

**Redução Microbiológica de Alfa-Ceto-Ésteres: Produção  
Enantiosseletiva de (*S*)- e de (*R*)-2-Hidroxi-4-Fenil-Butanoato  
de Etila**

por

**Paulo Sérgio Bergo de Lacerda**

Tese apresentada como um dos requisitos para a obtenção do grau de  
Doutor em Ciências, junto ao **Departamento de Química Orgânica do  
Instituto de Química da Universidade Federal do Rio de Janeiro,**

realizada sob a orientação dos Professores

**Prof. Dr. Edson Luiz da Silva Lima (DQO-IQ-UFRJ)**

e

**Prof. Dr. Octávio Augusto Ceva Antunes (DQI-IQ-UFRJ)**

Rio de Janeiro

Abril de 2005

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

Tese de Paulo Sérgio Bergo de Lacerda submetida à banca examinadora do Departamento de Química Orgânica do Instituto de Química da Universidade Federal do Rio de Janeiro como parte dos quesitos necessários para a obtenção do grau de Doutor em Ciências

**Orientadores:**

---

**Prof. Dr. Edson Luiz da Silva Lima (DQO-IQ-UFRJ)**

---

**Prof. Dr. Octávio Augusto Ceva Antunes (DQI-IQ-UFRJ)**

**Banca Examinadora:**

---

**Dr. Jean Pierre Férézou (IPD-Farma)**

---

**Prof. Dr. Vítor Francisco Ferreira (IQ-UFF)**

---

**Prof. Dr. João Francisco Cajaíba da Silva (IQ-UFRJ)**

---

**Profa. Dra. Cláudia Moraes de Rezende (IQ-UFRJ)**

---

**Profa. Dra. Selma Gomes Ferreira Leite (EQ-UFRJ)**

---

**Prof. Dr. Joel Jones Junior (IQ-UFRJ)**

Rio de Janeiro, 08 de abril de 2005

**Tese desenvolvida no Departamento de Química Orgânica do Instituto de Química da Universidade Federal do Rio de Janeiro, no Laboratório de Tecnologia Enzimática do Departamento de Bioquímica do Instituto de Química da Universidade Federal do Rio de Janeiro e no Laboratório de Microbiologia do Departamento de Engenharia Bioquímica da Escola de Química da Universidade Federal do Rio de Janeiro, sob a orientação dos Professores Edson Luiz da Silva Lima e Octávio Augusto Ceva Antunes.**

## Ficha Catalográfica

**Lacerda, Paulo Sérgio bergo**

**Redução Microbiológica de Alfa-Ceto-Ésteres: Produção Enantiosseletiva de (*S*)- e de (*R*)-2-Hidroxi-4-Fenil-Butanoato de Etila**

**Rio de Janeiro, UFRJ, Departamento de Química Orgânica do Instituto de Química, 2005**

**Tese: Doutorado em Ciências (Química Orgânica)**

**1.Redução Microbiológica**

**2.Síntese Assimétrica**

**3. $\alpha$ -Cetoésteres**

**4.Quiralidade**

**5.Tese**

**I. Universidade Federal do Rio de Janeiro**

**II. Título**

## Agradecimentos

Ao Professor Edson Luiz da Silva Lima pela orientação, pela amizade e oportunidade de crescimento profissional;

Ao Professor Octávio Augusto Ceva Antunes pela orientação, pela amizade e por abrir meus horizontes dentro da química;

À diretoria de Far-Manguinhos pela oportunidade de transformar um projeto em tese tecnológica;

À Professora Elba Pinto da Silva Bom, pela colaboração, pela hospitalidade com que fui recebido em seu laboratório, pela amizade e pelos ensinamentos;

À professora Selma Gomes Ferreira Leite pela hospitalidade e oportunidade de ter minha iniciação em biocatálise;

À Doutora Maria Antonieta Ferrara pelos ensinamentos, pela colaboração e pela amizade que foram fundamentais para o sucesso da tese;

À Joyce Benzaquem Ribeiro e Silva que me orientou nos primeiros passos em biocatálise;

Ao Doutor Edson Ferreira pela amizade, pelo apoio e pela ajuda nas discussões e correções da tese;

À Rose e ao Arthur, que veio durante minha tese, pelo amor, pela força e pelo amparo nos momentos difíceis;

A Paulo Machado de Lacerda, *in memoriam*, que me incentivou desde pequeno a trilhar meu próprio caminho e me amparou sempre nos tombos;

À minha mãe Nereida e à minha irmã Vanessa pela oportunidade, pelo amor e pelo apoio nos momentos difíceis que trilhamos juntos;

Aos amigos do laboratório 615 pela ajuda, convívio e amizade;

Aos amigos e colegas de Far-manguinhos;

Ao Ricardo Bezerra de Menezes (IQ-UFRJ) pelas análises em C.G.;

À Paula (Far-Manguinhos) pelas análises em C.G.;

À Central Analítica do DQO-DQI-IQ-UFRJ pelos espectros de RMN e IV;

À Central Analítica de Far-Manguinhos pela análise CG/MS;

Ao Instituto de Química pelas dependências;

À Far-Manguinhos – FIOCRUZ pelo apoio financeiro e pela oportunidade;

À FAPERJ, CAPES, CNPq e FUJB pelo apoio financeiro ao projeto.

## RESUMO

Neste trabalho foram testados diferentes microrganismos na redução enantiosseletiva do 2-oxo-4-fenil-butanoato de etila para a preparação do (*S*)- e (*R*)-2-hidroxi-4-fenil-butanoato de etila, intermediários estratégicos para a preparação dos inibidores da enzima conversora da angiotensina (ACE). A utilização de leveduras de panificação (*Saccharomices cerevisiae*) apresentou um excelente resultado para a obtenção do (*S*)-2-hidroxi-4-fenil-butanoato de etila com conversões de até 99%, rendimentos superiores a 65% e excessos enantioméricos (*ee*) de até 100%. Resultados semelhantes foram encontrados utilizando *Dekera sp.*, conversões superiores a 89%, rendimentos médios de 71% e *ee* de até 100%. Os resultados obtidos em conversão (*C*), rendimento (*R*), *ee* e configuração absoluta para os demais microrganismos utilizados foram: *Aureobasidium pullulans* (*C*: >92%, *R*: >72%, >60,1% *ee*, *S*), *Candida guilliermondii* (*C*: 100%, *R*: 26,7%, 100% *ee*, *S*), *Kluyveromyces marxianus* (*C*: >82%, *R*: >51%, 35% *ee*, *R*), *Pichia pastoris* (*C*: >95%, *R*: >82%, 35% *ee*, *R*) e *Pichia anomala* (*C*: >94%, *R*: >66%, 21% *ee*, *R*). A utilização de *Pichia angusta* na redução microbiológica do 2-oxo-4-fenil-butanoato de etila utilizando células íntegras em meio aquoso levou a inversão quantitativa do substrato, rendimentos isolados de 79% e excesso enantiomérico de 80% do enantiômero *R*.

## Abstract

In this work different microorganisms have been tested in the enantioselective reduction of ethyl 2-oxo-4-phenylbutyrate for the preparation of ethyl (*S*) - and (*R*)-2-hydroxy-4-phenylbutyrate, strategic intermediaries for the preparation of Angiotensin-Converting Enzyme (ACE) inhibitors. The use of baker yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) showed to be useful in production of ethyl (*S*)-2-hydroxy-4-phenylbutyrate, with conversions up to 99%, yields over 65% and *ee* around 100%. Similar results have been found using *Dekeyera sp*, conversions over 89%, average yields of 71% and *ee* around 100%. The results obtained in conversion (C), yields (R), *ee* and absolute configuration for the other microorganisms used were: *Aureobasidium pullulans* (C: >92%, R: >72%, >60,1% *ee*, *S*), *Candida guilliermondii* (C: 100%, R: 26,7%, 100% *ee*, *S*), *Kluyveromyces marxianus* (C: >82%, R: >51%, 35% *ee*, *R*), *Pichia pastoris* (C: >95%, R: >82%, 35% *ee*, *R*) e *Pichia anomala* (C: >94%, R: >66%, 21% *ee*, *R*). By using *Pichia angusta* in the microbiologic reduction of the ethyl 2-oxo-4-phenylbutyrate using whole cells in water it was obtained 100% conversion, 79% isolated yield and 80% *ee* of the *R* enantiomer.



## Sumário

<b>Resumo</b> .....	vi
<b>Abstract</b> .....	vii
<b>Sumário</b> .....	viii
<b>Índice de Esquemas</b> .....	xi
<b>Índice de Experimentais</b> .....	xiii
<b>Índice de Figuras</b> .....	xv
<b>Índice de Tabelas</b> .....	xiv
<b>Índice de Espectros</b> .....	xx
<b>Lista de Abreviações</b> .....	xxii
<b>1. Introdução</b> .....	1
1.1 Inibidores da Enzima Conversora da Angiotensina (ACE).....	3
1.2 Processos de Obtenção do Enalapril.....	6
1.3 Processos de Obtenção do (R)-2-hidroxi-4-fenil-butanoato de etila.....	7
1.3.1 Catálise Heterogênea.....	8
1.3.2 Redução Microbiológica.....	12
1.4 Algumas Considerações Sobre Biocatálise.....	26
1.4.1 Mecanismo da Biocatálise.....	30

1.4.2 Obtenção de Intermediários Quirais para a Indústria Farmacêutica por Biotálise.....	32
<b>2. OBJETIVO.....</b>	<b>35</b>
<b>3. ESTRATÉGIA SINTÉTICA.....</b>	<b>35</b>
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>38</b>
4.1 Redução Microbiológica do 2-Oxo-4-fenil-butanoato de etila.....	38
<b>5. CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS.....</b>	<b>65</b>
<b>6. EXPERIMENTAL.....</b>	<b>66</b>
6.1 Material e Métodos.....	66
6.2 Experimentais.....	70
6.2.1 Obtenção da biomassa para os experimentos de redução.....	70
6.2.2 Redução enantiosseletiva do 2-Oxo-4-fenil-butanoato de etila.....	70
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>74</b>
<b>8. ESPECTROS.....</b>	<b>82</b>
<b>9. APÊNDICE.....</b>	<b>85</b>
9.1 Redução Enantiosseletiva de 2-Oxo-ésteres com Oxazaborolidina.....	86
9.1.1 Introdução.....	86
9.1.2 Resultados e Discussão.....	91
9.1.3 Conclusão.....	102
9.1.4 Experimental.....	103

Material e Métodos.....	103
Experimentais.....	106
9.1.5 Referências Bibliográficas.....	122
9.1.6 Espectros.....	124

## Índice de Esquemas

Esquema 1: Preparação do enalapril por aminação redutiva.....	6
Esquema 2: Preparação do benazepril e de outros inibidores da ACE a partir dos $\alpha$ -hidroxi-ésteres (R)- <u>6</u> e (S)- <u>6</u> que podem ser obtidos por redução enantiosseletiva de <u>2</u> .....	8
Esquema 3: Obtenção do (R)-2-hidroxi-4-fenil-butanoato de etila, (R)- <u>6</u> , por síntese total.....	12
Esquema 4: Obtenção do (R)-2-hidroxi-4-fenil-butanoato de etila (R)- <u>6</u> por redução microbiológica do 2-oxo-4-fenil-butanoato de etila <u>2</u> .....	17
Esquema 5: Processo otimizado para a obtenção do $\alpha$ -hidroxi-éster (R)- <u>11</u> por redução microbiológica do 2-oxo-éster <u>10</u> utilizando levedura de panificação em éter-água.....	23
Esquema 6: Controle estereoquímico na redução microbiológica de <u>2</u> utilizando super expressão das enzimas Ypr1p e Gre2p na <i>E. coli</i> .....	23
Esquema 7: Síntese total do (R)-2-hidroxi-4-fenil-butanoato de etila tendo como etapa chave a redução carboetoxi-di-cetona <u>8</u> utilizando levedura de panificação em éter di-isopropílico-água.....	25
Esquema 8: Metodologias utilizadas para a preparação de (R)- <u>6</u> .....	26
Esquema 9: Reciclo do $\text{NAD}^+$ pela utilização de $\text{HCO}_2\text{H}$ como fonte de hidrogênio para a redução.....	31
Esquema 10: Obtenção das moléculas alvo.....	36
Esquema 11: Redução do 2-oxo-4-fenil-butanmoato de etila ( <u>2</u> ) utilizando microrganismo.....	38

Esquema 12: Decomposição do 2-oxo-4-fenil-butanoato de etila em água na presença de levedura.....	46
Esquema 13: Proposta do mecanismo para a catálise enantiosseletiva de cetonas (Corey <i>et al.</i> , 1998).....	87
Esquema 14: Estabilidade da coordenação da borana com a oxazaborolidina.....	88
Esquema 15: Enantiosseletividade esperada na redução de 2-oxo-ésteres com catalisador CBS.....	90
Esquema 16: Preparação da Me-oxazaborolidina ( <u>29</u> ).....	92

## Índice de Experimentais

Experimental 6.2.1: Obtenção da biomassa para os experimentos de redução.....	70
Experimental 6.2.2: Redução enantiosseletiva do 2-oxo-4-fenil-butanoato de etila (2) utilizando células livres dos seguintes microrganismo (MO): <i>Saccharomices cerevisiae</i> , <i>Dekera sp.</i> , <i>Kluyveromyces marxianus</i> , <i>Hansenula sp.</i> , <i>Pichia angusta</i> , <i>Pichia pastoris</i> , <i>Pichia anômala</i> , <i>Aureobasidium pullulans e Candida quilliermondii</i> .....	71
Experimental 9.1.4.1: Preparação do 2-oxo-butanoato de benzila (32).....	106
Experimental 9.1.4.2: Obtenção do 2-hidroxi-butanoato de benzila racêmico (35).....	107
Experimental 9.1.4.3: Preparação do Ester metílico da N-carboxietil-prolina (49).....	108
Experimental 9.1.4.4: Preparação do (S)-N-carboxietil-1,1-difenil-prolinol.....	109
Experimental 9.1.4.5: Preparação do (S)-1,1-difenilprolinol (44).....	111
Experimental 9.1.4.6: Preparação da (S)-1,3,2-(B-metil)-oxazaborolidina (29) a partir do (S)-1,1-difenilprolinol (44).....	112
Experimental 9.1.4.7: Preparação do complexo borana-(S)-1,3,2-(B-metil)-oxazaborolidina (Me-oxazaborolidina) (46).....	112
Experimental 9.1.4.8: Redução assimétrica do 2-oxo-4-fenil-butanoato de etila 2 com borana utilizando Me-oxazaborolidina.....	113
Experimental 9.1.4.9: Preparação do complexo borana-oxazaborolidina (49) em THF.....	114
Experimental 9.1.4.10: Redução assimétrica do 2-oxo-4-fenil-butanoato de etila (2) com borana utilizando oxazaborolidina como indutor quiral.....	115

Experimental 9.1.4.11: Redução assimétrica do 2-oxo-butanoato de benzila ( <u>32</u> ) com borana utilizando Me-oxazaborolidina como indutor quiral.....	116
Experimental 9.1.4.12: Redução assimétrica do 2-oxo-butanoato de benzila ( <u>32</u> ) com borana utilizando oxazaborolidina como indutor quiral.....	117
Experimental 9.1.4.13: Preparação do 2-oxo-propanoato de benzila ( <u>31</u> ).....	118
Experimental 9.1.4.14: Obtenção do 2-hidroxi-propanoato de benzila racêmico ( <u>48</u> )	119
Experimental 9.1.4.15: Redução assimétrica do 2-oxo-propanoato de benzila ( <u>31</u> ) com borana utilizando oxazaborolidina como indutor quiral.....	120
Experimental 9.1.4.16: Redução assimétrica do 2-oxo-propanoato de benzila ( <u>31</u> ) com borana utilizando Me-oxazaborolidina como indutor quiral.....	121

## Índice de Figuras

Figura 1: Sistema renina-angiotensina (RAS) de controle da pressão sangüínea (Barreiro e Fraga, 2001).....	4
Figura 2: Estrutura do captopril.....	4
Figura 3: Inibidores da enzima conversora da angiotensina (ACE).....	5
Figura 4: Estrutura da 10,11-dihidrocinchonidina (HCd).....	9
Figura 5: Estrutura da 9- <i>O</i> -metoxi-10,11-dihidrocinchonidina.....	11
Figura 6: Resultados obtidos em reduções microbiológicas enantiosseletivas em grandes escalas (Nakamura <i>et al.</i> , 2003).....	29
Figura 7: Estereoquímica da transferência do direto do NAD(P)H para a carbonila do substrato (S é um grupo pequeno e L é um grupo grande).....	31
Figura 8: Síntese enzimática do intermediário quiral utilizado na preparação do receptor agonista $\beta_3$ .....	33
Figura 9: Utilização de redução microbiológica na síntese do intermediário quiral ( <i>R</i> )-9 utilizado na preparação do agente antiarrítmico <u>25</u> .....	33
Figura 10: Obtenção do álcool ( <i>S, S</i> )-27, importante intermediário para a obtenção do inibidor da HIV-Protease BMS-186318 28, por redução microbiológica enantiosseletiva.....	34
Figura 11: Cromatograma do 2-oxo-4-fenil-butanoato de etila padrão.....	41
Figura 12 Cromatograma do 2-hidroxi-4-fenil-butanoato de etila racêmico.....	42
Figura 13: Cromatograma do 2-hidroxi-4-fenil-butanoato de etila obtido por redução microbiológica utilizando <i>S. cerevisiae</i> .....	43



Figura 14: CG/MS do sub-produto formada na redução microbiológica do 2-oxo-4-fenil-butanoato de etila utilizando <i>S. cerevisiae</i> .....	45
Figura 15: Cromatograma do 2-hidroxi-4-fenil-butanoato de etila obtido por redução microbiológica utilizando <i>Dekera sp</i> .....	47
Figura 16: Cromatograma do 2-hidroxi-4-fenil-butanoato de etila obtido por redução microbiológica utilizando <i>Hansenula sp</i> .....	48
Figura 17: Cromatograma do 2-hidroxi-4-fenil-butanoato de etila obtido por redução microbiológica utilizando <i>K. marxianus</i> .....	50
Figura 18: Redução microbiológica do $\alpha$ -ceto-éster <u>55</u> para fornecer ( <i>R</i> )- <u>26</u> e $\beta$ -hidroxi-ésteres obtidos seletivamente pela redução microbiológica de <u>57</u> .....	51
Figura 19: Cromatograma do 2-hidroxi-4-fenil-butanoato de etila obtido por redução microbiológica utilizando <i>A. pullulans</i> .....	53
Figura 20: Cromatograma do 2-hidroxi-4-fenil-butanoato de etila obtido por redução microbiológica utilizando <i>Candida guilliermondii</i> .....	54
Figura 21: Cromatograma do 2-hidroxi-4-fenil-butanoato de etila obtido por redução microbiológica utilizando <i>Pichia pastoris</i> .....	57
Figura 22: Cromatograma do 2-hidroxi-4-fenil-butanoato de etila obtido por redução microbiológica utilizando <i>Pichia anomala</i> .....	58
Figura 23: Cromatograma do 2-hidroxi-4-fenil-butanoato de etila obtido por redução microbiológica utilizando <i>Pichia angusta</i> .....	59
Figura 24: Estrutura das Oxazaborolidinas e dos substratos.....	91

- Figura 25: Cromatograma do produto obtido pela redução racêmica do 2-oxo-butanoato de benzila (32) utilizando borana.....94
- Figura 26: Cromatograma da redução do 2-oxo-butanoato de benzila (32) utilizando o complexo borana-oxazaborolidina à temperatura ambiente.....95
- Figura 27: Cromatograma do produto obtido pela redução do 2-oxo-butanoato de benzila (32) utilizando o complexo borana-Me-oxazaborolidina à temperatura ambiente.....96
- Figura 28: Cromatograma do produto obtido pela redução do 2-oxo-butanoato de benzila (32) utilizando o complexo borana-Me-oxazaborolidina a -30°C..... 96
- Figura 29: Cromatograma do produto obtido pela redução racêmica do 2-oxo-4-fenil-butanoato de etila (2) utilizando borana.....97
- Figura 30: Cromatograma do produto obtido pela redução do 2-oxo-4-fenil-butanoato de etila (2) utilizando o complexo borana-oxazaborolidina à temperatura ambiente.....98
- Figura 31: Cromatograma do produto obtido pela redução do 2-oxo-4-fenil-butanoato de etila (2) utilizando o complexo borana-Me-oxazaborolidina à temperatura ambiente.....98
- Figura 32: Cromatograma do produto obtido pela redução do 2-oxo-4-fenil-butanoato de etila (2) utilizando o complexo borana-Me-oxazaborolidina a -30°C.....99
- Figura 33: Cromatograma do produto obtido pela redução racêmica do 2-oxo-propanoato de benzila (31) utilizando borana.....100

- Figura 34: Cromatograma do produto obtido pela redução do 2-oxo-propanoato de benzila (31) utilizando o complexo borana-oxazaborolidina à temperatura ambiente.....100
- Figura 35: Cromatograma do produto obtido pela redução do 2-oxo-propanoato de benzila (31) utilizando o complexo borana-Me-oxazaborolidina à temperatura ambiente.....101
- Figura 36: Cromatograma do produto obtido pela redução do 2-oxo-propanoato de benzila (31) utilizando o complexo borana-Me-oxazaborolidina a -30°C... 101

## Índice de Tabelas

Tabela 1: Comparação da performance catalítica na hidrogenação de <u>2</u> utilizando Rh- <i>norfhos</i> (catálise homogênea) e Pt- <i>cinchonidina</i> (catálise heterogênea).....	9
Tabela 2: Hidrogenação enantiosseletiva otimizada de <u>2</u> utilizando 5% Pt/Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub> .....	10
Tabela 3: Redução enantiomérica de $\alpha$ -ceto-ésteres utilizando levedura de panificação em água e em hexano.....	14
Tabela 4: Redução enantiomérica de $\alpha$ -ceto-ésteres utilizando levedura de panificação (BY) em vários solventes.....	15
Tabela 5: Efeito do solvente na redução enantiosseletiva do 2-oxo-pentanoato de etila utilizando levedura de panificação (BY).....	16
Tabela 6: Redução de $\alpha$ -ceto-ésteres utilizando fermento de panificação em água e benzeno seco.....	16
Tabela 7: Redução Microbiológica do 2-oxo-4-fenil-butanoato de etila (United States Patent 5,371,014 (1994)).....	18
Tabela 8: Resultados obtidos na redução microbiológica enantiosseletiva do 2-oxo-4-fenil-butanoato de etila.....	40
Tabela 9: Resultados obtidos na redução microbiológica enantiosseletiva do 2-oxo-4-fenil-butanoato de etila utilizando leveduras metilotróficas, <i>Aureobasidium pullulans</i> e <i>Candida guilliermondii</i> .....	55
Tabela 10: Comparação das metodologias utilizadas para a redução enantiosseletiva do 2-oxo-4-fenil-butanoato de etila com os resultados obtidos.....	62

## Índice de Espectros

Espectro 1: RMN $^1\text{H}$ (200 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) da substância ( <i>S</i> )- <u>6</u> obtida por redução da substância <u>2</u> com levedura de panificação.....	83
Espectro 2: IV (filme) da substância <u>6</u> .....	84
Espectro 3: Espectro de RMN $^1\text{H}$ (200 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) do ácido 2-oxo-butanóico.....	125
Espectro 4: IV (filme) do ácido 2-oxo-butanóico.....	126
Espectro 5: Espectro de RMN $^1\text{H}$ (200 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) da substância <u>32</u> .....	127
Espectro 6: Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ (50 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) da substância <u>32</u> .....	128
Espectro 7: IV (filme) da substância <u>32</u> .....	129
Espectro 8: Espectro de RMN $^1\text{H}$ (200 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) da substância <u>47</u> .....	130
Espectro 9: IV (filme) da substância <u>47</u> .....	131
Espectro 10: Espectro de RMN $^1\text{H}$ (200 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) da substância <u>42</u> .....	132
Espectro 11: IV (filme) da substância <u>42</u> .....	133
Espectro 12: Espectro de RMN $^1\text{H}$ (200 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) da substância <u>43</u> .....	134
Espectro 13: Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ (50 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) da substância <u>43</u> .....	135
Espectro 14: IV (filme) da substância <u>43</u> .....	136
Espectro 15: Espectro de RMN $^1\text{H}$ (200 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) da substância <u>44</u> .....	137
Espectro 16: IV (pastilha de KBr) da substância <u>44</u> .....	138
Espectro 17: RMN $^1\text{H}$ (200 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) da substância <u>2</u> .....	139
Espectro 18: IV (filme) da substância <u>2</u> .....	140
Espectro 19: RMN $^1\text{H}$ (200 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) da substância <u>6</u> obtida por redução da	

substância <b>2</b> com complexo borana-Me-oxazaborlidina.....	141
Espectro 20: IV (filme) da substância <b>6</b> .....	142
Espectro 21: RMN $^1\text{H}$ (200 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) do ácido pirúvico. Espectro 19: IV (pastilha de KBr) da substância <b>51</b> .....	143
Espectro 22: IV (filme) do ácido pirúvico.....	144
Espectro 23: RMN $^1\text{H}$ (200 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) da substância <b>31</b> .....	145
Espectro 24: RMN $^{13}\text{C}$ (50 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) da substância <b>31</b> .....	146
Espectro 25: IV(filme) da substância <b>31</b> .....	147
Espectro 26: RMN $^1\text{H}$ (200MHz, $\text{CDCl}_3$ ) da substância <b>56</b> .....	148
Espectro 27: IV (filme) da substância <b>56</b> .....	149

## Lista de Abreviações

AcOEt – Acetato de Etila

ACE – Enzima Conversora da Angiotensina

ATCC - American Type Culture Collection, 123031 Parklawn Drive, Rockville,  
Maryland 20852 USA.

BzCl – Cloreto de Benzila

BzOH – Álcool Benzílico

BY – Levedura de Panificação

CCF – Cromatografia em Camada Fina

CFN – Cloreto de Fenacila

RMN <sup>13</sup>C – Ressonância Magnética Nuclear de Carbono

DCC – 1,3-Diciclohexilcarbodiimida

DEAD – Azodicarboxilato de Dietila

DMAP – N,N-Dimetil-4-amino-Piridina

DMS - Dimetilsulfeto

DMF – N, N-Dimetilformamida

*ee* – Excesso Enantiomérico

E.M. – Espectometria de Massa

EQ-UFRJ – Escola de Química da Universidade Federal do Rio de Janeiro

Et<sub>3</sub>N – Trietilamina

Et<sub>2</sub>O – Éter Etílico

EtOH – Etanol

FID – Detetor de Ionização de Chama

HCd - 10,11-dihidrocinchonidina

RMN  $^1\text{H}$  – Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio

IM – Íon Molecular

IQ-DBQ – Departamento de Bioquímica do Instituto de Química da Universidade  
Federal do Rio de Janeiro

IV – Infravermelho

MeOH – Metanol

Me – Metila

MO - Microrganismo

MsCl – Cloreto de Mesila

$\text{NAD}^+$  – Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo

NADH - Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo na forma reduzida

NADP – Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato

NAD(P)H – Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato na forma reduzida

Ph – Fenil

$\text{PPh}_3$  – Trifenilfosfina

RAS – Sistema Renina-Angiotensina

$R_f$ - Fator de Retenção

t.a. – Temperatura Ambiente



THF - Tetraidrofurano

$t_r$  – Tempo de Retenção

## 1. INTRODUÇÃO

A necessidade do desenvolvimento de novas tecnologias para a obtenção de intermediários quirais com alto grau de pureza ao menor custo possível tem levado as indústrias químicas, e em particular as indústrias farmacêuticas, à re-pensar todas as tecnologias desenvolvidas até o presente momento e re-avaliar sua eficiência para o momento atual. Existe uma grande pressão da sociedade e do governo em relação à poluição ambiental. Sendo assim, o custo de tecnologias obsoletas passa a ter um valor considerável devido aos altos investimentos, que são necessários, para o tratamento dos efluentes antes de retornar ao meio ambiente. Além disso, existe o fantasma da lei do Crime Ambiental em decorrência de acidentes graves que afetam o meio ambiente cuja multa é calculada pelo impacto ambiental causado e, muitas vezes por serem geralmente valores muito altos, podem levar uma indústria à falência.

Em 1992 ocorreu no Rio de Janeiro a Conferência das Nações Unidas sobre Meio Ambiente e Desenvolvimento (CNUMAD) (ECO 92) que originou a Agenda 21 Global que é o compromisso de 179 países em adotar uma abordagem equilibrada e integrada das questões relativas a meio ambiente e desenvolvimento, surgindo o conceito de desenvolvimento sustentável que harmoniza o imperativo do crescimento econômico com a promoção social e a preservação do patrimônio natural, garantindo assim que as necessidades das gerações sejam atendidas sem comprometer o atendimento das necessidades das gerações futuras. A Agenda 21 Global é dividida em 40 capítulos, divididos em áreas de programas descritas em termos de bases para a ação, objetivos, atividades e meios de implementação. Cada capítulo refere-se a um tópico e contém uma ou mais “áreas de programas”.

O capítulo 19 da Agenda 21 trata do manejo ecologicamente saudável das substâncias químicas tóxicas, incluindo a prevenção do tráfico internacional ilegal dos

produtos tóxicos e perigosos. A utilização substancial de produtos químicos é essencial para alcançar os objetivos sociais e econômicos da comunidade mundial e as melhores práticas modernas demonstram que eles podem ser amplamente utilizados com boa relação custo-eficiência e com alto grau de segurança. Entretanto, ainda resta muito a fazer para assegurar o manejo ecologicamente saudável das substâncias químicas tóxicas dentro dos princípios de desenvolvimento sustentável e da melhoria da qualidade de vida da humanidade. As áreas propostas para o programa são:

- ❖ Expansão e aceleração da avaliação internacional dos riscos químicos;
- ❖ Harmonização da classificação e da rotulagem dos produtos químicos;
- ❖ Intercâmbio de informações sobre os produtos químicos tóxicos e os riscos químicos;
- ❖ Implantação de programas de redução dos riscos;
- ❖ Fortalecimento das capacidades e potenciais nacionais para o manejo dos produtos químicos;
- ❖ Prevenção do tráfico internacional ilegal dos produtos tóxicos e perigosos.

No capítulo 20 da Agenda 21 é tratado o manejo ambientalmente saudável dos resíduos perigosos, incluindo a prevenção do tráfico internacional ilícito destes resíduos. O controle efetivo da geração, do armazenamento, do tratamento, da reciclagem e reutilização, do transporte, da recuperação e do depósito dos resíduos perigosos é de extrema importância para a saúde do homem e do meio ambiente. São áreas do programa:

- ❖ Promoção da prevenção e redução ao mínimo dos resíduos perigosos.

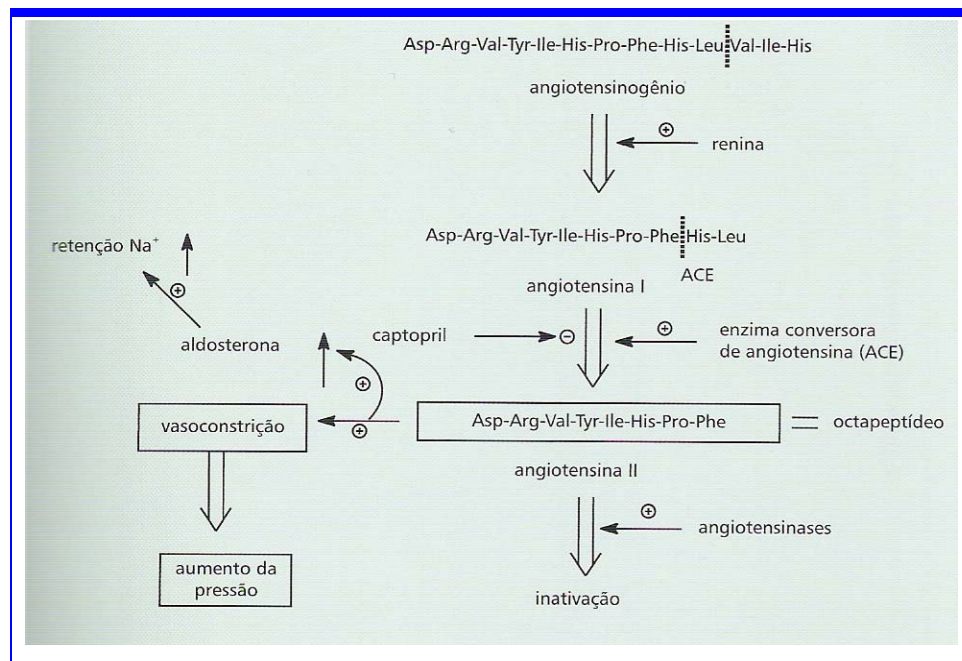
- ❖ Promoção e fortalecimento da capacidade institucional do manejo de resíduos perigosos.
- ❖ Promoção e fortalecimento da cooperação internacional para o manejo dos movimentos transfronteiriços de resíduos perigosos.
- ❖ Prevenção do tráfico internacional ilícito de resíduos perigosos.

Seguindo as diretrizes da Agenda 21, surgiram normas tais como: ISO 14000, Boas Práticas de Laboratório (BPL), Boas Práticas de Produção (GMP) e Produção Limpa que começaram a permear todas indústrias como uma rede global, cuja participação passou a ser um requisito importante para colocar o produto no mercado. Numa visão micro, surgiu o conceito de Química Verde ou Química Limpa (Anasta & Warnier, 1998 e Silva *et al.*, 2005) que tem a finalidade de direcionar todas as pesquisas na área da química rumo ao desenvolvimento sustentável.

### **1.1 Inibidores da Enzima Conversora da Angiotensina (ACE)**

O sistema renina-angiotensina (RAS) tem importância crucial na manutenção do sistema circulatório, exercendo controle sobre o volume e a pressão sanguínea e sobre o nível de sódio e potássio nos tecidos.

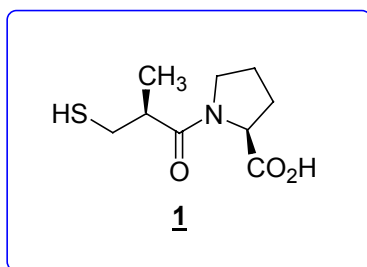
O RAS opera pela ação da renina, produzida nos rins, sobre o angiotensinogênio plasmático, levando a bioformação de um decapeptídeo inativo (angiotensina 1), substrato da enzima-conversora da angiotensina (ACE), que produz a angiotensina 2, um octapeptídeo capaz de provocar intensa vasoconstrição e aumentar a produção de aldosterona, resultando no aumento da pressão sanguínea (Barreiro & Fraga, 2001) (Figura 1).



**Figura 1: Sistema renina-angiotensina (RAS) de controle da pressão sanguínea (Barreiro & Fraga, 2001).**

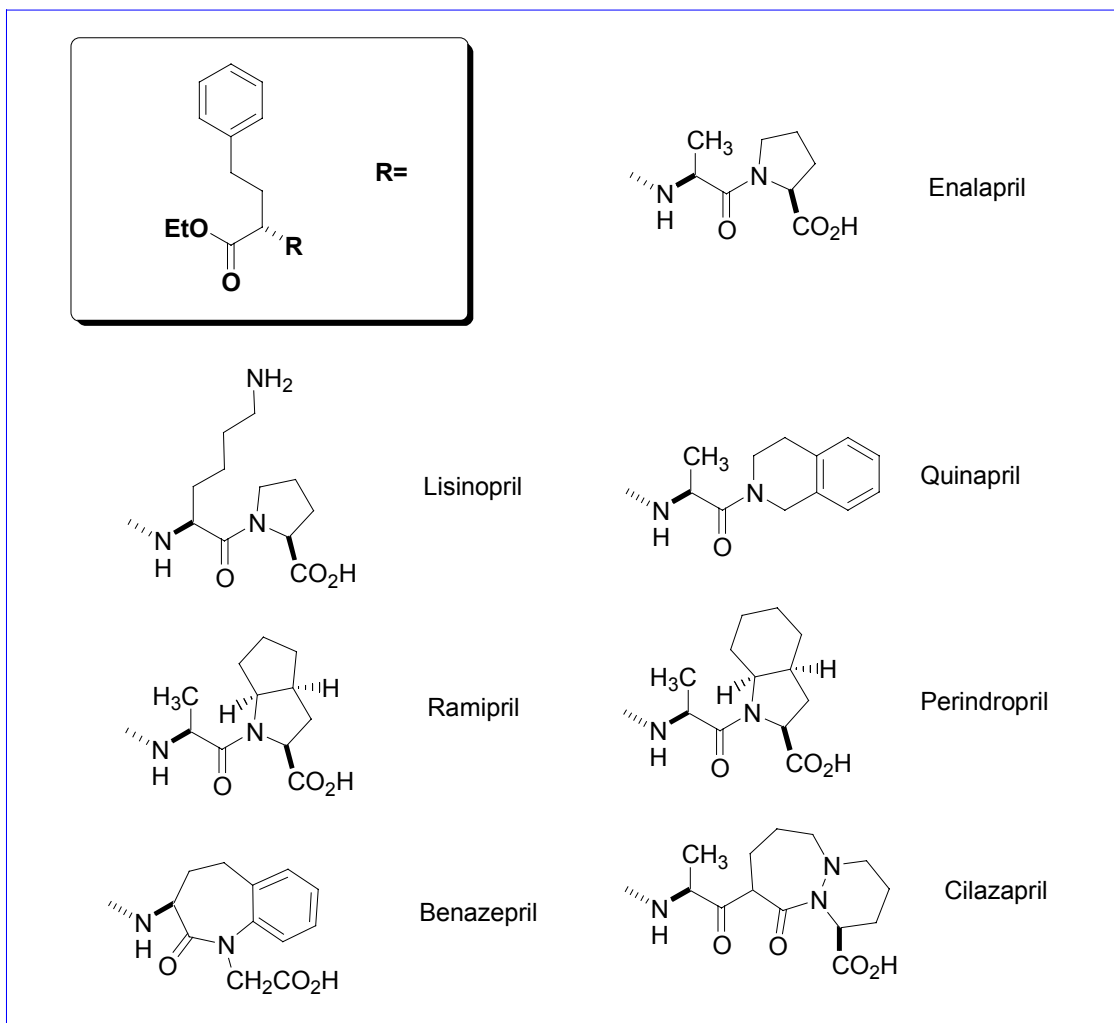
O desenvolvimento de inibidores da enzima conversora de angiotensina (ACE) como drogas anti-hipertensivas foi estimulado pela observação do efeito hipotensor do veneno da cobra *Botropos jararaca* causado por peptídeos.

O Captopril **1** (Figura 2) foi o primeiro inibidor de natureza peptóide sintetizado a partir dos estudos do veneno da cobra jararaca. Este composto e seus sucessores inibem a ACE agindo como falsos substratos no sítio de clivagem da enzima.



**Figura 2: Estrutura do captopril.**

A busca de uma melhor relação estrutura/atividade e diminuição dos efeitos colaterais levaram a uma família de inibidores da ACE, cuja estrutura é um dipeptídeo. Como exemplo desta classe de compostos temos o enalapril, lisinopril, quinapril, ramipril, perindopril, benazepril e cilazapril (Figura3).



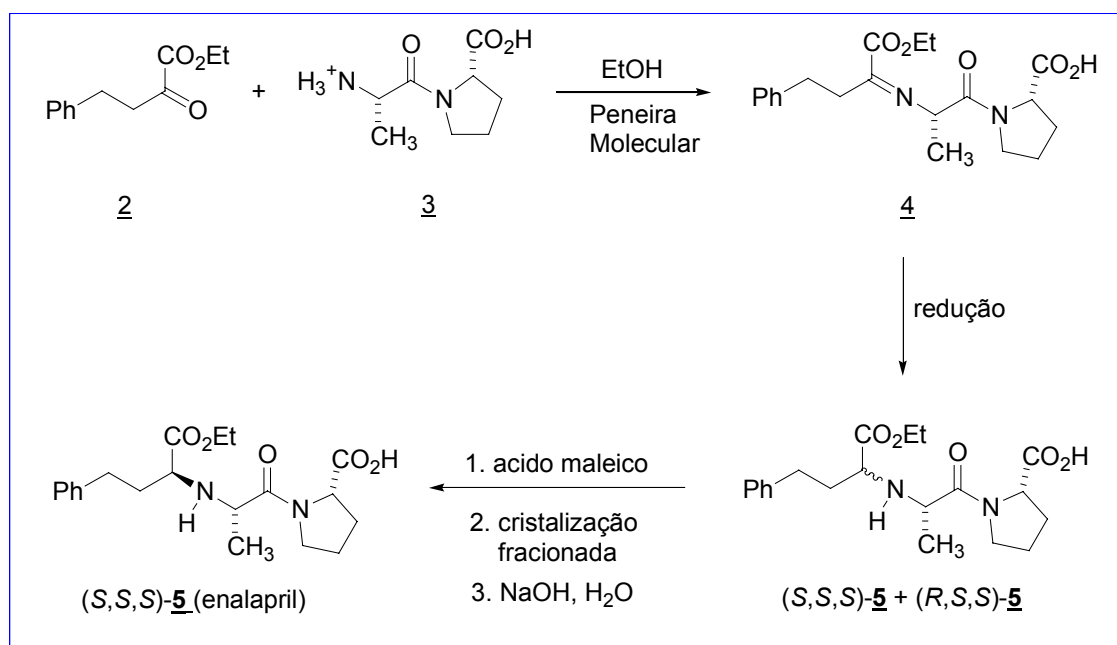
**Figura 3: Inibidores da enzima conversora da angiotensina (ACE).**

O enalapril é uma das drogas mais vendidas mundialmente para o combate a hipertensão, tendo um mercado anual global de aproximadamente US\$ 2,5 bilhões. A patente do maleato de enalapril, pertencente a Merck & Co., inspirou em 23 de agosto de 2000 abrindo a possibilidade de lançamentos de medicamentos genéricos no mercado.

## 1.2 Processos de Produção do Enalapril

A aminação redutiva foi o processo utilizado inicialmente para a produção do enalapril. O processo consiste da redução da imina **4**, formada pela reação do 2-oxo-4-fenil-butanoato de etila **2** com o dipeptídeo alanil-prolina **3**, utilizando como catalisador NaCNBH<sub>3</sub> ou 10% Pd/C e separação dos diastereoisômeros **5** por cristalização após reação com o ácido maleico para fornecer o enalapril (*SSS*)-**5** (Patchett *et al.*, 1980; Harris *et al.*, 1982; Wyvratt *et al.*, 1984) (Esquema 1). Foram obtidas baixas relações diastereoisoméricas (*SSS*): (*SRR*): 1,22: 1, utilizando como catalisador NaCNBH<sub>3</sub> e 1,63:1 utilizando 10% Pd/C.

O processo foi otimizado por Blacklock *et al.* (1988) utilizando como catalisador Ra-Ni com pressão de H<sub>2</sub> de 40 psi, tendo sido obtida uma relação diastereoisomérica (*SSS*): (*SRR*) de 6,7: 1.



Esquema 1: Preparação do enalapril por aminação redutiva.

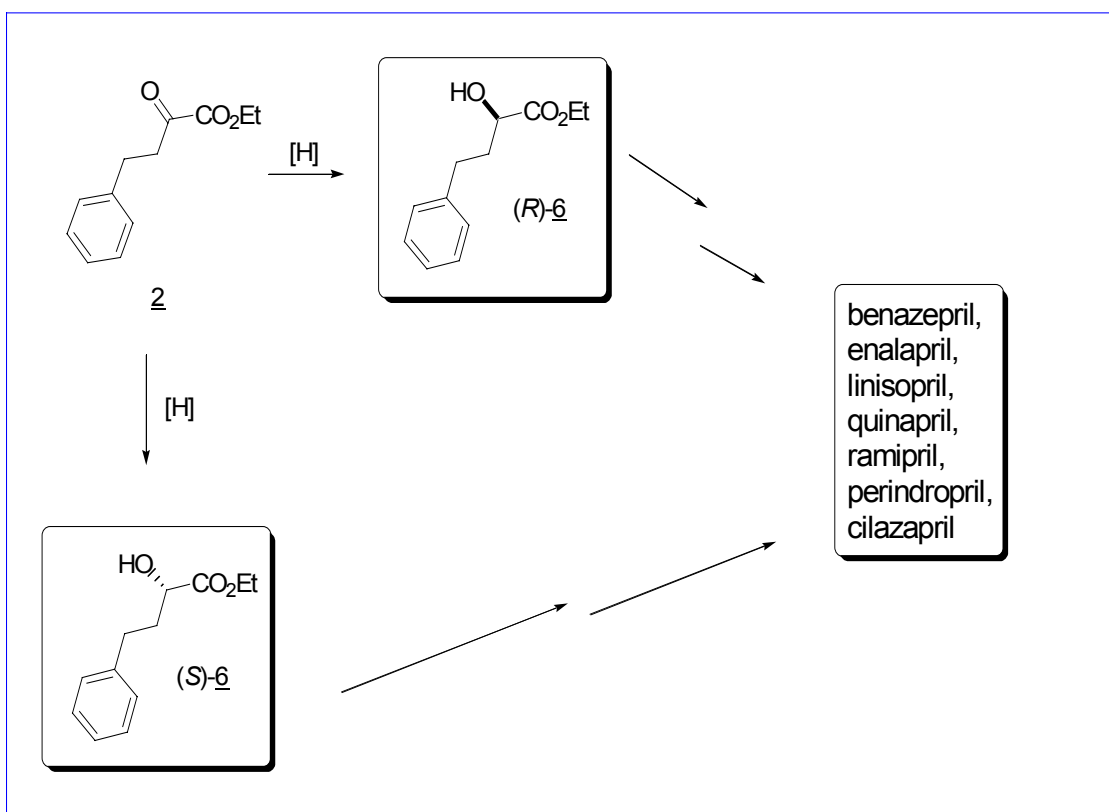
Com a utilização de 1,25 equivalente molar de ácido acético e a adição de 1,05 eq. de KF como aditivo, Huffmann *et al.* (1999) otimizaram a aminação redutiva para uma relação diastereoisomérica (SSS): (SRR) de 17:1 utilizando Ra/Ni em condições mais brandas; temperatura ambiente e uma atmosfera de H<sub>2</sub>. Todavia ainda sendo necessária uma operação unitária de separação e purificação do produto alvo, o que encarece o processo.

### 1.3 Processos de Obtenção do (R)-2-hidroxi-4-fenil-butanoato de etila.

A hidrogenação enantiosseletiva do 2-oxo-4-fenil-butanoato de etila **2** foi feita em escala piloto por Blaser *et al.* (1996) para a obtenção do (R)-2-hidroxi-4-fenil-butanoato de etila (R)-**6** a ser utilizado como intermediário na síntese do benazepril (Esquema 2). Esta metodologia abriu a possibilidade da utilização de um único intermediário para a obtenção de todos os inibidores da enzima conversora da angiotensina (ACE). A ativação da hidroxila de (R)-**6** com triflato (Urbach & Henning, 1984) e posterior deslocamento S<sub>N</sub>2 com o dipeptídeo apropriado, vide Figura 3, poderá fornecer os inibidores da ACE. Outra possibilidade é submeter o  $\alpha$ -hidroxi-éster (S)-**6** a reação de Mitsunobu (Wagner *et al.*, 2003; Ponzo *et al.*, 1995) e posteriormente a um deslocamento S<sub>N</sub>2 com o dipeptídeo. Há ainda a possibilidade do processo de dupla inversão a partir do enantiômero (S), via preparação do cloreto (R) e substituição com a amina apropriada para a formação do produto desejado.

O desafio passou a ser a otimização do *ee* da redução enantiosseletiva de **2** para a obtenção de (S)-**6** e/ou (R)-**6** preferencialmente por ser um processo mais direto.





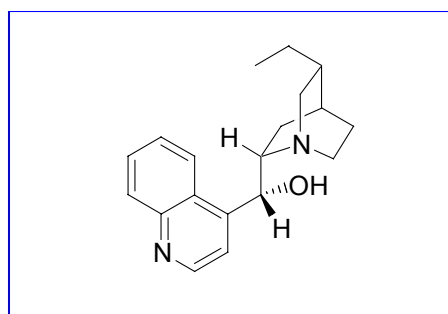
**Esquema 2: Preparação do benazepril e de outros inibidores da ACE a partir dos  $\alpha$ -hidroxi-ésteres (R)-**6** e (S)-**6** que podem ser obtidos por redução enantiosseletiva de **2**.**

### 1.3.1 Catálise Heterogênea

Após um estudo minucioso dos resultados obtidos e dos custos na utilização de catálise homogênea (catalisador Rh/norphos) e heterogênea para a redução de **2**, a última apresentou os melhores resultados, tendo sido utilizado como catalisador 5% Pt/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (pré-tratado com H<sub>2</sub> a 400°C por 4 horas), dihidrocinchonidina (HCd)(Figura 4) como auxiliar quiral, pressão de H<sub>2</sub> de 70 atm, temperatura ambiente e tempo de reação de 3-5 horas, obtendo-se um excesso enantiomérico de (R)-**6** de 80-92% e um rendimento de 98% (Blaser *et al.*, 1996). Os resultados obtidos são mostrados na Tabela 1.

**Tabela 1: Comparação da performance catalítica na hidrogenação de 2 utilizando Rh-*norfhos* (catálise homogênea) e Pt-*cinchonidina* (catálise heterogênea). O custo catalítico foi calculado por Kg do hidroxi-éster (Blaser *et al.*, 1996).**

	CATÁLISE HOMOGÊNEA	CATÁLISE HETEROGÊNEA
Enantiosseletividade	96%	80-92%
Solvente	EtOH, MeOH	tolueno( ácido acético)
Carga do Catalisador	100 (subst./cat.)	0,5% (5% Pt/Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub> ) (peso/peso)
Auxiliar Quiral	Rh:difosfina 1:1	0,03% HCd (peso/peso)
Tempo de Reação	20h	3-5h
Pressão/Temperatura	20-100bar, t.a.	70bar, t.a.
Separação do Catalisador	Não desenvolvido	Filtração (HCd não removido)
Manipulação	Sensível ao oxigênio	Nenhuma precaução especial
Estabilidade do Processo	Desconhecido	É crucial a qualidade do substrato
Custo do catalisador (US\$/Kg)	140-400	1-2



**Figura 4: Estrutura da 10,11-dihidrocinchonidina (HCd).**

Szöri *et al.* (2002) otimizaram o processo de obtenção de uma série de  $\alpha$ -ceto-ésteres, dentre eles o 2-oxo-4-fenil-butanoato de etila (**2**), depois de fazer um estudo criterioso dos parâmetros envolvidos chegando a conclusão que a ótima concentração do modificador é de  $1-3\text{mmol l}^{-1}$ . Em tais condições ele conseguiu diminuir a pressão de  $\text{H}_2$  de 70 para 25 atm. Os parâmetros utilizados no processo são mostrados na Tabela 2.

**Tabela 2: Hidrogenação enantiosseletiva otimizada de **2** utilizando 5% Pt/ $\text{Al}_2\text{O}_3$ . Tempo de reação de 60 min.**

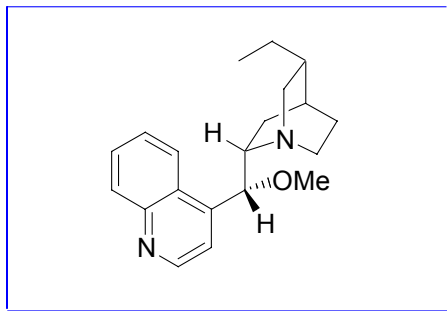
	Substr. (ml)	Modif. ( $\text{mmol l}^{-1}$ )	Temp. ( $^{\circ}\text{C}$ )	Cat. (mg)	$\text{H}_2$ (bar)	Solvente (ml)	Conversão ( $\text{mmol l}^{-1}$ )	<i>ee</i> / conf.
1	0,4	HCd (1)	20	50	25	5 <sup>a</sup>	100	90/R
2	0,4	HCd (1)	0	50	25	5 <sup>a</sup>	100	93/R

<sup>a</sup> Mistura 50% de tolueno em ácido acético

Pela adição contínua do indutor quiral dihidrocinchonidina (HCd) durante o processo LeBlond *et al.* (1999) conseguiram manter a relação ideal  $\text{Pt}/\text{HCd} = 1$  diminuindo a pressão de  $\text{H}_2$  para 5,8 atm utilizando como catalisador 1%Pt/ $\text{Al}_2\text{O}_3$  à temperatura de  $17^{\circ}\text{C}$  mantendo o tempo de reação de 60min utilizando como solvente ácido acético. Nestas condições não foi necessário o pré-tratamento do catalisador de Pt com 100 bar de  $\text{H}_2$  a  $400^{\circ}\text{C}$  e os excessos enantioméricos (*ee*) de (*R*)-**6** foram de 80-87%.

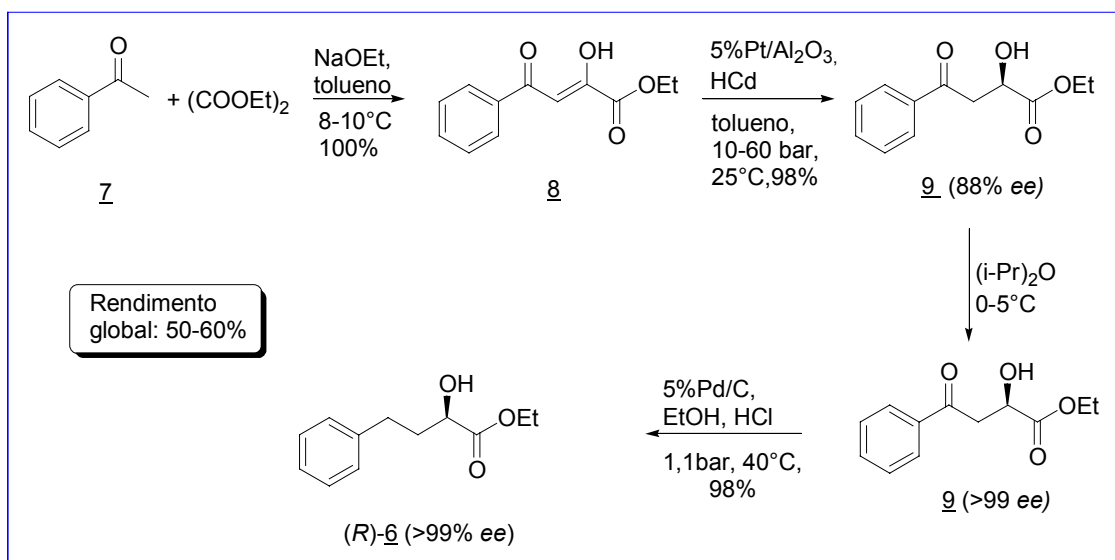
Utilizando ultra-som Török *et al.* (2000) aumentaram o *ee* na obtenção do (*R*)-**6** para 96% utilizando 5% Pt/ $\text{Al}_2\text{O}_3$  como catalisador, 9-*O*-metoxi-10,11-

dihidrocinchonidina (Figura 5) como indutor quiral, ácido acético como solvente, pressão de 10 bar e temperatura de 25°C.



**Figura 5: Estrutura da 9-*O*-metoxi-10,11-dihidrocinchonidina.**

A síntese total do (*R*)-2-hidroxi-4-fenil-butanoato de etila foi desenvolvida por Studer *et al.* (2000) e Herold *et al.* (2000) utilizando hidrogenação catalítica em duas etapas do processo (Esquema 3). A primeira etapa consiste na condensação de Perkin da acetofenona 7 com o oxalato de dietila quantitativamente. A segunda etapa, etapa chave do processo é a hidrogenação do 2,4-dioxo-éster 8 utilizando como catalisador 5%Pt/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> e dihidrocinchonidina (HCD) como indutor quiral fornecendo o (*R*)-2-hidroxi-4-ceto-4-fenil-éster 9 com *ee* de 88% e rendimento de 98%. O *ee* de 9 foi enriquecido para 99% por recristalização em éter isopropílico entre 0-5°C. A redução catalítica da função cetona de 9, utilizando como catalisador 5% Pd/C, forneceu o (*R*)-2-hidroxi-4-fenil-butanoato de etila (*R*)-6 com *ee* >99% e um rendimento global do processo de 50-60%.



**Esquema 3: Obtenção do (R)-2-hidroxi-4-fenil-butanoato de etila, (R)-6, por síntese total.**

A hidrogenação enantiosseletiva de cetonas ativadas catalisadas por catalisadores de Pt modificados é uma metodologia importante para a obtenção de álcoois quirais e pode ser empregada em diversos substratos (Studer *et al.*, 2003; Exner *et al.*, 2003; Blaser *et al.*, 1997).

### 1.3.2 Redução Microbiológica

A importância das biotransformações na Química Orgânica cresceu enormemente nos últimos anos tendo em vista a busca de tecnologias mais limpas e eficientes para a obtenção de moléculas estrategicamente importantes para a indústria (Faber, 2000).

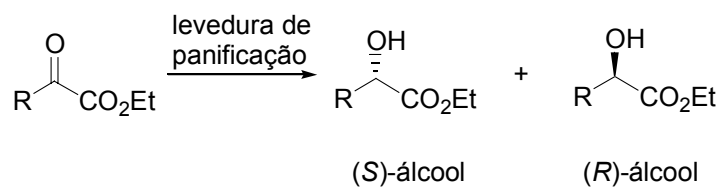
Nakamura *et al.* (1988) reduziram 2-ceto-ésteres utilizando levedura de panificação (*Saccharomyces cerevisiae*) em meio aquoso e hexano, utilizando células livres e imobilizadas em poliuretano para a preparação de 2-hidroxi-ésteres. Foram obtidos excessos enantioméricos (*ee*) de 30 a 94% com baixos rendimentos (20-47%),

ocorrendo inversão de *S* para *R* para substratos de cadeia alifática de 4 ou 5 carbonos na utilização de hexano como solvente. Os resultados são mostrados na Tabela 3.

A redução de  $\alpha$ -ceto-ésteres utilizando levedura de panificação seca não imobilizada foi testada em vários solventes fornecendo ambos os enantiômeros. Dependendo da estrutura do substrato utilizado os *ee* alcançaram até 93% (Nakamura *et al.*, 1991). Os resultados são mostrados na Tabela 4. O piruvato de etila apresentou melhores resultados, em H<sub>2</sub>O o *ee* foi de 93% do enantiômero *S* com 79% de rendimento. Ocorreu inversão de configuração para o 3-metil-2-oxo-butanoato de etila (**b**) e 2-oxo-heptanoato de etila (**c**), sendo que os melhores resultados foram observados em solvente orgânico, porém com baixos rendimentos.

Uma série de solventes orgânicos foi testada por Nakamura *et al.* (1993) visando o controle estereoquímico da redução do 2-oxo-heptanoato de etila utilizando levedura de panificação. O melhor resultado foi obtido com benzeno (Tabela 5). Com os resultados obtidos na redução de uma série de  $\alpha$ -ceto-ésteres, utilizando levedura de panificação em água ou benzeno seco podemos, concluir que existe uma preferência enantiomérica *R* na utilização de benzeno sendo exceção o piruvato de etila (Tabela 6).

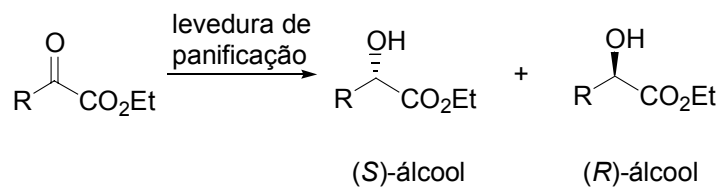
**Tabela 3: Redução enantiomérica de  $\alpha$ -ceto-ésteres utilizando levedura de Panificação (BY) em água e em hexano.**



R=CH<sub>3</sub>(CH<sub>2</sub>)*n*: **a**, *n*=0; **b**, *n*=1; **c**, *n*=2; **d**, *n*=3; **e**, *n*=4

ee (%) / Rendimento (%) / Configuração			
Substrato	BY em água	BY imobilizado em água	BY imobilizado em hexano
<b>a</b>	91/47/ <i>S</i>	87/43/ <i>S</i>	94/33/ <i>S</i>
<b>b</b>	75/42/ <i>S</i>	66/42/ <i>S</i>	36/28/ <i>S</i>
<b>c</b>	31/36/ <i>S</i>	39/36/ <i>S</i>	32/27/ <i>S</i>
<b>d</b>	50/29/ <i>S</i>	78/20/ <i>S</i>	47/41/ <i>R</i>
<b>e</b>	30/23/ <i>S</i>	30/23/ <i>S</i>	54/36/ <i>R</i>

**Tabela 4: Redução enantiomérica de  $\alpha$ -ceto-ésteres utilizando levedura de Panificação (BY) em vários solventes.**



Subst. <sup>a</sup>	R	BY (g)	Solv. <sup>b</sup>	Compl. <sup>c</sup>	Rend. (%)	ee (%)
a	CH <sub>3</sub>	5	H <sub>2</sub> O	-	79	93 (S)
		10	benzeno	H <sub>2</sub> O	55	81 (S)
		10	benzeno	tampão	56	73 (S)
b	(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> CH	5	H <sub>2</sub> O	-	63	19 (R)
		10	benzeno	H <sub>2</sub> O	39	87 (R)
		10	benzeno	tampão	49	90 (R)
c	C <sub>5</sub> H <sub>11</sub>	5	H <sub>2</sub> O	-	9	92 (S)
		5	hexano	H <sub>2</sub> O	30	37 (R)
		10	benzeno	H <sub>2</sub> O	18	84 (R)
		10	benzeno	tampão <sup>a</sup>	26	86 (R)

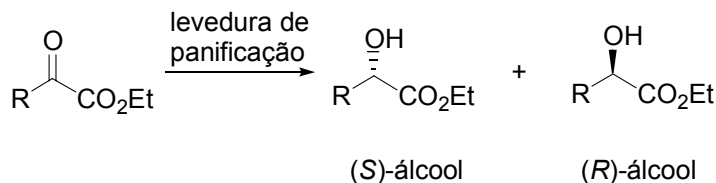
<sup>a</sup> 1mmol; <sup>b</sup> 50ml; <sup>c</sup> Tampão empregado: AcOH/AcONa 0,1M (pH 7).



**Tabela 5: Efeito do solvente na redução enantiosseletiva do 2-oxo-pentanoato de etila utilizando levedura de panificação.**

Solvente	Rend. (%)	ee (%)	Config.
Cicloexano	25	55	<i>R</i>
Hexano	22	61	<i>R</i>
Éter <i>t</i> -butil-metílico	26	63	<i>R</i>
Éter di-isopropílico	22	67	<i>R</i>
<i>p</i> -Xileno	17	72	<i>R</i>
Tolueno	25	76	<i>R</i>
Mesitileno	19	77	<i>R</i>
Benzeno	36	77	<i>R</i>
Acetato de <i>t</i> -butila	33	77	<i>R</i>

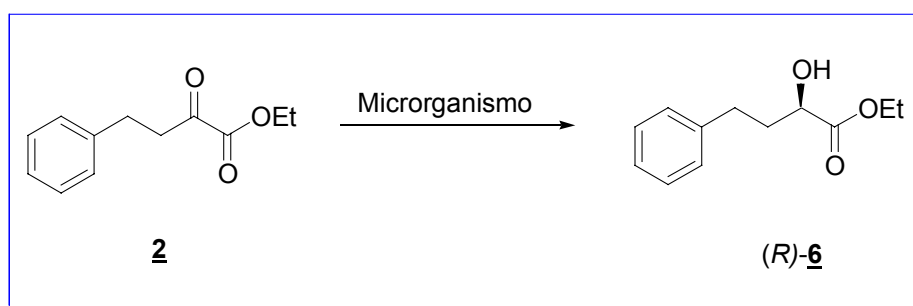
**Tabela 6: Redução de  $\alpha$ -ceto-ésteres utilizando fermento de panificação em água e benzeno seco.**



Substrato	Água		Benzeno		
	R	Rend. (%)	ee (%)	Rend. (%)	ee (%)
a	CH <sub>3</sub>	79	96 ( <i>S</i> )	56	73 ( <i>S</i> )
b	C <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	44	78 ( <i>S</i> )	39	13 ( <i>R</i> )
c	C <sub>3</sub> H <sub>7</sub>	23	76 ( <i>S</i> )	44	63 ( <i>R</i> )
d	C <sub>4</sub> H <sub>9</sub>	5	99 ( <i>S</i> )	54	86 ( <i>R</i> )
e	C <sub>5</sub> H <sub>11</sub>	9	92 ( <i>S</i> )	26	86 ( <i>R</i> )
f	(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> CH	63	19 ( <i>R</i> )	49	90 ( <i>R</i> )

Na elucidação do mecanismo do controle estereoquímico da redução de  $\alpha$ -ceto-ésteres em solvente orgânico, foram isoladas na levedura de panificação sete enzimas responsáveis pela redução e foram calculados os parâmetros cinéticos para a redução enzimática (Nakamura *et al.*, 1995).

A tentativa de Matsuyama *et al.* (1994) de produzir o (*R*)-2-hidroxi-4-fenil-butanoato de etila (*R*)-6 industrialmente por redução microbiológica do 2-oxo-4-fenil-butanoato de etila 2 células íntegras em água não teve sucesso (Esquema 4).



**Esquema 4: Obtenção do (*R*)-2-hidroxi-4-fenil-butanoato de etila (*R*)-6 por redução microbiológica do 2-oxo-4-fenil-butanoato de etila 2.**

Foram testados diversos microrganismos e os poucos resultados satisfatórios obtidos em relação ao *ee* apresentaram baixos rendimentos inviabilizando a possibilidade de aumento de escala. Os resultados são mostrados na Tabela 7.

**Tabela 7: Redução microbiológica do 2-oxo-4-fenil-butanoato de etila (Matsuyama *et al.* (1994) United States Patent 5,371,014).**

Microrganismos	Rend. (%)	Config. Absol.	EE (%)
<i>Achromobacter pestifer</i>	14	R	100
<i>Agrobacterium radiobacter</i>	16	S	35
<i>Ambrosiozyma cicatricosa</i>	11	S	56
<i>Ashbya gossypii</i>	37	S	100
<i>Aureobacterium testaceum</i>	41	S	62
<i>Bacillus licheniformis</i>	11	R	11
<i>Bacillus cereus</i>	12	R	21
<i>Bacillus subtilis</i>	15	S	71
<i>Botryosascus synnaedendrus</i>	16	S	19
<i>Brevibacterium ammoniagenes</i>	18	S	80
<i>Brevibacterium iodinum</i>	30	R	62
<i>Bretanomyces bruxellensis</i>	19	S	20
<i>Candida guilliermondii</i>	16	R	40
<i>Candida humicola</i>	10	S	26
<i>Candida parapsilosis</i>	50	S	20
<i>Candida pseudotropicalis</i>	10	S	62
<i>Candida rugosa</i>	21	S	71
<i>Candida utilis</i>	35	S	53
<i>Citrobacter freundii</i>	18	S	56
<i>Clavispora lusitaniae</i>	31	S	30
<i>Corynebacterium glutamicum</i>	54	S	20
<i>Erwinia carotovora</i>	11	R	100
<i>Esherichia coli</i>	34	S	94
<i>Filobasidium capsuligenum</i>	8	R	46
<i>Flavobacterium suaveolens</i>	23	S	85
<i>Geotrichum candidum</i>	34	S	28
<i>Guilliermondella selenospora</i>	10	R	20
<i>Hansenula fabianii</i>	43	S	36
<i>Hansenula holstii</i>	27	R	32
<i>Hansenula subpelliculosa</i>	32	R	34
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	12	R	100
<i>Kluyveromyces lactis</i>	43	R	32
<i>Kluyveromyces drosophilarum</i>	45	R	20
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	10	R	61
<i>Lactobacillus buchneri</i>	12	R	54
<i>Lactobacillus brevis</i> (IFO3960)	8	R	100
<i>Lactobacillus brevis</i> (NRIC1037)	59	S	65
<i>Lactobacillus casei</i> (IFO12004)	16	R	100
<i>Lactobacillus casei</i> (NRIC1044)	36	S	20
<i>Lactobacillus casei</i> (IFO3425)	35	S	20
<i>Lactobacillus cellobiosus</i>	11	R	53
<i>Lactobacillus collinoides</i>	12	R	60

MICROORGANISMOS	REND. (%)	CONFIG. ABSOL.	ee (%)
<i>Lactobacillus coryniformis</i>	13	R	53
<i>Lactobacillus curvatus</i>	13	R	56
<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	37	S	20
<i>Lactobacillus frigidus</i>	12	R	57
<i>Lactobacillus fructosus</i>	12	S	50
<i>Lactobacillus hilgardii</i>	13	R	39
<i>Lactobacillus lactis</i>	96	R	59
<i>Lactobacillus leichmannii</i>	44	S	40
<i>Lactobacillus malefermentans</i>	13	R	61
<i>Lactobacillus parvus</i>	73	R	22
<i>Lactobacillus plantarum</i>	30	S	96
<i>Lactobacillus sake</i>	14	R	24
<i>Lactobacillus salivarius</i>	13	R	58
<i>Lactobacillus vaccinistercus</i>	13	R	45
<i>Lactobacillus viridescens</i>	55	S	72
<i>Lactobacillus xylosum</i>	59	S	20
<i>Lactobacillus yamanashiensis</i>	13	S	33
<i>Leuconostoc dextranicum</i>	19	S	20
<i>Leuconostoc citrovorum</i>	77	R	35
<i>Leuconostoc cremoris</i>	12	R	57
<i>Leuconostoc dextranicum</i>	17	R	24
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> (IFO3349)	45	R	74
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> (IFO3426)	27	R	20
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> (NRIC1085)	21	R	25
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> (AHU1067)	15	S	84
<i>Lipomyces starkeyi</i>	10	R	24
<i>Lodderomyces elongisporus</i>	52	R	26
<i>Mycobacterium smegmatis</i>	15	S	21
<i>Micrococcus luteus</i>	10	S	24
<i>Pachysolen tannophilus</i>	26	R	20
<i>Paracoccus denitrificans</i>	11	S	74
<i>Pediococcus parvulus</i>	18	R	20
<i>Pediococcus pentosaceus</i>	39	R	22
<i>Pediococcus acidilactici</i>	56	R	37
<i>Pichia burtonii</i>	12	S	71
<i>Pichia farinosa</i>	20	S	67
<i>Pichia heedii</i>	21	R	69
<i>Pichia membranaefaciens</i>	47	R	33
<i>Pichia opuntiae</i> (IFO10024)	35	R	20
<i>Pichia opuntiae</i> (IFO10025)	10	S	34
<i>Pimelobacter simplex</i>	11	S	100
<i>Proteus vulgaris</i>	12	S	30
<i>Protaminobacter ruber</i>	21	S	43
<i>Pseudomonas aureofaciens</i>	36	S	95
<i>Pseudomonas chlororaphis</i>	46	S	76

MICROORGANISMOS	REND. (%)	CONFIG. ABSOLUTA	ee (%)
<i>Pseudomonas dacunhae</i>	13	R	100
<i>Pseudomonas riboflavina</i>	12	S	56
<i>Rhodococcus equii</i>	11	S	100
<i>Rhodosporidium diobovatum</i>	42	R	72
<i>Rhodosporidium toruloides</i>	10	R	100
<i>Rhodotorula glutinis</i> (AHU3454)	41	R	48
<i>Rhodotorula glutinis</i> (IFO0389)	10	S	37
<i>Rhodotolura minuta</i>	10	S	20
<i>Rhodotorula rubra</i>	25	R	57
<i>Serratia marcescens</i>	40	S	89
<i>Sporobolomyces salmonicolor</i>	45	S	20
<i>Staphylococcus aureus</i>	23	S	85
<i>Streptococcus alactosus</i>	10	R	25
<i>Streptococcus equinus</i>	12	R	91
<i>Streptococcus faecium</i>	93	R	52
<i>Streptococcus uberis</i>	80	R	40
<i>Streptococcus agalactiae</i>	95	S	68
<i>Streptococcus lactis</i>	26	S	76
<i>Streptococcus faecalis</i>	33	S	85
<i>Sporolactobacillus inulinus</i>	10	S	91
<i>Saccharomyces bayanus</i>	96	S	43
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	15	S	32
<i>Saccharomyces chevalieri</i>	96	S	40
<i>Saccharomyces dairensis</i>	29	R	42
<i>Saccharomyces kluyveri</i>	35	S	65
<i>Saccharomycopsis lipolytica</i>	10	S	61
<i>Saccharomyces rouxii</i>	14	R	78
<i>Saccharomyces uvarum</i>	20	S	33
<i>Saccharomycopsis capsularis</i>	10	R	20
<i>Saccharomycopsis fibuligera</i>	10	R	22
<i>Saccharomycopsis lipolytica</i>	10	S	61
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	34	R	20
<i>Schizosaccharomyces octosporus</i>	26	S	40
<i>Schwanniomyces occidentalis</i>	17	S	31
<i>Sporidiobolus pararoseus</i>	25	R	99
<i>Sporobolomyces salmonicolor</i>	45	S	20
<i>Sporidiobolus johnsonii</i>	51	R	22
<i>Sporobolomyces roseus</i>	11	R	52
<i>Stephanoascus ciferrii</i>	12	S	48
<i>Syringospora albicans</i>	58	S	32
<i>Torulasporea delbrueckii</i>	58	R	20
<i>Torulasporea delbrueckii</i>	70	R	45
<i>Trigonopsis variabilis</i>	25	S	69
<i>Wickerhamiella domercqii</i>	36	S	41
<i>Wingea robertsii</i>	19	S	42

MICROORGANISMOS	REND. (%)	CONFIG. ABSOLUTA	ee (%)
<i>Xanthomonas oryzae</i>	37	R	20
<i>Zygosaccharomyces bailii</i>	23	R	20
<i>Zygosaccharomyces fermentati</i>	31	S	20

Chadha *et al.* (1996) reportaram que não foi possível reduzir o 2-oxo-4-fenil-butanoato de etila 2 utilizando *Saccharomyces cerevisiae*. A redução foi alcançada com sucesso utilizando extrato aquoso de células de *Daucus carota* (cenoura selvagem) com excelentes rendimentos químicos (90%) e excessos enantioméricos (>99%). Entretanto, a utilização de culturas de células de planta requer uma grande quantidade de células em relação ao substrato (100:1) o que dificulta o aumento de escala do processo. Outra desvantagem é o longo tempo de processo (10 dias) inviabilizando sua utilização como um processo industrial.

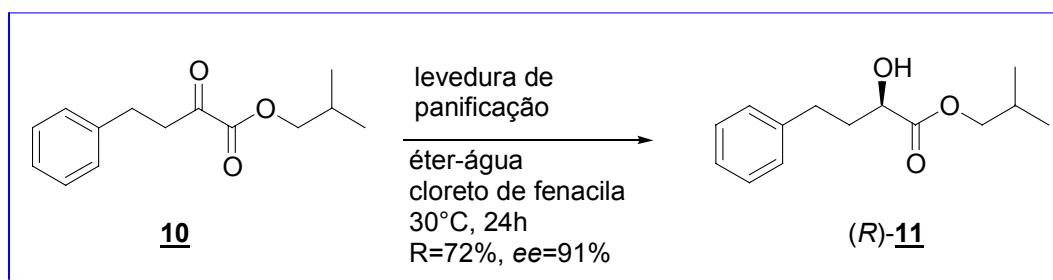
Oda *et al.* (1998) produziu o (R)-2-hidroxi-4-fenil-butanoato de etila (R)-6 pela redução do 2-oxo-4-fenil-butanoato de etila 2 em bioreator de interface utilizando os microrganismos *Rhodotorula minuta* IFO 0920 e *Candida holmii* KPY 12402. Os excessos enantioméricos obtidos foram de 95 e 94% para a *R. minuta* e para a *C. holmii* respectivamente. O tempo de incubação foi de 4 dias e os rendimentos em torno de 60%.

Dao *et al.* (1998a; 1998b) reportaram que *Saccharomyces cerevisiae*, pré-incubada na presença de cloreto de fenacila em éter dietílico, contendo pequena quantidade de água, reduz enantiosseletivamente o 2-oxo-4-fenil-butanoato de etila 2 com rendimentos de 94-96% e excessos enantioméricos de 81% fornecendo o (R)-2-hidroxi-4-fenil-butanoato de etila (R)-6. A otimização do procedimento para a redução

de diversos ésteres 2-oxo-4-fenil-butanóico foi feita pelo estudo de diversos parâmetros tais como:

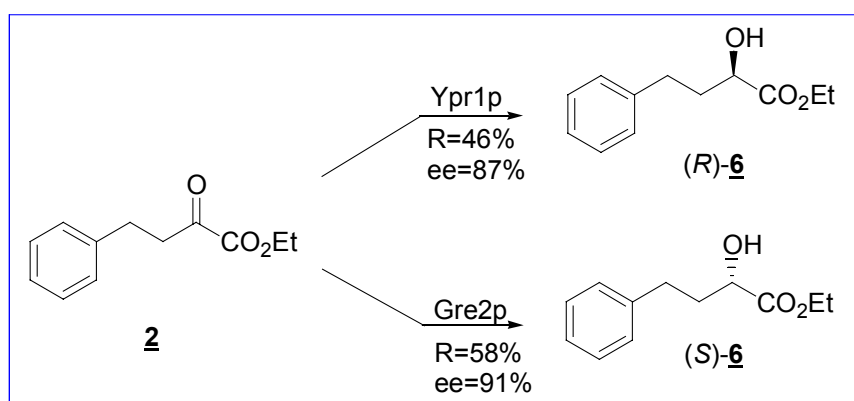
- ❖ Efeito da concentração de água na redução microbiológica em solvente orgânico,
- ❖ Efeito da concentração do substrato na redução utilizando como solvente éter dietílico-água,
- ❖ Efeito da estrutura do grupo alcóxi na redução microbiológica do 2-oxo-4-fenil-butanoato de alquila ou arila em éter dietílico-água
- ❖ Efeito da adição de um terceiro reagente na redução microbiológica do 2-oxo-4-fenil-butanoato de etila 2 em éter dietílico-água,
- ❖ Efeito do tempo de pré-incubação do microrganismo com cloreto de fenacila na redução microbiológica do 2-oxo-4-fenil-butanoato de etila 2.

O processo otimizado consiste na pré-incubação de 103g de levedura de panificação com 600mg de cloreto de fenacila utilizando como solvente 1,2L de éter dietílico contendo 60mL de água por um período de 6h a 30°C com 130 rpm de rotação. Após este período, 1,0g do  $\alpha$ -ceto-éster 10 é adicionado e a reação é mantida por um período de 24h obtendo (*R*)-11 com rendimento 72% e *ee* de 91%. A redução do 2-oxo-4-fenil-butanoato de etila 2 nas mesmas condições apresentou rendimento em torno de 96% e *ee* de 81% (Esquema 5).



**Esquema 5: Processo otimizado para a obtenção do  $\alpha$ -hidroxi-éster (R)-11 por redução microbiológica do 2-oxo-éster 10 utilizando levedura de panificação em éter-água.**

A super expressão na *Escherichia Coli* de duas hidrogenases em sua forma nativa, Ypr1p e Gre2p, produzidas pela levedura de panificação (*Saccharomyces cerevisiae*) permitiu o controle estereoquímico da redução microbiológica do 2-oxo-éster **2** para a obtenção do (R)-**6** com 42% de rendimento e 87% de *ee* pela utilização da enzima Ypr1p e obtenção do (S)-**6** com 58% de rendimento e 91% de *ee* pela utilização da enzima Gre2p sem a necessidade de adição de co-fator em ambos os casos (Kaluzna *et al.*, 2002)(Esquema 6).

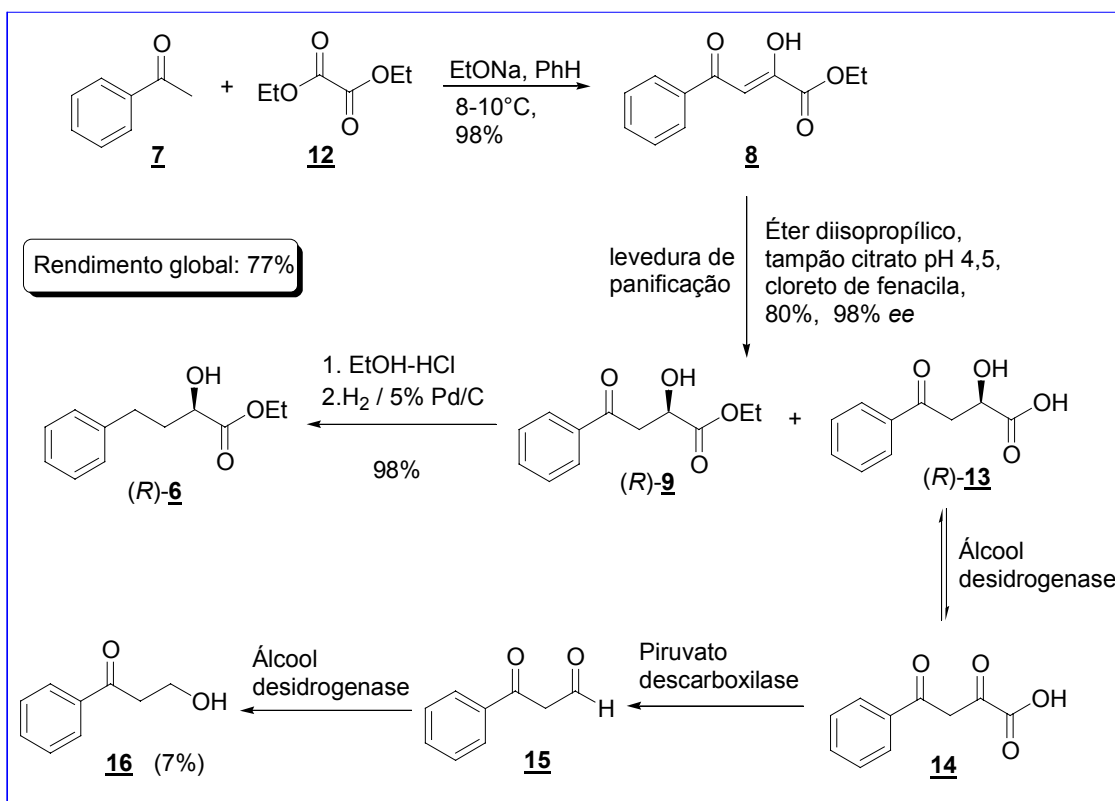


**Esquema 6: Controle estereoquímico na redução microbiológica de 2 utilizando super expressão das enzimas Ypr1p e Gre2p na *E. coli*.**



A redução assimétrica de **2** utilizando *Candida parapsilosis* forneceu (*S*)-**6** com 71% de rendimento e 99% de *ee* utilizando células livres e 65% de rendimento com 98% de *ee* utilizando células imobilizadas (Baskar *et al.*, 2004).

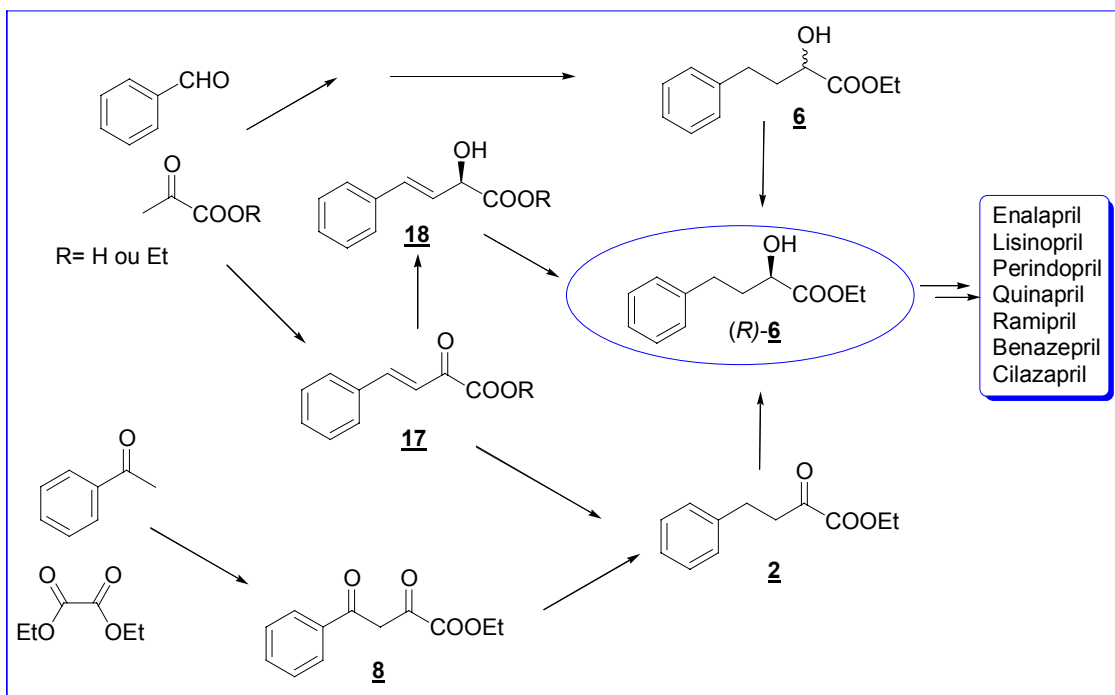
A produção (*R*)-2-hidroxi-4-fenil-butanoato de etila, (*R*)-**6**, foi feita por Fadnavis *et al.* (2004) com um excelente resultado, rendimento global de 77%, *ee* de 98%. A primeira etapa foi a condensação de Claisen da acetofenona (**7**) com o oxalato de dietila (**12**), redução do 2,4-di-ceto-éster (**8**) formado utilizando a metodologia desenvolvida por Dao *et al.* (1998a, 1998b), redução microbiológica empregando levedura de panificação em mistura éter di-isopropílico-água na presença de cloreto de fenacila, esterificação do ácido (*R*)-**13** formado por hidrólise com uma solução 1M de ácido clorídrico em etanol e posterior hidrogenação da cetona utilizando 5% de Pd/C como catalisador (Esquema 7). Durante a redução microbiológica ocorreu a oxidação lenta da  $\alpha$ -hidroxila de (*R*)-**13** catalisada por uma enzima álcool desidrogenase para formar o 2,4-di-ceto-ácido **14** que se decompôs pela ação da piruvato descarboxilase para formar o ceto-aldeído **15**. Pela ação da enzima aldol desidrogenase ocorreu decomposição de **15** para formar o álcool **16** com aproximadamente 7% de rendimento. O rendimento global (77%) foi melhor que o encontrado por Studer *et al.* (2000) em que foi utilizado hidrogenação na presença de 5%Pt/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> e dihidrocinchonidina (HCd) como indutor quiral na redução de **8** para **9** (50-60%). No processo utilizando catálise heterogênea foi necessário otimizar o excesso enantiomérico de 88 para 98% por recristalização utilizando éter isopropílico.



**Esquema 7: Síntese total do (R)-2-hidroxi-4-fenil-butanoato de etila tendo como etapa chave a redução carboetoxi-di-cetona 8 utilizando levedura de panificação em éter di-isopropílico-água.**

Um resumo das rotas utilizadas para a obtenção do (R)-2-hidroxi-4-fenil-butanoato de etila (R)-6 é mostrado no Esquema 8. (R)-6 pode ser obtido por resolução da mistura racêmica de 6 (Attwood *et al.*, 1986), redução enantiosseletiva do ácido 17 (referências citadas por Herold *et al.*, 2000), redução microbiológica ou hidrogenação utilizando catálise heterogênea de 2 como descrito anteriormente. Cada rota tem um ou mais pontos fracos:

- O melhor rendimento alcançado pela resolução da mistura racêmica 6 é de 50%.
- Nas reduções de 17 e 2 existem dificuldades com relação a seletividade e/ou atividade catalítica.
- Custo das matérias primas utilizadas.



**Esquema 8: Metodologias utilizadas para a preparação de (R)-6.**

#### 1.4 Algumas Considerações Sobre Biocatálise

Os biocatalisadores possuem características bem peculiares quando comparados com os catalisadores químicos (homogêneos e heterogêneos). Algumas características são:

**Seletividade:** os biocatalisadores possuem altas enantio, régio e quími-seletividades devido o reconhecimento do substrato pela enzima. Altas seletividades podem ser alcançadas com a redução de cetonas alifáticas possuindo substituintes parecidos, tal como metil-etil-cetona, o que não é possível pela utilização de catalisadores químicos que necessitam de uma grande diferença entre os substituintes para que ocorra altas enantiosseletividades.

**Segurança:** as reduções biocatalíticas são realizadas em condições brandas utilizando como solvente água. As fontes de hidrogênio são substâncias totalmente seguras tais como etanol e glicose, não necessitando da utilização de H<sub>2</sub> gasoso que é altamente explosivo

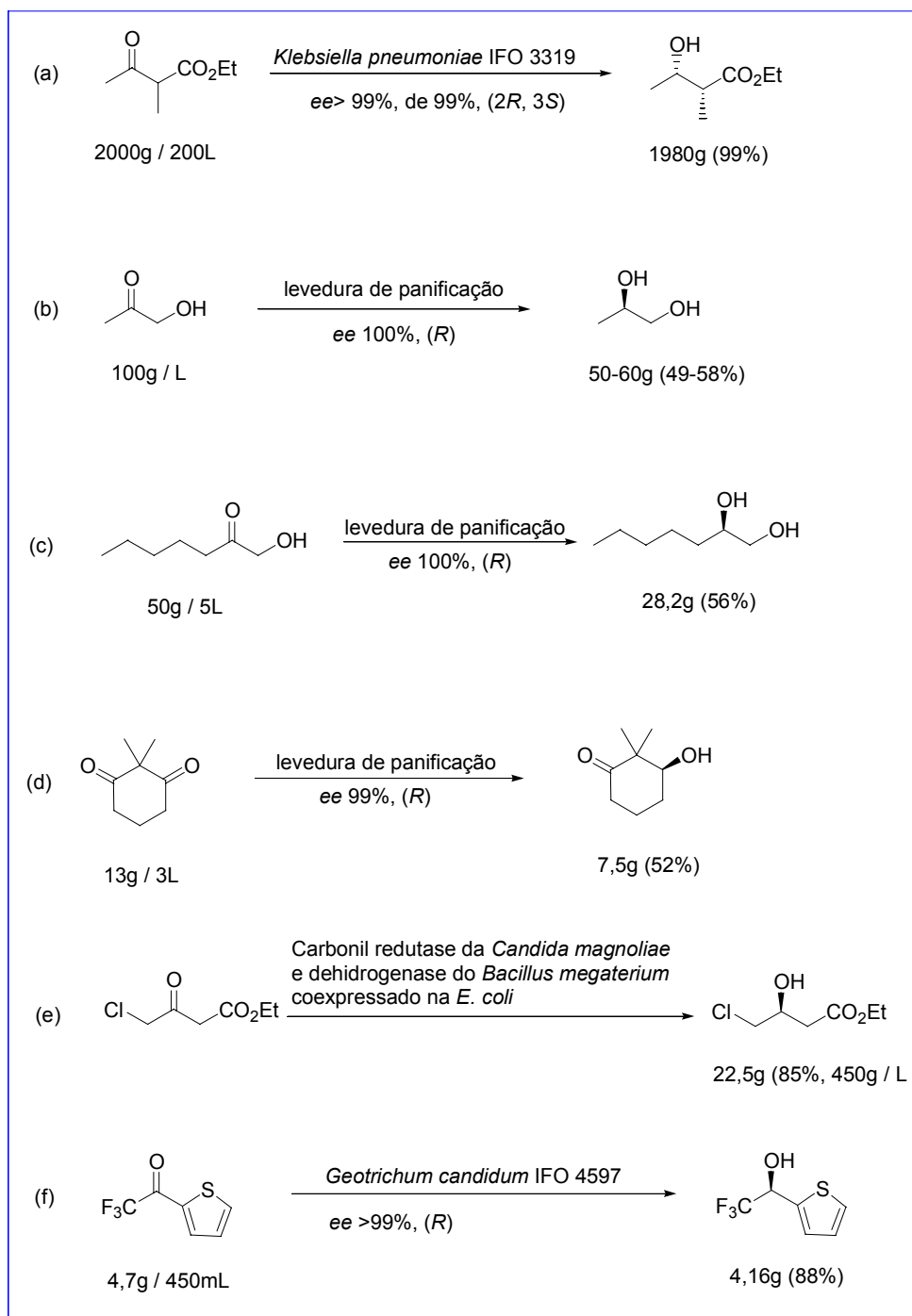
**Catalisador natural:** os biocatalisadores são microrganismos, plantas, animais ou enzimas isoladas destes organismos, por serem naturais, podem ser decompostos no meio ambiente após sua utilização. Muitos biocatalisadores utilizados para redução são enzimas isoladas e células íntegras disponíveis comercialmente e prontas para serem utilizadas semelhantes aos catalisadores químicos. São biocatalisadores encontrados comercialmente: levedura de panificação, álcool desidrogenases extraídas da levedura de panificação, *Thermoanaerobium brockii* (TBADH), fígado de cavalo e hidroxisteróide desidrogenases extraídas da *Pseudomonas testosteroni* e *Bacillus sphaericus*. A obtenção de outros biocatalisadores é feita pelo cultivo de células provenientes de culturas sementes que podem ser disponíveis comercialmente ou pertencente a coleções de microrganismos.

**Escolha do biocatalisador:** pode ser feita por: (1) triagem (*screening*) em diversas fontes tais como: amostras do solo, enzimas comerciais, coleções de microrganismos, bancos de clones entre outros (Demirjian *et al.*, 2000); (2) super expressão de enzimas de um microrganismo em outro (Esquema 6) e (3) preparação de microrganismos mutantes por evolução direcionada (Allen *et al.*, 2000).

**Otimização das condições reacionais:** muitas vezes os resultados obtidos em uma redução utilizando microrganismos necessitam ser otimizados em função dos rendimentos ou dos excessos enantioméricos obtidos. A otimização pode ser feita por: (1) utilização de massa celular seca em acetona com adição de co-enzima para aumento do excesso enantiomérico (Nakamura *et al.*, 2003); (2) utilização de solventes não

aquosos (Tabelas de 3-6), líquidos iônicos (Howarth *et al.*, 2001), CO<sub>2</sub> supercrítico (Matsuda *et al.*, 2003); (3) pela utilização de inibidores enzimáticos tais como: cloroacetato de etila, metil-vinil-cetona, álcool alílico, brometo de alila, compostos contendo enxofre, Mg<sup>2+</sup> e Ca<sup>2+</sup> entre outros que tem sido reportados como inibidores de enzimas pertencentes à levedura de panificação (Nakamura *et al.*, 2003); (4) modificação da temperatura da reação, que pode influenciar na enantiosseletividade (Heiss *et al.*, 2001).

**Síntese em grande escala:** uma desvantagem na utilização de biocatalisadores em relação aos catalisadores químicos é na síntese em grandes escalas; (1) o isolamento do produto pode ser complicado, (2) pode ser necessária a utilização de grandes espaços para o cultivo das células, (3) a quantidade de produto obtido em função do volume e do tempo é baixa devido as baixas concentrações e os longos tempos necessários para as reações quando comparados com os catalisadores químicos. Entretanto, este problema tem sido contornado pela otimização dos biocatalisadores através de: (1) modificações nas condições reacionais; (2) super expressão de enzimas de um microrganismo em outro (Esquema 6) e (3) preparação de microrganismos mutantes por evolução direcionada visando o aumento do poder de redução da enzima (Allen *et al.*, 2000). Alguns resultados obtidos em reduções microbiológicas enantiosseletiva em grande escala é mostrado na Figura 6 (Nakamura *et al.*, 2003)



**Figura 6: Resultados obtidos em reduções microbiológicas enantiosseletivas em grandes escalas (Nakamura *et al.*, 2003).**

### 1.4.1 Mecanismo da Biocatálise

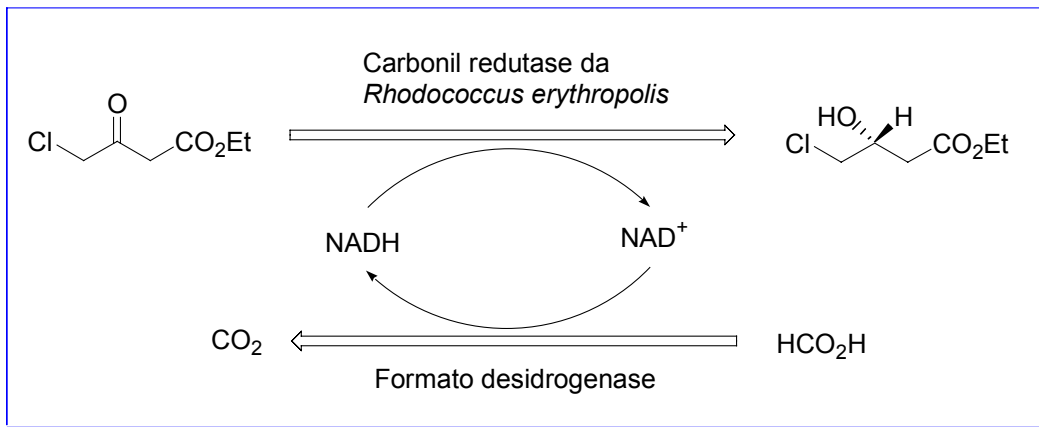
O mecanismo proposto para a redução microbiológica assimétrica de cetonas por enzimas desidrogenases e redutases consiste na transferência de um hidreto de uma coenzima, como exemplo NADH e NAD(P)H, para a carbonila do substrato e posterior regeneração do cofator pela transferência de um hidreto de uma fonte de hidrogênio tal como etanol, 2-propanol, glicose ou ácido fórmico para a coenzima catalisada por uma enzima desidrogenase. O Esquema 9 mostra o reciclo do cofator pela utilização do ácido fórmico na redução microbiológica do 4-cloro-3-oxo-butanoato de etila utilizando *Rhodococcus erythropolis*.

Existem quatro caminhos que permitem a transferência de hidreto da coenzima NAD(P)H para o substrato como é mostrado na Figura 7 (Nakamura *et al.*, 2003). Através das enzimas E1 (Bradshaw *et al.*, 1992b) e E2 (Nakamura *et al.*, 1990) o hidreto ataca a face *Si* do grupo carbonila e por intermédio das enzimas E3 (Jones *et al.*, 1976) e E4 o hidreto ataca a face *Re* formando o álcool nas configurações *R* e *S* respectivamente. As enzimas E1 e E3 transferem o hidreto pro-*(R)* da coenzima e as enzimas E2 e E4 utilizam os hidretos pro-*(S)*. Exemplos de enzimas E1-E3 são:

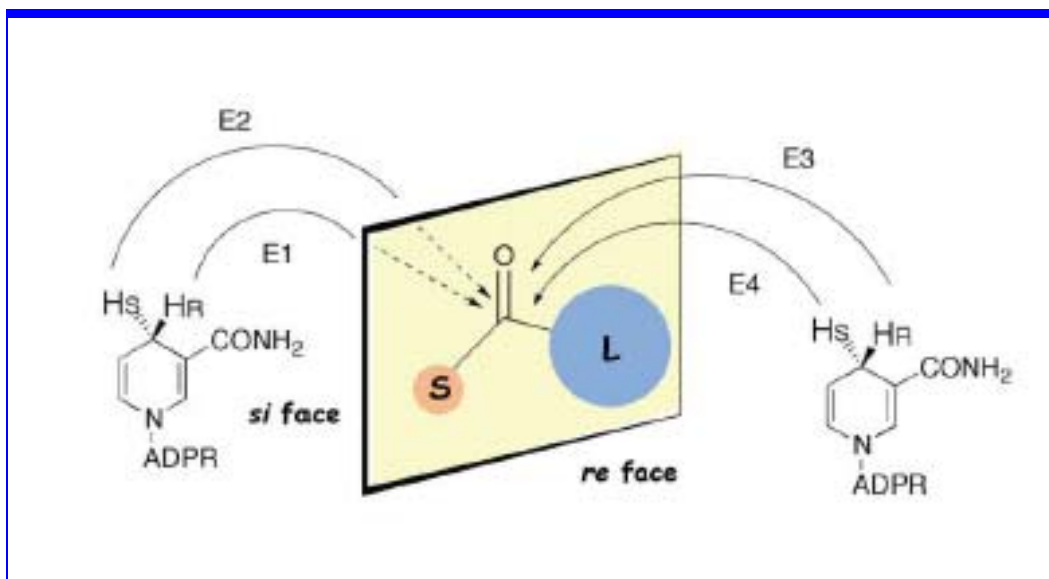
E1: *Pseudomonas sp.* álcool desidrogenase (Bradshaw *et al.*, 1992a), *Lactobacillus kefir*, álcool desidrogenase (Bradshaw *et al.*, 1992b).

E2: *Geotrichum candidum* glicerol desidrogenase (Nakamura *et al.*, 1990), *Mucor javanicus* diidroxiacetona redutase (Dudler *et al.*, 1977).

E3: álcool desidrogenase de levedura (Prelog, V., 1964), álcool desidrogenase de fígado de cavalo (Jones, 1986; Jones *et al.*, 1976), *Moraxella sp.* álcool desidrogenase (Velonia *et al.*, 1999).



**Esquema 9: Reciclo do NAD<sup>+</sup> pela utilização de HCO<sub>2</sub>H como fonte de hidrogênio para a redução.**



**Figura 7: Estereoquímica da transferência do hidreto do NAD(P)H para a carbonila do substrato (S é um grupo pequeno e L é um grupo grande). ADPR = Ribose-Difosfato-Adenina**

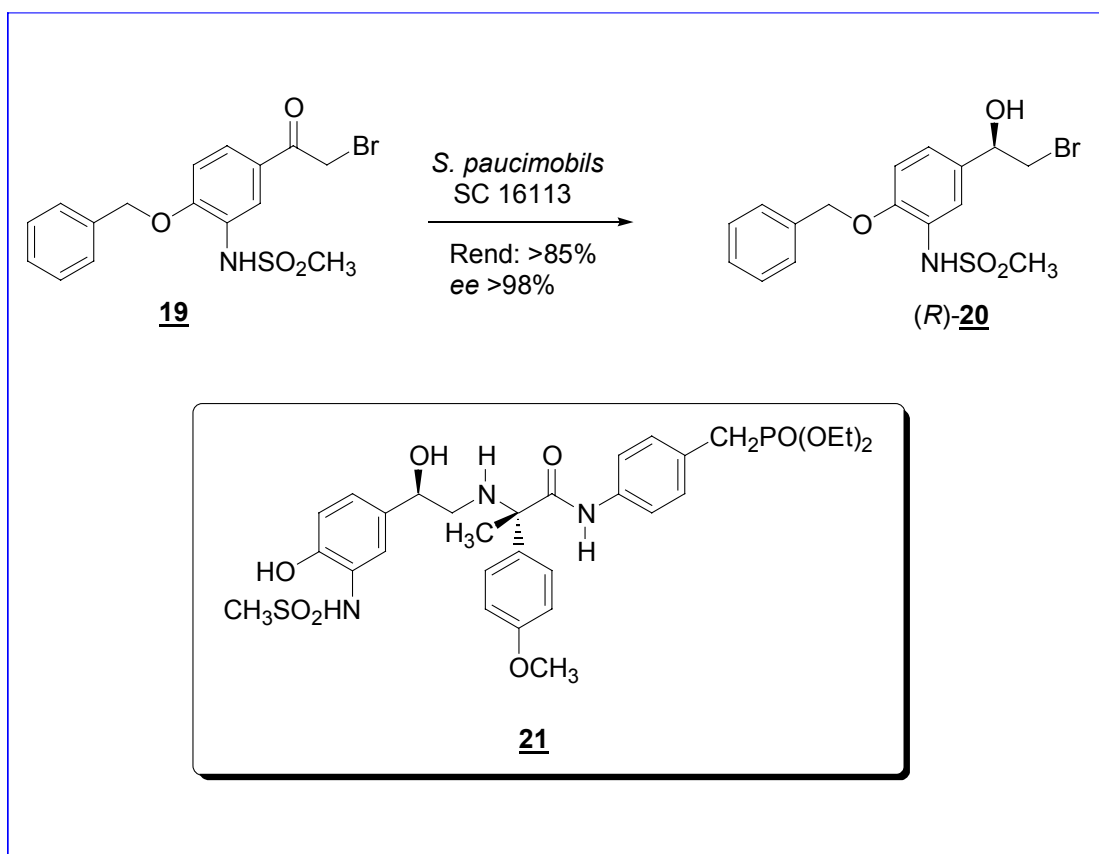


#### 1.4.2 Obtenção de Intermediários Quirais para a Indústria Farmacêutica por Biocatálise

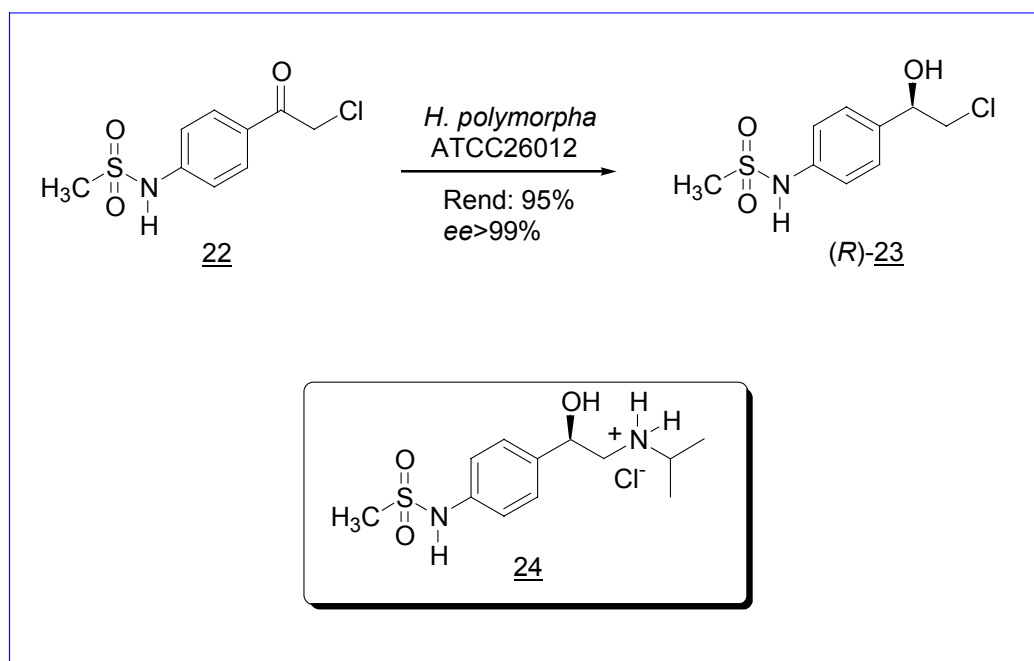
Nos últimos anos tem crescido bastante o emprego de biocatálise para a obtenção de intermediários estratégicos na indústria farmacêutica (Patel, 2001; Patel, 2002; Patel *et al.*, 2003).

A redução microbiológica de **19** (Figura 8) utilizando *S. paucimobilis* para a obtenção do álcool (*R*)-**20**, importante intermediário para a preparação do receptor agonista  $\beta_3$  **21**, foi feita na escala de 320g (Patel, 2001). O crescimento celular foi feito em um fermentador de 750L sendo coletadas 60kg de células úmidas por batelada. As células coletadas foram utilizadas na biotransformação de **19** em bateladas preparativas de 1L, 10L e 210L em condições aeróbicas e anaeróbicas a 37°C em um meio aquoso contendo glicose a pH 6,0. Em todas as bateladas foram obtidos rendimentos superiores a 85% e excessos enantioméricos superiores a 98%. A batelada preparativa de 200L forneceu 320g de (*R*)-**20** com 80% de rendimento e 99,5% de *ee*.

O álcool (*R*)-**23** (Figura 9), intermediário estratégico para a preparação do  $\beta$ -bloqueador com propriedades antiarrítmicas **24**, foi preparado por redução microbiológica de **22** utilizando *H. polymorpha* ATCC 26012 na escala de 12g (Patel, 2001). O crescimento celular foi feito em fermentador de 380L e as reduções foram realizadas em bateladas de 3L em uma solução tamponada a pH 7,0 contendo glicose a temperatura de 25°C. Após um período de 20 horas de reação o álcool (*R*)-**23** foi isolado com 68% de rendimento e excessos enantioméricos superiores a 99%.

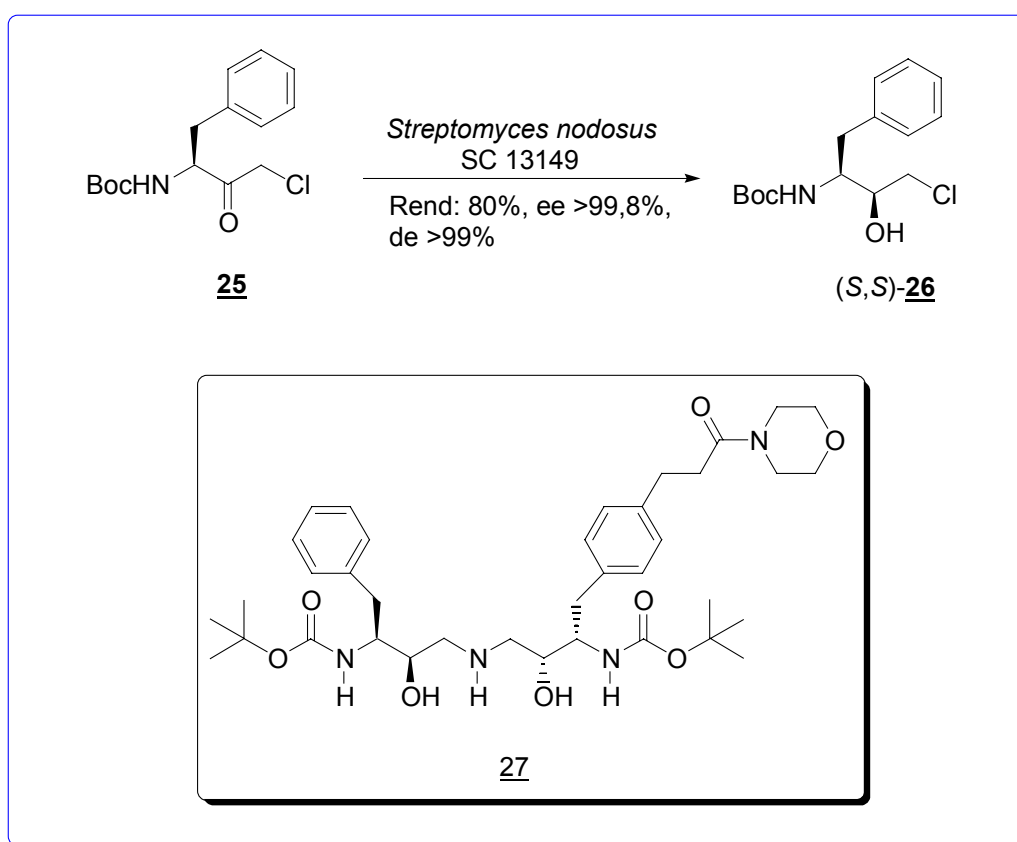


**Figura 8:** Síntese enzimática do intermediário quiral (**(R)-20**) utilizado na preparação do receptor agonista **β3**.



**Figura 9:** Utilização de redução microbiológica na síntese do intermediário quiral (**(R)-23**) utilizado na preparação do agente antiarrítmico **24**.

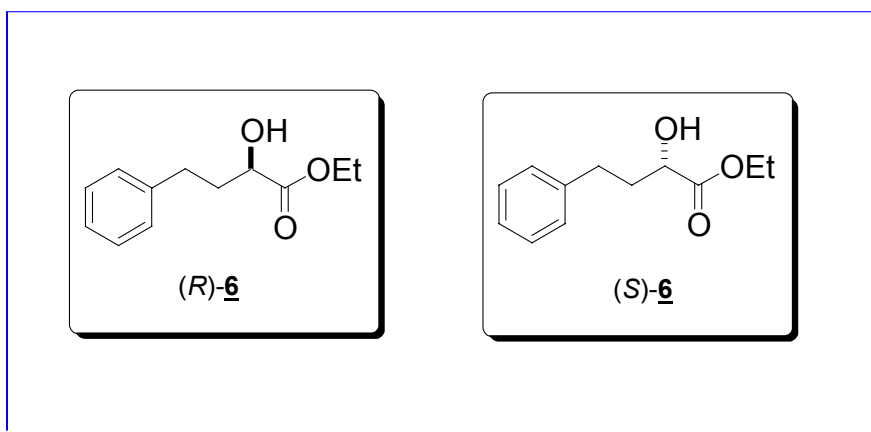
Para a produção do álcool (*S,S*)-**26**, importante intermediário para a obtenção do inibidor da HIV-Protease BMS-186318 **27**, a cetona **25** foi reduzida enantiosseletivamente utilizando *Streptomyces nodosus* SC 13149 (Patel, 2001) (Figura 10). O crescimento celular foi feito em fermentador de 25L por um período de 48 horas e a biotransformação de **25** foi processada em dois estágios por um período de 24 horas fornecendo o álcool (*S,S*)-**26** com 67% de rendimento, 99,9% de *ee* e pureza diastereoisomérica superior a 99%.



**Figura 10: Obtenção do álcool (*S,S*)-**26**, importante intermediário para a obtenção do inibidor da HIV-Protease BMS-186318 **27** por redução microbiológica enantiosseletiva.**

## 2. OBJETIVO

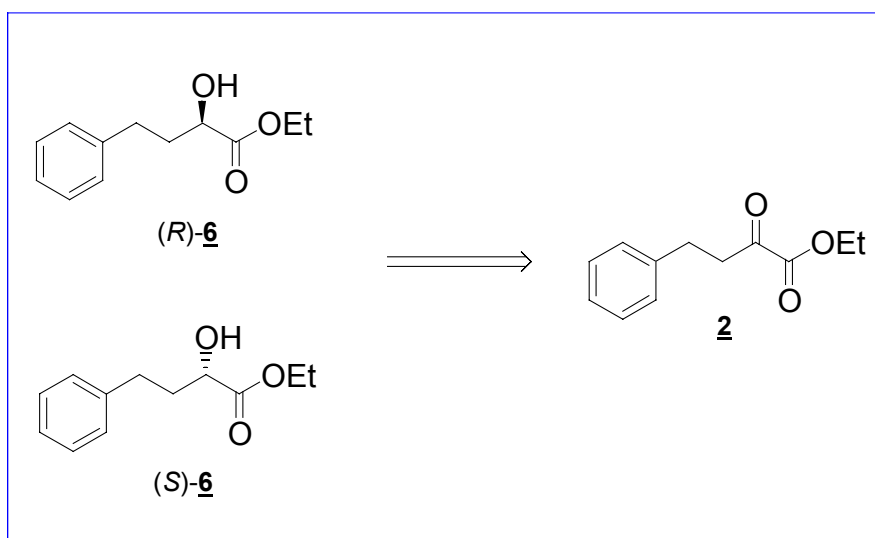
Este trabalho teve como objetivo principal a busca de uma metodologia limpa e eficiente para a redução enantiosseletiva do 2-oxo-4-fenil-butanoato de etila para a produção de (*R*)-2-hidroxi-4-fenil-butanoato de etila ((*R*)-**6**) e de (*S*)-2-hidroxi-4-fenil-butanoato de etila ((*S*)-**6**), importantes intermediários para a síntese dos inibidores da enzima conversora da angiotensina (ACE) tais como enalapril, lisinopril, quinapril, ramipril, perindopril, cilazapril e benazepril (Figura 3).



## 3. ESTRATÉGIA

### 3.1 Produção de (*S*) e de (*R*)-2-hidroxi-4-fenil-butanoato de etila

As seguintes metodologias podem ser empregadas para a preparação das moléculas alvo (*R*)-**6** e (*S*)-**6** a partir do 2-oxo-4-fenil-butanoato de etila **2**, matéria prima barata e facilmente encontrada no mercado (Esquema 10).



**Esquema 10: Obtenção das moléculas alvo.**

- Otimização do processo descrito por Szöri *et al.* (2002) para a hidrogenação enantiosseletiva do 2-oxo-4-fenil-butanoato de etila (2), por catálise heterogênea, utilizando como catalisador 5% Pt/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>.
- Utilização de oxazaborolidina (catalisador CBS) (Corey & Helal, 1998), como indutor quiral usado na redução assimétrica da função cetona visando uma nova metodologia para obtenção das moléculas alvo (*R*)- e (*S*)-6.
- O emprego da biocatálise (Nakamura *et al.*, 2003) como uma estratégia para a redução enantiosseletiva do 2-oxo-4-fenil-butanoato de etila 2 visando a obtenção dos intermediários (*S*)-(+)-2-hidroxi-4-fenil-butanoato de etila e (*R*)-(-)-2-hidroxi-4-fenil-butanoato de etila seletivamente. Tendo em vista que Chadha *et al.* (1995) não conseguiram reduzir o 2-oxo-4-fenil-butanoato de etila utilizando levedura de panificação (*Saccharomycies cerevisie*) e o controle estereoquímico foi conseguido por Dao *et al.* (1998) utilizando levedura de panificação em éter contendo pequena quantidade de água na presença cloreto de fenacila, em que foi obtido 81% de excesso enantiomérico e 96% de

rendimento, o desenvolvimento de uma metodologia limpa e barata para a obtenção das moléculas alvo (*R*)-**6** e (*S*)-**6** a partir da redução microbiológica do substrato **2** em meio aquoso é de suma importância para a aplicação desta tecnologia na produção dos inibidores da ACE.

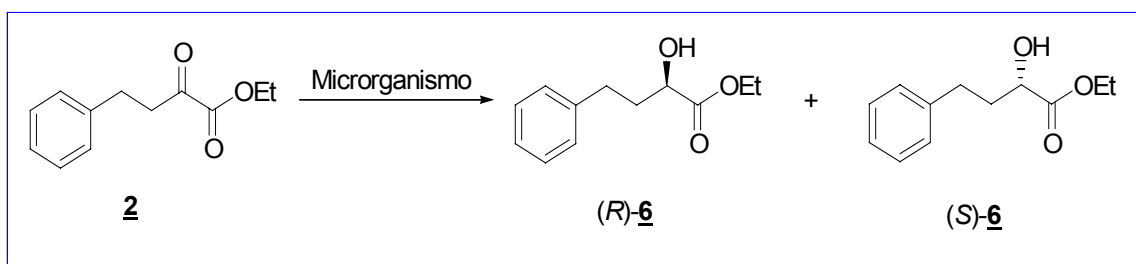
Dentre as metodologias citadas acima a mais interessante é a que emprega biocatálise por envolver condições mais brandas, limpas e operações unitárias mais simples. O protocolo utilizado foi desenvolvido por Ribeiro e col. (2003) para  $\beta$ -cetoésteres em que foi feito um *screening* empregando as enzimas redutases de várias leveduras.

Por ser um processo ainda não descrito na literatura, é importante verificar a reatividade do complexo borana-oxazaborolidina na redução enantiosseletiva de  $\alpha$ -cetoésteres.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Redução Microbiológica do 2-Oxo-4-fenil-butanoato de etila

Os microrganismos inicialmente testados para a redução microbiológica do 2-oxo-4-fenil-butanoato de etila (**2**) (Esquema 11) foram: *Saccharomices cerevisiae*, *Dekera sp.*, *Kluyveromyces marxianus* e *Hansenula sp.* Os protocolos utilizados na triagem inicial foram os mesmos utilizados por Ribeiro *et al.* (2003).



**Esquema 11: Redução 2-oxo-4-fenil-butanoato de etila (**2**) utilizando microrganismos.**

A biomassa foi obtida pelo inóculo de uma alçada da cultura em uma solução aquosa contendo glicose (1%), extrato de levedura (0,5%), peptona de carne (0,5%), sulfato de amônio (0,1%) e sulfato de magnésio hepta-hidratado (0,1%). A solução foi mantida entre 25-28°C sob agitação de 150 rpm por um período de 48 horas. A biomassa obtida foi separada por centrifugação e utilizada prontamente nas reações de redução.

A redução microbiológica foi feita pela adição da biomassa e do substrato, solubilizado em etanol, ao meio reacional contendo glicose (5%) e cloreto de magnésio (0,1%) em água. A solução foi mantida sob agitação de 150 rpm à temperatura ambiente por um período de 24 horas. Após este período, a mistura foi centrifugada para separação das células e a fase aquosa extraída com acetato de etila. A fase orgânica foi seca com sulfato de sódio anidro, filtrada e concentrada em evaporador rotatório fornecendo em óleo levemente amarelado. Os rendimentos mássicos, conversões,

rendimentos, excessos enantioméricos das transformações e o percentual de decomposição dos produtos obtidos são mostrados nas Tabela 8. Os rendimentos mássicos correspondem ao percentual da massa isolada com relação ao valor teórico e as conversões, rendimentos, excessos enantioméricos e decomposições foram calculados em área % utilizando CG.

O produto apresentou na região do infravermelho um sinal com número de onda na região de 3300 a 3400  $\text{cm}^{-1}$  (Espectro 2 ; página 84) relativo à deformação axial de hidroxila e o desaparecimento do sinal com número de onda na região de 1732  $\text{cm}^{-1}$  (Espectro 1; página 83 ) relativo à carbonila de cetona. No RMN  $^1\text{H}$  ocorreu o aparecimento de uma absorção na região de 4,16 a 4,30 ppm (Espectro ; pagina ), relativo ao metino ligado à hidroxila formada, na mesma região da absorção do metileno da função éster.

O cálculo dos excessos enantioméricos e a configuração absoluta do 2-hidroxi-4-fenil-butanoato de etila obtido por redução microbiológica estão detalhados em Material e Métodos.

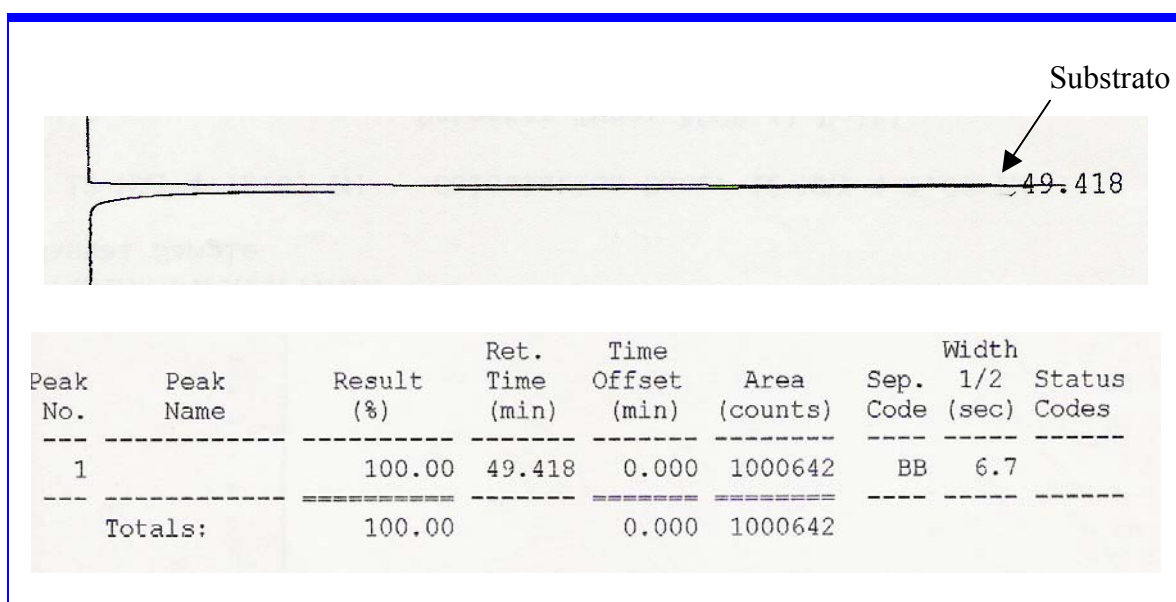


**Tabela 8: Resultados obtidos na redução microbiológica enantiosseletiva do 2-oxo-4-fenil-butanoato de etila.**

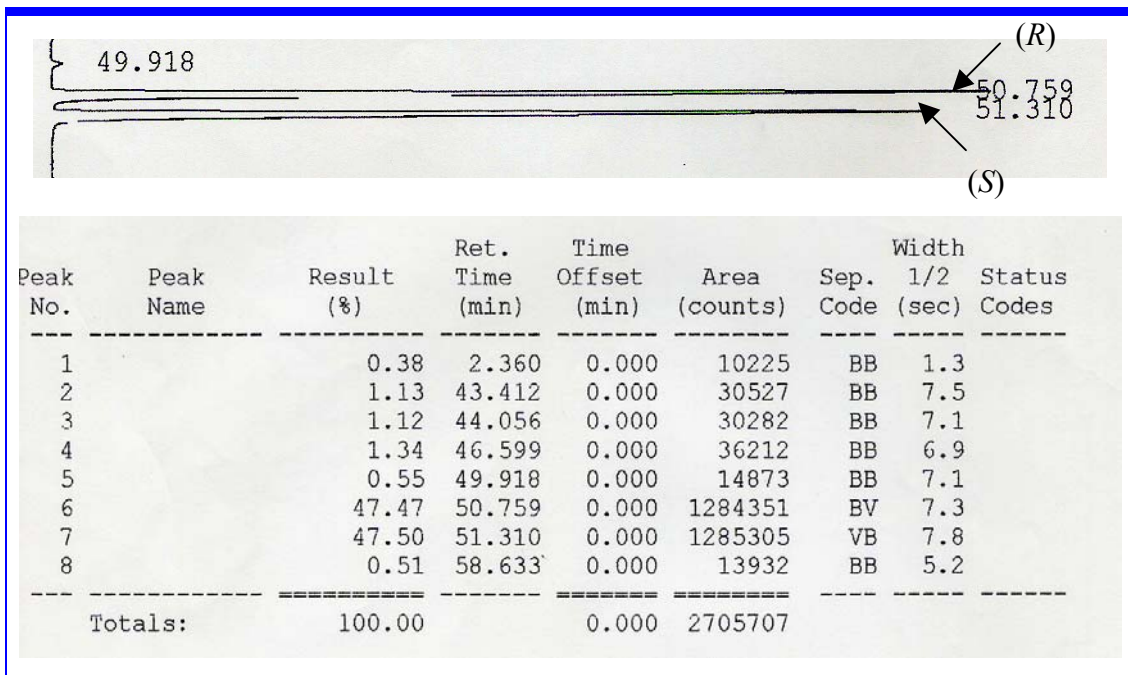
Entrada	Microrganismo	Origem	Ref.	Rend. Mássico (%)	Resultados obtidos por cromatografia em fase gasosa (CG)						
					Conv.(%) <sup>1</sup>	Rend. (%) <sup>1</sup>	ee (%) <sup>1</sup>	Config.	Decomp. (%) <sup>1</sup>	Impur. (%) <sup>1</sup>	
1	<i>S. cerevisiae</i>	EQ-DEB	-	88,7	100	55,4	100	S	41,0	3,5	
2		EQ-DEB	-	89,5	91,5	64,7	100	S	20,4	6,4	
3		EQ-DEB	-	84,0	92,4	63,7	100	S	19,7	9,0	
4		Fleischman			56,7	99,0	77,8	78,6	S	19,5	1,7
5		IQ-DBQ	Selvagem		90,0	96,0	69,5	98,0	S	19,5	7,0
6		IQ-DBQ	Selvagem		90,0	96,2	73,0	91,2	S	17,0	6,2
7		IQ-DBQ	P403CD1		76,8	96,0	59,2	97,2	S	27,4	9,4
8		IQ-DBQ	P4030C		74,5	95,6	62,5	85,6	S	23,7	9,4
9		IQ-DBQ	P4030C		75,5	90,0	69,4	60,5	S	17,9	2,7
10	<i>Dekera sp.</i>	EQ-DEB	-	89,0	89,0	53,5	100	S	35,5	0,0	
11		EQ-DEB	-	74,1	91,0	70,0	82,0	S	19,7	1,2	
12		EQ-DEB	-	76,0	95,4	73,4	95,6	S	20,5	1,6	
13	<i>Hansenula sp.</i>	EQ-DEB	-	69,8	8,2	8,2	22,6	S	0	0,0	
14		EQ-DEB	-	49,8	7,3	6,6	42,8	S	0	0,7	
15		EQ-DEB	-	58,2	12,4	12,4	30,0	S	0	0,0	
16	<i>K. marxianus</i>	EQ-DEB	-	64,5	82,5	51,7	30,5	R	30,4	21,6	
17		EQ-DEB	-	87,0	93,6	61,7	35,0	R	32,0	0,0	
18		EQ-DEB	-	64,5	97,5	42,5	8,5	S	50,0	5,0	

<sup>1</sup>Área%, EQ-DEB: Departamento de Engenharia Bioquímica da Escola de Química da UFRJ, IQ-DBQ: Departamento de Bioquímica do Instituto de Química da UFRJ, Selvagem: cepa selvagem, P403CD1 e P4030C: cepas mutantes.

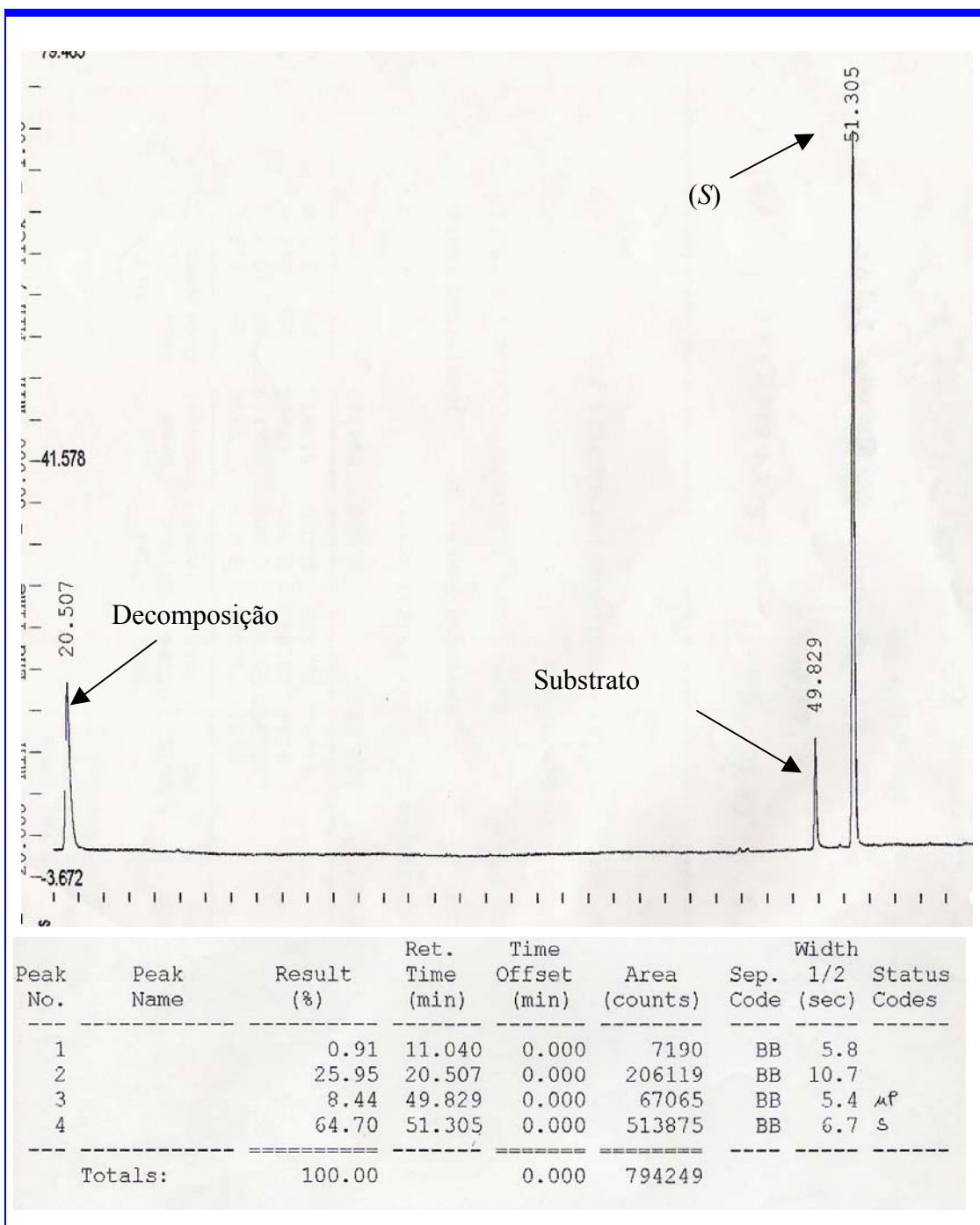
As reduções enantiosseletivas do 2-oxo-4-fenil-butanoato de etila empregando *S. cerevisiae* apresentaram altas conversões (>90%), rendimentos em torno de 63,0% por CG e excelentes excessos enantioméricos, chegando a 100% dependendo da origem da cepa utilizada (entradas 1, 2, 3 e 5 da Tabela 8). Cromatogramas (CG quiral) do substrato e do 2-hidroxi-4-fenil-butanoato racêmico e obtido por redução microbiológica utilizando *S. cerevisiae* são mostrados nas Figuras 11, 12 e 13 respectivamente ( $t_r$  do substrato: 49,9 min.,  $t_r$  do enantiômero *R*: 50,7 min e  $t_r$  do enantiômero *S*: 51,3 min).



**Figura 11: Cromatograma do 2-oxo-4-fenil-butanoato de etila padrão.**



**Figura 12: Cromatograma do 2-hidroxi-4-fenil-butanoato de etila racêmico.**



**Figura 13:** Cromatograma do 2-hidroxi-4-fenil-butanoato de etila obtido por redução microbiológica utilizando *S. cerevisiae*.

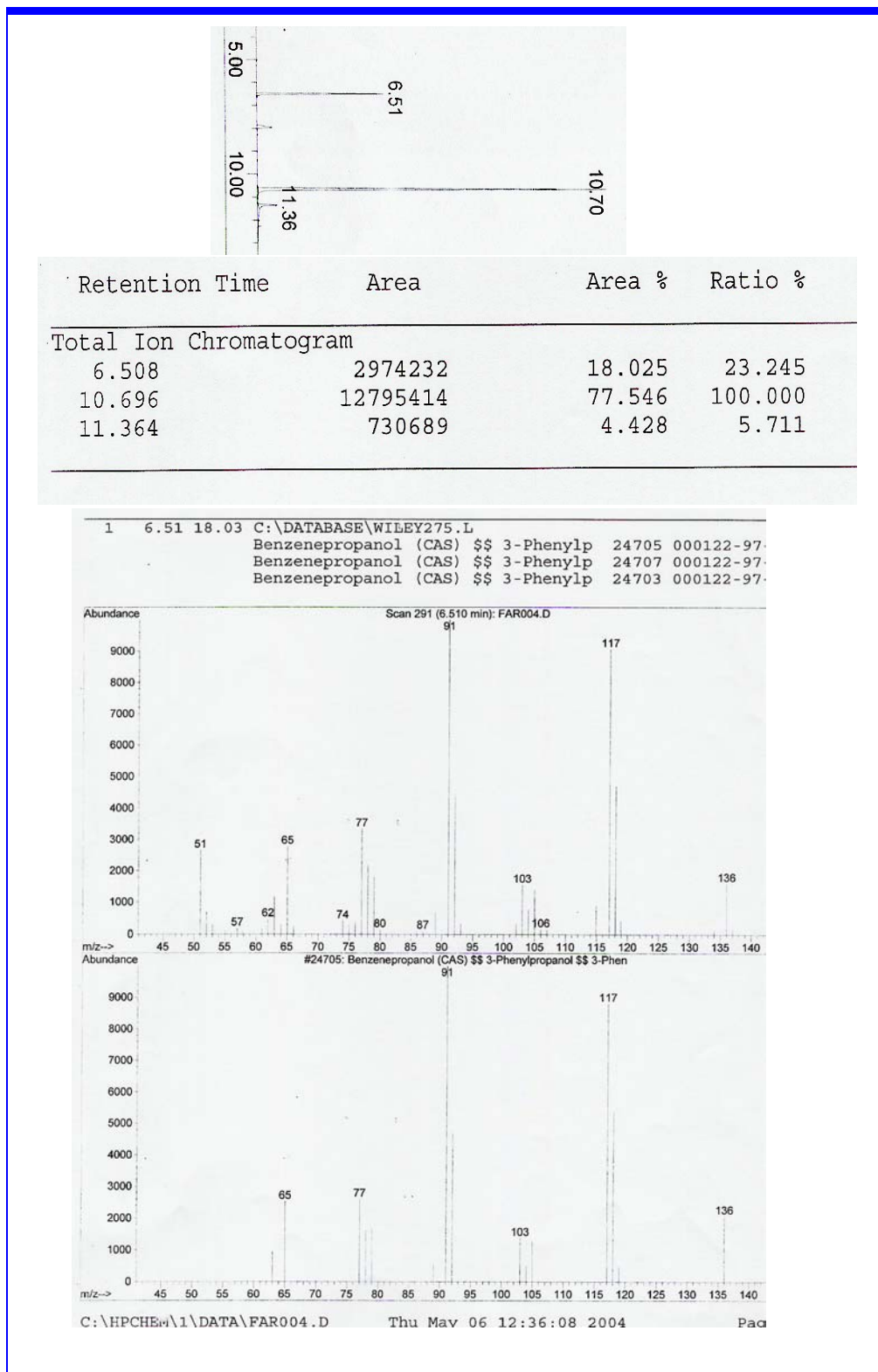
A rotação específica determinada por polarimetria para o 2-hidroxi-4-fenil-butanoato de etila obtido por redução utilizando *S. cerevisiae* foi de +19,8(1,0; CHCl<sub>3</sub>) mostrando que o enantiômero formado seletivamente com o maior tempo de retenção ( $t_r$ ,

em torno de 51,3 min) possui a configuração absoluta *S* quando comparado com o valor da rotação específica descrita na literatura para o enantiômero *R* que é de -15,7 ( $c=1,0$ ;  $\text{CHCl}_3$ ) (Dao *et al.*, 1998).

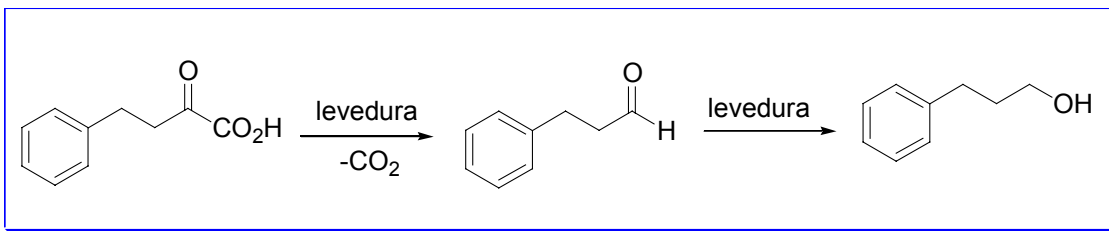
O resultado foi surpreendente porque Chadha *et al.* (1996) reportaram que não foi possível reduzir o 2-oxo-4-fenil-butanoato de etila utilizando *Saccharomyces cerevisiae*. A redução foi alcançada com sucesso utilizando extrato aquoso de células de *Daucus carota* (cenoura selvagem) com excelentes rendimentos químicos (90%) e excessos enantioméricos (>99%) para a obtenção do enantiômero *R*. O resultado obtido por Matsuyama *et al.* (1994) na redução do mesmo substrato, utilizando *Saccharomyces cerevisiae* em meio aquoso apresentou rendimento de 15% e *ee* de 32% para o enantiômero *S*. Vários fatores tais como: origem da cepa, diferença do meio de crescimento e do meio reacional podem ter alterado substancialmente a atividade enzimática corroborando para a obtenção de melhores resultados na presente tese. A cepa utilizada por Matsuyama foi de origem diferente da usada no presente trabalho, conseqüentemente diferentes enzimas devem ter atuado no processo. O meio de crescimento utilizado por Matsuyama *et al.* foi: glicose (2%), extrato de levedo (0.5%), peptona (0.3%), extrato de carne (0.3%), di-hidrogênio fosfato de potássio (0.1%), hidrogênio fosfato de potássio (0.2%) e carbonato de cálcio (0.5%) e o utilizado por nós foi: glicose (1%), extrato de levedura (0,5%), peptona de carne (0,5%), sulfato de amônio (0,1%) e sulfato de magnésio hepta-hidratado (0,1%). Está descrito na literatura que o  $\text{Mg}^{2+}$  é um inibidor de enzimas da *S. cerevisiae* (Nakamura *et al.*, 2003).

O sub-produto formado, com aproximadamente 20% de rendimento por CG e tempo de retenção de 20,5min, foi analisado por CG/EM mostrando ser o álcool 3-fenil-propílico (Figura 14) formado pela decomposição ácido 2-oxo-4-fenil-butanóico, proveniente da hidrólise do substrato em água, pelo microrganismo (Dao *et al.*, 1998)

ocorrendo inicialmente descarboxilação e em seguida a redução do aldeído formado (Figura 14)(Esquema12).



**Figura 14: CG/EM do sub-produto formada na redução microbiológica do 2-oxo-4-fenil-butanoato de etila utilizando *S. cerevisiae*.**



**Esquema 12: Decomposição do 2-oxo-4-fenil-butanoato de etila em água na presença de levedura.**

Os resultados obtidos para a redução do 2-oxo-4-fenil-butanoato de etila utilizando cepa industrial (Entrada 4; Tabela 8), cepa selvagem (Entradas 5 e 6; Tabela 8) e cepas mutantes (Entradas 7,8 e 9; Tabela 8) apresentaram resultados satisfatórios com conversões > 90%, rendimentos > 59%, *ee* > 78%, com exceção do resultado obtido na Entrada 9, e decomposições entre 17 e 27% calculados por CG. Os rendimentos isolados após extração da fase aquosa com acetato de etila foram superiores a 74% com alto grau de pureza.

A redução de 2 utilizando *Dekera sp.* é inédita na literatura e apresentou resultados bem semelhantes aos obtidos com *S. cerevisiae* (Entradas 10,11 e 12; Tabela 8). Um cromatograma do produto obtido (CG) utilizando coluna quiral é mostrado na Figura 16.

As reduções utilizando *Hansenula sp* apresentaram baixas conversões e baixos *ee* (Entradas 13, 14 e 15; Tabela 8). Um cromatograma do produto obtido (CG) utilizando coluna quiral é mostrado na Figura 33.

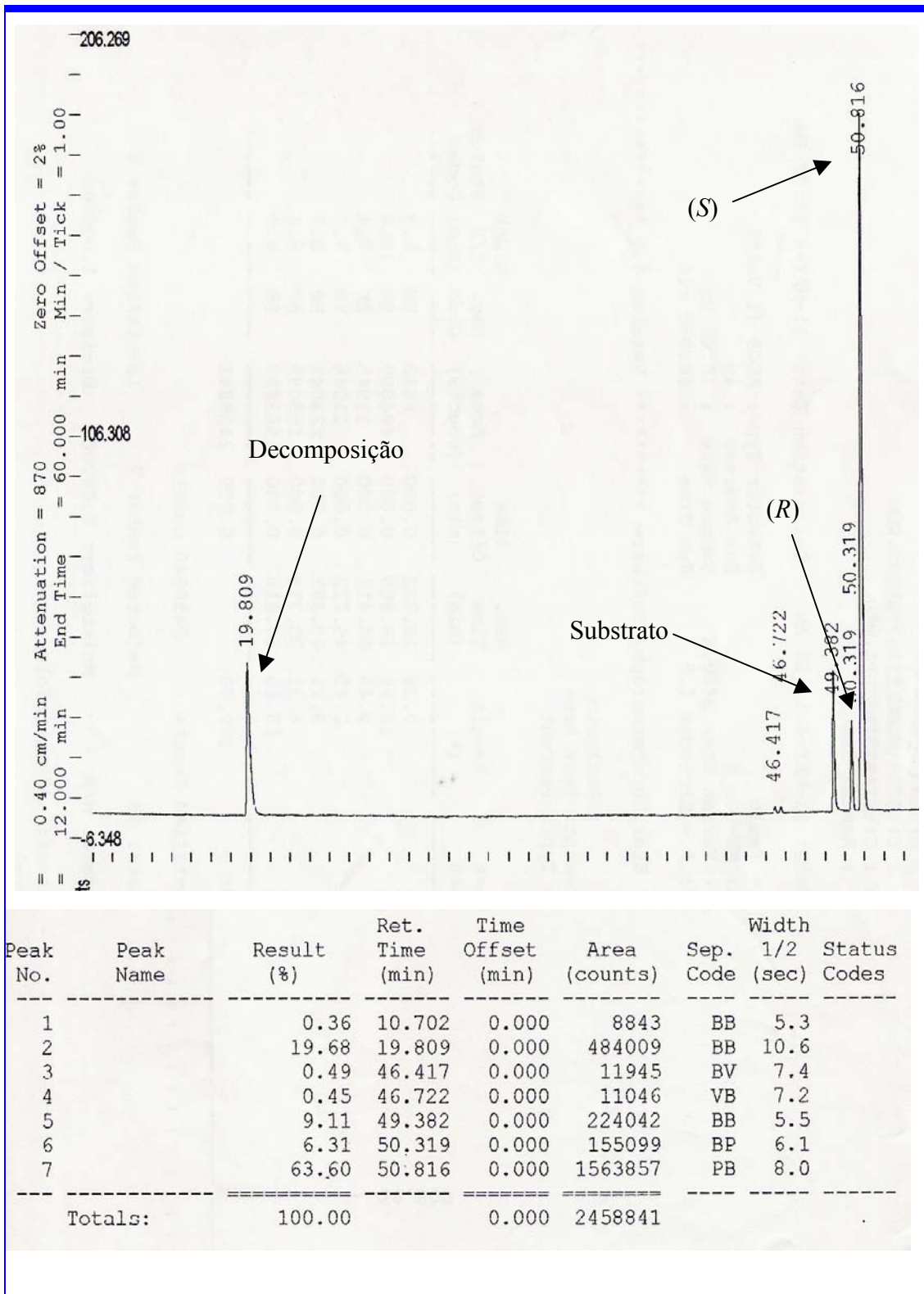


Figura 15: Cromatograma do 2-hidroxi-4-fenil-butanoato de etila obtido por redução microbiológica utilizando *Dekera sp.*



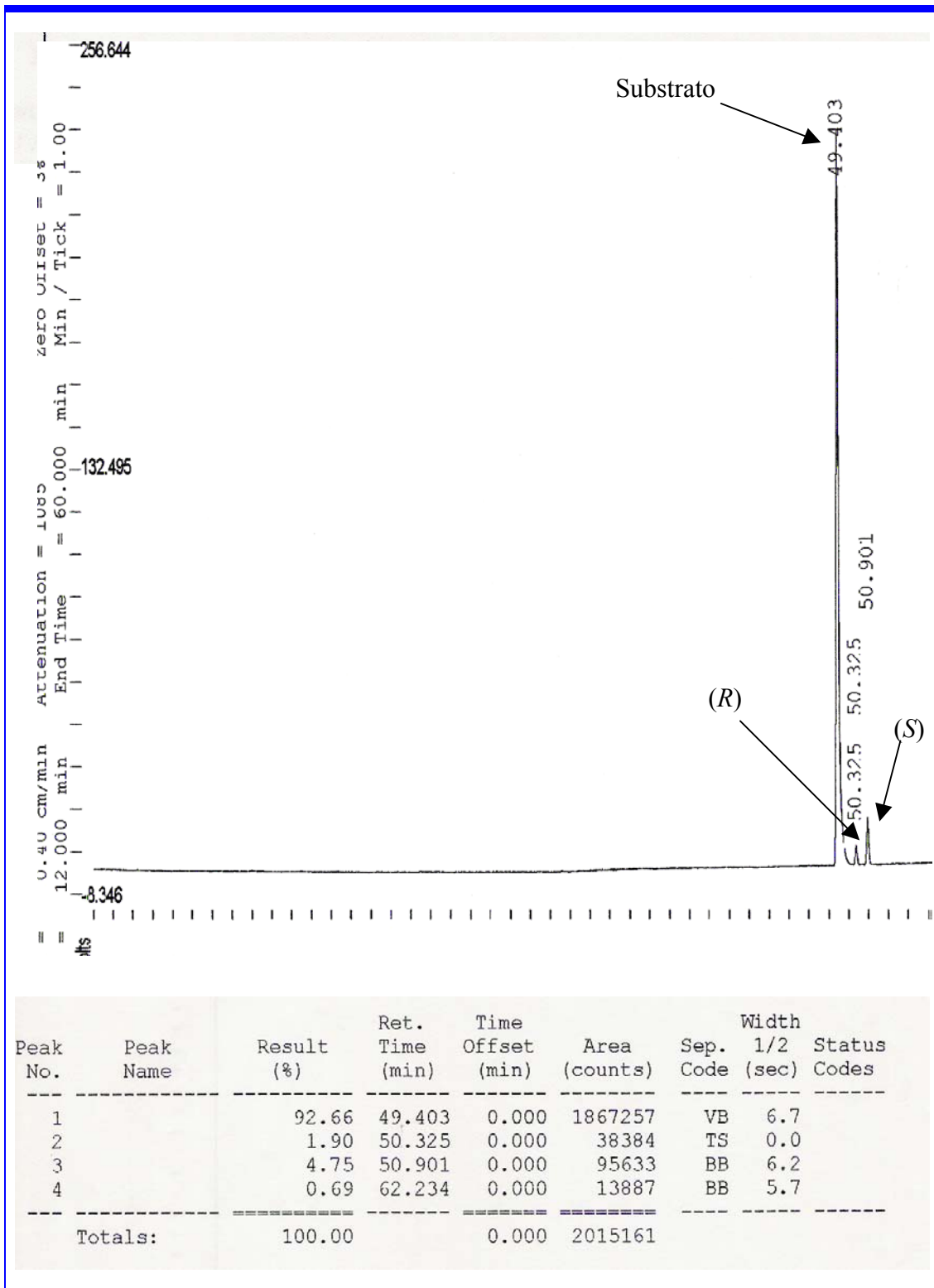


Figura 16: Cromatograma do 2-hidroxi-4-fenil-butanoato de etila obtido por redução microbiológica utilizando *Hansenula sp.*

As reduções utilizando *K. marxianus* apresentaram excelentes conversões (>80%), rendimentos médios (entre 52 e 61%) e baixos excessos enantioméricos (32%) do enantiômero *R*, resultado semelhante ao obtido por Matsuyama *et al.* (1994) utilizando *K. lactis* ( $R=43$ ,  $ee=32\%$ , config. *R*) e *K. drosophilum* ( $R=45$ ,  $ee=20\%$ , config. *R*) (Entradas 16,17 e 18; Tabela 9). Um cromatograma do produto (CG quiral) é mostrado na Figura 19.

O sucesso obtido por Patel *et al.* (2002) na redução microbiológica do  $\alpha$ -ceto-éster **28** para a obtenção do  $\alpha$ -hidroxi-éster (*R*)-**29** com rendimento e  $ee$  de 98% utilizando *Aureobasidium pullulans* e o controle da redução enantiosseletivas do  $\beta$ -ceto-éster **30** conseguido por Reeve (1997) para a obtenção dos  $\alpha$ -hidroxi-ésteres **31** e **32** (Figura 18) utilizando uma série de Microrganismos, dentre eles *Pichia angusta* (Razão **31:32** = 110:1), *Pichia pastoris* (Razão **31:32** = 20:1) e uma série de *Candidas* (Razão **31:32** = 20:1) nos encorajou a testar as enzimas redutases produzidas por estes microrganismos na redução do nosso substrato no intuito de direcionar a enantiosseletividade para o enantiômero *R*, estrategicamente mais interessante.

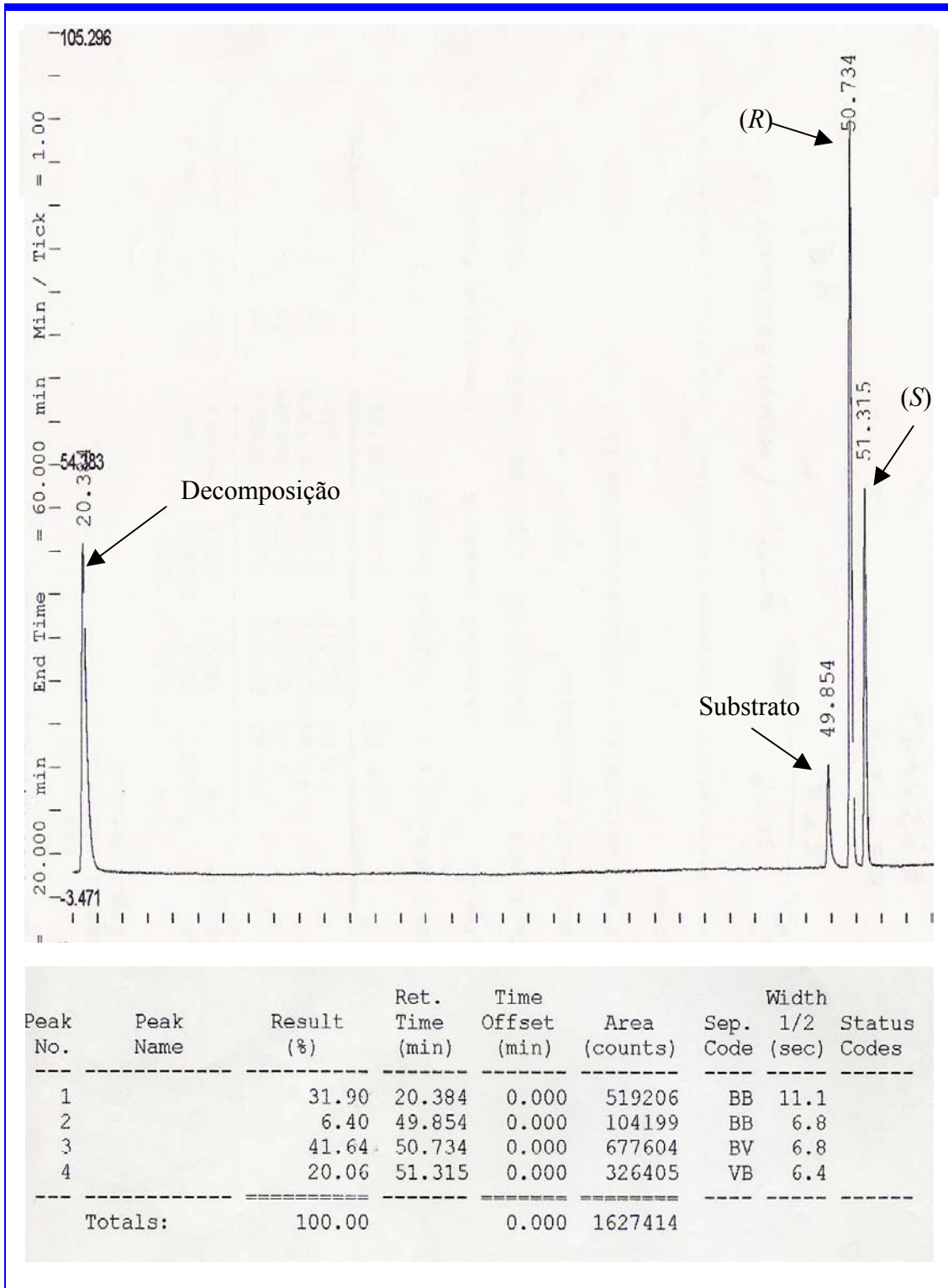
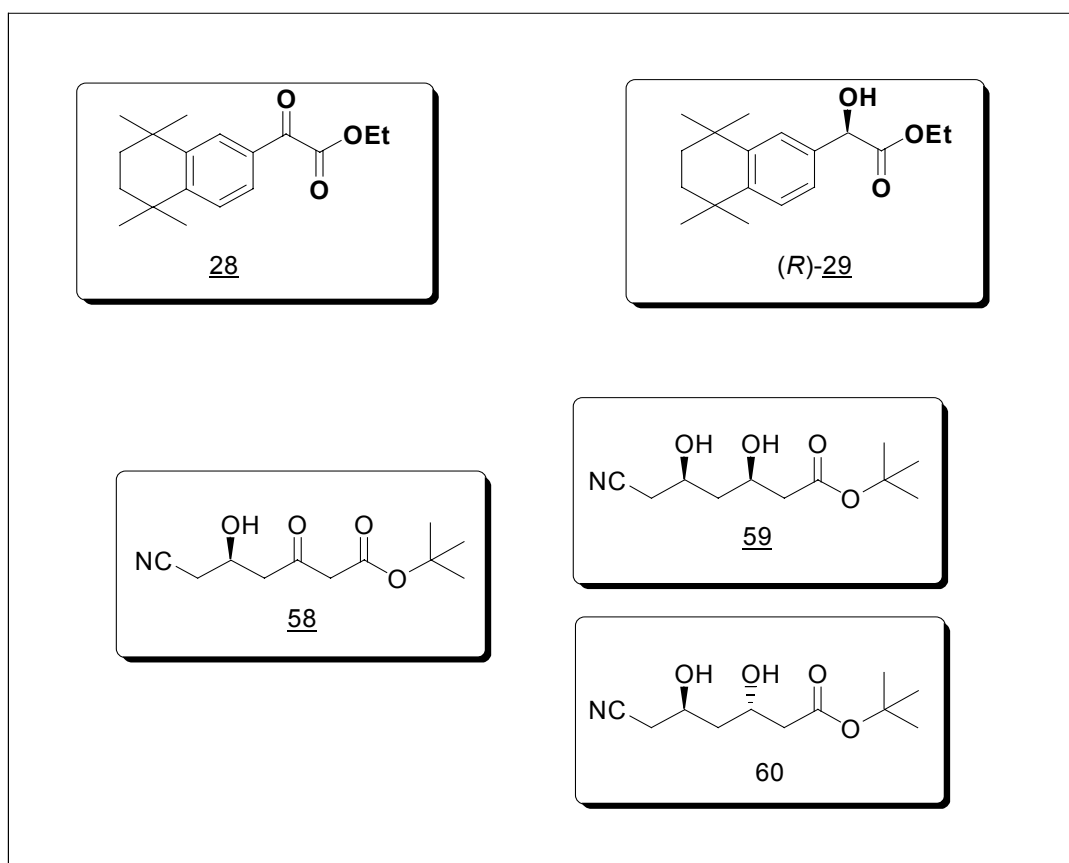


Figura 17: Cromatograma do 2-hidroxi-4-fenil-butanoato de etila obtido por redução microbológica utilizando *K. marxianus*.

Figura 17: Redução microbológica do  $\alpha$ -ceto-éster 55.



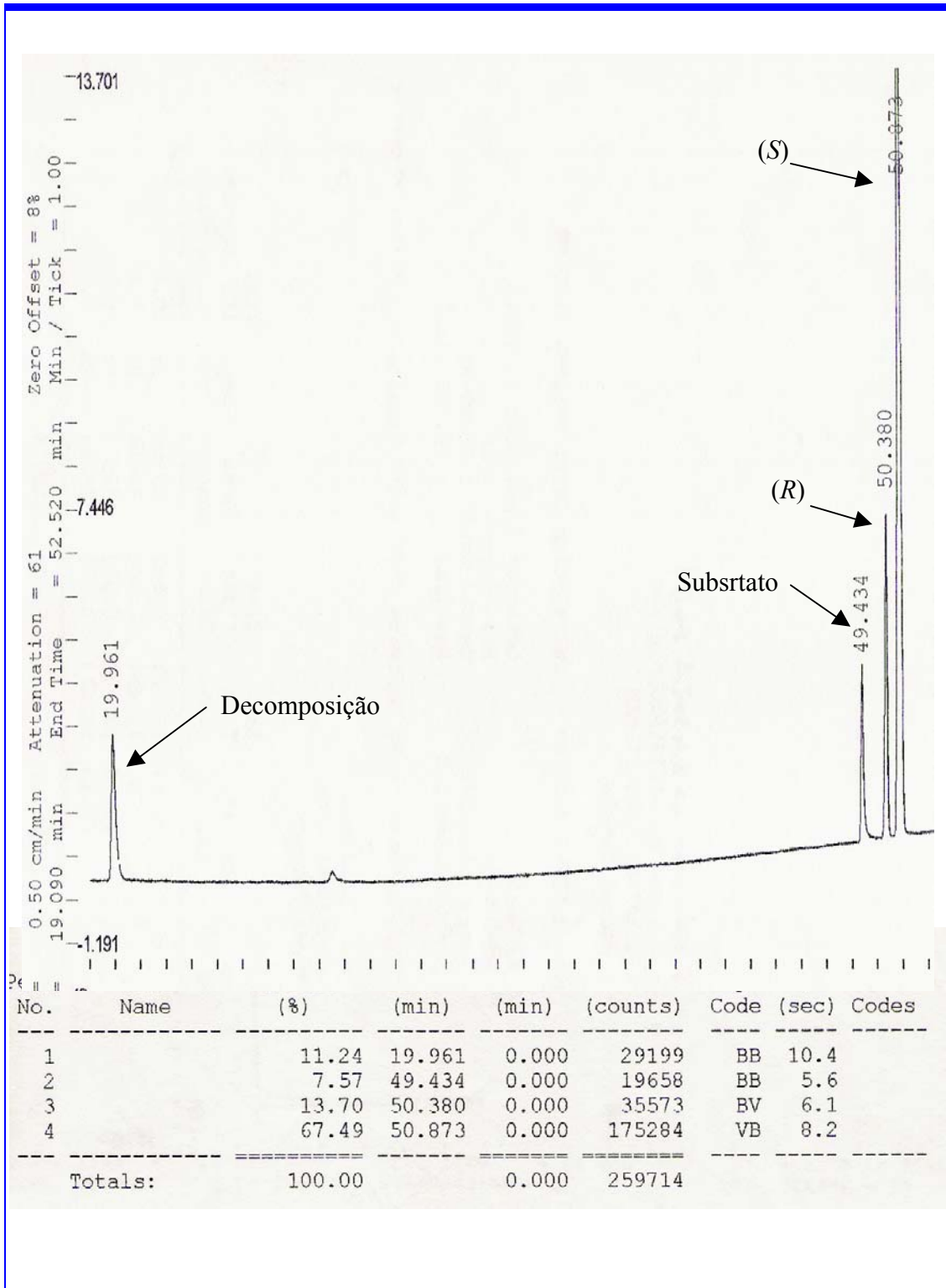
**Figura 18: Redução microbiológica do  $\alpha$ -ceto-éster 55 para fornecer (*R*)-26 e  $\beta$ -hidroxi-ésteres obtidos seletivamente pela redução microbiológica de 57.**

Empregando o mesmo protocolo utilizado nas reduções microbiológicas que constam da Tabela 8, submetemos o 2-oxo-4-fenil-butanoato de etila a redução utilizando *Aureobasidium pullulans*, *Candida guilliermondii*, *Pichia pastoris*, *Pichia anomala* e *Pichia angusta*. Os resultados são mostrados na Tabela 9. Os produtos obtidos apresentaram os mesmos valores de  $R_f$  por cromatografia em camada fina, e os mesmos tempos de retenção, por CG, que os produtos obtidos pela redução de 2 utilizando os microrganismos que constam da Tabela 8,  $R_f = 0,48$ ,  $t_r$  do substrato: 49,4 min.,  $t_r$  do enantiômero *R*: 50,3 min e  $t_r$  do enantiômero *S*: 50,9 min.

As reduções utilizando o fungo *A. pullulans* (Entradas 1 e 2, Tabela 9) apresentaram altas conversões (>92%), rendimentos razoáveis (>72%), excessos enantioméricos na faixa de 60% do enantiômero *S*, nível de decomposição médio de

13% e rendimentos isolados de 69%. Um cromatograma obtido por CG utilizando coluna quiral é mostrado na Figura 19.

As reduções utilizando *Candida guilliermondii* (Entradas 3 e 4, Tabela 9) forneceram excessos enantioméricos de 100% com baixos rendimentos (20%) e altas decomposições do substrato (73,2 e 85,4%) para formar o 3-fenil-propanol ( $t_r = 19,89$ ). Um cromatograma da análise quiral do produto por CG é mostrado na Figura 20.



**Figura 19:** Cromatograma do 2-hidroxi-4-fenil-butanoato de etila obtido por redução microbológica utilizando *A. pullulans*.

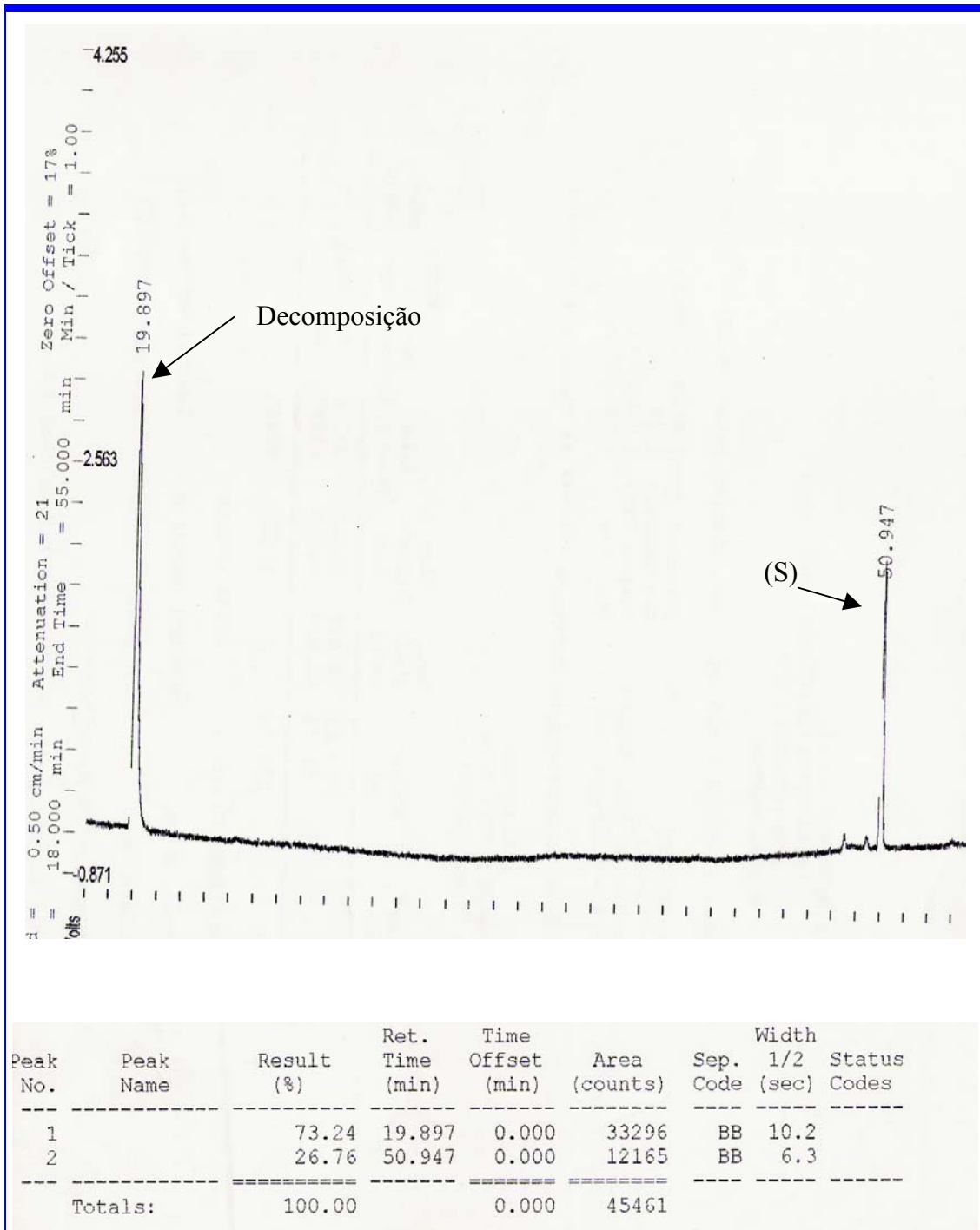


Figura 20: Cromatograma do 2-hidroxi-4-fenil-butanoato de etila obtido por redução microbiológica utilizando *Candida guilliermondii*.

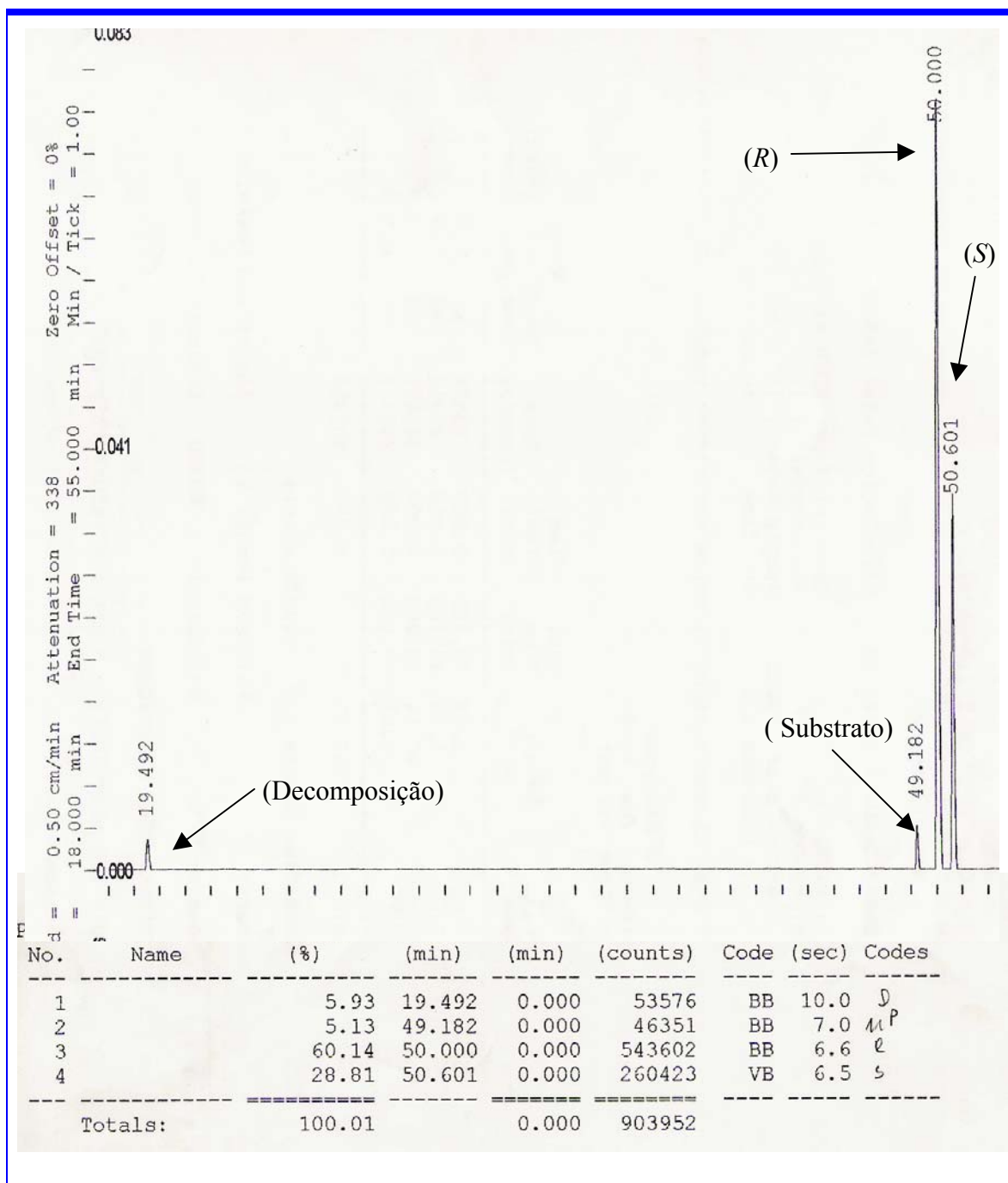
**Tabela 9: Resultados obtidos na redução microbiológica enantiosseletiva do 2-oxo-4-fenil-butanoato de etila utilizando leveduras metilotróficas, *Aureobasidium pullulans* e *Candida guilliermondii*.**

Entrada	Microrganismos	Origem	Ref.	Rend. Mássico (%)	Resultados obtidos por cromatografia em fase gasosa (CG)					
					Conv.(%) <sup>1</sup>	Rend. (%) <sup>1</sup>	ee (%) <sup>1</sup>	Config.	Decomp. (%) <sup>1</sup>	Impur. (%) <sup>1</sup>
1	<i>A. pullulans</i>	INCQS	ATCC: 9.348	61,1	92,4	81,2	66,2	<i>S</i>	11,2	0,0
2		INCQS	ATCC: 9.348	60,3	99,0	72,4	60,1	<i>S</i>	14,7	11,9
3	<i>Candida guill.</i>	INCQS	ATCC: 6.260	67,5	100	14,6	100	<i>S</i>	85,4	0,0
4		INCQS	ATCC: 6.260	97,1	100	26,7	100	<i>S</i>	73,2	0,1
5	<i>Pichia Pastoris</i>	IQ-DBQ	-	80,0	96,3	82,4	21,6	<i>R</i>	8,7	5,2
6		IQ-DBQ	-	78,0	94,9	89,0	35,2	<i>R</i>	6,0	0,0
7	<i>Pichia anomala</i>	INCQS	ATCC: 16.763	74,3	100	79,0	20,7	<i>R</i>	21,0	0,0
8		INCQS	ATCC: 16.763	79,2	94,6	66,1	20,7	<i>R</i>	28,5	0,0
9	<i>Pichia angusta</i>	INCQS	ATCC: 34.438	81,6	100	82,5	80,0	<i>R</i>	17,5	0,0
10		INCQS	ATCC: 34.438	78,3	100	85,5	81,3	<i>R</i>	14,5	0,0
11		INCQS	ATCC: 34.438	80,4	100	83,0	79,6	<i>R</i>	17,0	0,0
12		INCQS	ATCC: 34.438	82,2	97,3	79,0	79,0	<i>R</i>	16,6	1,7
13		INCQS	ATCC: 34.438	82,2	100	79,0	76,0	<i>R</i>	19,1	1,9

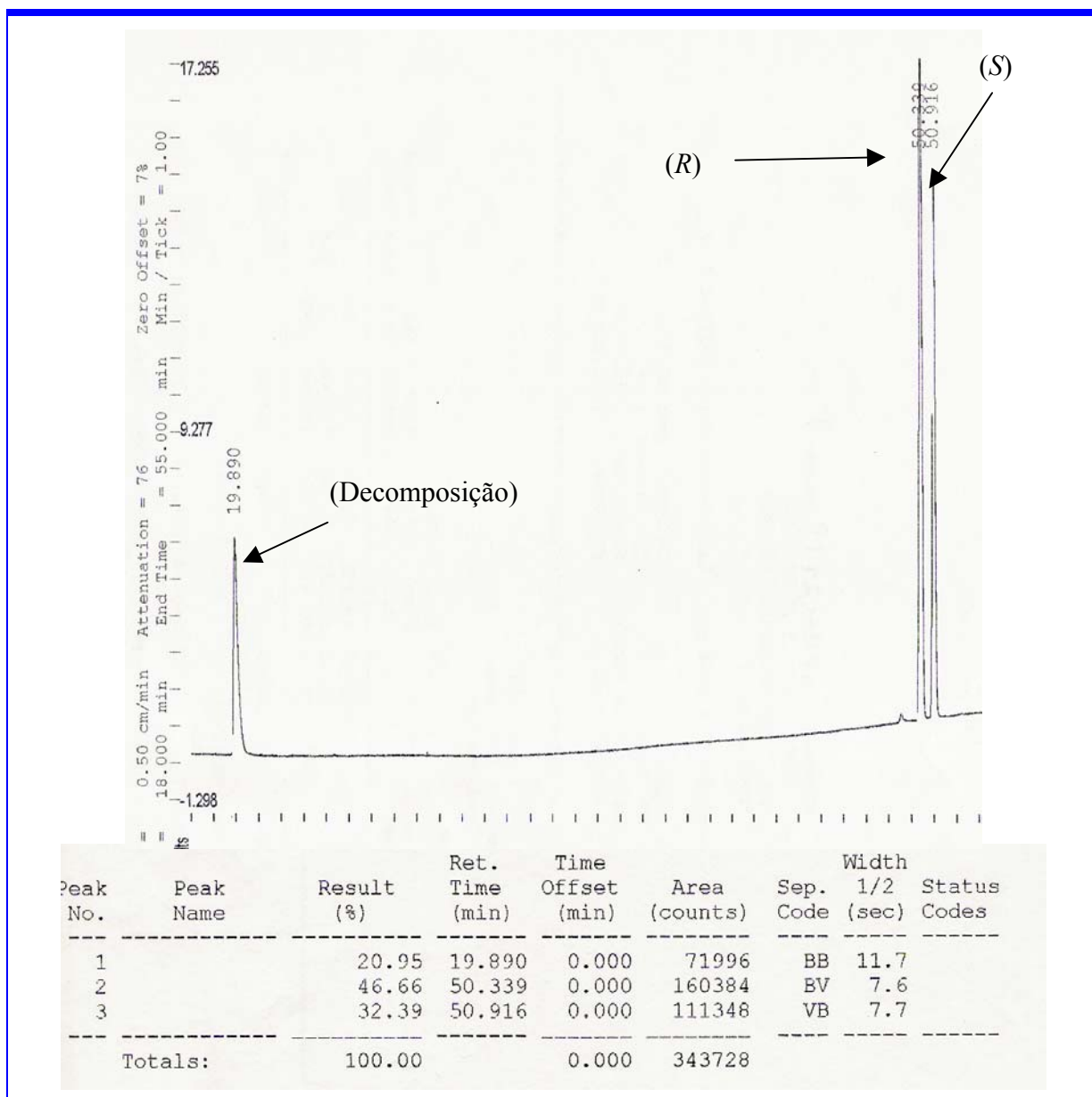
<sup>1</sup>Área%, INCQS: Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde – Fiocruz, IQ-DBQ: Departamento de Bioquímica do Instituto de Química da UFRJ



A utilização de leveduras metilotróficas, que tem a capacidade de metabolizar álcoois tais como metanol e etanol como fontes de carbono e energia ao invés de açúcares (Walker, 1998), para a redução do 2-oxo-4-fenil-butanoato de etila apresentou um resultado inesperado, a obtenção preferencial do (*R*)-2-hidroxi-4-fenil-butanoato de etila em relação ao enantiômero *S* em todos os casos (Entradas 5-13, Tabela 9). Os rendimentos isolados foram acima de 74%, as conversões obtidas por CG quiral foram superiores a 94%, as decomposições para a *Pichia pastoris* foram menores quando comparadas com as demais leveduras e um resultado surpreendente foram os excessos enantioméricos obtidos pela utilização da *Pichia angusta*, em torno de 81%, bem maior do que os obtidos para a *Pichia pastoris* e *Pichia anomala* (20%). Os rendimentos obtidos por Matsuyama *et al.* (1994) para a redução do mesmo substrato utilizando *P. burtonii*, *P. farinosa*, *P. heddi*, *P. membranaefaciens* e *P. opuntiae* apresentaram baixos rendimentos (10-47%) e *ee* de 20 a 71% oscilando entre os enantiômeros *R* e *S*. Cromatogramas obtidos por CG quiral da redução 2-oxo-4-fenil-butanoato de etila utilizando *Pichia pastoris*, *Pichia anomala* e *Pichia angusta* são mostrados nas Figuras 21, 22 e 23 respectivamente.



**Figura 21: Cromatograma do 2-hidroxi-4-fenil-butanoato de etila obtido por redução microbiológica utilizando *Pichia pastoris*.**



**Figura 22: Cromatograma do 2-hidroxi-4-fenil-butanoato de etila obtido por redução microbiológica utilizando *Pichia anomala*.**

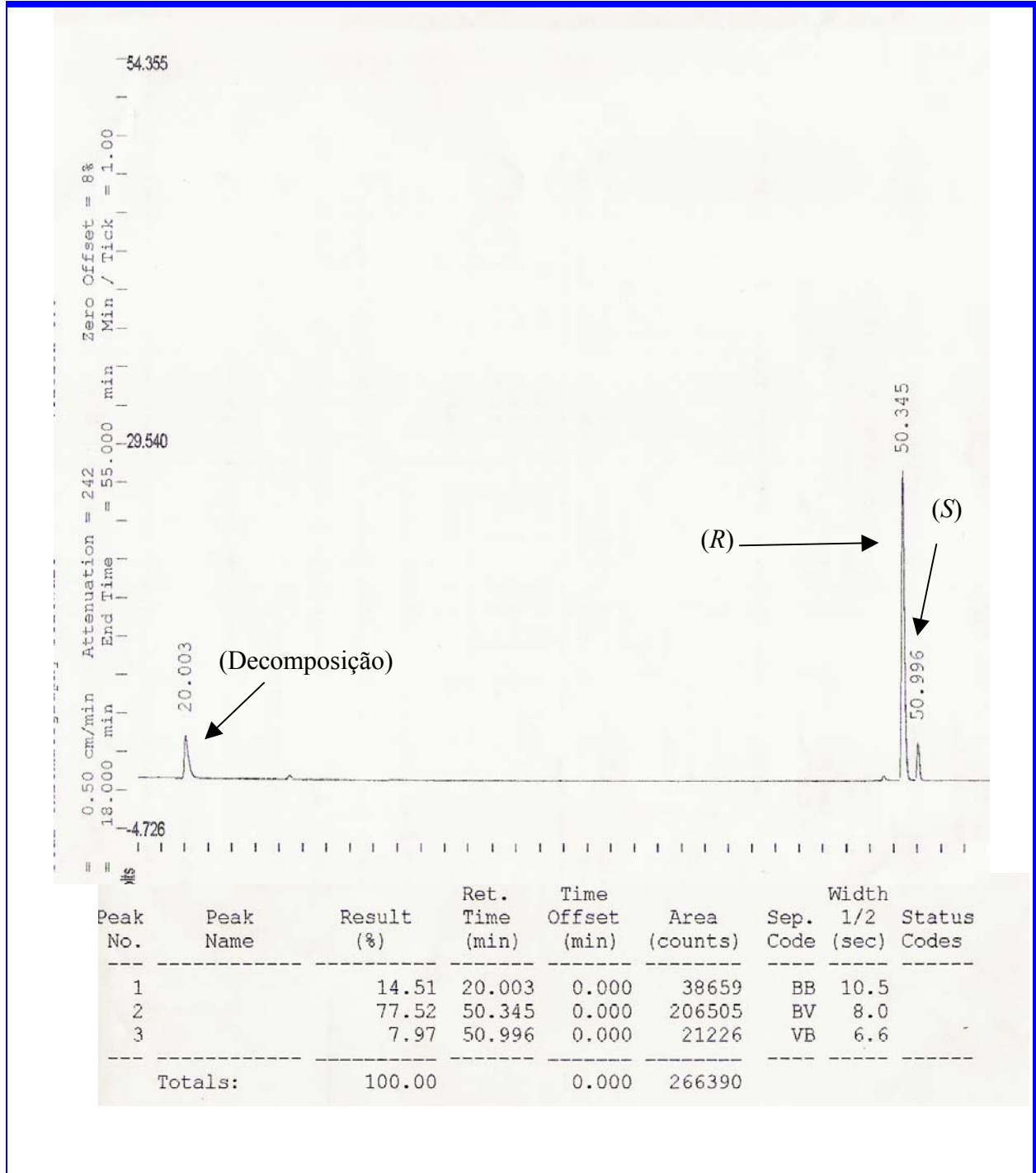


Figura 23: Cromatograma do 2-hidroxi-4-fenil-butanoato de etila obtido por redução microbiológica utilizando *Pichia angusta*.

Um resumo das principais metodologias utilizadas para a obtenção do (*R*)-2-hidroxi-4-fenil-butanoato de etila está descrito na Tabela 10.

O processo desenvolvido por Szöri *et al.* (2002), em que é utilizada catálise heterogênea, tem conversão de 100% e *ee* de 90% (Entrada 1, Tabela 10). Desvantagens do processo:

- Necessidade de pré-tratamento do catalisador ( $H_2$  a  $400C^\circ$  por 4 horas).
- Utilização de 11% de peso de catalisador em relação ao substrato.
- Necessidade de altas pressões de hidrogênio (25 atm).

LeBlond *et al.* (1999) melhoraram o processo, eliminando a necessidade de pré-tratamento do catalisador e diminuindo a pressão de  $H_2$  para 5,8 atm, pela adição contínua do indutor quiral (DHCD) mantendo a relação Pt/dihidrocinchonidina = 1 obtendo *ee* de 91% (Entrada 2, Tabela 11). Desvantagens do processo:

- Necessidade de um controle rígido da adição do indutor quiral para manter os excessos enantioméricos com valores altos.
- Utilização de 8,6% de peso de catalisador em relação ao substrato.

A obtenção do (*R*)-2-hidroxi-4-fenil-butanoato de etila com *ee* de 99% e alta conversão (90%) foi conseguida por Chadha *et al.* (1996) utilizando extrato aquoso de células de *Daucus carota* (Entrada 3, Tabela 10). Desvantagens do processo:

- Necessita de uma grande quantidade de células em relação ao substrato (100:1) o que dificulta o aumento de escala do processo (“*scaled up*”).
- Tempo de duração do processo: 10 dias.

Oda *et al.* (1998) produziram o (*R*)-2-hidroxi-4-fenilbutanoato de etila em bioreator de interface utilizando os microrganismos *Rhodotorula minuta* e *Candida holmii* com tempo de incubação de 4 dias obtendo excessos enantiomérico de 94 e 95% respectivamente (Entradas 4 e 5, Tabela 10). A desvantagem do processo são os rendimentos obtidos que foram de 60%.

O único processo utilizando *S. cerevisiae* para a obtenção enantiosseletiva do (*R*)-2-hidroxi-4-fenil-butanoato de etila foi descrito por Dao ( Dao *et al.*, 1998) utilizando como solvente uma mistura de Et<sub>2</sub>O/H<sub>2</sub>O e como aditivo cloreto de fenacila (Entrada 6, Tabela 11). A conversão foi boa (72%) com alto *ee* (91%). Desvantagens do processo:

- Utilização de Et<sub>2</sub>O em altas concentrações (relação Et<sub>2</sub>O: H<sub>2</sub>O de 20:1) que dificulta o aumento de escala devido a perigo de explosão e perda de solvente por evaporação.
- Utilização de uma grande quantidade de massa celular em relação ao peso de substrato (1g de célula para 12 mg de substrato).
- Utilização do cloreto de fenacila que é altamente tóxico e lacrimogêneo.

**Tabela 10: Comparação das metodologias utilizadas para a redução enantiosseletiva do 2-oxo-4-fenil –butanoato de etila com os resultados obtidos.**

Entrada	Condição Reacional						Resultado			Referência
	Catalisador	Solvente	Aditivo	Temp. (°C)	Tempo	Pressão (atm.)	Conver., Rend. (%)	ee (%)	Config.	
1	5% Pt/Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub> <sup>a</sup>	Tolueno/AcOH	HCD <sup>b</sup>	20	60min.	25 (H <sub>2</sub> )	100 -	90	R	Szöri, 2002
2	1% Pt/Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	AcOH	HCD <sup>c</sup>	17	-	5,8 (H <sub>2</sub> )	- -	91	R	LeBlond, 1999
3	<i>D. carota</i>	H <sub>2</sub> O	-	25	10dias	1	90 80	99	R	Chadha, 1996
4	<i>R. minuta</i>	Org./H <sub>2</sub> O	-	25	4dias	1	60 -	95	R	Oda, 1998
5	<i>C. holmii</i>	Org./H <sub>2</sub> O	-	25	4dias	1	60 54	94	R	Oda, 1998
6	<i>S. cerevisiae</i>	Et <sub>2</sub> O/H <sub>2</sub> O	CFN <sup>d</sup>	30	24h	1	96 94	81	R	Dao, 1998
<b>7</b>	<b><i>S. cerevisiae</i></b>	<b>H<sub>2</sub>O</b>	<b>-</b>	<b>25</b>	<b>48</b>	<b>1</b>	<b>92</b> <b>64</b>	<b>100</b>	<b>S</b>	<b>Tabela 8, entrada 3</b>
<b>8</b>	<b><i>Dekera sp.</i></b>	<b>H<sub>2</sub>O</b>	<b>-</b>	<b>25</b>	<b>48</b>	<b>1</b>	<b>95</b> <b>73</b>	<b>96</b>	<b>S</b>	<b>Tabela 8, entrada 12</b>
<b>9</b>	<b><i>P. angusta</i></b>	<b>H<sub>2</sub>O</b>	<b>-</b>	<b>25</b>	<b>48</b>	<b>1</b>	<b>100</b> <b>85</b>	<b>81</b>	<b>R</b>	<b>Tabela 9, entrada 10</b>

<sup>a</sup> pré-tratado com H<sub>2</sub> a 400°C por 4 hora, <sup>b</sup> 10,11-dihidrocinchonidina, <sup>c</sup> adicionado continuamente durante o processo mantendo razão Pt<sub>superfície</sub>/HCD=1, <sup>d</sup> cloreto de fenacila

Os resultados obtidos na presente tese foram excelentes, pois a redução do 2-oxo-4-fenil-butanoato pode ser direcionada para a obtenção do (*S*)-2-hidroxi-4-fenil-butanoato de etila utilizando enzimas redutases pertencentes aos microrganismos *S. cerevisiae* e *Dekera sp.* com elevados *ee* (100%) e altas conversões (89-100%) (Entradas 7 e 8, Tabela 10) ou para a obtenção do (*R*)-2-hidroxi-4-fenil-butanoato de etila utilizando enzimas redutases pertencentes ao microrganismo *Pichia angusta* com excelentes conversões (100%) e altos excessos enantioméricos (80%)(Entrada 9, Tabela 10). O processo é feito em condições brandas, temperatura e pressão ambiente, não necessitando de catalisadores ou equipamentos especiais. Todo o processo é feito em solução aquosa cujos componentes podem ser descartados sem necessidade de tratamentos especiais seguindo os princípios da Química Verde (Anastas *et al.*, 1998) que são:

- ❖ É melhor prevenir resíduos do que tratá-los ou limpá-los depois de formados.
- ❖ Métodos sintéticos devem ser projetados para maximizar a incorporação no produto final de toda matéria prima utilizada no processo.
- ❖ Sempre que possível, as metodologias sintéticas devem ser planejadas para gerar e formar substâncias que possuam pouca ou nenhuma toxicidade para a saúde do ser humano e do meio ambiente.
- ❖ Os produtos químicos devem ser projetados para ter maior eficiência na sua utilização e menor toxidez.
- ❖ A utilização de substâncias auxiliares (ex. solventes, agentes de separação, etc.) deve ser desnecessária sempre que possível ou inofensiva quando utilizadas.
- ❖ A demanda energética para o processo deve ser avaliada com relação ao impacto econômico e ambiental. Métodos sintéticos devem ser conduzidos à temperatura e pressão ambiente.
- ❖ A matéria prima deve ser de fonte renovável sempre que possível tecnicamente e economicamente.



- ❖ Derivações desnecessárias (grupos bloqueadores, proteção/desproteção e modificações temporárias de processos físico-químicos) devem ser evitadas sempre que possível.
- ❖ Reagentes catalíticos, quanto mais seletivos, são superiores a reagentes estequiométricos.
- ❖ Os produtos químicos devem ser projetados para que no final da sua utilização não persista no meio ambiente e que seus produtos de degradação sejam inócuos.
- ❖ Metodologias analíticas devem ser desenvolvidas para monitorar em tempo real o processo com o objetivo de minimizar a formação de substâncias perigosas.
- ❖ Devemos escolher as substâncias e sua forma de utilização em processos químicos levando em consideração minimizar o potencial de acidentes químicos, vazamentos e incêndios.

Os resultados obtidos na redução do 2-oxo-4-fenil-butanoato de etila utilizando *S. cerevisiae* e *Dekera sp.* para a obtenção do (S)-2-hidroxi-4-fenil-butanoato de etila e *Pichia angusta* para a obtenção do enantiômero (R) embora excelentes, não foram otimizados. Com a otimização existe a possibilidade de uma grande melhoria nos resultados obtidos e aplicação deste em escala industrial para a obtenção dos inibidores da ACE e outros fármacos.

## 5. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Neste trabalho foram obtidos resultados inéditos para a redução microbiológica enantiosseletiva do 2-oxo-4-fenil-butanoato de etila para a preparação do (*S*)- e (*R*)-2-hidroxi-4-fenil-butanoato de etila, intermediários estratégicos para a preparação dos inibidores da enzima conversora da angiotensina (ACE). A utilização de leveduras de panificação (*S. cerevisiae*) e *Dekera sp.* apresentaram um excelente resultado para a obtenção do (*S*)-2-hidroxi-4-fenil-butanoato de etila com conversões de até 99%, rendimentos superiores a 65% e excessos enantioméricos de até 100%. Com a utilização de *P.angusta* foi obtido o (*R*)-2-hidroxi-4-fenil-butanoato de etila com conversões de até 100%, rendimentos superiores a 79%, excessos enantioméricos médios de 80%, resultados inédito para a obtenção deste enantiômero em meio aquoso utilizando células íntegras.

Existe uma grande possibilidade para a produção industrial do (*R*)-2-hidroxi-4-fenil-butanoato de etila por redução microbiológica do 2-oxo-4-fenil-butanoato de etila utilizando *P. angusta* por ser esta uma levedura metilotrófica que pode atingir altas densidades celulares pela utilização de metanol em lugar de glicose como fonte de carbono (Walker, 1998). A futura otimização deste processo, tal como o aumento do excesso enantiomérico, depende de um estudo mais minucioso dos parâmetros envolvidos tais como:

- ❖ Avaliação da atividade enzimática durante a fase de crescimento pela substituição da glicose pelo metanol como fonte de carbono para a levedura,
- ❖ Sendo a *Pichia angusta* termotolerante, temperatura ideal para crescimento de 42°C (Walker, 1998), avaliar a atividade enzimática durante esta fase em diversas temperaturas.
- ❖ Testar inibidores visando o aumento de seletividade.

## 6. EXPERIMENTAL

### 6.1 Material e Métodos

Os espectros de absorção na região do infravermelho (IV) foram registrados no espectrofotômetro Nicolet-Magna 760, utilizando pastilhas de brometo de potássio e/ou filme em célula de cloreto de sódio. Os valores para a absorção foram expressos em número e onda, utilizando a unidade centímetro recíproco ( $\text{cm}^{-1}$ ).

Os espectros de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN  $^1\text{H}$ ) foram obtidos a 200 MHz, em um aparelho Brüker DPX 200, utilizando o núcleo de hidrogênio residual do clorofórmio deuterado ( $\text{CHCl}_3$ ) como referencial interno. Os valores dos deslocamentos químicos foram expressos em unidades adimensionais de delta ( $\delta$ ), representando parte por milhão (ppm) da frequência aplicada e os valores da constante de acoplamento ( $J$ ) foram registrados em Hertz (Hz). As áreas relativas dos sinais foram obtidas por integração eletrônica e os espectros de hidrogênio foram tabulados na ordem: multiplicidade (s, singlete; d, dublete; t, tripleto; q, quarteto; quin, quinteto; m, multiplete e sl, sinal largo), constante de acoplamento, assinalamento de hidrogênio e número de hidrogênio.

Os espectros de Ressonância Magnética Nuclear de Carbono (RMN  $^{13}\text{C}$ ) foram obtidos a 50 MHz utilizando o núcleo do carbono residual do clorofórmio deuterado ( $\text{CDCl}_3$ ) como referencial interno. Os valores dos deslocamentos químicos foram expressos em unidades adimensionais de delta ( $\delta$ ), representando parte por milhão (ppm) da frequência aplicada.

Os excessos enantioméricos ( $ee$ ) das reduções enantiosseletivas dos 2-oxo-ésteres utilizando microrganismos (MO) foram analisados no laboratório do Professor Joel Jones

Junior utilizando Cromatografia Gasosa Quiral de Alta Resolução (CGQAR), em um cromatógrafo Variant Star 3400 CX. As condições para as análises foram:

- Coluna capilar Cyclodex B (30m x 0,25, id), fase  $\beta$ -ciclodextrina modificada, fornecida pela J W Scientific (112-2532).
- Sistema de injeção split/splitless com split (razão de divisão) de 40:1.
- Gás de arraste: Hélio, pressão 25psi, com vazão de 40cm/s.
- Temperatura do injetor: 230°C.
- Temperatura de detector: 230°C.
- Temperatura inicial da coluna: 120°C (30 min).
- Rampa: 2°C/min.
- Temperatura final da coluna: 200°C.
- Sistema de aquisição de dados: Star Chromatography Workstation-Varian versão 4.

Os excessos enantioméricos (*ee*) das reduções enantiosseletivas dos 2-oxo-ésteres utilizando oxazaborolidianas foram analisados no laboratório de síntese de Far-Manguinhos utilizando Cromatografia Gasosa Quiral de Alta Resolução (CGQAR), em um cromatógrafo Shimadzu. GC-14B. As condições para as análises foram:

- Coluna capilar Cyclodex B (30m x 0,25, id) fornecida pela J & W Scientific (112-2532).
- Sistema de injeção split/splitless com split (razão de divisão) de 100:1
- Gás de arraste: Hélio.

- Temperatura do injetor: 230°C.
- Temperatura de detector: 230°C.
- Temperatura inicial da coluna: 120°C (30 min).
- Rampa: 2°C/min.
- Temperatura final da coluna: 200°C.
- Sistema de aquisição de dados: Class LC-10.

Os excessos enantioméricos foram calculados utilizando a seguinte equação:  $ee=100(A_1 - A_2)/(A_1 + A_2)$  onde  $A_1 > A_2$  e A corresponde à área obtida no cromatograma para o componente  $A_x$  da mistura enantiomérica.

O monitoramento das reações químicas foi feito por cromatografia em camada fina (CCF), utilizando folhas cromatográficas de sílica suportadas em base de alumínio Kiesegel 60 F<sub>254</sub>, com espessura de 0,25mm (Merck).

A visualização das substâncias nas placas de CCF foi realizada sob lâmpada de ultravioleta (254 nm) e/ou por imersão em soluções reveladoras de funções químicas:

- Exposição ao vapor de Iodo;
- Imersão e combustão em solução de molibdato de amônio cérico 10%. A solução foi preparada pela adição de 10g de molibdato de amônia e 0,4g de sulfato cérico em 90mL de água. Adicionou-se 10mL de ácido sulfúrico concentrado e a solução resultante amarelada foi estocada à temperatura ambiente.

Os produtos obtidos, após isolamento, foram purificados por cromatografia em coluna, empregando gel de sílica 60 (70-230 ou 230-400 mesh ASTM Merck).

A nomenclatura das substâncias citadas nesta tese foi determinada pelo programa CS CHEMDRAW ULTRA<sup>®</sup>, utilizando a base de dados Beilstein<sup>®</sup>.

A evaporação dos solventes foi feita em evaporadores rotatórios marca Büchi e Bücher, e os resíduos foram removidos em sistema de alto vácuo.

Os valores das rotações específicas foram obtidos em um polarímetro Jasco DIP-370 utilizando uma cubeta de 0,1dm de caminho ótico e concentração de 1g de 2-hidroxi-4-fenil-butanoato de etila para 100mL de CHCl<sub>3</sub>. A rotação específica determinada para o 2-hidroxi-4-fenil-butanoato de etila obtido por redução utilizando *S. cerevisiae* foi de +19,8(1,0; CHCl<sub>3</sub>) e a rotação específica descrita na literatura para o enantiômero *R* que é de -15,7 (c=1,0; CHCl<sub>3</sub>) (Dao *et al.*, 1998).

Os Microrganismos utilizados nas reduções microbiológicas *Saccharomices cerevisiae*, *Dekera sp.*, *Kluyveromyces marxianus* e *Hansenula sp* pertencem à coleção do Departamento de Bioquímica da Escola de Química da Universidade Federal do Rio de Janeiro, a levedura de panificação marca Fleischman foi adquirida no comércio e as cepas de *S. cerevisiae* selvagem, P403CD1 e P4030C pertencem à coleção do Departamento de Bioquímica do Instituto de Química da Universidade Federal do Rio de Janeiro. Os Microrganismos *Aureobasidium pullulans*, *Candida guilliermondii*, *Pichia pastoris*, *Pichia anomala* e *Pichia angusta* pertencem a coleção do Laboratório de Materiais de Referência do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS) da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ).

## 6.2 Experimentais

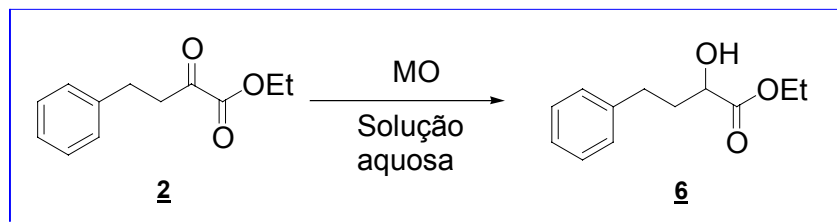
### 6.2.1 Obtenção das biomassas para os experimentos de redução

Uma solução de 100ml de meio de crescimento celular contendo glicose (1%), extrato de levedura (0,5%), peptona de carne (0,5%), sulfato de amônio (0,1%) e sulfato de magnésio hepta-hidratado (0,1%) em água destilada foi esterilizada em autoclave sob uma pressão de 0,5 atm por um período de 15 minutos, em seguida, a solução foi inoculada através da adição de uma alíquota da cultura estoque e mantida na faixa de temperatura de 25 à 28°C sob agitação orbital de 150 rpm por um período de 48 horas. As biomassas obtidas foram separadas por centrifugação a 3180 rpm por um período de 12 minutos e utilizadas na redução microbiológica do 2-oxo-4-fenilbutanoato de etila

Concentrações celulares aproximadas utilizadas nos experimentos:

- *Saccharomices cerevisiae*, *Dekera sp.*, *Kluyveromyces marxianus*, *Hansenula sp.*,  
: 3,867g/l (peso seco).
- *Pichia angusta*, *Pichia pastoris*, *Pichia anômala*, *Aureobasidium pullulans*, *Candida quilliermondii*: 6,900g/l (leitura UV, 600 nm, diluição 1:50, fator 0,5).

**6.2.2 Redução enantiosseletiva do 2-oxo-4-fenil-butanoato de etila (2) utilizando células livres dos seguintes microrganismos (MO): *Saccharomices cerevisiae*, *Dekera sp.*, *Kluyveromyces marxianus*, *Hansenula sp.*, *Pichia angusta*, *Pichia pastoris*, *Pichia anômala*, *Aureobasidium pullulans* e *Candida quilliermondii*.**



A biomassa obtida conforme o item anterior foi adicionada a 100ml de um meio reacional contendo glicose (5%) e cloreto de magnésio (0,1%) em água. Após 15 minutos da adição do MO, foi adicionado ao meio o substrato, 2-oxo-4-fenil-butanoato de etila (2) (150mg), solubilizado em etanol (1,0ml). A solução foi mantida sob agitação de 150rpm à temperatura ambiente por um período de 24 horas. Após este período, a mistura foi centrifugada para separação das células e a fase aquosa extraída com acetato de etila (3×30ml). A fase orgânica obtida foi seca sobre sulfato de sódio anidro, filtrada e concentrada em evaporador rotatório fornecendo em óleo levemente amarelado.

$R_f = 0,48$  (eluente:  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ );

CG quiral  $t_r = 50,25\text{min}$  (*R*),  $t_r = 50,92\text{min}$  (*S*);

IV max. (filme)  $\nu\text{-cm}^{-1}$ : 3467 ( $\nu$  O-H), 1732 ( $\nu$  C=O), 1214, 1100 ( $\nu$  C-O), 701 ( $\nu$  C=C fora do plano);

RMN  $^1\text{H}$  (200 MHz/ $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 7,20-7,30 (m, 5H, Ar-H); 4,16-4,27 (m, 3H,  $\text{CH(OH)CO}$  e  $\text{CH}_2(\text{OCO})\text{CH}_3$ ); 2,7 3-2,82(m, 2H,  $\text{PhCH}_2\text{CH}_2$ ); 2,3 (s, OH); 1,93-2,09 (m, 2H,  $J=7,2$  Hz,  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CHOH}$ ); 1,30 (t, 3H,  $J=7,2$  Hz,  $\text{COCH}_2\text{CH}_3$ ).



Rendimentos mássicos obtidos:

<b>REAÇÃO</b>	<b>MO</b>	<b>ORIGEM</b>	<b>REF.</b>	<b>SUBST. (mg)</b>	<b>REND. MASS. (mg) (%)</b>
1 (1)	<i>S. cerevisiae</i>	EQ-DEB	-	108,4	<b>97,1 (88,7)</b>
2 (7)	<i>S. cerevisiae</i>	EQ-DEB	-	155,0	<b>140,0 (89,5)</b>
3 (12)	<i>S. cerevisiae</i>	EQ-DEB	-	157,8	<b>133,9 (84,0)</b>
4 (18)	<i>S. cerevisiae</i>	Fleichman	-	150,0	<b>89,4 (56,7)</b>
5 (19)	<i>S. cerevisiae</i>	IQ-DBQ	Selvagem	152,0	<b>138,0 (90,0)</b>
6 (20)	<i>S. cerevisiae</i>	IQ-DBQ	Selvagem	164,0	<b>147,8 (90,0)</b>
7 (21)	<i>S. cerevisiae</i>	IQ-DBQ	P403CD1	153,0	<b>118,7 (76,8)</b>
8 (22)	<i>S. cerevisiae</i>	IQ-DBQ	P4030C	154,1	<b>114,9 (74,5)</b>
9 (25)	<i>S. cerevisiae</i>	IQ-DBQ	P4030C	162,2	<b>124,0 (75,5)</b>
10 (03)	<i>Dekera sp.</i>	EQ-DEB	-	113,8	<b>101,3 (89,0)</b>
11 (09)	<i>Dekera sp.</i>	EQ-DEB	-	163,8	<b>122,7 (74,1)</b>
12 (15)	<i>Dekera sp.</i>	EQ-DEB	-	166,7	<b>127,1 (76,0)</b>
13 (06)	<i>Hansenula sp.</i>	EQ-DEB	-	161,3	<b>113,7 (69,8)</b>
14 (11)	<i>Hansenula sp.</i>	EQ-DEB	-	156,0	<b>78,5 (49,8)</b>
15 (13)	<i>Hansenula sp.</i>	EQ-DEB	-	175,4	<b>92,5 (58,2)</b>
16(10)	<i>K. marxianus</i>	EQ-DEB	-	163,3	<b>106,4 (64,5)</b>
17 (08)	<i>K. marxianus</i>	EQ-DEB	-	149,5	<b>131,7 (87,0)</b>
18 (14)	<i>K. marxianus</i>	EQ-DEB	-	158,2	<b>103,0 (64,5)</b>
19 (23)	<i>P. pastoris</i>	IQ-DBQ		162,1	<b>129,7 (80,0)</b>
20 (26)	<i>P. pastoris</i>	IQ-DBQ	-	163,1	<b>126,8 (78,0)</b>

21 (29)	<i>P. anomala</i>	INCQS	ATCC: 16.763	164,8	<b>123,7 (74,3)</b>
22 (30)	<i>P. anomala</i>	INCQS	ATCC: 16.763	164,9	<b>131,9 (79,2)</b>
23 (31)	<i>P. angusta</i>	INCQS	ATCC: 34.438	151,4	<b>124,7 (81,6)</b>
24 (32)	<i>P. angusta</i>	INCQS	ATCC: 34.438	164,1	<b>128,6 (78,3)</b>
15 (36)	<i>P. angusta</i>	INCQS	ATCC: 34.438	160,4	<b>130,3 (80,4)</b>
26 (37)	<i>P. angusta</i>	INCQS	ATCC: 34.438	162,1	<b>133,2 (82,2)</b>
27 (38)	<i>P. angusta</i>	INCQS	ATCC: 34.438	163,5	<b>135,8 (82,2)</b>
28 (33)	<i>A. pullulans</i>	INCQS	ATCC: 9.348	158,1	<b>96,6 (61,1)</b>
29 (34)	<i>A. pullulans</i>	INCQS	ATCC: 9.348	157,6	<b>95,12 (60,3)</b>
30 (27)	<i>C. guill.</i>	INCQS	ATCC: 6.260	150,0	<b>102,3 (67,5)</b>
31 (28)	<i>C. guill.</i>	INCQS	ATCC: 6.260	159,8	<b>156,7 (97,1)</b>

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANASTAS, P.T., WARNER, J.C. (1998). “Green Chemistry Theory and Practice”, Oxford University Press, Oxford.

ALLEN, S.J., HOLBROOK, J. (2000). “Production of an activated form bacillus stearothermophilus L-2-hydroxy acid desidrogenase by directed evolution”. *Protein Eng.*, vol. 13, 4-7.

ATTWOOD, M.R., HASSALL, C.H., KRÖHN, A., LAWTON, G., REDSHAW, S. (1986). “The design and synthesis of the angiotensin converting enzyme inhibitors cilazapril and related bicyclic compounds”. *J. Chem. Soc. Perkin, Trans 1*, 1011.

BARREIRO, E.J., FRAGA, C.A.M. (2001). “Química medicinal: as Bases moleculares da ação dos fármacos”. Artmed Editora, Porto Alegre.

BASKAR, B., PANDIAN, G.N., PRIYA, K., CHADHA, A. (2004). “Asymmetric reduction of alkyl 2-oxo-arylbutanoates and but-3-enoates by *Candida parapsilosis* ATCC 7330: assignment of the absolute configuration of ethyl 2-hydroxy-4-(p-methylphenyl)-but-3-enoate by <sup>1</sup>H NMR”. *Tetrahedron: Asymmetry*, vol.15, 3961-3966.

BLACKLOCK, T.J., SHUMAN, R.F., BUTCHER, J.W., SHEARING Jr., W.E., BUDAVARI, J., GREYDA, V.J. (1988). “Synthesis of semisynthetic dipetides using N-carboxyanhydrides and chiral induction on Raney Nickel. A method practical for large scale”. *J. Org. Chem.*, vol. 53, 836-844.

BLASER, H.U., JALET, H.P., SPLINDER, F. (1996). "Enantioselective hydrogenation of  $\alpha$ -ketoesters: comparison of homogeneous and heterogeneous catalysis". *J. Mol. Cat. A: Chemical*, vol. 107, 85-94.

BLASER, H.U., JALET, H.P., MÜLLER, M., STUDER, M. (1997). "Enantioselective hydrogenation of  $\alpha$ -ketoesters using cinchona modified platinum catalyst and related systems: A review". *Catalysis Today*, vol.37, 441-463.

BRADSHAW, C.W., FU, H., SHEN, G.J., WONG, C.W. (1992a). "A *Pseudomonas* sp. alcohol dehydrogenase with broad substrate specificity and unusual stereospecificity for organic synthesis". *J. Org. Chem.*, Vol. 57, 1526-1532.

BRADSHAW, C.W., HUMMEL, H., WONG, C.H. (1992b). "Lactobacillus kefir alcohol dehydrogenase: a useful catalyst for synthesis". *J. Org. Chem.*, Vol. 57, 1532-1536.

CHADHA, A., MANOHAR, M., SOUNDARAJAN, T., LOKESWARI, T.S. (1996). "Asymmetric reduction of 2-oxo-4-phenylbutanoic acid ethyl ester by *Daucus carota* cell cultures". *Tetrahedron: Asymmetry*, vol.7, No.6, 1571-1772.

DAO, H.D., KAWAI, Y., HIDA, K., HORNES, S., NAKAMURA, K., OHNO, A., OKAMURA, M., AKASAKA, T. (1998a). "Stereochemical control in microbiological reduction. 30. Reduction of alkyl 2-oxo-4-phenylbutyrate as precursors of angiotensin converting enzyme (ACE) inhibitors". *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, vol. 71, 425-432.

DAO, H.D., OKAMURA, M., AKASADA, T., KAWAI, Y., HIDA, K., HORNES, OHNO, A. (1998b). "Stereochemical control in microbial reduction. Part 31. "Reduction of alkyl 2-oxo-4-arylbutyrates by baker's yeast under selected reaction conditions". *Tetrahedron: Asymmetry*, vol.9, 2725-2737.

DERMIJIAN, D.C., SHAH, P.C., MORIS-VARAS, F., (2000). IN: Biocatalysis From Discovery to Application, Springer-Verlag, Berlin, 1-29.

DHARANIPRAGADA, R., VANHULLE, K., BANNISTER, A., BEAR, S., KENNEDY, L., HRUBY, V.J. (1992). "Asymmetric synthesis of unusual amino acids: An efficient synthesis of optically pure isomers of  $\beta$ -methylphenylalanine". *Tetrahedron*, vol.48, 4733-4748.

DUDLER, H., VAN DE BAAN, J.L., HOCHULI, E., KIS, Z., TAYLOR, K.E., PRELOG, V., (1977). "Dihydroxyacetone reductase from *Mucor javanicus*". *Eur. J. Biochem.* Vol.75, 423-432.

EXNER, C., PFALTZ, A., STUDER, M., BLASER, H.U. (2003). " Heterogeneous enantioselective hydrogenation of activated ketones catalyzed by modified Pt-catalyst: A systematic structure-selectivity study". *Adv. Synth. Catal.*, vol. 345, 1253-1260.

FABER , K. (2000). "*Biotransformations in Organic Chemistry: a Text Book*". Springer –Verlag, 4<sup>a</sup> ed., Berlin.

FADNAVIS, W.N., KASIRAMAN, R.R. (2004). "Enantio- and regiospecific reduction of ethyl 4-phenyl-2,4-dioxobutyrate with baker's yeast: preparation of (R)-HPB ester". *Tetrahedron: Asymmetry*, vol.15, 3443-3447.

HARRIS, E.E., PATCHETT, A.A., TRISTRAM, E.W., WYVRATT, M.J. (1982). "Aminoacid derivatives as antihypertensives". US Pat 4,374,829.

HEISS, C., LAIVENIEKS, M., ZEIKUS, J.G., PHILLIPS, R.S., (2001). "The Stereospecificity of Secondary Alcohol Dehydrogenase from *Thermoanaerobacter ethanolicus* is partially determined by active site water". *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 123, 345-346.

HEROLD, P., INDOLESE, A.F., STUDER, M., JALET, H.P., SIEGRIST, U., BASER, H.U. (2000). "New technical synthesis of ethyl (R)-2-hydroxy-4-phenylbutyrate of high enantiomeric purity". *Tetrahedron*, vol. 56, 6497-6499.

HOWARTH, J., JAMES P., DAI, J. (2001). "Immobilized baker's yeast reduction of ketones in an ionic liquid, [bmim]PF<sub>6</sub> and water mix". *Tetrahedron Lett.*, vol.42, 7517-7519.

HUFFMANN, M.A., REIDER, P.J. (1999). Improved stereoselectivity in the heterogeneous catalytic synthesis of enalapril obtained through multidimensional screening". *Tetrahedron Letters*, vol. 40, 831-834.

KALUZNA, I., ANDREW, A.A., BONILLA, M., MARTZEN, M.R., STEWART, J.D. (2002). "Enantioselective reductions of ethyl 2-oxo-4-phenylbutyrate by *Saccharomyces cerevisiae* dehydrogenases". *J. Mol. Cat. B: Enzymatic*, vol. 17, 101-105.

JONES J.B., BECK, J.F. (1976). In: Applications of Biochemical Systems in Organic Chemistry, Wiley, New York, 107-401.

JONES J.B. (1986). "Tetrahedron report number 203: Enzymes in organic synthesis". *Tetrahedron*, vol. 42, 3351-3403.

KIZAKI, N., SHIMIZU, S., (2001). "Synthesis of optically pure ethyl (S)-4-chloro-3-hydroxybutanoate by *Escherichia coli* transformant cells coexpressing". *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 55, 590-595.

LE BLOND, C., WANG, J., LIU, J., ANDREWS, A.T., SUN, Y.K. (1999). "Highly enantioselective heterogeneously catalyzed hydrogenation of  $\alpha$ -ketoesters under mild conditions". *J. Am. Chem. Soc.*, Vol. 121, 4920-4921.

MATSUDA, T., WATANABE, K., KAMITANAKA, T., HARADA, T., NAKAMURA, K. (2003). "Biocatalytic reduction of ketones by a semi-continuous flow process using supercritical carbon dioxide". *Chem. Commun.*, 1198

MATSUYAMA, A., TERUYUKI, N., YOSHINORI, K. (1994). "Process for the production of optically active 2-hydroxy acid esters using microbes to reduce the 2-oxo precursor". US Pat 5,371,014.

NAKAMURA, K., INOUE, K., USHIO, K., OKA, S., OHNO, A. (1988). "Stereochemical control on yeast reduction of  $\alpha$ -keto esters. Reduction by immobilized baker yeast in hexano". *J. Org. Chem.*, vol. 53, 2589-2583.

NAKAMURA, K., SHIRAGA, T., MIYAI, T., OHNO, A. (1990). "Stereochemistry of NAD(P)-coenzyme in the reaction catalyzed by glycerol dehydrogenase". *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, vol. 63, 1735-1737.

NAKAMURA, K., KONDO, S., KAWAI, Y., OHNO, A. (1991). "Reduction by baker's yeast in benzene". *Tetrahedron Letters*; vol. 32, No. 48, 7075-7078.

NAKAMURA, K., KONDO, S., KAWAI, Y., OHNO, A. (1993). "Stereochemical control in microbial reduction. XXI. Effect of organic solvents on reduction of  $\alpha$ -keto esters mediated by baker's yeast". *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, vol. 66, 2738 – 2743.

NAKAMURA, K., KONDO, S., NAKAJIMA, N., OHNO, A. (1995). "Mechanistic study for stereochemical control of microbial reduction of  $\alpha$ -keto esters in an organic solvent". *Tetrahedron*; vol. 51, No. 3, 687-694.

NAKAMURA, K., MATSUDA, T., SHIMIZU, M., FUJISAWA, T. (1998). "Asymmetric reduction of trifluoromethyl ketones containing a sulfur functionality by the alcohol dehydrogenase from *Geotrichum*". *Tetrahedron*, vol.54, 8393-8402.

NAKAMURA, K., YAMANAKA, R., MATSUDA, T., HARADA, T. (2003). "Recent developments in asymmetric reduction of ketones with biocatalyst". *Tetrahedron: Asymmetry*, vol.14, 2659-2681.

ODA, S., INADA, Y., KOBAYASHI, A., OHTA, H. (1998). "Production of ethyl (R)-2-hydroxy-4-phenylbutanoate via reduction of ethyl 2-oxo-4-phenylbutanoate in an interface bioreactor". *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, Vol. 62 (9), 1762-1767.

PATCHETT, A.A., HARRIS, E., TRISTRAM, W.E., WYVRATT, M.J., WU, M.T., TAUB, D., PETERSON, E.R., IKELER, T.J., TEN BROEKE, J., PAINE, L.G., ONDEYKA, D.L., THORSETT, E.D., GREENLEE, W.J., LOHR, N.S., HOFFSOMMER, F.D., JOSHUA, H., RUYLE, W.V., ROTHROCK, J.W., ASTER, S.D., MAYCOCK, A.L., ROBINSON, F.M., HIRSCHMANN, R. (1980). "A new class of angiotensin converting enzyme inhibitors. *Nature*, vol. 288, 280-283.

PATEL, R.N. (2001). "Enzymatic synthesis of chiral intermediates for drug development". *Adv. Synth. Catal.*, vol. 343, 527-546.

PATEL, R.N., (2002). "Microbial/enzymatic synthesis of chiral intermediates for pharmaceuticals". *Enzyme and Microbial Technology*, vol. 31, 804-826.

PATEL, R.N., CHU, L., CHINDAMBARAM, R., ZHU, J., KANT, J. (2002). "Enantioselective microbial reduction of 2-oxo-2-(1', 2', 3', 4'-tetrametil-6'-naphthalenyl) acetic acid and its ethyl ester". *Tetrahedron: Asymmetry*, vol.13, 346-355.

PATEL, R.N., HANSON, R., GOSWAMI, A., NANDURI, V., BANERJEE, A., DONOVAN, M., GOLDBERG, S., JOHNSTON, R., BRZOSOWSKI, D., TULLY, T., HOWELL, J., CAZZULINO, D., KO, R. (2003). "Enzymatic synthesis of chiral intermediates for pharmaceuticals". *J. Ind. Microb. Biotechnol.* vol.30, 252-259.



PONZO, V.L., KAUFMAN, T.S. (1995). "The first chiral version of Jackson N-benzyl-N-tosylaminoacetal cyclization a new enantioselective total synthesis of 1-S(-)-salsolidine". *Tetrahedron Letters*; vol. 36, **No.** , 9105-9108.

PRELOG, V., (1964). *Pure Appl. Chem.*, vol. 9, 119-130.

REEVE, CD. (1997). "Reduction of ketone groups". WO 97/00968.

RIBEIRO, J.B., RAMOS, M.C.K.V., DE AQUINO NETO, F.R., LEITE S.G.F, ANTUNES, O.A.C. (2003). "Microbiological enantioselective reduction of ethyl acetoacetate". *J. Mol. Cat. B: Enzymatic*, vol. 24-25, 121-124.

SILVA F.M., BERGO DE LACERDA, P.S., JONES JUNIOR, J. (2005). "Desenvolvimento sustentável e Química Verde". *Quím. Nova*, Vol. 28 ,No 1 , 103-110.

SITTIG, M. (1988). "Pharmaceutical Manufacturing Encyclopedia". Vol.1, Noyes Publication, 2<sup>a</sup>edition., New Jersey, 582-584.

STUDER, M., BURKHARDT, S., INDOLESE, A.F., BLASER, H.U. (2000). "Enantio- and chemoselective reduction of 2,4-diketo acid derivatives with cinchona modified Pt-catalyst. Synthesis of (R)-2-hydroxi-4-phenylbutyric acid ethyl ester". *Chem.Commun.* 1327-1328.

STUDER, M., BLASER, H.U., EXNER, C. (2003). "Enantioselective hydrogenation using heterogeneous modified catalysis: An update". *Adv. Synth. Catal.*, vol. 345, 45-65.

SZÖRI, K., SUTYINSZKI, M., FELDÖLDI, K., BARTÓK, M. (2002). "Heterogeneous asymmetric reactions part. 28. Efficient and practical method for the preparation of (R)- and (S)-hydroxy esters by the enantioselective heterogeneous catalytic hydrogenation of  $\alpha$ -ketoesters". *Applied Catalysis A: General*, vol. 237, 275-280.

TÖRÖK, B., BALÁZSIK, K., TÖRÖK, M., SZÖLLÖSI, GY., BARTÓK, M. (2000). "Asymmetric sonochemical reactions. Enantioselective hydrogenation of  $\alpha$ -ketoesters over platinum catalysts". *Ultrasonic Sonochemistry*, vol. 7, 151-155.

URBACH, H., HENNING, R. (1984). "A favorable diastereoselective synthesis of N-(1-S-ethoxycarbonyl-3-phenylpropyl)-S-alanine". *Tetrahedron Letters*, vol. 25, No. 11, 1143-1146.

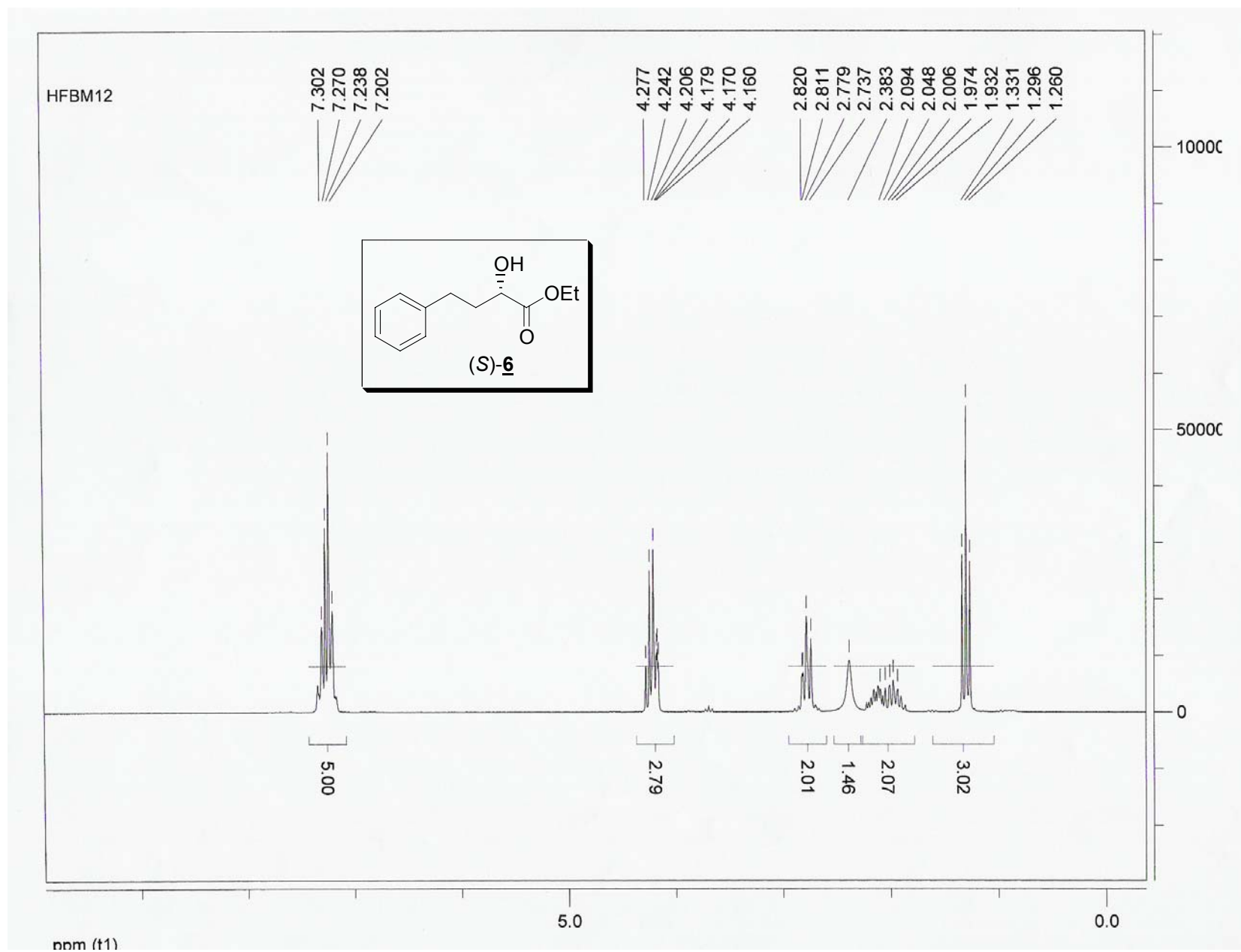
VELONIA, K., TSIGOS, I., BOURIOTIS, V., SMONOU, I. (1999) "Stereospecificity of hydrogen transfer by the NAD<sup>+</sup>-linked alcohol dehydrogenase from the Antarctic psychrophile *Moraxella* sp. TAE123". *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, vol. 9, 65-68.

WAGNER, J.M., MCELHINNY, J.R., CJ, LEWIN, A.H., CARROLL, F.I. (2003). "Stereospecific synthesis of amphetamines". *Tetrahedron Asymmetry*, vol.14, 2119-2125.

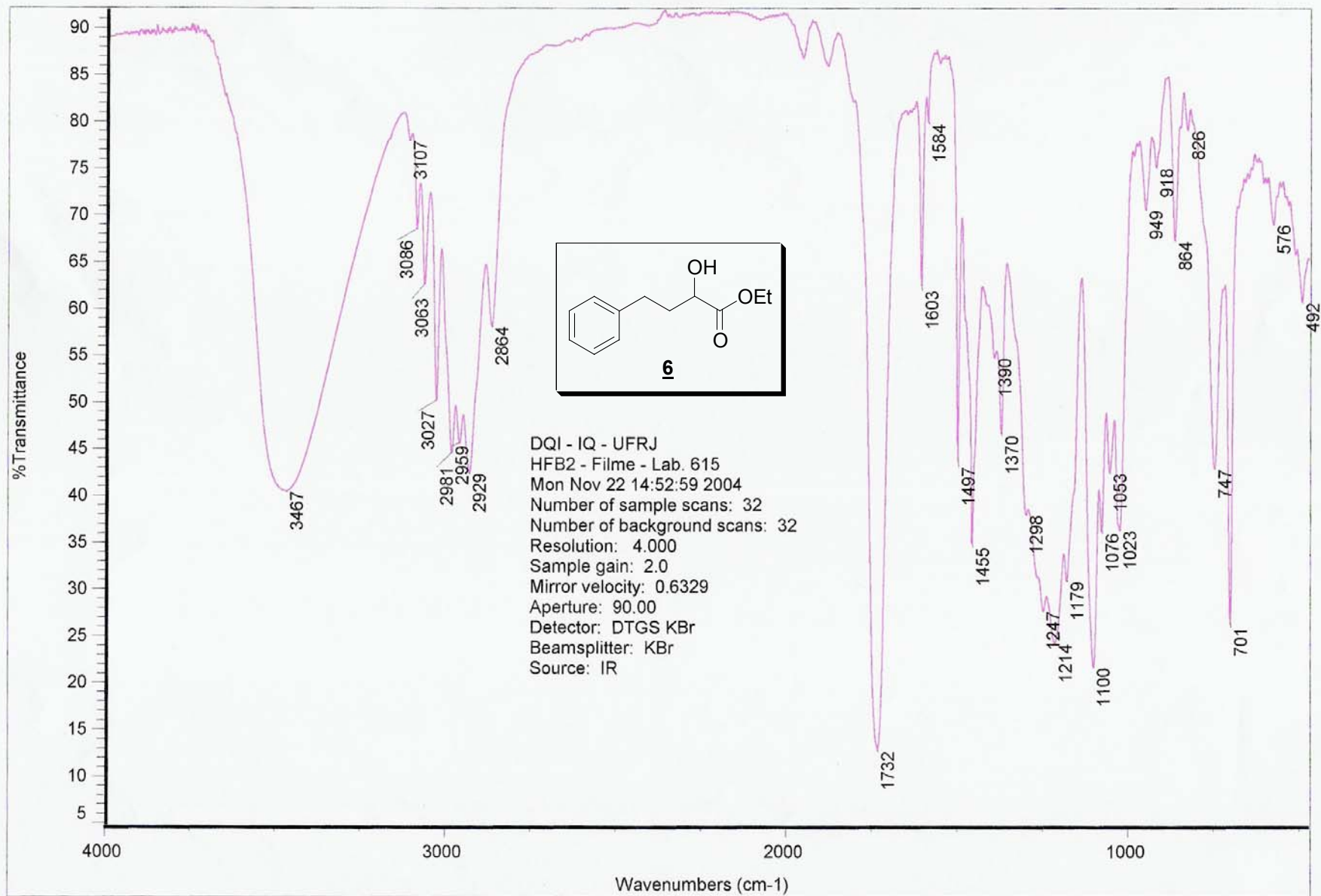
WALKER G.M. (1998). "Yeast Physiology and Biotechnology". John Wiley and Sons, Chichester, England, 231-233 e 281

WYVRATT, M.J., TRISTRAM, IKELER, T.J., LOHR, N.S., JOSHUA, H., SPRINGER, J.P., ARISON, B.H., PATCHETT, A.A. (1984). "Reductive amination of ethyl 2-oxo-4-phenylbutanoate with *L*-alanyl-*L*-proline. Synthesis of enalapril maleate". *J. Org. Chem.*, vol. 49, 2816-2819.

## **8. ESPECTROS**



Espectro 1: RMN-<sup>1</sup>H (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>) da substância (S)-**6** obtida por redução da substância **2** com levedura de panificação.



Espectro 2: IV (filme) da substância **6**.

## 9. APÊNDICE

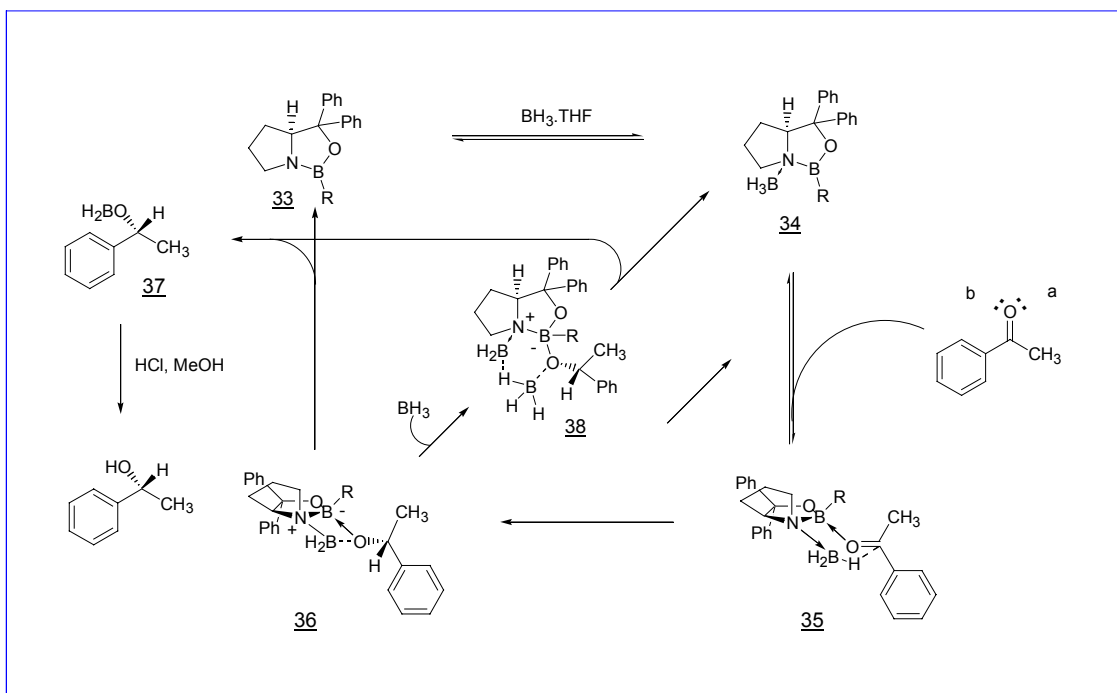
## 9.1 Redução Enantiosseletiva de 2-Oxo-ésteres com Oxazaborolidina

### 9.1.1 Introdução

Durante a busca de alternativas para a redução enantiosseletiva de  $\alpha$ -ceto-ésteres foi avaliada a possibilidade de utilização do complexo  $BH_3$ -oxazaborolidina, até o presente momento inédito na literatura, para a redução assimétrica destes substratos. Os resultados obtidos não foram otimizados, porém abrem um caminho para novas pesquisas nesta área.

As oxazaborolidinas são consideradas uma ferramenta importante para a síntese de intermediários quirais e compostos bioativos (Corey e Helal, 1998) por apresentar um excelente desempenho na redução enantiosseletiva de cetonas;  $\alpha$ ,  $\beta$ -enonas;  $\alpha$ ,  $\beta$ -inonas;  $\alpha$ -ceto-oximas e iminas.

A enantiosseletividade observada nas reduções utilizando oxazaborolidina foi racionalizada por Corey e colaboradores (Corey *et al.*, 1987a; Corey *et al.*, 1987b; Corey *et al.* 1988 e Corey 1990). O modelo mecanístico para a redução explica a estereoquímica absoluta, a notável seletividade obtida, o grande aumento na velocidade da reação e a reutilização do catalisador. A proposta mecanística é mostrada no Esquema 13.

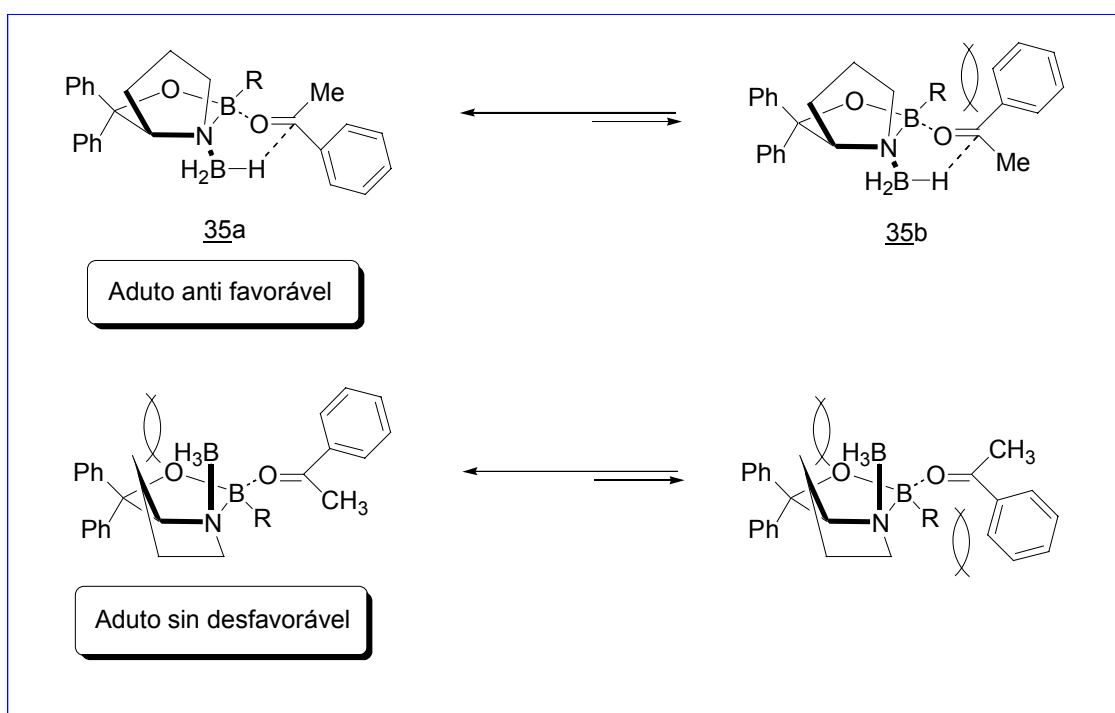


**Esquema 13: Proposta do mecanismo para a catálise enantiosseletiva de cetonas utilizando oxazaborolidina (Corey *et al.*, 1998).**

A etapa inicial do processo é a rápida ( e provavelmente reversível) coordenação do  $\text{BH}_3$  com o átomo de nitrogênio pela face  $\alpha$  da oxazaborolidina **33**, em que a borana adota uma conformação anti em relação ao substituinte em C4 do anel pirrolidínico preferencialmente em relação a face  $\beta$  (isômero sin), devido a maior estabilidade do complexo formado no primeiro caso, em que não existe interações desfavoráveis entre a borana e o anel pirrolidínico (Esquema 14). Esta orientação é corroborada pela espectroscopia de RMN- $^{11}\text{B}$  e por difração de Raios-X do intermediário cristalino (Corey, 1987a). A coordenação da borana ao átomo de nitrogênio de **33** serve para ativar o  $\text{BH}_3$  como um doador de hidreto, aumentar a acidez do boro endocíclico e potencializar a razão de redução das oxazaborolidinas como catalisadores. Na segunda etapa o substrato cetônico, no exemplo acima acetofenona, é coordenado com o complexo **34** fortemente ativado através do par de elétrons mais acessível *a*, na posição *cis* com o  $\text{BH}_3$  vicinal para formar o complexo **35**. Esta



orientação minimiza as interações estéricas entre a oxazaborolidina e a cetona além de alinhar eletronicamente a carbonila deficiente de elétrons com a borana coordenada facilitando a transferência do hidreto para a face *Si* da carbonila, através de um estado de transição de seis membros, para formar o produto da redução **36** na configuração *R*.

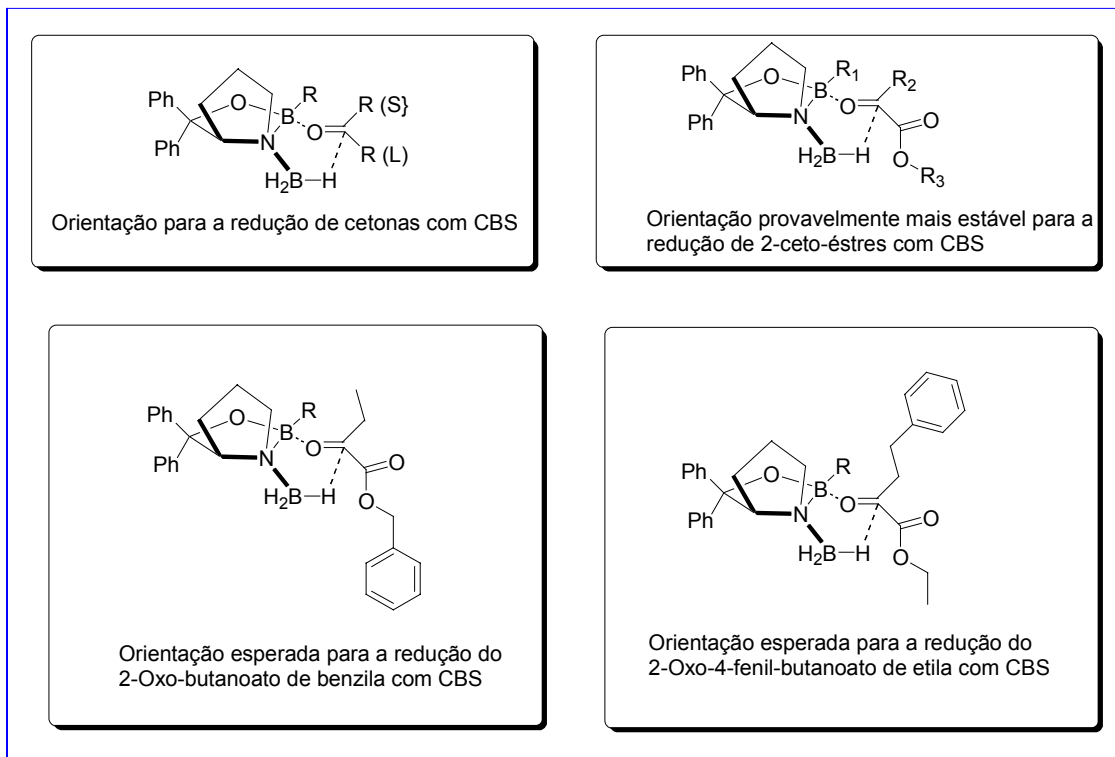


**Esquema 14: Estabilidade da coordenação da borana com a oxazaborolidina.**

A dissociação do produto reduzido **36** para regenerar a oxazaborolidina pode seguir por dois diferentes caminhos:

- Reação do alcóxido ligado ao boro endocíclico com o átomo de boro adjacente para regenerar **33** e formar o borinato **37** ou
- Pela adição de  $\text{BH}_3$  ao complexo **36** para formar a espécie **38** contendo um anel de seis membros que ao se decompor produz o catalisador coordenado ao  $\text{BH}_3$  **34** e o borinato **37**.

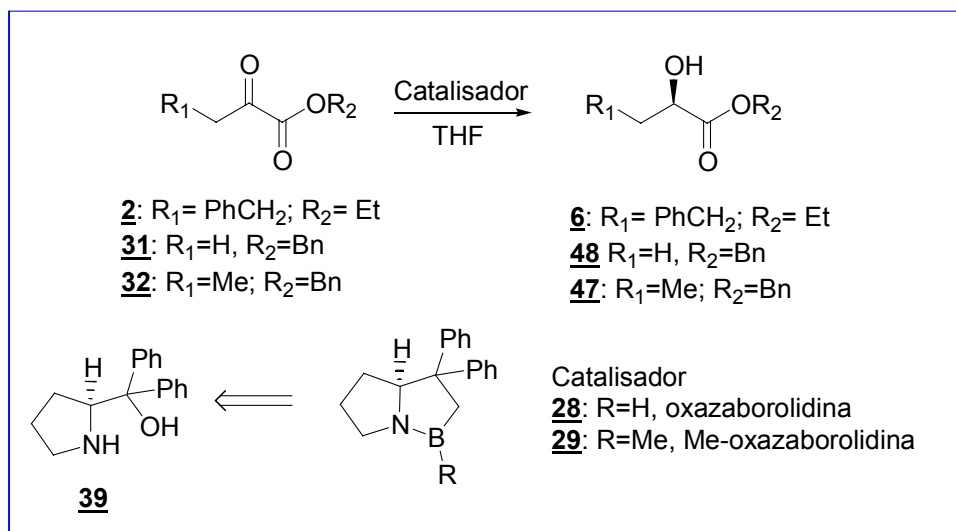
A redução enantiosseletiva de cetonas utilizando oxazaborolidina (catalisador CBS) segue a orientação mostrada no Esquema 18, em que os substituintes menores {R(S)} ficam localizados na direção do anel pirrolidínico e os substituintes maiores {R(L)} ficam localizados na direção oposta para evitar interações estéricas entre a oxazaborolidina e o substrato cetônico de acordo com o Esquema 17. Os  $\alpha$ -ceto-ésteres devem possuir a mesma seletividade facial para a adição do hidreto. Os substituintes menores ( $R_2$ ) devem ficar direcionados para cima do plano do anel da oxazaborolidina na direção do anel pirrolidínico e o substituinte mais volumoso, no caso a carboxila, deve ficar direcionada no sentido oposto, para baixo, facilitando adição do hidreto pela face *Si* em que é formado preferencialmente o  $\alpha$ -hidroxi-álcool com configuração *R*. Nestas condições a enantiosseletividade deve ser direcionada para a obtenção do (*R*)-2-hidroxi-butanoato de benzila e do (*R*)-2-hidroxi-4-fenil-butanoato de etila quando os substratos utilizados são 2-oxo-butanoato de benzila e 2-oxo-4-fenil-butanoato de etila respectivamente (Esquema 15). A Me-oxazaborolidina deve ser mais seletiva do que a oxazaborolidina devido ao maior impedimento entre o substrato e o substituinte do boro endocíclico em **35b** (Esquema 14).



**Esquema 15: Enantiosseletividade esperada na redução de 2-oxo-ésteres utilizando complexo BH<sub>3</sub>-oxazaborolidina.**

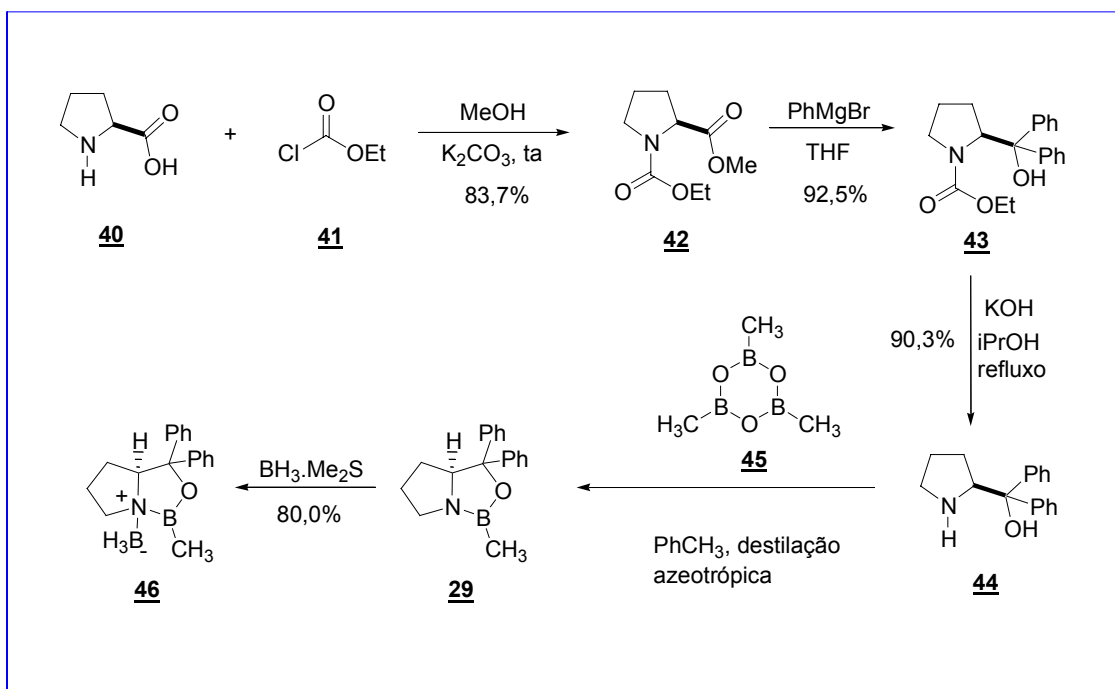
### 9.1.2 Resultados e Discussão

Foram avaliadas inicialmente as oxazaborolidina (**28**) e Me-oxazaborolidina (**29**), provenientes do (*S*)-prolinol (**39**), na redução do piruvato de benzila (**31**), 2-oxo-butanoato de benzila (**32**) e 2-oxo-4-fenil-butanoato de etila (**2**) (Figura 24).



**Figura 24:** Estrutura das oxazaborolidinas e dos substratos.

A preparação do catalisador Me-oxazaborolidina, que envolve várias etapas sintéticas (Xavier, 1996), está descrita no Esquema 16. A primeira reação é a formação do carbamato **42**, via anidrido misto, através da reação da L-prolina (**40**) com o cloroformiato de etila (**41**) utilizando como solvente MeOH na presença de carbonato de potássio. Foi isolado um líquido oleoso levemente amarelado com 83,7% de rendimento. O sucesso da transformação foi observado pela presença de sinais no espectro do infravermelho nos números de onda 1750 e 1701 cm<sup>-1</sup> característico da presença de éster e carbamato no produto obtido (Espectro 11, pág. 133). Em relação ao RMN <sup>1</sup>H ocorreu aparecimento de sinais a δ= 4,12 ppm e δ= 1,26 ppm relativo ao grupo etila do carbamato e δ= 3,73 ppm atribuído a metila ligada ao grupo carboxila (Espectro 10, pág. 132).



**Esquema 16: Preparação da Me-oxazaborolidina (29).**

O difenil-prolinol **44** foi preparado através de uma reação de Grignard do carbamato **42** com o brometo de fenil magnésio e posterior hidrólise alcalina do carbamato **43** fornecendo um sólido branco com 92,5% de rendimento. No espectro de infravermelho do produto formado ocorreu o aparecimento de um sinal com número de onda de 3453 cm<sup>-1</sup> relativo a deformação axial de hidroxila e o desaparecimento do sinal com número de onda de 1750 cm<sup>-1</sup> relativo a carbonila de éster (Espectro 14, pág. 136). Para corroborar com a formação do produto esperado, no RMN <sup>1</sup>H ocorreu o desaparecimento do sinal a δ= 3,71 ppm relativo a metoxila ligada a carbonila e o aparecimento de um sinal a δ= 7,33 ppm relativo a dez hidrogênios que corresponde a adição de duas fenilas à carbonila (Espectro 10, pág. 134). O RMN <sup>13</sup>C apresenta sinais a δ= 128 ppm que correspondem a absorção de carbonos aromáticos (Espectro 13, pág. 135).

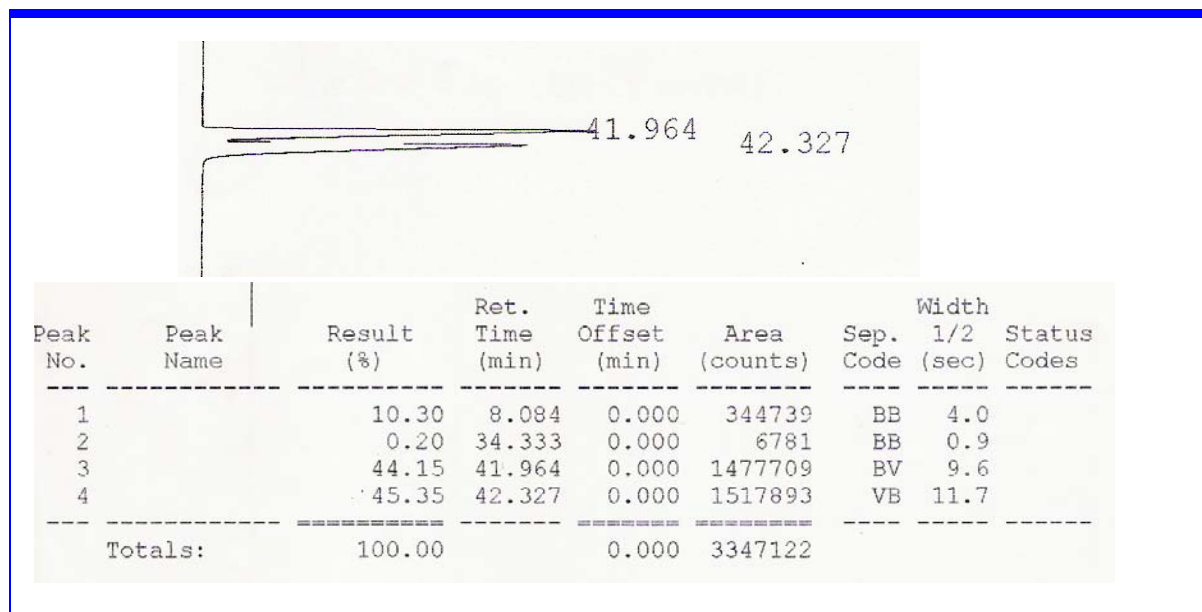
A hidrólise alcalina do carbamato **43** foi realizada com álcool isopropílico e hidróxido de potássio sob refluxo por um período de 1 hora fornecendo um sólido levemente creme com

90,3% de rendimento. No espectro de infravermelho do produto obtido, ocorreu o aparecimento de um sinal com número de onda de  $3329\text{ cm}^{-1}$  relativo a deformação axial de hidrogênio de amina secundária e o desaparecimento do sinal com número de onda de  $1677\text{ cm}^{-1}$  relativo a carbonila do carbamato (Espectro 16, pág. 138). Em relação ao RMN  $^1\text{H}$  ocorreu o desaparecimento dos sinais a  $\delta = 1,47\text{ ppm}$  e  $\delta = 4,12\text{ ppm}$  relativos a etila ligada a carboxila do carbamato (Espectro 15, pág. 137). Os dados analíticos acima confirmam a formação do produto esperado.

A (*S*)-1,3,2-(*B*-metil)-oxazaborolidina **29** foi preparado pela adição de trimetilboroxina (**45**) sobre uma mistura do difenil-prolinol (**44**) dissolvido em tolueno seco. Após destilação azeotrópica do ácido metilborônico com tolueno, a mistura reacional foi deixada atingir a temperatura ambiente em atmosfera de argônio e concentrada fornecendo um óleo bem viscoso levemente amarelado que foi usado imediatamente na próxima reação.

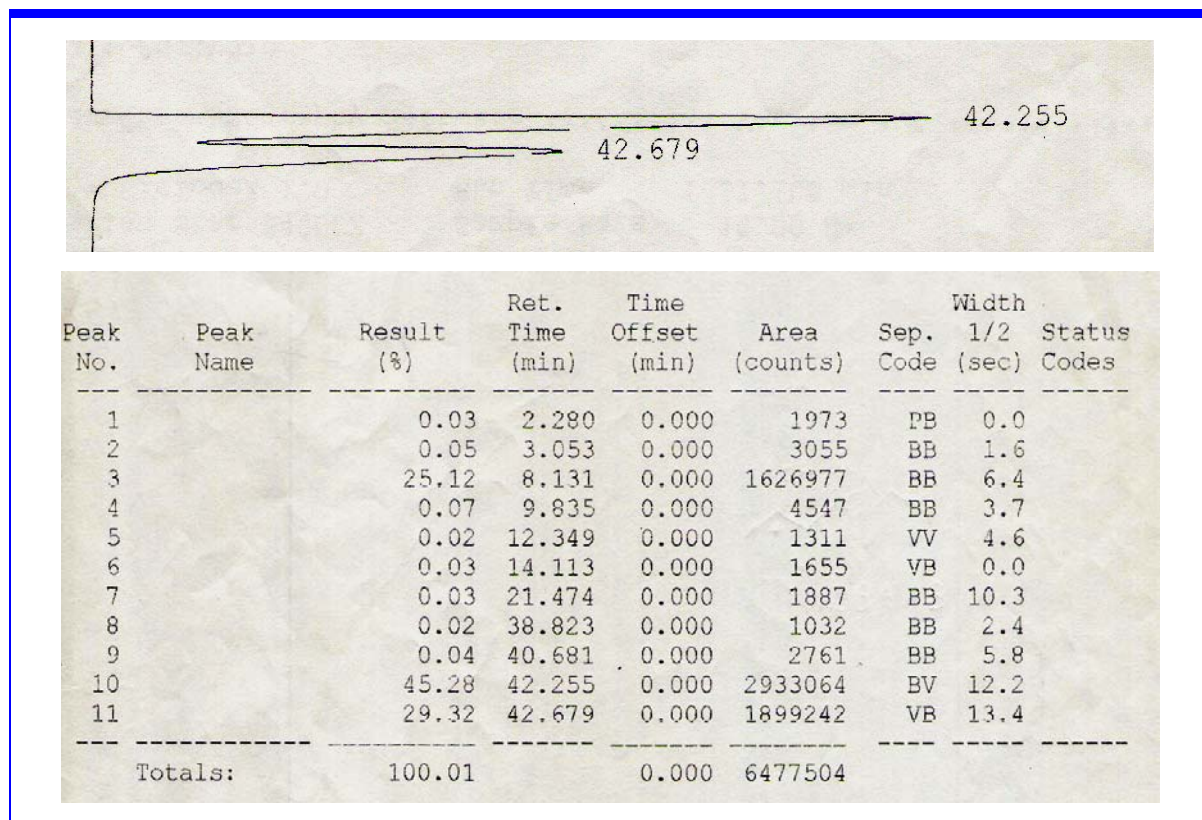
A (*B*-metil)-oxazaborolidina (**29**) reagiu com borana fornecendo **46** com 80,0% de rendimento.

O 2-hidroxi-butanoato de benzila racêmico (**47**) foi obtido pela redução do 2-oxo-butanoato de benzila (**32**) utilizando borana com rendimento de 64,0% (Figura 25). Os enantiômeros, separados por cromatografia quiral em fase gasosa, apresentam tempos de retenção de 41.964 min. e 42.327min. com áreas praticamente iguais ( Figura 26).



**Figura 25: Cromatograma do produto obtido pela redução racêmica do 2-oxo-butanoato de benzila (32) utilizando borana.**

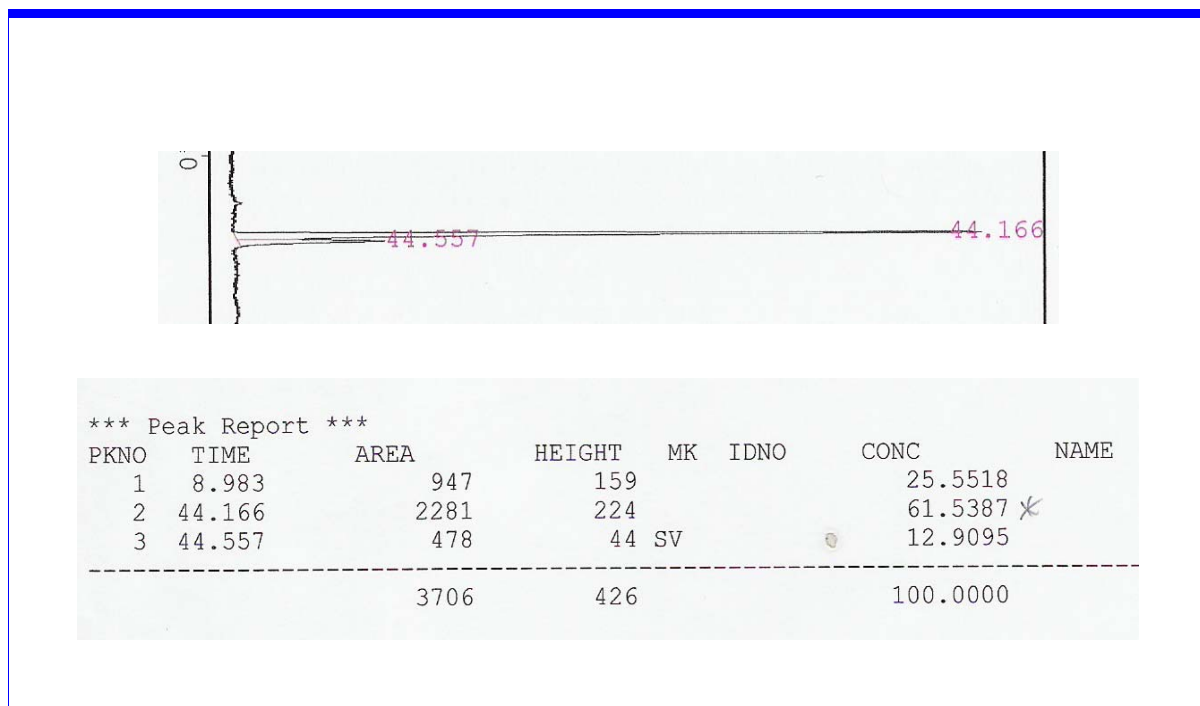
A redução de 32 utilizando complexo  $BH_3$ -oxazaborolidina à temperatura ambiente forneceu o 2-hidroxi-butanoato de benzila com o perfil cromatográfico (CG-quiral) mostrado na Figura 18. Ocorreu um aumento da área relativa do pico com tempo de retenção de 42.255min. em relação ao pico com tempo de retenção de 42.679min. mostrando que ocorreu uma pequena enantiosseletividade.



**Figura 26: Cromatograma da redução do 2-oxo-butanoato de benzila (32) utilizando o complexo borana-oxazaborolidina à temperatura ambiente.**

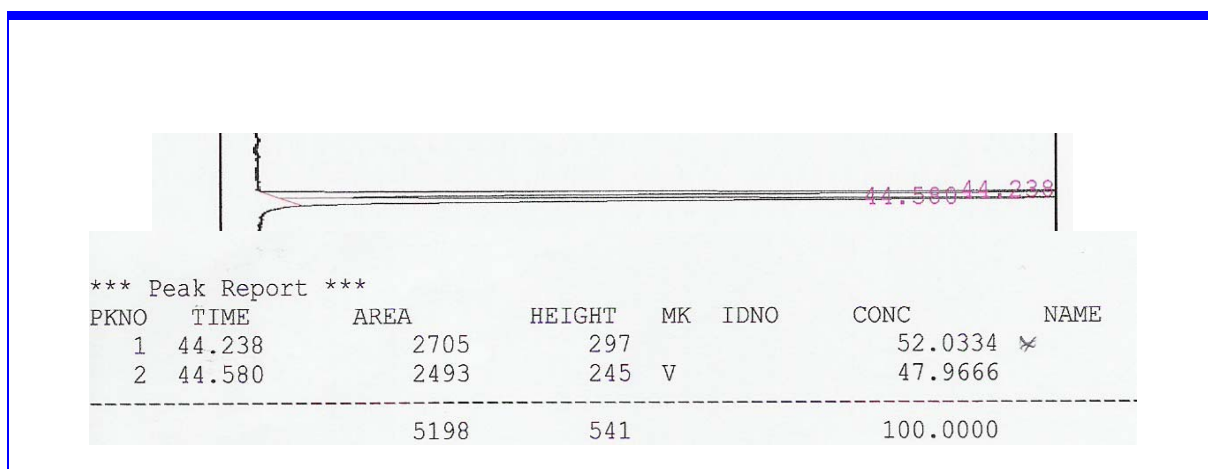
O complexo  $\text{BH}_3\text{-Me-oxazaborolidina}$  foi mais seletivo na redução de 32 quando comparado com o complexo  $\text{BH}_3\text{-oxazaborolidina}$  como é mostrado na diferença das áreas relativas ( $t_r = 44.166\text{min.}$  e  $t_r = 44.557\text{min.}$ ) no cromatograma da Figura 27.





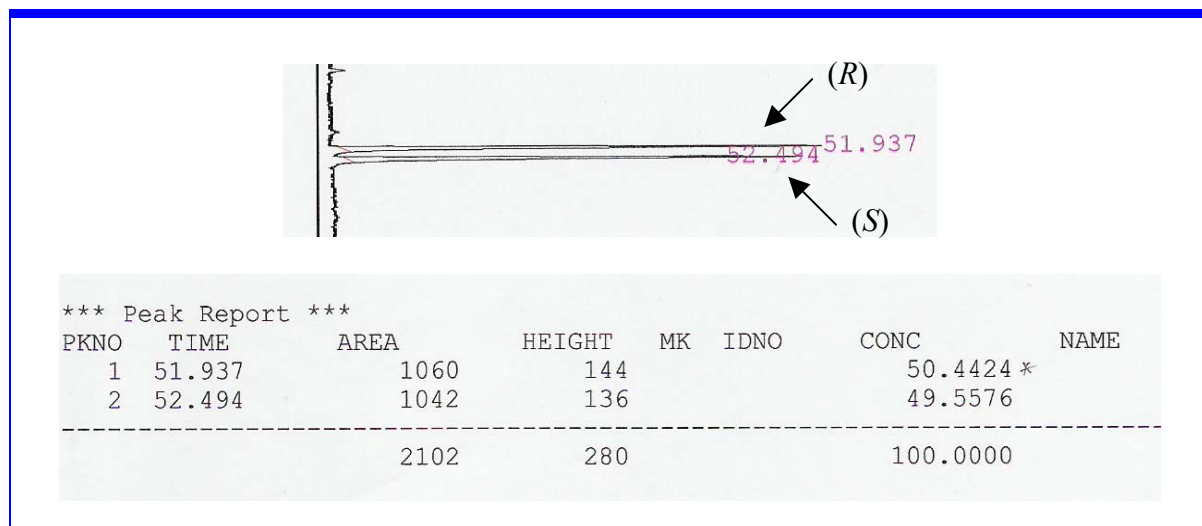
**Figura 27:** Cromatograma do produto obtido pela redução do 2-oxo-butanoato de benzila (**32**) utilizando o complexo borana-Me-oxazaborolidina à temperatura ambiente.

Não ocorreu enantiosseletividade na redução de 32 utilizando Me-oxazaborolidina à -30°C (Figura 28).



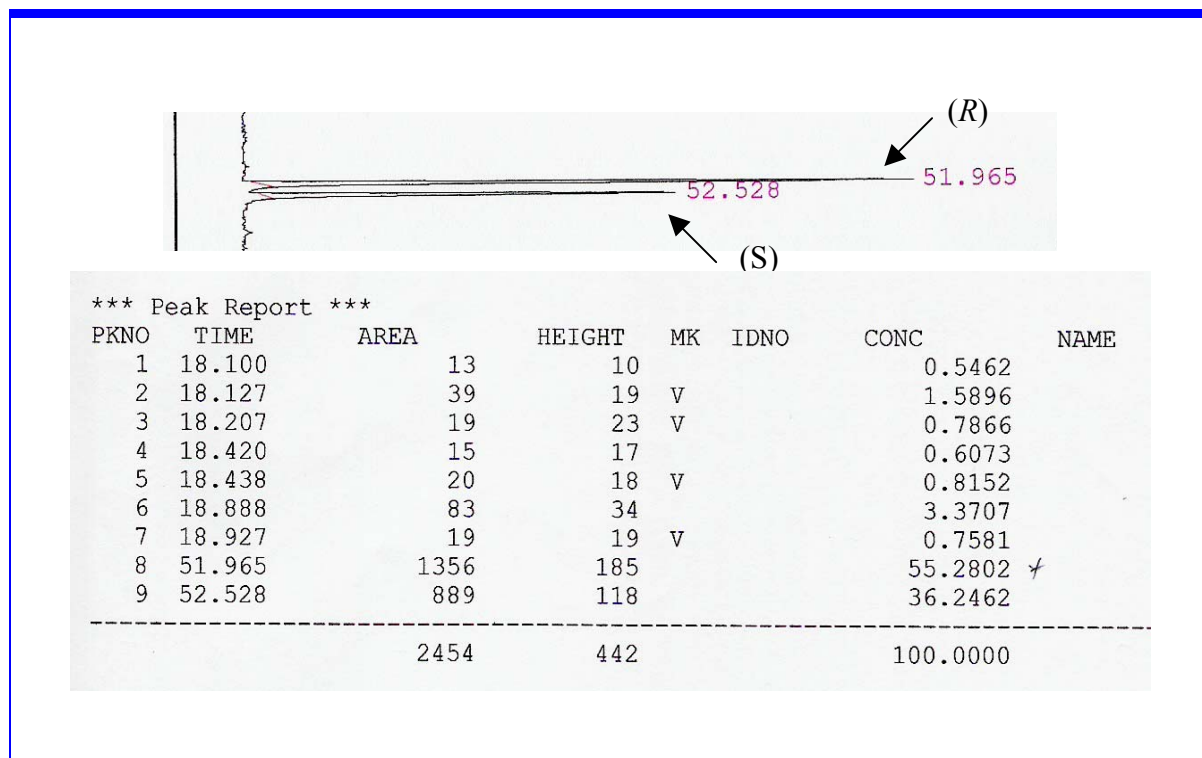
**Figura 28:** Cromatograma do produto obtido pela redução do 2-oxo-butanoato de benzila (**32**) utilizando o complexo borana-Me-oxazaborolidina a -30°C.

O cromatograma do 2-hidroxi-4-fenil-butanoato de etila obtido por redução de **2** com borana é mostrado na Figura 29. O enantiômero com configuração (*R*) apresenta tempo de retenção de 51.937min. e o (*S*) 52.494min.

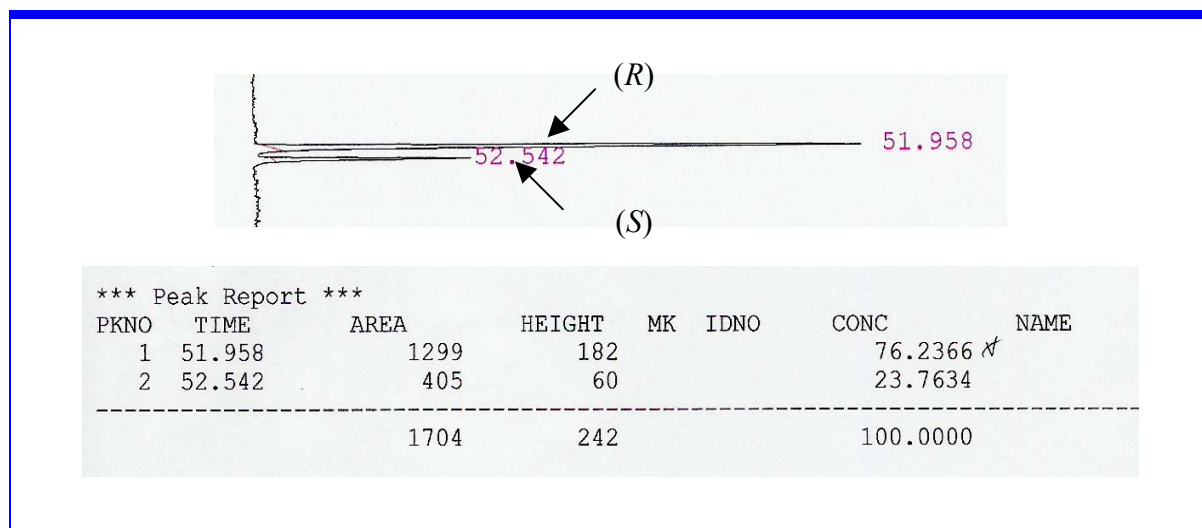


**Figura 29: Cromatograma do produto obtido pela redução racêmica do 2-oxo-4-fenil-butanoato de etila (**2**) utilizando borana.**

A redução de **2** utilizando oxazaborolidina como indutor quiral à temperatura ambiente forneceu o enantiômero (*R*) com 21% de excesso enantiomérico (Figura 30) e com a utilização de Me-oxazaborolidina ocorreu um aumento de enantiosseletividade para 52% como é mostrado na Figura 31.

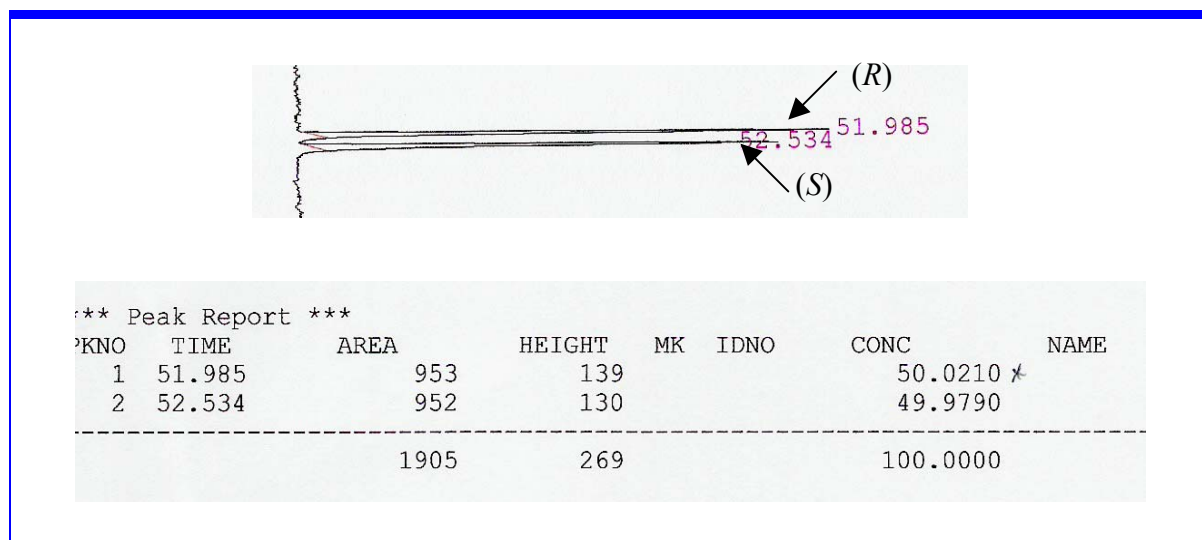


**Figura 30: Cromatograma do produto obtido pela redução do 2-oxo-4-fenil-butanoato de etila (2) utilizando o complexo-oxazaborolidina à temperatura ambiente.**



**Figura 31: Cromatograma do produto obtido pela redução do 2-oxo-4-fenil-butanoato de etila (2) utilizando o complexo-Me-oxazaborolidina à temperatura ambiente.**

Não ocorreu enantiosseletividade na redução de **2** utilizando como indutor quiral Me-oxazaborolidina à -30°C (Figura 32).



**Figura 32:** Cromatograma do produto obtido pela redução do 2-oxo-4-fenil-butanoato de etila (**2**) utilizando o complexo-Me-oxazaborolidina a -30°C.

Na Figura 33 é mostrado o cromatograma do 2-hidroxi-propionato de benzila (**48**) racêmico obtido pela redução de (**31**) com borana.

As reduções de **31** utilizando os complexos BH<sub>3</sub>-oxazaborolidina e BH<sub>3</sub>-Me-oxazaborolidina forneceram praticamente a mesma enantiosseletividade (17%) como é mostrado nas Figuras 34 e 35.

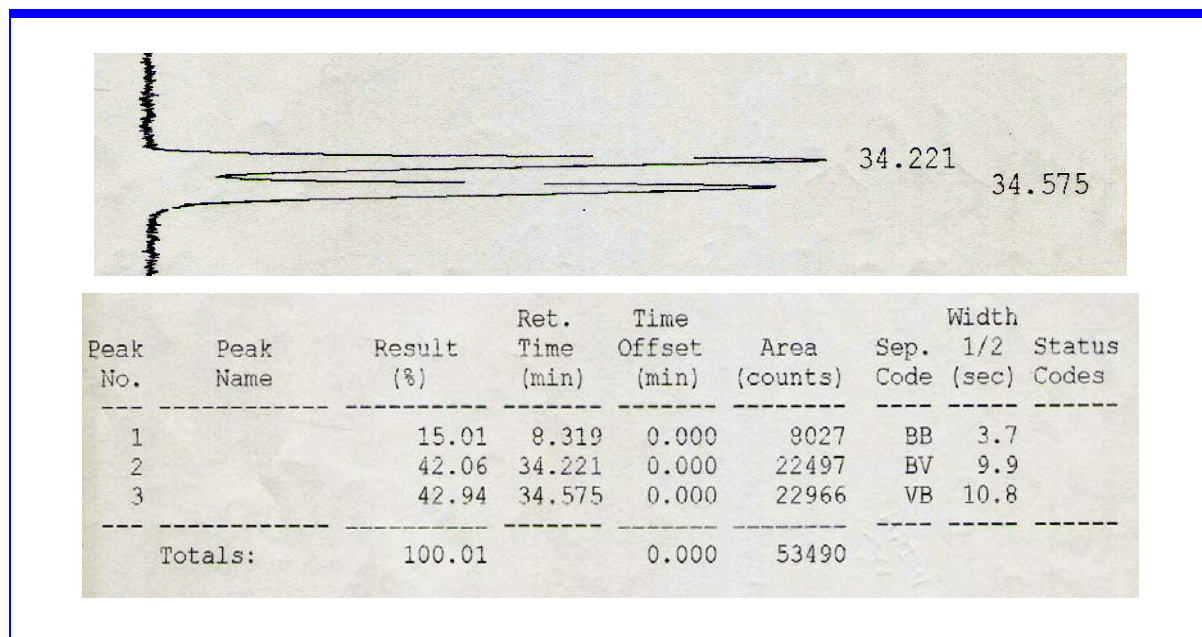


Figura 33: Cromatograma do produto obtido pela redução racêmica do 2-oxo-propanoato de benzila (31) utilizando borana.

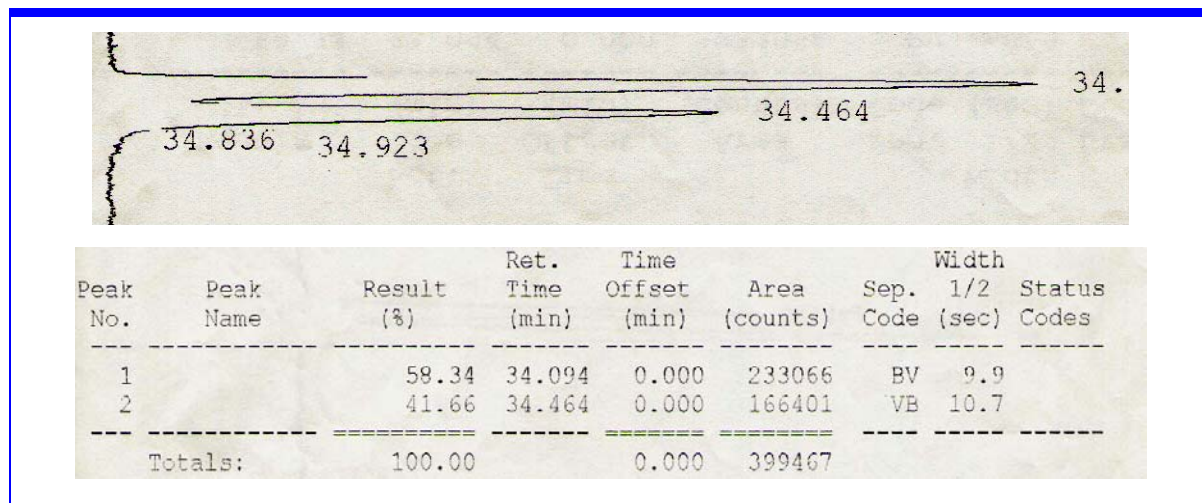
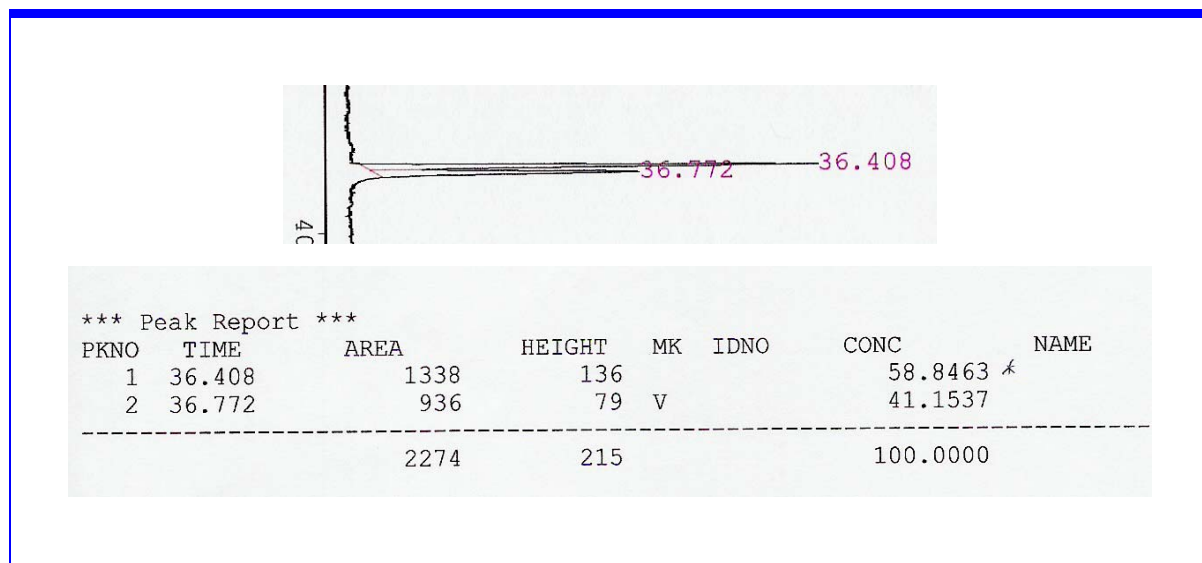
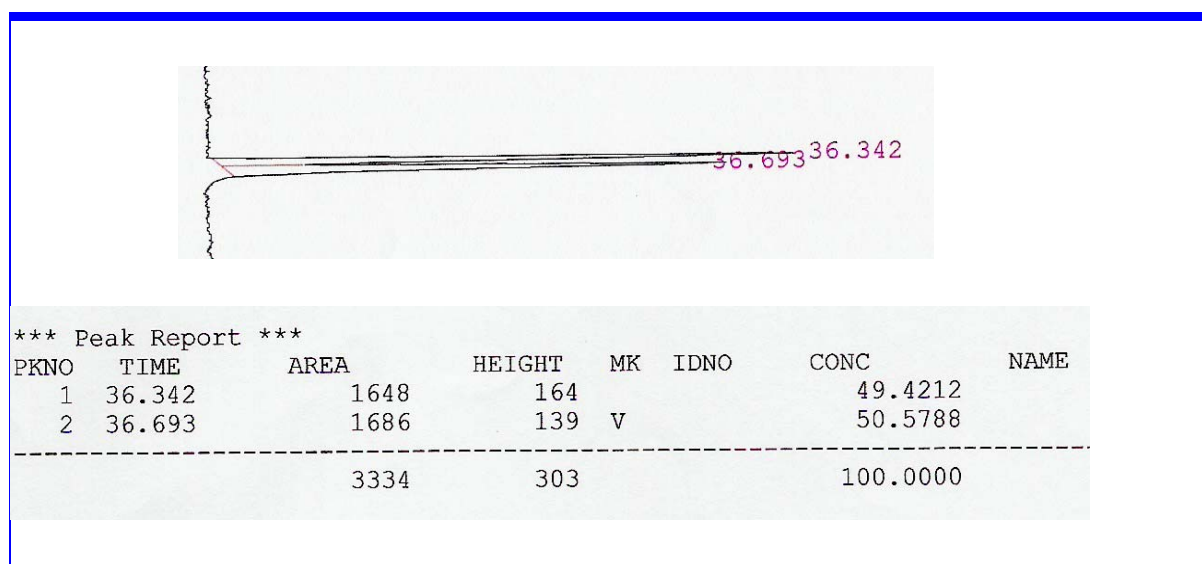


Figura 34: Cromatograma do produto obtido pela redução do 2-oxo-propanoato de benzila (31) utilizando o complexo borana-oxazaborolidina à temperatura ambiente.



**Figura 35:** Cromatograma do produto obtido pela redução do 2-oxo-propanoato de benzila (**31**) utilizando o complexo borana-Me-oxazaborolidina à temperatura ambiente.

Não ocorreu enantiosseletividade na redução de **31** utilizando como indutor quiral Me-oxazaborolidina à -30°C (Figura 36).



**Figura 36:** Cromatograma do produto obtido pela redução do 2-oxo-propanoato de benzila (**31**) utilizando o complexo borana-Me-oxazaborolidina a -30°C.

O sucesso das reduções utilizando oxazaborolidina e borana é mostrado pelo aparecimento de um sinal com número de onda na região de 3300 a 3400  $\text{cm}^{-1}$  relativo a deformação axial de hidroxila e o desaparecimento de um sinal com número de onda na região de 1743  $\text{cm}^{-1}$  relativo a carbonila de cetona (Espectros 9, 20, 27; pág. 131, 142, 149 ). Para corroborar a formação do produto esperado, no RMN  $^1\text{H}$  ocorreu a formação de um multiplete na região de  $\delta = 4,16$  a 4,30 ppm relativo ao metino vizinho à hidroxila formada (Espectro 8, 19, 26; pág. 130, 141, 148).

Os excessos enantioméricos dos 2-hidroxi-ésteres foram calculados utilizando cromatografia em fase gasosa quiral de alta resolução. O tempo de retenção relativo ao do (*R*)-2-hidroxi-4-fenil-butanoato de etila foi determinado utilizando um padrão do (*S*)-2-hidroxi-4-fenil-butanoato de etila puro obtido por redução microbiológica cuja rotação específica foi determinada por polarimetria e comparada com dados da literatura. A metodologia aplicada para a obtenção destes dados está detalhada no capítulo de Experimental em Material e Métodos.

### 9.1.3 Conclusão

Os resultados obtidos preliminarmente na redução dos 2-ceto-ésteres utilizando oxazaborolidina como indutor quiral apresentaram um aumento na enantiosseletividade na ordem: 2-oxo-butanoato de benzila > 2-oxo-4-feni-butanoato de etila > piruvato de benzila. O catalisador Me-oxazaborolidina é mais seletivo do que a oxazaborolidina quando a reação é realizada à temperatura ambiente e ambos os catalisadores não apresentaram enantiosseletividade à temperatura de  $-30^\circ\text{C}$ .

## 9.1.4 Experimental

### Material e Métodos

Os espectros de absorção na região do infravermelho (IV) foram registrados no espectrofotômetro Nicolet-Magna 760, utilizando pastilhas de brometo de potássio e/ou filme em célula de cloreto de sódio. Os valores para a absorção foram expressos em número e onda, utilizando a unidade centímetro recíproco ( $\text{cm}^{-1}$ ).

Os espectros de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio ( $^1\text{H}$ -RMN) foram obtidos a 200 MHz, em um aparelho Brüker DPX 200, utilizando o núcleo de hidrogênio residual do clorofórmio deuterado ( $\text{CHCl}_3$ ) como referencial interno. Os valores dos deslocamentos químicos foram expressos em unidades adimensionais de delta ( $\delta$ ), representando parte por milhão (ppm) da frequência aplicada e os valores da constante de acoplamento ( $J$ ) foram registrados em Hertz (Hz). As áreas relativas dos sinais foram obtidas por integração eletrônica e os espectros de hidrogênio foram tabulados na ordem: multiplicidade (s, singlete; d, dublete; t, tripleto; q, quarteto; qt, quinteto; m, multiplete e sl, sinal largo), constante de acoplamento, assinalamento de hidrogênio e número de hidrogênio.

Os espectros de Ressonância Magnética Nuclear de Carbono ( $^{13}\text{C}$ -RMN) foram obtidos a 50 MHz utilizando o núcleo do carbono residual do clorofórmio deuterado ( $\text{CDCl}_3$ ) como referencial interno. Os valores dos deslocamentos químicos foram expressos em unidades adimensionais de delta ( $\delta$ ), representando parte por milhão (ppm) da frequência aplicada.

Os excessos enantioméricos ( $ee$ ) das reduções enantiosseletivas dos 2-oxo-ésteres utilizando oxazaborolidianas foram analisados no laboratório de síntese de Far-Manguinhos



utilizando Cromatografia Gasosa Quiral de Alta Resolução (CGQAR), em um cromatógrafo Shimadzu. GC-14B. As condições para as análises foram:

- Coluna capilar Cyclodex B (30m x 0,25, id) fornecida pela J & W Scientific (112-2532).
- Sistema de injeção split/splitless com split (razão de divisão) de 100:1
- Gás de arraste: Hélio.
- Temperatura do injetor: 230°C.
- Temperatura de detector: 230°C.
- Temperatura inicial da coluna: 120°C (30 min).
- Rampa: 2°C/min.
- Temperatura final da coluna: 200°C.
- Sistema de aquisição de dados: Class LC-10.

Os excessos enantioméricos foram calculados utilizando a seguinte equação:  $ee=100(A_1 - A_2)/(A_1 + A_2)$  onde  $A_1 > A_2$  e A corresponde à área obtida no cromatograma para o componente  $A_x$  da mistura enantiomérica.

O monitoramento das reações químicas foi feito por cromatografia em camada fina (CCF), utilizando folhas cromatográficas de sílica suportadas em base de alumínio Kiesegel 60 F<sub>254</sub>, com espessura de 0,25mm (Merck).

A visualização das substâncias nas placas de CCF foi realizada sob lâmpada de ultravioleta (254 nm) e/ou por imersão em soluções reveladoras de funções químicas:

- Exposição ao vapor de Iodo;

- Imersão e combustão em solução de molibdato de amônio cérico 10%. A solução foi preparada pela adição de 10g de molibdato de amônia e 0,4g de sulfato cérico em 90mL de água. Adicionou-se 10mL de ácido sulfúrico concentrado e a solução resultante amarelada foi estocada à temperatura ambiente.

Os produtos obtidos, após isolamento, foram purificados por cromatografia em coluna, empregando gel de sílica 60 (70-230 ou 230-400 mesh ASTM Merck).

A nomenclatura das substâncias citadas nesta tese foi determinada pelo programa CS CHEMDRAW ULTRA<sup>®</sup>, utilizando a base de dados Beilstein<sup>®</sup>.

A evaporação dos solventes foi feita em evaporadores rotatórios marca Büchi e Bücher, e os resíduos foram removidos em sistema de alto vácuo.

Os valores das rotações específicas foram obtidos em um polarímetro Jasco DIP-370 utilizando uma cubeta de 0,1dm de caminho ótico e concentração de 1g de 2-hidroxi-4-fenilbutanoato de etila para 100mL de CHCl<sub>3</sub>.

Os solventes foram tratados e secos segundo metodologias descritas abaixo:

### **Secagem e Purificação de Solventes e Reagentes**

**Ácido 2-oxobutanoico** – Foi purificado por destilação utilizando Kugelhor.

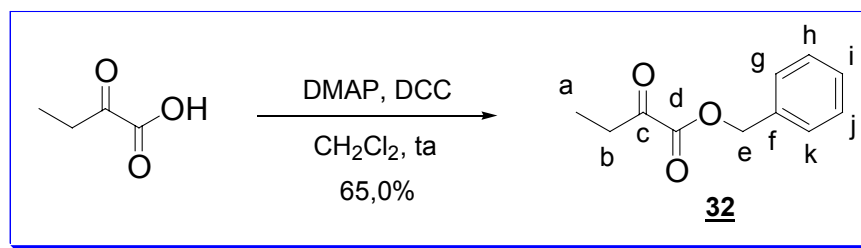
**Tetraidrofurano** - O solvente foi previamente agitado em poeira de sódio (ver abaixo), submetido a refluxo e destilado em atmosfera anidra.

**Diclorometano, Dimetilformamida e Trietilamina** - As substâncias foram mantidas em refluxo sob agitação na presença de hidreto de cálcio, até terminar o desprendimento de gás, e em seguida destiladas antes de serem utilizadas.

**Poeira de sódio:** Em um balão de fundo redondo foram adicionados 10g de sódio metálico e 50mL de tolueno. Conectou-se uma coluna de refluxo ao balão, o meio foi agitado fortemente até ocorrer pulverização do metal, a mistura foi deixada atingir a temperatura ambiente mantendo a agitação, o tolueno foi retirado e o metal foi deixado em contato com o THF a ser purificado.

## Experimentais

### 9.1.4.1 Preparação do 2-oxo-butanoato de benzila (32)



Em um balão de 500mL contendo ácido 2-oxo-butanóico (2,0g, 19,6mmol), álcool benzílico (1,90g, 17,6mmol), DMAP (200mg, 0,98mmol) em diclorometano (80mL) refrigerado com banho de gelo, foi adicionado DCC (4,43g, 21,2mmol) dissolvido em diclorometano (70mL) por um período de 30 minutos através de um funil de adição com equalizador de pressão. A mistura reacional foi deixada sobre agitação à temperatura ambiente por um período de 21 horas. A mistura reacional foi filtrada e concentrada em evaporador rotatório fornecendo um resíduo oleoso castanho amarelado (5,7g) que foi purificado por filtração em sílica (“flash chromatography”) (40,0g, 70-230 MESH, coluna: 20cm (h)  $\times$  2,5cm ( $\varnothing$ ), frações: 8,0ml, fase móvel  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ) fornecendo um líquido oleoso levemente amarelado (2,29g, 65,0%).

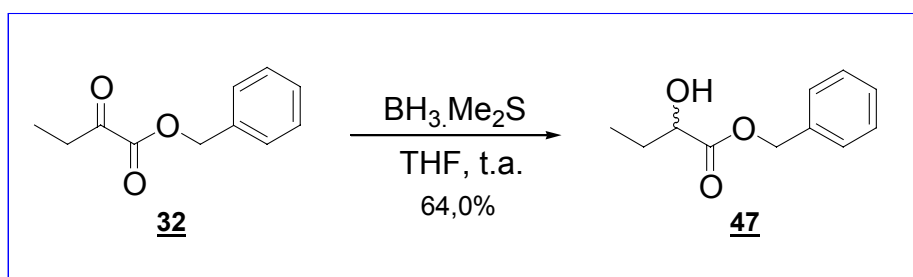
$R_f = 0,62$  (eluente:  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ );

IV max. (filme)  $\nu\text{-cm}^{-1}$ : 2981, 2941 ( $\nu$  C-H), 1730 ( $\nu$  C=O), 1456 ( $\nu$  C=C), 1272, 1100 ( $\nu$  C-O), 699 ( $\nu$  C=C fora do plano);

RMN  $^1\text{H}$  (200 MHz/ $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 7,27-7,42 (m, 5H, Ar-H); 5,28 (s, 2H,  $\text{CH}_2(\text{Ph})\text{OCO}$ ); 2,84 e 2,77 (q,  $J=7,2$  Hz  $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CO}$ ); 1,06 (t, 3H,  $J=7,2$  Hz,  $\text{CH}_3\text{CH}_2$ );

RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 50 MHz)  $\delta$ : 7,98 ( $\text{C}_a$ ), 33,06 ( $\text{C}_b$ ), 68,88 ( $\text{C}_c$ ), 129,67, 129,78, 129,84 ( $\text{C}_{g,h,i,j,k}$ ), 135,66 ( $\text{C}_f$ ), 162,05 ( $\text{C}_d$ ), 195,76 ( $\text{C}_e$ ).

#### 9.1.4.2 Obtenção do 2-hidroxi-butanoato de benzila racêmico (35)



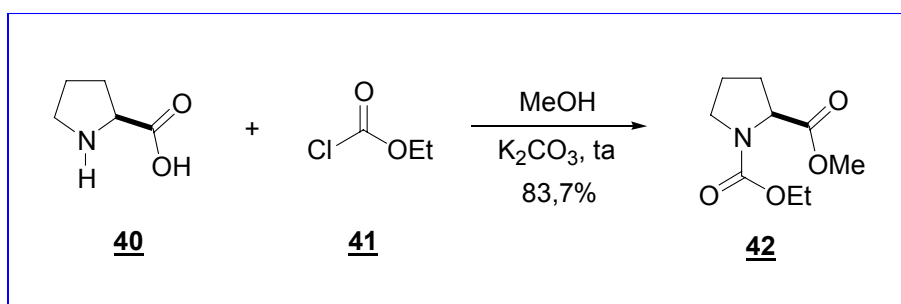
Em um balão de fundo redondo de 250mL contendo **32** (2,714g, 11,23mmol) em 34,0ml de THF, refrigerado com banho de gelo em etanol, adicionou-se uma solução de  $\text{BH}_3 \cdot \text{DMS}$  (2,0 M em tolueno, 6,63mL, 0,47mmol) em 30mL de metanol lentamente, através de um funil de adição com equalizador de pressão, por um período de 7 minutos. A mistura reacional foi deixada agitar à temperatura ambiente por um período de 2 horas, quando ocorreu o consumo total do 2-oxo-butanoato de benzila por CCF, adicionou-se 6,0mL de metanol e a agitação foi mantida por mais 30 minutos à temperatura ambiente. A mistura reacional foi concentrada a pressão reduzida, o óleo bruto foi filtrado em sílica (40,0g, 70-230 MESH, coluna: 25cm (h)  $\times$  2,5cm ( $\emptyset$ ), altura: 19cm, frações: 8,0ml, fase móvel  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ) fornecendo o composto **47** na forma de um óleo incolor (1,39g, 64,0%).

$R_f = 0,26$  (eluente:  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ );

IV max. (filme)  $\nu\text{-cm}^{-1}$ : 3451 ( $\nu$  C-OH), 2968, 2937 ( $\nu$  C-H), 1736 ( $\nu$  C=O), 1456 ( $\nu$  C=C), 1213, 1131 ( $\nu$  C-O), 698 ( $\nu$  C=C fora do plano);

RMN  $^1\text{H}$  (200 MHz/ $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 7,3 (m, 5H, Ar-H); 5,15 (s, 2H,  $\text{PhCH}_2\text{OCO}$ ); 4,11-4,16 (m, 1H,  $J = 4,5$  Hz,  $\text{CH}_2\text{CH}(\text{OH})\text{CO}$ ); 2,3 (s, OH); 1,67-1,63 (m, 2H,  $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}$ ); 0,88 (t, 3H,  $J = 7,4$  Hz,  $\text{CH}_3\text{CH}_2$ ).

#### 9.1.4.3 Preparação do Éster metílico da N-carboxietil-prolina (**49**)



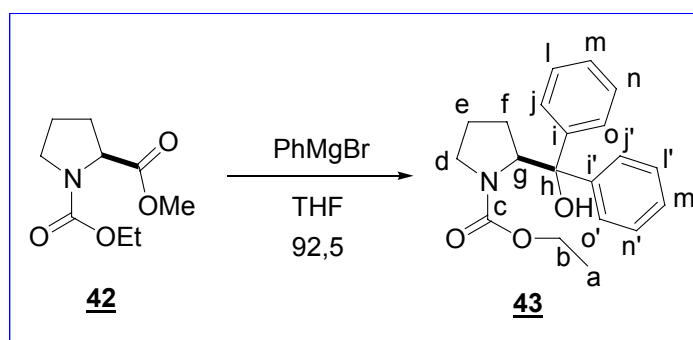
Em um balão de 100mL seco foi adicionado metanol (60,8mL), L-prolina (**40**) (3,50g, 30,43mmol) e carbonato de potássio (4,01g, 30,43mmol). A mistura foi refrigerada a  $0^\circ\text{C}$  e adicionou-se cloroformato de etila (**41**) (6,6ml, 70,0mmol), através de seringa, por um período de 15 minutos. A reação foi mantida com agitação à temperatura ambiente por um período de 24 horas. Após este período, o metanol foi evaporado a pressão reduzida, fornecendo um sólido que foi solubilizado em uma solução 5% de bicarbonato de sódio (30,0mL), a fase aquosa foi extraída com acetato de etila ( $3 \times 45\text{mL}$ ), a fase orgânica foi seca sobre sulfato de sódio anidro e concentrada em evaporador rotatório, fornecendo o éster metílico da N-carboxietil-prolina (**42**) (5,12g, 83,7%) como um líquido oleoso levemente amarelado.

$R_f = 0,26$  (eluente: AcOEt/Hex 7:3);

IV max. (filme)  $\nu\text{-cm}^{-1}$ : 2982, 2957 ( $\nu$  C-H), 1750 ( $\nu$  C=O de éster), 1701 ( $\nu$  C=O de amida), 1420 (C-N), 1202, 1174 ( $\nu$  C-O), 772 ( $\nu$  C-H)  $\text{cm}^{-1}$ ;

RMN  $^1\text{H}$  (200 MHz/ $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 4,33 (m, 1H,  $\text{CH}_2\text{CHCO}$ ); 4,07-4,19 (m, 2H,  $J=7,2$  Hz,  $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OCO}$ ); 3,72 (d, 3H,  $J=3,0$  Hz,  $\text{CH}_3\text{OCO}$ ); 3,49-3,57 (m, 2H,  $\text{CH}_2\text{NCO}$ ); 1,92-2,19 (m, 4H,  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}$ ); 1,15-1,30 (m, 3H,  $J=7,2$  Hz,  $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OCO}$ ).

#### 9.1.4.4 Preparação do (S)-N-carboxietil-1,1-difenil-prolinol



##### A) Preparação do brometo de fenil magnésio

Magnésio em pó (2,30g, 95,66mmol) foi adicionado em um balão de duas bocas de fundo redondo de 100mL, contendo uma barra de agitação magnética. O sólido foi deixado agitar vigorosamente sob um fluxo de argônio por um período de 4 horas. Após este período, adicionou-se alguns cristais de iodo, o fluxo de argônio foi descontinuado e a mistura sólida foi aquecida utilizando uma pistola de aquecimento até não ocorrer mais desprendimento de vapor violeta de iodo. O magnésio ativado foi suspenso em THF (12,0mL) e adicionou-se uma solução de bromobenzeno (5,03mL, 7,5g, 47,8mmol) em THF (18,0mL) através de seringa lentamente por um período de 45 minutos. Durante a adição do bromobenzeno

ocorreu desprendimento de calor suficiente para manter solução em refluxo. A mistura foi então deixada atingir a temperatura ambiente sob agitação por um período de 45 minutos.

#### B) Preparação do (*S*)-*N*-carboxietil-1,1-difenil-prolinol (**43**)

Ao balão de fundo redondo contendo brometo de fenil magnésio, preparado anteriormente, foi adicionado o éster metílico da *N*-carboxietil-prolina (**42**) (2,0g, 9,12mmol) em THF anidro (11,9mL) através de seringa a 0°C por um período de 15 minutos. Após 3 horas de reação a 0°C adicionou-se a mistura reacional uma solução saturada de cloreto de amônio (20,0mL). O sólido branco formado foi deixado decantar, o precipitado foi lavado com clorofórmio (2×20mL) e a fase H<sub>2</sub>O/THF foi extraída com clorofórmio (3×20mL). As fases orgânicas foram combinadas, extraídas com uma solução saturada de cloreto de sódio (3×15mL) e secas com sulfato de sódio anidro fornecendo um óleo que em poucos minutos cristalizou-se como um sólido branco (3,12g; 92,5%).

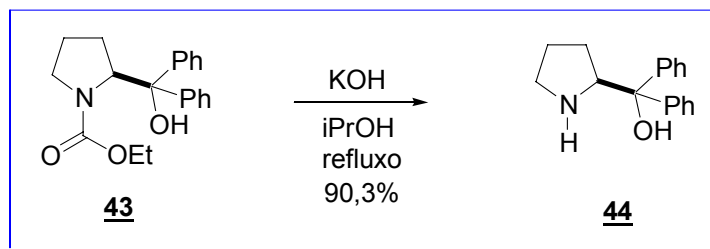
$R_f = 0,55$  (eluente: AcOEt/Hex 4:6);

IV max. (filme)  $\nu\text{-cm}^{-1}$ : 3452 ( $\nu$  C-OH), 2986, 2963 ( $\nu$  C-H), 1677 ( $\nu$  C=O de amida), 1449 ( $\nu$  C=C), 1428 (C-N), 1107 ( $\nu$  C-O), 705 ( $\nu$  C=C fora do plano);

RMN <sup>1</sup>H (200 MHz/CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 7,21-7,40 (m, 10H, Ar-H); 4,91-4,97 (m, 1H,  $J = 4,9$  e  $3,7$  Hz CH<sub>2</sub>CHNCO); 4,08-4,15 (t, 2H,  $J = 7,1$  Hz, CH<sub>2</sub>OCO); 3,40-3,45(m, 1H, CH<sub>2</sub>NCO); 1,94-2,01 (m, 2H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>); 1,49-1,53 (m, 2H, CH<sub>2</sub>CHNCO); 1,23 (t, 3H,  $J = 7,1$  Hz, CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>OCO);

RMN <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>, 50 MHz)  $\delta$ : 15,72 (C<sub>a</sub>); 24,04(C<sub>f</sub>); 30,75(C<sub>e</sub>); 48,83(C<sub>d</sub>); 63,00(C<sub>g</sub>); 82,71(C<sub>h</sub>); 128,22; 128,23; 128,26; 128,53; 128,71; 128,96; 129,24; 130,59(C<sub>i,j,l,m,n,o,i',j',l',m',n',o',i</sub>); 144,76 (C<sub>h</sub>); 147,44(C<sub>c</sub>).

#### 9.1.4.5 Preparação do (S)-1,1-difenilprolinol (44)



Em um balão de fundo redondo de 25mL adicionou-se 43 (500,0mg, 1,47mmol), álcool isopropílico (14,7mL) e hidróxido de potássio (825,0mg, 22,6 mmol). A mistura reacional foi refluxada por um período de 1 hora, concentrada em evaporador rotatório, o resíduo obtido foi solubilizado em água (1,69mL), a fase aquosa foi extraída com clorofórmio (3× 2,5mL) e a fase orgânica foi extraída com uma solução aquosa de cloreto de sódio (3×5mL), seca sobre sulfato de sódio anidro, filtrada e concentrada em evaporador rotatório fornecendo um sólido levemente creme (337,0g, 90,3%).

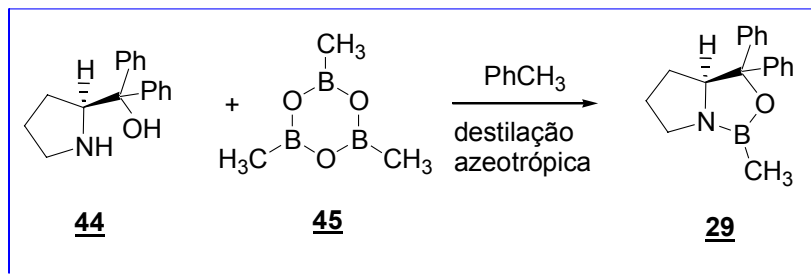
$R_f = 0,26$  (eluente: AcOEt com 1 gota de  $Et_3N$ );

IV max. (filme)  $\nu\text{-cm}^{-1}$ : 3406 ( $\nu$  O-H), 3329 ( $\nu$  N-H), 1447 ( $\nu$  C=C), 700 ( $\nu$  C=C fora do plano);

RMN  $^1H$  (200 MHz/ $CDCl_3$ )  $\delta$ : 7,13-7,26 (m, 6H, Ar-H); 7,26-7,56 (m, 4H, Ar-H); 4,22 (t, 1H,  $J = 7,2$  Hz,  $CH_2CHNC$  2,88-3,01 (m, 2H,  $CH_2CH_2NC$ , N-H, O-H), 1,54-1,72 (m, 4H,  $CH_2CH_2CH_2CH$ );

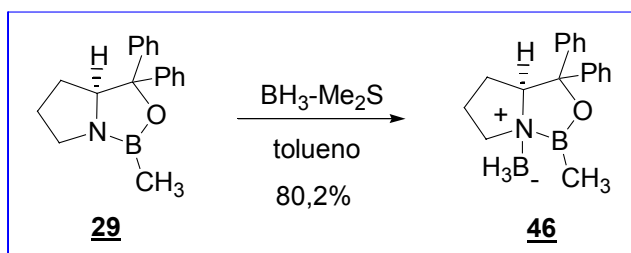


#### 9.1.4.6 Preparação da (S)-1,3,2-(B-metil)-oxazaborolidina (**29**) a partir do (S)-1,1-difenilprolinol (**44**)



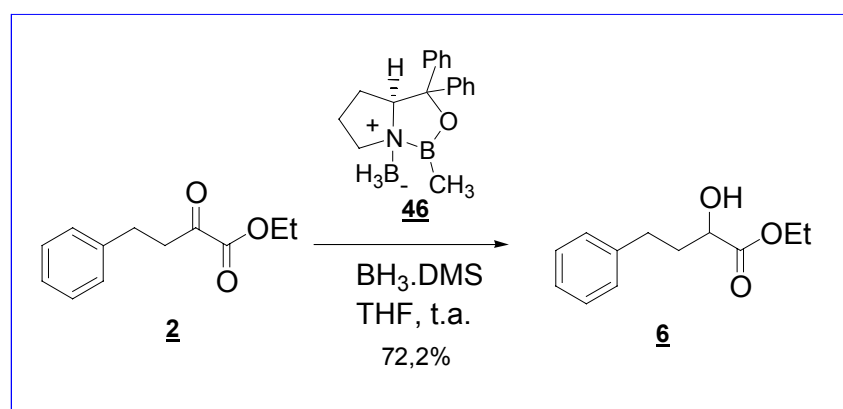
Em um balão 25 mL conectado a uma aparelhagem de destilação, foi adicionado **44** (337mg, 1,32mmol) e tolueno seco (6,7mL). A mistura foi refrigerada a -2°C, adicionou-se trimetilboroxina (0,16mL, 1,6mmol), deixou-se atingir a temperatura ambiente e a agitação foi mantida por 30 minutos ocorrendo a formação de um precipitado branco. A mistura reacional foi então aquecida e o tolueno destilado junto com o ácido metilborônico. Adicionou-se mais tolueno (5mL) a mistura reacional e uma nova destilação foi feita para remover o restante do ácido metilborônico formado juntamente com o tolueno. A mistura reacional foi deixada atingir a temperatura ambiente em atmosfera de argônio e concentrada em evaporador rotatório fornecendo um óleo bem viscoso levemente amarelado que foi usado imediatamente na próxima reação.

#### 9.1.4.7 Preparação do complexo borana-(S)-1,3,2-(B-metil)-oxazaborolidina (Me-oxazaborolidina) (**46**)



Ao balão contendo a (*S*)-1,3,2-(*B*-metil)-oxazaborolidina (**29**) obtida anteriormente foi refrigerado a 5°C e adicionou-se 0,20 ml de BH<sub>3</sub>·DMS (2,0 M em tolueno, 0,40mmol). A mistura reacional foi deixada sob agitação à temperatura ambiente por um período de 16 horas. Após este período, adicionou-se hexano (2,5mL), ocorrendo formação de um sólido branco. A mistura foi deixada em freezer por um período de 2 horas para completar a cristalização. O sólido formado foi filtrado e o sobrenadante concentrado ocorrendo nova cristalização. Os cristais incolores unidos (309,8mg, 80,2%) foram estocados em freezer.

#### 9.1.4.8 Redução assimétrica do 2-oxo-4-fenil-butanoato de etila **2** com borana utilizando Me-oxazaborolidina como indutor quiral



Em um balão de fundo redondo de 15mL contendo Me-oxazaborolidina (**46**) (15,0mg, 0,05mmol,) em 3ml de THF em atmosfera de argônio foi adicionado 0,16 ml de BH<sub>3</sub>·DMS (2,0 M em tolueno, 0.32mmol). O 2-oxo-4-fenilbutanoato de etila (**2**) (106,2mg, 0,5mmol) em 1ml de THF foi adicionado através de seringa por um período de 7 minutos à temperatura ambiente. Após agitação por 15 minutos à temperatura ambiente, o meio reacional foi refrigerado com banho de gelo em etanol, adicionou-se 0,4mL de metanol e deixou-se agitar por um período de 1 hora. A mistura reacional foi concentrada a pressão reduzida, o óleo

bruto foi filtrado em sílica utilizando como fase móvel  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  fornecendo o 2-hidroxi-4-fenilbutanoato de etila (**6**) na forma de um óleo incolor (76,9mg) com 72,2% de rendimento e 52% de *ee* (*R*).

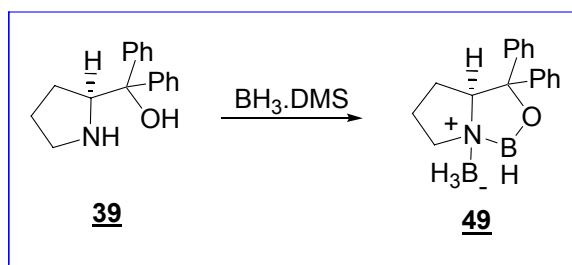
$R_f = 0,48$  (eluente:  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ );

CG quiral  $t_r = 51,958\text{min}$  (*R*),  $t_r = 52,542\text{min}$  (*S*);

IV max. (filme)  $\nu\text{-cm}^{-1}$ : 3467 ( $\nu$  O-H), 1732 ( $\nu$  C=O), 1214, 1100 ( $\nu$  C-O), 701 ( $\nu$  C=C fora do plano);

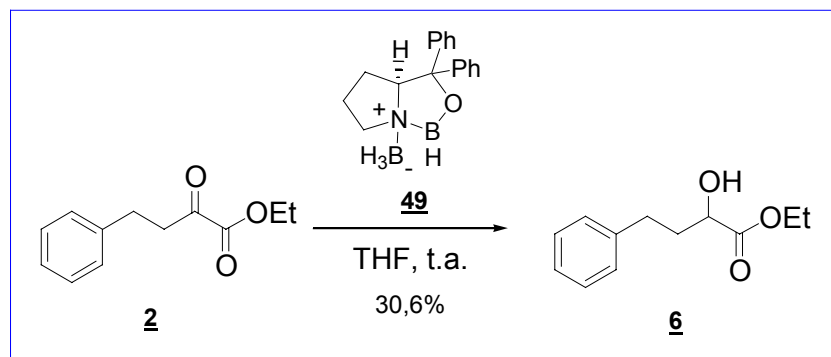
RMN  $^1\text{H}$  (200 MHz/ $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 7,25-7,31 (m, 5H, Ar-H); 4,21-4,25 (m, 3H,  $\text{CH}(\text{OH})\text{CO}$  e  $\text{CH}_2(\text{OCO})\text{CH}_3$ ); 2,57-2,79 (m, 2H,  $\text{PhCH}_2\text{CH}_2$ ); 2,57 (s, OH); 1,98-2,19 (m, 2H,  $J=7,2$  Hz,  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CHOH}$ ); 1,29 (t, 3H,  $J=7,2$  Hz,  $\text{COCH}_2\text{CH}_3$ ).

#### 9.1.4.9 Preparação do complexo borana-oxazaborolidina (**49**) em THF



Em um balão de fundo redondo de 15mL contendo difenilprolinol (**39**) (26,35mg, 0,104mmol) e THF (0,62mL) em atmosfera de argônio, refrigerado com banho de gelo em etanol, adicionou-se 0,67mL de  $\text{BH}_3 \cdot \text{DMS}$  (2,0 M em tolueno, 1,34mmol) através de seringa por um período de 5 minutos. A mistura foi deixada agitar à temperatura ambiente por um período de 20 horas.

**9.1.4.10 Redução assimétrica do 2-oxo-4-fenil-butanoato de etila (**2**) com borana utilizando oxazaborolidina como indutor quiral**



O 2-oxo-4-fenil-butanoato de etila (**2**) (200mg, 0,97mmol) em 0,56ml de THF foi adicionado através de seringa sobre a solução de **54** (26,35mg, 0,104mmol) em THF (0,62mL), preparada anteriormente, por um período de 30 minutos à temperatura ambiente. Após agitação por 5 minutos à temperatura ambiente, o meio reacional foi refrigerado com banho de gelo em etanol, adicionou-se 1,25ml de metanol e deixou-se agitar por um período de 1 hora. A mistura reacional foi concentrada a pressão reduzida, o óleo bruto foi filtrado em sílica utilizando como fase móvel CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> fornecendo o 2-hidroxi-4-fenil-butanoato de etila (**6**) na forma de um óleo incolor (72,4mg) com 36,0% de rendimento e 21% de *ee* (*R*).

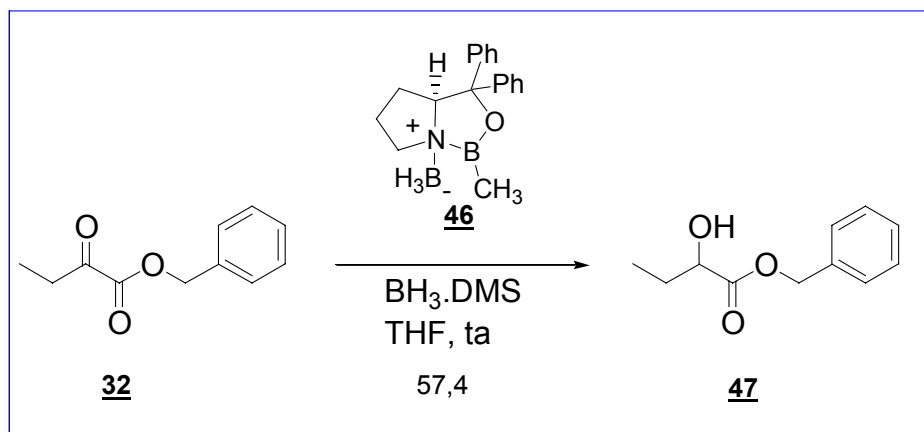
$R_f = 0,48$  (eluente: CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>);

CG quiral  $t_r = 51,958\text{min}$  (*R*),  $t_r = 52,542\text{min}$  (*S*);

IV max. (filme)  $\nu\text{-cm}^{-1}$ : 3464 ( $\nu$  O-H), 1732 ( $\nu$  C=O), 1213, 1101 ( $\nu$  C-O), 701 ( $\nu$  C=C fora do plano);

RMN <sup>1</sup>H (200 MHz/CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 7,24-7,30 (m, 5H, Ar-H); 4,22-4,26 (m, 3H, CH(OH)CO e CH<sub>2</sub>(OCO)CH<sub>3</sub>); 2,56-2,80 (m, 2H, PhCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>); 2,57 (s, OH); 1,98-2,19 (m, 2H,  $J=7,2$  Hz, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CHOH); 1,29 (t, 3H,  $J=7,2$  Hz, COCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>).

**9.1.4.11 Redução assimétrica do 2-oxo-butanoato de benzila (32) com borana utilizando Me-oxazaborolidina como indutor quiral**



Em um balão de fundo redondo de 10mL contendo **46** (16,2mg, 0,05mmol) em 1ml de THF em atmosfera de Argônio foi adicionado 0,16 ml de  $\text{BH}_3 \cdot \text{DMS}$  (2,0 M em tolueno, 0,32mmol). O 2-oxo-butanoato de benzila (**32**) (100,0mg, 0,5mmol) em 1ml de THF foi adicionado através de seringa por um período de 7 minutos à temperatura ambiente. Após agitação por 15 minutos, o meio reacional foi refrigerado com banho de gelo em etanol, adicionou-se 0,4ml de metanol e deixou-se agitar por um período de 1 hora. A mistura reacional foi concentrada a pressão reduzida, o óleo bruto foi filtrado em sílica utilizando como fase móvel  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  fornecendo o 2-hidroxi-butanoato de benzila (**35**) na forma de um óleo incolor (58,0mg) com 57,4% de rendimento e 65% de *ee*.

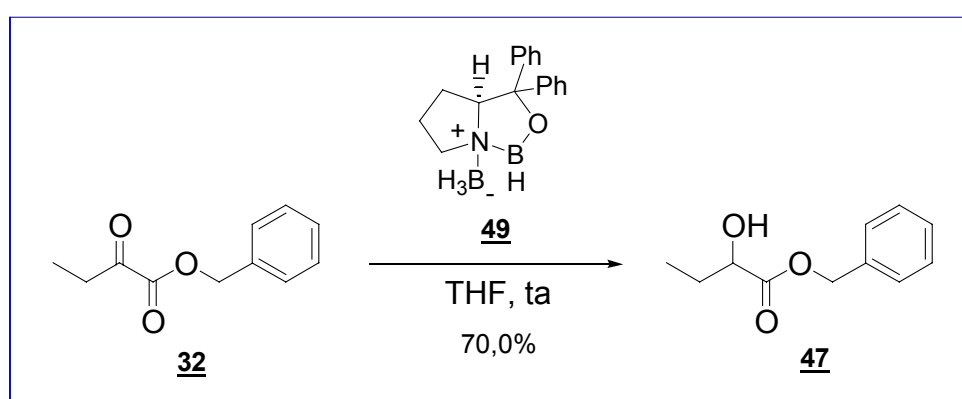
$R_f = 0,26$  (eluente:  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ );

CG quiral  $t_r = 44,166\text{min}$  (61,5%),  $t_r = 44,557\text{min}$  (12,9%);

IV max. (filme)  $\nu\text{-cm}^{-1}$ : 3551 ( $\nu$  O-H); 2968, 2937 ( $\nu$  C-H), 1736 ( $\nu$  C=O), 1456 ( $\nu$  C=C), 1213, 1131 ( $\nu$  C-O), 698 ( $\nu$  C=C fora do plano);

RMN  $^1\text{H}$  (200 MHz/ $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 7,3 (m, 5H, Ar-H); 5,15 (s, 2H,  $\text{PhCH}_2\text{OCO}$ ); 4,11-4,16 (m, 1H,  $J=4,5$  Hz,  $\text{HOCHCO}$ ); 2,3 (s, OH); 1,67-1,63 (m, 2H,  $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{COH}$ ); 0,88 (t, 3H,  $J=7,4$  Hz,  $\text{CH}_3\text{CH}$ ).

#### 9.1.4.12 Redução assimétrica do 2-oxo-butanoato de benzila (**32**) com borana utilizando oxazaborolidina como indutor quiral



2-oxo-butanoato de benzila (**32**) (200mg, 1,03mmol) em 0,56ml de THF foi adicionado através de seringa sobre a solução **49** (26,35mg, 0,104mmol) em THF (0,62mL), preparada anteriormente, por um período de 30 minutos à temperatura ambiente. Após agitação por 5 minutos à temperatura ambiente, o meio reacional foi refrigerado com banho de gelo em etanol, adicionou-se 1,25ml de metanol e deixou-se agitar por um período de 1 hora. A mistura reacional foi concentrada a pressão reduzida, o óleo bruto foi filtrado em sílica utilizando como fase móvel  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  fornecendo o 2-hidroxi-butanoato de benzila (**35**) na forma de um óleo incolor (141,4mg) com 70,0% de rendimento e 21% de *ee*.

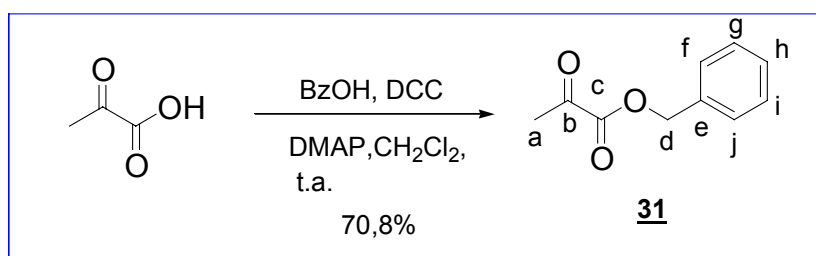
$R_f = 0,28$  (eluente:  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ );

CG quiral  $t_r = 42,255\text{min}$  (45,29%),  $t_r = 42,679\text{min}$  (29,32%);

IV max. (filme)  $\nu$ -cm<sup>-1</sup>: 3451 ( $\nu$  O-H); 2968, 2937 ( $\nu$  C-H), 1736 ( $\nu$  C=O), 1456 ( $\nu$  C=C), 1213, 1131 ( $\nu$  C-O), 698 ( $\nu$  C=C fora do plano);

RMN <sup>1</sup>H (200 MHz/CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 7,3 (m, 5H, Ar-H); 5,15 (s, 2H, PhCH<sub>2</sub>OCO); 4,11-4,16 (m, 1H,  $J$ = 4,5 Hz, HOCHCO); 2,3 (s, OH); 1,67-1,63 (m, 2H, CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>COH); 0,88 (t, 3H,  $J$ = 7,4 Hz, CH<sub>3</sub>CH).

#### 9.1.4.13 Preparação do 2-oxo-propanoato de benzila (**31**)



Em um balão de 500mg contendo ácido pirúvico (2,0g, 22,1mmol), álcool benzílico (2,14g, 19,86mmol), DMAP (0,53g, 1,106mmol) em diclorometano (80mL) refrigerado com banho de gelo, foi adicionado DCC (4,49g, 23,92mmol) dissolvida em diclorometano (70mL) por um período de 30 minutos através de um funil de adição com equalizador de pressão. A mistura reacional foi deixada sobre agitação à temperatura ambiente por um período de 20 horas. A mistura reacional foi filtrada e concentrada em evaporador rotatório fornecendo **31** como um óleo amarelado (3,59g, 89,0%) que foi purificado por filtração em sílica (“flash chromatography”) (40,0g, 70-230 MESH, coluna: 20cm (h)  $\times$  2,5cm ( $\varnothing$ ), frações: 8,0ml, fase móvel CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) fornecendo um líquido oleoso levemente amarelado (2,86g, 70,8%).

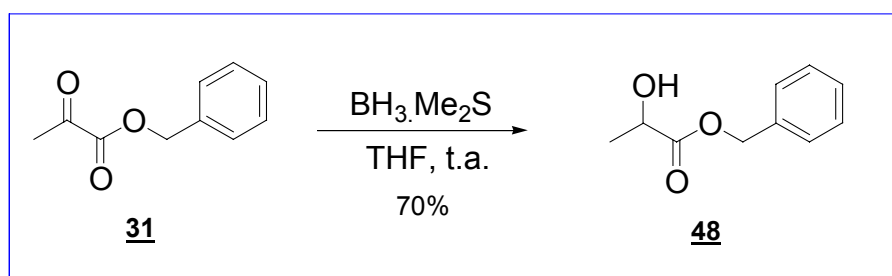
$R_f$  = 0,67 (eluente: CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>;

IV max. (filme)  $\nu$ -cm<sup>-1</sup>: 1732 ( $\nu$  C=O), 1456 ( $\nu$  C=C), 1135 ( $\nu$  C-O), 698 ( $\nu$  C=C fora do plano);

RMN  $^1\text{H}$  (200 MHz/ $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 7,27-7,43 (m, 5H, Ar-H); 5,24-5,28 (s, 2H,  $\text{PhCH}_2\text{OCO}$ ); 2,47-2,48 (s, 3H,  $\text{CH}_3\text{CO}$ );

RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 50 MHz)  $\delta$ : 27,84( $\text{C}_a$ ); 69,10( $\text{C}_d$ ); 128,58, 129,46, 129,75, 129,81, 129,91( $\text{C}_{f,j}$ ); 135,55( $\text{C}_e$ ); 161,64( $\text{C}_c$ ); 192,63( $\text{C}_b$ ).

#### 9.1.4.14 Obtenção do 2-hidroxi-propanoato de benzila racêmico (**48**)



Em um balão de fundo redondo de 25mL contendo 2-oxo-propanoato de benzila (**31**) (300,0mg, 1,69mmol) em 9,74ml de THF, refrigerado com banho de gelo em etanol, adicionou-se  $\text{BH}_3 \cdot \text{DMS}$  (2,0 M em tolueno, 1,0mL, 1,0mmol) lentamente, utilizando seringa, por um período de 7 minutos. A mistura reacional foi deixada agitar à temperatura ambiente por um período de 4 horas, adicionou-se 0,69mL de metanol e a agitação foi mantida por mais 30 minutos. A mistura reacional foi concentrada a pressão reduzida, o óleo bruto foi purificado por filtração em sílica (12,0g, 230-400 MESH, coluna: 6cm (h)  $\times$  2,5cm ( $\varnothing$ ), frações: 8,0ml, fase móvel  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ) fornecendo o 2-hidroxi-propanoato de benzila (**48**) na forma de um óleo incolor (203,0mg, 70,0%).

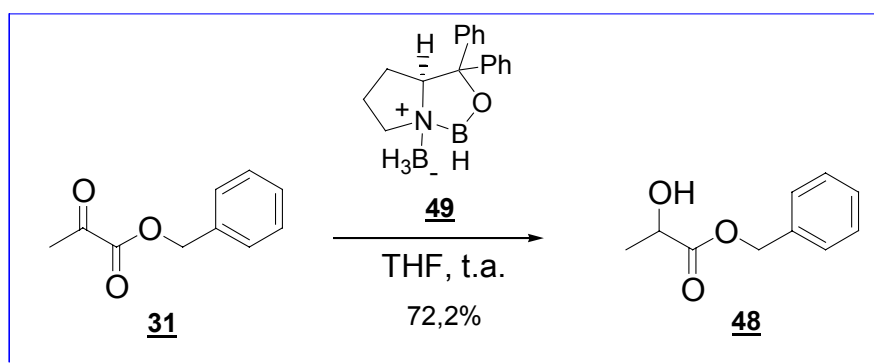
$R_f = 0,39$  (eluente:  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ );



IV max. (filme)  $\nu\text{-cm}^{-1}$ : 3346 ( $\nu$  O-H), 1454 ( $\nu$  C=C), 1012 ( $\nu$  C-O), 698 ( $\nu$  C=C fora do plano);

RMN  $^1\text{H}$  (200 MHz/ $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 7,26-7,37 (m, 5H, Ar-H); 5,21 (s, 2H,  $\text{PhCH}_2\text{OCO}$ ); 4,68 (s, OH); 4,32 (q, 1H,  $J=6,9$  Hz,  $\text{CH}_3\text{CHOH}$ ); 1,44 (d, 3H,  $J=6,9$  Hz,  $\text{CH}_3\text{CHOH}$ ).

#### 9.1.4.15 Redução assimétrica do 2-oxo-propanoato de benzila (**31**) com borana utilizando oxazaborolidina como indutor quiral



Piruvato de benzila (**31**) (200mg, 2,25mmol) em 1,12ml de THF foi adicionado através de seringa sobre a solução de **49** (26,35mg, 0,104mmol) em THF (0,62mL), preparada anteriormente, por um período de 23 minutos à temperatura ambiente. Após agitação por 5 minutos à temperatura ambiente, o meio reacional foi refrigerado com banho de gelo em etanol, adicionou-se 2,25ml de metanol e deixou-se agitar por um período de 1 hora. A mistura reacional foi concentrada a pressão reduzida, o óleo bruto foi filtrado em sílica (12,0g, 230–400 MESH, coluna: 6cm (h)  $\times$  2,5cm ( $\varnothing$ ), frações: 9,0ml, fase móvel  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ) fornecendo o 2-hidroxi-propanoato de benzila (**48**) na forma de um óleo incolor (146,6mg) com 72,2% e 17% de *ee*.

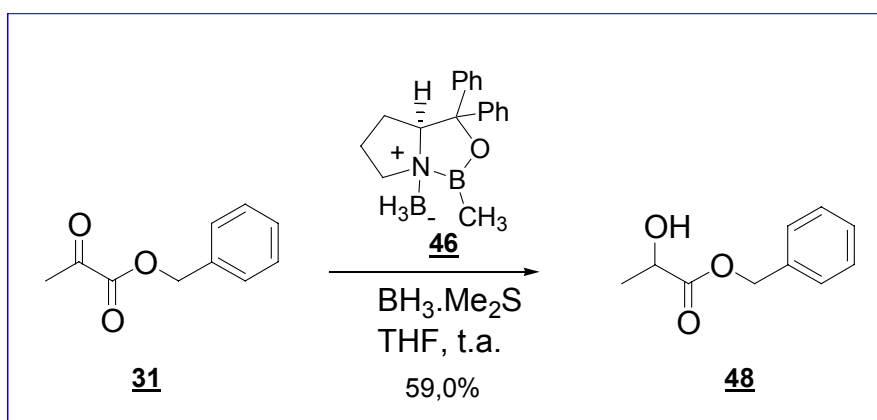
$R_f = 0,39$  (eluente:  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ );

CG quiral  $t_r$ = 34,094min (58,34%), 34,464min (41,66%);

IV max. (filme)  $\nu$ - $\text{cm}^{-1}$ : 3346 ( $\nu$  O-H), 1454 ( $\nu$  C=C), 1012 ( $\nu$  C-O), 698 ( $\nu$  C=C fora do plano);

RMN  $^1\text{H}$  (200 MHz/ $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 7,26-7,37 (m, 5H, Ar-H); 5,21 (s, 2H,  $\text{PhCH}_2\text{OCO}$ ); 4,68 (s, OH); 4,32 (q, 1H,  $J=6,9$  Hz,  $\text{CH}_3\text{CHOH}$ ); 1,44 (d, 3H,  $J=6,9$  Hz,  $\text{CH}_3\text{CHOH}$ ).

#### 9.1.4.16 Redução assimétrica do 2-oxo-propanoato de benzila (**31**) com borana utilizando como indutor quiral Me-oxazaborolidina



Em um balão de fundo redondo de 10mL contendo **46** (15,0mg, 0,05mmol,) em 1ml de THF em atmosfera de argônio foi adicionado 0,16 ml de  $\text{BH}_3 \cdot \text{DMS}$  (2,0 M em tolueno, 0,32mmol). O piruvato de benzila (**31**) (100mg, 0,56mmol) em 1ml de THF foi adicionado através de seringa por um período de 4 minutos à temperatura ambiente. Após agitação por 15 minutos, o meio reacional foi refrigerado com banho de gelo em etanol, adicionou-se 0,4ml de metanol e deixou-se agitar por um período de 1 hora. A mistura reacional foi concentrada a pressão reduzida, o óleo bruto foi filtrado em sílica utilizando como fase móvel  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , fornecendo o 2-hidroxi-propanoato de benzila (**48**) na forma de um óleo incolor (59,7mg) com 59,0% e 17% de *ee*.

$R_f = 0,39$  (eluente:  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ );

CG quiral  $t_r = 36,408\text{min}$  (58,84%),  $36,772\text{min}$  (41,15%);

IV max. (filme)  $\nu\text{-cm}^{-1}$ : 3346 ( $\nu$  O-H), 1454 ( $\nu$  C=C), 1012 ( $\nu$  C-O), 698 ( $\nu$  C=C fora do plano);

RMN  $^1\text{H}$  (200 MHz/ $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 7,26-7,37 (m, 5H, Ar-H); 5,21 (s, 2H,  $\text{PhCH}_2\text{OCO}$ ); 4,68 (s, OH); 4,32 (q, 1H,  $J = 6,9$  Hz,  $\text{CH}_3\text{CHOH}$ ); 1,44 (d, 3H,  $J = 6,9$  Hz,  $\text{CH}_3\text{CHOH}$ ).

### 9.1.5 Referências Bibliográficas

COREY, E.J., BAKSHI, R.K., SHIBATA, S. (1987a), "Highly enantioselective borane reduction of ketones catalyzed by chiral oxazaborolidines. Mechanism and synthetic implication". *J. Am. Chem. Soc.*, Vol. 109, 5551-5553.

COREY, E.J., BAKSHI, R.K., SHIBATA, S., CHEN, C.P., SINGH V.K. (1987b), "A stable and easily prepared catalyst for the enantioselective reduction of ketones. Applications to multistep synthesis". *J. Am. Chem. Soc.*, Vol. 109, 7925-7926.

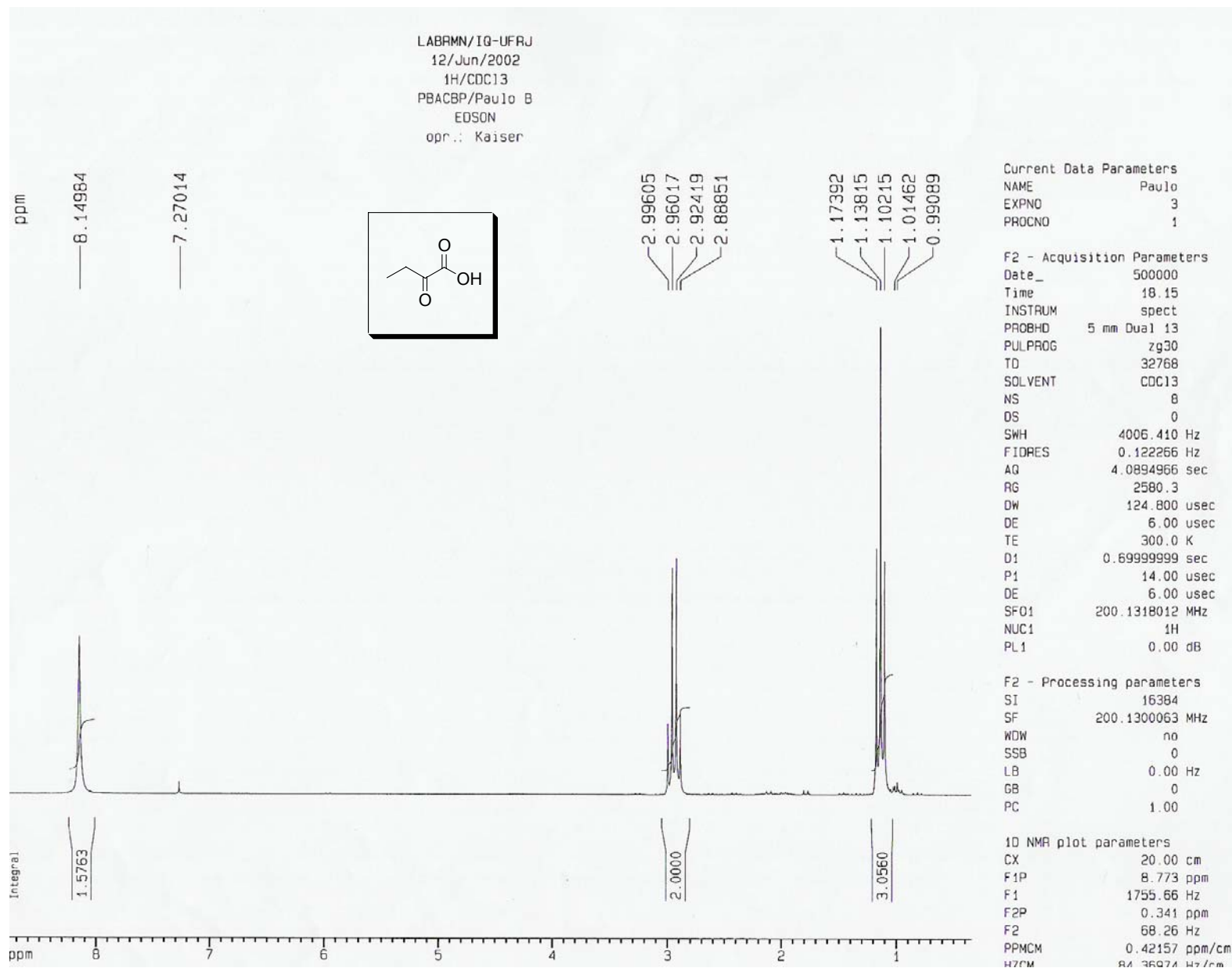
COREY, E.J., SHIBATA, S., BAKSHI, R.K. (1988), "An efficient and catalytically enantioselective route to (S)-(-)-phenyloxirane. *J. Org. Chem.*, Vol. 53, 2861-2863.

COREY, E.J., (1990), "The enantioselective routes to biologically interesting compounds". *Pure Appl. Chem.*, Vol. 62, 1209-1261.

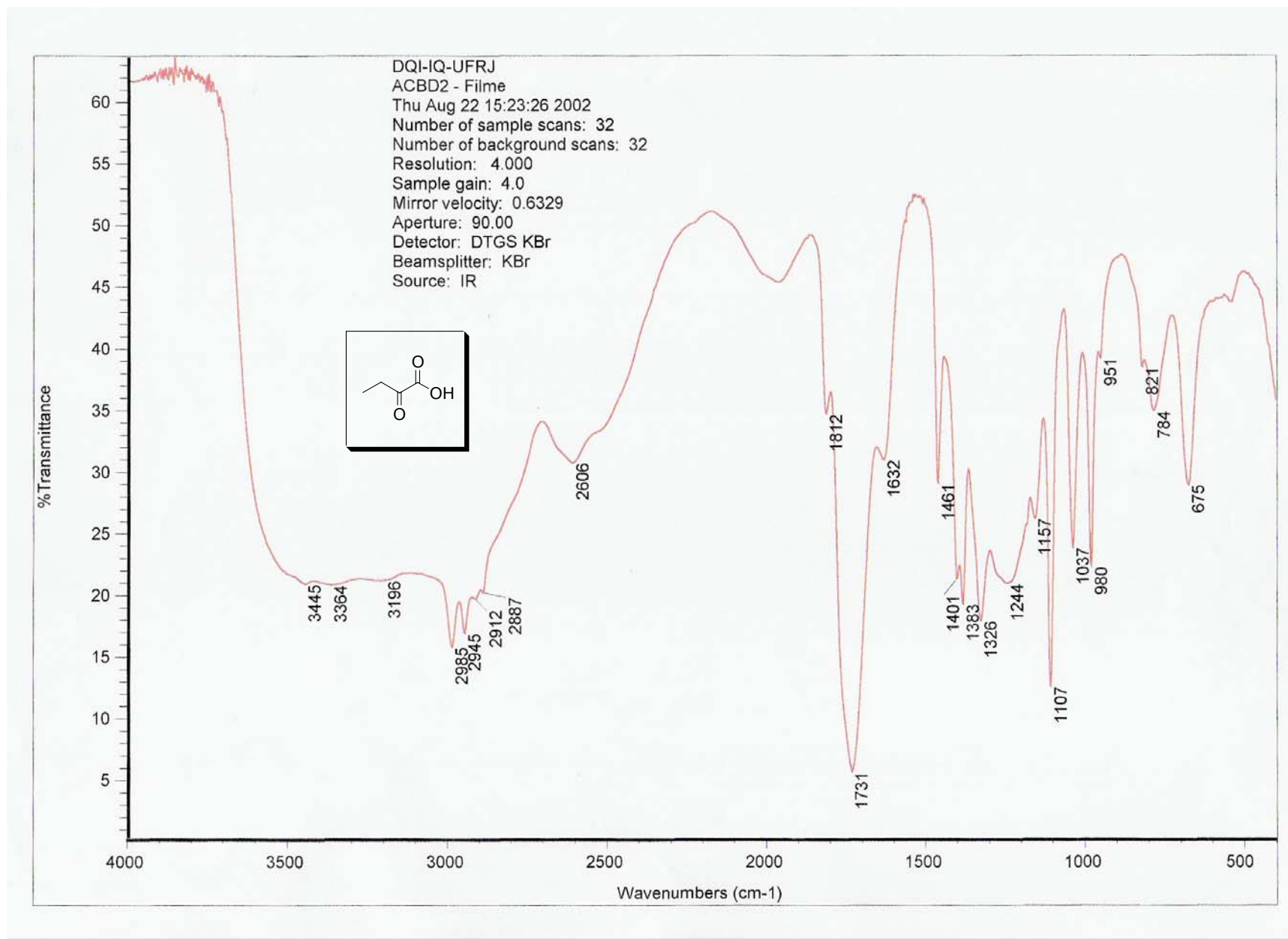
COREY, E.J., HELAL C. (1998), "Reduction of carbonyl compounds with a chiral oxazaborolidine catalyst: A new paradigm for enantioselective catalysis and a powerful new synthetic method". *Angew. Chem. Int. Ed.*, 1986-2016.

XAVIER, L.C., MOHAN, J.J., MATRHE, D.J., THOMPSON, A.S., CARROL, J.D.,  
DESMOND, R. (1996), “(S)-Tetrahydro-1-methyl-3,3-diphenyl-1-H,3H-pyrrolo-  
[1,2,c][1,3,2]oxazaborole-borane complex”, *Organic Synthesis*, I. Shinkai Ed., Vol 74, 50-71.

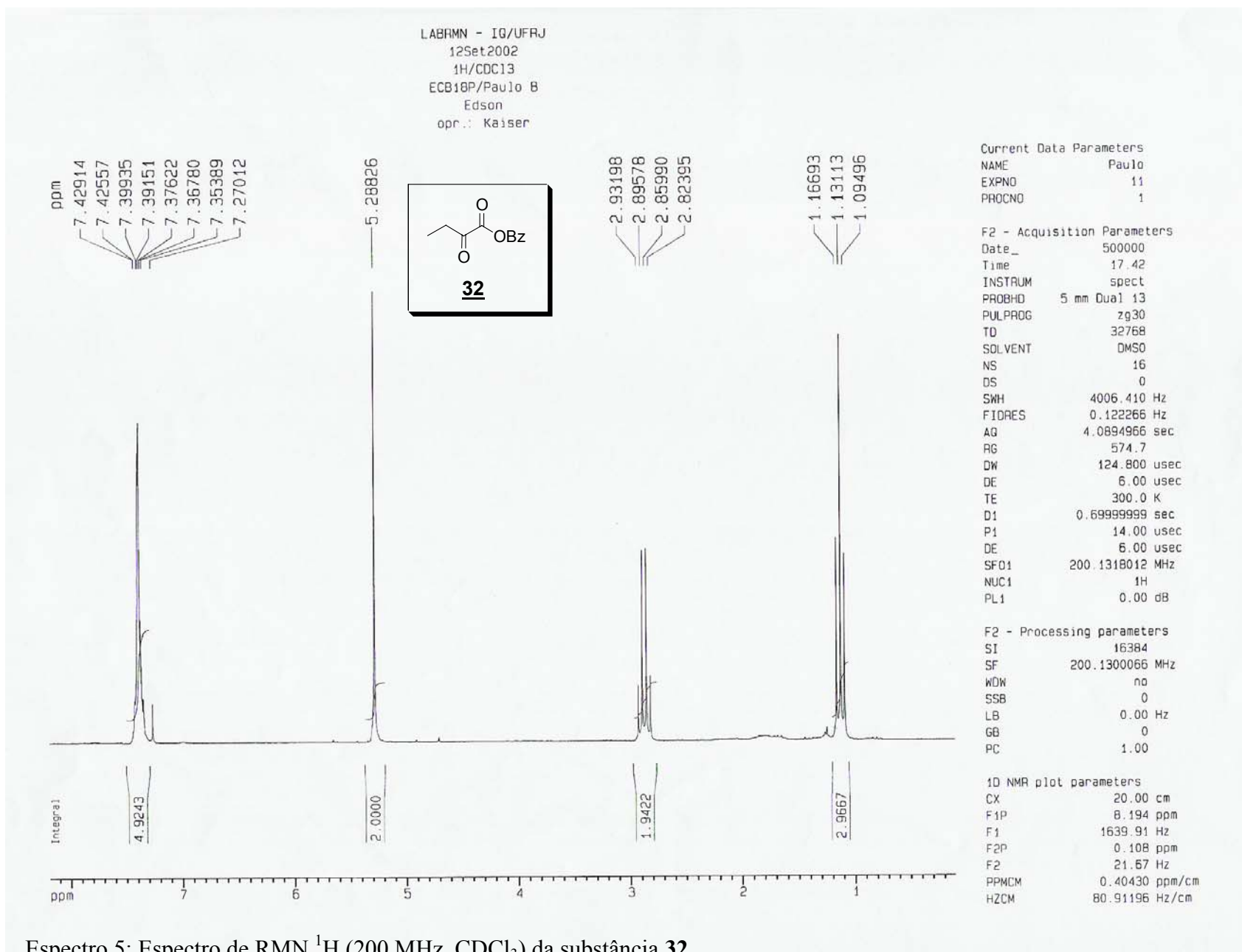
## 9.1.6 Espectros



Espectro 3: Espectro de RMN <sup>1</sup>H (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>) do ácido 2-oxo-butanóico

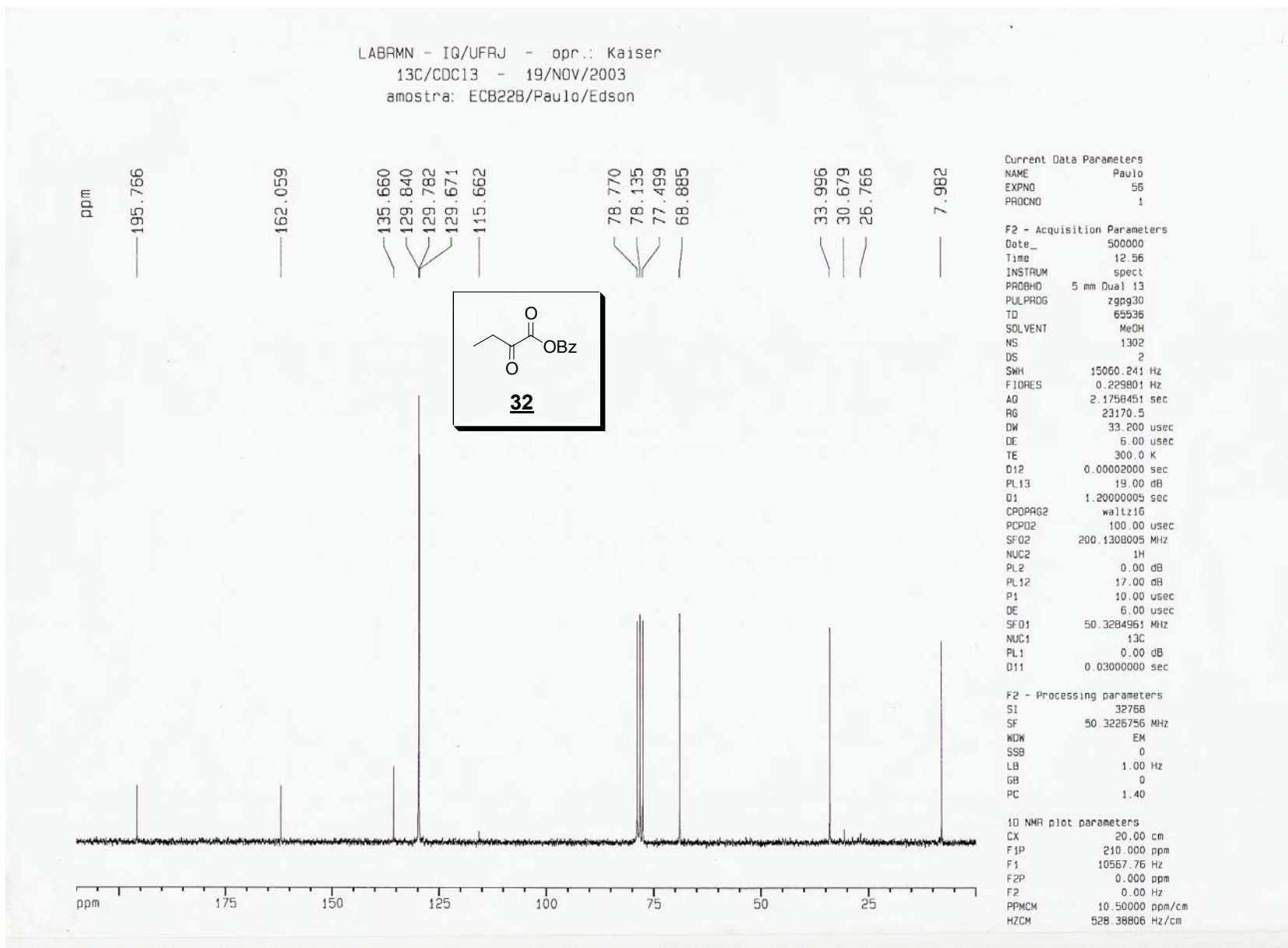


Espectro 4: IV (Filme) do ácido 2-oxo-butanóico

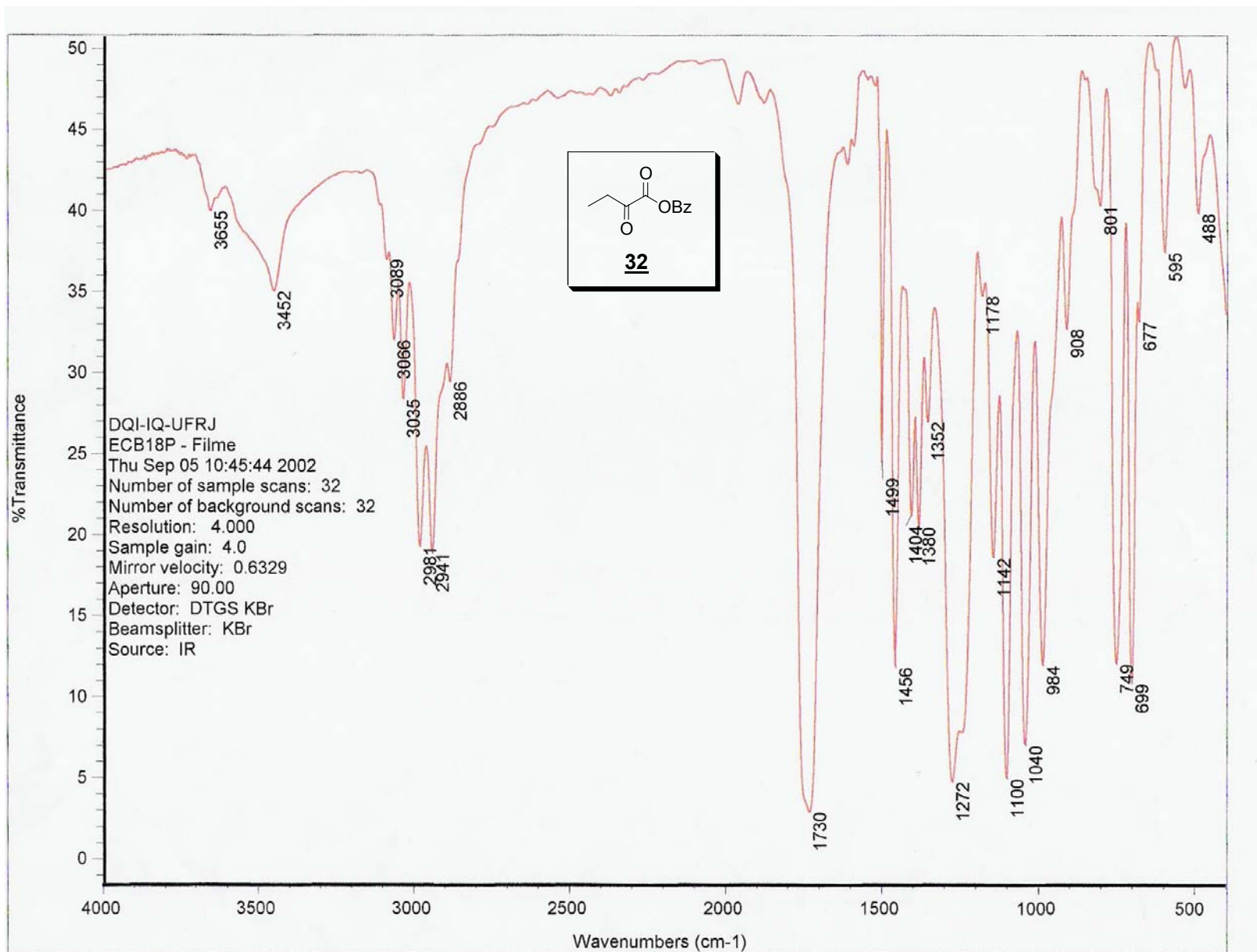


Espectro 5: Espectro de RMN  $^1\text{H}$  (200 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) da substância **32**

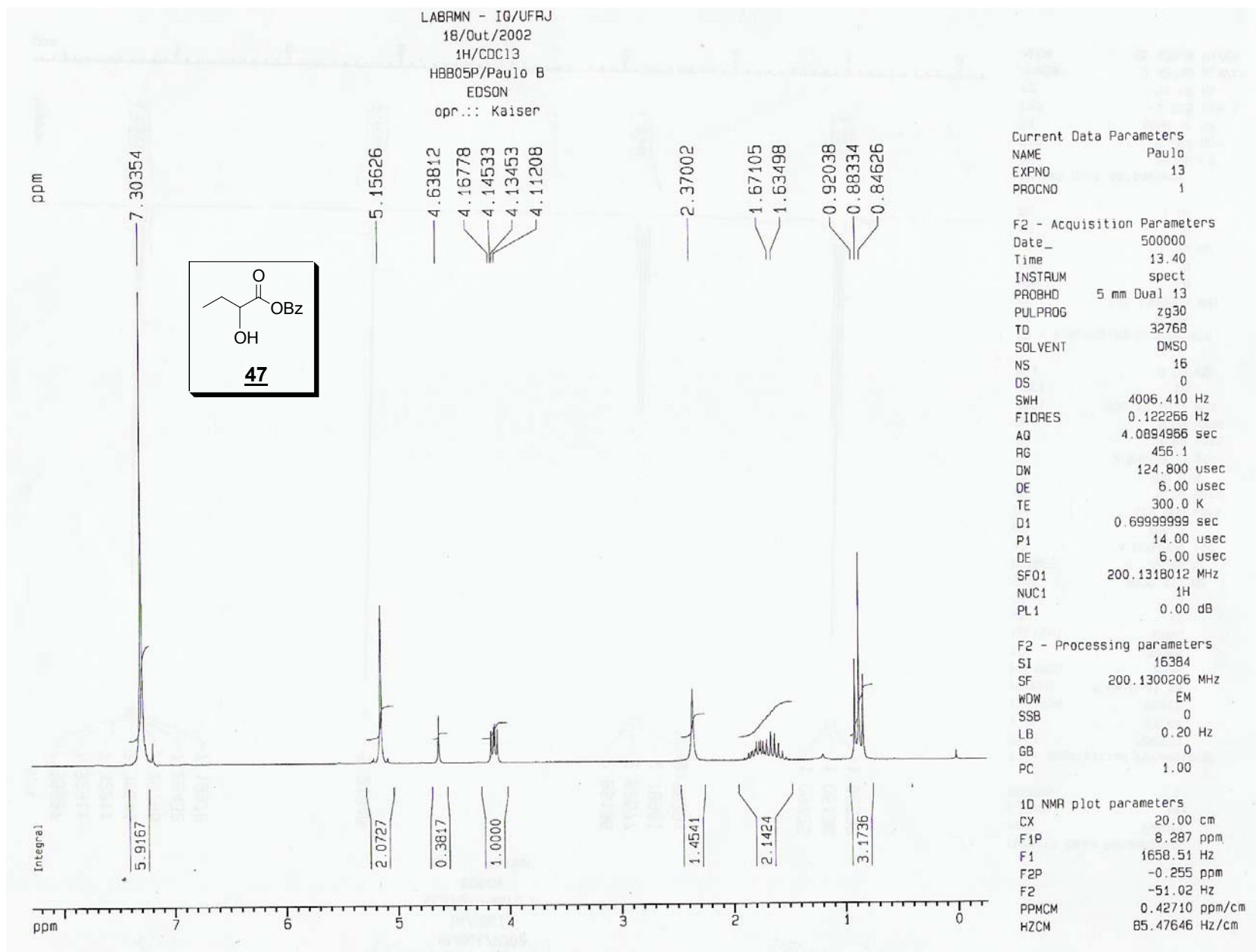




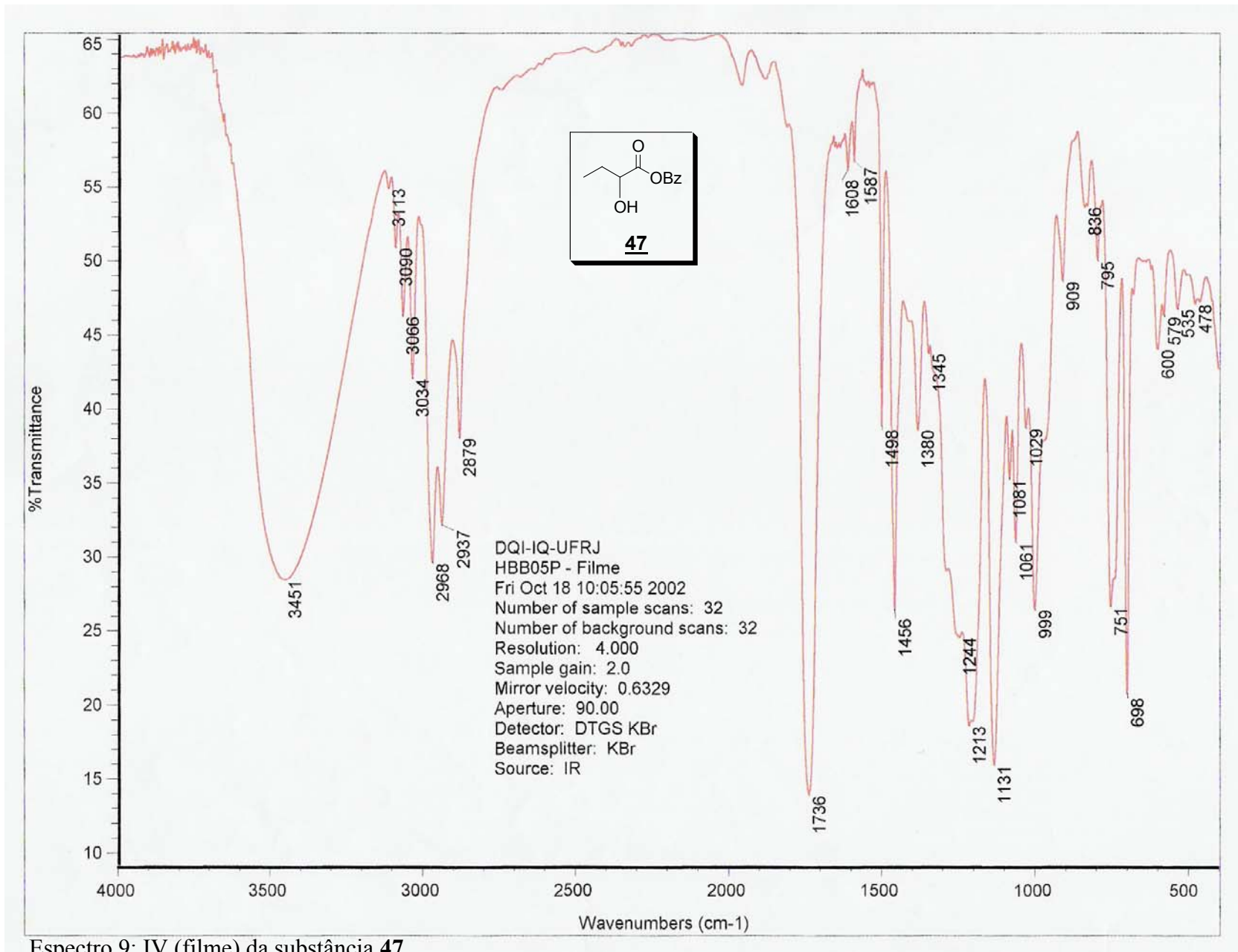
Espectro 6: Espectro de RMN <sup>13</sup>C (50 MHz, CDCl<sub>3</sub>) da substância **32**



Espectro 7: IV (filme) da substância **32**

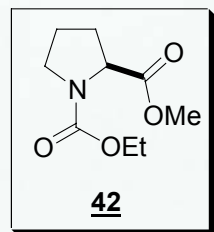


Espectro 8: Espectro de RMN  $^1\text{H}$  (200 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) da substância **47**



Espectro 9: IV (filme) da substância 47

LABRMN/IQ-UFRJ opr.: Kaiser  
 1H/CDC13 - 18/SET/2003  
 amostra: CEP01/PauloB/Edson



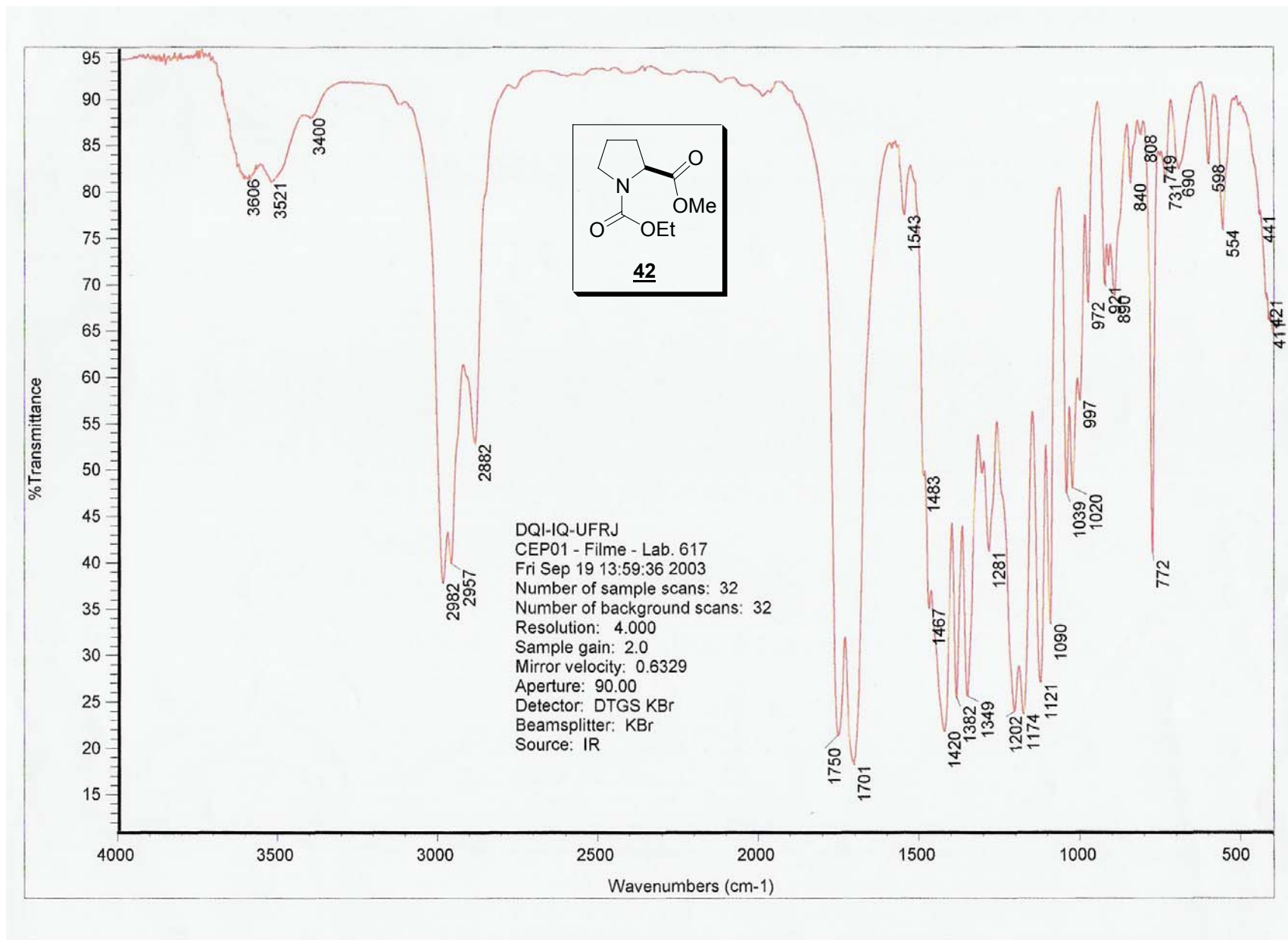
Current Data Parameters  
 NAME Paulo  
 EXPNO 39  
 PROCNO 1

F2 - Acquisition Parameters  
 Date\_ 500000  
 Time 17.08  
 INSTRUM spect  
 PROBHD 5 mm Dual 13  
 PULPROG zg30  
 TD 32768  
 SOLVENT CDC13  
 NS 8  
 DS 0  
 SWH 5592.841 Hz  
 FIDRES 0.170680 Hz  
 AQ 2.9295092 sec  
 RG 574.7  
 DW 89.400 usec  
 DE 6.00 usec  
 TE 300.0 K  
 D1 0.69999999 sec  
 P1 14.00 usec  
 DE 6.00 usec  
 SFO1 200.1320013 MHz  
 NUC1 1H  
 PL1 0.00 dB

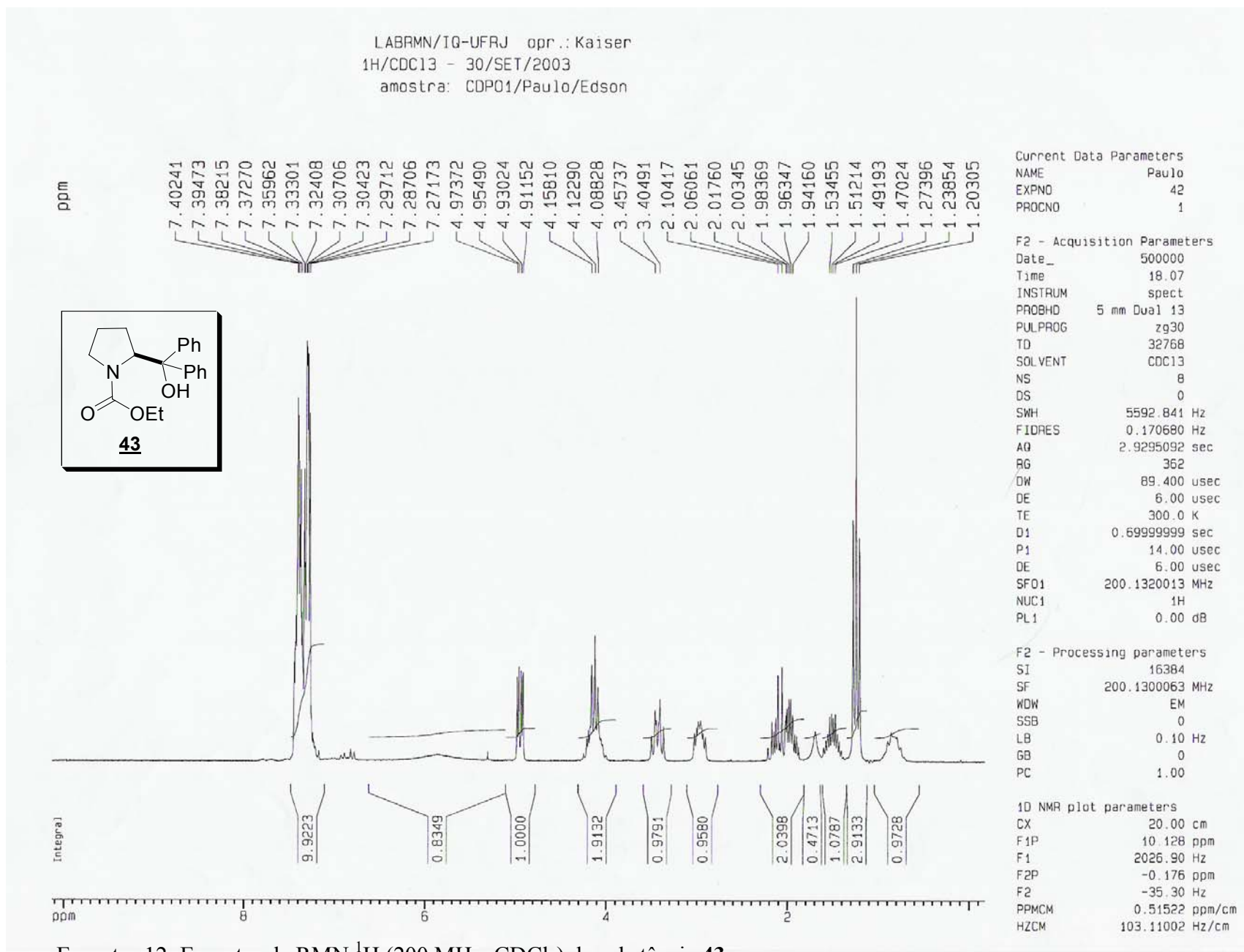
F2 - Processing parameters  
 SI 16384  
 SF 200.1300063 MHz  
 WDW EM  
 SSB 0  
 LB 0.10 Hz  
 GB 0  
 PC 1.00

1D NMR plot parameters  
 CX 20.00 cm  
 F1P 8.351 ppm  
 F1 1671.32 Hz  
 F2P -0.188 ppm  
 F2 -37.61 Hz  
 PPMCM 0.42695 ppm/cm  
 HZCM 85.44618 Hz/cm

Espectro 10: Espectro de RMN <sup>1</sup>H (200 MHz, CDC<sub>13</sub>) da substância **42**.

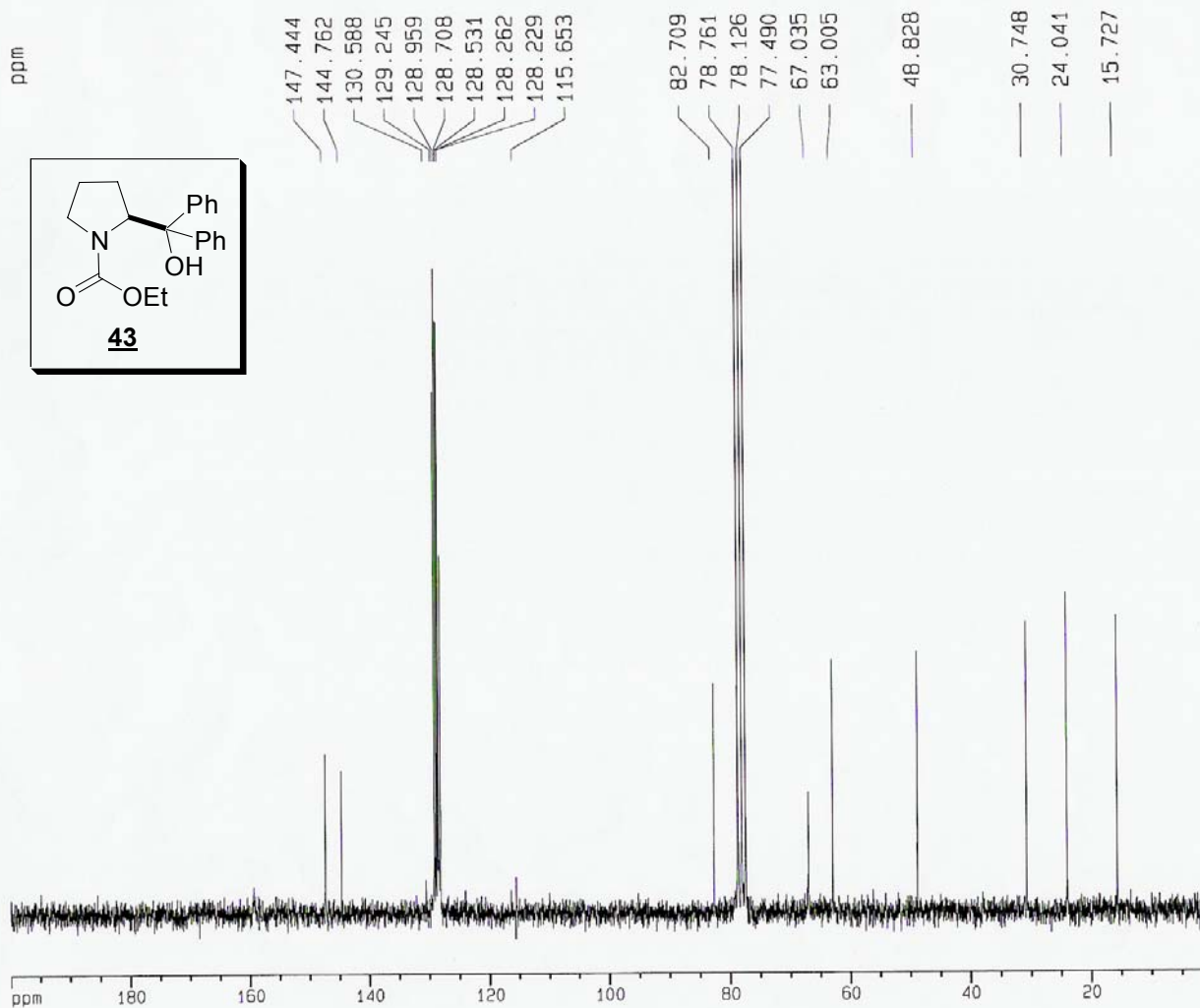


Espectro 11: IV (filme) da substância **42**.



Espectro 12: Espectro de RMN <sup>1</sup>H (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>) da substância **43**.

LABRMN/IQ-UFRJ opr.: Kaiser  
 13C/CDC13 - 08/OUT/2003  
 amostra: CDP01/Paulo/Edson



Current Data Parameters  
 NAME Paulo  
 EXPNO 44  
 PROCNO 1

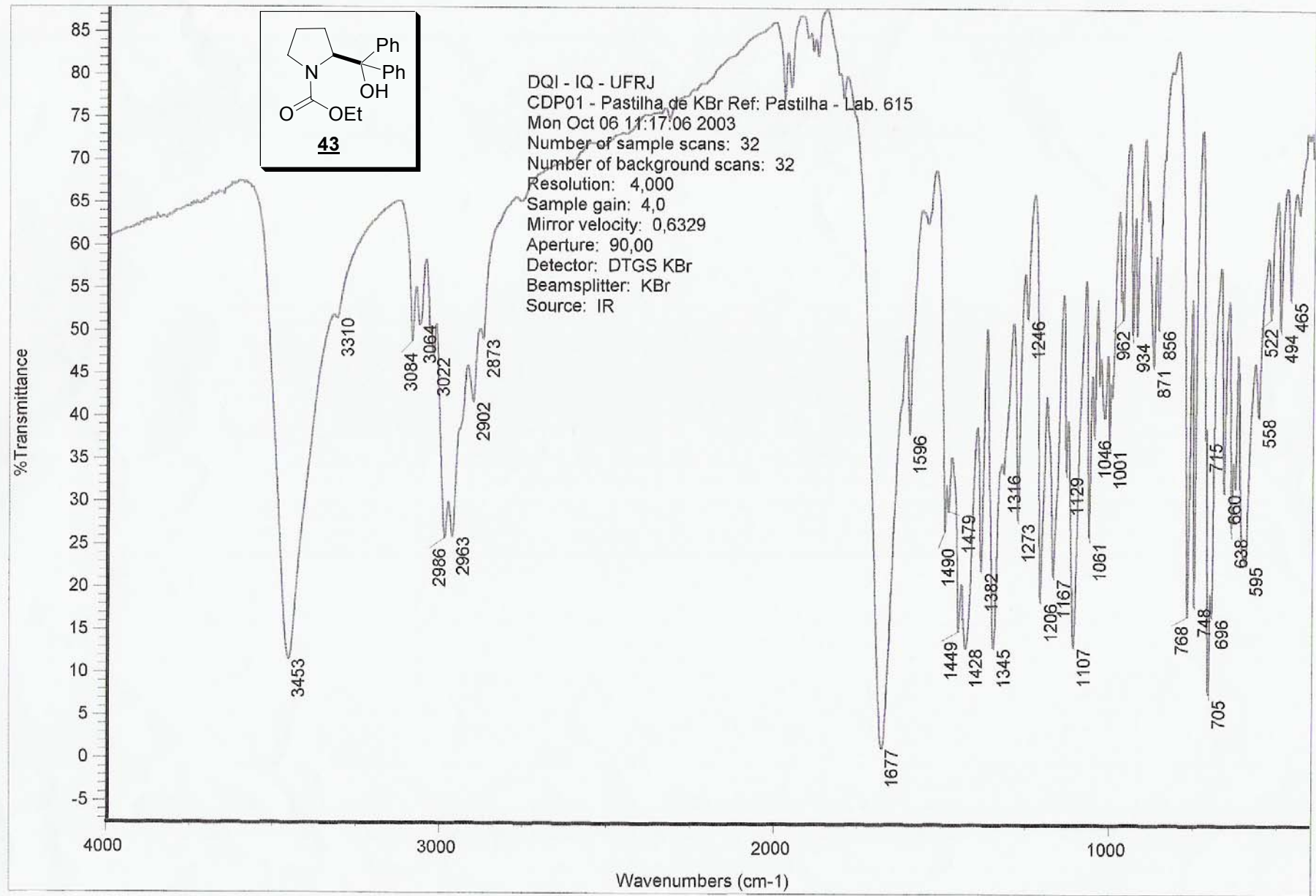
F2 - Acquisition Parameters  
 Date\_ 500000  
 Time 13.55  
 INSTRUM spect  
 PROBHID 5 mm Dual 13  
 PULPROG zgpg30  
 TD 65536  
 SOLVENT MeOH  
 NS 512  
 DS 2  
 SWH 15060.241 Hz  
 FIDRES 0.229801 Hz  
 AQ 2.1758451 sec  
 RG 23170.5  
 DW 33.200 usec  
 DE 6.00 usec  
 TE 300.0 K  
 D12 0.00002000 sec  
 PL13 19.00 dB  
 D1 1.20000005 sec  
 CPDPRG2 waltz16  
 PCPD2 100.00 usec  
 SF02 200.1308005 MHz  
 NUC2 1H  
 PL2 0.00 dB  
 PL12 17.00 dB  
 P1 10.00 usec  
 DE 6.00 usec  
 SF01 50.3284961 MHz  
 NUC1 13C  
 PL1 0.00 dB  
 D11 0.03000000 sec

F2 - Processing parameters  
 SI 32768  
 SF 50.3226756 MHz  
 NDM EM  
 SSB 0  
 LB 1.00 Hz  
 GB 0  
 PC 1.40

1D NMR plot parameters  
 CX 20.00 cm  
 F1P 200.000 ppm  
 F1 10064.54 Hz  
 F2P 0.000 ppm  
 F2 0.00 Hz  
 PPMCM 10.00000 ppm/cm  
 HZCM 503.22675 Hz/cm

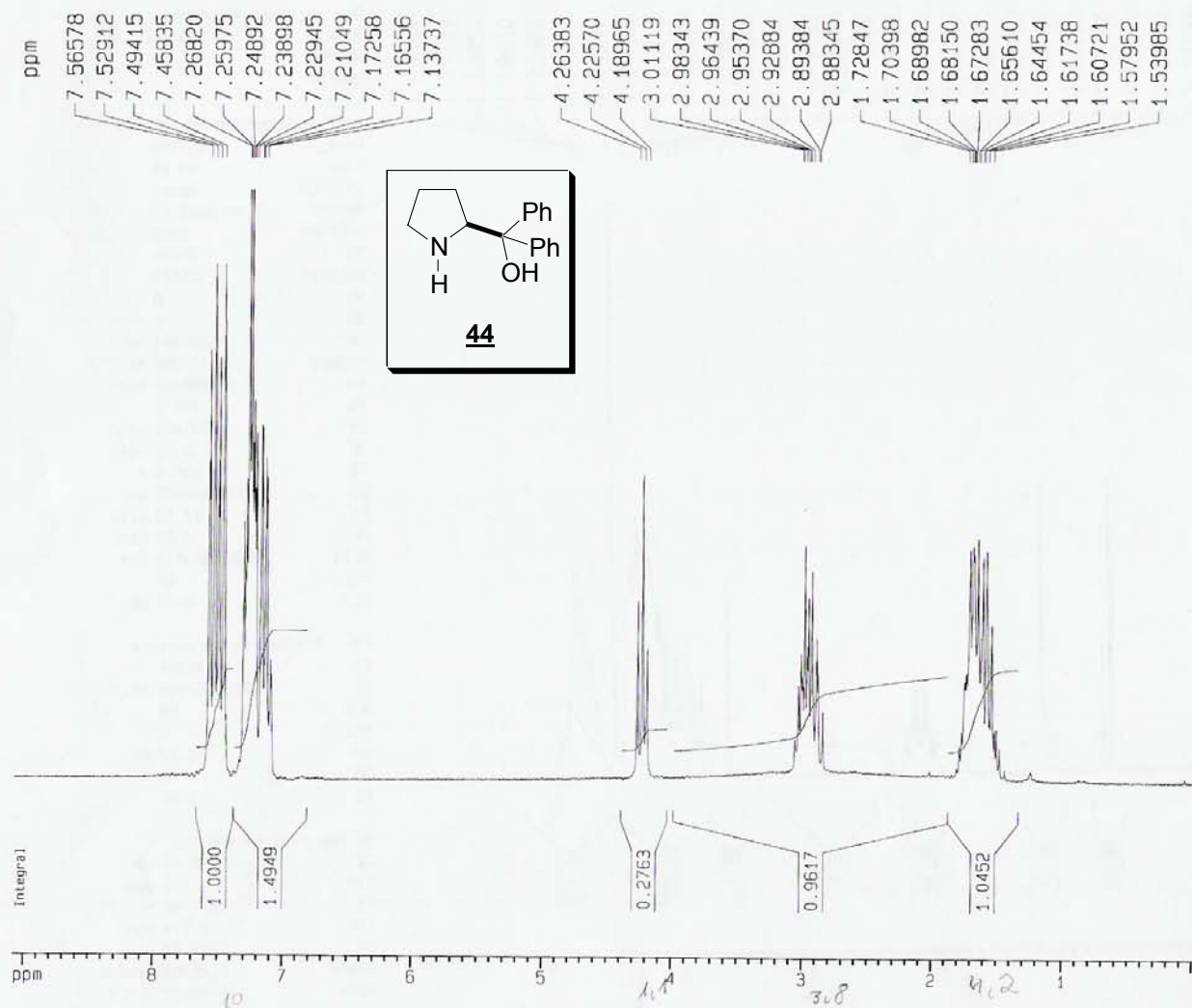
Espectro 13: Espectro de RMN <sup>13</sup>C (50 MHz, CDCl<sub>3</sub>) da substância **43**.





Espectro 14: IV (filme) da substância **43**.

LABRMN/IG-UFRJ op.: Kaiser  
 1H/CDC13 14/OUT/2003  
 amostra: DFP01/Paulo/Edson



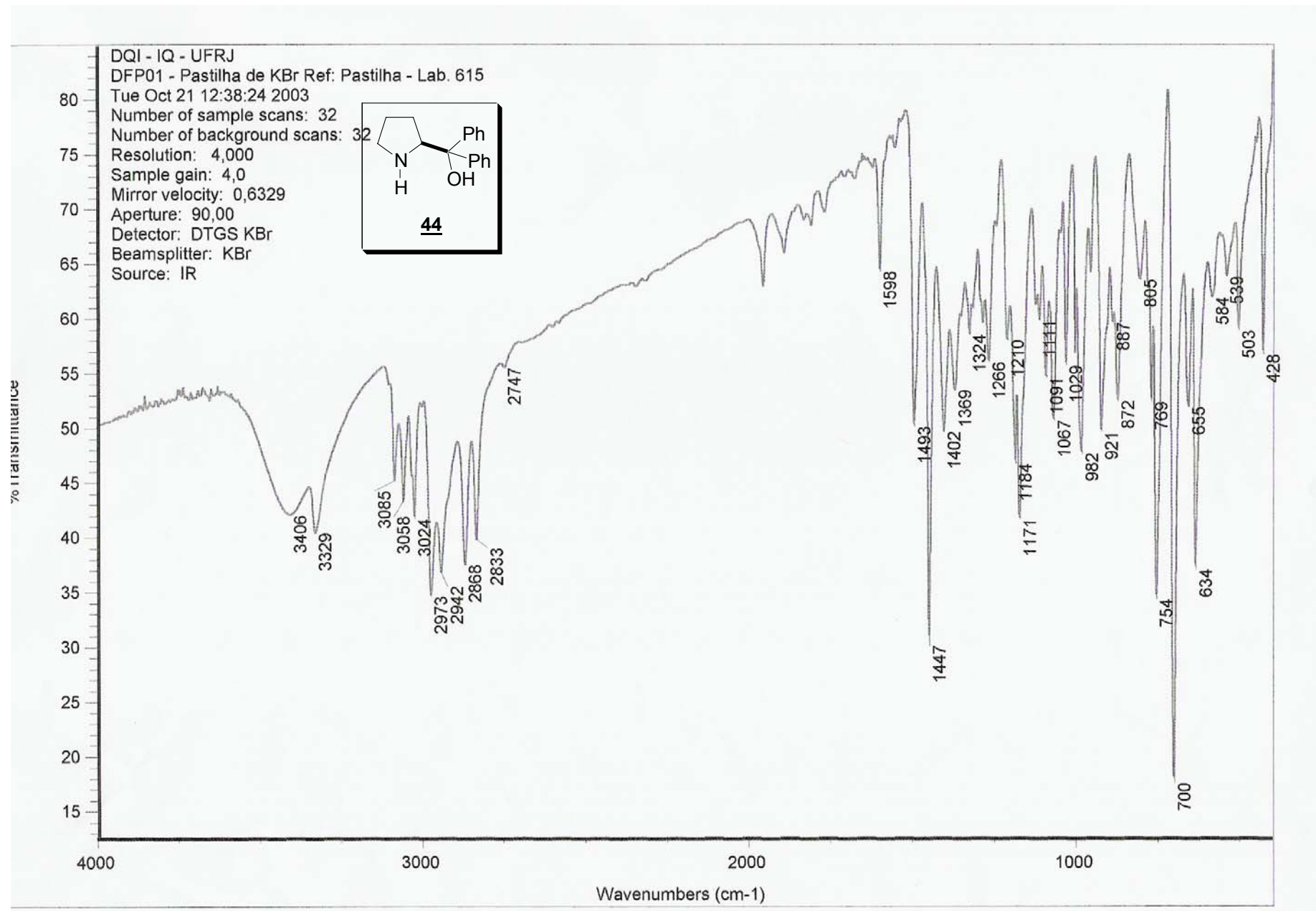
Current Data Parameters  
 NAME Paulo  
 EXPNO 48  
 PROCNO 1

F2 - Acquisition Parameters  
 Date\_ 500000  
 Time 18.29  
 INSTRUM spect  
 PROBHD 5 mm Dual 13  
 PULPROG zg30  
 TD 32768  
 SOLVENT CDC13  
 NS 8  
 DS 0  
 SWH 5592.841 Hz  
 FIDRES 0.170680 Hz  
 AQ 2.9295092 sec  
 RG 181  
 DW 89.400 usec  
 DE 6.00 usec  
 TE 300.0 K  
 D1 0.69999999 sec  
 P1 14.00 usec  
 DE 6.00 usec  
 SFO1 200.1320013 MHz  
 NUC1 1H  
 PL1 0.00 dB

F2 - Processing parameters  
 SI 16384  
 SF 200.1300160 MHz  
 WDW EM  
 SSB 0  
 LB 0.10 Hz  
 GB 0  
 PC 1.00

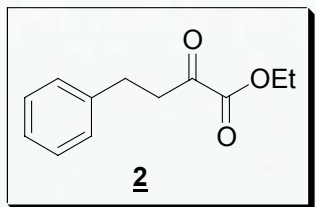
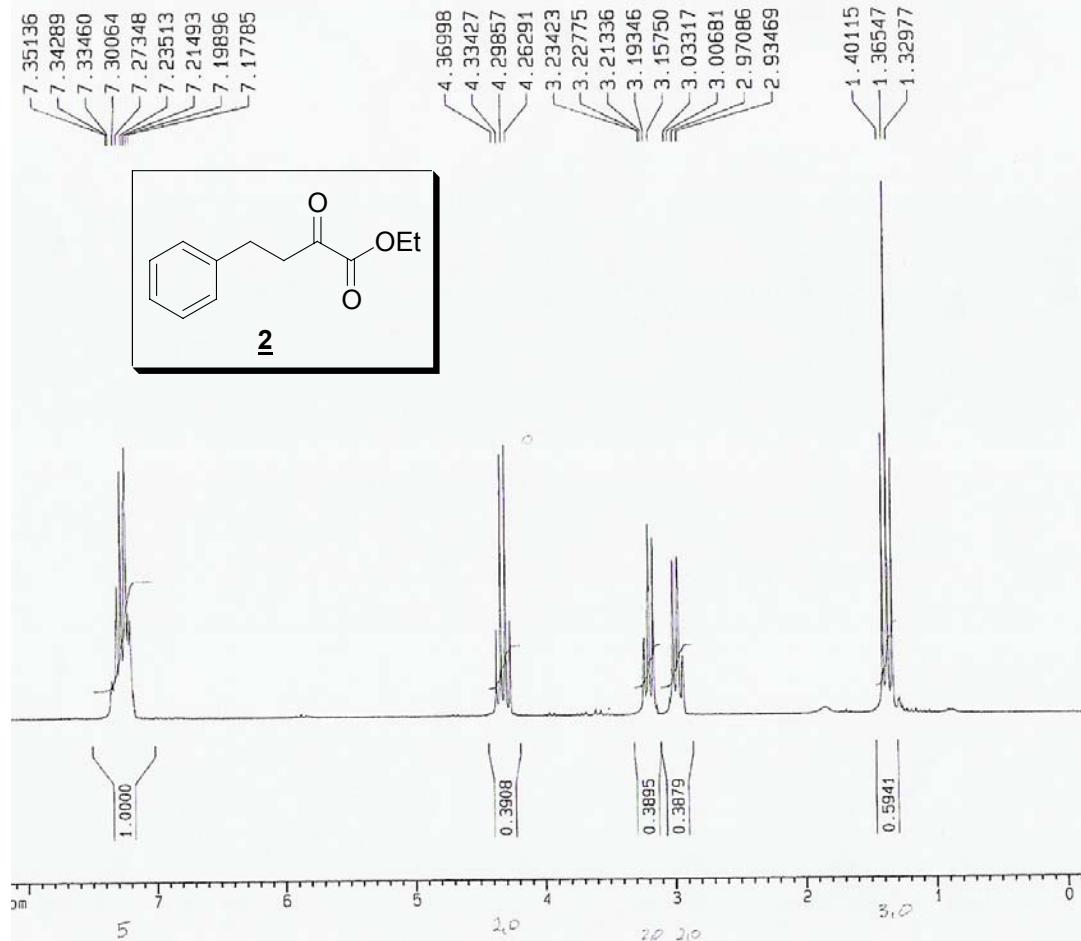
1D NMR plot parameters  
 CX 20.00 cm  
 F1P 9.079 ppm  
 F1 1817.05 Hz  
 F2P -0.074 ppm  
 F2 -14.87 Hz  
 PPMCM 0.45768 ppm/cm  
 HZCM 91.59572 Hz/cm

Espectro 15: Espectro de RMN  $^1\text{H}$  (200 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) da substância **44**.



Espectro 16: IV (pastilha de KBr) da substância **44**.

LABRMN/IG-UFRJ op.: Kaiser  
 1H/CDC13 14/NOV/2003  
 amostra: FCBA/Paulo/Edson



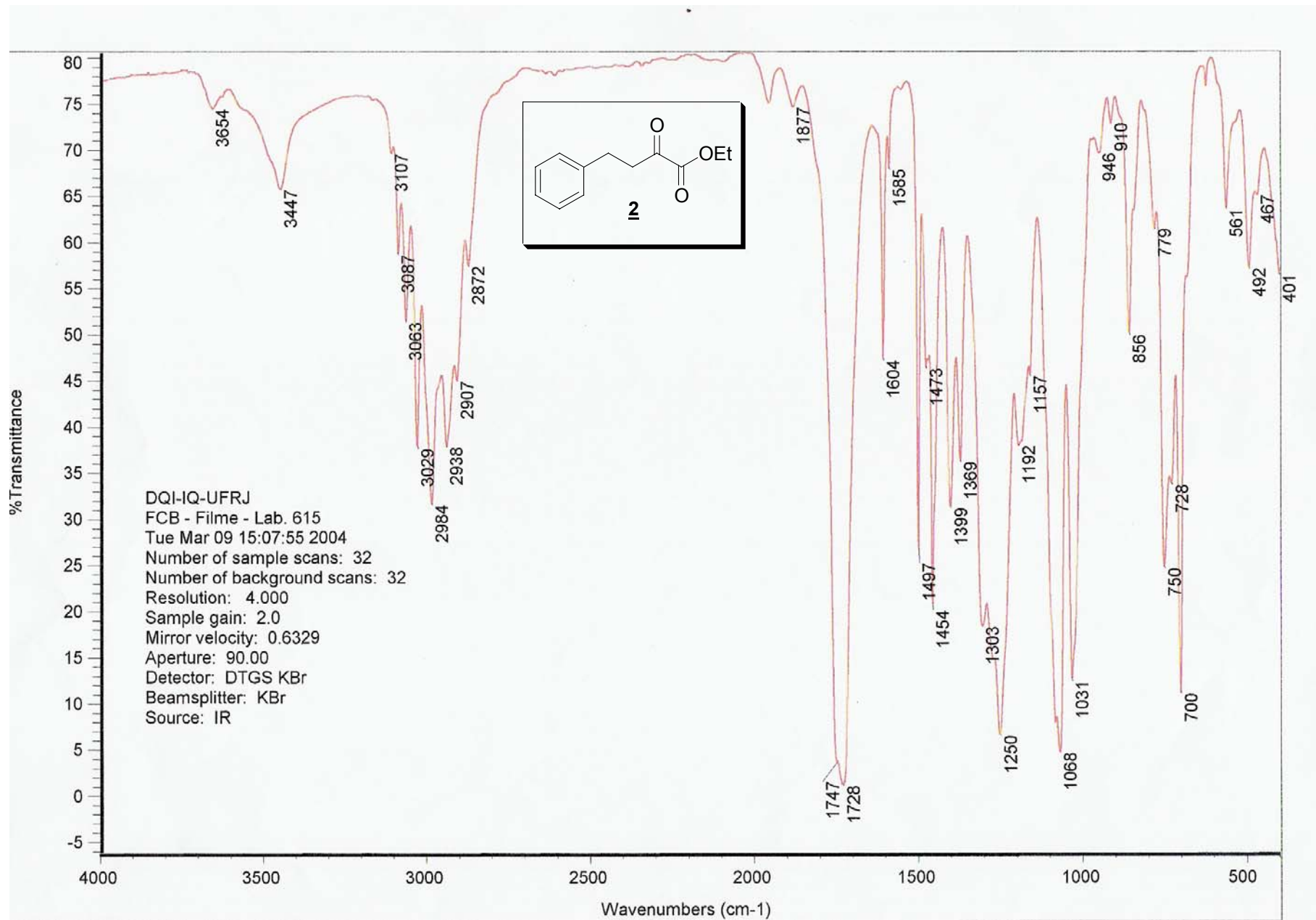
Current Data Parameters  
 NAME Paulo  
 EXPNO 54  
 PROCNO 1

F2 - Acquisition Parameters  
 Date\_ 500000  
 Time 17.13  
 INSTRUM spect  
 PROBHD 5 mm Dual 13  
 PULPROG zg30  
 TD 32768  
 SOLVENT CDC13  
 NS 8  
 DS 0  
 SWH 5592.841 Hz  
 FIDRES 0.170680 Hz  
 AQ 2.9295092 sec  
 RG 256  
 DW 89.400 usec  
 DE 6.00 usec  
 TE 300.0 K  
 D1 0.69999999 sec  
 P1 14.00 usec  
 DE 6.00 usec  
 SF01 200.1320013 MHz  
 NUC1 1H  
 PL1 0.00 dB

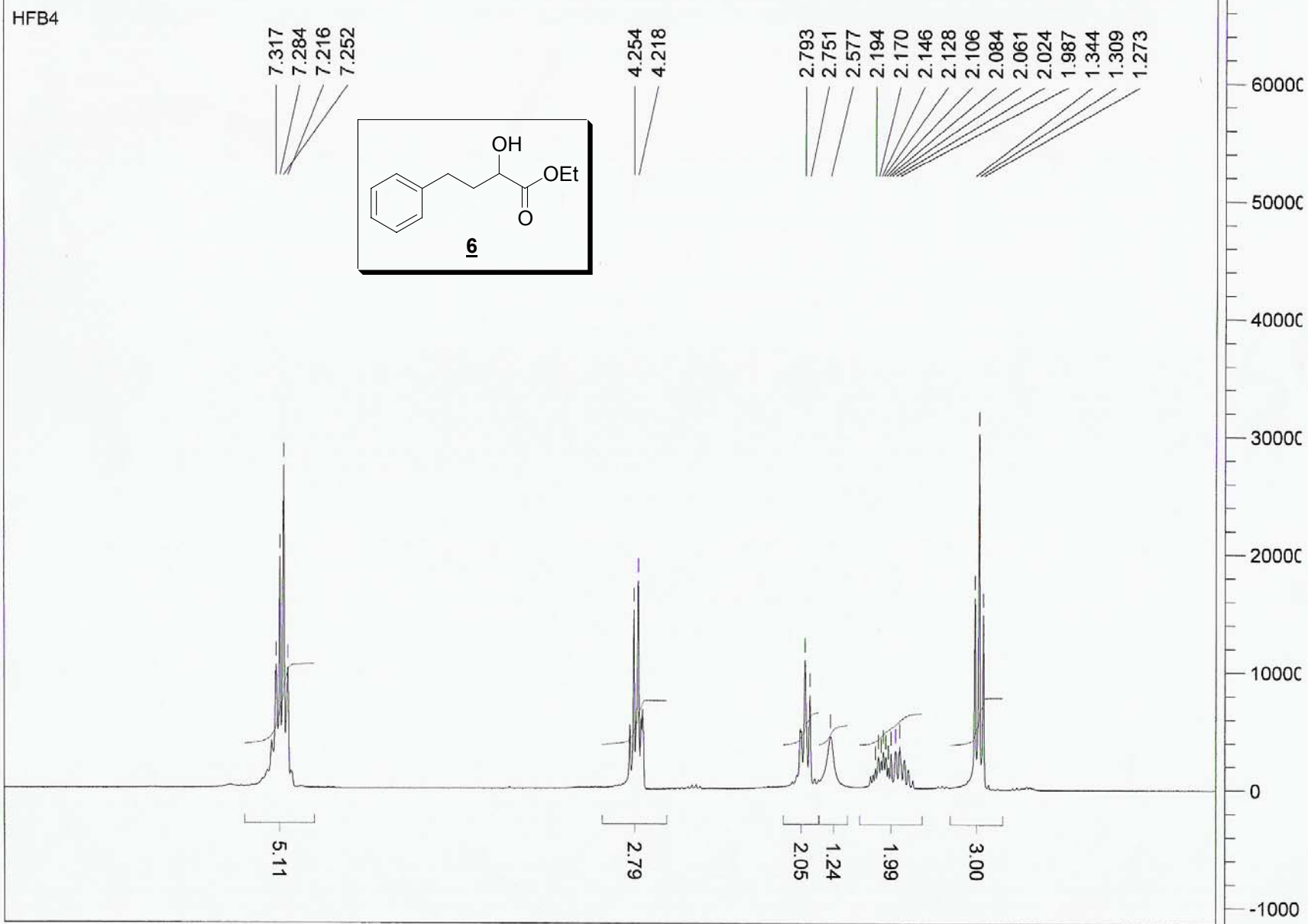
F2 - Processing parameters  
 SI 16384  
 SF 200.1300063 MHz  
 WDW EM  
 SSB 0  
 LB 0.20 Hz  
 GB 0  
 PC 1.00

1D NMR plot parameters  
 CX 20.00 cm  
 F1P 8.238 ppm  
 F1 1648.69 Hz  
 F2P -0.152 ppm  
 F2 -30.47 Hz  
 PPMCM 0.41952 ppm/cm  
 HZCM 83.95795 Hz/cm

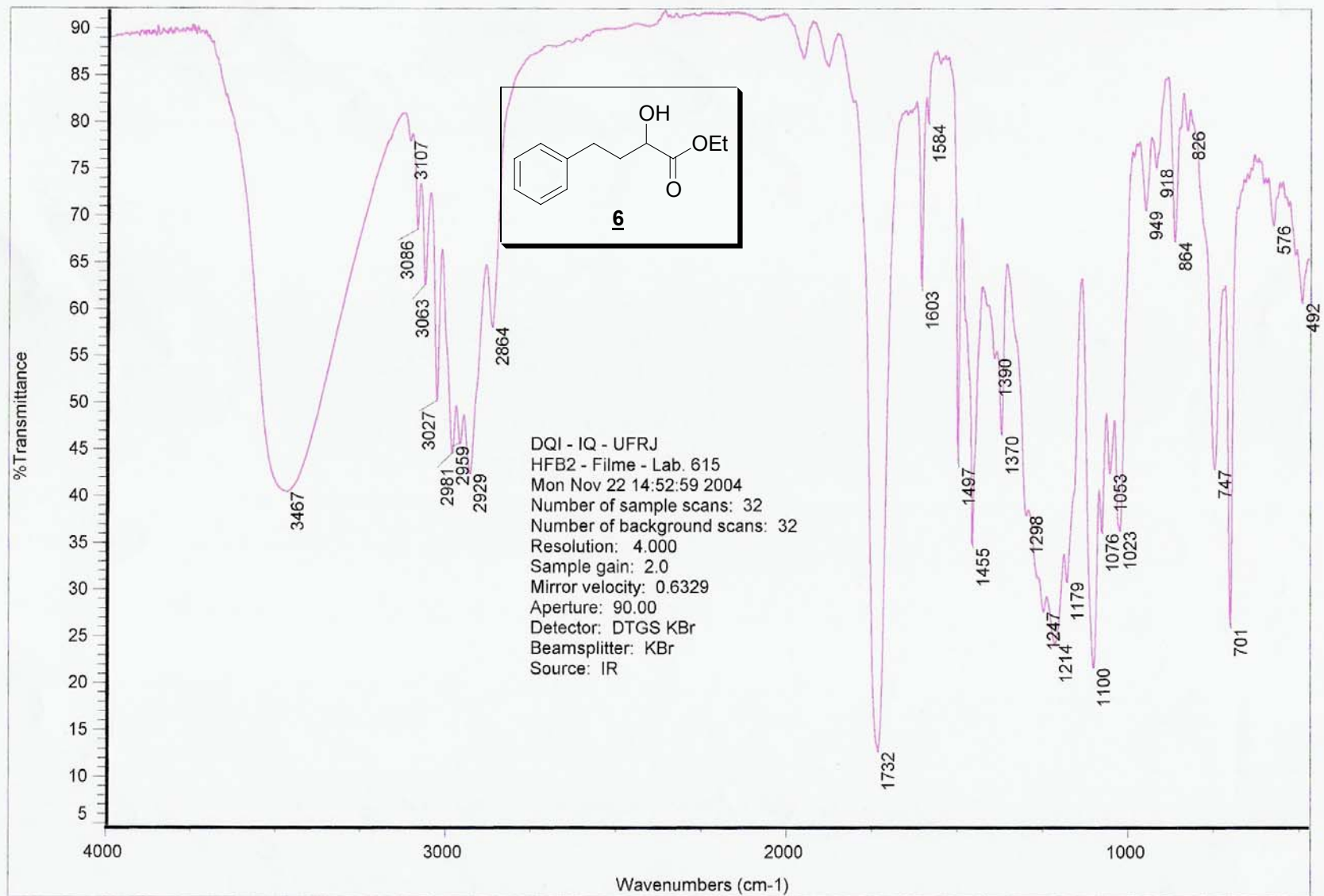
Spectro 17: RMN <sup>1</sup>H (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>) da substância **2**.



Espectro 18: IV (filme) da substância 2.

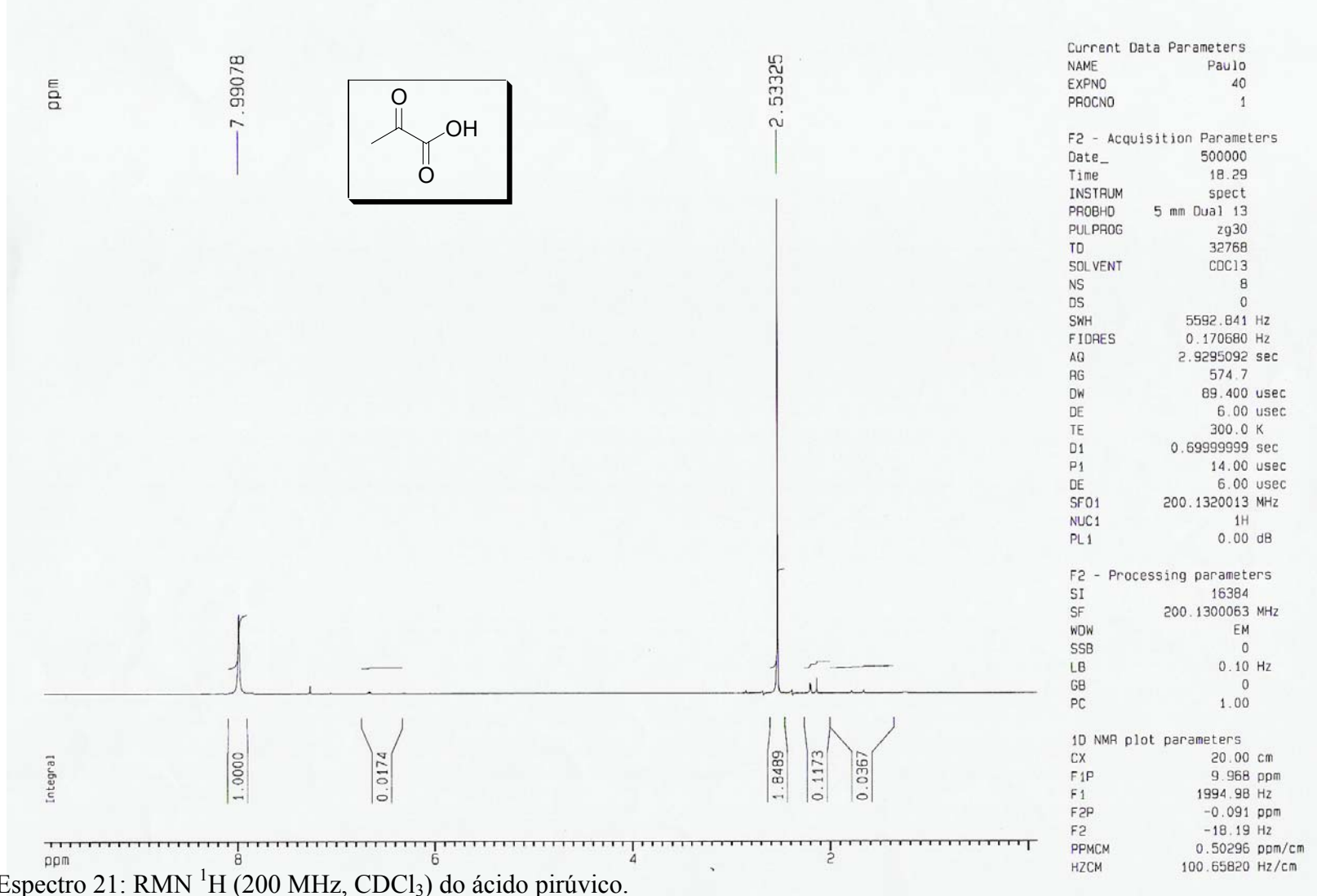


Espectro 19: RMN  $^1\text{H}$  (200 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) da substância **6** obtida por redução da substância **2** com complexo borana-Me-oxazaborlidina.

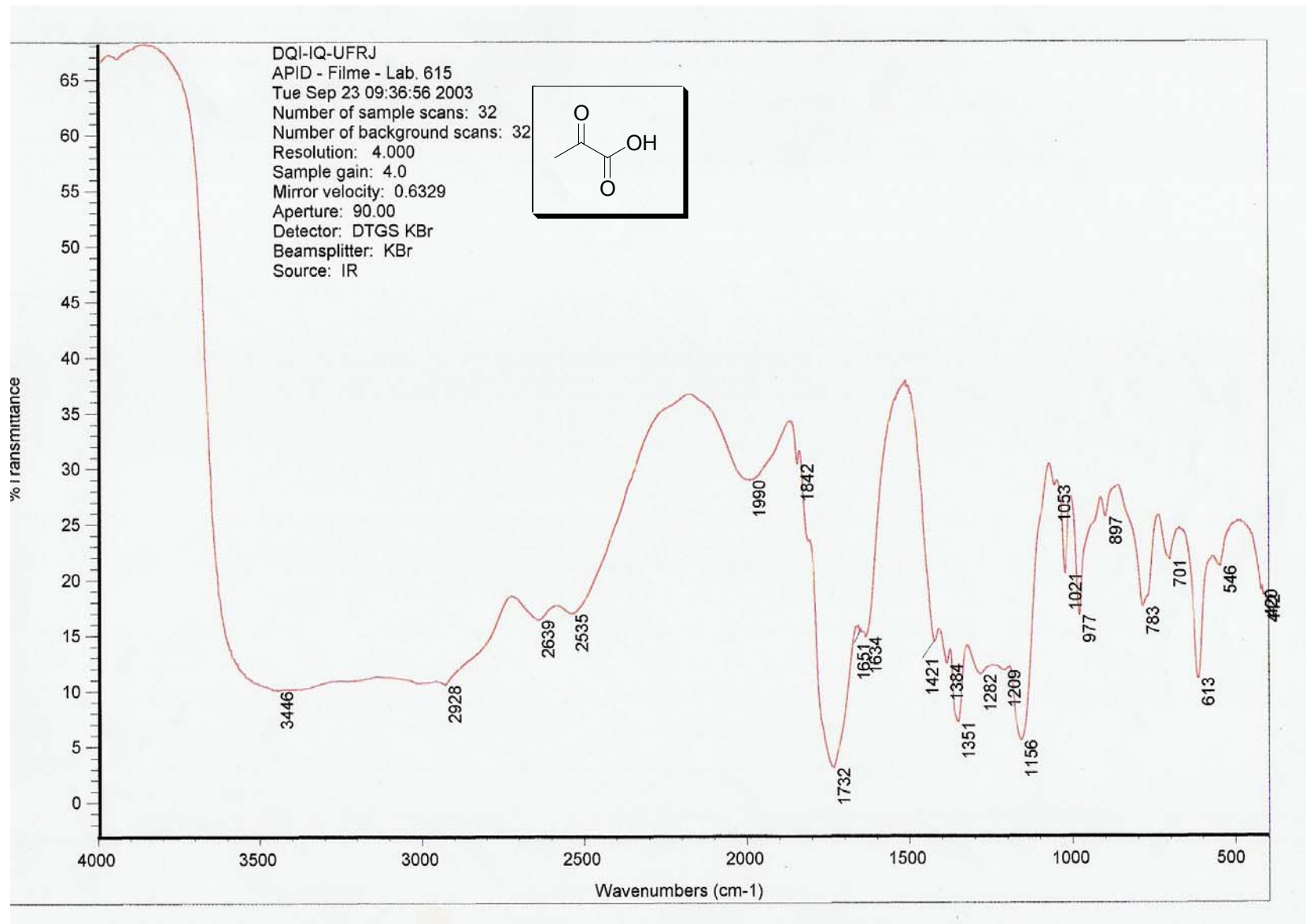


Espectro 20: IV (filme) da substância **6**.

LABRMN/IQ-UFRJ opr.: Kaiser  
1H/CDC13 - 22/SET/2003  
amostra: APID/PauloB/Edson

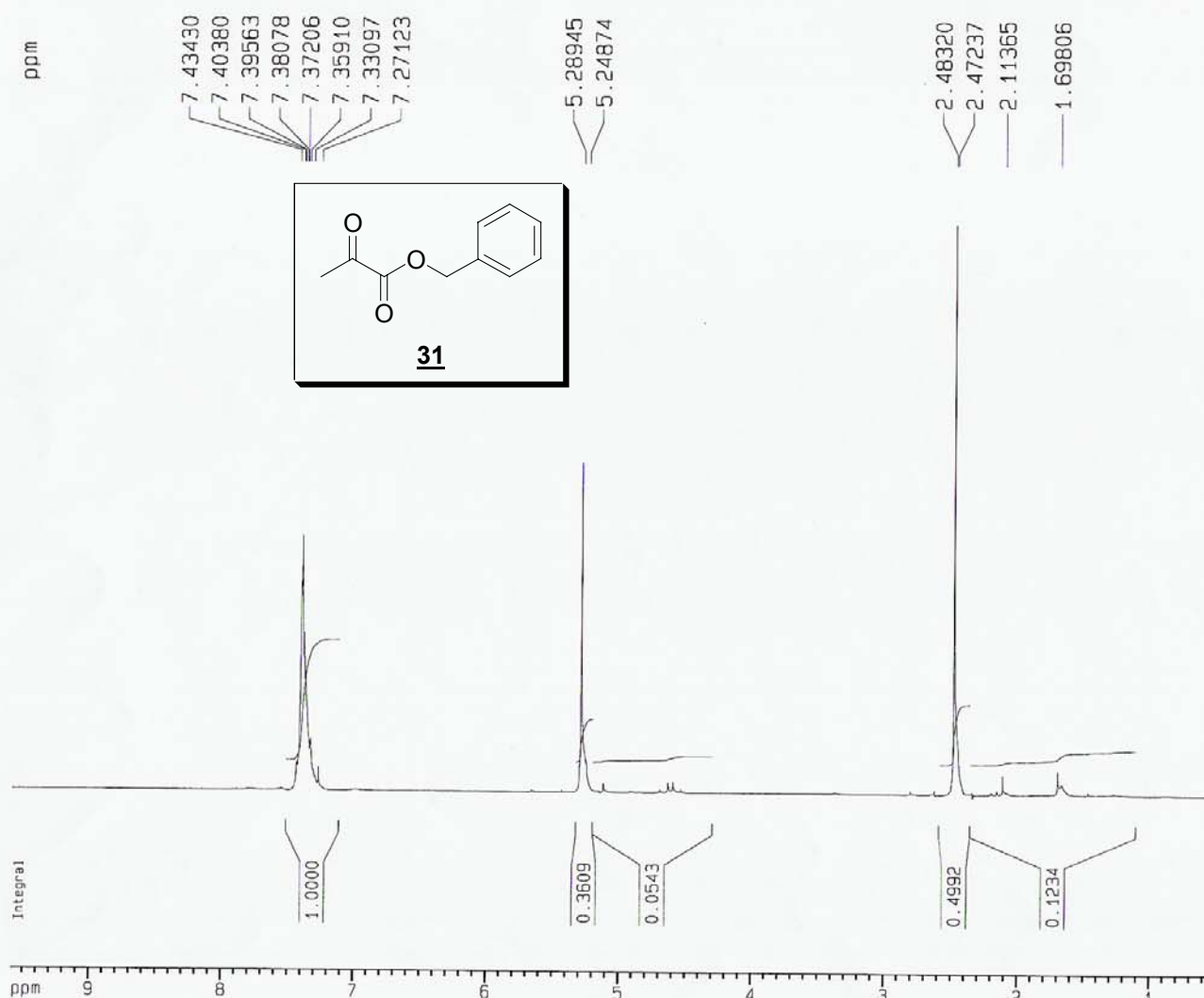






Espectro 22: IV (filme) do ácido pirúvico.

LABRMN/IQ-UFRJ opr.: Kaiser  
1H/CDC13 - 02/OUT/2003  
amostra: EPI4B/Paulo/Edson



Current Data Parameters  
NAME Paulo  
EXPNO 43  
PROCNO 1

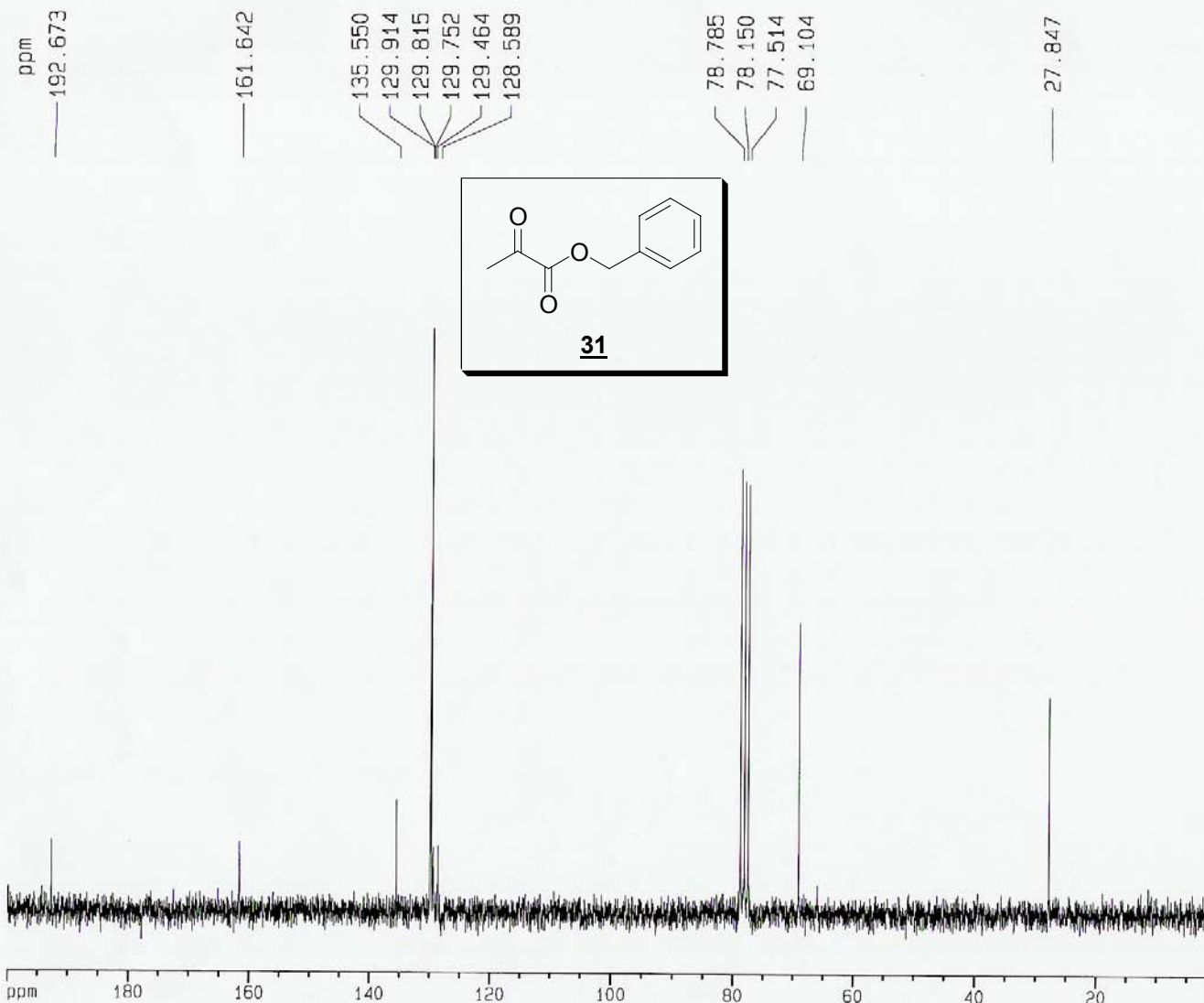
F2 - Acquisition Parameters  
Date\_ 500000  
Time 12.16  
INSTRUM spect  
PROBHD 5 mm Dual 13  
PULPROG zg30  
TD 32768  
SOLVENT CDC13  
NS 8  
DS 0  
SWH 5592.841 Hz  
FIDRES 0.170680 Hz  
AQ 2.9295092 sec  
RG 362  
DW 89.400 usec  
DE 6.00 usec  
TE 300.0 K  
D1 0.69999999 sec  
P1 14.00 usec  
DE 6.00 usec  
SF01 200.1320013 MHz  
NUC1 1H  
PL1 0.00 dB

F2 - Processing parameters  
SI 16384  
SF 200.1300063 MHz  
WDW EM  
SSB 0  
LB 0.10 Hz  
GB 0  
PC 1.00

1D NMR plot parameters  
CX 20.00 cm  
F1P 9.586 ppm  
F1 1918.36 Hz  
F2P 0.525 ppm  
F2 105.16 Hz  
PPMCM 0.45301 ppm/cm  
HZCM 90.66021 Hz/cm

Espectro 23: RMN <sup>1</sup>H (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>) da substância **31**.

LABRMN/IQ-UFRJ opr.: Kaiser  
13C/CDC13 - 08/OUT/2003  
amostra: EPI4B/PauloB/Edson



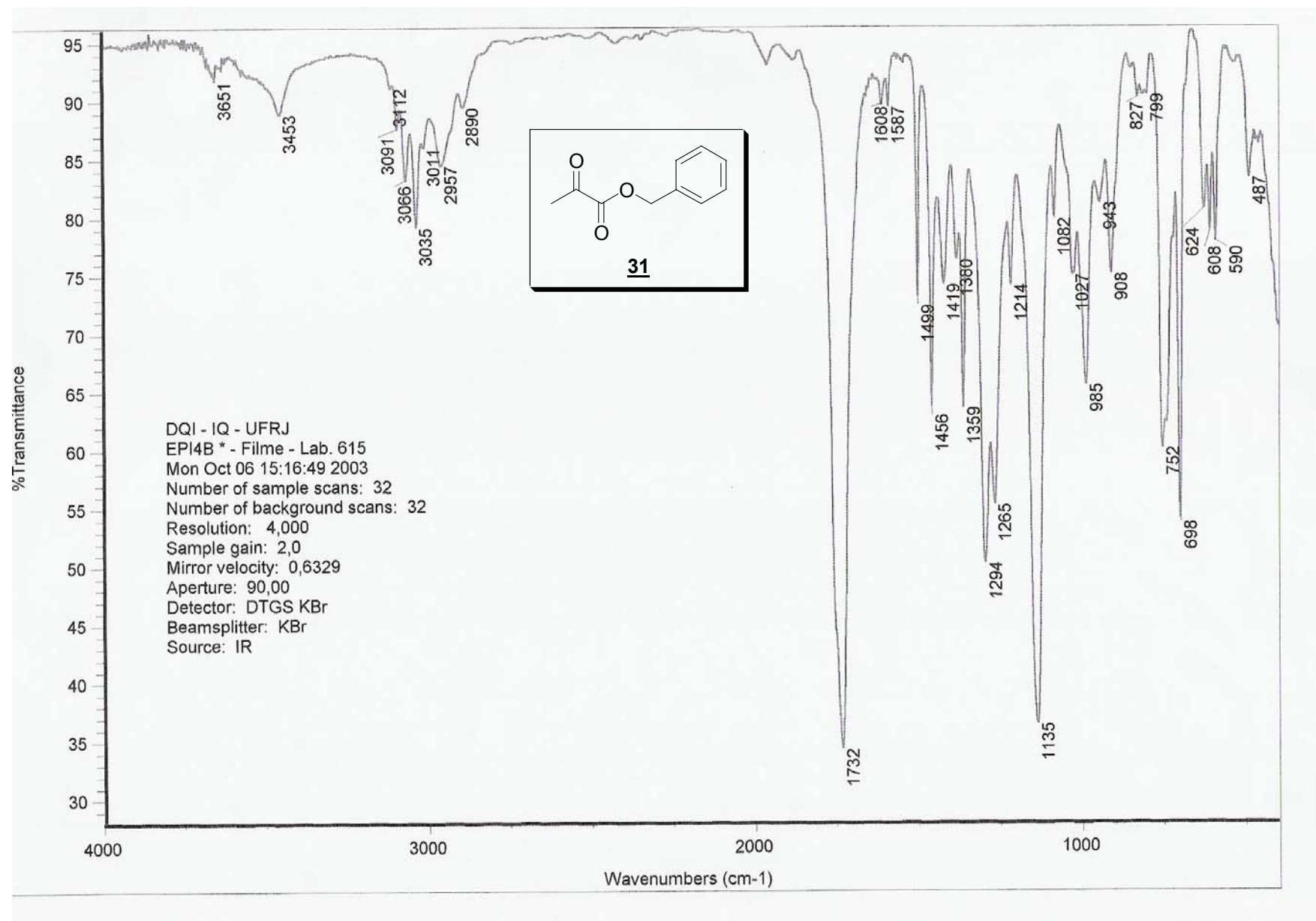
Current Data Parameters  
NAME Paulo  
EXPNO 46  
PROCNO 1

F2 - Acquisition Parameters  
Date\_ 500000  
Time 19.01  
INSTRUM spect  
PROBHD 5 mm Dual 13  
PULPROG zgpg30  
TD 65536  
SOLVENT MeOH  
NS 82  
DS 2  
SWH 15060.241 Hz  
FIDRES 0.229801 Hz  
AQ 2.1758451 sec  
RG 2896.3  
DW 33.200 usec  
DE 6.00 usec  
TE 300.0 K  
D12 0.0002000 sec  
PL13 19.00 dB  
D1 1.20000005 sec  
CPDPRG2 waltz16  
PCPD2 100.00 usec  
SF02 200.1308005 MHz  
NUC2 1H  
PL2 0.00 dB  
PL12 17.00 dB  
P1 10.00 usec  
DE 6.00 usec  
SF01 50.3284961 MHz  
NUC1 13C  
PL1 0.00 dB  
D11 0.03000000 sec

F2 - Processing parameters  
SI 32768  
SF 50.3226756 MHz  
WDW EM  
SSB 0  
LB 1.00 Hz  
GB 0  
PC 1.40

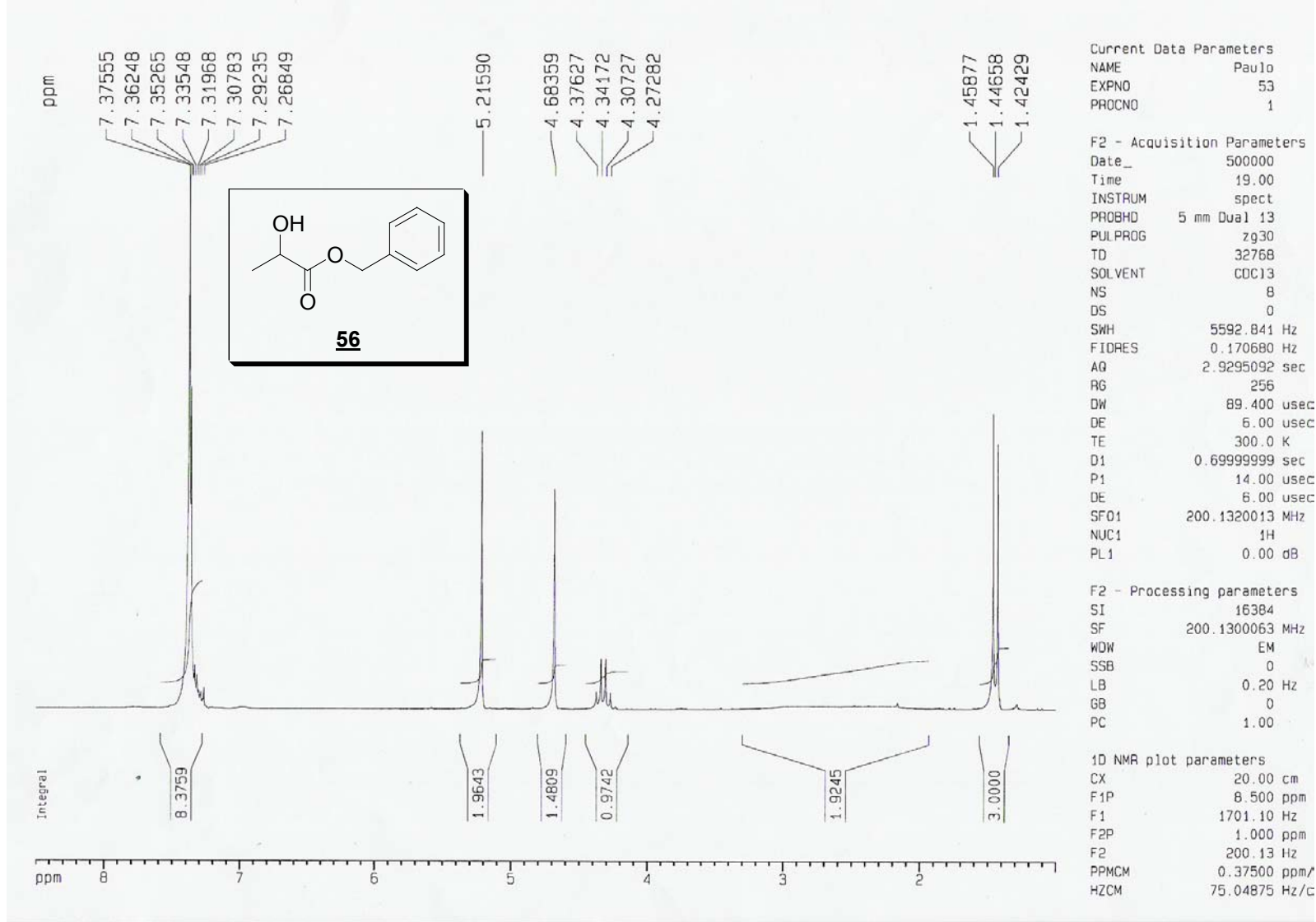
1D NMR plot parameters  
CX 20.00 cm  
F1P 200.000 ppm  
F1 10064.54 Hz  
F2P 0.000 ppm  
F2 0.00 Hz  
PPMCM 10.00000 ppm/cm  
HZCM 503.22675 Hz/cm

Espectro 24: RMN  $^{13}\text{C}$  (50 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) da substância **31**.

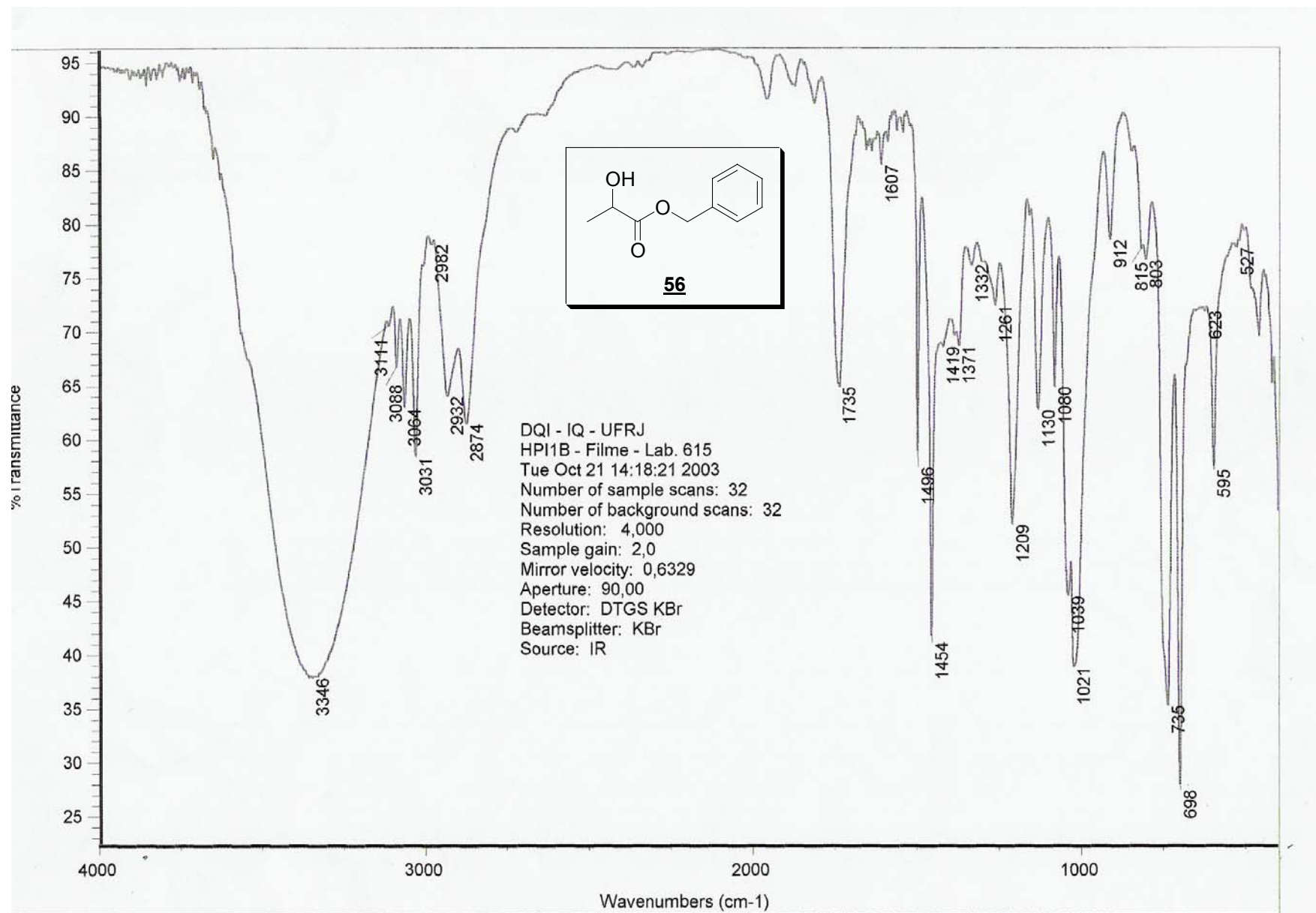


Espectro 25: IV(filme) da substância **31**.

LABRMN/IG-UFRJ 10.11.2003 operador: Rosane  
 RMN H-1/CDC13 amostra: HPI3AB  
 Paulo/Edson



Espectro 26: RMN <sup>1</sup>H (200MHz, CDCl<sub>3</sub>) da substância **56**.



Espectro 27: IV (filme) da substância **56**.

# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)