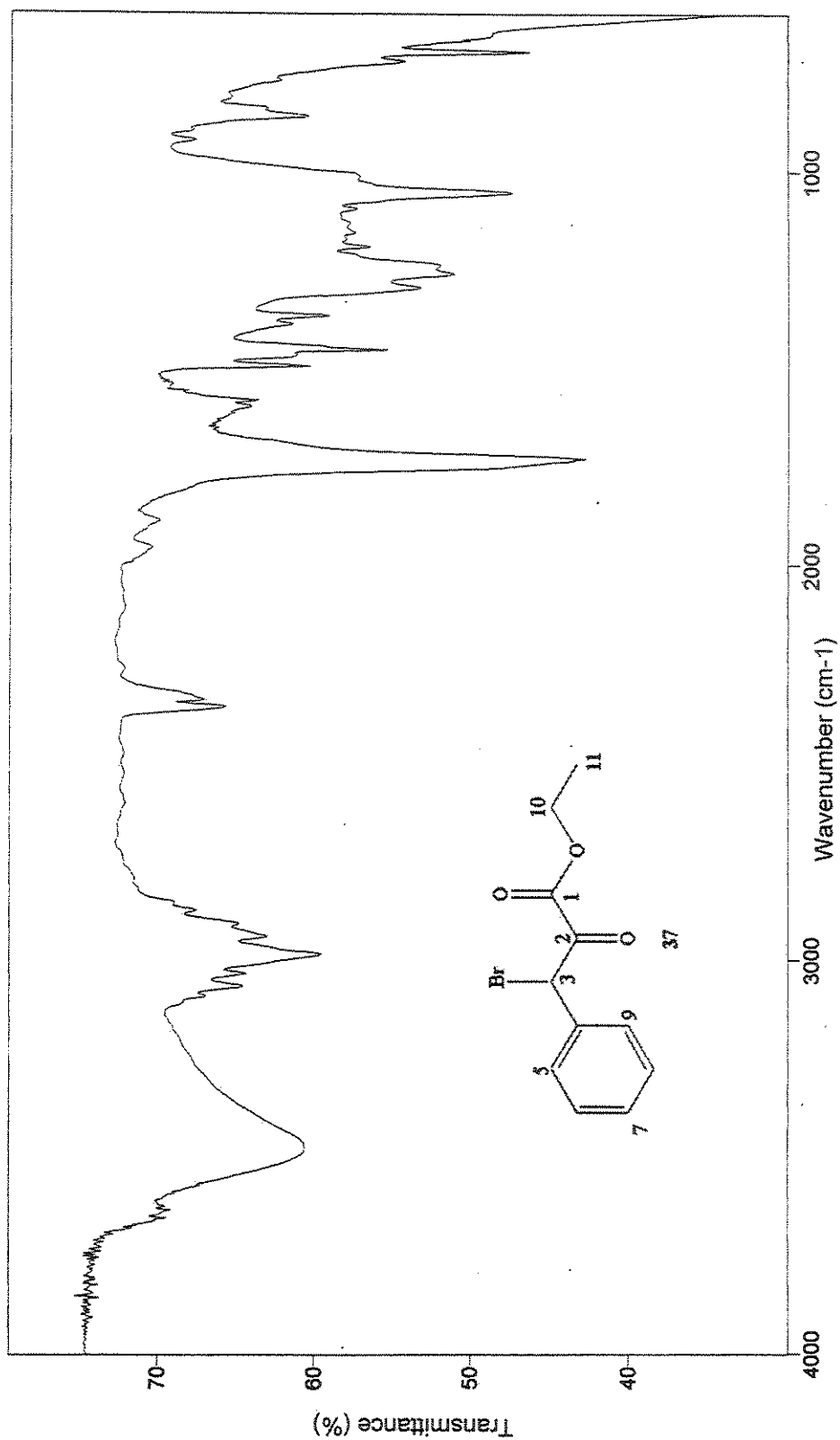
E49. Espectro no IV (2R, 3S)-4-fenil-2-hidroxi-3-acetilamino-butanoato de etila 33



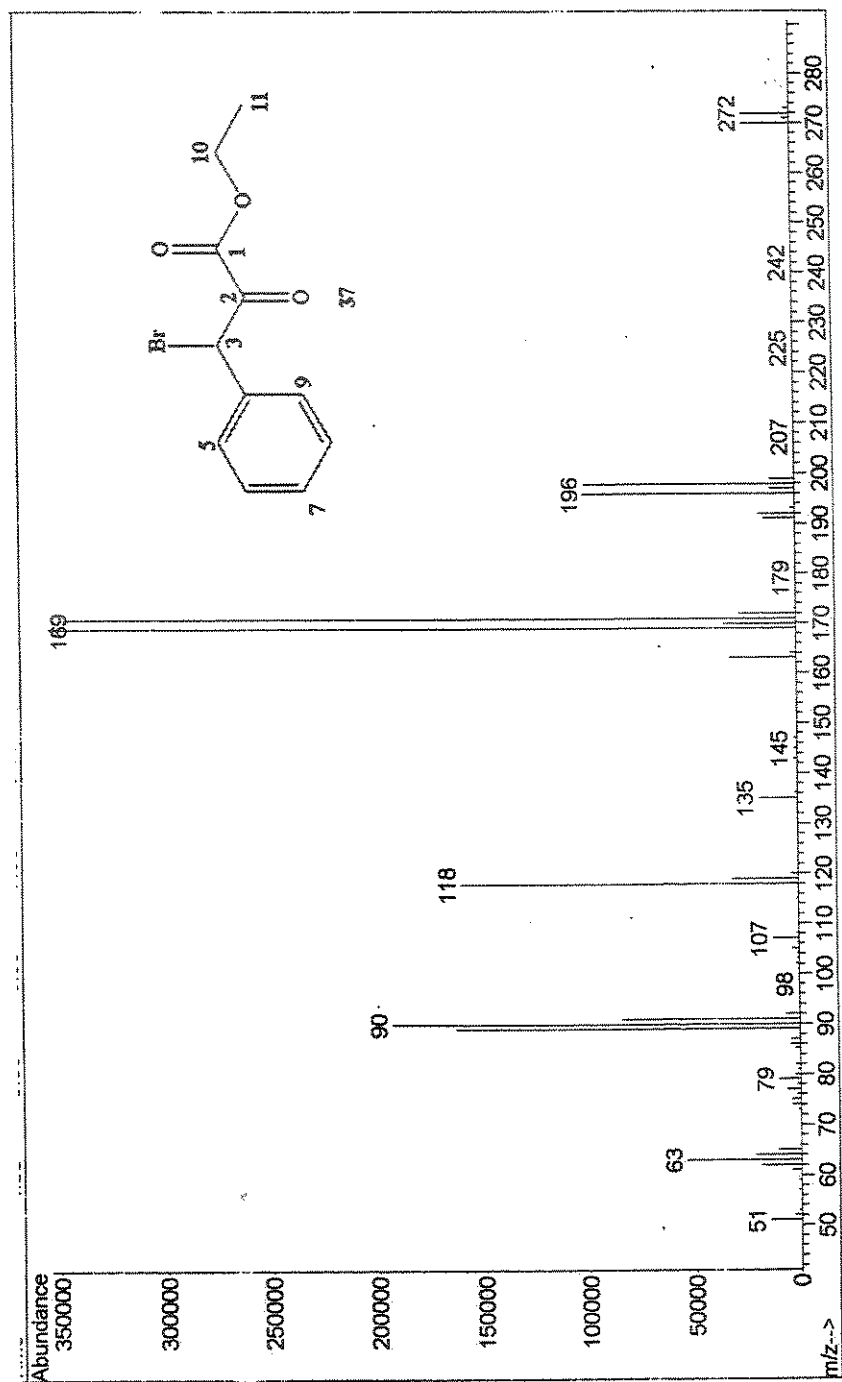
E50. Espectro de massas (2R, 3S)-4-fenil-2-hidroxi-3-acetilamino-butanoato de etila 33

E51. Espectro de RMN de ^1H de 3-bromo-2-oxo-fenilpropionato de etila 37

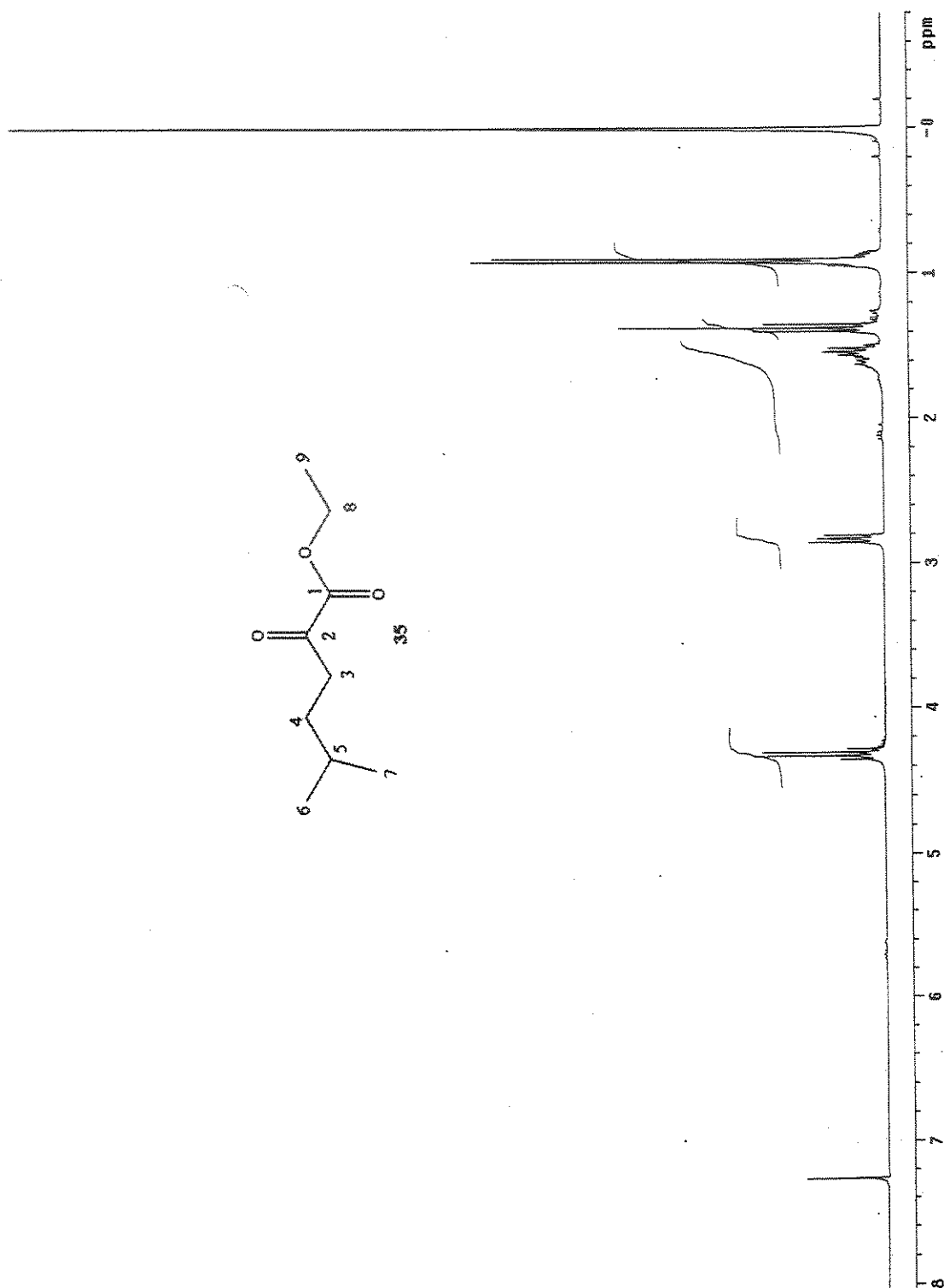
E52. Espectro de RMN de ^{13}C de 3-bromo-2-oxo-fenilpropionato de etila 37

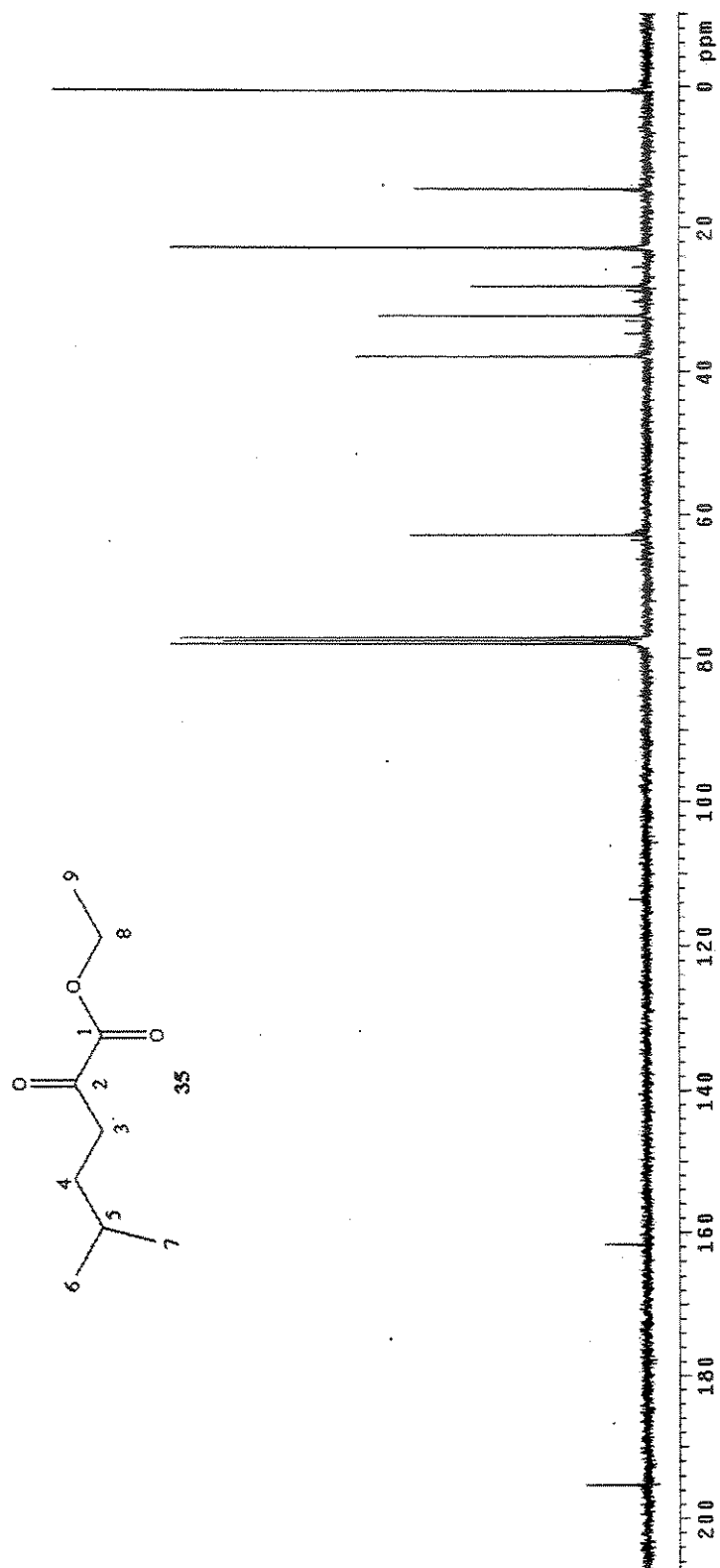


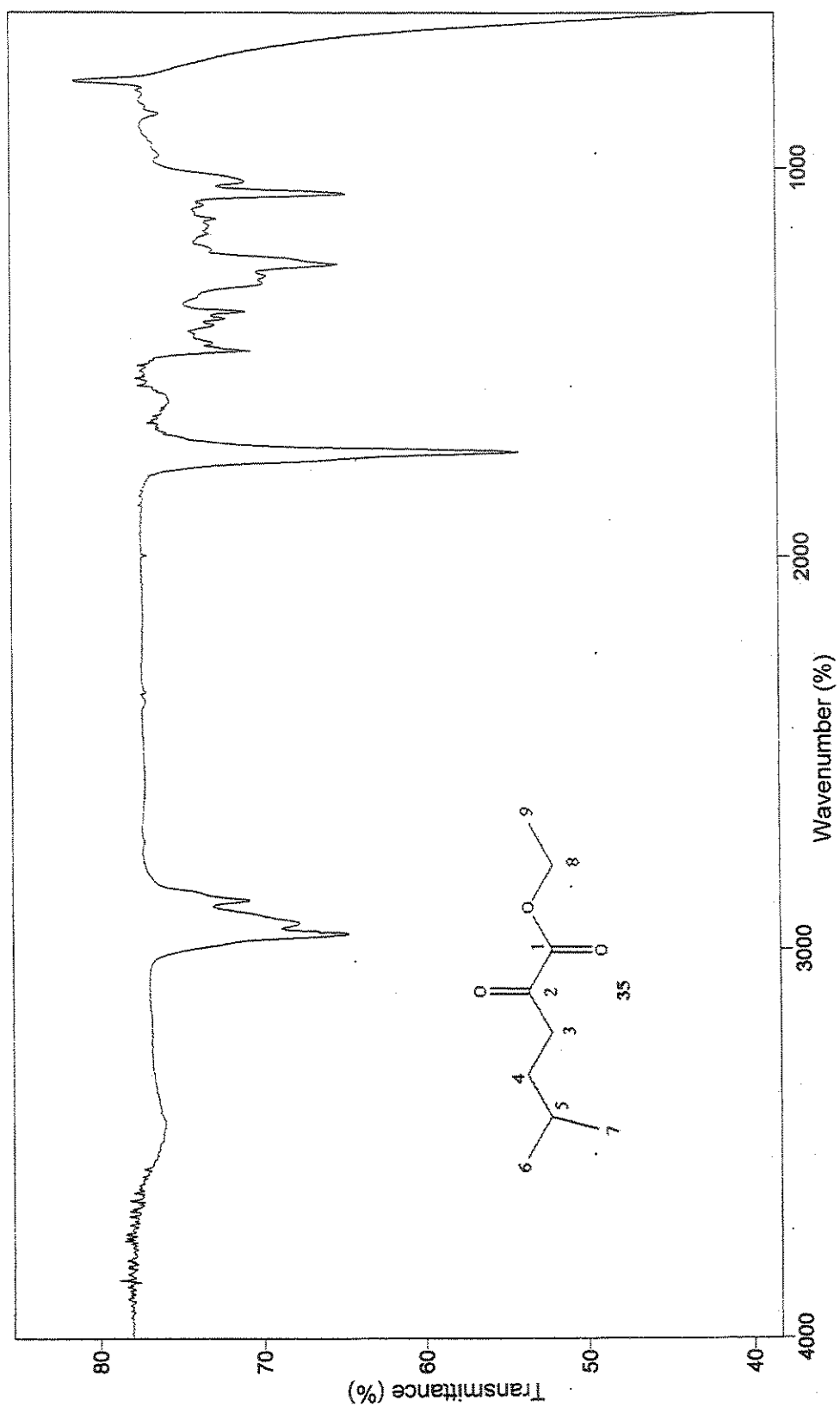
E53. Espectro no IV de 3-bromo-2-oxo-fenilpropionato de etila 37



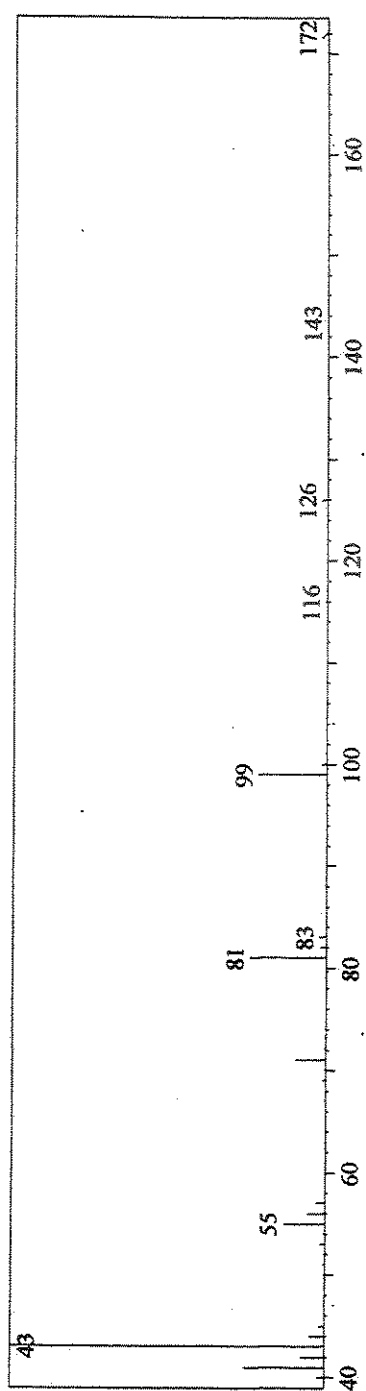
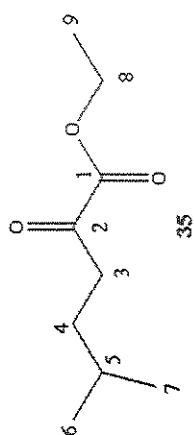
E54. Espectro de massas de 3-bromo-2-oxo-fenilpropionato de etila 37

E55. Espectro de RMN de ^1H de 2-oxo-6-metil-hexanoato de etila 35

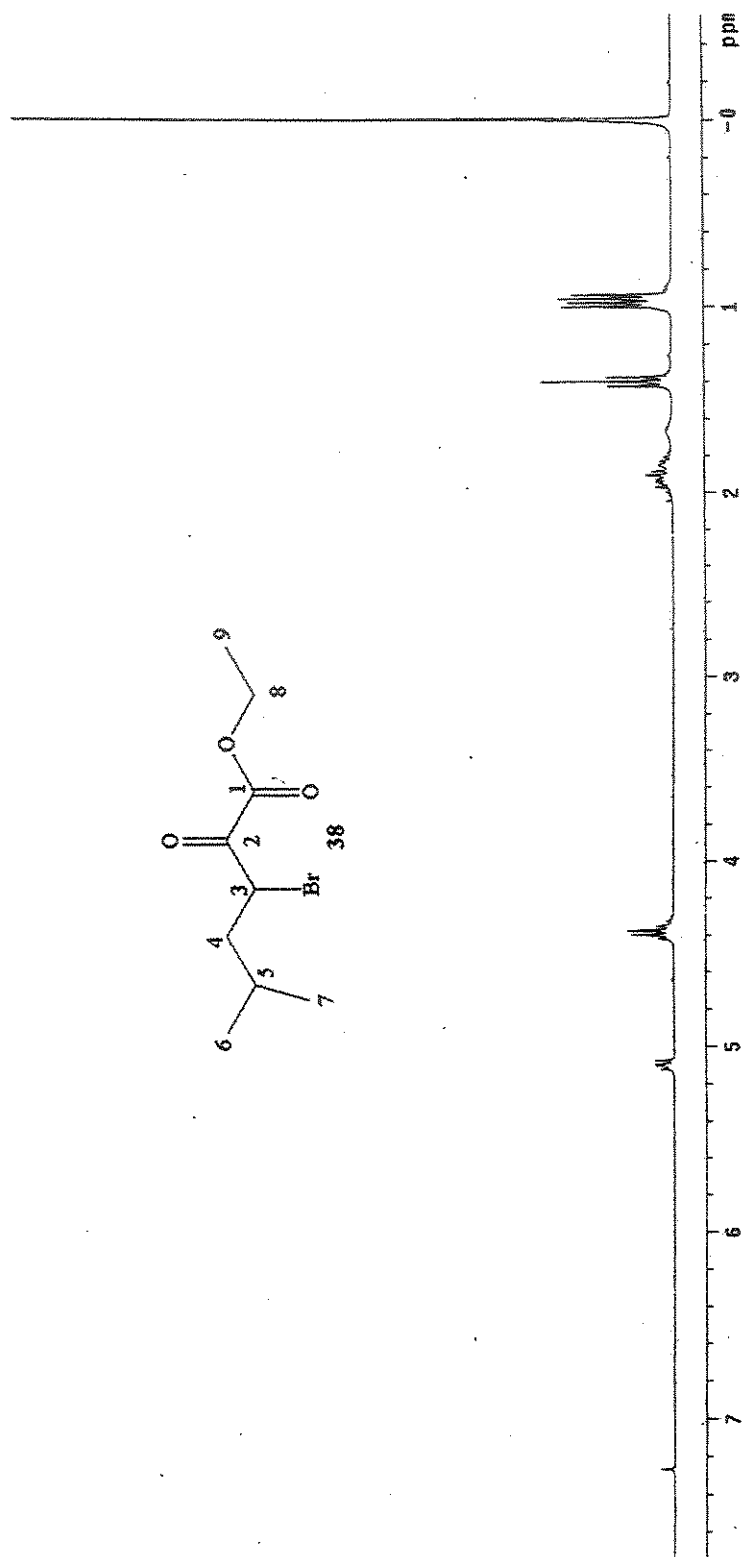
E56. Espectro de RMN de ^{13}C de 2-oxo-6-metil-hexanoato de etila 35



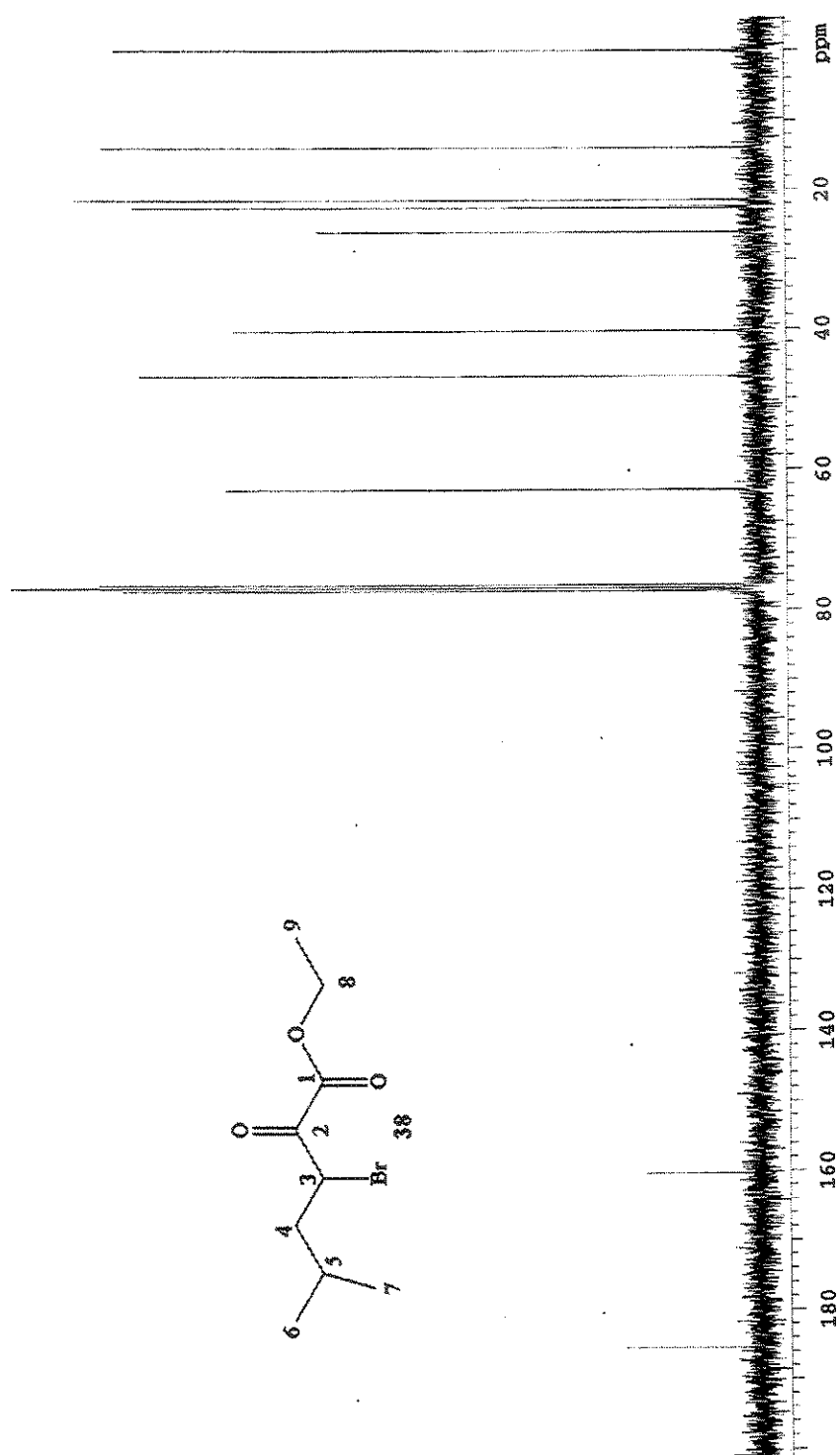
E57. Espectro no IV de 2-oxo-6-metil-hexanoato de etila 35



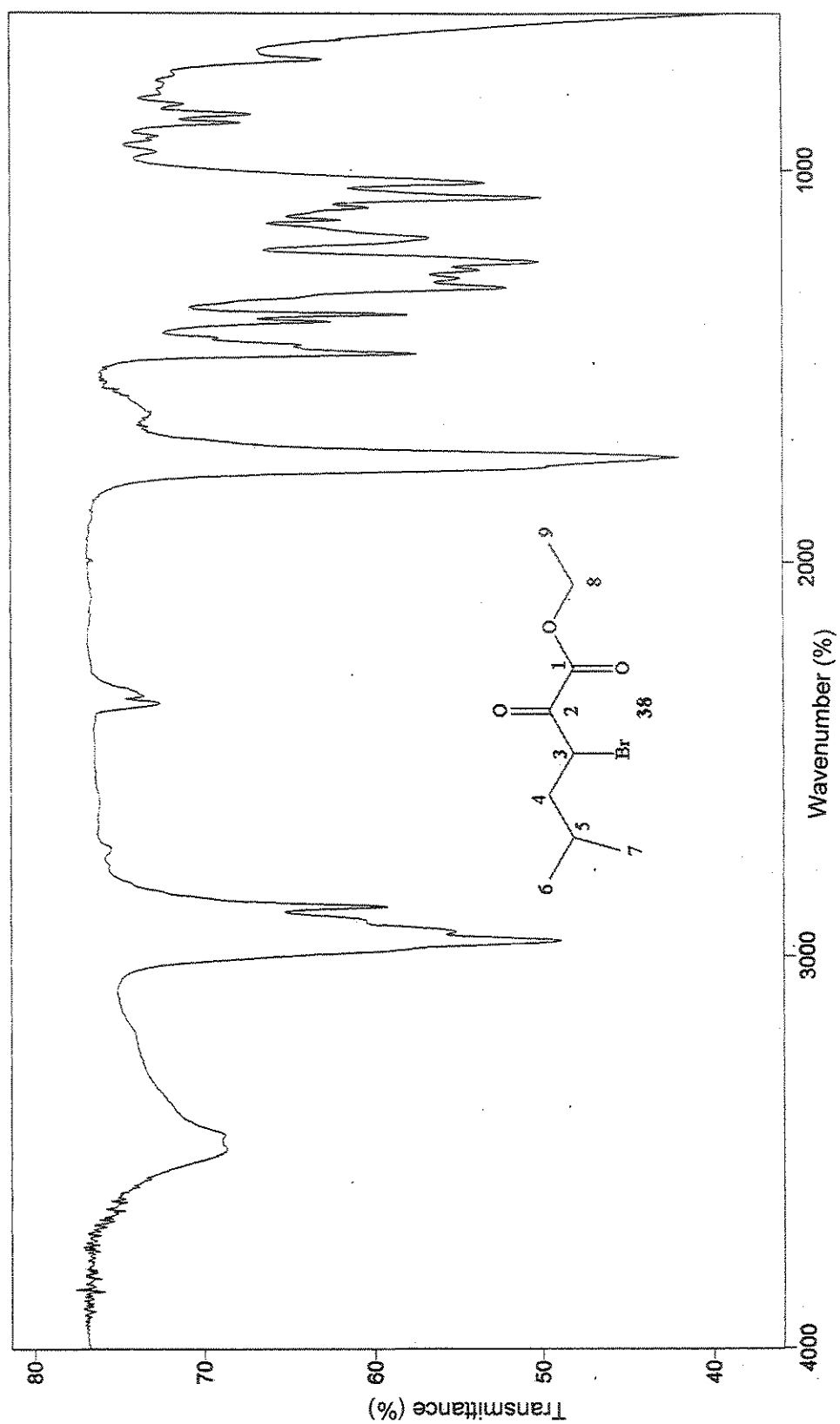
E58. Espectro de massas de 2-oxo-6-metil-hexanoato de etila 35



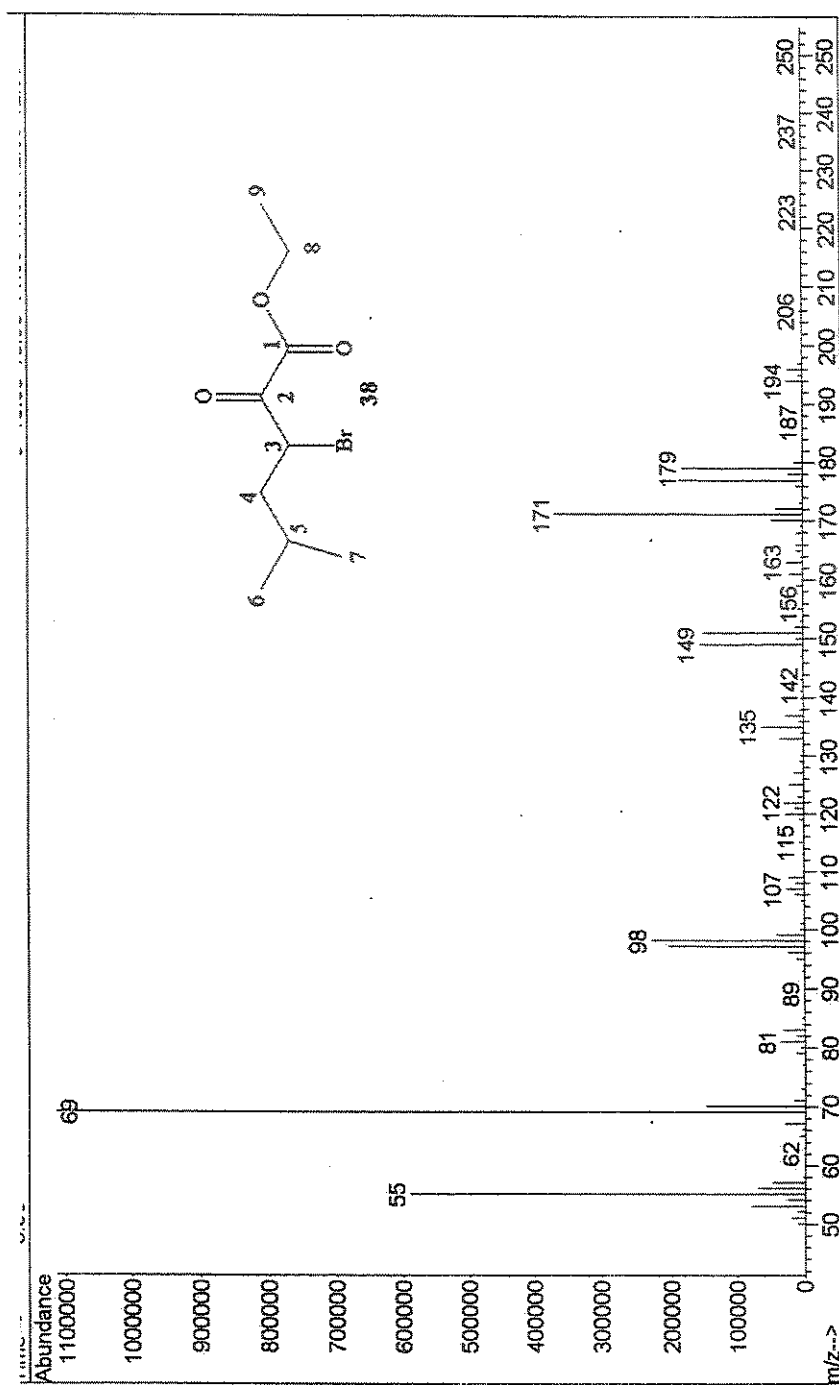
E59. Espectro de RMN de ^1H de 3-bromo-2-oxo-5-metil-hexanoato de etila **38**



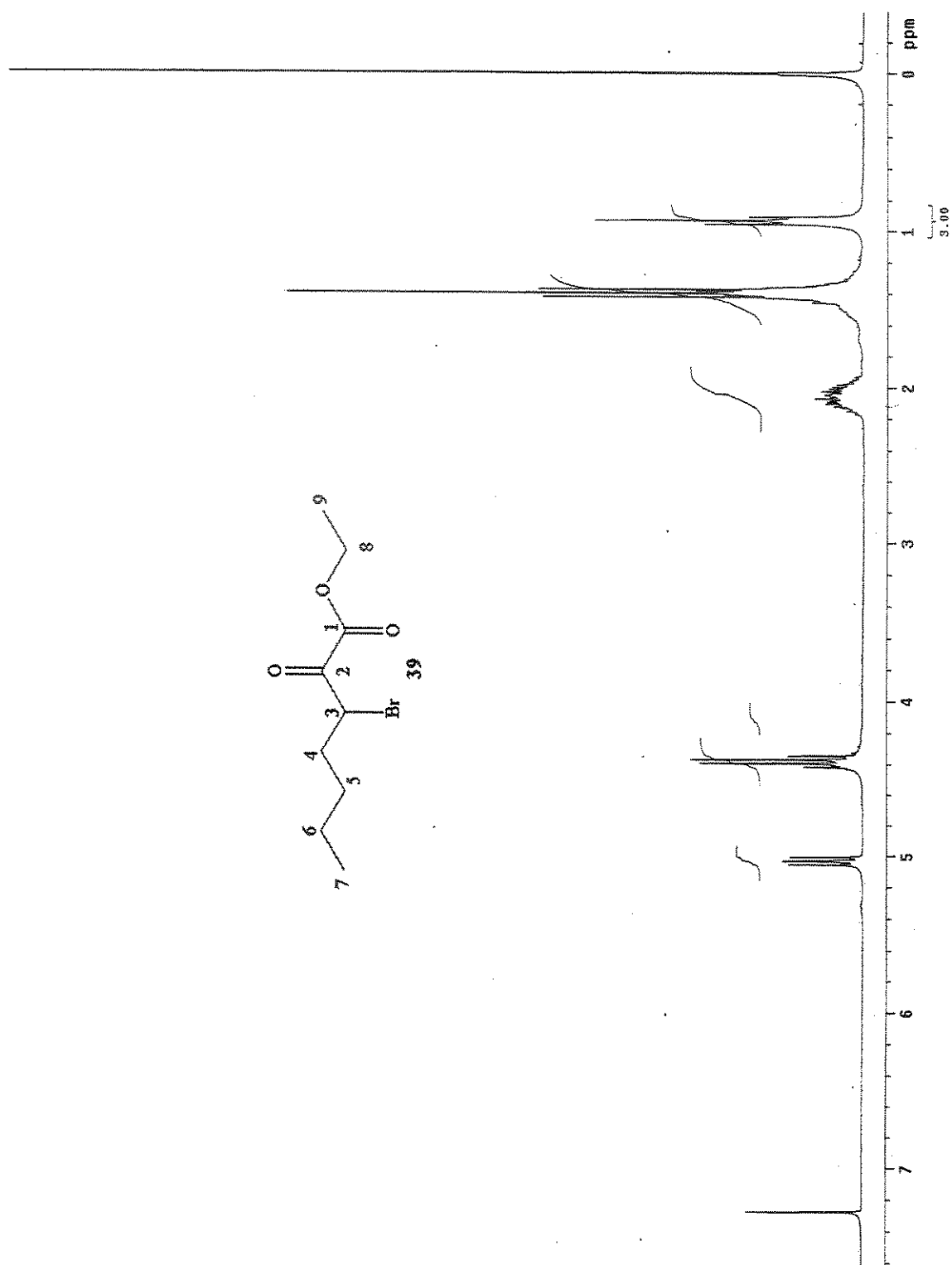
E60. Espectro de RMN de ^{13}C de 3-bromo-2-oxo-5-metil-hexanoato de etila
38



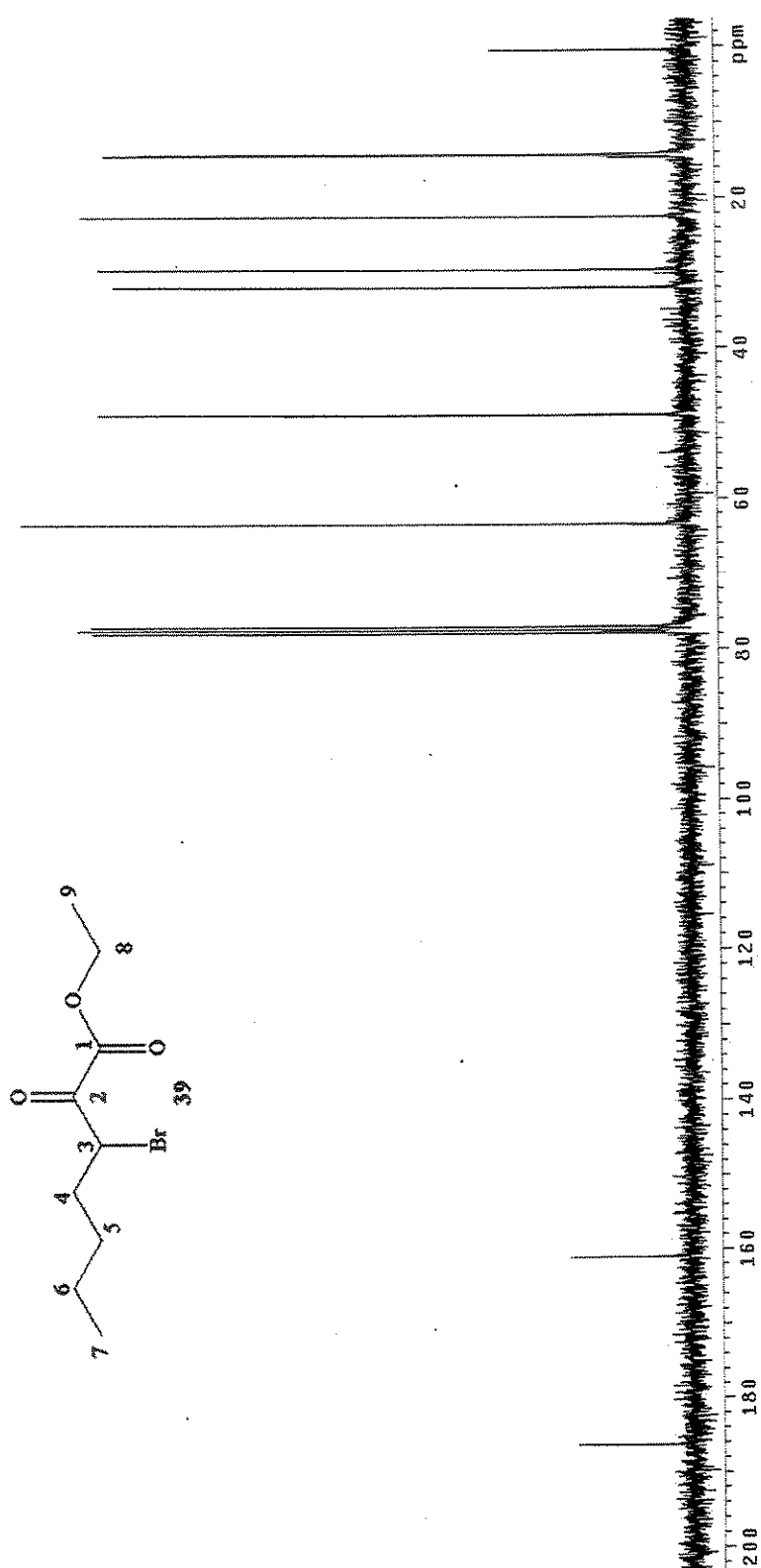
E61. Espectro no IV de 3-bromo-2-oxo-5-metil-hexanoato de etila 38

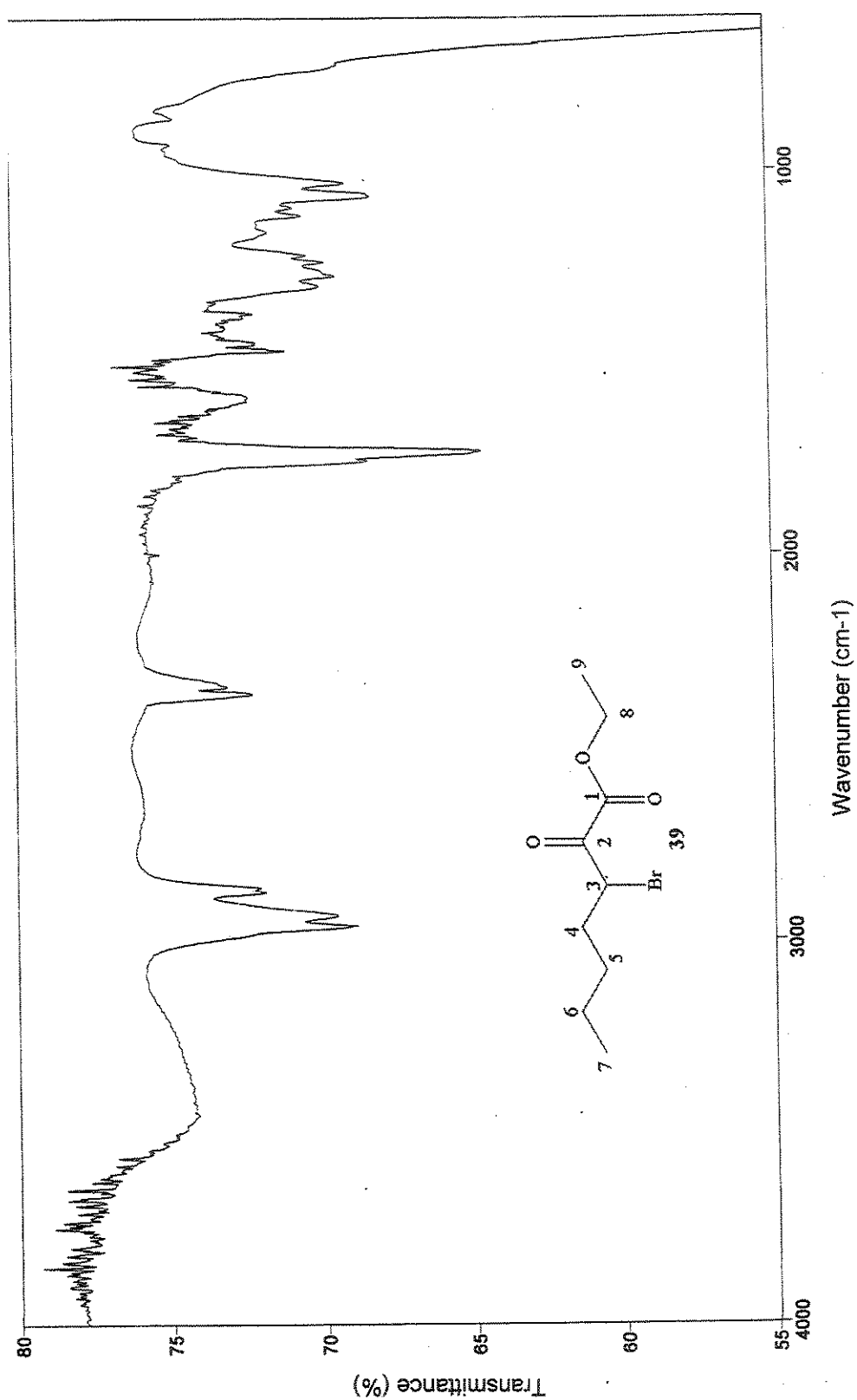


E62. Espectro de massas de 3-bromo-2-oxo-5-metil-hexanoato de etila 38

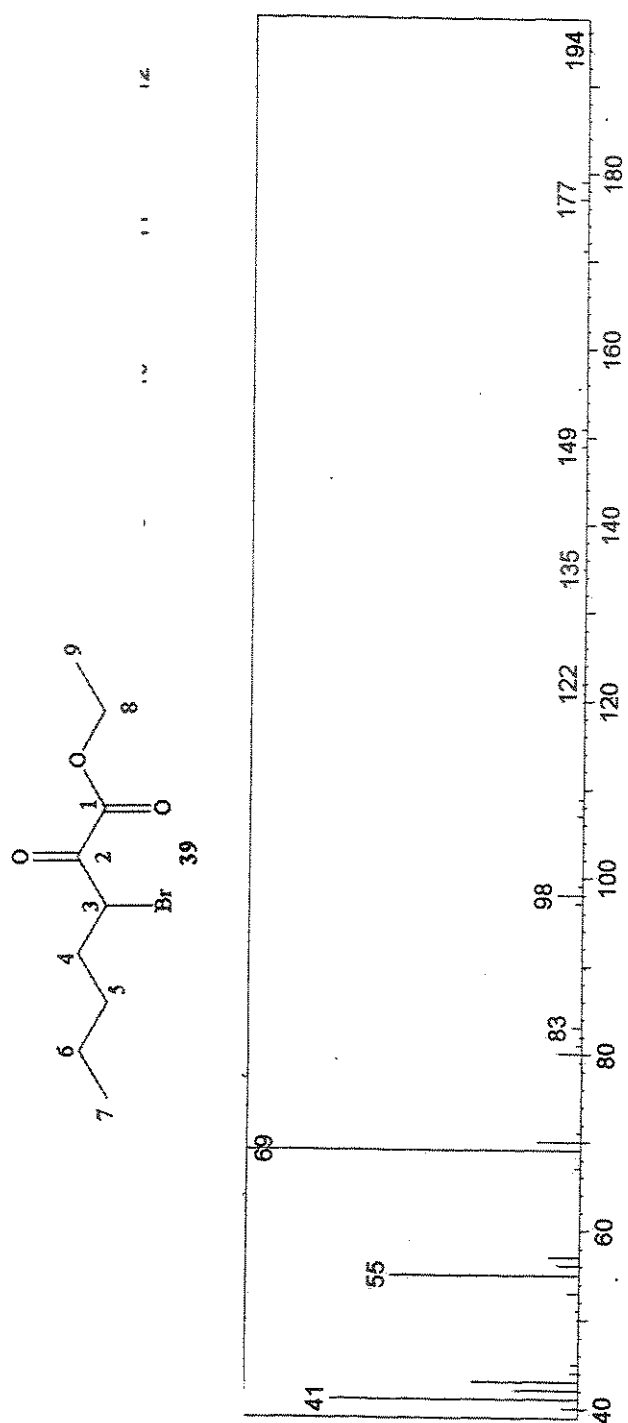


E63. Espectro de RMN de ^1H de 3-bromo-2-oxo-heptanoato de etila **39**

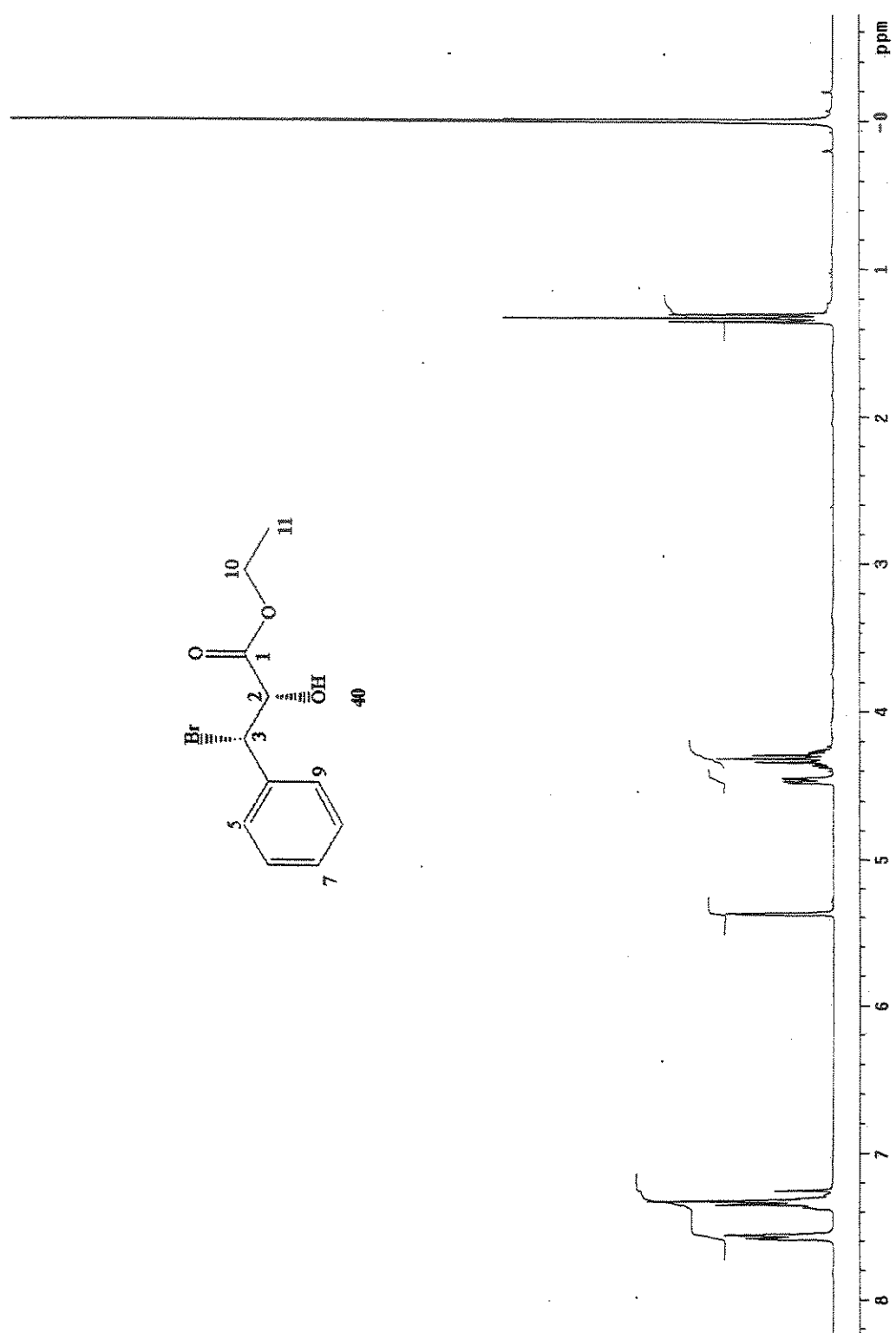
E64. Espectro de RMN de ^{13}C de 3-bromo-2-oxo-heptanoato de etila 39



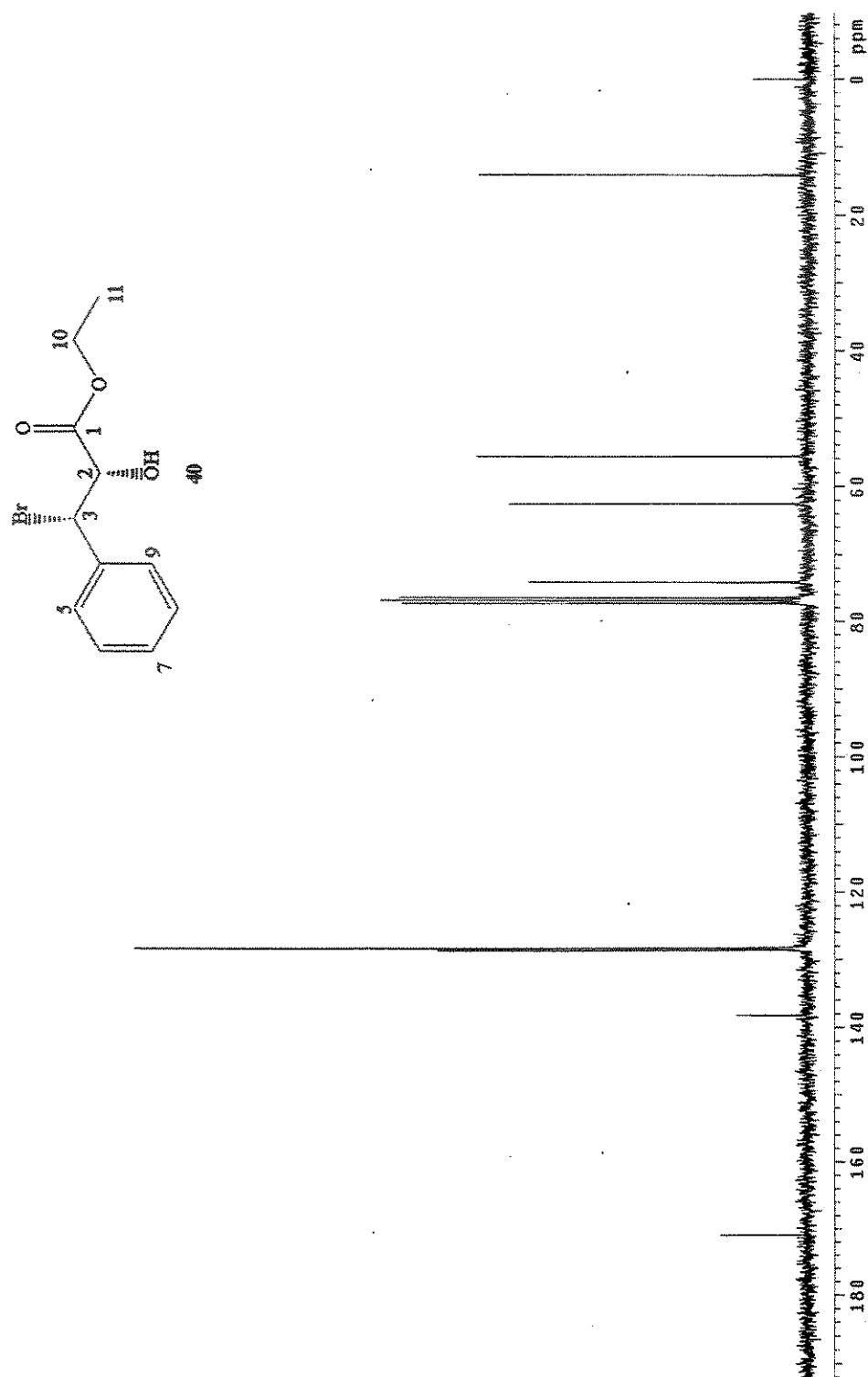
E65. Espectro no IV de 3-bromo-2-oxo-heptanoato de etila 39



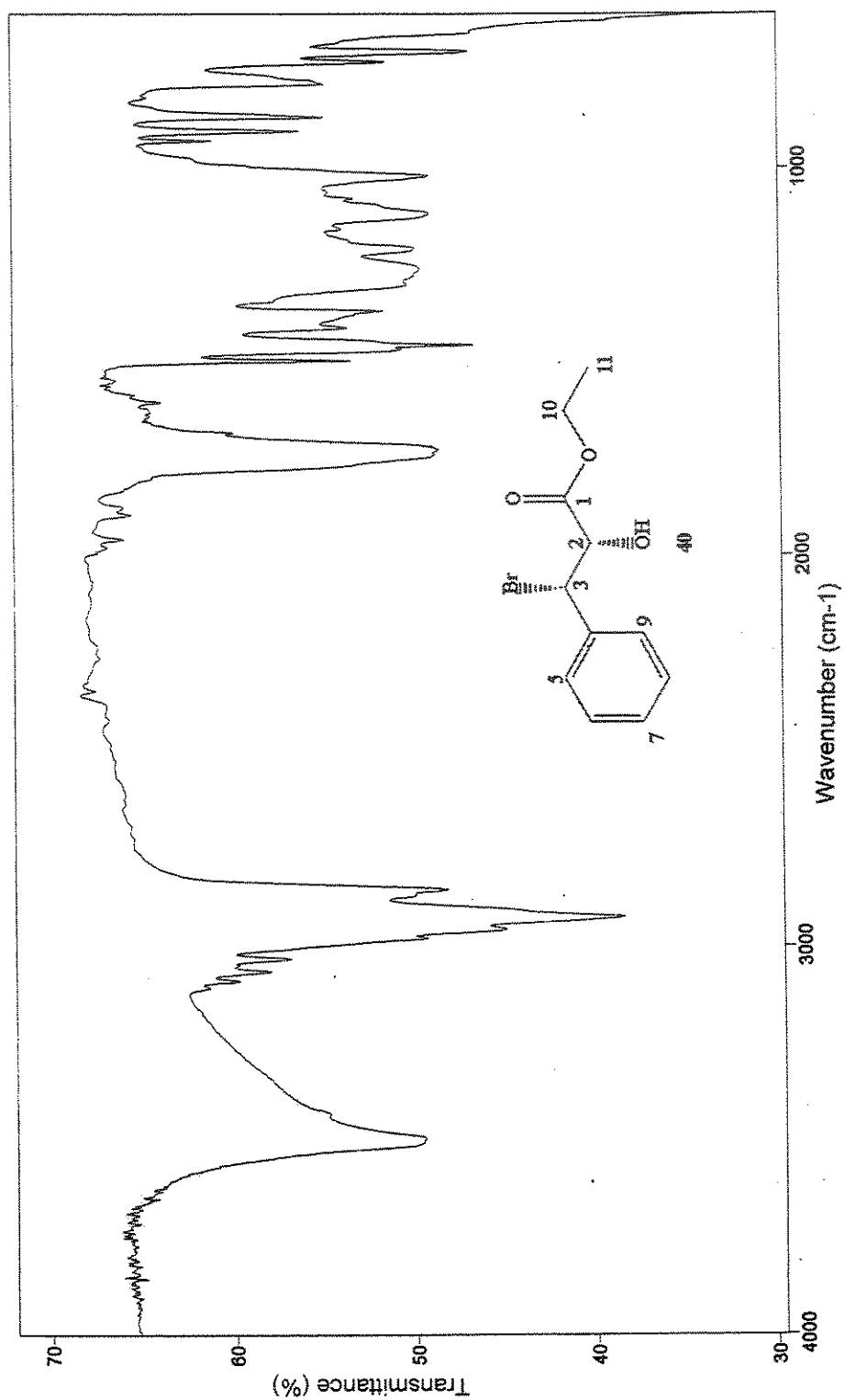
E66. Espectro de massas de 3-bromo-2-oxo-heptanoato de etila 39



E67. Espectro de RMN de ^1H de (2S, 3S)-3-bromo-2-hidroxi-fenilpropanoato de etila 40

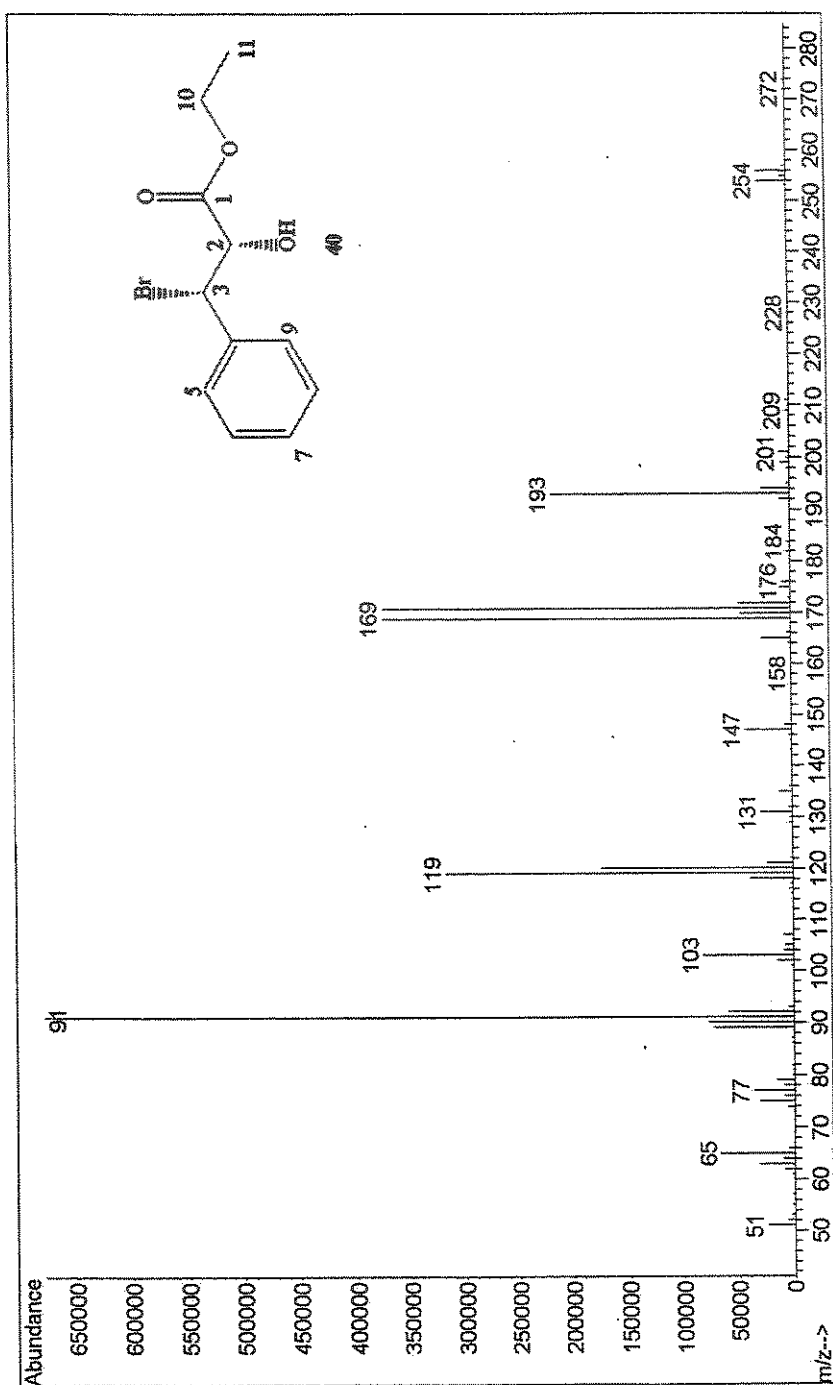


E68. Espectro de RMN de ^{13}C de (2*S*, 3*S*)-3-bromo-2-hidroxi-fenilpropanoato de etila **40**

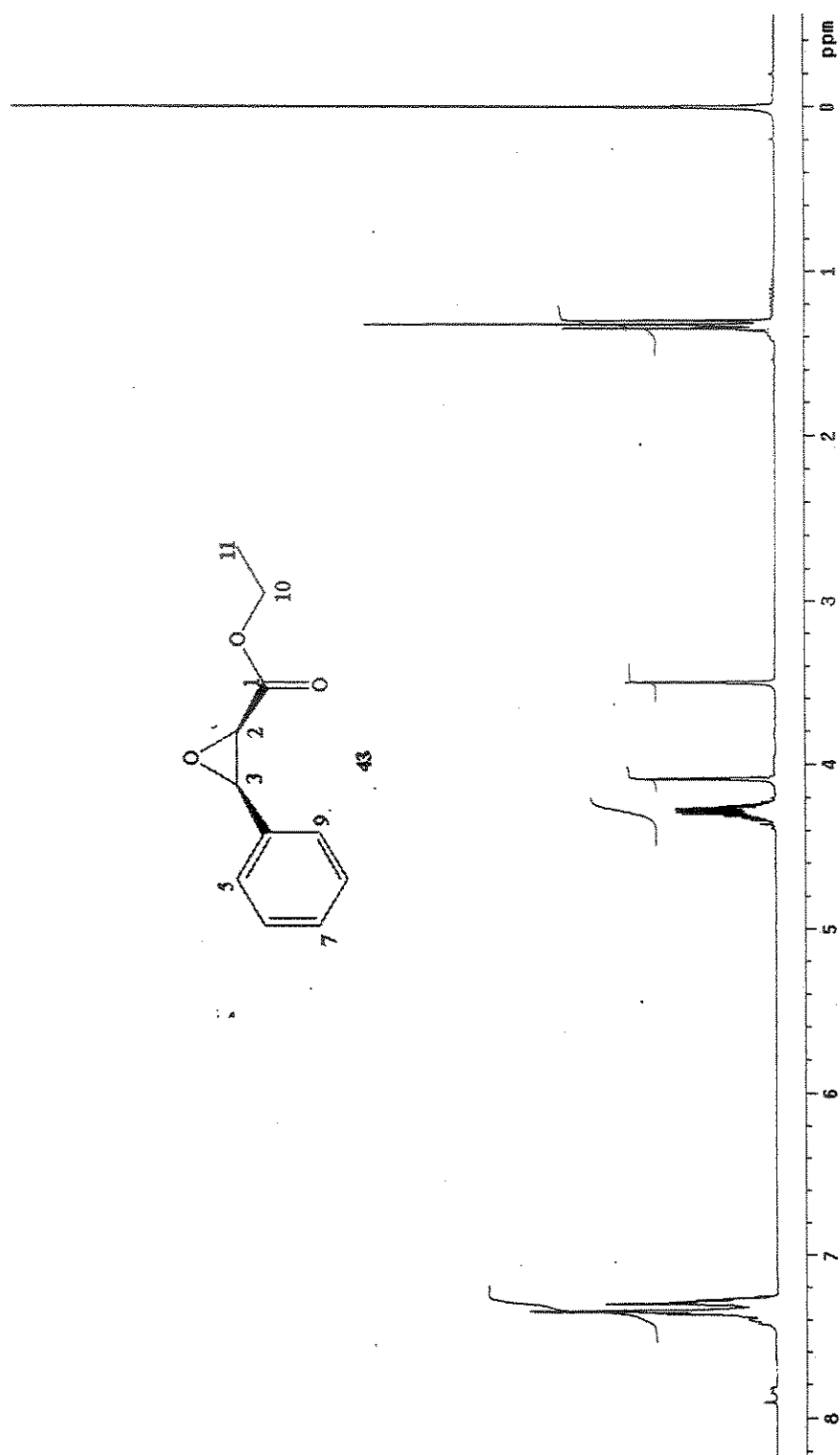


E69. Espectro no IV de (2*S*, 3*S*)-3-bromo-2-hidroxi-fenilpropanoato de etila

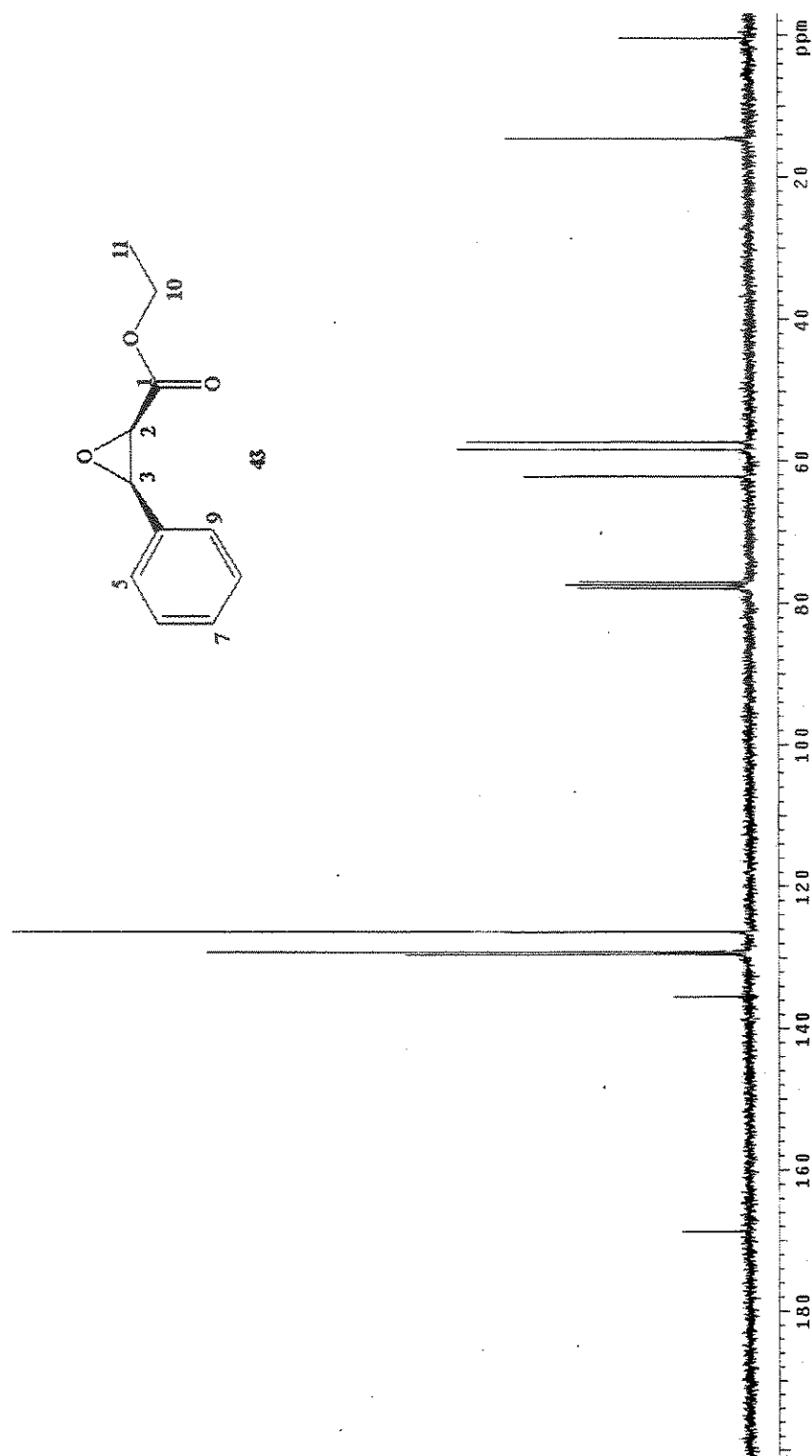
40



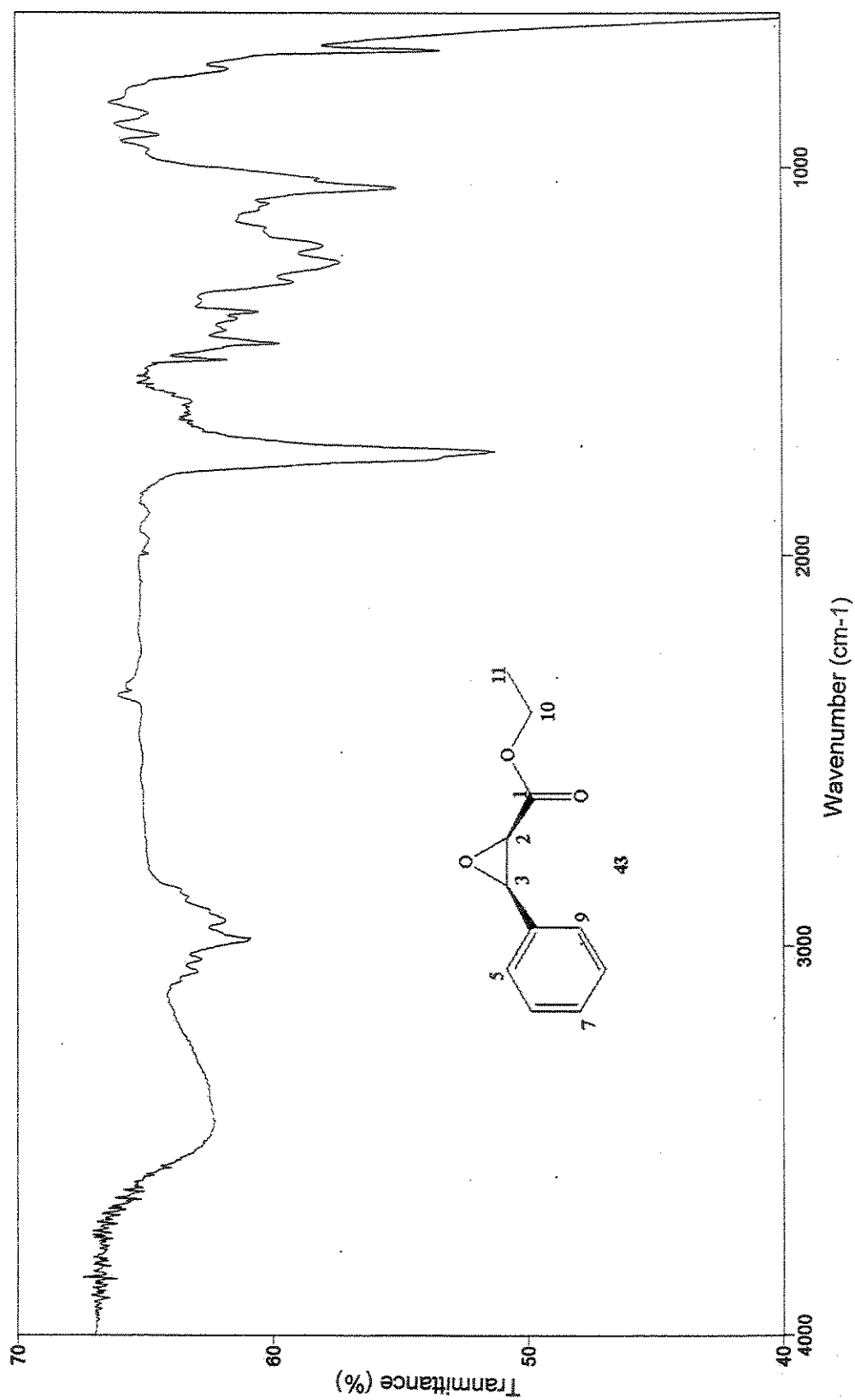
E70. Espectro de massas de (2S, 3S)-3-bromo-2-hidroxi-fenilpropanoato de etila 40

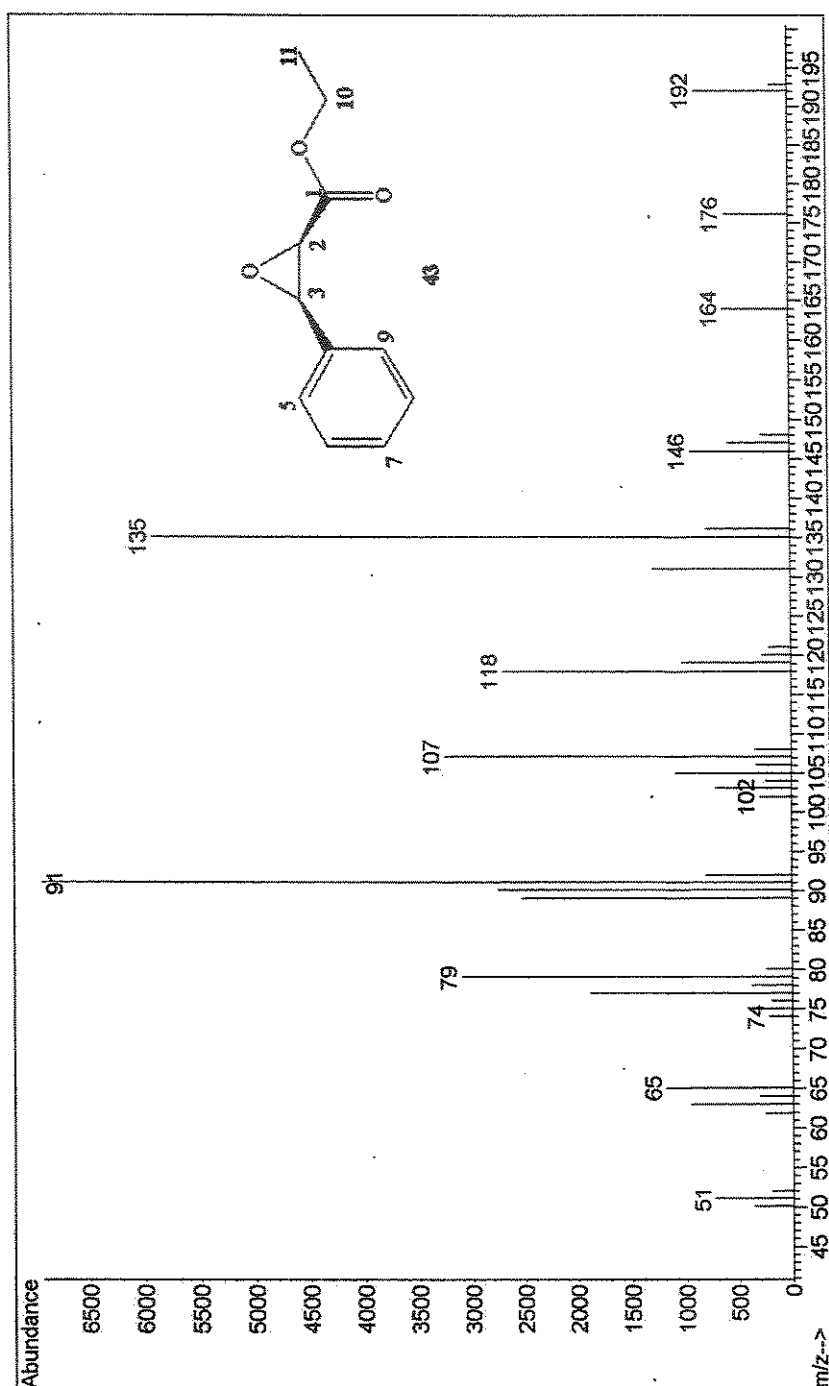


E71. Espectro de RMN de ^1H de (4*R*, 3*R*)-fenil-2,3-oxiranofenilpropanoato de etila 43



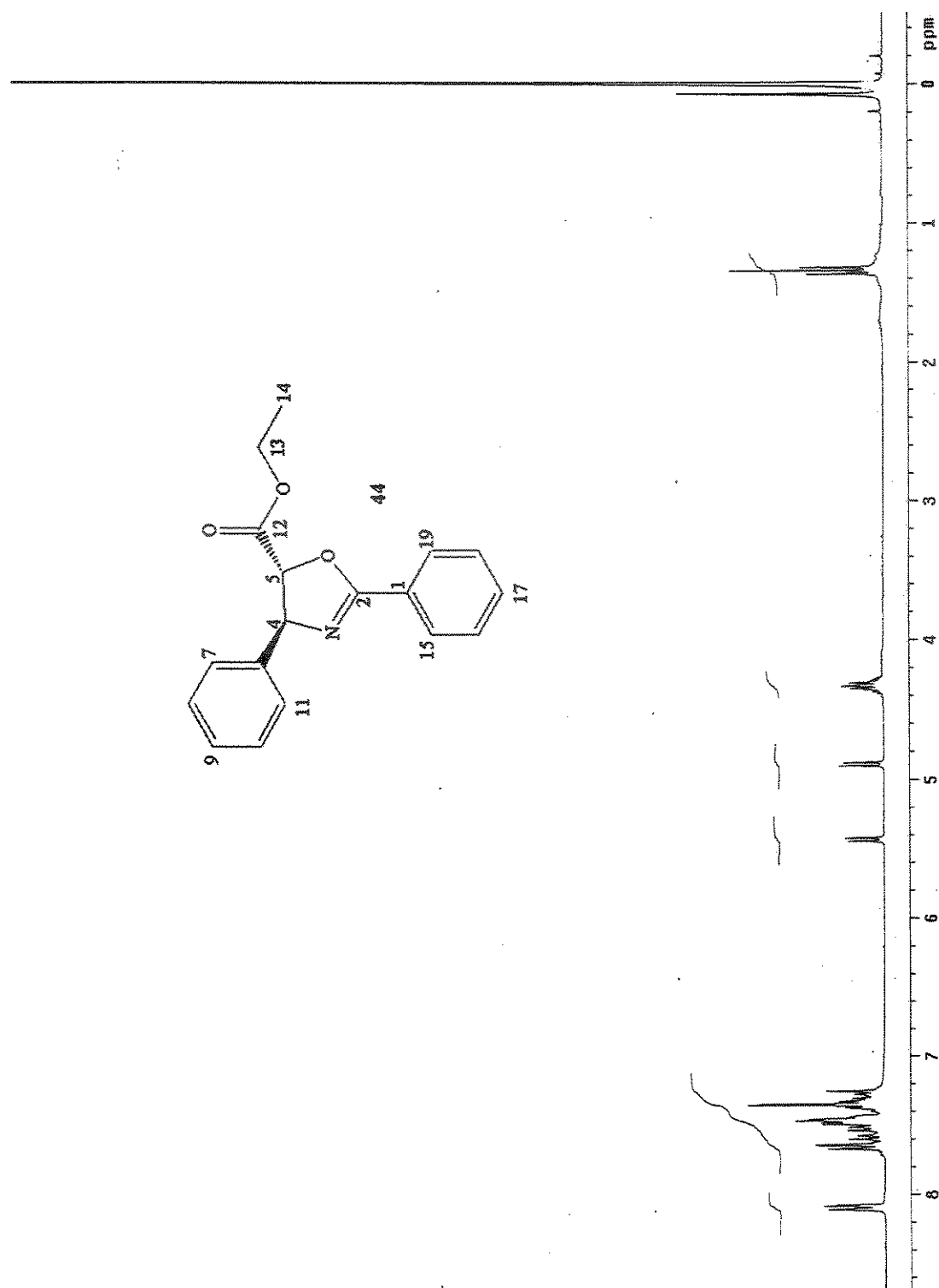
E72. Espectro de RMN de ^{13}C de (4*R*, 3*R*)-fenil-2,3-oxiranofenilpropanoato de etila 43

E73. Espectro no IV de (4*R*, 3*R*)-fenil-2,3-oxiranofenilpropanoato de etila 43



E74. Espectro de massas de (4R, 3R)-fenil-2,3-oxiranofenilpropanoato de etila

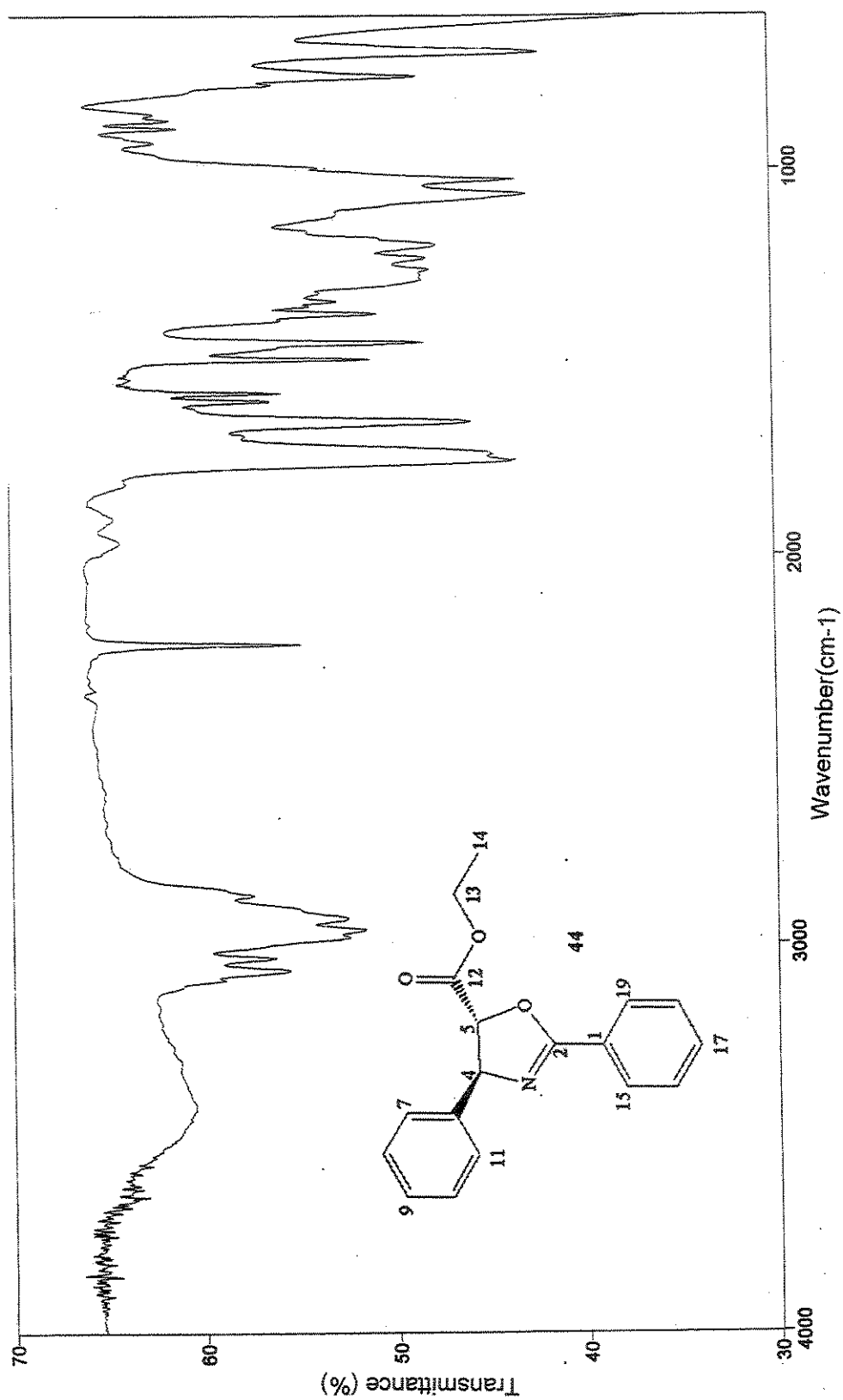
43



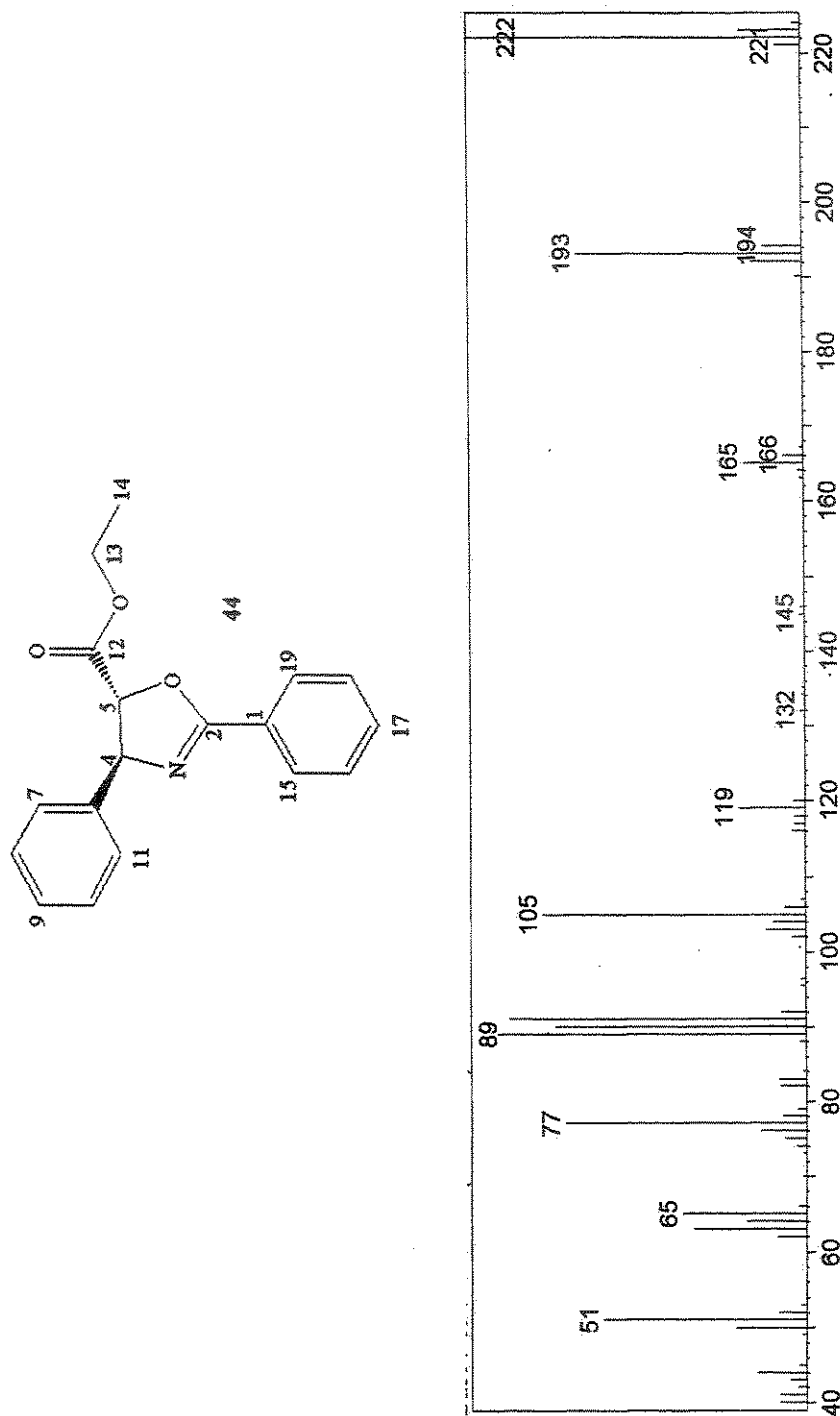
E75. Espectro de RMN de ^1H de 3-fenil-2-metil-2-oxazolina-5-carboxilato de etila 44



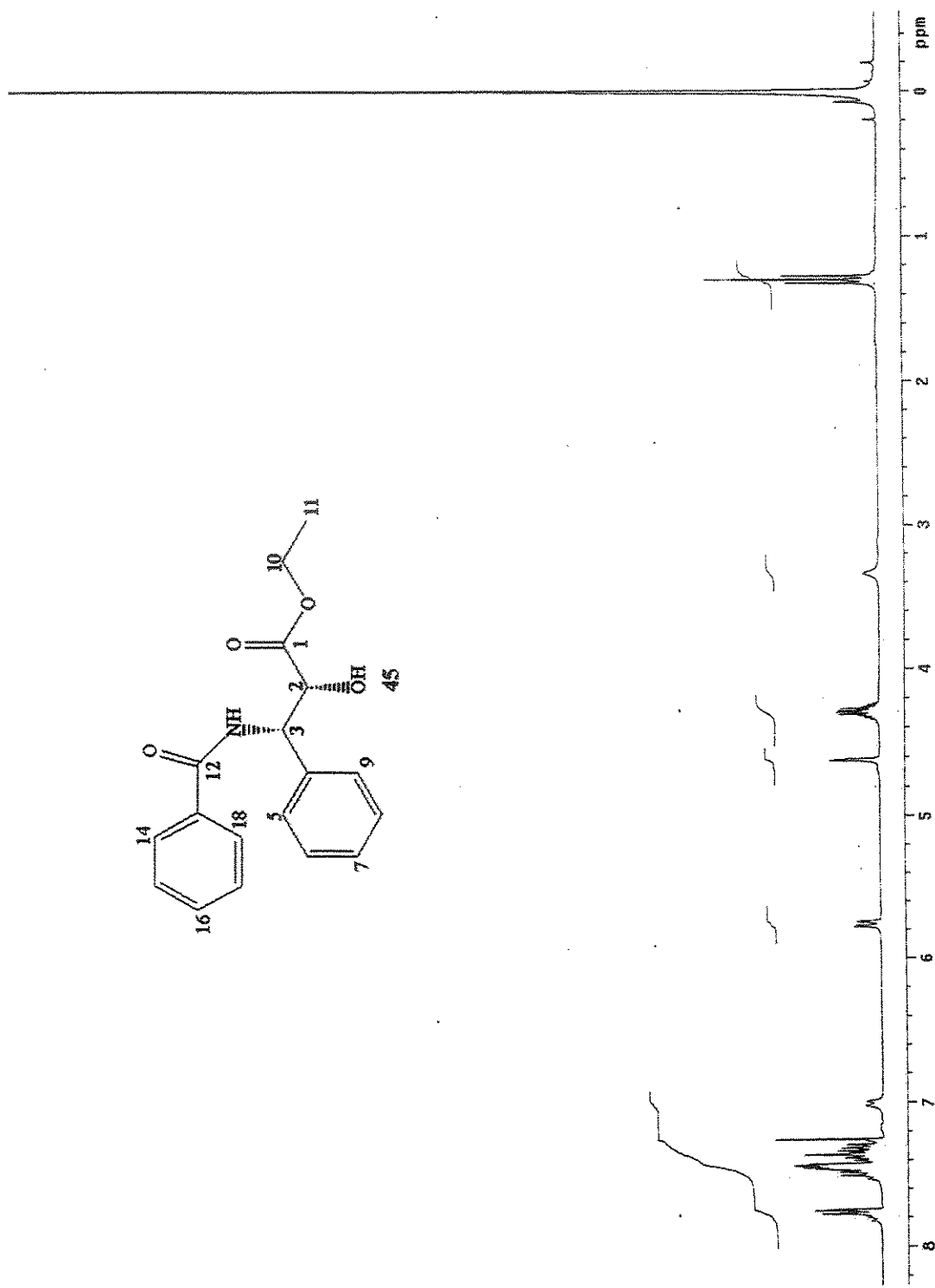
E76. Espectro de RMN de ^{13}C de 3-fenil-2-metil-2-oxazolina-5-carboxilato de etila 44



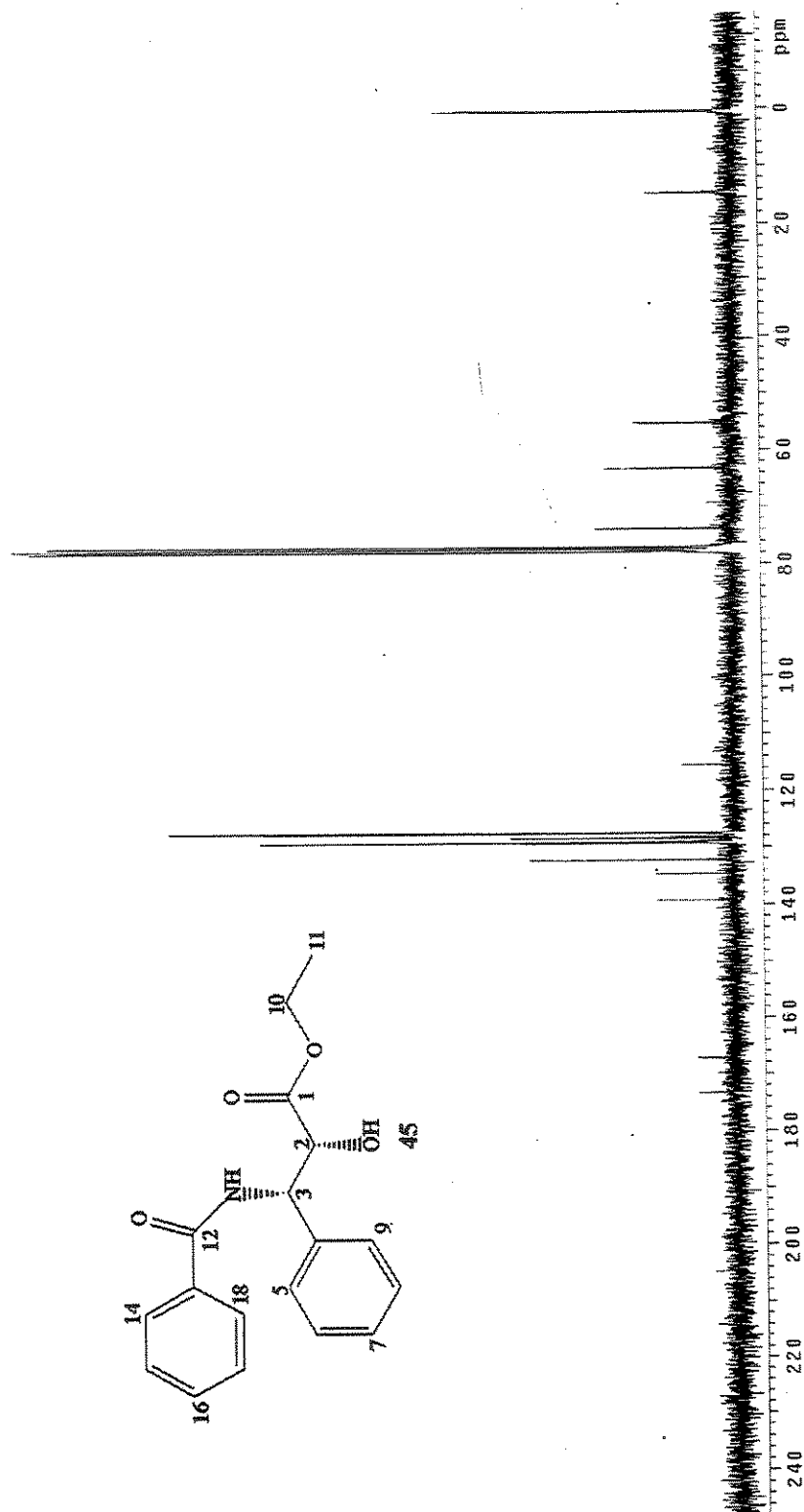
E77. Espectro no IV de 3-fenil-2-metil-2-oxazolina-5-carboxilato de etila 44



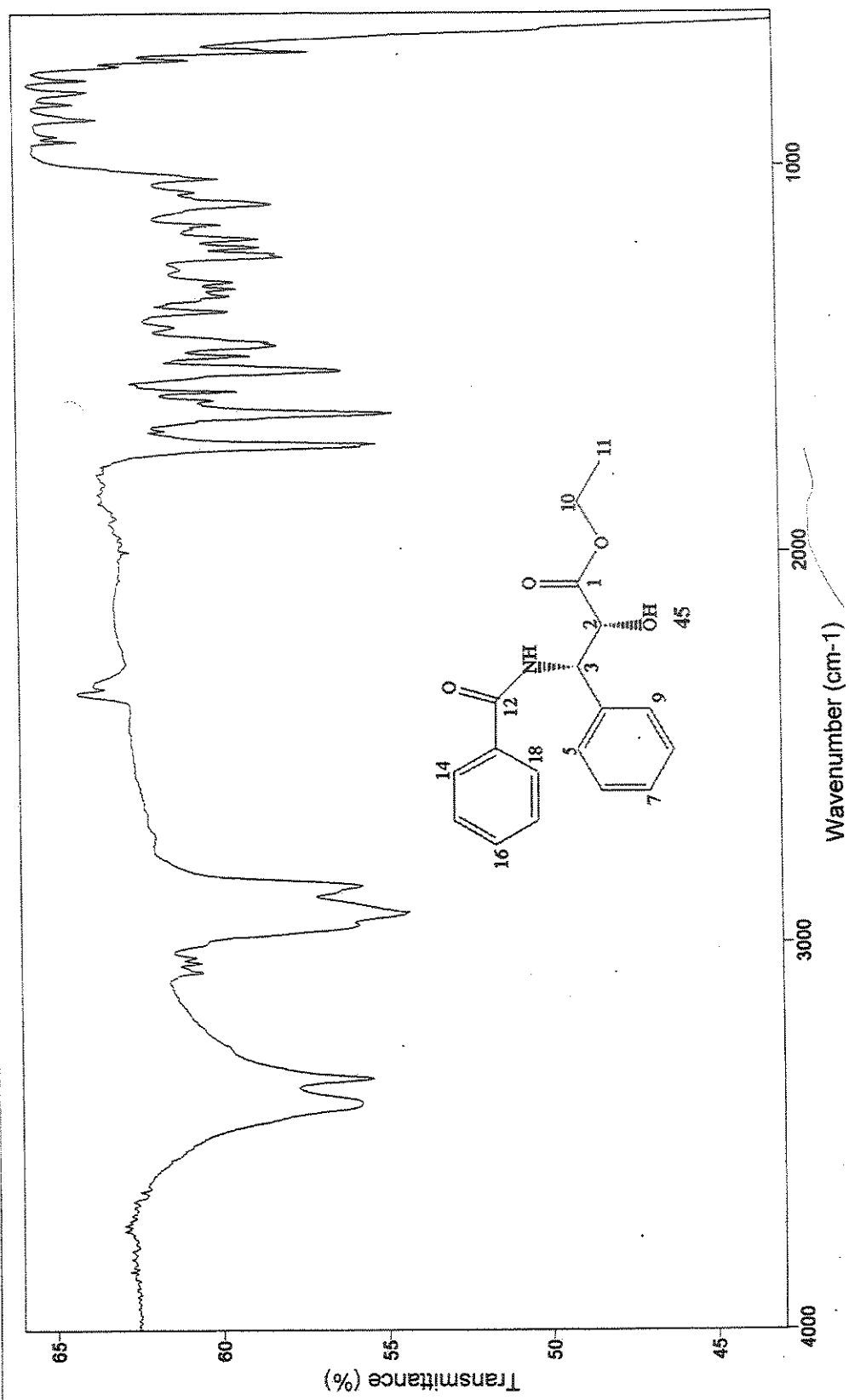
E78. Espectro de massas de 3-fenil-2-metil-2-oxazolina-5-carboxilato de etila
44



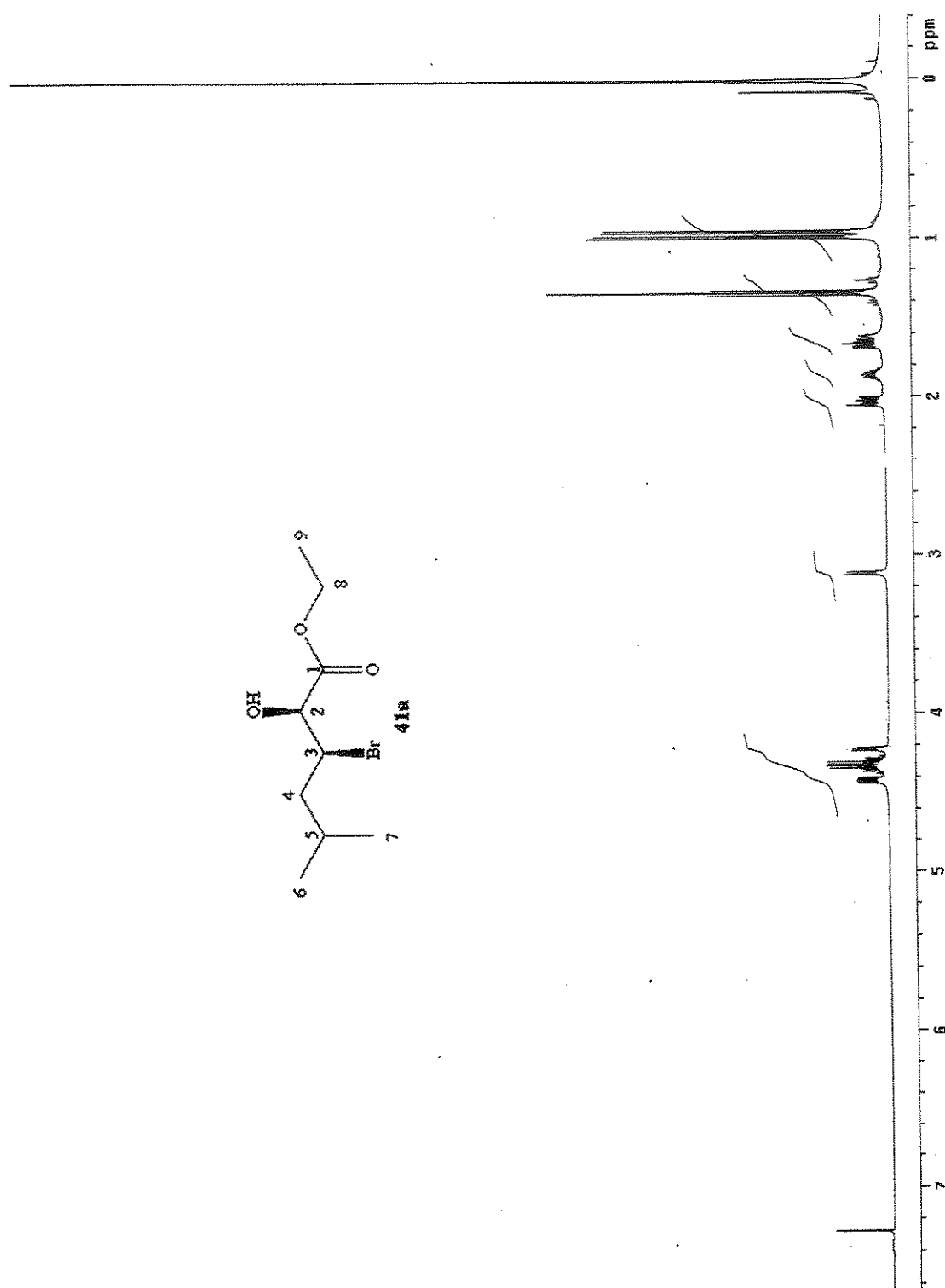
E79. Espectro de RMN de ^1H de 4-fenil-2-hidroxi-3-acetilamino-butirato de etila **45**



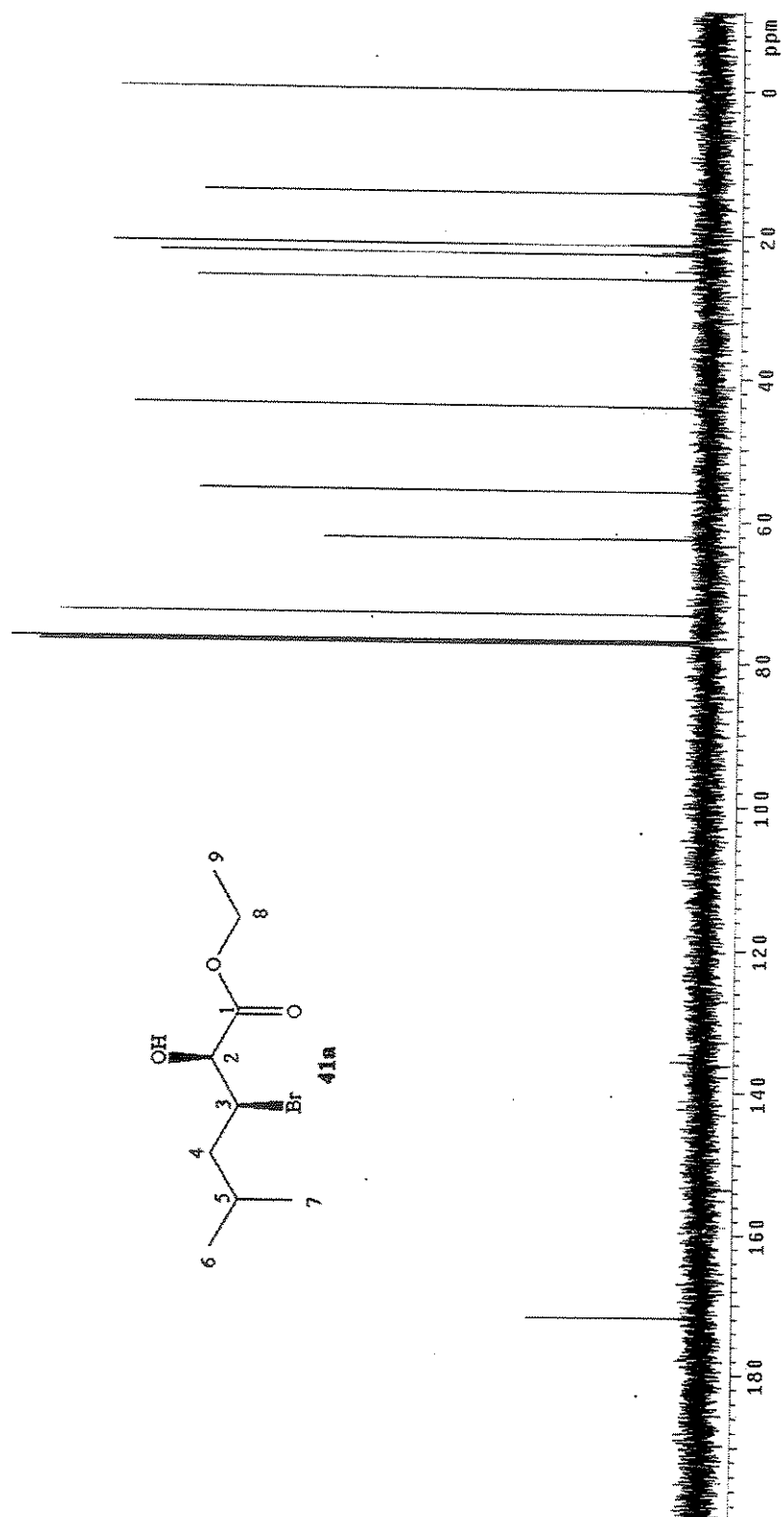
E80. Espectro de RMN de ^{13}C de 4-fenil-2-hidroxi-3-acetilamino-butirato de etila 45



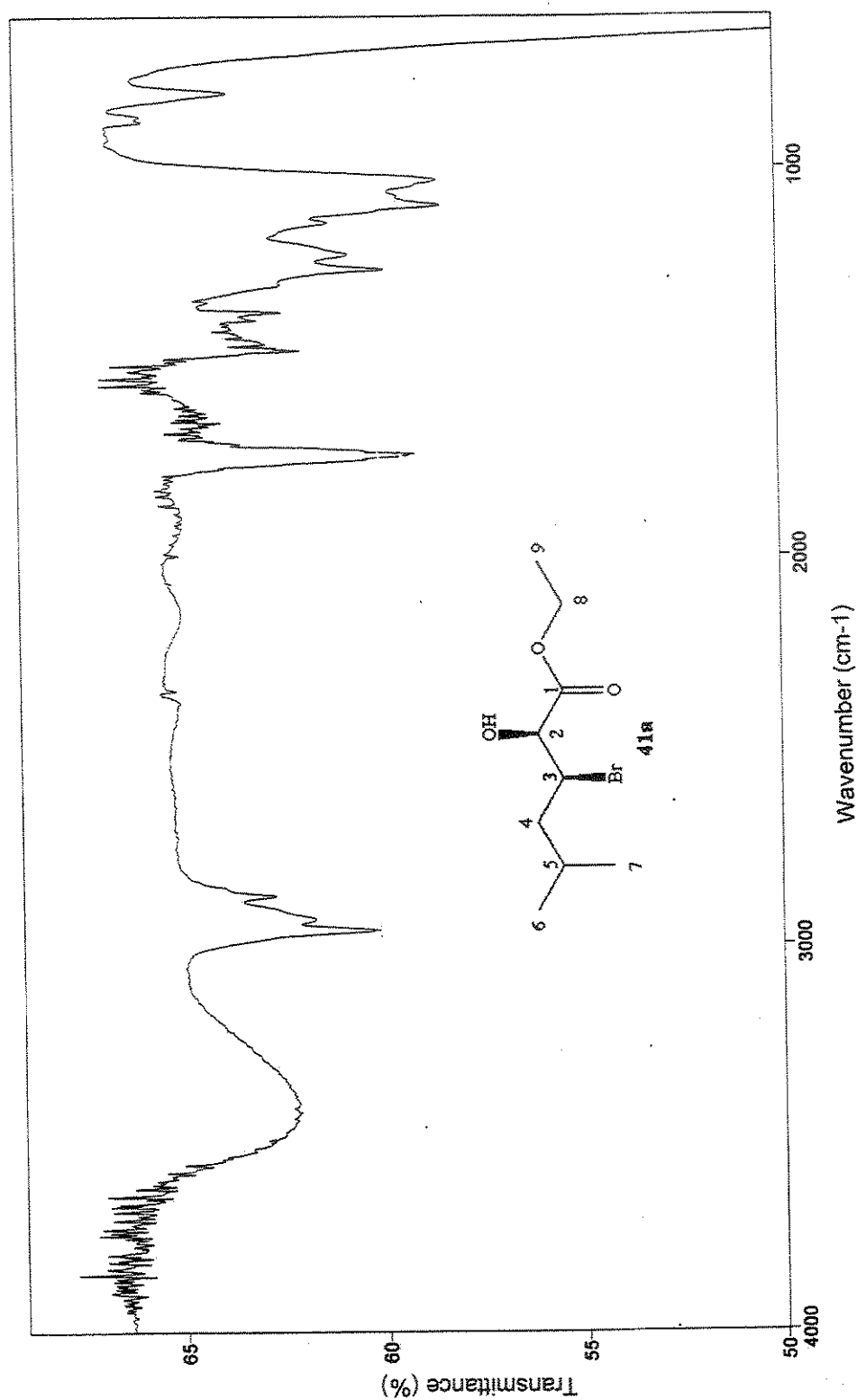
E81. Espectro no IV de 4-fenil-2-hidroxi-3-acetilamino-butirato de etila 45



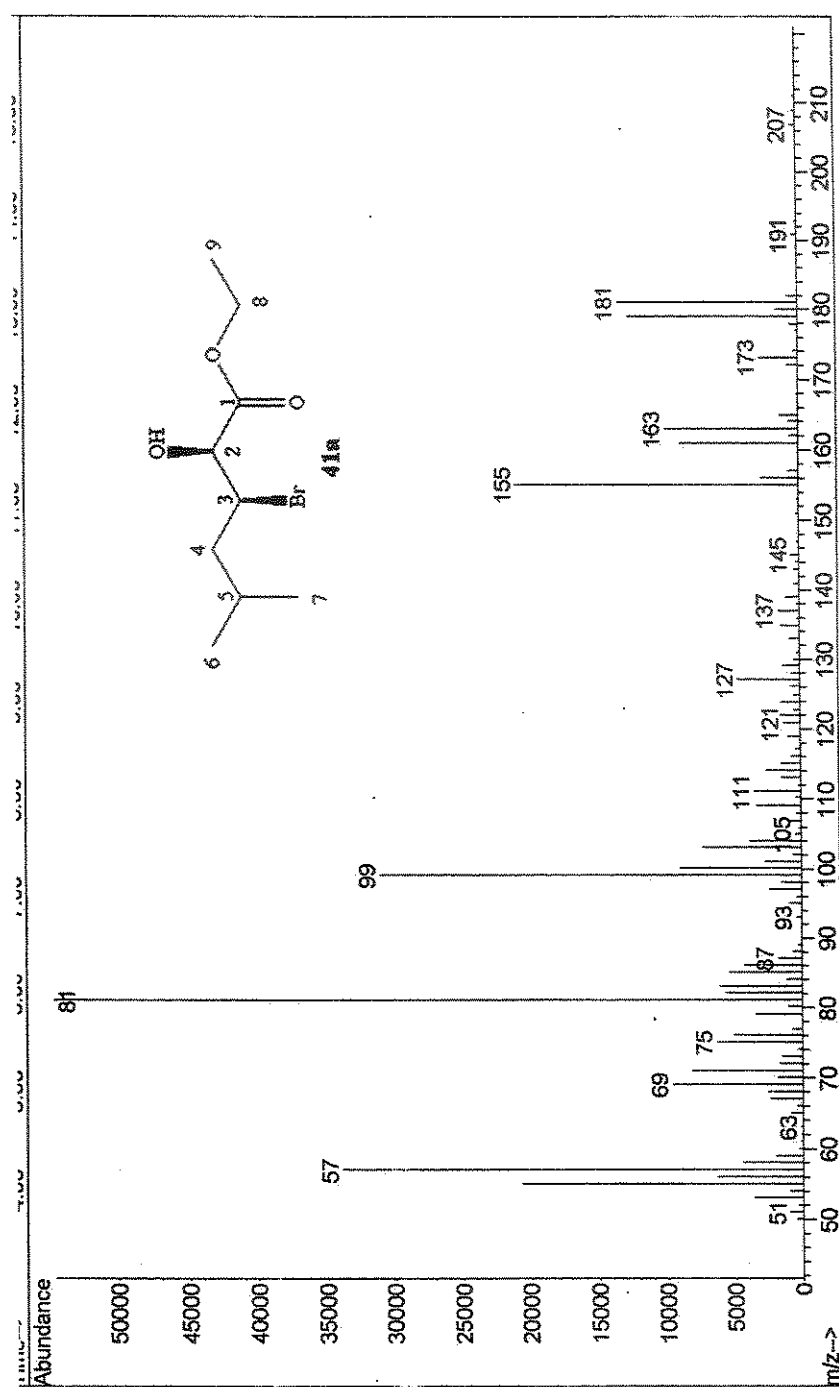
E82. Espectro de RMN de ^1H de (2*S*, 3*S*)-3-bromo-2-hidroxi-5-metilhexanoato de etila **41a**



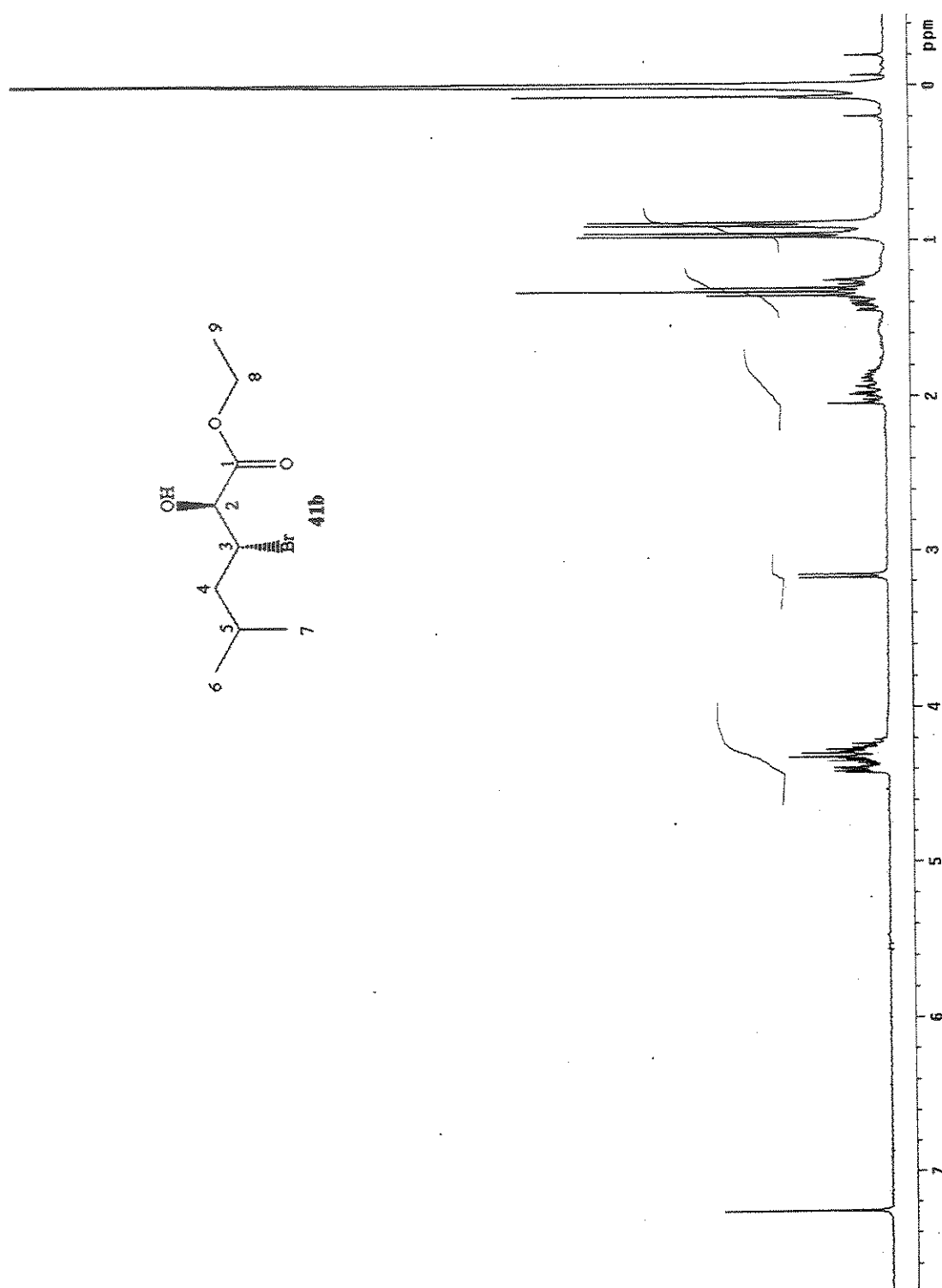
E83. Espectro de RMN de ^{13}C de (2*S*, 3*S*)-3-bromo-2-hidroxi-5-metil-hexanoato de etila **41a**



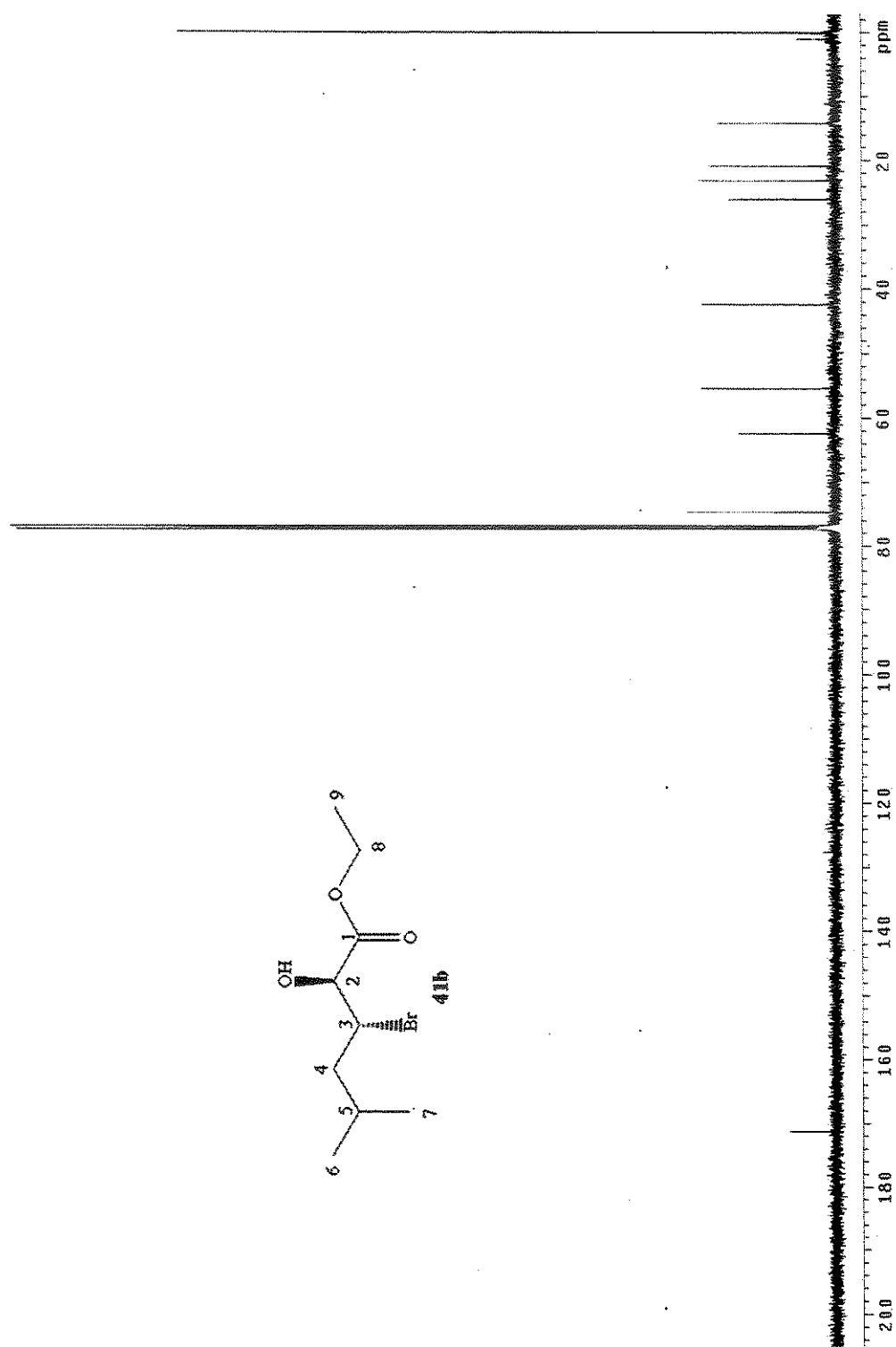
E84. Espectro no IV de (2*S*, 3*S*)-3-bromo-2-hidroxi-5-metil-hexanoato de etila
41a



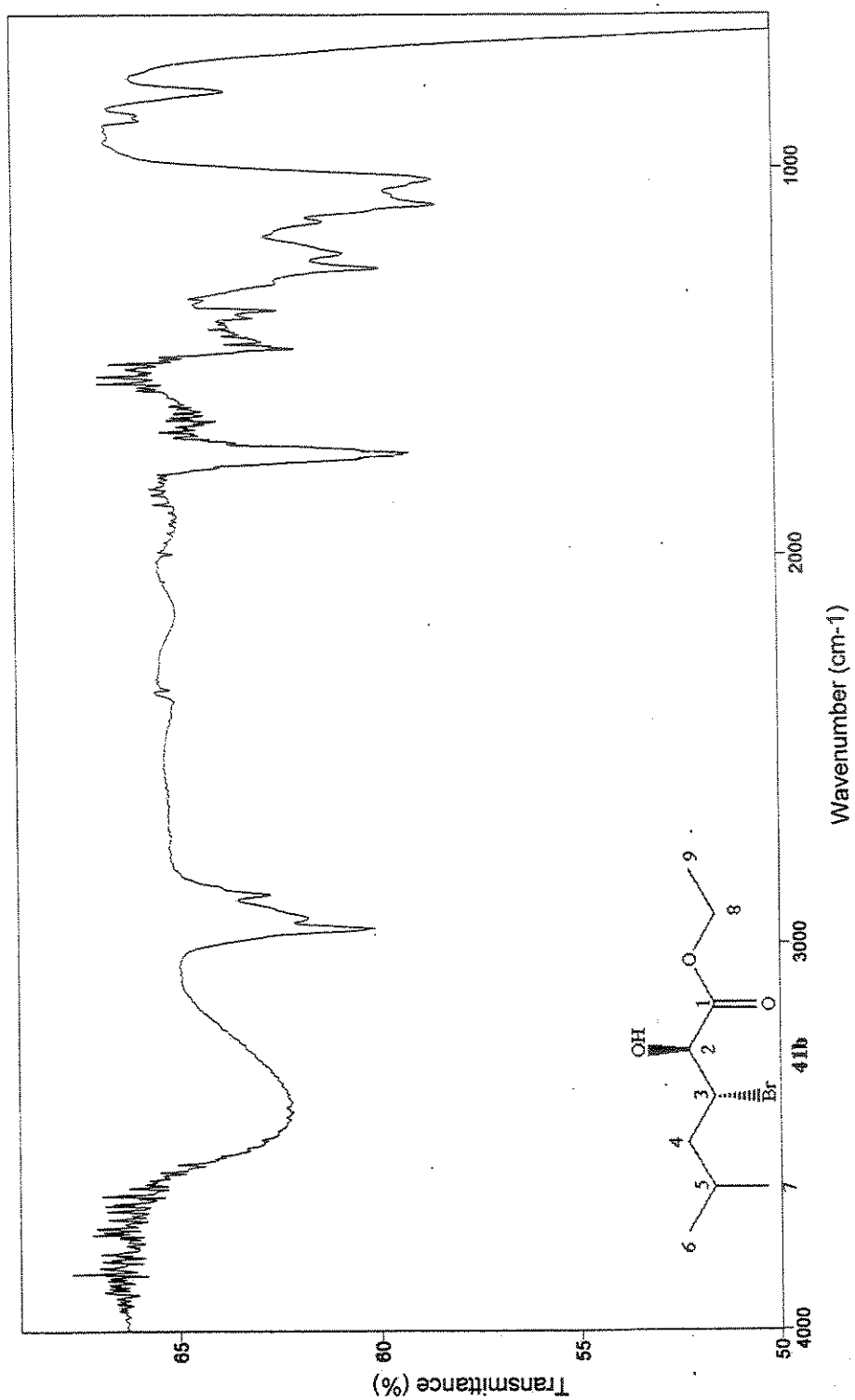
E85. Espectro de massas de (2*S*, 3*S*)-3-bromo-2-hidroxi-5-metil-hexanoato de etila **41a**



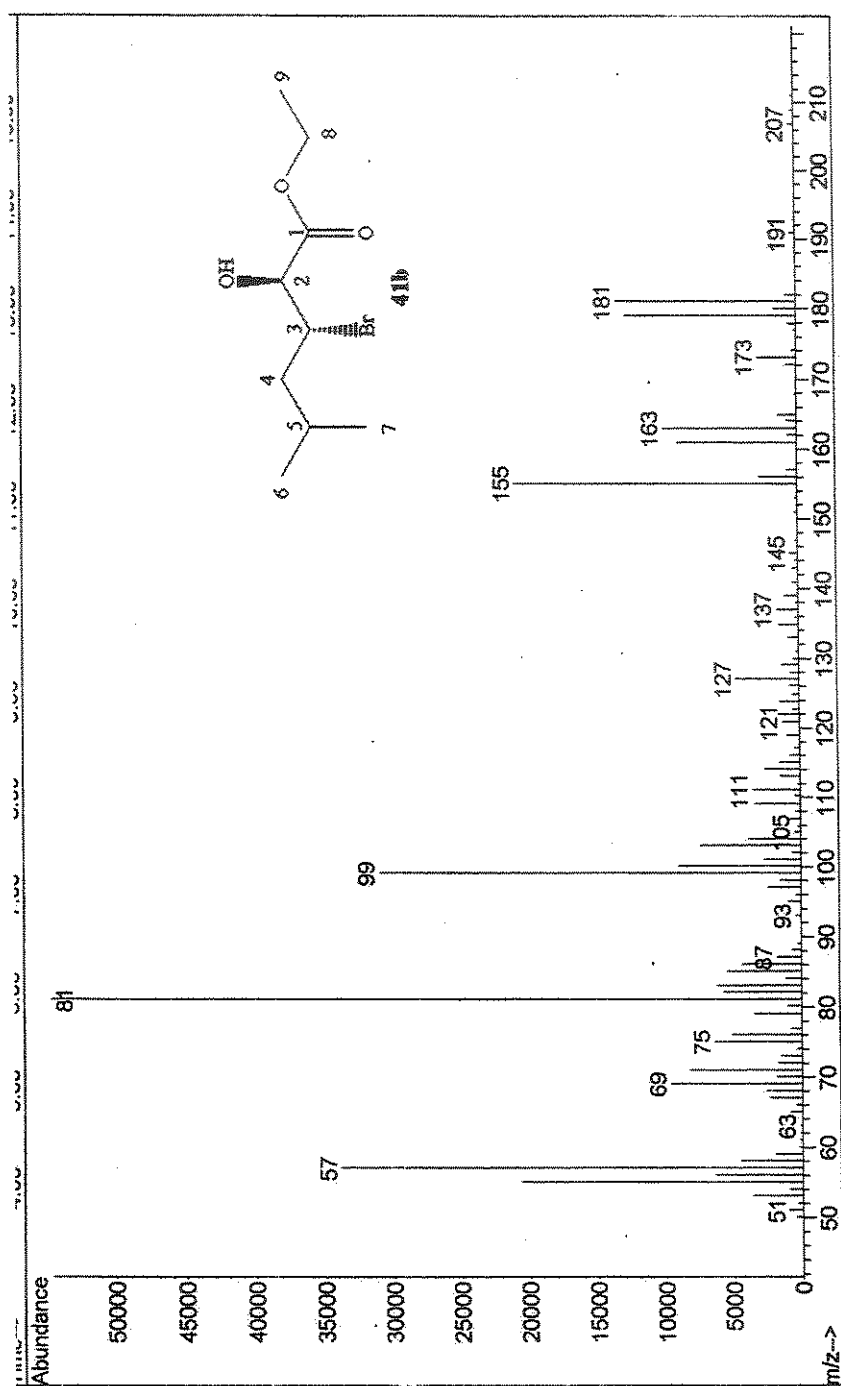
E86. Espectro de RMN de ^1H de (2*S*, 3*R*)-3-bromo-2-hidroxi-5-metilhexanoato de etila **41b**



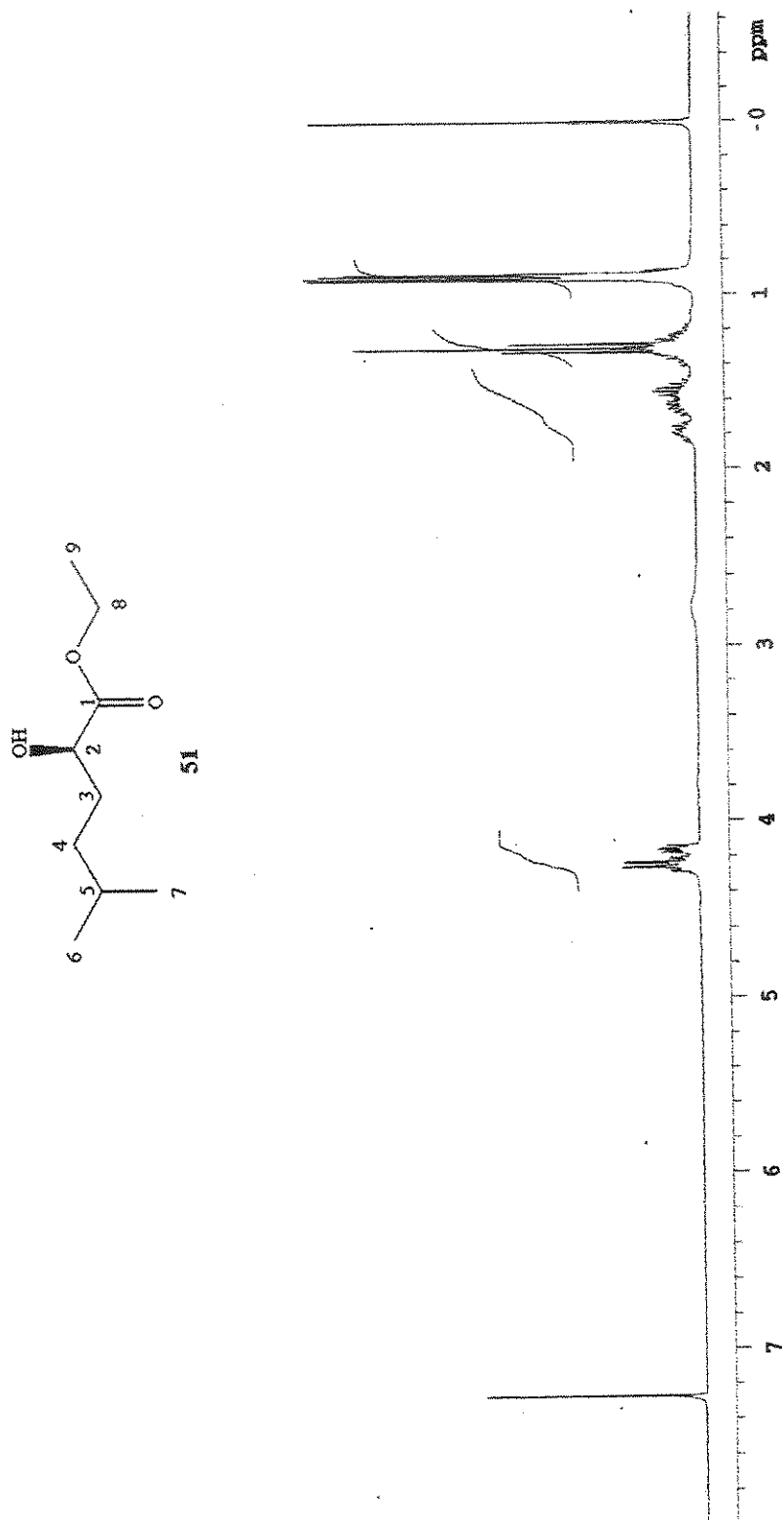
E87. Espectro de RMN de ^{13}C de (2*S*, 3*R*)-3-bromo-2-hidroxi-5-metil-hexanoato de etila **41b**

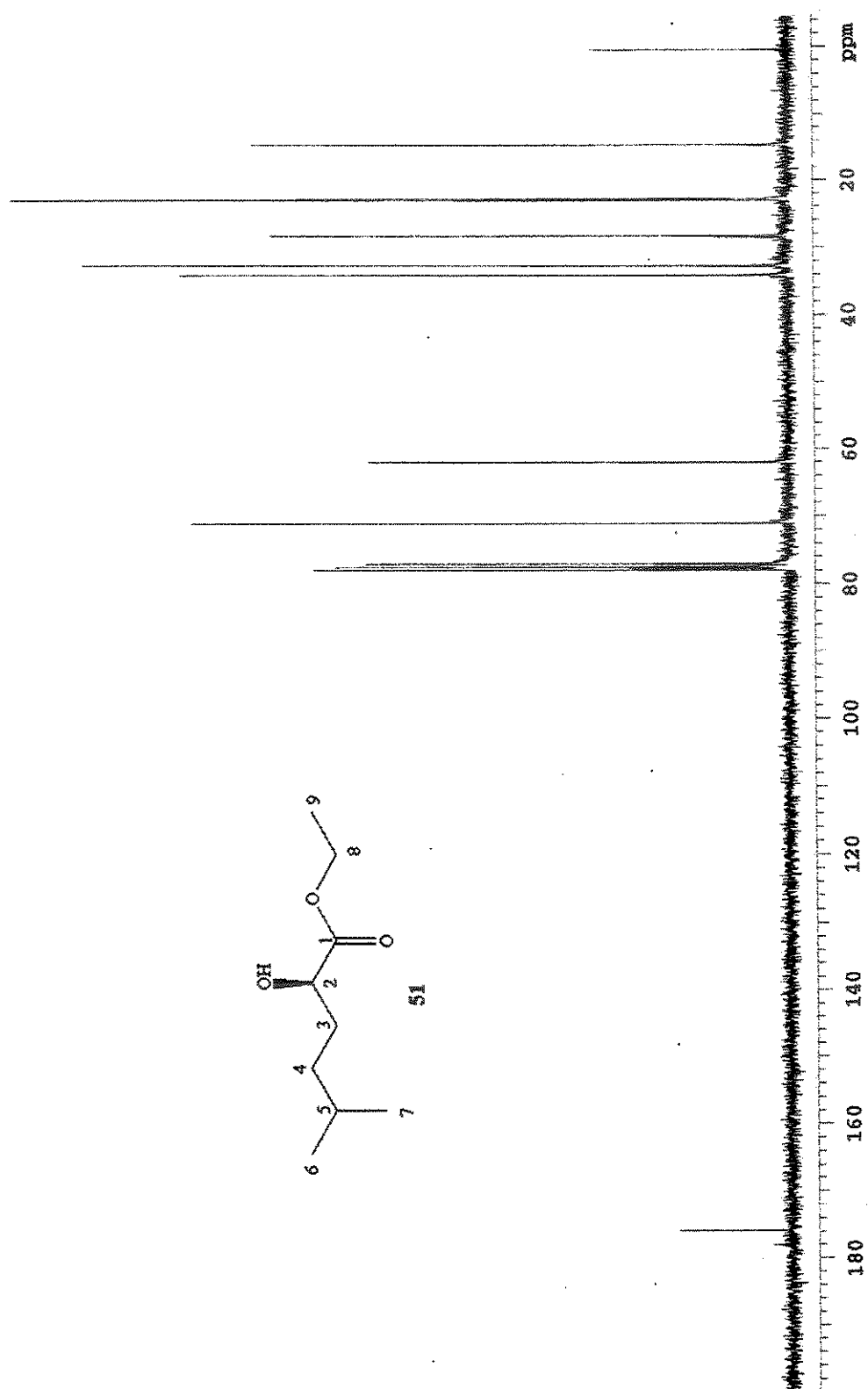


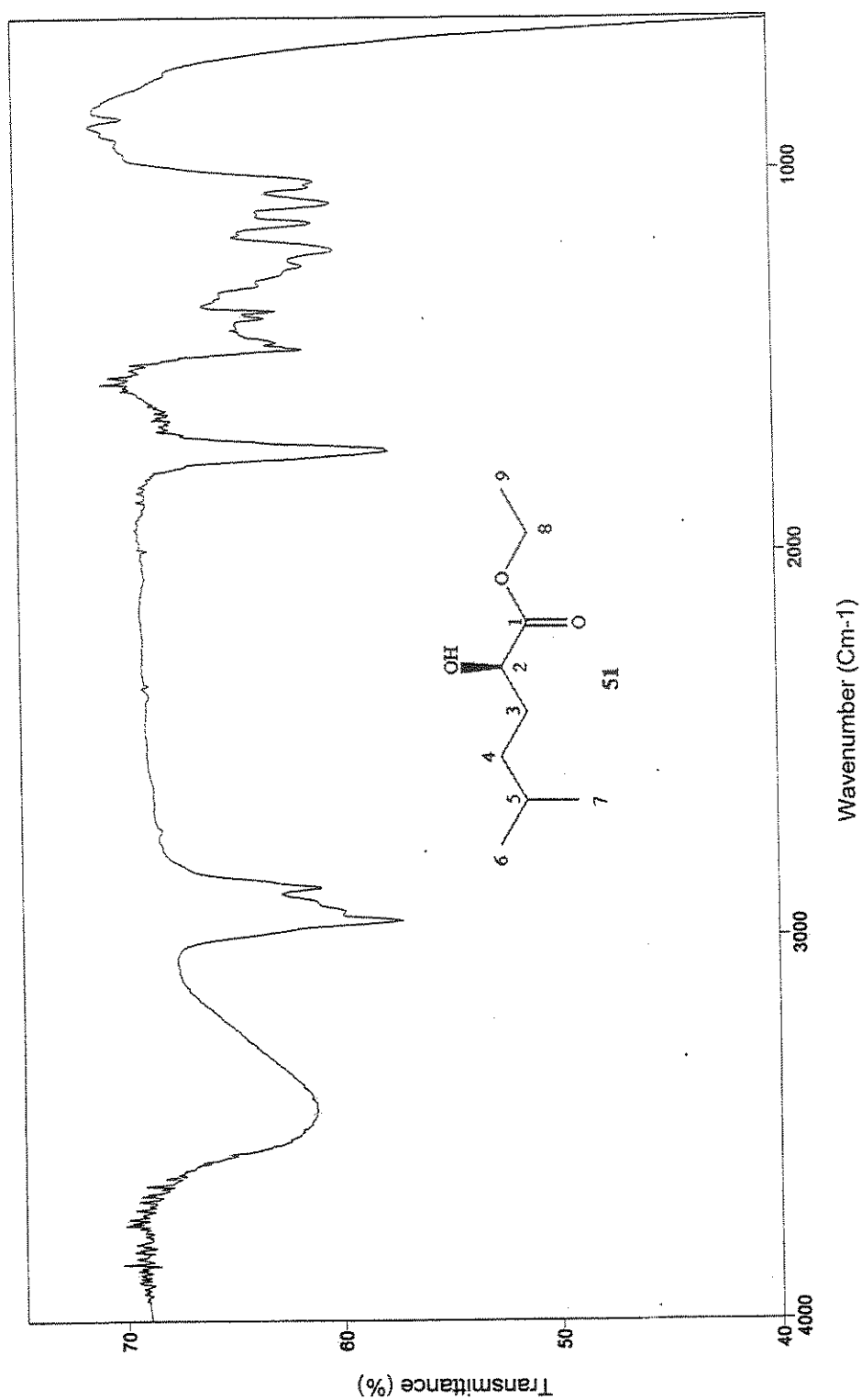
E88. Espectro no IV de (2*S*, 3*R*)-3-bromo-2-hidroxi-5-metil-hexanoato de etila
41b

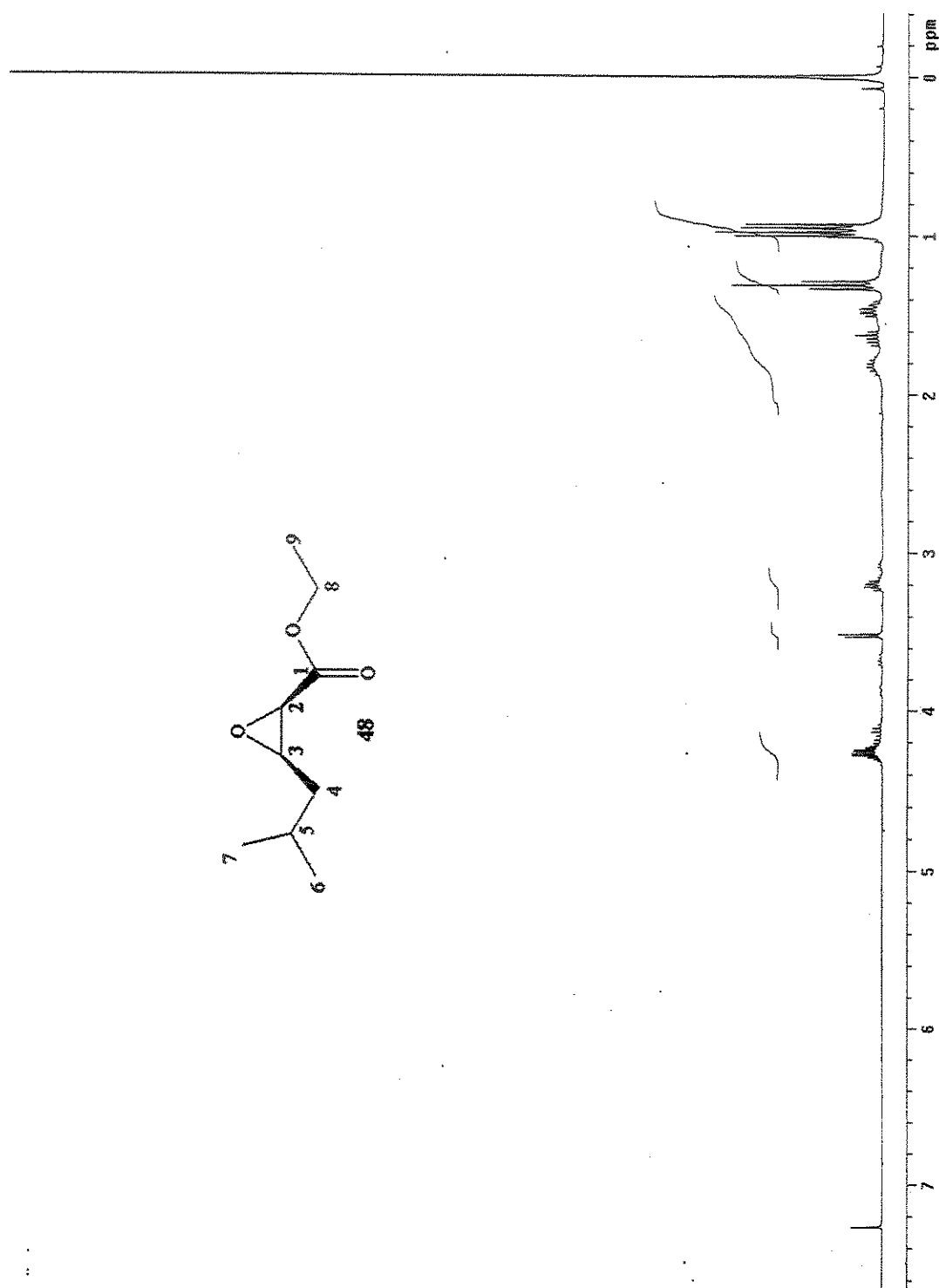


E89. Espectro de massas de (2S, 3R)-3-bromo-2-hidroxi-5-metil-hexanoato de etila **41b**

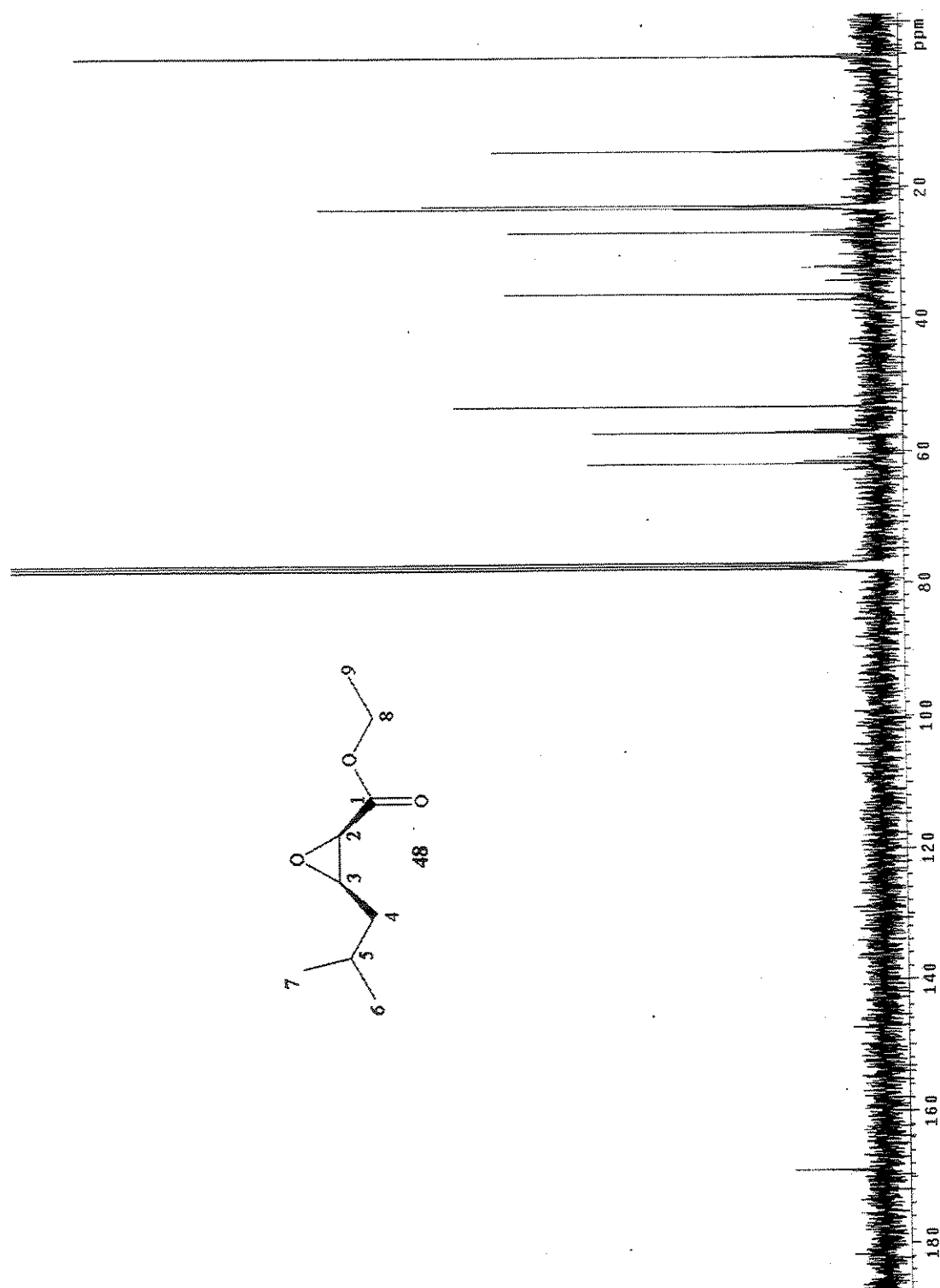
E90. Espectro de RMN de ^1H de (*R*)-2-hidroxi-5-metil-hexanoato de etila **51**

E91. Espectro de RMN de ^{13}C de (*R*)-2-hidroxi-5-metil-hexanoato de etila **51**

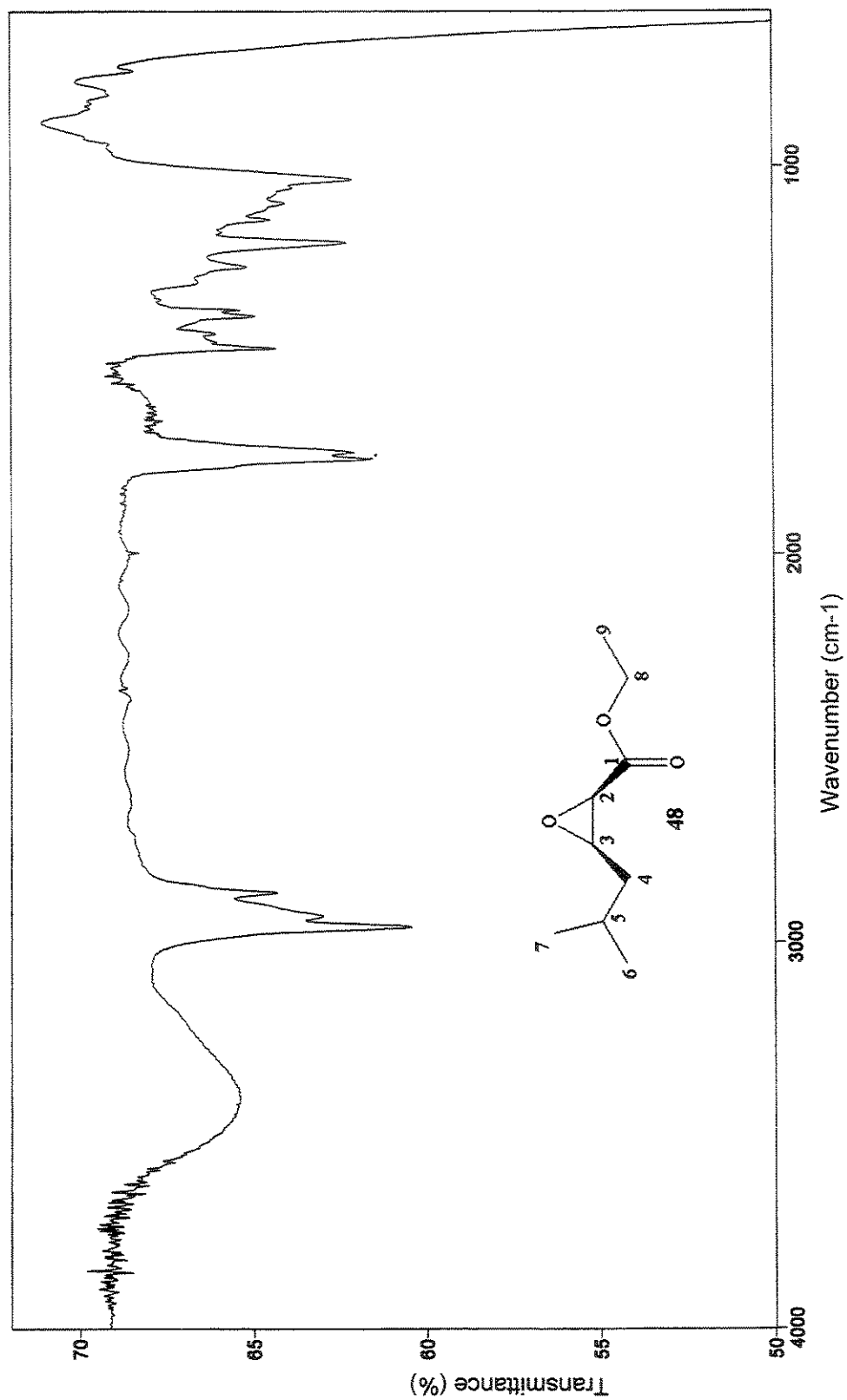
E92. Espectro no IV de (*R*)-2-hidroxi-5-metil-hexanoato de etila **51**

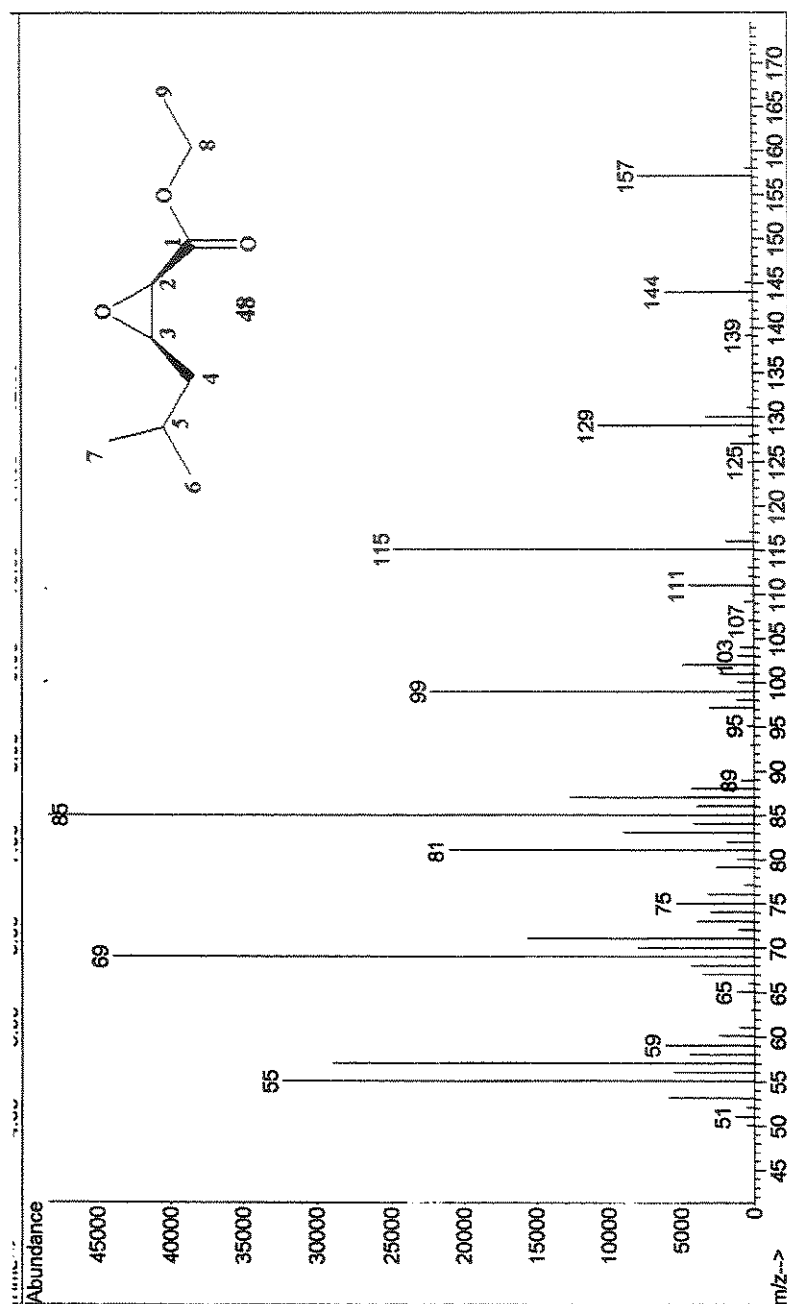


E93. Espectro de RMN de ^1H de (2R, 3R)-5-metil-2,3-oxirano-hexanoato de etila 48

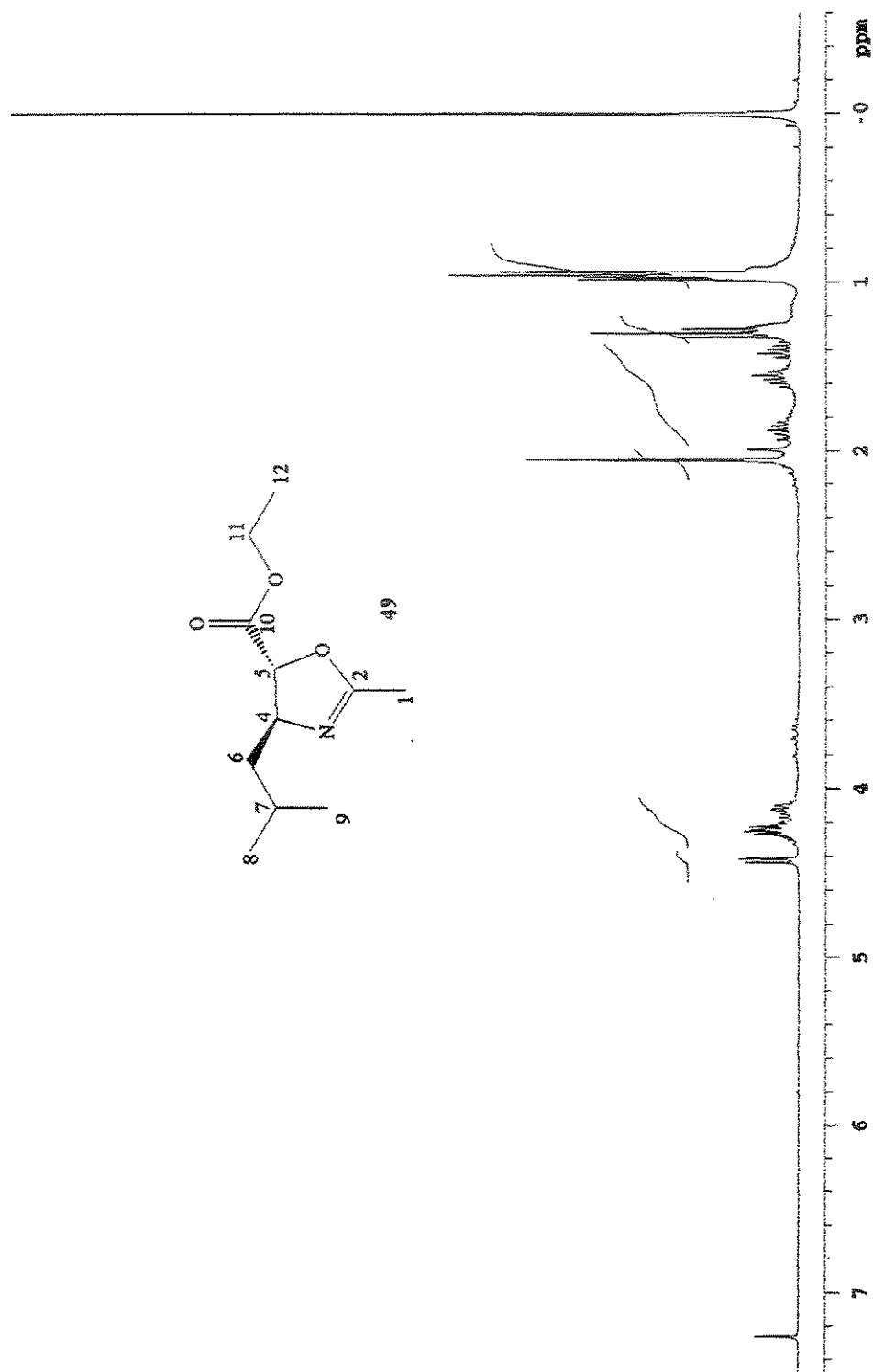


E94. Espectro de RMN de ^{13}C de (2*R*, 3*R*)-5-metil-2,3-oxirano-hexanoato de etila 48

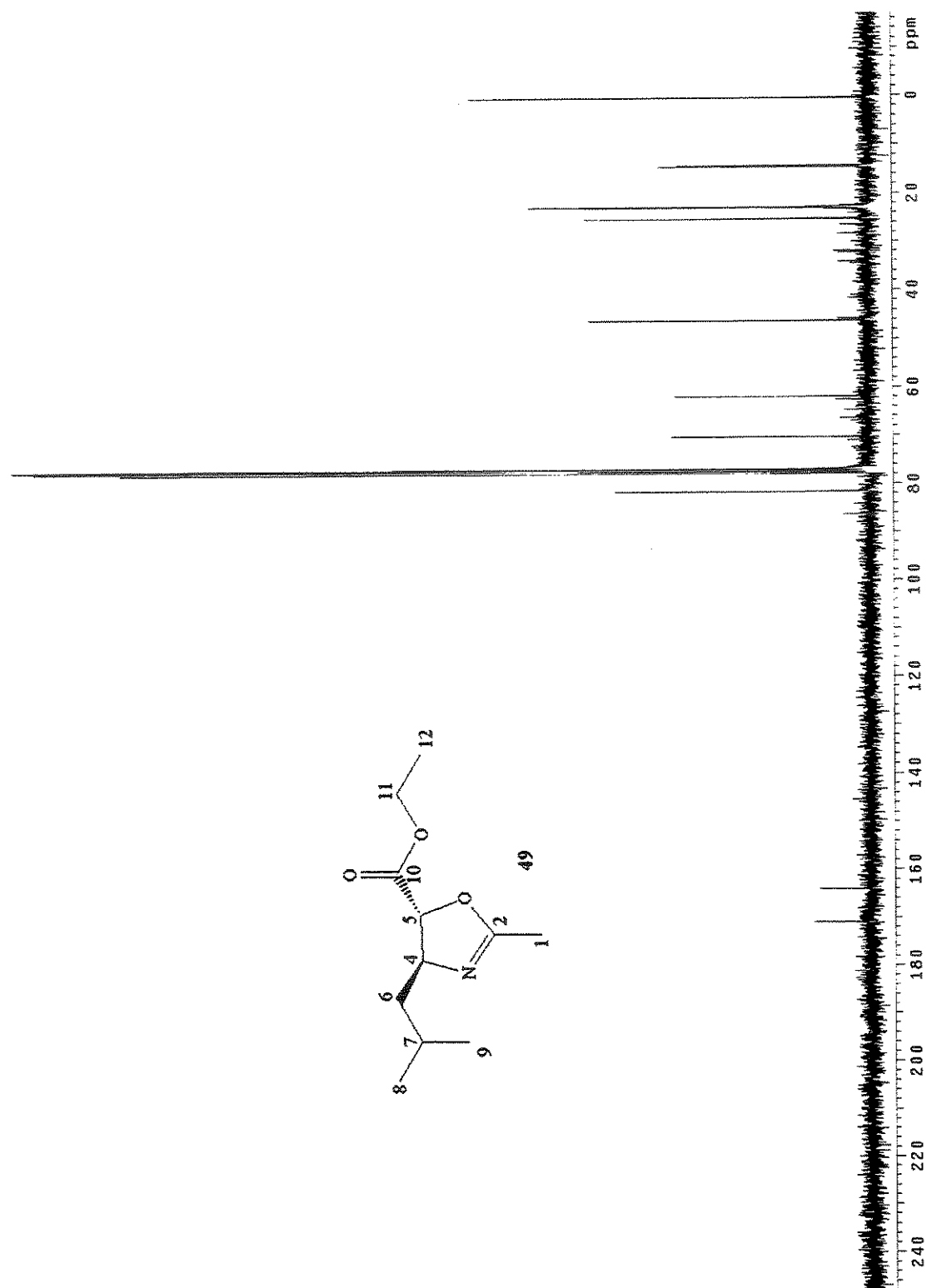
E95. Espectro no IV de (2*R*, 3*R*)-5-metil-2,3-oxirano-hexanoato de etila **48**



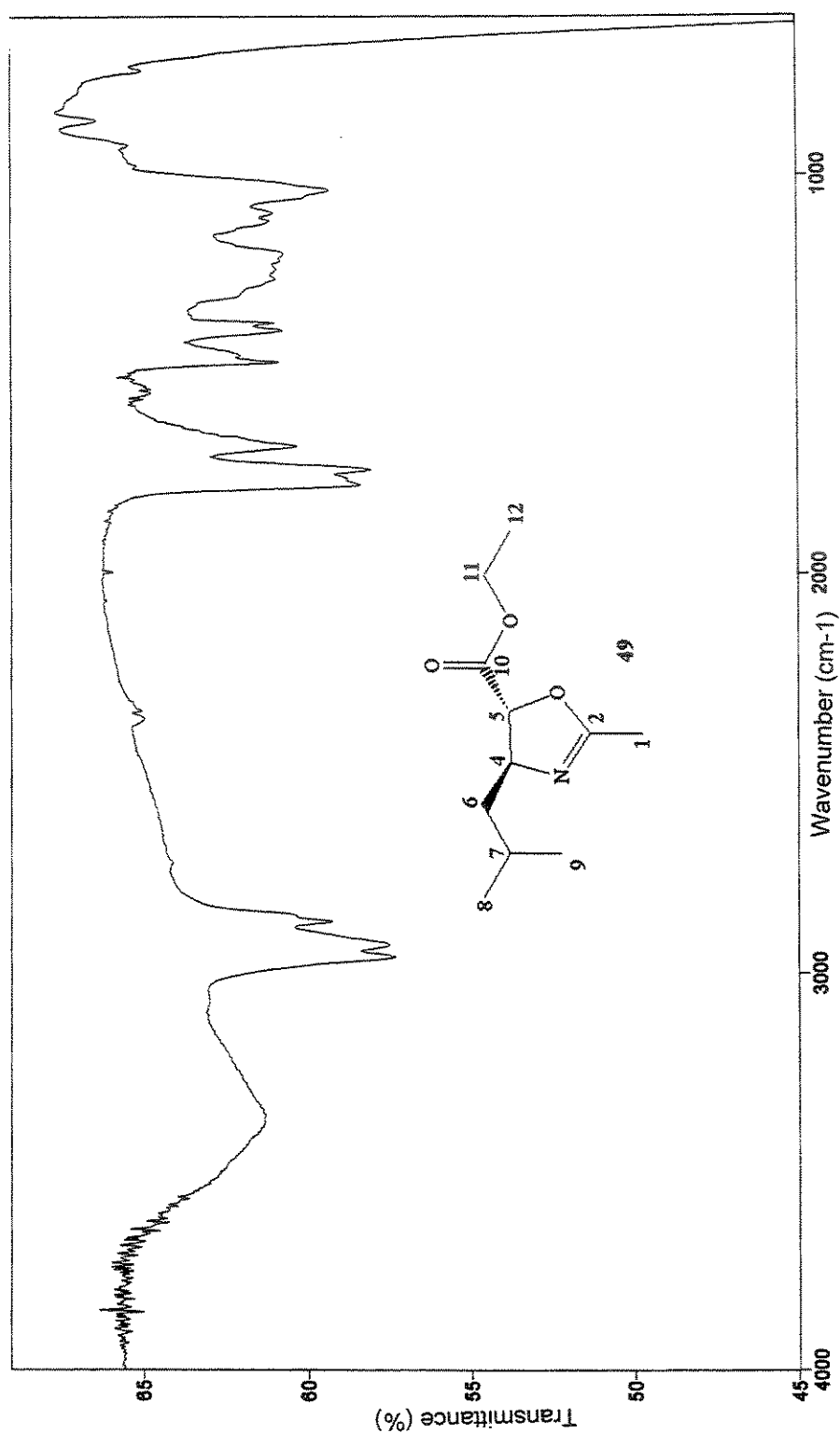
E96. Espectro de massas de (2R, 3R)-5-metil-2,3-oxirano-hexanoato de etila



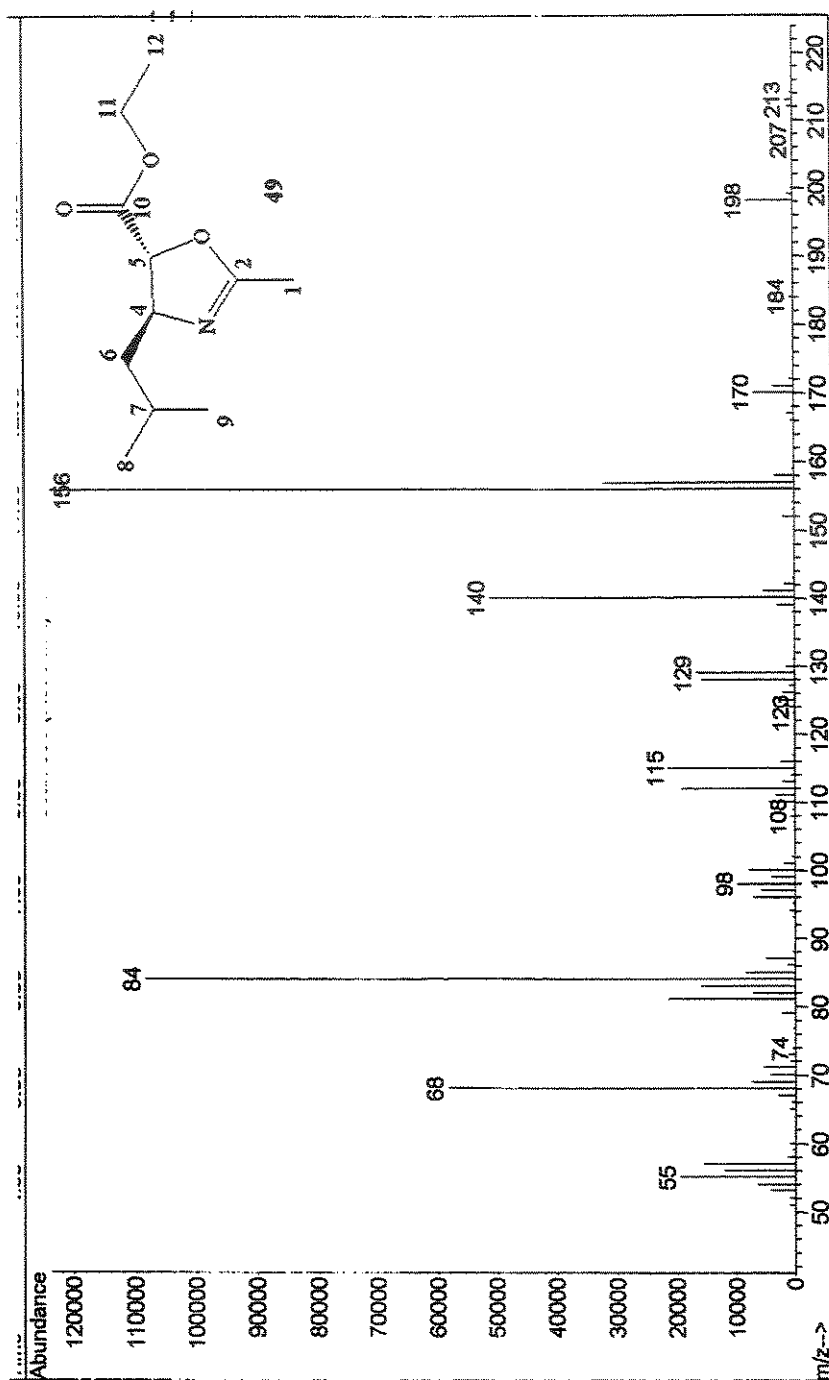
E97. Espectro de RMN de ^1H de (4*S*, 5*R*)-4-isopropil-2-metil-2-oxazolina-5-carboxilato de etila **49**



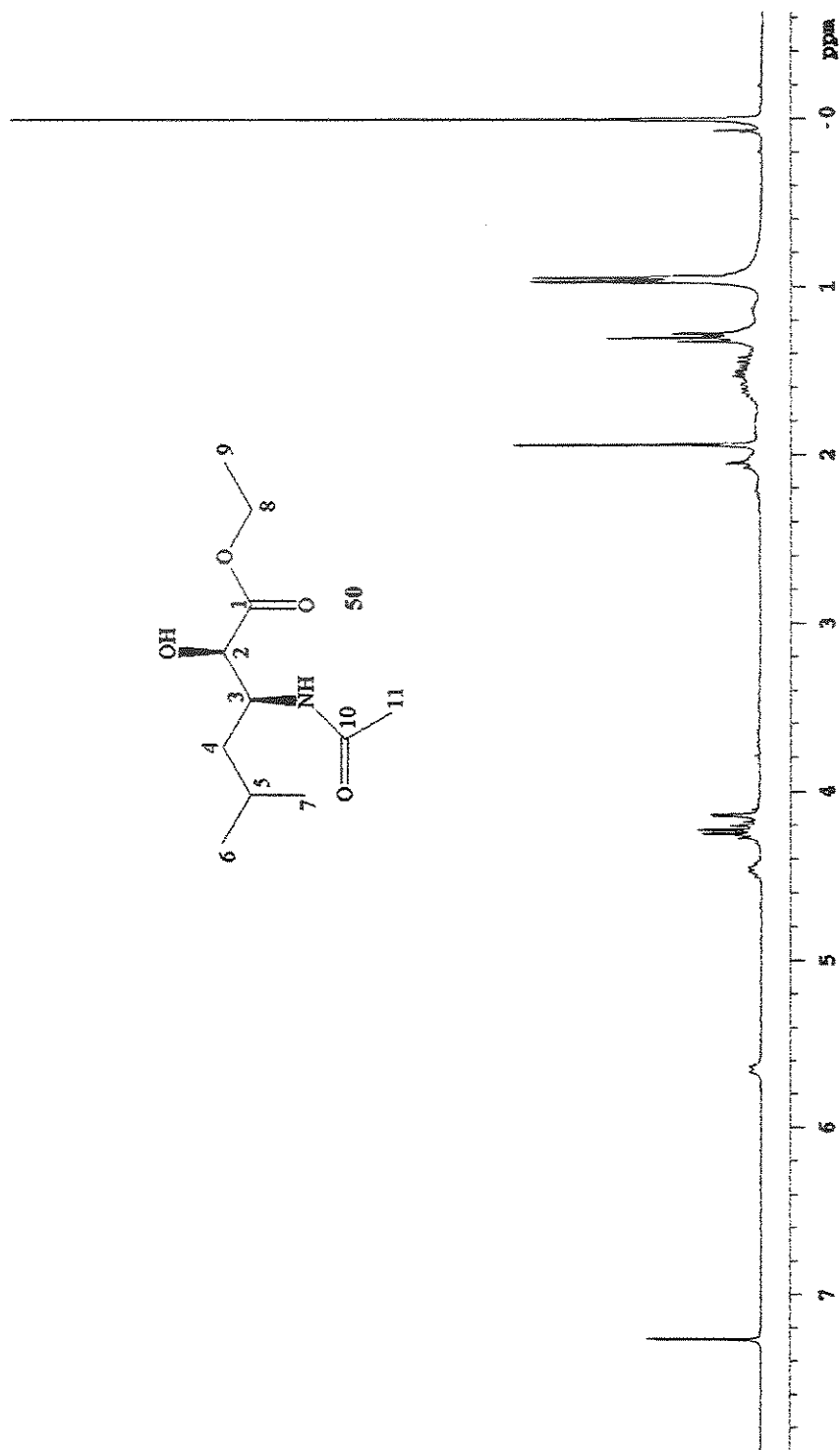
E98. Espectro de RMN de ^{13}C de (4*S*, 5*R*)-4-isopropil-2-metil-2-oxazolina-5-carboxilato de etila **49**



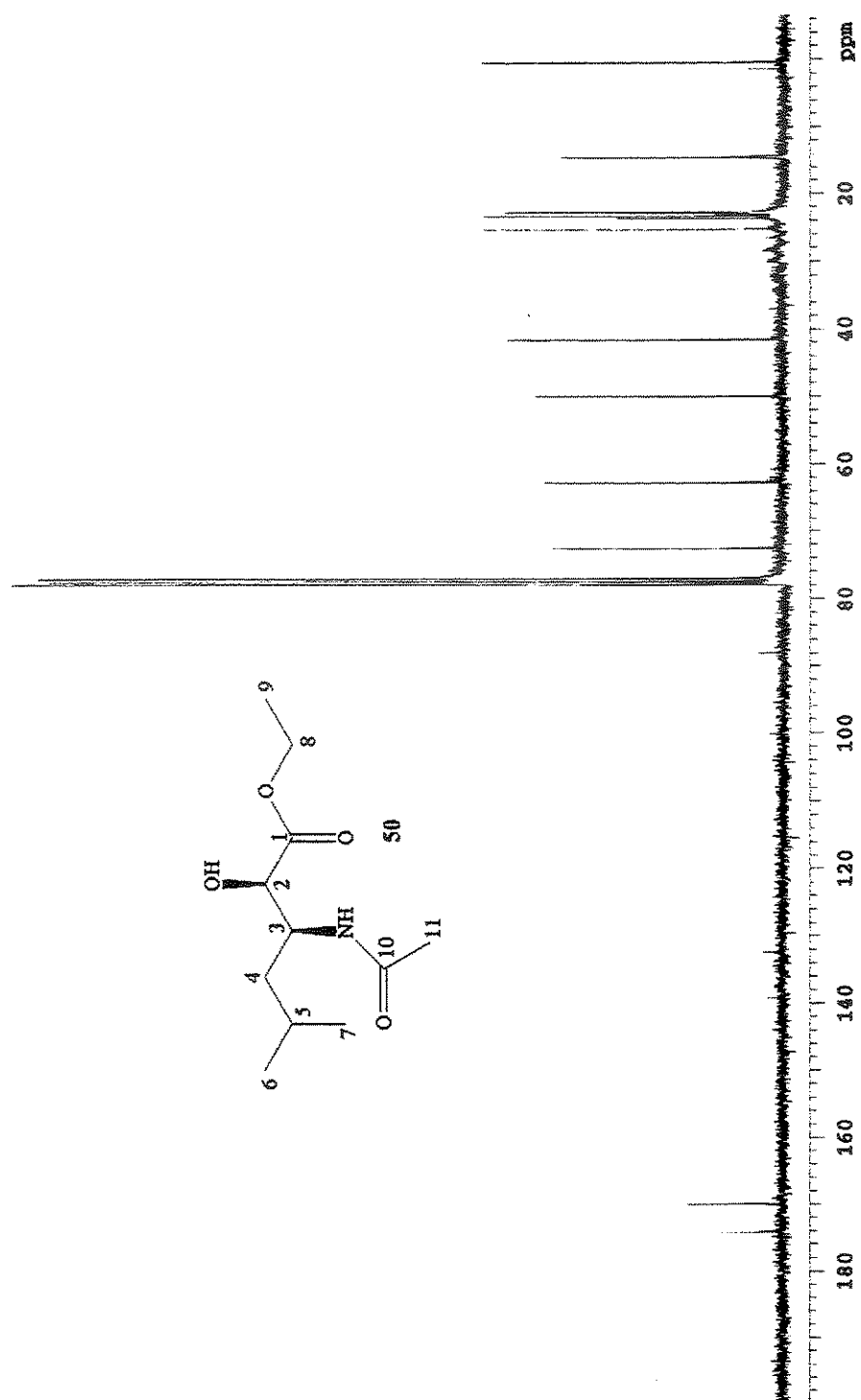
E99. Espectro no IV de (4*S*, 5*R*)-4-isopropil-2-metil-2-oxazolina-5-carboxilato de etila **49**



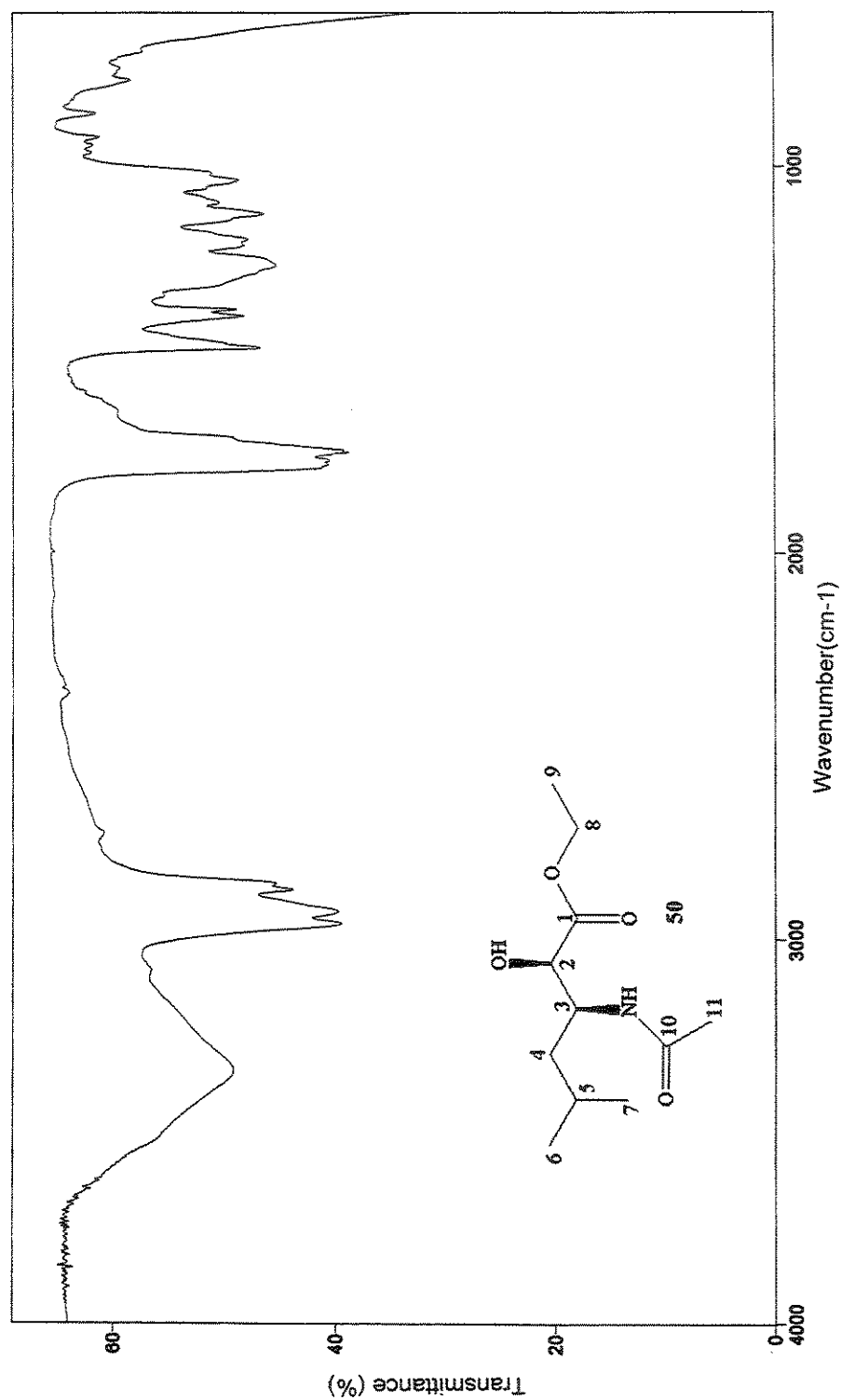
E100. Espectro de massas de (4*S*, 5*R*)-4-isopropil-2-metil-2-oxazolina-5-carboxilato de etila 49



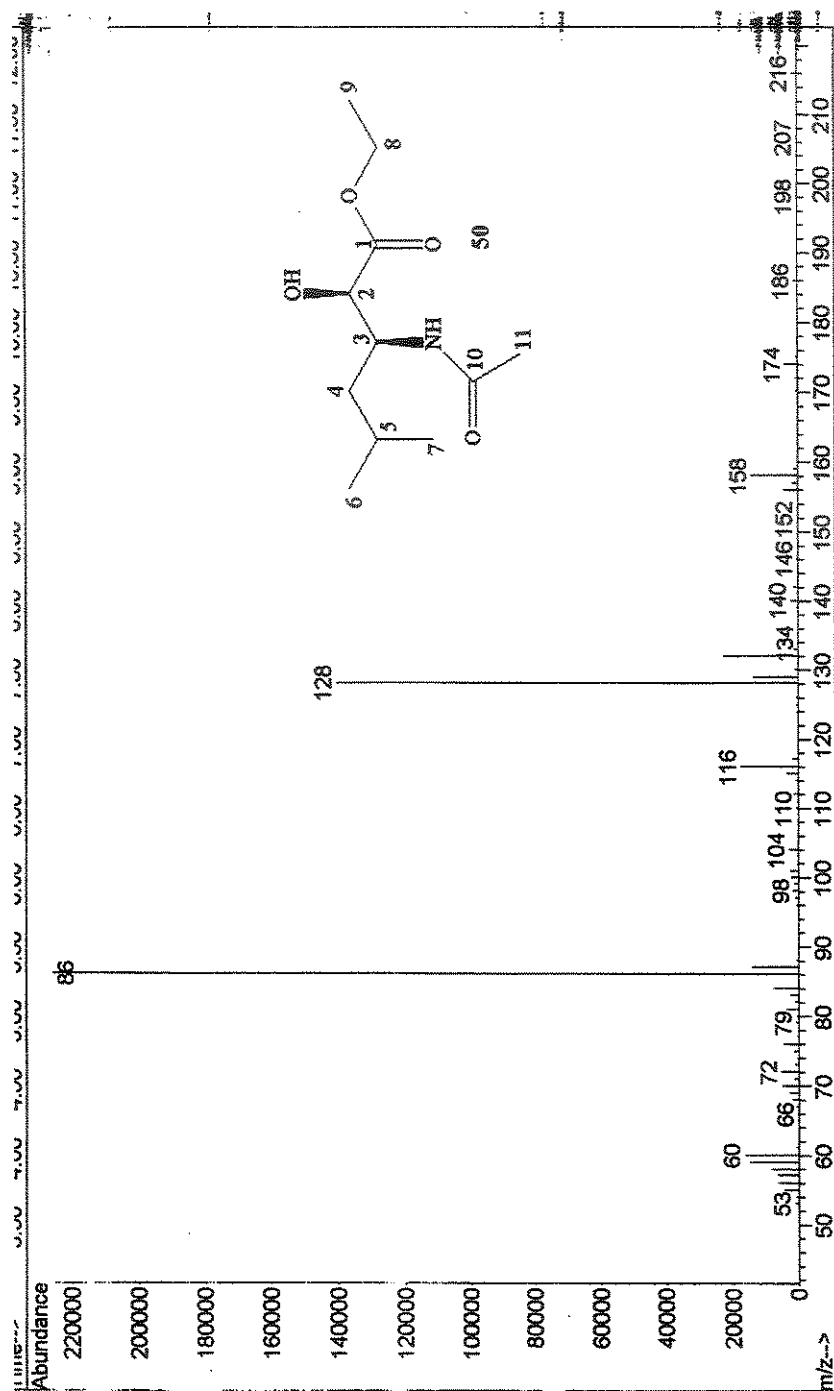
E101. Espectro de RMN de ^1H de (2*S*, 3*S*)-3-acetilamino-2-hidroxi-5-metilpentanoato de etila **50**



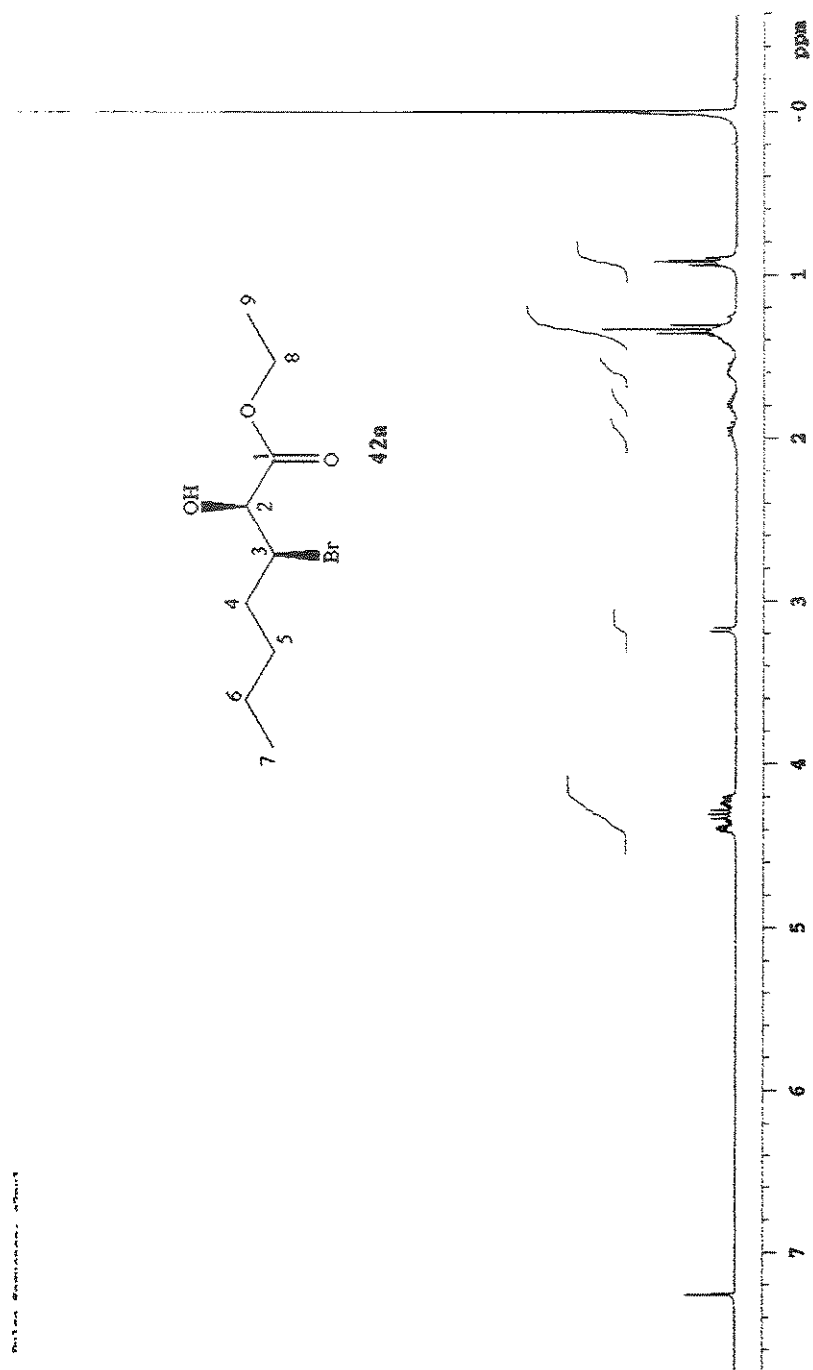
E102. Espectro de RMN de ^{13}C de (2S, 3S)-3-acetilamino-2-hidroxi-5-metilpentanoato de etila 50



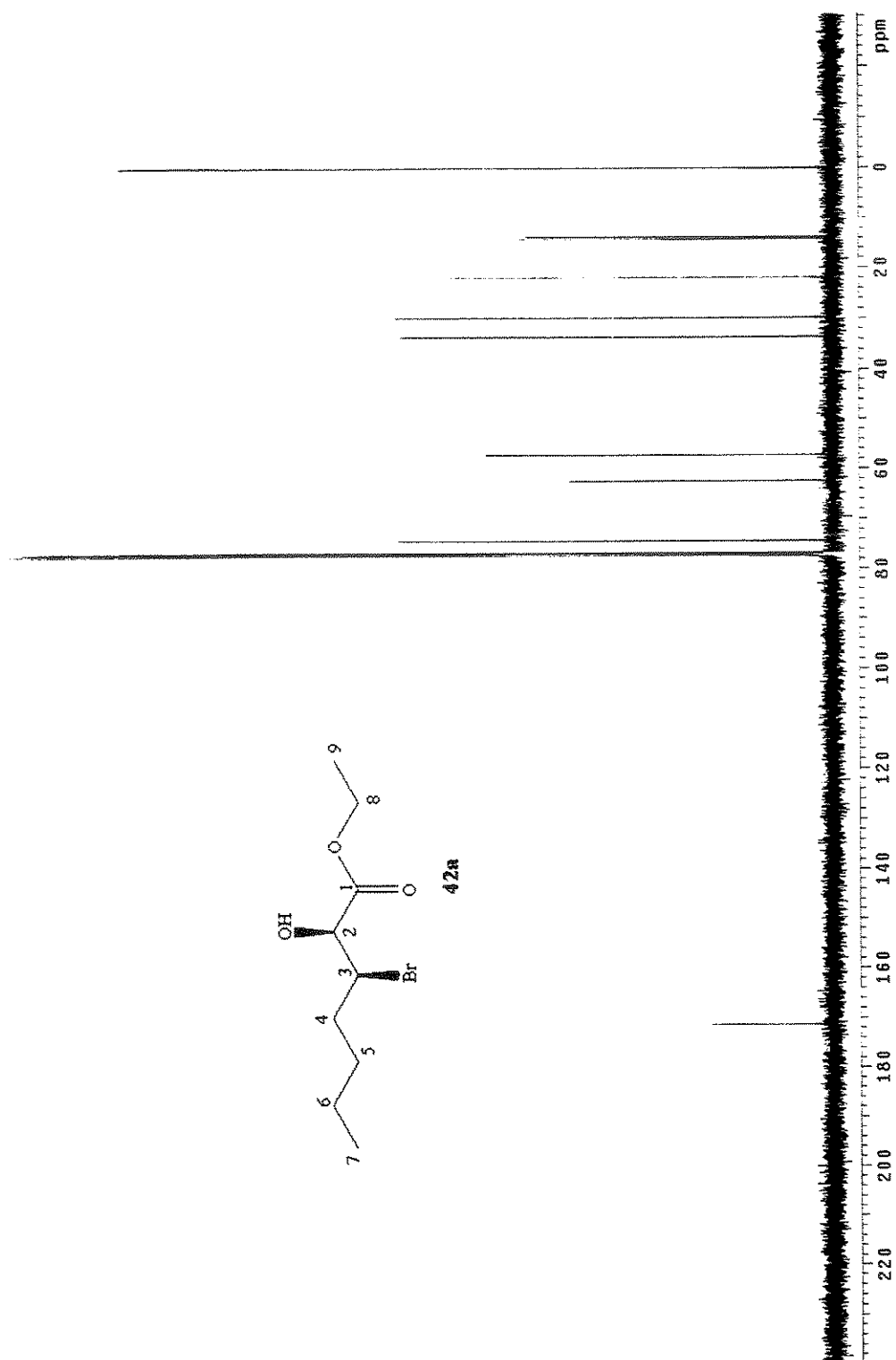
E103. Espectro no IV de (2*S*, 3*S*)-3-acetilamino-2-hidroxi-5-metilpentanoato de etila **50**



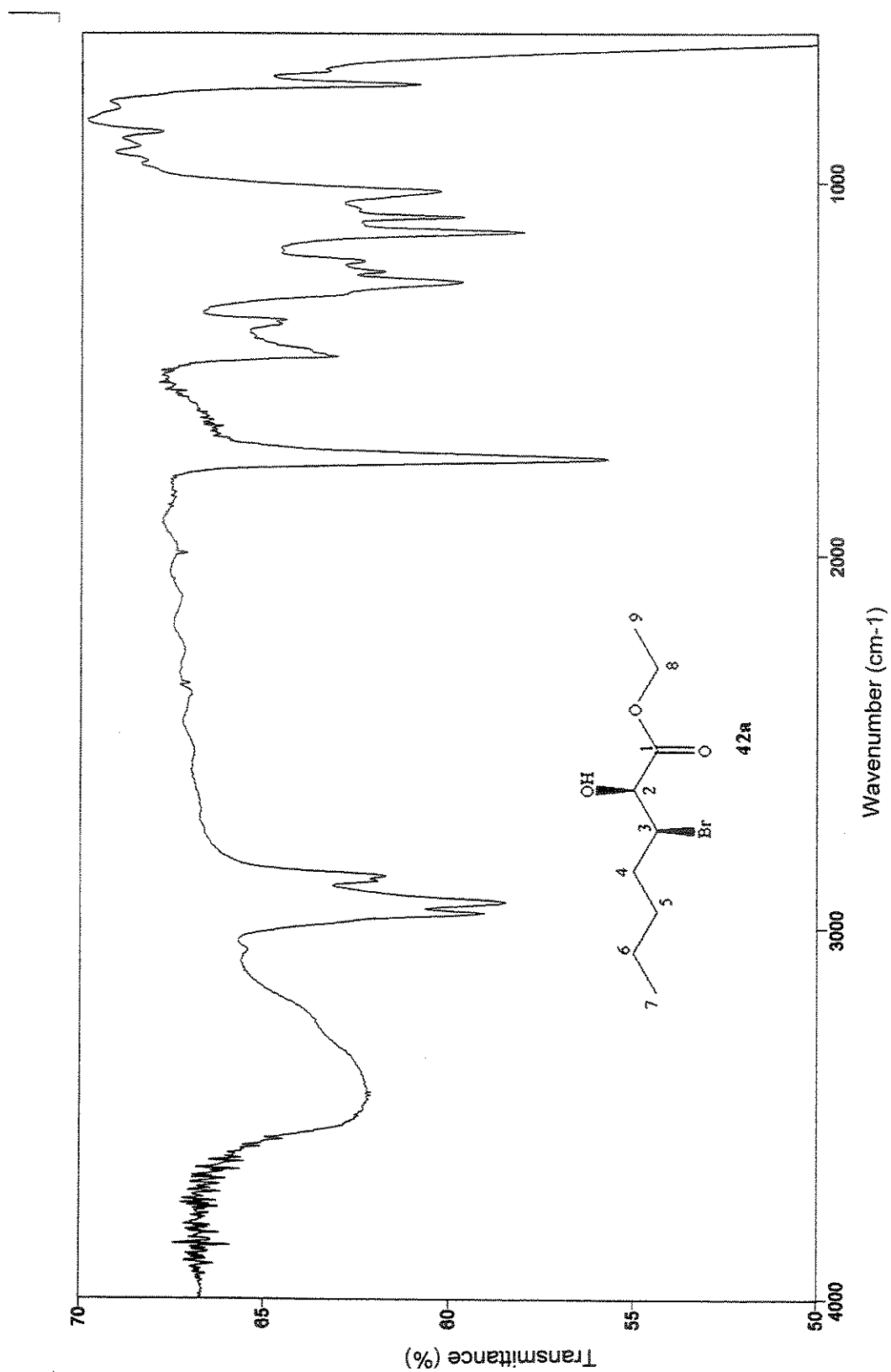
E104. Espectro de massas de (2S, 3S)-3-acetilamino-2-hidroxi-5-metilpentanoato de etila **50**

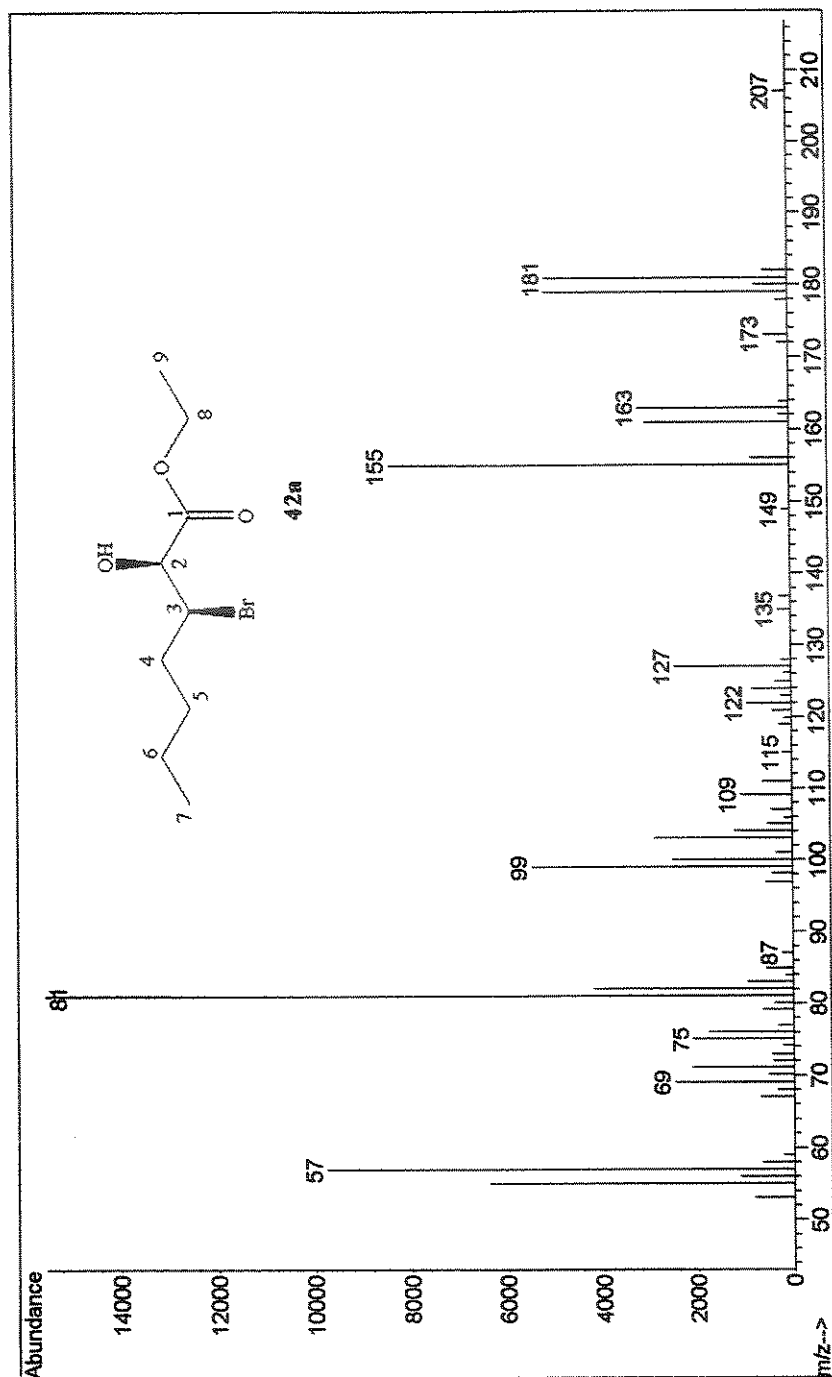


E105. Espectro de RMN de ^1H de (2*S*, 3*S*)-3-bromo-2-hidroxi-heptanoato de etila **42a**

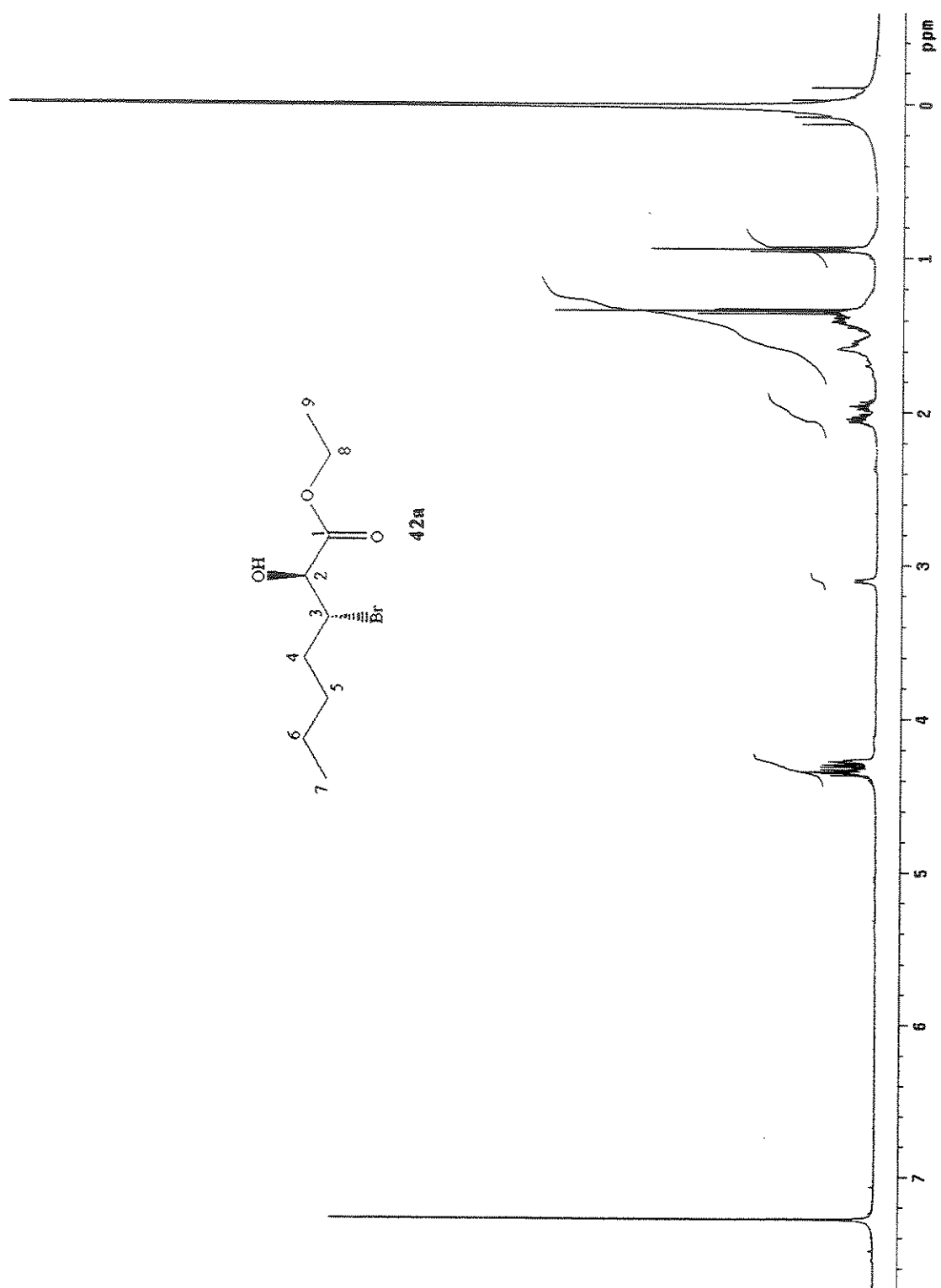


E106. Espectro de RMN de ^{13}C de (2S, 3S)-3-bromo-2-hidroxi-heptanoato de etila 42a

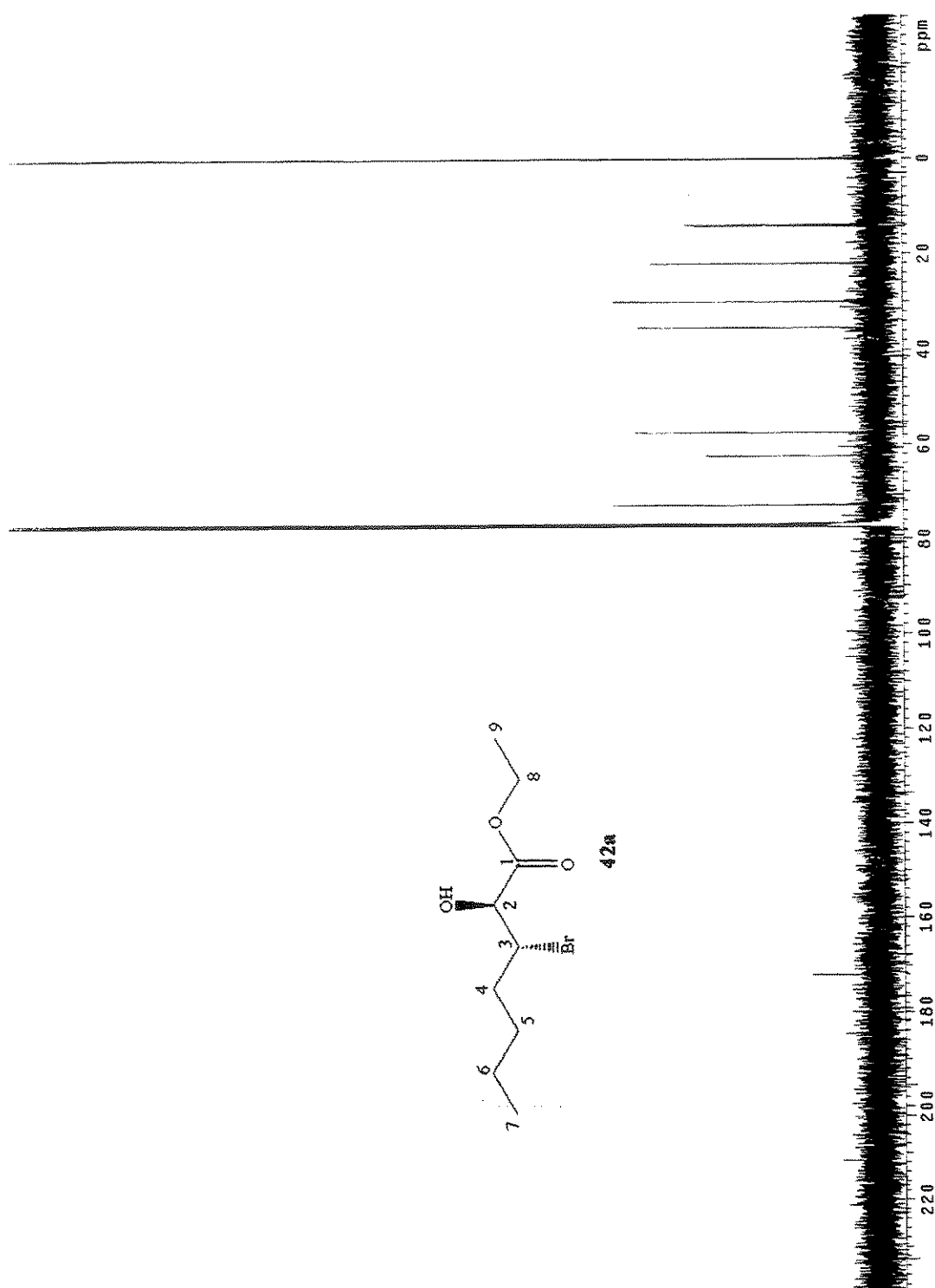
E107. Espectro no IV de (2*S*, 3*S*)-3-bromo-2-hidroxi-heptanoato de etila **42a**



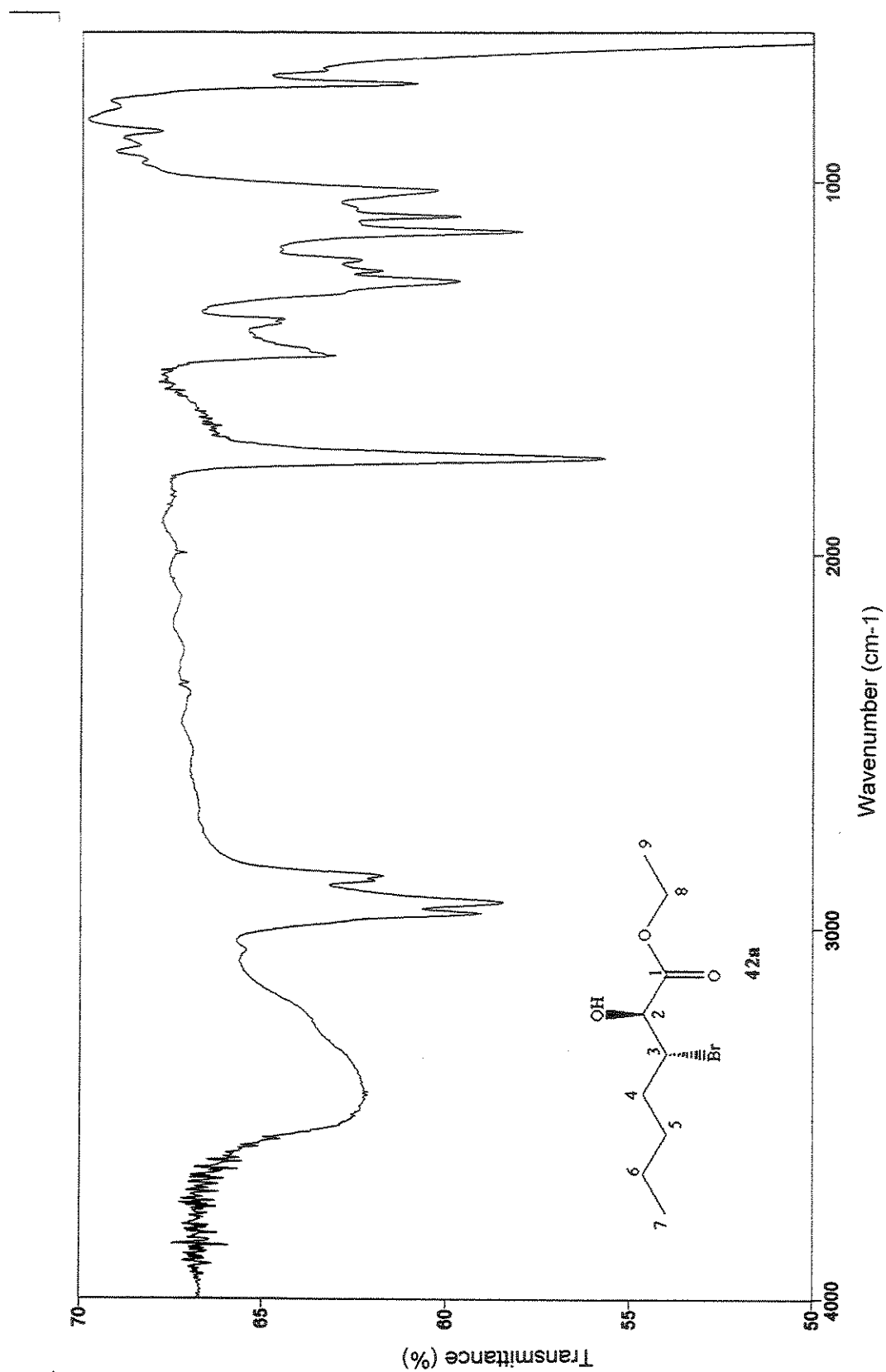
E108. Espectro de massas de (2*S*, 3*S*)-3-bromo-2-hidroxi-heptanoato de etila
42a

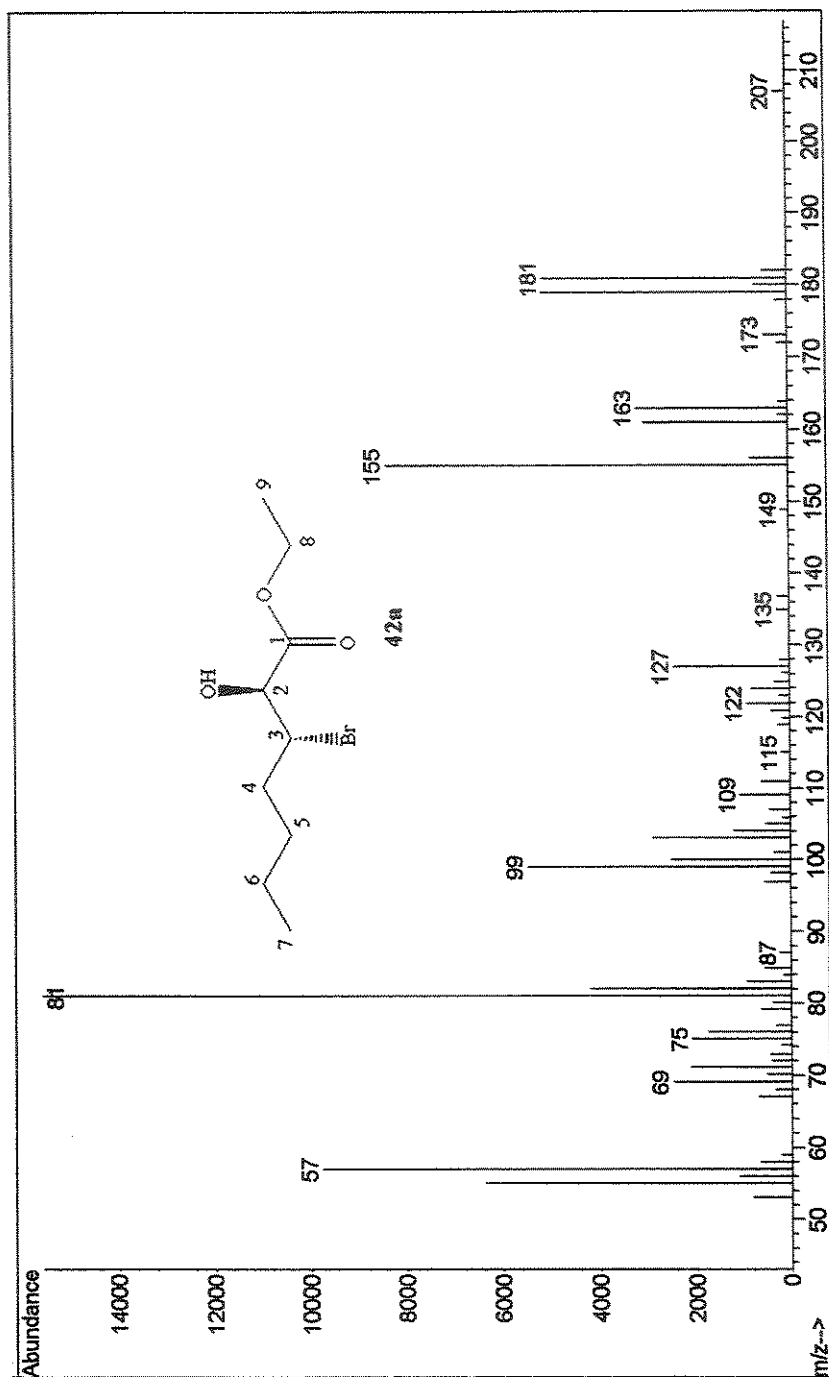


E109. Espectro de RMN de ^1H de (2*S*, 3*R*)-3-bromo-2-hidroxi-heptanoato de etila **42b**

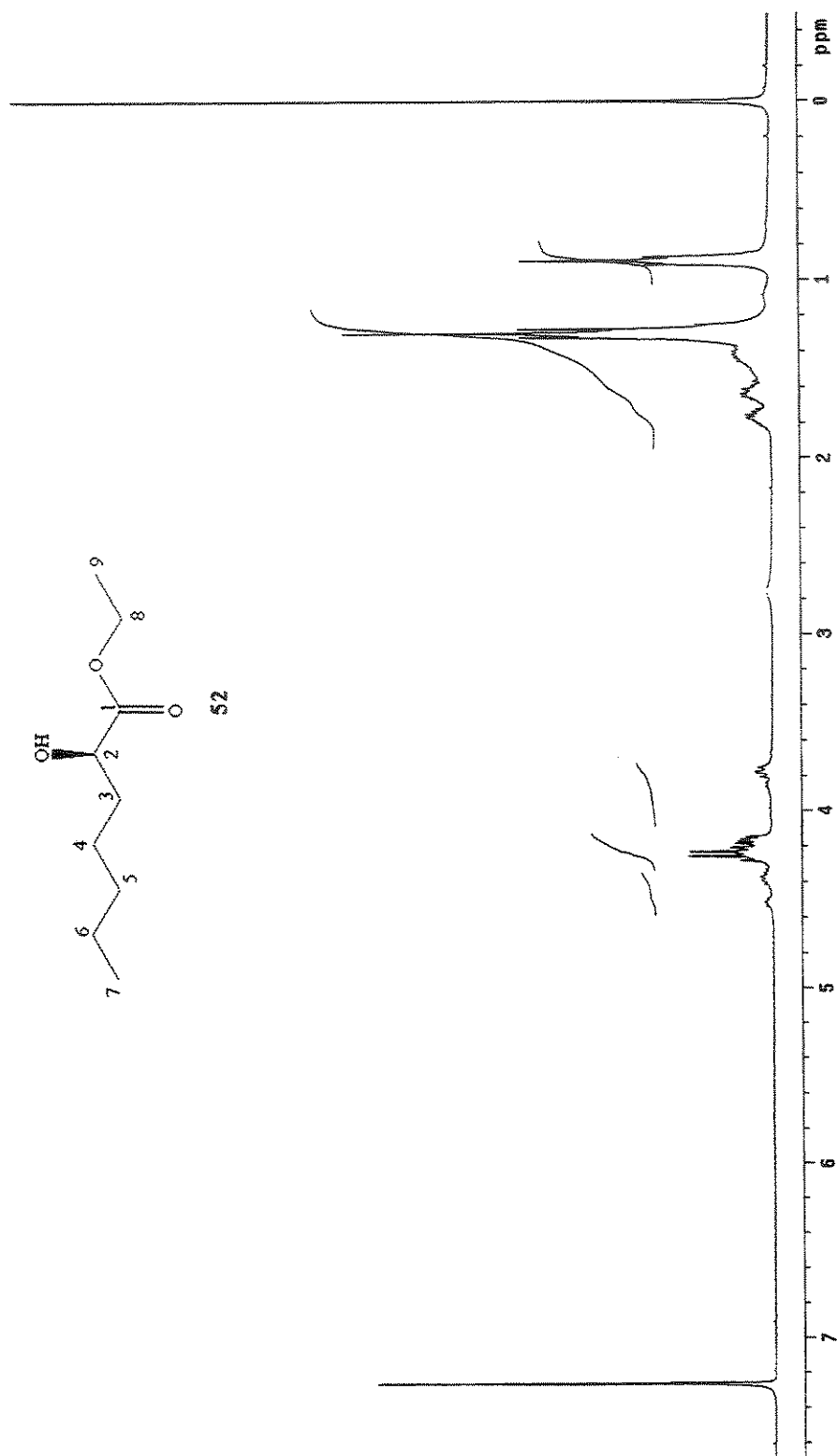


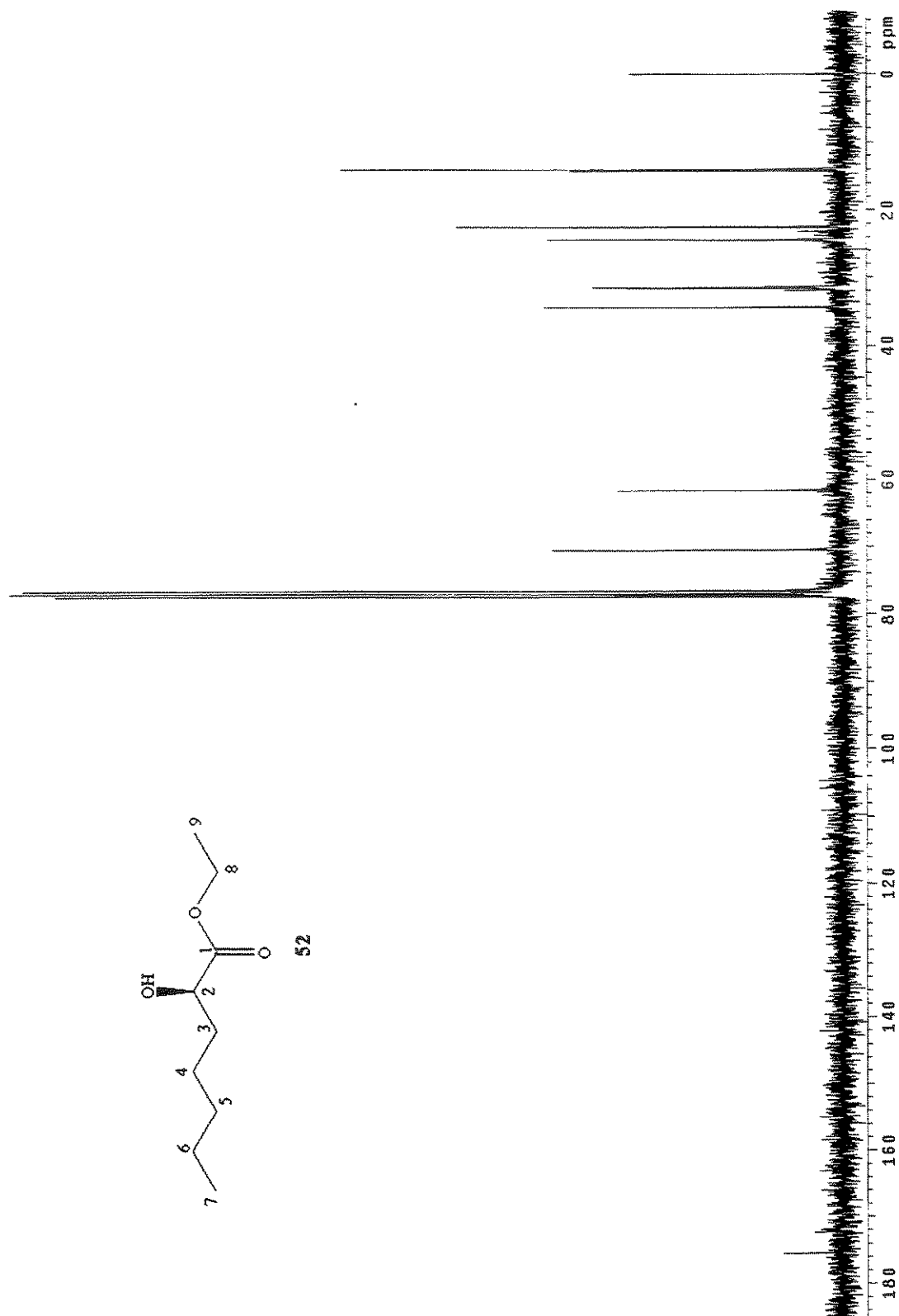
E110. Espectro de RMN de ^{13}C de (2*S*, 3*R*)-3-bromo-2-hidroxi-heptanoato de etila **42b**

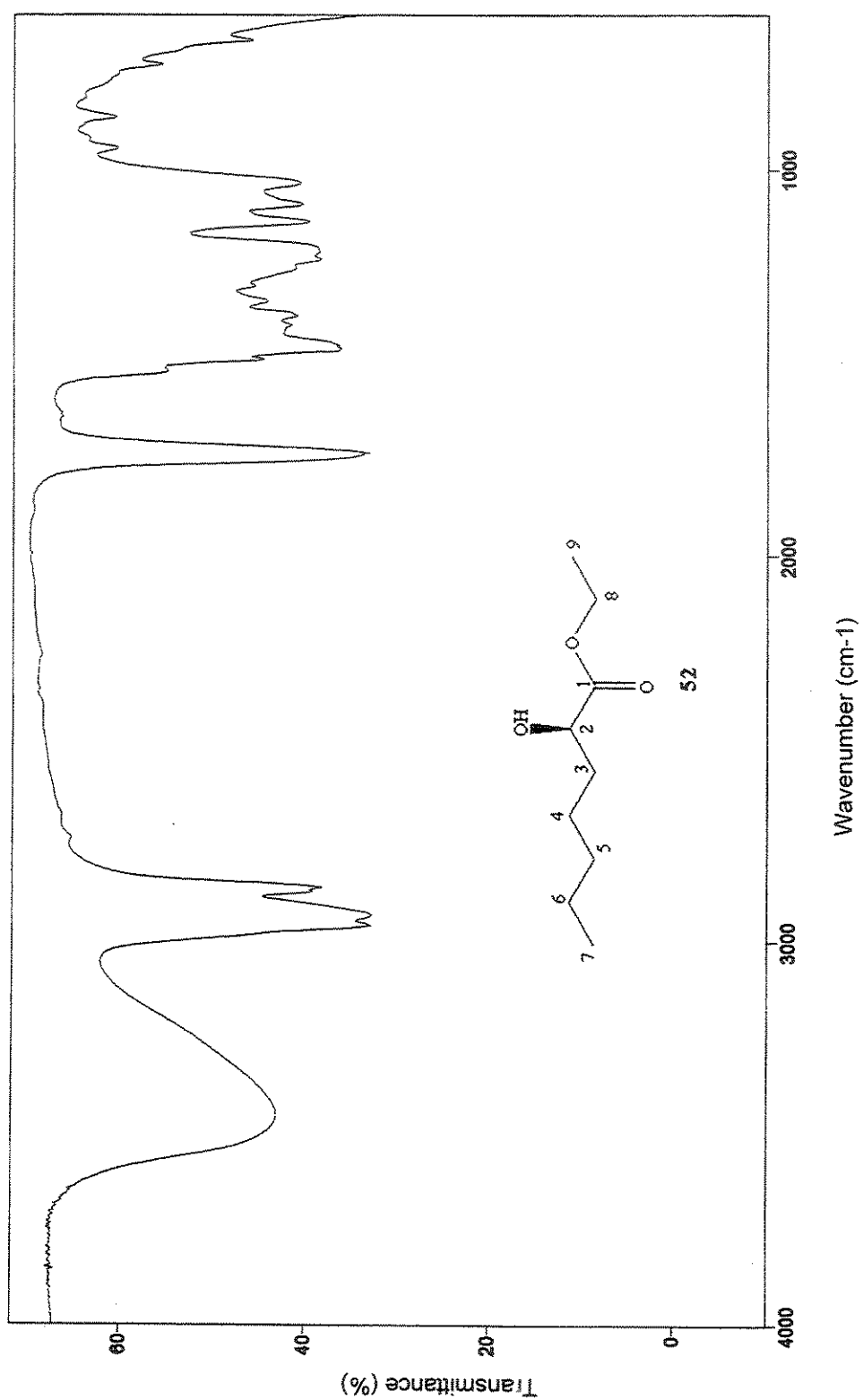
E111. Espectro no IV de (2*S*, 3*R*)-3-bromo-2-hidroxi-heptanoato de etila **42b**



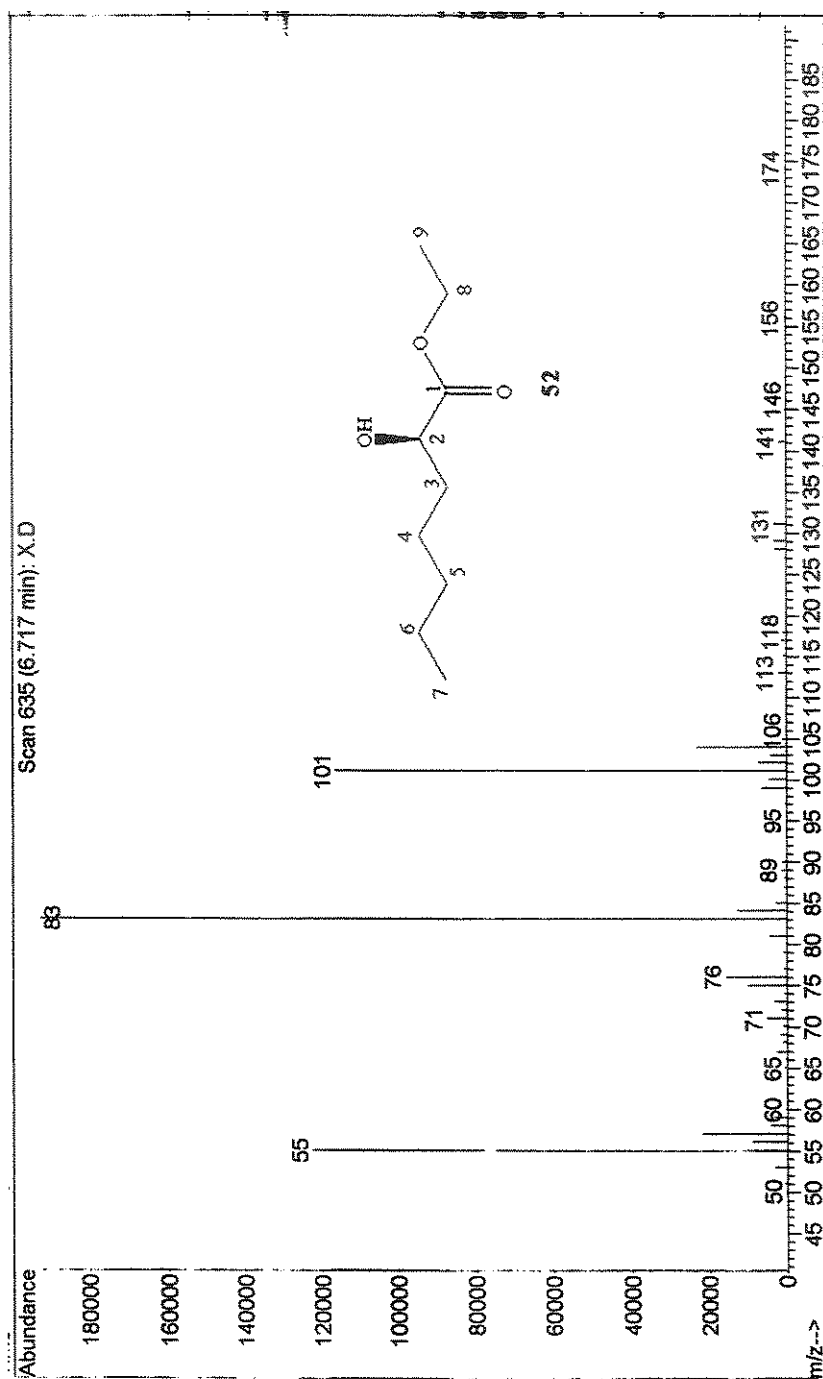
E112. Espectro de massas de (2*S*, 3*R*)-3-bromo-2-hidroxi-heptanoato de etila
42b

E113. Espectro de RMN de ^1H de (*R*)-2-hidroxi-heptanoato de etila **52**

E113. Espectro de RMN de ^{13}C de (*R*)-2-hidroxi-heptanoato de etila 52



E113. Espectro no IV de (R)--2-hidroxi-heptanoato de etila 52

E113. Espectro de massas de (*R*)-2-hidroxi-heptanoato de etila 52