



FÁBIO DOMINGUES NASÁRIO

**“DESRACEMIZAÇÃO DE ALCOÓIS SECUNDÁRIOS POR UM ÚNICO  
MICROORGANISMO”**

**Campinas**

**2013**





**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
INSTITUTO DE QUÍMICA**

**FÁBIO DOMINGUES NASÁRIO**

**DESRACEMIZAÇÃO DE ALCOÓIS SECUNDÁRIOS POR UM ÚNICO  
MICROORGANISMO**

**ORIENTADOR: PROF. DR. JOSÉ AUGUSTO ROSÁRIO RODRIGUES**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO APRESENTADA  
AO INSTITUTO DE QUÍMICA DA UNICAMP PARA  
OBTENÇÃO DO TÍTULO DE MESTRE EM QUÍMICA NA  
ÁREA DE QUÍMICA ORGÂNICA.**

**ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA DISSERTAÇÃO DEFENDIDA  
POR FÁBIO DOMINGUES NASÁRIO, E ORIENTADA PELO PROF.DR. JOSÉ AUGUSTO ROSÁRIO  
RODRIGUES.**

---

**Assinatura do Orientador**

**CAMPINAS**

**2013**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR DANIELLE DANTAS DE SOUSA -  
CRB8/6490 - BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE QUÍMICA DA UNICAMP

N17d Nasário, Fábio Domingues (1989-).  
Desracemização de alcoóis secundários por um  
único microrganismo / Fábio Domingues Nasário. –  
Campinas, SP: [s.n.], 2013.

Orientador: José Augusto Rosário Rodrigues.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de  
Campinas, Instituto de Química.

1. Desracemização. 2. Estereoinversão. 3. Álcool. 4.  
Biocatálise. 5. Química verde I. Rodrigues, José Augusto  
Rosário. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto  
de Química. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

**Título em inglês:** Deracemization of secondary alcohols by a single microorganism

**Palavras-chave em inglês:**

Deracemization  
Stereoinversion  
Alcohol  
Biocatalysis  
Green chemistry

**Área de concentração:** Química Orgânica

**Titulação:** Mestrado em Química na área de Química Orgânica

**Banca examinadora:**

José Augusto Rosário Rodrigues [Orientador]  
Wanda Pereira Almeida  
Leandro Helgueira de Andrade

**Data de defesa:** 26/07/2013

**Programa de pós-graduação:** Química

Para Ana Celia e Milton, meus pais.

*“A mente que se abre a uma nova ideia jamais voltará  
ao seu tamanho original”.*

Albert Einstein

## **Agradecimentos**

Ao prof. Dr. José Augusto pela orientação, dedicação, amizade, paciência e pelos ensinamentos.

Ao prof. Paulo Moran pela valiosa contribuição durante o desenvolvimento do trabalho.

Aos meus pais Milton e Ana Celia, que me educaram de uma forma que não posso deixar de considerar como exemplar. Tudo o que sou e conquistei até o momento foi graças aos valores éticos e morais que recebi deles, que nunca deixaram de me incentivar a alcançar meus objetivos mesmo possuindo poucos recursos.

Ao meu irmão, Danilo, pelo apoio fraternal que, apesar dos conflitos naturais, sempre foi constante.

A Joice pelo companheirismo, paciência, compreensão, carinho e amor, estando sempre disposta a ajudar.

Aos colegas de laboratório, Bruno, Michel, Claudio, Rafael, Fernanda, Luciana, Jeany, Artur, Carlos, Leandro, Henrique, Gustavo, Bruna, pelo convívio, momentos de descontração, aprendizado, em especial a Tarcila e Juliana que compartilharam vários momentos especiais.

Aos amigos que conheci no IQ-UNICAMP, Lair, Bruna, Marcelo, Marília, Rômulo, Gabriela, Ricardo que me possibilitaram momentos de alegria, em especial à Gisele, que me auxiliou em muitas situações.

Aos meus parentes que sempre preocupados, torceram pelo meu sucesso, em especial ao meu primo João Paulo, que por estar mais próximo, pode compartilhar de alegrias e angustias.

A Maria Helena que foi um amparo em momentos de dificuldade e uma grande amiga.

Ao CNPQ, FAPESP (Processo 2011/51861-0) e ao Instituto de Química UNICAMP pelo apoio financeiro e infraestrutura que possibilitaram o desenvolvimento do projeto.

## Curriculum Vitae

**Nome** Fábio Domingues Nasário

e-mail: fabio.nasario@iqm.unicamp.br , fanasario@yahoo.com.br

Currículo na Plataforma Lattes:

<http://buscatextual.cnpq.br/buscatextual/visualizacv.do?metodo=apresentar&id=K4426488J8>

### Formação acadêmica/titulação

- 2011 - 2013** Mestrado em Química.  
Universidade Estadual de Campinas, UNICAMP, Campinas, Brasil  
Título: “DESRACEMIZAÇÃO DE ÁLCOOIS SECUNDÁRIOS POR UM ÚNICO MICRORGANISMO”  
Orientador: Jose Augusto Rosario Rodrigues  
Bolsista do(a): Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
- 2007 - 2010** Graduação em Bacharelado em Química Ambiental.  
Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, São José do Rio Preto, Brasil  
Título: Síntese, Caracterização e Estudo da Interação de Derivados Catiônicos de Quitosana com Vesículas de DPPC  
Orientador: Marcio José Tiera  
Bolsista do(a): Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo

### Atuação profissional

#### Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP

#### Programa Estágio Docente (PED-C)

**Disciplina:** Química Orgânica I

**Período:** 1º semestre 2013

### Prêmios e títulos

- 2011** Prêmio Lavoisier, Conselho Regional de Química - 4ª Região
- 2009** Primeiro colocado entre os trabalhos da área de Exatas, XXXVI Colóquio de Incentivo a Pesquisa IBILCE - UNESP - SJRP

### Produção bibliográfica

#### Artigos completos publicados em periódicos

1. PICOLA, ISADORA PFEIFER DALLA, BUSSON, KAREN ANDRESSA NUNES, CASÉ, ANA HELENA, **Nasário, Fábio Domingues**, TIERA, VERA APARECIDA DE OLIVEIRA, TABOGA, SEBASTIÃO ROBERTO, NETO, JOÃO RUGGIERO, TIERA, MARCIO JOSÉ  
Effect of ionic strength solution on the stability of chitosan-DNA nanoparticles. Journal of Experimental Nanoscience. , v.1, p.1 - 14, 2012.

## **Participação em eventos**

1. Rodrigues, J. A. R.; Moran, J. S.; Nasário, F. D.; Desracemização de alcoóis secundários por *Saccharomyces cerevisiae* e *Candida albicans*. 36ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, **2013**.
2. Tiera, M. J.; Picola, I. P. D.; Nasário, F. D.; Síntese e Caracterização de Derivados Catiônicos de Quitosanas: Estudo do Comportamento em Solução Aquosa. 33ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, **2010**.
3. Tiera, M. J.; Picola, I. P. D.; Nasário, F. D.; Estudo da interação de derivados anfifílicos de quitosana com vesículas de DPPC. I Simpósio de Pós-graduação em Química, **2010**.
4. Tiera, M. J.; Picola, I. P. D.; Nasário, F. D.; Síntese, caracterização e estudo da interação de derivados catiônicos de quitosana com vesículas de DPPC. XXII Congresso de Iniciação Científica da Unesp, **2010**.
5. Tiera, M. J.; Picola, I. P. D.; Nasário, F. D.; Síntese e Caracterização de Derivados Anfifílicos de Quitosanas de Baixa Massa Molecular. XXI Congresso de Iniciação Científica da Unesp, **2009**.
6. Tiera, M. J.; Picola, I. P. D.; Nasário, F. D.; Síntese e Caracterização de Derivados Hidrofóbicos de Quitosana,. XXXVI Colóquio de Incentivo a Pesquisa, **2009**.

## Resumo

A desracemização de alcoóis secundários por estereoinversão utilizando apenas um microrganismo é um processo ambientalmente compatível que se enquadra nos princípios da química verde, e apresenta grande interesse visto a utilização desses compostos enantiomericamente puros na síntese de fármacos e outras moléculas biologicamente ativas.

Nesse estudo foram empregadas as leveduras *S. cerevisiae* e *C. albicans* CCT 5847/18804, separadamente para realizar a desracemização de alguns alcoóis secundários como 1-feniletanol, mandelato de etila, 3-fenil-3-hidroxiopropanoato de etila, 4-fenil-2-hidroxi-butirato de etila. Esse processo mostrou-se bastante eficiente para obtenção de alcoóis enantiomericamente enriquecidos, visto que dispensa a utilização de enzimas isoladas e uso de custosos cofatores.

Foi possível obter (*R*)-1-feniletanol 90% rendimento cromatográfico e 99% ee com desracemização do *rac*-1-feniletanol catalisada por *C. albicans*, e o outro enantiômero (*S*)-1-feniletanol a partir da redução de acetofenona com *S. cerevisiae* tipo II com 75% de conversão e 96% ee. A desracemização do 4-fenil-2-hidroxi-butirato de etila foi possível com *C. albicans* e *S. cerevisiae* com apenas 2 horas de reação obteve-se o (*S*)-4-fenil-2-hidroxi-butirato de etila com ee de 96% e rendimento de 99%. Foi possível obter o (*S*)-mandelato de etila ee de 96% e 90% de rendimento a partir da desracemização com *C. albicans* e o outro enantiômero com redução do respectivo ceto-éster com *S. cerevisiae*. O (*S*)-3-hidroxi-3-fenilpropionato de etila foi produzido a partir da desracemização de 3-hidroxi-3-fenilpropionato de etila com *S. cerevisiae* tipo II após 2 dias de reação com 96% ee e 75% de rendimento.

O processo de desracemização de alcoóis secundários utilizando um único microrganismo mostrou-se eficiente para obtenção de compostos quirais com alta economia de átomos e baixo fator de impacto ambiental para a maioria dos substratos estudados.

## Abstract

The deracemization of secondary alcohols by stereoinversion using only one microorganism is an environmentally compatible process that fits the principles of green chemistry and presents great interest since the use of these compounds in the synthesis of enantiomerically pure drugs and other biologically active molecules.

In this study we employed the yeasts of *S. cerevisiae* and *C. albicans* CCT 5847/18804 separately to perform deracemization of some secondary alcohols such as 1-phenylethanol, ethyl mandelate, ethyl 3-hydroxy-3-phenylpropanoate, ethyl 2-hydroxy-4-phenylbutyrate. This process proved to be very efficient for obtaining enantiomerically enriched alcohols, since it eliminates the use of isolated enzymes and expensive cofactors.

It was possible to perform a deracemization of 1-phenylethanol and obtain 90% of the (*R*)-1-phenylethanol in 99% ee by *C. albicans*, and the other enantiomer (*S*)-1-phenylethanol from the enantioselective reduction of acetophenone with *S. cerevisiae* with 75% conversion and 96% ee. The deracemization of ethyl 2-hydroxy-4-phenylbutyrate was possible to perform with *C. albicans* and *S. cerevisiae* with only 2 hours of reaction to obtain the (*S*)-ethyl 2-hydroxy-4-phenylbutyrate (ee of 96% and yield of 100%), which is impressive, since the production of (*S*)-ethyl 2-hydroxy-4-phenylbutyrate may be performed in any chemistry laboratory, since *S. cerevisiae* type II is lyophilized and dispenses use of sterile materials and laminar flow hood. It was also possible to obtain (*S*)-ethyl mandelate (ee of 96% and yield of 90%) by deracemization of ethyl mandelate with *C. albicans* and other enantiomer by reduction of the corresponding ketone with *S. cerevisiae*. (*S*)-ethyl 3-hydroxy-3-phenylpropionate (96% ee and 75% yield) was produced by deracemization of ethyl 3-hydroxy-3-phenylpropanoate with *S. cerevisiae* Type II after 2 days of reaction.

The deracemization of secondary alcohols using a single microorganism was effective for obtaining chiral compounds with high atomic efficiency and low environmental factor to most substrates studied.

# Índice

Índice de Tabelas .....	xv
Índice de Figuras .....	xvii
1- Introdução .....	1
1.1 - Biocatálise.....	1
1.2 - Enzimas .....	2
1.3 - Relevância do estudo.....	3
2-Objetivos .....	14
3-Resultados e discussão.....	15
3.1-Preparação dos padrões.....	15
3.2- 1-feniletanol (2) .....	16
3.2 –2-cloro-1-feniletanol (4) .....	23
3.3- 4-cloro-3-hidróxibutanoato de etila (6) .....	25
3.4- 3-hidróxi-3-fenilpropionato de etila (8).....	26
3.5- 4-fenil-2-hidróxifenilbutanoato de etila (11) .....	29
3.6- Mandelato de etila (15) .....	32
4-Conclusões.....	36
5-Parte experimental .....	38
5.1 – Aspectos instrumentais .....	38
5.1.1 - Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) .....	38
5.1.2 - Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas (CG/EM) ....	38
5.1.3 - Cromatografia Gasosa acoplada ao Detector por ionização de chama – CG/DIC .....	38
5.1.4 – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).....	39
5.1.5 - Métodos Cromatográficos.....	39

5.1.6 - Espectroscopia no infravermelho.....	39
5.1.7 - Rotação Ótica .....	39
5.1.8 - Procedência de reagentes .....	39
5.2 - Preparação dos padrões .....	40
5.2.1 1-fenil etanol. ....	40
5.2.2 – 2-cloro-1-feniletanol .....	40
5.2.3 – 4-cloro-3-hidróxibutanoato de etila.....	41
5.2.4 – 3-fenil-3-hidróxipropanoato de etila.....	41
5.2.5 – 4-fenil-2-hidróxibutanoato de etila. ....	42
5.2.6 – Fenil(hidróxi)acetato de etila (mandelato de etila).....	42
5.3 – Crescimento dos microrganismos .....	43
5.4 –Biorreduções das cetonas .....	43
5.5- Desracemização dos alcoóis.....	44
5.6 – Alcoóis enantiomericamente enriquecidos: .....	45
5.6.1 – ( <i>S</i> )-1-feniletanol.....	45
5.6.2 - ( <i>R</i> )-1-feniletanol .....	45
5.6.3- ( <i>S</i> )-3-fenil-3-hidróxipropanoato de etila.....	46
5.6.4 – ( <i>S</i> )-4-fenil-2-hidróxibutanoato de etila .....	46
5.6.5 – ( <i>R</i> )-mandelato de etila.....	46
5.6.6 – ( <i>S</i> )-mandelato de etila.....	47
6-Referências bibliográficas .....	48
Anexos I: Espectros de RMN, IV e massas.....	50
Anexo II – Cromatogramas.....	62

## Índice de Tabelas

<b>Tabela 1:</b> Preparo dos padrões de alcoóis a partir da redução das respectivas cetonas com NaBH <sub>4</sub> em etanol por cerca de 1 hora .....	15
<b>Tabela 2:</b> Redução de <b>1</b> catalisada por <i>S. cerevisiae</i> tipo II .....	16
<b>Tabela 3:</b> Redução da acetofenona adsorvida em matriz de celulose catalisada por <i>S. cerevisiae</i> tipo II.....	17
<b>Tabela 4:</b> Estudo da desracemização de <b>2</b> com <i>S.cerevisiae</i> tipo I na presença e ausência de resina Amberlite XAD-7 .....	18
<b>Tabela 5:</b> Desracemização de <b>2</b> com <i>S. cerevisiae</i> tipo II na ausência e presença de resina Amberlite XAD-7 .....	19
<b>Tabela 6:</b> Estudo da desracemização de <b>2</b> catalisada por <i>Candida albicans</i> obtida pelo <b>Método A e Método B</b> .....	20
<b>Tabela 7:</b> Estudo da desracemização de <b>2</b> em atmosfera de N <sub>2</sub> com <i>Candida albicans</i> obtida pelo <b>Método B</b> .....	21
<b>Tabela 8:</b> Estudo do comportamento de (S)- <b>2</b> com <i>C. albicans</i> obtida pelo <b>Método B</b>	22
<b>Tabela 9:</b> Estudo da redução de <b>3</b> com <i>S. cerevisiae</i> tipo II na ausência e presença de resina XAD-7. ....	24
<b>Tabela 10:</b> Estudo da redução de <b>3</b> com <i>Candida albicans</i> obtida pelo <b>Método B</b> .....	24
<b>Tabela 11:</b> Redução de <b>5</b> com <i>S. cerevisiae</i> tipo II na presença e ausência de resina XAD-7.....	25
<b>Tabela 12:</b> Estudo da redução de <b>7</b> com <i>S. cerevisiae</i> tipo II. ....	27
<b>Tabela 13:</b> Estudo da desracemização de <b>8</b> com <i>Candida albicans</i> obtida pelo <b>Método A e Método B</b> .....	28
<b>Tabela 14:</b> Estudo da desracemização de <b>8</b> com <i>S. cerevisiae</i> tipo II .....	28
<b>Tabela 15:</b> Estudo da redução de <b>10</b> com <i>S. cerevisiae</i> tipo II .....	29
<b>Tabela 16:</b> Desracemização de <b>11</b> com <i>C. albicans</i> obtida pelo <b>Método A e Método B</b> .....	30
<b>Tabela 17:</b> Desracemização de <b>11</b> com <i>S. cerevisiae</i> tipo II.....	31
<b>Tabela 18:</b> Variação de algumas condições na desracemização de <b>11</b> com <i>S. cerevisiae</i> tipo II, com 2 horas de reação .....	31

<b>Tabela 19:</b> Biorredução de <b>14</b> com <i>S. cerevisiae</i> tipo II na presença e ausência de resina XAD-7.....	33
<b>Tabela 20:</b> Estudo da desracemização de <b>15</b> com <i>Candida albicans</i> obtida pelos <b>Métodos A e B</b> .....	34
<b>Tabela 21:</b> Estudo da desracemização de <b>15</b> com <b>S. cerevisiae</b> tipo II.....	34

## Índice de Figuras

<b>Figura 1:</b> Redução do piruvato a L-lactato por lactato desidrogenase dependente de NADH. ....	3
<b>Figura 2:</b> Redução do 4-cloroacetoacetato de etila catalisada por microrganismos para obtenção do (S)-4-cloro-3-hidróxibutanoato de etila.....	4
<b>Figura 3:</b> Esquema de redução de cetona e oxidação de alcoóis secundários por ADHs. ....	5
<b>Figura 4:</b> Oxidação do (1 <i>R</i> ,2 <i>S</i> )-1-fenil-1,2-fenilpropanodiol com <i>S. cerevisiae</i> previamente condicionado por 2 dias. ....	5
<b>Figura 5:</b> Resolução cinética oxidativa de derivados do 1-feniletanol por <i>A. atrocyaneus</i> . ....	6
<b>Figura 6:</b> Esquema de desracemização de alcoóis secundários: (A) estereoinversão e (B) resolução cinética dinâmica.....	7
<b>Figura 7:</b> Esquema de desracemização por estereoinversão empregando células de <i>A. faecalis</i> e uma ADH <i>S</i> -estereosseletiva. ....	8
<b>Figura 8:</b> Desracemização do mandelato de etila por estereoinversão. ....	8
<b>Figura 9:</b> Desracemização de 2-hidróxi-1-tetralona por <i>T. cutaneum</i> .....	9
<b>Figura 10:</b> Desracemização de 2-hidróxi-1-indanona com células de <i>T. cutaneum</i> . ....	10
<b>Figura 11:</b> Mecanismo de racemização do 1-feniletanol com complexo de ( $\eta^5$ -Ph <sub>5</sub> C <sub>5</sub> )Ru(CO) <sub>2</sub> Cl.....	11
<b>Figura 12:</b> Mecanismo do processo enantioconvergente para obtenção de ( <i>R</i> ) alcoóis secundários utilizando 2 enzimas isoladas PISA1 e PAS. ....	12
<b>Figura 13:</b> Mecanismo de desracemização de carbinóis arilalquílicos por hidrólise enzimática enantiosseletiva seguida de esterificação de Mitsunobu.....	13
<b>Figura 14:</b> Estrutura dos alcoóis que foram estudados. ....	14
<b>Figura 15:</b> Reação de redução da acetofenona (1) com borohidreto de sódio para preparação do padrão 2. ....	15
<b>Figura 16:</b> Padrões dos alcoóis preparados por redução das respectivas cetonas com NaBH <sub>4</sub> .....	16
<b>Figura 17:</b> Biorredução de acetofenona (1) catalisada por <i>S. cerevisiae</i> tipo II.....	16

<b>Figura 18:</b> Desracemização de <b>2</b> com <i>S. cerevisiae</i> .....	18
<b>Figura 19:</b> Desracemização de <b>2</b> catalisada por <i>C. albicans</i> . A etapa <b>A</b> consiste na oxidação do enantiômero ( <i>S</i> )- <b>2</b> , gerando a cetona <b>1</b> , deixando o enantiômero ( <i>R</i> )- <b>2</b> intacto. Na etapa <b>B</b> , ocorre a redução de <b>1</b> obtendo 100% do enantiômero ( <i>R</i> )- <b>2</b> .....	20
<b>Figura 20:</b> Progresso da reação de desracemização do <i>rac</i> - <b>2</b> em atmosfera de N <sub>2</sub> catalisada por <i>C. albicans</i> preparada pelo <b>Método B</b> .....	21
<b>Figura 21:</b> Estudo do comportamento de ( <i>S</i> )- <b>2</b> com <i>C. albicans</i> obtida pelo <b>Método B</b> .....	22
<b>Figura 22:</b> Biorredução de <b>3</b> com células de <i>S. cerevisiae</i> tipo II.....	23
<b>Figura 23:</b> Redução de <b>5</b> com <i>S. cerevisiae</i> tipo II.....	25
<b>Figura 24:</b> Biorredução de <b>7</b> com <i>S. cerevisiae</i> tipo II.....	26
<b>Figura 25:</b> Estudo da desracemização de <b>8</b> com <i>C. albicans</i> .....	27
<b>Figura 26:</b> Estudo da desracemização de <b>8</b> com <i>S. cerevisiae</i> tipo II.....	28
<b>Figura 27:</b> Redução de <b>10</b> com <i>S. cerevisiae</i> tipo II.....	29
<b>Figura 28:</b> Desracemização de <b>11</b> com <i>C. albicans</i> .....	30
<b>Figura 29:</b> Reação de desracemização de <b>11</b> com <i>S. cerevisiae</i> .....	31
<b>Figura 30:</b> Redução de <b>14</b> com <i>S. cerevisiae</i> tipo II, produzindo o ( <i>R</i> )- <b>15</b> .....	32
<b>Figura 31:</b> Desracemização de <b>15</b> com <i>C. albicans</i> .....	33
<b>Figura 32:</b> Desracemização de <b>15</b> com <i>S. cerevisiae</i> tipo II.....	34

## **Anexos I: Espectros de RMN, IV e massas**

<b>Espectro 1:</b> Espectro de RMN de $^1\text{H}$ (250 MHz) de 1-feniletanol (2).	50
<b>Espectro 2:</b> Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ (125 MHz) de 1-feniletanol (2).	50
<b>Espectro 3:</b> Espectro de massas (EI, 70 eV) de 1-feniletanol (2).	51
<b>Espectro 4:</b> Espectro de IV (filme em NaCl) de 1-feniletanol (2).	51
<b>Espectro 5:</b> Espectro de RMN de $^1\text{H}$ (500 MHz) de 2-cloro-1-feniletanol (4).	52
<b>Espectro 6:</b> Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ (150 MHz) de 2-cloro-1-feniletanol (4).	52
<b>Espectro 7:</b> Espectro de massas (EI, 70 eV) de 2-cloro-1-feniletanol (4).	53
<b>Espectro 8:</b> Espectro de IV (filme em NaCl) de 2-cloro-1-feniletanol (4).	53
<b>Espectro 9:</b> Espectro de RMN de $^1\text{H}$ (500 MHz) de 4-cloro-3-hidróxibutanoato de etila (6).	54
<b>Espectro 10:</b> Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ (62,5 MHz) de 4-cloro-3-hidróxibutanoato de etila (6).	54
<b>Espectro 11:</b> Espectro de massas (EI, 70 eV) de 4-cloro-3-hidróxibutanoato de etila (6).	55
<b>Espectro 12:</b> Espectro de IV (filme em NaCl) de 4-cloro-3-hidróxibutanoato de etila (6).	55
<b>Espectro 13:</b> Espectro de RMN de $^1\text{H}$ (500 MHz) de 3-fenil-3-hidróxipropanoato de etila (8).	56
<b>Espectro 14:</b> Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ (150 MHz) de 3-fenil-3-hidróxipropanoato de etila (8).	57
<b>Espectro 15:</b> Espectro de massas (EI, 70 eV) de 3-fenil-3-hidróxipropanoato de etila (8).	57
<b>Espectro 16:</b> Espectro de IV (filme em NaCl) de 3-fenil-3-hidróxipropanoato de etila (8).	57
<b>Espectro 17:</b> Espectro de RMN de $^1\text{H}$ (500 MHz) de 4-fenil-2-hidróxibutanoato de etila (11).	58
<b>Espectro 18:</b> Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ (150 MHz) de 4-fenil-2-hidróxibutanoato de etila	58
<b>Espectro 19:</b> Espectro de massas (EI, 70 eV) de 4-fenil-2-hidróxibutanoato de etila (11).	59

<b>Espectro 20:</b> Espectro de IV (filme) de 4-fenil-2-hidróxibutanoato de etila ( <b>11</b> ). .....	59
<b>Espectro 21:</b> Espectro de RMN de $^1\text{H}$ (250 MHz) de fenil(hidróxi)acetato de etila ( <b>15</b> ). .....	60
<b>Espectro 22:</b> Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ (150 MHz) de fenil(hidróxi)acetato de etila ( <b>15</b> ). .....	60
Espectro 23: Espectro de massas (EI, 70 eV) de fenil(hidróxi)acetato de etila ( <b>15</b> ). ....	61
<b>Espectro 24:</b> Espectro de IV (filme em NaCl) de fenil(hidróxi)acetato de etila ( <b>15</b> ). ....	61

## **Anexo II: Cromatogramas**

<b>Cromatograma 1:</b> Separação de <i>rac-2</i> por CLAE.....	62
<b>Cromatograma 2:</b> Análise de <b>2</b> por CLAE após biocatálise: <b>(A)</b> ( <i>R</i> )- <b>2</b> , <b>(B)</b> ( <i>S</i> )- <b>2</b> . .....	62
<b>Cromatograma 3:</b> Separação de <i>rac-4</i> por CLAE.....	63
<b>Cromatograma 4:</b> Separação de <i>rac-6</i> por CG-DIC.....	63
<b>Cromatograma 5:</b> <b>(A)</b> separação de <i>rac-8</i> por CLAE e <b>(B)</b> ( <i>S</i> )- <b>8</b> enriquecido após biocatálise.....	64
<b>Cromatograma 6:</b> <b>(A)</b> separação de <i>rac-11</i> por CLAE e <b>(B)</b> análise do ( <i>S</i> )- <b>11</b> após biocatálise.....	64
<b>Cromatograma 7:</b> Separação de <i>rac-15</i> por CLAE.....	65
<b>Cromatograma 8:</b> <b>(A)</b> análise de ( <i>R</i> )- <b>15</b> por CLAE após biocatálise e <b>(B)</b> análise de ( <i>S</i> )- <b>15</b> após biocatálise.....	65

# 1- Introdução

## 1.1 - Biocatálise

A biocatálise, utilização de enzimas livres ou células íntegras como catalisadores em reações de química orgânica, é uma importante ferramenta sintética na criação e resolução de centros assimétricos, pois além de possuir uma alta quimio, diastereo e enantiosseletividade, é ambientalmente compatível, utiliza condições reacionais brandas, o que minimiza os problemas causados por reações paralelas e degradações químicas além de catalisar um amplo espectro de reações orgânicas<sup>1-3</sup>. Essas características se enquadram nos fundamentos da química verde<sup>4</sup>.

No entanto há algumas inconveniências na utilização de biocatalisadores que limitam sua aplicação na área de síntese orgânica, como por exemplo: a necessidade da utilização de cofatores, como NADH e NAD(P)H, que possuem um custo proibitivo em quantidades equimolares. A restrita margem para a variação de parâmetros reacionais como pressão, temperatura, pH e a máxima atividade dos biocatalisadores em água entretanto, é um solvente pouco adequado para reações em síntese orgânica, devido ao seu elevado ponto de ebulição calor de vaporização e baixa solubilidade da maioria dos substratos orgânicos. Tais fatores foram significativamente amenizados nos últimos anos pelo desenvolvimento e aperfeiçoamento de diversas técnicas de reações catalisadas por microrganismos e enzimas. Algumas das modificações mais comuns são o uso de solventes orgânicos, a adição de inibidores enzimáticos e técnicas de imobilização e de reciclagem de cofatores<sup>2</sup>.

Uma vez que as células dos microrganismos se mantêm mais estáveis em água, faz-se necessário o uso deste solvente nas reações de biocatálise com células de microrganismos. No entanto, a maioria dos substratos estudados nesses processos biocatalíticos apresentam baixa solubilidade em água. Para contornar esse impasse faz-se necessário o uso de ferramentas para facilitar a dispersão do substrato no meio reacional.

Uma opção é a utilização de polímeros hidrofóbicos como Amberlite® XAD-7 para adsorver o substrato, pois atua como um reservatório tanto do substrato como do produto formado durante a reação, liberando baixas quantidades do substrato e adsorvendo o produto formado. Ao final da reação, grande parte do produto encontra-se

adsorvido na resina, sendo necessária apenas uma filtração seguida de extração para isolar o produto, e a resina pode ser reutilizada em outra reação. Essa característica confere um aumento na enantiosseletividade, evita um possível efeito inibitório e até reduz uma eventual toxicidade devido à baixa concentração do substrato e produto no meio. Essa metodologia permite ainda a realização de biotransformações em escala preparativa<sup>5,6</sup>. Outra alternativa utilizada é matriz de celulose (papel de filtro), no qual o substrato adsorvido é liberado lentamente ao meio reacional, melhorando os resultados de biocatálise.

## 1.2 - Enzimas

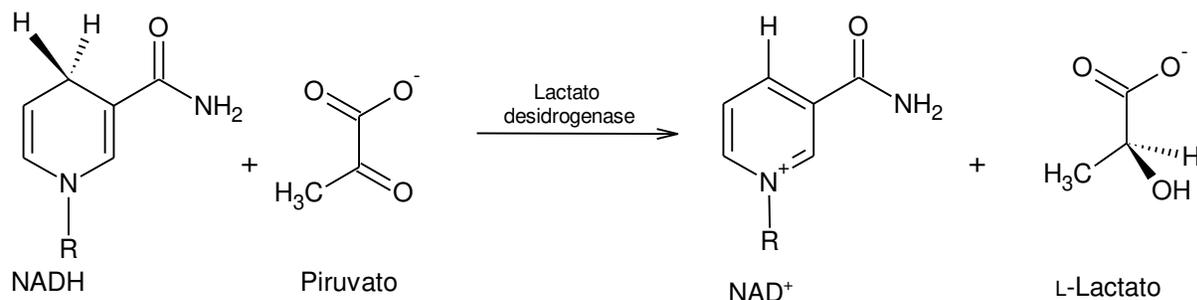
Enzimas são constituídas de cadeias peptídicas, com exceção de um pequeno grupo de moléculas de RNA catalíticas, e possuem uma estrutura tridimensional determinada predominantemente pela sua sequência primária e secundária. A estrutura enzimática é mantida (fortemente) por ligações de hidrogênio intra e intermoleculares e com a camada superficial de água, pelas interações de van de Waals das cadeias alifáticas, interações  $\pi - \pi$  de unidades aromáticas, interações eletrostáticas de grupos carregados, e também pelas ligações covalentes de dissulfetos<sup>2</sup>. Suas atividades catalíticas dependem da integridade da conformação da proteína. Se uma enzima é desnaturada ou dissociada em suas subunidades, a atividade catalítica geralmente é perdida<sup>7</sup>.

Elas são classificadas de acordo com tipo de reação que catalisam, sendo divididas em seis categorias:

- Oxireduases: catalisam reações de oxidação-redução, oxigenação de ligações C-H, C-C e C=C, ou reações de adição e remoção de hidrogênio;
- Transferases: catalisam reações que envolvem a transferência de grupos acil, açúcares, fosforil, grupos aldeído e cetona, de uma molécula para outra;
- Hidrolases: mediam reações de hidrólise ou formação de ésteres, amidas, lactonas, epóxidos, nitrilas, anidridos, glicosídeos e haletos orgânicos;
- Liases: participam de reações de adição e eliminação de moléculas pequenas em ligações C=C, C=N e C=O;
- Isomereases: realizam isomerizações, como racemizações, epimerizações e rearranjos;

- Ligases: auxiliam na formação e quebra de ligações C-O, C-S, C-N, C-C e ésteres de fosfatos;

As desidrogenases são enzimas classificadas como oxirredutases e são utilizadas em reduções de grupos carbonílicos de cetonas ou aldeídos e de ligações C=C. Estas enzimas são dependentes dos cofatores NAD<sup>+</sup> (dinucleotídeo de nicotinamida-adenina) e NADP<sup>+</sup> (fosfato de dinucleotídeo de nicotinamida), independentem de oxigênio molecular (O<sub>2</sub>) e atuam transferindo diretamente o ânion hidreto para o cofator oxidado NAD(P)<sup>+</sup> ou do cofator reduzido NAD(P)H para o substrato<sup>7</sup> (**Figura 1**).



**Figura 1:** Redução do piruvato a L-lactato por lactato desidrogenase dependente de NADH.

Uma grande variedade de cetonas pode ser reduzida enantioselectivamente utilizando-se álcool desidrogenases (ADHs) para fornecer álcoois secundários enantiomericamente enriquecidos<sup>8-10</sup>. Durante o curso da reação, a enzima pode adicionar o hidreto, preferencialmente pela face *Re* ou pela face *Si* da cetona para fornecer, os alcoóis (*S*) ou (*R*) respectivamente<sup>6,11-14</sup>.

### 1.3 - Relevância do estudo

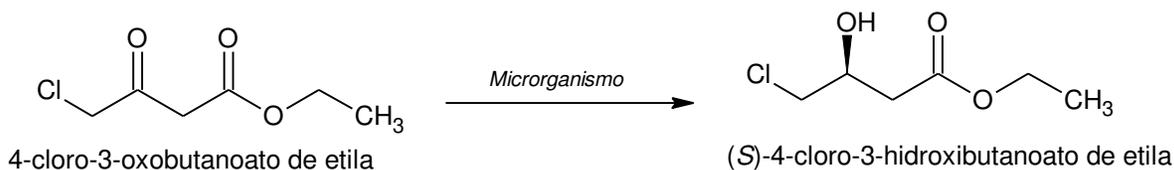
A obtenção de alcoóis enantiomericamente puros é de grande interesse visto a vasta utilização destes como bloco construtor de moléculas biologicamente ativas. β-hidróxi-ácidos e seus derivados são importantes na síntese de fármacos como antibióticos beta-lactâmicos<sup>15,16</sup>, lipídio A<sup>17</sup> e L-carnitina<sup>18</sup>. (*S*)-β-bloqueadores como propanolol, alprenolol<sup>19</sup>. Taxol apresenta um amino derivado de (*S*)-β-hidróxi-éster em sua estrutura<sup>20</sup>. 3-fenil-3-hidróxi-propanoato de etila é o precursor da fluoxetina<sup>21</sup>.

(*R*)-4-fenil-2-hidróxibutanoato de etila e (*S*)-4-fenil-2-hidróxibutanoato de etila são α-hidróxi ésteres sintéticos, que apresentam grande importância para química sintética por serem empregados na síntese de benazepril, enalapril, lisinopril, ramipril e

aquinapril, inibidores da enzima conversora de angiotensina anti-hipertensivos usados em tratamentos cardiovasculares<sup>22-26</sup>.

A obtenção de alcoóis secundários enantiomericamente puros pode ocorrer de forma química<sup>27</sup>, enzimática ou quimio-enzimática<sup>28</sup>. A forma enzimática pode ser por reduções de cetonas pró-quirais<sup>11,29-31</sup>, resolução cinética dinâmica<sup>32,33</sup>, resolução cinética oxidativa<sup>34</sup>, desracemização de alcoóis secundários<sup>35-38</sup>, processos enantioconvergentes<sup>39</sup> entre outros.

Um exemplo da enantiosseletividade das reduções de alcoóis secundários a partir de microrganismos pode ser observado na obtenção do β-hidróxi-éster (S)-4-cloro-3-hidróxibutanoato de etila é um intermediário da síntese de (S)-lagueninas B e C<sup>40</sup>, inibidor de HMG-CoA redutases<sup>41</sup> (**Figura 2**). Ribeiro *et al.* 2009, estudaram a obtenção de (S)-4-cloro-3-hidróxibutanoato de etila a partir da redução do 4-cloroacetoacetato de etila com vários microrganismos diferentes. Observou-se que em 24 horas de reação com *S. cerevisiae*, apenas 63% do álcool (S) com 81% de ee<sup>42</sup>. Já Kaliaperumal *et al.* 2009, com células de *Candida parapsilosis* ATCC 7330 observaram a redução de 4-cloroacetoacetato de etila com apenas 10 minutos de reação e 96% de rendimento do produto (S)-4-cloro-3-hidróxibutanoato de etila com 99% de ee. Também foi verificado que a adição de 50 g.L<sup>-1</sup> de glicose aumenta a taxa de redução<sup>43</sup>. Esses exemplos mostram claramente que diferentes microrganismos podem apresentar diferentes enzimas que catalisam uma determinada reação.

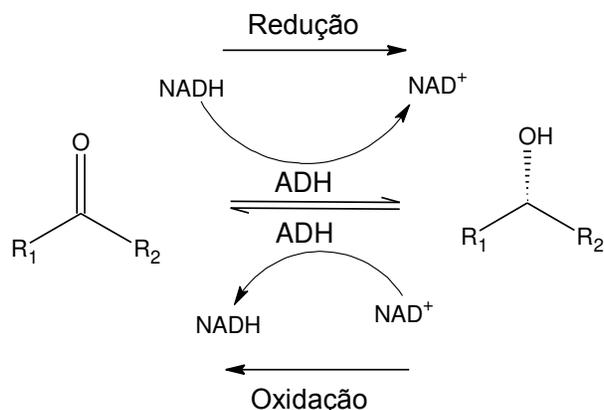


**Figura 2:** Redução do 4-cloroacetoacetato de etila catalisada por microrganismos para obtenção do (S)-4-cloro-3-hidróxibutanoato de etila.

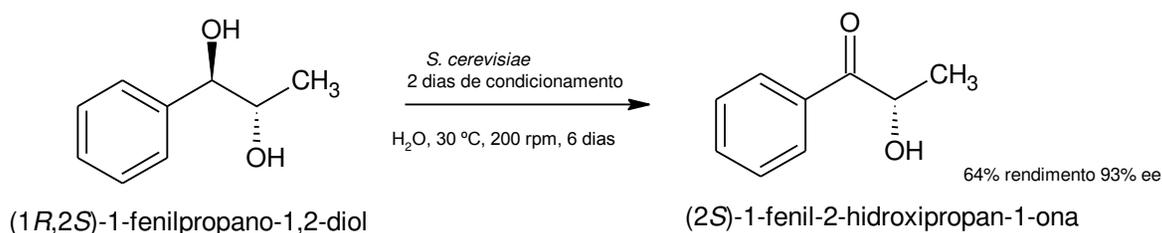
O esquema de redução de cetonas e oxidação de alcoóis secundários por ADHs está apresentado na **Figura 3**. Essas enzimas são dependentes de cofatores e catalisam tanto a reação de redução de cetonas (oxidação do cofator NADH) quanto a oxidação de alcoóis ( redução do cofator oxidado NAD<sup>+</sup>).

O tempo de incubação em água destilada (condicionamento) é fundamental para deixar o microrganismo ávido pelo substrato. Nesse período o microrganismo consome

as fontes de carbono presente no meio e pode ativar ou desativar algumas enzimas e após a adição do substrato, utiliza este para regeneração de NAD(P)H aumentando consideravelmente a velocidade de oxidação. Martins *et al.* 2011 observaram que 2 dias de condicionamento do *S. cerevisiae* foram necessários para oxidação de 1-fenil-1,2-propanodiol mais eficientemente<sup>44</sup> (**Figura 4**).



**Figura 3:** Esquema de redução de cetona e oxidação de alcoóis secundários por ADHs.

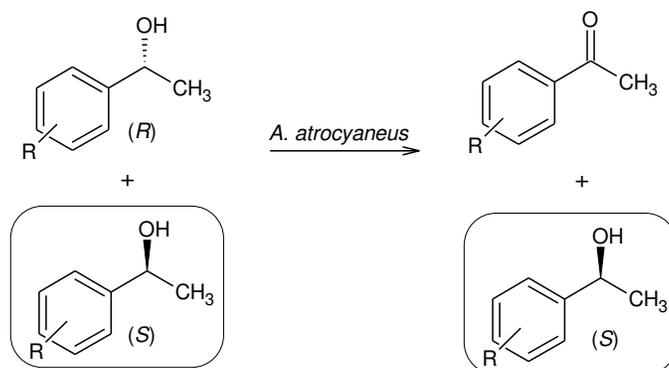


**Figura 4:** Oxidação do (1*R*,2*S*)-1-fenil-1,2-fenilpropanodiol com *S. cerevisiae* previamente condicionado por 2 dias.

O uso da biocatálise em oxidação de compostos orgânicos tem sido bastante estudado visto a importância em resolução cinética oxidativa de alcoóis e amins secundários<sup>1,32,44,45</sup>.

A resolução cinética oxidativa de alcoóis secundários consiste na oxidação de um dos enantiômeros. Partindo de uma mistura racêmica, obtém-se 50% do antípoda que não reagiu e 50% da respectiva cetona. Silva *et al.* 2012, utilizando *Arthrobacter atrocyaneus* (R1AF57) (bactéria isolada de solo da Floresta Amazônica) realizaram estudo da resolução cinética oxidativa do 1-feniletanol e seus derivados (**Figura 5**). De

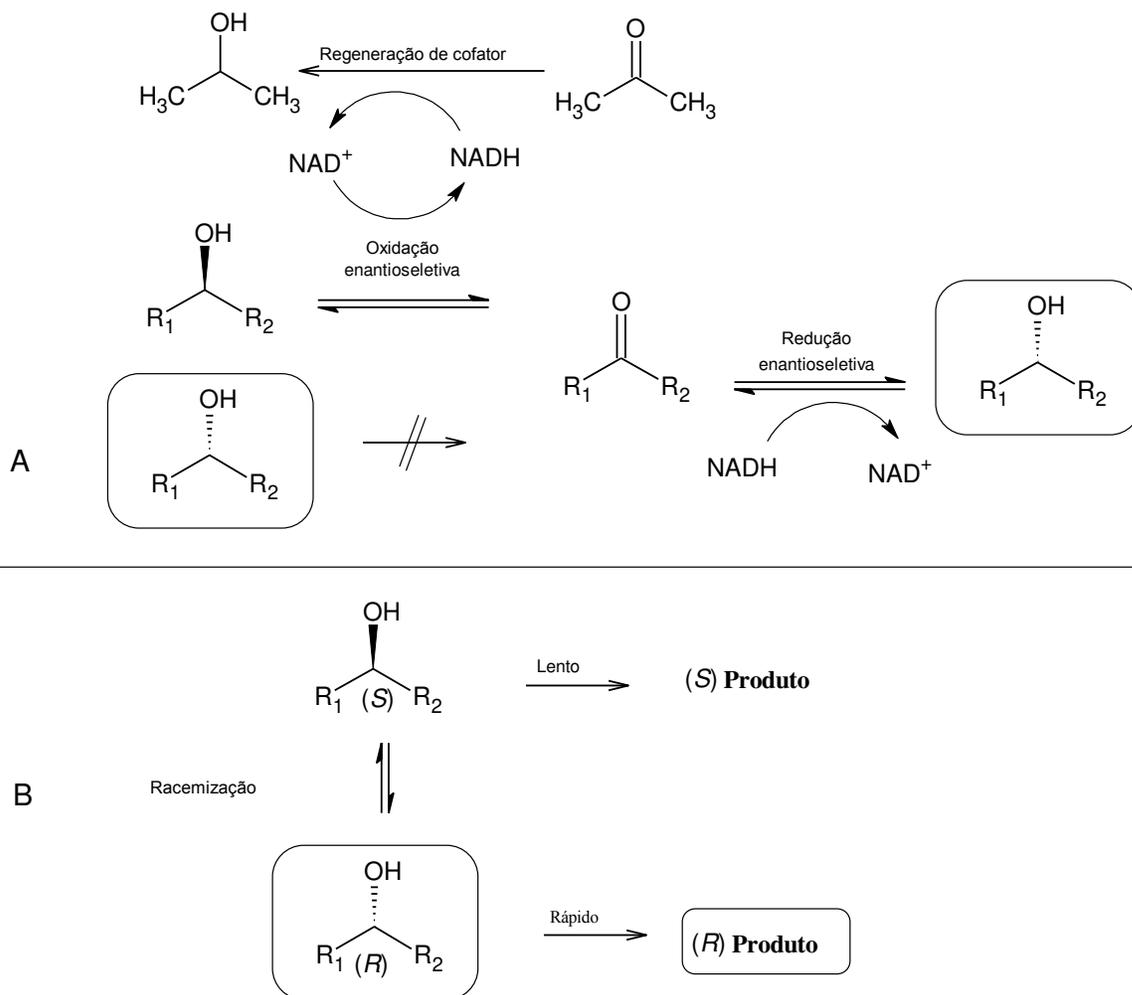
modo geral, a metodologia aplicada permitiu a obtenção de 50% do enantiômero (*S*) (ee 99%) e todo o enantiômero (*R*) foi convertido para a respectiva cetona. Observou-se que a etapa de oxidação do álcool é dificultada pela presença de halogênios no anel aromático e também por substituintes na posição *orto*.<sup>34</sup>



**Figura 5:** Resolução cinética oxidativa de derivados do 1-feniletanol por *A. atrocyaneus*.

A desracemização foi um processo fundamental no estabelecimento da vida<sup>46</sup> e trata-se de uma metodologia verde que atende aos princípios de sustentabilidade ambiental e que apresenta um baixo fator ambiental E (quanto menor o valor de E maior é a sustentabilidade)<sup>4</sup>. O procedimento apresenta também 100% de economia de átomos, o que não ocorre com a maioria dos procedimentos químicos.

A desracemização de alcoóis secundários pode ocorrer por estereoinversão ou resolução cinética dinâmica (DKR). A estereoinversão enzimática consiste na oxidação seletiva de um dos enantiômeros seguida da redução seletiva da cetona para o outro enantiômero (**Figura 6A**)<sup>47</sup>. Nesse mecanismo de desracemização faz-se necessário o uso de cetona de sacrifício, geralmente acetona, para reciclar os cofatores e facilitar a etapa de oxidação<sup>38,44</sup>. A desracemização via DKR (**Figura 6B**) consiste na racemização química ou enzimática do álcool e uma segunda reação rápida para um dos enantiômeros, favorecendo a formação majoritária de um produto quiral<sup>48</sup>.

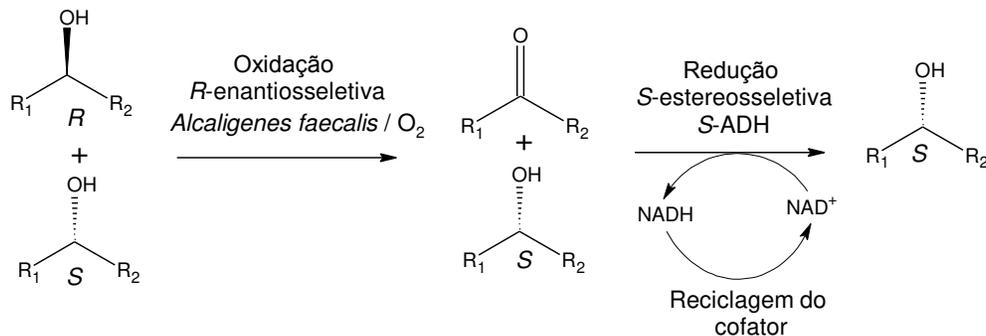


**Figura 6:** Esquema de desracemização de alcoóis secundários: **(A)** estereoinversão e **(B)** resolução cinética dinâmica.

Geralmente se emprega a biocatálise com dois microrganismos para desracemização de alcoóis secundários, na qual um microrganismo faz a oxidação enantiosseletiva de um enantiômero enquanto o outro possui uma redutase específica para formar o antípoda. Também é comum o uso de enzimas específicas isoladas para catalisar esse tipo de reação.

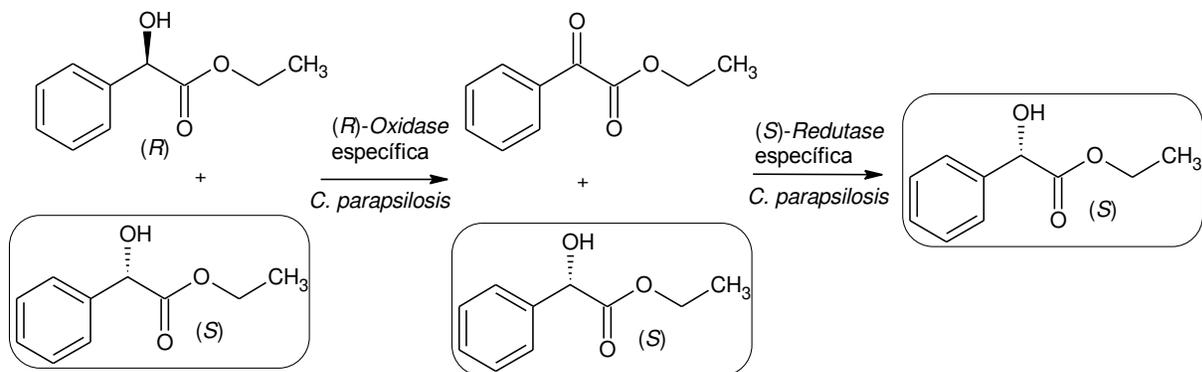
Um exemplo do emprego desse sistema com um microrganismo especializado em oxidação com uma oxidase (*R*)-enantioespecífica dependente de oxigênio molecular, *Alcaligenes faecalis* e uma redutase (*S*)-estereosseletiva álcool desidrogenase isolada de *Rhodococcus ruber* foi estudado por Voss *et al.* 2008 (**Figura 7**), que observaram a desracemização de vários alcoóis secundários como 1-feniletanol, 2-octanol, 2-dodecanol, 1-fenil-2-propanol entre outros e obtiveram 99% de produtos

com configuração *S* e 99% de ee para maioria dos substratos. Para reciclagem do cofator foi utilizado 2-propanol 5% v/v ou glicose com glicose desidrogenase<sup>36,48-50</sup>.



**Figura 7:** Esquema de desracemização por estereoinversão empregando células de *A. faecalis* e uma ADH *S*-estereosseletiva.

Um exemplo de desracemização por estereoinversão foi observado por Chadha *et al.* 2005 no preparo de  $\alpha$  e  $\beta$ -hidróxi-ésteres enantiomericamente enriquecidos, blocos construtores de várias moléculas bioativas importantes. Foi estudada a desracemização de 4-fenil-2-hidróxibutanoato de etila e metila, também dos ésteres mandelato de etila e metila, com células de *Candida parapsilosis* (ATCC 7330), constatou-se a desracemização dos alcoóis com apenas uma hora de reação obtendo 87% do (*S*)-2-hidróxi-4-fenilbutanoato de etila (99% ee)<sup>51,52</sup>. A **Figura 8** apresenta a desracemização do mandelato de etila.

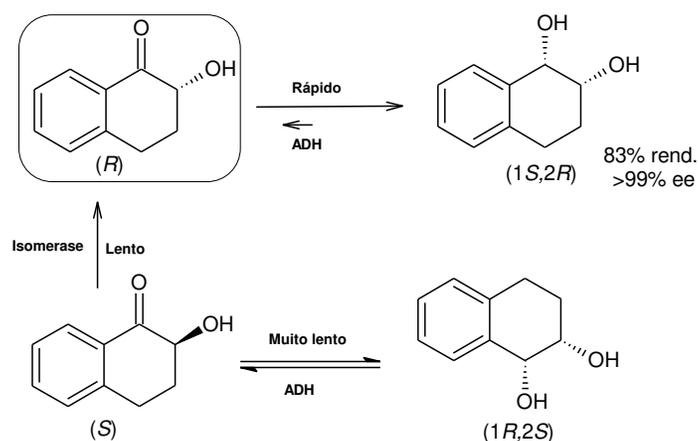


**Figura 8:** Desracemização do mandelato de etila por estereoinversão.

Magallanes-Noguera *et al.* 2012, no estudo da oxidação de alcoóis secundários com células de plantas observaram que a *Gardenia jasminoides* apresentou melhor estereosseletividade, e o estudo quimio-enzimático utilizando as células imobilizadas em alginato de cálcio para oxidar (*S*)-1-feniletanol e borohidreto de sódio para reduzir a cetona formada obtiveram ao final de 7 ciclos de reações o (*R*)-1-feniletanol rendimento

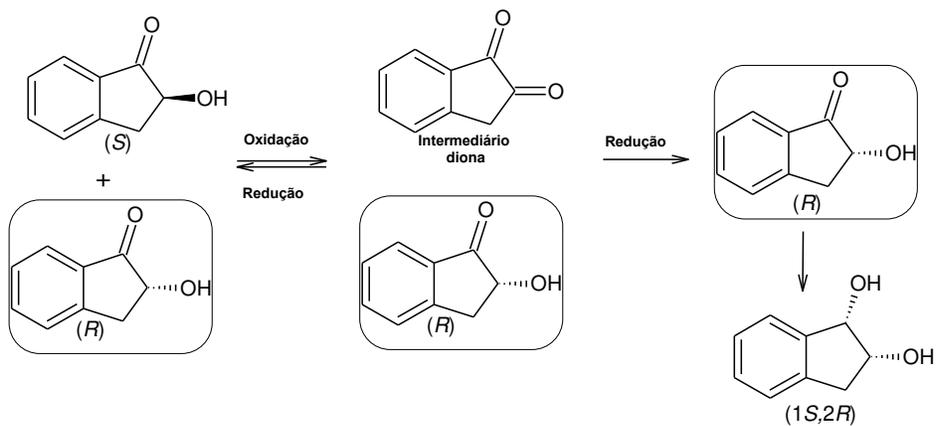
de 87% com 98% de excesso enantiomérico<sup>28</sup>. Nakamura *et al* 2005 na desracemização do *rac*-1-feniletanol com células de *Geotrichum candidum* IFO 5767 concluíram que o processo ocorreu por estereoinversão, em que o (*S*)-1-feniletanol foi oxidado e a acetofenona formada foi reduzida para o enantiômero *R* e com apenas 24 horas de reação. O (*R*)-1-feniletanol foi obtido com 97% de ee e 96% de rendimento<sup>53,54</sup>.

Lunardi *et al.* 2007, realizaram estudo sobre a desracemização de 2-hidróxi-1-tetralona com *Trichosporun cutaneum*, obtendo 83% do diol *cis*-(1*S*,2*R*) com 99% ee. A partir de vários experimentos concluiu-se que o mecanismo de reação ocorre via DKR: uma isomerase atua na hidroxila do (*R*)-2-hidróxi-1-tetralona gerando o outro enantiômero e que a redução da carbonila deste para o diol (1*S*,2*R*) ocorre rapidamente<sup>55</sup> (Figura 9).



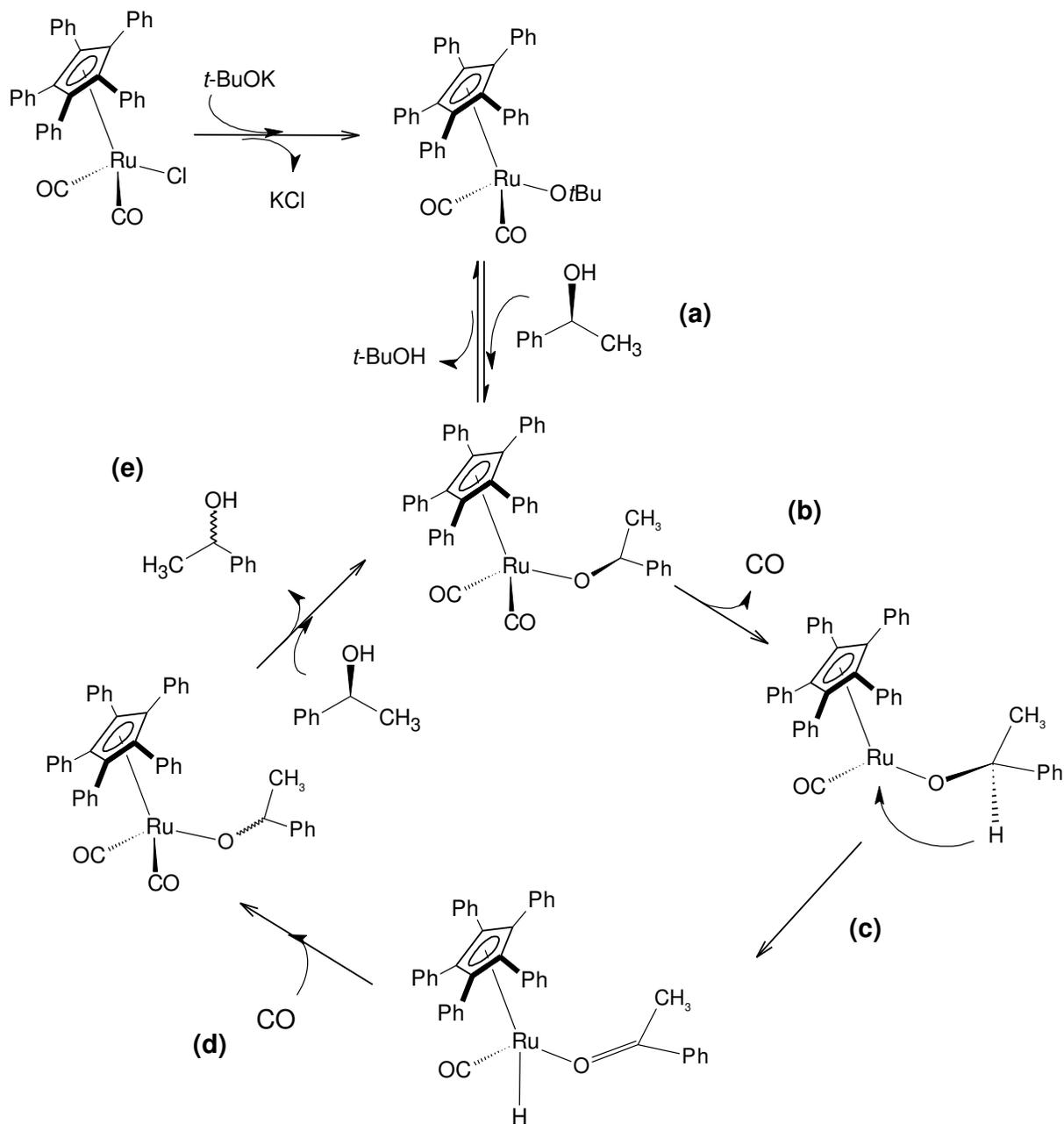
**Figura 9:** Desracemização de 2-hidróxi-1-tetralona por *T. cutaneum*.

Cazetta *et al.* 2007, com estudo mecanístico da desracemização de 2-hidróxi-1-indanona, verificaram a partir de reações dos enantiômeros puros com células de *T. cutaneum*, a formação da dicetona partindo do enantiômero (*S*) e a posterior redução formando o enantiômero (*R*), que foi reduzido ao diol (1*S*,2*R*) com 100% de conversão em 120 horas de reação<sup>56</sup> (Figura 10).



**Figura 10:** Desracemização de 2-hidróxi-1-indanona com células de *T. cutaneum*.

O emprego de complexos de rutênio para realizar a etapa de racemização de alcoóis secundários é bastante estudado no processo de resolução cinética dinâmica<sup>57-64</sup>. O esquema da **Figura 11** apresenta o mecanismo de racemização do 1-feniletanol com o complexo  $(\eta^5\text{-Ph}_5\text{C}_5)\text{Ru}(\text{CO})_2\text{Cl}$  estudado por Bäckvall *et. al.* 2013<sup>57</sup>.

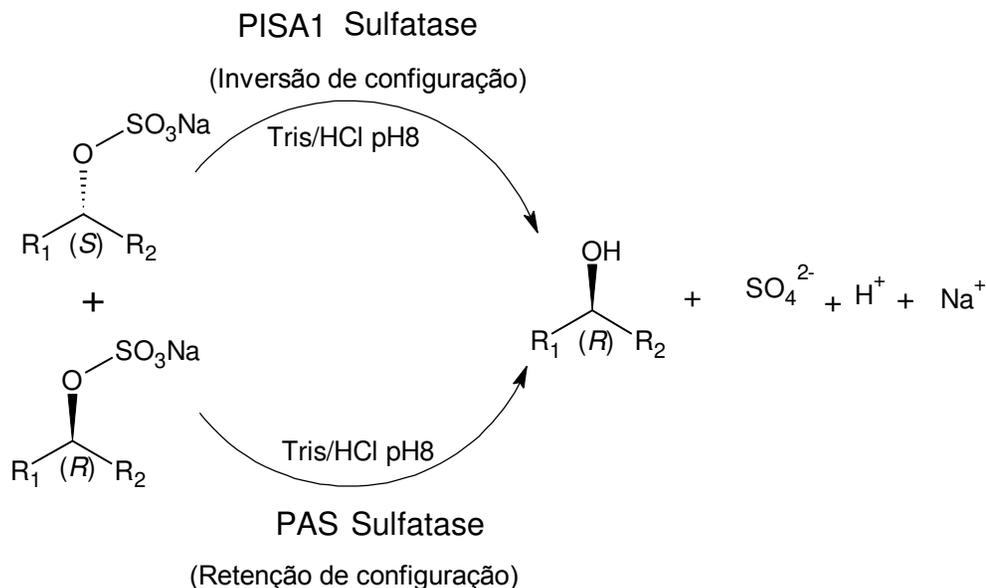


**Figura 11:** Mecanismo de racemização do 1-feniletanol com complexo de  $(\eta^5\text{-Ph}_5\text{C}_5\text{Ru}(\text{CO})_2\text{Cl})$ .

O processo consiste na substituição do terc-butóxido pelo (*S*)-1-feniletanol no rutênio na etapa **a**, saída de um monóxido de carbono na etapa **b**, transferência intramolecular de hidreto (etapa **c**), ligação de um CO no rutênio e a adição do hidreto para o carbono 1 da acetofenona ligada ao rutênio (etapa **d**) que pode ser pela face *Re* ou *Si* formando conseqüentemente uma mistura racêmica do 1-feniletanol. E por fim a substituição do *rac*-1-feniletanol por (*S*)-1-feniletanol (etapa **e**) recomeçando o ciclo de

racemização. Dessa forma obtém-se o rac-1-feniletanol para um processo de resolução cinética dinâmica.

Outra forma de obter alcoóis secundários é por enantioconvergência - conjunto de transformações em que ambos enantiômeros de um substrato quiral são convertidos em um mesmo enantiômero de um produto através de caminhos diferentes<sup>65,66</sup>. Um estudo realizado por Faber e colaboradores, 2013, mostrou a eficiência do processo enantioconvergente utilizando 2 enzimas isoladas: sec-alquilsulfatases PISA1, capaz de catalisar a hidrólise de (alquil) ésteres de sulfatos a partir da clivagem da ligação C-O, facilitando o ataque nucleofílico da água por um mecanismo de substituição nucleofílica bimolecular causando a inversão de configuração do átomo de carbono quiral, e a PAS, que catalisa a clivagem da ligação S-O, mantendo a configuração do carbono quiral, como apresentado na **Figura 12**<sup>39</sup>.

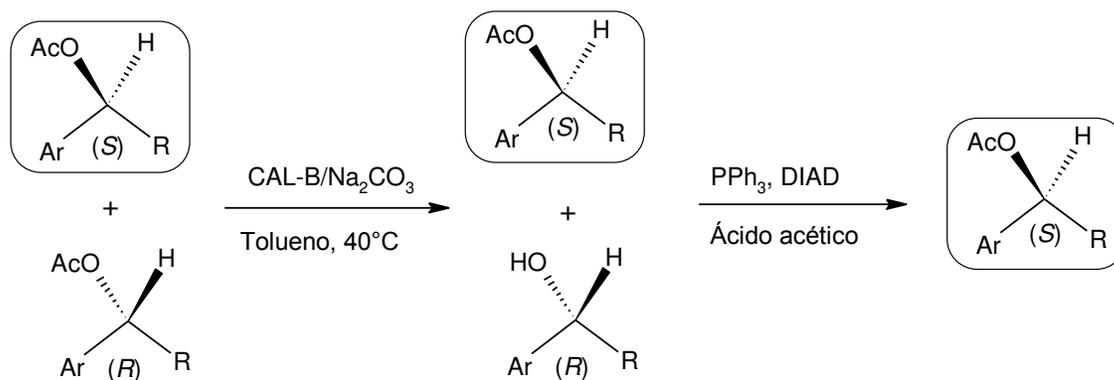


**Figura 12:** Mecanismo do processo enantioconvergente para obtenção de (*R*) alcoóis secundários utilizando 2 enzimas isoladas PISA1 e PAS.

A utilização dessas duas enzimas em um único frasco reacional proporcionou a obtenção de alcoóis secundários com altos valores de ee a partir de mistura racêmica de ésteres de sulfato.

Outro exemplo de aplicação de desracemização foi estudado por Houiene e colaboradores 2013, na obtenção de (*S*)-carbinóis arilalquílicos através da hidrólise enzimática enantiosseletiva de alguns acetatos benzílicos secundários seguido da

esterificação de Mitsunobu do álcool formado (**Figura 13**), proporcionando no final do processo (*S*)-acetatos com ee variando de 75% a 99% e rendimentos de 70% a 89%<sup>67</sup>.

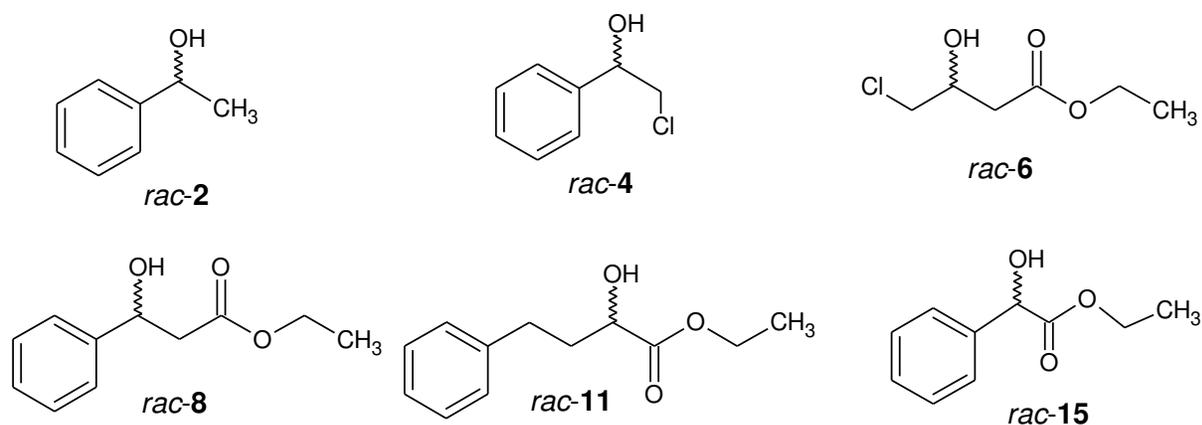


**Figura 13:** Mecanismo de desracemização de carbinóis arilalquílicos por hidrólise enzimática enantiosseletiva seguida de esterificação de Mitsunobu.

## 2-Objetivos

Este projeto teve por objetivos:

- Desenvolver estudos para efetuar a desracemização por estereoinversão de alcoóis secundários (**Figura 14**) empregando células de apenas um microrganismo (especialmente *Saccharomyces cerevisiae* (Aldrich) e *Candida albicans* CCT 5847/18804 adquirida da Fundação André Tosello) existente em nossa coleção.
- Encontrar estruturas de álcoois secundários mais adequadas para obter a estereoinversão com elevada taxa de conversão e enantiosseletividade por variação estrutural, com diferentes grupos retiradores de elétrons nas posições  $\alpha$  e  $\beta$  a hidroxila.
- Otimizar as condições experimentais para obter melhores resultados, como variar o tempo de incubação, quantidade de substrato, uso de material adsorvente como resina Amberlite XAD-7 ou matriz de celulose.

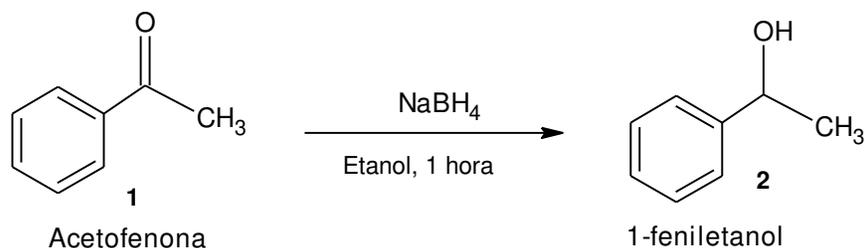


**Figura 14:** Estrutura dos alcoóis que foram estudados.

### 3-Resultados e discussão

#### 3.1-Preparação dos padrões.

A preparação dos álcoois com  $\text{NaBH}_4$  consiste em um ataque nucleofílico do hidreto proveniente do borohidretode sódio à carbonila da cetona pró-quiral, podendo se ligar pela face *Re* ou *Si*, formando uma mistura racêmica do álcool produto. A reação mostrou-se eficaz e rápida possibilitando a obtenção dos padrões dos alcoóis (**Figura 14**) para o estudo de desracemização (**Tabela 1**).

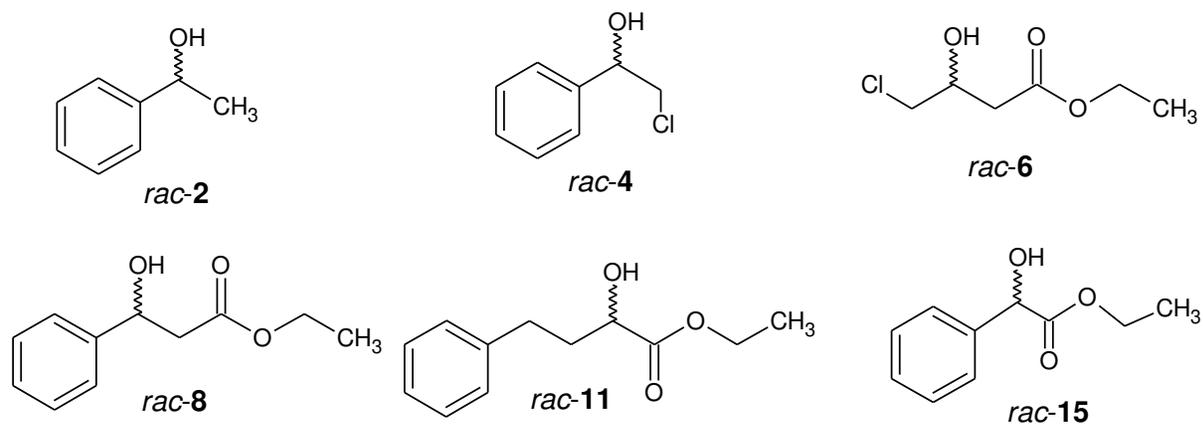


**Figura 15:** Reação de redução da acetofenona (**1**) com borohidreto de sódio para preparação do padrão **2**.

**Tabela 1:** Preparo dos padrões de alcoóis a partir da redução das respectivas cetonas com  $\text{NaBH}_4$  em etanol por cerca de 1 hora

Cetona	Produto	Conversão (%)	Rendimento (%)
1	2	100	88
3	4	100	91
5	6	100	87
7	8	100	93
10	11	100	89
14	15	100	86

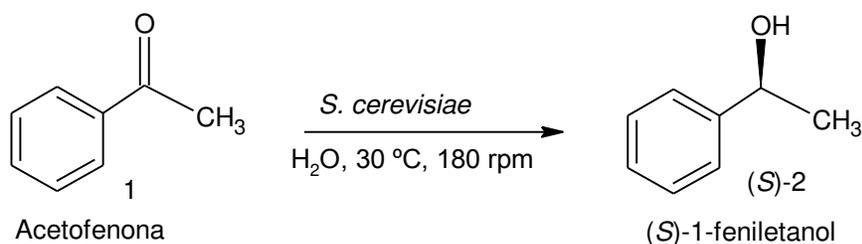
A reação de redução mostrou-se eficaz e rápida, visto que com aproximadamente 1 hora todo o reagente fora consumido e o rendimento isolado da síntese dos padrões foram todos excelentes, superiores a 85%. Os padrões preparados pela redução com  $\text{NaBH}_4$  estão apresentados na **Figura 16**.



**Figura 16:** Padrões dos alcoóis preparados por redução das respectivas cetonas com  $\text{NaBH}_4$ .

### 3.2- 1-feniletanol (2)

A redução da acetofenona (1) (**Figura 17**) catalisada por células de *Saccharomyces cerevisiae* foi estudada na presença e ausência de resina Amberlite XAD-7 (**Tabela 2**).



**Figura 17:** Biorredução de acetofenona (1) catalisada por *S. cerevisiae* tipo

II.

**Tabela 2:** Redução de 1 catalisada por *S. cerevisiae* tipo II

Entrada	Tempo (dias)	Resina (mg)	1 (%)	2 (%)	ee (S) (%)
1	1	400	87	13	nd
2	3	400	64	37	nd
3	4	400	60	40	92
4	1	0	83	17	nd
5	3	0	95	5	nd
6	4	0	91	9	nd

nd = não determinado. As entradas 1-3 correspondem a reações independentes.

O experimento de biorredução de **1** na ausência de resina apresentou baixa conversão, cerca de 10% de formação do álcool **2**, enquanto na presença da resina a conversão aumentou para 40% com 4 dias de reação. O ee maior que 90%, mostra a estereosseletividade das ADHs do *S. cerevisiae*. Isso pode ser explicado pelo fato do substrato ser liberado lentamente quando empregado a resina, facilitando a ação das enzimas (ADHs), visto que a reação é realizada em meio aquoso, (meio em que o substrato apresenta baixa solubilidade), também evita uma possível inibição do substrato a alguma enzima, pois a concentração deste no meio aquoso é sempre baixa.

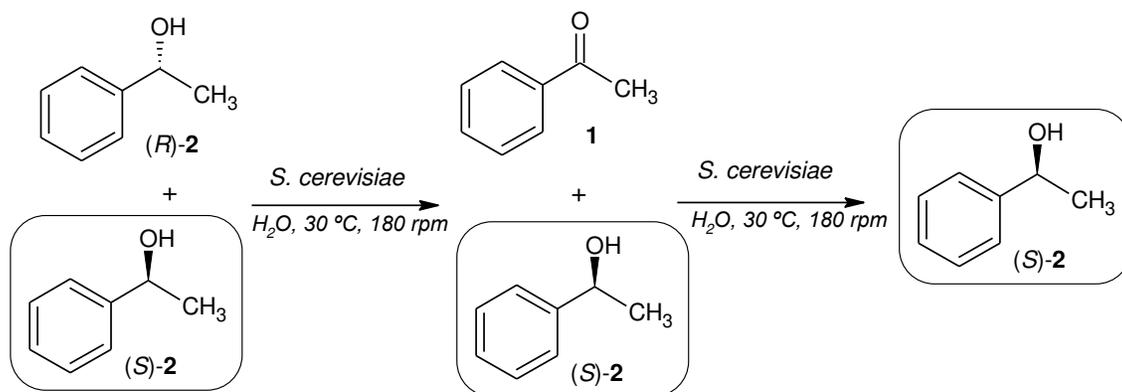
Também foi realizado um estudo da redução de **1** adsorvido em matriz de celulose (papel de filtro), que facilita a dispersão do substrato no meio reacional (**Tabela 3**).

**Tabela 3:** Redução da acetofenona adsorvida em matriz de celulose catalisada por *S. cerevisiae* tipo II

Tempo (dias)	<b>1</b> (%)	<b>2</b> (%)	ee( <b>S</b> )(%)
<b>1</b>	61	39	94
<b>2</b>	34	66	92
<b>3</b>	25	75	93

Pode-se observar que com a adsorção do substrato em matriz de celulose, a reação apresenta melhor conversão comparado às condições anteriores chegando a 74 % de formação de **2**. A utilização de matriz de celulose mostrou-se mais eficaz que a resina e na ausência de material adsorvente para o processo de biorredução de **1**.

O estudo de desracemização de **2** (**Figura 18**) foi realizado na presença e ausência de resina hidrofóbica XAD-7, utilizando acetona como cetona de sacrifício (para reciclar o cofator), com as leveduras *S. cerevisiae* tipo I e II, e com células de *Candida albicans*. Para o *S. cerevisiae* tipo I e II, **Tabela 4** e **Tabela 5** respectivamente, foram observados o consumo do enantiômero(*R*)-**2** e a formação da cetona **1**, no entanto o processo ocorreu lentamente, pouco enantiosseletivo e equilibrou-se como pode se observar na **Tabela 4**.



**Figura 18:** Desracemização de **2** com *S. cerevisiae*.

**Tabela 4:** Estudo da desracemização de **2** com *S. cerevisiae* tipo I na presença e ausência de resina Amberlite XAD-7

Entrada	Tempo (h)	Resina (mg)	1 (%)	2 (%)	ee(S) (%)
1	9	0	6	94	18
2	24	0	16	84	nd
3	48	0	24	76	nd
4	120	0	28	72	20
5	360	0	0	100	20
6	48	400	20	80	18
7	72	400	32	68	nd
8	96	400	36	64	28
9	150	400	35	65	20

nd = não determinado. As entradas **6-9** correspondem a reações independentes.

As álcool desidrogenases provenientes do *S. cerevisiae* tipo I oxidam o álcool **2** pouco seletivamente, formando **1**, progressivamente. Com 5 dias de reação observou-se formação de aproximadamente 30 % de **1**, no entanto o **2** remanescente apresentou um baixo ee. Já com 15 dias de reação toda a cetona que havia sido formada foi reduzida observando-se 100% do álcool **2**, com ee de 20%. Na presença de resina, o comportamento foi similar, todavia mais lento. A oxidação de **2** apresentou-se pouco seletiva e com 15 dias de reação observou-se quase 65% do álcool **2** com ee de 20%.

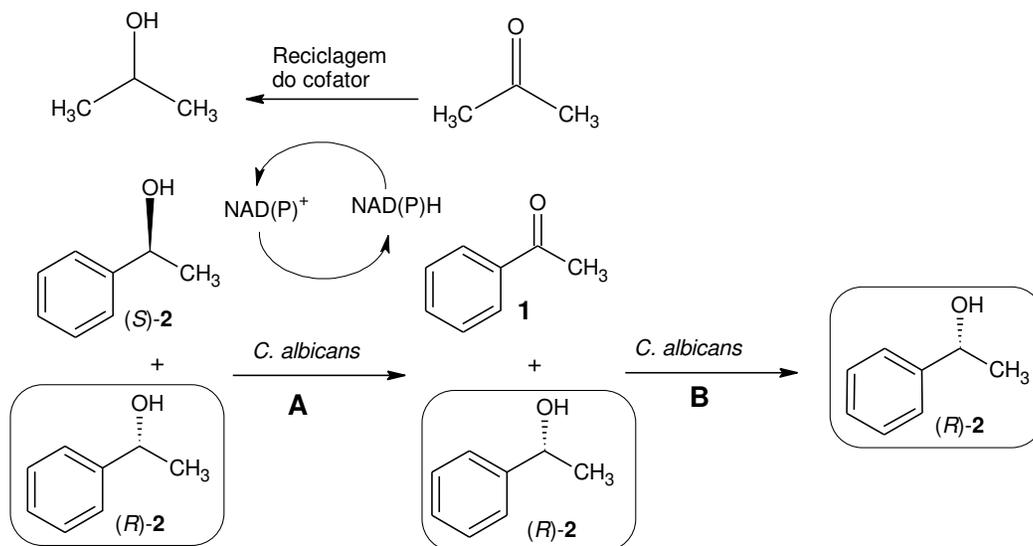
**Tabela 5:** Desracemização de **2** com *S. cerevisiae* tipo II na ausência e presença de resina Amberlite XAD-7

Entrada	Tempo (h)	Resina (mg)	1 (%)	2 (%)	ee (S) (%)
1	9	0	1	99	18
2	24	0	6	94	nd
3	48	0	13	87	21
4	120	0	68	32	nd
5	48	400	20	80	18
6	72	400	23	77	nd
7	96	400	28	72	nd
8	15 dias	400	35	66	20

nd = não determinado. As entradas **5-8** correspondem a reações independentes.

No estudo com *S. cerevisiae* tipo II, também foi observado uma baixa estereosseletividade da oxidação de **2**. Na ausência de resina a reação se processa mais rapidamente, com 5 dias de reação observou-se a formação de 68% de **1** no entanto o álcool remanescente apresentou um baixo ee.

Diferente das cepas de *S. cerevisiae*, o estudo com a *Candida albicans* mostrou-se bastante promissor, visto uma oxidação de **2** com alta enantiosseletividade e a redução estereosseletiva da cetona formada **1** (**Figura 17**). O resultado com *C. albicans* obtida pelo **Método A** (**Tabela 6**) mostrou-se menos eficiente comparado ao experimento com *C. albicans* obtida pelo **Método B**.



**Figura 19:** Desracemização de **2** catalisada por *C. albicans*. A etapa **A** consiste na oxidação do enantiômero (*S*)-**2**, gerando a cetona **1**, deixando o enantiômero (*R*)-**2** intacto. Na etapa **B**, ocorre a redução de **1** obtendo 100% do enantiômero (*R*)-**2**.

**Tabela 6:** Estudo da desracemização de **2** catalisada por *Candida albicans* obtida pelo **Método A** e **Método B**

Método	Tempo (horas)	1 (%)	2 (%)	ee ( <i>R</i> ) (%)
<b>A</b>	3	40	60	87
	24	36	64	96
	48	23	77	95
	120	46	54	nd
	288	34	66	84
<b>B</b>	3	47	53	89
	24	11	89	>99
	48	13	87	nd
	72	14	86	nd
	240	100	0	---

nd = não determinado.

O experimento com *C. albicans* obtida pelo **Método A** apresentou em apenas 3 horas de reação, a formação de **1** em 40%, e o consumo deste com o tempo, chegando a 23% de **1** em 48 horas de reação. As ADHs da *C. albicans* oxidaram majoritariamente o enantiômero (*S*)-**2**, e o (*R*)-**2** obtido apresentou ee de 96% com 24 horas de reação. Para esse experimento o melhor resultado foi após 48 horas de reação, pois apresentou

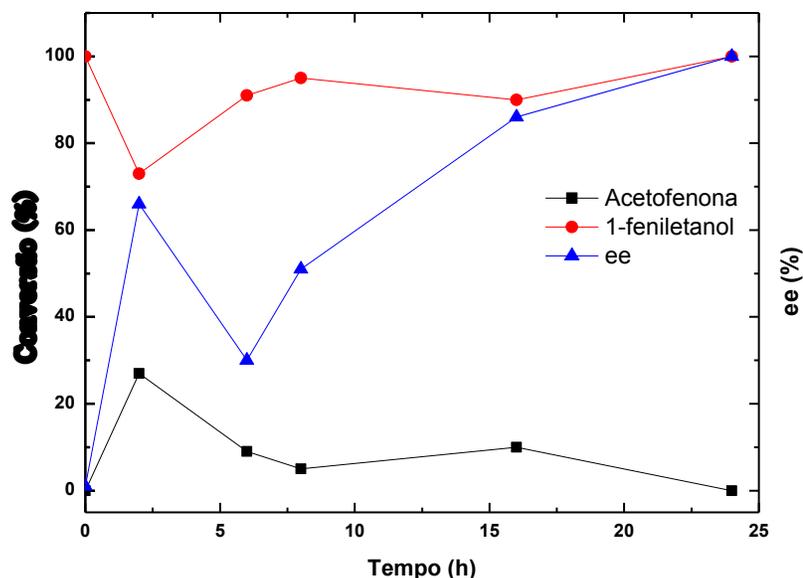
77% do álcool (*R*)-**2** ee 95%, o antípoda do álcool obtido com *S. cerevisiae*. Deste modo, conseguimos encontrar uma metodologia que nos fornece os dois estereoisômeros do 1-feniletanol com boa enantiosseletividade e conversão, por meio de estereoinversão empregando um único biocatalisador.

O experimento da *C. albicans* obtida pelo **Método B**, mostrou-se ainda mais eficaz comparado ao experimento anterior. Com apenas 24 horas de reação constatou-se 89% do (*R*)-**2** com ee>99%. Outro resultado interessante foi a oxidação de 100% de **2** após 10 dias de reação.

Para verificara influência de O<sub>2</sub> no processo de desracemização foi realizado o experimento anterior em atmosfera de N<sub>2</sub> (**Tabela 7** e **Figura 18**).

**Tabela 7:** Estudo da desracemização de **2** em atmosfera de N<sub>2</sub> com *Candida albicans* obtida pelo **Método B**

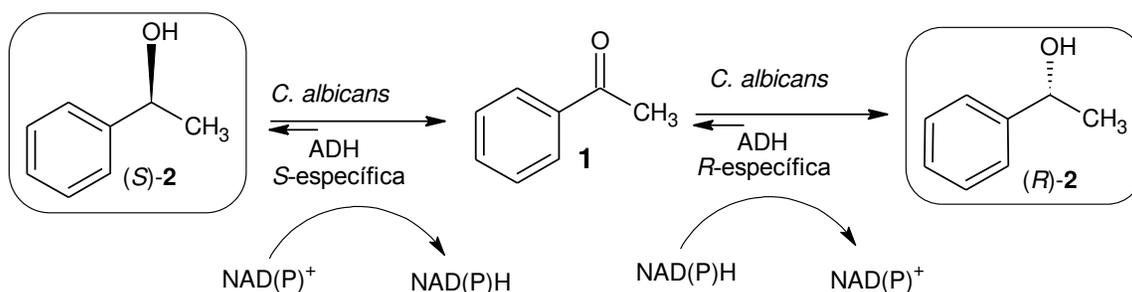
Tempo (horas)	1 (%)	2 (%)	ee( <i>R</i> ) (%)
2	27	73	66
6	9	91	30
8	5	95	51
16	10	90	86
24	---	100	>99



**Figura 20:** Progresso da reação de desracemização do *rac*-**2** em atmosfera de N<sub>2</sub> catalisada por *C. albicans* preparada pelo **Método B**.

É possível observar que o processo de desracemização independe de  $O_2$ , indicativo que a etapa de oxidação do (S)-**2** é catalisada por uma ADH e não uma oxidase, também que o sistema de regeneração de cofator NAD(P)H independe de  $O_2$ , pois com 2 horas de reação foi observado 27% de **1** e este foi consumido. Com 24 horas de reação não se detectou **1**, apenas (R)-**2** com ee superior a 99%. Caso o sistema fosse dependente de  $O_2$ , a reação não ocorreria.

Com o intuito de investigar o mecanismo da desracemização foi realizado experimento utilizando (S)-**2** com ee de 96% (**Figura 22**) (ao invés de *rac*-**2**) nas condições do experimento de desracemização com *C. albicans* obtida pelo Método B (**Tabela 8**).



**Figura 21:** Estudo do comportamento de (S)-**2** com *C. albicans* obtida pelo Método B.

**Tabela 8:** Estudo do comportamento de (S)-**2** com *C. albicans* obtida pelo Método B

Tempo (horas)	<b>1</b> (%)	<b>2</b> (%)	ee (%)
0 hora	---	100	96 (S)
1 dia	76	24	28 (R)
2 dias	70	30	50 (R)
8 dias	43	56	87 (R)

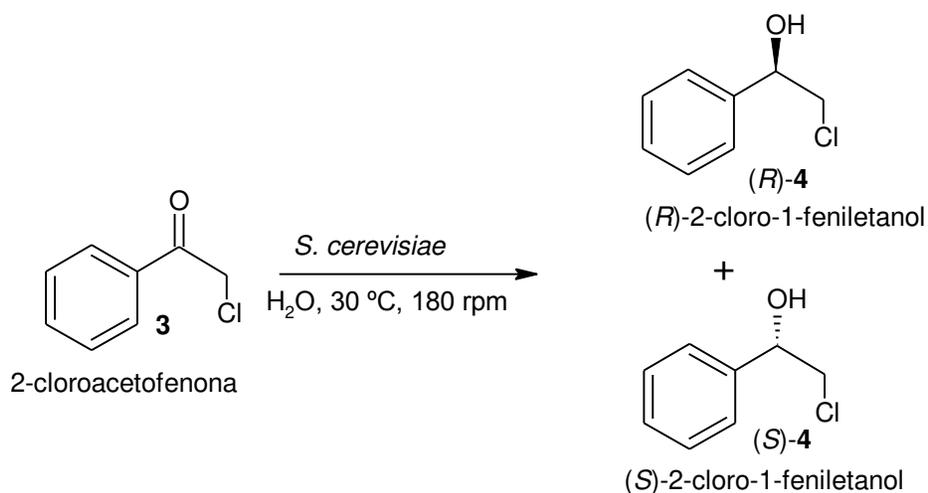
Observou-se que (S)-**2** foi vagarosamente oxidado a **1**. Após 24 horas detectou-se 76% de **1** e esse valor foi diminuindo com maiores tempos de reação pois **1** foi lentamente reduzido a (R)-**2**, com 8 dias de reação constatou-se 56% de (R)-**2** com ee de 87%. Resultado que comprova o mecanismo de estereoinversão proposto.

Este estudo proporcionou a obtenção dos dois enantiômeros enriquecidos, o (S)-**2** a partir da redução do **1**, com *S. cerevisiae* tipo II, e o (R)-**2** com a desracemização de *rac*-**2** com *Candida albicans* ambos, com ee acima de 95%. Comparando os resultados

obtidos com os reportados na literatura, a desracemização de **2** observada com *C. albicans* supera a resolução cinética oxidativa de Silva *et al.* 2012, que obtiveram apenas 50% do enantiômero (*S*)-**2**<sup>34</sup>, e apresenta maior viabilidade que a desracemização quimio-enzimática de Magallanes-Noguera *et al.* 2012, pois utilizaram uma razão massa de célula/substrato 4 vezes maior que a empregada neste trabalho e por fazer ciclos de redução química de **1** com borohidreto de sódio para obter o *rac*-**2**<sup>28</sup>. Já Nakamura *et al.* 1995 observaram a desracemização de *rac*-**2** com *Geotrichum candidum* após 24 horas de reação, 96% de rendimento do (*R*)-**2** com 99% ee e sem condicionamento prévio do microrganismo<sup>54</sup>, fato que exemplifica os diferentes resultados utilizando microrganismos distintos.

### 3.2 –2-cloro-1-feniletanol (**4**)

A biorredução de 2-cloroacetofenona (**3**) (**Figura 22**) catalisada por células de *S. cerevisiae* tipo II foi realizada e os valores de conversão e ee na presença e ausência de resina XAD-7 estão apresentados na **Tabela 9**. A velocidade de reação foi maior comparada a acetofenona, devido ao halogênio (grupo retirador de elétrons) estar ligado α à carbonila, facilitando o ataque nucleofílico do hidreto proveniente do NAD(P)H.



**Figura 22:** Biorredução de **3** com células de *S. cerevisiae* tipo II.

**Tabela 9:** Estudo da redução de **3** com *S. cerevisiae* tipo II na ausência e presença de resina XAD-7.

Entrada	Tempo (dias)	XAD-7 (mg)	<b>3</b> (%)	<b>4</b> (%)	ee ( <i>R</i> ) (%)
<b>1</b>	1	400	32	68	nd
<b>2</b>	3	400	7	93	58
<b>3</b>	4	400	7	93	nd
<b>4</b>	1	0	31	69	nd
<b>5</b>	3	0	17	83	31
<b>6</b>	4	0	2	98	58

nd = não determinado. As entradas **1-3** correspondem a reações independentes.

É possível observar que na redução de **3** o emprego na resina pouco influenciou na velocidade e na enantiosseletividade da reação. Para ambos os experimentos, a conversão foi superior a 90% com 4 dias de reação, todavia o excesso enantiomérico não superou 60%, o que indica uma baixa estereosseletividade das ADHs frente a esse composto. Os resultados da biorredução catalisada por células de *C. albicans* estão apresentados na **Tabela 10**.

**Tabela 10:** Estudo da redução de **3** com *Candida albicans* obtida pelo Método B

Tempo (horas)	<b>3</b> (%)	<b>4</b> (%)	ee( <i>R</i> )(%)
<b>3</b>	0	100	50
<b>24</b>	0	100	51

A biorredução de **3** catalisada por *C. albicans* também apresentou alta velocidade (3 horas) porém uma baixa enantiosseletividade ee de 50% de **4**.

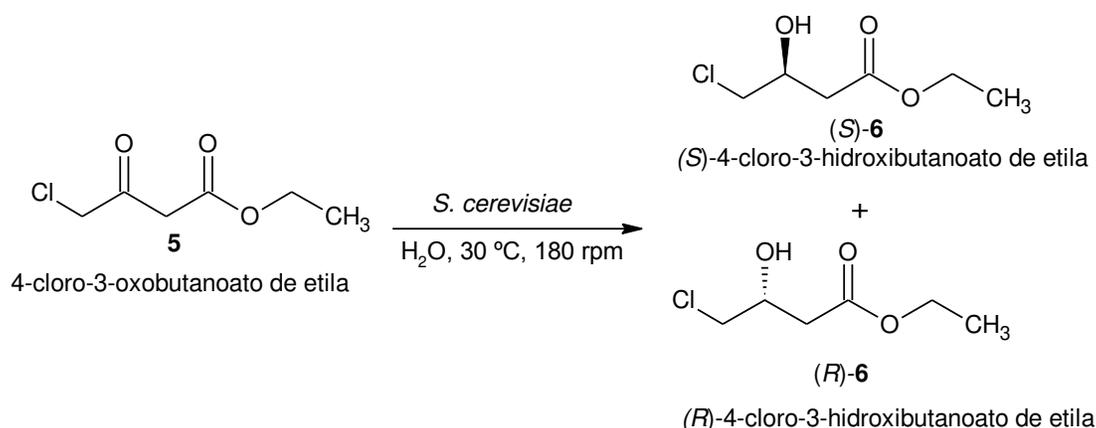
Para a desracemização de **4** foi realizado o estudo com o *S. cerevisiae* tipo I e II, e com células de *C. albicans*. O resultado observado foi que todas as condições empregadas para facilitar a oxidação do álcool **4** não foram bem sucedidas.

Uma possível explicação para o resultado obtido é a presença do grupo cloro  $\alpha$  a hidroxila, que aumenta o caráter eletrofílico do carbono, dificultando a

saída de um hidreto. Como foi observado que a presença do grupo halogênio  $\alpha$  facilita a redução da carbonila, é de se esperar que a oxidação da hidroxila seja dificultada.

### 3.3- 4-cloro-3-hidróxibutanoato de etila (6)

O 4-cloroacetoacetato de etila (**5**) possui uma carbonila bastante deficiente em elétrons devido aos grupos retirados de elétrons, halogênio  $\alpha$  e éster  $\beta$ . Por isso a redução da carbonila (**Figura 23**) ocorre rapidamente com *S. cerevisiae* tipo II como pode ser observada na **Tabela 11**.



**Figura 23:** Redução de **5** com *S. cerevisiae* tipo II.

**Tabela 11:** Redução de **5** com *S. cerevisiae* tipo II na presença e ausência de resina XAD-7.

Tempo (h)	XAD-7 (mg)	<b>5</b> (%)	<b>6</b> (%)	ee( <b>S</b> ) (%)
<b>2</b>	400	---	100	60
<b>2</b>	0	---	100	2

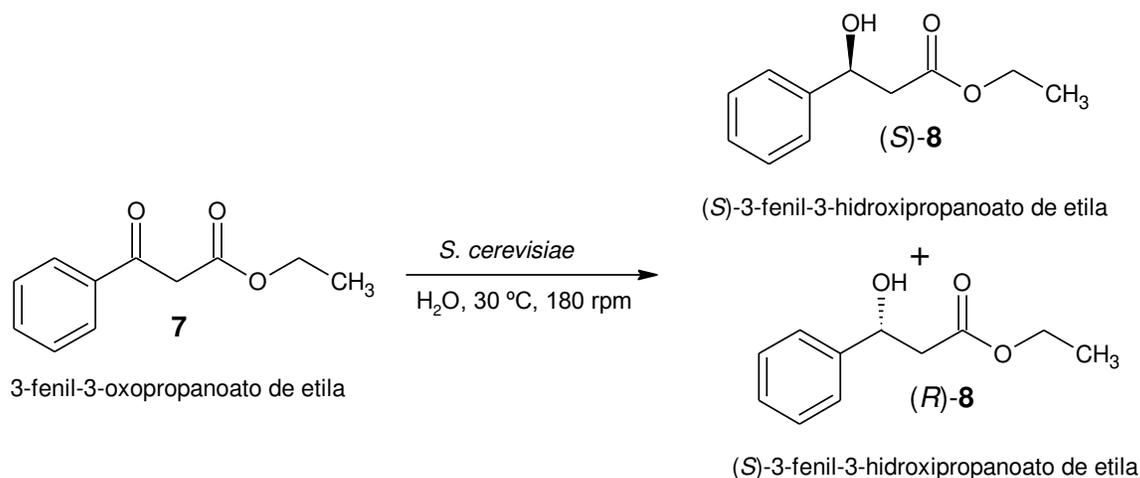
Com 2 horas de reação ocorre a redução total de **5**, no entanto, na ausência de resina, o ataque nucleofílico do hidreto ocorre pelas duas faces da cetona, como pode ser observado o baixo ee de 2%. A utilização da resina proporcionou uma redução mais enantiosseletiva formando (**S**)-**6** com ee de 60%.

Baseado nos resultados de Ribeiro *at al.* 2009, que observou a formação de 63% de (*S*)-**6** com 81% ee, a redução de **5** na presença da resina mostrou-se mais eficiente porém menos enantiosseletiva<sup>42</sup>.

A desracemização do *rac*-4-cloro-3-hidróxibutanoato de etila não foi observada em nenhuma condição empregada com *S. cerevisiae* ou *C. albicans*. Resultado idêntico a outra halodrina **4** estudada, provavelmente devido a dificuldade de remover um hidreto do carbono ligado deficiente em elétrons a hidroxila.

### 3.4- 3-hidróxi-3-fenilpropionato de etila (**8**)

O beta-hidróxi-éster **8** foi obtido a partir da redução de **7** com *S. cerevisiae* tipo II (Figura 24).



**Figura 24:** Biorredução de **7** com *S. cerevisiae* tipo II.

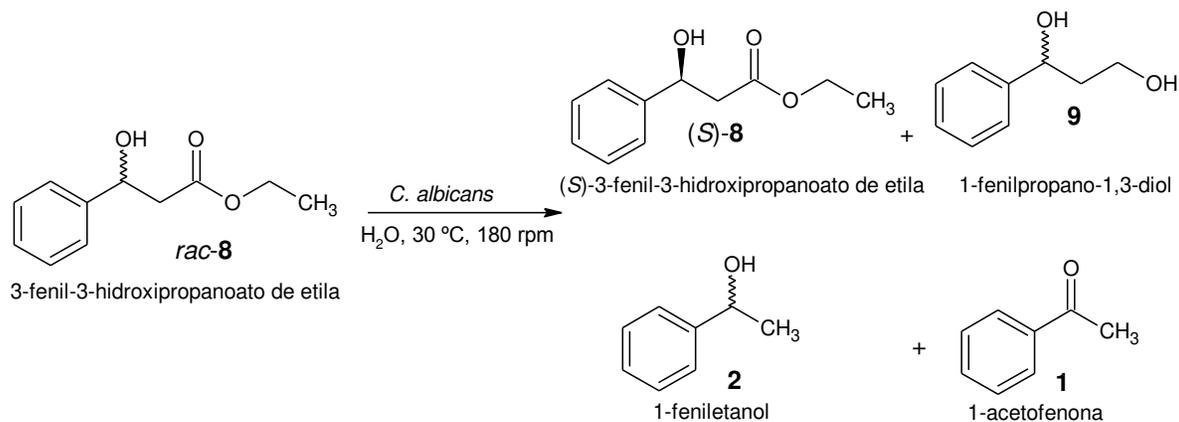
A redução de **7** foi estudada na ausência e presença de resina XAD-7. Observou-se que o composto **7** decompõe-se nas condições empregadas para análise em CG/EM, por isso a conversão de **7** a **8** foi analisada por CLAE (Tabela 12).

**Tabela 12:** Estudo da redução de **7** com *S. cerevisiae* tipo II.

Tempo (h)	XAD-7 (mg)	7(%)	8 (%)	ee (S) (%)
1	0	79	21	62
2	0	64	46	53
6	0	45	55	56
9	0	44	56	45
26	0	26	74	54
2	400	94	6	1
6	400	91	9	10
48	400	66	34	28

Na ausência da resina, a redução de **7** ocorreu rapidamente comparado ao mesmo experimento realizado na presença desta, no entanto a enantiosseletividade da reação foi baixa obtendo o máximo de 62% de ee com 1 hora de reação, mesmo diminuindo a concentração de **7** no meio reacional a seletividade não se aumentou.

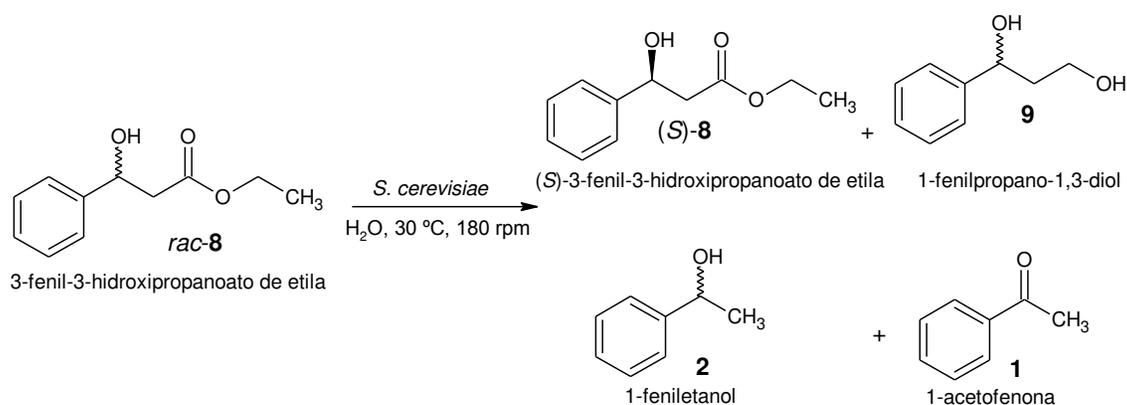
O estudo de desracemização de **8** (**Figura 25**) foi realizado com *Candida albicans* obtida pelo **Método A** e **Método B** (**Tabela 13**) e com *S. cerevisiae* tipo II (**Figura 26**, **Tabela 14**).



**Figura 25:** Estudo da desracemização de **8** com *C. albicans*.

**Tabela 13:** Estudo da desracemização de **8** com *Candida albicans* obtida pelo **Método A** e **Método B**

Método	Tempo (h)	2(%)	1(%)	9 (%)	8(%)	ee(S)(%)
<b>A</b>	3	---	---	1	99	14
	24	2	3	---	95	56
	48	10	---	68	22	nd
<b>B</b>	3	1	1	2	96	8
	24	---	---	12	88	64
	48	16	---	51	33	---



**Figura 26:** Estudo da desracemização de **8** com *S. cerevisiae* tipo II.

**Tabela 14:** Estudo da desracemização de **8** com *S. cerevisiae* tipo II

Tempo (h)	2 (%)	1 (%)	9 (%)	8 (%)	ee(S)(%)
<b>9</b>	2	---	3	95	17
<b>24</b>	4	2	10	84	63
<b>48</b>	6	8	13	73	96
<b>72</b>	6	18	17	59	94
<b>120</b>	4	40	12	44	46

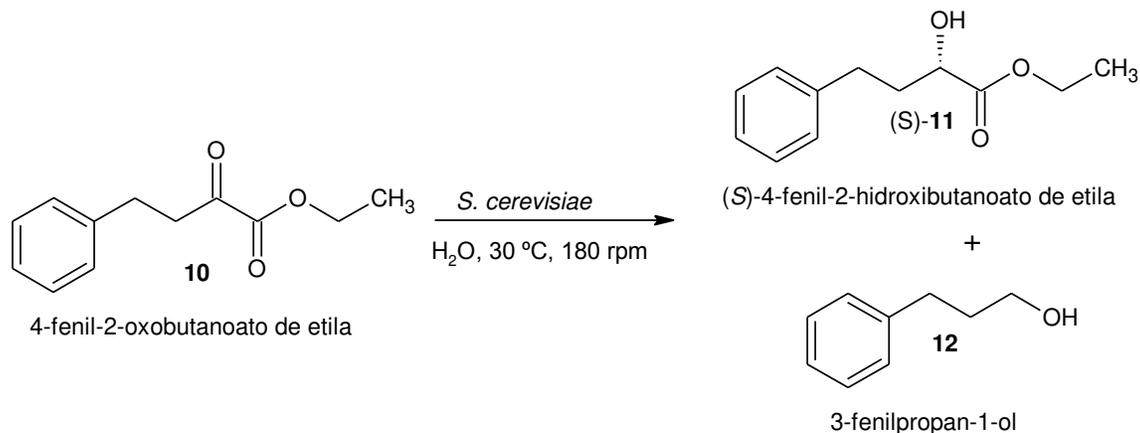
No estudo com células de *C. albicans* observou-se uma baixa enantiosseletividade das enzimas e uma grande formação do diol **9**, com 48 horas de reação 68% de **9** estava presente na alíquota do experimento preparado pelo **Método A**.

No processo de desracemização de **8** com *S. cerevisiae* tipo II, observou-se a formação de subprodutos proveniente da hidrólise do éster seguido da redução do

ácido carboxílico gerando o diol **9**. Também a hidrólise do éster seguido da descarboxilação gerou **2**, que pode ser oxidado a **1**. Com dois dias de reação observou-se 72% de (*S*)-**8** e ee de 96%.

### 3.5- 4-fenil-2-hidróxifenilbutanoato de etila (**11**)

A redução do alfa-ceto-éster 4-fenil-2-oxobutanoato de etila (**10**) foi estudada com *S. cerevisiae* tipo II (**Figura 27**), na presença e ausência de resina XAD-7 (**Tabela 15**).



**Figura 27:** Redução de **10** com *S. cerevisiae* tipo II.

**Tabela 15:** Estudo da redução de **10** com *S. cerevisiae* tipo II

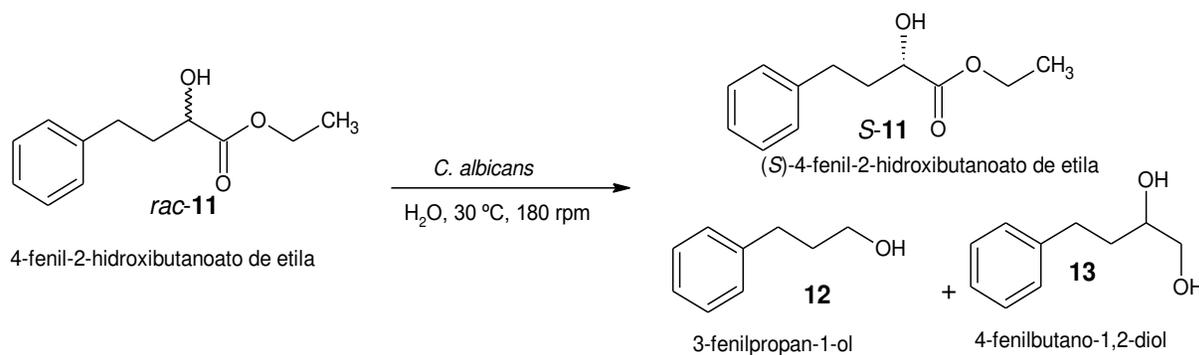
Entrada	Tempo (h)	XAD-7 (mg)	<b>12</b> (%)	<b>10</b> (%)	<b>11</b> (%)	ee( <i>S</i> )(%)
<b>1</b>	1	0	43	---	57	92
<b>2</b>	2	0	45	---	55	nd
<b>3</b>	1	400	26	60	24	nd
<b>4</b>	2	400	34	54	12	nd
<b>5</b>	6	400	81	13	6	nd

nd = não determinado. As entradas **3-5** correspondem a reações independentes.

Na ausência da resina, com apenas uma hora de reação, todo ceto-éster **10** foi consumido, formando cerca de 60% do álcool (*S*)-**11**, com ee de 92% e 45% de **12**, produto de hidrólise do éster e descarboxilação seguida da redução da carbonila. Com o uso da resina, a redução foi mais lenta sendo observado com 6 horas de reação 13% do material de partida. O produto **12** foi observado em maior quantidade comparado ao

experimento sem resina, com o ápice de 81% após 6 horas de reação. Pode-se observar que o composto **11**, é convertido a **12** com maiores tempo de reação.

Desracemização de **11** (**Figura 28**) foi estudada com células de *Candida albicans* obtida pelo **Método A** e **Método B** (**Tabela 16**) e *S. cerevisiae* tipo II (**Figura 29** e **Tabela 17**).

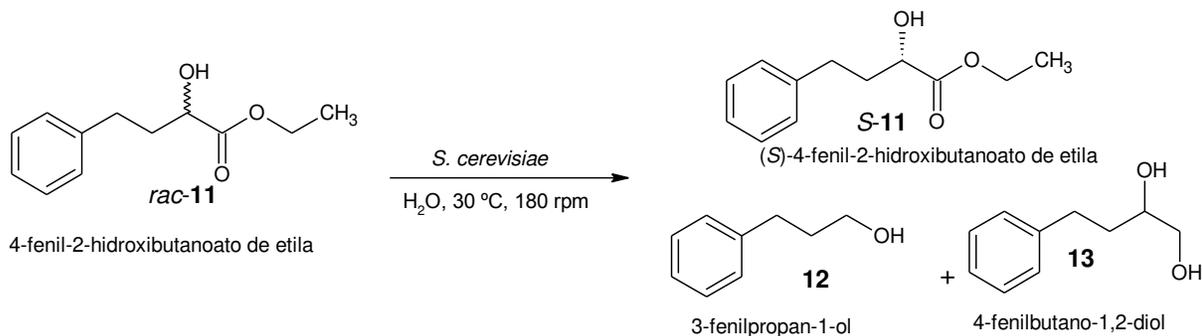


**Figura 28:** Desracemização de **11** com *C. albicans*.

**Tabela 16:** Desracemização de **11** com *C. albicans* obtida pelo **Método A** e **Método B**

Método	Tempo (h)	<b>12</b> (%)	<b>13</b> (%)	<b>11</b> (%)	ee( <b>S</b> )(%)
<b>A</b>	3	---	---	100	41
	24	---	---	100	71
<b>B</b>	3	---	---	100	91
	24	29	23	47	83

O estudo realizado com células de *C. albicans* obtida pelo **Método B** apresentou a desracemização de **11** com apenas 3 horas de reação. Foi observado 100% de (S)-**11** com ee maior que 90%, no entanto após 24 horas de reação foi observado 23% de **14**, subproduto de hidrólise de **11** e redução, e 29% de **12**, produto de hidrólise seguido de descarboxilação. Já no experimento preparado pelo **Método A**, não foi observado a formação de subprodutos com até 24 horas de reação, porém o ee foi menor em 10 unidades de medida. Esse resultado indica a maior produção de hidrolases por *C. albicans* com maior tempo de crescimento celular.



**Figura 29:** Reação de desracemização de **11** com *S. cerevisiae*.

**Tabela 17:** Desracemização de **11** com *S. cerevisiae* tipo II

Tempo (h)	<b>12</b> (%)	<b>13</b> (%)	<b>11</b> (%)	ee( <b>S</b> )(%)
<b>1</b>	---	---	100	78
<b>2</b>	10	---	90	85
<b>4</b>	20	---	80	93

A desracemização catalisada por *S. cerevisiae* também ocorreu rapidamente, foi observado com 2 horas de reação 90% de **11** com ee de 85%. Tempos maiores de reação geraram subprodutos como **12** e **13**. Um estudo complementar para aprimorar o processo de desracemização foi realizado, variando a atmosfera reacional e a quantidade de massa celular como pode ser observado na **Tabela 18**.

**Tabela 18:** Variação de algumas condições na desracemização de **11** com *S. cerevisiae* tipo II, com 2 horas de reação

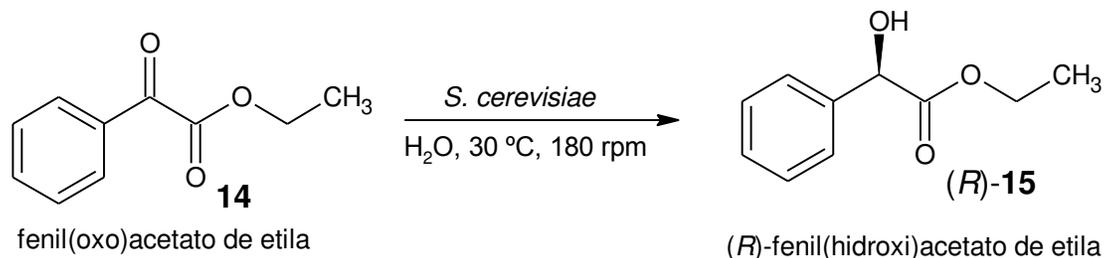
Massa (g)	Atmosfera	<b>11</b> (%)	ee ( <b>S</b> ) (%)
<b>1,0</b>	Ambiente	100	86
<b>1,0</b>	Argônio	100	98
<b>1,0</b>	O <sub>2</sub>	100	88
<b>1,5</b>	Ambiente	100	88
<b>2,0</b>	Ambiente	100	73
<b>3,0</b>	Ambiente	100	80

O aumento da massa celular não teve aumento significativo na desracemização de **11**, no entanto a mudança da atmosfera reacional aumentou o ee de (**S**)-**11**. Como

foi observado no estudo de desracemização de **2** catalisado por *C. albicans*, o processo ocorreu na ausência de O<sub>2</sub> (**seção 3.1**). Nesse caso além de mostrar que o O<sub>2</sub> não participa do processo, o ee do produto aumentou com a mudança de atmosfera para argônio e N<sub>2</sub>, obtendo (*S*)-**11** com ee de 98%. Além dos resultados apresentados com a *S. cerevisiae* tipo II, também se observou um comportamento similar com *C. albicans*, com apenas 2 horas de reação em atmosfera de N<sub>2</sub>, obteve-se 100% do (*S*)-**11** com ee de 96%. A ausência de oxigênio molecular não impediu a desracemização o que indica que a oxidação de **11** ocorre por uma ADH (álcool desidrogenase) e não por uma oxidase, e a oxidação do cofator NAD(P)H também não ocorre por uma oxidase dependente de oxigênio molecular<sup>38</sup>. Comparando os resultados com os reportados por Chadha *et al.* 2002, que obtiveram em 1 hora a desracemização de **11** com *C. parapsilosis*, nossa metodologia mostrou-se mais conveniente, pois o uso das células de *S. cerevisiae* liofilizado, dispensa o uso de autoclave, meio de cultura para crescimento, capela de fluxo laminar, ambiente estéril, ou seja, uma metodologia que pode ser empregada em qualquer laboratório de química.

### 3.6- Mandelato de etila (**15**)

A redução de **14** (**Figura 30**) foi estudada com *S. cerevisiae* tipo II, e como outros alfa-ceto-ésteres, a reação ocorreu rapidamente como apresentado na **Tabela 19**.



**Figura 30:** Redução de **14** com *S. cerevisiae* tipo II, produzindo o (*R*)-**15**.

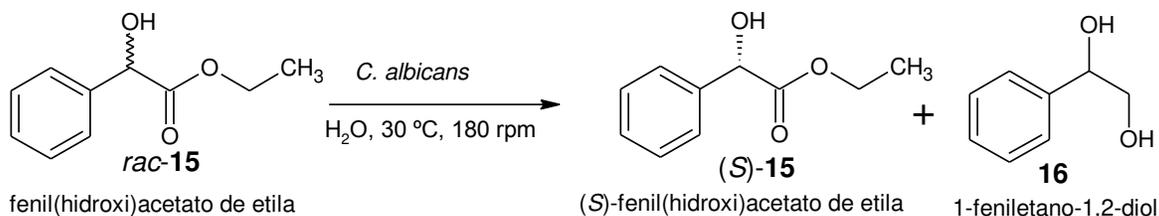
**Tabela 19:** Biorredução de **14** com *S. cerevisiae* tipo II na presença e ausência de resina XAD-7.

Entrada	Tempo (h)	XAD-7 (mg)	14(%)	15(%)	ee ( <i>R</i> )(%)
<b>1</b>	2	0	---	100	92
<b>2</b>	2	400	24	76	nd
<b>3</b>	6	400	13	87	92
<b>4</b>	16	400	0	100	96

nd = não determinado. As entradas **2-4** correspondem a reações independentes.

O experimento realizado na ausência da resina mostrou-se mais rápido, com 100% de conversão em (*R*)-**15** ee de 92,4% após 2 horas de reação. Na presença de resina com 16 horas de reação observou-se o consumo de todo **14**, e ee de 96,7% do produto **15** formado. Pode-se concluir que o uso da resina não se faz necessária, pois diminui a velocidade de redução por um aumento insignificante de ee.

O estudo de desracemização foi realizado com *C. albicans* (**Figura 31** e **Tabela 20**) e *S. cerevisiae* tipo II (**Figura 32** e **Tabela 21**).

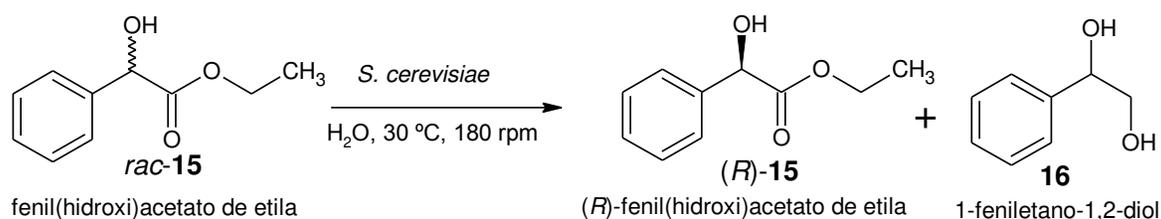


**Figura 31:** Desracemização de **15** com *C. albicans*.

**Tabela 20:** Estudo da desracemização de **15** com *Candida albicans* obtida pelos Métodos A e B

Método	Tempo (h)	16(%)	15 (%)	%ee(S)
<b>A</b>	<b>2</b>	4	96	23
	<b>24</b>	6	94	86
	<b>48</b>	9	92	>99
<b>B</b>	<b>2</b>	3	97	13
	<b>24</b>	12	88	92
	<b>48</b>	21	79	>99
	<b>72</b>	26	74	nd

nd = não determinado.



**Figura 32:** Desracemização de **15** com *S. cerevisiae* tipo II.

**Tabela 21:** Estudo da desracemização de **15** com *S. cerevisiae* tipo II

Tempo (h)	16(%)	15 (%)	%ee(R)
<b>9</b>	4	96	7
<b>24</b>	5	95	10
<b>48</b>	6	94	nd
<b>72</b>	8	92	2
<b>120</b>	12	88	27
<b>240</b>	100	---	---

nd = não determinado.

O experimento com *C. albicans* obtida pelo **Método A** apresentou resultados excelentes. Observou-se 92% do (*S*)-**15** ee>99% após 48 horas de reação. Com as células obtidas pelo **Método B** também se obteve o (*S*)-**15** com ee>99%, porém obteve-

se 23% do diol **16**. Enquanto que a desracemização com *S. cerevisiae* tipo II mostrou-se ineficaz, todavia com 240 horas de reação todo o alfa hidróxi-éster **15** foi convertido ao diol **16**. A partir do estudo realizado foi possível obter o (S)-**15** pela desracemização com *C. albicans* e (R)-**15** pela redução de **14** com *S. cerevisiae*. A fim de comparação, a desracemização de **15** observado no presente estudo é similar, no entanto um pouco mais lenta, ao resultado reportado por Chadha *et al.* 2002, que obtiveram em 1 hora a desracemização de **15** com *C. parapsilosis*<sup>51</sup>.

## 4-Conclusões

A utilização de um único microrganismo mostrou ser uma boa alternativa para desracemização de alcoóis secundários, visto que dispensa a utilização de enzimas isoladas e uso de custosos cofatores. Alguns alcoóis não foram possíveis de se desracemizar, e as velocidades de oxidação/redução, se diferem para cada substrato e para cada microrganismo.

Obteve-se a partir da desracemização de 1-feniletanol **2** o (*R*)-1-feniletanol com 90% de conversão e ee de 99% com *C. albicans*, e o (*S*)-**2** pela redução da acetofenona com *S. cerevisiae* tipo II com 75% de conversão e 96% de ee. Estudou-se o mecanismo de desracemização de *rac*-**2** e comprovou-se que ocorreu por estereoinversão, catalisado por enzimas independentes de O<sub>2</sub>, provavelmente ADHs.

Preparou-se o (*S*)-4-fenil-2-hidróxibutirato de etila **11** com 100% conversão e 98% de ee a partir da desracemização de *rac*-**11** catalisada por *C. albicans* e *S. cerevisiae* com apenas 2 horas de reação, o que é relevante, pois a produção do (*S*)-**11** pode ser realizada em qualquer laboratório de química, visto que o *S. cerevisiae* tipo II é liofilizado e dispensa uso de materiais esterilizados e uso de capela de fluxo laminar.

Obteve-se o (*S*)-mandelato de etila **15** com 88% de conversão e 92% de ee a partir da desracemização de *rac*-**15** catalisada por *C. albicans* e o (*R*)-**15** com a redução do respectivo ceto-éster catalisada por *S. cerevisiae*. O (*S*)-3-hidróxi-3-fenilpropionato de etila **8** foi produzido a partir da desracemização do *rac*-**8** com *S. cerevisiae* tipo II após 2 dias de reação com 96% de ee e 75% de conversão.

Observou-se que substituintes retiradores de elétrons como um haleto alfa a carbonila aumenta a velocidade de redução como 2-cloroacetofenona, cloroacetato de etila, no entanto a desracemização dos respectivos alcoóis, **4** e **6** não ocorreu.

Constatou-se diferenças no estudo da desracemização com diferentes tempos de crescimento celular da *C. albicans* de 24 e 72 horas, pois o microrganismo encontrava-se em diferentes estágios de crescimento, produzindo quantidades diferentes de enzimas como hidrolases, oxidases, ADHs.

A desracemização foi um processo fundamental no estabelecimento da vida<sup>46</sup>. A metodologia apresentada nesta dissertação sugere um procedimento de simples

execução e que pode ser facilmente reproduzido para escala preparativa. Além disso, trata-se de uma metodologia verde que atende aos princípios de sustentabilidade ambiental e que apresenta um baixo fator ambiental E (quanto menor o valor de E maior é a sustentabilidade)<sup>4</sup>. O procedimento desenvolvido apresenta também 100% de economia atômica, o que não ocorre com a maioria dos procedimentos químicos, além de permitir que futuros estudos com substratos mais complexos sejam realizados.

## 5-Parte experimental

### 5.1 – Aspectos instrumentais

#### 5.1.1 - Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

Os espectros de Ressonância Magnética Nuclear foram realizados em Bruker 250 MHz, Advance 250 MHz e em Varian INOVA 500. Os deslocamentos químicos ( $\delta$ ) do hidrogênio foram registrado em ppm, empregando o tetrametilsilano (TMS,  $\delta=0,00$  para  $^1\text{H}$ ) como referência. Os deslocamentos químicos de  $^{13}\text{C}$  foram registrados em ppm, empregando como referência o clorofórmio deuterado ( $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta = 77,00$ ).. As análises foram realizadas pesando-se de 15 a 30 mg da amostra em 0,5 mL de  $\text{CDCl}_3$ .

#### 5.1.2 - Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas (CG/EM)

As amostras foram analisadas em cromatógrafo gasoso modelo GC/MS-QP5000 – Shimadzu acoplado a um detector de massas contendo uma fonte de ionização por impacto de elétrons com energia de ionização de 70 eV ou em um Agilent Technologies 7890 A acoplado a um detector de massa 5975C, utilizando coluna capilar HP-5MS (30 m x 0,25 mm x 0,25  $\mu\text{m}$ ), operando com uma fonte de ionização por impacto de elétrons também de 70 eV. O fluxo de He foi mantido à 1,0 mL.min<sup>-1</sup>, temperatura do injetor à 260 °C e detector à 280 °C, split 50:1. O método para separação dos produtos foi:

**Método 1:** 80 °C por 1 min, 30 °C.min<sup>-1</sup> até 230 °C, 25 °C.min<sup>-1</sup> até 280 e manteve-se a 280 °C por 2 min (total 10 min).

#### 5.1.3 - Cromatografia Gasosa acoplada ao Detector por ionização de chama – CG/DIC

As análises em CG/DIC foram realizadas em um cromatógrafo modelo Agilent Technologies 6850, utilizando coluna capilar quiral Lipodex-E (28 m x 0,25 mm x 0,25  $\mu\text{m}$ ). O fluxo permaneceu constante de  $\text{H}_2$  de 1 mL.min<sup>-1</sup>, temperatura do injetor de 200°C e do detector 220°C.

**Método 2:** 50 °C, 2 °C.min<sup>-1</sup> até 130 °C, 10 °C.min<sup>-1</sup> até 180 e manteve-se a 180 por 2min (total 47 min).

### 5.1.4 – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

As análises de CLAE foram realizadas em um cromatógrafo Agilent Technologies 1200 series, utilizando coluna Supelco Astec celulose DMP 15 cm x 2,1 mm x 5 µm obtida de Sigma-Aldrich.

**Método 3:** fase móvel consistiu em uma mistura isocrática de hexano/isopropanol na proporção 98:2, com fluxo de 0,5 mL.min<sup>-1</sup>. O detector de UV-Vis monitorando a absorbância em 215 nm.

### 5.1.5 - Métodos Cromatográficos

As separações cromatográficas em colunas foram realizadas com sílica gel 203-400 mesh da Merck com gradiente de eluição hexano/acetato de etila. As reações foram monitoradas por cromatografia em camada delgada (CCD) por meio de placas de 3 cm x 4 cm da Merck, suportada em alumínio com filme de sílica gel 60 F<sub>254</sub>. A revelação dos compostos nas placas foi realizado por meio de irradiação ultravioleta em um Spectroline modelo ENF-260C, com irradiação à 254 nm.

### 5.1.6 - Espectroscopia no infravermelho

Os espectros de infravermelho foram obtidos em um Bomem MB-series FTIR-Hartmann & Braun Michelson, na região de 650 a 4000 cm<sup>-1</sup>, utilizando filme de cloreto de sódio.

### 5.1.7 - Rotação Ótica

Os valores de  $[\alpha]_D^{20}$  foram medidos em um polarímetro 341 Pelkin Elmer, utilizando cela de caminho ótico de 1 cm.

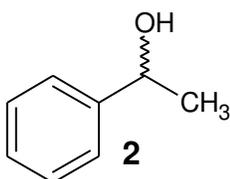
### 5.1.8 - Procedência de reagentes

Os reagentes e solventes empregados para as sínteses e purificações foram adquiridos comercialmente pela Sigma-Aldrich®.

## 5.2 - Preparação dos padrões

Os padrões dos alcoóis estudados foram obtidos a partir da redução química das cetonas comerciais com borohidreto de sódio (0.5 equivalente) em álcool etílico (5 mL por mmol de substrato) em balão de fundo redondo em banho de gelo por, aproximadamente, uma hora. O consumo da cetona (material de partida) e formação do álcool (produto) foram observados por cromatografia em camada delgada, e após o termino da reação adicionou-se solução de ácido clorídrico 10%. O solvente foi evaporado a pressão reduzida, e o resíduo particionado com acetato de etila em funil de separação por três vezes. Adicionou-se sulfato de sódio anidro como agente dessecante e por fim evaporou-se o solvente orgânico a pressão reduzida.

### 5.2.1 1-fenil etanol.



1-feniletanol

Óleo incolor.

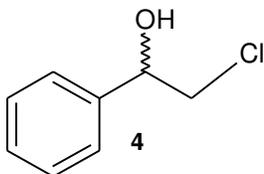
**EM**  $m/z$ (%): 122 ( $M^+$ ,13), 107 (100), 105 (18), 104 (15), 103 (11), 79 (94), 78 (26), 77 (64), 51 (25), 50 (11), 43 (24), 40 (17), 32 (16).

**RMN<sup>1</sup>H** (250 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$ : 1,49 (d, 3H, $J$  = 6,5 Hz), 4,89 (q, 1H, $J$  = 6,5 Hz),7,25–7,37 (m, 5H)ppm.

**RMN<sup>13</sup>C** (125 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$ : 25,2, 70,5, 125,4, 127,5, 128,5, 145,8ppm.

**IV** (filme em NaCl): 3356, 3029, 2973, 2884  $cm^{-1}$ .

### 5.2.2 – 2-cloro-1-feniletanol



2-cloro-1-feniletanol

Óleo incolor.

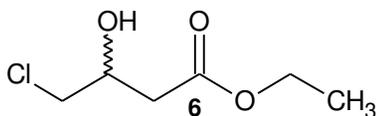
**EM**  $m/z$  (%): 156 ( $M^+$ , 3), 107 (100), 105 (8), 91 (12), 79 (53), 78 (9), 77 (39), 51 (10).

**RMN<sup>1</sup>H** (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 2,69 (1H, largo, OH), 3,64 (dd, 1H,  $J = 11,5$  Hz e 8,7Hz), 3,74 (dd 1H,  $J = 11$  Hz e 3,2 Hz), 4,89 (dd, 1H  $J = 8,7$  Hz e 3,2 Hz) 7,32-7,38 (m, 5H) ppm.

**RMN<sup>13</sup>C** (150 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 50,9, 74,1, 126,1, 128,5, 128,7, 139,9 ppm.

**IV** (filme em NaCl): 3410, 3063, 3032, 2955 cm<sup>-1</sup>.

### 5.2.3 – 4-cloro-3-hidróxibutanoato de etila



4-cloro-3-hidróxibutanoato de etila

Óleo amarelo.

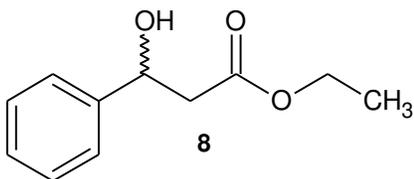
**EM**  $m/z$  (%): 166 (M<sup>+</sup>, 0), 123 (12), 121 (39), 118 (6), 117 (100), 113 (10), 89 (39), 81 (11), 79 (35), 75 (20), 71 (86), 60 (20), 45 (15), 43 (63), 42 (16),

**RMN<sup>1</sup>H** (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 1,28 (t, 3H, 7Hz), 2,58-2,68 (m, 2H), 3,2 (s, H, OH), 3,58-3,65 (m 2H), 4,19 (q, 2H  $J = 7$  Hz), 4,23-4,30 (m, 1H) ppm.

**RMN<sup>13</sup>C** (62,5 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 14,1, 38,4, 48,1, 61,0, 67,9, 171,0 ppm.

**IV** (filme em NaCl): 3451, 2983, 1731 cm<sup>-1</sup>.

### 5.2.4 – 3-fenil-3-hidróxipropanoato de etila



3-fenil-3-hidróxipropanoato de etila

Óleo incolor.

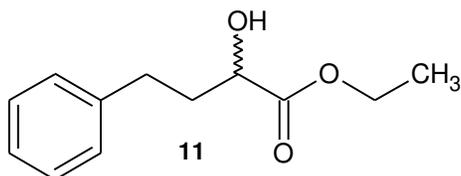
**EM**  $m/z$  (%): 194 (M<sup>+</sup>, 18), 147 (9), 131 (14), 120 (17), 107 (100), 106 (42), 105 (89), 104 (12), 103 (15), 88 (19), 79 (61), 78 (20), 77 (70), 61 (10), 60 (16), 51 (22), 50 (9), 43 (16).

**RMN<sup>1</sup>H** (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 1,26 (t, 3H,  $J = 7$  Hz), 2,67-2,85 (m, 2H), 4,17 (q, 2H,  $J = 7$  Hz), 5,13 (dd, 1H,  $J = 9$  Hz e 4 Hz), 7,25-7,37 (m, 5H) ppm.

**RMN<sup>13</sup>C** (150 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 14,2, 40,5, 60,1, 70,3, 125,7, 127,6, 127,8, 128,5, 128,6, 142,5, 172,4 ppm.

**IV** (filme em NaCl): 3436, 3063, 3031, 2981, 1733 cm<sup>-1</sup>.

### 5.2.5 – 4-fenil-2-hidróxibutanoato de etila.



4-fenil-2-hidróxibutanoato de etila

Óleo incolor.

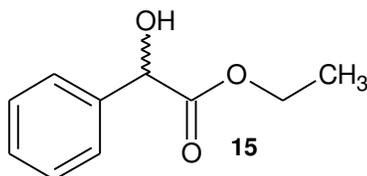
**EM**  $m/z$  (%): 208 (M<sup>+</sup>, 2), 117 (9), 105 (10), 104 (30), 92 (9), 91 (43), 77 (5), 76 (15), 44 (100), 40 (10), 32 (10).

**RMN<sup>1</sup>H** (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 1,28 (t, 3H,  $J = 7$  Hz), 1,93-2,16 (m, 2H), 2,67-2,83 (m, 2H), 4,11-4,22 (m, 1H), 4,21 (q, 2H,  $J = 7$  Hz) 7,15-7,32 (m, 5H) ppm.

**RMN<sup>13</sup>C** (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 14,2, 31,0, 36,0, 61,8, 69,7, 126,0, 128,4, 128,6, 141,2, 175,2 ppm.

**IV** (filme em NaCl): 3455, 3027, 2929, 1732 cm<sup>-1</sup>.

### 5.2.6 – Fenil(hidróxi)acetato de etila (mandelato de etila).



fenil(hidróxi)acetato de etila

Óleo levemente amarelo.

**EM**  $m/z$  (%): 180 (M<sup>+</sup>, 4), 108 (8), 107 (100), 105 (11), 79 (49), 77 (33), 51 (7).

**RMN<sup>1</sup>H** (250 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 1,22 (t, 3H,  $J = 7$  Hz), 4,10-4,30 (m, 2H), 5,15 (s, 1H), 7,25-7,41 (m, 5H) ppm.

**RMN<sup>13</sup>C** (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 14,0, 62,2, 72,9, 126,1, 126,5, 128,4, 128,5, 128,6, 138,4, 173,7 ppm.

**IV** (filme em NaCl): 3451, 3033, 2983, 1732 cm<sup>-1</sup>.

### 5.3 – Crescimento dos microrganismos

A *Candida albicans* (CCT 5847/18804) foi adquirida da Coleção de Culturas Tropicais da Fundação Tropical André Tosello, Parque Taquaral, Campinas, SP.

As células de *Candida albicans*, utilizadas nos estudos de redução e desracemização, foram inoculadas em capela de fluxo laminar em meio de cultura YM, estéril, de composição: para 1000 mL de água destilada: 10 g de glicose, 3 g de extrato de levedura, 3 g de extrato de malte e 5 g de peptona.

O crescimento foi a 30 °C e 180 rpm em *Shaker* (Incubadora refrigerada MARCONI) por 24 horas (utilizado no **Método A**) ou 72 horas (utilizado no **Método B**). Após o período de crescimento, a suspensão foi centrifugada a 3500 rpm por 30 min em centrífuga (Novatecnica NT820), desprezou-se o sobrenadante, e coletou-se a massa úmida de células úmidas que foi utilizada para as biotransformações descritas nas **seções 5.4 e 5.5**.

O *S. cerevisiae* tipo I e II (obtidos comercialmente da Aldrich®) por serem liofilizados não necessitaram de crescimento celular, apenas uma hidratação em água destilada a 40°C e já estavam aptos a utilização nas biotransformações descritas nas **seções 5.4 e 5.5**.

### 5.4 –Biorreduções das cetonas

A redução das cetonas (40-50 mg) foi realizada com 1 g de *S. cerevisiae* tipo I e II ou 3 gramas de célula úmida de *C. albicans* (ver **seção 5.3**) em 10 mL de água destilada previamente aquecida a 40 °C. Os substratos foram introduzidos no meio reacional adsorvidos em resina hidrofóbica Amberlite® XAD-7. O processo de adsorção dos substratos em resina consistiu em dissolver os substratos em aproximadamente 1 mL de acetona, adicioná-los a resina e evaporar o solvente a pressão reduzida. A razão de massa de resina : substrato foi similar a valores empregados em estudos anteriores<sup>6</sup>. Nos experimentos em que o substrato foi adsorvidos em matriz de celulose, dissolveu os substratos em aproximadamente 0,5 mL de éter etílico e dispersou a solução na matriz de celulose, esta foi cortada em pequenos fragmentos e adicionados ao meio reacional. E os experimentos em que não se empregou materiais adsorventes

simplesmente dissolveu-se o substrato em 0,5 mL de etanol e adicionou-o à mistura. O pH das reações manteve-se constante cerca de 5 levemente ácido. As reações foram acompanhadas por CG/EM e os excessos enantioméricos quantificados por CG/DIC e CLAE.

## 5.5- Desracemização dos alcoóis

Os experimentos de desracemização foram realizados com a suspensão do microrganismo em água destilada que permaneceu por 2 dias em condicionamento a 30 °C e 180 rpm. Em experimentos de pequena escala foram utilizados 1 g de massa seca de *S. cerevisiae* tipo I e II suspensas em 10 mL de água destilada e incubação a 30 °C e 180 rpm por 2 dias (condicionamento).

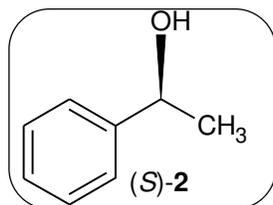
Para o estudo com *C. albicans* foram suspensos em 10 mL de água destilada 3 g de massa úmida de células que tiveram tempos de crescimento em meio YM de 24 horas (denominado **Método A**) e 72 horas (denominado **Método B**) como descrito na **seção 5.3**.

Os substratos (40-50 mg) foram introduzidos ao meio reacional após os 2 dias de condicionamento em água destilada, dissolvidos em acetona 5% v/v, ou adsorvidos em resina XAD-7 ou adsorvidos em matriz de celulose (papel de filtro), este cortado em pequenos fragmentos. Em todos os casos foram adicionados 5% v/v de acetona. O pH das reações manteve-se constante cerca de 5 levemente ácido. As reações foram acompanhadas por CG/EM e o excesso enantiomérico quantificados por CG/DIC e CLAE.

Para os experimentos em atmosfera de argônio e N<sub>2</sub> a suspensão de células em água destilada foi mantida com fluxo contínuo dos respectivos gases por aproximadamente 2 horas antes de adicionar os substratos e durante a reação. Para a reação em que houve adição de O<sub>2</sub>, foi mantido um fluxo contínuo de ar comprimido no meio reacional por aproximadamente uma hora antes da adição dos substratos e também durante toda a reação.

## 5.6 – Alcoóis enantiomericamente enriquecidos:

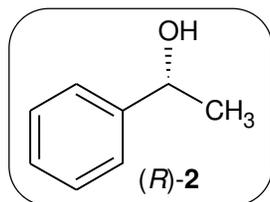
### 5.6.1 – (S)-1-feniletanol



(S)-1-feniletanol

Foi obtido a partir da redução da acetofenona adsorvida em matriz de celulose catalisado por *S. cerevisiae* tipo II após 3 dias reação. Extraiu-se o produto com acetato de etila, utilizou-se sulfato de sódio como agente dessecante e evaporou-se o solvente a pressão reduzida. A purificação foi realizada por cromatografia de adsorção (cromatografia flash) o eluente foi uma mistura hexano/acetato de etila 8:2. Após a evaporação do solvente a pressão reduzida obteve-se o produto (S)-2 com rendimento de 60% e 96% de ee determinado por CLAE **Método 3**.  $[\alpha]_D^{20} = -44^\circ$  (c=0,52, CHCl<sub>3</sub>), lit.  $[\alpha]_D^{20} = -49^\circ$  (c=0,52, CHCl<sub>3</sub>)<sup>68</sup>.

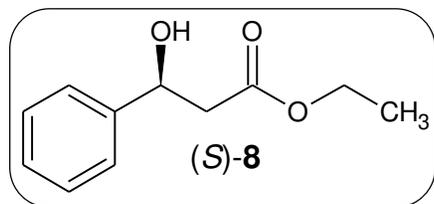
### 5.6.2 - (R)-1-feniletanol



(R)-1-feniletanol

Foi obtido a partir da desracemização do *rac-2* catalisado por células de *C. albicans* obtida pelo **Método B**, após 24 horas de reação e sob atmosfera de N<sub>2</sub>. Ao termino da reação realizou-se a extração e purificação similar ao descrito na **seção 5.6.1**. O rendimento da reação foi de 50% e o produto (R)-2 com ee de 98% também determinado CLAE **Método 3** apresentou  $[\alpha]_D^{20} = +55^\circ$  (c=1,00, CHCl<sub>3</sub>), lit.  $[\alpha]_D^{20} = +58^\circ$  (c=1,01, CHCl<sub>3</sub>)<sup>54</sup>.

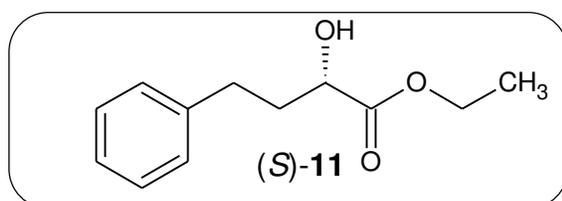
### 5.6.3- (S)-3-fenil-3-hidróxiopropanoato de etila



(S)-3-fenil-3-hidróxiopropanoato de etila

Foi obtido a partir da desracemização do *rac*-8 catalisado por *S. cerevisiae* tipo II após 48 horas de reação, observou-se 73% de rendimento cromatográfico e 96% de ee determinado por CLAE **Método 3**.

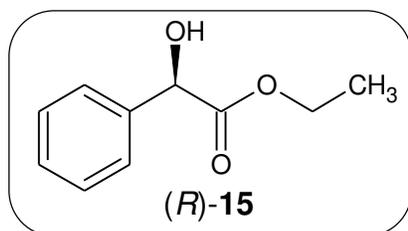
### 5.6.4 – (S)-4-fenil-2-hidróxiбутаноato de etila



(S) 4-fenil-2-hidróxiбутаноato de etila

Foi obtido por desracemização de *rac*-11 catalisada por *S. cerevisiae* tipo II. após 2 horas de reação e sob atmosfera de argônio. Ao termino da reação realizou-se a extração e purificação similar ao descrito na **seção 5.6.1**. O rendimento da reação foi de 60% e o produto (S)-11 com ee de 96% apresentou  $[\alpha]_D^{20} = +16^\circ$  ( $c=1,00$ ,  $\text{CHCl}_3$ ), lit.  $[\alpha]_D^{20} = +21^\circ$  ( $c=1,00$ ,  $\text{CHCl}_3$ )<sup>69</sup>. Também foi possível obter (S)-11 por desracemização de *rac*-11 catalisada por *C. albicans* obtida pelo **Método B** após 2 horas de reação e o rendimento foi de 65%. O ee foi determinado por CLAE **Método 3**.

### 5.6.5 – (R)-mandelato de etila

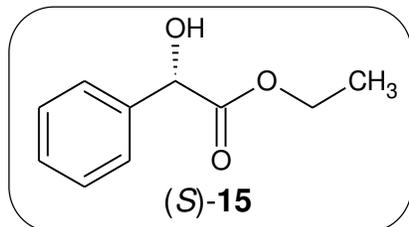


(R)-fenil(hidróxi)etanoato de etila

Foi obtido a partir da redução de **14** catalisada por *S. cerevisiae* tipo II após 1 hora de reação. Ao termino da reação realizou-se a extração e purificação

similar ao descrito na **seção 5.6.1**. O rendimento da reação foi de 60% e o produto (*R*)-**15** com ee de 96% apresentou  $[\alpha]_D^{20} = -132^\circ$  (c=1,00, CHCl<sub>3</sub>), lit.  $[\alpha]_D^{20} = -138^\circ$  (c=1,00, CHCl<sub>3</sub>)<sup>70</sup>. O ee foi determinado por CLAE **Método 3**.

### 5.6.6 – (*S*)-mandelato de etila



(*S*)-fenil(hidróxi)etanoato de etila

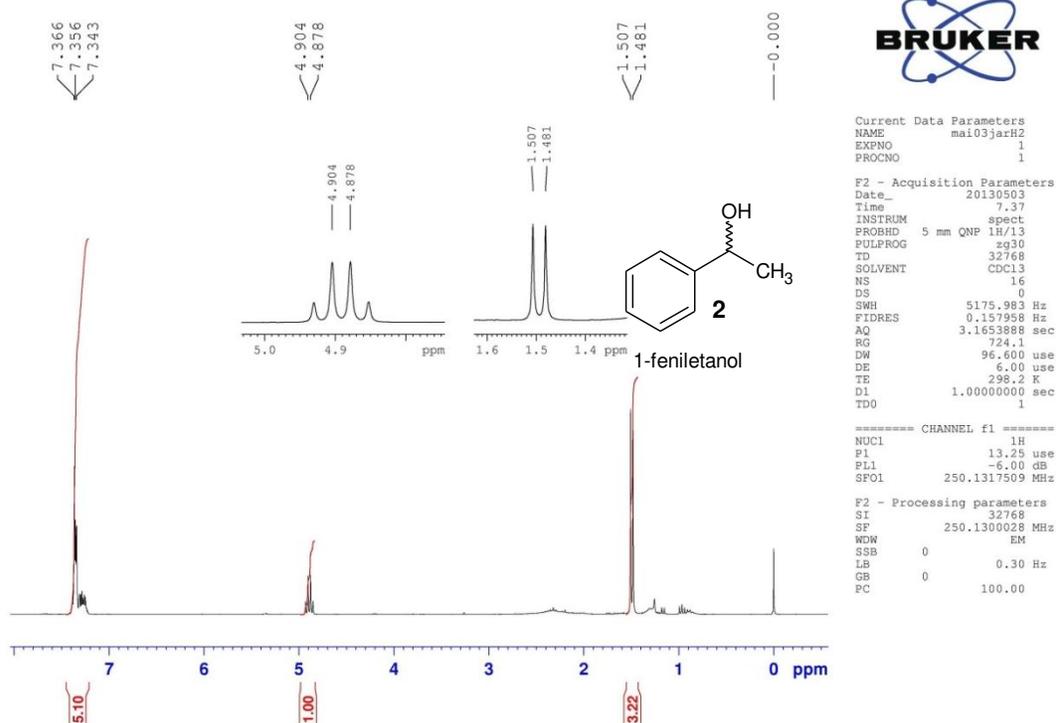
Foi obtido a partir da desracemização de *rac*-**15** catalisada por células de *C. albicans* obtida pelo **Método A** após 48 horas de reação. Ao término da reação realizou-se a extração e purificação similar ao descrito na **seção 5.6.1**. O rendimento da reação foi de 50 % e o produto (*R*)-**15** com ee de 96%, determinado por CLAE **Método 3**.

## 6-Referências bibliográficas

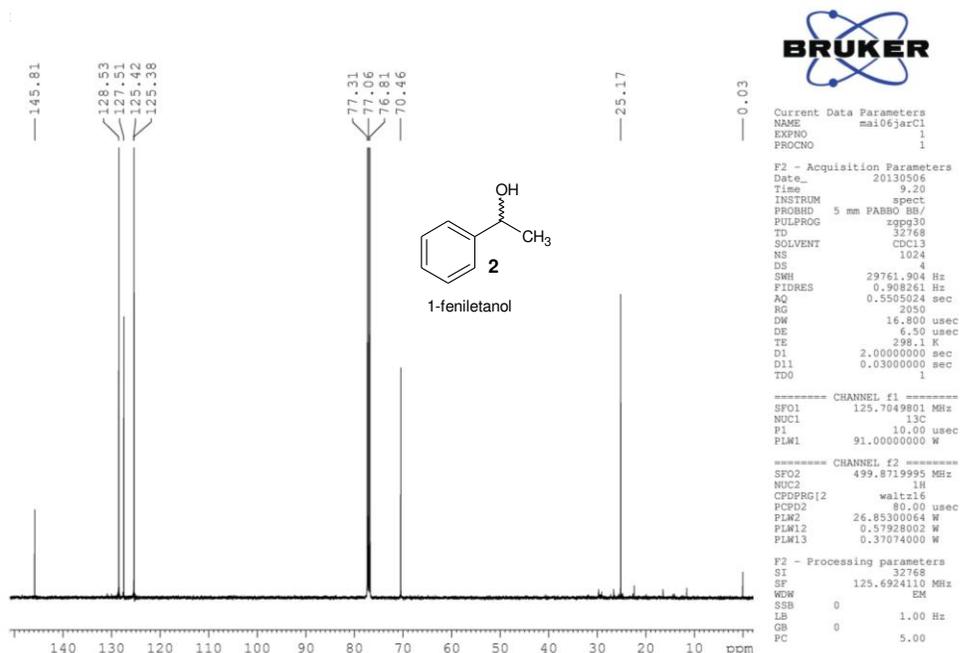
- 1 - Hollmann, F.; Arends, I. W. C. E.; Buehler, K.; Schallmeyer, A.; Buhler, B. *Green Chem.* **2011**, *13*, 226.
- 2 - Faber, K. *Biotransformations in Organic Chemistry*; 5<sup>a</sup> Edition ed.; Springer: Berlin/Heidelberg, **2004**.
- 3 - Huisman, G. W.; Collier, S. J. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2013**, *17*, 284.
- 4 - Sheldon, R. A. *Chem. Soc. Rev.* **2012**, *41*, 1437.
- 5 - Simpson, H. D.; Alphand, V.; Furstoss, R. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2001**, *16*, 101.
- 6 - Conceição, G. J. A.; Moran, P. J. S.; Rodrigues, J. A. R. *Tetrahedron: Asymmetry* **2003**, *14*, 43.
- 7 - Nelson, D. L.; Cox, M. M. *Lehninger Principles of Biochemistry*, 4th Edition; W. H. Freeman, **2004**.
- 8 - Hanson, R. L.; Goldberg, S.; Goswami, A.; Tully, T. P.; Patel, R. N. *Adv. Synth. Catal.* **2005**, *347*, 1073.
- 9 - Shen, N.-D.; Ni, Y.; Ma, H.-M.; Wang, L.-J.; Li, C.-X.; Zheng, G.-W.; Zhang, J.; Xu, J.-H. *Org. Lett.* **2012**, *14*, 1982.
- 10 - Itoh, N.; Isotani, K.; Nakamura, M.; Inoue, K.; Isogai, Y.; Makino, Y. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2012**, *93*, 1075.
- 11 - Ravía, S. P.; Carrera, I.; Seoane, G. A.; Vero, S.; Gaménara, D. *Tetrahedron: Asymmetry* **2009**, *20*, 1393.
- 12 - Mahajabeen, P.; Chadha, A. *Tetrahedron: Asymmetry* **2011**, *22*, 2156.
- 13 - Hu, Q. S.; Xu, Y.; Nie, Y. *Bioresour. Technol.* **2010**, *101*, 8502.
- 14 - Fragnelli, M. C.; Hoyos, P.; Romano, D.; Gandolfi, R.; Alcántara, A. R.; Molinari, F. *Tetrahedron* **2012**, *68*, 523.
- 15 - Banfi, L.; Cascio, G.; Ghiron, C.; Guanti, G.; Manghisi, E.; Narisano, E.; Riva, R. *Tetrahedron* **1994**, *50*, 11983.
- 16 - Swaren, P.; Massova, I.; Bellettini, J. R.; Bulychev, A.; Maveyraud, L.; Kotra, L. P.; Miller, M. J.; Mobashery, S.; Samama, J.-P. *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 5353.
- 17 - Guaragna, A.; De, N. M.; Pedatella, S.; Palumbo, G. *Tetrahedron: Asymmetry* **2006**, *17*, 2839.
- 18 - Zhou, B. N.; Gopalan, A. S.; VanMiddlesworth, F.; Shieh, W. R.; Sih, C. J. *J. Am. Chem. Soc.* **1983**, *105*, 5925.
- 19 - Wuensche, K.; Schwaneberg, U.; Bornscheuer, U. T.; Meyer, H. H. *Tetrahedron: Asymmetry* **1996**, *7*, 2017.
- 20 - Brieva, R.; Crich, J. Z.; Sih, C. J. *J. Org. Chem.* **1993**, *58*, 1068.
- 21 - Chenevert, R.; Fortier, G. *Chem. Lett.* **1991**, *20*, 1603.
- 22 - Urbach, H.; Henning, R. *Tetrahedron Lett.* **1984**, *25*, 1143.
- 23 - Lin, W.-Q.; He, Z.; Jing, Y.; Cui, X.; Liu, H.; Mi, A.-Q. *Tetrahedron: Asymmetry* **2001**, *12*, 1583.
- 24 - Yanagisawa, H.; Ishihara, S.; Ando, A.; Kanazaki, T.; Miyamoto, S.; Koike, H.; Iijima, Y.; Oizumi, K.; Matsushita, Y.; Hata, T. *J. Med. Chem.* **1988**, *31*, 422.
- 25 - Yanagisawa, H.; Ishihara, S.; Ando, A.; Kanazaki, T.; Miyamoto, S.; Koike, H.; Iijima, Y.; Oizumi, K.; Matsushita, Y.; Hata, T. *J. Med. Chem.* **1987**, *30*, 1984.
- 26 - Chen, Y.; Lin, H.; Xu, X.; Xia, S.; Wang, L. *Adv. Synth. Catal.* **2008**, *350*, 426.
- 27 - Díaz-Álvarez, A. E.; Mesas-Sánchez, L.; Dinér, P. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2013**, *52*, 502.
- 28 - Magallanes-Noguera, C.; Ferrari, M. n. M.; Kurina-Sanz, M.; Orden, A. A. *J. Biotechnol.* **2012**, *160*, 189.
- 29 - Kim, J.; De Castro, K. A.; Lim, M.; Rhee, H. *Tetrahedron* **2010**, *66*, 3995.
- 30 - Hoyos, P.; Sansottera, G.; Fernandez, M.; Molinari, F.; Sinisterra, J. V.; Alcántara, A. R. *Tetrahedron* **2008**, *64*, 7929.
- 31 - Engelking, H.; Pfaller, R.; Wich, G.; Weuster-Botz, D. *Enzyme Microb. Technol.* **2006**, *38*, 536.
- 32 - Kozyra, K.; Brzezińska-Rodak, M.; Klimek-Ochab, M.; Żymańczyk-Duda, E. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2013**, *91*, 32.
- 33 - Cuetos, A.; Rioz-Martinez, A.; Bisogno, F. R.; Grischek, B.; Lavandera, I.; de, G. G.; Kroutil, W.; Gotor, V. *Adv. Synth. Catal.* **2012**, *354*, 1743.
- 34 - Silva, C. R.; Souza, J. C.; Araújo, L. S.; Kagohara, E.; Garcia, T. P.; Pelizzari, V. H.; Andrade, L. H. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2012**, *83*, 23.
- 35 - Voss, C. V.; Gruber, C. C.; Kroutil, W. *Synlett* **2010**, 991.
- 36 - Voss, C. V.; Gruber, C. C.; Kroutil, W. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2008**, *47*, 741.
- 37 - Voss, C. V.; Gruber, C. C.; Faber, K.; Knaus, T.; Macheroux, P.; Kroutil, W. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 13969.
- 38 - Gruber, C. C.; Lavandera, I.; Faber, K.; Kroutil, W. *Adv. Synth. Catal.* **2006**, *348*, 1789.
- 39 - Schober, M.; Toesch, M.; Knaus, T.; Strohmeier, G. A.; van Loo, B.; Fuchs, M.; Hollfelder, F.; Macheroux, P.; Faber, K. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2013**, *52*, 3277.

- 40 - Jiang, B.; Liu, J.-F.; Zhao, S.-Y. *J. Org. Chem.* **2003**, *68*, 2376.
- 41 - Amidjojo, M.; Weuster-Botz, D. *Tetrahedron: Asymmetry* **2005**, *16*, 899.
- 42 - Ribeiro, J. B.; de Souza Ramos, A.; Fiaux, S. B.; Leite, S. G. F.; Ramos, M. d. C. K. V.; de Aquino Neto, F. R.; Antunes, O. A. C. *Tetrahedron: Asymmetry* **2009**, *20*, 2263.
- 43 - Kaliaperumal, T.; Kumar, S.; Gummadi, S. N.; Chadha, A. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **2009**, *37*, 159.
- 44 - Martins, R. S.; Zampieri, D. S.; Rodrigues, J. A. R.; Carvalho, P. O.; Moran, P. J. S. *ChemCatChem* **2011**, *3*, 1469.
- 45 - Hall, M.; Bommarius, A. S. *Chem. Rev.* **2011**, *111*, 4088.
- 46 - Rodrigues, J. A. R. *Quim. Nova* **2010**, *33*, 1175.
- 47 - Amrutkar, S. M.; Banoth, L.; Banerjee, U. C. *Tetrahedron Letters* **2013**, *54*, 3274.
- 48 - Gamenara, D.; Seoane, G. A.; Saenz-Méndez, P.; de María, P. D. In *Redox Biocatalysis*; John Wiley & Sons, Inc.: **2012**, p 101.
- 49 - Matsuda, T.; Yamanaka, R.; Nakamura, K. *Tetrahedron: Asymmetry* **2009**, *20*, 513.
- 50 - Oroz-Guinea, I.; García-Junceda, E. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2013**, *17*, 236.
- 51 - Chadha, A.; Baskar, B. *Tetrahedron: Asymmetry* **2002**, *13*, 1461.
- 52 - Baskar, B.; Pandian, N. G.; Priya, K.; Chadha, A. *Tetrahedron* **2005**, *61*, 12296.
- 53 - Nakamura, K.; Fujii, M.; Ida, Y. *Tetrahedron: Asymmetry* **2001**, *12*, 3147.
- 54 - Nakamura, K.; Inoue, Y.; Matsuda, T.; Ohno, A. *Tetrahedron Lett.* **1995**, *36*, 6263.
- 55 - Lunardi, I.; Cazetta, T.; Conceição, G. J. A.; Moran, P. J. S.; Rodrigues, J. A. R. *Adv. Synth. Catal.* **2007**, *349*, 925.
- 56 - Cazetta, T.; Lunardi, I.; Conceição, G. J. A.; Moran, P. J. S.; Rodrigues, J. A. R. *Tetrahedron: Asymmetry* **2007**, *18*, 2030.
- 57 - Stewart, B.; Nyhlen, J.; Martin-Matute, B.; Backvall, J.-E.; Privalov, T. *Dalton Trans.* **2013**, *42*, 927.
- 58 - Lee, S. Y.; Murphy, J. M.; Ukai, A.; Fu, G. C. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 15149.
- 59 - Warner, M. C.; Nagendiran, A.; Bogar, K.; Backvall, J.-E. *Org. Lett.* **2012**, *14*, 5094.
- 60 - Warner, M. C.; Verho, O.; Backvall, J.-E. *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 2820.
- 61 - Aberg, J. B.; Warner, M. C.; Backvall, J.-E. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 13622.
- 62 - Leijondahl, K.; Boren, L.; Braun, R.; Backvall, J.-E. *J. Org. Chem.* **2009**, *74*, 1988.
- 63 - Martin-Matute, B.; Aberg, J. B.; Edin, M.; Backvall, J.-E. *Chem Eur. J.* **2007**, *13*, 6063.
- 64 - Shimada, Y.; Miyake, Y.; Matsuzawa, H.; Nishibayashi, Y. *Chem Asian J* **2007**, *2*, 393.
- 65 - Szymanski, W.; Westerbeek, A.; Janssen, D. B.; Feringa, B. L. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2011**, *50*, 10712.
- 66 - Schober, M.; Gadler, P.; Knaus, T.; Kayer, H.; Birner-Grunberger, R.; Gully, C.; Macheroux, P.; Wagner, U.; Faber, K. *Org. Lett.* **2011**, *13*, 4296.
- 67 - Houiene, Z.; Merabet-Khelassi, M.; Bouzemi, N.; Riant, O.; Aribi-Zouiouche, L. *Tetrahedron: Asymmetry* **2013**, *24*, 290.
- 68 - Knoepfel, T. F.; Aschwanden, P.; Ichikawa, T.; Watanabe, T.; Carreira, E. M. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2004**, *43*, 5971.
- 69 - Baskar, B.; Pandian, N. G.; Priya, K.; Chadha, A. *Tetrahedron: Asymmetry* **2004**, *15*, 3961.
- 70 - Dieskau, A. P.; Plietker, B. *Org. Lett.* **2011**, *13*, 5544.

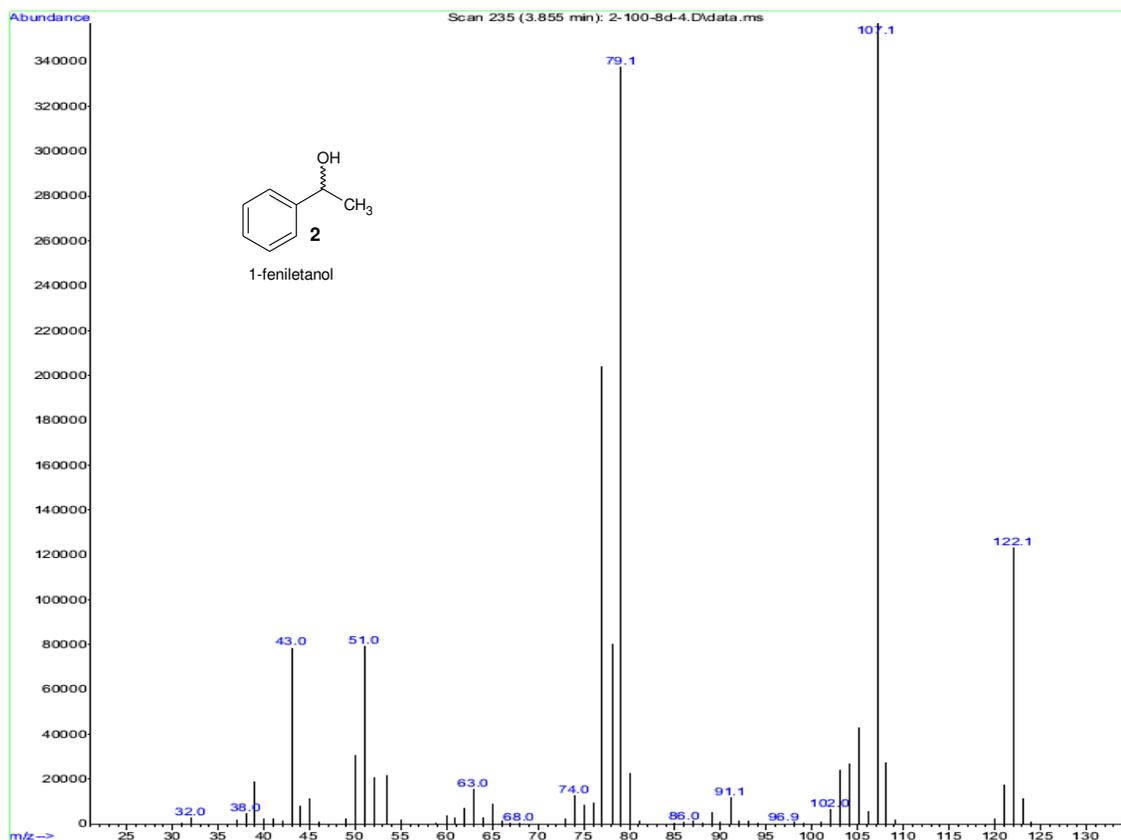
# Anexos I: Espectros de RMN, IV e massas.



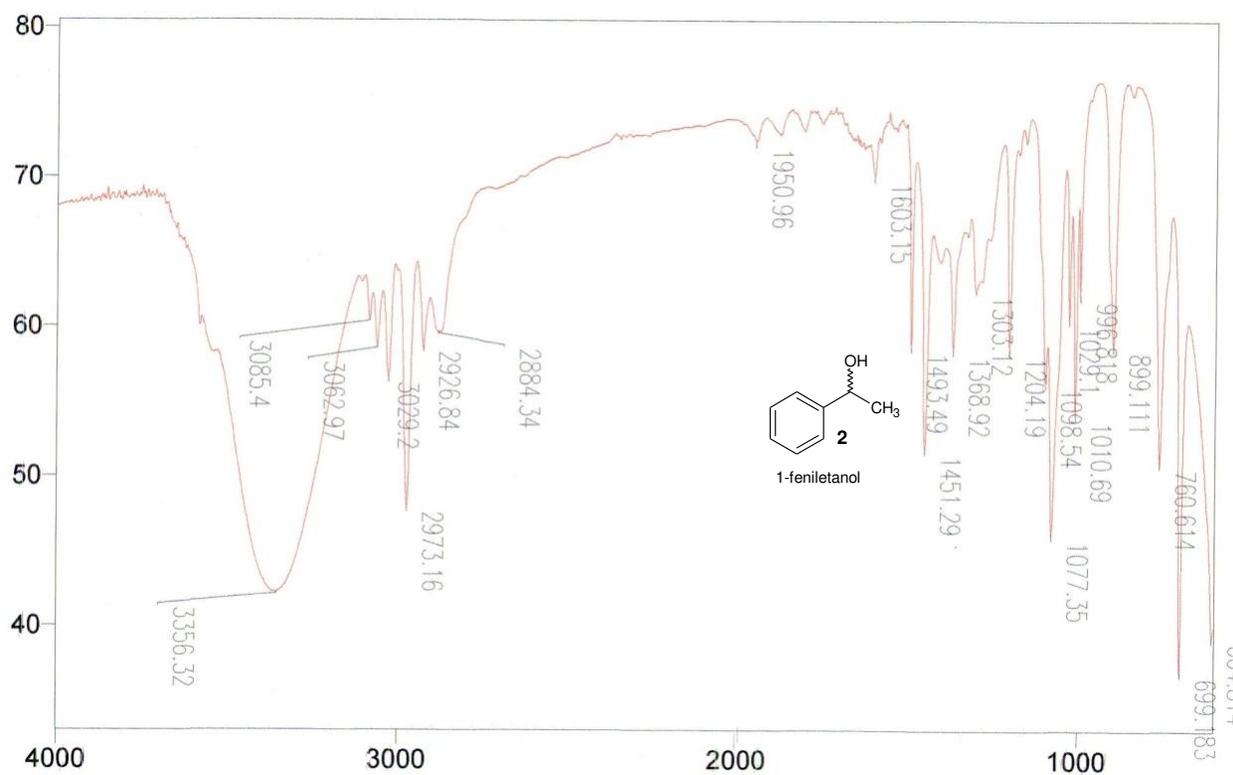
**Espectro 1:** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (250 MHz) de 1-feniletanol (**2**).



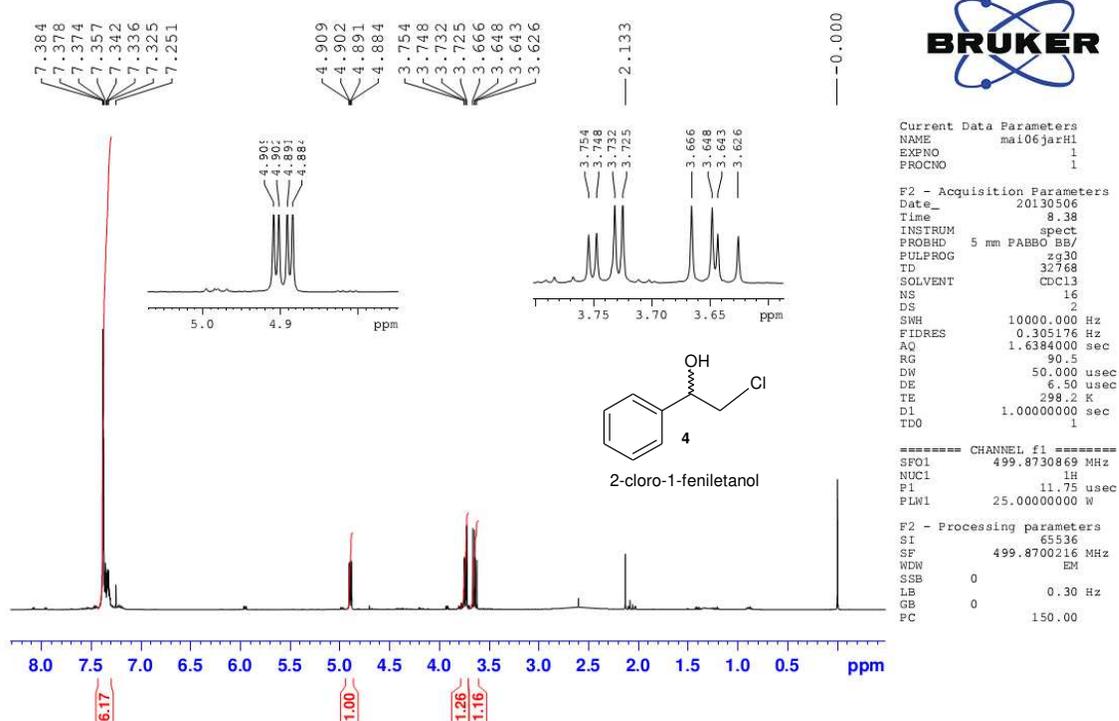
**Espectro 2:** Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (125 MHz) de 1-feniletanol (**2**).



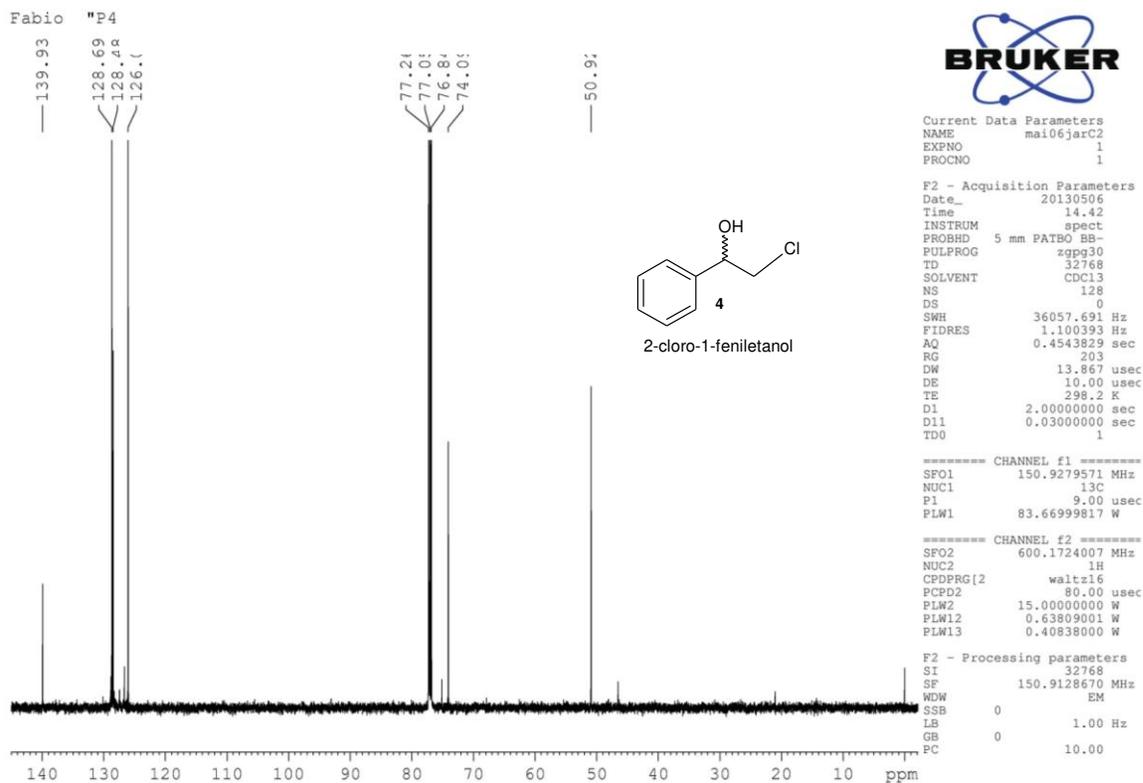
**Espectro 3:** Espectro de massas (EI, 70 eV) de 1-feniletanol (2).



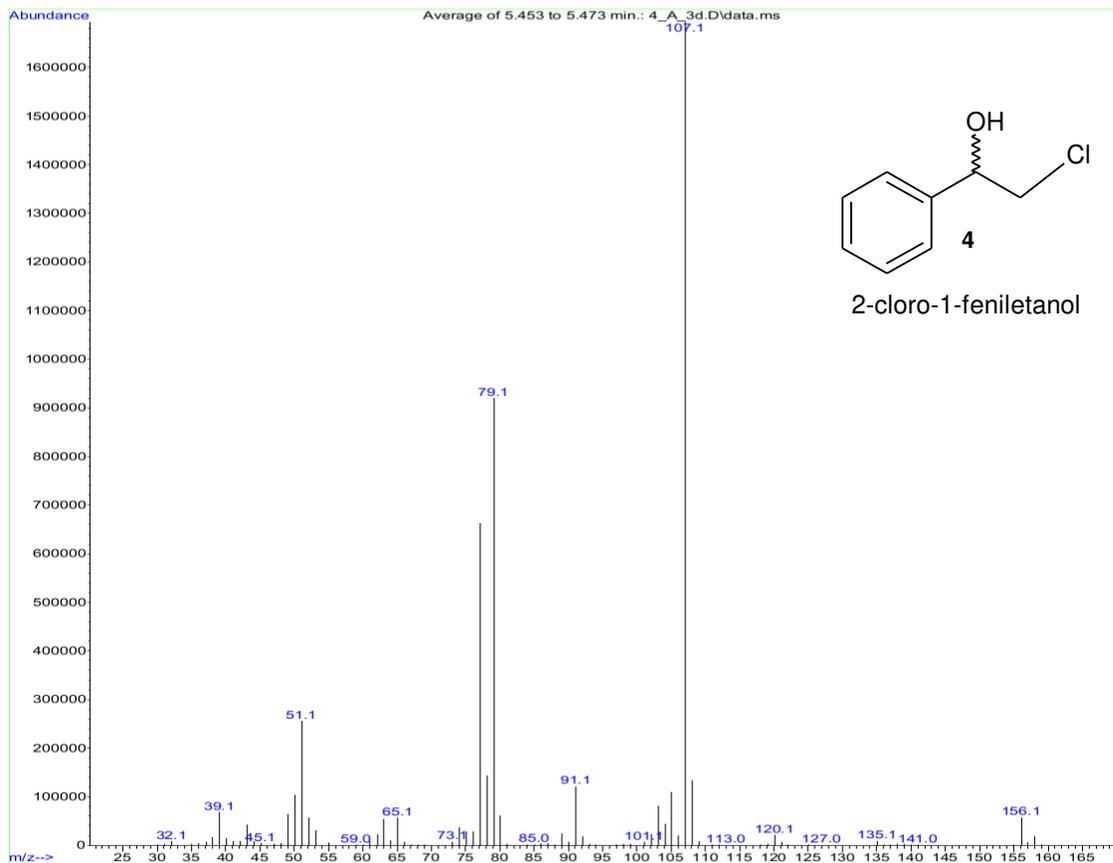
**Espectro 4:** Espectro de IV (filme em NaCl) de 1-feniletanol (2).



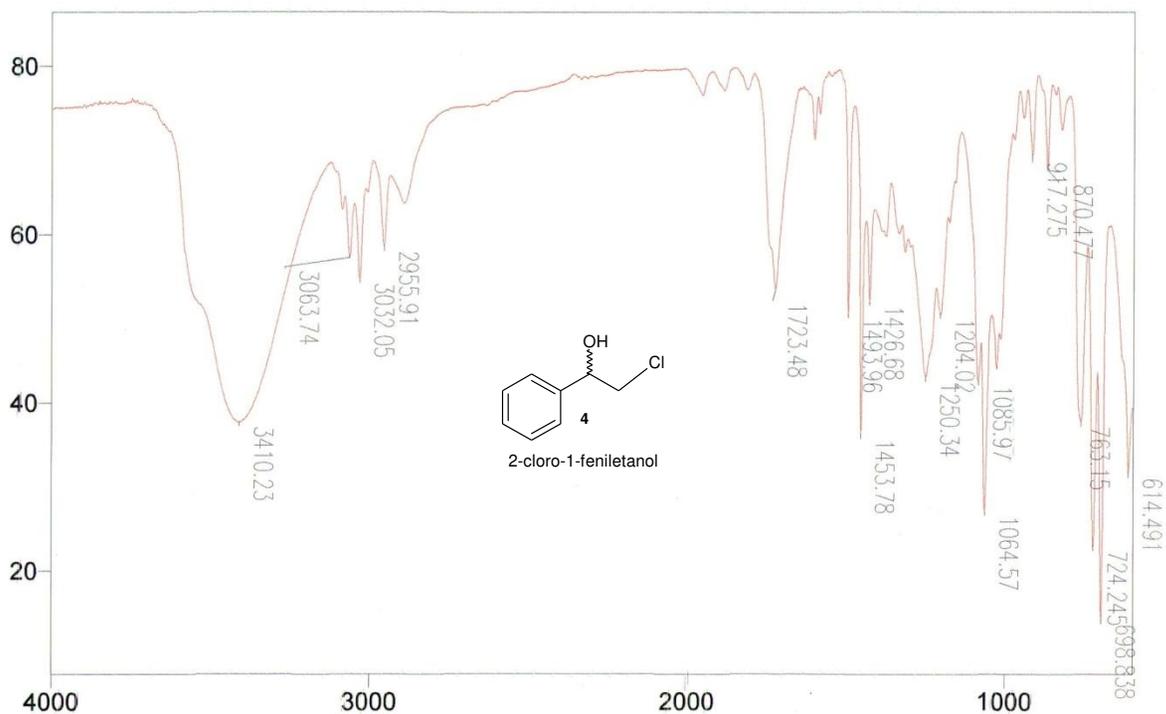
**Espectro 5:** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (500 MHz) de 2-cloro-1-feniletanol (4).



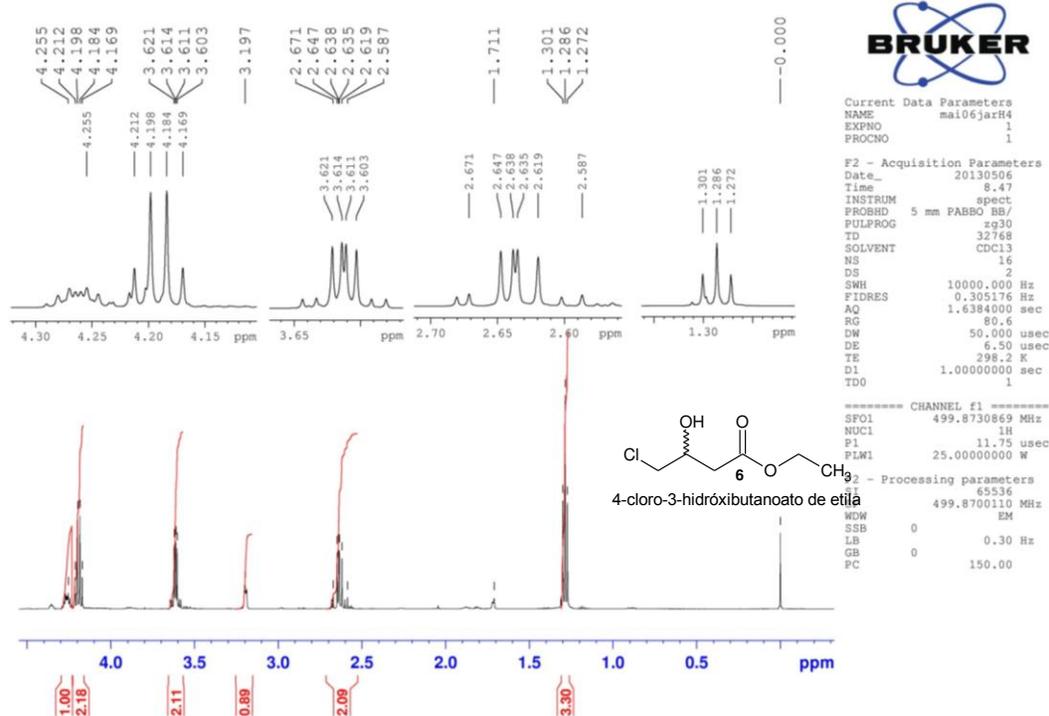
**Espectro 6:** Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (150 MHz) de 2-cloro-1-feniletanol (4).



**Espectro 7:** Espectro de massas (EI, 70 eV) de 2-cloro-1-feniletanol (4).

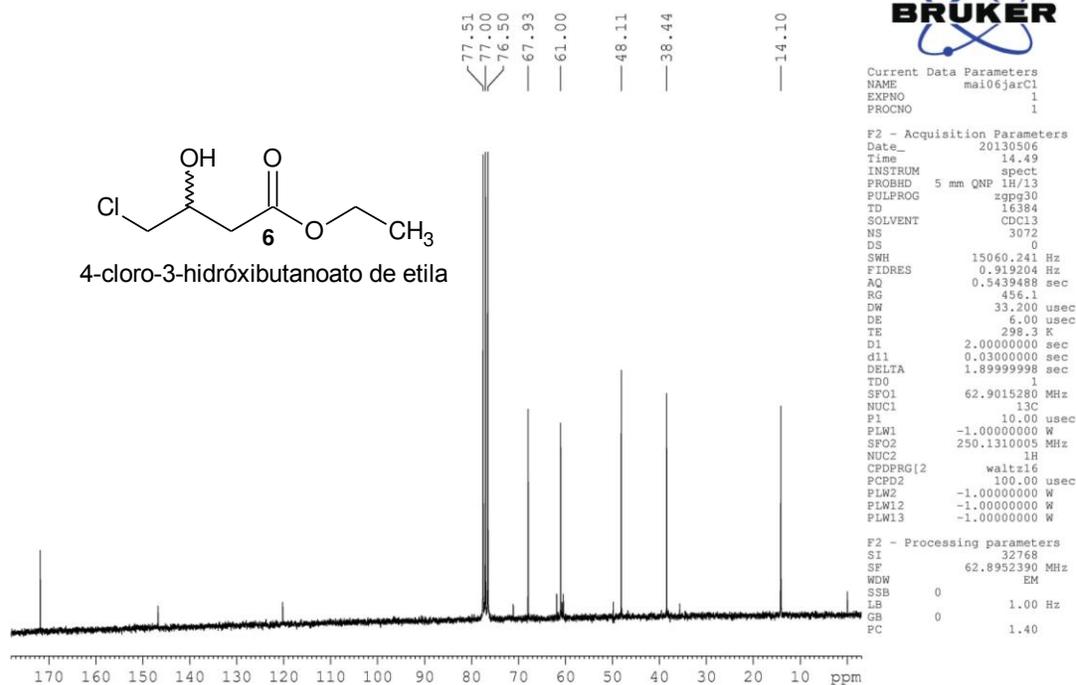


**Espectro 8:** Espectro de IV (filme em NaCl) de 2-cloro-1-feniletanol (4).

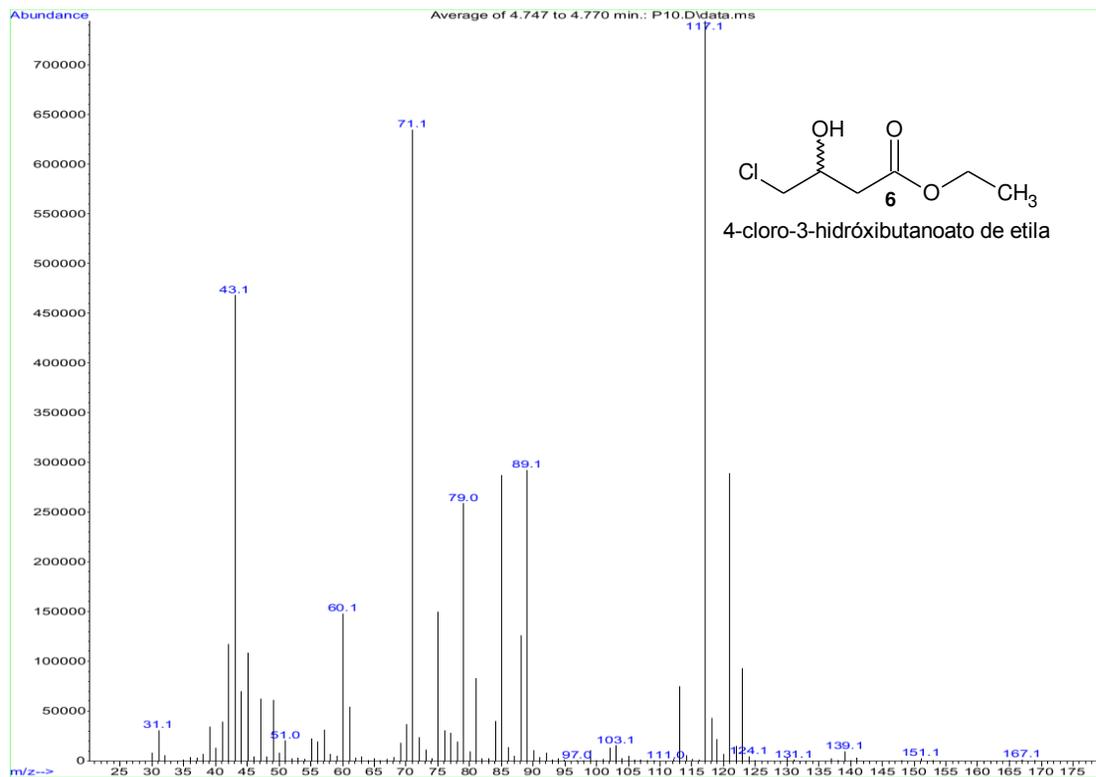


**Espectro 9:** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (500 MHz) de 4-cloro-3-hidróxibutanoato de etila (6).

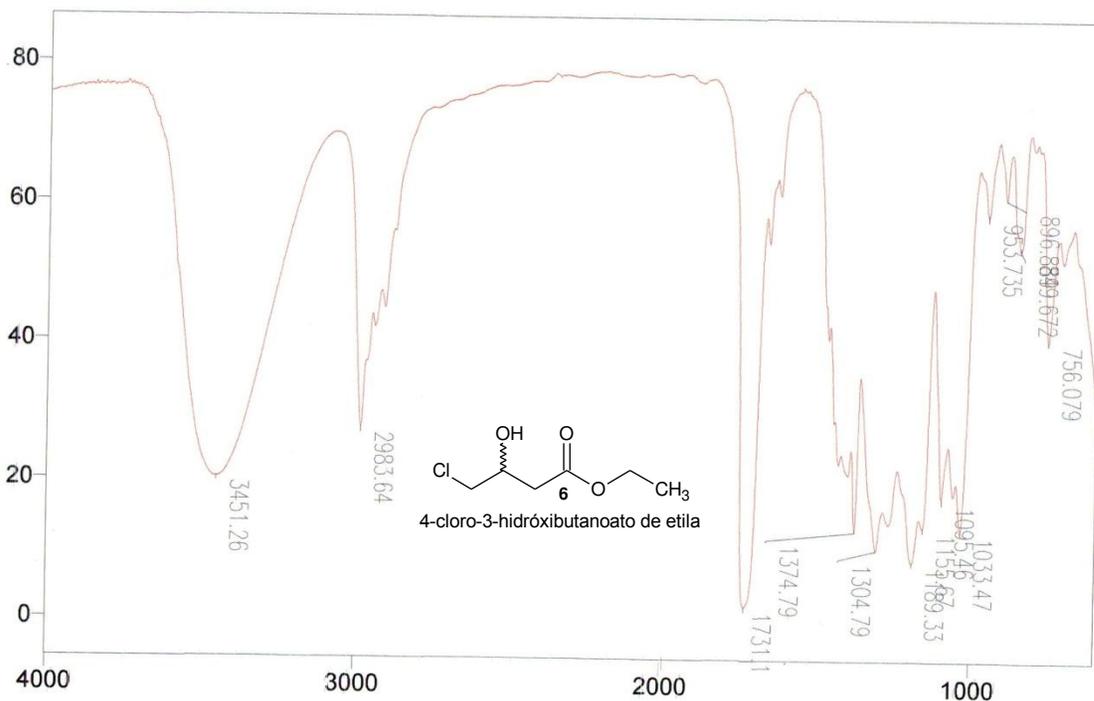
Fabio - P10 - CDCl3 - Bruker 250MHz - mai06jarCl



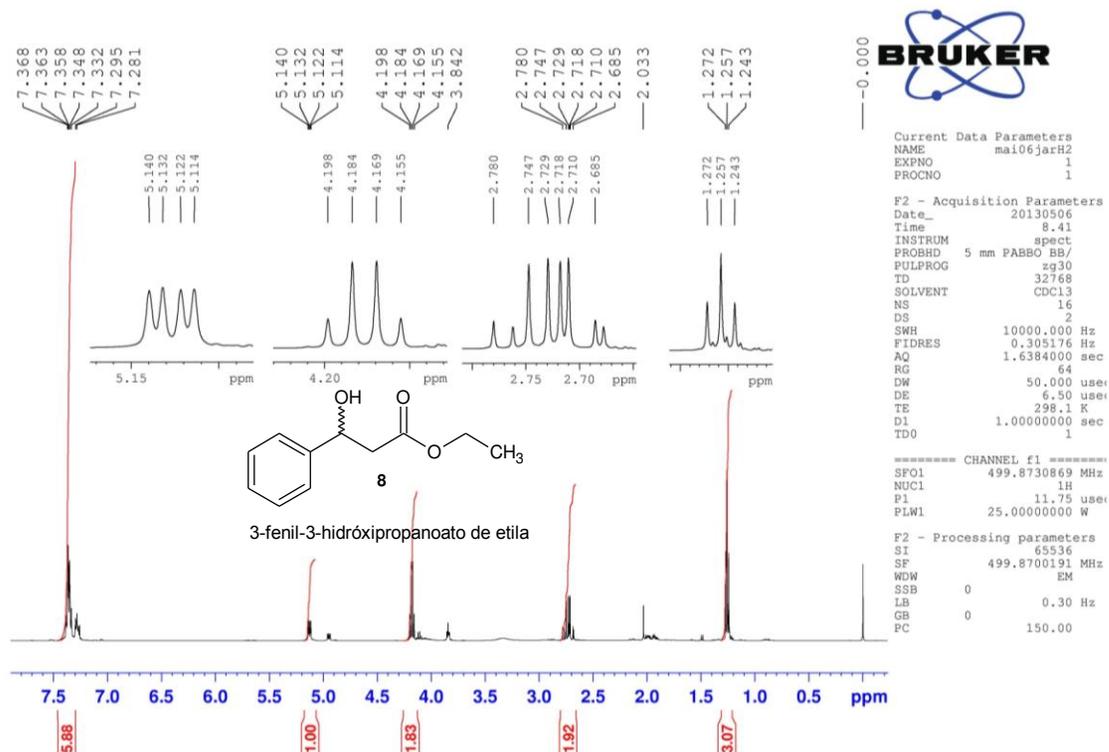
**Espectro 10:** Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (62,5 MHz) de 4-cloro-3-hidróxibutanoato de etila (6).



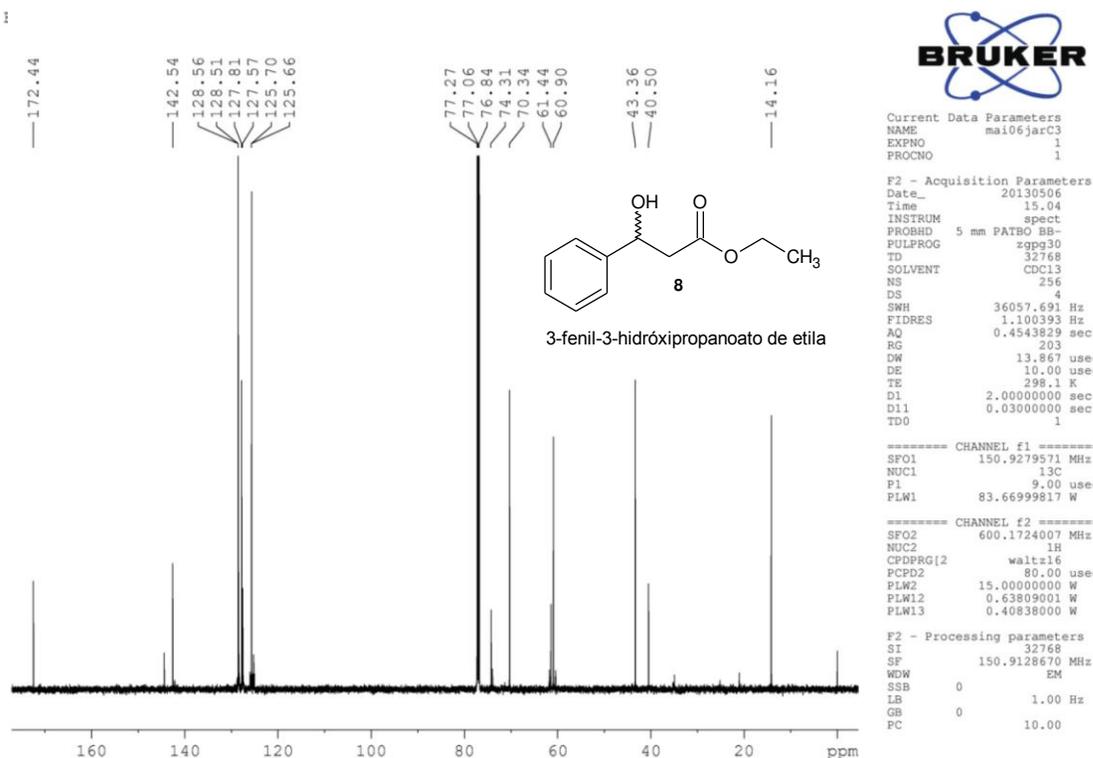
**Espectro 11:** Espectro de massas (EI, 70 eV) de 4-cloro-3-hidróxibutanoato de etila (6).



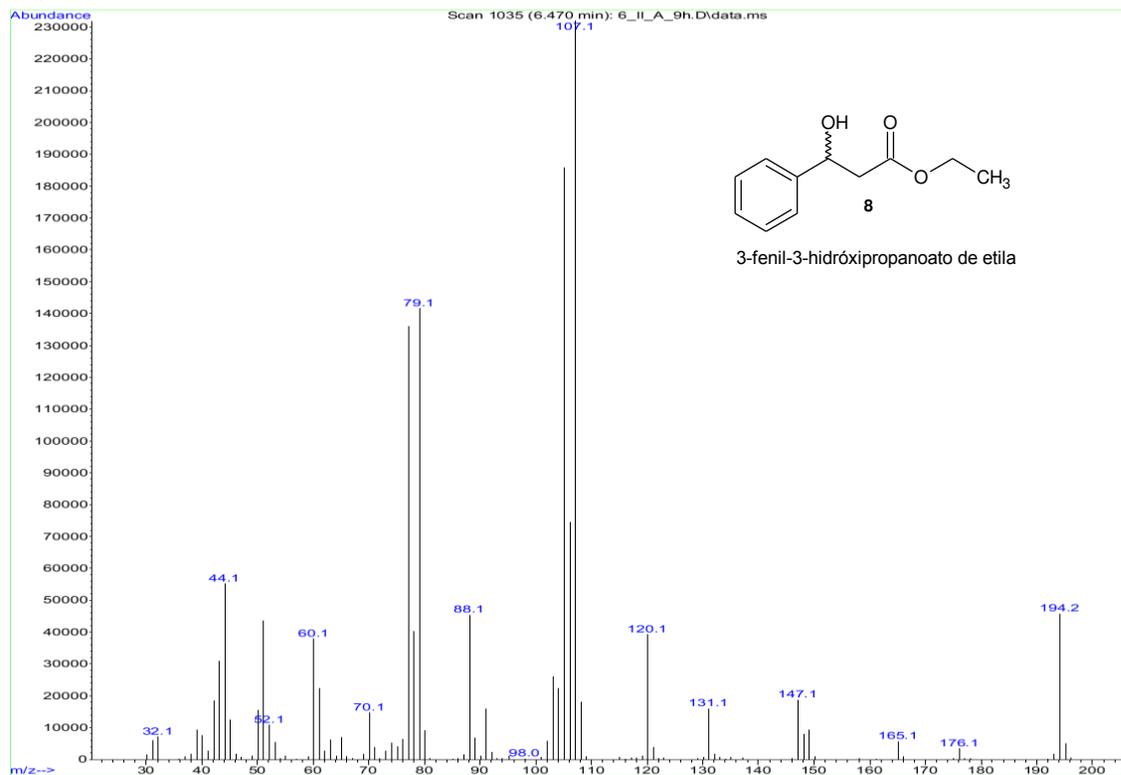
**Espectro 12:** Espectro de IV (filme em NaCl) de 4-cloro-3-hidróxibutanoato de etila (6).



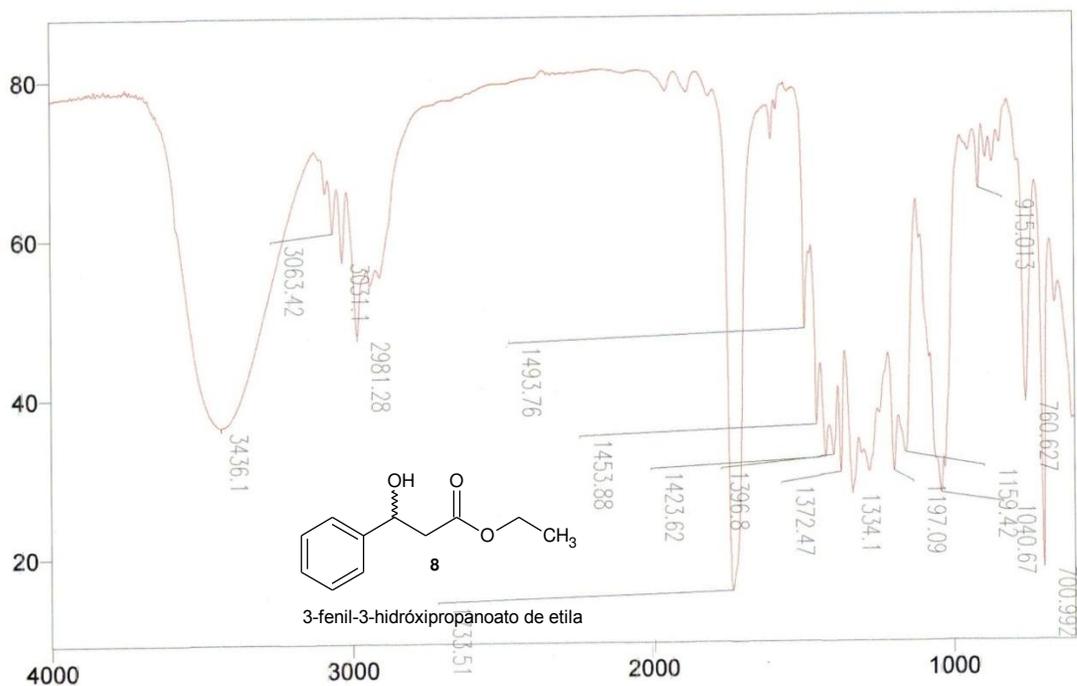
**Espectro 13:** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (500 MHz) de 3-fenil-3-hidróxiopropanoato de etila (8).



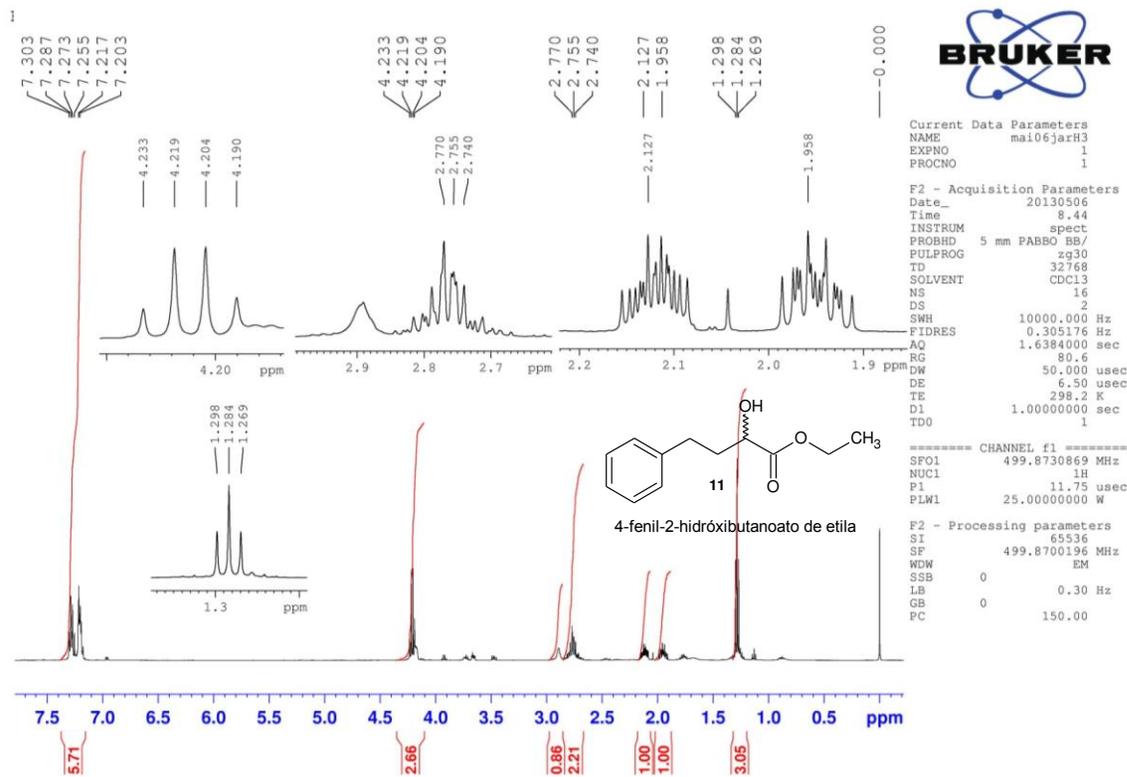
**Espectro 14:** Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (150 MHz) de 3-fenil-3-hidróxiopropanoato de etila (8).



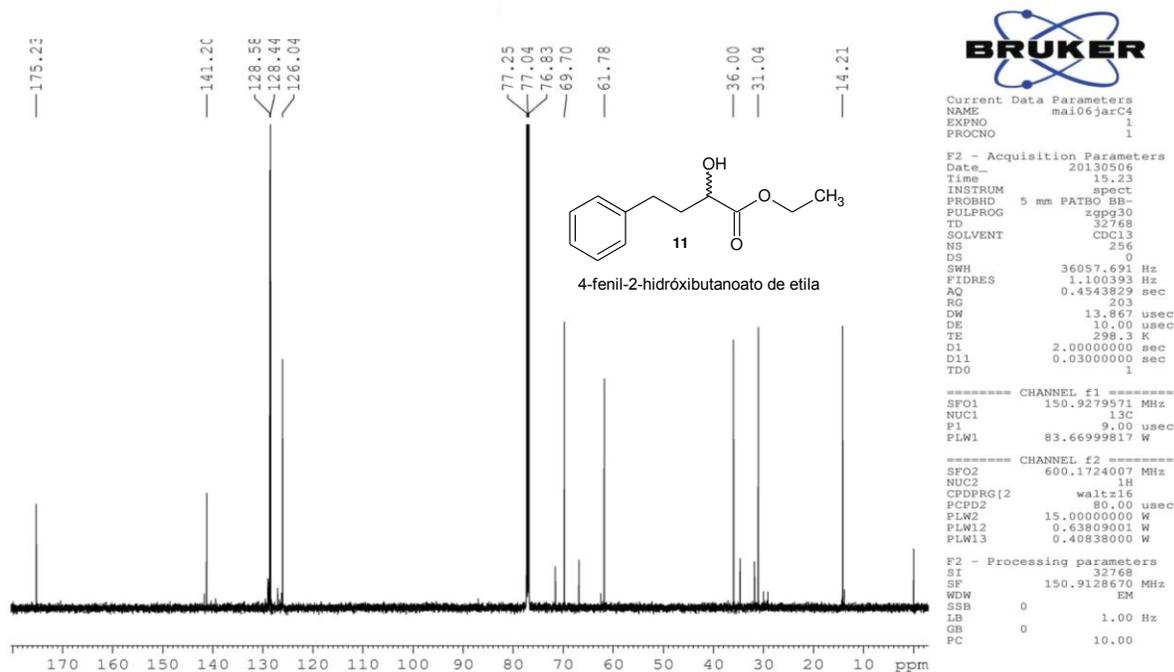
**Espectro 15:** Espectro de massas (EI, 70 eV) de 3-fenil-3-hidróxiopropanoato de etila (8).



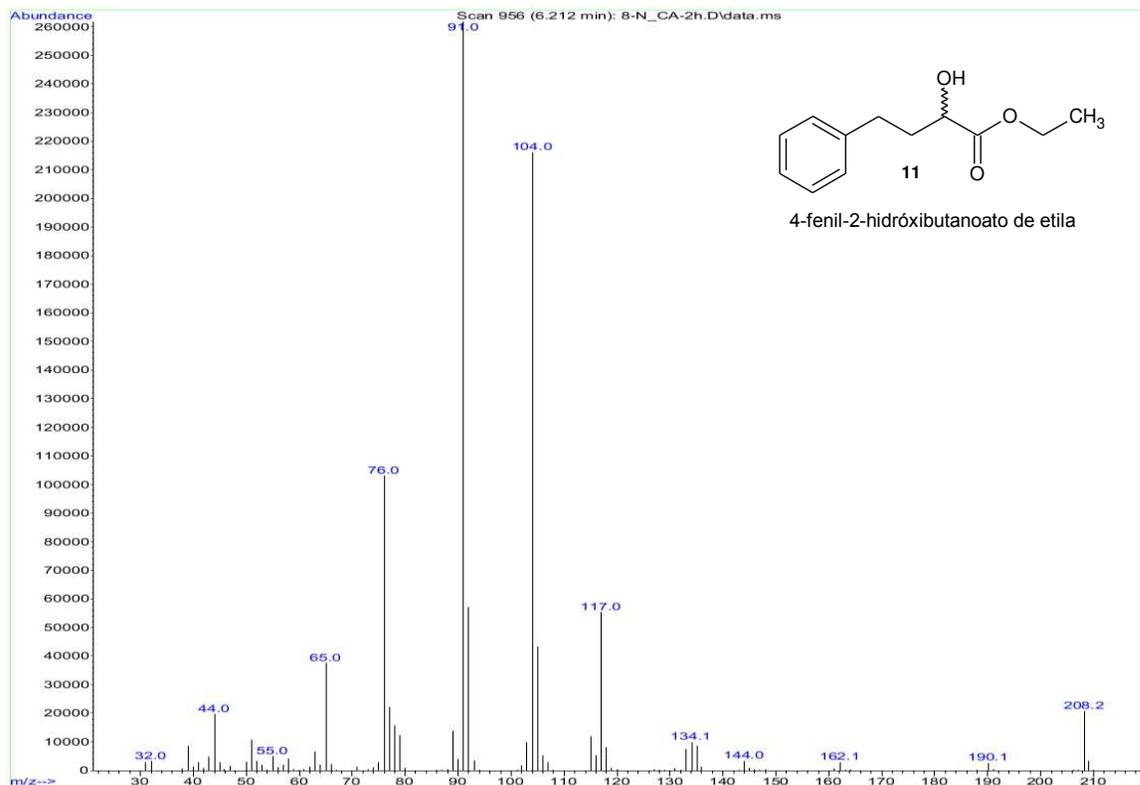
**Espectro 16:** Espectro de IV (filme em NaCl) de 3-fenil-3-hidróxiopropanoato de etila (8).



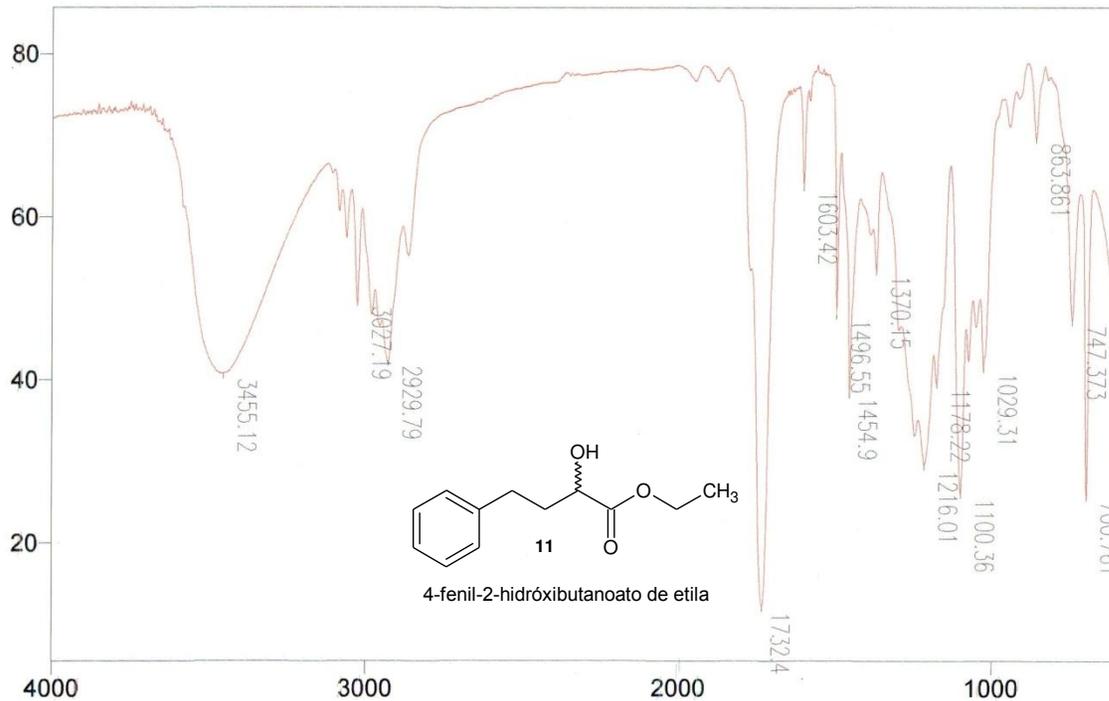
**Espectro 17:** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (500 MHz) de 4-fenil-2-hidróxibutanoato de etila (11).



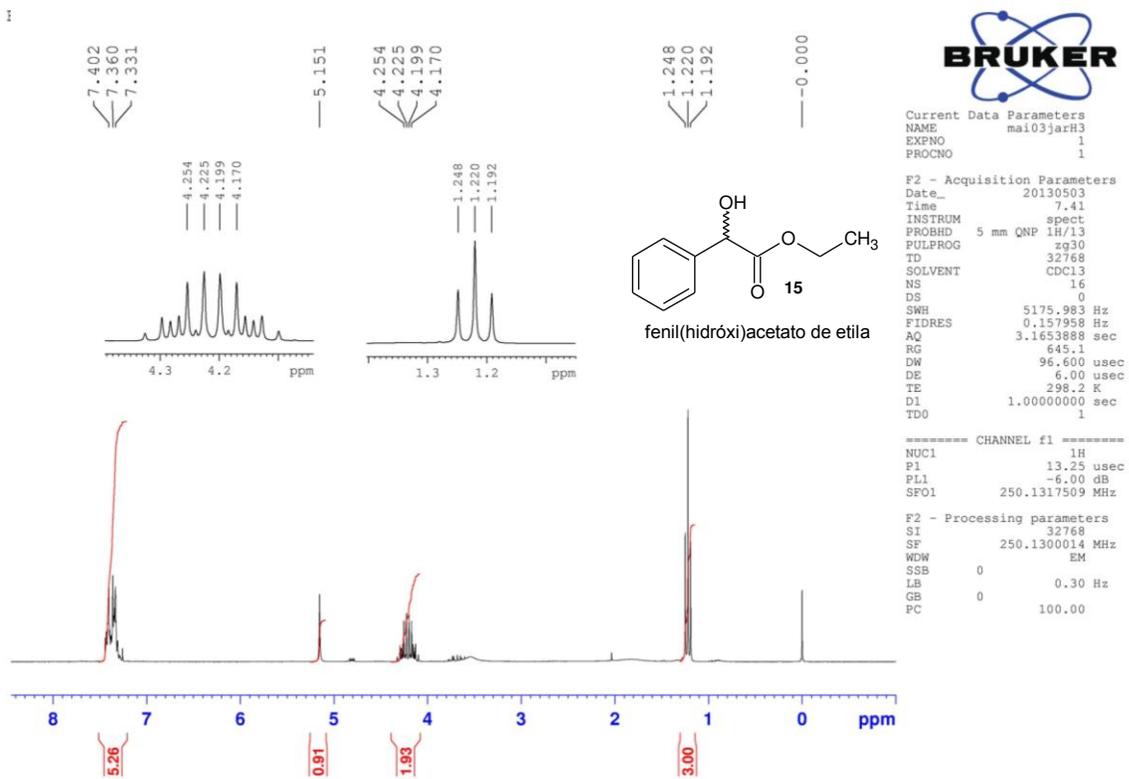
**Espectro 18:** Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (150 MHz) de 4-fenil-2-hidróxibutanoato de etila (11).



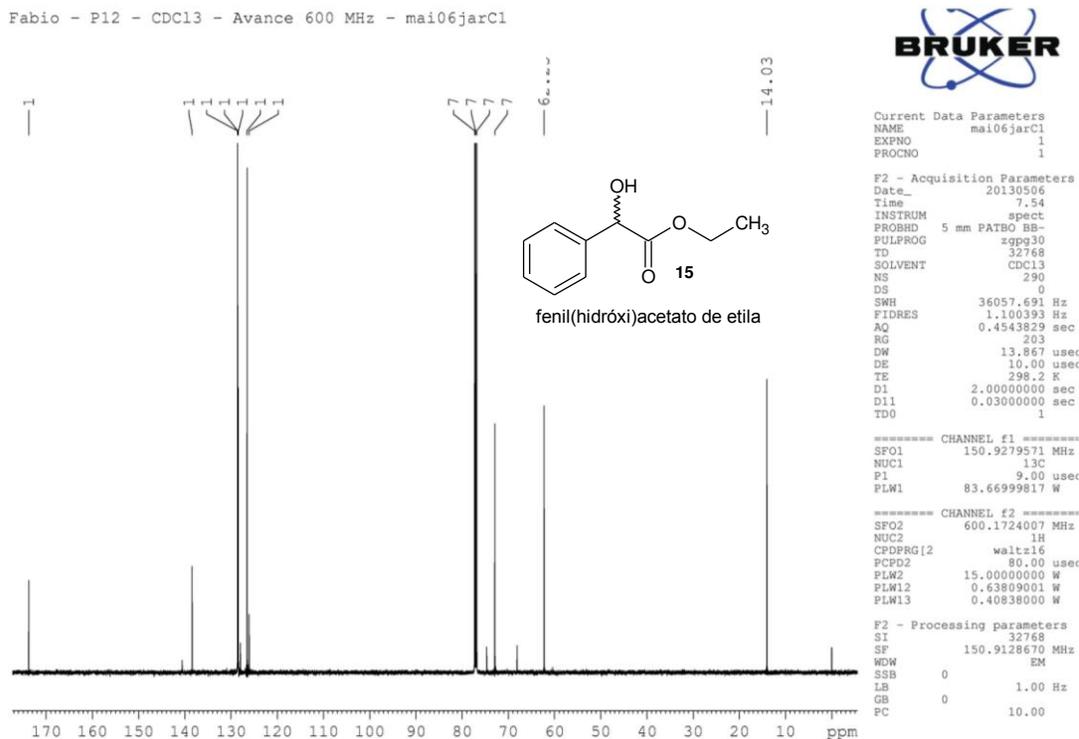
**Espectro 19:** Espectro de massas (EI, 70 eV) de 4-fenil-2-hidróxibutanoato de etila (11).



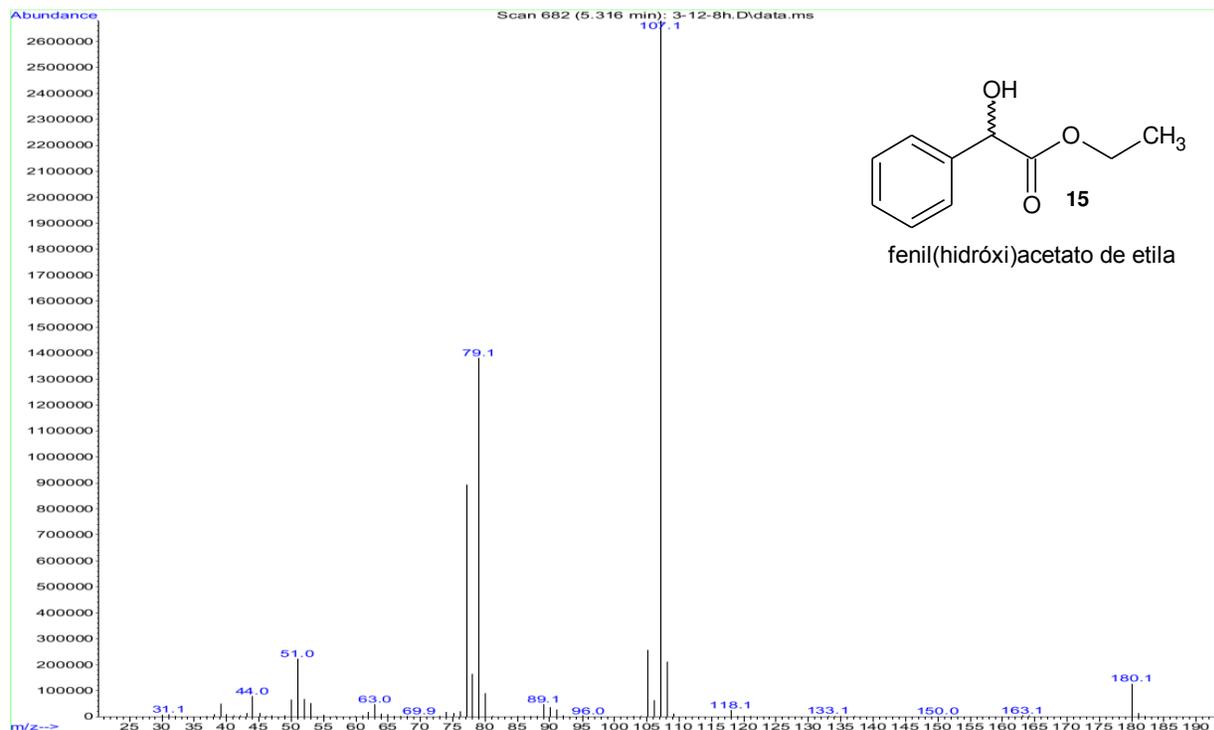
**Espectro 20:** Espectro de IV (filme) de 4-fenil-2-hidróxibutanoato de etila (11).



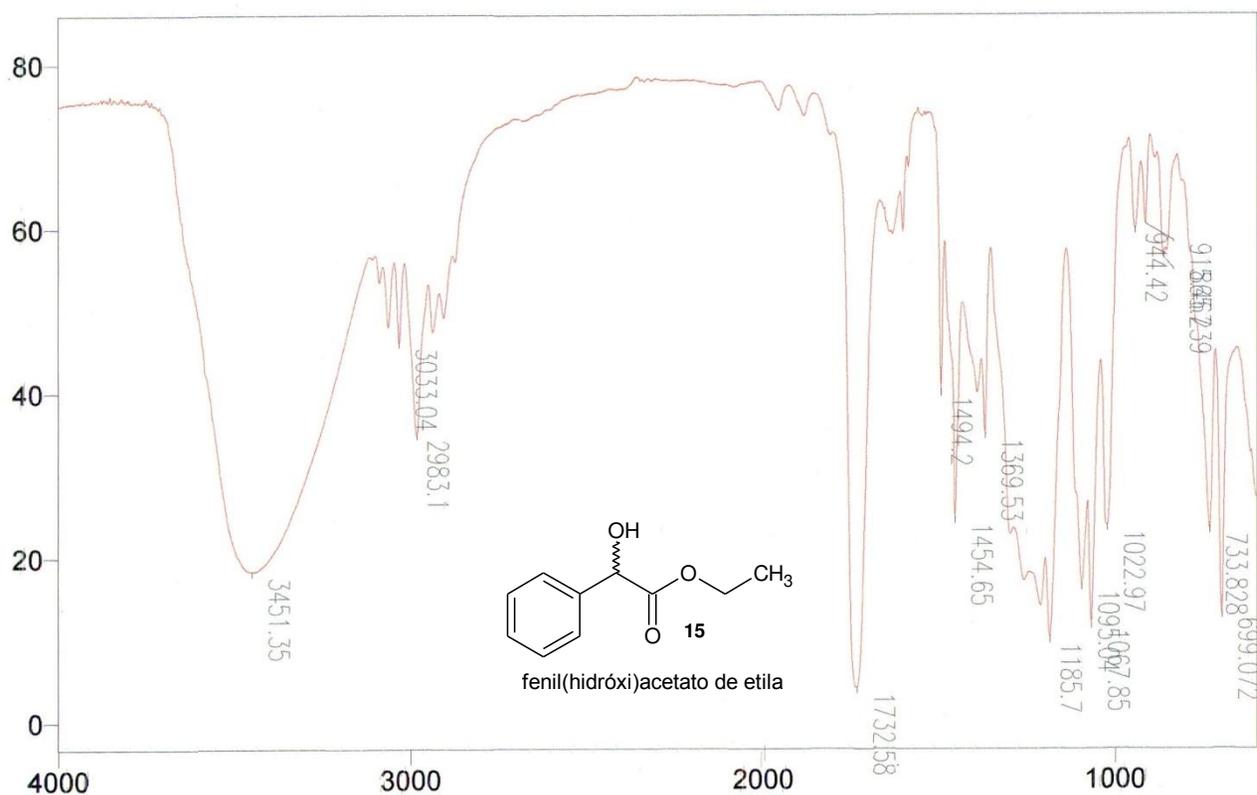
**Espectro 21:** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (250 MHz) de fenil(hidróxi)acetato de etila (15).



**Espectro 22:** Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (150 MHz) de fenil(hidróxi)acetato de etila (15).

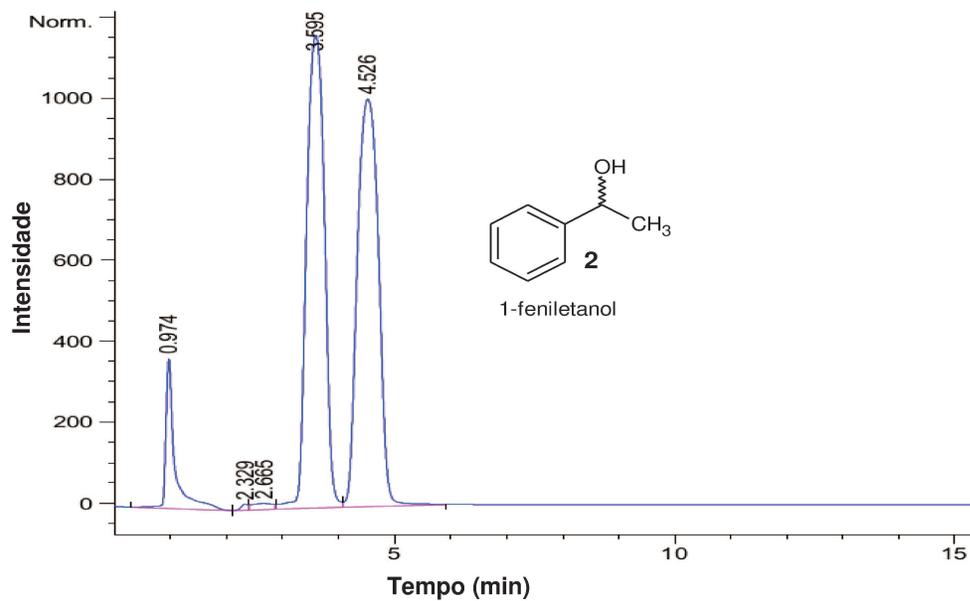


**Espectro 23:** Espectro de massas (EI, 70 eV) de fenil(hidróxi)acetato de etila (**15**).

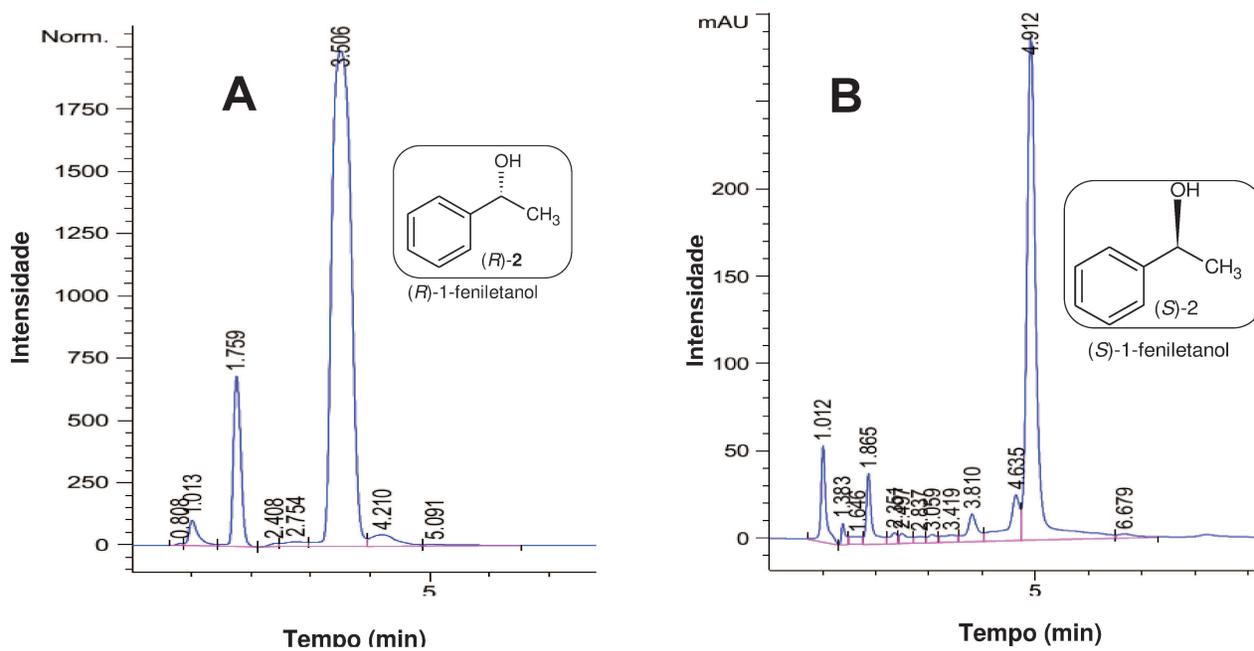


**Espectro 24:** Espectro de IV (filme em NaCl) de fenil(hidróxi)acetato de etila (**15**).

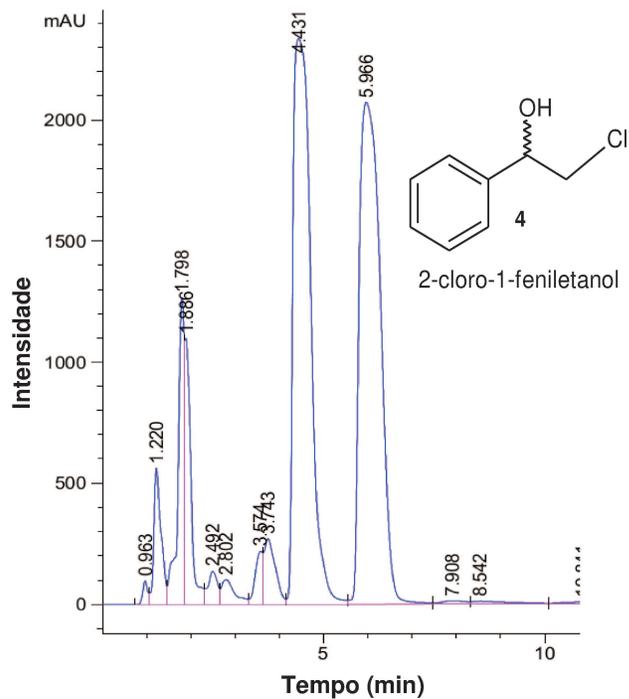
## Anexo II – Cromatogramas



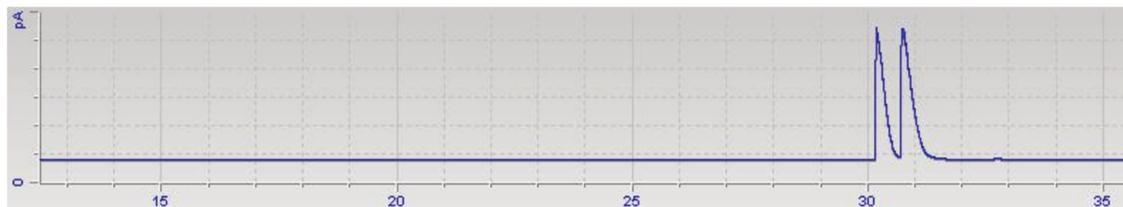
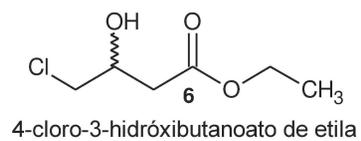
Cromatograma 1: Separação de *rac*-2 por CLAE.



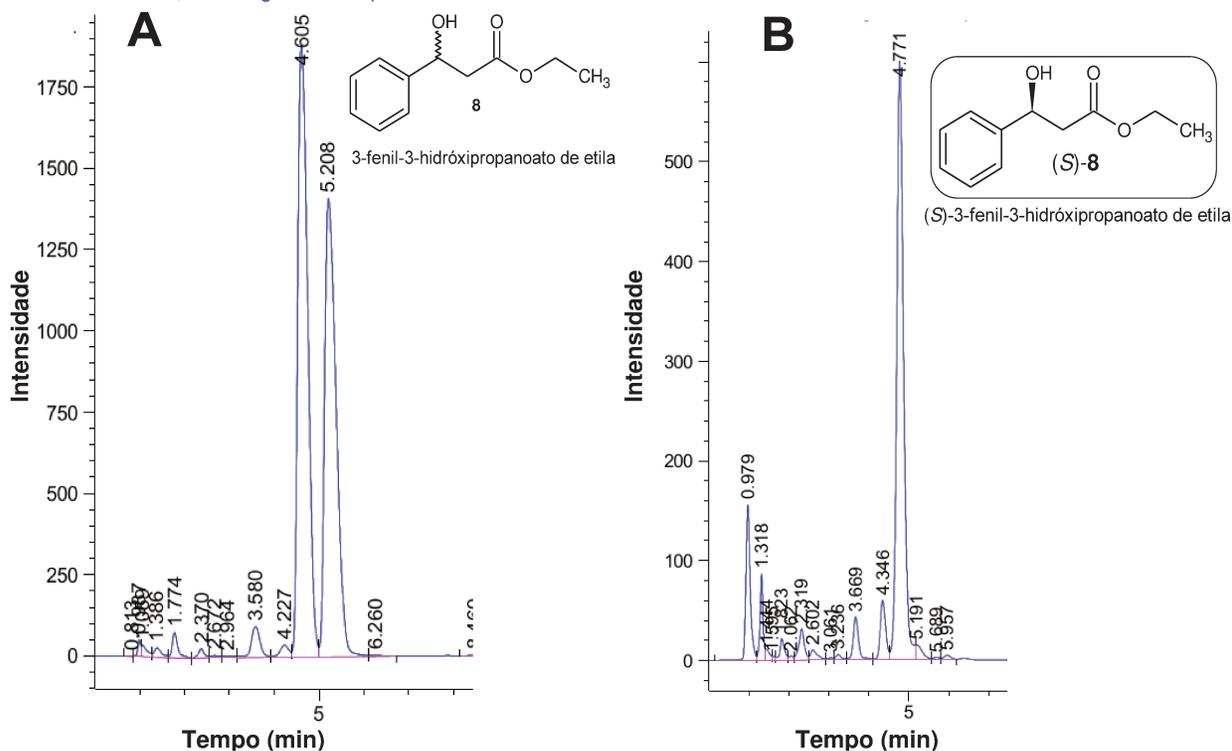
Cromatograma 2: Análise de 2 por CLAE após biocatálise: (A) (*R*)-2, (B) (*S*)-2.



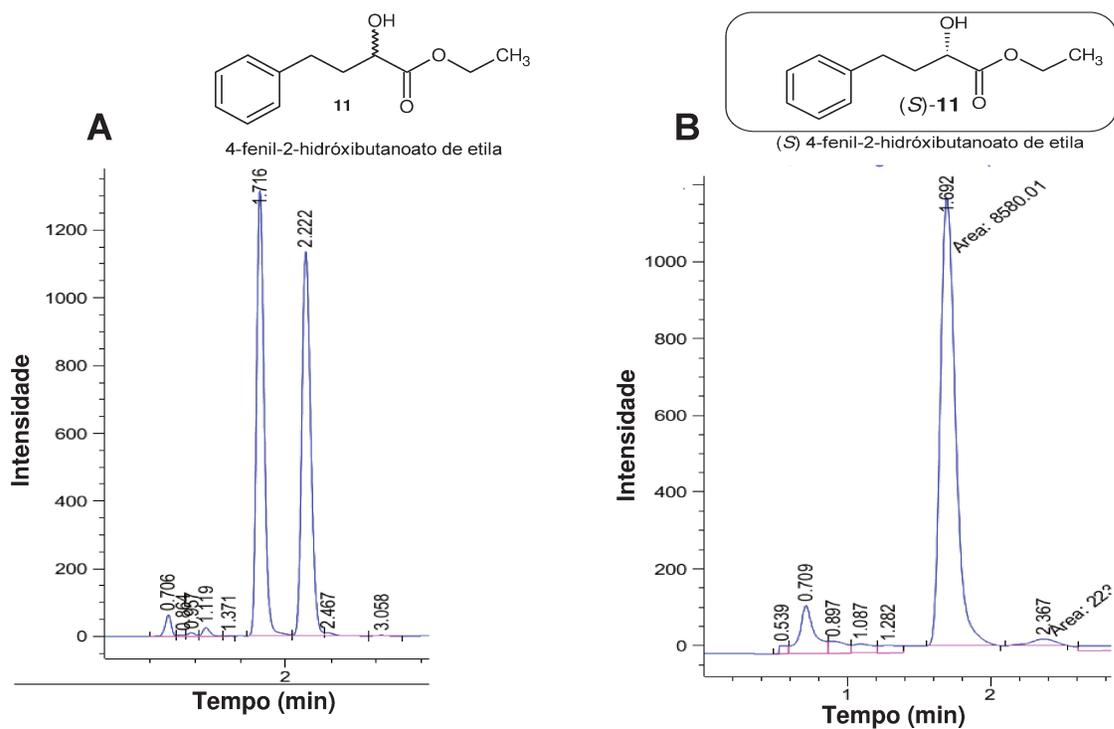
**Cromatograma 3:** Separação de *rac*-4 por CLAE.



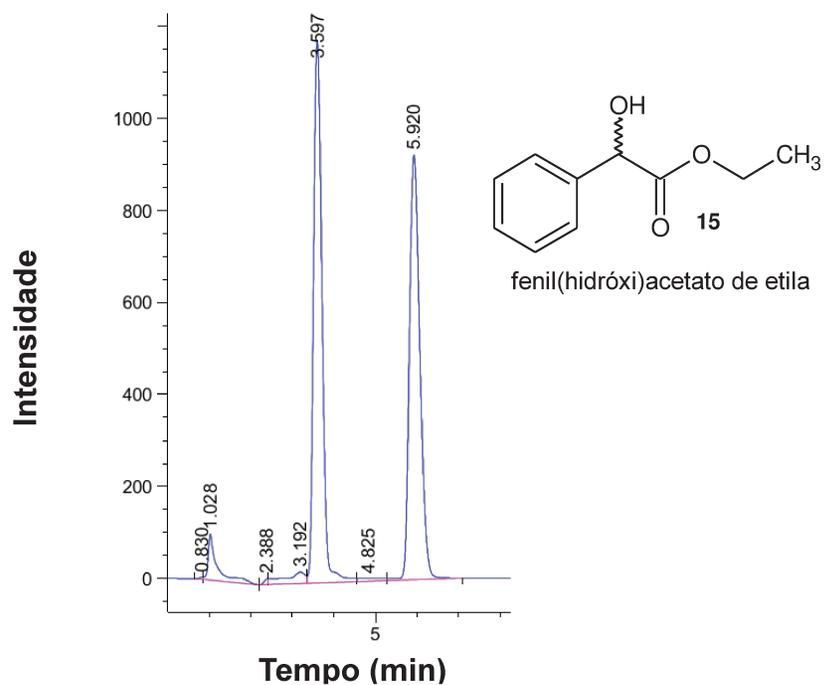
**Cromatograma 4:** Separação de *rac*-6 por CG-DIC.



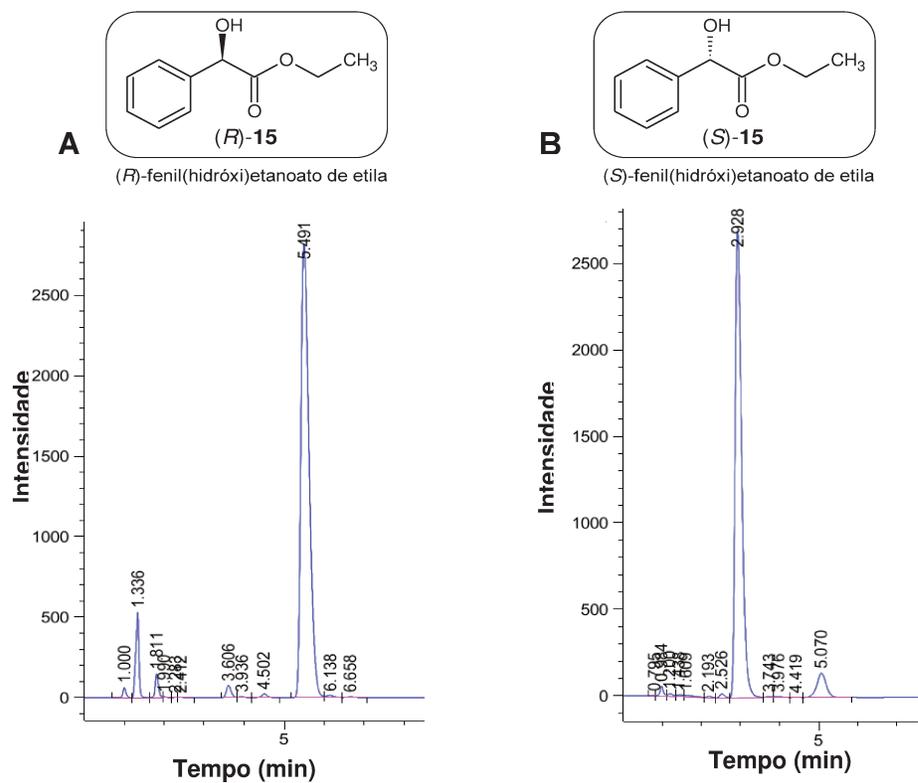
**Cromatograma 5:** (A) separação de *rac*-8 por CLAE e (B) (S)-8 enriquecido após biocatálise.



**Cromatograma 6:** (A) separação de *rac*-11 por CLAE e (B) análise do (S)-11 após biocatálise.



**Cromatograma 7:** Separação de *rac*-15 por CLAE.



**Cromatograma 8:** (A) análise de (*R*)-15 por CLAE após biocatálise e (B) análise de (*S*)-15 após biocatálise.