



MICHEL RICARDO DE BARROS CHAVES

BIORREDUÇÃO DE METILENOCETOÉSTERES POR MICRORGANISMOS

CAMPINAS

2013



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE QUÍMICA**

MICHEL RICARDO DE BARROS CHAVES

BIORREDUÇÃO DE METILENOCETOÉSTERES POR MICRORGANISMOS

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 MICHEL RICARDO DE BARROS CHAVES E ORIENTADO PELO
PROF. DR. JOSÉ AUGUSTO ROSÁRIO RODRIGUES.**

Assinatura do Orientador

**CAMPINAS
2013**

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR SIMONE LUCAS- CRB8/8144-
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE QUÍMICA DA UNICAMP**

Chaves, Michel Ricardo de Barros (1987-).
C398b Biorredução de metilenocetoésteres por microrganismos/
Michel Ricardo de Barros Chaves.–Campinas, SP: [s.n.], 2013.

Orientador: José Augusto Rosário Rodrigues.

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

1. Metilenocetoésteres. 2. *Saccharomyces cerevisiae*. 3.
Biorredução.
I. Rodrigues, José Augusto Rosário. II. Universidade Estadual de
Campinas. Instituto de Química. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em inglês: Bioreduction of methyleneketoesters mediated by microorganisms.

Palavras-chave em inglês:

Methyleneketoesters
Saccharomyces cerevisiae
Bioreduction

Área de concentração: Química Orgânica

Titulação: Mestre em Química na área de Química Orgânica

Banca examinadora:

José Augusto Rosário Rodrigues [Orientador]
André Luiz Meleiro Porto
Ljubica Tasic

Data de defesa: 20/02/2013

Programa de pós-graduação: Química

*“Somos um em meio ao todo, mas o todo só existe
quando cada um se une”.*

Hiromu Arakawa

Dedicatória

Dedico esse trabalho aos meus pais, Paulo e Socorro, que souberam me compreender e me apoiar durante toda essa trajetória e que sempre acreditaram em mim, mesmo quando nem mesmo eu acreditei.

À todos os amigos que estiveram comigo durante esse período, de Teresina e Campinas, seja nos momentos de confraternização ou momentos de apoio moral e palavras confortantes em momentos delicados.

E À Deus, senhor dos céus, por criar forças em mim que em muitos momentos até eu mesmo desconhecia, força para seguir em frente sempre.

AGRADECIMENTOS

Ao professor José Augusto por todos os ensinamentos, lições, discussões, aprendizados e incentivos.

Ao professor Paulo Moran, pelas recorrentes dúvidas e questionamentos solucionados sempre que disponível.

Aos meus pais, Paulo e Socorro, que tiveram uma imensa contribuição na minha formação e caráter, além de todo o apoio, compreensão, carinho e amor em todos os momentos.

Aos meus irmãos Mairton, Mayrla e o primo-irmão Thiago que também sempre me apoiaram, cada um de uma forma particular, seja nos momentos de alegria ou nos momentos de aflição.

A Fernanda por todo apoio, paciência, carinho e amor nos momentos delicados, sempre mostrando disposição em ajudar.

Aos companheiros do grupo, Juliana, Fábio, Bruno, Dávila, Rafael, Cláudio, Arthur e Leandro, pelo convívio, discussões, vários momentos de descontração e principalmente à Tarcila, que sempre me auxiliou e “co-orientou” durante todo o trabalho, além das enriquecedoras discussões e amizade.

A toda comunidade piauiense do IQ-Unicamp em especial os integrantes da República Pitihú, Adriano (Sol), Lucas e Thiago por terem me acolhido quando cheguei, além de todos os momentos de conversas e descontração.

A todos os amigos de Campinas, em especial Lair, Gisele, Rômulo, Janaína, Irlene, Adriana, Luelc, Samuel, Flamys, Olímpio, Tiago, Nego Chico, que sempre marcaram presença nas confraternizações e reuniões, regadas à muita diversão e por todas as conversas descontraídas.

A todos os amigos de Teresina, Jéssica, Patrícia, Jardel, Vivane, Irakerley que sempre me apoiaram e acreditaram em mim desde os momentos da graduação até hoje.

Ao Gustavo e ao professor Luiz Carlos Dias pela ajuda durante os experimentos de derivatização e determinação da configuração absoluta.

Aos membros da banca examinadora, André Porto e Ljubica Tasic, por terem aceitado o convite gentilmente.

A CAPES, FAPESP, CNPq e ao Instituto de Química da Unicamp por terem proporcionado todo apoio financeiro e de infraestrutura para a realização deste trabalho.

Curriculum vitae

Nome: Michel Ricardo de Barros Chaves

e-mail: michel.chaves@iqm.unicamp.br ou rickchaveslp@hotmail.com

Currículo na Plataforma Lattes:

<http://buscatextual.cnpq.br/buscatextual/visualizacv.do?id=K4270598A4>

Formação acadêmica/titulação

- 2010 - 2013** Mestrado em Química - Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, Brasil.
Área de concentração: Química Orgânica
Título: Biorredução de metilenocetoésteres por microrganismos
Orientador: José Augusto Rosário Rodrigues
Bolsista do(a): Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
- 2006 - 2009** Graduação em Bacharelado em Química c/ Atribuições Tecnológicas. Universidade Federal do Piauí, UFPI, Teresina, Brasil

Formação Complementar

- 2008-2009** Iniciação Científica
Universidade Federal do Piauí, UFPI, Brasil.
Bolsista do(a): Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, CNPq.

Atuação Profissional

Programa de Estágio Docente (IQ/Unicamp) – PED C

Disciplina: Química Orgânica II (Eng. Química)

Período: 2º semestre de 2012.

Apresentações em Congressos:

1. CHAVES, M. R. B., CAZETTA, T., MORAN, P. J. S., RODRIGUES, J. A. R. Redução diasterosseletiva de metilenocetoésteres mediada por *Saccharomyces cerevisiae*. VI Workshop de Biocatálise e Biotransformação, Fortaleza, Ceará, **2012**.

2. CAZETTA, T., CHAVES, M. R. B., MORAN, P. J. S., RODRIGUES, J. A.R. Biocatálise Extrativa na Redução Assimétrica da Metilenovalerofenona. VI Workshop de Biocatálise e Biotransformação. Fortaleza, Ceará, **2012**.

3. CHAVES, M. R. B., LEAL, V. L., FERNANDES, I. A., ROCHA, J M., MOITA, G. C., Avaliação da adulteração do óleo de Pequi (*Caryocar brasiliense*): uma abordagem convencional. 32^o Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, Fortaleza, Ceará, **2009**.

4. MORAIS, R. K. S., CHAVES, M. B. C., MOURA, C. V., MOURA, E. M., CAVALCANTE, A. A., LIMA, T. M. S. Isolamento e Seleção de Fungos Filamentosos Produtores de Enzima Extracelular com Atividade Lipolítica visando a aplicação na Transesterificação de óleos vegetais. XI Encontro Nacional de Microbiologia Ambiental. Fortaleza, Ceará, **2008**.

5. MORAIS, R. K. S., CHAVES, M. B. C., MOURA, C. V., MOURA, E. M., CAVALCANTE, A. A., LIMA, T. M. S. Isolamento e Seleção de Microrganismos produtores de Biosurfactantes. XI Encontro Nacional de Microbiologia Ambiental. Fortaleza, Ceará, **2008**.

RESUMO

Biorredução de metilenocetoésteres por microrganismos

A redução microbiológica de α -metileno- β -cetoésteres é capaz de fornecer produtos com redução quimio, enantio e diasterosseletiva da ligação C=C, da ligação C=O, ou mesmo de ambas, fazendo uso das enoato redutases e álcool desidrogenases presentes nos microrganismos. Sendo assim, os substratos em estudo foram sintetizados empregando diferentes protocolos, entretanto, o que mostrou ser mais eficiente consistiu do preparo α -metileno- β -hidroxi-ésteres, conhecidos como adutos de Morita-Baylis-Hillman, seguido de oxidação com ácido 2-iodoxibenzóico. Os substratos 2-(benzoil)-prop-2-enoato de metila, 2-[(4-clorofenil)carbonil]-prop-2-enoato de metila e 2-[(4-bromofenil)carbonil]-prop-2-enoato de metila foram biorreduzidos com *Saccharomyces cerevisiae* tipo II (Sigma-Aldrich®), *Pichia stiptis* CCT 2617, *Rhodotorula glutinis* CCT 2182 e *Pichia kluyveri* CCT 3365 como biocatalisadores. Os α -metil- β -hidroxi-ésteres foram formados tendo *Saccharomyces cerevisiae* tipo II como melhor biocatalisador, com rendimentos de 70 à 79% além de apresentarem razões *syn/anti* de até 9:1 com excessos enantioméricos de 99% para ambos diastereoisômeros e predominância do diastereoisômero *syn* (2*S*,3*S*) sobre o *anti* (2*R*,3*S*). Foram avaliados como suporte para o substrato a resina polimérica XAD7HP, que, apesar de fornecer incrementos na diastereosseletividade, apresentou resultados insatisfatórios para a conversão dos α -metil- β -hidroxi-ésteres. A alternativa empregada para contornar os baixos rendimentos apresentados foi o uso de papéis de filtro como suporte para o substrato, realizando o fornecimento do substrato ao meio reacional. O produto 3-(*p*-bromofenil)-3-hidroxi-2-metil-propanoato de metila teve sua configuração absoluta determinada por RMN de ^1H empregando o método de Mosher, obtendo a configuração (2*S*,3*S*).

Palavras-chave: Biorredução, *Saccharomyces cerevisiae*, metilenocetoésteres, resina XAD7HP, papel de filtro.

ABSTRACT

Bioreduction of methyleneketoesters mediated by microorganisms

The microbial reduction of α -methylene- β -ketoesters can furnish products with chemio, enantio and diastereoselective reduction of C=C, C=O or both bonds, making use of the enoate reductases and alcohol dehydrogenases present on microorganisms. Thus, the substrates studied here were prepared using different protocols, but, the one that showed better results consisted of the preparing of Morita-Baylis-Hillman adducts followed by their oxidation with 2-iodoxybenzoic acid. Methyl 2-benzoylprop-2-enoate, methyl 2-[(4-chlorophenyl)carbonyl]prop-2-enoate and methyl 2-[(4-bromophenyl)carbonyl]prop-2-enoate were bioreduced by type II *Saccharomyces cerevisiae* (Sigma-Aldrich®), *Pichia stipitis* CCT 2617, *Rhodotorula glutinis* CCT 2182 and *Pichia kluyveri* CCT 3365 as biocatalysts and the first one showed better activity. The α -methyl- β -hydroxy-esters were obtained up to 79% yield, showing *syn/anti* ratio up to 9:1 and *e.e.* of 99% for both diastereoisomers, also was observed that the *syn* (2*S*, 3*S*) prevailed over its *anti* diastereoisomer (2*R*,3*S*). The use of the polymeric resin XAD7HP as substrate reservoir was evaluated, obtaining good improvement on the diastereoselectivity, although the conversion was unsatisfactory. The chosen alternative to achieve the presented yields was the use of filter paper as substrate reservoir, performing the substrate feeding to the medium. Assignment of the absolute configuration of methyl 3-(*p*-bromophenyl)-3-hydroxy-2-methyl propanoate was determined by Mosher's method, obtaining the configuration (2*S*,3*S*).

Key-words: Methyleneketoesters, *Saccharomyces cerevisiae*, bioreduction, XAD7HP resin, filter paper.

ÍNDICE

Lista de Abreviaturas.....	xxi
Lista de Tabelas.....	xxiii
Lista de Figuras.....	xxv
Lista de Esquemas.....	xxix
Lista de Anexos.....	xxx
1. Introdução.....	3
1.1 Enzimas e biocatálise.....	3
1.2 Reduções biocatalíticas de ligações C=O e C=C.....	8
1.3 Imobilização do substrato em Biocatálise	13
1.4 α -Alquil- β -hidroxi-ésteres	17
2. Objetivos.....	23
3. Resultados e Discussão	27
3.1 Preparo de α -metileno- β -cetoésteres.....	27
3.2 Biorredução de α -metileno- β -cetoésteres	37
3.2.1 Triagem dos microrganismos	37
3.2.2 Emprego de suportes para os substratos	44
3.3 Determinação da configuração relativa e absoluta dos produtos.....	48
4. Conclusões.....	55
5. Parte Experimental	59
5.1 Aspectos Instrumentais	59
5.1.1 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN)	59
5.1.2 Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas (CG-EM)...	59
5.1.3 Cromatografia Gasosa acoplada ao Detector por ionização de chama – CG/DIC 60	
5.1.4 Métodos Cromatográficos.....	60
5.1.5 Espectroscopia no infravermelho.....	61
5.1.6 Rotação Ótica.....	61

5.1.7	Procedência de reagentes.....	61
5.1.8	Microrganismos	61
5.2	Preparo dos substratos	62
5.2.1	Reação de α -metilenação.....	62
5.2.2	Preparo do Líquido Iônico BMIM(PF ₆) (Hexafluorofostato de 1-Butil-3-metilimidazólio)	62
5.2.3	Reação de α -metilenação em líquido iônico	63
5.2.4	Reação de Morita-Bayllis-Hillman.....	64
5.2.5	Oxidação aeróbica dos adutos de MBH com sistema TEMPO/Fe(NO ₃) ₃ ...	68
5.2.6	Oxidação aeróbica dos adutos de MBH com 2,3-dicloro-5,6-diciano-1,4-benzoquinona (DDQ) e nitrito de sódio.....	69
5.2.7	Procedimento de Oxidação por ácido 2-iodoxibenzóico (IBX).....	69
5.2.8	Preparo dos padrões	71
5.2.8.1	Procedimento geral para hidrogenação catalítica com Pd/C.....	71
5.3	Cultivo dos microrganismos em meio YMA (<i>Yeast extract-malt extract/agar</i>) ...	73
5.4	Cultivo dos microrganismos em meio YM (<i>Yeast extract-malt extract</i>)	74
5.5	Procedimento para Biorredução.....	74
5.5.1	Biorredução com células liofilizadas de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	74
5.5.2	Biorredução com células crescidas de <i>Pichia stiptis</i> , <i>Rhodotorula glutinis</i> e <i>Pichia kluyveri</i>	75
5.5.3	Biorredução empregando XAD7HP como suporte para o substrato.....	75
5.5.4	Biorredução empregando papel de filtro como suporte para o substrato ...	75
5.5.5	Determinação da configuração absoluta de 34c por derivatização com MTPCI (Cloreto de Mosher)	79
6.	ANEXOS.....	83

Lista de Abreviaturas

CCD – Cromatografia em Camada Delgada

CCT – Coleção de Culturas Tropicais

CG – Cromatografia Gasosa

e.e. – Excesso enantiomérico

syn/anti – razão entre os diastereoisômeros *syn* e *anti*

L.I. – Líquido iônico

EM – Espectro de massas

DIC – Detector por ionização de chama

m/z - coeficiente entre massa e carga

RMN¹H – Ressonância magnética nuclear de hidrogênio

RMN¹³C - Ressonância magnética nuclear de carbono 13

IV – infravermelho

(BMIM)PF₆ – Hexafluorofosfato de 1-butil-3-metilimidazólio

DMSO_{d6} – Dimetilsulfóxido deuterado

CDCl₃ – Clorofórmio deuterado

m_s/m_r – razão massa de substrato e massa de resina

K_m – constante de Michaelis-Menten

EMAR – Espectrometria de Massas de Alta Resolução

MTPCI – Cloreto de α-metoxi-α-trifluorometilfenilacila

Lista de Tabelas

Tabela 1. Classificação geral para as enzimas.....	4
Tabela 2. Exemplos de álcoois quirais obtidos por reduções de cetonas mediadas por microrganismos realizadas em escala industrial ¹⁰	9
Tabela 3. Redução biocatalítica de α -metil-enonas por fermento de pão	13
Tabela 4. Redução de fenilcetonas por dois métodos com <i>Geotricum candidum</i> IFO 5767	16
Tabela 5. α -Metilenação dos β -cetoésteres 26a-c sob atmosfera inerte	28
Tabela 6. α -Metilenação dos β -cetoésteres empregando líquido iônico	29
Tabela 7. Preparo dos adutos de Morita-Baylis-Hillman	31
Tabela 8: Oxidação aeróbica dos adutos de MBH com sistema TEMPO/Fe(NO ₃) ₃ ..	34
Tabela 9. Oxidação dos adutos de MBH com ácido 2-iodóxibenzóico (IBX)	36
Tabela 10. Triagem para a biorredução dos α -metileno- β -cetoésteres	39
Tabela 11. Biorredução dos α -metileno- β -cetoésteres	42
Tabela 12. Redução dos α -metileno- β -cetoésteres por <i>Saccharomyces cerevisiae</i> com XAD7HP como suporte para o substrato.	45
Tabela 13. Redução biocatalítica dos α -metileno- β -cetoésteres mediada por <i>Saccharomyces cerevisiae</i> com e sem papel de filtro como suporte para o substrato.	47
Tabela 14. Dados de RMN ¹ H para os produtos 34a-c	48
Tabela 15. Dados de rotação ótica dos produtos 34a-c	49
Tabela16: Valores de deslocamentos químicos para os ésteres de (<i>S</i>) e (<i>R</i>) Mosher de 34c	50

Lista de Figuras

Figura 1. Resumo de reações selecionadas catalisadas pelas oxidoreduases (adaptado) ⁴	5
Figura 2. Processos mais empregados para geração de quiralidade em escala industrial ¹⁰	6
Figura 3. Síntese enzimática de um intermediário para um agente anti-asma por <i>Microbacterium campoquemadoensis</i> em suspensão celular ¹²	7
Figura 4. Regeneração do cofator <i>in situ</i> empregando duas enzimas (adaptado) ¹³	7
Figura 5. Redução da cetona 4 pela álcool desidrogenase de <i>Rhodococcus erythropolis</i> e regeneração do NADPH pela formato desidrogenase de <i>Candida boidinii</i> ¹⁴	8
Figura 6. Padrões para transferência do hidreto do NAD(P)H para cetonas pró-quirais ¹⁸	10
Figura 7. Efeito do pré-tratamento do biocatalisador na enantiosseletividade da redução da 3-cloropropiofenona ¹⁹	11
Figura 8. Quimiosseletividade apresentada pela alteração das condições na conversão da cicloexanona pelo fungo <i>Geotrichium candidum</i> ²⁰	11
Figura 9. Representação do ciclo catalítico da <i>old yellow enzyme</i> e estereopreferência para redução da ligação C=C (adaptado) ²³	12
Figura 10. Biorredução em larga escala do 3,4-metileno-dioxifenilacetona empregando resinas poliméricas como suporte ²⁶	14
Figura 11. Representação de uma biotransformação empregando reservatório de substrato e remoção do produto <i>in situ</i> por resina adsorvente hidrofóbica (adaptado) ¹²	15
Figura 12. Redução quimiosseletiva de 2-etil-1-fenilprop-2-en-1-ona adsorvida em XAD-7 pelas leveduras <i>Pichia stiptis</i> e <i>Rhodotorula glutinis</i> (adaptado) ²⁹⁻³⁰	17
Figura 13. Redução de β -cetoésteres pelas enzimas Gre3p e Gcy1p expressadas em cepas de <i>E. coli</i> (adaptado) ³⁶	18
Figura 14. Síntese quimioenzimática das lactonas (3 <i>R</i> ,4 <i>S</i> ,5 <i>R</i>)- 25 e (3 <i>R</i> ,4 <i>R</i> ,5 <i>S</i>)- 25 ³⁷	19
Figura 15. Mecanismo determinado anteriormente pelo grupo para a condensação de formaldeído com cetoésteres ³⁸	27

Figura 16. Mecanismo mostrando a dualidade existente na reação de Morita-Baylis-Hillman ⁴⁷	30
Figura 17. Representação da estabilização do estado de transição do aza-enolato <i>Z</i> em relação ao <i>E</i> na reação de Bayllis-Hillman ⁵⁰	32
Figura 18: Oxidação de Swern em aduto de Morita-Baylis-Hillman fornecendo o respectivo cloreto de alila como um único estereoisômero.	33
Figura 19: Ciclo reacional para a oxidação de álcoois secundários com IBX e o IBX recuperado (adaptado) ⁴⁴	37
Figura 20: Representação dos possíveis produtos de biorredução dos α -metileno- β -cetoésteres e as rotas a serem tomadas durante a redução biocatalítica dos mesmos.	38
Figura 21. Redução de ligações C=C ativadas biocatalisada por enoato redutases do tipo <i>old yellow enzymes</i> com especificidade <i>trans</i> ⁶¹	40
Figura 22. Representação da estereoinversão da metila na posição α dos α -metil- β -cetoésteres produzidos pela redução biocatalítica dos substratos.....	40
Figura 23. Perfil reacional para os α -metileno- β -cetoésteres 31a (A), 31b (B) e 31c (C) na biorredução com <i>Saccharomyces cerevisiae</i> empregando 50 mg dos substratos.	41
Figura 24. Representação do modelo para predição da diasterosseletividade em reduções de β -cetoésteres α -substituídos.....	43
Figura 25. Mecanismo proposto para a seletividade na biorredução dos α -metileno- β -cetoésteres mediada por <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	44
Figura 26. Representação esquemática demonstrando o meio reacional contendo o substrato adsorvido no papel de filtro (A) e após a formação do produto (B).	46
Figura 27. Valores de <i>J</i> (Hz) dos prótons carbinólicos para os adutos aldol observado por Ferreira, mostrando acoplamentos 1,2- <i>syn</i> (A e B) e 1,2- <i>anti</i> (C) (adaptado) ⁷⁰ ..	49
Figura 28. Cromatograma do padrão (\pm)- 34a obtido por CG-DIC com coluna quiral.	72
Figura 29. Cromatograma do padrão (\pm)- 34b obtido por CG-DIC com coluna quiral.	72
Figura 30. Cromatograma do padrão (\pm)- 34c obtido por CG-DIC com coluna quiral.	73
Figura 31. Cromatograma do produto de biorredução (2 <i>S</i> ,3 <i>R</i>)- 34a obtido por CG-DIC em coluna quiral.	76

Figura 32. Cromatograma do produto de biorredução (2 <i>S</i> ,3 <i>R</i>)- 34b obtido por CG-DIC em coluna quiral.	77
Figura 33. Cromatograma do produto de biorredução (2 <i>S</i> ,3 <i>R</i>)- 34c obtido por CG-DIC em coluna quiral.	78

Lista de Esquemas

- Esquema 1.** Biorredução dos α -metileno- β -cetoésteres e os possíveis produtos que podem ser obtidos.....23
- Esquema 2:** Propostas de oxidações aeróbicas avaliadas para os adutos de MBH.34
- Esquema 3:** Reação de preparo do IBX e do DMP.35

Lista de Anexos

Anexo 01. Espectro de massa obtido por ionização de elétrons (70 eV) do acrilato de metil-2-[hidroxi(fenil)metil] 30a .	83
Anexo 02. Espectro de infravermelho (NaCl) do acrilato de metil-2-[hidroxi(fenil)metil] 30a .	83
Anexo 03. Espectro de RMN de H ¹ (250 MHz, CDCl ₃) do acrilato de metil-2-[hidroxi(fenil)metil] 30a .	84
Anexo 04. Espectro de RMN de C ¹³ (62,5 MHz, CDCl ₃) do acrilato de metil-2-[hidroxi(fenil)metil] 30a .	84
Anexo 05. Espectro de EM (70eV) do acrilato de metil-2-[hidroxi(4-clorofenil)metil] 30b .	85
Anexo 06. Espectro de infravermelho (NaCl) do acrilato de metil-2-[hidroxi(4-clorofenil)metil] 30b .	85
Anexo 07. Espectro de RMN de H ¹ (250 MHz, CDCl ₃) do acrilato de metil-2-[hidroxi(4-clorofenil)metil] 30b .	86
Anexo 08. Espectro de RMN de C ¹³ (62,5 MHz, CDCl ₃) do acrilato de metil-2-[hidroxi(4-clorofenil)metil] 30b .	86
Anexo 09. Espectro de EM (70eV) do acrilato de metil-2-[hidroxi(4-bromofenil)metil] 30c .	87
Anexo 10. Espectro de infravermelho (KBr) do do acrilato de metil-2-[hidroxi(4-bromofenil)metil] 30c .	87
Anexo 11. Espectro de RMN de H ¹ (250 MHz, CDCl ₃) do do acrilato de metil-2-[hidroxi(4-bromofenil)metil] 30c .	88
Anexo 12. Espectro de RMN de C ¹³ (250 MHz, CDCl ₃) do do acrilato de metil-2-[hidroxi(4-bromofenil)metil] 30c .	88
Anexo 13. Espectro de EM (70eV) do acrilato de metil-2-[hidroxi(4-nitrofenil)metil] 30d .	89
Anexo 14. Espectro de infravermelho (KBr) do acrilato de metil-2-[hidroxi(4-nitrofenil)metil] 30d .	89

Anexo 15. Espectro de RMN de H ¹ (250 MHz, CDCl ₃) do acrilato de metil-2-[hidroxi(4-nitrofenil)metil] 30d	90
Anexo 16. Espectro de RMN de C ¹³ (250 MHz, CDCl ₃) do acrilato de metil-2-[hidroxi(4-nitrofenil)metil] 30d	90
Anexo 17. Espectro de EM (70eV) do acrilato de metil-2-[hidroxi(2-clorofenil)metil] 30e	91
Anexo 18. Espectro de infravermelho (NaCl) do acrilato de metil-2-[hidroxi(2-clorofenil)metil] 30e	91
Anexo 19. Espectro de RMN de H ¹ (600 MHz, CDCl ₃) do acrilato de metil-2-[hidroxi(2-clorofenil)metil] 30e	92
Anexo 20. Espectro de RMN de C ¹³ (150 MHz, CDCl ₃) do acrilato de metil-2-[hidroxi(2-clorofenil)metil] 30e	92
Anexo 21. Espectro de EM (70eV) do 3-hidroxi-2-metileno-5-metil-hexanoato de metila 30f	93
Anexo 22. Espectro de infravermelho (NaCl) do 3-hidroxi-2-metileno-5-metil-hexanoato de metila 30f	93
Anexo 23. Espectro de RMN de H ¹ (250 MHz, CDCl ₃) do 3-hidroxi-2-metileno-5-metil-hexanoato de metila 30f	94
Anexo 24. Espectro de RMN de C ¹³ (62,5 MHz, CDCl ₃) do 3-hidroxi-2-metileno-5-metil-hexanoato de metila 30f	94
Anexo 25. Espectro de EM (70eV) do acrilonitrilil-2-[hidroxi(fenil)metil] 30h	95
Anexo 26. Espectro de infravermelho (NaCl) do acrilonitril-2-[hidroxi(fenil)metil] 30h .95	
Anexo 27. Espectro de RMN de H ¹ (250 MHz, CDCl ₃) do acrilonitril-2-[hidroxi(fenil)metil] 30h	96
Anexo 28. Espectro de RMN de C ¹³ (62,5 MHz, CDCl ₃) do acrilonitril-2-[hidroxi(fenil)metil] 30h	96
Anexo 29. Espectro de EM (70eV) do acrilonitrilil-2-[hidroxi(4-clorofenil)metil] 30i . 97	
Anexo 30. Espectro de infravermelho (NaCl) do acrilonitrilil-2-[hidroxi(4-clorofenil)metil] 30i	97
Anexo 31. Espectro de RMN de H ¹ (250 MHz, CDCl ₃) do acrilonitrilil-2-[hidroxi(4-clorofenil)metil] 30i	98

Anexo 32. Espectro de RMN de C^{13} (62,5 MHz, $CDCl_3$) do acrilonitrilil-2-[hidroxi(4-clorofenil)metil] 30i	98
Anexo 33. Espectro de EM (70eV) do acrilonitrilil-2-[hidroxi(4-nitrofenil)metil] 30j . .	99
Anexo 34. Espectro de infravermelho (KBr) do acrilonitrilil-2-[hidroxi(4-nitrofenil)metil] 30j	99
Anexo 35. Espectro de RMN de H^1 (250 MHz, $CDCl_3$) do acrilonitrilil-2-[hidroxi(4-nitrofenil)metil] 30j	100
Anexo 36. Espectro de RMN de C^{13} (250 MHz, $CDCl_3$) do acrilonitrilil-2-[hidroxi(4-nitrofenil)metil] 30j	100
Anexo 37. Espectro de EM (70eV) do 2-(benzoil)-prop-2-enoato de metila 31a	101
Anexo 38. Espectro de infravermelho (NaCl) 2-(benzoil)-prop-2-enoato de metila 31a	101
Anexo 39. Espectro de RMN de H^1 (250 MHz, $CDCl_3$) do 2-(benzoil)-prop-2-enoato de metila 31a	102
Anexo 40. Espectro de RMN de C^{13} (62,5 MHz, $CDCl_3$) do 2-(benzoil)-prop-2-enoato de metila 31a	102
Anexo 41. Espectro de EM (70 eV) do 2-[(4-clorofenil)carbonil]-prop-2-enoato de metila 31b	103
Anexo 42. Espectro de infravermelho (NaCl) do 2-[(4-clorofenil)carbonil]-prop-2-enoato de metila 31b	103
Anexo 43. Espectro de RMN de H^1 (500 MHz, $CDCl_3$) do 2-[(4-clorofenil)carbonil]-prop-2-enoato de metila 31b	104
Anexo 44. Espectro de RMN de C^{13} (150 MHz, $CDCl_3$) do 2-[(4-clorofenil)carbonil]-prop-2-enoato de metila 31b	104
Anexo 45. Espectro de EM (70eV) do 2-[(4-bromofenil)carbonil]-prop-2-enoato de metila 31c	105
Anexo 46. Espectro de infravermelho (NaCl) do 2-[(4-bromofenil)carbonil]-prop-2-enoato de metila 31c	105
Anexo 47. Espectro de RMN de H^1 (250 MHz, $CDCl_3$) do 2-[(4-bromofenil)carbonil] - prop-2-enoato de metila 31c	106

Anexo 48. Espectro de RMN de H ¹ (150 MHz, CDCl ₃) do 2-[(4-bromofenil)carbonil] - prop-2-enoato de metila 31c	106
Anexo 49. Espectro de EM (70eV) do (-)-(2 <i>S</i> ,3 <i>S</i>)-3-fenil-3-hidroxi-2-metil-propanoato de metila 34a	107
Anexo 50. Espectro de infravermelho (NaCl) do (-)-(2 <i>S</i> ,3 <i>S</i>)-3-hidroxi-3-fenil-2-metil-propanoato de metila 34a	107
Anexo 51. Espectro de RMN de H ¹ (500 MHz, CDCl ₃) do (-)-(2 <i>S</i> ,3 <i>S</i>)-3-fenil-3-hidroxi-2-metil-propanoato de metila 34a	108
Anexo 52. Espectro de RMN de C ¹³ (100 MHz, CDCl ₃) do (-)-(2 <i>S</i> ,3 <i>S</i>)-3-fenil-3-hidroxi-2-metil-propanoato de metila 34a	108
Anexo 53. Espectro de EM (70eV) do (-)-(2 <i>S</i> ,3 <i>S</i>)-3-(4-clorofenil)-3-hidroxi-2-metil-propanoato de metila 34b	109
Anexo 54. Espectro de infravermelho (NaCl) do (-)-(2 <i>S</i> ,3 <i>S</i>)-3-(4-clorofenil)-3-hidroxi-2-metil-propanoato de metila 34b	109
Anexo 55. Espectro de RMN de H ¹ (600 MHz, CDCl ₃) do (-)-(2 <i>S</i> ,3 <i>S</i>)-3-(4-clorofenil)-3-hidroxi-2-metil-propanoato de metila 34b	110
Anexo 56. Espectro de RMN de C ¹³ (125 MHz, CDCl ₃) do (-)-(2 <i>S</i> ,3 <i>S</i>)-3-(4-clorofenil)-3-hidroxi-2-metil-propanoato de metila 34b	110
Anexo 57. Espectro de EM (70eV) do (-)-(2 <i>S</i> ,3 <i>S</i>)-3-(4-bromofenil)-3-hidroxi-2-metil-propanoato de metila 34c	111
Anexo 58. Espectro de infravermelho (NaCl) do (-)-(2 <i>S</i> ,3 <i>S</i>)-3-(4-bromofenil)-3-hidroxi-2-metil-propanoato de metila 34c	111
Anexo 59. Espectro de RMN de H ¹ (600 MHz, CDCl ₃) do (-)-(2 <i>S</i> ,3 <i>S</i>)-3-(4-bromofenil)-3-hidroxi-2-metil-propanoato de metila 34c	112
Anexo 60. Espectro de RMN de C ¹³ (150 MHz, CDCl ₃) (-)-(2 <i>S</i> ,3 <i>S</i>)-3-(4-bromofenil)-3-hidroxi-2-metil-propanoato de metila 34c	112
Anexo 61. Espectro de RMN de H ¹ (600 MHz, CDCl ₃) do (2 <i>S</i> , 3 <i>S</i> , 2' <i>S</i>)-3-(2'-metoxi-2'-trifluor-2'-fenilacetil)-3-(4-bromofenil)-2-metil-propanoato de metila	113
Anexo 62. Espectro de RMN de H ¹ (600 MHz, CDCl ₃) do (2 <i>S</i> , 3 <i>S</i> , 2' <i>R</i>)-3-(2'-metoxi-2'-trifluor-2'-fenilacetil)-3-(4-bromofenil)-2-metil-propanoato de metila.	113

Anexo 63. Espectro de EM (70eV) do (\pm)-3-fenil-3-hidroxi -2-metil-propanoato de metila.	114
Anexo 64. Espectro de infravermelho (NaCl) do (\pm)-3-fenil-3-hidroxi-2-metil-propanoato de metila.	114
Anexo 65. Espectro de RMN de H^1 (250 MHz, $CDCl_3$) do (\pm)-3-fenil-3-hidroxi-2-metil-propanoato de metila.....	115
Anexo 66. Espectro de RMN de C^{13} (62,5 MHz, $CDCl_3$) do (\pm)-3-fenil-3-hidroxi-2-metil-propanoato de metila.	115
Anexo 67. Espectro de EM (70eV) do do (\pm)-3-(4-clorofenil)-3-hidroxi-2-metil-propanoato de metila.	116
Anexo 68. Espectro de infravermelho (NaCl) do do (\pm)-3-(4-clorofenil)-3-hidroxi-2-metil-propanoato de metila.....	116
Anexo 69. Espectro de RMN de H^1 (250 MHz, $CDCl_3$) do do (\pm)-3-(4-clorofenil)-3-hidroxi-2-metil-propanoato de metila.	117
Anexo 70. Espectro de RMN de C^{13} (125 MHz, $CDCl_3$) do do (\pm)-3-(4-clorofenil)-3-hidroxi-2-metil-propanoato de metila.	117
Anexo 71. Espectro de EM (70eV) do do (\pm)-3-(4-bromofenil)-3-hidroxi-2-metil-propanoato de metila.	118
Anexo 72. Espectro de infravermelho (NaCl) do do (\pm)-3-(4-bromofenil)-3-hidroxi-2-metil-propanoato de metila.	118
Anexo 73. Espectro de RMN de H^1 (400 MHz, $CDCl_3$) do do (\pm)-3-(4-bromofenil)-3-hidroxi-2-metil-propanoato de metila.	119
Anexo 74. Espectro de RMN de C^{13} (125 MHz, $CDCl_3$) do (\pm)-3-(4-bromofenil)-3-hidroxi-2-metil-propanoato de metila.	119

1. Introdução

1.1 Enzimas e biocatálise

Enzimas são consideradas catalisadores que permitem a execução de processos químicos complexos sob condições brandas e ecologicamente corretas¹. Sua função cataliticamente ativa é resultado das suas estruturas tridimensionais complexas e do sítio ativo integrado no mesmo, o que permite o reconhecimento altamente específico para substratos específicos².

Dentre outras propriedades, a quimio e estereosseletividade das enzimas geralmente é alta ou excelente, como resultado disso, a regio, diastereo e a enantioseletividade das reações enzimáticas apresentam-se igualmente excelentes³.

Essas características tornam as enzimas candidatas interessantes em diversos processos, além de terem atraído a atenção da comunidade acadêmica e da indústria como uma ferramenta sintética ao lado de outras disciplinas de orgânica como a síntese “clássica”, catálise por metais e organocatálise⁴.

As enzimas são classificadas levando em consideração o tipo de reação que elas catalisam, sendo assim, elas são subdivididas e categorizadas em 6 classes. A tabela 1 resume as principais classes de enzimas. Essas classes são delimitadas pela Comissão de Enzimas da União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular (*International Union of Biochemistry and Molecular Biology*), órgão responsável pela identificação das enzimas⁵.

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

² VOET, D., VOET, J. G., Pratt, C. W. *Fundamentos de Bioquímica*, **2002**, Artmed. Porto Alegre, pp. 24-285.

³ Uppenber, J., Oehmer, N., Norin, M., Hult, K., Kleywegt, G. J., Patkar, S., Waagen, V., Anthonsen, T., Jones, T.A. *Biochemistry*, **1995**, *34*, 16838–16851.

⁴ Drauz, K., Gröger, H., May, O. *Enzyme catalysis in organic synthesis*, **2012**, 3º ed., Wiley-VCH, Alemanha, pp. 3.

⁵ <http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/> (Acessado em 6 de janeiro de 2013).

Tabela 1. Classificação geral para as enzimas

Classe de enzima	Classe	Reações onde atuam
Oxidoredutases	1	Redução de ligações C=O, C=C; aminação redutiva de C=O; oxidação de ligação C-H, C-N e C-O; redução/ oxidação de cofator
Transferases	2	Transferência de grupo funcional como amina, acil, fosforil, metil, glicosil, nitro e grupos contendo enxofre
Hidrolases	3	Hidrólise de ésteres, amidas, lactonas, lactamas, epóxidos, nitrilas entre outras, além das reações reversas para obter tais funcionalidades
Liases (Sintases)	4	Adição de pequenas moléculas à ligações duplas como C=C, C=N e C=O
Isomerases	5	Transformação de isômeros (isomerização), racemização, epimerização e reações de rearranjo
Ligases (Sintetases)	6	Formação de compostos complexos, (em analogia às liases) mas enzimaticamente ativas somente quando combinadas com a clivagem do ATP

As oxidoredutases catalisam reações em sistemas biológicos e estão relacionadas com os processos de respiração e fermentação. Além disso, elas se dividem em três categorias (sub-classes): hidrogenases, oxidases e oxigenases⁶. Na Figura 1 está representado um resumo das reações que envolvem as oxidoredutases.

As desidrogenases (redutases) são as oxidoredutases mais amplamente empregadas para propósitos sintéticos, uma vez que estão associadas à formação de um ou mais centros estereogênicos. Elas são classificadas nos grupos EC 1.1.1. (atuam

⁶ Faber, K. *Biotransformations in organic chemistry: a text book*. 2004, 5th Edition, Springer: New York, 454 p.

nos grupos CH-OH doadores), EC 1.2.1.- (atuando nos grupos aldeído e oxo doadores), EC 1.4.1. – (atuando nos grupos CH-NH₂ doadores), sempre usando NAD⁺ e NADP⁺ como cofatores⁷.

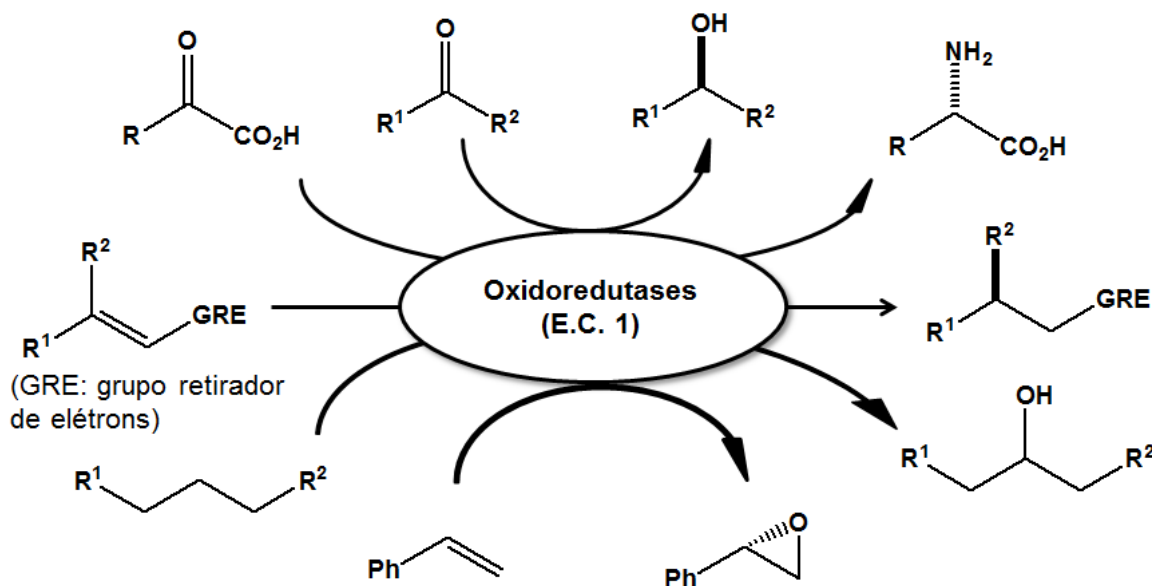


Figura 1. Resumo de reações selecionadas catalisadas pelas oxidoredutases (adaptado)⁴.

O interesse crescente por moléculas orgânicas quirais enantiomericamente puras tem expandido consideravelmente o desenvolvimento de novas tecnologias e processos sintéticos para esse fim. A necessidade por maiores preocupações no desenvolvimento de processos sustentáveis e ambientalmente corretos é obrigatória para a tecnologia do século 21, aspectos que os processos enzimáticos combinam com sucesso⁸.

Enzimas que catalisam a redução de cetonas pró-quirais (desidrogenases) são fontes confiáveis de álcoois quirais com elevado excesso enantiomérico, se igualando ou mesmo superando a habilidade de catalisadores químicos realizarem as mesmas reações⁹. Apesar das resoluções cinéticas enzimáticas com hidrolases serem os processos que têm sido mais explorados em escala industrial para geração de produtos

⁷ Gamenara, D., Seoane, G. A., Saézn-Mendes, P., Maria, P. D. *Redox biocatalysis: fundamentals and applications*, 2013, John Wiley & Sons, EUA, pp. 13.

⁸ Gotor, V., Alfonso, I., Garcia-Urdiales, E. *Asymmetric organic synthesis with enzymes*, 2008, Wiley-VCH, Alemanha. pp. XI.

⁹ Moore, J.C., Pollard, D.J., Kosjek, B., Devine, P.N. *Acc. Chem. Res.* 2007, 40, 1412–1419.

oticamente puros (Figura 2), as reduções biocatalíticas vem crescendo rapidamente, quase se equiparando às hidrolases no cenário atual¹⁰.



Figura 2. Processos mais empregados para geração de quiralidade em escala industrial¹⁰.

Uma das principais formas de realizar reduções biocatalíticas é por meio de microrganismos em suspensão, que apresenta vantagens econômicas, uma vez que o processo de reciclagem do cofator é realizado no próprio meio, enquanto que as enzimas isoladas necessitam de coenzimas caras e ciclos de reciclagem para o cofator. Além disso, os microrganismos em suspensão apresentam uma especificidade para substratos maior que as enzimas isoladas¹¹.

Um exemplo do uso de células em suspensão é o emprego da bactéria *Microbacterium campoquemadoensis* na síntese de um intermediário-chave para a droga anti-asma Montelukast, preparado por meio da redução da cetona correspondente¹².

¹⁰ Hollman F., Arends, I. W. C. E., Holltman, D. *Green Chem.* **2011**, *13*, 2285-2313.

¹¹ Nakamura, K.; Kondo, S.; Kawai, Y.; Nakajima, N.; Ohno, A. *Biosci. Biotech. Biochem.* **1994**, *58*, 2236–2240.

¹² Shaffie, A., Motamedi, H., King, A., *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **1998**, *49*, 709-717.

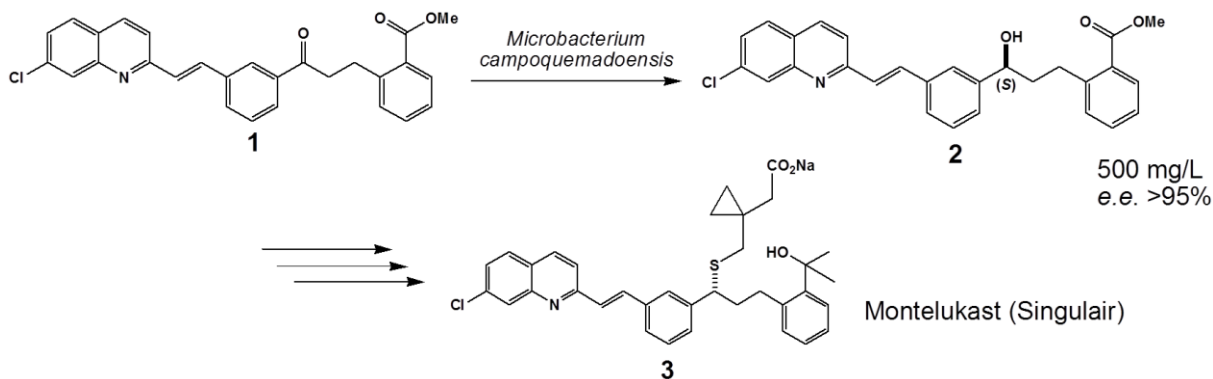


Figura 3. Síntese enzimática de um intermediário para um agente anti-asma por *Microbacterium campoquemadoensis* em suspensão celular¹².

O emprego de desidrogenases isoladas está associada ao consumo estequiométrico dos cofatores nicotinamida adenina dinucleotídeo, na forma reduzida (NADH) e oxidada (NAD⁺), além da nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzido (NADPH) e oxidado (NADP⁺). O elevado valor comercial desses cofatores dificulta aplicações em escala preparativa, necessitando de constante regeneração dos mesmos, para que possam ser usados em quantidades catalíticas¹³.

Para regeneração *in situ* dos cofatores, uma alternativa é a aplicação de sistemas de regeneração com uma ou mesmo duas enzimas, elevando ainda mais o custo do processo (Figura 4).

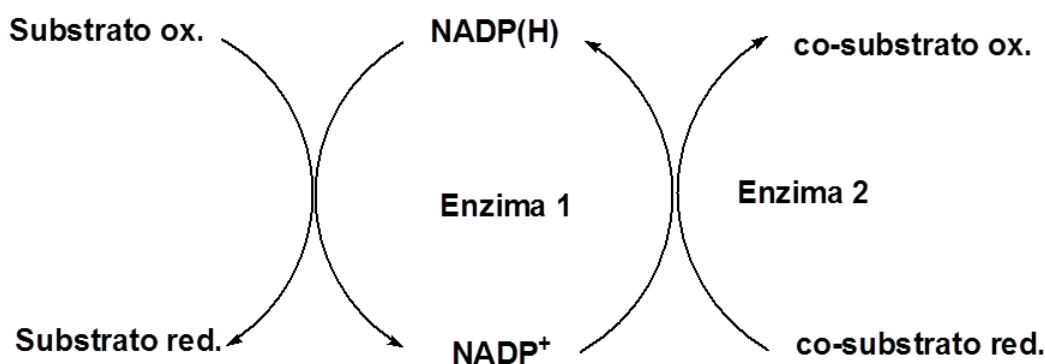


Figura 4. Regeneração do cofator *in situ* empregando duas enzimas (adaptado)¹³.

¹³ Monti, D., Ottolina, G., Carrea, G., Riva, S. *Chem. Rev.* **2011**, *111*, 4111–4140.

Um exemplo do uso de um sistema com regeneração do cofator empregando duas enzimas foi mostrado por Gröger¹⁴, ao utilizar uma álcool desidrogenase recombinante proveniente de *Rhodococcus erythropolis* e a formato desidrogenase proveniente de *Candida boidinii* para regeneração do NADPH. Ao usar hexano para formar um meio bifásico, a concentração do substrato pode ser aumentada para 10-200 mmol e o álcool (S)-**5** pode ser obtido com boas taxas de conversão e e.e.>99% (Figura 5).

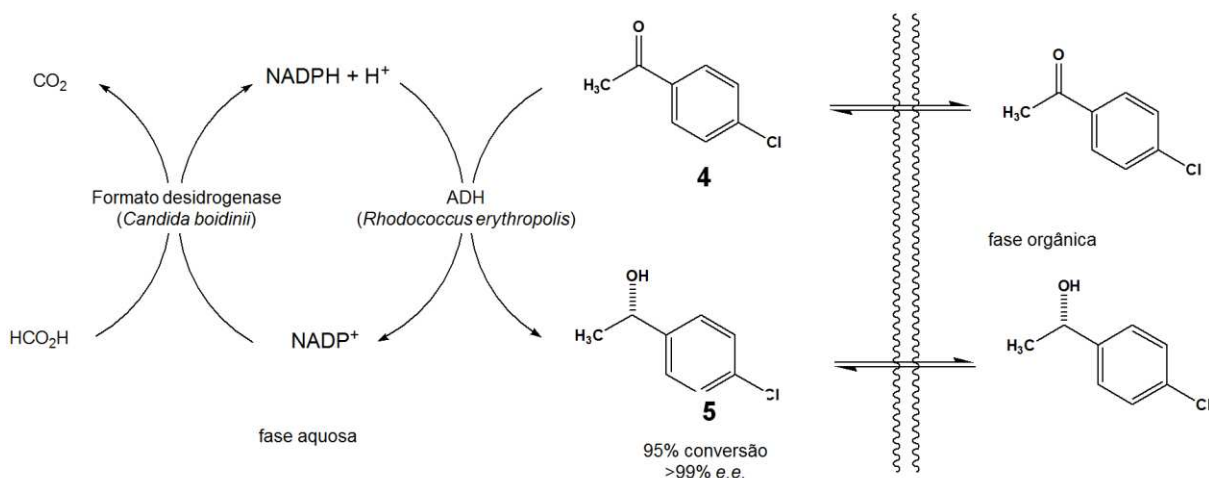


Figura 5. Redução da cetona **4** pela álcool desidrogenase de *Rhodococcus erythropolis* e regeneração do NADPH pela formato desidrogenase de *Candida boidinii*¹⁴.

1.2 Reduções biocatalíticas de ligações C=O e C=C

Atualmente, compostos quirais são os blocos construtores mais importantes na indústria química e farmacêutica de catalisadores químicos, cristais líquidos, aromas, produtos agroquímicos ou drogas¹⁵.

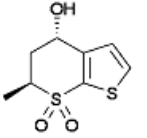
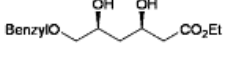
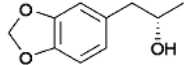
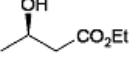
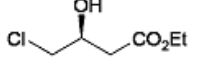
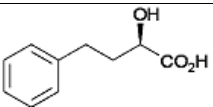
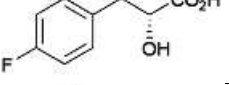
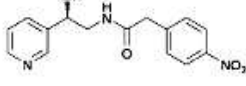
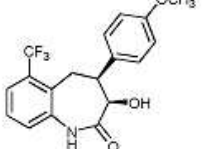
Álcoois secundários quirais opticamente ativos são amplamente usados como intermediários para a introdução de quiralidade no produto. Na indústria, geralmente métodos bem estabelecidos são usados, mas nas últimas décadas, o interesse para a

¹⁴ Gröger, H., Hummel, W., Rollmann, C., Chamouleau, F., Hüskens, H., Werner, H., Wunderlich, C., Abokitse, K., Drauz, K. and Buchholz, S. *Tetrahedron*, **2004**, *60*, 633–64.

¹⁵ Daubmann T., Hennemann H. G., Rosen, T. C. *Chem Ing. Tech*, **2006**, *78*, 249–255.

criação de centros estereogênicos aplicando novos métodos biocatalíticos tem crescido¹⁶. Uma seleção desses processos está resumida na tabela 2.

Tabela 2. Exemplos de álcoois quirais obtidos por reduções de cetonas mediadas por microrganismos realizadas em escala industrial^{10,17}.

Produto	Bioatalisador	Rend. (%)	e.e.(%)	Escala	Companhia
	<i>Neurospora crassa</i>	>85	>98	Multi ton	Astra Zaneca
	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	92	99	n.d.	Bristol-Myers Squibb
	<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>	96	>99,9	300 L	Eli Lilly
	<i>Lactobacillus brevis</i>	96	99,88	35 ta ⁻¹	Wacker Chemie
	<i>Geotrichium candidum</i>	95	99	Multi kg	Bristol-Myers Squibb
	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	91	99,9	n.d.	Ciba
	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	99	99,0	Multi kg	Pfizer
	<i>Candida sorbophila</i>	82,5	>98	Multi kg	Merck
	<i>Nocardia salmonicolor</i>	96	99,8	n.d.	Bristol-Myers Squibb

n.d.: não divulgado

¹⁶ a) Blaser, H. U., Malan C., Pugin B., Spindler, F., Steiner, H., Studer, M. *Adv. Synth. Catal.* **2003**, 345,103–151; b) *Biocatalysis in the pharmaceutical and biotechnology industries*. **2006**, Taylor & Francis, New York, pp 529–546.

¹⁷ Liese, A., Seelbach, K., Wandrey, C. *Industrial biotransformations*, **2006**, Wiley-VCH, Weinheim.

A obtenção desses álcoois secundários é realizada por meio da redução de cetonas pró-quirais pelas desidrogenases, enzimas que são dependentes de nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato, NAD(P)H, como cofator. O mecanismo para a redução ocorre por quatro padrões de transferência do hidreto do NAD(P)H para o substrato (Figura 6)¹⁸. O hidreto ataca pela face *re* ou pela face *si* da carbonila, dependendo da orientação da ligação do substrato à enzima, resultando no álcool-(*R*) ou (*S*), além disso, a enzima transfere o hidreto pro-(*R*) ou pro-(*S*) da coenzima, dependendo da enzima (E1, E2, E3 ou E4).

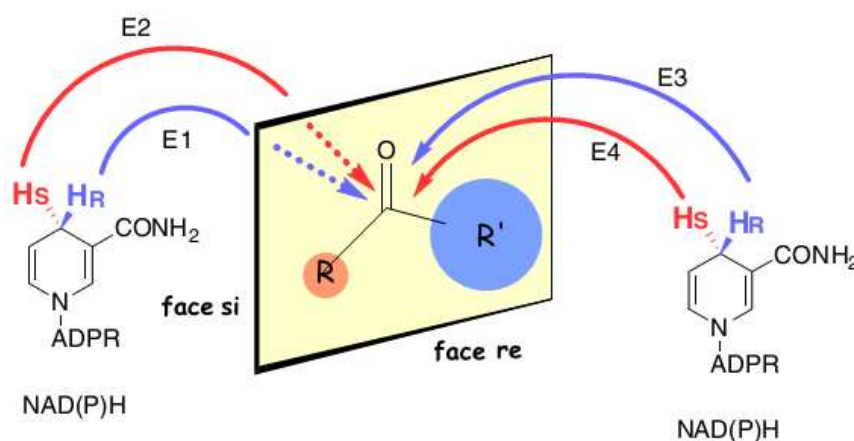


Figura 6. Padrões para transferência do hidreto do NAD(P)H para cetonas pró-quirais¹⁸.

Yang¹⁹ relatou o seu desafio ao realizar a redução do 3-cloropropiofenona **6** por *Saccharomyces cerevisiae*, tendo o produto formado com 60% de *e.e.* quando as células não passavam por um tratamento térmico e, quando submetida ao aquecimento, o produto obtido apresentava-se enantiomericamente puro (Figura 7). Ainda segundo Yang, o tratamento das células com o aquecimento inativou a desidrogenase estereocomplementar presente nas células do *Saccharomyces cerevisiae*, resultando no aumento da enantiosseletividade.

¹⁸ Matsuda, T., Yamanaka, T., Nakamura, K. *Tetrahedron: Asymmetry*, **2009**, *20*, 513–557.

¹⁹ Yang, G. S., Ou, Z. M., Yao, S. J., Xu, J. Y. *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, **2009**, *57*, 83–88.

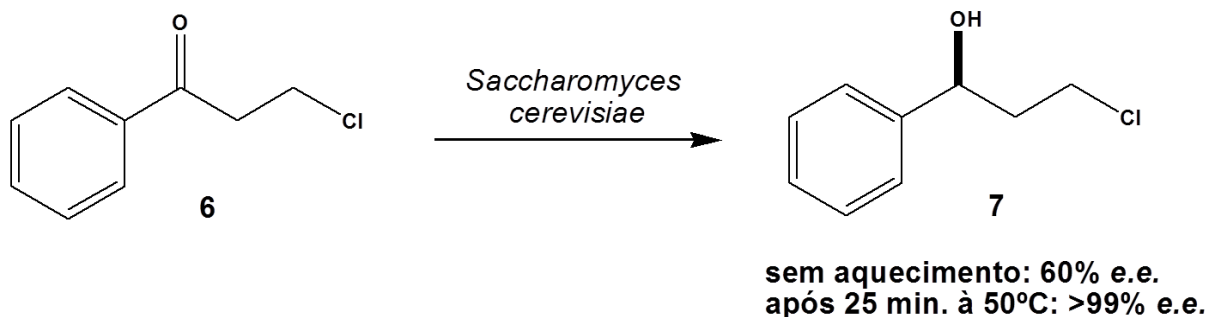


Figura 7. Efeito do pré-tratamento do biocatalisador na enantiosseletividade da redução da 3-cloropropiufenona¹⁹.

Modificações nas condições de reação podem influenciar também na quimiosseletividade do processo, como demonstrou Carballeira²⁰ na biotransformação da ciclohexanona catalisada pelo fungo *Geotrichium candidum*. A obtenção simultânea do ciclohexanol e da ϵ -caprolactona era resultado da redução e oxidação de Baeyer-Villiger da cetona de partida, respectivamente.

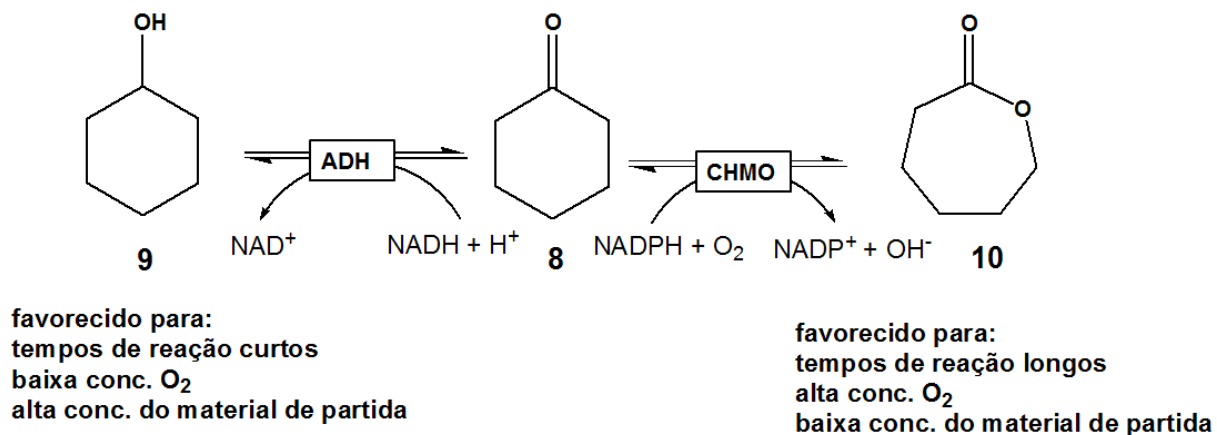


Figura 8. Quimiosseletividade apresentada pela alteração das condições na conversão da ciclohexanona pelo fungo *Geotrichium candidum*²⁰.

Diferente da redução de carbonilas de cetonas pró-quirais, a redução de ligações C=C ativadas é capaz de fornecer até dois centros estereogênicos simultaneamente, dependendo da estrutura do substrato, podendo ser realizada também em condições

²⁰ Carballeira, J. D., Alvarez, Sinisterra, E., J. V. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2004**, *28*, 25–32.

brandas²¹. Essas reduções, que são promovidas por enoato-redutases, são conhecidas à um longo tempo, mas o seu potencial sintético continua subestimado e pouco explorado.

Muitas dessas enoato-redutases pertencem à família das *old yellow enzymes* (OYE), como as já isoladas e caracterizadas OYE1, proveniente do *Saccharomyces pastorianus* e OYE2-3 oriundas do *Saccharomyces cerevisiae*²². A redução por essas enzimas envolve uma adição *trans* à ligação dupla, com a transferência do hidrogênio pro-*R* do NADPH na forma de um hidreto (via o N(5) da flavina) para o carbono β seguido da abstração de um próton do solvente ou resíduo de aminoácido na posição α (Figura 9)²³. Todos os membros da família das OYEs apresentam a flavina mononucleotídeo como grupo prostético não-covalente e NAD(P)H como cofator.

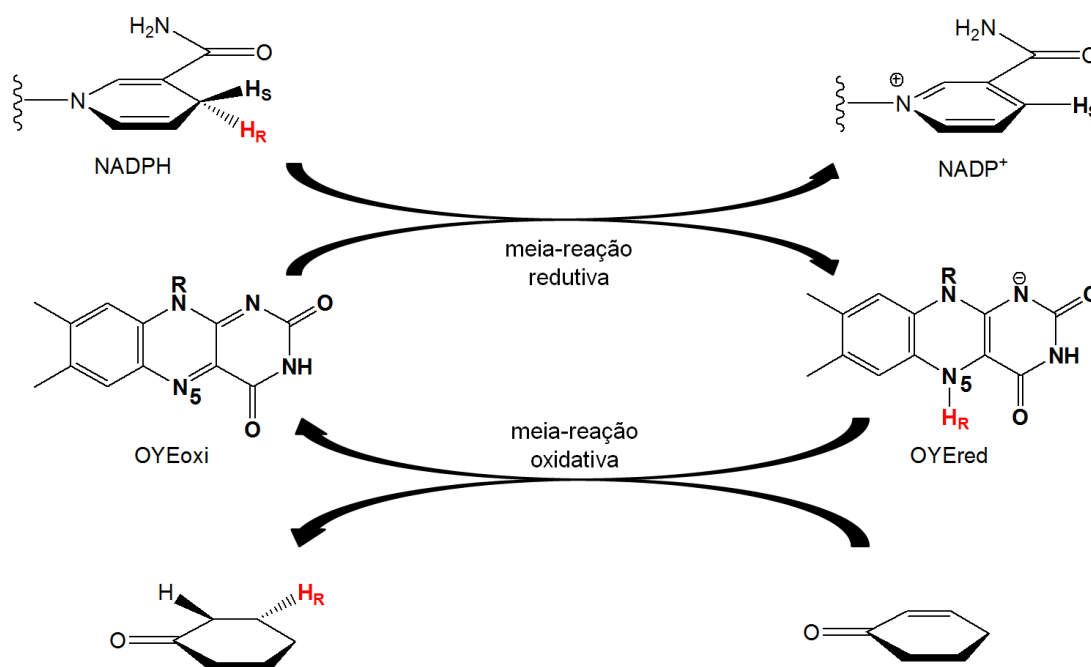


Figura 9. Representação do ciclo catalítico da *old yellow enzyme* e estereopreferência para redução da ligação C=C (adaptado)²³.

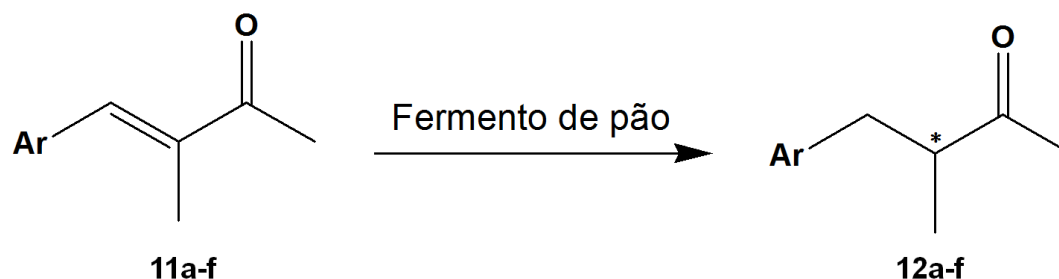
²¹ Brenna, E., Gatti, F. G., Manfredi, A., Monti, D., Parmeggiani *Eur. J. Org. Chem.* **2011**, 4015–4022.

²² Y. S. Niino, S. Chakraborty, B. J. Brown, V. Massey, *J. Biol. Chem.* **1995**, *270*, 1983–1991.

²³ Brown, B. J.; Hyun, J.; Duvvuri, S.; Karplus, P. A.; Massey, V. *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 2138-2145.

Um exemplo de redução de ligações C=C é a redução de α -metil-enonas aromáticas por Tokitoh²⁴ e colaboradores, que avaliaram a influência da posição do nitrogênio em grupos piridinil, assim como a presença do grupo *N*-O no anel piridínico (Tabela 3). A redução mostrou-se quimiosseletiva, formando apenas o produto de redução da ligação C=C com excessos enantioméricos de até >95% para as enonas **11b** e **11e**, fornecendo, para a maioria dos casos, a predominância do produto *S*. Somente para a enona **11d** foi observada a formação da metil-cetona (*R*), ainda que com excesso enantiomérico moderado.

Tabela 3. Redução biocatalítica de α -metil-enonas por fermento de pão



Entrada	Ar	Tempo (h)	Rend. (%)	e.e.(%)	Config.
A	2-Pi	4	59	65	<i>S</i>
B	3- Pi	9	76	>95	<i>S</i>
C	4- Pi	6	72	77	<i>S</i>
d	<i>N</i> -O-2- Pi	16	69	71	<i>R</i>
e	<i>N</i> -O-3- Pi	20	87	>95	<i>S</i>
f	<i>N</i> -O-4- Pi	22	64	71	<i>S</i>

1.3 Imobilização do substrato em Biocatálise

Atualmente existem métodos para a imobilização de uma enzima a fim de facilitar a sua recuperação e reutilização, pois quando usadas na forma isolada garantem um aumento significativo de custo para o processo, dificultando aplicações em reações de escala industrial¹. Entretanto, há um direcionamento da aplicação desses métodos para

²⁴ Kawai, Y., Hayashi, M., Tokitoh, N. *Tetrahedron: Asymmetry* **2001**, *12*, 3007–3013.

o substrato ao invés da enzima, visto que a imobilização da enzima muitas vezes causa redução da atividade catalítica.

Uma aplicação que vem sendo explorada é a aplicação de suportes poliméricos para o substrato, como o uso da resina XAD-7, que apresenta matriz polimérica de éster meta-acrílico e apresenta-se moderadamente hidrofílica²⁵. A principal vantagem do uso de resina é a fácil separação e/ou purificação em reações onde o biocatalisador é empregado como células em suspensão.

Um exemplo que mostrou ser aplicado em grande escala foi a biorredução do 3,4-metileno-dioxifenilacetona em reatores com células de *Zigosaccharomyces rouxii* em suspensão (Figura 10)²⁶. Foi observado que, tanto o substrato quanto o produto, o candidato a fármaco LY300164, apresentaram efeitos tóxicos para o biocatalisador, com isso, a resina XAD-7 foi empregada para reduzir a concentração das espécies no meio, evitando tais problemas.

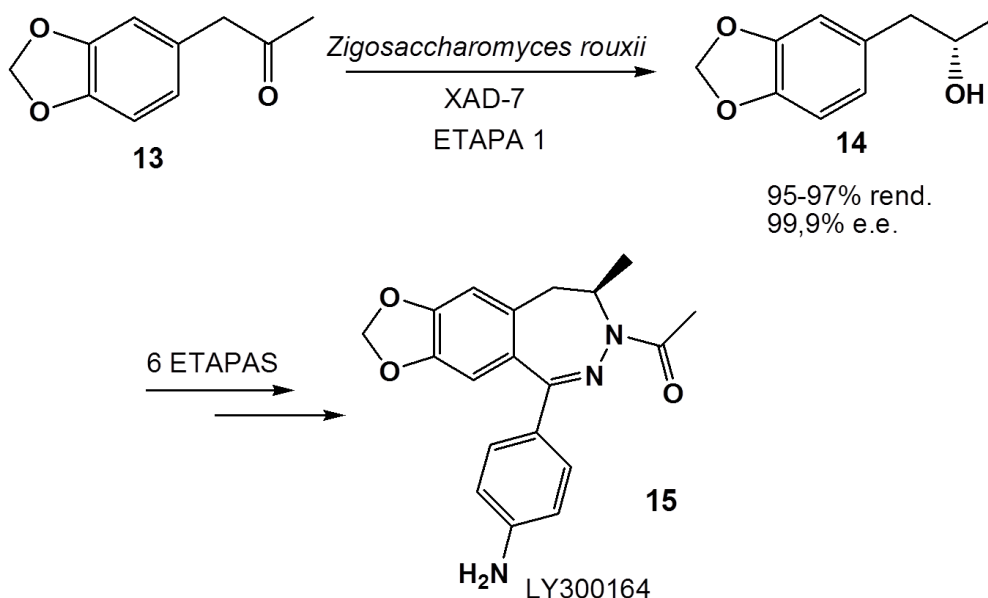


Figura 10. Biorredução em larga escala do 3,4-metileno-dioxifenilacetona empregando resinas poliméricas como suporte²⁶.

²⁵ a) Kallenberg, A. I., van Rantjik, F., Sheldon, R. A. *Adv. Synth. Catal.* **2005**, *347*, 905-926; b) Oliveira, M. W., Hilsdorf, A. W. F., Silva, A. F. S., Oliveira, A. F. *Quimica Nova*, **2009**, *5*, 1134-1138.

²⁶ Vicenzi, J. T., Zmijewski, M. J., Reinhard, M. R., Landen, B. E., Muth, W. L., Marler, P. G. *Enzyme Microb. Technol.*, **1997**, *20*, 496-499.

A Figura 11 representa a atuação da resina sobre o substrato durante um processo envolvendo células do microrganismo em suspensão.

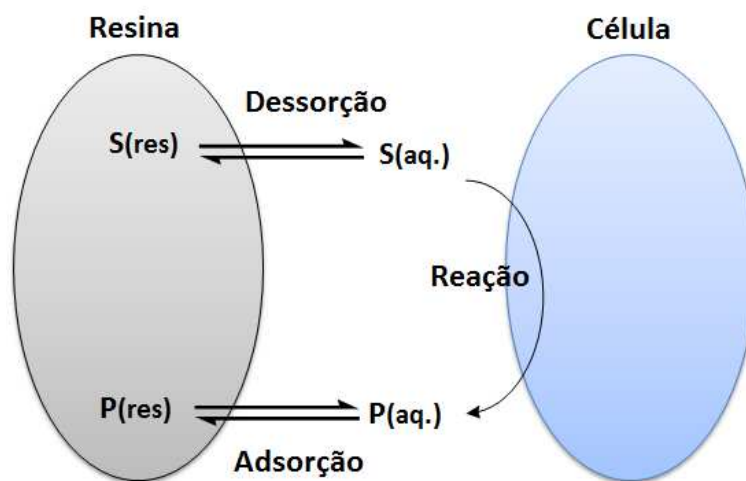


Figura 11. Representação de uma biotransformação empregando reservatório de substrato e remoção do produto *in situ* por resina adsorvente hidrofóbica (adaptado)¹³.

O substrato é introduzido ao meio reacional adsorvido em uma matriz polimérica, sendo liberado gradualmente por dessorção, enquanto o produto formado é extraído *in situ* pela mesma matriz polimérica por adsorção. Isso garante uma concentração reduzida do substrato e do produto formado, evitando problemas como a toxidez das espécies químicas para o microrganismo²⁷.

Um estudo realizado por Nakamura²⁸ mostrou o preparo de ambos os enantiômeros de álcoois secundários empregando células úmidas de *Geotricum candidum* IFO 5767 apenas alterando a condição de reação. Em um procedimento (método B) a redução é feita em condições aeróbicas obtendo os álcoois **17a-f** com configuração (*R*). Quando a reação é realizada com os substratos adsorvidos em XAD-7 em condições anaeróbicas, os mesmos álcoois obtidos apresentaram configuração (*S*) e, para o álcool **17c**, foi observado um excesso enantiomérico superior ao obtido pelo processo aeróbico (Tabela 3).

²⁷ a) Gotor, V.; Alfonso, I.; Garcia-Urdiales, E. *Asymmetric organic synthesis with enzymes*. Wiley-VCH, Weinheim, Alemanha, 2008; b) D'Arrigo, P.; Fantoni, G. P.; Servi, S.; Strini, A. *Tetrahedron: Asymmetry* **1997**, 8 (14), 2375-2379.

²⁸ Nakamura, K., Takenaka, K., Fujii, M., Ida, Y. *Tetrahedron Letters*, **2002**, 43, 3629–3631.

Tabela 4. Redução de fenilcetonas por dois métodos com *Geotrichum candidum* IFO 5767

Geotrichum candidum IFO 5767

$\text{R}-\text{C}(=\text{O})-\text{CH}_3 \xrightarrow[\text{Método A}]{\text{XAD-7}} \text{R}-\text{C}(\text{OH})(\text{H})-\text{CH}_3 \text{ (S)-17}$

$\text{R}-\text{C}(=\text{O})-\text{CH}_3 \xrightarrow[\text{Método B}]{\text{cond. aeróbicas}} \text{R}-\text{C}(\text{OH})(\text{H})-\text{CH}_3 \text{ (R)-17}$

92->99% e.e.
74-92% rend.

85->99% e.e.
56-99% rend.

16a **16b** **16c** **16d** **16e** **16f**

Substrato	Método A			Método B		
	rend. (%) ¹	e.e. (%)	config.	rend. (%) ¹	e.e. (%)	config.
16a	74	>99	<i>S</i>	73	>99	<i>R</i>
16b	92	92	<i>S</i>	99	98	<i>R</i>
16c	90	>99	<i>S</i>	56	85	<i>R</i>
16d	88	99	<i>S</i>	82	95	<i>R</i>
16e	77	98	<i>S</i>	89	99	<i>R</i>
16f	79	99	<i>S</i>	60	>99	<i>R</i>

¹ Rendimento isolado

Mais recentemente, a aplicação de resinas foi avaliada na redução da enona 2-etil-1-fenilprop-2-em-1-ona **18** adsorvida em XAD-7 empregando células de *Pichia stiptis* (Figura 12). Somente o produto de redução da carbonila, o álcool alílico **19**, foi obtido, com excesso enantioméricos de 99%²⁹.

²⁹ Conceição, G. J. A., Moran, P. J. S., Rodrigues, J. A. R. *ARKIVOC*, **2003**, 10, 500.

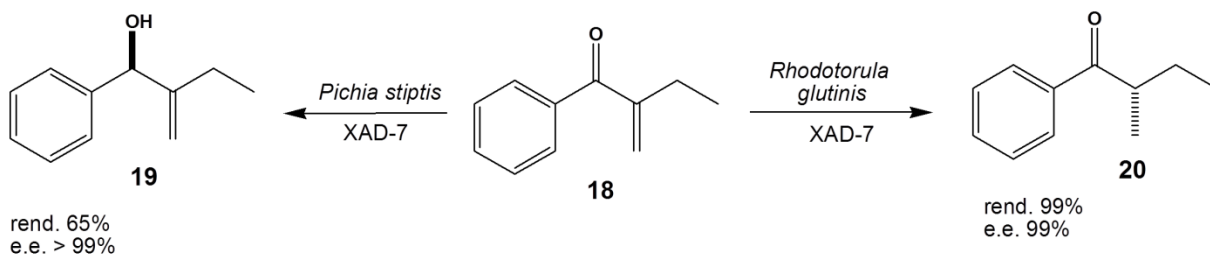


Figura 12. Redução quimioseletiva de 2-etil-1-fenilprop-2-en-1-ona adsorvida em XAD-7 pelas leveduras *Pichia stiptis* e *Rhodotorula glutinis* (adaptado)²⁹⁻³⁰.

A mesma enona **18** quando reduzida usando células de *Rhodotorula glutinis* como biocatalisador, forneceu somente a metil-cetona **20**, produto de redução da ligação C=C, com excesso enantiomérico >99%³⁰.

1.4 α -Alquil- β -hidroxi-ésteres

Blocos construtores do tipo α -alquil- β -hidroxi-éster enriquecidos enantiomericamente estão presentes em várias estruturas bioativas e naturais como estatinas³¹, ferormônios³², policetídeos e outros produtos farmacêuticos. Eles podem ser obtidos por redução assimétrica empregando reagentes de hidreto quirais³³, catalisadores de metais de transição quirais³⁴ e redução com boroidreto mediada por ácidos de Lewis³⁵.

Demonstrando bons resultados, Stewart e colaboradores³⁶ avaliaram duas aldol-redutases presentes no fermento de pão expressas em *E. coli* para a redução de α -alquil- β -cetoésteres (Figura 13). Para os substratos sem grupos alquil na posição α foi obtido somente o álcool (*S*) com excessos enantioméricos de até 98%. Para os β -cetoésteres α substituídos foi observado uma rápida racemização na posição α

³⁰ Conceição, G. J. A., Moran, P. J. S., Rodrigues, J. A. R. *Tetrahedron: Asymmetry*, **2003**, *14*, 43-45.

³¹ a) M. Chartrain, P. M. Salmon, D. K. Robinson, B. C. Buckland, *Curr. Opin. Biotechnol.* **2000**, *11*, 209–214; b) J. Staunton, K. J. Weissman, *Nat. Prod. Rep.* **2001**, *18*, 380–416; c) G. F. Liou, C. Khosla, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2003**, *7*, 279–284.

³² D. Kalaitzakis, S. Kambourakis, D. J. Rozzell, I. Smonou, *Tetrahedron: Asymmetry* **2007**, *18*, 2418–2426.

³³ Soai, K.; Yamanoi, T.; Hikima, H.; Oyamada, H. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1985**, 138-139.

³⁴ Burk, M. J.; Harper, T. G. P.; Kalberg, C. S. *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 4423-4424.

³⁵ Marcantoni, E.; Alessandrini, S.; Malavolta, M. *J. Org. Chem.* **1999**, *64*, 1986-1992.

³⁶ Rodriguez, S., Schroeder, K. T., Kayser, M. M., Stewart, J. D. *J. Org. Chem.* **2000**, *65*, 2586-2587.

permitindo a resolução cinética dinâmica, fornecendo como único produto o diastereoisômero *syn* (*2R*, *3S*) com excessos enantioméricos e diastereoméricos de até 98%, tanto para a enzima Gcy1p quanto para a enzima Gre3p.

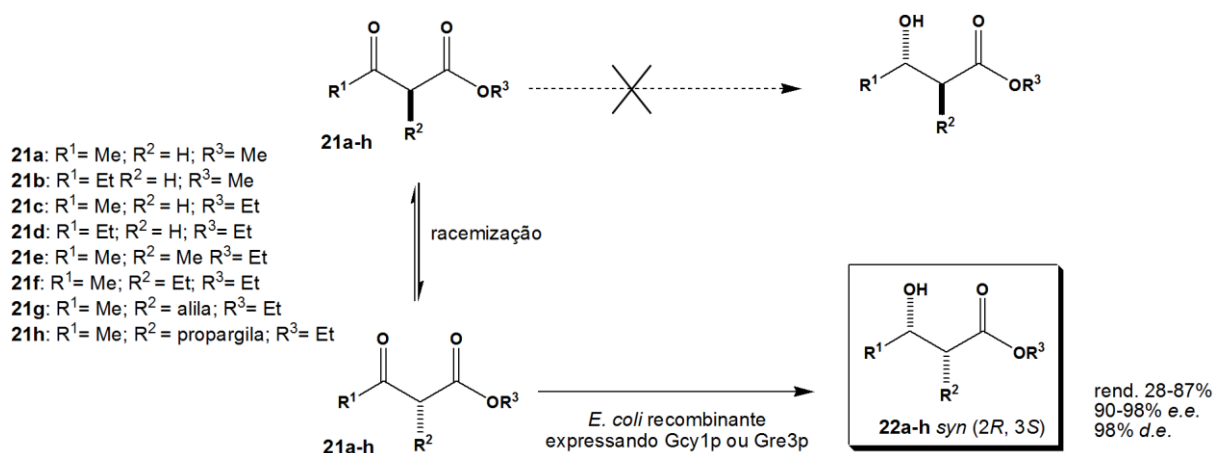


Figura 13. Redução de β -cetoésteres pelas enzimas Gre3p e Gcy1p expressadas em cepas de *E. coli* (adaptado)³⁶.

Mais recentemente Milagre *et. al*³⁷ conseguiram obter o α -hidroxi- β -metil- γ -cetoéster **24** enantio e diastereosseletivamente, ao realizar a biorredução do α -hidroxi- β -metileno- γ -cetoéster quiral (*R*)-**23** com *Rhodotorula glutinis* CCT 2182 como biocatalisador (Figura 14). Apesar da estereosseletividade obtida nessa redução ser excelente (98% e.e.), a quimiosseletividade não foi igualmente satisfatória, fornecendo somente (*2R,3S*)-**24** e (*2R,3R*)-**24** com uma proporção de 90:10. Com isso, **24** foi submetido à redução química com *n*Bu₄NBH₄ fornecendo as lactonas (*3R,4S,5R*)-**25** e (*3R,4R,5S*)-**25**, também com elevados e.e. e proporção de 1:12 entre os diastereoisômeros.

³⁷ Milagre, C. D. F., Milagre, H. M. S., Moran, P. J. S., Rodrigues, J. A. R. *J. Org. Chem.* **2010**, 75, 1410–1418.

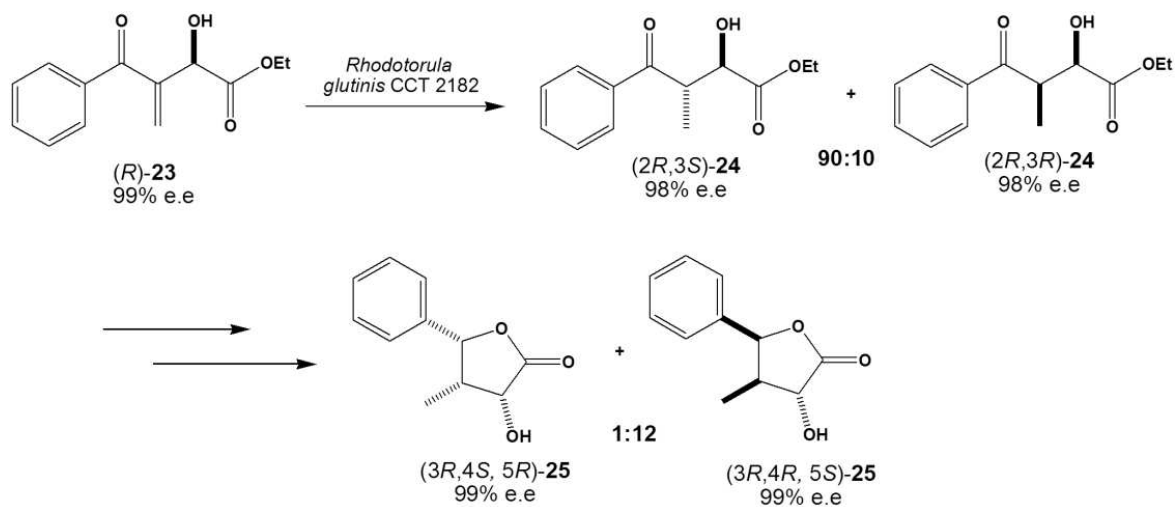
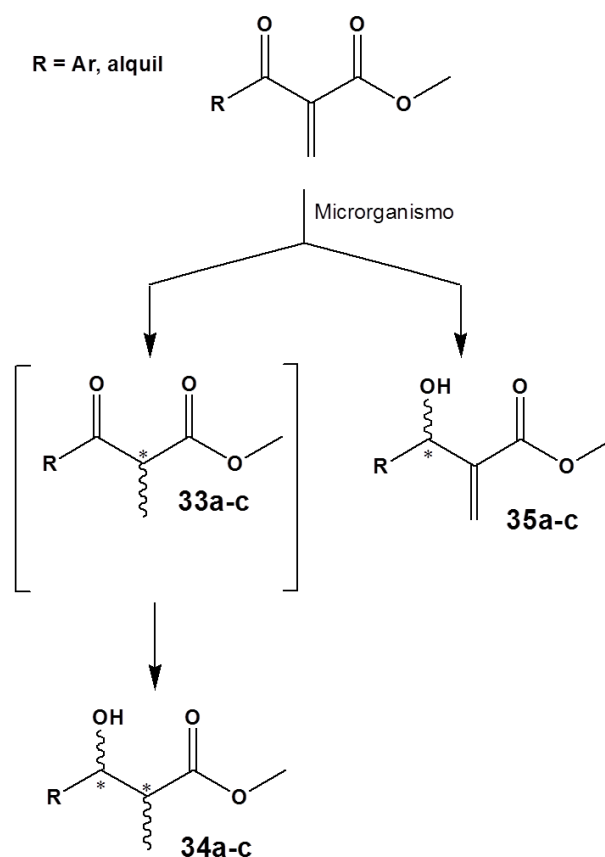


Figura 14. Síntese quimioenzimática das lactonas $(3R,4S,5R)$ -**25** e $(3R,4R,5S)$ -**25**³⁷.

OBJETIVOS

2. Objetivos

Preparar os α -metileno- β -cetoésteres por meio de uma proposta ambientalmente compatível e empregá-los na biorredução com diferentes microrganismos e condições reacionais, avaliando a quimio e enantiosseletividade do processo, seja obtendo somente o produto de redução da ligação C=O ou de ambas as ligações C=O e C=C, fornecendo dois centros estereogênicos contíguos simultaneamente.



Esquema 1. Biorredução dos α -metileno- β -cetoésteres e os possíveis produtos que podem ser obtidos.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

3. Resultados e Discussão

3.1 Preparo de α -metileno- β -cetoésteres

Inicialmente a proposta para a obtenção dos substratos consistiu de uma metodologia *one-pot*, desenvolvida em nosso grupo, de condensação de β -cetoésteres e paraformaldeído³⁸.

A α -metilenação de compostos carbonílicos tendo como rota o acetato de morfolínio tem como principal vantagem a formação do íon imínio *in-situ* por meio da condensação da morfolina com o formaldeído (Figura 15). A reação do íon imínio com a forma enólica da cetona resulta na base de Mannich que, após a eliminação da morfolina, o catalisador é regenerado e o α -metilencetoéster é formado³⁹.

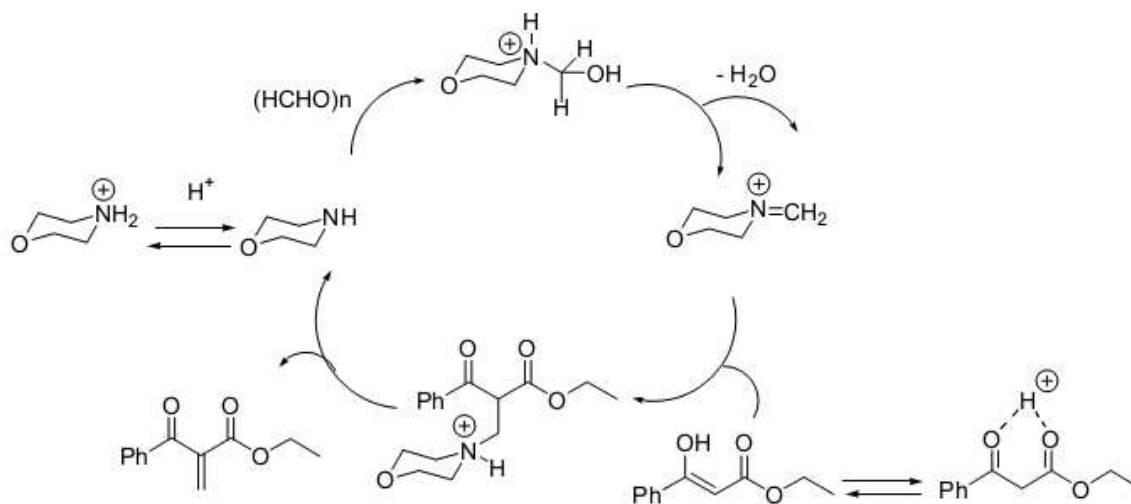


Figura 15. Mecanismo determinado anteriormente pelo grupo para a condensação de formaldeído com cetoésteres³⁸.

³⁸ Rodrigues, J. A. R., Siqueira, E. P. F., Mancilha, M., Moran, P. J. S. *Synthetic Comm.* **2003**, 33, 331.

³⁹ MARCH, J. *Advanced organic chemistry: reactions, mechanisms and structures*, **1992**, 4a ed., John Wiley & Sons, Nova York.

As conversões observadas para os cetoésteres empregados não foram satisfatórias (Tabela 5), mesmo mantendo o controle da umidade e temperatura, fatores que já se mostraram ser de crucial importância para o bom andamento do processo⁴⁰.

Tabela 5. α -Metilação dos β -cetoésteres **26a-c** sob atmosfera inerte

30 mol%

(HCOH)_n 9 mmol
AcOH, peneira molecular
refluxo, atm inerte

26a-c → **27a-c**

Entrada	Produto	R	Conversão(%) ¹
1	27a	Et	10
2	27b	Pr	15
3	27c	Ph	50

¹ Determinado por CG/EM

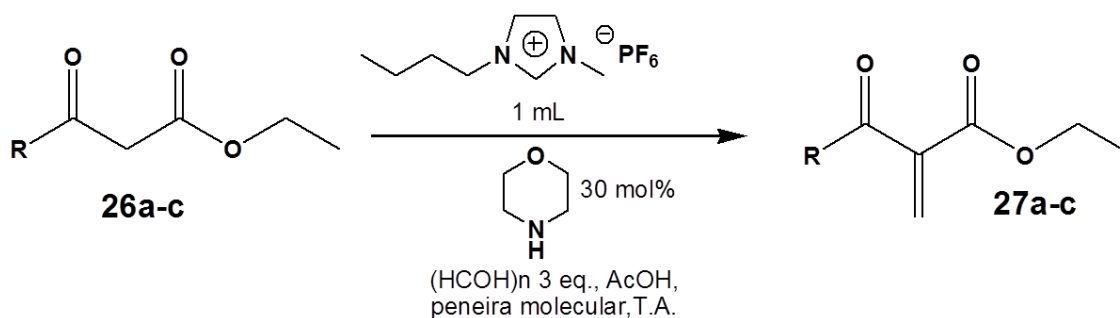
Uma variação do protocolo aplicado, também desenvolvido pelo grupo, baseia-se na utilização de líquidos iônicos como promotores na reação de α -metilação⁴¹, uma vez que atuam estabilizando os intermediários zwitteriônicos que, por meio de pares iônicos supramoleculares com ligações de hidrogênio, demonstram uma natureza iônico-covalente⁴². O líquido iônico foi sintetizado de acordo com um procedimento da literatura⁴³.

⁴⁰ Milagre, C. D. F. Dissertação de Mestrado, 2003, Instituto de Química, UNICAMP.

⁴¹ Vale, J. A., Zanchetta, D. F., Moran, P. J. S., Rodrigues, J. A. R. *Synlett*, **2009**, 1, 75.

⁴² a) Dupont, J, *J. Braz. Chem. Soc.* **2004**, 15, 341; b) Rosa, J. N.; Afonso, C. A. N.; Santos, A. G. *Tetrahedron*, **2001**, 57, 4189; c) Kumar, A.; Pawar, S. S. *J Mol. Cat. A: Chem.* **2003**, 208, 33.

⁴³ Cassol, C. C., Eberling, G., Ferrera, B., Dupont, J. *Adv. Synth. Catal.* **2006**, 324, 243.

Tabela 6. α -Metilenação dos β -cetoésteres empregando líquido iônico

Entrada	Produto	R	Conversão(%) ¹
1	27a	Et	20
2	27b	Pr	35
3	27c	Ph	60

¹ Determinado por CG/EM

Os resultados obtidos com o líquido iônico hexafluorofosfato de 1-butil-3-metilimidazólio (BMIM)PF₆, mostraram-se melhores do que a metodologia anterior, com boas conversões, entretanto, estes resultados ainda não se mostraram satisfatórios, mostrando a necessidade da busca de uma nova alternativa.

Com isso, foi realizada a reação de Morita-Baylis-Hillman empregando diferentes aldeídos juntamente com acrilato de metila como principal nucleófilo.

A reação de Morita-Baylis-Hillman é conhecida como um processo organocatalisado com a formação de pequenas moléculas com alto grau de funcionalização⁴⁴. Sendo assim, tais moléculas foram e ainda são usadas na síntese de vários produtos naturais e fármacos⁴⁵.

Outros aspectos que tornam este processo de grande interesse é o fato de apresentar uma elevada economia atômica, uma vez que todos os reagentes são incorporados no produto final⁴⁶, e o desafio das propostas de mecanismos para a reação, que se dividem entre autocatálise (com uma segunda molécula de aldeído) e influência de solventes próticos na velocidade reacional (Figura 16)⁴⁷.

⁴⁴ M. Shi, F.-Wang, M. X. Zhao, Y. Wei, *The Chemistry of the Morita–Baylis–Hillman Reaction*, **2011**, RSC Publishing: Cambridge, UK.

⁴⁵ Basavaiah, D.; Veeraraghavaiah, G. *Chem. Soc. Rev.*, **2012**, 41, 68–78.

⁴⁶ Dunn, P. J. *Chem. Soc. Rev.* **2012**, 41, 1452.

⁴⁷ a) Cantillo, D., Kappe, C. O. *J. Org. Chem.* **2010**, 75, 8615–8626; b) Price, K. E.; Broadwater, S. J., Jung, H. M., McQuade, D. T. *Org. Lett.* **2004**, 7, 147; c) Amarante, G., Milagre, H., Vaz, B.; Ferreira, B.;

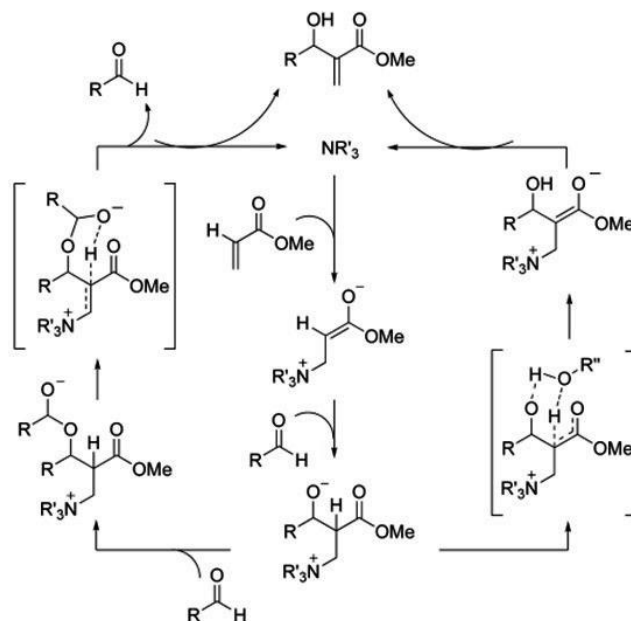
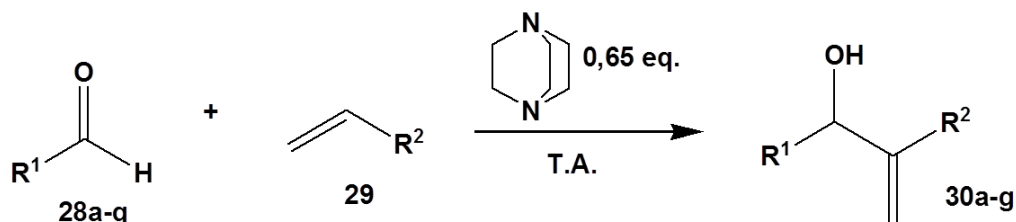


Figura 16. Mecanismo mostrando a dualidade existente na reação de Morita-Baylis-Hillman⁴⁷.

Foi empregado o protocolo desenvolvido por Coelho⁴⁸ e colaboradores para o preparo dos adutos de Morita-Baylis-Hillman. Os rendimentos obtidos foram bons e estão resumidos na tabela 7.

Eberlin, M., Coelho, F. *J. Org. Chem.* **2009**, 74, 3031; d) Aggarwal, V. K., Fulford, S. Y., Lloyd-Jones, G. C. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, 44, 1706.

⁴⁸ Coelho, F., Almeida, W. P., Veronese, D., Mateus, C. R., Lopes, E. C. S., Rossi, R. C., Silveira, G. P. C., Pavam, C. H. *Tetrahedron*, **2002**, 58, 7437.

Tabela 7. Preparo dos adutos de Morita-Baylis-Hillman

Entrada	Aldeído	R ¹	R ²	Aduto	Tempo (h)	Rend. (%) ^a
1	28a	Ph	CO ₂ Me	30a	78	72
2	28b	p-Cl-Ph	CO ₂ Me	30b	68	91 ^b
3	28c	p-Br-Ph	CO ₂ Me	30c	48	92
4	28d	p-NO ₂ -Ph	CO ₂ Me	30b	8	89
5	28e	o-Cl-Ph	CO ₂ Me	30e	70	90 ^b
6	28f	<i>t</i> Bu	CO ₂ Me	30f	70	65
7	28g	Pr	CO ₂ Me	30g	71	85
8	28h	Ph	CN	30h	17	75
9	28i	p-Cl-Ph	CN	30i	3,5	70 ^c
10	28j	p-NO ₂ -Ph	CN	30j	0,5	71 ^c

^a Rendimento isolado.

^b Reação feita em banho com fonte ultrassônica de 1000 W, 25 kHz.

^c Reação realizada à 0°C.

Em geral, os adutos tendo acrilato de metila como olefina ativada mostraram rendimentos superiores em relação aos adutos tendo acrilonitrila. Em contrapartida, estes últimos demonstraram tempo reacional bem inferior, chegando à 3,5 horas e 0,5 horas para os adutos **30i** e **30j** respectivamente, quando as reações foram realizadas à 0°C.

Vasconcellos e colaboradores⁴⁹ demonstraram uma variação do procedimento para a reação de Morita-Baylis-Hillman envolvendo aldeídos com grupos que ativassem a carbonila. Quando estas espécies reagiram à 0°C, havia uma aceleração significativa do processo, que se mostrou mais pronunciado quando acrilonitrilas eram empregadas como olefina ativada na reação, ao invés do acrilato de metila. Esse comportamento foi observado inicialmente por Leahy e Rafael, que justificaram por meio da estabilização do

⁴⁹ Junior, C. G. L., Silva, F. P. L., Oliveira, R. G., Subrinho, F. L., Andrade, N. G., Vasconcellos, M. L. A. *A. J. Braz. Chem. Soc.* **2011**, *22* (11), 2220.

estado de transição do aza-enolato *Z* à 0°C em relação ao estado de transição *E*⁵⁰ (Figura 17).

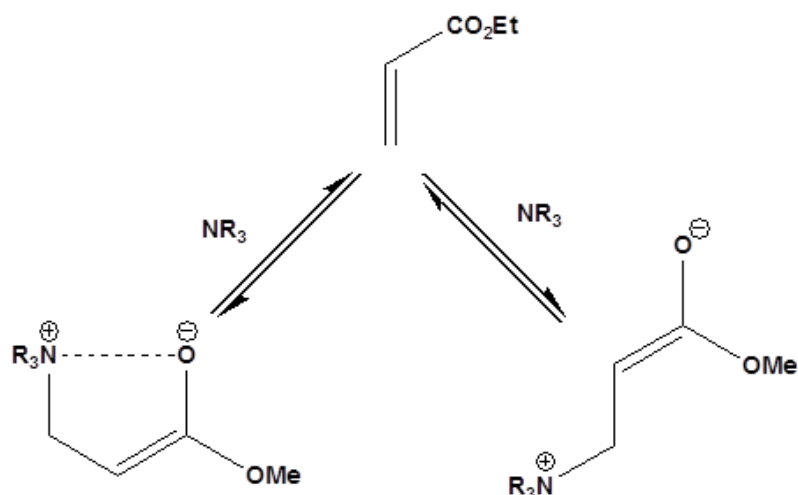


Figura 17. Representação da estabilização do estado de transição do aza-enolato *Z* em relação ao *E* na reação de Bayllis-Hillman⁵⁰.

Após obtenção dos adutos de MBH, a etapa seguinte foi a oxidação ao respectivo metilenocetoéster. Várias alternativas estão disponíveis para a oxidação de álcoois alílicos, entretanto, no caso dos adutos de MBH, a oxidação não é uma tarefa fácil.

Abordagens como a oxidação de Swern e Jones indicavam ser alternativas práticas, porém, Hadfield e colaboradores⁵¹ conseguiram obter apenas os respectivos cloretos de alila ao invés do metilenocetoéster esperado (Figura 18). Já Hoffman⁵² e colaboradores conseguiram oxidar os aduto de MBH usando o reagente de Jones, entretanto, este processo gera resíduos de cromo, o que torna o essa reação de menor interesse diante da química verde.

⁵⁰ Rafel, S., Leahy, S. W., *J. Org. Chem.* **1997**, 62, 1521.

⁵¹ Lawrence, N. J., Crump, J. P., McGown, A. T., Hadfield, J. A., *Tetrahedron Lett.*, **2001**, 42, 3939.

⁵² Hoffmann, H. M. R., Gassner, A., Eggert, U. *Chem. Ber.* **1991**, 124, 2475–2480.

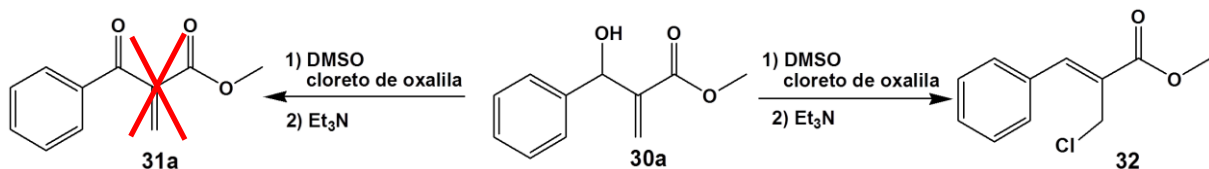


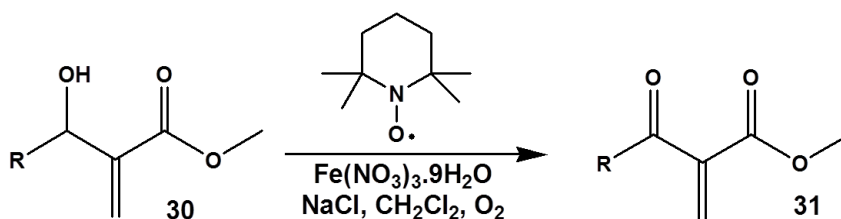
Figura 18: Oxidação de Swern em aduto de Morita-Baylis-Hillman fornecendo o respectivo cloreto de alila como um único estereoisômero.

Diante dos contratempos desses procedimentos, aparentemente práticos, foi decidido procurar outras rotas para oxidação dos adutos em questão, rotas verdes, como os métodos aeróbicos para oxidação de álcoois. Esses métodos têm crescido vastamente nos últimos anos graças às vantagens do dioxigênio como abundância, baixo custo e formação de subprodutos não tóxicos (H₂O)⁵³.

Considerando isso, foi avaliada a capacidade de um sistema empregando *N*-óxido de tetrametilpiperonila (TEMPO) e Fe(NO₃)₃ em oxidar os adutos de MBH de forma aeróbica à temperatura ambiente⁵⁴. Os resultados não foram satisfatórios, tendo como melhor resultado uma conversão de 51% para o aduto **30a**, mesmo após 16 horas de reação (Tabela 8).

⁵³ Kuang, Y., Islam, N. M., Nabaie, Y., Hayakawa, T., Kakimoto, M. *Angew. Chem.* **2010**, 122, 446–450.

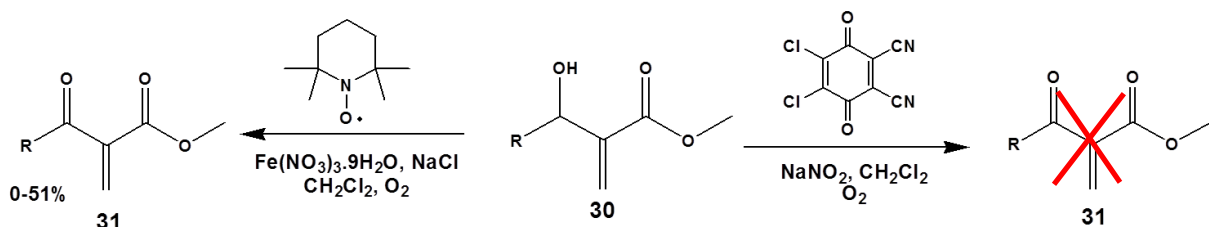
⁵⁴ Mang, S., Liu, J., Li, S., Chen, B., Cheng, J., Kuang, J., Liu, Y., Wan, B., Wang, Y., Ye, J., Yu, Q., Yuan, W., Yu, S. *Adv. Synth. Catal.* **2011**, 353, 1005.

Tabela 8: Oxidação aeróbica dos adutos de MBH com sistema TEMPO/ $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3$ 

Entrada	Aduto	Metilenoacetóéster	R ¹	Tempo (h)	Conversão(%) ¹
1	30a	31a	Ph	16	51
2	30d	31d	<i>p</i> -NO ₂ -Ph	24	0
3	30f	31f	<i>t</i> Bu	20	32
4	30b	31b	<i>p</i> -Cl-Ph	24	0

¹ Determinado por CG/EM.

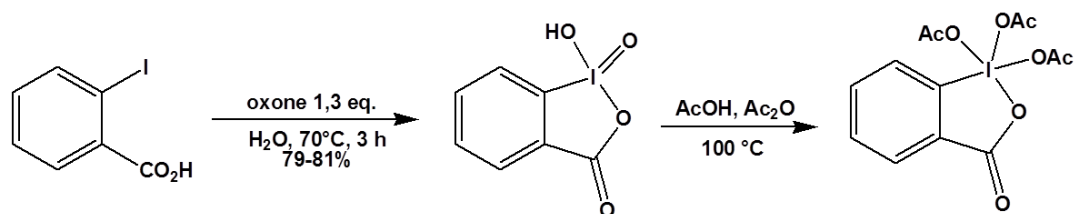
A avaliação da oxidação dos adutos por métodos aeróbicos ainda foi testada com procedimento envolvendo 2,3-dicloro-5,6-diciano-1,4-benzoquinona (DDQ) na presença de NaNO_2 ⁵⁵, entretanto os resultados foram ainda mais insatisfatórios, sugerindo a substituição das metodologias aeróbicas para oxidação dos álcoois. O esquema 2 representa as abordagens aeróbicas para a oxidação dos adutos de MBH realizadas.

**Esquema 2:** Propostas de oxidações aeróbicas avaliadas para os adutos de MBH.

O uso de reagentes de iodo hipervalente na oxidação de álcoois também vem crescendo nos últimos anos, geralmente por conta da sua baixa toxicidade, fácil manuseio, não gera resíduos tóxicos e boa tolerância à umidade. Os principais exemplos são o reagente de Dess-Martin e, mais atualmente, o ácido 2-iodoxibenzóico

⁵⁵ Wang, L.; Li, J.; Yang, H.; Lv, Y.; Gao, S.; *J. Org. Chem.* **2012**, 77, 790-794.

(IBX)⁵⁶, este último é conhecido por ser o precursor do periodinano de Dess-Martin (DMP) (Esquema 3)⁵⁷.



Esquema 3: Reação de preparo do IBX e do DMP.

Recentemente, o IBX tem sido usado em diversas transformações envolvendo adutos de MBH⁵⁸, sendo assim fomos encorajados a empregá-lo na oxidação dos adutos de MBH em estudo. O preparo do IBX foi feito por uma metodologia já estabelecida⁵⁹.

Os α -metileno- β -cetoésteres foram obtidos com excelentes rendimentos quase quantitativos dentro de poucas horas (Tabela 9) e, em quase todos os casos de adutos de acrilato de metila, o α -metileno- β -cetoéster foi o único produto observado sem precisar de qualquer purificação cromatográfica. O produto **31f**, apesar de formar o produto esperado, ainda que em conversão razoável, não foi isolado devido à degradação observada em coluna cromatográfica.

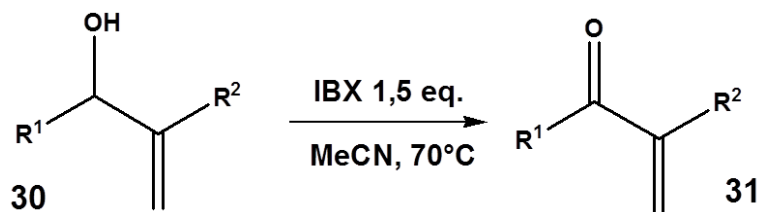
O aduto com acrilonitrila **30h** foi submetido à oxidação e sofreu rápida decomposição, assim, sugere-se que o grupo metileno formado torna-se altamente eletrofílico, o que pode contribuir para a decomposição dos produtos de oxidação.

⁵⁶ Moorthy, J. N., Singhal, N. Venkatakrishnan, P. *Tetrahedron Lett.* **2004**, 45, 5419.

⁵⁷ Dess, B. D., Martin, J. C. *J. Org. Chem.* **1983**, 48, 4155.

⁵⁸ a) Santos, M. S.; Coelho, F. *RSC Adv.*, **2012**, 2, 3237–324; b) L. D. S. Yadav and A. Chhama, *Tetrahedron Lett.*, **2009**, 50, 3801; c) L. D. S. Yadav and A. Chhama, *Tetrahedron Lett.*, **2009**, 50, 715; d) Yadav, L. D. S., Chhama, A., Ankita, R. *Tetrahedron Lett.*, **2008**, 49, 6360.

⁵⁹ Frigerio, M., Santagostino, M., Sputore, S. *J. Org. Chem.* **1999**, 64, 4537-4538.

Tabela 9. Oxidação dos adutos de MBH com ácido 2-iodóxibenzóico (IBX)

Entrada	Aduto	α -metileno- β -cetoéster	t (min)	Rend. (%) ^a
1	30a	31a, R ¹ = Ph; R ² = COOMe	150	95
2	30a	31a; R ¹ = Ph; R ² = COOMe	170	93 ^b
3	30b	31b; R ¹ = p-Cl-Ph; R ² = COOMe	170	96
4	30b	31b; R ¹ = p-Cl-Ph; R ² = COOMe	180	91 ^b
5	30c	31c; R ¹ = p-Br-Ph; R ² = COOMe	160	97
6	30c	31c; R ¹ = p-Br-Ph; R ² = COOMe	180	92 ^b
7	30f	31f; R ¹ = <i>t</i> Bu; R ² = COOMe	165	- ^c
8	30h	31h; R ¹ = Ph; R ² = CN	120	- ^d

^a Rendimento isolado;

^b Rendimento obtido empregando IBX obtido a partir da oxidação do ácido-iodosilbenzóico (IBA);

^c Foi observada uma conversão de 60% por CG-EM, o produto foi degradado durante purificação por coluna cromatográfica;

^d Decomposição do produto após o tempo indicado.

Foi avaliada ainda a possibilidade de recuperação o ácido 2-iodosilbenzóico (IBA) formado ao final da reação, como já foi abordado por Itoh e colaboradores⁶⁰. Sendo assim, o IBA formado ao fim da reação foi filtrado e reoxidado com oxone® sob as mesmas condições do preparo do IBX, fornecendo o mesmo após 3 horas com rendimentos de 70 à 78%.

Os adutos de MBH **30a**, **30b** e **30c** foram submetidos ao IBX recuperado do IBA e mostraram resultados semelhantes àqueles quando o IBX usado era proveniente do ácido 2-iodobenzóico (entrada **2**, **4** e **6**). Isso demonstra a grande capacidade e praticidade do IBX, podendo ser recuperado e reutilizado sem perder significativamente sua capacidade oxidante. A figura 17 demonstra o ciclo reacional proposto para oxidação dos adutos de MBH pelo IBX e reaproveitamento do IBX⁴⁴.

⁶⁰ Miura, T., Nakashima, K., Tada, N., Itoh, A. *Chem. Comm.* **2011**, 47, 1875-1877.

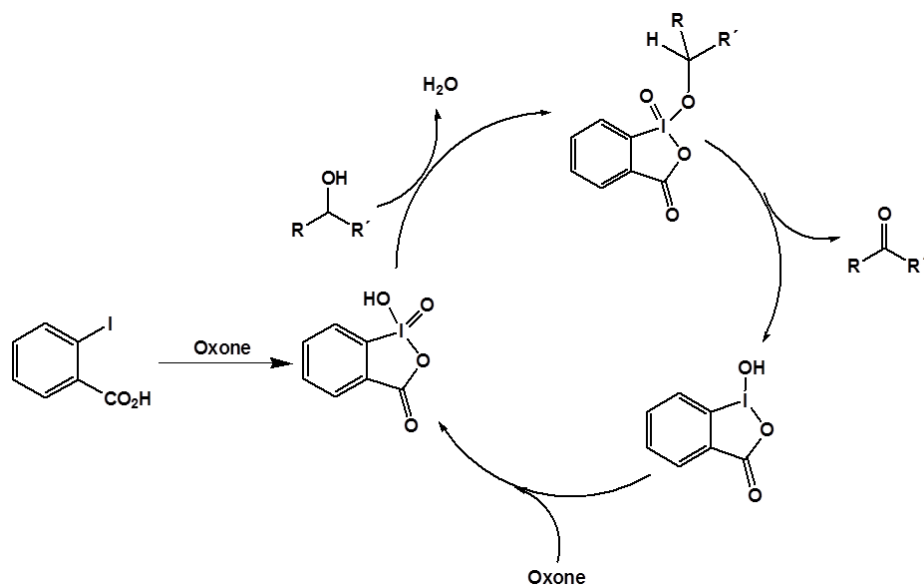


Figura 19: Ciclo reacional para a oxidação de álcoois secundários com IBX e o IBX recuperado (adaptado)⁴⁴.

3.2 Biorredução de α -metileno- β -cetoésteres

3.2.1 Triagem dos microrganismos

Uma vez obtidos os substrato **31a**, **31b** e **31c**, foram submetidos à biorredução com quatro microrganismos, todos já avaliados anteriormente pelo nosso grupo. Com isso foi possível descobrir como cada microrganismo atua sobre os substratos: promovendo a redução da ligação C=O, a redução da ligação C=C ou de ambas (figura 20).

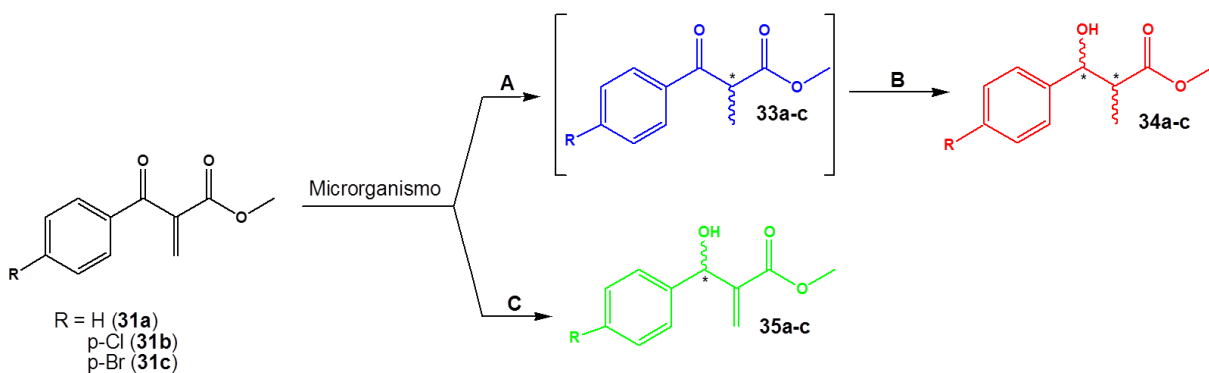
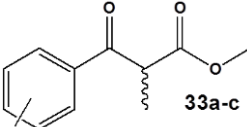
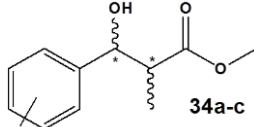


Figura 20: Representação dos possíveis produtos de biorredução dos α -metileno- β -cetoésteres e as rotas a serem tomadas durante a redução biocatalítica dos mesmos.

Os substratos obtidos foram submetidos à biotransformação com *Saccharomyces cerevisiae* liofilizado tipo II (Sigma-Aldrich®) e as leveduras *Pichia stipitis* CCT 2617, *Rhodotorula glutinis* CCT 2182 e *Pichia kluyveri* CCT 3365.

As álcool desidrogenases (ADH) presentes nas leveduras *Pichia stipitis*, *Rhodotorula glutinis* e *Pichia kluyveri* não foram capazes de reduzir os α -metil- β -cetoésteres aos respectivos α -metil- β -hidroxi-ésteres (Tabela 10). Entretanto, as enoatoredutases presentes nessas leveduras foram capazes de biotransformar os α -metileno- β -cetoésteres em seus respectivos produtos de redução da ligação C=C, os α -metil- β -cetoésteres, ainda que com baixas conversões e elevados tempos de reação (rota A, figura 20).

Tabela 10. Triagem para a biorredução dos α -metileno- β -cetoésteres.

Microrganismo	 33a-c		 34a-c	
	R	Conv. (%) ^a	Conv. (%) ^a	t (h)
<i>Sacharomyces cerevisiae</i> ^b	H	<3	98	38
	<i>p</i> -Cl	<3	96	40
	<i>p</i> -Br	<3	95	43
<i>Rhodotorula glutinis</i> ^c	H	37	-	77
	<i>p</i> -Cl	21	-	84
	<i>p</i> -Br	4	-	96
<i>Pichia stiptis</i> ^c	H	5	-	96
	<i>p</i> -Cl	7	-	96
	<i>p</i> -Br	3	-	96
<i>Pichia kluyveri</i> ^c	H	20	-	96
	<i>p</i> -Cl	-	-	96
	<i>p</i> -Br	16	-	96

^a Determinado por CG-EM;

^b Experimento realizado empregando 2 g de célula liofilizada, 50 mL de água destilada e 50 mg de substrato;

^c Experimento realizado em 50 mL do caldo YM (*Yeast Malt*) com suspensão celular e adição de 50 mg do substrato.

A redução da ligação C=C pela enoato redutase presente no fermento de pão, conhecida como *old yellow enzyme* (OYE), ocorre por meio de uma reação de Michael com especificidade *trans*, onde o ataque do hidreto proveniente da flavina mononucleotídeo (FMNH₂), é feito pela face *si* e o próton seguinte é abstraído pela face *re*, da parte alcoólica de um resíduo de tirosina presente no sítio ativo da enzima em questão (Figura 21)⁶¹.

⁶¹ a) Williams, L. E., Bruce, N. C., *Microbiology* **2002**, 148, 1607; b) Stuermer, R.; Hauer, B.; Hall, M.; Faber, K *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2007**, 11, 203.

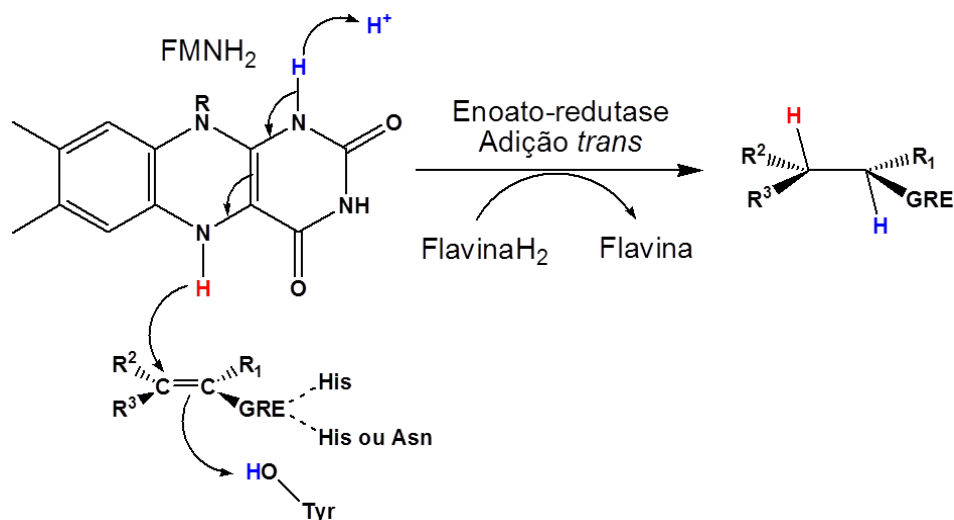


Figura 21. Redução de ligações C=C ativadas biocatalisada por enoato redutases do tipo *old yellow enzymes* com especificidade *trans*⁶¹.

Entretanto, os produtos obtidos apresentam uma metila na posição α em relação à carbonila cetônica e à carbonila do éster, o que pode resultar em uma estereoinversão do grupo metila, devido à elevada acidez do hidrogênio na mesma posição (Figura 22), prejudicando essa especificidade da enoato redutase presente.

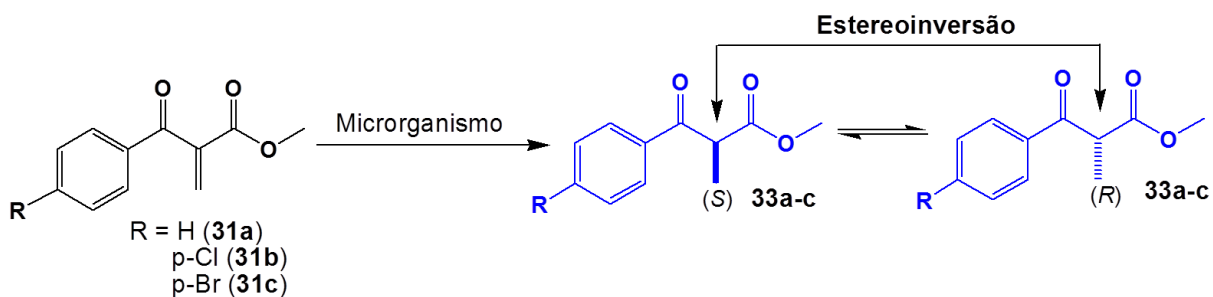


Figura 22. Representação da estereoinversão da metila na posição α dos α -metil- β -cetoésteres produzidos pela redução biocatalítica dos substratos.

Somente a cepa de *Saccharomyces cerevisiae* comercial demonstrou apresentar ADH capazes de promover a redução da ligação C=O subsequente, a partir dos α -metil- β -cetoésteres produzidos (rota A→B, figura 20). Estes α -metil- β -hidroxi-ésteres foram obtidos com conversões de até 98% e tempos de reação variando de 38 à 43 horas,

tornando o *Saccharomyces cerevisiae* como o biocatalisador de escolha para os substratos em estudo.

Os perfis reacionais obtidos para os α -metileno- β -ceto-ésteres **31a**, **31b** e **31c** observados durante a biorredução por *Saccharomyces cerevisiae* mostraram-se semelhantes em geral, como é mostrado na figura 23.

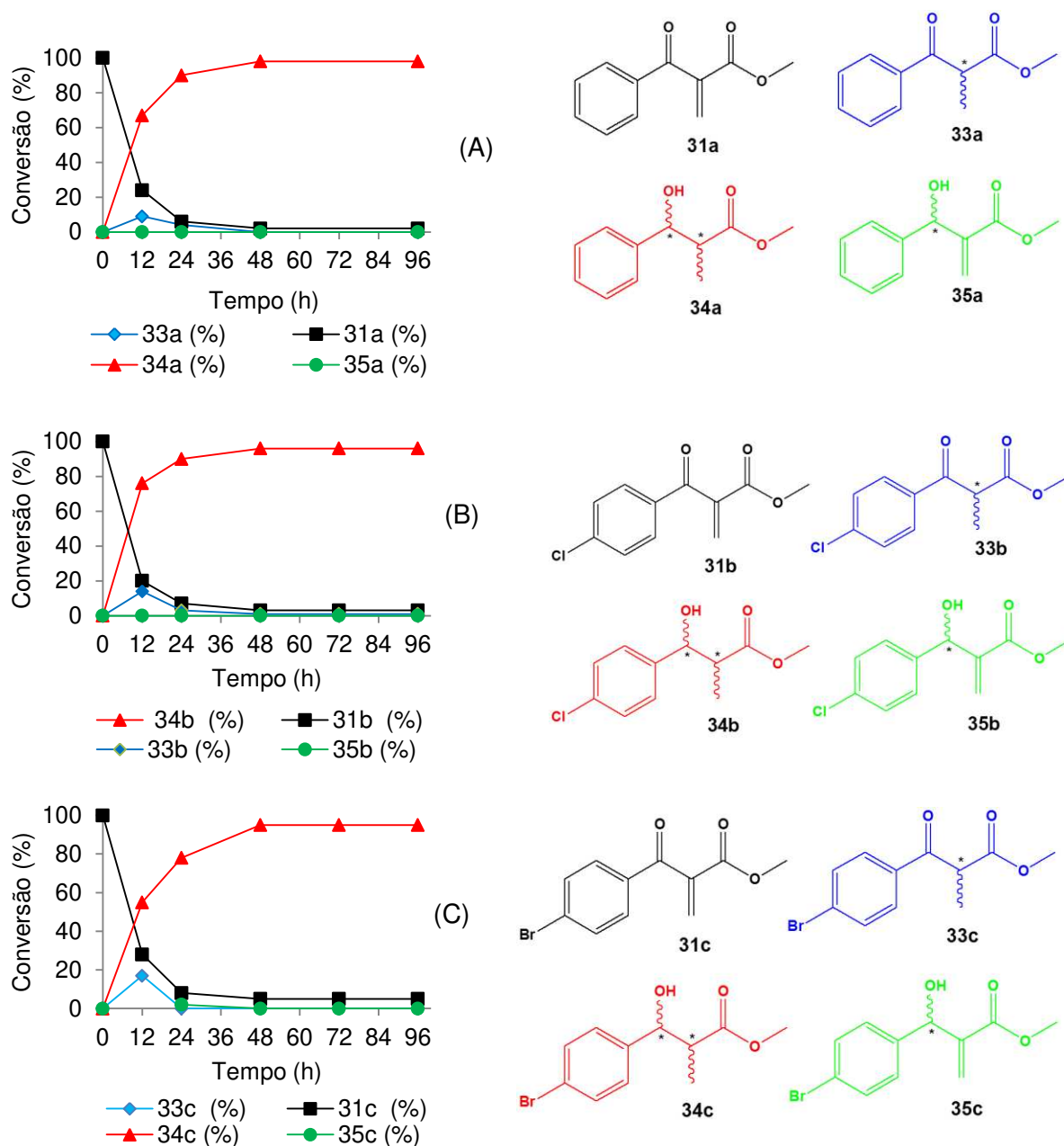
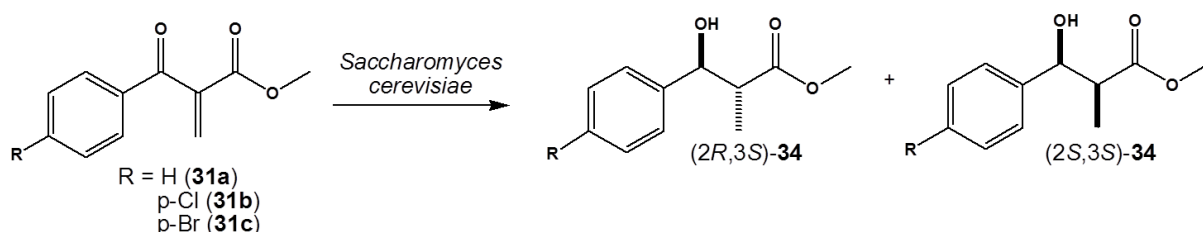


Figura 23. Perfil reacional para os α -metileno- β -cetoésteres **31a** (A), **31b** (B) e **31c** (C) na biorredução com *Saccharomyces cerevisiae* empregando 50 mg dos substratos.

Em seguida, as reações foram realizadas em escala preparativa (200 mg) a fim de isolar e caracterizar os produtos obtidos. Foi observado que os rendimentos isolados se mostraram bem inferiores ao apontado pela conversão determinada por CG-EM (Tabela 11).

Tabela 11. Biorredução dos α -metileno- β -cetoésteres



Ar	Produto	Conversão (%)	Rend. (%) ¹	% Composição [e.e.%]	
				(2R,3S)-34	(2S,3S)-34
Ph	34a	98	79	17 [99] ²	83 [99] ²
<i>p</i> -Cl-Ph	34b	96	41	12 [99] ³	88 [99] ³
<i>p</i> -Br-Ph	34c	95	35	10 [99] ²	90 [99] ²

¹ Rendimento isolado; ² Determinado por CG/DIC com coluna quiral Hidrodex- β ; ³ Determinado por CG/DIC com coluna quiral Lipodex-E.

Dentre os α -metil- β -hidroxi-ésteres obtidos, somente o **34a** apresentou um bom rendimento, entretanto, boas razões *syn/anti* foram observadas para todos os produtos, com predominância do diastereoisômero *syn* sobre o *anti*, além de elevados excessos enantioméricos para ambos diastereoisômeros. Esse comportamento na redução de α -metileno- β -ceto-ésteres também já foi evidenciado anteriormente pelo nosso grupo.⁶² A preferência pelo diastereoisômero *syn* já foi observada para a redução de vários β -cetoésteres α -substituídos pelo fermento de pão⁶³.

⁶² Closoki, G. C.; Milagre, C. D. F.; Moran, P. J. S.; Rodrigues, J. A. R. *J. Mol. Cat. B: Enz.* **2007**, *48*, 70–76.

⁶³ Milagre, H. M. S., Milagre, C. D. F., Moran, P. J. S., Santana, M. H. A., Rodrigues, J. A. R. *Org. Proc. Res. Dev.* **2006**, *10*, 611.

Um modelo para predição da diastereosseletividade em reduções biocatalíticas de β -cetoésteres- α -substituídos por fermento de pão já foi mostrado por Faber⁶⁴ e comprova a preferência observada (Figura 24). O modelo indica que quão maior a diferença entre o tamanho do substituinte na posição α (pequeno) e o grupo COOMe (grande), maior a preferência pelo produto *syn*. Caso o substituinte α seja tão grande quanto o outro, essa preferência deixa de existir e, caso seja maior que o outro grupo, a preferência é invertida.

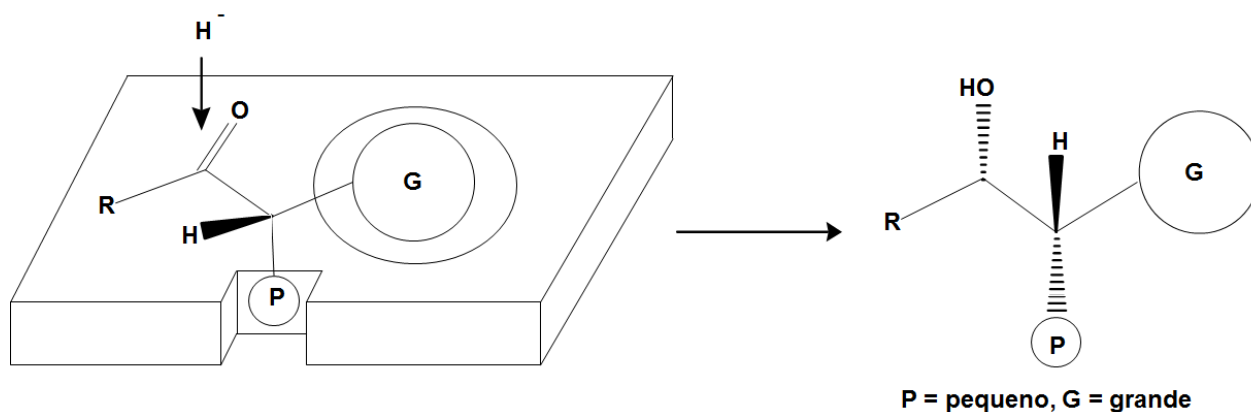


Figura 24. Representação do modelo para predição da diastereosseletividade em reduções de β -cetoésteres α -substituídos.

Com base nisso, foi proposto uma sequência reacional para a redução biocatalítica dos α -metileno- β -cetoésteres (Figura 25). Inicialmente, a redução da ligação C=C fornece os α -metil- β -cetoésteres com baixo *e.e.e*/ou estereoinversão da metila na posição α por conta de um tautomerismo ceto-enólico. Em seguida ocorre uma redução da ligação C=O pela face *re*, independente da configuração do centro quiral vizinho, com alto excesso enantiomérico, como já foi observado em reduções de cetonas aromáticas por fermento de pão⁶⁵.

⁶⁴ Faber, K. *Biotransformations in organic chemistry: a text book*. 2004, 5th Edition, Springer: New York, 454p.

⁶⁵ P.G. Dumanski, P. Florey, M. Knettig, A.J. Smallridge, M.A. Trehwella, *J. Mol. Catal. B: Enzym.* 2001, 11, 905.

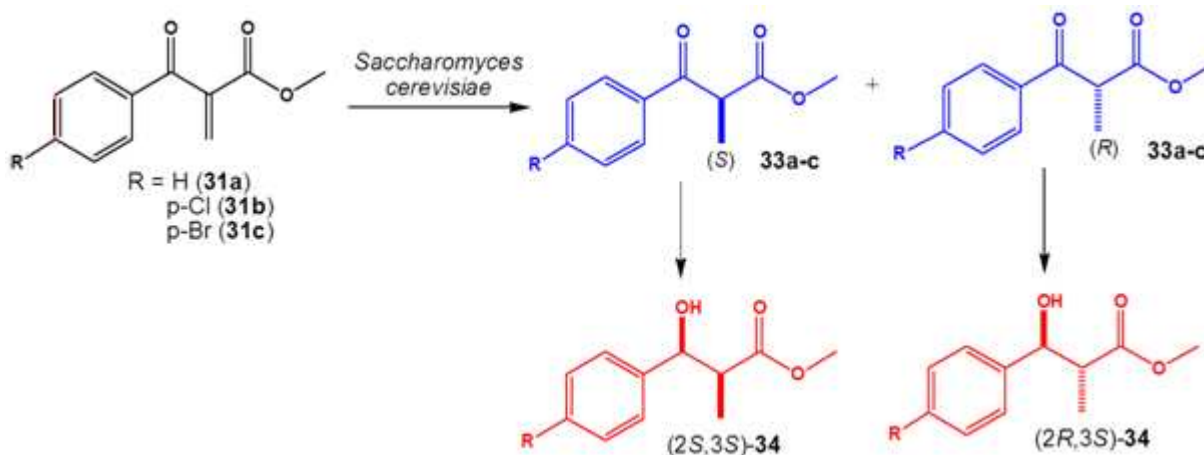


Figura 25. Mecanismo proposto para a seletividade na biorredução dos α -metileno- β -cetoésteres mediada por *Saccharomyces cerevisiae*.

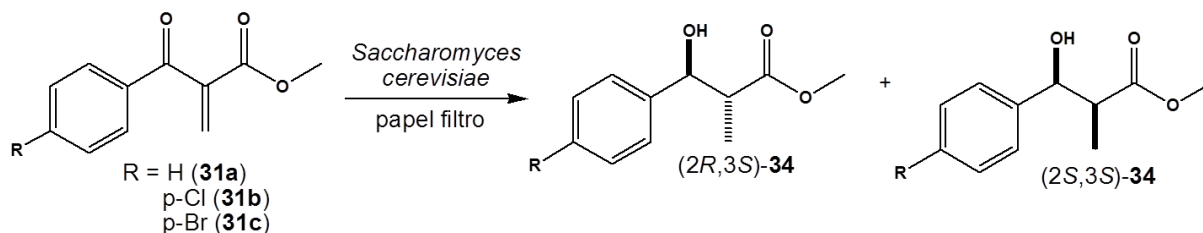
3.2.2 Emprego de suportes para os substratos

Apesar dos bons resultados para a seletividade da reação, os rendimentos se mostraram insatisfatórios para os substratos **31b** e **31c**. Sendo assim, foi avaliado o emprego da biocatálise extrativa, ferramenta que vem sendo utilizada tanto para contornar problemas de solubilidade como para contornar problemas de toxicidade do substrato ao biocatalisador,⁶⁶ por meio da redução da concentração do substrato no meio.

Diante dos resultados expostos na tabela 12, foi possível concluir que houve um decréscimo da conversão nos α -metil- β -hidroxi-ésteres além do aumento nos tempos de reação. Isso pode indicar que o substrato esteja fortemente adsorvido na resina e grande parte do mesmo não seja liberado para o meio reacional.

⁶⁶ a) Jin, J.; Li, H.; Zhang, J. *J. Appl Biochem Biotechnol.* **2010**, 162, 2075–2086; b) Erdélyi, B.; Szabó, A.; Birincsik, L.; Hoschke, A. *J. Mol. Cat. B: Enz.* **2004**, 29, 195–199.

Tabela 12. Redução dos α -metileno- β -cetoésteres por *Saccharomyces cerevisiae* com XAD7HP como suporte para o substrato.



Produto	m_r/m_s ¹	Conversão (%) ²	Tempo (h)	% Composição [e.e.%] ³	
				(2R,3S)-34	(2S,3S)-34
34a	4	75	38	12 [98]	88 [98]
34a	8	70	57	11 [>99]	89 [>99]
34a	12	59	72	8 [>99]	92 [>99]
34a	16	47	78	8 [>99]	92 [>99]
34a	20	41	90	7 [>99]	93 [>99]
34b	8	69	94	10 [99]	90 [99]
34c	10	61	89	9 [99]	91 [99]

¹ Massa de resina/massa de substrato; ² Determinado por CG-EM; ³ Determinado por CG/DIC com coluna quiral Hidrodex- β ou Lipodex-E.

Entretanto, a seletividade do processo mostrou bons resultados, tendo para o substrato **31a** melhorias significativas na razão *syn/anti* associadas ao aumento da relação massa de resina/ massa de substrato. O excesso enantiomérico dos diastereoisômeros, mesmo antes do uso da resina, foi de 99%, sendo assim, somente a relação *syn/anti* apresentou melhores resultados.

Sugere-se que a diminuição da concentração do substrato (e conseqüentemente do produto) dificulte a estereoinversão da metila α no intermediário α -metil- β -cetoéster e, após redução da cetona, passa a ter uma razão *syn/anti* ainda maior.

Para os produtos **31b** e **31c**, os excessos enantioméricos dos diastereoisômeros obtidos foram tão elevados quanto os apresentados por **31a** e, com relação à seletividade *syn/anti*, aqueles apresentaram bons resultados em suas condições otimizadas de m_r/m_s . Por meio da redução da concentração dos substratos no meio reacional, a enzima com menor K_m (Constante de Michaelis-Menten), dentre as enzimas

com especificidades opostas, é favorecida, considerando o meio reacional como um sistema multi-enzimático (células inteiras)⁶⁷.

Os baixos rendimentos obtidos com o emprego da resina como suporte para o substrato sugeriram a mudança para uma abordagem mais eficaz. Uma proposta abordada recentemente pelo nosso grupo passou a ser uma alternativa promissora. A ideia baseia-se no uso de papéis de filtro comuns como suporte para o substrato, que, diferente da resina, não atua como reservatório para o fornecimento do substrato e a extração *in situ* do produto formado, mas apenas como reservatório do substrato. A extração do produto pode ser feita comumente por meio de solventes orgânicos. Na figura 26 é mostrada uma representação da proposta para a biorredução com o papel filtro como suporte para o substrato.

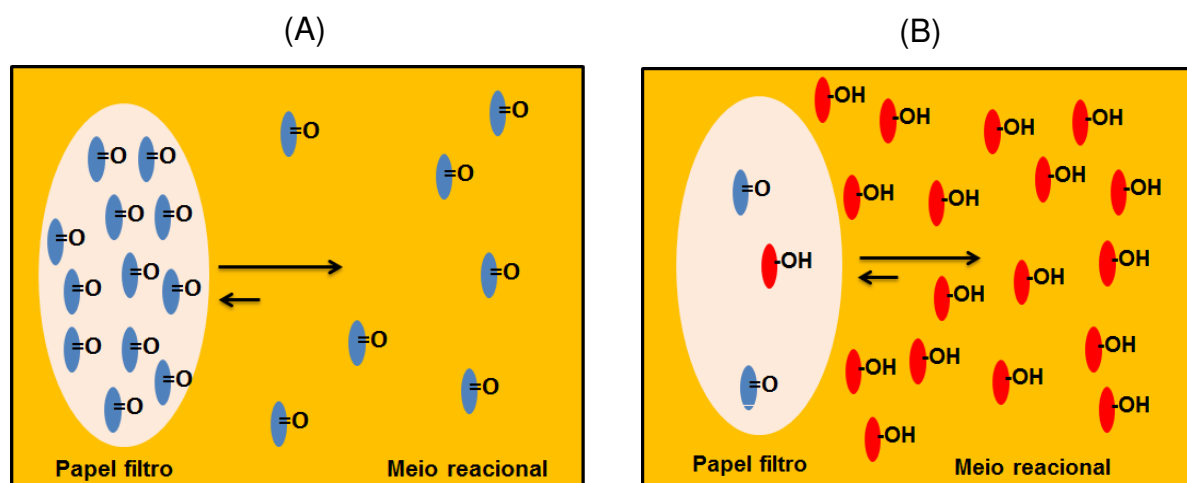
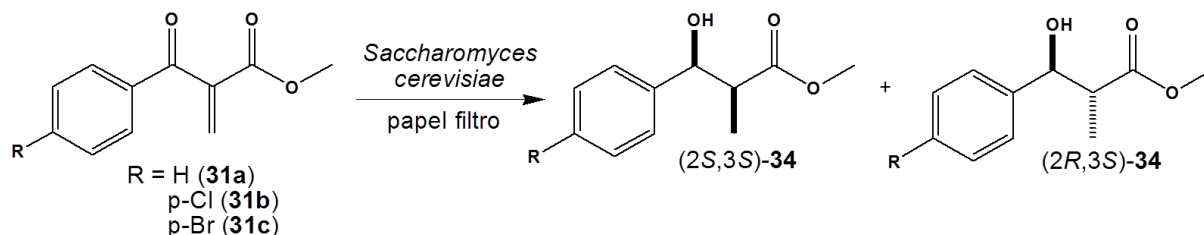


Figura 26. Representação esquemática demonstrando o meio reacional contendo o substrato adsorvido no papel de filtro (A) e após a formação do produto (B).

Dos substratos avaliados, somente o **31a** não demonstrou problemas de baixa solubilidade do respectivo substrato no meio reacional, visto que tanto o rendimento quanto a seletividade não foram afetados quando o papel filtro foi usado como suporte para o substrato (Tabela 13). Para o caso dos substratos **31b** e **31c**, o papel como suporte do substrato melhorou significativamente o rendimento, chegando a praticamente dobrar com o mesmo tempo de reação.

⁶⁷ Nakamura, K.; Kondo, S.; Nakajima, N.; Ohno, A. *Tetrahedron* **1995**, 51 (3), 687-694.

Tabela 13. Redução biocatalítica dos α -metileno- β -cetoésteres mediada por *Saccharomyces cerevisiae* com e sem papel de filtro como suporte para o substrato.



Ar (Produto)	Sem papel		Com papel	
	Rend (%) ¹	%Composição[e.e.%] (2R,3S)-34 (2S,3S)-34	Rend (%) ¹	%Composição[e.e.%] (2R,3S)-34 (2S,3S)-34
Ph (31a)	79	19,5 [99] ² 80,5 [99] ²	75	18 [99] ² 82 [99] ²
<i>p</i> -Cl-Ph (31b)	41	12 [99] ³ 88 [99] ³	70	14 [99] ³ 86 [99] ³
<i>p</i> -Br-Ph (31c)	35	10 [99] ³ 90 [99] ³	73	11 [99] ² 89 [99] ²

¹Rendimento isolado; ²Determinado por CG/DIC com coluna quiral Hidrodex- β ; ³ Determinado por CG/DIC com coluna quiral Lipodex-E.

A seletividade, entretanto, não apresentou nenhuma diferença em relação ao observado antes, possivelmente por não haver nenhuma alteração da concentração do substrato, como foi observado com o uso da resina XAD7HP.

Ao fim da reação a extração foi realizada empregando a resina XAD7HP, fazendo uso da adsorção para a remoção do produto do meio reacional, como já foi realizado por Patel⁶⁸ e colaboradores para obtenção biocatalítica de um retinóide. Após algumas horas sob agitação, a resina foi filtrada e extraída da forma convencional com solvente orgânico.

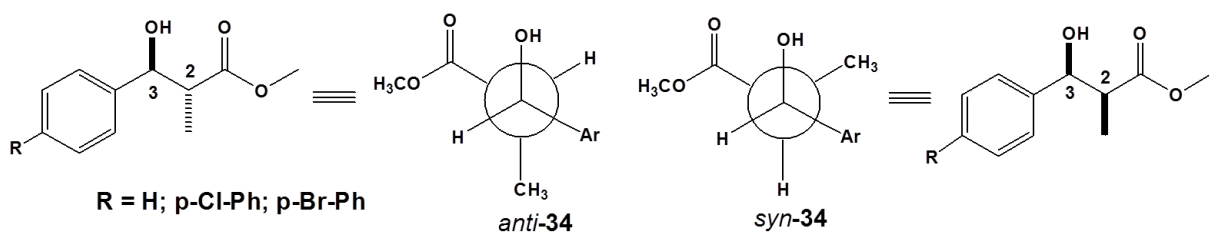
⁶⁸ Patel, R. N., Chu, L., Chidambaram, R., Zhu, J., Kant, J., *Tetrahedron: Asymmetry*, **2002**, *13*, 349–355.

3.3 Determinação da configuração relativa e absoluta dos produtos

A configuração relativa dos produtos foi determinada com base na análise dos deslocamentos químicos e constantes de acoplamento no espectro de RMN¹H em comparação com a literatura⁶⁹.

Não foi possível isolar os respectivos diastereoisômeros *anti* para caracterização, entretanto, a comparação dos valores de acoplamento e deslocamento químico do próton carbinólico para o diastereoisômero *syn* comprovam a configuração relativa dos mesmos (Tabela 14).

Tabela 14. Dados de RMN ¹H para os produtos **34a-c**.



(R)Produto	<i>anti</i>		<i>syn</i>	
	δ (ppm) H-3 [lit.]	$J^{\beta,2}$ (Hz) [lit.]	δ (ppm) H-3 [lit.]	$J^{\beta,2}$ (Hz) [lit.]
(H) 34a	N.D. [4,75]	N.D. [8,4]	5,13 [5,12]	4,2 [3,6]
(p-Cl-Ph) 34b	N.D. [4,73]	N.D. [8,4]	5,11[5,07]	3,6 [3,9]
(p-Br-Ph) 34c	N.D. [4,72] ¹	N.D. [7,4] ¹	5,10 [N.D.]	3,6 [N.D.]

¹ O produto a ser comparado apresenta o grupo COOEt ao invés do COOMe.

Valores de *J* baixos para o diastereoisômero *syn* em relação ao *anti* foram demonstrados também por Ferreira⁷⁰ em adutos aldol entre uma *N*-propionil-

⁶⁹ Para **34a**: Shiomi, T.; Ito, J.; Yamamoto, Y.; Nishiyama, H. *Eur. J. Org. Chem.* **2006**, 5594–5600. Para **34b**: a) Chuzel, O.; Descamp, J.; Chausteur, C.; Riant, O. *Org. Lett.*, **2006**, 8(26), 5943–5946. b) Sato, K.; Isoda, M.; Ohata, S.; Morita, S.; Tarui, A.; Omote, M.; Kumadaki, I.; Ando, A. *Adv. Synth. Catal.* **2012**, 354, 510 – 51. Para **34c**: Yamada, Y.; Nagata, T.; Sugi, K. D.; Yoroazu, K.; Ikeno, T.; Ohtsuka, Y.; Mukaiyama, T. *Chem. Eur. J.* **2003**, 9, 4485- 4509.

⁷⁰ Ferreira, M. A. B. Dissertação de Mestrado, UNICAMP, 2008.

oxazolidinona quiral e aldeídos aromáticos, uma vez que estes adutos se assemelham aos produtos estudados aqui (Figura 25).

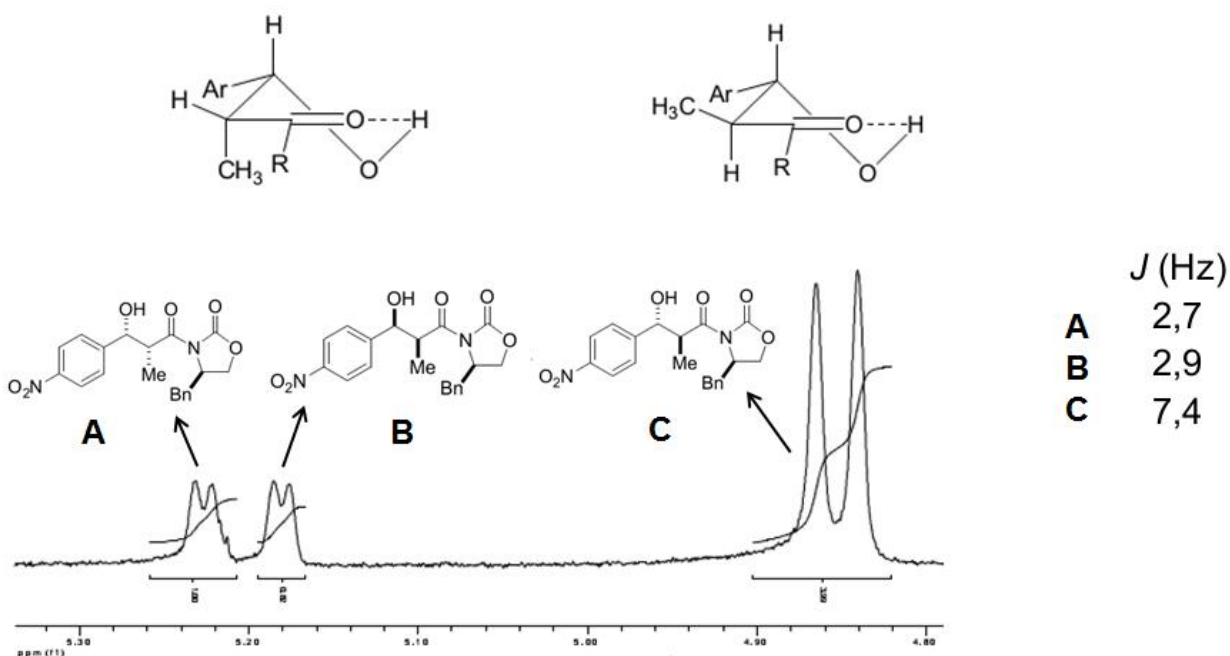


Figura 27. Valores de *J* (Hz) dos prótons carbinólicos para os adutos aldol observado por Ferreira, mostrando acoplamentos 1,2-*syn* (A e B) e 1,2-*anti* (C) (adaptado)⁷⁰.

A configuração absoluta dos produtos de biorredução foi avaliada pela comparação dos valores de rotação ótica com a literatura e, com base nas comparações, pode-se aferir a configuração (2*S*, 3*S*) para os produtos de biorredução obtidos (Tabela 15).

Tabela 15. Dados de rotação ótica dos produtos **34a-c**⁷¹.

Produto	α^{20}_D	α^{20}_D lit.	config.
34a	-19	-18,7	(2 <i>S</i> ,3 <i>S</i>)
34b	-12	-15,4	(2 <i>S</i> ,3 <i>S</i>)
34c	-11	-	-

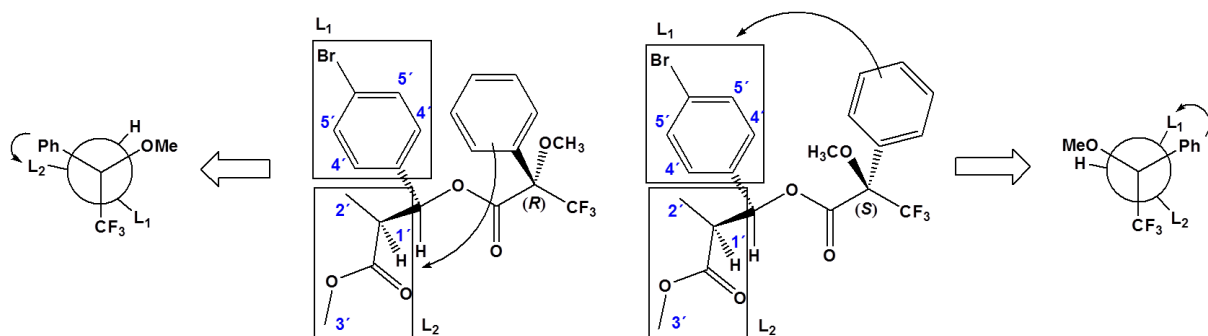
⁷¹ Para **34a**: Ramachandran, P. V., Pratihari, D. *Organic Lett.* **2009**, 11 (7), 1467; Para **34b**: Hitchcock, S. R., Davis, R. A., Richmond, D. M., Dore, D. D., Kuschel, S. L., Vaughn, J. F., Wolfe, J. A., Hamaker, C. G., Casper, D. M., Dingle, J. *J. Heteroc. Chem.* **2008**, 45 (5), 1265.

Para o α -metil- β -hidroxi-éster **34c** a configuração absoluta do centro estereogênico na posição β (HCOH) foi determinada por análise do espectro de RMN ^1H do produto de derivatização com um auxiliar quiral.

Uma das formas para a determinação da configuração absoluta por derivatização com auxiliar quiral, exige que o substrato quiral seja posto para reagir separadamente com os dois enantiômeros do auxiliar quiral (*S*) e (*R*), então, o espectro dos diastereoisômeros resultantes é comparado.

Sendo assim o α -metil- β -hidroxi-éster **34c** foi derivatizado com os dois enantiômeros do cloreto de α -metoxi- α -trifluorometil-fenilacila (MTPCI), também conhecido como cloreto de Mosher, e as atribuições dos sinais nos espectros de RMN ^1H mostraram claras diferenças nos deslocamentos químicos (Tabela 16).

Tabela16: Valores de deslocamentos químicos para os ésteres de (*S*) e (*R*) Mosher de **34c**.



H	Éster (<i>R</i>)-MTPA	Éster (<i>S</i>)-MTPA	$\Delta\delta\text{L}^{\text{RS}}$
H ₁	2,36	2,35	+0,01
H ₂	1,25	1,15	+0,1
H ₃	3,61	3,57	+0,04
H ₄	7,05	7,21	-0,16
H ₅	7,43	7,49	-0,06

Essa análise é baseada no efeito anisotrópico que o grupo fenila do MTPA exerce nos substituinte L₁ e L₂ do hidroxi-éster. Para esses casos, é assumido que a conformação mais representativa do éster de Mosher obtido apresente o grupo C(1')H, a carbonila e o grupo CF₃ no mesmo plano, assim os prótons do grupo L₁ são blindados pela fenila do éster do (*S*)-MTPA e os prótons do grupo L₂ são blindados pela fenila do éster (*R*)-MTPA.

A comparação destes dados com a literatura⁷² nos levou a atribuição da configuração absoluta do α -metil- β -hidroxi-éster **34c** como sendo (2*S*, 3*S*), a mesma observada para os demais produtos de biorredução.

⁷² a) Seco, J. M., Quiñoá, E., Riguera, R. *Tetrahedron: Asymmetry* **2001**, 12, 2915–2925; b) Dale, J.A., Mosher, H.S., *J. Am. Chem. Soc.* **1973**, 95, 512.

CONCLUSÕES

4. Conclusões

Dentre os procedimentos envolvidos para a obtenção dos α -metileno- β -ceto-ésteres, os melhores resultados foram obtidos por meio da oxidação de adutos de Morita-Baylis-Hillman empregando o IBX, que mostrou rendimentos excelentes, mesmo empregando o IBX proveniente da oxidação do IBA formado ao fim da reação.

A avaliação de diferentes microrganismos mostrou que o *Saccharomyces cerevisiae* liofilizado foi o melhor biocatalisador. Foram obtidos apenas os α -metil- β -hidroxi-ésteres como produto de biorredução, demonstrando ainda uma predominância do diastereoisômero *syn* sobre o *anti* em uma proporção de até 9:1, ambos com excessos enantioméricos de 99%. No âmbito de contornar os baixos rendimentos, o emprego da resina XAD7HP como suporte para o substrato mostrou amplificar as razões *syn/anti*, chegando à 14:1 para o α -metil- β -hidroxi-éster **31a**, entretanto, os rendimentos obtidos foram insatisfatórios.

Diferente da resina XAD7HP, o emprego do papel de filtro como suporte mostrou-se uma alternativa eficiente frente aos baixos rendimentos para os substratos **31b** e **31c**, chegando à 70 e 73%, respectivamente. Esses resultados comprovam a atuação do papel de filtro como um meio prático para fornecimento do substrato ao meio reacional.

A determinação da configuração absoluta de **34c** por RMN de ^1H empregando cloreto de Mosher (MTPCI) mostrou que o mesmo apresentou configuração (2*S*,3*S*).

PARTE EXPERIMENTAL

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 Advance (250 MHz para ^1H e para ^{13}C) e em um Varian INOVA 500 (500 MHz para ^1H e 250 MHz para ^{13}C). Os deslocamentos químicos (δ) do hidrogênio foram registrado em ppm, empregando o tetrametilsilano (TMS, $\delta=0,00$ para ^1H) como referência. Os deslocamentos químicos de ^{13}C foram registrados em ppm, empregando como referência o clorofórmio deuterado (CDCl_3 , $\delta = 77,00$).. As análises foram realizadas pesando-se de 15 a 30 mg da amostra em 0,5 mL de CDCl_3 .

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

As amostras foram analisadas em um cromatógrafo gasoso modelo GC/MS-QP5000 – Shimadzu acoplado à um detector de massas contendo uma fonte de ionização por impacto de elétrons com energia de ionização de 70 eV ou em um Agilent acoplado à um detector de massa HP5973, operando com uma fonte de ionização por impacto de elétrons também de 70 eV. O fluxo de He foi mantido à $0,9 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$, temperatura do injetor à $230 \text{ }^\circ\text{C}$ e detector à $280 \text{ }^\circ\text{C}$. Os métodos para separação dos produtos foram empregados como a seguir:

Método 1: 80°C por 3 min, ($30^\circ\text{C}/\text{min}$) a 290°C (3 min)

Método 2: 80°C por 3 min, ($25^\circ\text{C}/\text{min}$) a 290°C (3 min)

Método 3: 80°C por 3 min, ($20^\circ\text{C}/\text{min}$) a 290°C (3 min)

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

As análises em CG/DIC foram realizadas trem um modelo Agilent Technologies 6850, utilizando uma coluna capilar quiral Hidrodex- β (30 m x 0,25 mmx 0,25 μ m) ou uma Lipodex-E (28 m x 0,25 mm x 0,25 μ m). O cromatógrafo atuou com fluxo constante de H₂ de 1 mL.min⁻¹, temperatura do injetor de 200°C e do detector 220°C.

Os métodos empregados para a separação dos diastereoisômeros e enantiômeros foram:

A) Coluna Hidrodex- β

Método A3: 80°C (5°C/min), 180°C/10 min

Método A4: 80°C (1°C/min), 180°C/10 min

B) Coluna Lipodex-E

Método B5: 80°C (10°C/min)-100°C, 180°C (1°C/min)

5.1.4 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 F₂₅₄.

A revelação dos compostos nas placas foi realizado por meio de irradiação ultravioleta em um Spectroline modelo ENF-260C, com irradiação à 254 nm.

5.1.5 Espectroscopia no infravermelho

Os espectros de infravermelho foram obtidos em um Bomem MB-series FTIR-Hartmann & Braun Michelson, na reação de 400 a 4400 cm^{-1} , utilizando pastilhas de KBr e NaCl.

5.1.6 Rotação Ótica

Os valores de $[\alpha]_D^{25}$ foram medidos em um polarímetro 341 Pelkin Elmer, utilizando celas de 1 cm de caminho ótico.

5.1.7 Procedência de reagentes

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

5.1.8 Microrganismos

A cepa de *Sacharomyces cerevisiae* utilizada foi a classificada como tipo II e foi obtida comercialmente pela Sigma-Aldrich na forma liofilizada. Os demais microrganismos empregados para a biocatálise foram obtidos na Coleção de Culturas Tropicais (CCT, <http://www.cct.org.br>) da Fundação Tropical André Tosello, Parque Taquaral, Campinas, SP⁷³.

O crescimento dos microrganismos para as reações de biocatálise foi feito em meio YM (*Yeast Medium*) com 10,0 g de glicose, 3,0 g de extrato de levedura, 3,0 g de extrato de malte, 5,0 g de peptona bacteriológica e 1 L de água destilada. A esterilização dos meios foi feita em autoclave Quimis a 120°C e 1,0 Kg/cm^2 , por 15 minutos.

⁷³ Coleção de Culturas Tropical – Fundação Tropical de Pesquisa e Tecnologia “André Tosello” – Catálogo de Linhagens, 1996, 1ª edição, Campinas, SP, Brasil

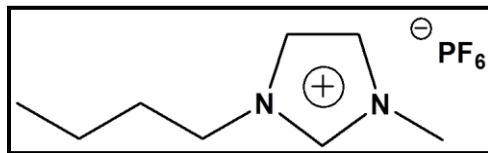
5.2 Preparo dos substratos

5.2.1 Reação de α -metilenação

Em um balão de duas bocas de 25 mL acoplado a um condensador foram primeiramente adicionados, sob atmosfera inerte, 5 mL de ácido acético glacial e 0,3 mmol de morfolina e 1 mmol do cetoéster. Em seguida foram adicionados 9 mmol de paraformaldeído e peneira molecular (4 Å) e então a mistura reacional foi aquecida e agitada. Uma vez observado o total consumo do material de partida por meio do acompanhamento da reação por CCD (AcOEt/Hex 3:7) foi adicionado à mistura reacional já na temperatura ambiente, uma solução saturada de NaHCO_3 e em seguida realizada a extração com volume igual de acetato de etila três vezes. As fases orgânicas obtidas foram lavadas com solução de NaCl saturada e secadas com MgSO_4 seguida pela evaporação de solvente a pressão reduzida³⁸.

5.2.2 Preparo do Líquido Iônico BMIM(PF_6) (Hexafluorofostato de 1-Butil-3-metilimidazólio)

Em um balão de 250 mL foram adicionados 470 mmol (109,9 g) de metanosulfonato de 1-butil-3-metilimidazólio, 493 mmol (90,7 g) de hexafluorofostato de potássio e 250 mL de água destilada, tal mistura foi agitada por 30 minutos. A fase aquosa foi separada e descartada e, ao líquido remanescente foram adicionados mais 23 mmol (4,3 g) de hexafluorofostato de potássio e 40 mL de água destilada. Foi mantida a agitação por mais 15 minutos e então 250 mL de diclorometano foram adicionados. A fase orgânica foi separada e secada com Na_2CO_3 e filtrada em uma coluna de 30 cm de alumina básica ativada. Ao fim de todo o processo o solvente foi evaporado a pressão reduzida, gerando o hexafluorofostato de 1-butil-3-metilimidazólio sendo um líquido incolor⁴².

*Hexafluorofosfato de 1-Butil-3-metilimidazólio*⁴³

F.M. C₈H₁₆PF₆; **M.M.** 284,97 g.mol⁻¹; óleo amarelo; **RMN** ¹H (CDCl₃ 250 MHz) δ 8,35 (s, 2H), 7,3 (d, J=7,5 Hz, 2H), 4,1 (t, J=7,25 Hz, 2H), 3,83 (s, 3H), 1,79 (q, J=7,5 Hz, 2H), 1,28 (m, J=7,5, 2H), 0,85 (t, J=7,25 Hz, 3H).

5.2.3 Reação de α-metilação em líquido iônico

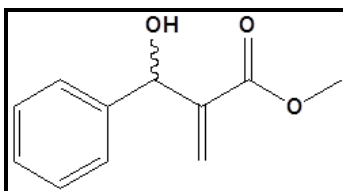
Em um balão de 25 mL foram adicionados 1 mL do líquido iônico BMIM(PF₆), 0,3 mmol de morfolina, 1 mmol de ácido acético glacial, 5 mmol de paraformaldeído e as peneiras moleculares (4Å). A agitação foi mantida constante e sob temperatura ambiente por 15 minutos e então foi adicionado 1mmol de cetoéster ao meio reacional. Acompanhamento da reação foi feito por CCD (Hex/AcOEt 7:3) e GC/MS, sendo que para o último foi necessário uma filtragem da amostra em uma coluna curta de sílica para tornar possível a análise da amostra.

Após a detecção do fim da reação foi adicionado uma solução saturada de NaHCO₃ e a extração foi realizada repetidas vezes com éter isopropílico. As fases orgânicas obtidas foram secadas com MgSO₄ anidro e o solvente foi evaporado a pressão reduzida. O líquido iônico foi recuperado do meio reacional com repetidas extrações com acetato de etila e purificado por meio de filtração em coluna de alumina básica devidamente ativada, finalizando com a evaporação do acetato de etila sob pressão reduzida⁴¹.

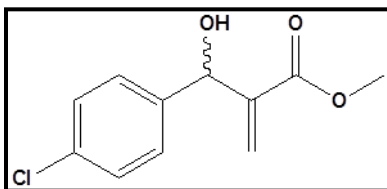
5.2.4 Reação de Morita-Bayllis-Hillman

Em um balão foram adicionados, 50 mmol (4,5 mL) de acrilato de metila, 0,65 eq. (3,64 g) de DABCO ([2,2,2]-Diazabiclicooctano) e por fim, 10 mmol do aldeído. A agitação foi mantida constante à temperatura ambiente. Quando realizada em banho ultrassom, a temperatura do banho foi mantida a 30-40°C durante a reação. A reação foi monitorada por CCD usando solução de vanilina ou 2,4-dinitrofenilhidrazina como revelador para os aldeídos alifáticos e luz UV (254 nm) para dos demais. Uma vez observados o consumo total do aldeído, o excesso de acrilato de metila foi evaporada à pressão reduzida, adicionado 20 mL de solução saturada de NaCl e a extração foi realizada com volume igual de acetato de etila (3 vezes). A fase orgânica foi seca com Na₂SO₄ anidro e o solvente foi evaporado à pressão reduzida⁴⁸.

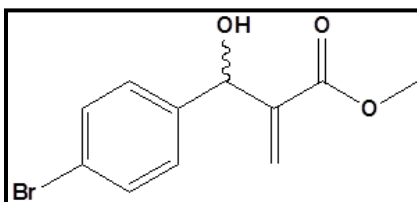
30a (*±*)-acrilato de metil-2-[hidroxi(fenil)metil]⁴⁶



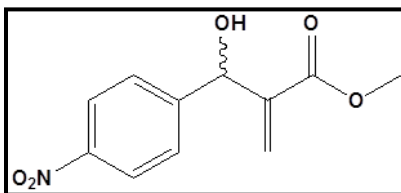
F.M. C₁₁H₁₂O₃; **M.M.** 192 g.mol⁻¹; óleo incolor; **IV**($\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$): 3449, 3089, 3004, 2952, 1721, 1630, 1588, 1493, 1453, 1159, 179, 959; **RMN** ¹H (CDCl₃ 250 MHz) δ 7.4 – 7.2 (m, 5H, aromático), 6.33 (s,1H), 5.83 (s, 1H), 5.55 (s, 1H), 3.71 (s, 3H), 3.14 (br s, 1H, trocável com D₂O); **¹³C RMN (62,5 MHz, CDCl₃)** δ 166.9, 142.1, 141.4, 128.5, 127.9, 126.7, 126.1, 73.2, 51.9; **E.M. (70 eV, m/z, %)** 192 (M⁺, 34), 191 (30), 160 (30), 159(12), 132 (56), 115 (32), 105 (100), 91 (10), 79 (40), 77 (50),55 (28).

30b (\pm)-acrilato de metil--2-[hidroxi(4-clorofenil)metil]⁴⁶

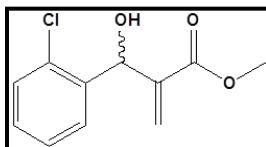
F. M. C₁₁H₁₁ClO₃; **M.M.** 226,5 g.mol⁻¹; sólido incolor; **P.F.** 44,1-46,4°C; **IV** ($\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$): 3444, 3000, 2953, 1715, 1630, 1090, 844; **RMN ¹H (250 MHz, CDCl₃)** δ 7,32 (s, 4H), 6,35 (s, 1H), 5,84 (s, 1H), 5,53 (d, 1H, J=2,75 Hz), 3,73 (s, 3H), 3,18 (d, 1H, J=2,75 Hz); **RMN ¹³C (250 MHz, CDCl₃)**: δ 167, 142, 140, 133, 128,5, 127,9, 126,3, 72,6, 52; **E.M. (70 eV, m/z, %)**: 228 (4), 226 (M⁺, 12), 194 (14), 166 (43), 149 (10), 139 (100), 115 (26), 77 (66), 55 (24).

30c (\pm)-acrilato de metil-2-[hidroxi(4-bromofenil)metil]^{56a}

F.M. C₁₁H₁₁BrO₃; **M.M.** 270,9 g.mol⁻¹; sólido branco; **P.F.** 64,5-65,6°C; **IV** ($\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$): 3342, 2958, 1717, 1636, 1071, 844; **¹H RMN (250 MHz, CDCl₃)** δ 7,35 (4H, dd, J¹ = 10 Hz, J² = 7,5 Hz), 6,3 (1H, s), 5,8 (1H, s), 5,5 (1H, d, J = 5 Hz), 3,7 (3H, s) 3,14 (1H, d, J = 5,75 Hz); **¹³C RMN (250 MHz, CDCl₃)**: δ 166,6, 141,5, 140,3, 131,5, 128,3, 126,4, 121,7, 72,7, 52; **E.M. (70 eV, m/z, %)**: 270 (M⁺, 15), 238 (12), 210 (43), 183 (86), 157 (27), 131 (22), 115 (40), 77 (100), 51 (30).

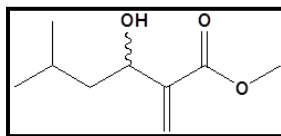
30d (\pm)-acrilato de metil-2-[hidroxi(4-nitrofenil)metil]⁴⁶

F.M. $C_{11}H_{11}O_5N$; **M.M.** $237\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$; sólido amarelo; **P.F.** $72\text{-}73^\circ\text{C}$; **IV** ($\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$) 13512, 2992, 1724, 1634; **$^1\text{H NMR}$ (250 MHz, CDCl_3)**: δ 8.71 (d, $J=8.79$ Hz, 2H, aromáticos), 7.56 (d, $J=8.79$ Hz, 2H, aromáticos), 6.40 (s, 1H), 5.89 (s, 1H), 5.64 (d, $J=5.86$ Hz, 1H), 3.75 (s, 3H), 3.40 (d, $J=6.34$ Hz, 1H, trocável com D_2O); **$^{13}\text{C NMR}$ (62,5 MHz, CDCl_3)** δ 166,6, 148,7, 147,6, 141,1, 127,48, 127,4, 123,7, 72,8, 72,7, 61,3, 52,2; **E.M. (70 eV, m/z, %)** 237 (M^+ , 20), 220 (58), 205 (40), 177(90), 155 (100), 131 (22), 115 (30), 104 (25), 77 (73), 55(80).

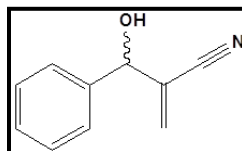
30e (\pm)-acrilato de metil-2-[hidroxi(2-clorofenil)metil]⁷⁴

F. M. $C_{11}H_{11}ClO_3$; **M.M.** $226,5\text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$; óleo incolor; **IV** ($\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$): 3435, 3067, 2999, 1723, 1596, 1439, 697, 758; **$^1\text{H RMN}$ (250 MHz, CDCl_3)** δ 7,55 (1H, dd, $J^1=2$ Hz, $J^2=7,6$ Hz), 7,3 (3H, m), 6,33 (H, s), 5,97 (1H, d, $J=4,8$ Hz), 5,57 (1H, s), 3,77 (3H, s), 3,31 (1H, d, $J=4,8$ Hz); **$^{13}\text{C RMN}$ (250 MHz, CDCl_3)** δ 166,7, 140,6, 138,2, 132,6, 129,2, 128,7, 127,9, 126,8, 126,7, 68,7, 51,9; **EM (70 eV, m/z, %)**: 226 (M^+ , 13), 225 (39), 159 (25), 139 (65), 115 (19), 105 (11), 87 (11), 77 (46), 55 (15).

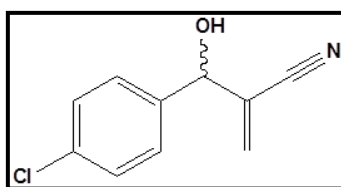
⁷⁴ Maher, D. J., Connon, S. J., *Tetrahedron Letters* **2004**, 45, 1301–1305.

30f (\pm)-3-hidroxi-2-metileno-5-metil-hexanoato de metila ⁷⁵

F.M. C₉H₁₆O₃; **M.M.** 172 g.mol⁻¹; óleo incolor; **IV** ($\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$): 3377, 2957, 2934, 1721, 1630, 1294, 1050, 881; **¹H RMN (250 MHz, CDCl₃)** δ 6,21 (s, 1H), 5,80 (s, 1H), 4,46 (d, J=3,5 Hz, 1H), 3,78 (s, 3H), 2,48 (d, J=6,25 Hz, 1H), 1,79 (m, 1H), 1,58 (m, 1H), 1,43 (m, 1H), 0,96 (d, J=2,75 Hz, 3H), 0,93 (d, J=2,75 Hz, 3H); **EM (70 eV, m/z, %)** 172 (M⁺, 1), 171 (1), 157 (2), 141 (3), 130 (9), 115 (100), 83 (65), 55 (14).

30h (\pm)-acrilonitrilil-2-[hidroxi(fenil)metil] ⁷⁶

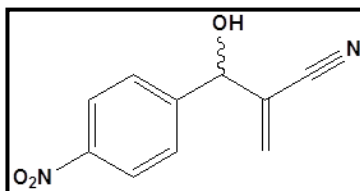
F.M. C₁₀H₉ON; **M.M.** 117 g.mol⁻¹; óleo incolor; **IV** ($\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$): 3424,3065, 2886, 2229, 1622, 1494, 1049, 847; **¹H RMN (250 MHz, CDCl₃)** δ 7,38 (5H, m), 6,1 (2H, dd, J¹ = 1,25 Hz, J² = 18,75 Hz), 5,28 (1H, d, J = 3,5 Hz); **¹³C RMN**: 139, 129,88, 128,9, 126,5, 126,2, 116,9, 74. **EM (70 eV, m/z, %)**: 159 (M⁺, 21), 130 (9), 107 (100), 79 (73), 51 (28), 40 (10).

30i (\pm)-2-[hidroxi(4-clorofenil)metil]-acrilonitrila ⁷³

F.M. C₁₀H₈ONCl; **M.M.** 141,5 g.mol⁻¹; óleo incolor; **IV** ($\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$): 3426, 2885, 2230, 1597, 1090; **¹H RMN (250 MHz, CDCl₃)** δ 7,35 (4H, d, J¹ = 5 Hz, J² = 7,5 Hz), 6,06 (2H, d, J = 16 Hz), 5,27 (1H, d, 2,5 Hz), 2,73 (1H, d, J = 4 Hz); **¹³C RMN**: 74,0, 117, 126,1, 126,5, 128,8, 130,0, 139,1. ;**EM (70 eV, m/z, %)**: 193 (M⁺, 15), 158 (6), 141 (100), 113 (22), 105 (9), 77 (69), 51 (13).

⁷⁵ Iwabuchi, Y., Nakatani, M., Yokoyama, N., Hatekeyama, S. *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 10219-10220.

⁷⁶ Júnior, C. G. L., Silva, F. P. L., Oliveira, R. G., Subrinho, F. L., Andrade, N. G., Vasconcellos, M. L. A. *A. J. Braz. Chem. Soc.* **2011**, *22*, (11), 1-31.

30j, (\pm)-2-[hidroxi(4-nitrofenil)metil]-acrilonitrila ⁷³

F.M. C₁₀H₈O₃N₂; **M.M.** 192 g.mol⁻¹; sólido amarelo claro; **P.F.** 73,3-74,5°C; **IV** ($\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$): 3482, 3108, 3072, 2907, 2228, 1654, 1508; **¹H RMN (250 MHz, CDCl₃)** δ 8,25 (2H, d, J = 9 Hz), 7,6 (2H, d, J = 8,75 Hz), 6,14 (2H, d, 20 Hz), 5,45 (1H, s), 2,8 (1H, s); **¹³C RMN:** 148, 145,9, 130,9, 127, 125, 124, 116, 73; **EM (70 eV, m/z, %):** 204 (M⁺, 6), 187 (3), 175 (3), 152 (100), 140 (8), 124 (6), 105 (12), 94 (9), 77 (19).

5.2.5 Oxidação aeróbica dos adutos de MBH com sistema TEMPO/Fe(NO₃)₃

Em um balão de duas bocas devidamente seco foi adicionado 0,05 mmol de Fe(NO₃)₃·9(H₂O), 0,1 mmol (21,3 mg) de TEMPO (*N*-óxido de tetrametilpiperidina), 0,1 mmol de NaCl e 4 mL de diclorometano anidro. A mistura reacional foi agitada durante 5 minutos sob atmosfera de O₂ até a saturação do meio. Então foi adicionado uma solução de 1mmol do aduto de Morita-Baylis-Hillman em 1 mL de diclorometano também anidro e a mistura foi mantida sob agitação constante a temperatura ambiente com oxigênio proveniente de um balão. O oxigênio também foi devidamente seco, para isso um sistema em U recheado com sílica azul e drierite ativadas foi utilizada. O acompanhamento da reação foi feito por CCD (Éter de petróleo/AcOEt 10:1) ou por GC/MS. A extração foi feita diluindo a mistura reacional em 30 mL de éter etílico e em seguida foi adicionado MgSO₄ para secagem. Por fim foi realizada uma filtração em uma coluna curta de sílica para remoção dos íons. ⁵²

5.2.6 Oxidação aeróbica dos adutos de MBH com 2,3-dicloro-5,6-diciano-1,4-benzoquinona (DDQ) e nitrito de sódio

DDQ (2,3 mg, 0.01 mmol) foi dissolvido em 5 mL de CH_2Cl_2 e 0,5 mL de ácido acético em um balão de 50 mL. A solução foi agitada sob temperatura ambiente, então foi adicionado o aduto (1 mmol), seguido NaNO_2 (6,9 mg, 0,1 mmol). A solução foi agitada sob atmosfera de oxigênio molecular proveniente de um balão por 2 horas. Ao fim do tempo, a reação foi filtrada em uma coluna curta de sílica e o produto foi eluído com CH_2Cl_2 . O solvente foi concentrado sob vácuo e o produto foi purificado por coluna cromatográfica⁵⁵.

5.2.7 Procedimento de Oxidação por ácido 2-iodoxibenzóico (IBX)

O ácido 2-iodoxibanzóico (IBX) foi preparado adicionando 20 mmol de ácido 2-iodobenzóico (4,96 g) em uma solução de Oxone[®] em água deionizada (60 mmol, 18,44 g em 200 mL) em um balão de 0,5 L. A reação foi agitada vigorosamente, inicialmente à 70°C por 1 hora, até que o meio reacional fique claro e, somente depois, a reação foi resfriada à 0°C e agitada levemente por mais 30 minutos⁵⁹.

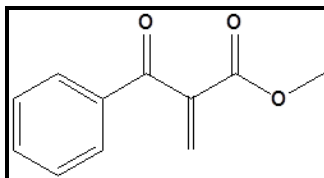
Ao término da reação, os sais foram filtrados em um filtro de vidro sinterizado e lavados repetidamente com água (6x100 mL), acetona (2x100 mL) e deixados para secar por 16 horas. A água mãe e a água de lavagem foram tratadas antes de serem descartadas com Na_3SO_3 e neutralizada com uma solução de NaOH 1M.

Uma vez obtido o IBX, uma solução 0,14 mol.L⁻¹ do aduto de Baylis-Hillman em acetonitrila foi preparada em um balão de duas bocas, em seguida, 1,5 eq. (418,35 g) de IBX foram adicionados à essa solução e logo em seguida essa mistura foi agitada à 70°C sob refluxo até total consumo do aduto. A reação foi acompanhada por CCD (hexano/AcOEt 8:2).

Ao fim da reação a mistura foi resfriada à temperatura ambiente, filtrada para recuperação do ácido 2-iodosilbenzóico (IBA) e o solvente evaporado, obtendo exclusivamente o produto de oxidação.

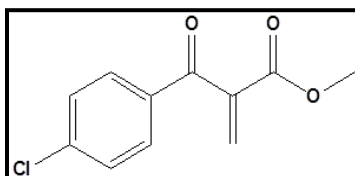
O ácido 2-iodosilbenzóico (IBA) obtido ao fim da reação como o agente oxidante na sua forma mais reduzida, foi reoxidado empregando a mesma metodologia usada para preparar o IBX substituindo o ácido 2-iodobenzóico pelo mesmo ácido 2-iodosilbenzóico.

31a - 2-(benzoil)-prop-2-enoato ^{56a}

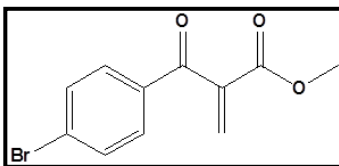


F.M. C₁₁H₁₀O₃; **M.M.** 190 g.mol⁻¹; óleo amarelo; **IV** ($\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$): 6063, 2954, 1729, 1665, 1438, 1075, 866; **¹H RMN (250 MHz, CDCl₃)** δ 7,85 (2H, d, J=1,5 Hz), 7,59 (1H, t, J=7,5 Hz), 7,47 (2H, t, 7,75 Hz), 6,7 (1H, s), 6,05 (1H, s), 3,76 (3H, s); **¹³C RMN (72,5 Hz, CDCl₃)**: δ 193, 164,8, 140,9, 136, 133, 131, 129, 128, 52. **EM (70 eV, m/z, %)**: 190 (M⁺, 6), 175 (3), 159 (3), 130 (4), 105 (100), 77 (51), 51 (19).

31b - 2-[(4-clorofenil)carbonil]-prop-2-enoato de metila



F.M. C₁₁H₉O₃Cl; **M.M.** 224,5 g.mol⁻¹; óleo amarelo claro; **IV** ($\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$): 3094, 2954, 1731, 1674, 1091; **¹H RMN (500 MHz, CDCl₃)** δ 7,82 (2H, d, J=8,5 Hz), 7,47 (2H, d, J=10 Hz), 6,7 (1H, s), 6,1 (1H, s), 3,79 (3H, s); **¹³C RMN (500 MHz, CDCl₃)**: δ 191,88, 164,5, 140,6, 140,3, 134,5, 131,9, 130,8, 129, 52; **EM (70 eV, m/z, %)**: 224 (M⁺, 7), 226 (2), 209 (2), 193 (2), 164 (2), 139 (100), 141 (33), 111 (34), 105 (1), 75 (20), 50 (7).

31c - 2-[(4-bromofenil)carbonil]-prop-2-enoato de metila ^{56a}

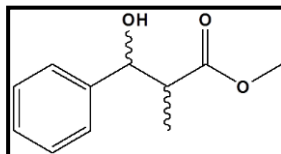
F.M. C₁₁H₉O₃Br; **M.M.** 268,9 g.mol⁻¹; óleo amarelo claro; **IV**($\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$): 3091, 2953, 1731, 1674, 1069, 774; **¹H RMN (250 MHz, CDCl₃)**: δ 7,73 (2H, d, J=8,5 Hz), 7,6 (2H, d, J=8,75 Hz), 6,72 (1H, s), 6,07 (1H, s), 3,77 (3H, s); **¹³C RMN (150 MHz, CDCl₃)**: δ 192, 164,5, 140,6, 134,9, 132, 130, 129, 52.; **EM (70 eV, m/z, %)**: 270 (M+2), 268 (M⁺, 12), 237 (2), 208 (2), 183 (100), 185 (96), 155 (34), 104 (5), 76 (30), 50 (18).

5.2.8 Preparo dos padrões

5.2.8.1 Procedimento geral para hidrogenação catalítica com Pd/C

Em uma solução de 0,5 mmol substrato em 2 mL de acetato de etila, foram adicionado 10% (m/m) de paládio em carvão ativado (10% de Pd). Em seguida, o balão contendo a mistura resultante foi purgado com N₂ através de um septo, para remover toda a umidade do meio reacional, para então, introduzir 1 atm de hidrogênio com uma seringa tendo um balão acoplado.

(±)-3-hidroxi-3-fenil-2-metil-propanoato de metila



F.M. C₁₁H₁₄O₃; **M.M.** 194 g.mol⁻¹; óleo incolor; **IV**($\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$): 3467, 3063, 2989, 1719, 1603, 1453, 1034, 859; **¹H RMN (250 MHz, CDCl₃)**: δ 7,3 (5H, m), 5,1 (1H, d, J=3,5 Hz), 4,75 (1H, d, J= 8,75 Hz), 3,73 (3H, s), 2,96 (1H, m), 2,82 (1H, m), 1,13 (3H, d, J=7,25 Hz), 1,1 (3H, d, J=7,25 Hz); **¹³C RMN (150 MHz, CDCl₃)**: 176, 141,5, 141,3, 128,5,

128,24, 128,09, 127,49, 126,66, 125, 93, 73,6, 51,9, 51,8, 47,1, 46,4, 14,4, 10,7; **E.M.** (70 eV, m/z, %): 194 (4), 163 (2), 177 (5), 107 (77), 105 (79), 88 (100), 79 (57), 57 (29).

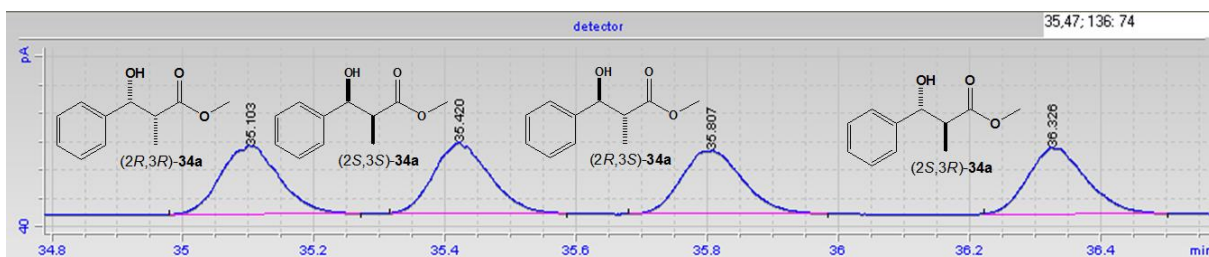
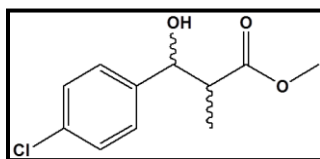


Figura 28. Cromatograma do padrão (±)-**34a** obtido por CG-DIC com coluna quiral.

(±)-3-hidroxi-3-(4-clorofenil)-2-metil-propanoato de metila



F.M. C₁₁H₁₃O₃Cl; **M.M.** 228,5 g.mol⁻¹; óleo incolor; **IV**($\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$): 3446, 3029, 2982, 1908, 1731, 1598, 1462, 1089, 827; **¹H RMN (250 MHz, CDCl₃)**: 7,54 (4H, m), 5,1 (1H, s), 4,75 (1H, d, $J = 5,25$ Hz), 3,75 (3H, s), 3,15 (1H, m), 2,78 (1H, m), 1,1 (3H, d, $J = 4,5$ Hz), 1,04 (3H, d, $J = 4,5$ Hz); **¹³C RMN (125 MHz, CDCl₃)**: 140, 139,8, 133,8, 133,2, 128,7, 128,4, 128, 127,4, 77,3, 77, 76,8, 75,6, 72,9, 52, 47, 46, 14,4; **EM (70 eV, m/z, %)**: 228 (M⁺, 1), 155 (1), 141 (49), 139 (22), 111 (12), 88 (74), 77 (36), 57 (20), 57 (20), 44 (100).

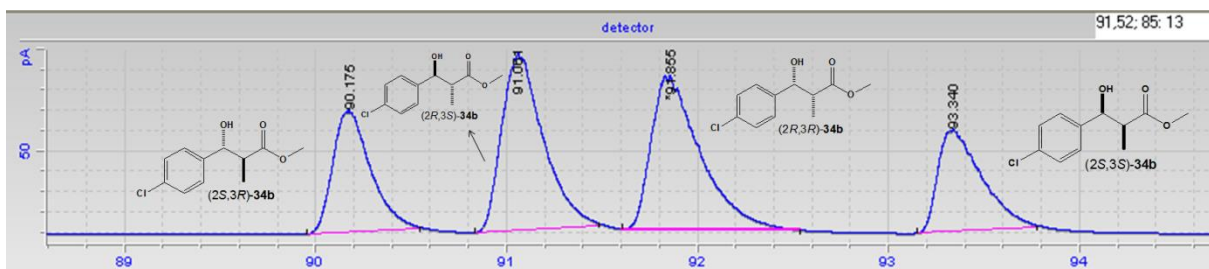
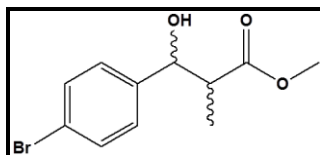


Figura 29. Cromatograma do padrão (±)-**34b** obtido por CG-DIC com coluna quiral.

(±)-3-hidroxi-3-(4-bromofenil)-2-metil-propanoato de metila



F.M. C₁₁H₁₃O₃Br; **M.M.** 272,9 g.mol⁻¹; óleo incolor; **IV**($\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$): 3476, 2985, 1908, 1731, 1592, 1488, 1071, 811; **¹H RMN (250 MHz, CDCl₃)**: 7,32 (2H, d, $J=8,4$ Hz), 7,25 (2H, d, $J=8,4$ Hz), 5,1 (1H, s), 3,73 (3H, s), 3,1 (1H, m), 2,78 (1H, m), 1,13 (3H, d, $J=7,2$ Hz); **¹³C RMN (125 MHz, CDCl₃)**: 140,3, 131,4, 127,7, 121,4, 77,3, 77, 76,8, 52, 46, 10,5; **E.M. (70 eV, m/z, %)**: 272 (M⁺, 4,8), 241 (1), 185 (48), 157 (16), 115 (8), 105 (5), 88 (100), 77 (37). Tempos de retenção obtidos conforme mostrado na figura 28.

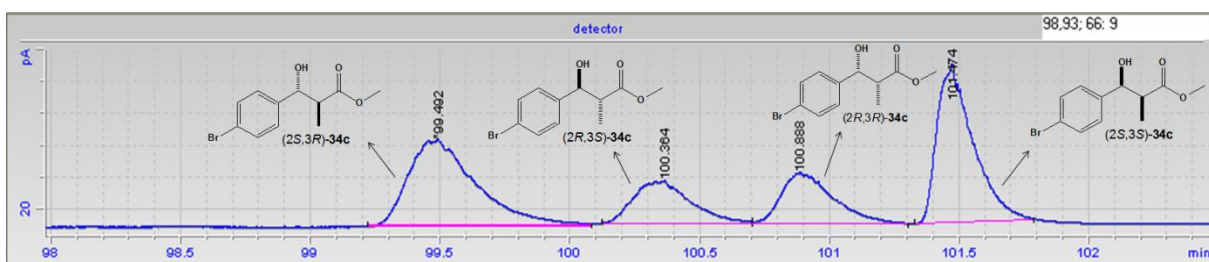


Figura 30. Cromatograma do padrão (±)-34c obtido por CG-DIC com coluna quiral.

5.3 Cultivo dos microrganismos em meio YMA (*Yeast extract-malt extract/agar*)

O cultivo das linhagens *Pichia stiptis* CCT 2617, *Rhodotorula glutinis* CCT 2182 e *Pichia kluyveri* CCT 3365 foi feito utilizando um caldo nutriente YM (*Yeast extract-malt extract*) da Merk, próprio para o crescimento de leveduras. O preparo foi realizado empregando 3 g de extrato de levedura, 3 g de extrato de malte, 5 g de peptona da marca Merck, 10 g de glicose e 20 g de ágar. O volume final foi completado para 1 L de água destilada seguido da esterilização por meio de autoclavagem à 121°C por 15 minutos e, passado esse tempo, o meio foi transferido assepticamente para placas de Petri em uma capela de fluxo laminar. Após a solidificação do meio ser atingido na

temperatura ambiente, o microrganismo foi inoculado com o auxílio de uma alça de platina.

5.4 Cultivo dos microrganismos em meio YM (*Yeast extract-malt extract*)

O cultivo das leveduras *Pichia stiptis* CCT 2617, *Rhodotorula glutinis* CCT 2182 e *Pichia kluyveri* CCT 3365 foi realizado empregando caldo YM (*Yeast extract-Malt extract*). O preparo foi realizado empregando 3 g de extrato de levedura, 3 g de extrato de malte, 5 g de peptona da marca Merck, 10 g de glicose e o volume final foi completado com 1 L de água destilada. A esterilização foi feita por meio de autoclavagem à 121°C por 15 minutos.

5.5 Procedimento para Biorredução

5.5.1 Biorredução com células liofilizadas de *Saccharomyces cerevisiae*

Em um frasco Erlenmeyer de 125 mL foi adicionado 2g de células liofilizada de *Saccharomyces cerevisiae* Tipo II (Sigma-Aldrich®) e 50 mL de água destilada previamente aquecida à 45°C. O meio recém preparado foi então pré-incubado à 180 rpm e 30°C por 30-45 minutos, e, decorrido esse tempo, 50 mg do substrato dissolvido em 1 mL de etanol foi adicionado ao meio reacional pré-encubado. Para as reações em escala maior (200 mg), foram empregados frasco Erlenmeyers de 500 mL e 200 mL de água destilada. Ao observar o completo consumo do substrato a reação foi extraída com volume igual de acetato de etila (3 vezes), a fase orgânica foi seca com Na₂SO₄ e o solvente evaporado sob pressão reduzida seguido de purificação por coluna cromatográfica (Hexano/AcOEt).

O acompanhamento foi feito por meio da retirada de alíquotas periódicas, seguidas de extração e análise em CG/EM para determinação da conversão e em GC/FID com coluna quiral para determinação dos excessos enantioméricos e razões *syn/anti*.

5.5.2 Biorredução com células crescidas de *Pichia stiptis*, *Rhodotorula glutinis* e *Pichia kluyveri*

Os microrganismos, previamente estocados em placas de Petri com meio YMA (*Yeast Malt Agar*), foram repicados assepticamente para um frasco Erlenmeyer com 200 mL de meio YM estéril, onde foram crescidos por 24-48 horas. Passado esse tempo a biotransformação foi feita empregando 100 mL do caldo final obtido, com adição de 50 mg do substrato dissolvido em 0,5 mL de etanol à 180 rpm e 28°C em um agitador orbital. Ao final da reação o meio reacional foi extraído (3 vezes) com volume igual de acetato de etila, a fase orgânica é seca com Na₂SO₄ anidro e o solvente foi evaporado à pressão reduzida.

5.5.3 Biorredução empregando XAD7HP como suporte para o substrato

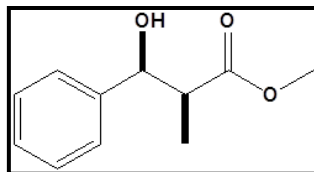
A resina foi adicionada em uma solução de 50 mg do substrato em 2 mL de éter seguida da evaporação do solvente. O substrato adsorvido na resina foi então transferido para o meio reacional preparado como mostrado no item 5.5.1. A reação foi acompanhada empregando um frasco Erlenmeyer de 50 mL de reação por alíquota, realizando a extração do meio com solvente orgânico seguido de análise em CG-EM. Ao fim da reação a resina foi filtrada e dela foi feita a extração com 20 mL de acetato de etila (3 vezes), seguida de secagem da fase orgânica com Na₂SO₄ e evaporação do solvente sob pressão reduzida.

5.5.4 Biorredução empregando papel de filtro como suporte para o substrato

Foram gotejados 50 mg do substrato dissolvidos em 2 ml de éter etílico em um papel de filtro qualitativo de 10 cm de diâmetro e, uma vez seco, o papel foi recortado em pedaços e adicionado ao meio reacional preparado de acordo como mostrado no

item 5.5.1. Para a reação em escala maior (200 mg), foram empregados dois papéis de filtro qualitativo de 18,5 cm, também devidamente recortados. A reação foi acompanhada por meio de alíquotas periódicas, seguidas de extração com solvente orgânico e análise em CG-EM. Ao fim da reação foi adicionado a resina XAD7HP ao meio reacional em uma proporção m_s/m_r de 1:50 e, após agitação orbital à 180 rpm por 2 horas, a resina foi filtrada e extraída com acetato de etila (3x100 mL) seguido de secagem da fase orgânica com Na_2SO_4 e evaporação do solvente sob pressão reduzida. A purificação dos α -metil- β -hidroxiéster foi realizada por cromatografia em coluna com acetato de etila/hexano (95:5).

34a (-)-(2*S*,3*S*)-3-hidroxi-3-fenil-2-metil-propanoato de metila



F.M. $\text{C}_{11}\text{H}_{14}\text{O}_3$; **M.M.** $194 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$; óleo amarelo claro; *e.e.* e razão *syn/anti* determinados por CG-DIC com coluna quiral Hidrodex- β , Método A3: $80^\circ\text{C}(5^\circ\text{C}/\text{min})$ - $180^\circ\text{C}/10 \text{ min}$; apresentando 99% de *e.e.* para o **34a**-(2*S*,3*S*) e uma razão *syn/anti* 5:1, tempos de retenção: 35,445 (*syn*, 2*S*,3*S*), 35,841 (*anti*, (2*R*,3*S*)); **IV**($v_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$): 3467, 3063, 2989, 1719, 1603, 1453, 1034, 859; **RMN** ^1H (500 MHz, CDCl_3): δ 7,3 (5H, m), 5,12 (1H, d, $J=3 \text{ Hz}$), 3,7 (3H, s), 3,01 (1H, s), 2,83 (1H, m), 1,15 (3H, d, $J=7,5 \text{ Hz}$); **RMN** ^{13}C (125 MHz, CDCl_3): 176,23, 141,44, 128,29, 127,54, 126, 74, 52, 46, 11; **E.M.** (70 eV, *m/z*, %): 194 (4), 163 (2), 177 (5), 107 (77), 105 (79), 88 (100), 79 (57), 57 (29); $[\alpha]_D^{20} = -19^\circ$ (*c* 1,2, CHCl_3), **lit.** $[\alpha]_D^{20} = -18,7^\circ$ (*c* 1,2 CHCl_3).

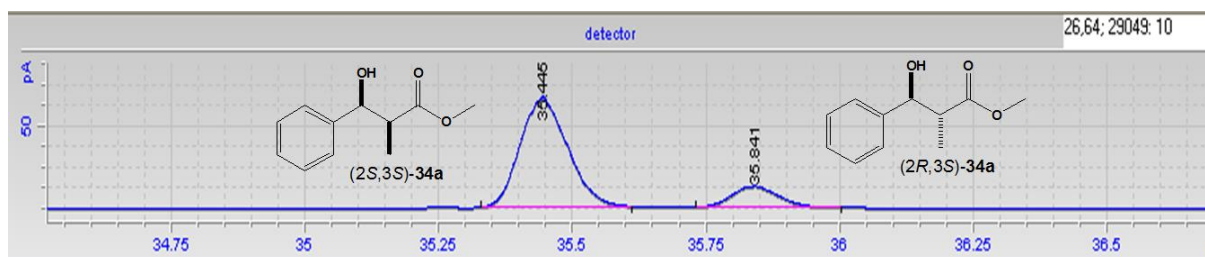
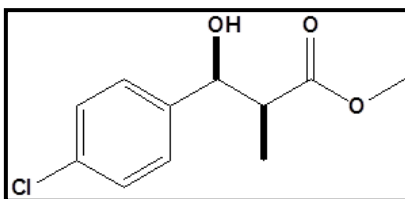


Figura 31. Cromatograma do produto de biorredução (2*S*,3*R*)-**34a** obtido por CG-DIC em coluna quiral.

34b (-)-(2*S*,3*S*)-3-hidroxi-3-(4-clorofenil)-2-metil propanoato de metila

F.M. C₁₁H₁₃O₃Cl; **M.M.** 228,5 g.mol⁻¹; óleo amarelo claro; *e.e.* e razão *syn/anti* determinados por CG-DIC com coluna quiral Lipodex-E, método B5: 80°C (10°C/min)-100°C, 180°C (1°C/min); apresentando 99% de *e.e.* para o **34b**-(2*S*,3*S*) e uma razão *syn/anti* 6/1; tempos de retenção: 91,27 (*anti*, 2*R*,3*S*), 93,368 (*syn*, 2*S*,3*S*); **IV**($\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$): 3446, 3029, 2982, 1908, 1731, 1598, 1462, 1089, 827; **RMN¹H** (600 MHz, CDCl₃): δ 7,34 (2H, d, $J=4,2$ Hz), δ 7,30 (2H, d, $J=8,4$ Hz), δ 5,11, (1H, d, $J=3,6$ Hz), δ 3,72 (3H, s), δ 3,04 (1H, d, $J=3$ Hz), δ 2,77 (1H, qd, $J_1=4,2$ Hz, $J_2=7,2$ Hz), δ 1,13 (3H, d, $J=7,2$ Hz); **RMN¹³C** (150 MHz, CDCl₃): 176, 139,8, 133,2, 128,5, 127,4, 72,9, 52, 46,2, 10,6; **EM** (70 eV, m/e, %): 228 (M⁺, 1), 155 (1), 141 (49), 139 (22), 111 (12), 88 (74), 77 (36), 57 (20), 57 (20), 44 (100); **[α]_D²⁰** = -12° (c 1,2, CHCl₃), **lit. [α]_D²⁰** = -15,3° (c 15,3, CHCl₃).

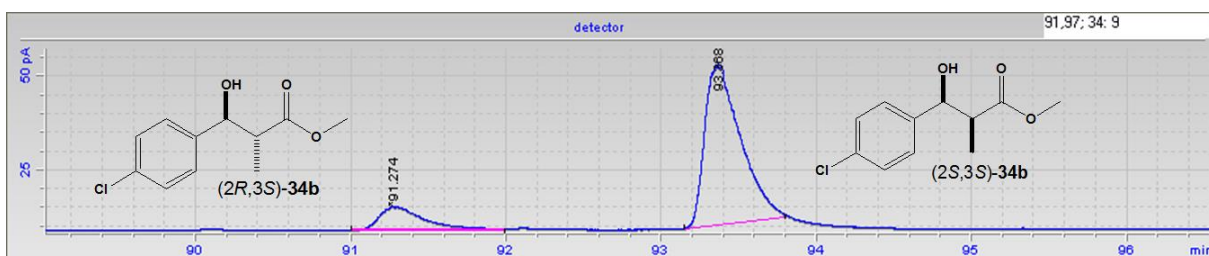
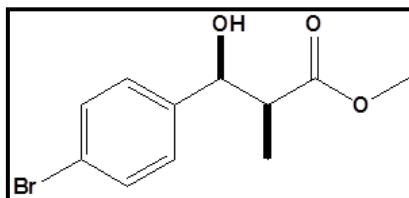


Figura 32. Cromatograma do produto de biorredução (2*S*,3*R*)-**34b** obtido por CG-DIC em coluna quiral.

34c (-)-(2*S*,3*S*)-3-hidroxi-3-(4-bromofenil)-2-metil propanoato de metila

F.M. C₁₁H₁₃O₃Br; **M.M.** 272,9 g.mol⁻¹; óleo amarelo claro; *e.e.* determinados por CG-DIC com coluna quiral Lipodex-E, método B5: 80°C (10°C/min)-100°C, 180°C (1°C/min); apresentando 99% de *e.e.* para o **34c**-(2*S*,3*S*) e razão *syn/anti* de 8/1; tempos de retenção: 100,42 (*anti*, 2*R*,3*S*), 101,53 (*syn*, 2*S*,3*S*); **IV**($\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$): 3476, 2985, 1908, 1731, 1592, 1488, 1071, 811; **RMN¹H (600 MHz, CDCl₃)**: δ 7,49 (2H, d, $J=8,4$ Hz), δ 7,24 (2H, d, $J=8,4$ Hz), δ 5,09 (2H, d, $J=3,6$ Hz), δ 3,72 (3H, s), 3,04 (1H, d, $J=3,6$ Hz), δ 2,77 (1H, qd, $J_1=4,2$ Hz, $J_2=7,2$ Hz), δ 1,13 (3H, d, $J=7,2$ Hz); **RMN¹³C (150 MHz, CDCl₃)**: 176,2, 139,8, 133, 128,5, 127,4, 72,9, 52, 46,2, 10,6; **EMAR** calcul. 272,0048, encontrado 272,0092; **E.M. (70 eV, m/e, %)**: 272 (M⁺, 4,8), 241 (1), 185 (48), 157 (16), 115 (8), 105 (5), 88 (100), 77 (37).; **[α]_D²⁰** = -11° (c 1,0, CHCl₃).

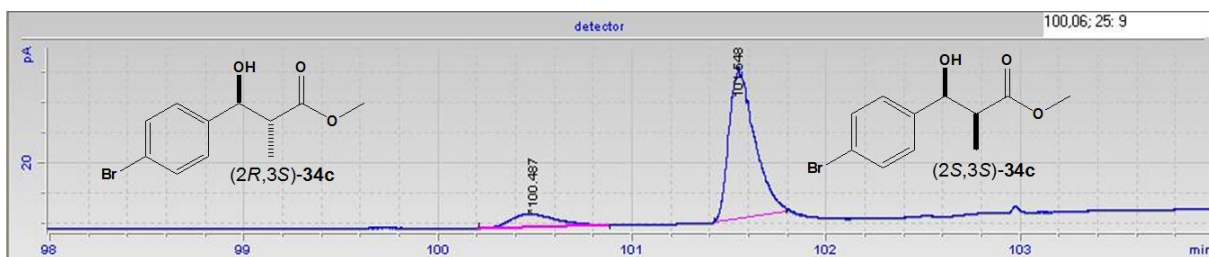
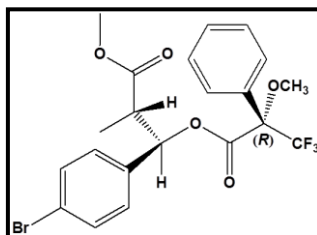


Figura 33. Cromatograma do produto de biorredução (2*S*,3*R*)-**34c** obtido por CG-DIC em coluna quiral.

5.5.5 Determinação da configuração absoluta de **34c** por derivatização com MTPCI (Cloreto de Mosher)

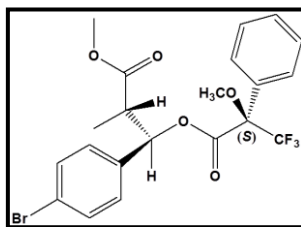
Em um balão de 25 mL foram adicionados 12,5 mg de **34c** (0,046 mmol) foram adicionados em 2 mL de CH₂Cl₂ seco, em seguida, foram adicionados 1 cristal de dimetil-aminopiridina (DMAP), 14,5 μL do ou (*S*)-MTPCI e por último, 65,7 μL de Et₃N seca. O procedimento foi repetido empregando o (*R*)-MTPCI em outro balão de 25 mL. A reação foi acompanhada por CCD (Hex/AcOEt 8:2) até o consumo total do material de partida. Ao fim da reação, o excesso de solvente foi evaporado sob pressão reduzida e a mistura resultante foi filtrada em uma coluna de sílica (Hex/AcOEt 8:2) obtendo o éster correspondente com rendimento de 99%.⁷⁷

(2S,3S, 2'R)-3-(2'-metoxi-2'-trifluor-2'-fenilacetil)-3-(4-bromofenil)-2-metil propanoato de metila



F.M. C₂₁H₂₀O₅Br; **M.M.** 431,9 g.mol⁻¹; óleo incolor; **RMN¹H (600 MHz, CDCl₃):** δ7,48-7,28 (9H, m), δ6,19 (1H, d, J=6,6 Hz), δ3,6 (3H, s), δ3,54 (3H, s), δ 2,94 (1H, m), δ1,25 (3H, d, J=7,2 Hz).

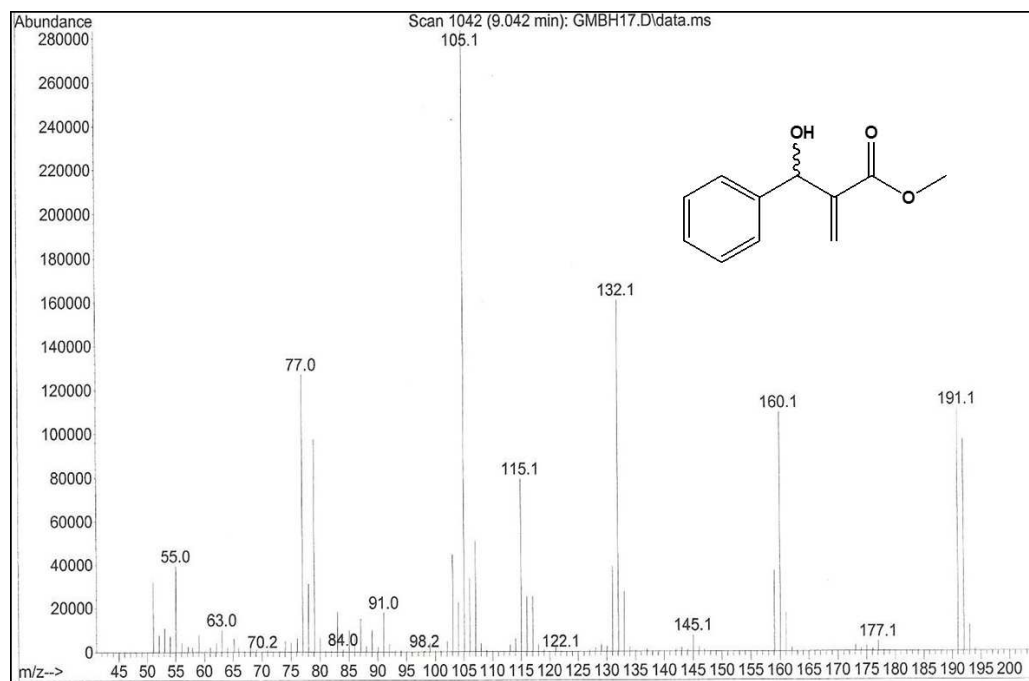
(2S, 3S, 2'S)-3-(2'-metoxi-2'-trifluor-2'-fenilacetil)-3-(4-bromofenil)-2-metil propanoato de metila



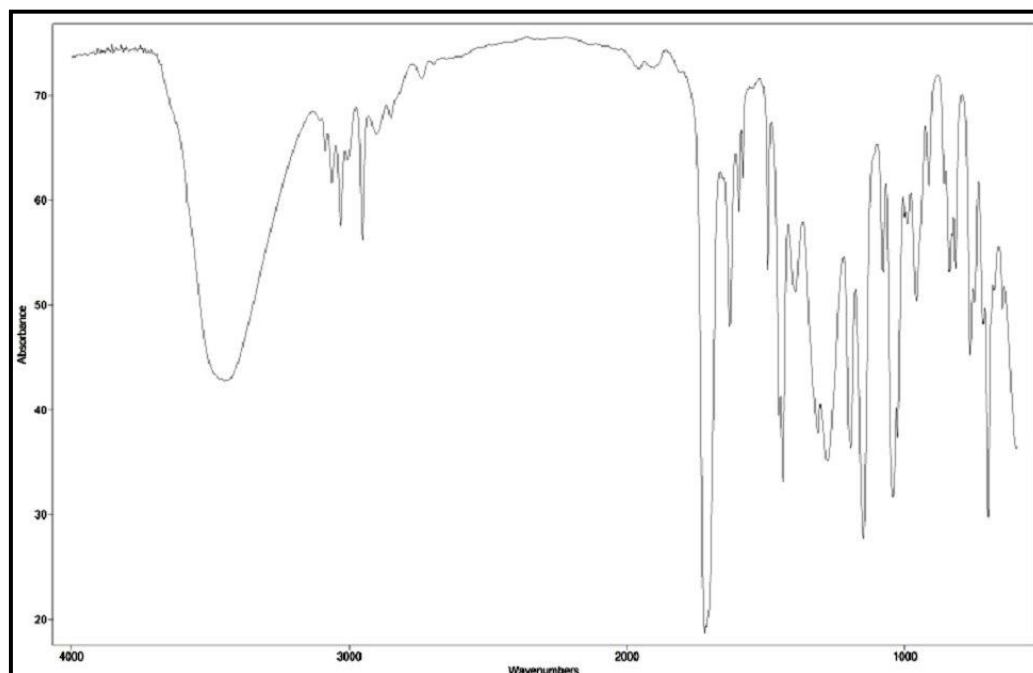
F.M. C₂₁H₂₀O₅Br; **M.M.** 431,9 g.mol⁻¹; óleo incolor; **RMN¹H (600 MHz, CDCl₃):** δ7,41-7,2 (9H, m), δ6,19(1H, d, J=6,6 Hz), δ3,57 (3H, s), δ3,45 (3H, s), δ 2,97 (1H, m), δ1,15 (3H, d, J=7,2 Hz).

⁷⁷ Ferreira, M. A. B. Tese de Doutorado, UNICAMP, 2012.

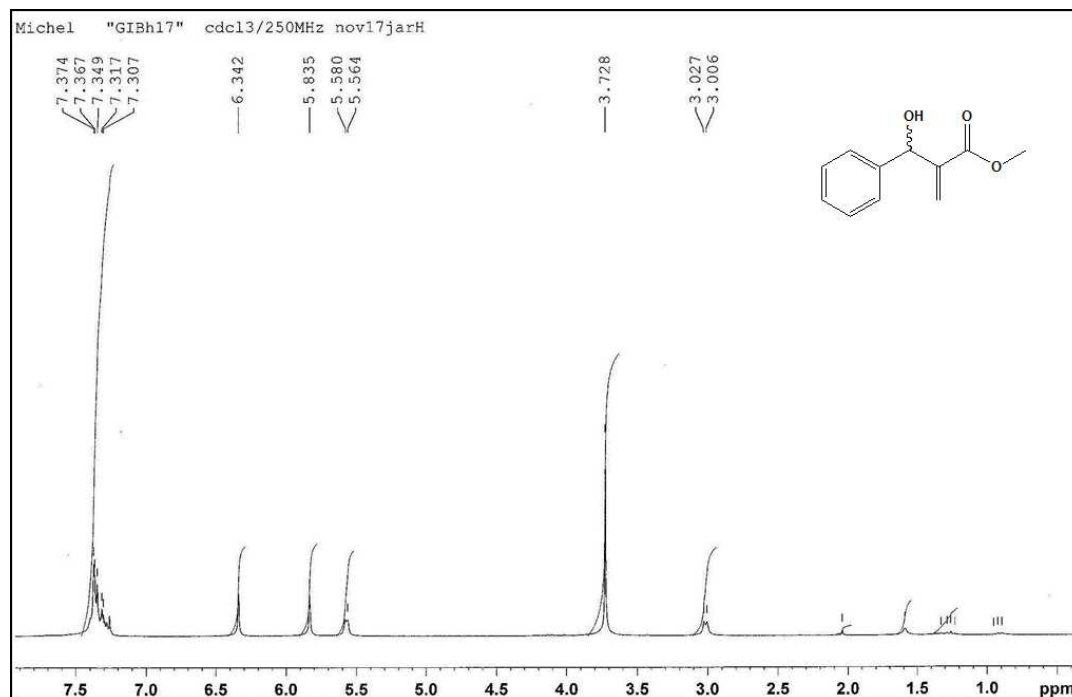
6. ANEXOS



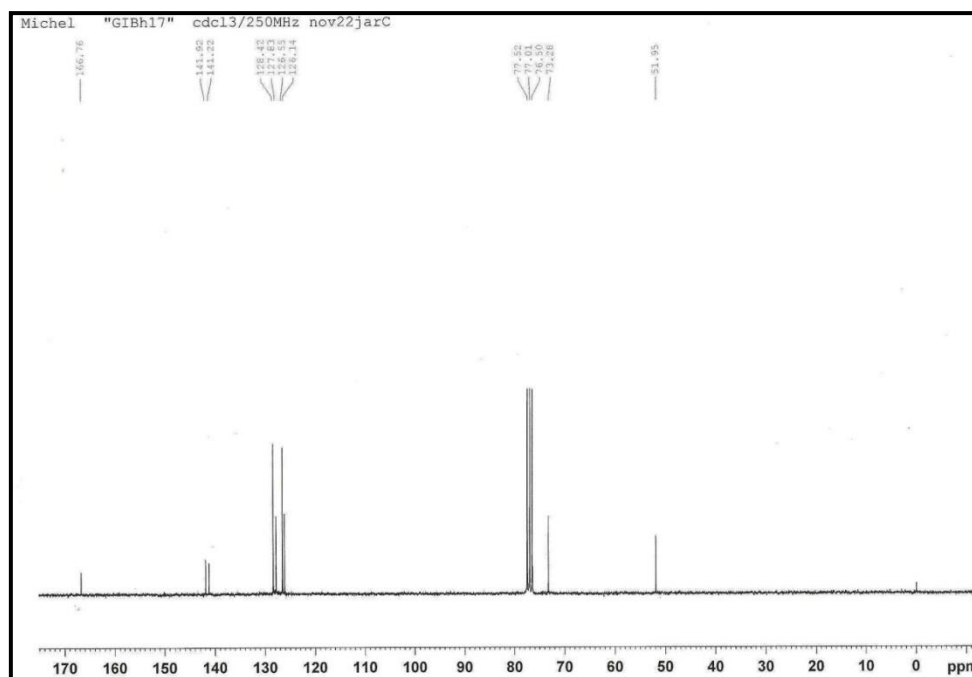
Anexo 01. Espectro de massa obtido por ionização de elétrons (70 eV) do acrilato de metil-2-[hidroxi(fenil)metil] **30a**.



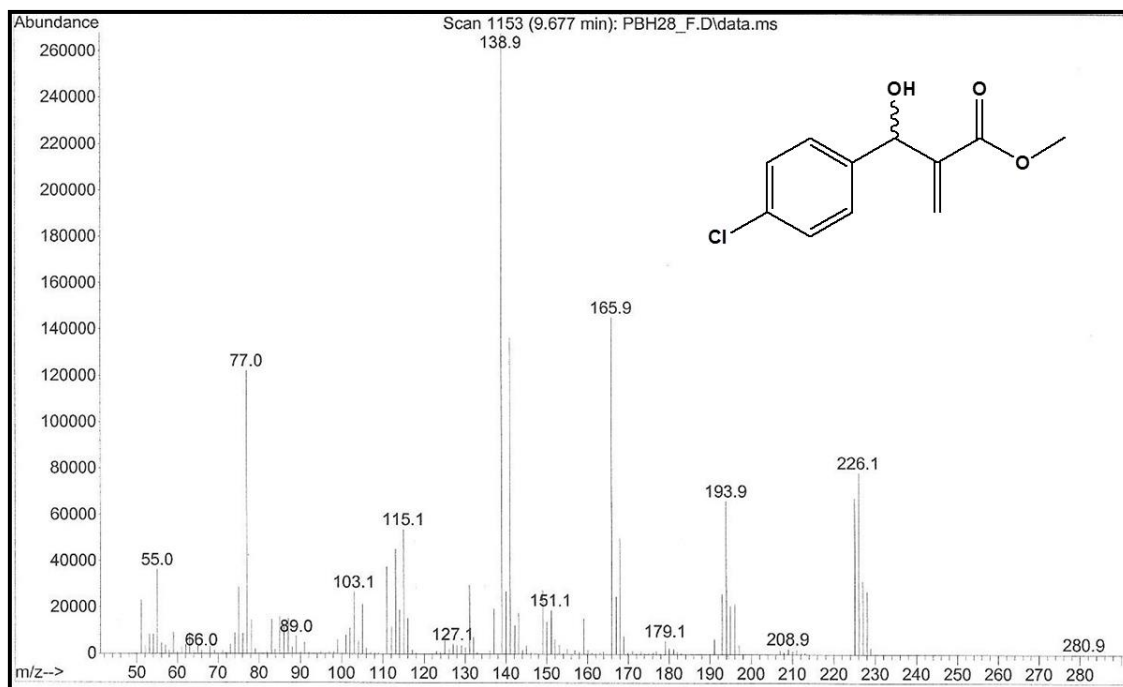
Anexo 02. Espectro de infravermelho (NaCl) do acrilato de metil-2-[hidroxi(fenil)metil] **30a**.



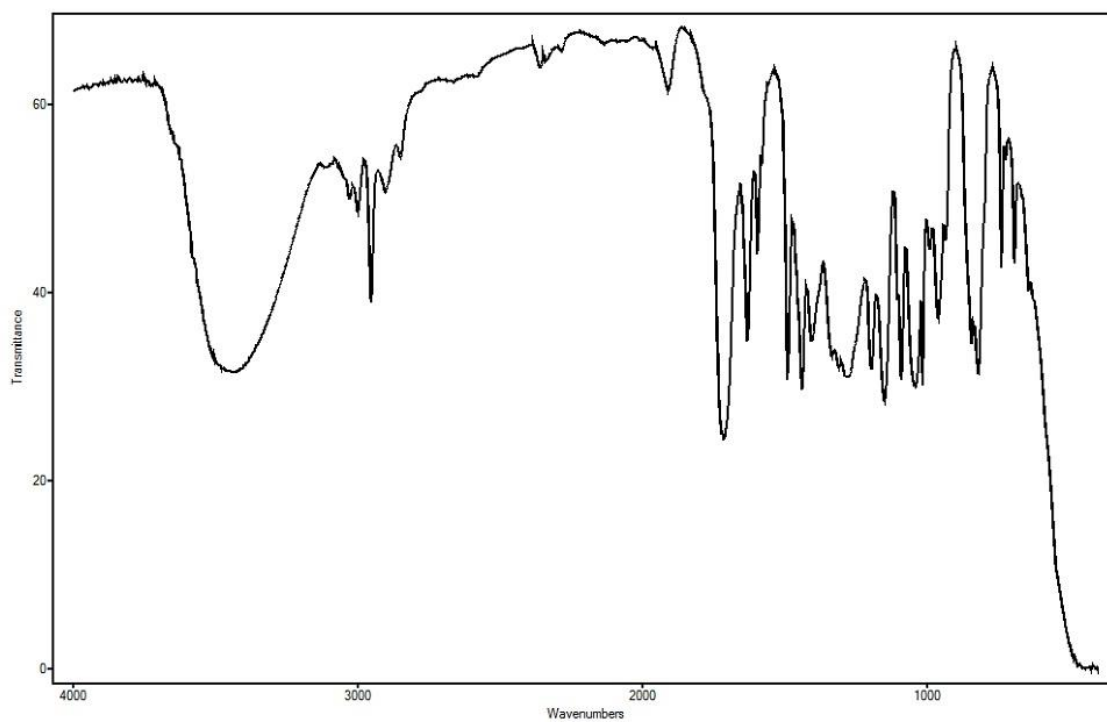
Anexo 03. Espectro de RMN de H^1 (250 MHz, $CDCl_3$) do acrilato de metil-2-[hidroxi(fenil)metil] 30a.



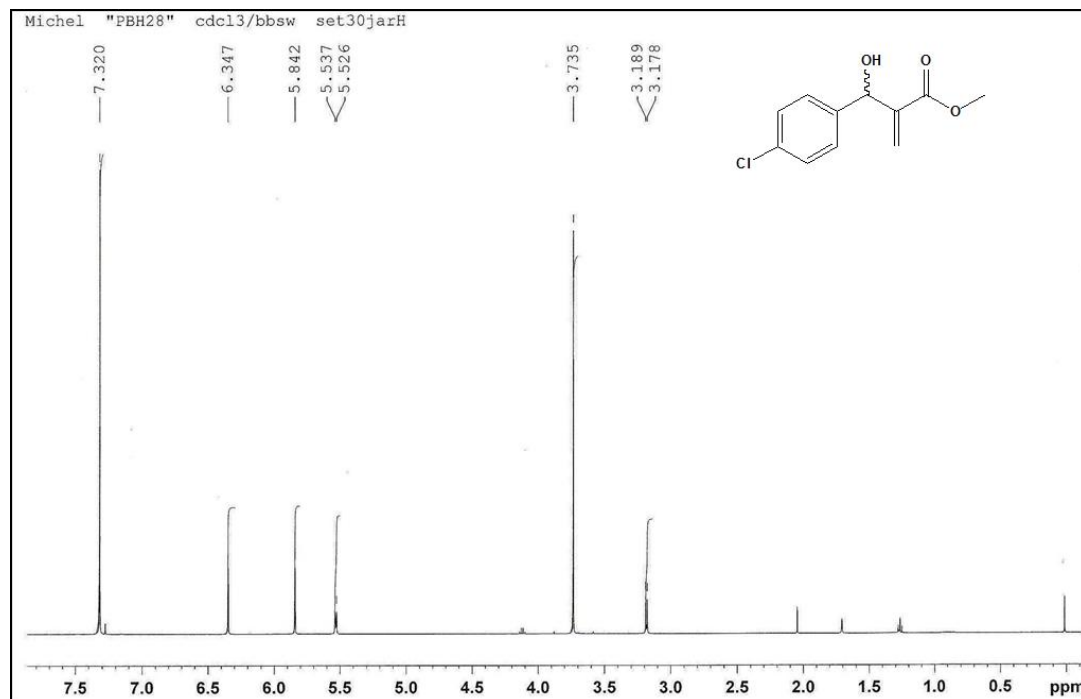
Anexo 04. Espectro de RMN de C^{13} (62,5 MHz, $CDCl_3$) do acrilato de metil-2-[hidroxi(fenil)metil] 30a.



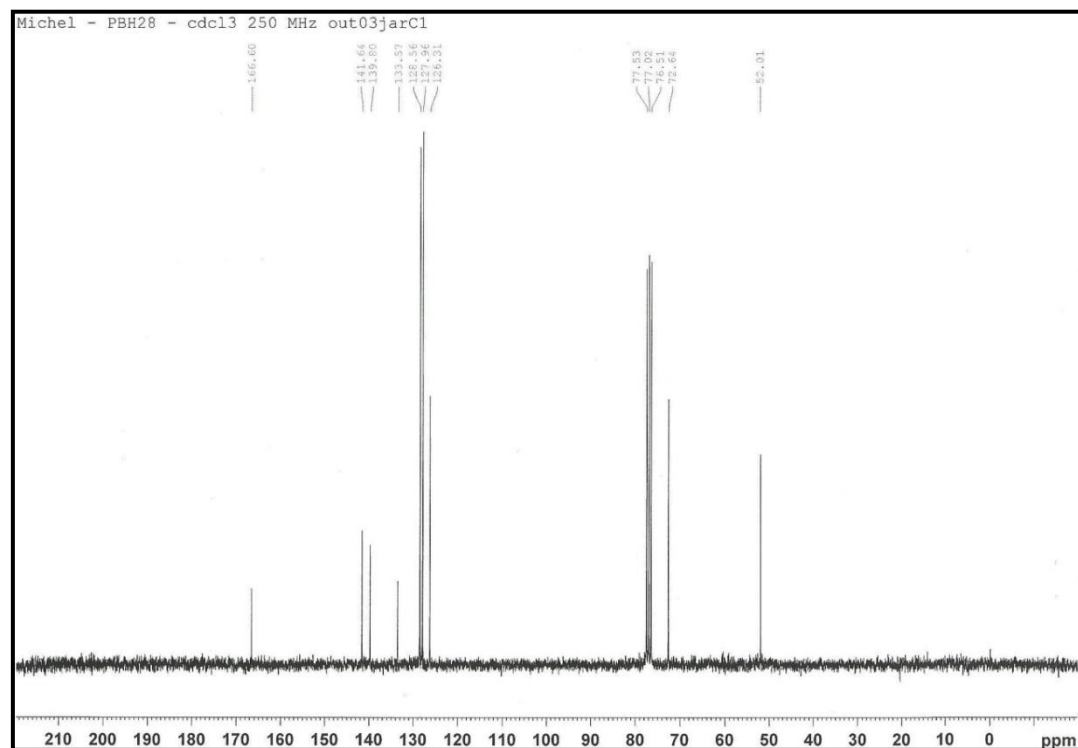
Anexo 05. Espectro de EM (70eV) do acrilato de metil-2-[hidroxi(4-clorofenil)metil] **30b**.



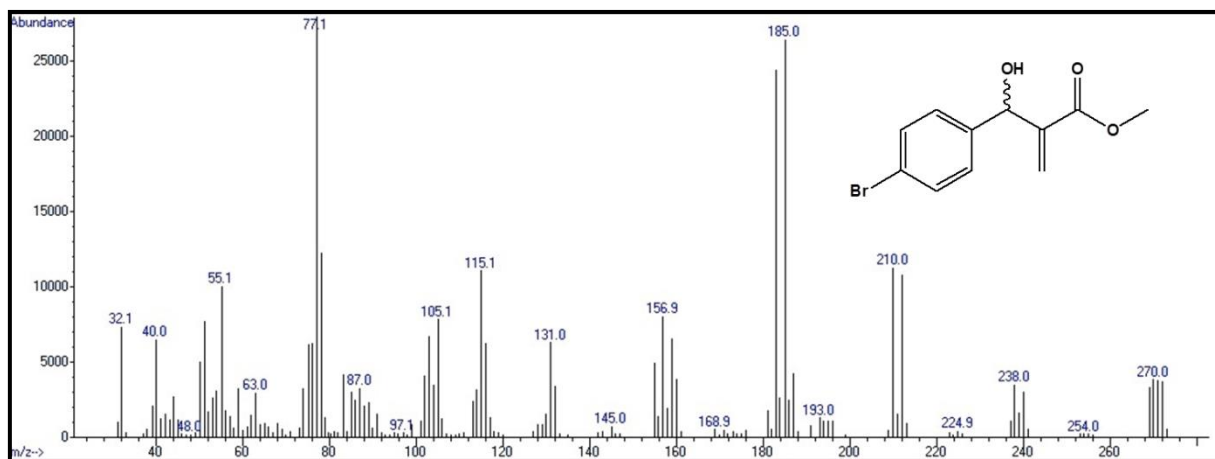
Anexo 06. Espectro de infravermelho (NaCl) do acrilato de metil-2-[hidroxi(4-clorofenil)metil] **30b**.



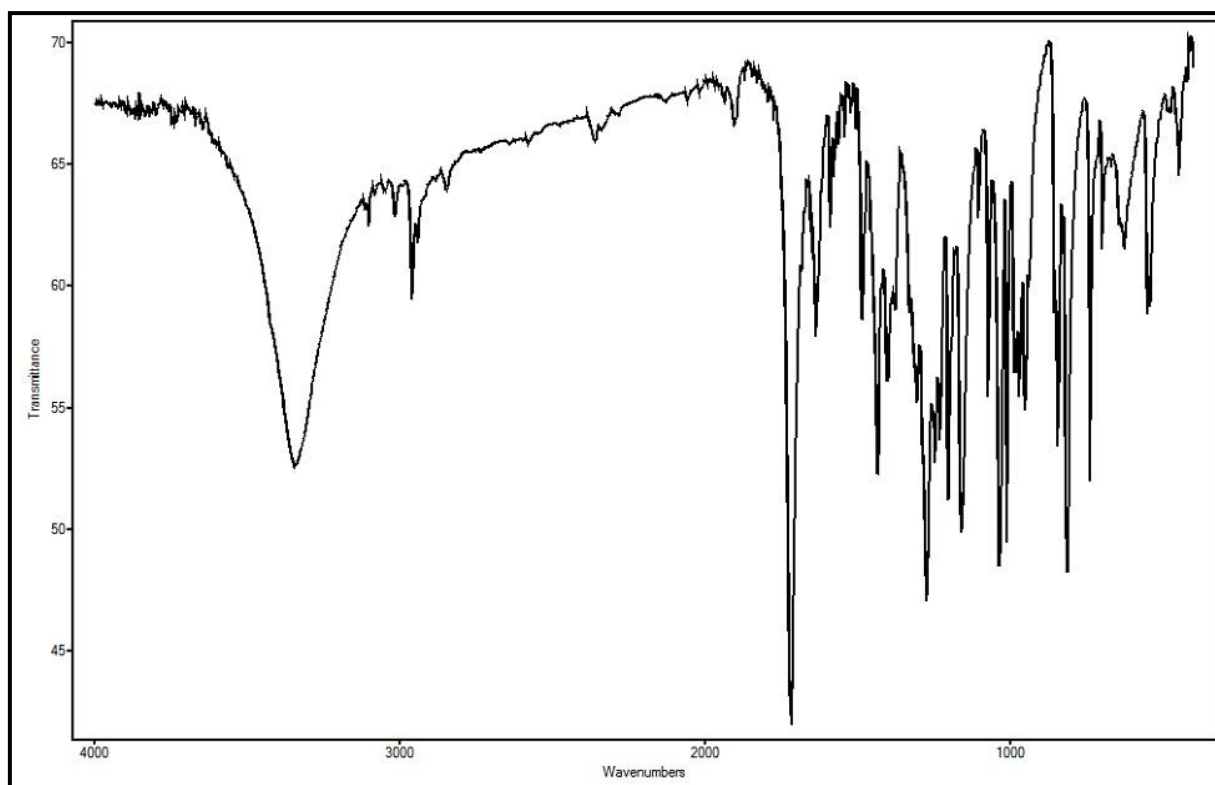
Anexo 07. Espectro de RMN de H¹ (250 MHz, CDCl₃) do acrilato de metil-2-[hidroxi(4-clorofenil)metil] **30b**.



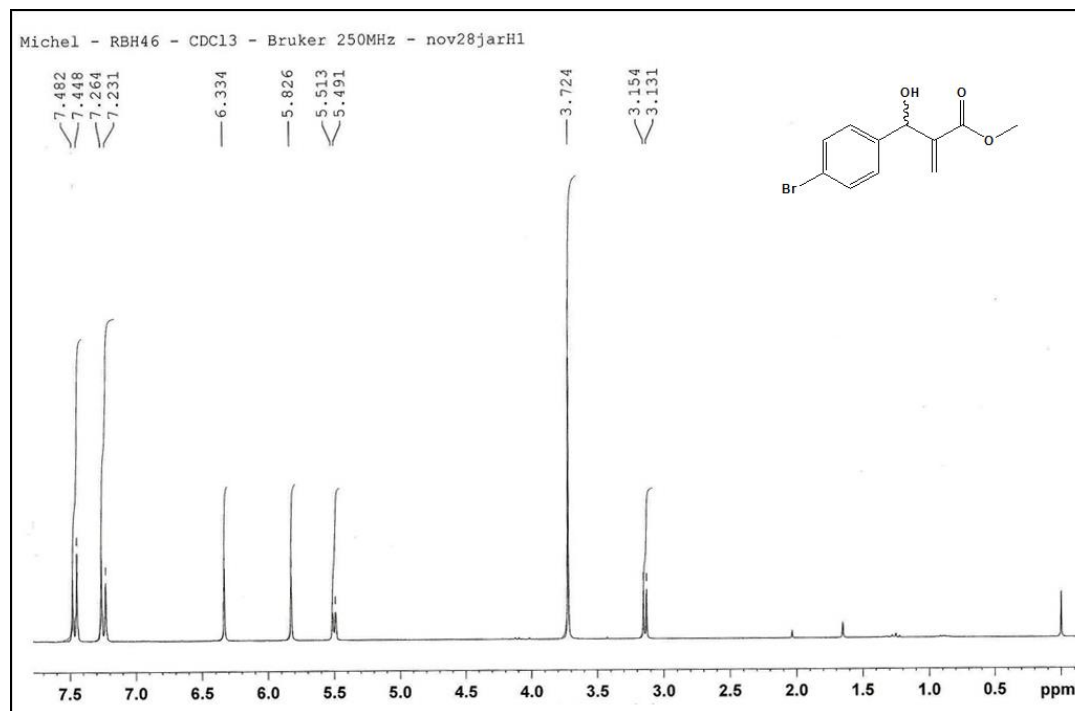
Anexo 08. Espectro de RMN de C¹³ (62,5 MHz, CDCl₃) do acrilato de metil-2-[hidroxi(4-clorofenil)metil] **30b**.



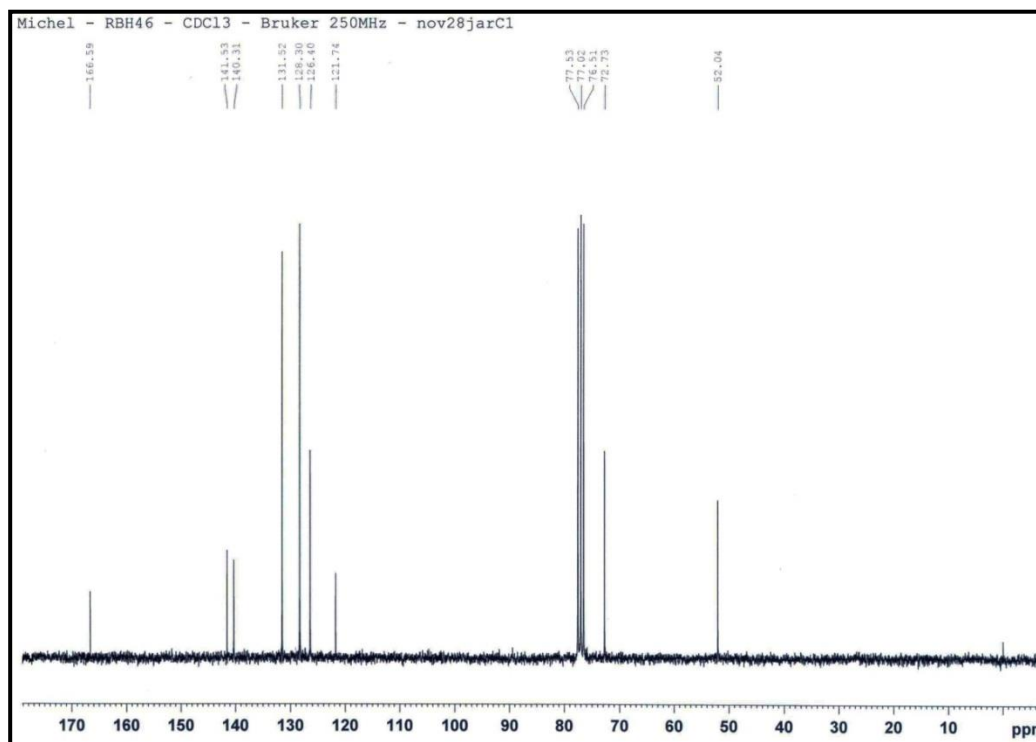
Anexo 09. Espectro de EM (70eV) do do acrilato de metil-2-[hidroxi(4-bromofenil)metil] **30c**.



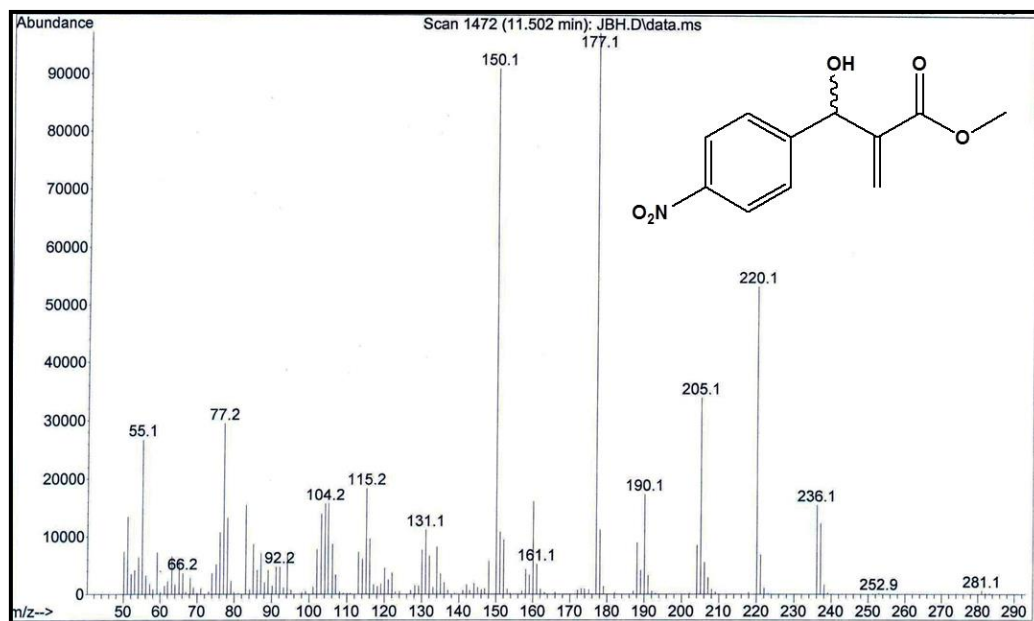
Anexo 10. Espectro de infravermelho (KBr) do do acrilato de metil-2-[hidroxi(4-bromofenil)metil] **30c**.



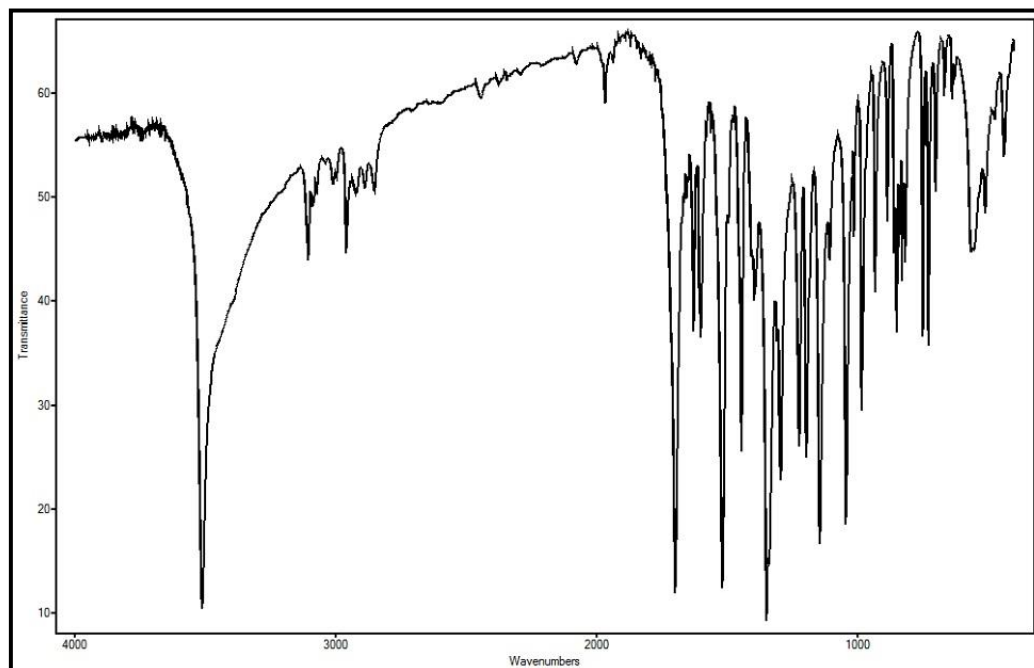
Anexo 11. Espectro de RMN de H¹ (250 MHz, CDCl₃) do do acrilato de metil-2-[hidroxi(4-bromofenil)metil] **30c**.



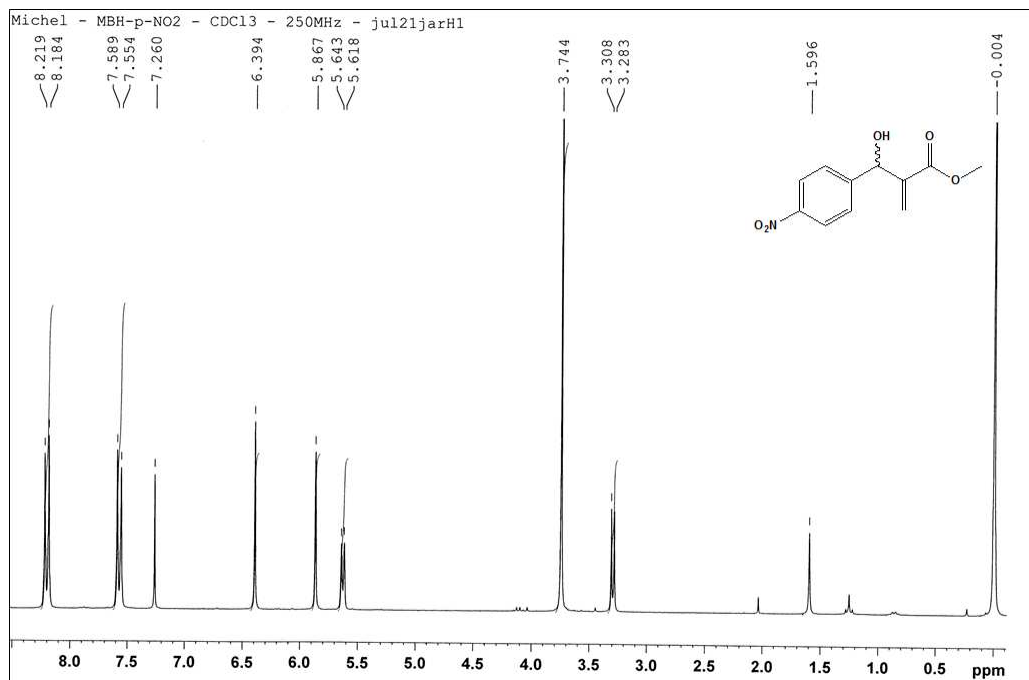
Anexo 12. Espectro de RMN de C¹³ (250 MHz, CDCl₃) do do acrilato de metil-2-[hidroxi(4-bromofenil)metil] **30c**.



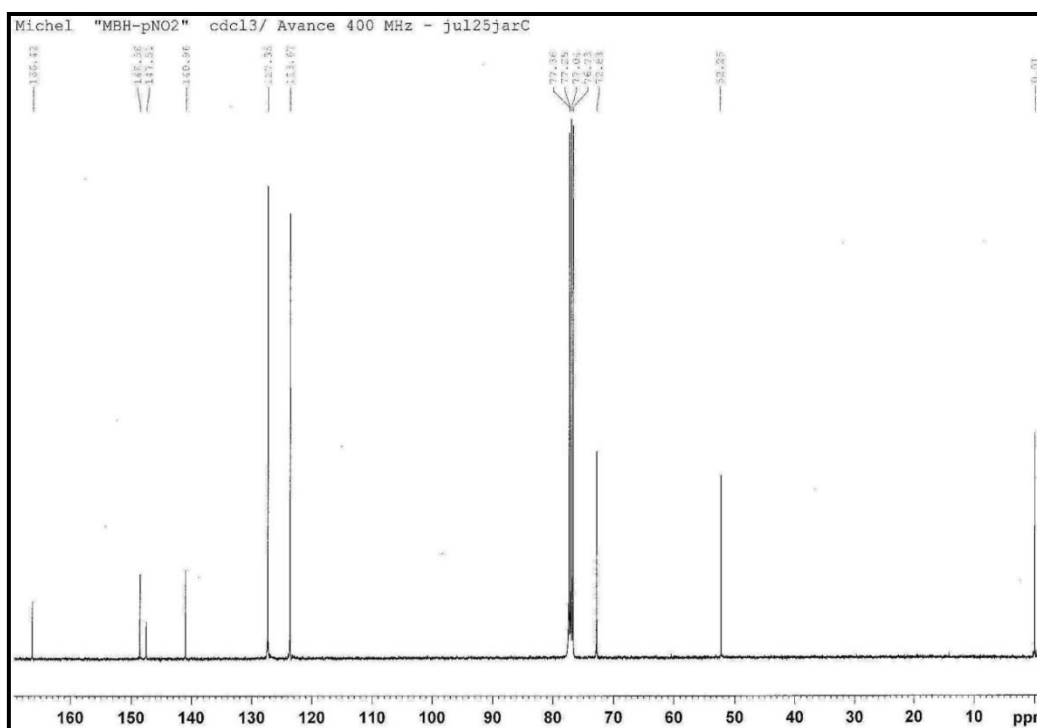
Anexo 13. Espectro de EM (70eV) do acrilato de metil-2-[hidroxi(4-nitrofenil)metil] **30d**.



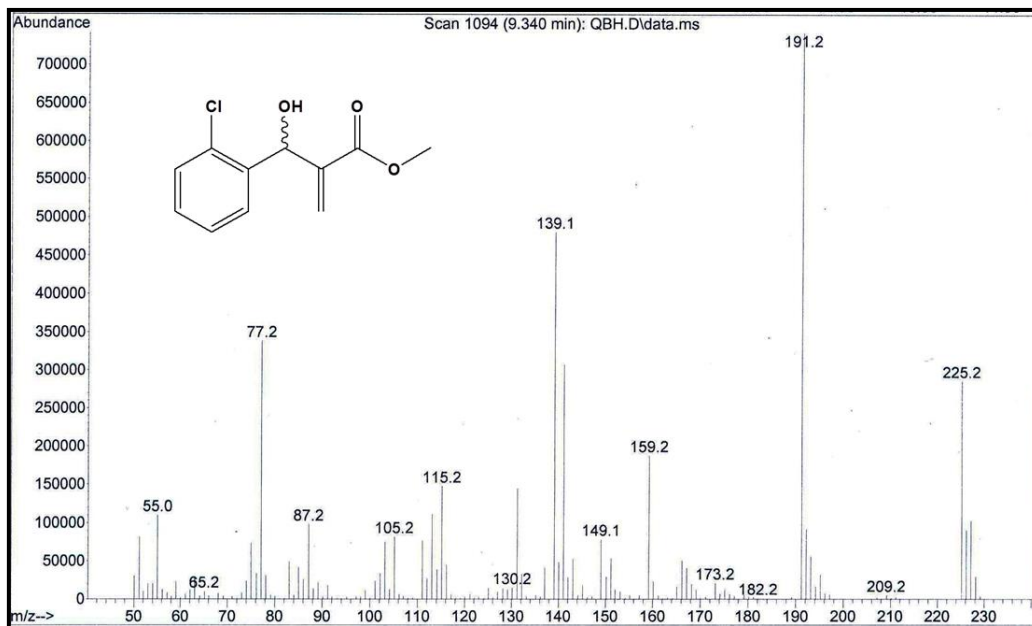
Anexo 14. Espectro de infravermelho (KBr) do acrilato de metil-2-[hidroxi(4-nitrofenil)metil] **30d**.



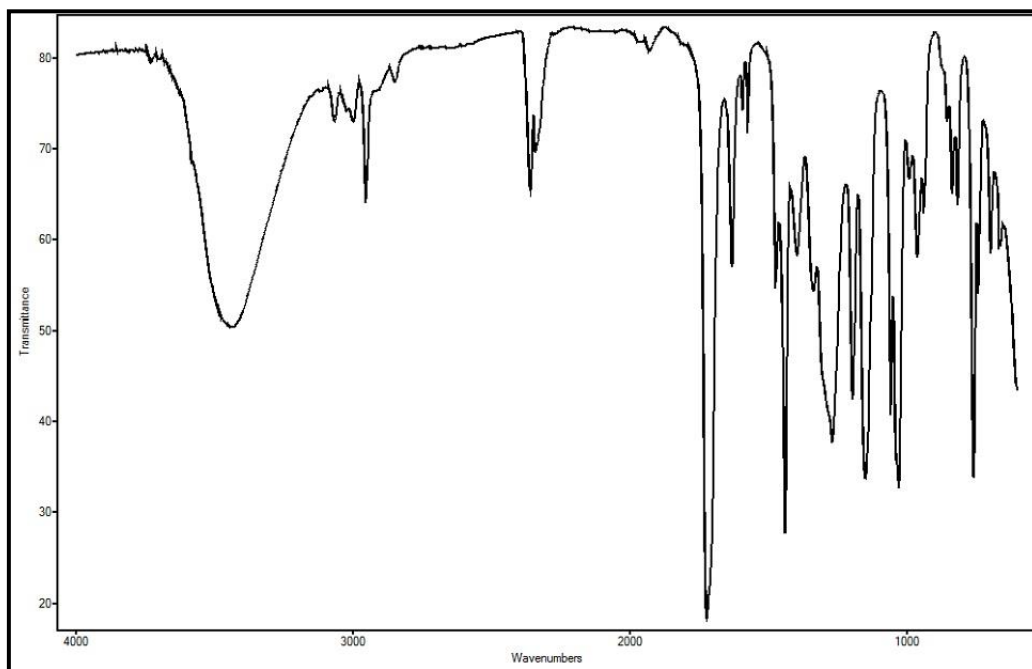
Anexo 15. Espectro de RMN de H^1 (250 MHz, $CDCl_3$) do acrilato de metil-2-[hidroxi(4-nitrofenil)metil] **30d**.



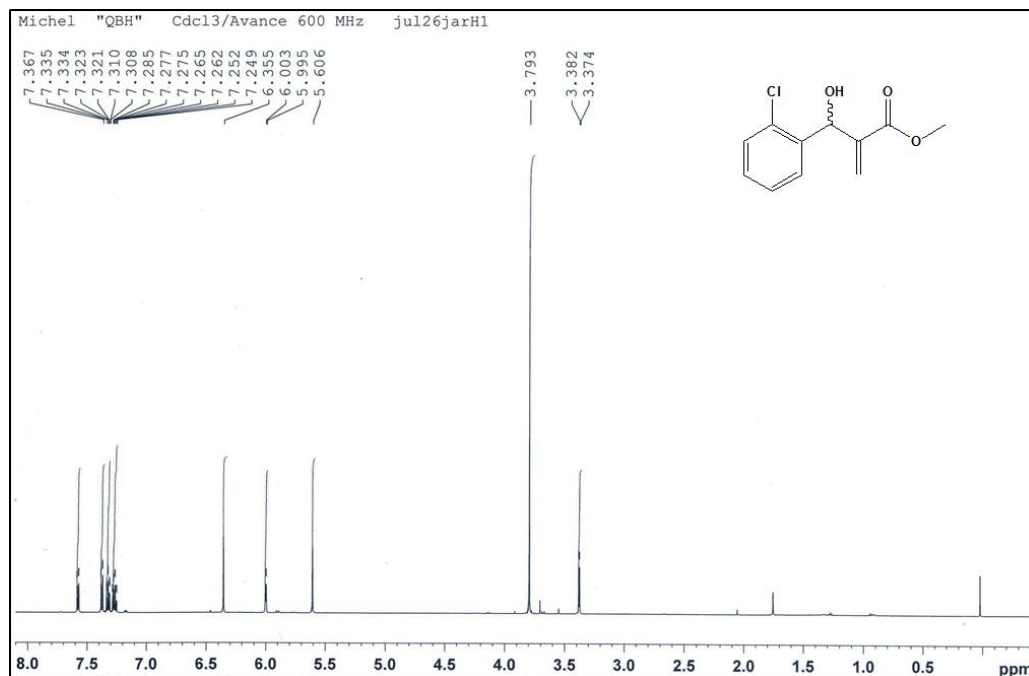
Anexo 16. Espectro de RMN de C^{13} (250 MHz, $CDCl_3$) do acrilato de metil-2-[hidroxi(4-nitrofenil)metil] **30d**.



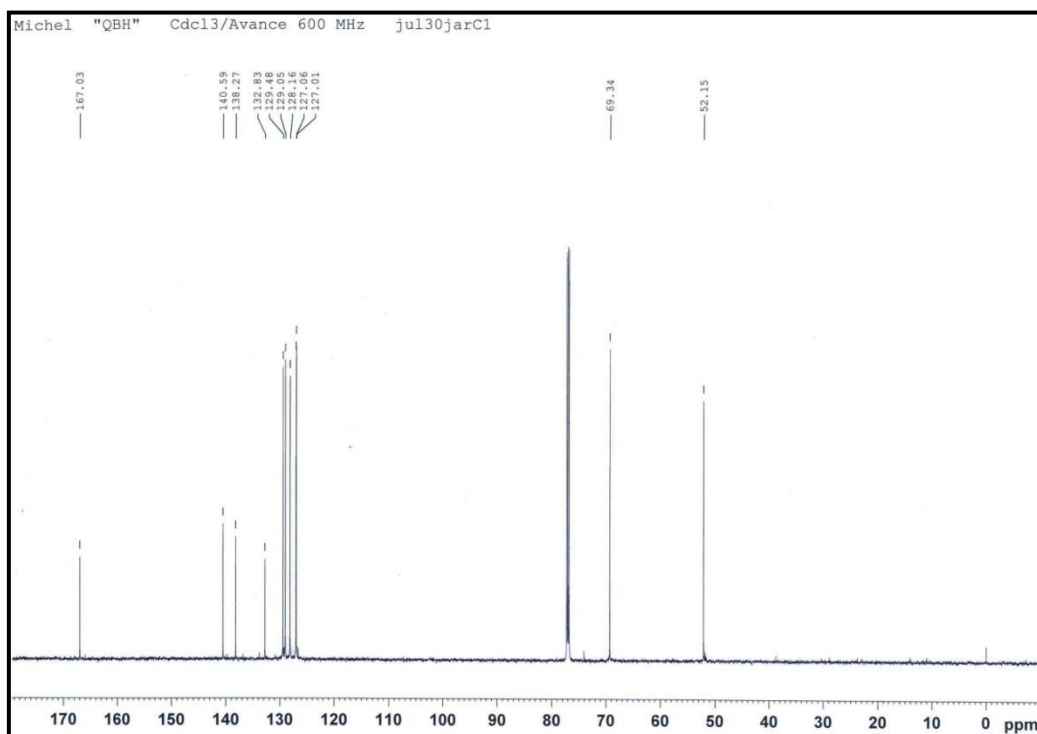
Anexo 17. Espectro de EM (70eV) do acrilato de metil-2-[hidroxi(2-clorofenil)metil] 30e.



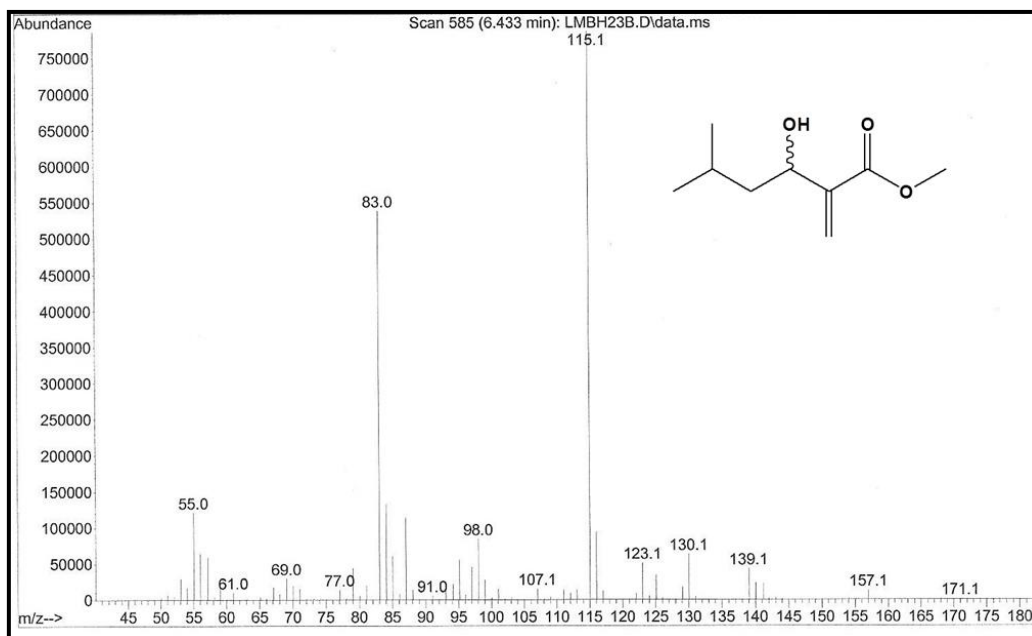
Anexo 18. Espectro de infravermelho (NaCl) do acrilato de metil-2-[hidroxi(2-clorofenil)metil] 30e.



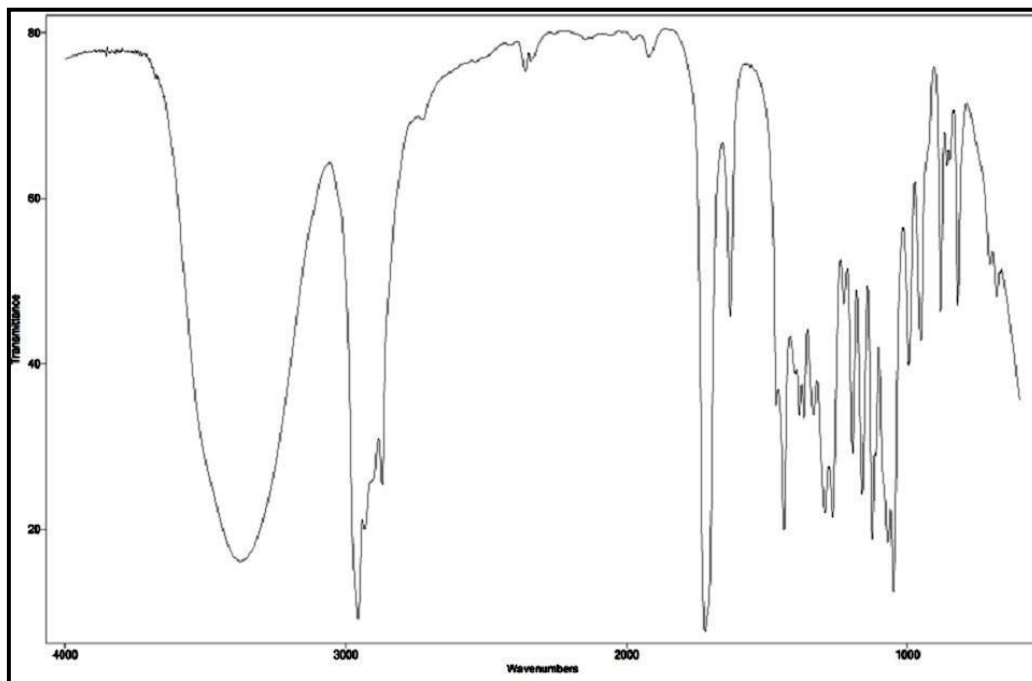
Anexo 19. Espectro de RMN de H^1 (600 MHz, $CDCl_3$) do acrilato de metil-2-[hidroxi(2-clorofenil)metil] **30e**.



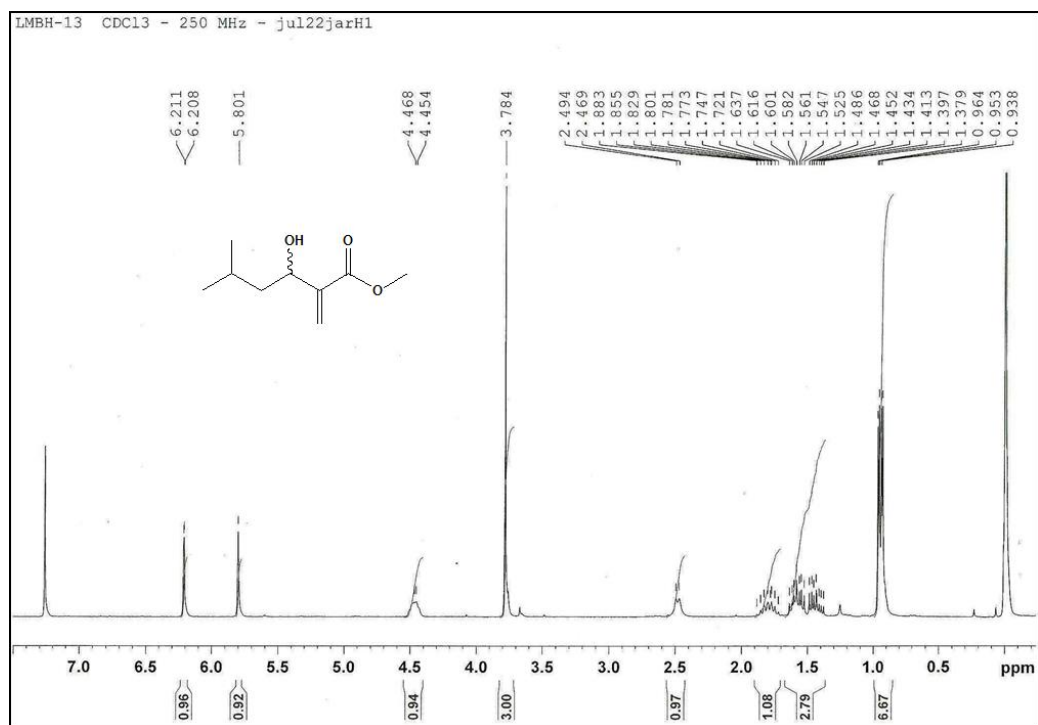
Anexo 20. Espectro de RMN de C^{13} (150 MHz, $CDCl_3$) do acrilato de metil-2-[hidroxi(2-clorofenil)metil] **30e**.



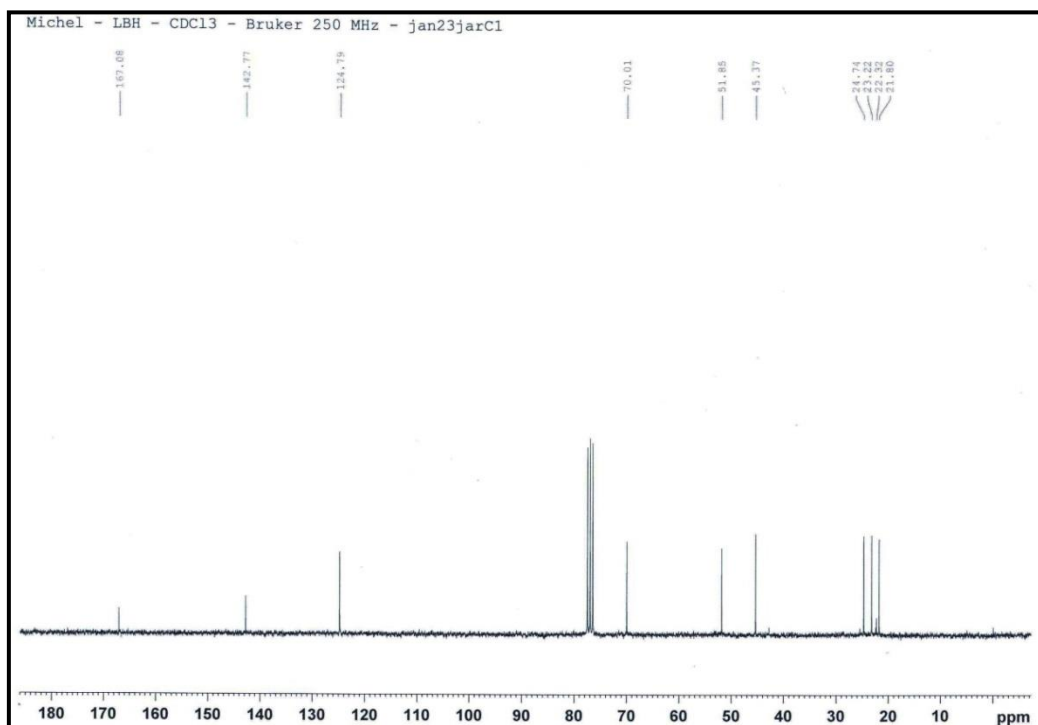
Anexo 21. Espectro de EM (70eV) do 3-hidroxi-2-metileno-5-metil-hexanoato de metila **30f**.



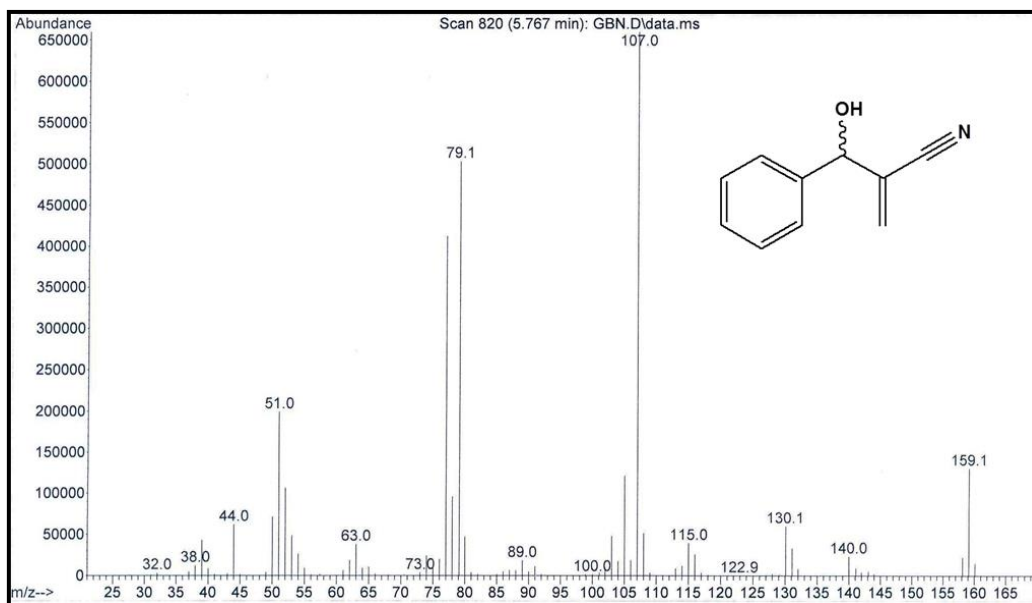
Anexo 22. Espectro de infravermelho (NaCl) do 3-hidroxi-2-metileno-5-metil-hexanoato de metila **30f**.



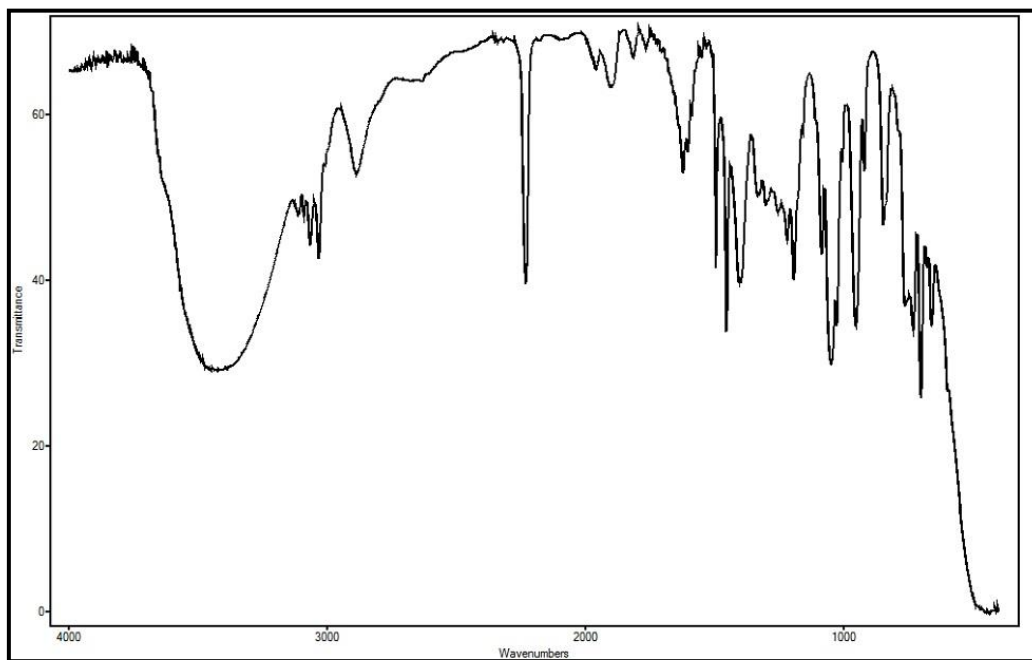
Anexo 23. Espectro de RMN de H¹ (250 MHz, CDCl₃) do 3-hidroxi-2-mileno-5-metil-hexanoato de metila **30f**.



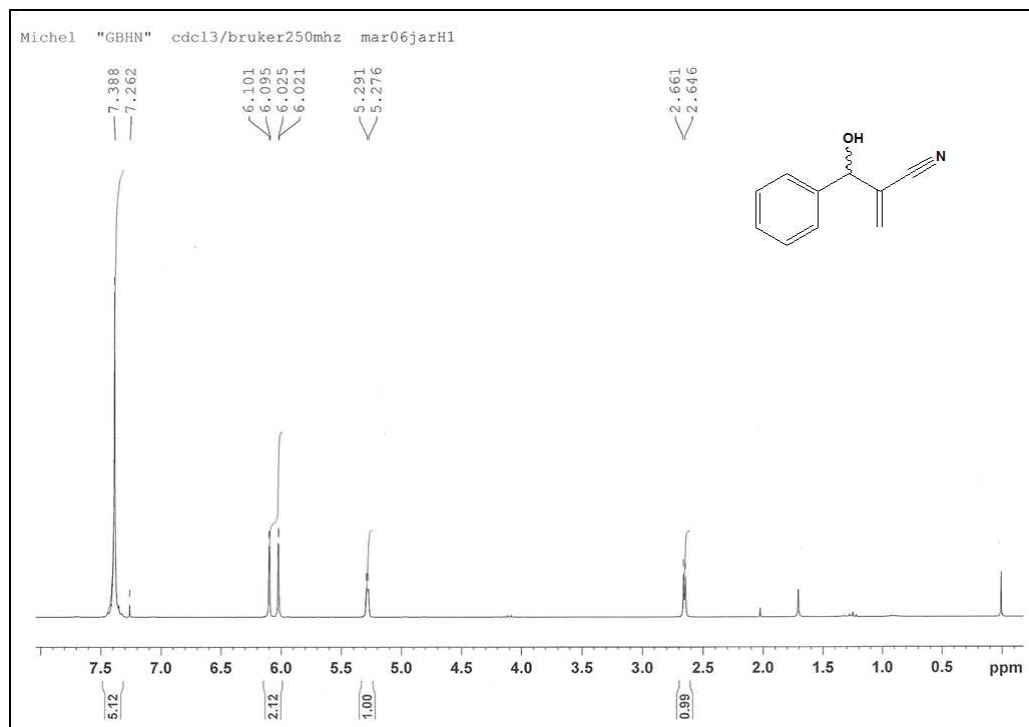
Anexo 24. Espectro de RMN de C¹³ (62,5 MHz, CDCl₃) do 3-hidroxi-2-mileno-5-metil-hexanoato de metila **30f**.



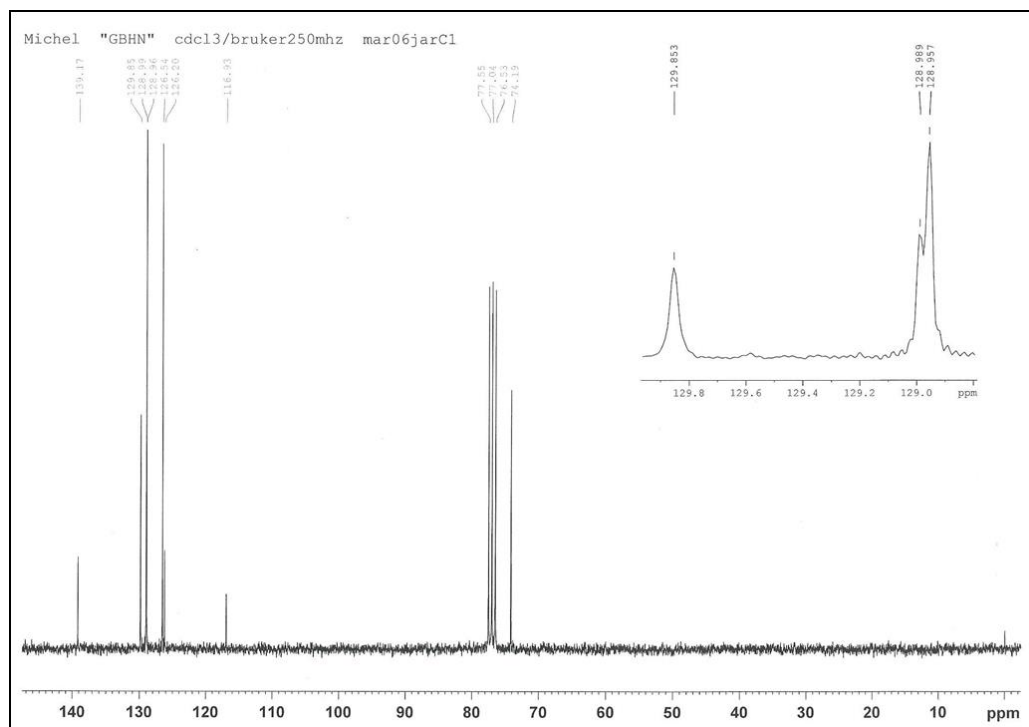
Anexo 25. Espectro de EM (70eV) do acrilonitril-2-[hidroxi(fenil)metil] **30h**.



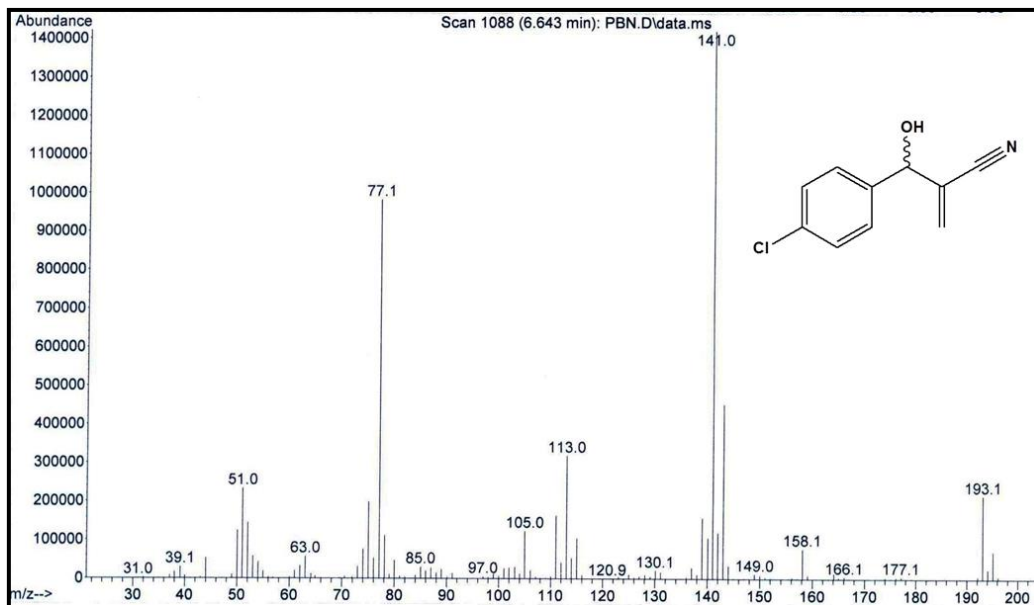
Anexo 26. Espectro de infravermelho (NaCl) do acrilonitril-2-[hidroxi(fenil)metil] **30h**.



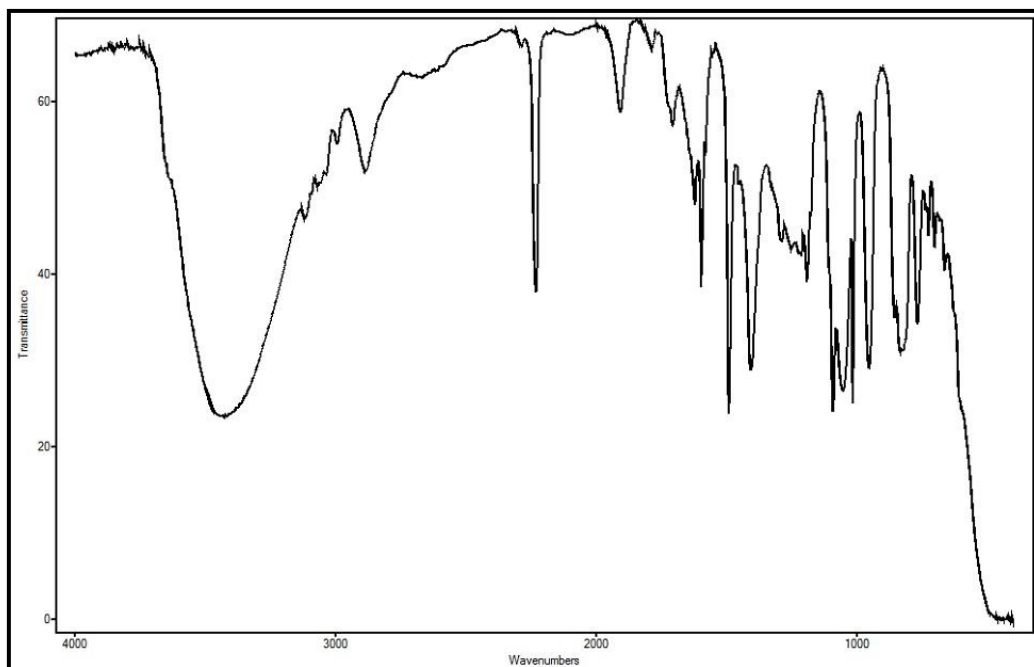
Anexo 27. Espectro de RMN de H^1 (250 MHz, $CDCl_3$) do acrilonitril-2-[hidroxi(fenil)metil] **30h**.



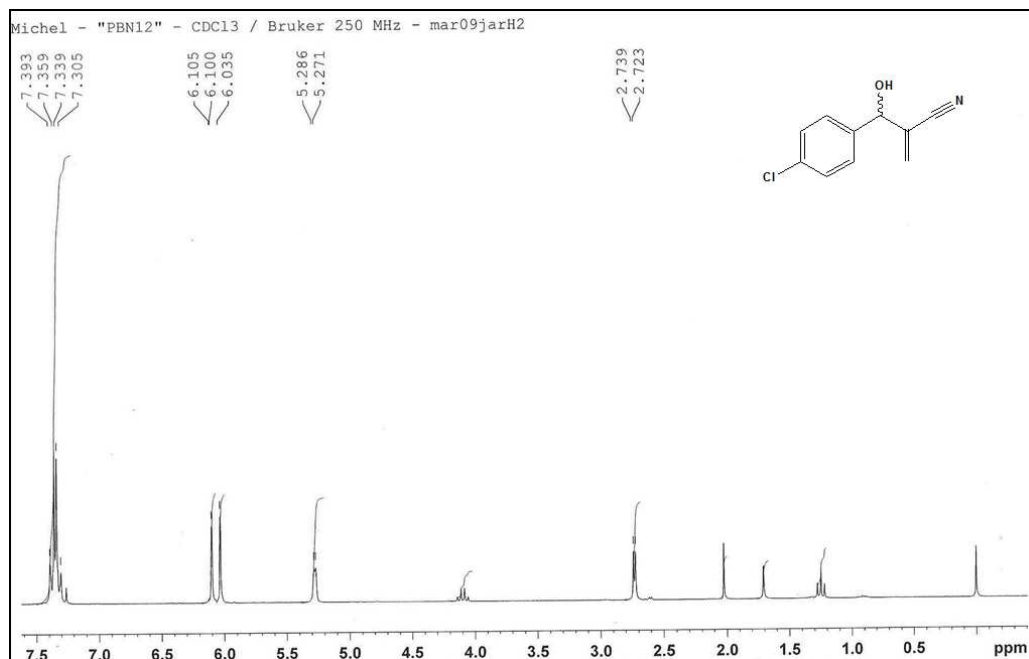
Anexo 28. Espectro de RMN de C^{13} (62,5 MHz, $CDCl_3$) do acrilonitril-2-[hidroxi(fenil)metil] **30h**.



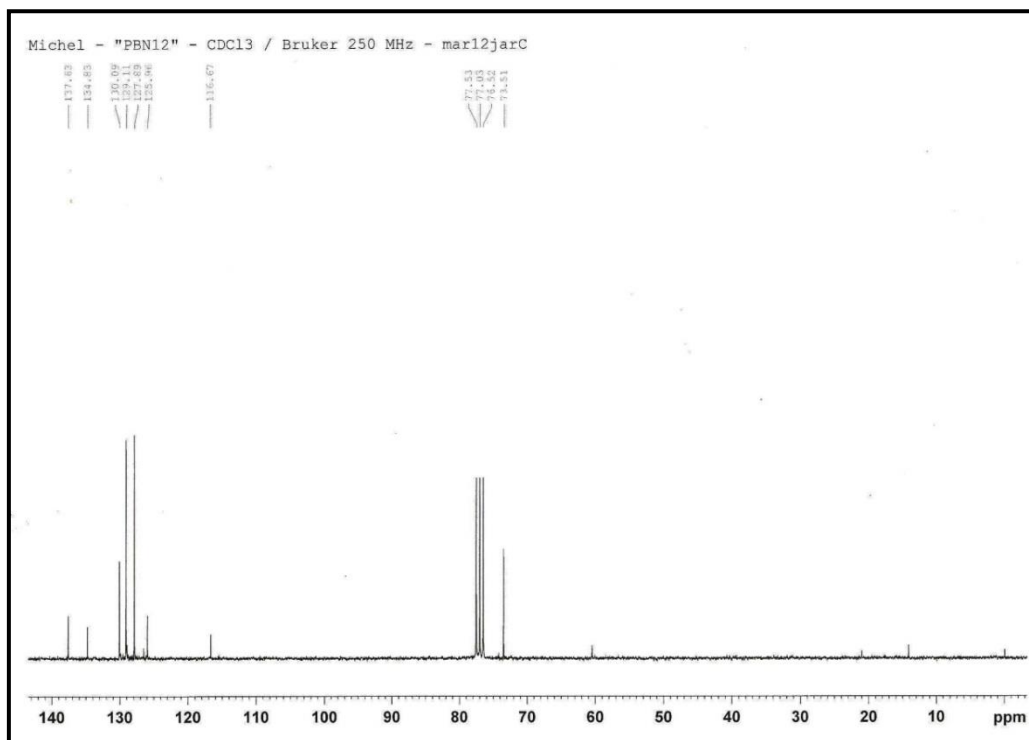
Anexo 29. Espectro de EM (70eV) do acrilonitrilil-2-[hidroxi(4-clorofenil)metil] **30i**.



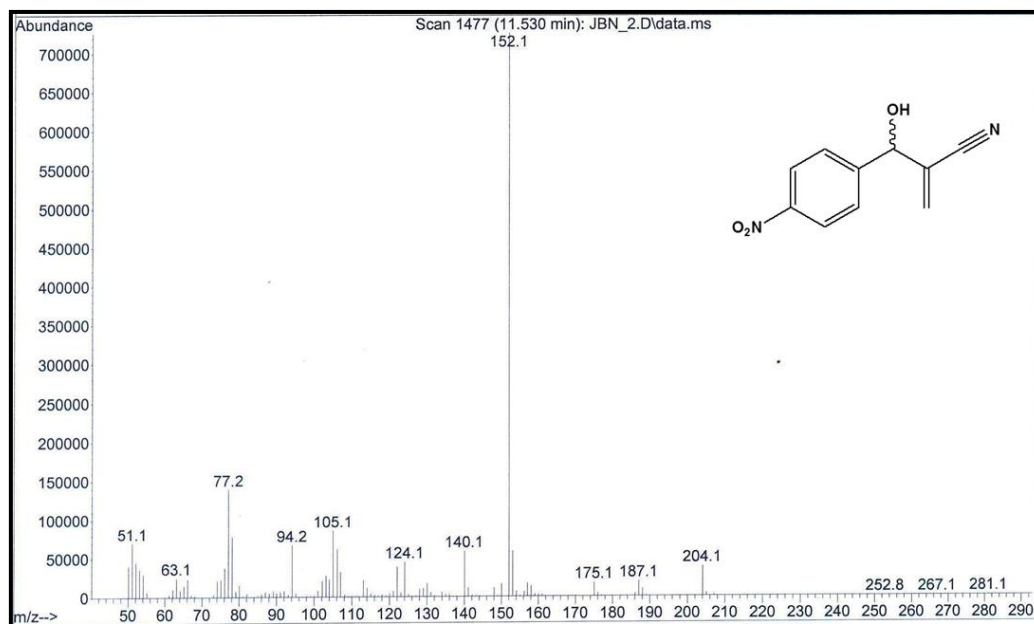
Anexo 30. Espectro de infravermelho (NaCl) do acrilonitrilil-2-[hidroxi(4-clorofenil)metil] **30i**.



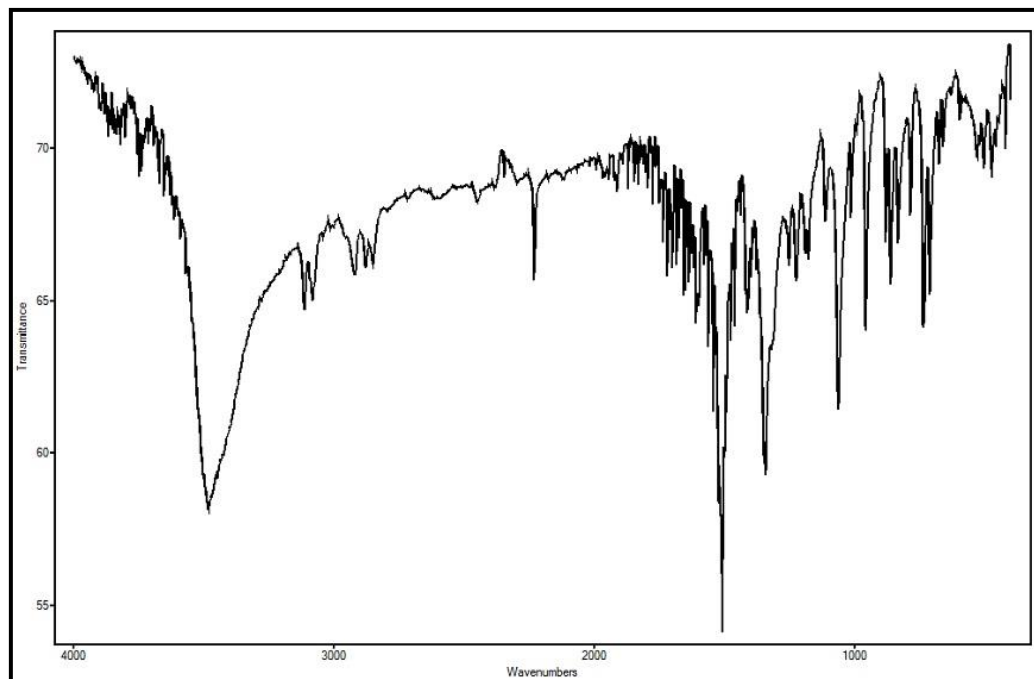
Anexo 31. Espectro de RMN de H¹ (250 MHz, CDCl₃) do acrilonitrilil-2-[hidroxi(4-clorofenil)metil] 30i.



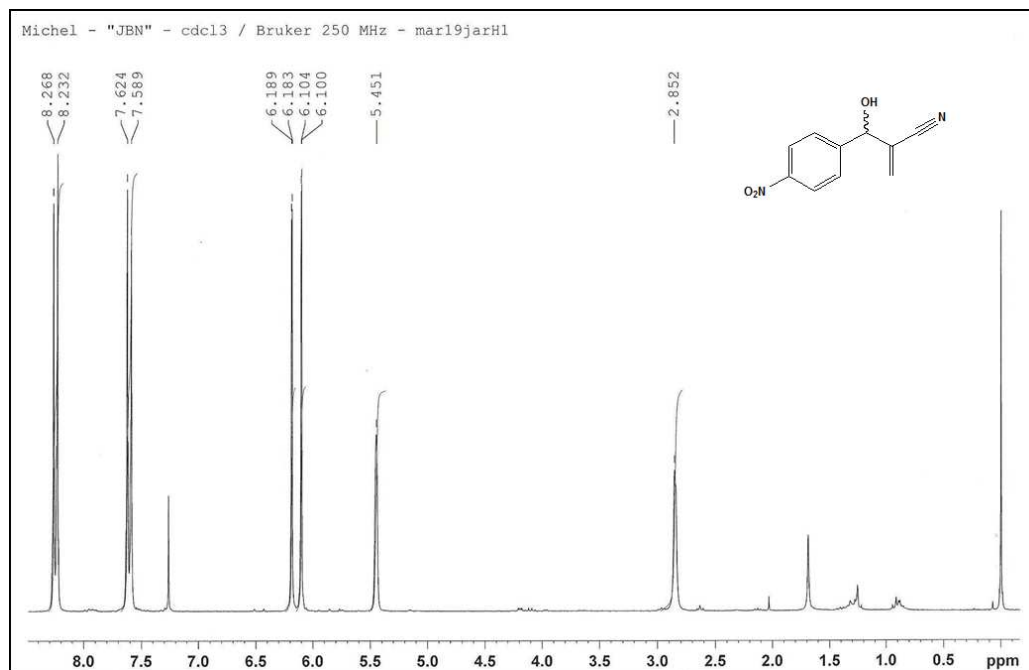
Anexo 32. Espectro de RMN de C¹³ (62,5 MHz, CDCl₃) do acrilonitrilil-2-[hidroxi(4-clorofenil)metil] 30i.



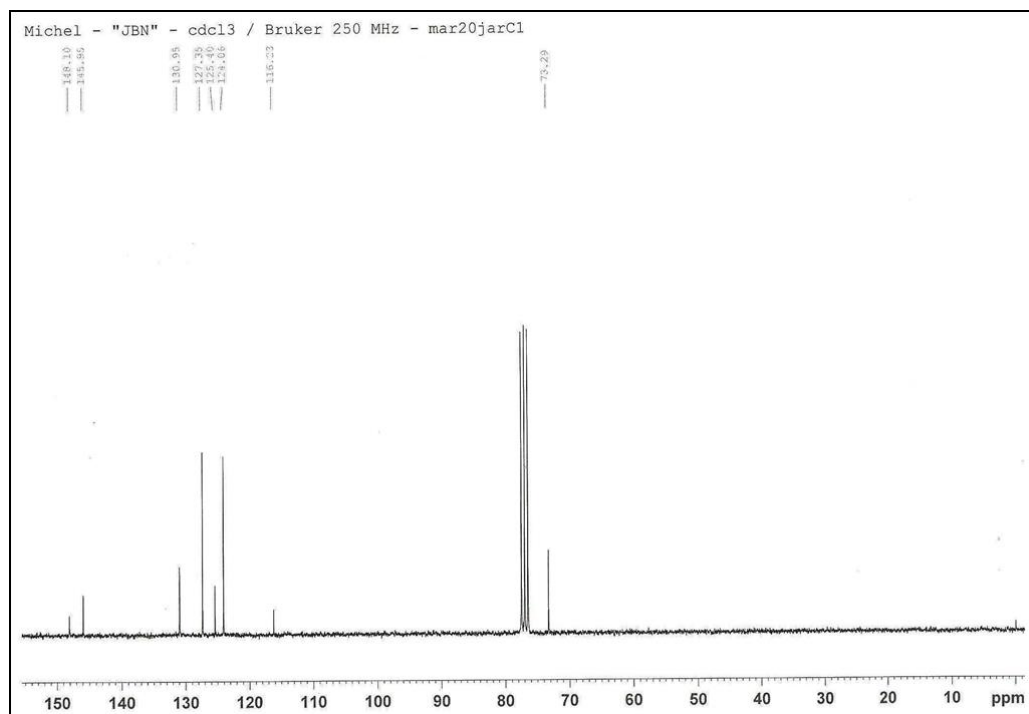
Anexo 33. Espectro de EM (70eV) do acrilonitrilil-2-[hidroxi(4-nitrofenil)metil] **30j**.



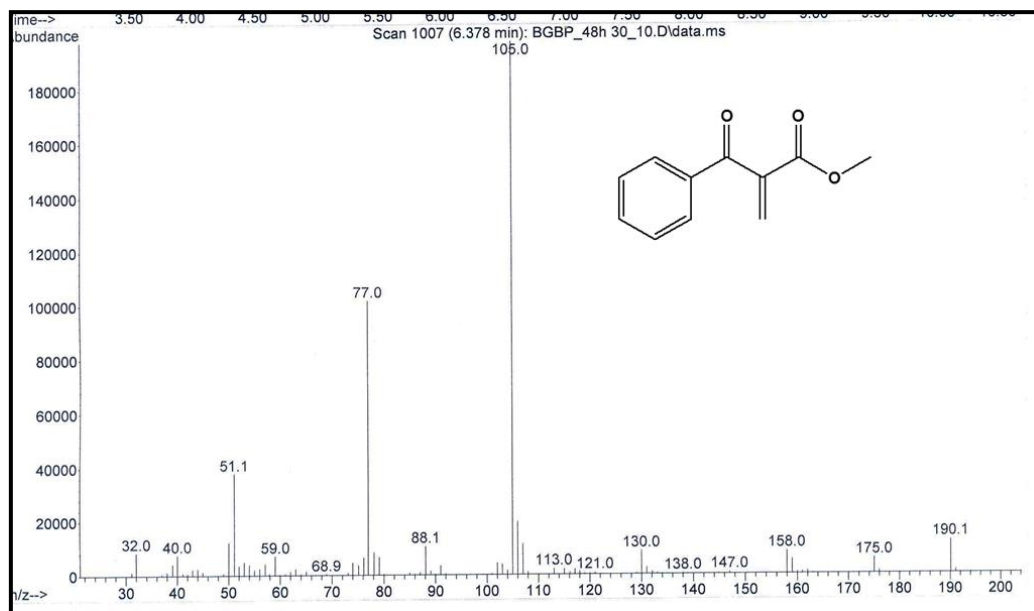
Anexo 34. Espectro de infravermelho (KBr) do acrilonitrilil-2-[hidroxi(4-nitrofenil)metil] **30j**.



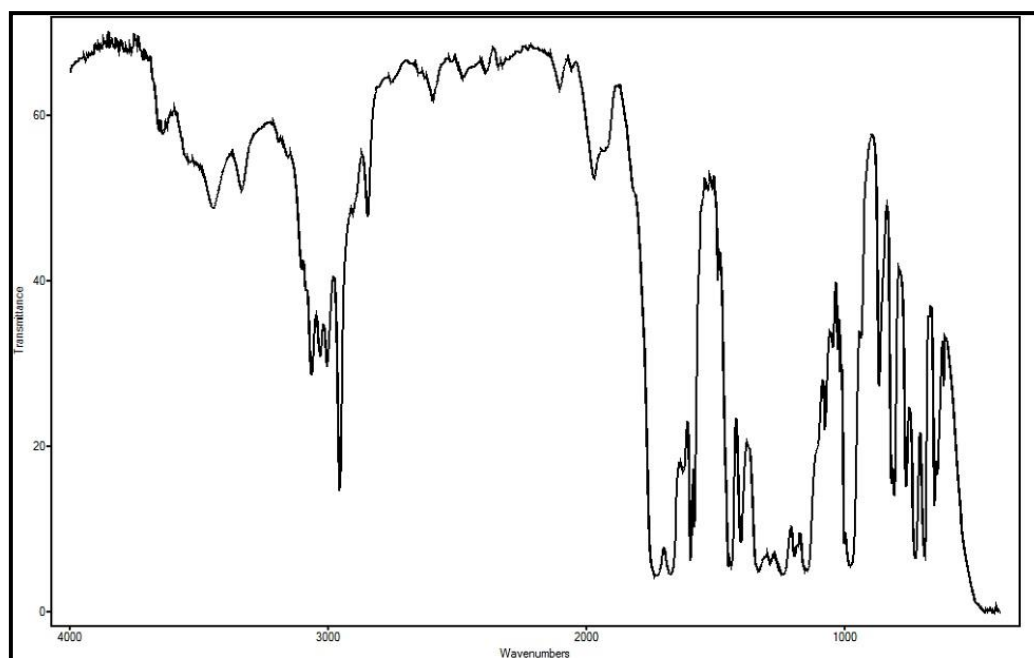
Anexo 35. Espectro de RMN de H¹ (250 MHz, CDCl₃) do acrilonitrilil-2-[hidroxi(4-nitrofenil)metil] 30j.



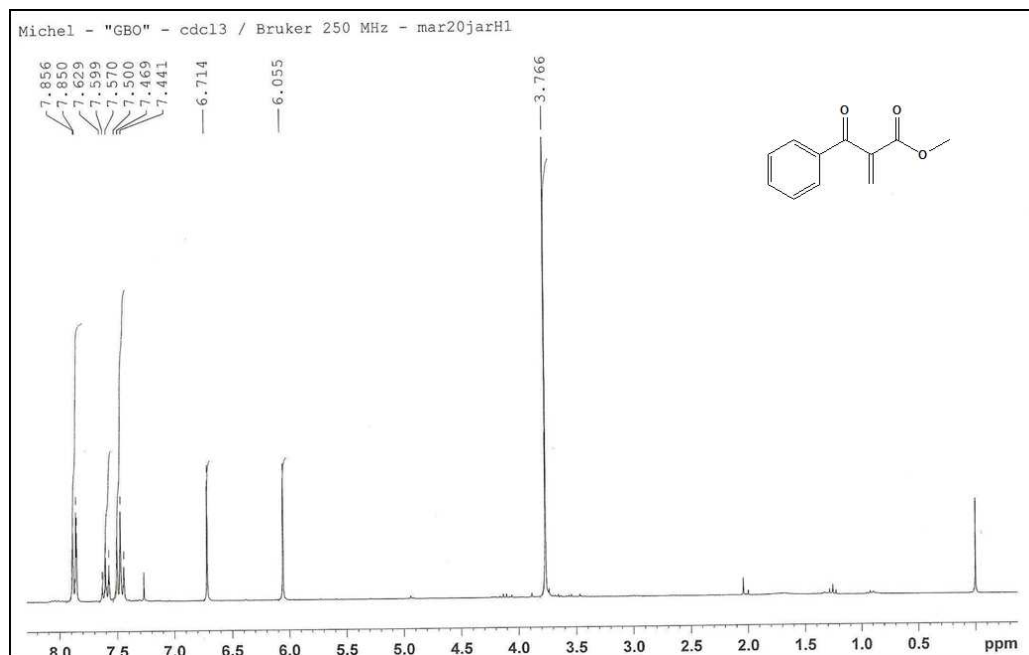
Anexo 36. Espectro de RMN de C¹³ (250 MHz, CDCl₃) do acrilonitrilil-2-[hidroxi(4-nitrofenil)metil] 30j.



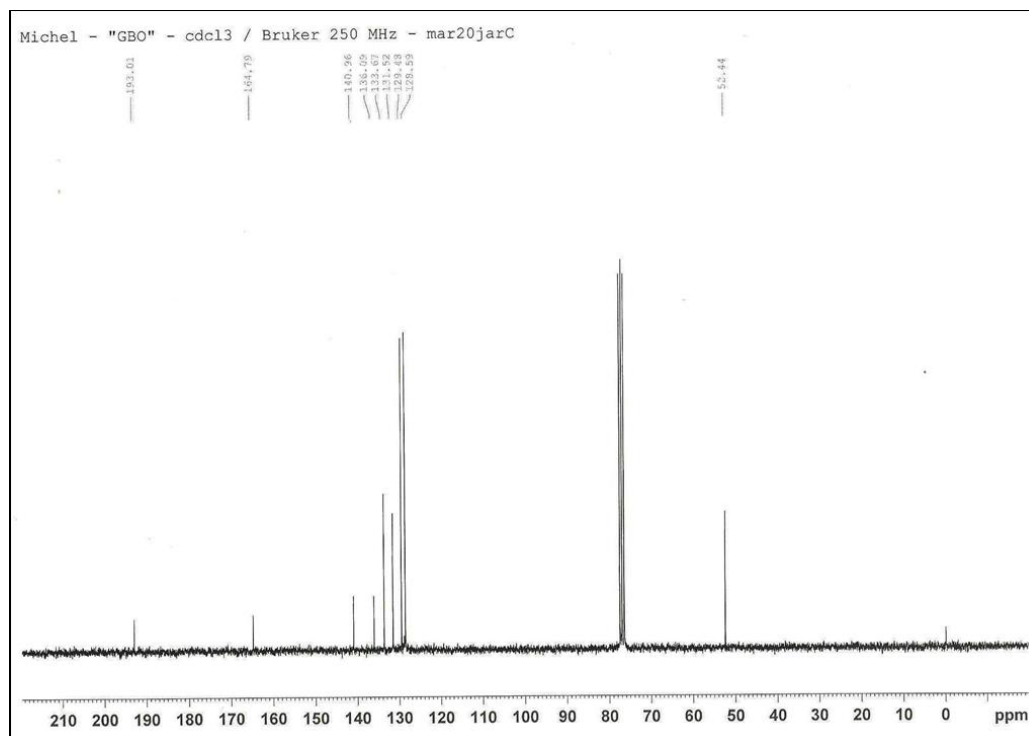
Anexo 37. Espectro de EM (70eV) do 2-(benzoiil)-prop-2-enoato de metila **31a**.



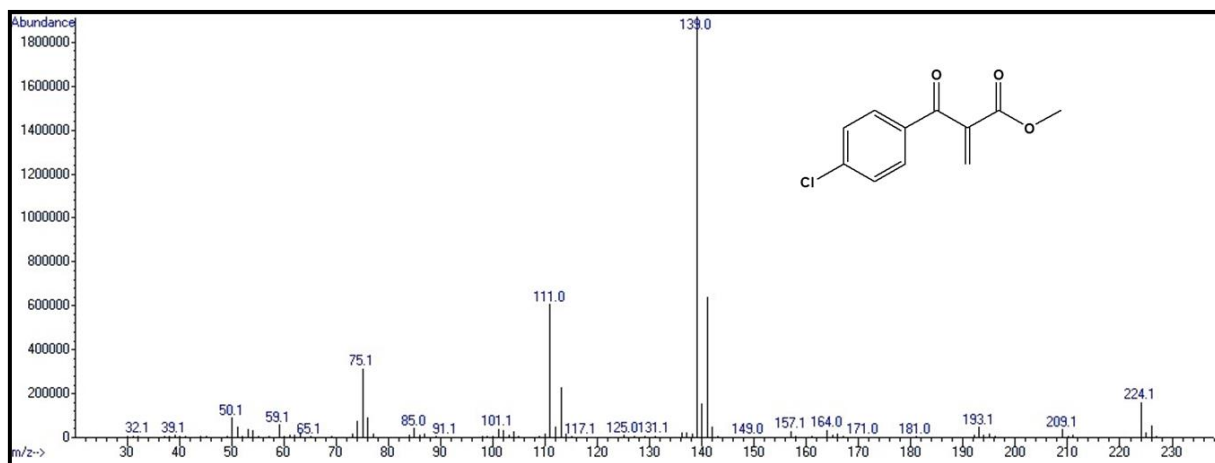
Anexo 38. Espectro de infravermelho (NaCl) 2-(benzoiil)-prop-2-enoato de metila **31a**.



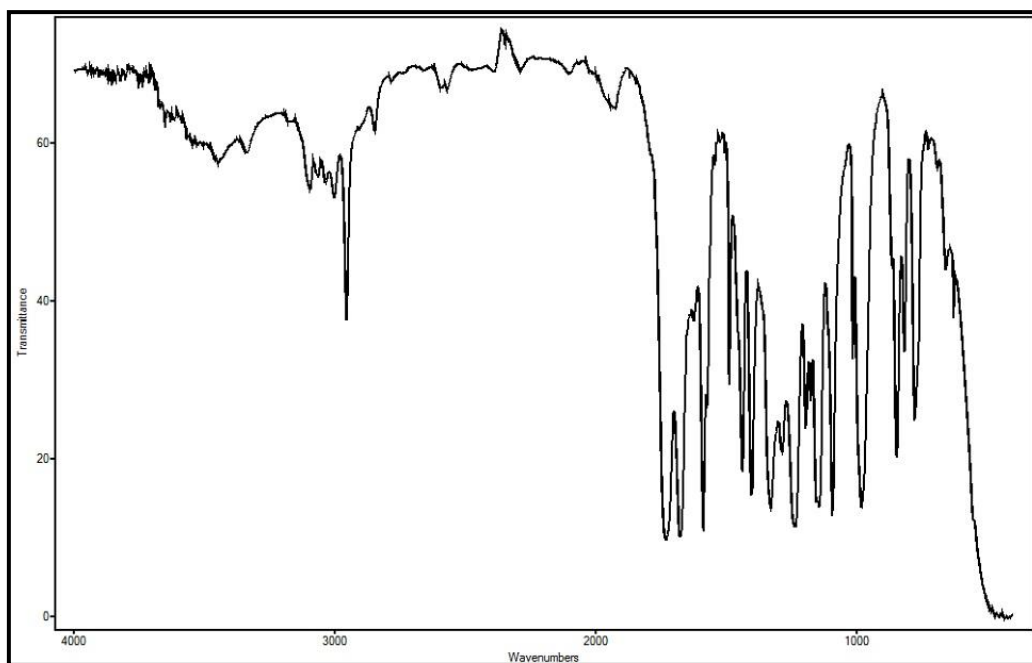
Anexo 39. Espectro de RMN de H¹ (250 MHz, CDCl₃) do 2-(benzoil)-prop-2-enoato de metila 31a.



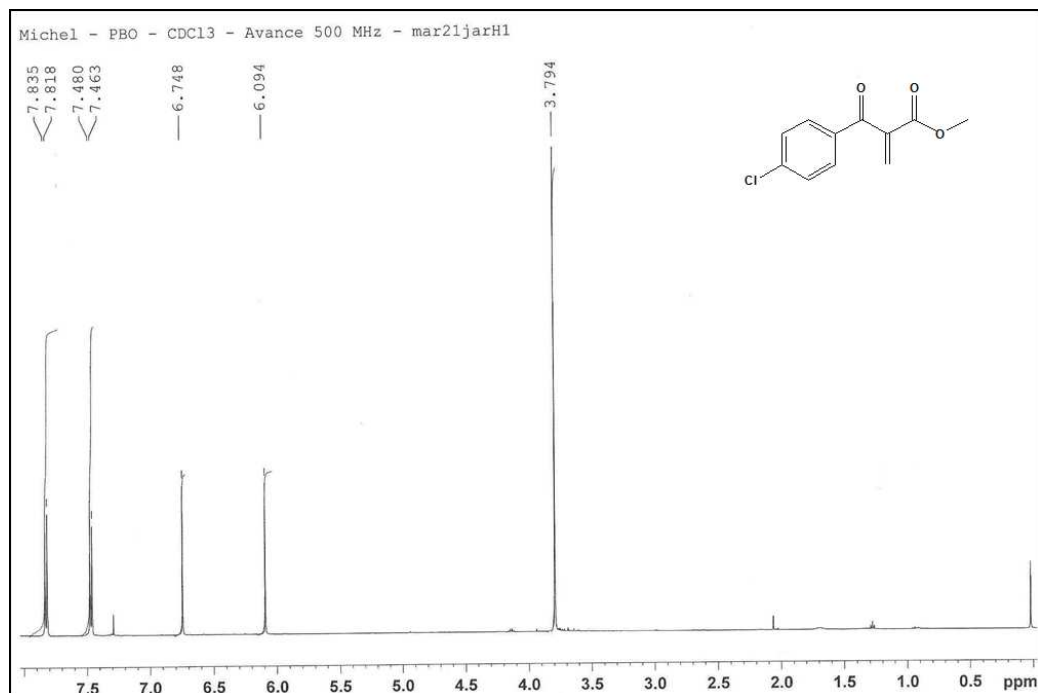
Anexo 40. Espectro de RMN de C¹³ (62,5 MHz, CDCl₃) do 2-(benzoil)-prop-2-enoato de metila 31a.



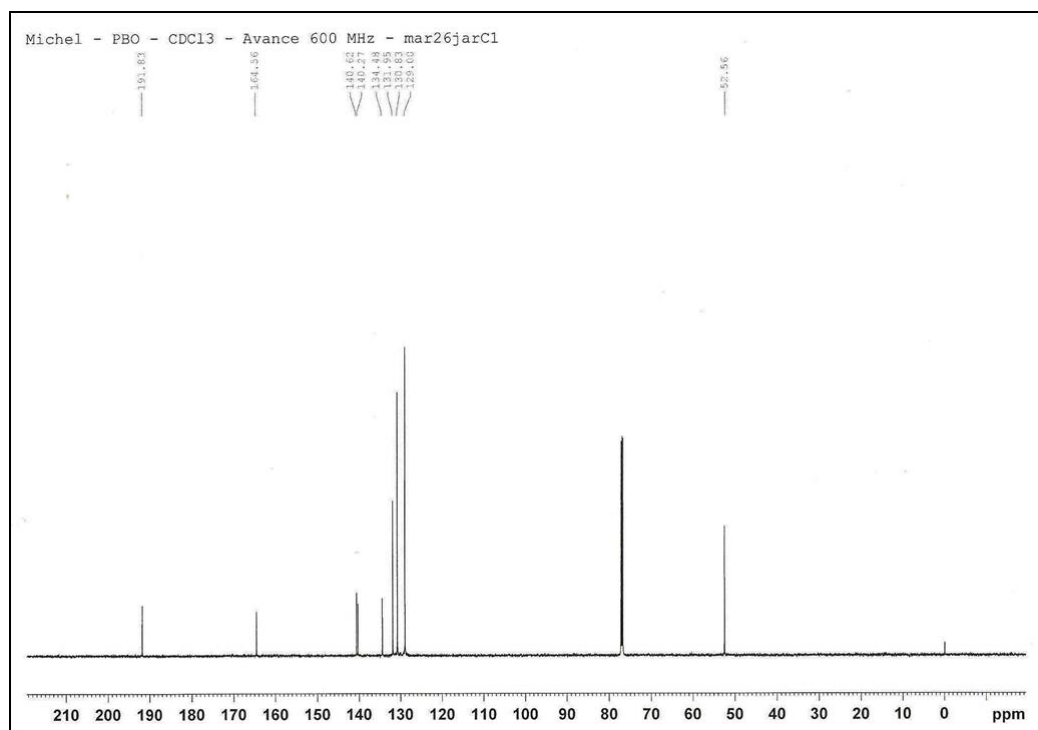
Anexo 41. Espectro de EM (70 eV) do 2-[(4-clorofenil)carbonil]-prop-2-enoato de metila **31b**.



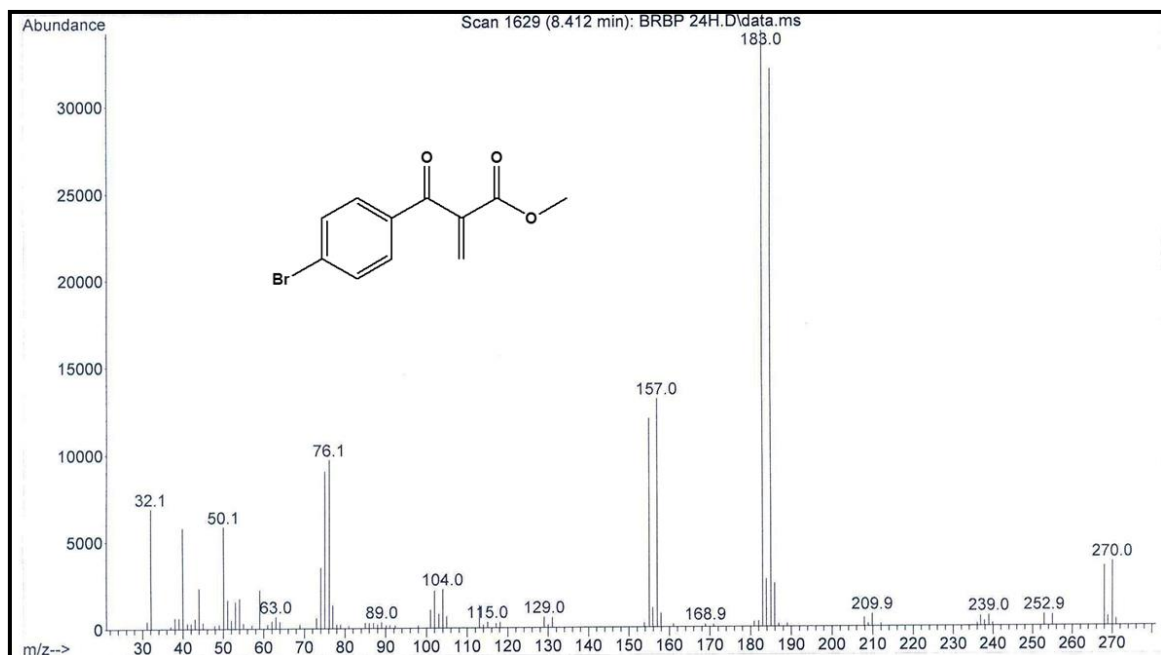
Anexo 42. Espectro de infravermelho (NaCl) do 2-[(4-clorofenil)carbonil]-prop-2-enoato de metila **31b**.



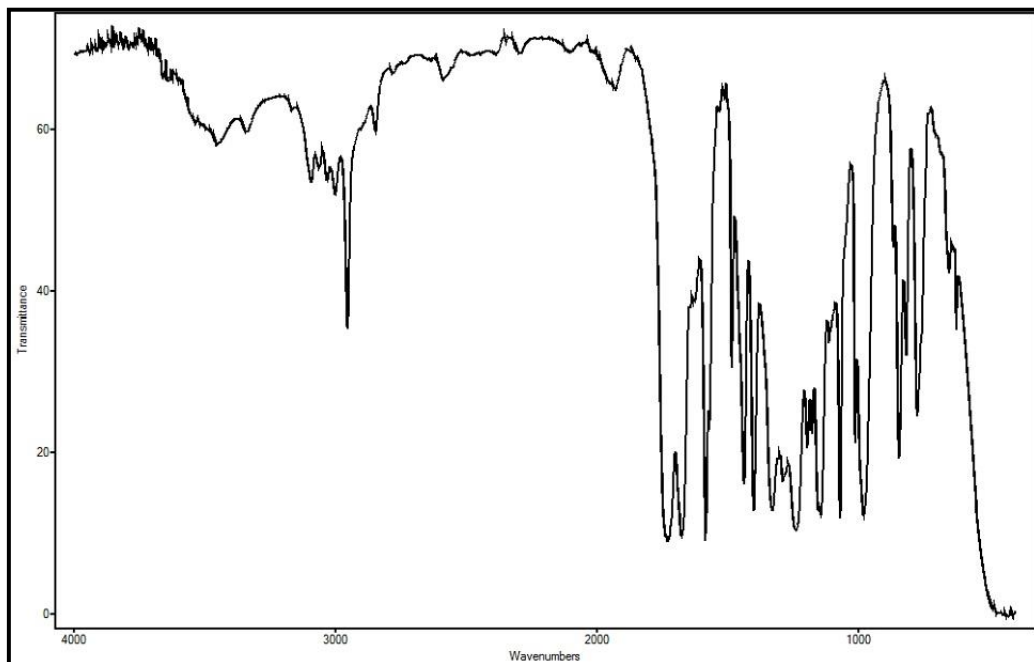
Anexo 43. Espectro de RMN de H^1 (500 MHz, $CDCl_3$) do 2-[(4-clorofenil)carbonil]-prop-2-enoato de metila **31b**.



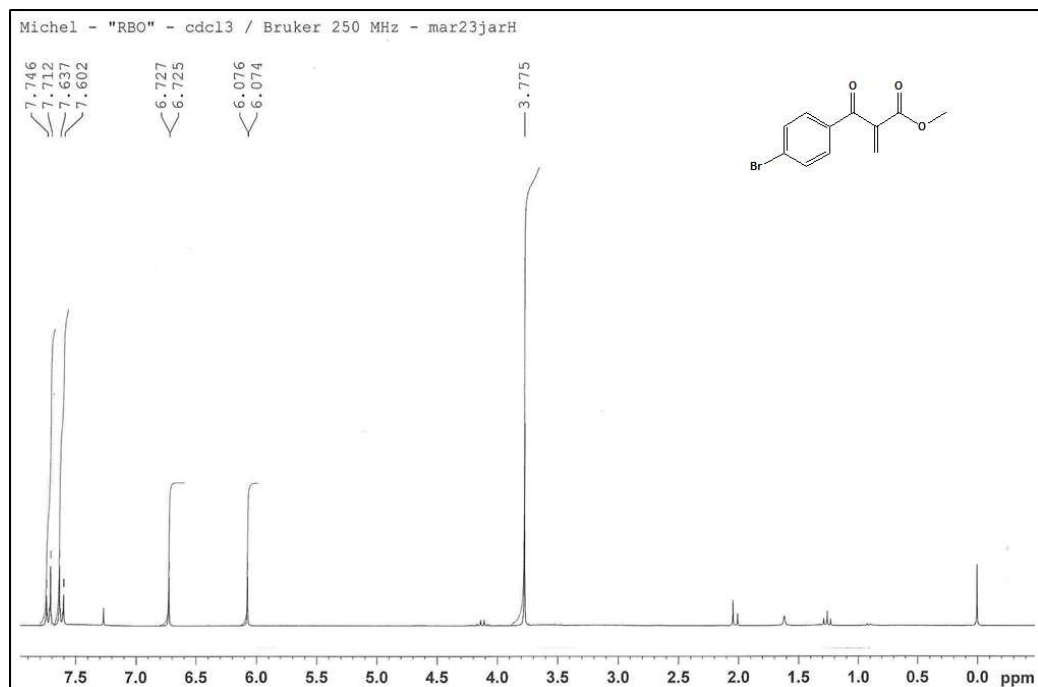
Anexo 44. Espectro de RMN de C^{13} (150 MHz, $CDCl_3$) do 2-[(4-clorofenil)carbonil]-prop-2-enoato de metila **31b**.



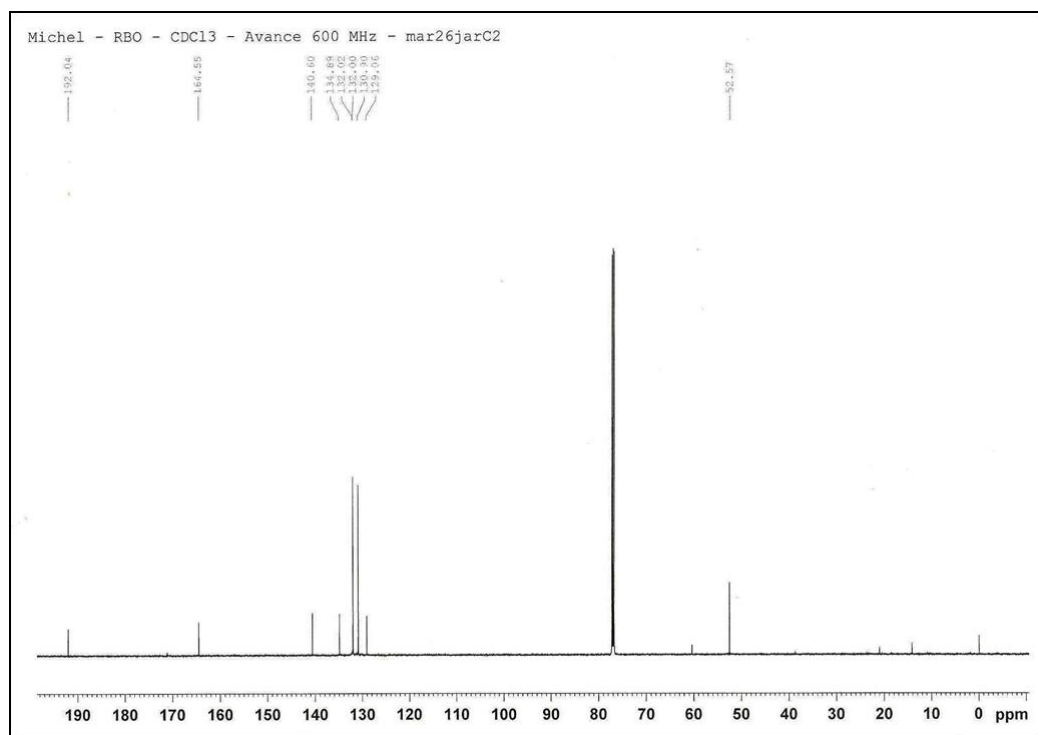
Anexo 45. Espectro de EM (70eV) do 2-[(4-bromofenil)carbonyl]-prop-2-enoato de metila **31c**.



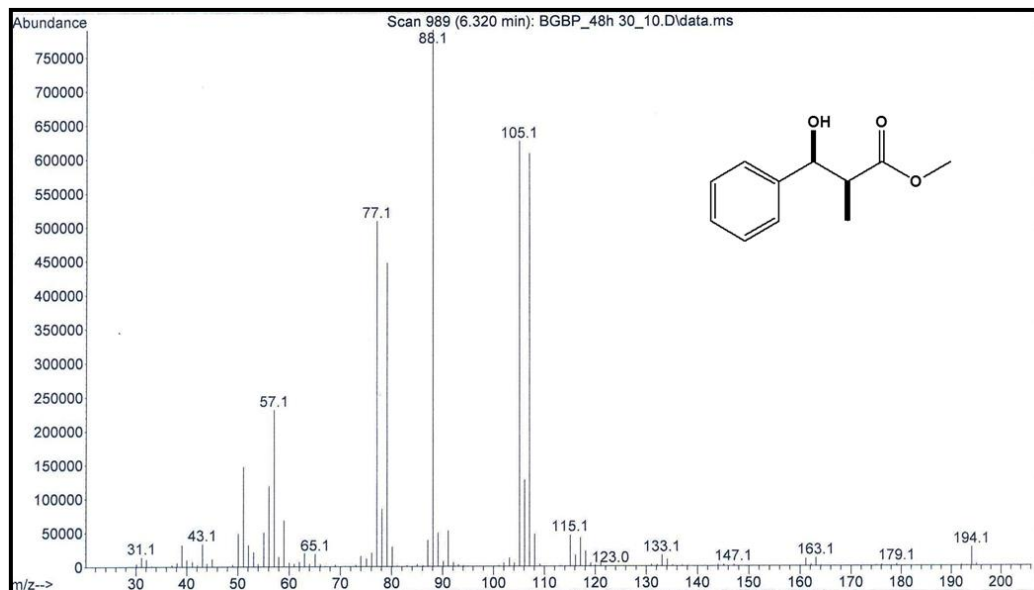
Anexo 46. Espectro de infravermelho (NaCl) do 2-[(4-bromofenil)carbonyl]-prop-2-enoato de metila **31c**.



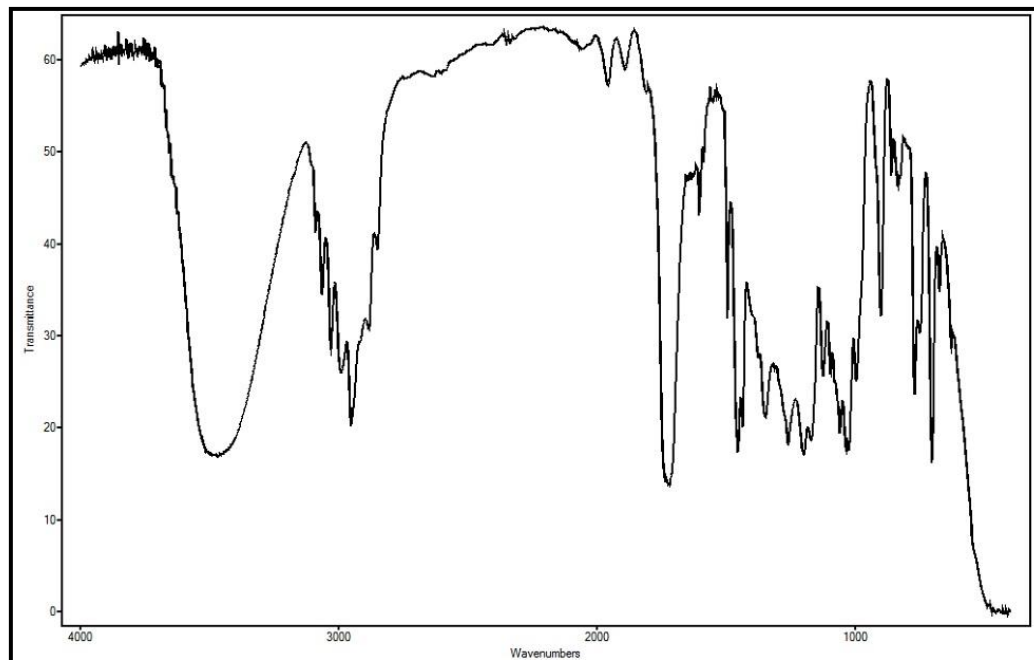
Anexo 47. Espectro de RMN de H^1 (250 MHz, $CDCl_3$) do 2-[(4-bromofenil)carbonil] -prop-2-enoato de metila **31c**.



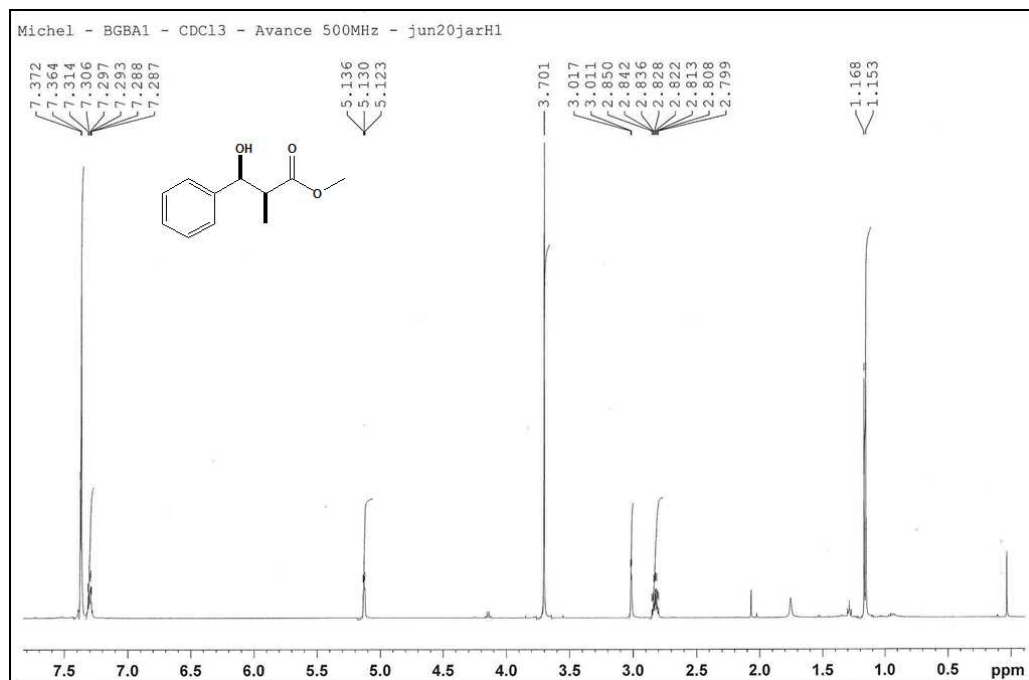
Anexo 48. Espectro de RMN de H^1 (150 MHz, $CDCl_3$) do 2-[(4-bromofenil)carbonil] -prop-2-enoato de metila **31c**.



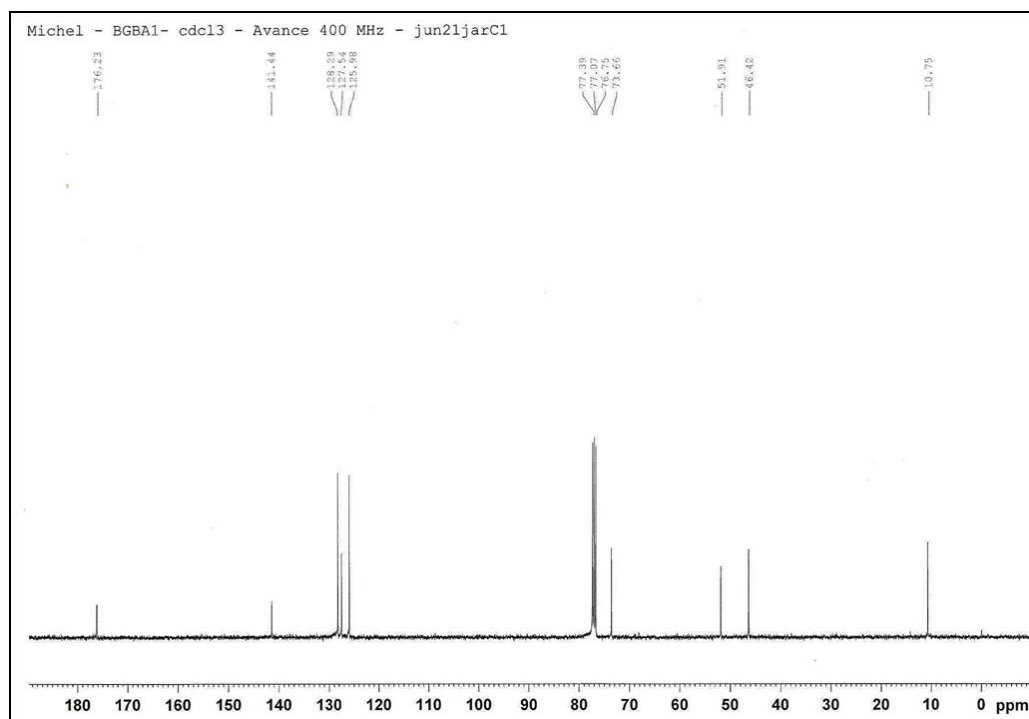
Anexo 49. Espectro de EM (70eV) do (-)-(2S,3S)-3-fenil-3-hidroxi-2-metil-propanoato de metila **34a**.



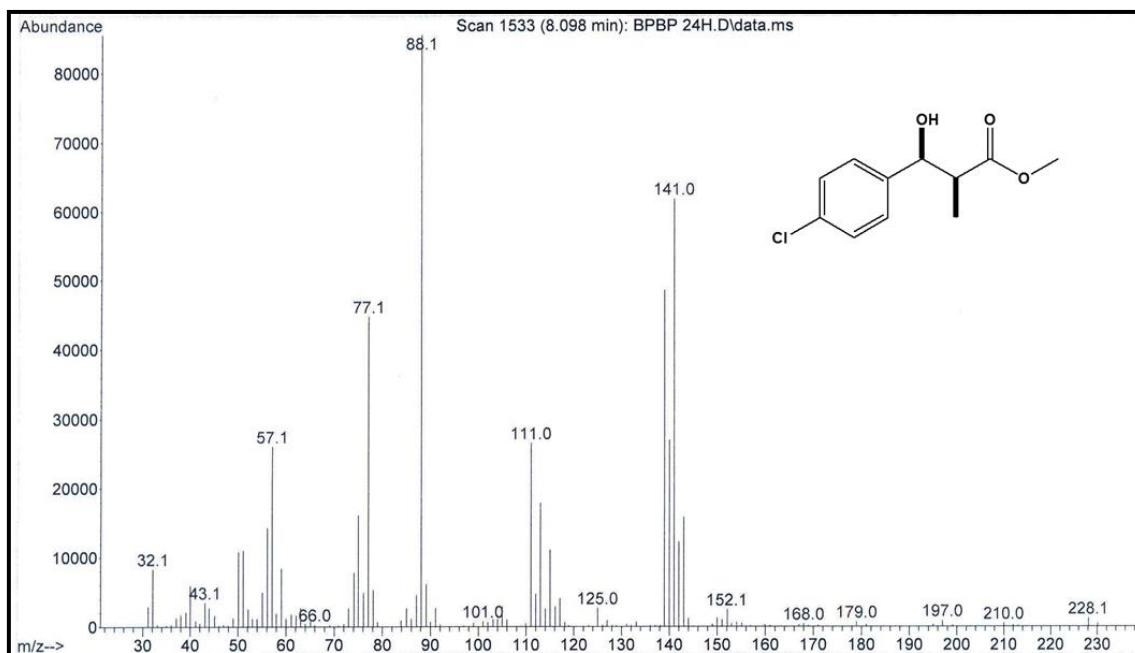
Anexo 50. Espectro de infravermelho (NaCl) do (-)-(2S,3S)-3-hidroxi-3-fenil-2-metil-propanoato de metila **34a**.



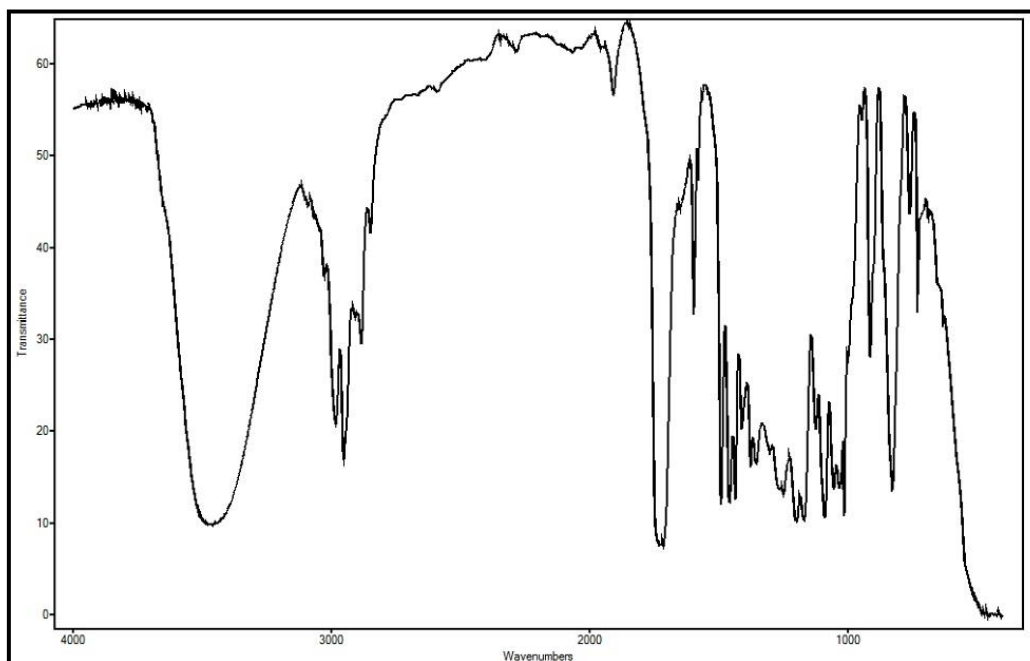
Anexo 51. Espectro de RMN de H^1 (500 MHz, $CDCl_3$) do (-)-(2S,3S)-3-fenil-3-hidroxi-2-metilpropanoato de metila **34a**.



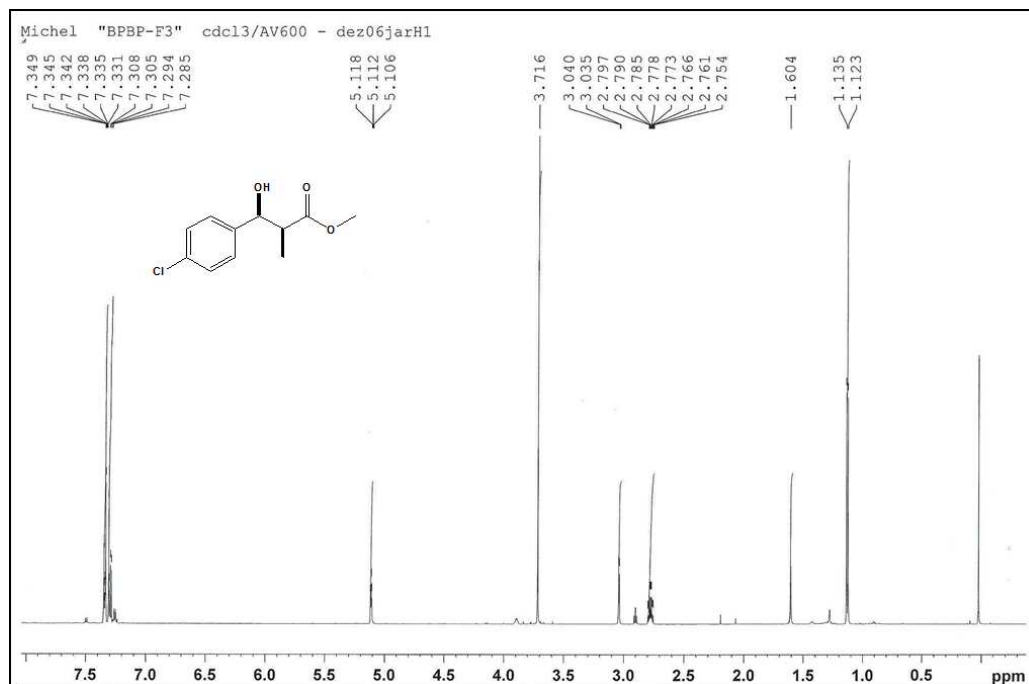
Anexo 52. Espectro de RMN de C^{13} (100 MHz, $CDCl_3$) do (-)-(2S,3S)-3-fenil-3-hidroxi-2-metilpropanoato de metila **34a**.



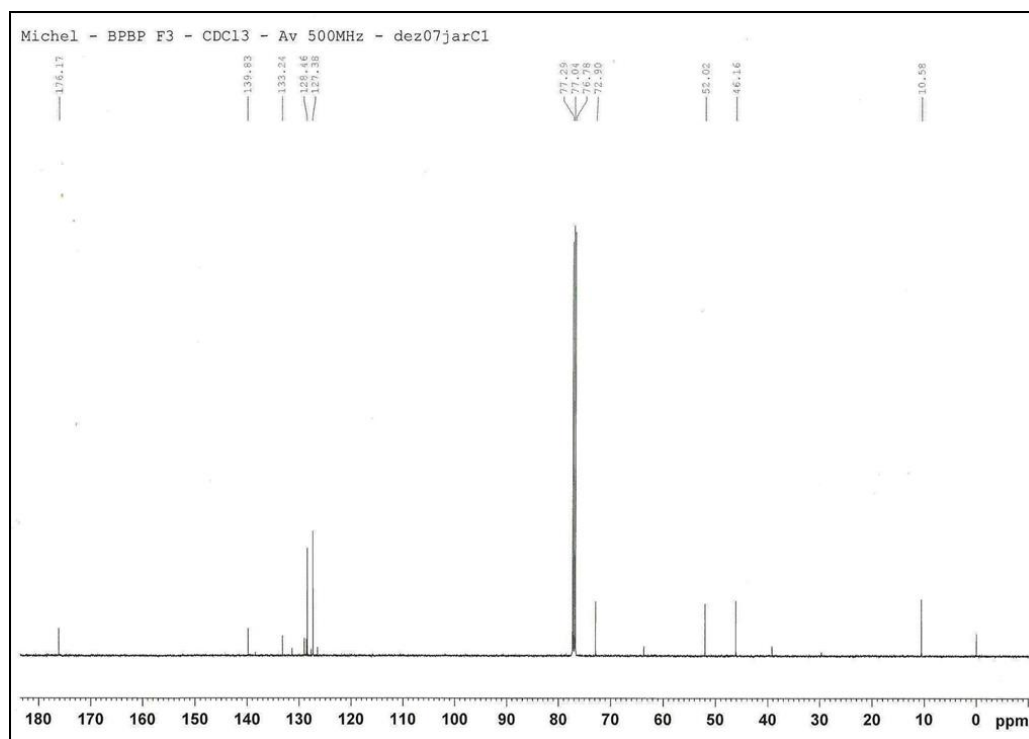
Anexo 53. Espectro de EM (70eV) do (-)-(2S,3S)-3-(4-clorofenil)-3-hidroxi-2-metil-propanoato de metila **34b**.



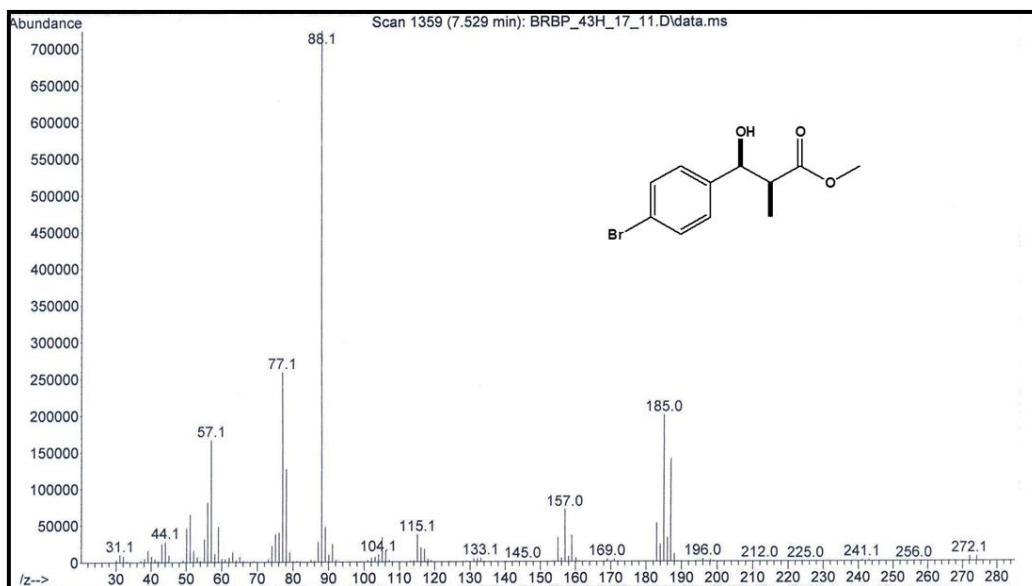
Anexo 54. Espectro de infravermelho (NaCl) do (-)-(2S,3S)-3-(4-clorofenil)-3-hidroxi-2-metil-propanoato de metila **34b**.



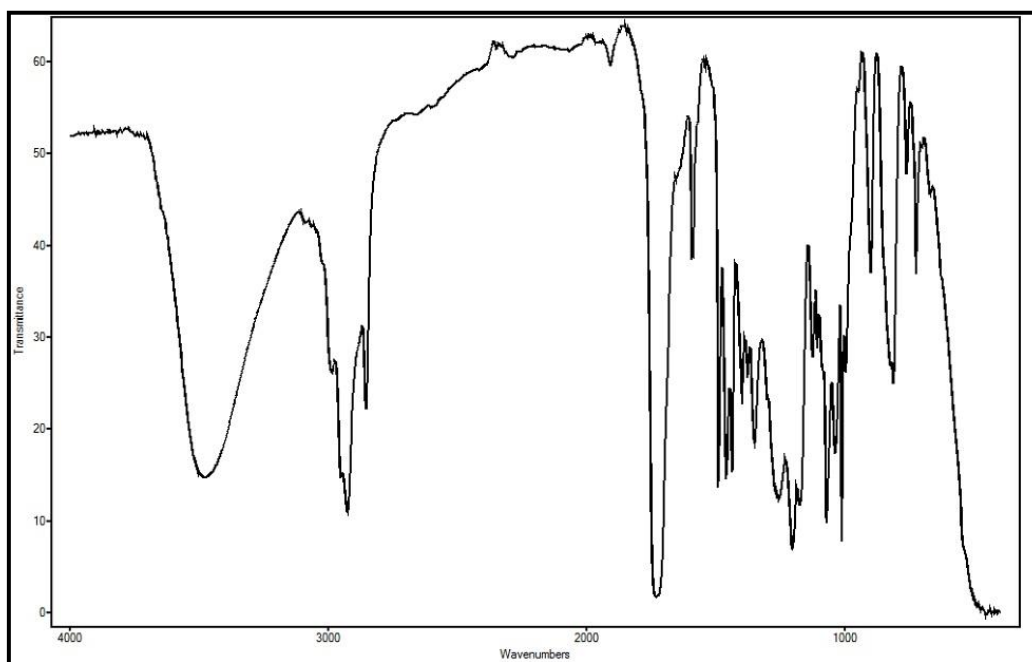
Anexo 55. Espectro de RMN de H^1 (600 MHz, $CDCl_3$) do (-)-(2S,3S)-3-(4-clorofenil)-3-hidroxi-2-metil-propanoato de metila **34b**.



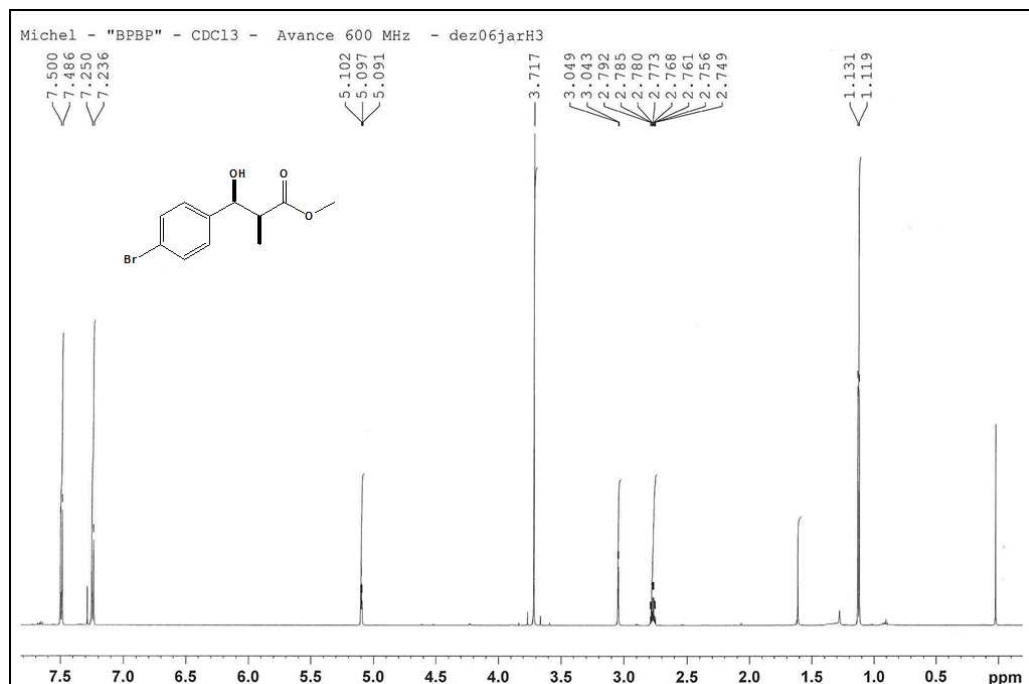
Anexo 56. Espectro de RMN de C^{13} (125 MHz, $CDCl_3$) do (-)-(2S,3S)-3-(4-clorofenil)-3-hidroxi-2-metil-propanoato de metila **34b**.



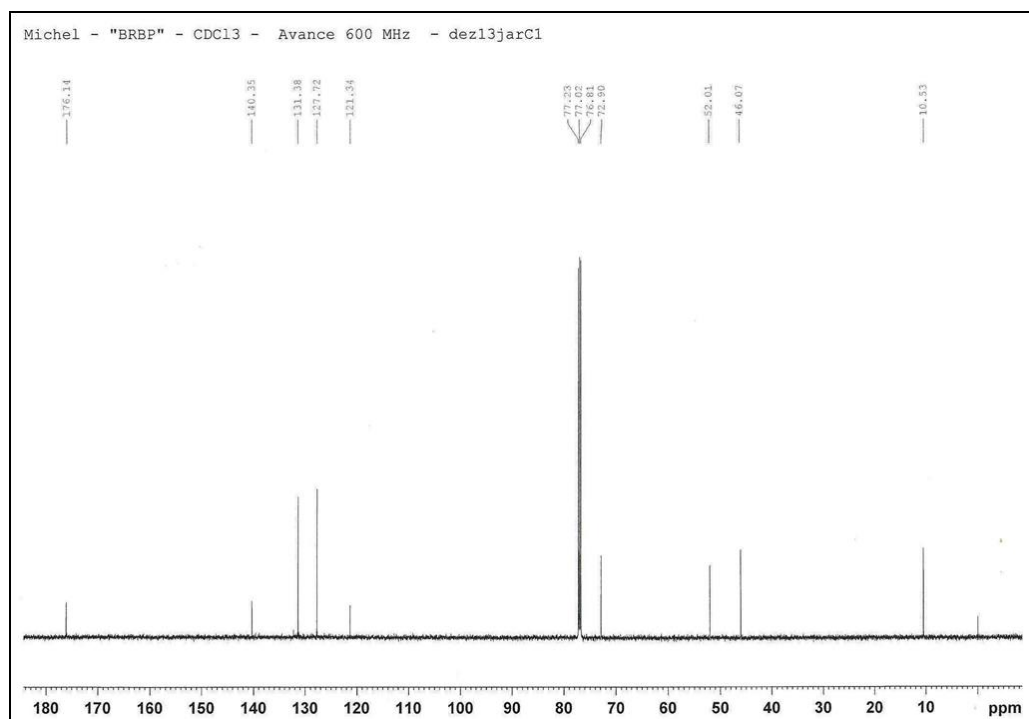
Anexo 57. Espectro de EM (70eV) do (-)-(2S,3S)-3-(4-bromofenil)-3-hidroxi-2-metil-propanoato de metila **34c**.



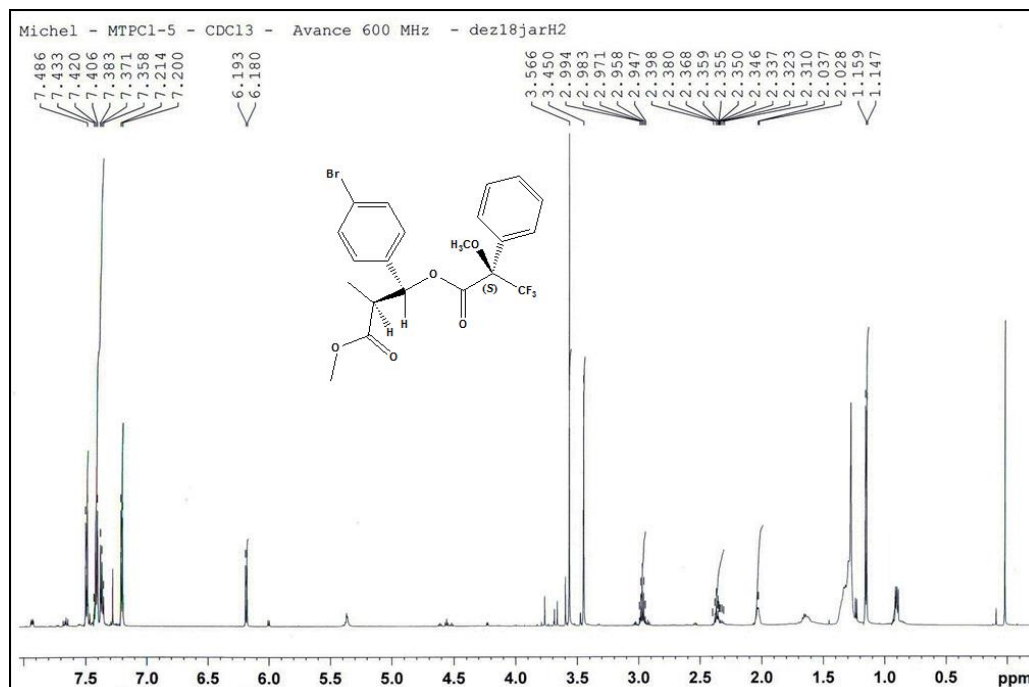
Anexo 58. Espectro de infravermelho (NaCl) do (-)-(2S,3S)-3-(4-bromofenil)-3-hidroxi-2-metil-propanoato de metila **34c**.



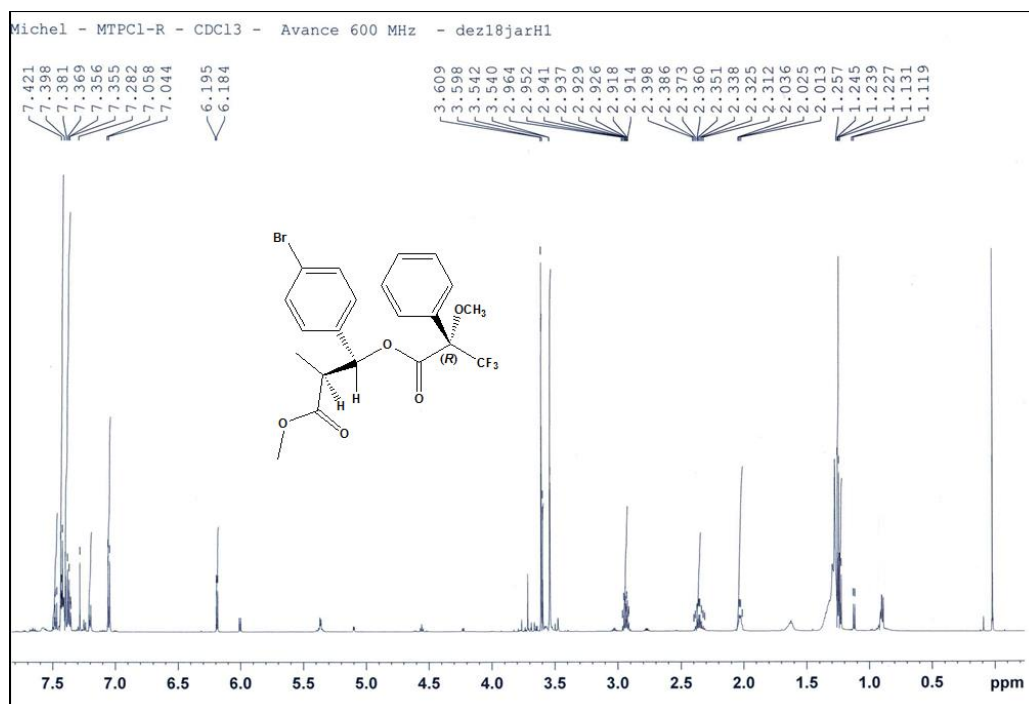
Anexo 59. Espectro de RMN de H¹ (600 MHz, CDCl₃) do (-)-(2*S*,3*S*)-3-(4-bromofenil)-3-hidroxi-2-metil-propanoato de metila **34c**.



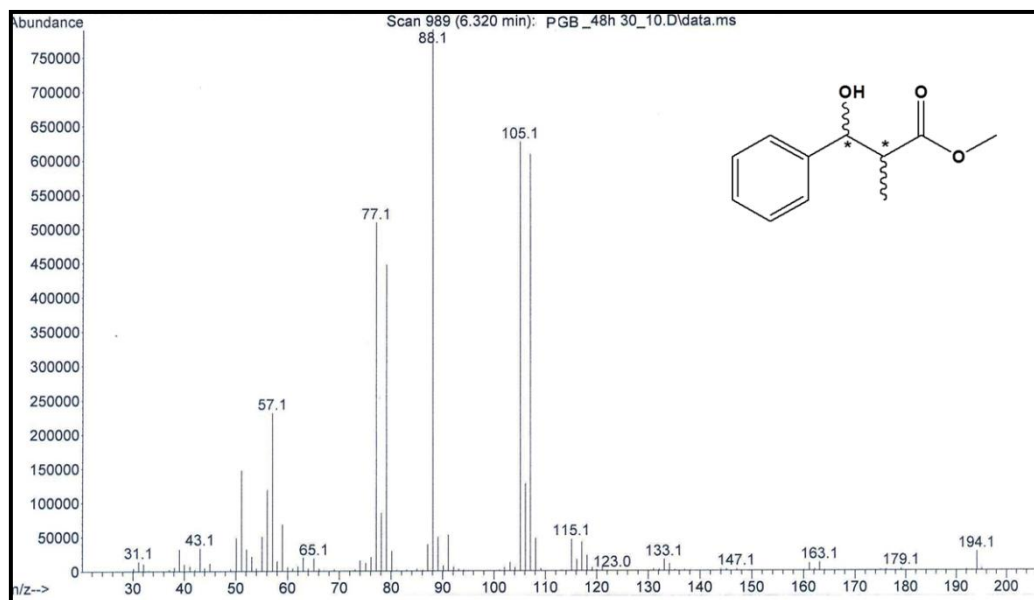
Anexo 60. Espectro de RMN de C¹³ (150 MHz, CDCl₃) (-)-(2*S*,3*S*)-3-(4-bromofenil)-3-hidroxi-2-metil-propanoato de metila **34c**.



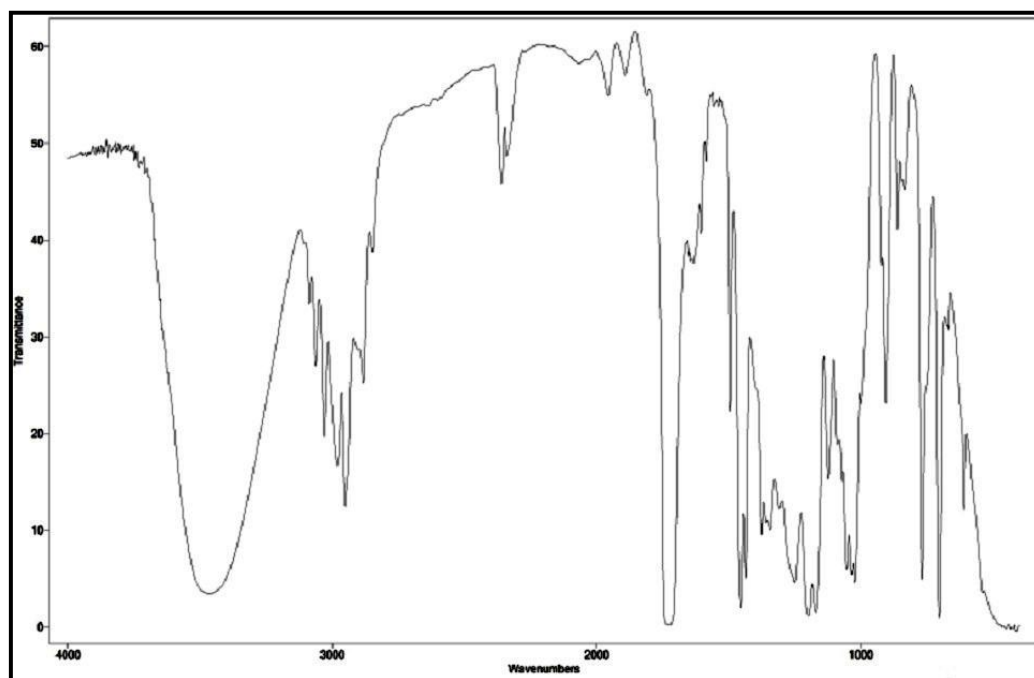
Anexo 61. Espectro de RMN de H¹ (600 MHz, CDCl₃) do (2*S*, 3*S*, 2'*S*)-3-(2'-metoxi-2'-trifluor-2'-fenilacetil)-3-(4-bromofenil)-2-metil-propanoato de metila .



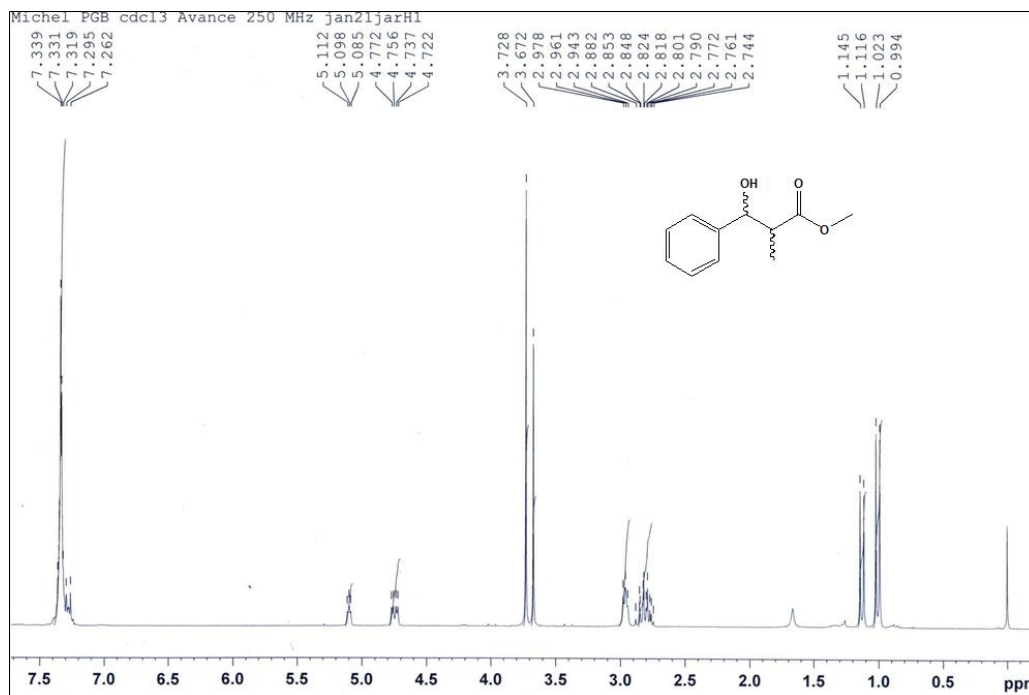
Anexo 62. Espectro de RMN de H¹ (600 MHz, CDCl₃) do (2*S*, 3*S*, 2'*R*)-3-(2'-metoxi-2'-trifluor-2'-fenilacetil)-3-(4-bromofenil)-2-metil-propanoato de metila.



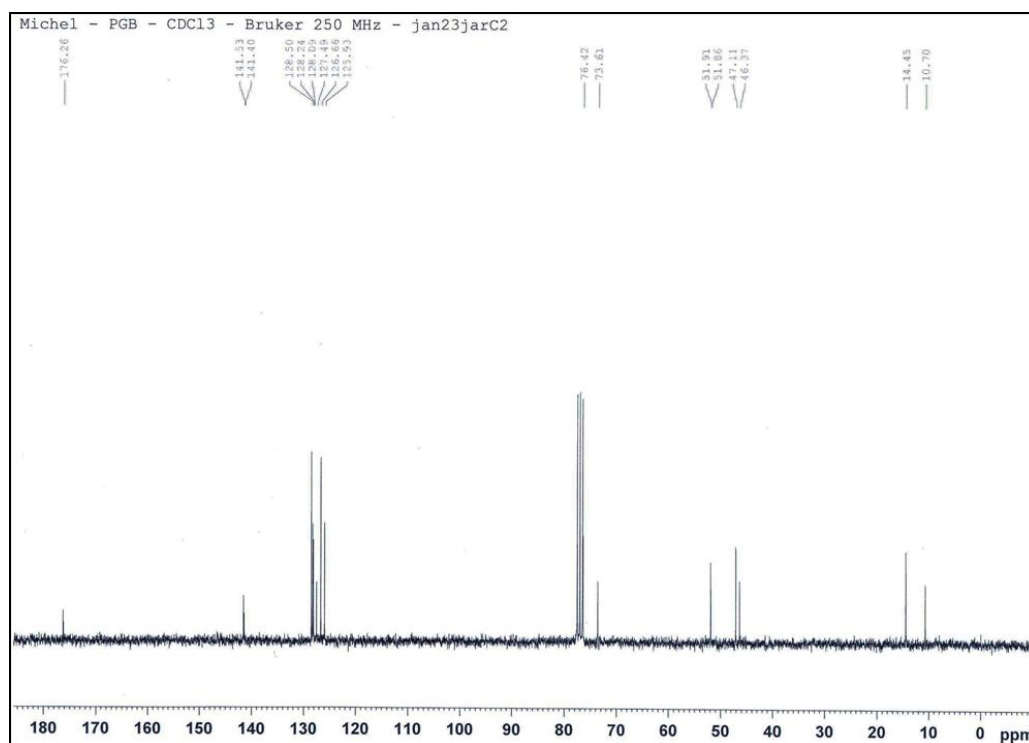
Anexo 63. Espectro de EM (70eV) do (±)-3-fenil-3-hidroxi -2-metil-propanoato de metila.



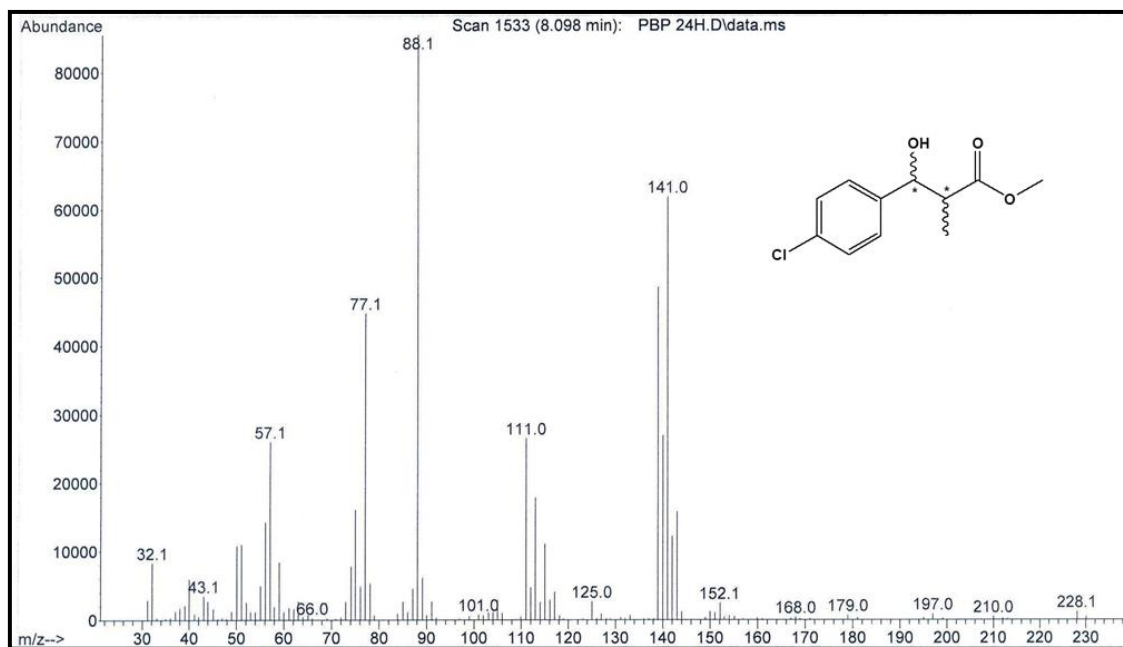
Anexo 64. Espectro de infravermelho (NaCl) do (±)-3-fenil-3-hidroxi -2-metil-propanoato de metila.



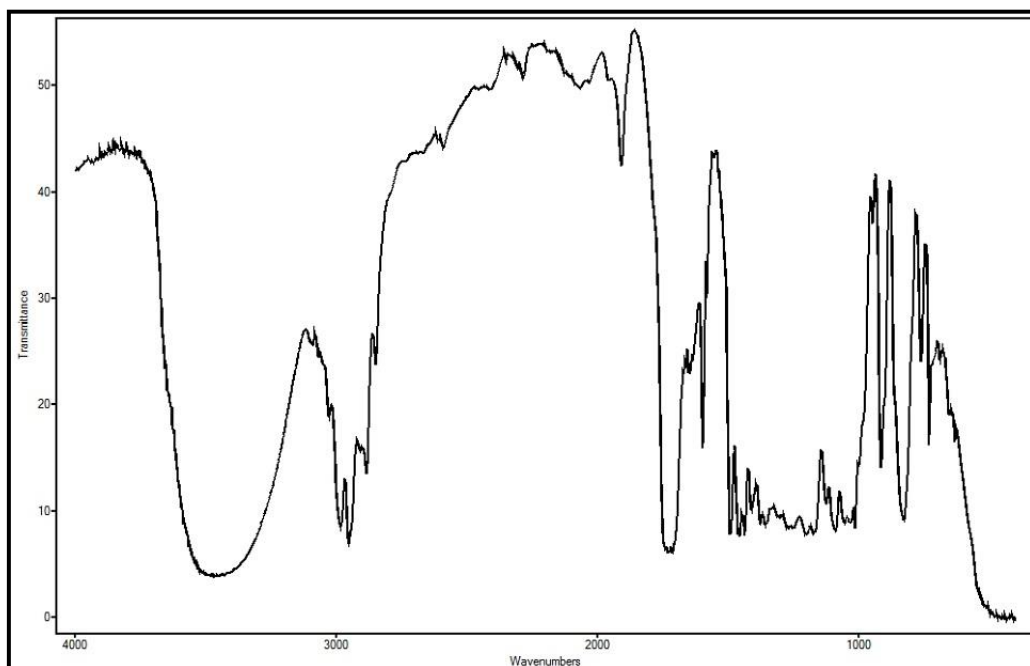
Anexo 65. Espectro de RMN de H^1 (250 MHz, $CDCl_3$) do (\pm)-3-fenil-3-hidroxi -2-metilpropanoato de metila.



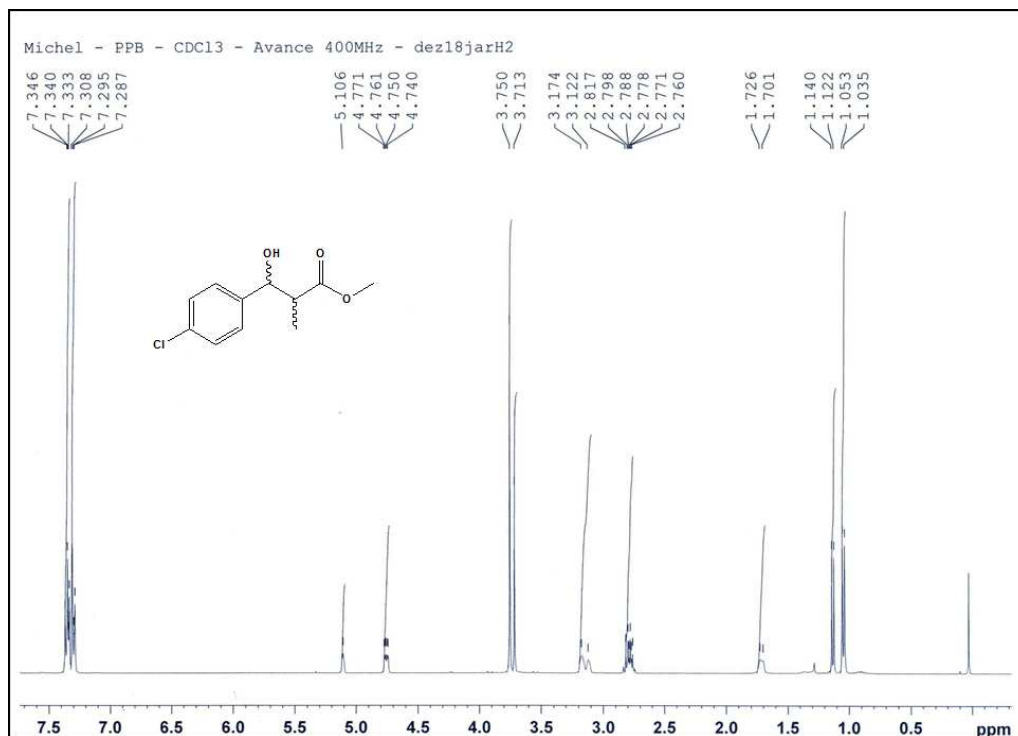
Anexo 66. Espectro de RMN de C^{13} (62,5 MHz, $CDCl_3$) do (\pm)-3-fenil-3-hidroxi-2-metilpropanoato de metila.



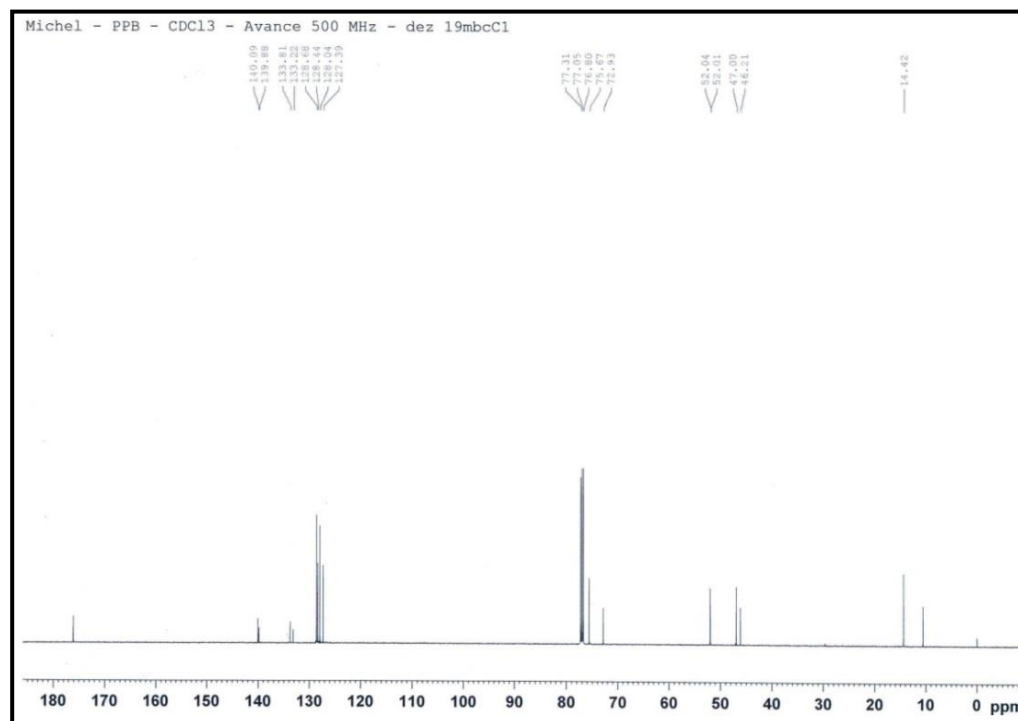
Anexo 67. Espectro de EM (70eV) do do (\pm)-3-(4-clorofenil)-3-hidroxi-2-metil-propanoato de metila.



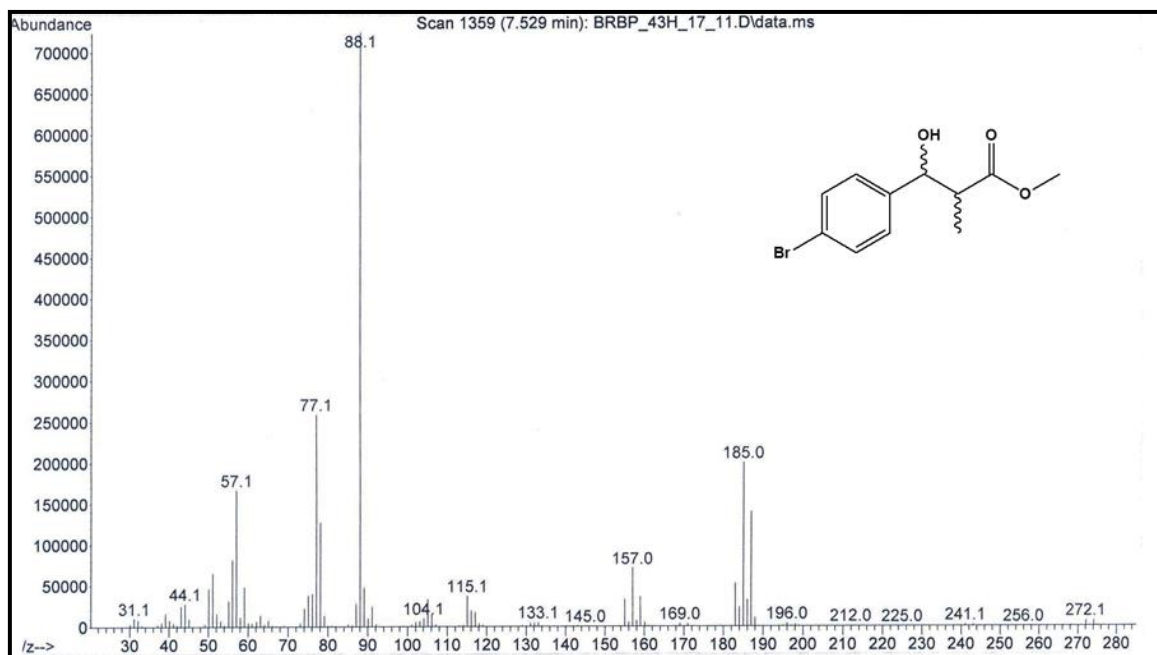
Anexo 68. Espectro de infravermelho (NaCl) do do (\pm)-3-(4-clorofenil)-3-hidroxi-2-metil-propanoato de metila.



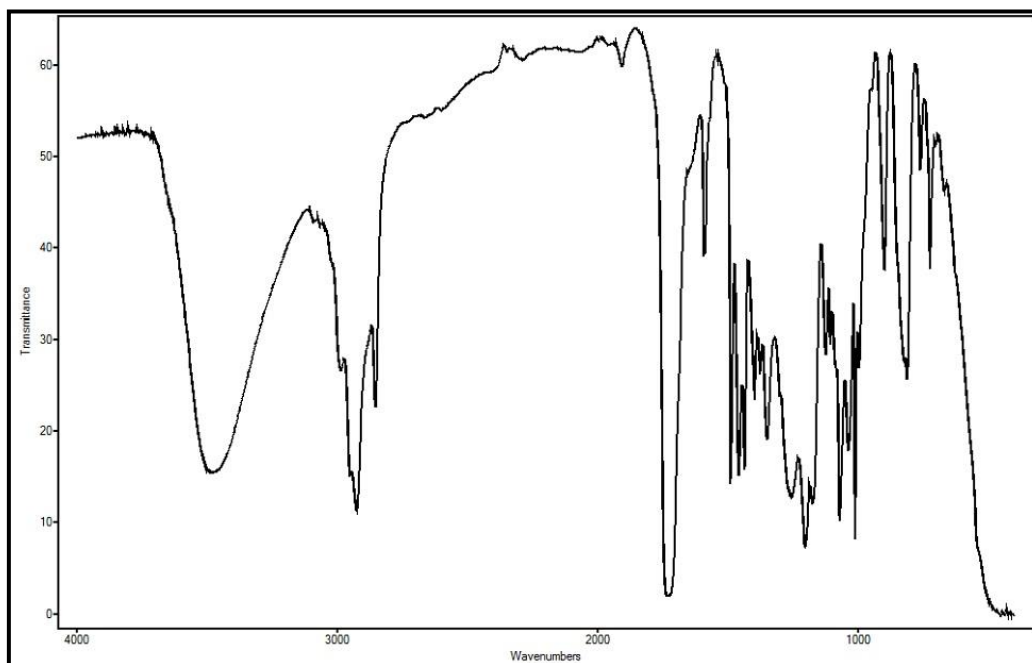
Anexo 69. Espectro de RMN de H¹ (250 MHz, CDCl₃) do do (±)-3-(4-clorofenil)-3-hidroxi-2-metil-propanoato de metila.



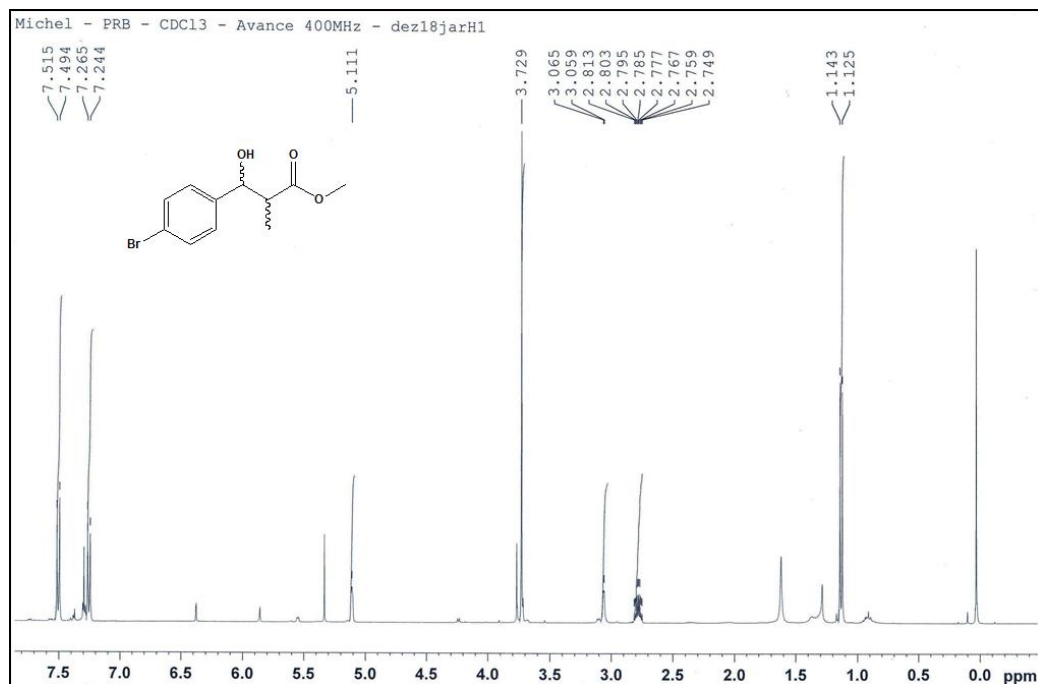
Anexo 70. Espectro de RMN de C¹³ (125 MHz, CDCl₃) do do (±)-3-(4-clorofenil)-3-hidroxi-2-metil-propanoato de metila.



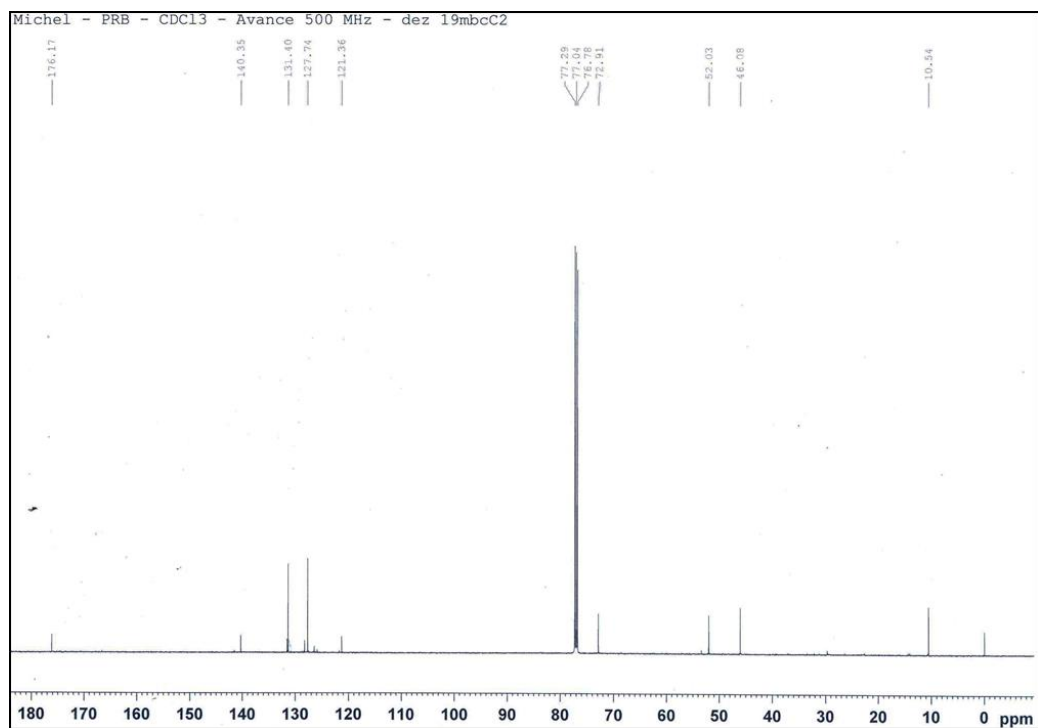
Anexo 71. Espectro de EM (70eV) do do (±)-3-(4-bromofenil)-3-hidroxi-2-metil-propanoato de metila.



Anexo 72. Espectro de infravermelho (NaCl) do do (±)-3-(4-bromofenil)-3-hidroxi-2-metil-propanoato de metila.



Anexo 73. Espectro de RMN de H¹ (400 MHz, CDCl₃) do do (±)-3-(4-bromofenil)-3-hidroxi-2-metil-propanoato de metila.



Anexo 74. Espectro de RMN de C¹³ (125 MHz, CDCl₃) do do (±)-3-(4-bromofenil)-3-hidroxi-2-metil-propanoato de metila.