



UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
INSTITUTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS - GRADUAÇÃO EM QUÍMICA



JAQUELINE REIS DE SOUZA BISPO

BIOREDUÇÃO E RESOLUÇÃO CINÉTICA OXIDATIVA DE
COMPOSTOS OXIGENADOS EMPREGANDO A ESPONJA MARINHA
DA ESPÉCIE *Cliona varians*

Salvador, 25 de Setembro de 2019.



UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
INSTITUTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS - GRADUAÇÃO EM QUÍMICA



BIOREDUÇÃO E RESOLUÇÃO CINÉTICA OXIDATIVA DE COMPOSTOS
OXIGENADOS EMPREGANDO A ESPONJA MARINHA DA ESPÉCIE *Cliona*
varians

JAQUELINE REIS DE SOUZA BISPO

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós- Graduação em Química da Universidade Federal da Bahia como requisito parcial à obtenção do título de mestre em Química Orgânica.

Orientador: Valéria Belli Riatto

Salvador, 25 de Setembro de 2019.

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema Universitário de Bibliotecas (SIBI/UFBA),
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Reis de Souza Bispo, Jaqueline
BIOREDUÇÃO E RESOLUÇÃO CINÉTICA OXIDATIVA DE
COMPOSTOS OXIGENADOS EMPREGANDO A ESPONJA MARINHA DA
ESPÉCIE *Cliona varians* / Jaqueline Reis de Souza
Bispo. -- Salvador, 2019.
132 f. : il

Orientadora: Prof^a. Dr^a Valeria Belli Riatto.
Dissertação (Mestrado - Pós graduação em Química) --
Universidade Federal da Bahia, Instituto de química,
2019.

1. Síntese enantiosseletiva. 2. Biotransformação. 3.
Cliona varians. I. Belli Riatto, Prof^a. Dr^a Valeria.
II. Título.

TERMO DE APROVAÇÃO

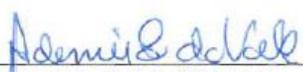
JAQUELINE REIS DE SOUZA BISPO

“BIOREDUÇÃO E RESOLUÇÃO CINÉTICA OXIDATIVA DE COMPOSTOS
OXIGENADOS EMPREGANDO A ESPONJA MARINHA DA ESPÉCIE *Cliona varians*”

Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Química,
Universidade Federal da Bahia, pela seguinte banca examinadora:

Prof.^a Dr.^a Valeria Belli Riatto  _____
Doutorado em Química, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP)
Universidade Federal da Bahia

Prof. Dr. Jorge Mauricio David  _____
Doutorado em Química, Universidade de São Paulo (USP)
Universidade Federal da Bahia

Prof. Dr. Ademir Evangelista Do Vale  _____
Doutorado em Química, Universidade Federal da Bahia (UFBA)
Universidade Federal da Bahia

Salvador, 25 de setembro de 2019.

AGRADECIMENTOS

A minha mãe Maria por sempre está presente na minha vida, encorajando-me, e por todo amor. Ao meu avô Antônio e minha avó Alzenira por todo amor e carinho demonstrado, pelos conselhos, eu amo muito vocês.

A professora Dr^a Valeria Belli Riatto pela amizade, orientação, por todas as palavras de incentivo, que com certeza foi fundamental em vários momentos da minha vida acadêmica, e pela oportunidade de fazer parte do GPSQ, por ser uma “mãe” em vários momentos, pela convivência durante esses 8 anos, não tenho palavras que definam quão agradecida eu sou pelo universo ter me proporcionado ser sua orientanda durante todo esse tempo, meu muito obrigada!

Ao Professor Dr. Mauricio Moraes Victor por toda a paciência, pelos ensinamentos no laboratório que levarei comigo em toda minha jornada, muito obrigada por tudo!

Ao professor Dr. Jorge Mauricio David e ao professor Dr. Ademir Evangelista do Vale por aceitar o convite para fazer parte da banca examinadora.

Ao Uchôa pela paciência no início da iniciação científica o que levou-me a pós graduação, pelos ensinamentos, pela amizade, pelas resenhas...Não tenho palavras para agradece, muito obrigada!

Aos colegas do GPSQ, Cíntia, Jaque Rosa, Maria Kuliaquita, Galbinho, Ravir, Clara, Marcelo, Elivana, Juliana, Viviane, Fernando pelos momentos de descontração e discussões científicas, Claro!

A Fabrícia Nunes, Oscar Caetano e Juliana Paixão por me aturar na Pós-graduação, foi e é, muito bom contar com a amizade de vocês.

Aos colegas do laboratório do Prof. Dr. Silvio do Desterro Cunha pela ajuda no Infravermelho, principalmente Lucas Prates e Raimundo Francisco.

Ao Prof. Dr. Kleber Oliveira e seu orientando Aloisio de Andrade, da UFSCAR, pelas análises dos espectros de Ressonância magnética nuclear disponibilizadas nesse trabalho e que foram de fundamental importância.

Meus agradecimentos ao EMEVZ/UFBa, meu atual cantinho de aprendizado, e em especial ao Prof. Dr. Claudio Ribeiro e a Prof. Dr^a Chiara Albano pela paciência nessa reta final de conclusão da dissertação.

Meus agradecimentos a todos os meus professores do Instituto de Química da UFBA pelo aprendizado durante essa jornada nas estrelas, que dizer, acadêmica.

Ao CNPq /UFBA pela bolsa concedida, a Universidade Federal da Bahia, ao Instituto de Química que proporcionam que sonhos sejam realizados mesmo com todas as dificuldades enfrentadas.

Meu muito obrigada a todos!

A IDEIA

De onde ela vem?! De que matéria bruta

Vem essa luz que sobre as nebulosas

Cai de incógnitas criptas misteriosas

Como as estalactites duma gruta?!

Vem da psicogenética e alta luta

Do feixe de moléculas nervosas,

Que, em desintegrações maravilhosas,

Delibera, e depois, quer e executa!

Vem do encéfalo absconso que a constringe,

Chega em seguida às cordas do laringe,

Tísica, tênue, mínima, raquítica ...

Quebra a força centrípeta que a amarra,

Mas, de repente, e quase morta, esbarra

No mulambo da língua parálitica.

Augusto dos Anjos, 1912

BISPO, J.R.S. Bioredução e resolução cinética oxidativa de compostos oxigenados empregando a esponja marinha da espécie *Cliona varians*. Dissertação de Mestrado – Instituto de Química, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2019.

RESUMO

A síntese orgânica assimétrica convencional é a área da química que se dedica a construção de moléculas bioativas e com elevada pureza óptica. O processo sintético de produção de compostos com centro(s) quiral(is) é complexo e envolve várias etapas de preparação, utilização de organocatalisadores, auxiliares quirais ou catalisadores metálicos. Estes procedimentos podem envolver reagentes caros e de difícil manipulação. Também pode ocorrer dificuldade de descarte dos metais de transição empregados como catalisadores, tal como Ru, Rh, Co, Pd, entre outros. Na tentativa de reduzir os custos e minimizar os impactos ambientais, a partir da segunda metade do século XX muitas pesquisas se voltaram para a síntese biocatalítica, utilizando processos enzimáticos na obtenção de compostos quirais. A biocatálise vem sendo muito empregada em processos industriais, principalmente no ramo farmacêutico e agroquímico. No intuito de valorizar a biodiversidade regional baiana, foi utilizada a esponja marinha *Cliona varians* inteira como biocatalisador em reações de bioredução de cetonas pró-quirais disponíveis no laboratório (acetofenona, *p*-nitroacetofenona e acetilfurano) e na resolução cinética oxidativa de mistura racêmica de álcoois secundários preparados quimicamente (*p*-nitrofeniletanol, *p*-metoxifeniletanol e 1-(2-furil) etanol e do 1-feniletanol. Os produtos reacionais foram caracterizados por técnicas espectroscópicas (espectroscopia no infravermelho, ¹H-RMN e ¹³C-RMN). Os experimentos foram realizados utilizando glicose e frutose como aditivos, e também na ausência de aditivos. As reações de biotransformações foram avaliadas durante 3, 5 e 7 dias e analisadas através de CG empregando coluna quiral. A biorredução de cetonas aromáticas demonstraram taxas de conversões baixas a moderadas e excesso enantioméricos moderados, sendo que o melhor resultado obtido foi utilizando a acetofenona como substrato e glicose como aditivo. O (*S*)-1-feniletanol foi obtido majoritariamente (31% conversão e 84% e.e.), com seletividade de acordo com a regra de PRELOG. As reações de resolução cinética oxidativa de álcoois racêmicos apresentaram resultados relevantes, sendo o melhor resultado obtido com o substrato (*R/S*)-*p*-metoxifeniletanol e sem adição de aditivo (78% conversão e 84%

e.e.), levando ao enriquecimento da (*R*)-*p*-metoxiacetofenona e seletividade anti-
PRELOG.

Palavras Chave: síntese enantiosseletiva, biotransformação, *Cliona varians*.

BISPO, J.R.S. Bioreduction and oxidative kinetic resolution of oxygenated compounds using a marine sponge of the species *Cliona varians*. Dissertation of Masters - Chemistry Institute, Federal University of Bahia, Salvador, 2019.

ABSTRACT

The conventional asymmetric organic synthesis is the area of chemistry dedicated to the obtention of bioactive molecules and with high optical purities. The synthetic process of compounds production with chiral centers are complex and involves several steps of preparation, use of organocatalysts, chiral substrates or metallic catalysts. Such procedures may involve expensive reagents and difficult handle. There may also be some difficulty to discard the transition metal used as catalysts, such as Ru, Rh, Co, Pd and others. In order to reduce costs and mitigate the environmental impacts, since the second half of the 20th Century, many studies focused on biocatalytic synthesis, using enzymatic processes to obtain chiral compounds. Biocatalysis has been frequently used in industry processes, especially in the field of pharmacy and agrochemistry. In order to value bioavailability of Bahia, the sea sponge *Cliona varians* was entirely tested as a biocatalyst in reactions of bioreduction of pro-chiral ketone available (acetophenone, nitroacetophenone and acetylfuran) and in the oxidative kinetic resolution of racemic mixture of secondary alcohols chemically prepared [*p*-nitrophenylethanol, *p*-methoxyphenylethanol and 1-(2-Furyl)ethanol]. The reactional products were characterized by spectroscopic techniques (IR, ¹H-RMN and ¹³C-RMN). The experiments were carried out employing glucose and fructose as additives, and also in reaction without additives. The biotransformation reactions were evaluated for 3, 5 and 7 days and analyzed through with chiral column. The bioreduction of aromatic ketones showed rates conversions ranging from low to moderate enantiomeric excess and the best result was obtained through acetophenone as substrate and glucose as additive. The (*S*)-1-phenylethanol was obtained mainly (31% conversion and 84% e.e.) selectively, according to PRELOG. The reactions of oxidative kinetic resolution of racemic alcohols showed relevant results, and the best result obtained through substrate (*R/S*)-*p*-methoxyphenylethanol and without additives (78% conversion and 84% e.e.), which led to the enrichment of (*R*)-*p*-methoxyacetophenone and anti-PRELOG selectively.

Keywords: enantioselective synthesis, biotransformation, *Cliona varians*.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CG = Cromatografia gasosa

CGQ = Cromatografia gasosa quiral

IV = Infravermelho

e.e. = Excesso enantiomérico

Tr = Tempo de retenção

ND = Não detectado

CDCl_3 = Clorofórmio deuterado

TMS = Tetrametilsilano

Hz = Hertz

ppm = parte por bilhão

dt = duplo tripleto

dd = duplo dubleto

s = singleto

q = quarteto

ADH's = álcoois desidrogenases

$[\alpha]_D$ = Rotação específica

Nº = Número

Conv = Conversão

KBr = Brometo de potássio

NaBH_4 = Borohidreto de sódio

NADPH = Dinucleotídeo de nicotinamida adenina fosfato

NADH = Dinucleotídeo de nicotinamida adenina

δ =Deslocamento químico

RMN de ^{13}C = Ressonância Magnética Nuclear de Carbono-13

RMN de ^1H = Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio

MeOH = Metanol

PCC = Clorocromato de piridínio

PDC = Dicromato de piridínio

NI: não identificado

β -CD: β -ciclodextrina

Pág. = Página

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Exemplos de moléculas que apresentam efeitos terapêuticos distintos em função da configuração absoluta.....	26
Figura 2: Modelos hipotéticos mecanístico da catalise enzimática. (Adaptado – Voet e Voet, 2013).....	28
Figura 3: Mecanismo proposto para a reação de redução de cetonas pró-quiral pela enzima álcool desidrogenase (LEHNINGER <i>et al</i> , 2014 – Adaptado).....	30
Figura 4: Faces enantiotópicas propostas por PRELOG para seletividade enantioméricas de cetonas pró-quirais (ITOH, 2014; PRELOG, 1964 - Adaptado)...	33
Figura 5: Estrutura química da β -ciclodextrina.	34
Figura 6: Estrutura química do surfactante Tween® 20 comercial. (Adaptado: https://www.sigmaaldrich.com/catalog/substance/tween2012345900564511?lang=pt&region=BR).....	50
Figura 7: Esponja marinha <i>Cliona varians</i> e local de coleta das amostras (Praia do Forte-Ba).	54
Figura 8: Proposta mecanística da redução de cetonas com NaBH ₄ . (PILLI et al, 2003 - Adaptado).....	57
Figura 9: Cromatograma comparativo da biorredução da acetofenona (1) utilizando glicose como aditivo e a esponja marinha <i>C.varians</i> como biocatalisador durante 3,5 e 7 dias.....	60
Figura 10: Cromatograma comparativo da biorredução da acetofenona utilizando frutose como aditivo e a esponja marinha <i>C.varians</i> como biocatalisador durante 3,5 e 7 dias.....	61
Figura 11: Avaliação cinética enantiosseletiva qualitativa da biorredução da acetofenona (1) utilizando a esponja marinha <i>C. varians</i>	61
Figura 12: Cromatograma comparativo da biooxidação do (<i>R/S</i>)-1-feniletanol (1a) sem adição de ativo utilizando a esponja marinha <i>C.varians</i> como biocatalisador durante 3,5 e 7 dias.....	63
Figura 13: Cromatograma comparativo da biooxidação do (<i>R/S</i>)-1-feniletanol com adição de glicose utilizando a esponja marinha <i>C.varians</i> como biocatalisador durante 3,5 e 7 dias.....	63
Figura 14: Cromatograma comparativo da biooxidação do (<i>R/S</i>)-1-feniletanol (1a) com adição de frutose utilizando a esponja marinha <i>C.varians</i> como biocatalisador durante 3,5 e 7 dias.....	64

Figura 15: Avaliação cinética enantiosseletiva qualitativa da biooxidação do (<i>R/S</i>)-1-Feniletanol (1a) utilizando a esponja marinha <i>C.varians</i>	65
Figura 16: Cromatograma comparativo da biorredução do <i>p</i> -nitroacetofenona (3) com adição de glicose como aditivo utilizando a esponja marinha <i>C.varians</i> como biocatalisador durante 3,5 e 7 dias.....	69
Figura 17: Cromatograma comparativo da biorredução do <i>p</i> -nitroacetofenona (3) com adição de frutose como aditivo utilizando a esponja marinha <i>C.varians</i> como biocatalisador durante 3,5 e 7 dias.....	70
Figura 18: Avaliação cinética qualitativa da enantiosseletiva da biorredução da <i>p</i> -nitroacetofenona (3) utilizando a esponja marinha <i>C.varians</i>	71
Figura 19: Cromatograma comparativo da bio-oxidação do (<i>R/S</i>)- <i>p</i> -metoxifeniletanol (2a), sem adição de aditivo, utilizando a esponja marinha <i>C.varians</i> como biocatalisador durante 3,5 e 7 dias.....	72
Figura 20: Cromatograma comparativo da da bio-oxidação do (<i>R/S</i>)- <i>p</i> -metoxifeniletanol (2a), com adição de glicose como aditivo, utilizando a esponja marinha <i>C.varinas</i> como biocatalisador durante 3,5 e 7 dias.....	73
Figura 21: Cromatograma comparativo da bio-oxidação do (<i>R/S</i>)- <i>p</i> -metoxifeniletanol (2a), com adição de frutose como aditivo, utilizando a esponja marinha <i>C.varinas</i> como biocatalisador durante 3,5 e 7 dias.....	73
Figura 22: Avaliação cinética da enantiosseletiva da bio-oxidação do (<i>R/S</i>)- <i>p</i> -metoxifeniletanol (2a), utilizando a esponja marinha <i>C.varians</i>	74
Figura 23: Cromatograma comparativo da bio-oxidação do (<i>R/S</i>)- <i>p</i> -nitrofeniletanol (3a), sem adição de aditivo, utilizando a esponja marinha <i>C.varians</i> como biocatalisador durante 3,5 e 7 dias.....	75
Figura 24: Cromatograma comparativo da bio-oxidação do (<i>R/S</i>)- <i>p</i> -nitrofeniletanol (3a), com adição de glicose, como aditivo utilizando a esponja marinha <i>C.varians</i> como biocatalisador durante 3,5 e 7 dias.....	76
Figura 25: Cromatograma comparativo da bio-oxidação do (<i>R/S</i>)- <i>p</i> -nitrofeniletanol (3a), com adição de frutose, como aditivo utilizando a esponja marinha <i>C.varians</i> como biocatalisador durante 3,5 e 7 dias.....	76
Figura 26: Avaliação cinética da enantiosseletiva da bio-oxidação do (<i>R/S</i>)- <i>p</i> -nitrofeniletanol (3a), utilizando a esponja marinha <i>C.varians</i>	77
Figura 27: Cromatograma comparativo da bio-oxidação do (<i>R/S</i>)-1-(2-furil)-etanol (4a), sem adição de aditivo, utilizando a esponja marinha <i>C. varinas</i> como biocatalisador durante 3,5 e 7 dias.....	81

Figura 28: Cromatograma comparativo da bio-oxidação do (<i>R/S</i>)-1-(2-furil)-etanol (4a), com adição de glicose como aditivo, utilizando a esponja marinha <i>C. varinas</i> como biocatalisador durante 3,5 e 7 dias.....	81
Figura 29: Cromatograma comparativo da bio-oxidação do (<i>R/S</i>)-1-(2-furil)-etanol (4a), com adição de frutose como aditivo, utilizando a esponja marinha <i>C. varinas</i> como biocatalisador durante 3,5 e 7 dias.....	82
Figura 30: Avaliação cinética da enantiosseletiva da bio-oxidação do (<i>R/S</i>)-1-(2-furil)-etanol (4a) utilizando a esponja marinha <i>C. varians</i>	82
Figura 31: Espectro no Infravermelho da Acetofenona (1).....	100
Figura 32: Padrão cromatográfico do reagente comercial acetofenona (1) (Tr=13,1min.) utilizado nas reações de bio-redução.	100
Figura 33: Cromatogramas (3,5 e 7 dias) das reações de bio-redução da acetofenona (1) (Tr=13,2min) utilizando glicose como aditivo.	101
Figura 34: Cromatogramas (3,5 e 7 dias) das reações de bio-redução da acetofenona (1) (Tr=13,3) utilizando frutose como aditivo.	102
Figura 35: Espectro no Infravermelho do (<i>R/S</i>)-1-Feniletanol (1a).....	103
Figura 36: Padrão cromatográfico do reagente comercial (<i>R/S</i>)-1-Feniletanol (1a) [Tr(<i>R</i>)=18,8min. E Tr(<i>S</i>)=19,3 min.] utilizado nas reações de bio-oxidação.	103
Figura 37: Cromatogramas (3,5 e 7 dias) das reações de bio-oxidação do (<i>R/S</i>)-1-Feniletanol (1a) [Tr(<i>R</i>)=19,0 e Tr(<i>S</i>)=19,4] sem aditivo.....	104
Figura 38: Cromatogramas (3,5 e 7 dias) das reações de bio-oxidação do (<i>R/S</i>)-1-Feniletanol (1a) [Tr(<i>R</i>)=18,9 e Tr(<i>S</i>)=19,4] utilizando glicose como aditivo.....	105
Figura 39: Cromatogramas (3,5 e 7 dias) das reações de bio-oxidação do (<i>R/S</i>)-1-Feniletanol (1a) [Tr(<i>R</i>)=18,9 e Tr(<i>S</i>)=19,4] utilizando frutose como aditivo.....	106
Figura 40: Espectro de Infravermelho do <i>p</i> -metoxiacetofenona (2).....	107
Figura 41: Padrão cromatográfico do reagente comercial <i>p</i> -metoxiacetofenona (2) [Tr =36,31min.] utilizado nas reações de bio-redução.	107
Figura 42: Cromatogramas (3,5 e 7 dias) das reações de bio-redução do <i>p</i> -metoxiacetofenona (2) [Tr=36,25]sem aditivo.	108
Figura 43: Cromatogramas (3,5 e 7 dias) das reações de bio-redução do <i>p</i> -metoxiacetofenona (2) [Tr=36,25] utilizando glicose como aditivo.	109
Figura 44: Cromatogramas (3,5 e 7 dias) das reações de bio-redução do <i>p</i> -metoxiacetofenona (2) [Tr=36,25] utilizando frutose como aditivo.	110

Figura 45: Espectro de espectroscopia no Infravermelho da <i>p</i> -metoxifeniletanol. .	111
Figura 46: Espectro de ¹ H-RMN da <i>p</i> -metoxifeniletanol.	111
Figura 47: Espectro de ¹³ C-RMN da <i>p</i> -metoxifeniletanol.....	112
Figura 48: Padrão cromatográfico do reagente (<i>R/S</i>)- <i>p</i> -metoxifeniletanol [Tr(<i>R</i>)=41,35min. E Tr(<i>S</i>)=42,55min.] utilizado nas reações de bioxidação.	112
Figura 49: Cromatogramas (3,5 e 7 dias) das reações de bioxidação do (<i>R/S</i>)- <i>p</i> -metoxifeniletanol [Tr(<i>R</i>)=45,35 e Tr(<i>S</i>)=42,55] sem aditivo.	113
Figura 50: Cromatogramas (3,5 e 7 dias) das reações de bioxidação do (<i>R/S</i>)- <i>p</i> -metoxifeniletanol [Tr(<i>R</i>)=45,35 e Tr(<i>S</i>)=42,55] utilizando glicose como aditivo.	114
Figura 51: Cromatogramas (3,5 e 7 dias) das reações de bioxidação do (<i>R/S</i>)- <i>p</i> -metoxifeniletanol [Tr(<i>R</i>)=45,35 e Tr(<i>S</i>)=42,55] utilizando frutose como aditivo.	115
Figura 52: Espectro de espectroscopia no Infravermelho do Acetilfurano.	116
Figura 53: Padrão cromatográfico do reagente comercial acetilfurano [Tr =10,54min.] utilizado nas reações de bio-redução.	116
Figura 54: Cromatogramas (3,5 e 7 dias) das reações de bio-redução do acetilfurano [Tr=10,54 min.] utilizando glicose como aditivo.	117
Figura 55: Cromatogramas [3(não recuperado),5 e 7 dias] das reações de bio-redução do acetilfurano [Tr=10,54 min.] utilizando frutose como aditivo.	118
Figura 56: Espectro de espectroscopia no Infravermelho do 1- (2-furil) etanol.	119
Figura 57: Espectro de ¹ H-RMN do 1- (2-furil) etanol.....	119
Figura 58: Espectro de ¹³ C-RMN do 1- (2-furil) etanol.	120
Figura 59: Padrão cromatográfico do reagente (<i>R/S</i>)-1-(2-furil) etanol [Tr(<i>ND</i>)=15,97min. E Tr(<i>ND</i>)=17,02min.] utilizado nas reações de bioxidação.	120
Figura 60: Cromatogramas (3,5 e 7 dias) das reações de bioxidação do (<i>R/S</i>)-1-(2-furil) etanol[Tr(<i>ND</i>)=16,36 e Tr(<i>ND</i>)=17,50] sem aditivo.....	121
Figura 61: Cromatogramas (3,5 e 7 dias) das reações de bioxidação do (<i>R/S</i>)-1-(2-furil) etanol [Tr(<i>ND</i>)=16,36 e Tr(<i>ND</i>)=17,50] utilizando glicose como aditivo.	122
Figura 62: Cromatogramas (3,5 e 7 dias) das reações de bioxidação do (<i>R/S</i>)-1-(2-furil) etanol [Tr(<i>ND</i>)=16,36 e Tr(<i>ND</i>)=17,50] utilizando frutose como aditivo.....	123
Figura 63: Espectro de Infravermelho do <i>p</i> -Nitroacetofenona.	124
Figura 64: Padrão cromatográfico do reagente comercial <i>p</i> -nitoacetofenona [Tr =19,81min.] utilizado nas reações de bio-redução.	124

Figura 65: Cromatogramas (3,5 e 7 dias) das reações de bioredução do <i>p</i> -nitroacetofenona [Tr=19,93] sem aditivo.	125
Figura 66: Cromatogramas [3 (não recuperado),5 e 7 dias] das reações de bioredução do <i>p</i> -nitroacetofenona [Tr=19,93] utilizando glicose como aditivo.	126
Figura 67: Cromatogramas (3 ,5 e 7 dias) das reações de bioredução do <i>p</i> -nitroacetofenona [Tr=19,93] utilizando frutose como aditivo.	127
Figura 68: Espectro de Infravermelho do <i>p</i> -Nitrofeniletanol.	128
Figura 69: Espectro de ¹ H-RMN do <i>p</i> -Nitrofeniletanol.	128
Figura 70: Espectro de ¹³ C-RMN do <i>p</i> -Nitrofeniletanol.	129
Figura 71: Padrão cromatográfico do reagente (<i>R/S</i>)- <i>p</i> -nitrofeniletanol [Tr(<i>R</i>)=34,91min. e Tr(<i>S</i>)=35,77min.] utilizado nas reações de bioxidação.	129
Figura 72: Cromatogramas (3,5 e 7 dias) das reações de bioxidação do (<i>R/S</i>)- <i>p</i> -nitrofeniletanol [Tr(<i>R</i>)=35,39 e Tr(<i>S</i>)=36,13] sem aditivo.	130
Figura 73: Cromatogramas (3,5 e 7 dias) das reações de bioxidação do (<i>R/S</i>)- <i>p</i> -nitrofeniletanol [Tr(<i>R</i>)=35,39 e Tr(<i>S</i>)=36,13] utilizando glicose como aditivo.	131
Figura 74: Cromatogramas (3,5 e 7 dias) das reações de bioxidação do (<i>R/S</i>)- <i>p</i> -nitrofeniletanol [Tr(<i>R</i>)=35,39 e Tr(<i>S</i>)=36,13] utilizando frutose como aditivo.	132

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Classificação internacional das enzimas de acordo com as reações que catalisam (NELSON e COX, 2014 – Adaptado).	29
Tabela 2: Cofatores inorgânicos utilizando por diversas enzimas (NELSON e COX, 2014 – Adaptado).	30
Tabela 3: Coenzimas utilizadas em reações enzimáticas mais comuns (VOET e VOET, 2013 – Adaptado).	31
Tabela 4: Representação esquemática dos substratos obtidos quimicamente utilizados nas reações de biotransformação.	58
Tabela 5: Caracterização estrutural dos substratos <i>p</i> -metoxifeniletanol 2a e <i>p</i> -nitrofeniletanol 3a por RMN de ^1H [CDCl_3 ; 400MHz; $\delta(\text{ppm})$].	67
Tabela 6: Caracterização estrutural dos substratos <i>p</i> -metoxifeniletanol e <i>p</i> -nitrofeniletanol por RMN de ^{13}C [CDCl_3 ; 100MHz; $\delta(\text{ppm})$].	68
Tabela 7: Caracterização estrutural do substrato 1-(2-furil)-etanol (4a) por RMN de ^1H [CDCl_3 ; 400MHz; $\delta(\text{ppm})$] e ^{13}C [CDCl_3 ; 100MHz; $\delta(\text{ppm})$].	79
Tabela 8: Métodos cromatográficos selecionado de eluição dos substratos utilizado cromatografia a gás com fase estacionária quiral nas reações biocatalíticas.	85

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1: Reação de redução da glicose.....	27
Esquema 2: Progresso catalítico de reação catalisada e não catalisada por enzimas (NELSON e COX, 2014 – Adaptado).	32
Esquema 3: Reações de oxidação de álcoois secundário utilizando oxidantes inorgânicos (SOLOMONS, 2016 – Adaptado).....	35
Esquema 4: Resolução cinética dinâmica de álcoois racêmicos.....	36
Esquema 5: Resolução cinética oxidativa de álcoois racêmicos utilizando complexo quaternário macrocíclicos quirais de Mn (III) como catalisador. (PELLISSIER, 2018 - Adaptado).....	36
Esquema 6: Representação esquemática da resolução cinética oxidativa (XU, 2010).	38
Esquema 7: avaliação biocinética do (<i>R/S</i>)-1-acetato de feniletila frente a diferentes vegetais.	39
Esquema 8: Reação do hidreto de alumínio e lítio com H ₂ O (SMITH, 2010).	41
Esquema 9: Mecanismo proposto de redução de compostos carbonílicos com LiAlH ₄ (SMITH, 2010 - Adaptado).	41
Esquema 10: Redução estereoespecífica da fenilacetona frente a células <i>Kluyveromyces marxianus</i> CBS 6556 (VITALE <i>et al</i> , 2011).....	42
Esquema 11: Representação esquemática das reações de biorredução.	43
Esquema 12: Biorredução assimétrica do (+/-)-4-cloro-acetoacetato de etila utilizando <i>Lactobacillus kefir</i> como biocatalisador.	44
Esquema 13: Representação esquemática das reações de biorredução.	44
Esquema 14: Representação esquemática de biooxidação de álcoois racêmicos. ...	46
Esquema 15: Representação esquemática da biorredução utilizando vegetais.....	47
Esquema 16: Biorredução do racemato [3.3.1] nonano-2,6-diona por enzimas vegetais. (ZILINSKAS, 2013 - Adaptado).	48
Esquema 17: Biorredução de aldeídos aromáticos.	49
Esquema 18: Biorredução de compostos aromáticos.	51
Esquema 19: Biorredução de compostos aromáticos.	52

Esquema 20: Resultados experimentais da biorredução de compostos carbonílicos frente a esponja marinha <i>C. Varinas</i> (SOUSA <i>et al</i> , 2017).	55
Esquema 21: Representação esquemática das reações químicas de redução da <i>p</i> -metoxiacetofenona e do <i>p</i> -nitroacetofenona para obtenção dos substratos racêmicos utilizados nas reações biocatalíticas.	57
Esquema 22: Representação esquemática da reação química de redução do acetilfurano para obtenção do substrato racêmico utilizado nas reações biocatalíticas.....	58
Esquema 23: Porcentagem das áreas cromatograficas normalizadas da biorredução da acetofenona utilizando a esponja marinha <i>C. Varians</i>	59
Esquema 24: Porcentagem das áreas cromatograficas normalizadas da biooxidação da (<i>R/S</i>)-1-feniletanol utilizando a esponja marinha <i>Cliona Varians</i>	62
Esquema 25: Biorredução da (<i>R/S</i>)- <i>p</i> -metoxiacetofenona (2) utilizando a esponja marinha <i>Cliona Varians</i>	68
Esquema 26: Porcentagem das áreas cromatograficas normalizadas obtidas das reações de biorredução da (<i>R/S</i>)- <i>p</i> -nitroacetofenona (3a) utilizando a esponja marinha <i>Cliona Varians</i>	69
Esquema 27: Porcentagem das áreas cromatográficas normalizadas para a reação de bio-oxidação do (<i>R/S</i>)- <i>p</i> -metoxifeniletanol (2a), utilizando a esponja marinha <i>C. varians</i>	71
Esquema 28: Porcentagem das áreas cromatograficas normalizadas da bio-oxidação do (<i>R/S</i>)- <i>p</i> -nitrofeniletanol (3a), utilizando a esponja marinha <i>Cliona Varians</i>	74
Esquema 29: Reação de biorredução do acetilfurano.....	80
Esquema 30: Porcentagem das áreas cromatográficas normalizadas para reação de bio-oxidação do (<i>R/S</i>)-1-(2-furil)-etanol (4a), utilizando a esponja marinha <i>C. varians</i>	80

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	24
1.1 Enzimas	27
1.2 Cromatografia gasosa quiral	33
1.3 Oxidação de álcoois.....	34
1.4 Redução de cetonas.....	41
1.5 Biocatálise empregando vegetais.....	45
1.6 Esponja marinha <i>Cliona Varians</i>	53
2. OBJETIVOS	55
2.1 Objetivos gerais.....	55
2.2 Objetivos Específicos.....	54
3. RESULTADOS E DISCURSÃO	56
3.1 Síntese química dos substratos	56
3.2 Biorredução da acetofenona	58
3.3 Resolução cinética oxidativa do (R/S)-1-feniletanol	61
3.4 Biotransformação dos derivados da acetofenona	65
3.4.1 Emprego de <i>C. varians</i> na biorredução dos derivados da acetofenona	68
3.4.2 Emprego de <i>C. varians</i> em reações de bio-oxidações dos derivados da acetofenona	71
3.5 Emprego da esponja marinha <i>C. varians</i> em reações de biorredução do acetilfurano e resolução cinética oxidativa do (R/S)-1-(2-furil) etanol.....	78
4. CONCLUSÃO	82
5. PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS	84
5.1 Reagentes.....	84
5.2 Reações de biorredução e resolução cinética oxidativa utilizando esponja marinha <i>Cliona varians</i>	84
5.3 Métodos Analíticos de Análise	85

5.4 Rotação Específica	87
5.5 Determinação das conversões e excessos enantioméricos	87
5.6 Síntese dos substratos	87
6. REFERÊNCIAS	91
7. ANEXOS	99

1. INTRODUÇÃO

A crescente demanda pela obtenção de compostos estruturalmente complexos e enantiomericamente puros por indústrias químicas e farmacêuticas, tem aumentado extraordinariamente e promovido uma rápida expansão do mercado mundial para a produção de compostos farmacêuticos, agroquímicos e alimentícios. A atual preocupação com questões ambientais vem incentivando o desenvolvimento de metodologias químicas que sejam sustentáveis. Neste contexto, enquadra-se a biocatálise, uma tecnologia complementar, que oferece valiosa contribuição à síntese orgânica convencional, apresentando altas regio-, quimio- e estereosseletividades (JEGANNATHAN *et al*, 2013; MARSAIOLI e GONÇALVES, 2013).

A utilização de enzimas em processos fermentativos é conhecida desde a antiguidade, como por exemplo, o preparo de queijos pela peptidase fictina extraída da seiva de filgueiras e as amilases, no preparo de cervejas extraídas de malte de cevadas.

Processos biocatalíticos (biotransformação), empregando enzimas isoladas ou células íntegras, tornaram-se uma tecnologia muito atraente como alternativa aos métodos sintéticos convencionais de síntese de compostos orgânicos. A biocatálise desempenha importante papel junto aos diversos ramos da indústria, onde as reações apresentam altos índices de seletividade, minimizam a formação de subprodutos, reduzem o consumo energético e apresentam baixo impacto ambiental, podendo ser inserida no contexto da Química Verde.

A Química Verde é então inserida como uma perspectiva de minimização de rejeitos e desenvolvimento de processos que sejam menos prejudiciais ao homem e ao meio ambiente, seguindo 12 princípios fundamentais. (VARGAS, 1999; PRADO, 2003; LENARDÃO, 2003).

- 1) *Prevenção*: Evitar a produção do resíduo é melhor do que trata-lo ou “limpá-lo” após sua geração.

- 2) *Economia de Átomos*: Desenvolvimentos de metodologias sintéticas que possam maximizar a incorporação de todos os materiais de partida no produto final.
- 3) *Síntese de Produtos Menos Perigosos*: Utilização e geração de substâncias que possuam pouca ou nenhuma toxicidade à saúde humana e ao ambiente.
- 4) *Desenvolvimento de compostos seguros*: Os produtos químicos deverão ser desenvolvidos no intuito de apresentar a menor toxicidade possível.
- 5) *Solventes e Auxiliares mais Seguros*: O uso de substâncias auxiliares (solventes, agentes de separação, secantes, etc.) precisa, sempre que possível, tornar-se desnecessário e, quando utilizadas, estas substâncias devem ser inócuas.
- 6) *Eficiência energética*: Os métodos sintéticos deverão ser conduzidos sempre que possível à pressão e temperatura ambientes, para diminuir a energia gasta durante um processo químico que representa um impacto econômico e ambiental.
- 7) *Uso de substâncias recicladas*: Os produtos e subprodutos de processos químicos deverão ser reutilizados sempre que possível.
- 8) *Evitar a Formação de Derivados*. A derivatização desnecessária (uso de grupos bloqueadores, proteção/desproteção, modificação temporária por processos físicos e químicos) deve ser minimizada ou, se possível, evitada.
- 9) *Catálise*. Reagentes catalíticos (tão seletivos quanto possível) são melhores que reagentes estequiométricos.
- 10) *Desenvolvimento de compostos para degradação*: Produtos químicos deverão ser desenvolvidos para a degradação inócua de produtos tóxicos, para não persistirem no ambiente;
- 11) *Análise em tempo real para a prevenção da poluição*: As metodologias analíticas precisam ser desenvolvidas para permitirem o monitoramento do processo em tempo real, para controlar a formação de compostos tóxicos.

12) Química segura para a prevenção de acidentes: As substâncias usadas nos processos químicos deverão ser escolhidas para minimizar acidentes em potencial, tais como explosões e incêndios.

A quiralidade de substratos envolve um fenômeno interessante: enantiômeros, embora possuam mesmas propriedades físicas e químicas, podem interagir de maneira distinta com o sítio ativo das enzimas. Um dos enantiômeros pode apresentar efeitos terapêuticos benéficos e o outro indesejado; ou mesmo os dois apresentarem a mesma atividade biológica, mas um deles oferecer um efeito indesejado. Sendo assim, o desenvolvimento de metodologias para a produção de moléculas enantomericamente puras tornou-se um desafio. Na figura 1 estão representadas pares de enantiômeros que apresentam diferentes atividades biológicas.

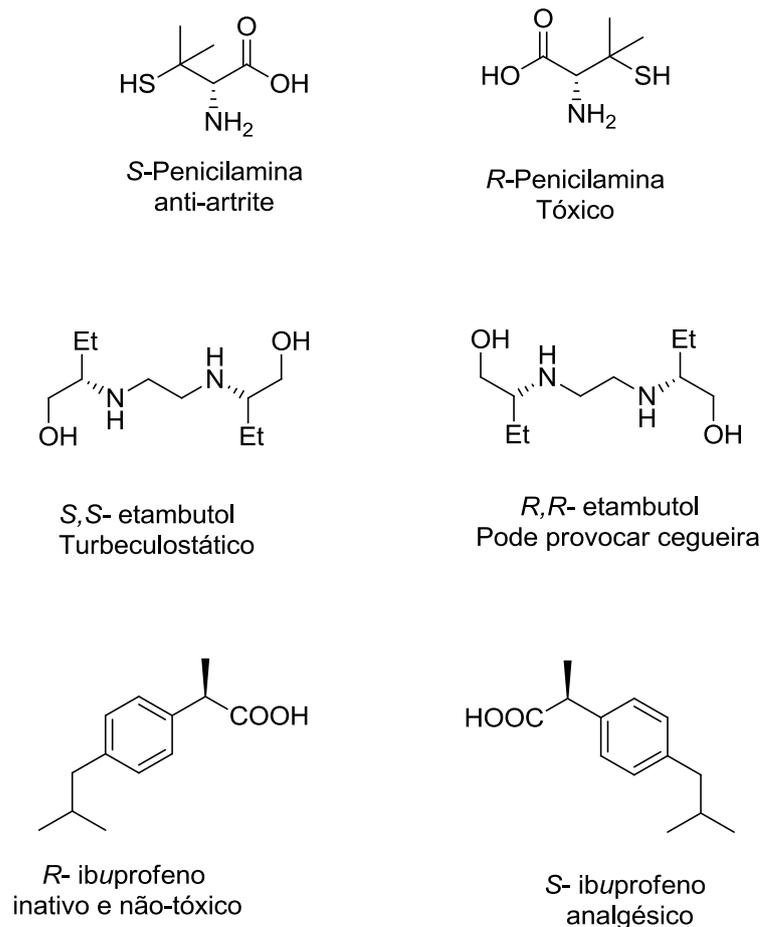


Figura 1: Exemplos de moléculas que apresentam efeitos terapêuticos distintos em função da configuração absoluta.

1.1 ENZIMAS

A reação química entre a glicose e o oxigênio, para produzir gás carbônico e água (Esquema1), libera uma grande quantidade de energia. Entretanto, essa transformação química não ocorre em condições normais de temperatura e pressão, embora esse processo químico seja termodinamicamente favorável, ele é muito lento. Sendo assim, a presença de enzimas como catalisadores aceleram essa reação, aumentando a velocidade de conversão do gás carbônico e de água, demonstrando o poder catalítico das enzimas frente a catalisadores químicos (MARZZOCO e TORRES, 2007; LEHNINGER *et al*, 2014; FABER, 2004).

Esquema 1: Reação de redução da glicose.



A catálise biológica foi inicialmente reconhecida e descrita no final do século XVIII em estudos sobre a digestão da carne, por secreções do estômago (NELSON e COX, 2014), e desde então os estudos por catálise biológica se intensificaram.

Em 1858, Louis Pasteur utilizou uma solução aquosa de sal de amônio do ácido tartárico racêmico com uma cultura do microorganismo *Penicillium glaucum*, levando ao consumo do ácido (+)-tartárico e ao enriquecimento do enantiômero (-), sendo esse experimento considerado um precursor da catálise enzimática. (REETZ, 2013).

Em 1897, Eduard Buchner publicou a observação de que extratos livres de células de leveduras foram capazes de realizar a fermentação de açúcar para álcool e dióxido de carbono. Diante dos experimentos anteriores, em 1894, Emil Fischer demonstrou que a enzima que hidrolisa sacarose, que ele chamou de "Invertina", age sobre α -glicosídeos, enquanto uma segunda enzima "Emulsina" atua os β -glicosídeos. Fischer deduziu que estas duas enzimas devem consistir em "moléculas construídas assimetricamente", e que "a enzima e o glucosídeo devem se encaixar como uma fechadura e chave para poder exercer uma influência química sobre um ao outro". Nesse modelo, a especificidade entre a enzima e o substrato é rígida e a reação é catalisada por um único substrato para fornecer um produto particular. O mecanismo hipotético da "chave e fechadura" de Fischer permaneceu por muito

tempo (BUGG, 2001). Outro modelo hipotético para explicar o processo enzimático é o encaixe induzido proposto por Koshland em 1960. Esta teoria sugere que através da complexação, o substrato induz uma mudança conformacional na subunidade da enzima com a qual interage. Esta mudança pode ser transmitida aos grupos ionizáveis, nesse caso, as subunidades dos aminoácidos vizinhos, induzindo na enzima a conformação responsável pelo processo catalítico (Figura 2) (FERSHT, 1998; VERLI, 2013).

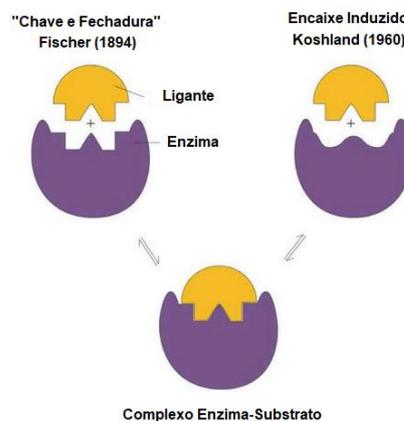


Figura 2: Modelos hipotéticos mecanístico da catalise enzimática. (Adaptado – Voet e Voet, 2013).

As enzimas são proteínas de cadeia longa, formadas por aminoácidos ligados em sequência, através de ligações peptídicas. Apresentam atividade catalítica ou inibidores reversíveis e irreversíveis, que interferem na catálise, diminuindo ou interrompendo as reações enzimáticas. As reações enzimáticas ocorrem em uma parte da enzima denominada de sítio ativo. O contorno da superfície do sítio ativo é delimitado por resíduos de aminoácidos com grupos nas cadeias laterais que ligam o substrato através de interações intermoleculares que catalisam a sua transformação química (NELSON e COX, 2014, 2014). Devido a diversidade enzimática, as enzimas foram divididas em classes e classificadas de acordo com as reações que catalisam (Tabela 1). As enzimas são catalisadores biológicos interessantes devido à gama de biotransformações que realizam em substratos endógenos, sendo, às vezes, mais eficientes e com velocidades de reações mais significativas por fatores de 10^6 - 10^{12} do que a catalise química convencional (SOLOMONS e FRYHLE, 2001).

Tabela 1. Classificação internacional das enzimas de acordo com as reações que catalisam (NELSON e COX, 2014 – Adaptado).

Nº da classe	Classe	Tipo de reação catalisada
1	Oxidoredutases	Transferência de elétrons (íons hidreto – H ⁻)
2	Transferases	Reações de transferência de grupos
3	Hidrolases	Reações de hidrólise (transferência de grupos funcionais para a água)
4	Liasas	Clivagem de C-C, C-O e C-N ou outras ligações por eliminação, rompimento de ligações duplas ou anéis, ou adição de grupos a ligações duplas.
5	Isomerasas	Transferência de grupos dentro de uma mesma molécula produzindo formas isoméricas.
6	Ligases	Formação de ligações C-C, C-S, C-O e C-N por reações de condensação acopladas à hidrólise de ATP ou cofatores similares.

Ao longo do século XX as pesquisas utilizando processos biocatalíticos se intensificaram devido à gama de aplicabilidade nas indústrias, capacidade de catalisar reações em alta taxas enantioméricas, em água a pH neutro, à temperatura ambiente e com altas seletividades. O rápido avanço envolvendo reações enzimáticas permitiu a aplicabilidade dos seus processos em vários setores, como na produção de alimentos, na fabricação de detergentes e nas indústrias têxtil e médico-farmacêutica. As enzimas podem ser encontradas em células animais ou de plantas, bem como em microrganismos. As reações de biotransformações podem ser realizadas com sistemas biológicos *in natura*, como plantas ou células ou mesmo enzimas isoladas quando o objetivo for minimizar reações laterais indesejáveis (NASCIMENTO *et al*, 2004; RIBEIRO *et al*, 2013).

Tabela 2: Cofatores inorgânicos utilizados por diversas enzimas (NELSON e COX, 2014 – Adaptado).

Íons	Enzimas
Cu^{2+}	Citocromo-oxidase
Fe^{2+} ou Fe^{3+}	Citocromo-oxidase, catalase, peroxidase
K^+	Piruvato-cinase
Mg^{2+}	Hexocinase, glicose-6-fosfatase, piruvato-cinase
Mn^{2+}	Arginase, ribonucleotídeo-redutase
Mo	Dinitrogenase
Ni^{2+}	Urease
Zn^{2+}	Anidrase carbônica, álcool-desidrogenase, carboxipeptidases A e B

As reações enzimáticas dependem da integridade das estruturas (primária, secundária, terciária e quaternária) e das interações intermoleculares que mantêm as suas conformações. Portanto, uma alteração conformacional da enzima inativa a sua atividade catalítica. Algumas enzimas necessitam de cofatores (Tabela 2) ou coenzimas (Tabela 3) para atuarem como biocatalisadores, pois juntos possuem uma função catalítica imprescindível para que as reações aconteçam, como por exemplo, as álcoois redutases, um tipo de enzima da classe das oxirredutases (Tabela 1), necessitam de íons Zn^{2+} para sua atividade enzimática (NELSON e COX, 2014).

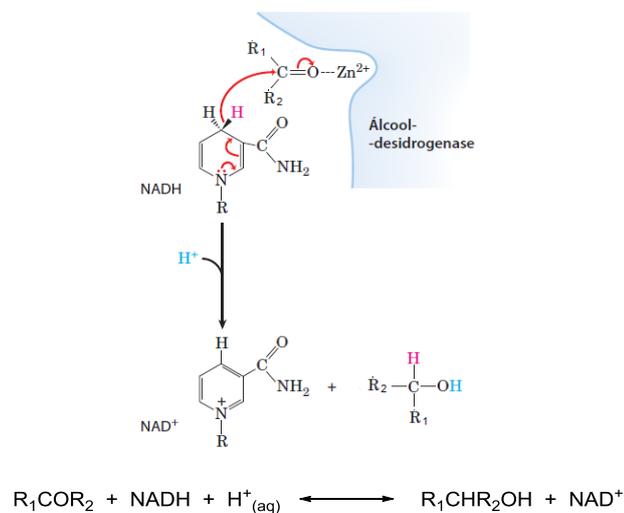


Figura 3: Mecanismo proposto para a reação de redução de cetonas pró-quiral pela enzima álcool desidrogenase (NELSON e COX, 2014 – Adaptado).

As enzimas oxirredutases são as responsáveis pela transferência de elétrons, entre ligantes e a cadeia polipeptídica, em um processo de oxirredução. Dentro dessa classe enzimática, a álcool desidrogenase (ADH) catalisa a redução de cetonas e a oxidação de álcoois primário e secundário a aldeídos e cetonas, respectivamente. A enzima álcool desidrogenase utiliza o íon zinco (Zn^{2+}), e por não apresentar a função redox, necessita do sistema de coenzimas $NAD^+/NADH$ (nicotina-adenina-dinucleotídeo). Na Figura 3 está representado o mecanismo proposto para a redução enzimática de cetonas pró-quirais. Um átomo de Zn^{2+} é coordenado no sítio ativo por resíduos de aminoácidos. O mecanismo reacional procede com o Zn^{2+} polarizando a ligação $C=O$, seguido do ataque do hidreto pelo cofator $NADH$. O intermediário reduzido adquire um próton do meio, formando o produto de interesse, e liberando o cofator NAD^+ oxidado. Por outro lado, na reação reversa de oxidação, o íon zinco, atua aumentando a eletrofilicidade do átomo de carbono da ligação $C-O$, facilitando a posterior abstração do próton pelo cofator NAD^+ (CRICHTON, 2012; NELSON e COX, 2014).

As coenzimas são pequenas moléculas orgânicas, que junto com certas classes de enzimas, possuem a função de catálise enzimática. A existência das coenzimas foi proposta pela primeira vez por Arthur Harden, que identificou espécies dialisáveis que denominou “co-zymase”, envolvidas em fermentação biológica. Esta espécie foi posteriormente identificada por Hans Von Euler como $NADH$ (Dinucleotídeo de nicotinamida adenina). A composição química e as estruturas de algumas coenzimas também foram elucidadas no período 1930-1950. Muitas das coenzimas nucleotídicas, tais como ATP , $NAD^+/NADH$, $FAD^+/FADH$, e coenzima B_{12} foram sintetizadas por Alexander Todd, que recebeu o prêmio Nobel em 1957 (BUGG, 2001).

Tabela 3: Coenzimas utilizadas em reações enzimáticas mais comuns (VOET e VOET, 2013 – Adaptado).

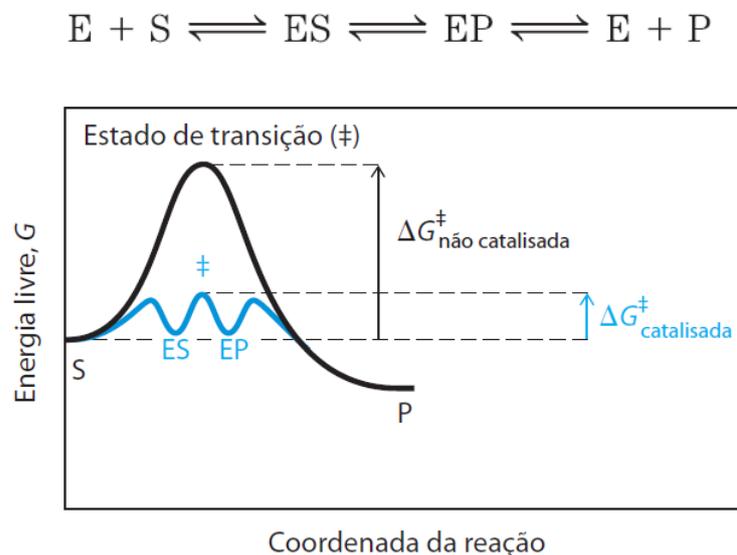
Coenzimas	Reação que catalisa
Biotina	Carboxilação
Coenzimas da cobalamina (B_{12})	Alquilação
Coenzima A	Transferência de acila
Coenzima da flavina	Oxidorredução
Ácido Lipoico	Transferências de acilas

Coenzimas da nicotinamida	Oxidorredução
Piridoxal-fosfato	Transferência de grupo amina
Tetra-hidrofolato	Transferência de grupos com um carbono
Tiamina-pirofosfato	Transferência de aldeído
ATP	Fosfoliração

As reações enzimáticas envolvem o estudo da velocidade das reações. O estudo da cinética de uma enzima permite elucidar os detalhes do mecanismo catalítico, função no metabolismo e modulação da atividade na célula. No Esquema 2 está representada uma equação química hipotética da reação enzimática, onde E e S representam a enzima e o substrato, respectivamente. ES e EP representam os complexos enzima-substrato e enzima-produto, intermediários da reação que ocupam um nível mínimo de energia na curva da progressão da reação catalisada por uma enzima.

De acordo com o gráfico, a reação catalisada enzimaticamente é muito mais rápida que o processo não catalisado, pois a barreira energética é menor nas reações catalisadas por enzimas, quando comparadas a uma reação não catalisada. As enzimas são catalisadores biológicos eficientes, que diminuem a barreira energética, sem modificar o equilíbrio reacional e acelerando a interconversão de substrato em produto (Esquema 2).

Esquema 2: Progresso catalítico de reação catalisada e não catalisada por enzimas (NELSON e COX, 2014 – Adaptado).



A estereosseletividade da enzima álcool desidrogenase pode ser prevista pela regra de Prelog (1964); esta regra indica que o substrato pró-quiral possui grupo grande e um grupo pequeno, que no sítio ativo controlam a estereosseletividade da adição do hidreto. As enzimas álcool desidrogenases são dependentes da presença de cofator, NADH ou NAD(P)H, que são as moléculas responsáveis pela transferência estereoespecífica de um dos hidretos diastereotópicos em C-4 de NADH ou NAD(P)H à carbonila do substrato com alta seletividade enantiofacial, como descrito na Figura 4 (ITOH, 2014; WONG *et al*, 1995). Em reações de redução, para que a reação ocorra, é preciso que a fonte enzimática disponha de desidrogenases estereosseletivas, que de acordo com a regra de Prelog, seguem uma ordem de prioridade: Grupos volumosos (de maior prioridade) devem estar localizados à direita da carbonila e, grupos pequenos (de menor prioridade), à esquerda. Assim, o hidreto é transferido prioritariamente através da face *re* da carbonila. A seletividade chamada de Prelog leva a formação de (*S*)-álcoois e a seletividade anti-Prelog, leva a formação de (*R*)-álcoois.

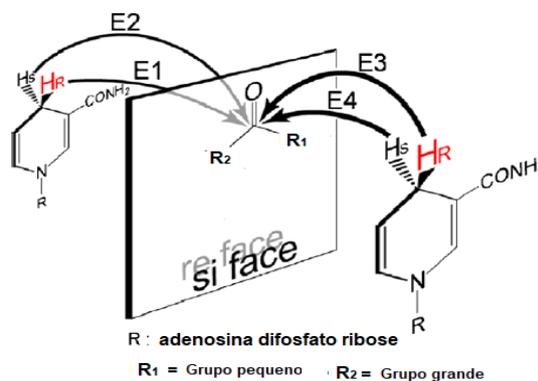


Figura 4: Faces enantiotópicas propostas por PRELOG para seletividade enantioméricas de cetonas pró-quirais (ITOH, 2014; PRELOG, 1964 - Adaptado)

1.2 CROMATOGRAFIA GASOSA QUIRAL

Na cromatografia utilizando fase estacionária quiral consiste de uma fase estacionária quiral, onde passa uma fase móvel que contém uma mistura de enantiômero. Cada enantiômero interage reversivelmente em diferentes graus com o suporte quiral e, portanto ficam retidos na coluna por períodos de tempos diferentes. Assim, um dos enantiômeros passa pela coluna antes do outro, permitindo a separação (VOLLHARD, 2013.).

O seletor quiral (fase estacionária) é composto de uma substância quiral enantiomericamente pura que interage com a mistura de estereoisômeros da amostra de maneira distinta, formando diastereoisoméricas com propriedades químicas e físicas diferentes. O “recheio” da fase estacionária quiral normalmente é constituído a partir de ciclodextrinas, oligossacarídeos cíclicos, que possuem no mínimo 6 unidades de glicoses unidas por ligação α -(1,4). A β -ciclodextrina (Figura 5) é a fase estacionária mais utilizada devido ao seu baixo custo e fácil comercialização. A cromatografia gasosa quiral é uma técnica muito vantajosa para identificação enantiomérica, quando comparada á outras técnicas de separação, principalmente devido a sua rapidez, reprodutibilidade e sensibilidade (PORTE *et al*, 2014; SILVA *et al*, 1996).

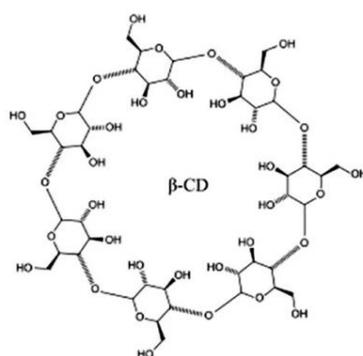


Figura 5: Estrutura química da β -ciclodextrina.

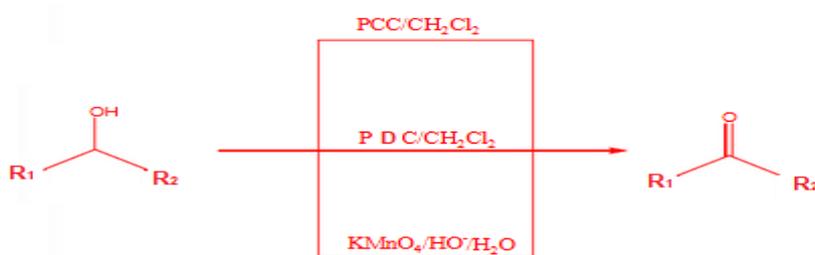
1.3 OXIDAÇÃO DE ÁLCOOIS

No século XX, o aumento da produção industrial impulsionou a produção por processos ambientalmente mais limpos, chamados de “verdes”, sendo assim, a procura por metodologias sintéticas, que visam a diminuição de resíduos, se intensificou em demanda, ao rápido avanço do setor industrial. Nesse contexto, surgiu o conceito de “Química Verde”, que segundo a *International Union of Pure and Applied Chemistry* (IUPAC) pode ser definida como: "A invenção, desenvolvimento e aplicação de produtos e processos químicos para reduzir ou eliminar o uso e a geração de substâncias perigosas". A oxidação de álcoois é uma importante metodologia aplicada no setor industrial, pois os produtos oriundos desse tipo de transformação química são precursores e auxiliares de quiralidade (ZORZANELLI e MULI, 2015). Entre as metodologias utilizadas, podemos citar, por exemplo, os oxidantes inorgânicos à base de cromo (trióxido de cromo (CrO_3),

dicromato de piridínio (PDC) e clorocromato de piridínio (PCC), de manganês [permanganato de potássio (KMnO_4)], dióxido de manganês (MnO_2), entre outros (Esquema 3) (BOWDEN *et al*, 1946; FATIADI, 1987; COREY e SUGGS, 1975; ZORZANELLI e MULI, 2015).

As rotas sintéticas convencionais, utilizadas amplamente para oxidação de álcoois, são à base dos reagentes oxidantes como PCC (clorocromato de piridínio) e o PDC (dicromato de piridínio), devido à facilidade de obtenção, condições brandas de reação, e na maioria das vezes, as sínteses são realizadas à temperatura ambiente (Esquema 3). O PCC e o PDC são oxidantes inorgânicos muito utilizados para converter álcoois secundários em cetonas e álcoois primários em aldeídos, de maneira bastante eficiente. A grande desvantagem destas metodologias é a geração de cromo como resíduo, sendo altamente tóxico para o meio-ambiente, podendo provocar lesões carcinogênicas, bronquite e dermatite (ZORZANELLI e MULI, 2015). O permanganato de potássio (KMnO_4) é outro agente oxidante inorgânico muito forte, e pouco seletivo, pode oxidar álcoois primários a ácidos carboxílicos. Os resíduos derivados de manganês também são tóxicos e podem provocar sérios danos, principalmente, se descartados de forma inadequada. Quando absorvido pelo organismo, o manganês é distribuído para todas as células do corpo, podendo ligar-se às proteínas plasmáticas no sangue, no fígado, pâncreas, rins e intestino (ZORZANELLI e MULI, 2015).

Esquema 3: Reações de oxidação de álcoois secundário utilizando oxidantes inorgânicos (SOLOMONS, 2016 – Adaptado).



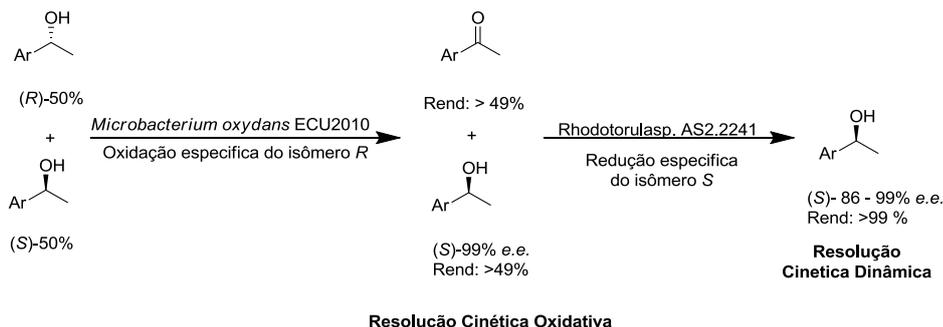
A resolução cinética de alcoóis, através da oxidação seletiva (Esquema 4), é um processo no qual os enantiômeros de um racemato são convertidos na cetona correspondente, em diferentes velocidades e enriquecendo o isômero que reage mais lentamente. A limitação deste processo é a obtenção máxima de 50% do enantiômero majoritário. A resolução cinética dinâmica é uma estratégia mais

7	CH ₂ Bn	Me	60	93
8	Et	Me	58	99

Complexos metálicos quirais podem ser empregados como catalisadores em reações de redução assimétrica de cetonas com muita eficiência (NAKAMURA *et al*, 2003). No entanto, a principal desvantagem do uso de compostos metálicos está na preparação e uso desses catalisadores, pois são caros, exigem condições reacionais extremas (temperaturas e pressões), solventes orgânicos são empregados e geram resíduos poluentes, de difícil tratamento e descarte (VANDENBERGHE *et al*, 2013).

A necessidade de desenvolver rotas sintéticas menos agressivas para o meio-ambiente e para os seres humanos, levou ao crescimento da área da biocatálise, metodologia que emprega enzimas para realização de reações químicas. Considerando que álcoois quirais são importantes blocos construtores (“chiral building blocks”) de moléculas biologicamente ativas, são intermediários sintéticos que possuem alto valor agregado. Neste contexto, inúmeras metodologias biocatalíticas têm sido desenvolvidas focando na obtenção desta classe de compostos (KRAGL *et al*, 2011; PATEL, 2018; PORTO *et al*, 2015).

Xu (2010) avaliou a resolução cinética oxidativa e dinâmica de sete álcoois secundários aromáticos racêmicos, utilizando células inteiras das cepas *Microbacterium oxydans* ECU2010 e *Rhodotorula sp.* AS2. 224 (Esquema 6). Primeiramente, os álcoois secundários foram submetidos à reação de oxidação enantiosseletiva catalisadas por *M. oxydans* ECU2010. Para todos os substratos testados, as reações apresentaram altos rendimentos (> 49,9%) e excelentes enantiosseletividades em favor do isômero de configuração S (> 99% e.e.). Visando aperfeiçoar os resultados, o processo de resolução cinética foi seguido de resolução cinética dinâmica. Para isso, em um processo *one-pot*, foi adicionada a cepa *Rhodotorula sp.* AS2. 224 e foi observada a redução da cetona intermediária. Os resultados da combinação dos dois microorganismos proporcionaram álcoois secundários opticamente puros com altos rendimentos (86-99%) e excelente pureza óptica (> 99% e.e.) em favor dos álcoois de configuração S e seletividade Prelog (PRELOG, 1964) (Esquema 6).

Esquema 6: Representação esquemática da resolução cinética oxidativa (XU, 2010).

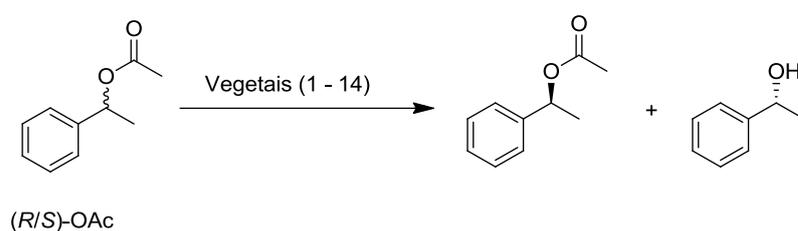
Entrada	Substrato	Resolução Cinética Oxidativa		Resolução Cinética Dinâmica	
		Conv. (%)	e.e. (%)	Conv. (%)	e.e. (%)
		(%)			
1	(R/S)- 1-feniletanol	>49	>99 (S)	95	>99 (S)
2	(R/S)- <i>p</i> -clorofeniletanol	>49	>99 (S)	98	>99 (S)
3	(R/S)- <i>p</i> -metilfeniletanol	>49	>99 (S)	>99	>99 (S)
4	(R/S)- <i>p</i> -nitrofeniletanol	>49	>99 (S)	98	>99 (S)
5	(R/S)- <i>p</i> -bromofeniletanol	>49	>99 (S)	98	>99 (S)
6	(R/S)-1-(2-naftil) -etanol	>49	>99 (S)	86	>99 (S)
7	(R/S)-1-piridin-3-iletanol	>49	>99 (S)	>99	>99 (S)

O processo de hidrólise enzimática é muito vantajoso somente se todos os compostos obtidos no final da reação tiverem utilidade sintética. Na resolução por hidrólise assimétrica, uma reação considerada ideal é aquela em que o catalisador é absolutamente estereosseletivo, ou seja, no final da reação 50% do produto enantiopuro é obtido, enquanto que 50% do substrato enantiopuro permanece no final da reação (VANDENBERGHE *et al*, 2013).

No intuito de valorizar a fauna e a flora local empregando-os como fontes enzimáticas em processos biocatalíticos, Vandenberghe *et al* (2013) investigaram vários vegetais recém cortadas, sem qualquer outro processamento, para realizar a hidrólise enantiosseletiva do (R/S)-1-acetato de feniletila (Esquema 7), um intermediário sintético de alto valor comercial, presente em etapas da síntese de fármacos como o ibuprofeno e naproxeno. Os vegetais selecionados pelos autores

para a investigação foram: maçã (*Malus pumila* var. Reinette), mandioca branco (*Tragopogon porrifolius* L.), cebola vermelha e amarela (*Allium cepa* L.), tomate (*Solanum Lycopersicum* L. var. Licorossa, Kumato), gengibre (*Zingiber officinale* Roscoe), cenoura (*Daucus carota* L.), repolho (*Brassica oleracea* var capitata), laranja (*Citrus sinensis* L.), aipo verde e branco (*Apium graveolens* cv. Dulce), chicória (*Cichorium intybus* var. Foliosum hegi), batata (*Solanum tuberosum* L.) e beterraba vermelha (*Beta vulgaris* L.).

Esquema 7: avaliação biocinética do (*R/S*)-1-acetato de feniletila frente a diferentes vegetais.



Entrada	Vegetais	Amostra	Conv (%)	(S)-OAc (%)	(R)-OAc (%)	(R)-OH (%)	(S)-OH (%)
1	<i>M. pumila</i>	Casca	68	1	99	23	77
2	<i>T. porrifolius</i>	Casca	47	56	44	59	41
3	<i>T. porrifolius</i>	Polpa	26	50	50	50	50
4	<i>A. cepa</i> L.	Polpa	46	80	20	79	21
5	<i>A. cepa</i> L.	Polpa	28	65	35	78	22
Casca e							
6	<i>Lycopersicum</i>	Polpa	52	80	20	74	26
7	<i>Lycopersicum</i>	Polpa	43	72	28	75	25
Casca e							
8	<i>Lycopersicum</i>	Polpa	45	65	35	67	33
9	<i>Lycopersicum</i>	Polpa	44	66	34	68	32
10	<i>Z. officinale</i>	Casca	39	63	37	69	31
11	<i>Z. officinale</i>	Polpa	17	55	45	79	21
12	<i>D. carota</i> L.	Casca	54	66	34	63	37
13	<i>D. carota</i> L.	Polpa	37	62	38	71	29
14	<i>B. oleracea</i>	Polpa	76	64	36	54	46
15	<i>C. sinensis</i> L.	Casca e	78	56	44	52	48

Polpa							
16	<i>A. graveolens</i>	Polpa	56	90	10	66	34
17	<i>A. graveolens</i>	Polpa	73	98	2	62	38
18	<i>C. intybus</i>	Polpa	12	51	49	51	49
19	<i>S. tuberosum</i>	Casca	84	98	2	59	41
20	<i>S. tuberosum</i>	Casca	73	94	6	66	34
21	<i>S. tuberosum</i>	Casca	71	91	9	66	34
22	<i>S. tuberosum</i>	Casca	68	88	12	68	32
23	<i>S. tuberosum</i>	Casca	75	95	5	64	36
24	<i>S. tuberosum</i>	Casca	73	93	7	66	34
25	<i>S. tuberosum</i>	Casca	83	98	2	60	40
26	<i>S. tuberosum</i>	Casca	86	98	2	58	42
27	<i>B. vulgaris</i> L.	Casca	68	100	0	70	30
28	<i>B. vulgaris</i> L.	Polpa	53	100	0	83	17

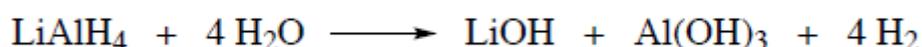
Os experimentos foram realizados com a polpa, as cascas e polpas e cascas juntas (Esquema 7). Entre os vegetais investigados, a casca de *T. porrifolius* L., o *S. Lycopersicum* L. var. Licorossa e as cascas de *D. carota* L. foram os vegetais que apresentaram resultados de conversões mais próximas à 50%. Entretanto, a polpa da *B. vulgaris* L. [(Conv.=53%; e.e.=66% (R)], entre os vegetais testados, foi a que demonstrou melhor eficiência. A *C. intybus* var. Foliosum hegi (Conv.= 12%; e.e. = ND) foi o vegetal que apresentou menor atividade catalítica frente à hidrólise do substrato testado (Esquema 7).

De acordo com os autores, a utilização de vegetais *in natura* como biocatalisadores apresentam muitas vantagens, entre elas, baixo custo, rápida taxa de reação, alta enantiosseletividade, condições suaves e menor produção de rejeitos poluentes. Sendo assim, é uma alternativa interessante para a resolução de acetatos racêmicos, para obtenção de álcoois secundários opticamente ativos.

1.4 REDUÇÃO DE CETONAS

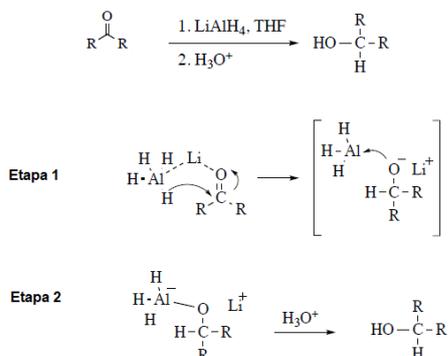
Os dois agentes redutores mais amplamente utilizados nas reduções de cetonas são hidreto de alumínio e lítio (LiAlH_4) e boro-hidreto de sódio (NaBH_4). Entre eles, o hidreto de alumínio e lítio é um agente redutor muito versátil, é estável à temperatura ambiente, mas reage violentamente com a umidade do ar, gerando gás hidrogênio, que é inflamável (Esquema 8).

Esquema 8: Reação do hidreto de alumínio e lítio com H_2O (SMITH, 2010).



O LiAlH_4 é amplamente utilizado para reduzir diversos compostos carbonílicos, incluindo os aldeídos, cetonas, ácidos carboxílicos, anidridos de ácido, cloretos de ácido, ésteres, lactonas, amidas, carbamatos, imidas e lactamas, sendo desvantajoso quanto à sua seletividade, pois reage vários grupos carbonílicos presentes na molécula.

Esquema 9: Mecanismo proposto de redução de compostos carbonílicos com LiAlH_4 (SMITH, 2010 - Adaptado).

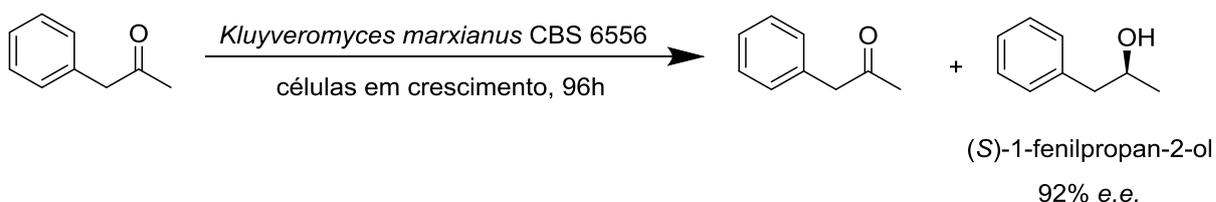


O mecanismo de redução proposto segue como descrito no Esquema 9. Na etapa 1 o lítio coordena ao oxigênio, enfraquecendo a ligação $-\text{C}=\text{O}-$, formando o alcóxialumínio intermediário e deixando o carbono mais eletrofílico. Em seguida, o hidreto “ataca” o carbono carbonílico, deficiente em elétrons, formando um intermediário tetraédrico. Na etapa 2, o alcóxido é protonado, formando o álcool racêmico de interesse.

Em comparação ao LiAlH_4 , o NaBH_4 é menos reativo e mais seletivo, muitas vezes reduzindo aldeídos, cetonas ou cloretos de ácido na presença de outros grupos funcionais redutíveis. Na redução de compostos pró-quirais utilizado LiAlH_4 ou NaBH_4 não ocorre um controle estereoquímico, formando os isômeros em quantidades equivalentes (Esquema 9; Figura 8).

A obtenção de compostos racêmicos não tem valor comercial significativo, pois são os compostos enantiomericamente puros que apontam uma importância biológica, uma vez que, a maioria dos receptores endógenos de fármacos, como proteínas de membranas e enzimas também são compostos quirais. Sendo assim, muitos fármacos quirais apresentam diferenças estereosseletivas significativas quanto à potência, toxicidade, absorção e metabolismo (ORLANDO *et al*, 2007). As cetonas pró-quirais são uma classe de compostos interessantes para obtenção de álcoois quirais. Os álcoois são intermediários importantes na síntese de diversos fármacos, principalmente na forma enantiomericamente pura. Vitale *et al* (2011) avaliaram a eficiência das células em crescimento de *Kluyveromyces marxianus* CBS 6556, frente à redução estereosseletiva da fenilacetona (Esquema 10). O álcool formado, 1-fenilpropan-2-ol, é um importante intermediário na preparação de L-deprenil, um fármaco que atua como inibidor seletivo e irreversível da Monoamina Oxidase B (enzima responsável pela degradação da dopamina), usado no tratamento de distúrbios neurodegenerativos, como a doença de Alzheimer e Parkinson. As células da levedura *Kluyveromyces marxianus* CBS 6556 demonstraram alta estereosseletividade pelo (S)-1-fenilpropan-2-ol e 92% de e.e. em 96h de reação.

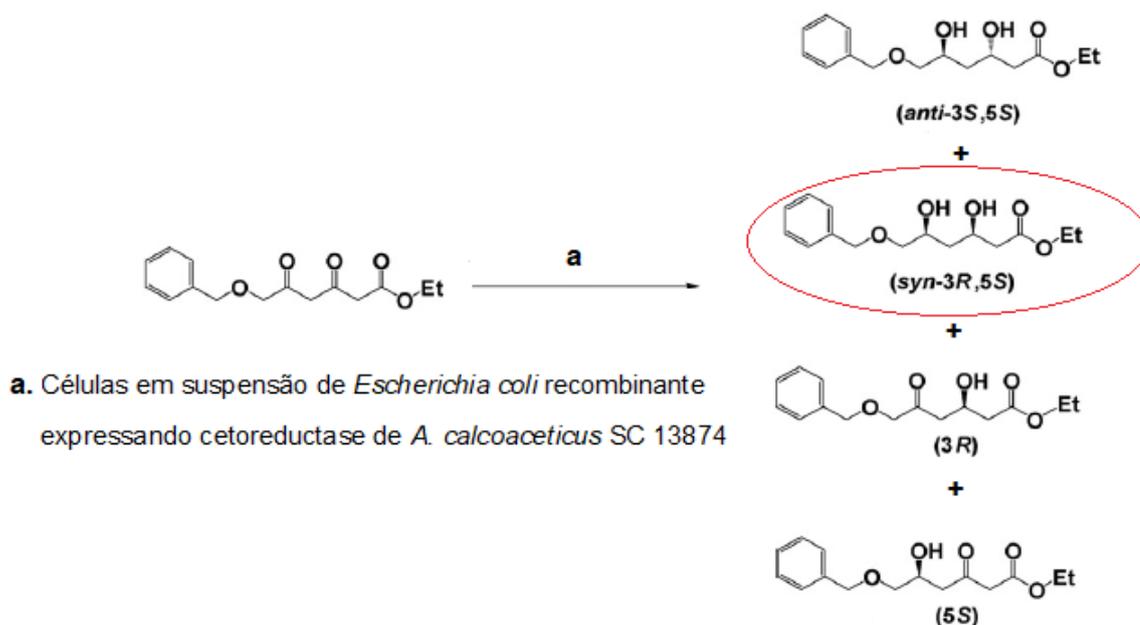
Esquema 10: Redução estereoespecífica da fenilacetona frente a células *Kluyveromyces marxianus* CBS 6556 (VITALE *et al*, 2011).



Os hidróxi-ésteres são intermediários úteis para sintetizar compostos bioativos quirais. Patel (2008) investigou a síntese de um importante intermediário presente nas estruturas das estatinas (Esquema 11). As estatinas são uma classe de

fármacos utilizados como agentes hipolipemiantes e para a prevenção de doenças cardiovasculares, atuando na inibição da 3-hidroxi-3-metilglutaril Coenzima A (HMG-CoA) redutase, uma enzima encontrada no tecido hepático que desempenha papel fundamental na produção de colesterol no corpo.

Esquema 11: Representação esquemática das reações de biorredução.

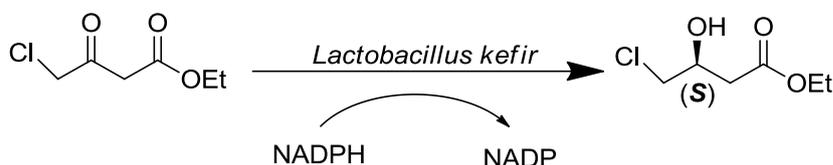


Entrada	Compostos	Conv. (%)	e.e. (%)
1	<i>Anti-3S, 5S</i>	0,8	-
2	<i>Syn-3R, 5S</i>	99,2	100
3	3R-OH	0	-
4	5S-OH	0	-
5	Reagente	0	-

No Esquema 11 estão expressas as conversões e os e.e. dos produtos que foram quantificados e isolados nas reações de biorredução. O produto de interesse, o *syn-(3R,5S)*-diidroxíéster, foi obtido em excelente conversão (99%) e enantiosseletividade (100%). Nesse caso, as células em suspensão de *Escherichia coli* recombinante, expressando cetoreductase de *A. calcoaceticus* SC 13874, demonstraram eficiência catalítica significativa e uma rota atrativa para a síntese do *syn-(3R, 5S)*-diidroxíéster opticamente puro.

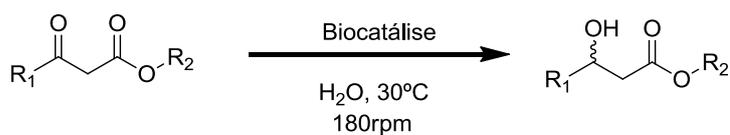
Outro intermediário chave na construção de moléculas inibidoras da HMG-CoA redutase foi descrito por Amidjojo e Weuster-Botz (2005). Os autores destacaram a síntese do (S)-etil-4-cloro-3-hidroxi-butanoato (Esquema 12). O β -ceto-éster foi reduzido com 99% de e.e. em favor do isômero de configuração S e um rendimento final de 97%, utilizando células de *Lactobacillus kefir* como biocatalisador. A baixa solubilidade do β -ceto-éster em meio aquoso não diminuiu a seletividade da enzima pelo substrato (Esquema 12).

Esquema 12: Biorredução assimétrica do (+/-)-4-cloro-acetoacetato de etila utilizando *Lactobacillus kefir* como biocatalisador.



Devido à importância biológica dos β -ceto-ésteres como intermediários e a ampla possibilidade de funcionalização das suas estruturas poli-oxigenadas, Uchôa e colaboradores (2017) descreveram o uso de *Dioscorea trifida* L. (Inhambu) e *Opuntia ficus-indica* L. (Palma) em reduções enantiosseletivas de β -ceto-ésteres substituídos. Os autores investigaram o potencial biocatalítico do inhambu e da palma frente a três β -ceto-ésteres [acetoacetato de etila, acetoacetato de cicloexila e 5-(*terc*-butildimetilsililoxi)-3-oxo-pentanoato de metila] com diferentes substituintes alquilas ligados à carbonila da cetona e diferentes grupos álcoxi ligados à carbonila do éster, no intuito de verificar a influência de grupos volumosos na preferência enantiotópica das enzimas presentes nos biocatalisadores investigados (Esquema 13).

Esquema 13: Representação esquemática das reações de biorredução.



$R_1 = Me$

$R_1 = Me$

$R_1 = 5-(\text{terc-butildimetilsililoxi})$;

$R_2 = Me$

$R_2 = \text{Ciclohexil}$

$R_2 = Me$

Os autores obtiveram excelentes conversões (83 – 100%) em todos os substratos testados e excessos enantioméricos variados (30 – 81%). Todos os ensaios testados seguiram seletividade Prelog. Ambas as espécies de plantas (inhambu e palma) apresentam sistemas enzimáticos capazes de reduzir os β -ceto-ésteres pró-quirais em β -hidroxiésteres quirais, sendo a palma o catalisador mais eficiente.

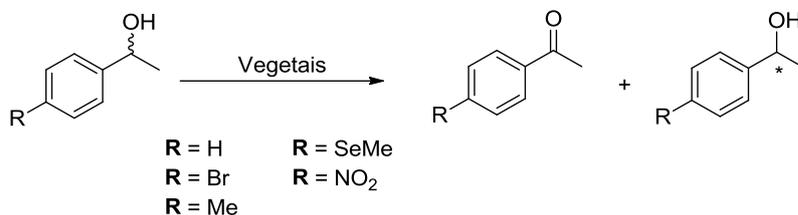
1.5 BIOCATÁLISE EMPREGANDO VEGETAIS

A capacidade de fontes naturais para induzir a quiralidade é conhecida há muito tempo. Na literatura, nos últimos anos, estão relatados vários estudos experimentais utilizando plantas e vegetais *in natura* em reações de biotransformação (MACHADO *et al*, 2006; YADAV *et al*, 2002; ALVES *et al*, 2015). Buscando investigar os vegetais locais na síntese assimétrica, Andrade e colaboradores (2006) avaliaram o potencial catalítico da biooxidação do (*R/S*)-1-feniletanol e seus respectivos derivados, frente a 15 tubérculos e raízes (Esquema 14). Os tubérculos utilizados nos experimentos foram a bardana (*Arctium lappa L.*); batata doce branca (*Ipomoea batatas L.*); batata doce vermelha (*I. batatas L.*); batata (*Solanum tuberosum L.*); inhame (*Dioscorea alata L.*); taro (*Colocasia esculenta L.*) e as raízes utilizadas foram as de beterraba (*Beta vulgaris L.*); cebolinha [*Allium schoenoprasum L.*]; coentro (*Coriandrum sativum L.*); gengibre (*Zingiber officinale*); lótus (*Nelumbo nucifera*); mandioca (*Manihot esculenta*); mandioquinha (*Arracacia xanthorrhiza*); nabo (*Brassica rapa L.*); rabanete (*Raphanus sativus L.*); yacon (*Polymnia sonchifolia*). O (*R/S*)-1-feniletanol apresentou os melhores resultados utilizando as raízes de cebolinha, levando a configuração do isômero *R* majoritário [Conv:54%; e.e.:>98% (*R*)]. Após utilização do substrato modelo, os autores prosseguiram os experimentos utilizando o (*R/S*)-*p*-bromofeniletanol, (*R/S*)-*p*-metilfeniletanol, (*R/S*)-*p*-nitrofeniletanol e (*R/S*)-*p*-metilseleniofeniletanol (Esquema 14).

Utilizando o (*R/S*)-*p*-bromofeniletanol, o inhame foi a raiz que apresentou o melhor resultado [Conv: 47%; e.e.: 83%(*S*)], seguido do gengibre utilizando o (*R/S*)-*p*-metilfeniletanol [Conv: 32%; e.e.: 86%(*R*)]. As raízes de beterraba foram a melhor fonte de biocatalisador para a oxidação completa de (*R/S*)-*p*-metilseleniofeniletanol

[Conv: 55%; e.e.:79% (*R*)], seguida do rabanete [Conversão:54%; e.e.:77% (*R*)] e coentro [Conv:54%; e.e.:77% (*R*)], respectivamente.

Esquema 14: Representação esquemática de bioxidação de álcoois racêmicos.



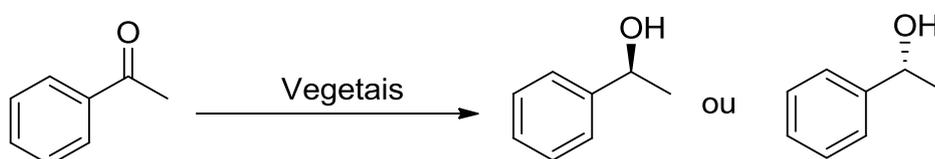
Entrada	Substano	Vegetal	Conv. (%)	e.e. (%)
1	(<i>R/S</i>)-1-feniletanol	Cebolinha (<i>A. schoenoprasum</i>)	54	>98(<i>R</i>)
2	(<i>R/S</i>)-1-feniletanol	Mandioquinha (<i>A. xanthorrhiza</i>)	98	97(<i>S</i>)
3	(<i>R/S</i>)-1-feniletanol	Gengibre (<i>Z. officinale</i>)	100	>98(<i>S</i>)
4	(<i>R/S</i>)-1-feniletanol	Yacon (<i>P. sonchifolia</i>)	99	93(<i>S</i>)
5	(<i>R/S</i>)- <i>p</i> -bromofeniletanol	Inhame (<i>D. alata</i> L.)	47	83(<i>S</i>)
6	(<i>R/S</i>)- <i>p</i> -metilfeniletanol	Gengibre (<i>Z. officinale</i>)	32	86(<i>R</i>)
7	(<i>R/S</i>)- <i>p</i> -metilseleniofeniletanol	Rabanete (<i>R. sativus</i> L.)	54	77(<i>R</i>)
8	(<i>R/S</i>)- <i>p</i> -metilseleniofeniletanol	Beterraba (<i>B. vulgaris</i> L.)	55	79(<i>R</i>)
9	(<i>R/S</i>)- <i>p</i> -metilseleniofeniletanol	Coentro (<i>C. sativum</i> L.)	54	77(<i>R</i>)

Os autores também relataram a desracemização do (*R/S*)1-feniletanol frente à mandioquinha [Conv:98%; e.e.:% 97(*S*)], gengibre [Conversão:100%; e.e.:>98% (*S*)] e yacon [Conversão:99%; e.e.:% 97(*S*)], em um período de 3, 6 e 9 dias respectivamente. Os resultados obtidos demonstram que um dos isômeros é

seletivamente oxidado, formando a cetona correspondente, que em seguida é reduzida por outra enzima redox, exibindo preferência estereoquímica oposta. Sendo assim, podemos inferir que mesmo em sistemas biocatalíticos com outras enzimas atuantes, o biocatalisador apresentou alta enantiosseletividade. No Esquema 14 estão descritos os dados das reações com vegetais que levaram conversões e e.e. mais satisfatórios. Os resultados apresentados por Andrade *et al* (2006) demonstraram que, a depender das raízes ou tubérculos utilizados, a estereosseletividade do produto majoritário pode inverter.

As enzimas presentes nos vegetais são capazes de realizar as mais diversas biotransformações, são sistemas simples, baratos, de fácil obtenção, não necessitam de adição de cofatores, pois a própria célula vegetal possui o seu sistema de regeneração e são investigadas em várias sínteses de compostos endógenos. Xu *et al* (2010) utilizaram sete vegetais na redução da acetofenona, entre eles, maçã fresca (*Malus pumila*), cenoura (*Daucus carota*), pepino (*Cucumis sativus*), cebola (*Allium cepa*), batata (*Solanum tuberosum*), rabanete (*Raphanus sativus*) e batata-doce (*Ipomoea batatas*). Os vegetais que levaram aos melhores resultados de conversão e e.e. foram a cenoura (*D. carota*), com enriquecimento do enantiômero *S* e seletividade Prelog (78% rendimento; 95% e.e. para 50h de reação e 79% de rendimento; 96% e.e. para 100h de reação), e a batata (*S. tuberosum*), com enriquecimento do enantiômero de configuração *R* e seletividade anti-Prelog e, (28% rendimento; 94% e.e. para 50h de reação e 51% de rendimento; 92% e.e. para 100h de reação) (Esquema 15).

Esquema 15: Representação esquemática da biorredução utilizando vegetais.

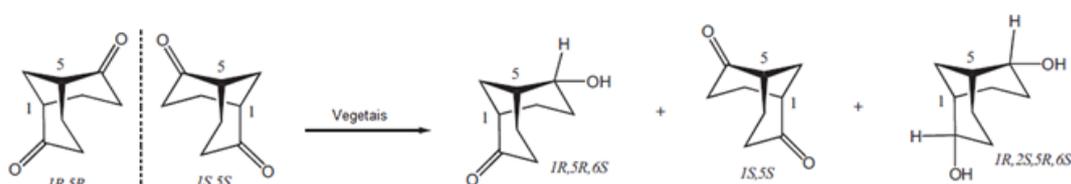


Vegetais	50h		100h	
	Conv. (%)	e.e. (%)	Conv. (%)	e.e. (%)
Maçã fresca (<i>M. pumila</i>)	39	83 (<i>R</i>)	41	81
Cenoura (<i>D. carota</i>)	78	95 (<i>S</i>)	80	96
Pepino (<i>C. sativus</i>)	50	75 (<i>S</i>)	55	76

Cebola (<i>A. cepa</i>)	53	74 (S)	54	74
Batata (<i>S. tuberosum</i>)	28	94 (R)	51	92
Rabanete (<i>R. sativus</i>)	72	71 (S)	82	73
Batata-doce (<i>I. batatas</i>)	42	80 (R)	43	80

Diante da gama de estudos envolvendo reações de biotransformação com vegetais já descritas na literatura, substratos com estruturas complexas também têm sido investigados. Por exemplo, o trabalho desenvolvido por Zilinskas (2013) relatou a biorredução estereosseletiva para a resolução de misturas racêmicas do biciclo [3.3.1] nonano. O biciclo [3.3.1] nonano é um precursor útil para a síntese de novos compostos, por exemplo, como intermediário quiral para síntese de taxóis, exibindo um amplo espectro de atividades biológicas. Os autores utilizaram 10 diferentes tipos de vegetais nas biorreduções (Esquema 16).

Esquema 16: Biorredução do racemato [3.3.1] nonano-2,6-diona por enzimas vegetais. (ZILINSKAS, 2013 - Adaptado).



Vegetais	$[\alpha]^{25}_{546}$	Rend. Dicetona (%)	Pureza óptica (%)
Cenoura (<i>Daucus carota</i>)	+38	50	59
Salsão (<i>Apium graveolens</i>)	+82	53	70
Alho-poró (<i>Allium porrum</i>)	+25	43	56
Couve (<i>Brassica oleracea</i>)	+9	51	52
Couve flor (<i>Brassica oleracea</i>)	+27	51	57
Gengibre (<i>Zingiber officinale</i>)	+46	34	61
Rabanete (<i>Raphanus sativus</i> var. <i>Niger</i>)	+4	60	51
Beterraba	+23	71	56

(*Beta vulgaris atrorubra*)

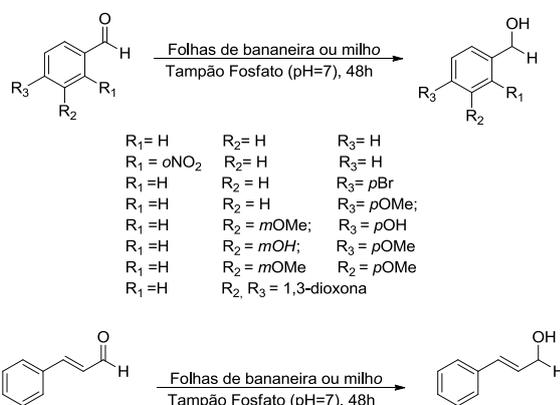
Salsa (<i>Petroselinum crispum</i>)	+52	43	67
Pastinaca (<i>Pastinaca sativa</i>)	+91	36	72

Os vegetais pastinaca, aipo, salsão e cenoura demonstraram um potencial promissor para a biorredução estereosseletiva e separação enantiomérica do biciclo racêmico [3.3.1] nonano-2,6-diona (Esquema 16). Portanto, esta metodologia permite recuperar de maneira simples e fácil o enantiômero (+) com elevada pureza óptica.

A bioconversão de aldeídos aromáticos também foi investigada no trabalho de Luna (2014). Os autores utilizaram folhas frescas *in natura* de plantas de bananeira e milho como alternativa econômica e sustentável aos métodos químicos tradicionais.

Em todos os casos, as folhas de milho reduziram mais eficientemente os aldeídos aromáticos em relação às folhas de banana, produzindo o álcool corresponde entre bons e excelentes rendimentos isolados. O benzaldeído, *p*-bromobenzaldeído, *p*-metoxibenzaldeído e a vanilina levaram aos melhores resultados, utilizando as folhas de milho como biocatalisador. As reduções do piperonal e do benzaldeído apresentaram os melhores rendimentos globais, de 98% e 90%, respectivamente (Esquema 17).

Esquema 17: Biorredução de aldeídos aromáticos.



Entrada	Composto	Rendimento Isolado (%)	
		Folhas de	Folhas de

		bananeira	milho
1	Álcool benzílico	0	90
2	<i>o</i> -nitrofenilmetanol	52	63
3	<i>p</i> -bromofenilmetanol	62	84
4	<i>p</i> -metoxifenilmetanol	30	79
5	<i>p</i> -hidroximetil- <i>o</i> -metoxifenol	68	64
6	<i>m</i> -bromo- <i>p</i> -metoxifenilmetanol	69	48
7	<i>m,p</i> -dimetoxifenilmetanol	30	71
8	3,4-metilenodioxibenzaldeído	85	98
9	(<i>E</i>)-3-fenilprop-2-en-1-ol	0	50

No intuito de investigar o poder catalítico das raízes de cenoura, tão difundido na literatura devido aos resultados promissores encontrados frente a diferentes tipos de compostos endógenos (BALDASSARRE *et al*, 2000; SCARPI *et al*, 2005; YADAV *et al*, 2007; ACHARYA *et al*, 2016; ACHARYA *et al*, 2018), Omori e Costa (2017) investigaram a redução assimétrica da acetofenona e dos seus derivados frente à cenoura (*Daucus Carota*) (Esquema 15), na presença do surfactante comercial Tween® 20 (Figura 6).

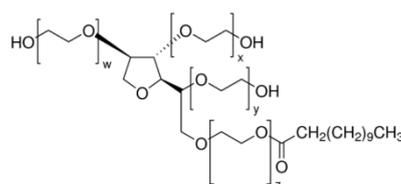
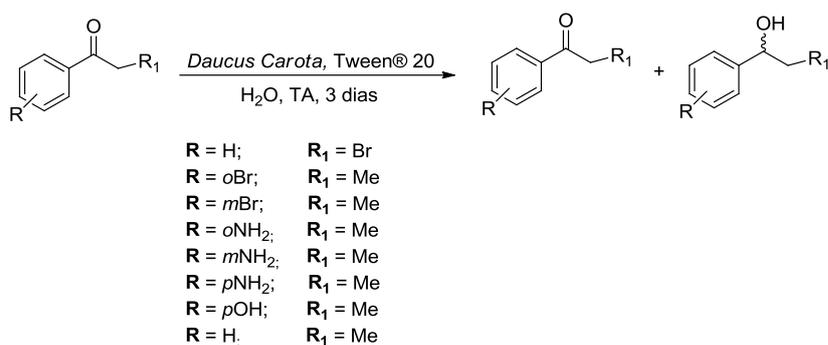


Figura 6: Estrutura química do surfactante Tween® 20 comercial. (Adaptado: <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/substance/tween2012345900564511?lang=pt®ion=BR>)

Os experimentos foram realizados adicionando-se ao meio reacional 1,5% do surfactante Tween® 20 e foram avaliadas as enantiosseletividades frente à uma série de acetofenonas substituídas (Esquema 18). Boas atividades de redução foram observadas em quase todas as acetofenonas testadas, com exceção da *o*-aminoacetofenona, *p*-aminoacetofenona e *p*-hidroxiacetofenona. O surfactante não iônico (Tween® 20) influenciou favoravelmente as conversões e enantiosseletividade na biorredução de acetofenonas catalisado por cenouras, sendo que os melhores resultados de conversão e e.e. foram observados para *o*-bromoacetofenona

[(conversão= 78%; e.e.= 98% (*R*)], *m*-bromoacetofenona [(conversão= 94%; e.e.= 90% (*S*)] e *p*-bromoacetofenona [(conversão= 67%; e.e.= 96% (*S*)], *m*-bromo-1-feniletanona [(conversão= 90%; e.e.= 98% (*S*)] e *m*-aminoacetofenona [(conversão= 82%; e.e.= 98% (*S*)].

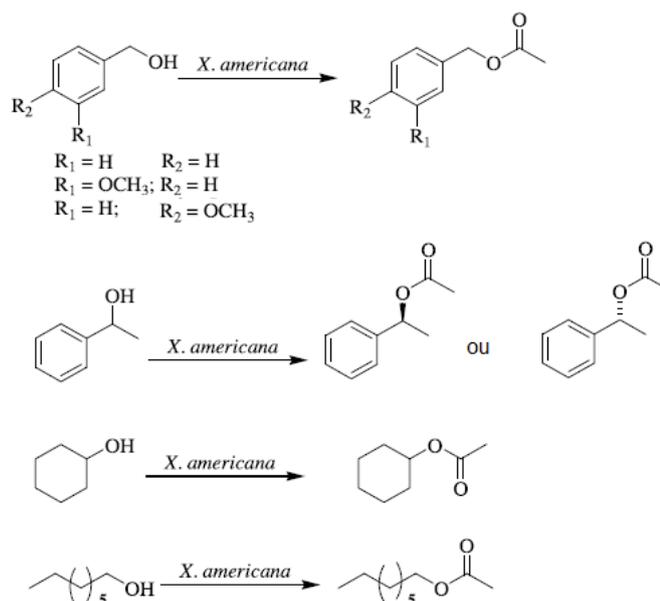
Esquema 18: Biorredução de compostos aromáticos.



Entrada	Substrato	Tween® 20		
		Conv. (%)	Rend. (%)	e.e. (%)
1	(<i>R/S</i>)- <i>p</i> -bromofeniletanol	28	67	96 (<i>S</i>)
2	(<i>R,S</i>)-2-bromo-1-feniletanol	90	43	>98 (<i>S</i>)
3	(<i>R/S</i>)- <i>o</i> -bromofeniletanol	78	66	>98 (<i>R</i>)
4	(<i>R/S</i>)- <i>m</i> -bromofeniletanol	94	88	90 (<i>S</i>)
5	(<i>R/S</i>)- <i>o</i> -aminofeniletanol	-	-	-
6	(<i>R/S</i>)- <i>m</i> -aminofeniletanol	82	48	>98 (<i>S</i>)
7	(<i>R/S</i>)- <i>p</i> -aminofeniletanol	8	-	50 (<i>S</i>)
8	(<i>R/S</i>)- <i>p</i> -hidroxifeniletanol	-	-	>98 (<i>S</i>)
9	(<i>R/S</i>)-1-feniletanol	31	10	>98 (<i>S</i>)

Recentemente, SILVA *et al* (2018) investigou a esterificação de álcoois aromáticos e alifáticos, utilizando grãos de ameixa-do-mato (*Ximenia americana*) como biocatalisador (Esquema 19). Os ésteres são importantes compostos, amplamente utilizados nas indústrias de alimentos e cosméticos.

Os autores observaram que os álcoois aromáticos foram esterificados com excelentes rendimentos, inclusive na bioesterificação do (*R/S*)-1-feniletanol, mas as reações foram pouco eficientes para os álcoois alifáticos (Esquema 19).

Esquema 19: Biorredução de compostos aromáticos.

Entrada	Substrato	Rend. (%)	e.e. (%)
1	Álcool benzílico	>99	-
2	3-metoxibenzilalcool	>99	-
3	4-metoxibenzilalcool	>99	-
4	(R/S)1-feniletanol	>99	25 (R)
5	Cicloexanol	18	-
6	1-octanol	40	-

O enorme número de trabalhos descritos na literatura envolvendo a flora local, demonstram o arsenal de biocatalisadores que podem ser empregados na síntese de compostos químicos com alto valor agregado. Concomitante com o desenvolvimento de métodos biocatalíticos, ocorrem mudanças de atitudes e pensamentos a respeito dos dejetos gerados pela produção industrial, buscando processos químicos econômicos, com redução de reagentes químicos e sistemas ambientalmente sustentáveis. A utilização de vegetais oferece vantagens interessantes em relação à síntese química padrão e minimiza custos em relação à utilização de enzimas isoladas, visto que, não há necessidade de adição de cofatores, pois os sistemas vegetais dispõem de diferentes classes de enzimas capazes de realizar diversas biotransformações. Sendo assim, a junção da síntese assimétrica química com etapas enzimáticas, permite a obtenção de produtos quirais complexos, de maneira

sustentável e contribuindo com os princípios da Química Verde, tão disseminado atualmente.

1.6 ESPONJA MARINHA *Cliona Varians*

As esponjas marinhas são organismos representantes do Reino Animal (*Reino Animalia*), metazoários mais antigos existentes. São abundantes em regiões polares e tropicais, e são encontradas em superfície e profundidade marítima e em corpos de água doce.

O nome do Filo – Porifera (do latim porus = poro; e ferre = portador) significa poroso, esponjoso, e deve-se à presença de numerosos poros na superfície destes animais. O estado da Bahia “abarca” um arsenal histórico dessas espécies, sendo considerado um dos litorais “paraísos” espongiológicos. As esponjas marinhas são seres sésseis, filtradores e importantes organismos nos ecossistemas que habitam. (HAJDU *et al*, 2010)

Na literatura estão documentados diversos trabalhos envolvendo estudos do potencial das esponjas marinhas devido à presença de diversas moléculas bioativas, como terpenos, nucleosídeos, peptídeos cíclicos e alcaloides (GUEVARA *et al*, 2016).

Outra aplicabilidade de esponjas marinhas relatada na literatura, é como fonte de microorganismos em reações de biotransformação de compostos endógenos, entre elas, a biorredução de iodoacetofenonas (ROCHA *et al*, 2012), azida-cetonas (ROCHA *et al*, 2015) e isatinas (BIROLLI, 2017).

A esponja marinha *Cliona Varians* (Figura 7) possui uma forma maciça, superfície hispida e aveludada de cor marrom externamente, e bege internamente. Aberturas exalantes pequenas (1-4 mm de diâmetro), distribuídas aleatoriamente (HAJDU *et al*, 2010). Foi identificada na costa atlântica do Caribe por Duchassaing e Michelotti em 1984 e pertence ao tipo demosponjas (Classe Demospongiae), apresentando um esqueleto suplementar de sílica com uma rede de fibras orgânicas chamadas “espongina” (LINO, 2016).

Moura (2007) investigou o potencial da atividade antitumoral da lectina CvL purificada da esponja marinha *C. varians* em linhagem de células K562, que expressam a leucemia mieloide crônica. A citotoxicidade dos métodos CvL foi avaliada em células tumorais de mamíferos e em linfócitos normais de sangue periférico pelo ensaio MTT. Os resultados experimentais demonstraram que a CvL

inibiu o crescimento de células cancerígenas leucêmicas humanas com valores de IC_{50} de 70 e 100 $\mu\text{g/mL}$ para as células K562 e posterior morte celular após 72h de exposição da lectina à célula K562.



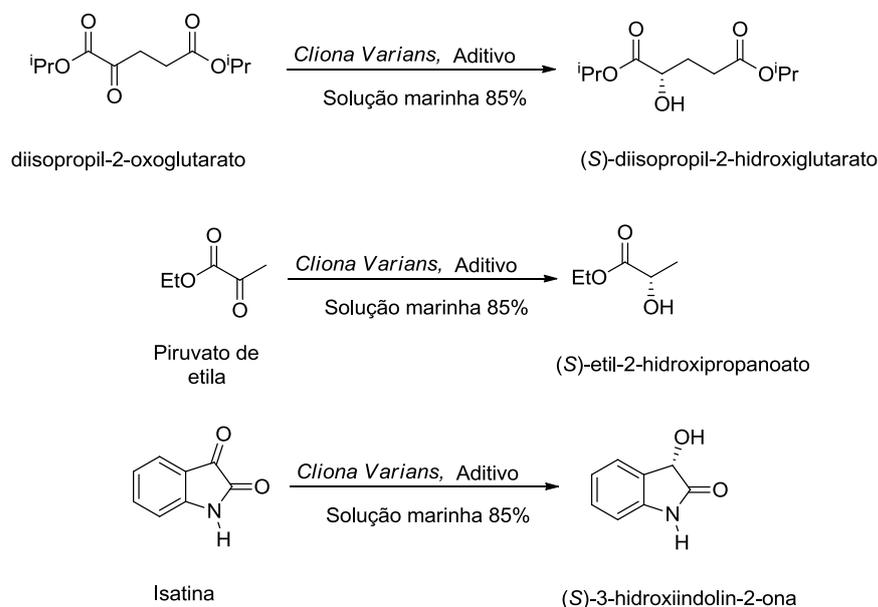
Figura 7: Esponja marinha *Cliona varians* e local de coleta das amostras (Praia do Forte-Ba).

Buscando ampliar o conhecimento sobre a esponja marinha *C. varians in natura*, Sousa e colaboradores (2017) avaliaram o potencial biocatalítico da *C. varians* frente á α -cetoesteres, isatina e o piruvato de etila, sem adição de aditivos e com adição de açucars (sacarose, D-glicose, D-maltose e D-frutose) e aminoácidos (L-alanina, glicina, L-glutamato e L-aspartato) ao meio reacional.

Os autores avaliaram a influência de volumes estéricos relativos ao grupo álcoxi do 2-oxoglutarato (dimetil-2-oxoglutarato, dietil-2-oxoglutarato e 2-oxoglutarato de diisopropilo), isatina e o piruvato de etila. Os resultados demonstraram a dependência dos aditivos na enantioseletividade das reações, visto que, diferentes isômeros foram obtidos em função do aditivo utilizado. Para a série de α -cetoésteres avaliados, o diisopropil 2-hidroxioglutarato, na presença de D-frutose, foi o substrato melhor avaliado, com 70% de conversão e 75% e.e., com predominância da configuração S. O piruvato de etila apresentou enantioseletividade frente aos aditivos D-frutose, sacarose, L-glutamato, L-aspartato e D-glicose, com conversões variando entre 19% a 74%, e e.e. entre 54% a 84%, sendo a sacarose o resultado melhor avaliado (conversão: 48%; e.e.:84%) em favor do isômero S. A isatina apresentou conversões variando entre 5% a 90% e excessos enantioméricos entre 44% a 74%, sendo o aditivo D-glicose o melhor avaliado (Conversão: 85%; e.e.:74%) em favor do isômero S. Assim, como nos α -cetoesteres, a isatina apresentou diferentes enantioseletividades a depender do aditivo utilizado. No

Esquema 20 estão expressos os resultados melhores avaliados pelos autores dos substratos utilizados.

Esquema 20: Resultados experimentais da bioedução de compostos carbonílicos frente a esponja marinha *C. Varinas* (SOUSA *et al*, 2017).



Substrato	Aditivo	Conversão (%)	e.e. (%)
2-oxoglutarato de dimetila	D-Frutose	70	75 (S)
2-oxoglutarato de dimetila	Sacarose	81	47 (S)
Piruvato de etila	D-Glicose	58	72 (S)
Piruvato de etila	Sacarose	48	84 (S)
Piruvato de etila	D-Frutose	74	54 (S)
Isatina	D-Frutose	90	44 (R)
Isatina	D-Maltose	90	60 (S)
Isatina	D-Glicose	85	74 (S)

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivos gerais

Esta dissertação tem como objetivo geral avaliar o potencial biocatalítico da esponja marinha *Cliona varians*, frente a cetonas pró-quiras e álcoois racêmicos.

2.2 Objetivos Específicos

- I. Verificar a influência de grupos doadores e retiradores de densidade eletrônica em derivados aromáticos da acetofenona e a influência desses grupos na enantiosseletividade.
- II. Preparar substratos quirais através da biorredução de cetonas e biooxidação de álcoois, utilizando a esponja marinha (*C. varians*);
- III. Determinar o excesso enantiomérico dos produtos obtidos;
- IV. Determinar a configuração absoluta dos estereoisômeros majoritários.

3. RESULTADOS E DISCURSÃO

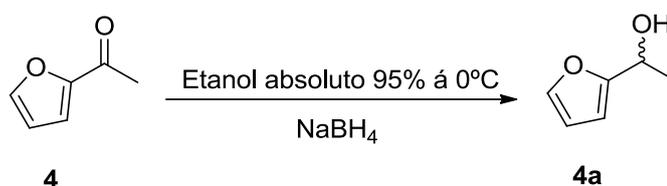
3.1 Síntese química dos substratos

Primeiramente, os padrões racêmicos foram preparados através da síntese química e caracterizados através da espectroscopia no infravermelho, ¹H-RMN e ¹³C-RMN, quando necessário. Os reagentes acetofenona (**1**), (*R/S*)-1-feniletanol (**1a**), *p*-metoxiacetofenona (**2**), *p*-nitroacetofenona (**3**) e o acetilfurano (**4**) são comerciais, disponíveis no laboratório e foram utilizados como substratos nas reações de biotransformação. Além da caracterização espectroscópica, os substratos foram analisados através de cromatografia a gás, com fase estacionária quiral, e foi selecionado o método de eluição mais eficaz para posterior comparação com os produtos provenientes das reações biocatalíticas (Tabela 8, Pág. 85). O teor das conversões e excessos enantioméricos (*e.e.*) dos substratos descritos nesse trabalho foram calculados através das áreas integradas provenientes dos cromatogramas gerados. As condições reacionais de todos os substratos avaliados estão descritas na página 85.

Os reagentes *p*-metoxifeniletanol (**2a**), *p*-nitrofeniletanol (**3a**) e o 1-(2-furil) etanol (**4a**) foram sintetizados no laboratório. Os produtos foram obtidos através da redução com NaBH₄ (COMASSETO, 2003), produzindo a mistura racêmica álcoois. Nos Esquemas 21 e 22 estão descritas as reduções sintéticas dos substratos e na Tabela 4 (Pág. 58) os rendimentos brutos.

O acetilfurano (**4**) foi reduzido ao 1-(2-furil) etanol (**4a**) utilizando boroidreto de sódio como agente redutor aquiral (Esquema 22). A reação gerou o produto com rendimento de 75% (Tabela 4).

Esquema 22: Representação esquemática da reação química de redução do acetilfurano para obtenção do substrato racêmico utilizado nas reações biocatalíticas.



Os produtos sintetizados foram analisados através de CG quiral e foram selecionados os métodos mais adequados para separação dos racematos (Tabela 8, Pág. 85). Os rendimentos das reações estão expressos na Tabela 4.

Tabela 4: Representação esquemática dos substratos obtidos quimicamente utilizados nas reações de biotransformação.

Entrada	Composto	Rendimento Global (%)
1	<p>2a</p>	75
2	<p>3a</p>	97
4	<p>4a</p>	75

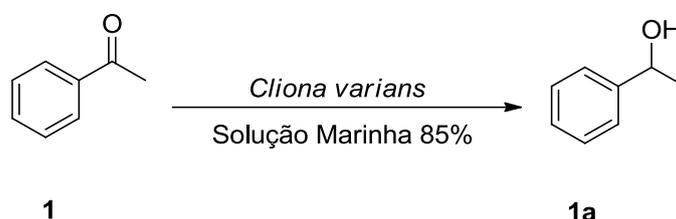
3.2 Biorredução da acetofenona

O primeiro substrato empregado para reação de biorredução foi a acetofenona (**1**). A acetofenona (**1**) foi caracterizada através de espectroscopia no infravermelho (IV). No espectro foram verificados os estiramentos C-H (sp^2) e C-H (sp^3), em

aproximadamente 3000 cm^{-1} ; o estiramento característico de carbonila de cetona (C=O), em aproximadamente 1686 cm^{-1} ; e o estiramento C=C, em aproximadamente 1600 cm^{-1} (Figura 31; Pág 100).

Após confirmação da estrutura do substrato, por IV, e escolha do método de separação cromatográfica no CG, foram iniciadas as reações de biotransformação empregando-se a esponja marinha *C. varians* e os resultados estão descritos no Esquema 23.

Esquema 23: Porcentagem das áreas cromatograficas normalizadas da biorredução da acetofenona utilizando a esponja marinha *C. Varians*.



	Sem Aditivo		Glicose		Frutose	
	Conv. (%)	e.e.(%) (S)-1a	Conv. (%)	e.e.(%) (S)-1a	Conv. (%)	e.e.(%) (S)-1a
3 dias	ND	ND	ND	ND	ND	ND
5 dias	ND	ND	22	84	7	99
7 dias	ND	ND	31	84	17	82

Conv.= Conversão; e.e.=excesso enantiomérico; ND = Não detectado

As reações foram realizadas através de uma suspensão da acetofenona (1,15 mmol) em 120 mL de solução marinha 0,85% e 40 g de esponja marinha *C. varians*. Foram colocadas em agitação a 180 rpm, em mesa agitadora, com controle de temperatura à $25\text{ }^{\circ}\text{C}$. Em trabalhos anteriores realizados pelo grupo de pesquisa (SOUSA, 2017), verificou-se que as reações envolvendo esta esponja marinha não apresentavam enantiosseletividades sem adição de aditivos. Sendo assim, as reações foram realizadas na ausência de aditivos e na presença de glicose e frutose como açúcares aditivos. As amostras foram analisadas durante um período 3, 5 e 7 dias, sendo que, em 3 e 5 dias foram retiradas alíquotas de 5mL, extraídas e analisadas, empregando-se CG quiral. Através das porcentagens das áreas

integradas geradas nos cromatogramas, foram determinadas as conversões do 1-feniletanol (**1a**) e os excessos enantioméricos dos produtos (Esquema 23).

As reações realizadas na ausência de aditivos não geraram produtos (Esquema 23). O produto da reação de biorredução da acetofenona (**1**), empregando-se frutose, após 7 dias foi isolado e determinada a rotação específica $[\alpha]_D^{20} = -12$ (c 0,68; CHCl_3) e comparada com a literatura $[\alpha]_D^{25} = -33,7$ (c 0,1; CHCl_3) (PINEDO-RIVILLA *et al*, 2009; ROMANO *et al*, 2016). A biorredução levou ao enriquecimento do enantiômero **S-1a** majoritariamente, condizente com o modelo proposto por Prelog para redução de carbonilas pró-quirais, onde o ataque do hidrogênio enantiotópico é realizada pela face menos impedida da carbonila (face *Re*) (PRELOG, 1964). Os cromatogramas das reações utilizando glicose e frutose estão descritos nas Figuras 9 e 10, respectivamente.

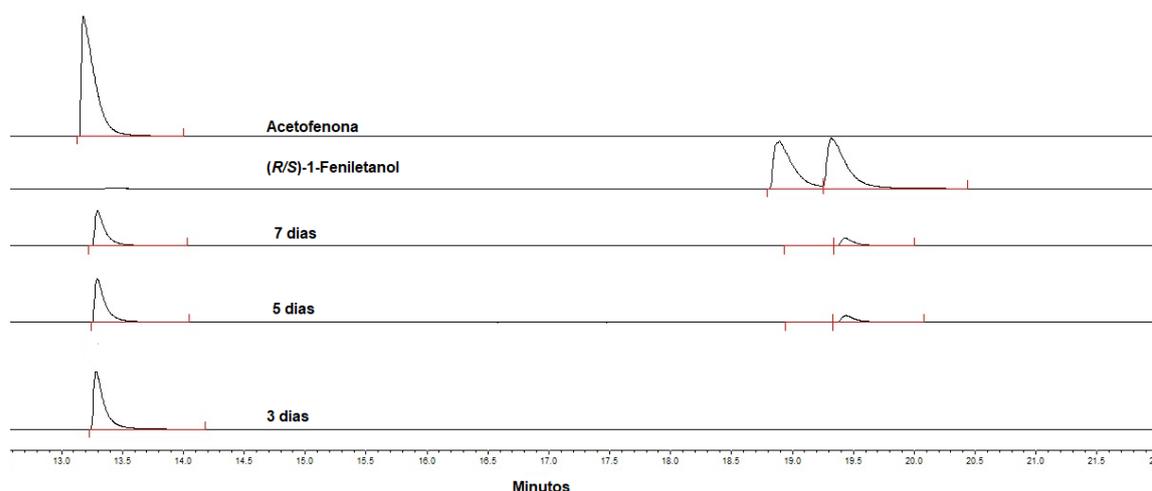


Figura 9: Cromatograma comparativo (3, 5 e 7 dias) referente da biorredução da acetofenona (**1**) utilizando glicose como aditivo e a esponja marinha *C.varians* como biocatalisador durante 3,5 e 7 dias obtido por cromatografia a gás com fase estacionária quiral; coluna Cyclosil B (28,5m x 0,25mm x 0,25 μm de espessura de filme) e rampa de temperatura: 80°C por 5 minutos, 2°C/min – 100°C; 5°C/min – 220°C; detector (FID): 220°C; injetor: 220°C; em modo split (1/10) e gás de arraste (Hélio): 1,18mL/min.

O produto da reação da biorredução da acetofenona (**1**), empregando-se glicose como aditivo, apresentou baixa conversão e alto e.e. (Esquema 23). A amostra foi retirada uma alíquota de 5mL com 7 dias de reação, extraída e analisada por cromatografia a gás quiral. A seletividade da reação seguiu a regra de Prelog, gerando o produto (**S-1a**) majoritariamente (Figura 10).

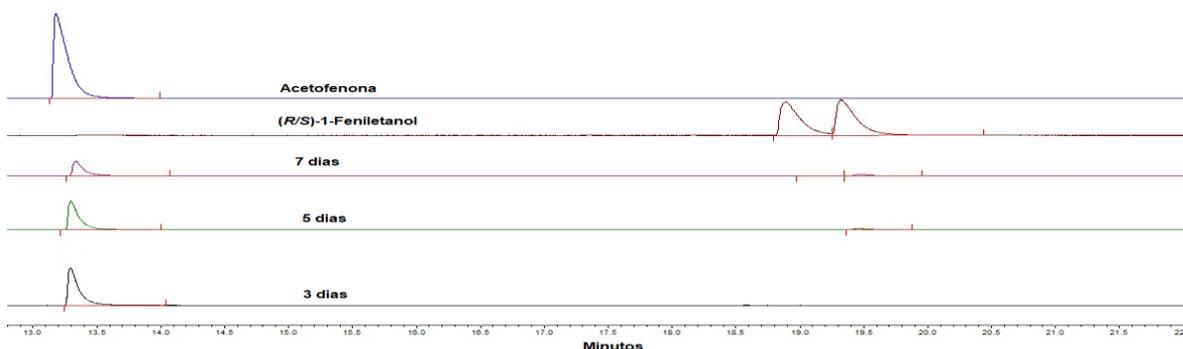


Figura 10: Cromatograma comparativo (3, 5 e 7 dias) referente da biorredução da acetofenona (**1**) utilizando frutose como aditivo e a esponja marinha *C.varians* como biocatalisador durante 3,5 e 7 dias obtido por cromatografia a gás com fase estacionária quiral; coluna Cyclosil B (28,5m x 0,25mm x 0,25µm de espessura de filme) e rampa de temperatura: 80°C por 5 minutos, 2°C/min – 100°C; 5°C/min – 220°C; detector (FID): 220°C; injetor: 220°C; em modo split (1/10) e gás de arraste (Hélio): 1,18mL/min.

Na Figura 11 está representada a avaliação cinética qualitativa da biorredução da acetofenona (**1**) sem aditivo e na presença de glicose e frutose. Através do gráfico podemos salientar a dependência do aditivo nas reações de redução utilizando a acetofenona (**1**) como substrato.

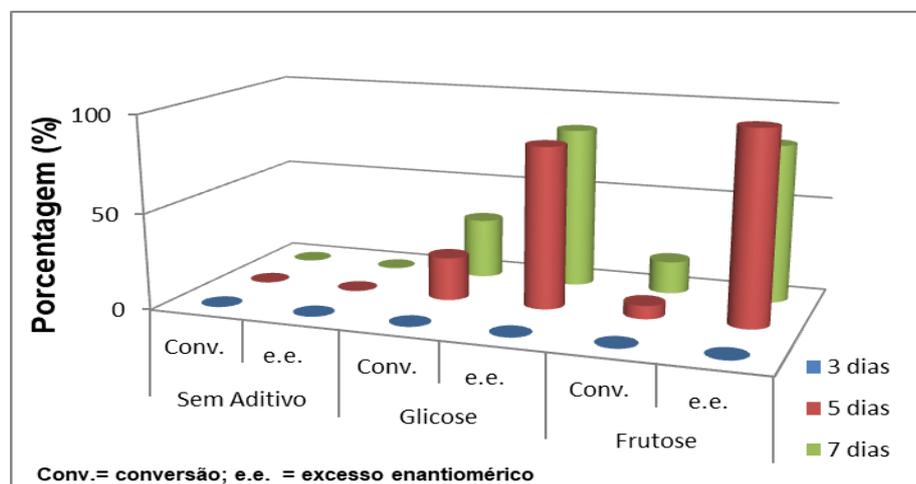


Figura 11: Avaliação cinética enantiosseletiva qualitativa da biorredução da acetofenona (**1**) utilizando a esponja marinha *C. varians*.

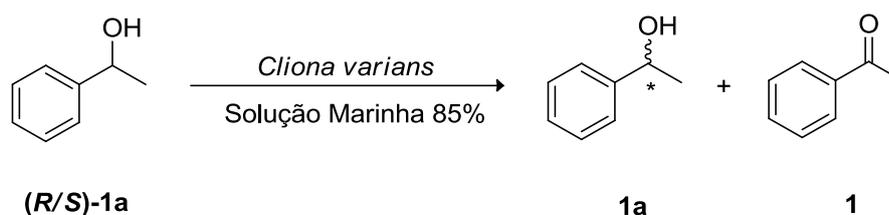
3.3 Resolução cinética oxidativa do (R/S)-1-feniletanol

O substrato (*R/S*)-1-feniletanol **1a** é um reagente comercial, disponível no laboratório, e foi caracterizado por espectroscopia no infravermelho. No espectro de

IV foi verificada uma banda larga e intensa em $3340\text{-}2927\text{cm}^{-1}$, característica de estiramento de ligação O-H de álcool; uma banda em torno de 1080 cm^{-1} , característica de estiramento C-O de álcool secundário conjugado; uma banda em $3062\text{-}2927\text{cm}^{-1}$, característica de C-H de anel aromático e C-H (Csp^3) característica da metila; bandas harmônicas fracas em $1948\text{-}1755\text{cm}^{-1}$, características de anel aromático monosubstituído (Figura 35; Pág. 103). O reagente foi injetado no cromatógrafo a gás e escolhido o método mais eficiente de eluição dos seus isômeros (Tabela 8, Pág. 85).

A resolução oxidativa da mistura racêmica (*R/S*)-**1a** gerou o composto **1** e manteve o *R*-**1a** enriquecido enantiomericamente (Esquema 24).

Esquema 24: Porcentagem das áreas cromatograficas normalizadas da biooxidação da (*R/S*)-1-feniletanol utilizando a esponja marinha *Cliona Varians*.



	Sem Aditivo		Glicose		Frutose	
	Conv. (%)	e.e.(%) <i>(R)</i> - 1a	Conv. (%)	e.e.(%) <i>(R)</i> - 1a	Conv. (%)	e.e.(%) <i>(R)</i> - 1a
3 dias	24	11	3	26	21	32
5 dias	44	26	25	23	32	48
7 dias	59	32	36	38	41	51

Conv.= Conversão; e.e.=excesso enantiomérico

No Esquema 24 estão representados os resultados provenientes das reações de biooxidação de (*R/S*)-**1a**, analisadas após 3, 5 e 7 dias de reação. As reações de biooxidação foram realizadas como descrito no procedimento experimental na página 84.

As reações sem aditivos apresentaram razoáveis conversões e baixos e.e. (Esquema 24). Vale ressaltar que, em relação à redução da acetofenona, a seletividade apresentada pela biooxidação do (*R/S*)-**1a** foi anti-Prelog (PRELOG, 1964) em favor do isômero (*R*)-**1a** majoritariamente (Figura 12).

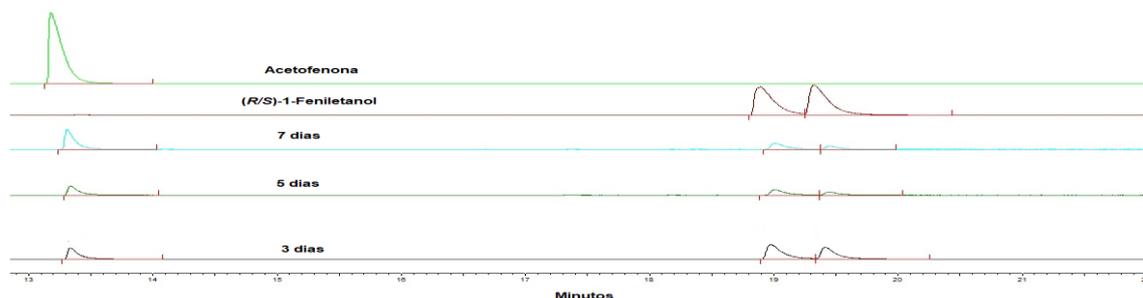


Figura 12: Cromatograma comparativo (3, 5 e 7 dias) referente bio-oxidação do (*R/S*)-1-feniletanol (**1a**) sem adição de ativo e a esponja marinha *C.varians* como biocatalisador durante 3,5 e 7 dias obtido por cromatografia a gás com fase estacionária quiral; coluna Cyclosil B (28,5m x 0,25mm x 0,25µm de espessura de filme) e rampa de temperatura: 80°C por 5 minutos, 2°C/min – 100°C; 5°C/min – 220°C; detector (FID): 220°C; injetor: 220°C; em modo split (1/10) e gás de arraste (Hélio): 1,18mL/min.

As reações utilizando glicose (Figura 13) e frutose (Figura 14) como aditivos, ocorreram com conversões baixas para o composto **1**, todavia em 7 dias de reação os valores de *e.e.* foram maiores que 80% em favor do isômero (*R*)-**1a**. As reações utilizando frutose foram as que exibiram melhores resultados. O tempo de reação é um fator a ser considerado, pois a partir de 5 dias é possível notar o aumento da enantiosseletividade da reação. Em experimentos anteriores, o pH da reação no início era neutro, porém a partir do quinto dia, o pH estava mais próximo de 8. Sendo assim, podemos sugerir que as enzimas redutases da esponja marinha *C. varians* são eficientes em pH mais básicos.

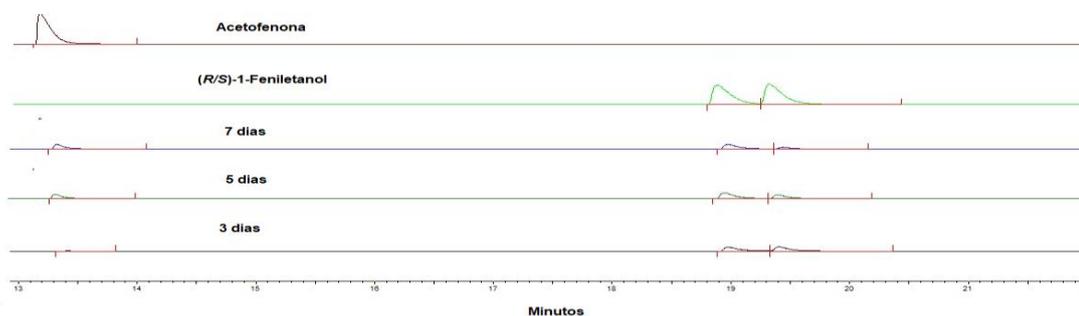


Figura 13: Cromatograma comparativo (3, 5 e 7 dias) referente bio-oxidação do (*R/S*)-1-feniletanol (**1a**) com adição de glicose como aditivo e a esponja marinha *C.varians* como biocatalisador durante 3,5 e 7 dias obtido por cromatografia a gás com fase estacionária quiral; coluna Cyclosil B (28,5m x 0,25mm x 0,25µm de espessura de filme) e rampa de temperatura: 80°C por 5 minutos, 2°C/min – 100°C; 5°C/min – 220°C; detector (FID): 220°C; injetor: 220°C; em modo split (1/10) e gás de arraste (Hélio): 1,18mL/min.

Nas Figuras 12, 13 e 14 estão expressos os cromatogramas das reações (*R/S*)-**1a** avaliados durante 3, 5 e 7 dias com a adição de glicose e frutose e sem adição de aditivo.

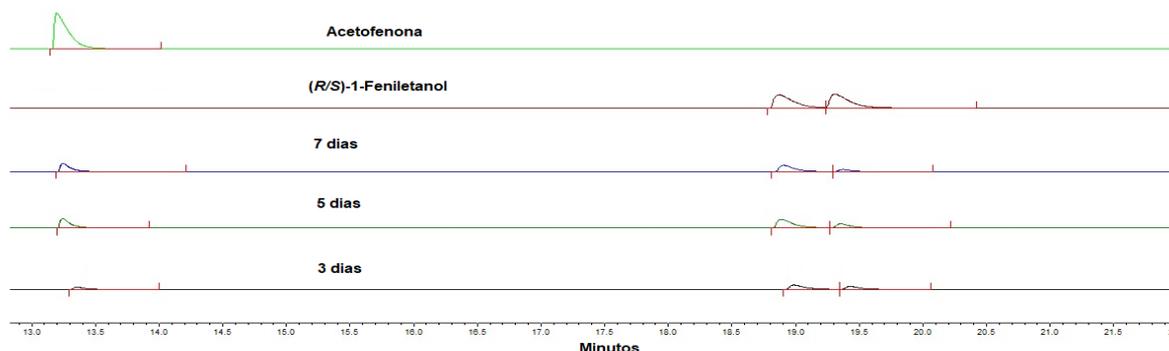


Figura 14: Cromatograma comparativo (3, 5 e 7 dias) referente bio-oxidação do (*R/S*)-1-feniletanol (**1a**) com adição de frutose como aditivo e a esponja marinha *C.varians* como biocatalisador durante 3,5 e 7 dias obtido por cromatografia a gás com fase estacionária quiral; coluna Cyclosil B (28,5m x 0,25mm x 0,25µm de espessura de filme) e rampa de temperatura: 80°C por 5 minutos, 2°C/min – 100°C; 5°C/min – 220°C; detector (FID): 220°C; injetor: 220°C; em modo split (1/10) e gás de arraste (Hélio): 1,18mL/min.

As conversões de **1a** e os e.e. expressos no esquema 24 apresentaram resultados razoáveis, sendo que, os melhores resultados observados foram sem adição de aditivos (60% conv.; 32% e.e.), em favor do isômero (*R*)-**1a**; e na presença de frutose (41% conversão, 51% e.e) em favor do isômero (*R*)-**1a**, no tempo de reação de 7 dias. Em ambos os ensaios foram medidas as rotações específicas para identificarmos a configuração do enantiômero majoritário através da comparação com os valores da literatura (*R*) $[\alpha]_{D}^{25} = +40$ (c 0,5 CHCl₃) (PINEDO-RIVILLA *et al*, 2009; ROMANO *et al*, 2016). As rotações específicas medidas foram $[\alpha]_{D}^{20} = +14$ (c 0,1 CHCl₃) e $[\alpha]_{D}^{20} = +16$ (c 0,1 CHCl₃) para as reações utilizando frutose e glicose, respectivamente. Os resultados experimentais inferem o excesso enantiomérico em favor *R*-1-feniletanol **1a**.

Na Figura 15 está representada a avaliação cinética qualitativa da biooxidação do (*R/S*)-**1a**, sem aditivo e na presença de glicose e frutose.

As reações de biorredução da acetofenona (**1**) e bio-oxidação de (*R/S*)-1-feniletanol (**1a**) apresentaram resultados distintos quanto à estereosseletividade do

isômero majoritário. Os resultados apresentados apontam que a esponja marinha *C. varians in natura* dispõe de enzimas ceto-redutases e álcool desidrogenases enantioespecíficas, que catalisam as reações tanto de redução como de oxidação, com estereoseletividades invertidas. Vale ressaltar que a obtenção de (*R*)-**1a** opticamente puro com seletividade anti-Prelog não é muito comum de ser observada através de células inteiras *in natura*, normalmente sendo preparado usando enzimas isoladas como, por exemplo, LK-ADH de *Lactobacillus kefir* (HUMMEL, 1990), 10 PF-ADH de *Pseudomonas fluorescens* (HILDEBRANDT *et al*, 2002) e carbonil redutase de *Candida magnoliae* (CMCR) (ZHU, 2006). Sendo assim, a esponja marinha *C. Varians* demonstrou ser um excelente biocatalisador na resolução cinética oxidativa de (+/-)-1-feniletanol (**1a**).

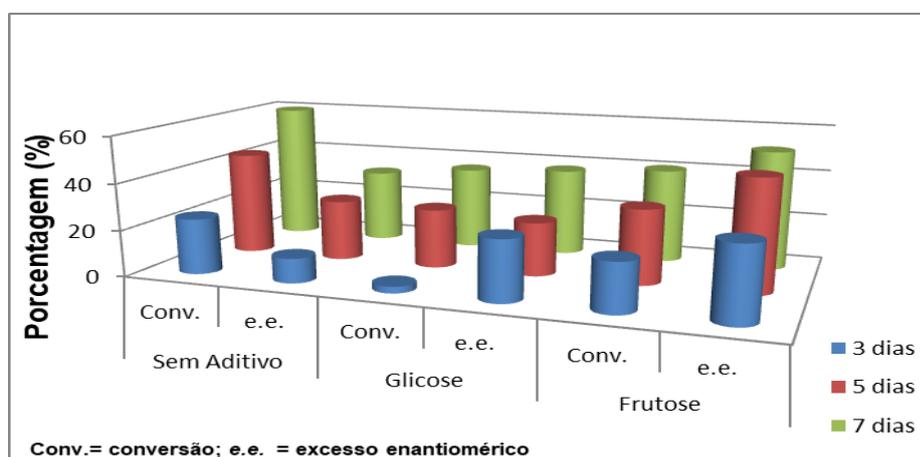


Figura 15: Avaliação cinética enantioesletiva qualitativa da biooxidação do (*R/S*)-1-Feniletanol (**1a**) utilizando a esponja marinha *C. varians*.

3.4 Biotransformação dos derivados da acetofenona

Após o estudo biocatalítico preliminar, utilizando a acetofenona (**1**) e o (*R/S*)-1-feniletanol (**1a**) como substratos, e no desígnio de ampliar e avaliar o potencial catalítico da esponja marinha *C. varians* frente a outros substratos, estendeu-se os estudos a derivados *p*-substituídos da acetofenona **1** e do (*R/S*)-1-feniletanol **1a**. Foram selecionados substratos com substituinte *p*-diregente doador de densidade eletrônica ao anel aromático (-OMe) e um substituinte retirador de densidade eletrônica ao anel aromático (-NO₂). Os substratos empregados nas reações de biorredução foram a *p*-metoxiacetofenona (**2**) e a *p*-nitroacetofenona (**3**). Estes compostos foram adquiridos da Sigma Aldrich e da ProSynth, respectivamente; e foram caracterizados por espectroscopia no infravermelho. Para a avaliação da

bioxidação dos derivados da acetofenona, foram escolhidos os substratos (*R/S*)-*p*-metoxifeniletanol (**2a**) e (*R/S*)-*p*-nitrofeniletanol (**3a**), ambos sintetizados no laboratório e já discutidos anteriormente.

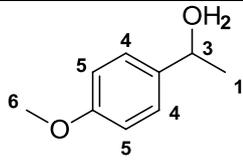
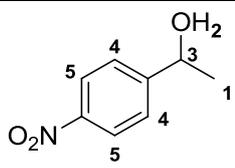
As bio reduções e bio oxidações foram avaliadas cineticamente por um período de 3,5 e 7 dias, sem adição de aditivos e adicionando-se glicose ou frutose ao meio reacional (Procedimento Experimental pág. 84).

Os substratos (*p*-metoxiacetofenona (**2**) e *p*-nitroacetofenona (**3**)), disponíveis no laboratório, foram caracterizados por IV. Ambos apresentam semelhanças espectrais com bandas em aproximadamente 1680 cm^{-1} , características de C=O de cetonas (Figura 40, Pág. 107; Figura 63, Pág. 124).

Os substratos sintetizados no laboratório [*p*-metoxifeniletanol (**2a**) e a *p*-nitrofeniletanol (**3a**)] foram caracterizados por RMN de ^1H , RMN de ^{13}C e infravermelho. Os espectros de infravermelho de ambos os compostos apresentaram bandas característica da função álcool em aproximadamente 3363 cm^{-1} no *p*-metoxi e 3363 cm^{-1} para o *p*-nitro. Assim como bandas em 1242 cm^{-1} e 1265 cm^{-1} , para a o estiramento C-O, respectivamente. Em 856 cm^{-1} foi observada uma banda característica de estiramento C-N para o nitro derivado **3a** e duas bandas; uma de estiramento assimétrico em $1512,18\text{ cm}^{-1}$ e $1346,31\text{ cm}^{-1}$ de estiramento simétrico característico de grupo nitro conjugado em anel aromático (Figura 45, Pág. 111; Figura 68, Pág. 128).

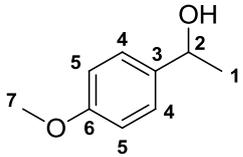
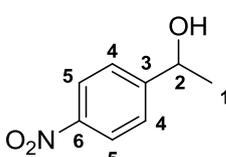
No RMN de ^1H podemos verificar que ambos os compostos apresentam deslocamentos químicos semelhantes, por exemplo, o hidrogênio da função álcool em aproximadamente 1,85 ppm para **2a** e 2,25 ppm para **3a**. Os multipletos (H4 e H5 – Tabela 5), característico de deslocamentos químico em campo baixo de anel aromático (Figura 46, Pág. 111; Figura 69, Pág. 130). Ambos os compostos sintetizados possuem deslocamentos químicos de acordo com aqueles descritos na literatura (CONTENTE, 2016).

Tabela 5: Caracterização estrutural dos substratos *p*-metoxifeniletanol **2a** e *p*-nitrofeniletanol **3a** por RMN de ^1H [CDCl_3 ; 400MHz; δ (ppm)].

	 2a	 3a
Deslocamento químico (ppm)		
1 - 3H (d)	1,47	1,52
2 - 1H, OH (s)	1,85	2,25
6 - 3H, OCH₃ (s)	3,75	-
3 - 1H (q)	4,85	5,02
4 - 2H (d-2a e d-3a)	6,88	7,56
5 - 2H (d-2a e d-3a)	7,30	8,18

Os dados de RMN de ^{13}C dos compostos apresentam picos característicos como o C_1 de metila e o C_2 ligado ao oxigênio, em aproximadamente 70, ppm. Os dados de RMN de ^{13}C dos compostos **2a** e **3a** estão descritos na Tabela 6 (Figura 47, Pág. 112; Figura 70, Pág. 129) e corroboram com os dados descritos na literatura (CONTENTE, 2016).

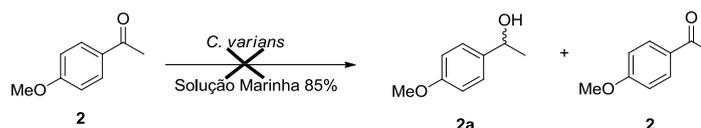
Tabela 6: Caracterização estrutural dos substratos *p*-metoxifeniletanol e *p*-nitrofeniletanol por RMN de ^{13}C [CDCl_3 ; 100MHz; δ (ppm)].

 2a	 3a
Deslocamento químico (ppm)	
1 – 25,0	1 – 25,5
2 – 70,0	2 – 69,5
3 – 138,0	3 – 147,1
4 – 126,6	4 – 126,1
5 – 113,8	5 – 123,7
6 – 159,0	6 – 153,0
7 – 55,3	-

3.4.1 Emprego de *C. varians* na biorredução dos derivados da acetofenona

As reações de biorredução da *p*-metóxi-acetofenona (**2**) foram realizadas sem adição de aditivos e com adição de glicose e frutose, na presença de *C. varians* (Esquema 23). Após 7 dias de reação, não foi observada conversão do substrato para produto em nenhum dos sistemas avaliados. Vale ressaltar, que nos ensaios testados não foi notada a formação de subprodutos, sendo assim, podemos sugerir que não houve um encaixe efetivo entre o sitio ativo da enzima ADH e o substrato.

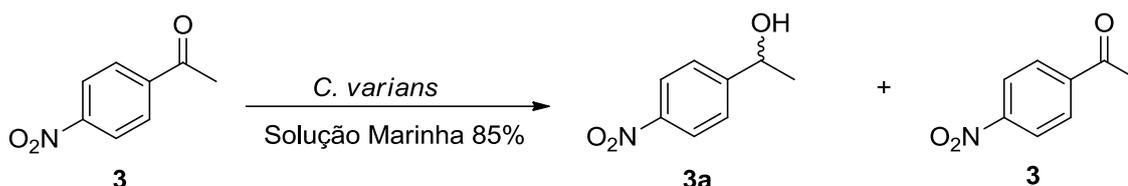
Esquema 25: Biorredução da (*R/S*)-*p*-metoxiacetofenona (**2**) utilizando a esponja marinha *Cliona Varians*



As reações de biorredução da *p*-nitroacetofenona (**3**), empregando-se *C. varians*, foram realizadas sem adição de aditivos e na presença de glicose e frutose Esquema 26. As reações de biorredução na ausência de aditivos não apresentaram

resultados nos períodos de tempo analisados (Esquema 26, Figura 65, p. 125). A adição de glicose (Esquema 26; Figura 16) ou frutose (Esquema 26; Figura 17) ao meio reacional levaram a baixas conversões e baixos excessos enantioméricos, em função do tempo, sendo a adição de glicose o aditivo melhor avaliado.

Esquema 26: Porcentagem das áreas cromatograficas normalizadas obtidas das reações de biorredução da (*R/S*)-*p*-nitroacetofenona (**3a**) utilizando a esponja marinha *Cliona Varians*.



	Sem Aditivo		Glicose		Frutose	
	Conv. (%)	e.e. (%) (<i>S</i>)-3a	Conv. (%)	e.e. (%) (<i>S</i>)-3a	Conv. (%)	e.e. (%) (<i>S</i>)-3a
3 dias	ND	ND	ND	ND	ND	ND
5 dias	ND	ND	4	38	1	2
7 dias	ND	ND	17	47	6	6

Conv.= Conversão; e.e.=excesso enantiomérico; ND = Não detectado

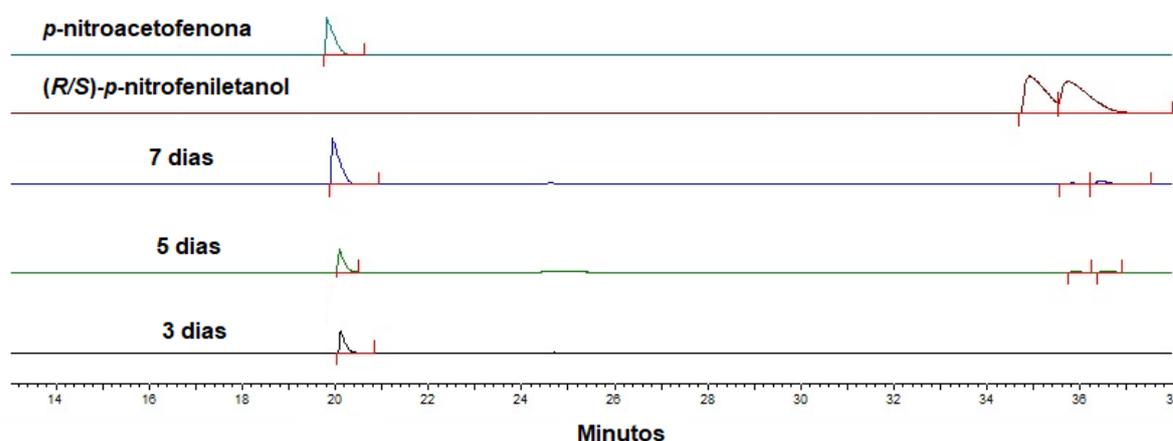


Figura 16: Cromatograma comparativo (3, 5 e 7 dias) referente bio-redução da *p*-nitroacetofenona (**3**) com adição de glicose como aditivo utilizando a esponja marinha *C. varians* como biocatalisador durante 3,5 e 7 dias obtido por cromatografia a gás com fase estacionária quiral; coluna Cyclosil B (28,5m x 0,25mm x 0,25µm de espessura de filme) e rampa de temperatura: 130°C por 3 minutos, 1°C/min – 165°C; detector (FID): 220°C; injetor: 220°C; em modo split (1/10) e gás de arraste (Hélio): 1,18mL/min.

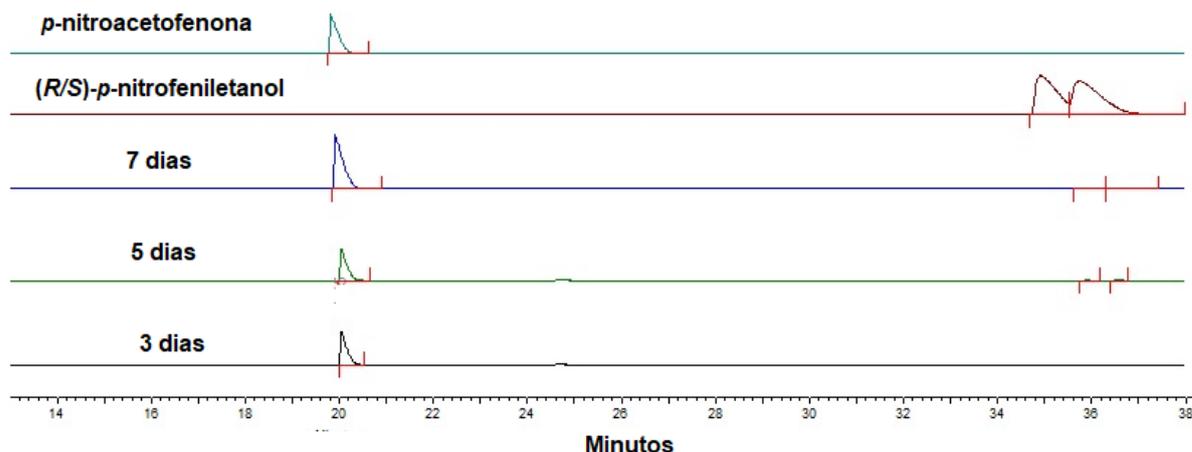


Figura 17: Cromatograma comparativo (3, 5 e 7 dias) referente bio-redução da *p*-nitroacetofenona (**3**) com adição de frutose como aditivo utilizando a esponja marinha *C.varians* como biocatalisador durante 3,5 e 7 dias obtido por cromatografia a gás com fase estacionária quiral; coluna Cyclosil B (28,5m x 0,25mm x 0,25 μ m de espessura de filme) e rampa de temperatura: 130°C por 3 minutos, 1°C/min – 165°C; detector (FID): 220°C; injetor: 220°C; em modo split (1/10) e gás de arraste (Hélio): 1,18mL/min.

A partir dos resultados obtidos, pode-se admitir que as reações ocorreram com baixas conversões e enantiosseletividades. O produto obtido a partir da reação com glicose foi extraído, sua rotação específica foi medida e comparada com o valor descrito na literatura. A rotação específica medida foi $[\alpha]_D^{20} = -4$ (c 0,1 CHCl₃) e o valor descrito na literatura para o isômero **S-3a** é $[\alpha]_D^{25} = -22,6$ (c 1,0; CHCl₃); (PINEDO-RIVILLA *et al*, 2009; ROMANO *et al*, 2016). Portanto, o produto obtido apresentou excesso enantiomérico em favor do isômero **S-3a**, de acordo com a regra de Prelog.

Na Figura 18 está representada a avaliação cinética qualitativa da biorredução da *p*-nitroacetofenona (**3**) sem aditivo e na presença de glicose e frutose.

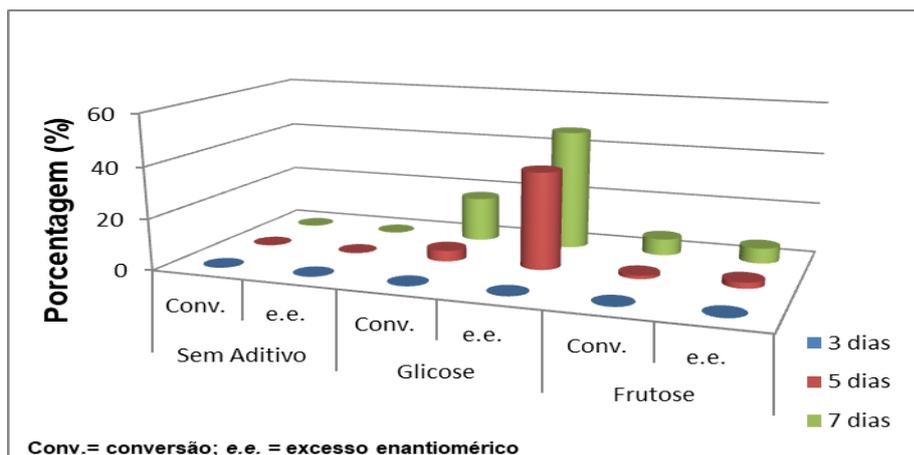


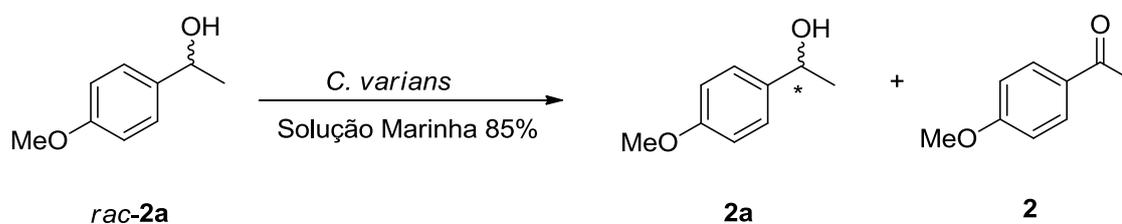
Figura 18: Avaliação cinética qualitativa da enantiosseletiva da biorredução da *p*-nitroacetofenona (**3**) utilizando a esponja marinha *C. varians*.

Podemos admitir que ambas acetofenonas *p*-substituídas **2** e **3**, apresentaram baixas reatividades frente à *C. varians*. O grupo -NO₂ levou a uma melhor reatividade, uma vez que é um forte retirador de densidade eletrônica do anel aromático, sendo assim, o carbono carbonílico estaria mais eletrofílico, facilitando o ataque do íon hidreto do cofator NADH para o substrato.

3.4.2 Emprego de *C. varians* em reações de bio-oxidações dos derivados da acetofenona

As reações de bio-oxidação, mediadas por *C. varians*, do *p*-metoxifeniletanol **2a** foram realizadas na presença de glicose, frutose e sem aditivos (Esquema 27; Procedimento Experimental pág 84). Os resultados obtidos estão descritos na Tabela 25.

Esquema 27: Porcentagem das áreas cromatográficas normalizadas para a reação de bio-oxidação do (*R/S*)-*p*-metoxifeniletanol (**2a**), utilizando a esponja marinha *C. varians*.



	Sem Aditivo		Glicose		Frutose	
	Conv. (%)	e.e. (%) (<i>R</i>)-2a	Conv. (%)	e.e. (%) (<i>R</i>)-2a	Conv. (%)	e.e. (%) (<i>R</i>)-2a

3 dias	2	6	40	42	4	3
5 dias	37	7	54	86	24	20
7 dias	78	84	55	83	36	45

Conv.= Conversão; e.e.=excesso enantiomérico

Os dados experimentais obtidos sugerem que as velocidades reacionais dos isômeros do (*R/S*)-*p*-metoxifeniletanol (**2a**) são diferentes em ambos os ensaios, prevalecendo a obtenção do isômero (*R*)-**2a** majoritariamente, com seletividade anti-Prelog (Esquema 27). As enzimas ADH demonstraram boas conversões e enantiosseletividades em 7 dias de reação, sem a adição de aditivo (Conv= 78%; e.e.=84%; Figura 19) e utilizando glicose como aditivo (Conv= 55%; e.e.=83%; Figura 20) e baixas converções utilizando frutose (Conv= 36%; e.e.=45%; Figura 21). O produto obtido a partir da reação sem aditivo foi extraído, sua rotação específica foi medida e comparada com o valor descrito na literatura. A rotação específica medida foi $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = 10$ (c 0,718; CHCl₃) e o valor descrito na literatura para o isômero S é $[\alpha]_{\text{D}}^{25} = 51,9$ (c 0,718; CHCl₃); (PINEDO-RIVILLA *et al*, 2009; ROMANO *et al*, 2016).

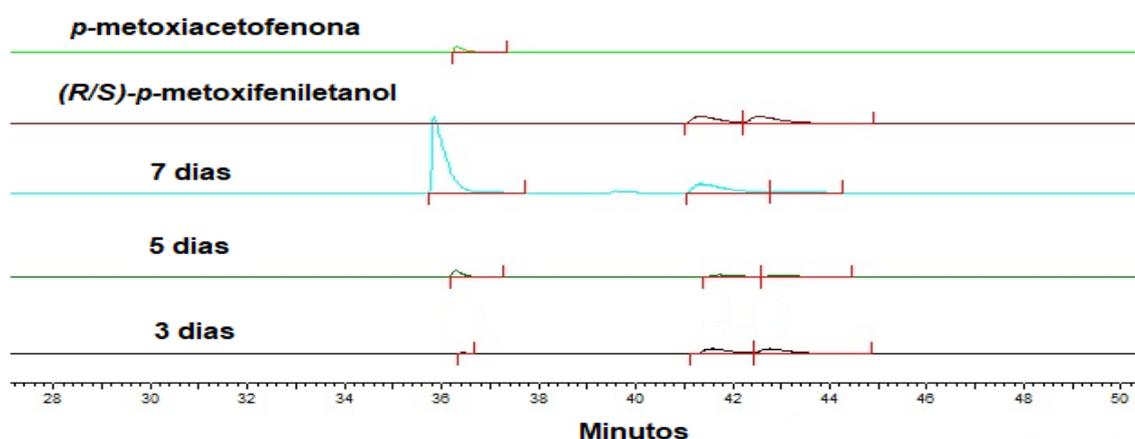


Figura 19: Cromatograma comparativo (3, 5 e 7 dias) referente bio-oxidação da (*R/S*)-*p*-metoxifeniletanol (**2a**) sem adição de aditivo utilizando a esponja marinha *C.varians* como biocatalisador durante 3,5 e 7 dias obtido por cromatografia a gás com fase estacionária quiral; coluna Cyclosil B (28,5m x 0,25mm x 0,25µm de espessura de filme) e rampa de temperatura: 80°C por 2 minutos, 5°C/min – 100°C; 0,5°C/min – 130°C; 45°C/min – 220°C; detector (FID): 220°C; injetor: 220°C; em modo split (1/10) e gás de arraste (Hélio): 1,18mL/min.

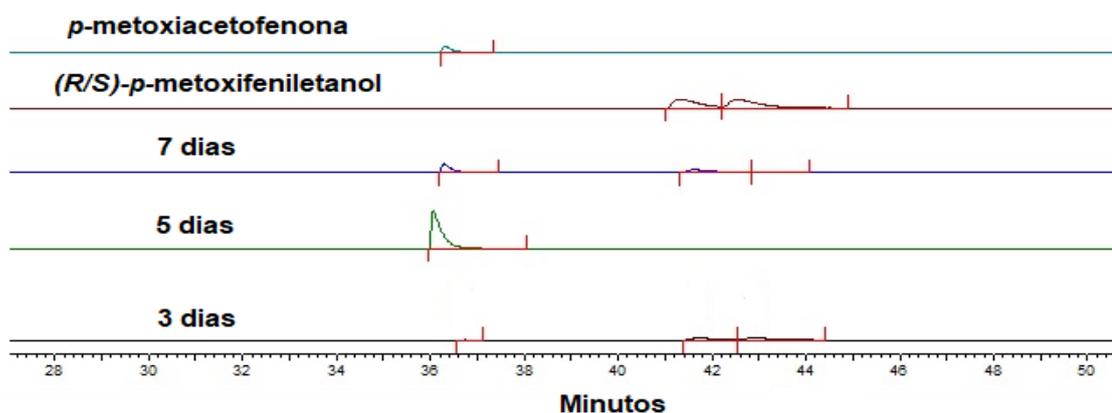


Figura 20: Cromatograma comparativo (3, 5 e 7 dias) referente bio-oxidação da (*R/S*)-*p*-metoxifeniletanol (**2a**) com adição de glicose como aditivo utilizando a esponja marinha *C.varians* como biocatalisador durante 3,5 e 7 dias obtido por cromatografia a gás com fase estacionária quiral; coluna Cyclosil B (28,5m x 0,25mm x 0,25 μ m de espessura de filme) e rampa de temperatura: 80°C por 2 minutos, 5°C/min – 100°C; 0,5°C/min – 130°C; 45°C/min – 220°C; detector (FID): 220°C; injetor: 220°C; em modo split (1/10) e gás de arraste (Hélio): 1,18mL/min.

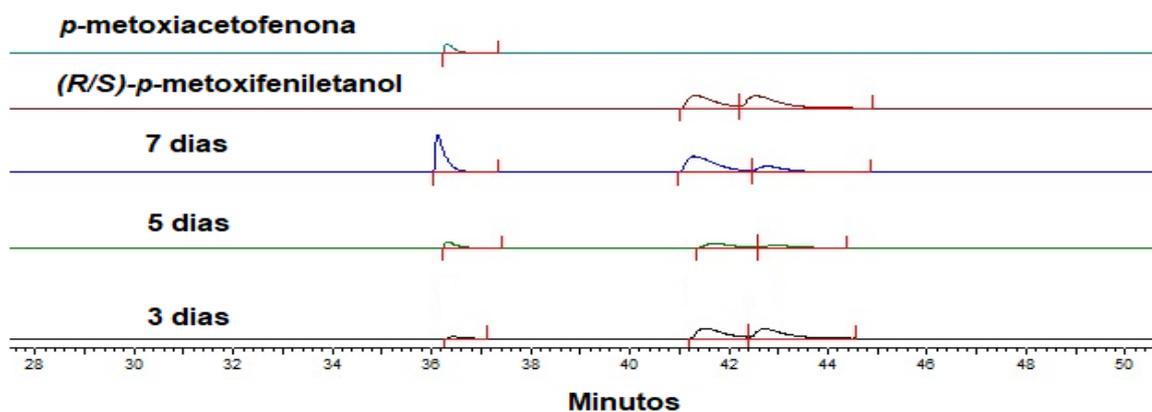


Figura 21: Cromatograma comparativo (3, 5 e 7 dias) referente bio-oxidação da (*R/S*)-*p*-metoxifeniletanol (**2a**) com adição de frutose como aditivo utilizando a esponja marinha *C.varians* como biocatalisador durante 3,5 e 7 dias obtido por cromatografia a gás com fase estacionária quiral; coluna Cyclosil B (28,5m x 0,25mm x 0,25 μ m de espessura de filme) e rampa de temperatura: 80°C por 2 minutos, 5°C/min – 100°C; 0,5°C/min – 130°C; 45°C/min – 220°C; detector (FID): 220°C; injetor: 220°C; em modo split (1/10) e gás de arraste (Hélio): 1,18mL/min.

Na Figura 22 está representada a avaliação cinética qualitativa da bio-oxidação do (*R/S*)-*p*-metoxifeniletanol (**2a**), sem aditivo e na presença de glicose e frutose.

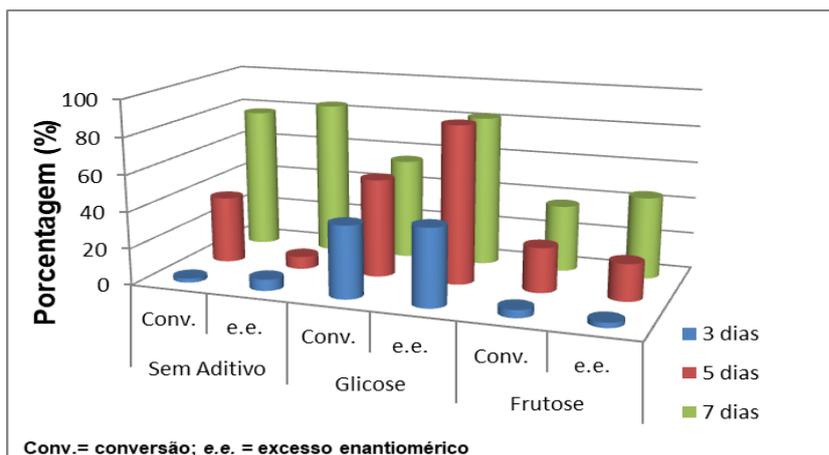
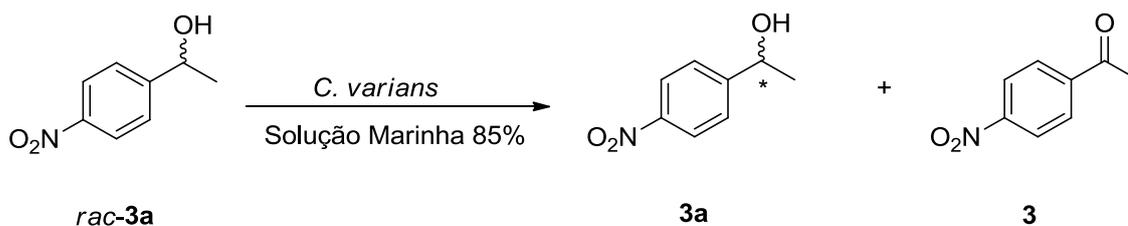


Figura 22: Avaliação cinética da enantiosseletiva da bio-oxidação do (*R/S*)-*p*-metoxifeniletanol (**2a**), utilizando a esponja marinha *C.varians*.

Após realização das reações de bio-oxidação do (*R/S*)-**2a**, o estudo foi ampliado para (*R/S*)-**3a**. As reações foram realizadas na presença da esponja marinha *C. varians*, na ausência de aditivos (Esquema 28, Figura 23) e na presença dos açúcares glicose (Esquema 28, Figura 24) e frutose (Esquema 28, Figura 24). As reações prosseguiram como descritas no procedimento experimental pág. 84. Os resultados obtidos estão descritos no Esquema 28.

Esquema 28: Porcentagem das áreas cromatograficas normalizadas da bio-oxidação do (*R/S*)-*p*-nitrofeniletanol (**3a**), utilizando a esponja marinha *Cliona Varians*.



	Sem Aditivo		Glicose		Frutose	
	Conv. (%)	e.e. (%) (<i>R</i>)- 3a	Conv. (%)	e.e. (%) (<i>R</i>)- 3a	Conv. (%)	e.e. (%) (<i>R</i>)- 3a
3 dias	ND	ND	ND	ND	ND	ND
5 dias	1	5	1	4	1	1
7 dias	1	2	1	4	1	3

Conv.= Conversão; e.e.=excesso enantiomérico; ND = Não detectado

A bio-oxidação do (*R/S*)-**3a** não gerou resultados satisfatórios em nenhum ensaio, obtendo-se baixas conversões e enantiosseletividade (Esquema 28).

Considerando que o grupo nitro é um substituinte retirador de densidade eletrônica no anel aromático, a reação possui uma cinética mais lenta em relação ao substrato contendo grupo doador de densidade eletrônica (-OMe) **2a**. O grupo nitro retira densidade eletrônica, deixando o carbono da ligação C-O deficiente em elétrons, dificultando a remoção do hidreto pelo cofator NADH (EICHBERGER *et al*, 1985; HOMANN *et al*, 2004). Esta observação corrobora com os dados obtidos para bio-oxidação dos derivados da acetofenona e observados pelos autores supracitados anteriormente.

De acordo com os resultados obtidos, o (*R/S*)-*p*-metoxifeniletanol (**2a**) possui reatividade mais adequada para reações de bio-oxidação, exibindo boas conversões e enantiosseletividades nos 3 sistemas avaliados (Esquema 27), e apresentando sempre seletividade anti-Prelog, em favor da formação do isômero (*R*)-**2a** majoritariamente.

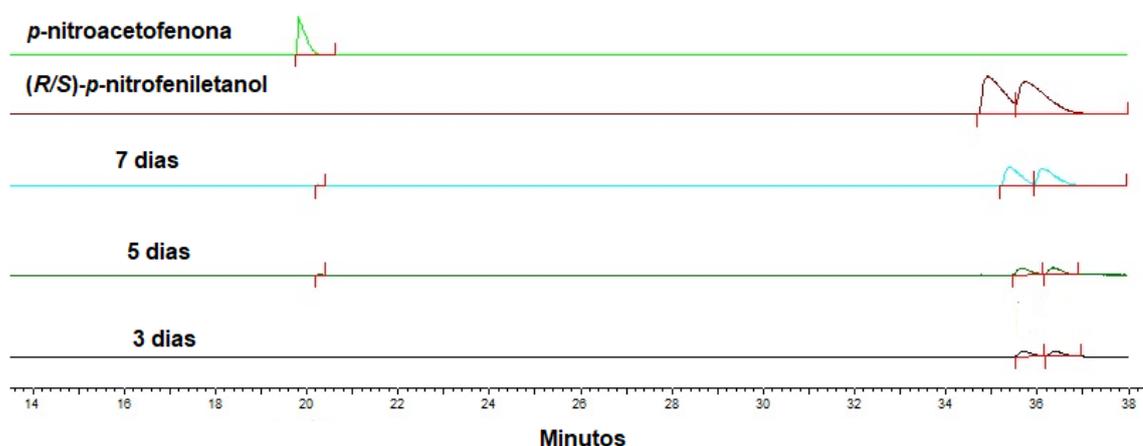


Figura 23: Cromatograma comparativo (3, 5 e 7 dias) referente bio-oxidação da (*R/S*)-*p*-nitrofeniletanol (**3a**) sem adição de aditivo utilizando a esponja marinha *C. varians* como biocatalisador durante 3,5 e 7 dias obtido por cromatografia a gás com fase estacionária quiral; coluna Cyclosil B (28,5m x 0,25mm x 0,25µm de espessura de filme) e rampa de temperatura: 130°C por 3 minutos, 1°C/min – 165°C; detector (FID): 220°C; injetor: 220°C; em modo split (1/10) e gás de arraste (Hélio): 1,18mL/min.

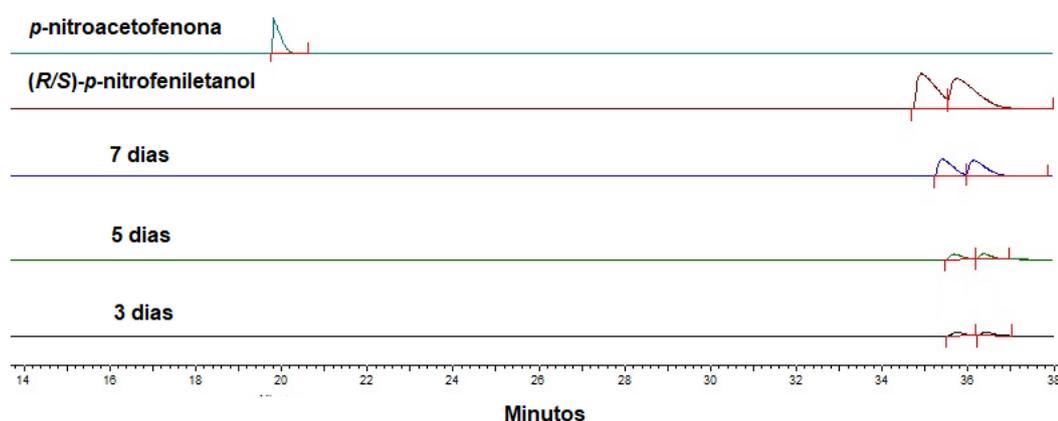


Figura 24: Cromatograma comparativo (3, 5 e 7 dias) referente bio-oxidação da (*R/S*)-*p*-nitrofeniletanol (**3a**) com adição de glicose como aditivo utilizando a esponja marinha *C.varians* como biocatalisador durante 3,5 e 7 dias obtido por cromatografia a gás com fase estacionária quiral; coluna Cyclosil B (28,5m x 0,25mm x 0,25µm de espessura de filme) e rampa de temperatura: 130°C por 3 minutos, 1°C/min – 165°C; detector (FID): 220°C; injetor: 220°C; em modo split (1/10) e gás de arraste (Hélio): 1,18mL/min.

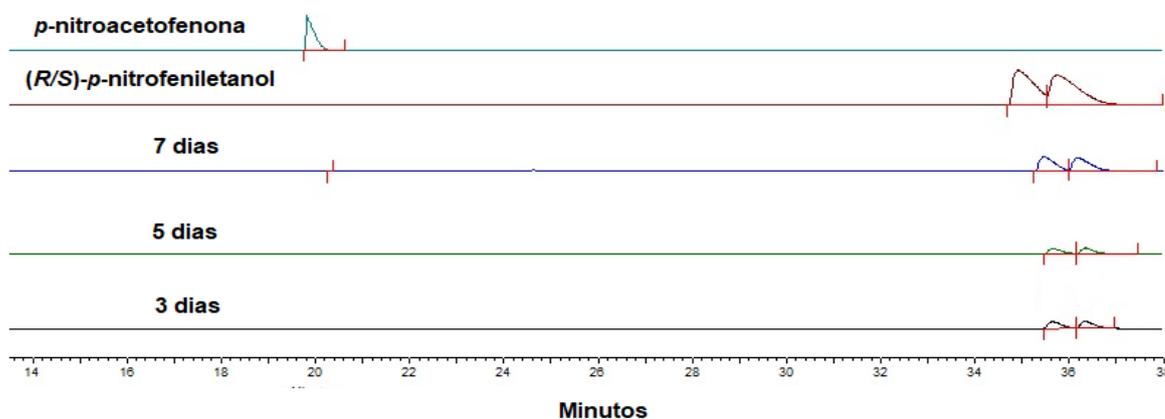


Figura 25: Cromatograma comparativo (3, 5 e 7 dias) referente bio-oxidação da (*R/S*)-*p*-nitrofeniletanol (**3a**) com adição de frutose como aditivo utilizando a esponja marinha *C.varians* como biocatalisador durante 3,5 e 7 dias obtido por cromatografia a gás com fase estacionária quiral; coluna Cyclosil B (28,5m x 0,25mm x 0,25µm de espessura de filme) e rampa de temperatura: 130°C por 3 minutos, 1°C/min – 165°C; detector (FID): 220°C; injetor: 220°C; em modo split (1/10) e gás de arraste (Hélio): 1,18mL/min.

Na Figura 26, está representada a avaliação cinética qualitativa da bio-oxidação do (*R/S*)-*p*-nitrofeniletanol (**3a**), sem aditivo e na presença de glicose e frutose.

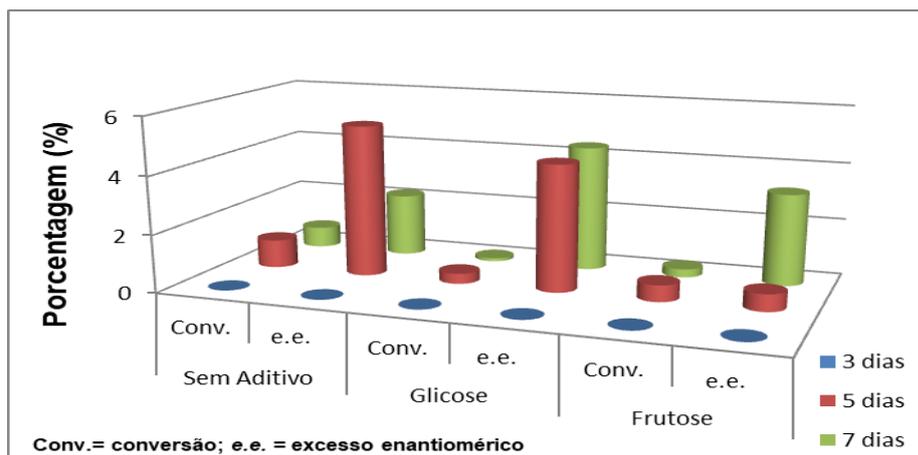


Figura 26: Avaliação cinética da enantiosseletividade da bio-oxidação do (*R/S*)-*p*-nitrofeniletanol (**3a**), utilizando a esponja marinha *C. varians*.

Para a que a reação de oxidação ocorra, é necessário que um dos resíduos de aminoácido básico da enzima retire o hidrogênio da hidroxila do substrato, facilitando a abstração do íon hidreto pelo cofator NAD^+ . Em estudos de biorredução de *para*, *meta* e *orto* nitroacetofenonas, Comasseto (2006) constatou que as biotransformações são sensíveis ao pH do meio reacional, sendo as reações mais suscetíveis em pH's ácidos.

Na tentativa de compreender os resultados apresentados pelas reações de bio-oxidação, foram medidos os pH's dos ensaios durante 3, 5 e 7 dias. No início das reações o pH medido foi 7; após três dias, o pH das reações estavam entre 8 e 10 e assim prosseguiram até o final das reações, com 7 dias. Portanto, a presença do pH básico no meio reacional deve prejudicar a reatividade do substrato, justificando os maus resultados observados para o *p*-nitrofeniletanol **3a**, em comparação ao *p*-metoxifeniletanol **2a**. No caso do grupo metóxi, podemos justificar sua reatividade em meio básico por causa do seu efeito doador de densidade eletrônica. Esse efeito tende a polarizar a ligação C-O mais eficientemente, o que explicaria os melhores resultados.

Em estudos anteriores desenvolvidos no nosso grupo de pesquisa por Sousa e colaboradores (2017) (Esquema 20, Pág. 54) foi observada a biorredução de α -cetoesteres, isatina e o piruvato de etila. Os resultados demonstraram que a esponja marinha *C. varians* foi enantiosseletiva na presença de glicose e frutose como aditivos (Pág. 54), sendo assim, podemos concluir que o biocatalisador possui diferentes formas que dependem exclusivamente da estrutura do substrato, pois

certos substratos permitem um encaixe mais efetivo, no estado de transição, entre a enzima e o substrato.

3.5 Emprego da esponja marinha *C. varians* em reações de biorredução do acetilfurano e resolução cinética oxidativa do (*R/S*)-1-(2-furil) etanol.

Após estudos de biorredução e bio-oxidação empregando substratos aromáticos contendo um grupo doador (-OMe) e um grupo retirador (-NO₂) de densidade eletrônica do anel, o estudo de reatividade e seletividade foi estendido para o emprego do acetilfurano (**4**) nas reações de biorredução e do (*R/S*)-1-(2-furil)-etanol (**4a**) para reações de bio-oxidação. Esses substratos foram selecionados porque a presença de heterocíclis em compostos biológicos atribui características muito interessantes à molécula. O esqueleto de anéis de 5 membros está presente em numerosos agentes medicinais que possuem uma variedade de atividades biológicas como analgésica, antibacteriana, anticonvulsivante, antifúngica, antiinflamatória, anti-hiperglicêmica, antitumoral, antiviral, entre outras.

O acetilfurano (**4**) utilizado foi obtido de fonte comercial, adquirido da Sigma Aldrich, e caracterizado apenas por infravermelho para confirmação estrutural (Figura 52, Pág. 116). Os sinais encontrados foram uma banda característica de C=O de cetona conjugada em 1681 cm⁻¹, e um estiramento característico de C-H em 3132 cm⁻¹. O produto **4a** teve confirmação estrutural através de análises de IV, RMN de ¹H e RMN de ¹³C. No IV foi observada uma banda em 3151cm⁻¹, característica de estiramento O-H, além de uma banda em 2981cm⁻¹, referente ao estiramento C-H (Figura 56, Pág. 119).

No espectro de RMN de ¹H (400 MHz; CDCl₃) constam seis sinais distintos (Figura 57 , p.119). Um duplo dubleto em 7,36 ppm (dd, *J*=0,84 Hz; *J*=1,83 Hz, 1H) foi atribuído ao H_α em relação ao átomo de oxigênio. O sinal 6,32 ppm (dd, *J*=1,85 Hz; *J*=3,22 Hz, 1H) referente ao H_α e em 6,22 ppm (dt, *J*=0,76 Hz; *J*=3,24 Hz, 1H) referente ao H_β, ambos em relação ao carbono *ipso* do anel aromático. O sinal em 4,87 ppm (q, *J*=6,58 Hz, 1H) foi atribuído ao hidrogênio ligado ao carbono carbinólico. O sinal 2,05 ppm (s.1H, OH) é característico de hidrogênio ligado ao oxigênio, pois grupos que possam efetuar ligações de hidrogênio tendem a não aparecer o sinal no espectro de RMN ou apresentar um sinal pouco visível, o que pode ser verificado no espectro em questão. Em 1,54 ppm (d, *J*=6,58 Hz, 3H),

adjacente ao carbono carbinólico, foi atribuído aos hidrogênios metílicos (Tabela 7). O substrato também foi caracterizado por RMN de ^{13}C (Figura 58, p.120). O espectro apresentou 6 sinais distintos, o que condiz com o esperado para o produto. Em 157ppm, o sinal foi conferido ao $\text{C}\alpha$ aromático ao carbono carbinólico. O sinal em 141,9 ppm foi atribuído ao carbono aromático ligado ao átomo de oxigênio. O sinal em 110,1 ppm referente ao $\text{C}\alpha$ e em 105,1 ppm referente ao $\text{C}\beta$ foram atribuídos aos carbonos adjacentes ao carbono *ipso* aromático. O sinal em 63,6 ppm foi atribuído ao carbono carbinólico e em 21,2 ppm o sinal foi atribuído a metila adjacente ao carbono carbinólico (Tabela 7). Os valores observados corroboram com os descritos na literatura (PRINCIVAL, 2016).

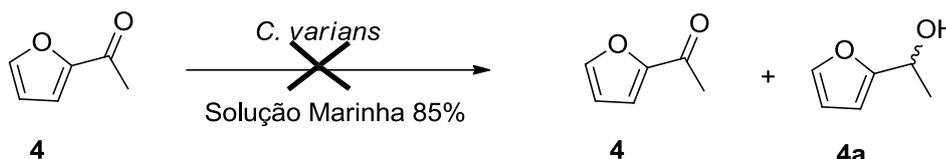
Tabela 7: Caracterização estrutural do substrato 1-(2-furil)-etanol (**4a**) por RMN de ^1H [CDCl_3 ; 400MHz; $\delta(\text{ppm})$] e ^{13}C [CDCl_3 ; 100MHz; $\delta(\text{ppm})$].

Deslocamento químico (ppm)			
^1H [400Mz, CDCl_3 , $\delta(\text{ppm})$]		^{13}C [100MHz, CDCl_3 , $\delta(\text{ppm})$]	
1 – 1H (OH)	2,05	1 – (-COH)	63,6
2 – 1H	4,87	2 – CH_3	21,2
3 – 3H	1,54	3 - C (<i>ipso</i>)	157,5
4 – 1H (Ar)	6,22	4 – C (Ar)	110,1
5 – 1H (Ar)	6,32	5 - C (Ar)	105,1
6 – 1H (Ar)	7,36	6 - C (Ar)	141,9

Os testes foram iniciados com as reações de biorredução do acetilfurano (Esquema 29), utilizando a esponja marinha *C. varians*, conforme descrito no procedimento experimental na página 84. Os experimentos foram conduzidos na presença de glicose ou frutose, como fontes de açúcares, e sem adição de aditivos. As reações foram realizadas em 3,5 e 7 dias, e analisadas suas conversões e enantiosseletividades. Os cromatogramas das reações que foi possível a sua recuperação estão descritos na Figura 54, pág 116 e Figura 55, pág.117. Os

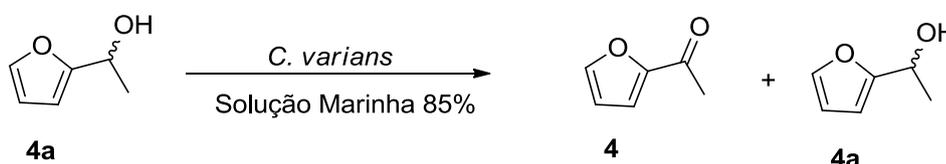
resultados demonstraram que a esponja marinha *C. varians* não foi um catalisador eficiente para a redução do acetilfurano (**4**). Não foram observadas reações paralelas, o que indica a não reatividade do substrato frente aos micro-organismos presentes na esponja marinha *C. varians*.

Esquema 29: Reação de biorredução do acetilfurano.



Diante dos resultados negativos apresentados na reação de redução do acetilfurano (**4**), os experimentos prosseguiram com a bio-oxidação do seu análogo, o (*R/S*)-1-(2-furil)-etanol (**4a**). O procedimento experimental seguiu conforme descrito na página 84 e os resultados foram mais significativos nas reações de bio-oxidação do que biorredução (Esquema 30). Nos cromatogramas (Figuras 27, 28, 29) podemos verificar que a reação apresentou melhores conversões e excessos enantioméricos somente para as reações sem aditivo. Entre os aditivos avaliados (glicose e frutose), ambos levaram a resultados de baixas conversões e e.e. (Esquema 30). Na figura 30 está representada a avaliação cinética qualitativa do (*R/S*)-1-(2-furil)-etanol (**4a**) das reações de bio-oxidação.

Esquema 30: Porcentagem das áreas cromatográficas normalizadas para reação de bio-oxidação do (*R/S*)-1-(2-furil)-etanol (**4a**), utilizando a esponja marinha *C. varians*.



	Sem Aditivo		Glicose		Frutose	
	Conv. (%)	e.e.(%) 4a	Conv. (%)	e.e.(%) 4a	Conv. (%)	e.e.(%) 4a
3 dias	7	4	ND	ND	11	10
5 dias	33	26	ND	ND	23	24

7 dias	49	46	10	10	27	34
---------------	----	----	----	----	----	----

Conv.= Conversão; e.e.=excesso enantiomérico; ND = Não detectado

Devido aos resultados negativos, os produtos das reações de biotransformação não foram isolados e não foi possível determinar a estereoquímica do enantiômero majoritário.

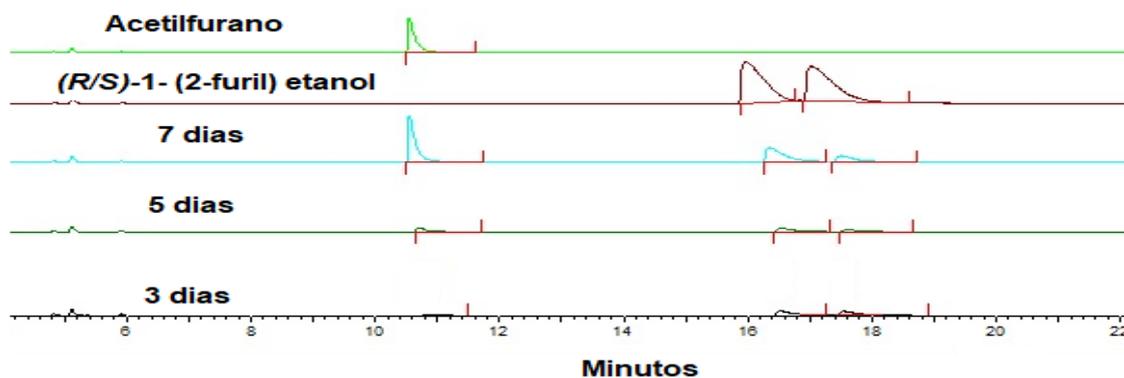


Figura 27: Cromatograma comparativo (3, 5 e 7 dias) referente bio-oxidação do (*R/S*)-1-(2-furil)-etanol (**4a**) sem adição de aditivo utilizando a esponja marinha *C.varians* como biocatalisador durante 3,5 e 7 dias obtido por cromatografia a gás com fase estacionária quiral; coluna Cyclosil B (28,5m x 0,25mm x 0,25µm de espessura de filme) e rampa de temperatura: 60°C por 1 minuto, 1°C/min – 100°C; detector (FID): 220°C; injetor: 220°C; em modo split (1/10) e gás de arraste (Hélio): 1,18mL/min.

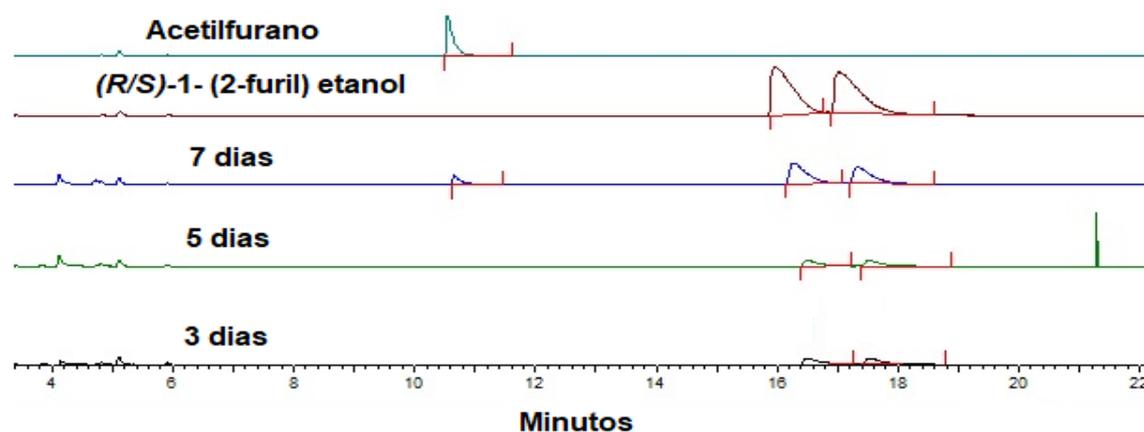


Figura 28: Cromatograma comparativo (3, 5 e 7 dias) referente bio-oxidação do (*R/S*)-1-(2-furil)-etanol (**4a**) com adição de glicose como aditivo utilizando a esponja marinha *C.varians* como biocatalisador durante 3,5 e 7 dias obtido por cromatografia a gás com fase estacionária quiral; coluna Cyclosil B (28,5m x 0,25mm x 0,25µm de espessura de filme) e rampa de temperatura: 60°C por 1 minuto, 1°C/min – 100°C; detector (FID): 220°C; injetor: 220°C; em modo split (1/10) e gás de arraste (Hélio): 1,18mL/min.

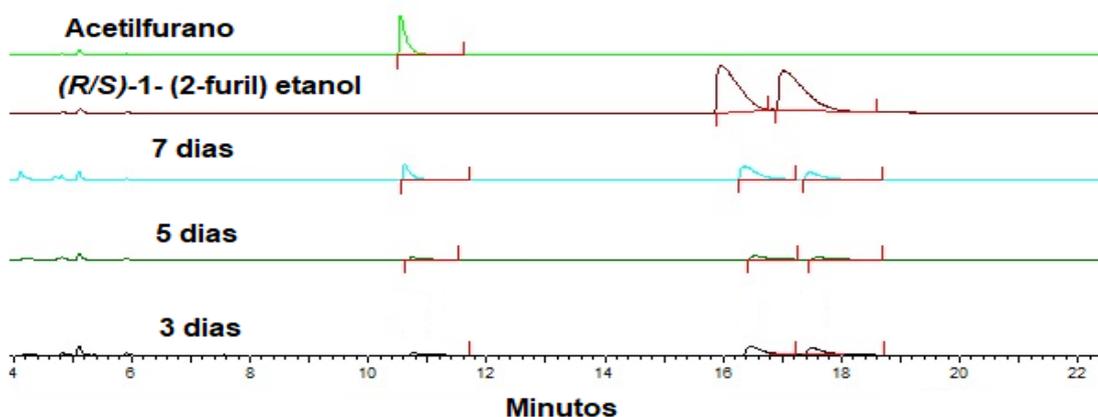


Figura 29: Cromatograma comparativo (3, 5 e 7 dias) referente bio-oxidação do *(R/S)*-1-(2-furil)-etanol (**4a**) com adição de frutose como aditivo utilizando a esponja marinha *C.varians* como biocatalisador durante 3,5 e 7 dias obtido por cromatografia a gás com fase estacionária quiral; coluna Cyclosil B (28,5m x 0,25mm x 0,25 μ m de espessura de filme) e rampa de temperatura: 60°C por 1 minuto, 1°C/min – 100°C; detector (FID): 220°C; injetor: 220°C; em modo split (1/10) e gás de arraste (Hélio): 1,18mL/min.

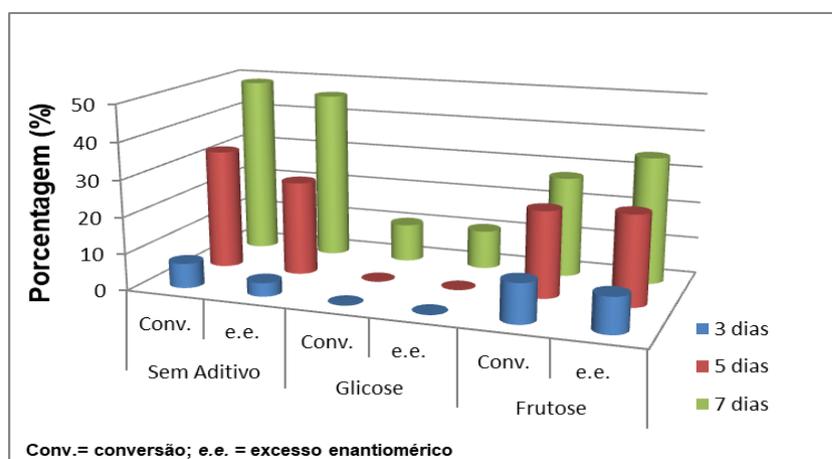


Figura 30: Avaliação cinética da enantiosseletiva da bio-oxidação do *(R/S)*-1-(2-furil)-etanol (**4a**) utilizando a esponja marinha *C.varians*.

4. CONCLUSÃO

Os resultados demonstraram que os micro-organismos, presentes na esponja marinha *C. varians*, responsáveis pelas biorreduções enantiosseletivas das cetonas aromáticas de seis e cinco membros demonstraram baixas especificidades enzimáticas e baixas enantiosseletividades. Entretanto, as bio-oxidações dos álcoois racêmicos demonstram boas a excelentes enantiosseletividades. Assim, podemos

inferir que as enzimas presentes na *C. varians* são enantiosseletivas em reações de oxidação para derivados da acetofenona.

Os resultados experimentais demonstraram que as biotransformações tem influencia direta da estrutura do substrato, suas interações com o sitio ativo da enzima e nos efeitos eletrônicos dos substituintes. Os produtos obtidos apresentaram seletividades Prelog e anti-Prelog.

Sendo assim, a utilização de processos enzimáticos (micro-organismos, células inteiras e enzimas isoladas) é muito atrativa no desenvolvimento de rotas verdes alternativas para a síntese de substâncias químicas finas. Compostos aromáticos de seis membros são importantes grupos encontrados em produtos naturais e sintéticos de interesse biológico. Os resultados experimentais apresentados nesse trabalho demonstraram que a enzima álcool desidrogenase era estável sob condições básicas, favorecendo reações de bio-oxidação. Entretanto, são necessárias maiores investigações sobre a natureza das oxiredutases presentes na esponja marinha e posterior estudo do mecanismo reacional.

PESPECTIVAS

A esponja marinha *C. varians* demonstrou ser um catalisador interessante para a obtenção de compostos enantiomericamente enriquecidos, principalmente na oxidação de álcoois com seletividade anti-prelog. Visto que a competição enzimática é um fator determinante para o rendimento e enantiosseletividade das reações, seria interessante identificar e isolar os seus micro-organismos para posterior investigações das estereoseletividades. A esponja marinha *C. varians* demonstrou potencial de redução e oxidação de compostos carbonilados, o que infere que suas enzimas possuem enantiosseletividades para esses compostos. A concentração do substrato *versus* biocatalisador também é um fator a ser considerado, visto que, as enzimas podem ser saturadas com concentração exacerbada do substrato, o que diminui a sua capacidade catalítica. Outros parâmetros que são passíveis de avaliação sobre a eficiência enzimática são a temperatura e o pH.

5. PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

5.1 Reagentes

Os reagentes acetofenona **1** e (*R/S*)-1-feniletanol **1a**, *p*-metoxiacetofenona **2** foram adquiridos da Sigma Aldrich e o *p*-nitroacetofenona **3** foi adquirido da Dinâmica. Os açúcares frutose e glicose foram adquiridos da Nuclear e Sigma Aldrich, respectivamente. Os solventes utilizados foram adquiridos da Sigma Aldrich e Synth. As soluções salinas foram preparadas com sal marinho comercial adquirido em casa de produtos naturais.

A esponja marinha *Cliona varians* foi coletada em maré baixa, pois são esponjas de superfície, na Praia do Forte, localizada no município de Mata de São João, no estado da Bahia, no Brasil (Figura 7, pág. 54). As esponjas foram coletadas em sacolas plásticas e armazenadas imersas em água do mar. Após a coleta, as amostras foram transportadas a 0°C até o laboratório 10 localizado no Cienam II - UFBA, e armazenadas em um freezer á -20°C.

A espécie de *C. varians* foi identificada pela bióloga Dra. Carla Menegola. As amostras de comprovantes (n^os 4039, 4040 e 4032) foram depositadas no Museu de Zoologia da Biologia, localizado na Universidade Federal da Bahia, Salvador, Brasil. A coleta foi autorizada pelo ministro do Meio Ambiente (licença permanente do SISBIO-ICMBio-MMA n^o 11793-3).

5.2 Reações de biorredução e resolução cinética oxidativa utilizando esponja marinha *Cliona varians*

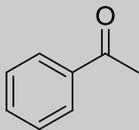
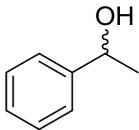
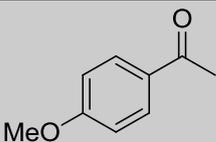
A esponja marinha *Cliona varians* foi lavada com solução marinha 0,85% em água destilada por um período de 10 minutos e cortada em pequenos pedaços de aproximadamente 1 cm de comprimento, em condições assépticas. Em experimentos individuais, o substrato (1,15 mmol) foi adicionado a uma suspensão do biocatalisador (40g) em solução marinha a 0,85% (120 mL) em erlenmayer de 250mL. Cada mistura foi colocada em agitação mecânica em uma mesa agitadora orbital com controle de temperatura, a 180 rpm e 25°C. Após 3 e 5 dias foram retiradas uma alíquota de 5mL das amostras individuais e extraídas com 2x3mL de acetato de etila. Com 7 dias, as amostras foram homogeneizadas com celite e filtradas a vácuo em funil de Buchner. Após filtração, as reações foram extraídas

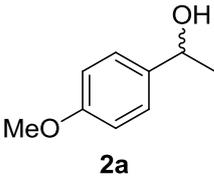
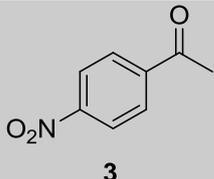
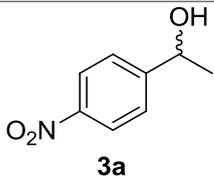
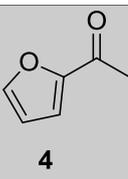
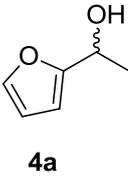
com 3x15mL de acetato de etila e posteriormente secas com MgSO₄ anidro. O solvente foi evaporado sob pressão reduzida em rotaevaporador. Os produtos obtidos foram analisados por cromatografia gasosa em fase estacionaria quiral e a percentagem de conversão e o excesso enantiomérico das amostras individuais foram calculadas a partir da normalização e integração das áreas dos picos gerados no cromatograma.

A cada experimento individual foi adicionado glicose (38mmol) ou frutose (38mmol), como fonte de aditivos para avaliação do potencial enantioselectivo das reações. Os produtos obtidos contendo os carboidratos seguem como descritos anteriormente.

5.3 Métodos Analíticos de Análise

Tabela 8: Métodos cromatográficos selecionado de eluição dos substratos utilizado cromatografia a gás com fase estacionária quiral nas reações biocatalíticas.

Entrada	Substrato	Método de eluição - CG	Tempo de retenção (min.)
1	 1	80°C – 5 min. 2°C/min – 100°C 5°C/min – 220°C	13,18
2	 1a	80°C – 5 min. 2°C/min – 100°C 5°C/min – 220°C	18,89 (R) 19,31 (S)
3	 2	80°C – 2 min. 5°C/min – 100°C 0,5°C/min – 130°C 45°C/min – 220°C	36,31

4	 <p>2a</p>	80°C – 2 min. 5°C/min – 100°C 0,5°C/min – 130°C 45°C/min – 220°C	41,35 (R) 42,55 (S)
5	 <p>3</p>	130°C – 3 min. 1°C/min – 165°C	19,81
6	 <p>3a</p>	130°C – 3 min. 1°C/min – 165°C	34,91 (R) 35,77 (S)
7	 <p>4</p>	60°C – 1 min. 1°C/min – 100°C	10,54
8	 <p>4a</p>	60°C – 1 min. 1°C/min – 100°C	16,15 (NI) 17,19 (NI)

NI: não identificado

Os excessos enantioméricos e as conversões das reações de biotransformações foram determinados por cromatografia gasosa do fabricante *Agilent Technologies*, modelo 7820A, com detector por ionização de chama (FID) e injetor automático. Os substratos das reações de oxidação e redução foram separados em coluna quiral cyclosil B 30% heptakis (2,3-di-O-metil-6-O-terc-butil-dimetilsilício) β-ciclodextrina, com dimensões de comprimento de 28,5m e 0,25mm de diâmetro interno, 0,25μm de espessura de filme. As temperaturas do detector e do injetor foram constantes em 220°C e a vazão do gás hélio utilizado como gás de arraste foi de 1,18mL/min. Todas as corridas foram analisadas em modo Split (1/10). As análises de espectroscopia no infravermelho foram realizadas em um espectrômetro Shimadzu, com transformada de Fourier Affinity-1, através de pastilhas de NaCl (amostras líquidas) ou em pastilhas trituradas e prensadas de brometo de potássio. Nas caracterizações dos substratos por RMN de ¹H e de ¹³C,

foi utilizado um aparelho Bruker de 400 MHz. As amostras foram solubilizadas em CDCl_3 , expressos em ppm e as constantes de acoplamento em Hz.

5.4 Rotação Específica

A rotação específica dos compostos oriundos das reações biocatalíticas foram medidas em um equipamento de polarímetro digital Perkin Elmer, modelo 343 a 25°C e comprimento de onda da radiação do sódio ($D=589\text{nm}$). Os solventes utilizados para medida da rotação óptica foi em relação aos dados relatados na literatura.

5.5 Determinação das conversões e excessos enantioméricos

Os valores de conversão para os substratos foram calculados através da normalização das áreas integradas dos cromatogramas obtidos.

$$\text{Normalização: \%A} = (\text{Área A} / \text{Área total}) \times 100$$

A porcentagem dos excessos enantioméricos foram calculados normalizado as áreas integradas segundo a equação abaixo:

$$e.e\% = [(A-a)/(A+a)] \times 100$$

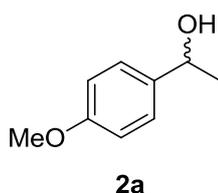
A = área normalizada do enantiômero maior

a = área normalizada do enantiômero menor

e.e. = excesso enantiomérico

5.6 Síntese dos substratos

p-Metoxifeniletanol **2a**



p-metoxiacetofenona **2** (2059,6 mg; 13,71mmol) foi pesada em um balão de 125 mL e posteriormente adicionado 25mL de MeOH (grau HPLC). O balão foi vedado com um septo e conectado a um sistema de saída e atmosfera inerte, a 0°C ,

sob agitação. Aguardou-se 5 minutos, e então adicionou-se ao sistema reacional NaBH_4 vagorosamente e aguardou-se novamente 5 minutos até completa dissolução. O sistema de saída de gás foi retirado e a reação permaneceu por 24h sob agitação, em atmosfera inerte. Após 24h foi adicionado vagorosamente HCl 5% a 0°C , até o pH atingir 5 ou 6, e então evaporou-se o solvente. Posteriormente, a reação foi lavada com 10mL de salmoura, extraída com 3x15mL de diclorometano e seca com MgSO_4 anidro. Após a extração, foi realizada uma filtração por gravidade e em seguida o solvente foi evaporado a vácuo, obtendo-se o (*R/S*)-*p*-metoxifeniletanol **2a** em 75% de rendimento global (COMASSETO, 2003).

$^1\text{H RMN}$ (400 MHz; CDCl_3) δ : 1.47 (d, $J=6,5$ Hz, 3H), 3,75 (s, 3H), 4,85 (q, $J=6,5$ Hz, 1H), 6,85 – 6,91(m, 2H), 7,27 – 7,33(m, 2H)

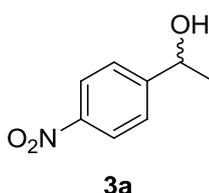
$^{13}\text{C RMN}$ (100 MHz; CDCl_3) δ : 25,0; 55,3; 70,0; 113,8; 126,6; 138,0; 159,0.

IV (cm $^{-1}$) = 3363 cm^{-1} , 2968 cm^{-1} , 1242 cm^{-1} .

CGQ = Tr (*R*): 39,1min. e Tr (*S*): 41,1min.

Estado Físico= Líquido

p-Nitrofeniletanol **3a**



p-nitroacetofenona **3** (2059,6 mg; 13,71mmol) foi pesada em um balão de 125 mL e, posteriormente, foram adicionados 25mL de MeOH (grau HPLC). O balão foi vedado com um septo e conectado a um sistema de saída e atmosfera inerte, a 0°C , sob agitação. Aguardou-se 5 minutos, e então adicionou ao sistema reacional NaBH_4 vagorosamente, aguardou-se novamente 5 minutos até completa dissolução. O sistema de saída de gás foi retirado e a reação permaneceu por 24h sob agitação, em atmosfera inerte. Após 24h, foi adicionado vagorosamente HCl 5% a 0°C , até o pH atingir 5 ou 6, e então evaporou-se o solvente e posteriormente a reação foi

lavada com 10mL de salmoura, extraída com 3x15mL de diclorometano e seca com MgSO₄ anidro. Após a extração, foi realizada uma filtração por gravidade e em seguida o solvente foi evaporado, obtendo-se o p-nitrofeniletanol **3a** em 95% de rendimento global (COMASSETO, 2003).

¹H RMN (400MHz; CDCl₃) δ: 1,52 (d, *J*=6,5 Hz, 3H), 2,25 (s, 1H, OH), 5,02 (q, *J*=6,7 Hz, 1H), 7,56 (d, *J*=8,5 Hz, 2H), 8,18 (d, *J*=8,5 Hz, 2H)

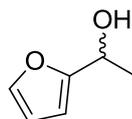
¹³C RMN (100MHz; CDCl₃) δ: 25,5; 69,5; 123,7; 126,1; 147,1; 153,0.

IV (cm⁻¹) = 3387 cm⁻¹, 1265 cm⁻¹, 1512,18 cm⁻¹, 1346,31 cm⁻¹ e 856 cm⁻¹.

CGQ = Tr (*R*): 34,9min e Tr (*S*): 35,7min.

Estado Físico= Líquido

1-(2-furil)-etanol **4a**



4a

Em um balão de 100mL seco foi pesado o acetilfurano **4** (2001,2 mg; 18,17 mmol) e adicionado 30mL de etanol absoluto 95% com o meio reacional em agitação. O balão foi vedado com septo e conectados a saída e atmosfera inerte á 0°C. Após 5 minutos foi adicionado NaBH₄ (343,0mg; 9,06) vagorosamente até completa dissolução, permanecendo a reação por 2h a atmosfera inerte. Decorridos ás 2h, o solvente foi removido a pressão reduzida e o resíduo diluído com 30mL de NaHCO₃ e extraído com 3x20mL de diclorometano. A fase orgânica foi separada e seca com MgSO₄. O solvente foi evaporado a pressão reduzida obtendo o 1- (2-furil) etanol **4a** com 75% de rendimento (COMASSETO, 2003).

¹H RMN (400 MHz; CDCl₃) δ: 1.54 (d, *J*=6.6 Hz, 3H), 2,05 (s, 1H, OH), 4,87 (q, *J*=6,6 Hz, 1H), 6,22 (dt, *J*=0,8 Hz; *J*=3,2 Hz, 1H), 6,32 (dd, *J*=1,9 Hz; *J*=3,2 Hz, 1H), 7,36 (dd, *J*=0,7 Hz; *J*=1,9 Hz, 1H).

¹³C RMN (100 MHz; CDCl₃) δ: 21,2; 63,6; 105,1; 110,1; 141,9; 157,5.

IV (cm⁻¹) = 3132 cm⁻¹, 3151 cm⁻¹

$[\alpha]^{20}_D$ Lit. (S) = -20,0 (c 1; CHCl₃) [PRINCIVAL, 2016]

CGQ = Tr (ND): 16,9min e Tr (ND): 17,9min

Estado Físico = Líquido.

6. REFERÊNCIAS

ACHARYA, C.; ACHARI, A.; JAISANKAR, P. *Daucus carota* root enzyme catalyzed Henry reaction: A green approach. *Tetrahedron Letters*. Vol. 59, p.663-666, 2018.

ACHARYA, C.; MANDALA, M.; DUTTAB, T.; GHOSH, A. K.; JAISANKARA, P. Enzyme from *Daucus carota* root catalyzed asymmetric cross aldol reaction. *Tetrahedron Letters*. Vol. 57, p.4382–4385, 2016.

ALVES, L. A. ; BERTINI , L. M. ; BIZERRA, A. M. C. ; MATTOS, M. C. ; MONTE, F. J. Q. ; de LEMOS T. L. G. Zingiber officinale (GENGIBRE) COMO FONTE ENZIMÁTICA NA REDUÇÃO DE COMPOSTOS CARBONÍLICOS. *Química Nova*. v. 38, p. 483 - 487, 2015.

AMIDJOJO, M.; WEUSTER-BOTZ, D. Asymmetric synthesis of the chiral synthon ethyl (S)-4-chloro-3-hydroxybutanoate using *Lactobacillus kefir*. *Tetrahedron: Asymmetry*. Vol.16, p.899–901, 2005.

ANDRADE, L. H.; UTSUNOMIYA, R. S.; OMORI, A. T.; PORTO, A. L. M.; COMASSETO, J. V. Edible catalysts for clean chemical reactions: Bioreduction of aromatic ketones and biooxidation of secondary alcohols using plants. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. Vol. 38, p. 84–90, 2006.

BALDASSARRE, F.; BERTONI, G.; CHIAPPE, C.; MARIONI, F. Preparative synthesis of chiral alcohols by enantioselective reduction with *Daucus carota* root as biocatalyst. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. Vol.11, p.55-58, 2000.

BERA, P. K.; MAITY, N. C.; ABDI, S. H.R.; KHAN, N. H.; KURESHY, .I.; BAJAJ, H. C. Macrocyclic Mn(III) salen complexes as recyclable catalyst for oxidative kinetic resolution of secondary alcohols. *Applied Catalysis A: General*. Vol.467, p.542–551, 2013.

BIROLI, W. G.; FERREIRA, I. M.; JIMENEZ, D. E. Q.; SILVA, B. N. M.; SILVA, B. V.; PINTO, A. C.; PORTO, A. L. M. First Asymmetric Reduction of Isatin by Marine-Derived Fungi. *Journal of the Brazilian Chemical Society*. Vol.28, p.1023, 2017.

BOWDEN, K.; HEILBRON, I. M.; JONES, E. R. H.; WEEDON, B. C. L. Researches on acetylenic compounds: Part I. The preparation of acetylenic ketones by oxidation of acetylenic carbinols and glycols. *Journal of the Chemical Society*. Vol.39, 1946.

BUGG, T. D. H. The development of mechanistic enzymology in the 20th century. *Natural Product Reports*. Vol.18, p.465–493, 2001.

CHADHA, A.; VENKATARAMAN, S.; PREETHA, R.; PADHI, S. K. *Candida parapsilosis*: A versatile biocatalyst for organic oxidation- reduction reactions. *Bioorganic Chemistry*. Vol. 68, p.187–213, 2016

CHAMPE, C. P.; HARVEY, R. A. Bioquímica ilustrada. 3 ed.; Porto Alegre: Artmed, 2006.

CRICHTON, R. R. Zinc – Lewis Acid and Gene Regulator. *Biological Inorganic Chemistry*. p. 229-246, 2012.

COMASSETO, J.V.; OMORI, A .T.; ANDRADE, L. H.; PORTO, A. L. M. Bioreduction of fluoroacetophenones by the fungi *Aspergillus terreus* and *Rhizopus oryzae*. *Tetrahedron:Asymmetry*. Vol.14, p.711–715, 2003.

CORDELL, G. A.; LEMOS, T. L. G.; MONTE, F. J. Q.; MATTOS, M. C. Vegetables as Chemical Reagents. *Journal of Natural Products*. Vol. 70, nº. 3, p.478-492, 2007

COREY, E. J.; SUGGS, W. Pyridinium chlorochromate: An efficient reagent for oxidation of primary and secondary alcohols to carbonyl compounds. *Tetrahedron Letters*. Vol.16, p.2647,1975.

COSTA, P. R. R.; PILLI, R. A.; PINHEIRO, S.; VASCONCELOS, M. L. A. A.; Substâncias Carboniladas e seus Derivados, Bookman: Porto Alegre, 2003

EICHBERGER ,G; FABER, K; GRIENGL, H; Reduktion 4-substituierter Acetophenone mittels Hefe. *Mon. Chem*. Vol. 116, p. 1233–1236, 1985.

FABER, K.; *Biotransformations in Organic Chemistry*, 5th ed.; Springer, 2004.

FATIADI, A. J. The classical permanganate ion: still a novel oxidant in organic chemistry. *Synthesis*. Vol.2, p.85-127, 1987.

FERSHT, A. Structure and mechanism in protein science: a guide to enzymecatalysis and protein folding. *Freeman: New York*. p. 295, 1998.

GOLDBERG, S.; GUO, Z.; CHEN, S.; GOSWAMI, A.; PATEL, R. N. Synthesis of ethyl-(3R,5S)-dihydroxy-6-benzyloxyhexanoates via diastereo- and enantioselective microbial reduction: Cloning and expression of ketoreductase III from *Acinetobacter* sp. SC 13874. *Enzyme and Microbial Technology*. Vol. 43, p. 544–549, 2008.

HAYDELBA, D.; HADJU, E.; PEIXINHO, S.; FERNANDEZ, J. C. C. Esponjas marinhas da Bahia: guia de campo e laboratório. Rio de Janeiro: Museu Nacional. p. 276, 2011.

HAJDU, E. ; CUSTODIO, M. R. Checklist de Porifera do Estado de São Paulo, Brasil. *Biota Neotrop*. Vol.11, p.427-444, 2011.

HOMANN, M. J; VAIL, R. B; PREVITE, E; TAMAREZ, M; MORGAN, B; DODDS, D. R; ZAKS, A; Rapid identification of enantioselective ketone reductions using targeted microbial libraries. *Tetrahedron*, Vol. 60, p. 789–797, 2004.

HUMMEL, W. Reduction of acetophenone to R(+)-phenylethanol by a new alcohol dehydrogenase from *Lactobacillus kefir* *Applied Microbiol. Biotechnol.* Vol.34, nº. 1, p.15-19, 1990.

ITOH, N; Use of the anti-Prelog stereospecific alcohol dehydrogenase from *Leifsonia* and *Pseudomonas* for producing chiral alcohols. *Appl Microbiol Biotechnol.* Vol.98, p. 3889–3904, 2014.

JEGANNATHAN, K. R.; NIELSEN, P. H. Environmental assessment of enzyme use in industrial production – a literature review. *Journal of Cleaner Production*. Vol.42, p.228, 2013.

LI, Y.-L.; XU, J.-H.; XU, Y. Deracemization of aryl secondary alcohols via enantioselective oxidation and stereoselective reduction with tandem whole-cell biocatalysts. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. Vol.64, p.48–52, 2010.

LINO, G.; MARÍA, A.; MILAGROS, F.; RICAUTER, L.-B. Bioactividad de las esponjas marinas *Cliona varians* y *Cinachyrella kuekenthali* provenientes de Isla Larga, Bahía de Mochima, Estado Sucre, Venezuela. *Revista Ciencia UNEMI*. Vol.9, nº 20, p.19 – 28, 2016.

LUNA, H.; HERNÁNDEZ-VÁZQUEZA, L.; REYOB, A.; ARIASA, L.; MANJARREZA, N.; NAVARRO-OCAÑA, A. Banana and maize leaf wastes as a green alternative for the preparation of benzyl alcohols used as starting materials for fragrances. *Industrial Crops and Products*. Vol. 59, p.105–108, 2014.

MARSAIOLI, A. J.; GONÇALVES, C. C. S. Fatos e tendências da biocatálise. *Química Nova*. Vol. 36, No. 10, p.1587-1590, 2013.

MARZZOCO, A.; TORRES, B. B. Bioquímica básica. 3. ed.; Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2007.

MORAES, F. C.; VILANOVA, E. P.; MURICY, G. Distribuição das esponjas (porifera) na reserva biológica do atol das rocas, nordeste do Brasil. *Arquivos do Museu Nacional, Rio de Janeiro*. Vol.61, p.13-22, 2003.

MOURA, R. M.; QUEIROZ, A. F. S.; FOOK, J. M. S. L. L.; et al. CvL, a lectin from the marine sponge *Cliona varians*: Isolation, characterization and its effects on pathogenic bacteria and *Leishmania* promastigotes. *Comparative Biochemistry and Physiology - A Molecular and Integrative Physiology*. Vol.145, p. 517–523, 2006.

NAKAMURA, K.; YAMANAKA, R.; MATSUDAB, T.; HARADAB, T. Recent developments in asymmetric reduction of ketones with biocatalysts. *Tetrahedron: Asymmetry*. Vol.14, p.2659–2681, 2003.

NASCIMENTO, M. G.; VECCHIA, R. D.; SOLDI, V. Aplicações sintéticas de lipases imobilizadas em polímeros. *Química Nova*. Vol. 27, No. 4, p.623-630, 2004.

NELSON, D.L.; COX, M. M. Princípios de bioquímica de Lehninger. 6. Ed.; Porto Alegre: Artmed, 2014.

OLIVEIRA, N. B. Inovação e produção na química fina. *Química Nova*. Vol.28, suppl.0, 2005.

OMORI, A. T.; LOBO, F. G.; AMARAL, A. C. G.; OLIVEIRA, C. S. Purple carrots: Better biocatalysts for the enantioselective reduction of acetophenones than common orange carrots (*D. carota*). *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. Vol.127 (p. 93–97, 2016).

OMORI, A. T.; COSTA, M. R. Tween® 20-Enhanced Bioreduction of Acetophenones Promoted by *Daucus carota* Root. *Food Technol. Biotechnol.* Vol. 55, p. 231–235, 2017.

ORLANDO, R. M.; FILHO, N. C.; GIL, E. S.; STRINGHETTA, J. P. S. Importância farmacêutica de fármacos quirais. *Revista Eletrônica de Farmácia* Vol.4, nº.1, p.08-14, 2007.

PATEL, R. N. Biocatalysis for synthesis of pharmaceuticals. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. Vol.26, p.1252–1274, 2018.

PELLISSIER, H. Recent developments in non-enzymatic catalytic oxidative kinetic resolution of secondary alcohols. *Tetrahedron*. Vol.74, p.3459 -3468, 2018.

PINEDO-RIVILLA, C.; CAFÊU, M. C.; CASATEJADA, J. A.; ARAUJO, Â. R.; COLLADO, I. G. Asymmetric microbial reduction of ketones: absolute configuration of trans-4-ethyl-1-(1S-hydroxyethyl)cyclohexanol. *Tetrahedron:Asymmetry*. Vol.20, p.2666–2672, 2009.

PLAPP, B. V; Conformational changes and catalysis by alcohol dehydrogenase. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. Vol.493, p. 3–12, 2010.

PRELOG, V. *Pure Appl. Chem.* Vol. 9, p. 119,1964.

PRINCIVAL, J. L.; FERREIRA, D. S.P.; FERREIRA, J. G.; FILHO, E. F.S. Tuning lipase-catalysed kinetic resolution of 2-substituted thiophenes and furans: A scalable chemoenzymatic route to masked γ -bis-oxo-alcohols. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. Vol.126, p.37–45, 2016.

PORTE, A.; PORTEB, L. H. M.; OLIVEIRA, L. M. Cromatografia gasosa quiral na resolução de enantiômeros envolvidos em *flavours* de frutas. *Química Nova*. Vol. 37, p.1670-1679, 2014.

QUEIROZ, A. F. S.; SILVA, R. A.; MOURA, R. M.; et al. Growth inhibitory activity of a novel lectin from *Cliona varians* against K562 human erythroleukemia cells. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*. Vol. 63, p. 1023–1033, 2009.

REETZ, M.T. Biocatalysis in Organic Chemistry and Biotechnology: Past, Present, and Future. *Journal of the American Chemical Society*. Vol. 135, p.12480-12496, 2013.

RIBEIRO, B. D.; CASTRO, A. M.; SALGADO, A. M.; COELHO, M. A. Z. Aplicação de Enzimas: Propostas para Disciplina Experimental. *Revista Virtual de Química*. Vol.5, No. 5, p.787-805, 2013.

ROCHA, L. C.; LUIZ, R. F.; ROSSET, I. G.; RAMINELLI, C.; SELEGHIM, M. H. R.; SETTE, L. D.; PORTO, A. L. M. Bioconversion of iodoacetophenones by marine fungi. *Mar. Biotechnol.* Vol.14, p.396, 2012.

ROCHA, L. C.; SELEGHIM, M. H. R.; COMASSETO, J. V.; PORTO, A. L. M. *Mar. Biotechnol.* Vol.17, p.736, 2015.

RODRIGUES, J. R.; MORAN, P. J. S.; CONCEIÇÃO, G. J. A.; FARDELONE, L. C. Recent Advances in the Biocatalytic Asymmetric Reduction of Acetophenones and α,β -Unsaturated Carbonyl Compounds. *Food Technology and Biotechnology*. Vol.42, p.295–303, 2004.

SCARPI, D.; OCCHIATO, E. G.; GUARNA, A. Selectivity of *Daucus carota* roots and baker's yeast in the enantioselective reduction of γ -nitroketones. *Tetrahedron: Asymmetry*. Vol.16, p.1479–1483, 2005.

SILVA, E. F.; RAMOS, M. C. K. V.; NETO, F. R. A. Utilização de Derivados de Ciclodextrinas como Fase Estacionária Quiral em Cromatografia Gasosa de Alta Resolução. *Química Nova*. Vol. 19, p.1670-1679, 1996.

SOUSA, F. J.; VICTOR, M. M.; RIATTO, V. B; MENEGOLA, C. Biotechnological Properties of Sponges from Northeast Brazil: *Cliona varians* as a biocatalyst for enantioselective reduction of carbonyl compounds. *Journal of the Brazilian Chemical Society*. Vol. 30, p.149-157, 2019.

SILVA, R. A. C.; MESQUITA, B. M.; FARIAS, I. F.; NASCIMENTO, P.G. G.; LEMOS, T. L. G.; MONTE, F. J. Q. Enzymatic chemical transformations of aldehydes, ketones, esters and alcohols using plant fragments as the only biocatalyst: *Ximenia americana* grains. *Molecular Catalysis*. Vol.445, p.187–194, 2018.

UCHÔA, J. E.; VICTOR, M. M.; RIATTO, V. B. First use of cactus and cushcush as biocatalysts in the enantioselective reduction of β -ceto esters. *Industrial Crops and Products*. Vol.96, p.126–131, 2017.

VANDENBERGHE, A.; MARKÓ, I. E.; LUCACCIONI, F.; LUTTS, S. Enantioselective hydrolysis of racemic 1-phenylethyl acetate by an enzymatic system from fresh vegetables. *Industrial Crops and Products*. Vol. 42, p.380–385, 2013.

VERLI, H.; BARREIRO, E. J. Um paradigma da química medicinal: a flexibilidade dos ligantes e receptores. *Química Nova*. Vol. 28, p.95-102, 2005

VITALE, P.; PERNA, F. M.; PERRONE, M. G.; SCILIMATI, A. Screening on the use of *Kluyveromyces marxianus* CBS 6556 growing cells as enantioselective biocatalysts for ketone reductions. *Tetrahedron: Asymmetry*. Vol.22, p.1985–1993, 2011.

VOET, D.; VOET, J.G. Bioquímica. 4. ed. Porto Alegre, Artmed, 2013

WONG, C-H.; FANG, J-M.; LIN, C-H.; BRADSHAW, C. W. Enzymes in organic synthesis: oxidoreductions. *Journal of the Chemical Society., Perkin Trans. 1*. p.967-978, 1995.

XU, C.; ZHONGHUA, Y.; RONG, Z.; GAI, Y.; JIABAO, Y. Production of Chiral Aromatic Alcohol by Asymmetric Reduction with Vegetable Catalyst. *Chinese Journal of Chemical Engineering*. Vol. 18, p. 1029 - 1033, 2010.

YADAV, J. S.; REDDY, G. S. K. K.; SABITHA, G.; KRISHNA, A. D.; PRASAD, A. R.; U-R-RAHAMAN, H.; RAO, K. V.; RAO, A. B. *Daucus carota* and baker's yeast mediated bio-reduction of prochiral ketones. *Tetrahedron: Asymmetry*. Vol.18, p.717–723, 2007.

YAO, Y.; SONG, P.; LU, C.; FEI, Z.; ZHAO, B. Enantioselective Reduction of Ketones Catalyzed by Rare-Earth Metals Complexed with Phenoxy Modified Chiral Prolinols. *Journal Organic Chemical*. Vol.83, p.6093–6100, 2018.

ZILINSKAS, A.; SEREIKAITĖ, J. Stereoselective bioreduction for the resolution of racemic mixtures of bicyclo[3.3.1]nonane-2,6-dione using vegetables. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. Vol.90, p.66 -69, 2013.

ZORZANELLI, B. C.; MURI, E. M. F. Oxidação de Alcoóis em Química Verde. *Revista Virtual Química*. Vol.7, p.663-683, 2015.

7. ANEXOS

I. Espectros de Infravermelho

II. Espectros de RMN de ^1H e de ^{13}C

III. Cromatogramas

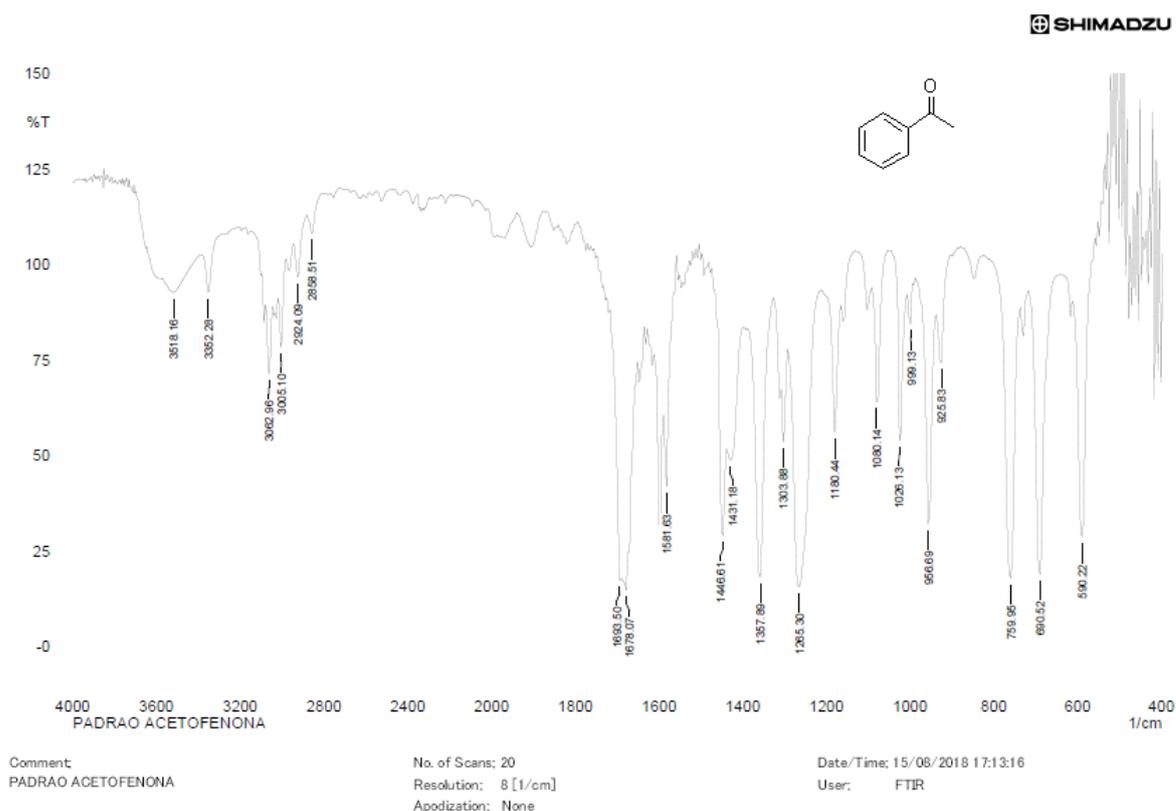


Figura 31: Espectro no Infravermelho da Acetofenona (1) – [Pastilha de KBr].

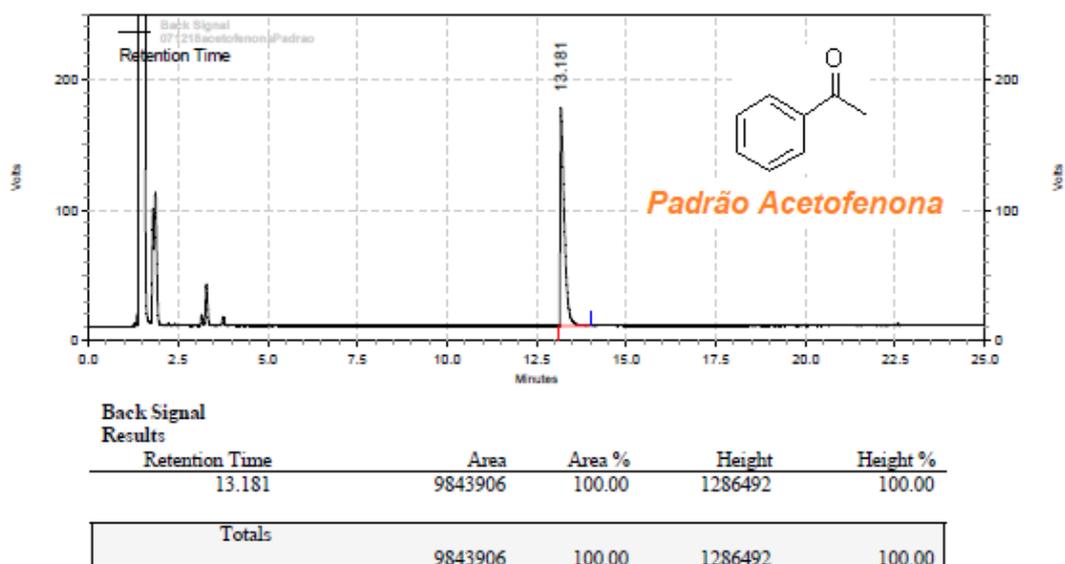


Figura 32: Cromatograma do reagente acetofenona (1) ($T_r=13,1$ min.) obtido por cromatografia á gas com fase estacionária quiral; coluna Cyclosil B (28,5m x 0,25mm x 0,25 μ m de espessura de filme) e rampa de temperatura: 80°C por 5 minutos, 2°C/min – 100°C; 5°C/min. – 220°C; detector (FID): 220°C; injetor: 220°C; em modo split (1/10) e gás de arraste (Hélio): 1,18mL/min.

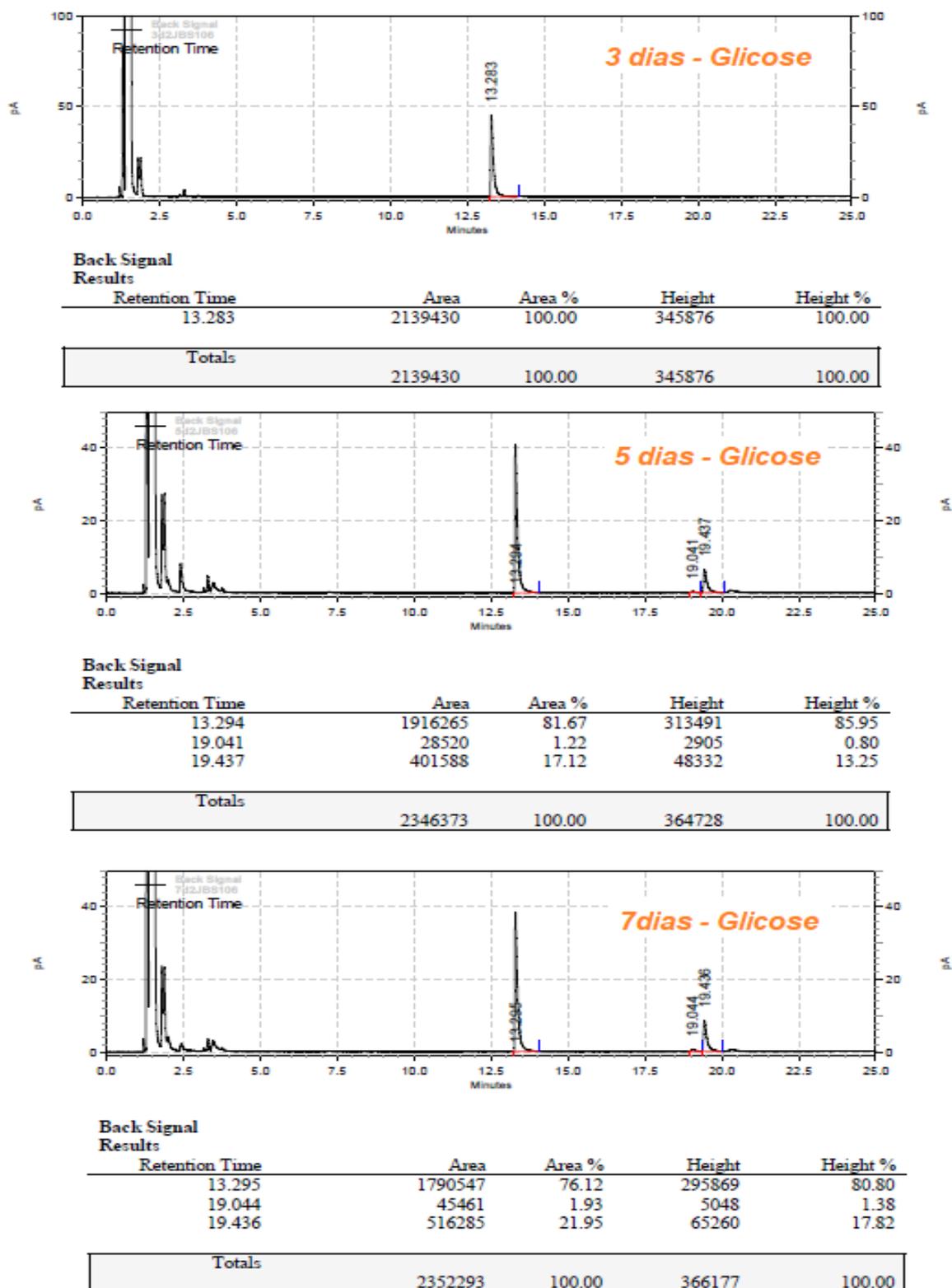


Figura 33: Cromatograma (3, 5 e 7 dias) referente a bioredução da acetofenona (1) ($T_r=13,2$ min) utilizando glicose como aditivo obtido por cromatografia à gas com fase estacionária quiral; coluna Cyclosil B (28,5m x 0,25mm x 0,25 μ m de espessura de filme) e como rampa de temperatura: 80°C por 5 minutos, 2°C/min – 100°C; 5°C/min. – 220°C; detector (FID): 220°C; injetor: 220°C; em modo split (1/10) e gás de arraste (Hélio): 1,18mL/min.

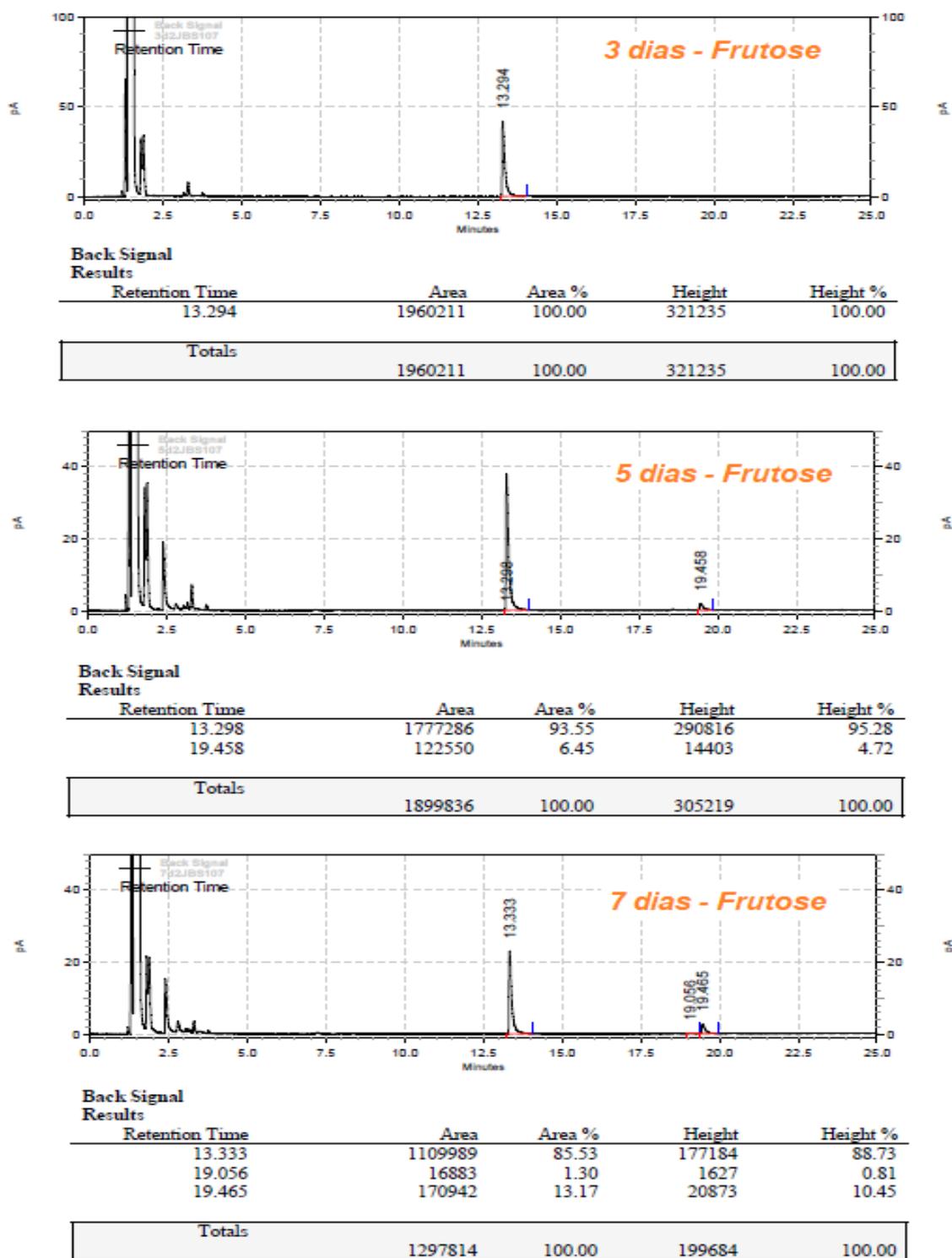


Figura 34: Cromatograma (3, 5 e 7 dias) referente a bioredução da acetofenona (1) ($T_r=13,2\text{min}$) utilizando frutose como aditivo obtido por cromatografia a gás com fase estacionária quiral; coluna Cyclosil B (28,5m x 0,25mm x 0,25 μm de espessura de filme) e rampa de temperatura: 80°C por 5 minutos, 2°C/min – 100°C; 5°C/min. – 220°C; detector (FID): 220°C; injetor: 220°C; em modo split (1/10) e gás de arraste (Hélio): 1,18mL/min.

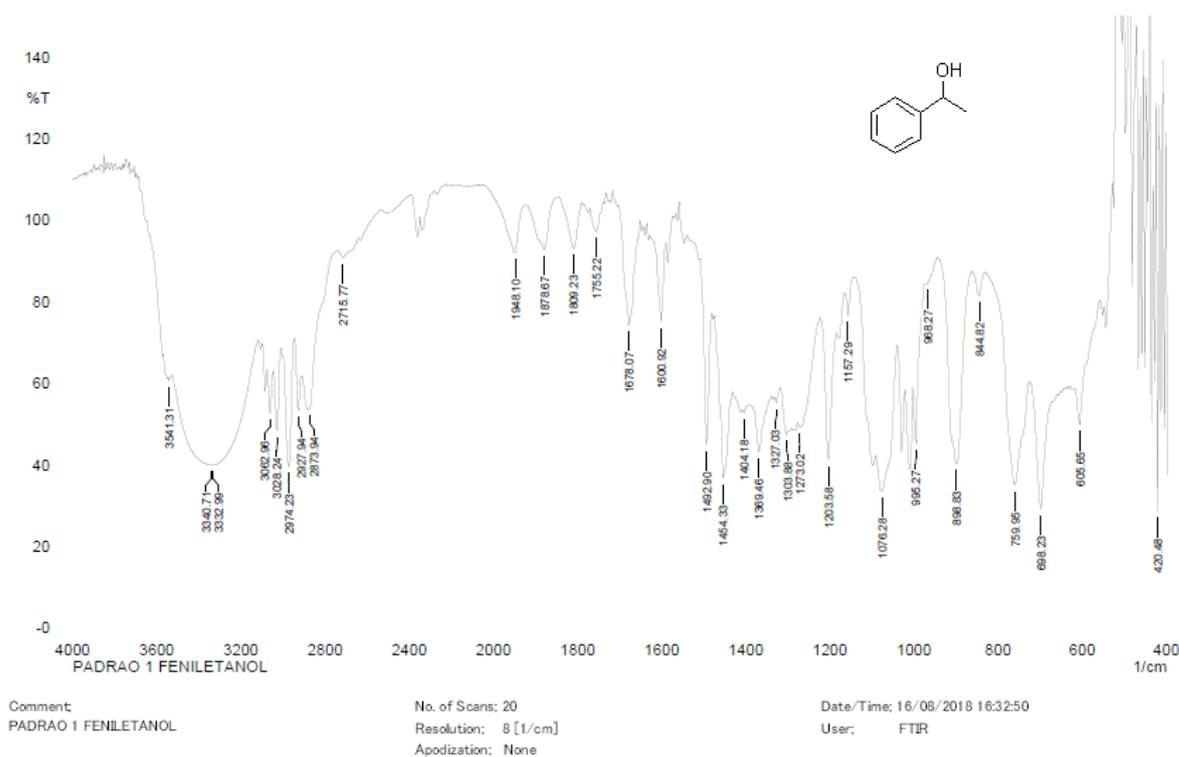


Figura 35: Espectro no Infravermelho do (*R/S*)-1-Feniletanol (**1a**) – [Pastilha de KBr].

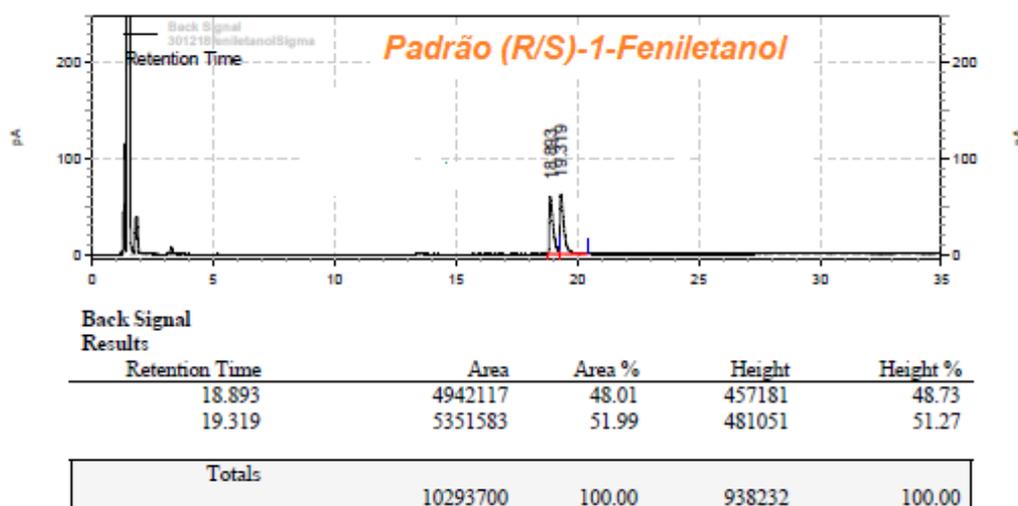


Figura 36: Cromatograma do reagente (*R/S*)-1-Feniletanol (**1a**) [Tr(*R*)=18,8min. e Tr(*S*)=19,3 min.] obtido por cromatografia á gas com fase estacionária quiral; coluna Cyclosil B (28,5m x 0,25mm x 0,25µm de espessura de filme) e rampa de temperatura: 80°C por 5 minutos, 2°C/min – 100°C; 5°C/min. – 220°C; detector (FID): 220°C; injetor: 220°C; em modo split (1/10) e gás de arraste (Hélio): 1,18mL/min.

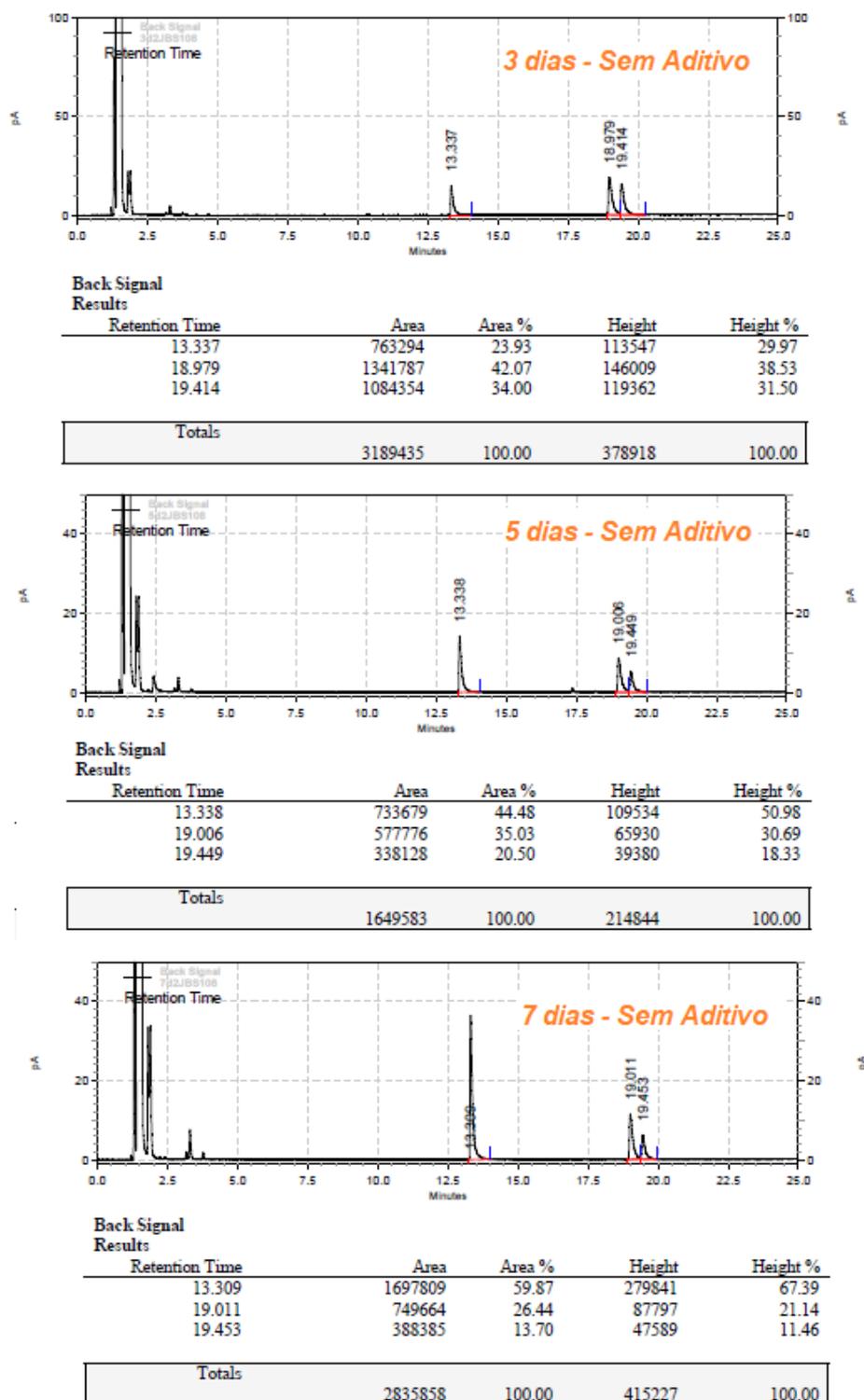


Figura 37: Cromatograma (3, 5 e 7 dias) referente a bio-oxidação (*R/S*)-1-Feniletanol (**1a**) [Tr(*R*)=19,0 e Tr(*S*)=19,4] sem adição de aditivo obtido por cromatografia à gas com fase estacionária quiral; coluna Cyclosil B (28,5m x 0,25mm x 0,25µm de espessura de filme) e rampa de temperatura: 80°C por 5 minutos, 2°C/min – 100°C; 5°C/min. – 220°C; detector (FID): 220°C; injetor: 220°C; em modo split (1/10) e gás de arraste (Hélio): 1,18mL/min.

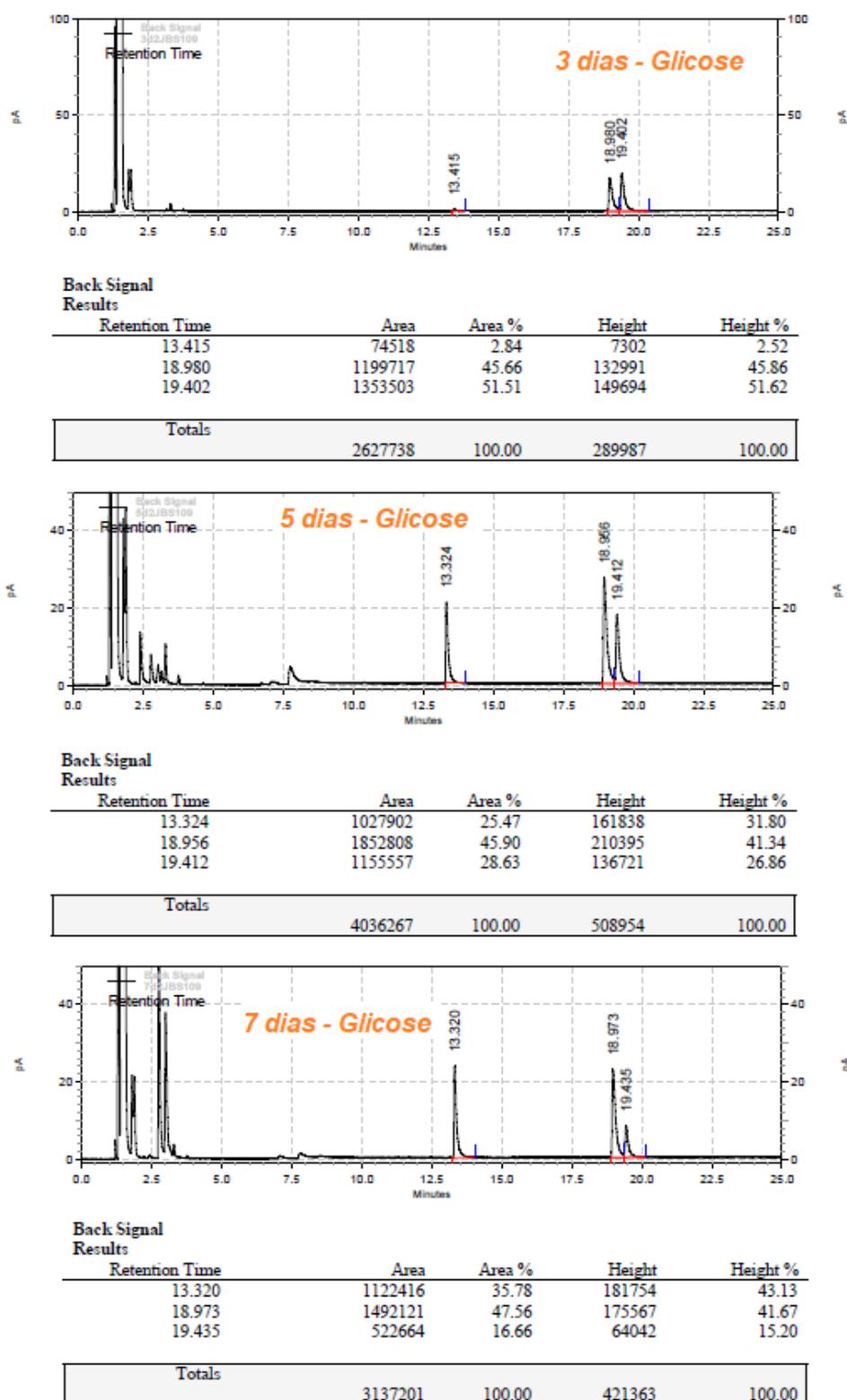


Figura 38: Cromatograma (3, 5 e 7 dias) referente a bio-oxidação (*R/S*)-1-Feniletanol (**1a**) [Tr(*R*)=18,9 e Tr(*S*)=19,4] utilizando glicose como aditivo obtido por cromatografia á gas com fase estacionária quiral; coluna Cyclosil B (28,5m x 0,25mm x 0,25µm de espessura de filme) e rampa de temperatura: 80°C por 5 minutos, 2°C/min – 100°C; 5°C/min. – 220°C; detector (FID): 220°C; injetor: 220°C; em modo split (1/10) e gás de arraste (Hélio): 1,18mL/min.

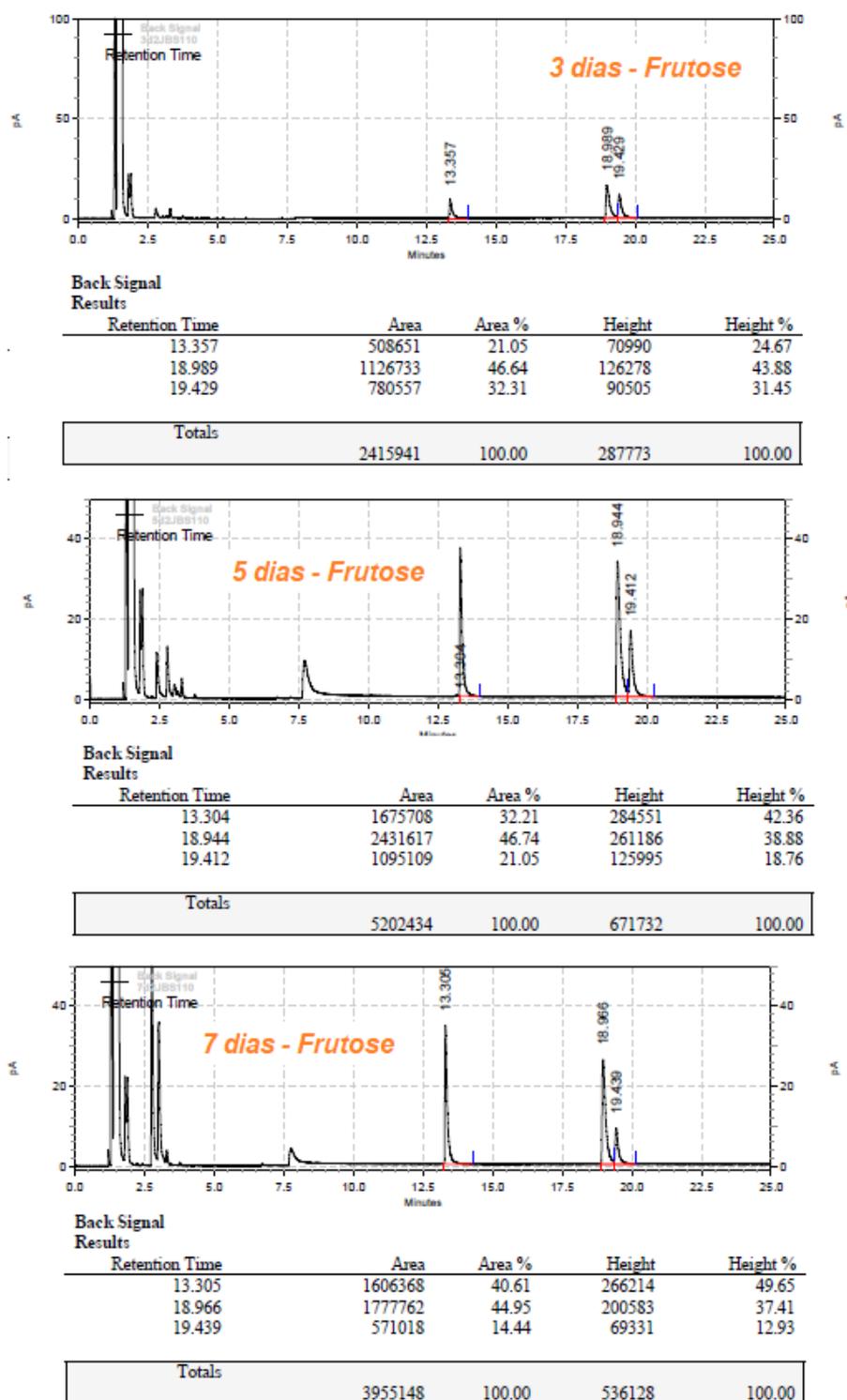


Figura 39: Cromatograma (3, 5 e 7 dias) referente a bio-oxidação (*R/S*)-1-Feniletanol (**1a**) [Tr(*R*)=18,9 e Tr(*S*)=19,4] utilizando frutose como aditivo obtido por cromatografia á gas com fase estacionária quiral; coluna Cyclosil B (28,5m x 0,25mm x 0,25µm de espessura de filme) e rampa de temperatura: 80°C por 5 minutos, 2°C/min – 100°C; 5°C/min. – 220°C; detector (FID): 220°C; injetor: 220°C; em modo split (1/10) e gás de arraste (Hélio): 1,18mL/min.

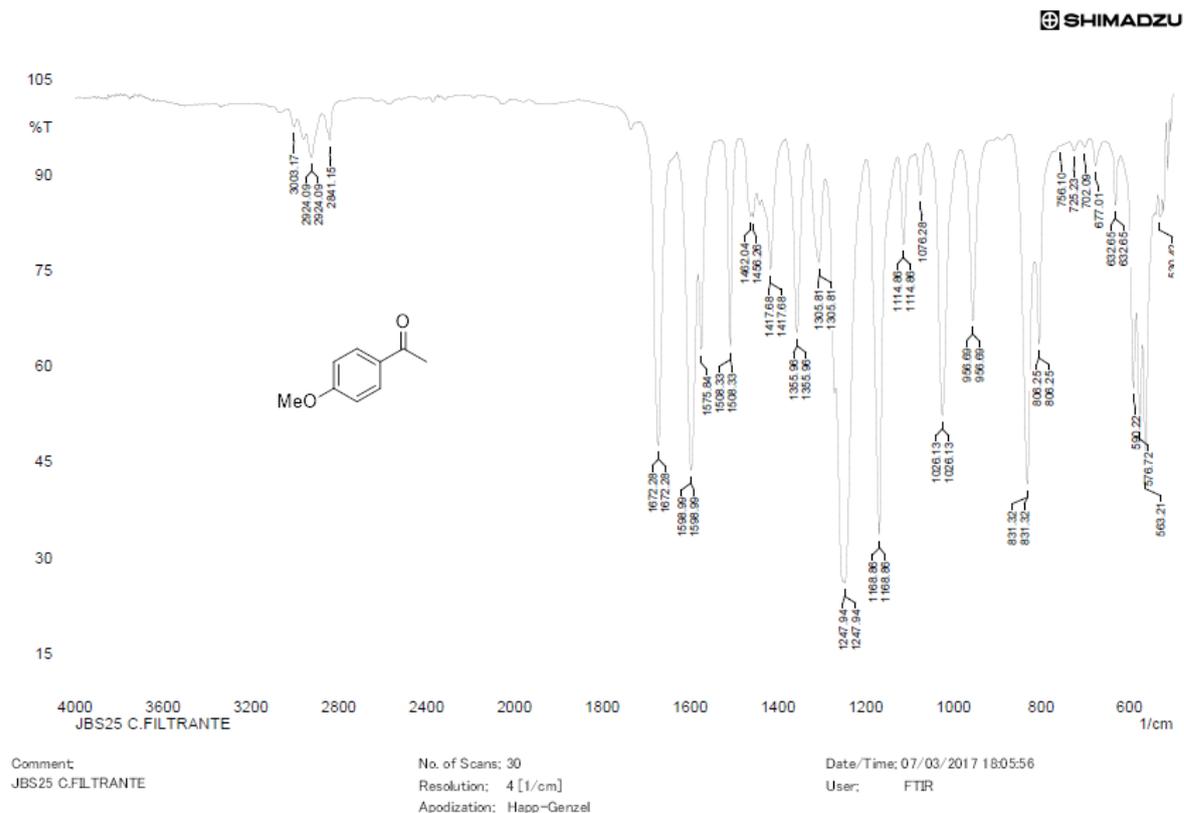


Figura 40: Espectro de Infravermelho do *p*-metoxiacetofenona (2) – [Pastilha de KBr].

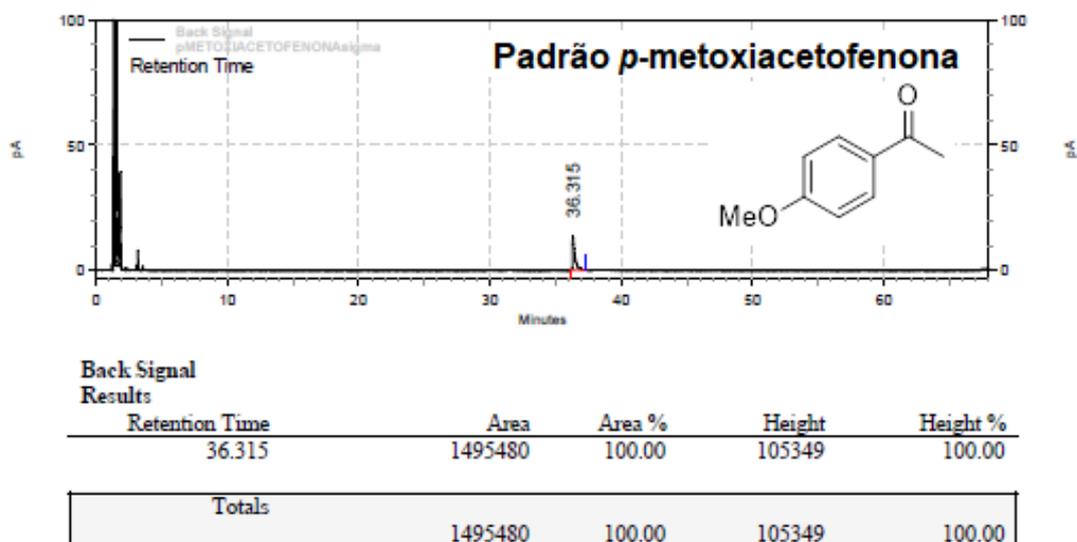


Figura 41: Cromatograma do reagente *p*-metoxiacetofenona (2) [Tr =36,31min.] obtido por cromatografia á gas com fase estacionária quiral e coluna Cyclosil B (28,5m x 0,25mm x 0,25µm de espessura de filme) e rampa de temperatura: 80°C por 2 minutos, 5°C/min – 100°C; 0,5°C/min – 130°C; 45°C/min. – 220°C; detector (FID): 220°C; injetor: 220°C; em modo split (1/10) e gás de arraste (Hélio): 1,18mL/min.

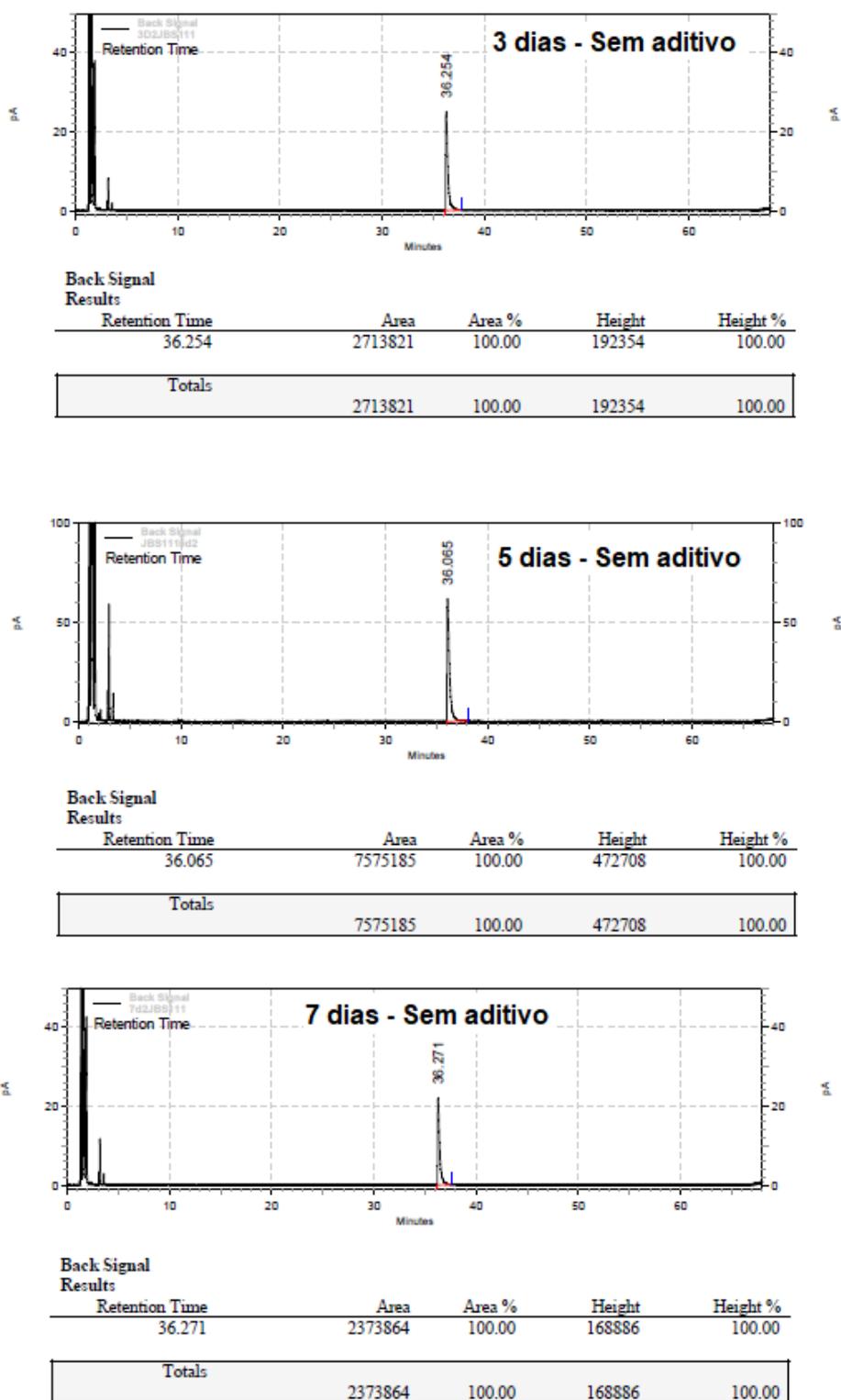
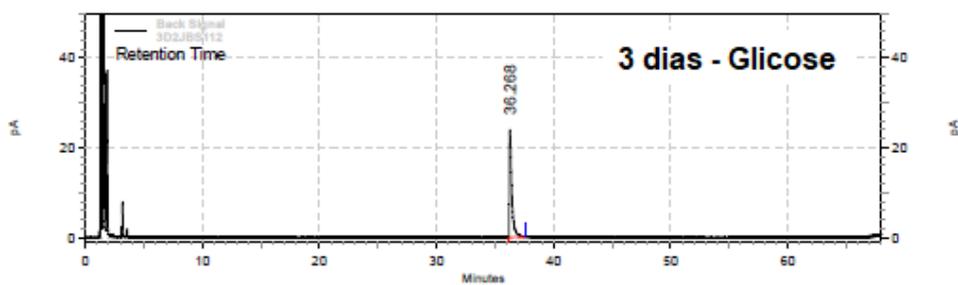


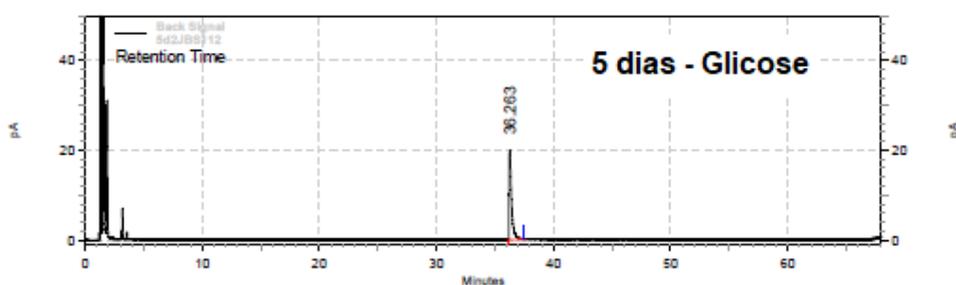
Figura 42: Cromatograma (3, 5 e 7 dias) referente a bioredução da *p*-metoxiacetofenona (2) [Tr=36,25] sem aditivo obtido por cromatografia à gas com fase estacionária quiral; coluna Cyclosil B (28,5m x 0,25mm x 0,25µm de espessura de filme) e rampa de temperatura: 80°C por 2 minutos, 5°C/min – 100°C; 0,5°C/min.- 130°C; 45°C/min. – 220°C; detector (FID): 220°C; injetor: 220°C; em modo split (1/10) e gás de arraste (Hélio): 1,18mL/min.



Back Signal
Results

Retention Time	Area	Area %	Height	Height %
36.268	2625018	100.00	184189	100.00

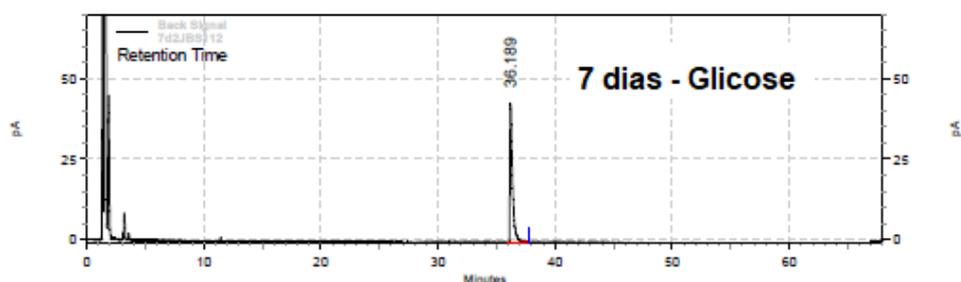
Totals	2625018	100.00	184189	100.00
--------	---------	--------	--------	--------



Back Signal
Results

Retention Time	Area	Area %	Height	Height %
36.263	2136753	100.00	151848	100.00

Totals	2136753	100.00	151848	100.00
--------	---------	--------	--------	--------



Back Signal
Results

Retention Time	Area	Area %	Height	Height %
36.189	4982976	100.00	333502	100.00

Totals	4982976	100.00	333502	100.00
--------	---------	--------	--------	--------

Figura 43: Cromatograma (3, 5 e 7 dias) referente a bioredução da do *p*-metoxiacetofenona (**2**) [Tr=36,25] utilizando glicose como aditivo obtido por cromatografia á gas com fase estacionária quiral; coluna Cyclosil B (28,5m x 0,25mm x 0,25µm de espessura de filme) e rampa de temperatura: 80°C por 2 minutos, 5°C/min – 100°C; 0,5°C/min.- 130°C; 45°C/min. – 220°C; detector (FID): 220°C; injetor: 220°C; em modo split (1/10) e gás de arraste (Hélio): 1,18mL/min.

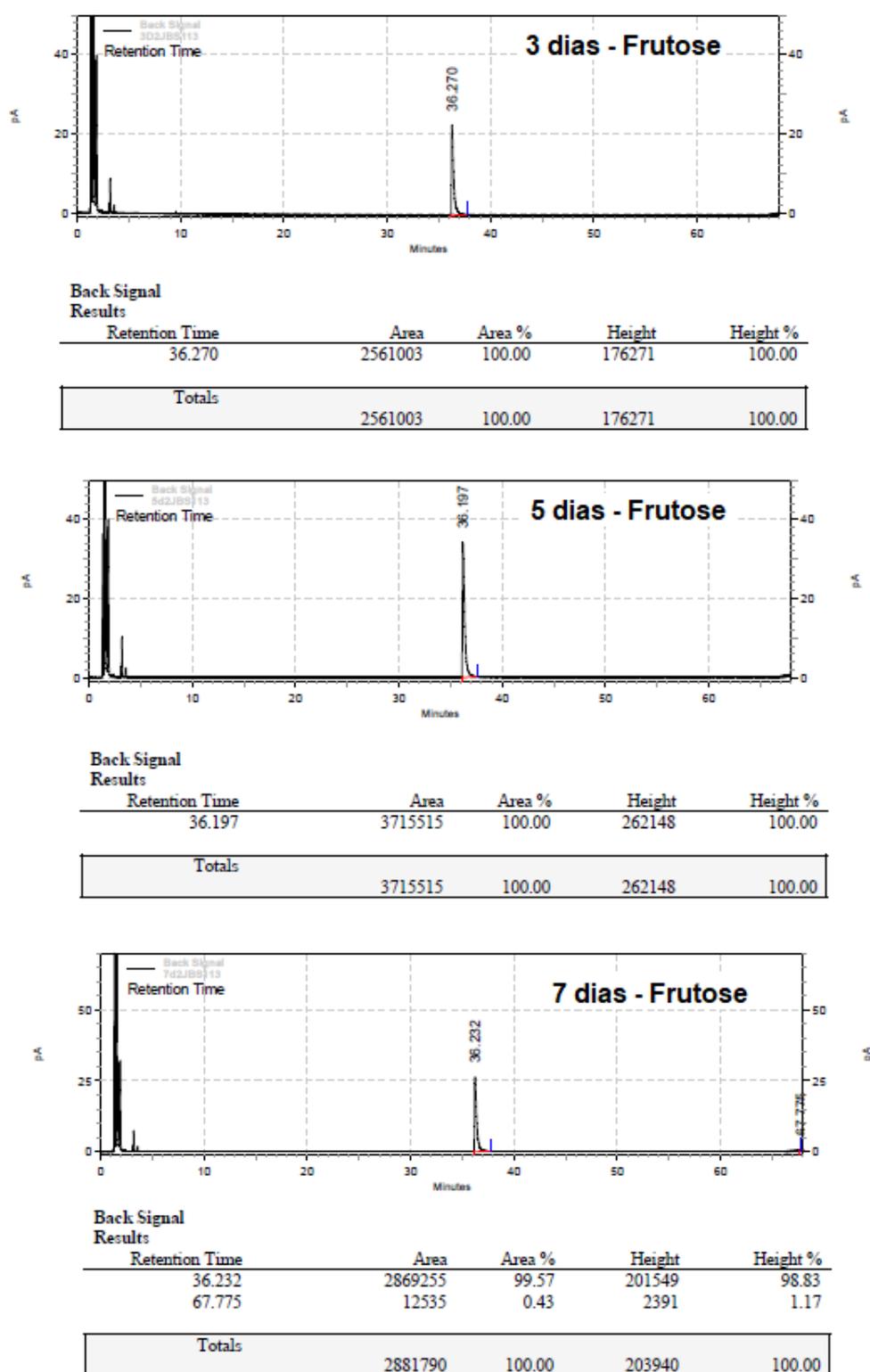


Figura 44: Cromatograma (3, 5 e 7 dias) referente a bioredução da do *p*-metoxiacetofenona (**2**) [Tr=36,25] utilizando frutose como aditivo obtido por cromatografia á gas com fase estacionária quiral; coluna Cyclosil B (28,5m x 0,25mm x 0,25µm de espessura de filme) e rampa de temperatura: 80°C por 2 minutos, 5°C/min – 100°C; 0,5°C/min.- 130°C; 45°C/min. – 220°C; detector (FID): 220°C; injetor: 220°C; em modo split (1/10) e gás de arraste (Hélio): 1,18mL/min.

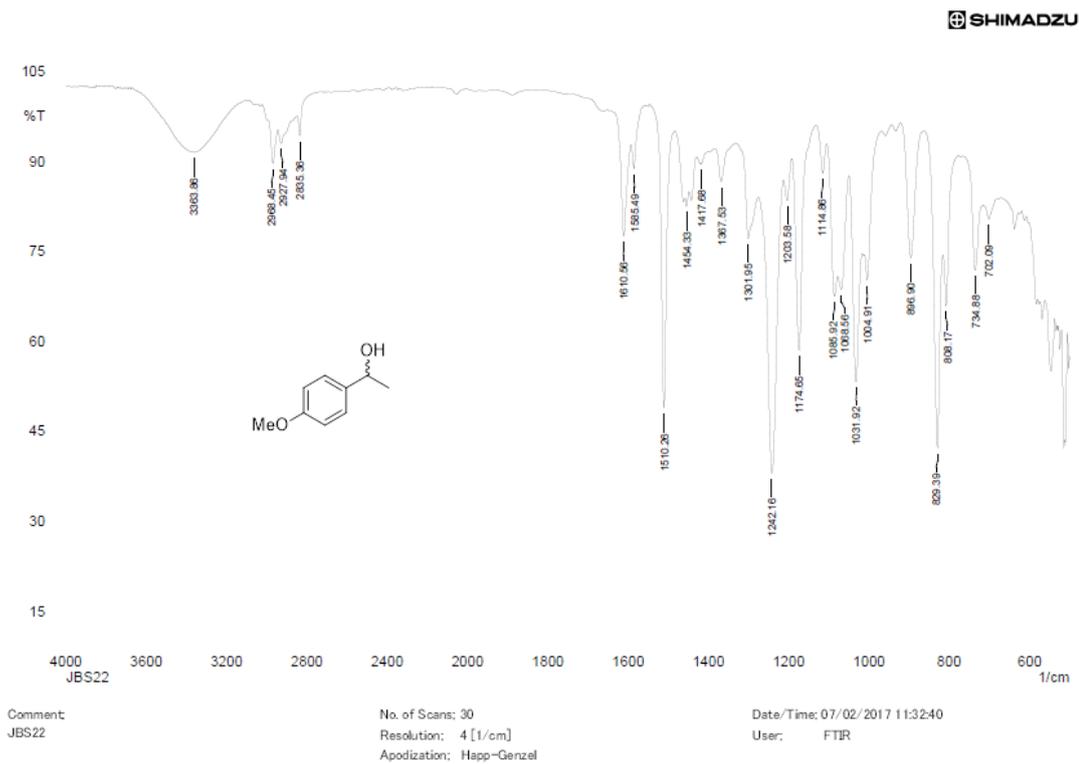


Figura 45: Espectro de espectroscopia no Infravermelho da *p*-metoxifeniletanol (**2a**) – [Pastilha de KBr].

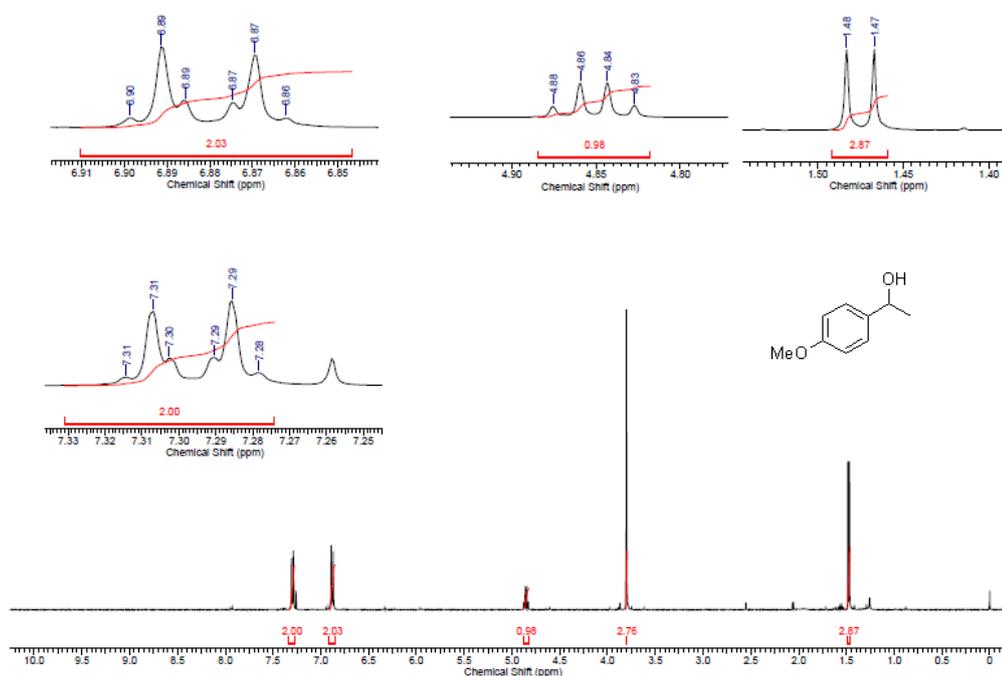


Figura 46: Espectro de RMN de ^1H do *p*-metoxifeniletanol (**2a**) - [CDCl_3 ; 400MHz; δ (ppm)].

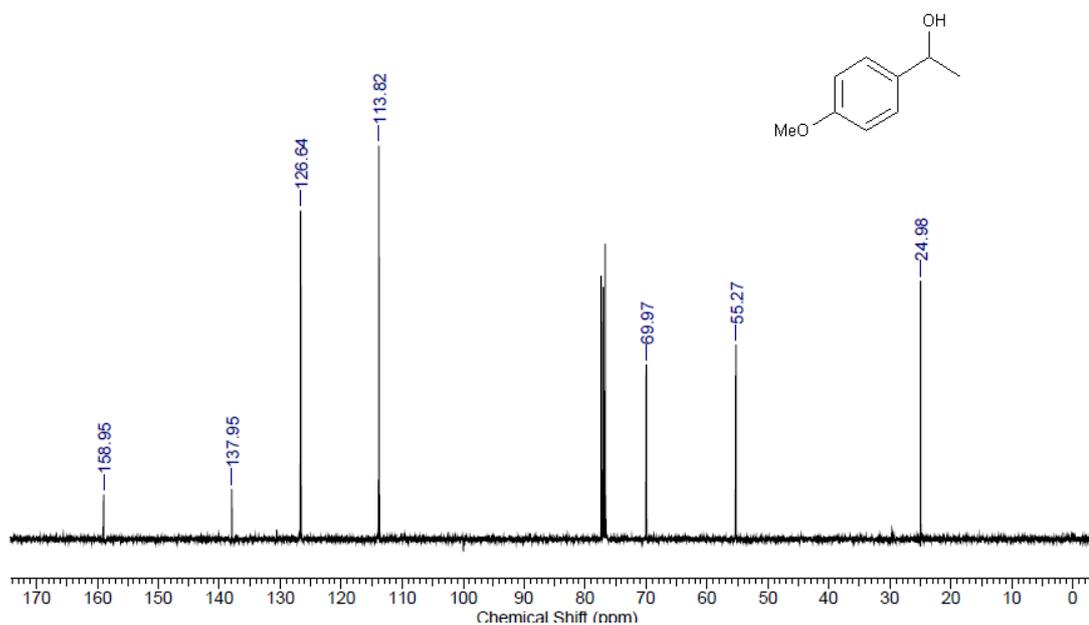


Figura 47: Espectro de RMN de ^{13}C do *p*-metoxifeniletanol (**2a**) - [CDCl_3 ; 100MHz; δ (ppm)].

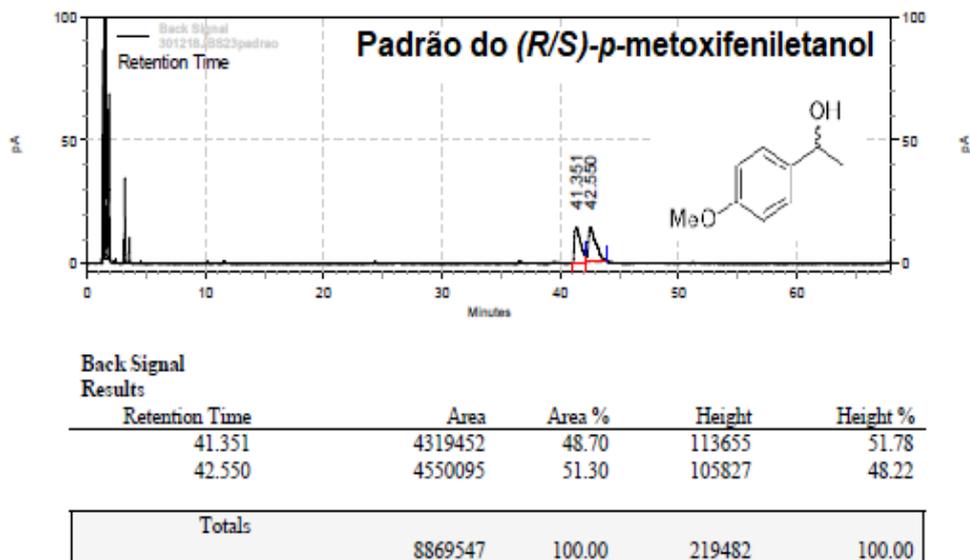


Figura 48: Cromatograma do reagente (*R/S*)-*p*-metoxifeniletanol (**2a**) [Tr(*R*)=41,35min. e Tr(*S*)=42,55min.] obtido por cromatografia á gas com fase estacionária quiral e coluna Cyclosil B (28,5m x 0,25mm x 0,25 μm de espessura de filme) e rampa de temperatura: 80°C por 2 minutos, 5°C/min – 100°C; 0,5°C/min – 130°C; 45°C/min. – 220°C; detector (FID): 220°C; injetor: 220°C; em modo split (1/10) e gás de arraste (Hélio): 1,18mL/min.

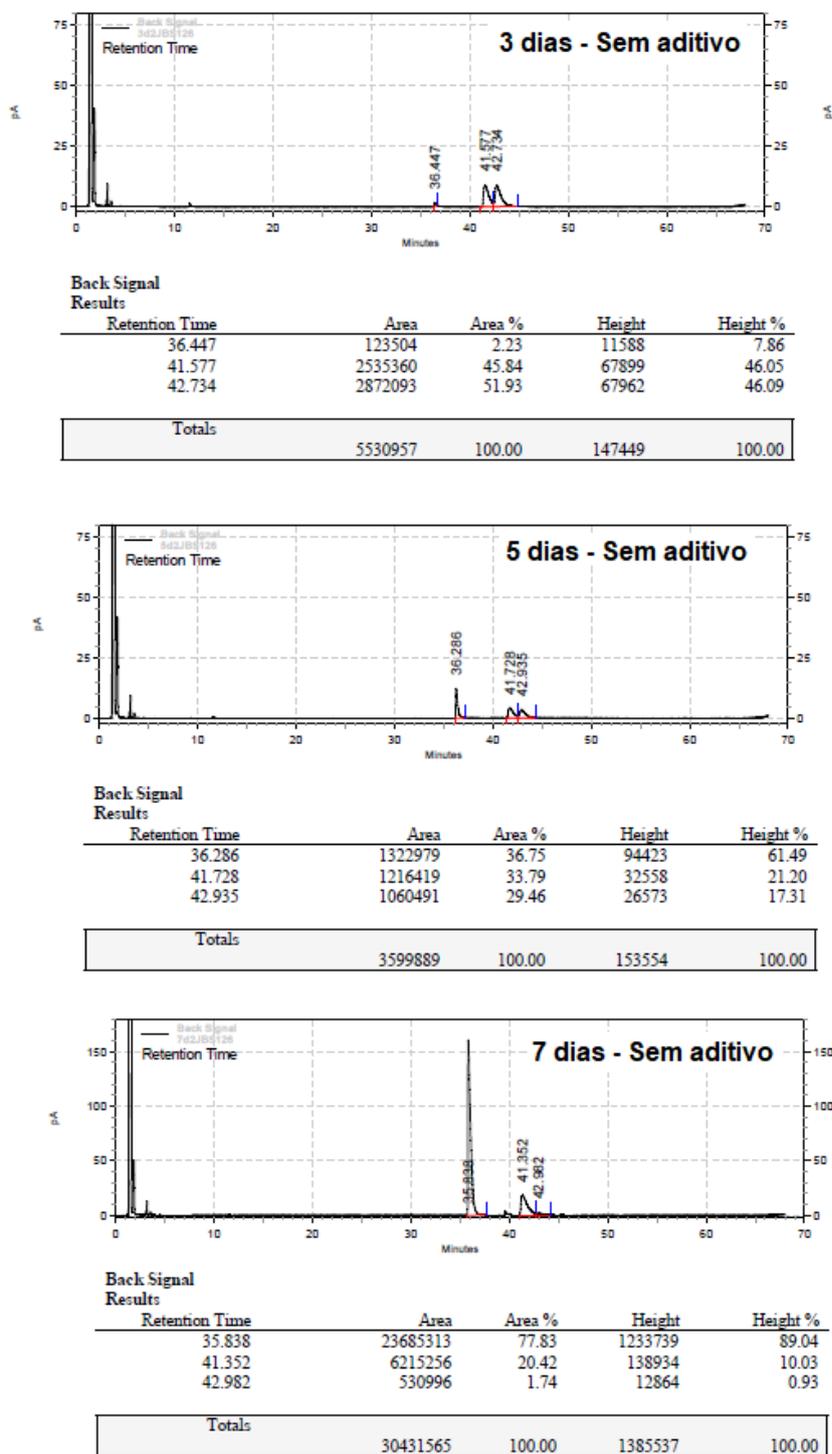


Figura 49: Cromatograma (3, 5 e 7 dias) referente a bio-oxidação do (*R/S*)-*p*-metoxifeniletanol (**2a**) [Tr(*R*)=45,35 e Tr(*S*)=42,55] sem aditivo obtido por cromatografia á gas com fase estacionária quiral; coluna Cyclosil B (28,5m x 0,25mm x 0,25µm de espessura de filme) e rampa de temperatura: 80°C por 2 minutos, 5°C/min – 100°C; 0,5°C/min.- 130°C; 45°C/min. – 220°C; detector (FID): 220°C; injetor: 220°C; em modo split (1/10) e gás de arraste (Hélio): 1,18mL/min.

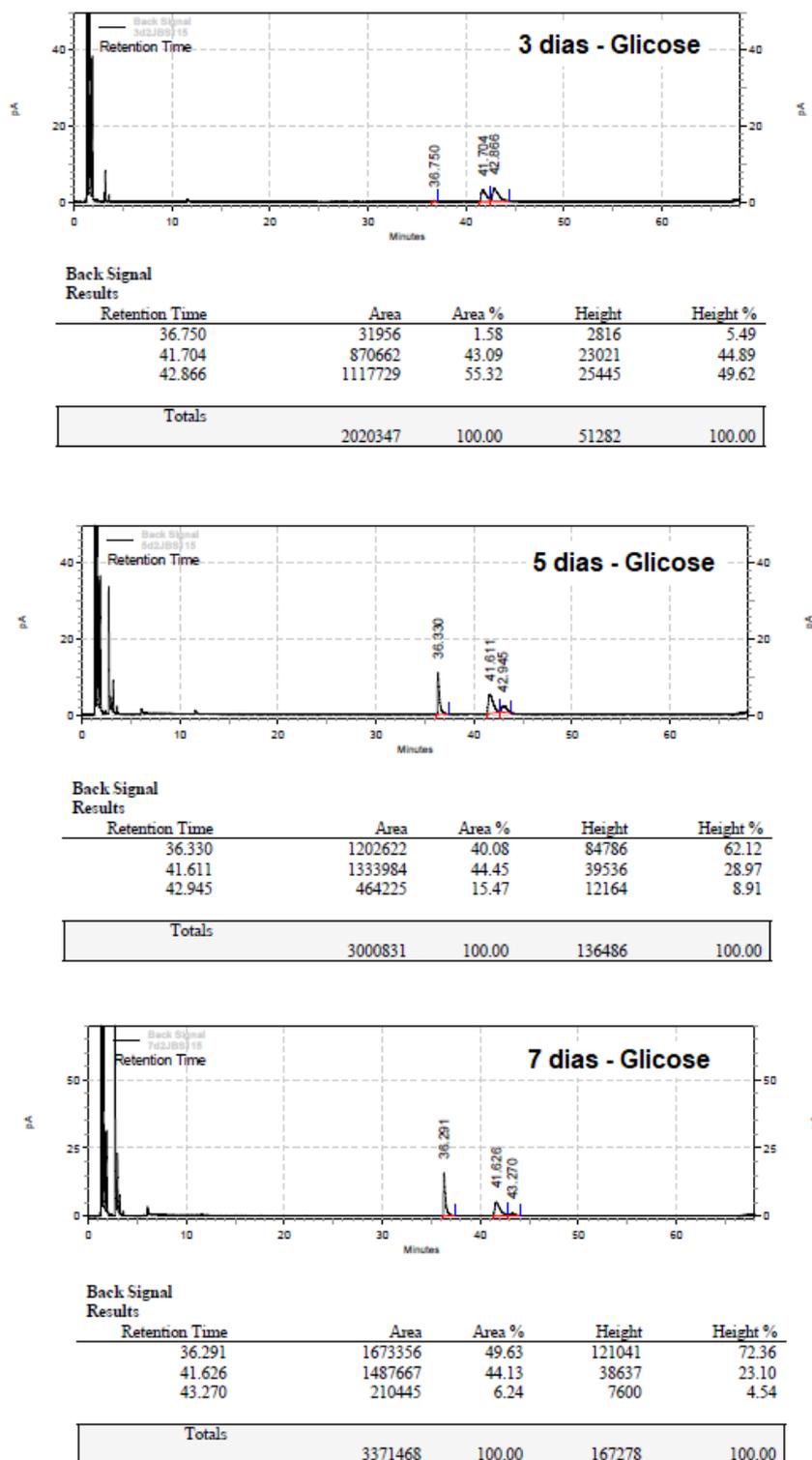


Figura 50: Cromatograma (3, 5 e 7 dias) referente a bio-oxidação do (*R/S*)-*p*-metoxifeniletanol (**2a**) [Tr(*R*)=45,35 e Tr(*S*)=42,55] utilizando glicose como aditivo obtido por cromatografia a gás com fase estacionária quiral; coluna Cyclosil B (28,5m x 0,25mm x 0,25µm de espessura de filme) e rampa de temperatura: 80°C por 2 minutos, 5°C/min – 100°C; 0,5°C/min.- 130°C; 45°C/min. – 220°C; detector (FID): 220°C; injetor: 220°C; em modo split (1/10) e gás de arraste (Hélio): 1,18mL/min.

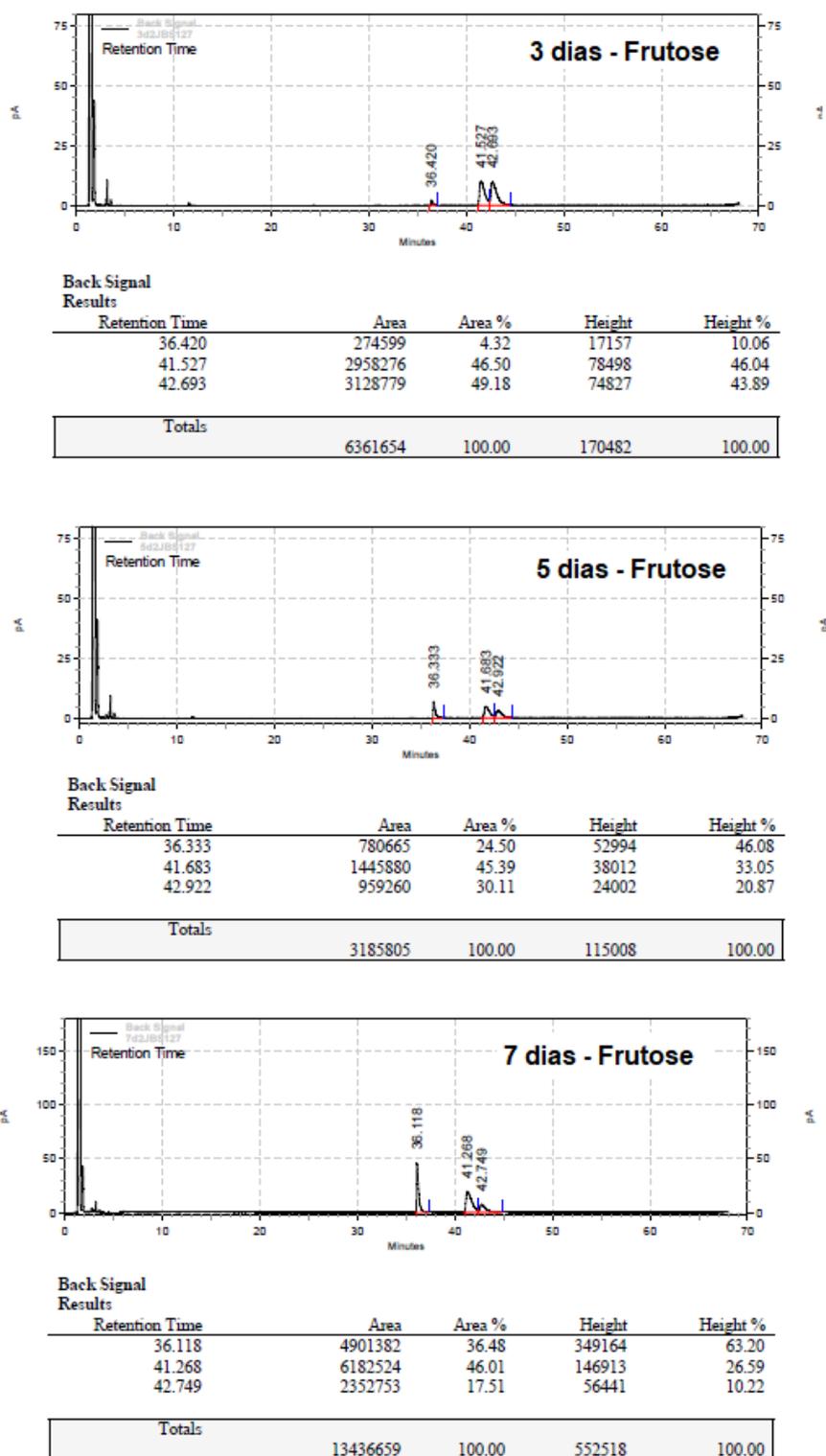


Figura 51: Cromatograma (3, 5 e 7 dias) referente a bio-oxidação do (*R/S*)-*p*-metoxifeniletanol (**2a**) [Tr(*R*)=45,35 e Tr(*S*)=42,55] utilizando frutose como aditivo obtido por cromatografia a gás com fase estacionária quiral; coluna Cyclosil B (28,5m x 0,25mm x 0,25µm de espessura de filme) e rampa de temperatura: 80°C por 2 minuto, 5°C/min – 100°C; 0,5°C/min.- 130°C; 45°C/min. – 220°C; detector (FID): 220°C; injetor: 220°C; em modo split (1/10) e gás de arraste (Hélio): 1,18mL/min.

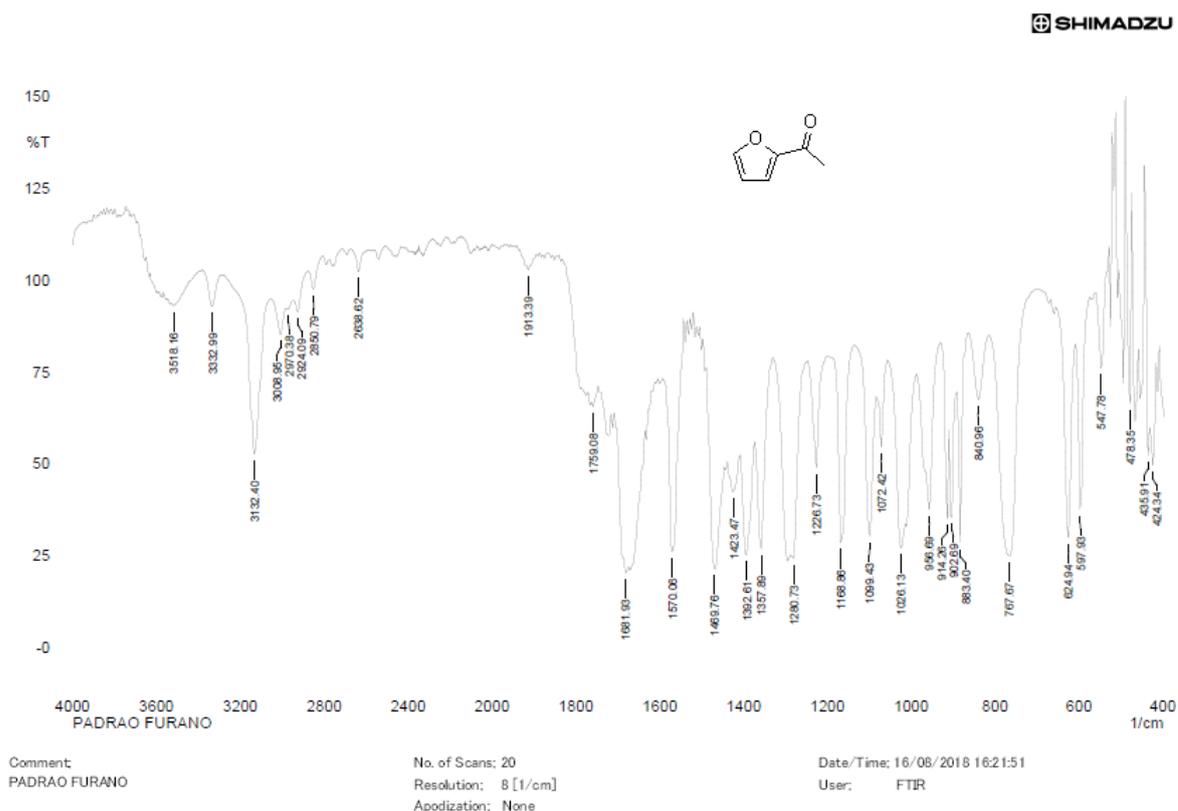


Figura 52: Espectro de espectroscopia no Infravermelho do Acetilfurano (4) – [Pastilha de KBr].

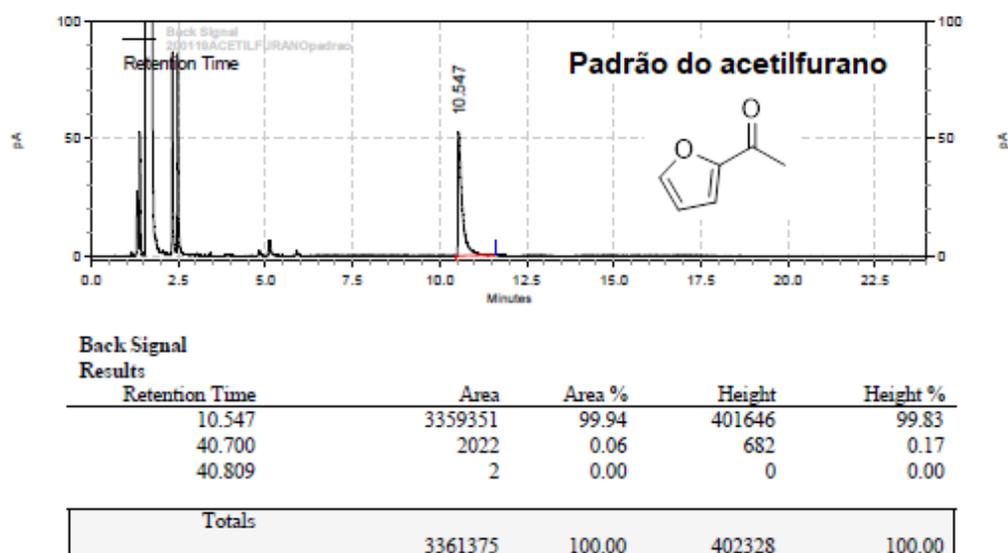
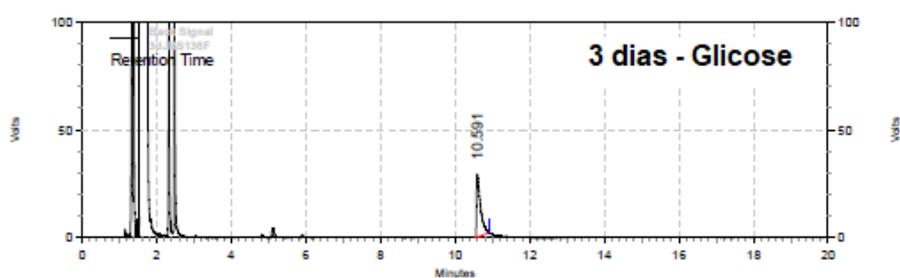
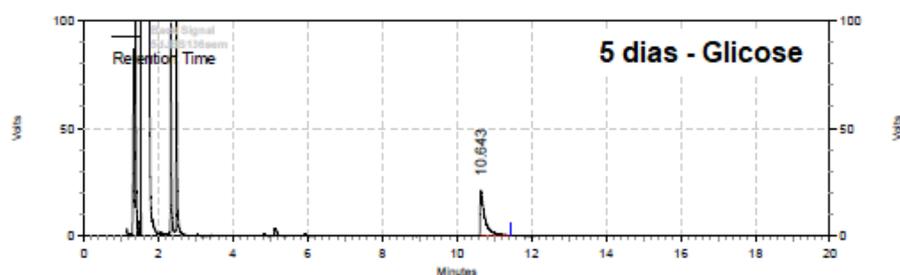


Figura 53: Cromatograma do reagente acetilfurano (4) [Tr =10,54min.] obtido por cromatografia a gás com fase estacionária quiral e coluna Cyclosil B (28,5m x 0,25mm x 0,25µm de espessura de filme) e rampa de temperatura: 60°C por 1 minuto, 1°C/min – 100°C; detector (FID): 220°C; injetor: 220°C; em modo split (1/10) e gás de arraste (Hélio): 1,18mL/min.



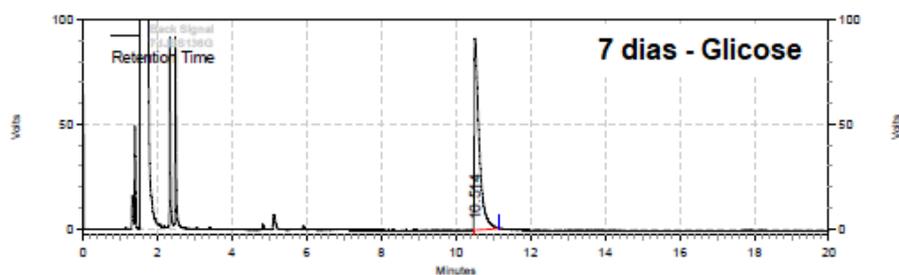
Back Signal
Results

Retention Time	Area	Area %	Height	Height %
10.591	1659607	100.00	224882	100.00
Totals				
	1659607	100.00	224882	100.00



Back Signal
Results

Retention Time	Area	Area %	Height	Height %
10.643	1456248	100.00	162287	100.00
Totals				
	1456248	100.00	162287	100.00



Back Signal
Results

Retention Time	Area	Area %	Height	Height %
10.514	6287103	100.00	703381	100.00
Totals				
	6287103	100.00	703381	100.00

Figura 54: Cromatograma (3, 5 e 7 dias) referente a bioredução do acetilfurano (4) [Tr=10,54 min.] utilizando glicose como aditivo obtido por cromatografia à gas com fase estacionária quiral; coluna Cyclosil B (28,5m x 0,25mm x 0,25µm de espessura de filme) e rampa de temperatura: 60°C por 1 minuto; 1°C/min – 100°C; detector (FID): 220°C; injetor: 220°C; em modo split (1/10) e gás de arraste (Hélio): 1,18mL/min.

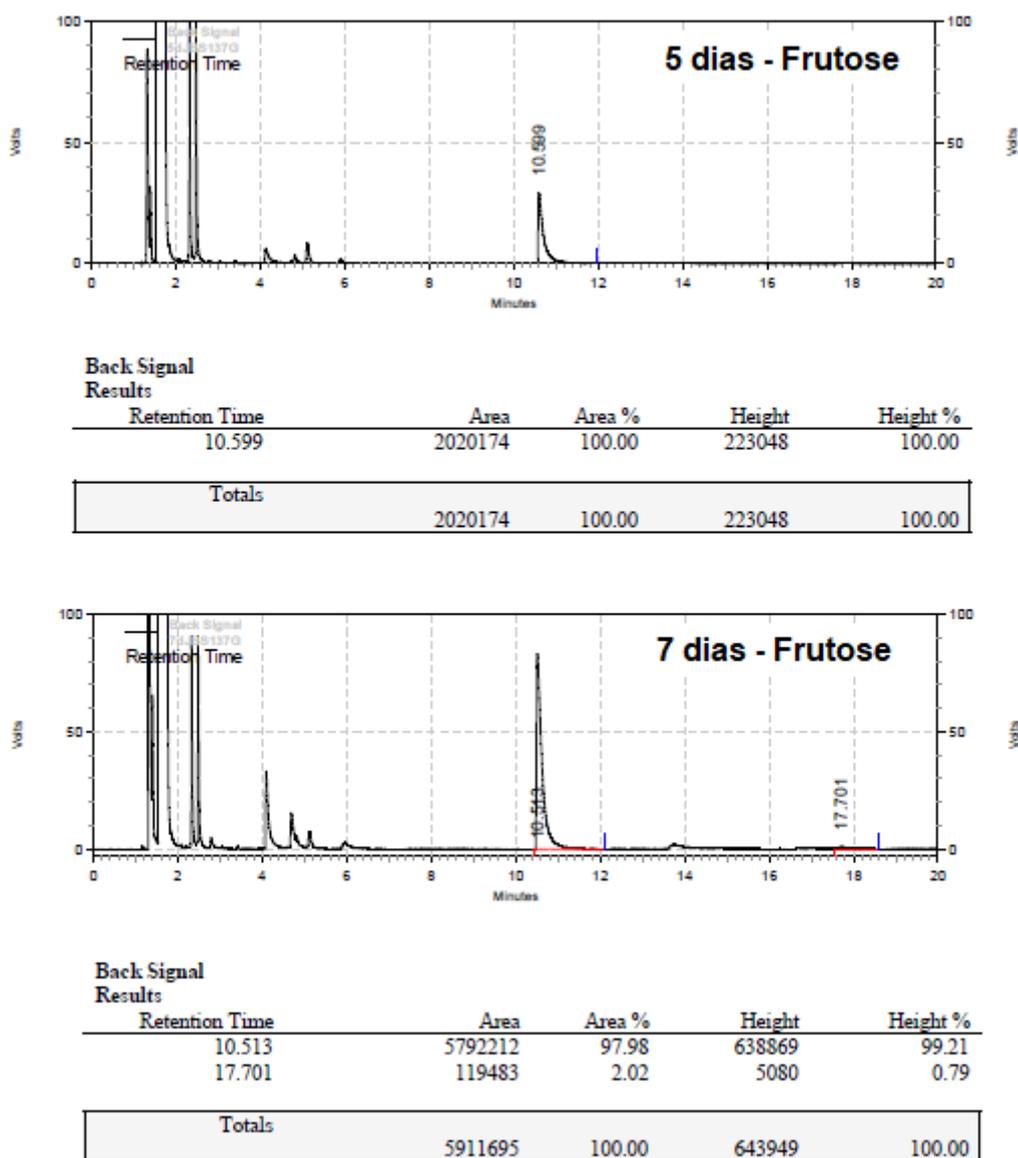


Figura 55: Cromatograma (3, 5 e 7 dias) referente a bioredução do acetilfurano (4) [Tr=10,54 min.] utilizando frutose como aditivo obtido por cromatografia a gás com fase estacionária quirál; coluna Cyclosil B (28,5m x 0,25mm x 0,25µm de espessura de filme) e rampa de temperatura: 60°C por 1 minuto; 1°C/min – 100°C; detector (FID): 220°C; injetor: 220°C; em modo split (1/10) e gás de arraste (Hélio): 1,18mL/min.

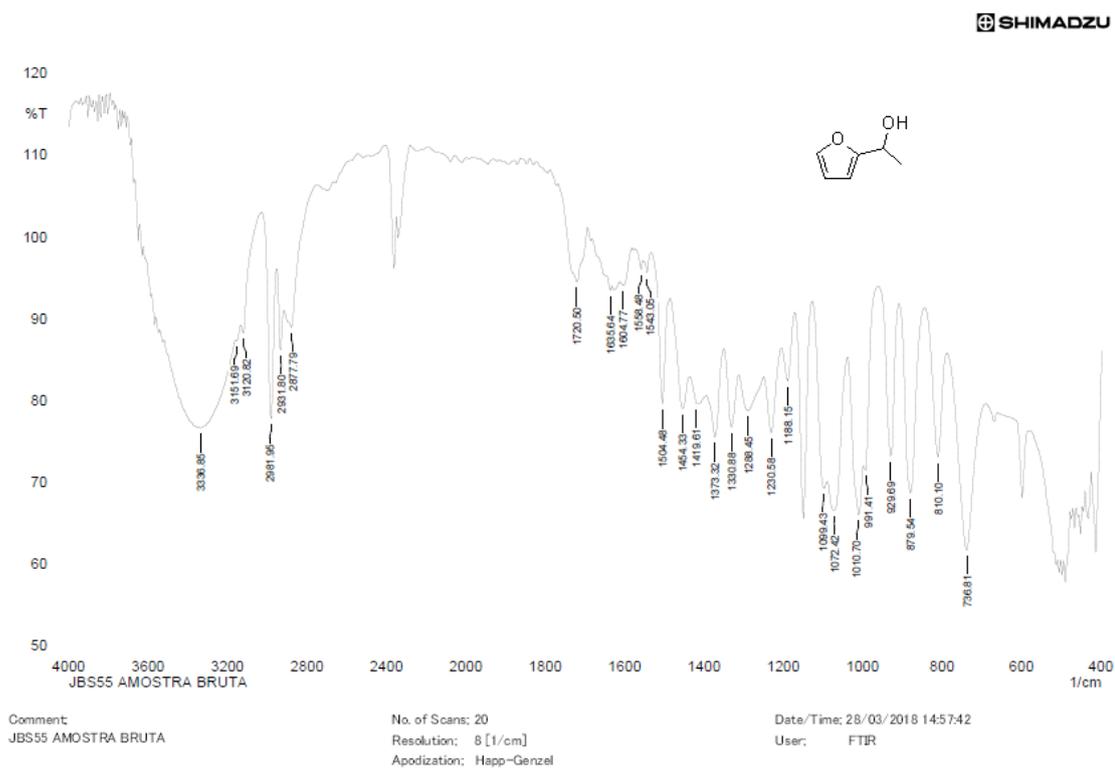


Figura 56: Espectro de espectroscopia no Infravermelho do 1- (2-furil) etanol (**4a**) – [Pastilha de KBr].

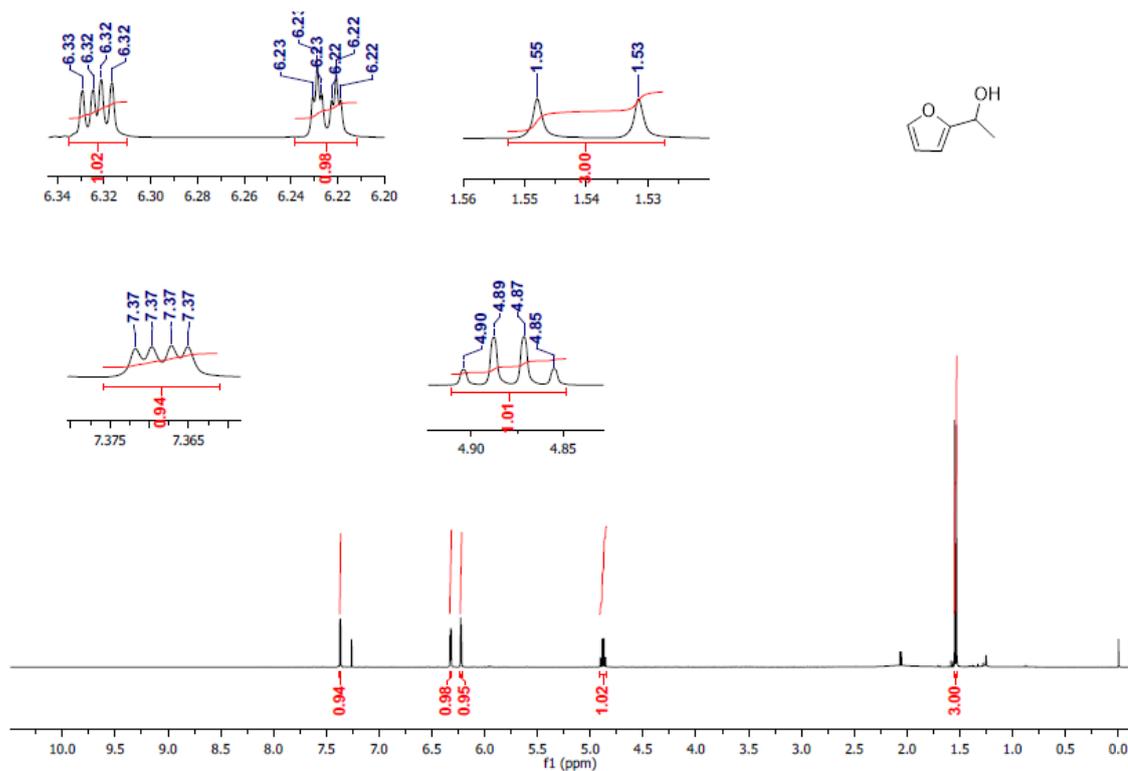


Figura 57: Espectro de RMN de ^1H do 1- (2-furil) etanol (**4a**) - [CDCl_3 ; 400MHz; δ (ppm)]

1A718_JBS_28_13C_1k.001.esp

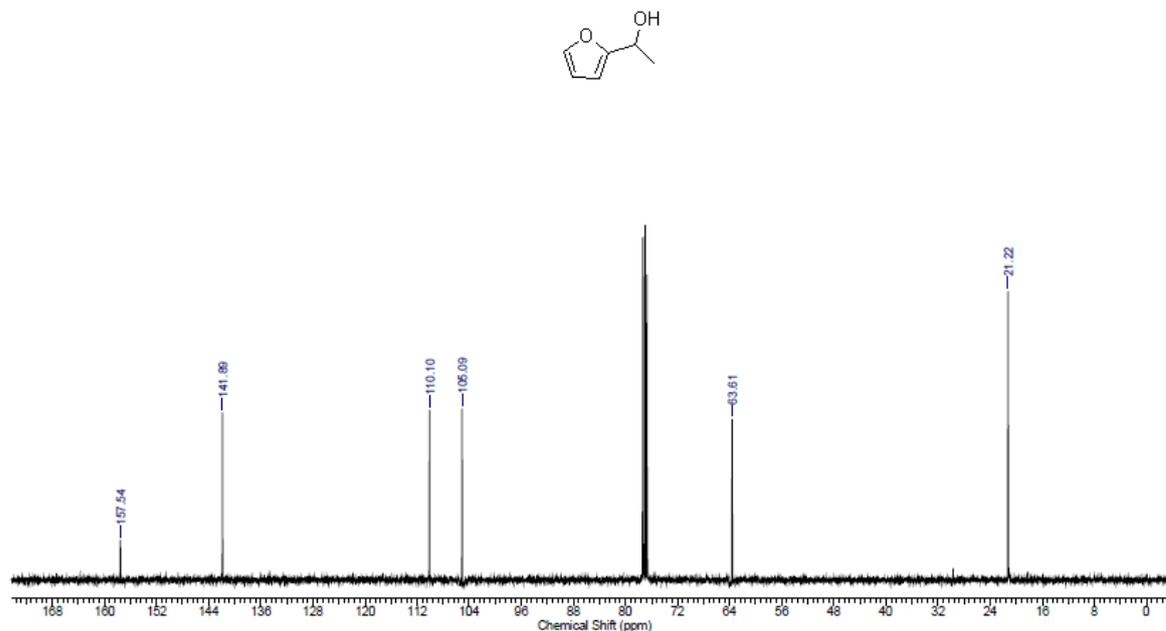


Figura 58: Espectro de ^{13}C -RMN do 1- (2-furil) etanol (**4a**) - [CDCl_3 ; 100MHz; δ (ppm)]

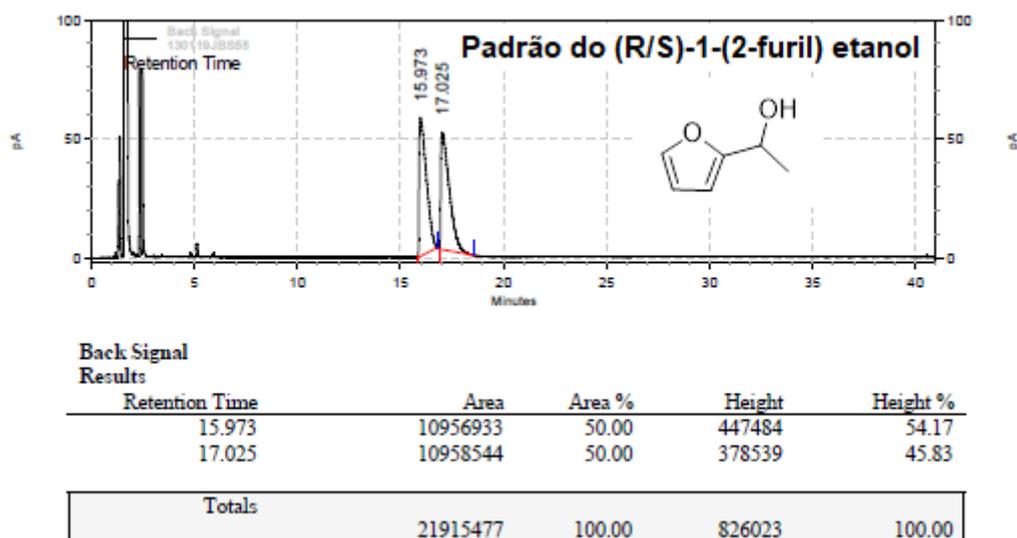


Figura 59: Cromatograma do (*R/S*)-1-(2-furil) etanol [Tr(Nl)=15,97min. E Tr(Nl)=17,02min.] obtido por cromatografia a gás com fase estacionária quiral e coluna Cyclosil B (28,5m x 0,25mm x 0,25 μm de espessura de filme) e rampa de temperatura: 60 $^{\circ}\text{C}$ por 1 minuto, 1 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ – 100 $^{\circ}\text{C}$; detector (FID): 220 $^{\circ}\text{C}$; injetor: 220 $^{\circ}\text{C}$; em modo split (1/10) e gás de arraste (Hélio): 1,18mL/min.

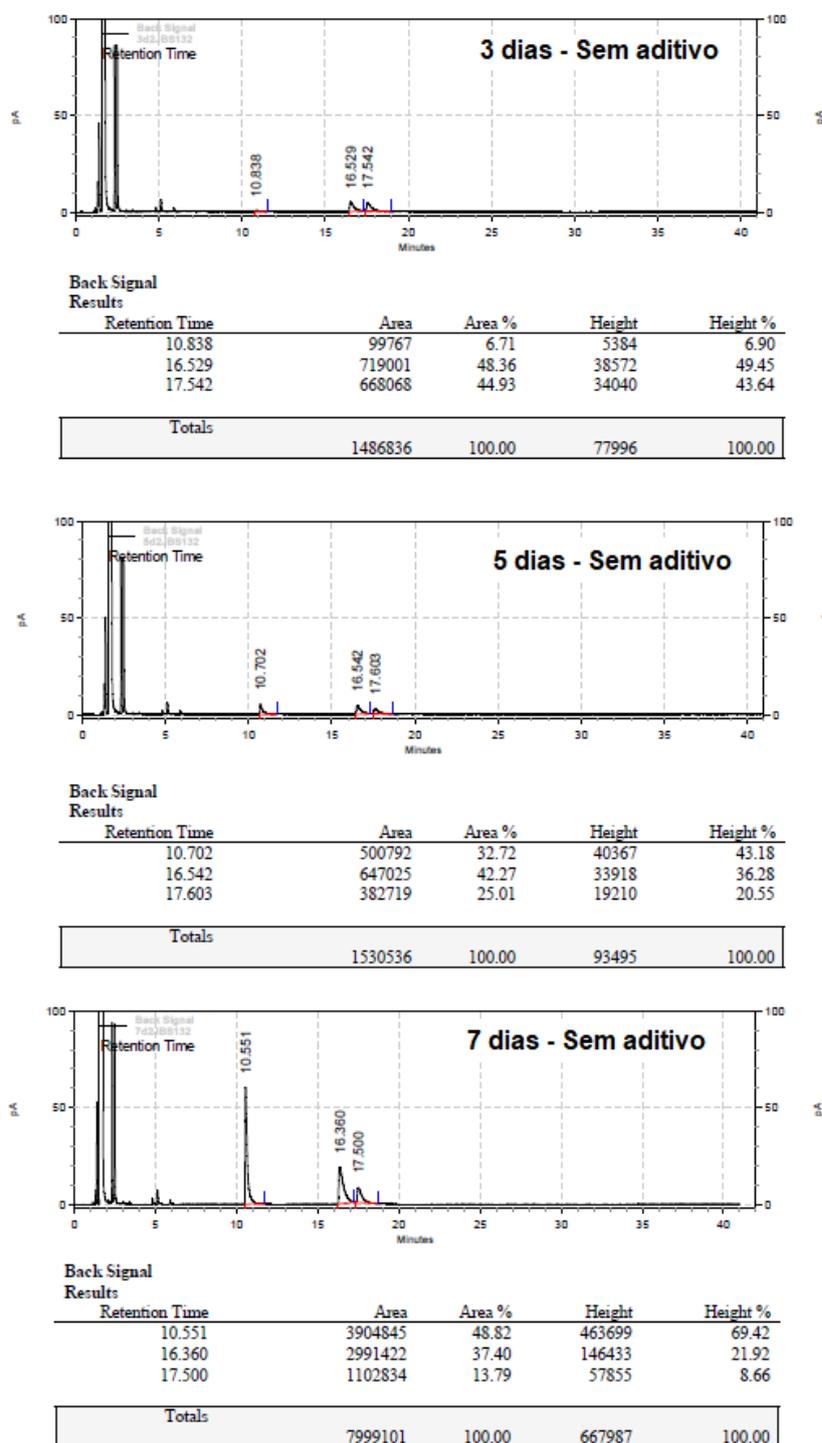
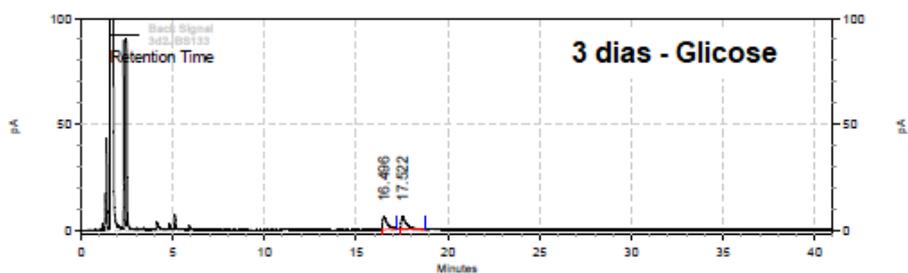


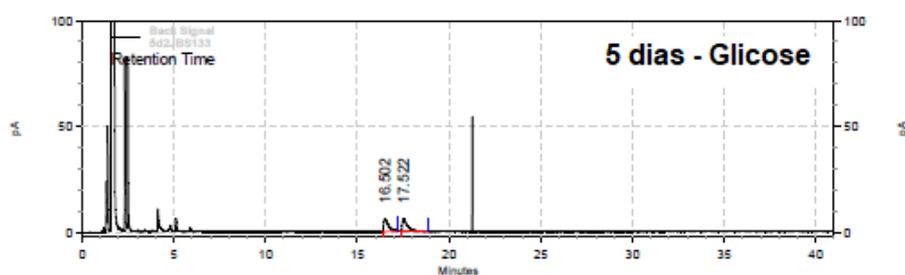
Figura 60: Cromatograma (3, 5 e 7 dias) referente a bio-oxidação do (*R/S*)-1-(2-furil) etanol (**4a**) $Tr(ND)=16,36$ e $Tr(ND)=17,50$] sem aditivo obtido por cromatografia a gás com fase estacionária quiral; coluna Cycosil B (28,5m x 0,25mm x 0,25 μ m de espessura de filme) e rampa de temperatura: 60°C por 1 minuto, 1°C/min – 100°C; detector (FID): 220°C; injetor: 220°C; em modo split (1/10) e gás de arraste (Hélio): 1,18mL/min.



**Back Signal
Results**

Retention Time	Area	Area %	Height	Height %
16.496	828834	49.77	45610	51.15
17.522	836468	50.23	43562	48.85

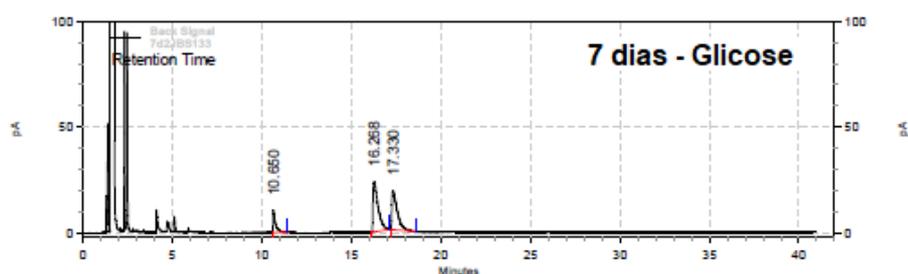
Totals	Area	Area %	Height	Height %
	1665302	100.00	89172	100.00



**Back Signal
Results**

Retention Time	Area	Area %	Height	Height %
16.502	836165	49.63	46239	51.14
17.522	848671	50.37	44186	48.86

Totals	Area	Area %	Height	Height %
	1684836	100.00	90425	100.00



**Back Signal
Results**

Retention Time	Area	Area %	Height	Height %
10.650	764274	10.41	79798	19.86
16.268	3635392	49.52	181115	45.08
17.330	2941993	40.07	140878	35.06

Totals	Area	Area %	Height	Height %
	7341659	100.00	401791	100.00

Figura 61: Cromatograma (3, 5 e 7 dias) referente a bio-oxidação do do (*R/S*)-1-(2-furil) etanol (**4a**) [Tr(ND)=16,36 e Tr(ND)=17,50] utilizando glicose como aditivo obtido por cromatografia a gás com fase estacionária quiral; coluna Cyclosil B (28,5m x 0,25mm x 0,25µm de espessura de filme) e rampa de temperatura: 60°C por 1 minuto, 1°C/min – 100°C; detector (FID): 220°C; injetor: 220°C; em modo split (1/10) e gás de arraste (Hélio): 1,18mL/min.

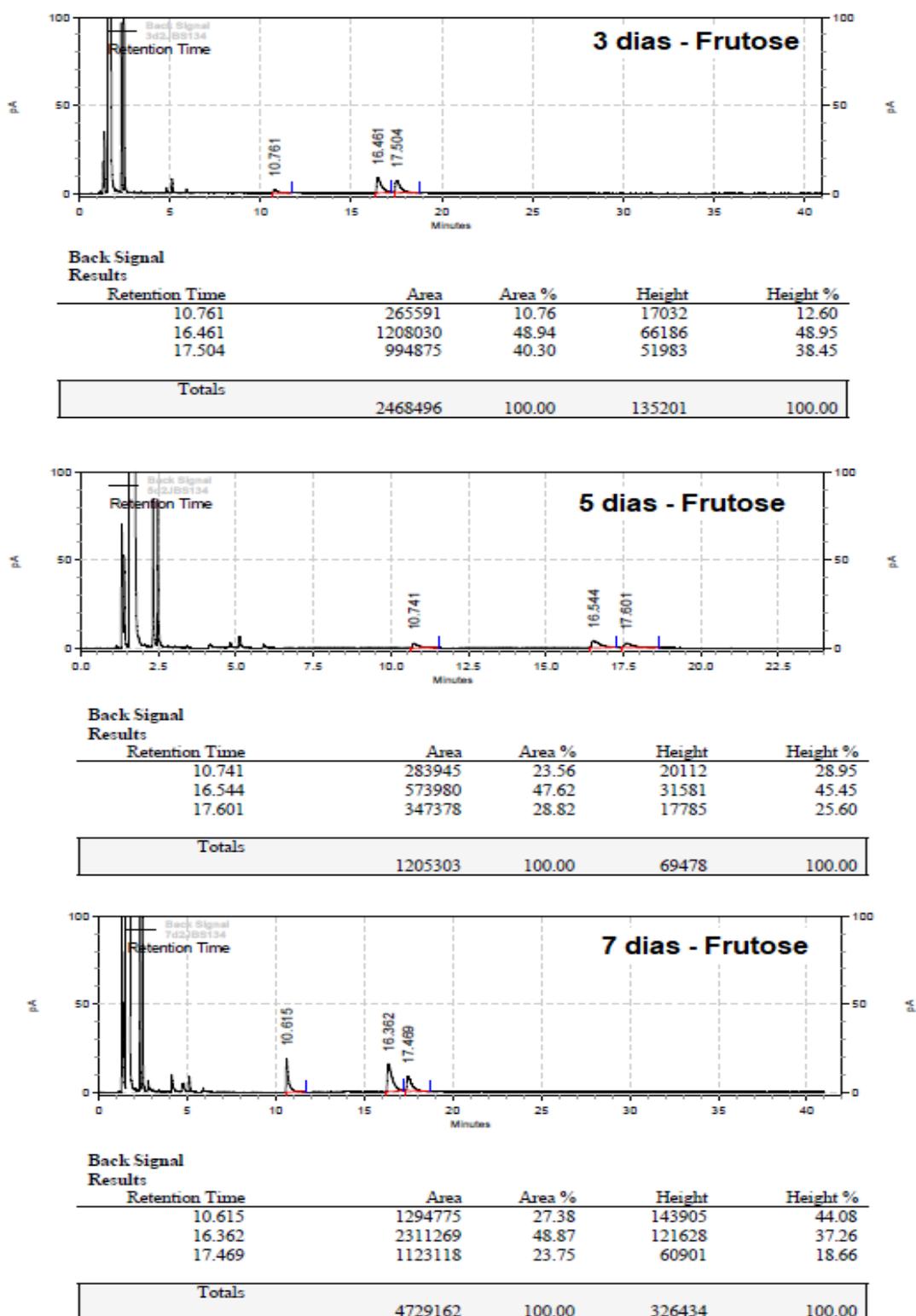


Figura 62: Cromatograma (3, 5 e 7 dias) referente a bio-oxidação do do (*R/S*)-1-(2-furil) etanol [Tr(ND)=16,36 e Tr(ND)=17,50] utilizando frutose como aditivo obtido por cromatografia a gás com fase estacionária quiral; coluna Cyclosil B (28,5m x 0,25mm x 0,25µm de espessura de filme) e rampa de temperatura: 60°C por 1 minuto, 1°C/min – 100°C; detector (FID): 220°C; injetor: 220°C; em modo split (1/10) e gás de arraste (Hélio): 1,18mL/min.

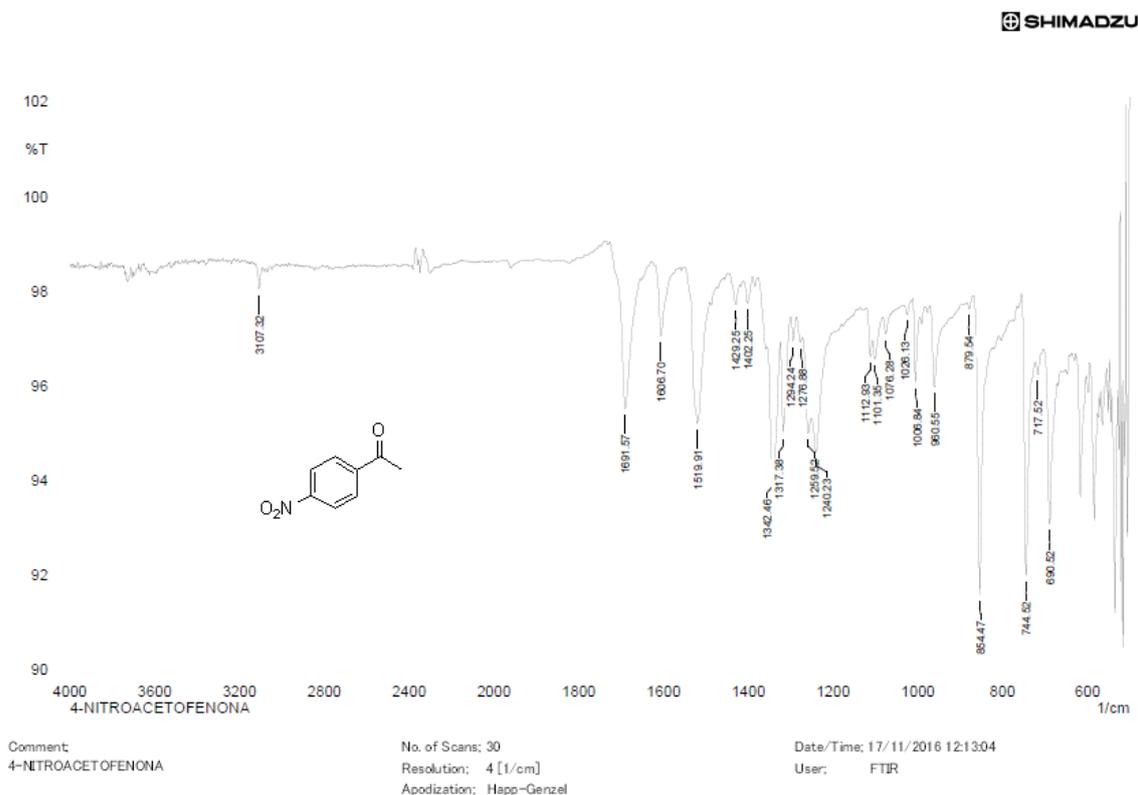


Figura 63: Espectro de Infravermelho do *p*-Nitroacetofenona (3) – [Pastilha de KBr].

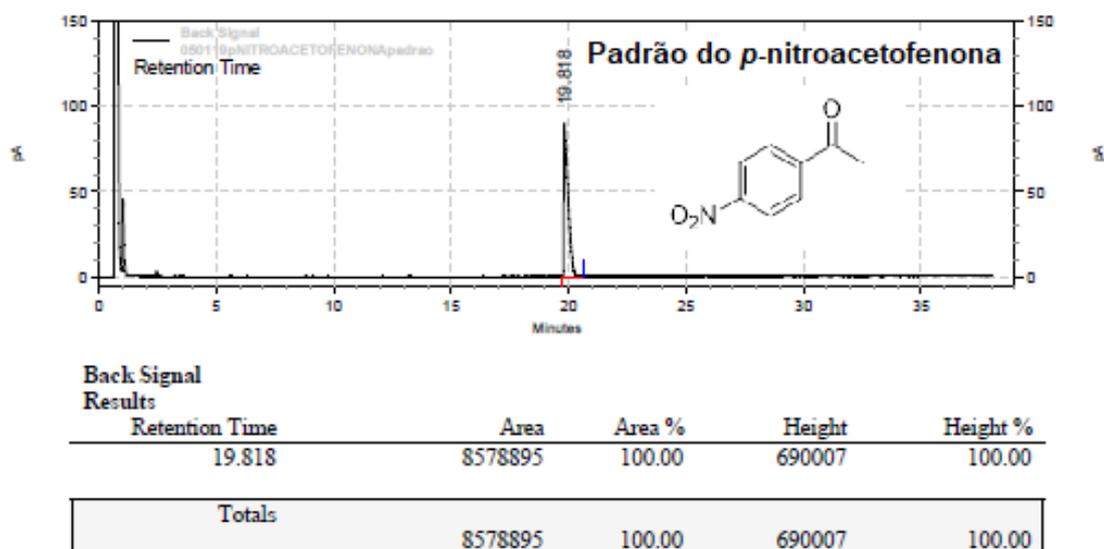


Figura 64: Cromatograma do comercial *p*-nitroacetofenona (3) [Tr =19,81min.] obtido por cromatografia a gás com fase estacionária quiral e coluna Cyclosil B (28,5m x 0,25mm x 0,25µm de espessura de filme) e rampa de temperatura: 130°C por 3 minutos, 1°C/min – 165°C; detector (FID): 220°C; injetor: 220°C; em modo split (1/10) e gás de arraste (Hélio): 1,18mL/min.

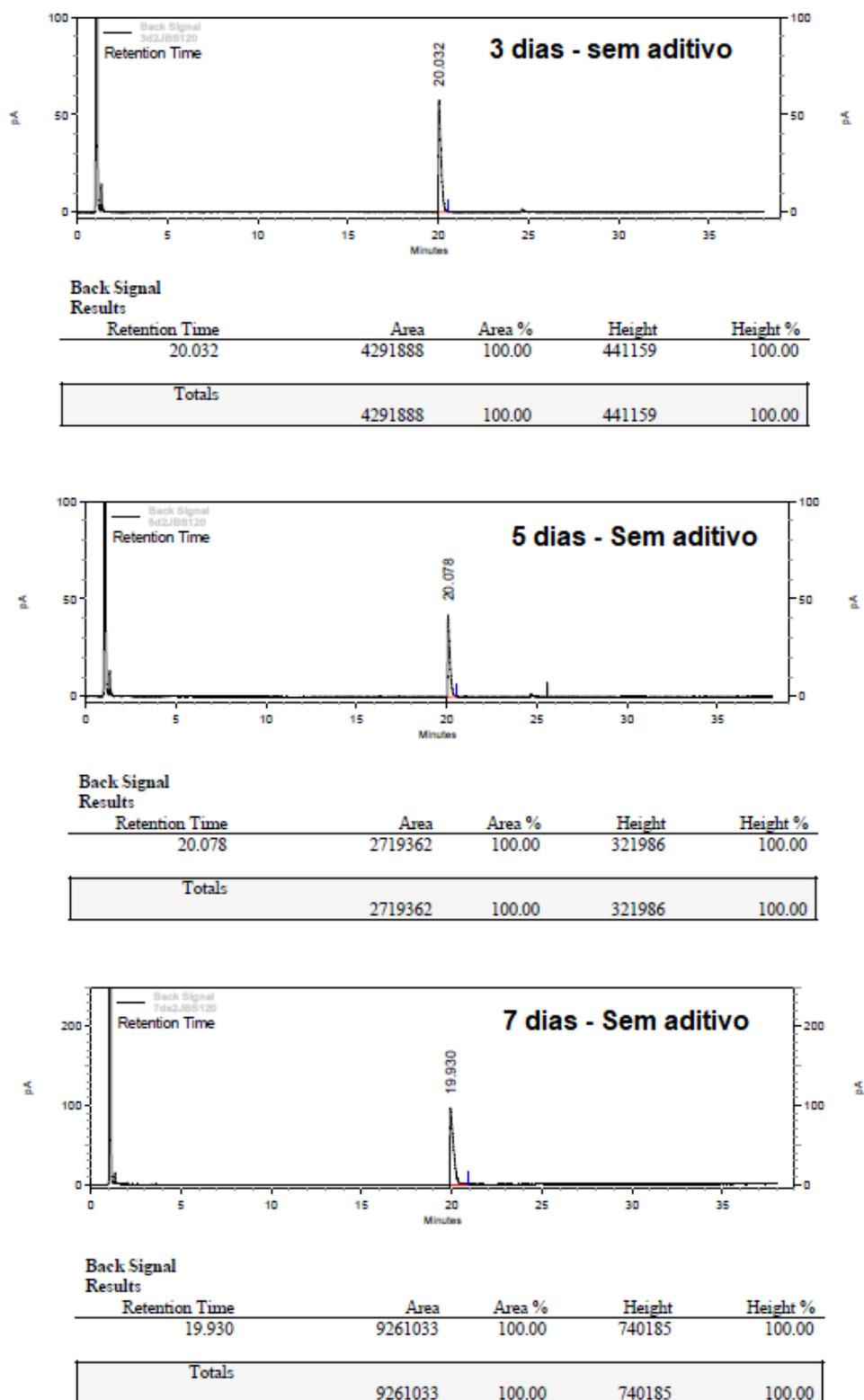


Figura 65: Cromatograma (3, 5 e 7 dias) referente a bioredução do *p*-nitroacetofenona (3) [Tr=19,93] sem aditivo obtido por cromatografia a gás com fase estacionária quiral; coluna Cyclosil B (28,5m x 0,25mm x 0,25µm de espessura de filme) e rampa de temperatura: 130°C por 3 minutos, 1°C/min – 165°C; detector (FID): 220°C; injetor: 220°C; em modo split (1/10) e gás de arraste (Hélio): 1,18mL/min.

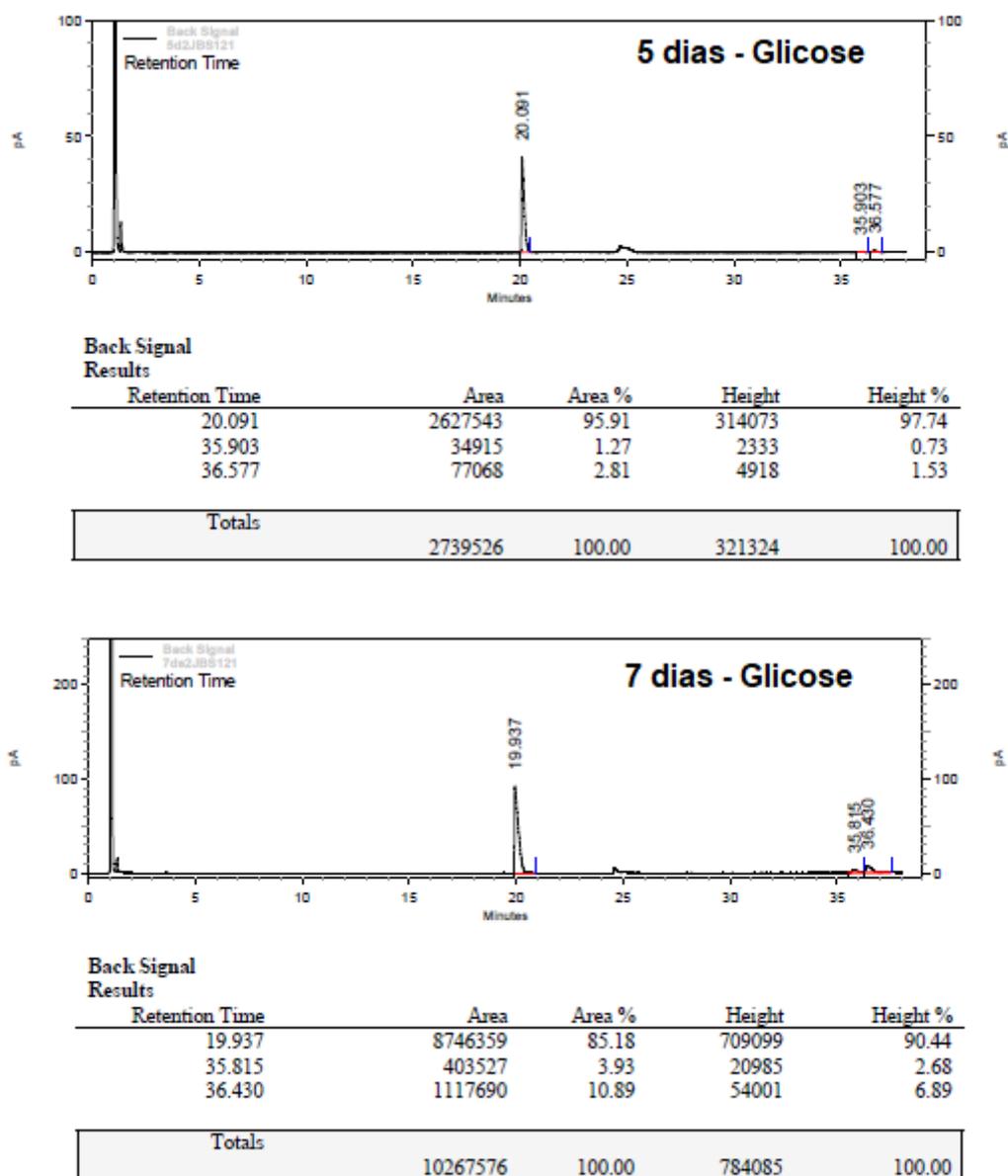


Figura 66: Cromatogramas [3 (não recuperado), 5 e 7 dias] referente a bioredução do *p*-nitroacetofenona (**3**) [Tr=19,93] utilizando glicose como aditivo obtido por cromatografia a gás com fase estacionária quiral; coluna Cyclosil B (28,5m x 0,25mm x 0,25µm de espessura de filme) e rampa de temperatura: 130°C por 3 minutos, 1°C/min – 165°C; detector (FID): 220°C; injetor: 220°C; em modo split (1/10) e gás de arraste (Hélio): 1,18mL/min.

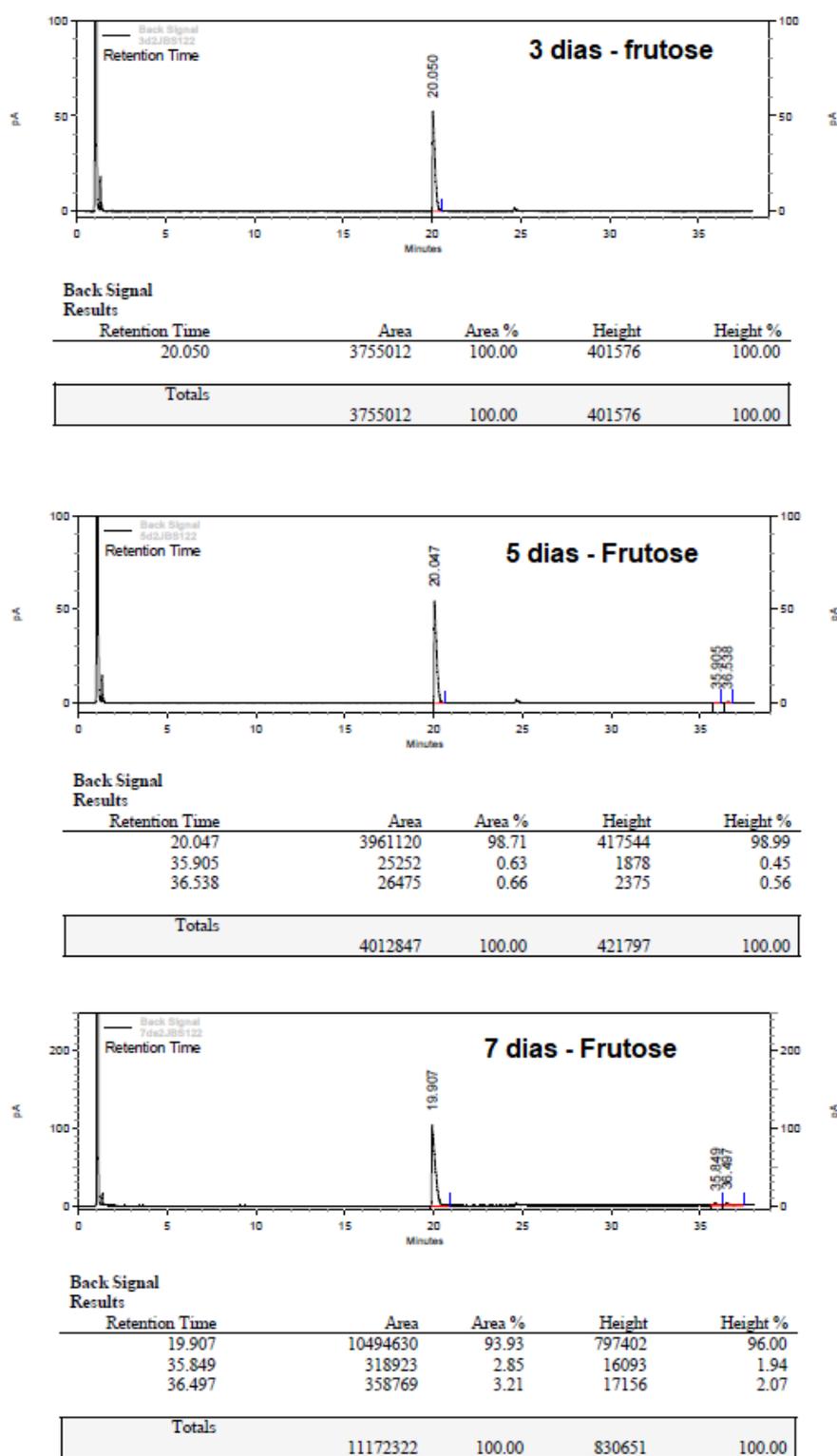


Figura 67: Cromatograma (3, 5 e 7 dias) referente a bioredução do p-nitroacetofenona (3) [Tr=19,93] utilizando frutose como aditivo obtido por cromatografia a gás com fase estacionária quiral; coluna Cyclosil B (28,5m x 0,25mm x 0,25µm de espessura de filme) e rampa de temperatura: 130°C por 3 minutos, 1°C/min – 165°C; detector (FID): 220°C; injetor: 220°C; em modo split (1/10) e gás de arraste (Hélio): 1,18mL/min.

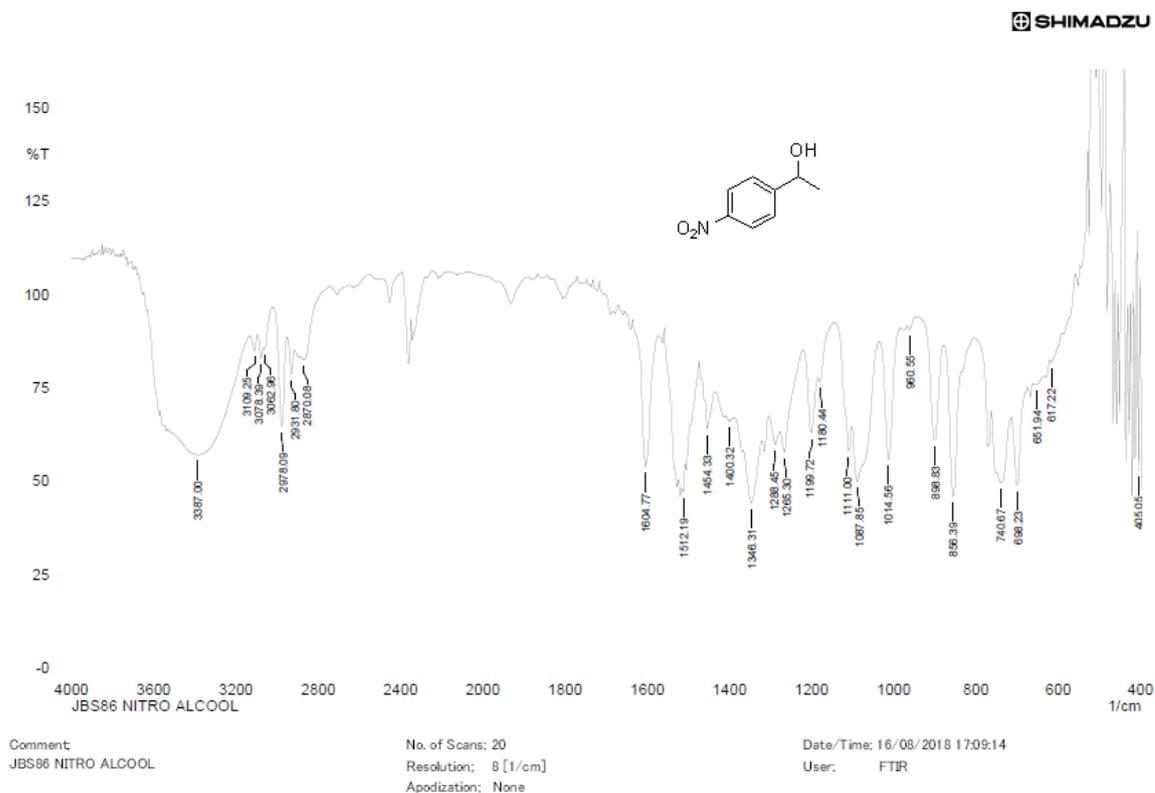


Figura 68: Espectro de Infravermelho do *p*-Nitrofeniletanol (**3a**) – [Pastilha de KBr].

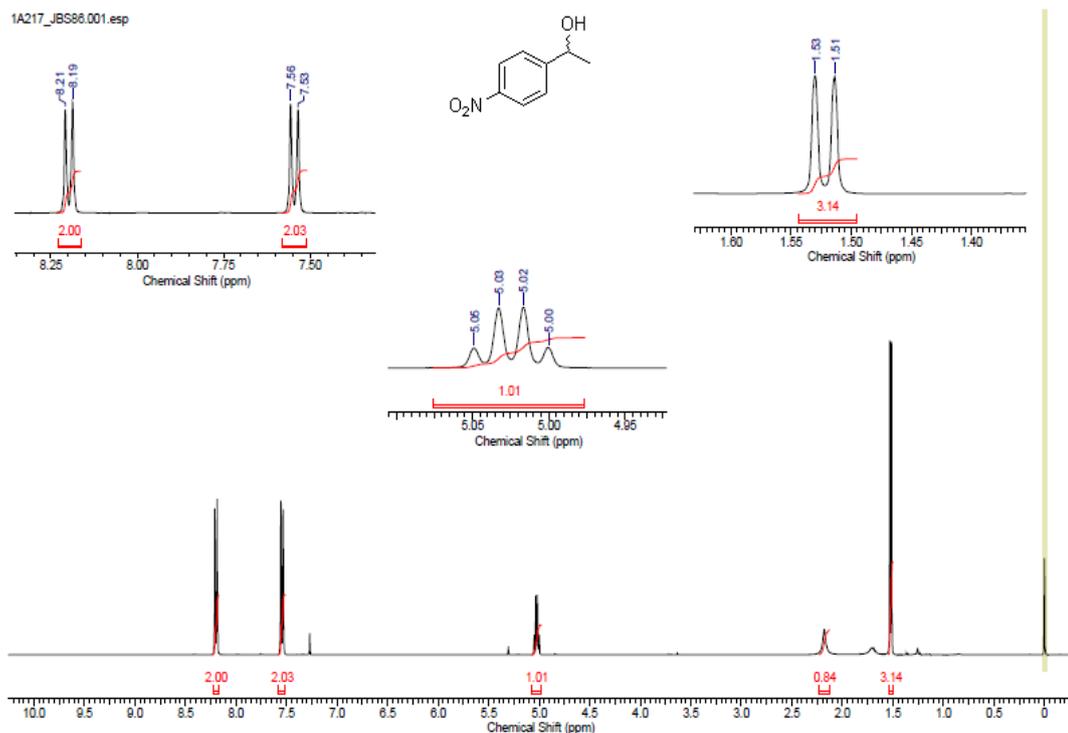


Figura 69: Espectro de RMN de ^1H do *p*-Nitrofeniletanol (**3a**) - [CDCl_3 ; 400MHz; δ (ppm)]

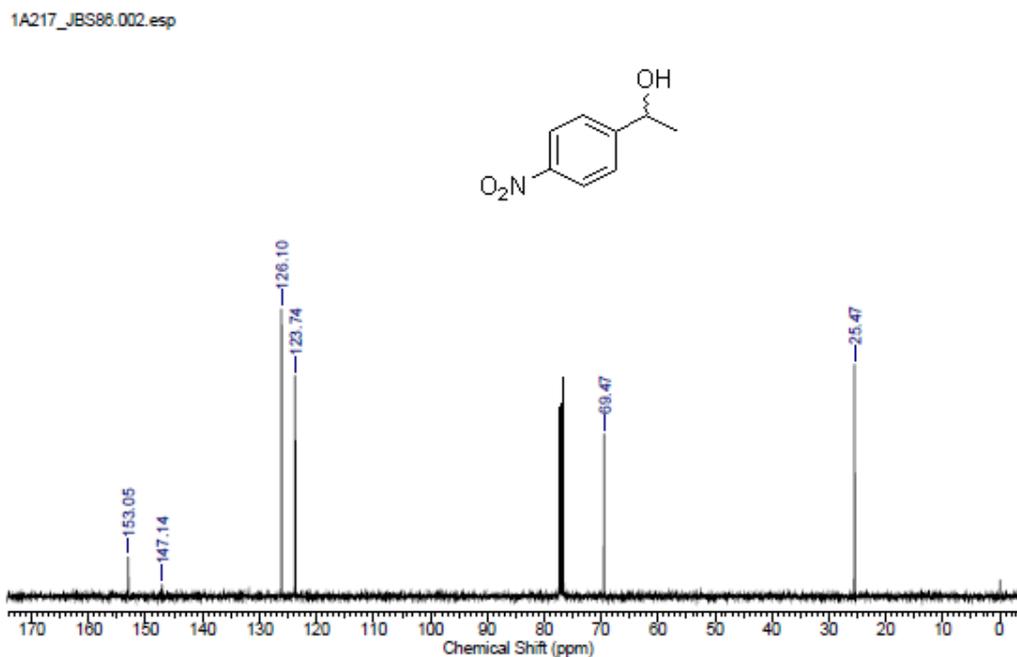


Figura 70: Espectro de $^1\text{-RMN}$ de ^{13}C do *p*-Nitrofeniletanol(3a) - $[\text{CDCl}_3; 100\text{MHz}; \delta(\text{ppm})]$

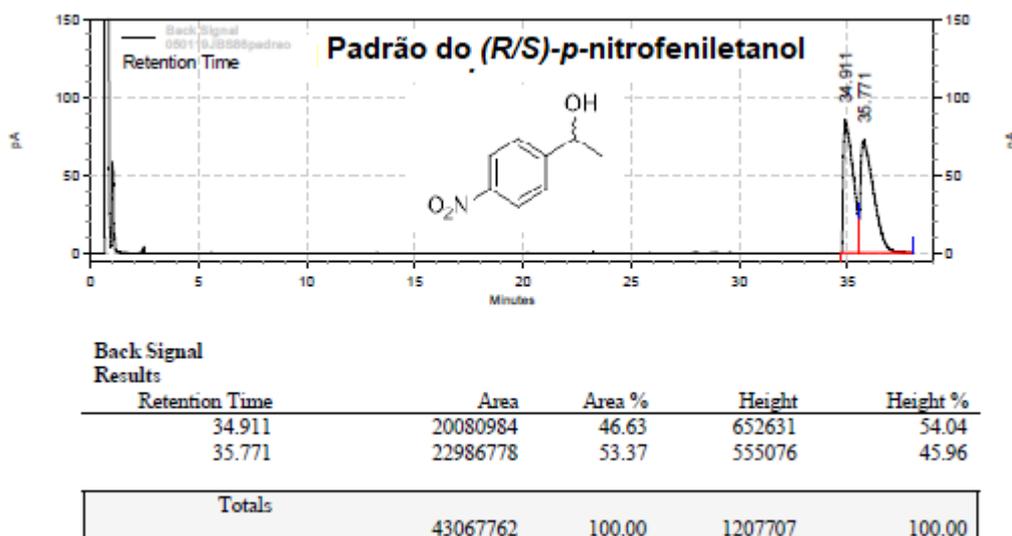


Figura 71: Cromatograma do (*R/S*)-*p*-nitrofeniletanol (3a) [$\text{Tr}(\text{R})=34,91\text{ min.}$ e $\text{Tr}(\text{S})=35,77\text{ min.}$] obtido por cromatografia a gás com fase estacionária quiral e coluna Cyclosil B (28,5m x 0,25mm x 0,25 μm de espessura de filme) e rampa de temperatura: 130 $^{\circ}\text{C}$ por 3 minutos, 1 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ – 165 $^{\circ}\text{C}$; detector (FID): 220 $^{\circ}\text{C}$; injetor: 220 $^{\circ}\text{C}$; em modo split (1/10) e gás de arraste (Hélio): 1,18mL/min.

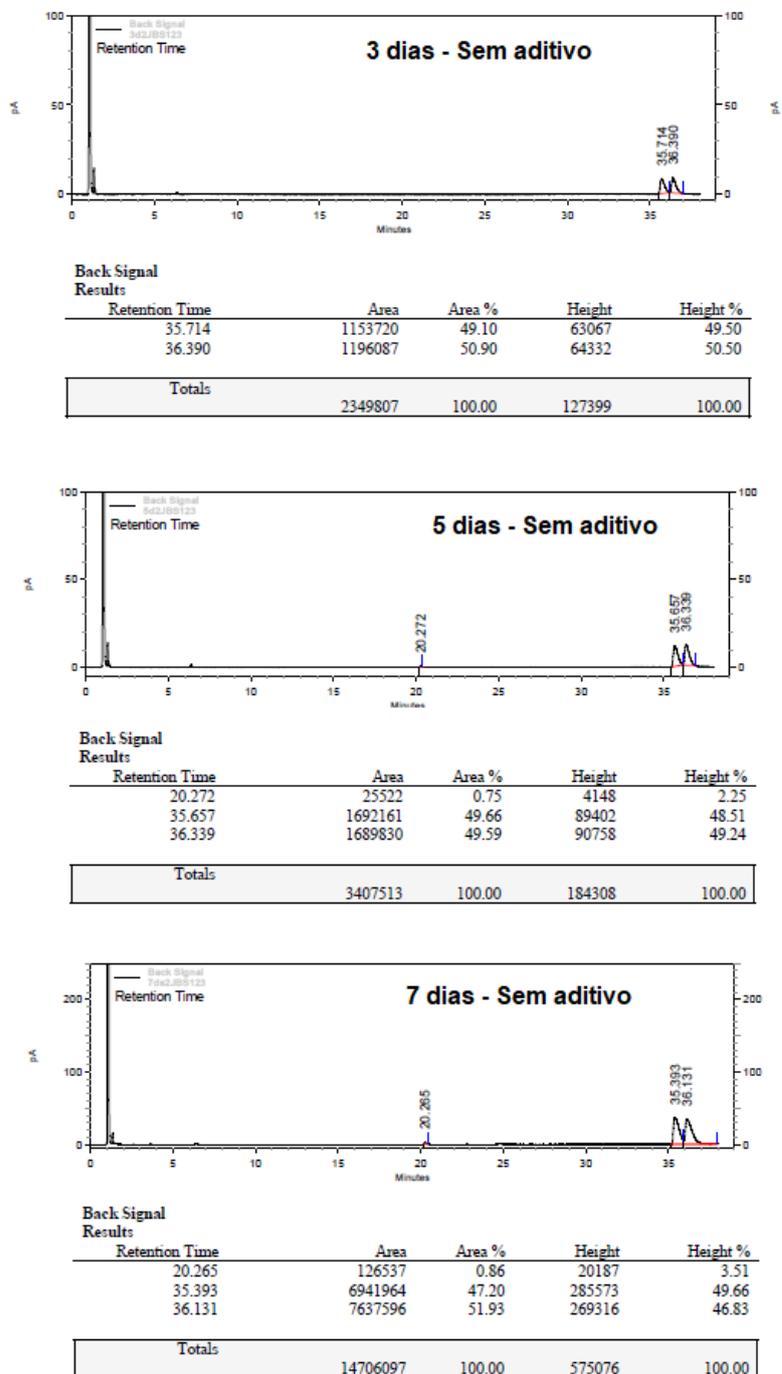


Figura 72: Cromatograma (3, 5 e 7 dias) referente a bio-oxidação do (*R/S*)-*p*-nitrofeniletanol (**3a**) [Tr(*R*)=35,39 e Tr(*S*)=36,13] sem aditivo obtido por cromatografia a gás com fase estacionária quiral; coluna Cyclosil B (28,5m x 0,25mm x 0,25µm de espessura de filme) e rampa de temperatura: 60°C por 1 minuto, 1°C/min – 100°C; detector (FID): 220°C; injetor: 220°C; em modo split (1/10) e gás de arraste (Hélio): 1,18mL/min.

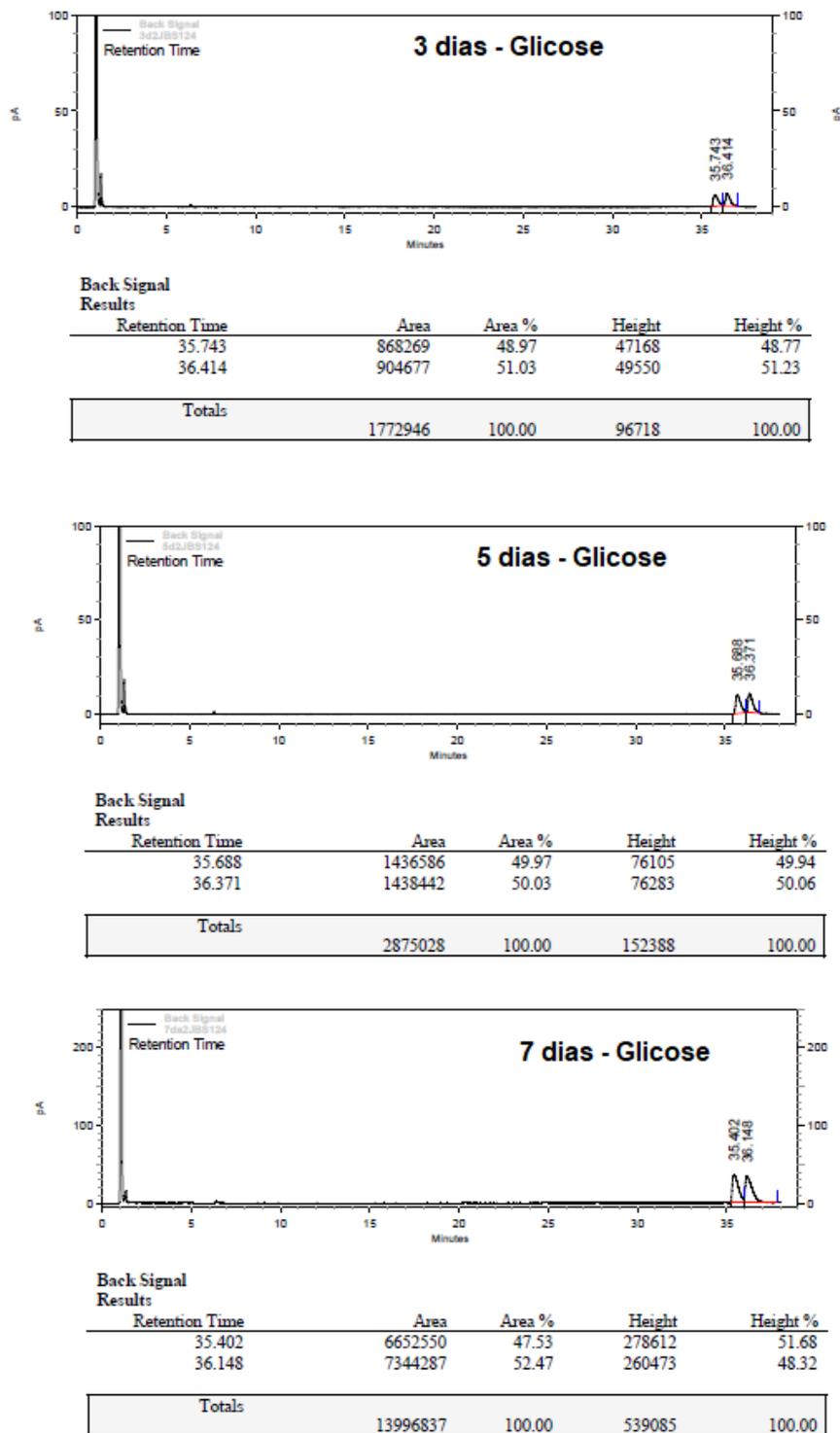


Figura 73: Cromatograma (3, 5 e 7 dias) referente a bio-oxidação do (*R/S*)-*p*-nitrofeniletanol (**3a**) [Tr(*R*)=35,39 e Tr(*S*)=36,13] utilizando glicose como aditivo obtido por cromatografia a gás com fase estacionária quiral; coluna Cyclosil B (28,5m x 0,25mm x 0,25µm de espessura de filme) e rampa de temperatura: 60°C por 1 minuto, 1°C/min – 100°C; detector (FID): 220°C; injetor: 220°C; em modo split (1/10) e gás de arraste (Hélio): 1,18mL/min.

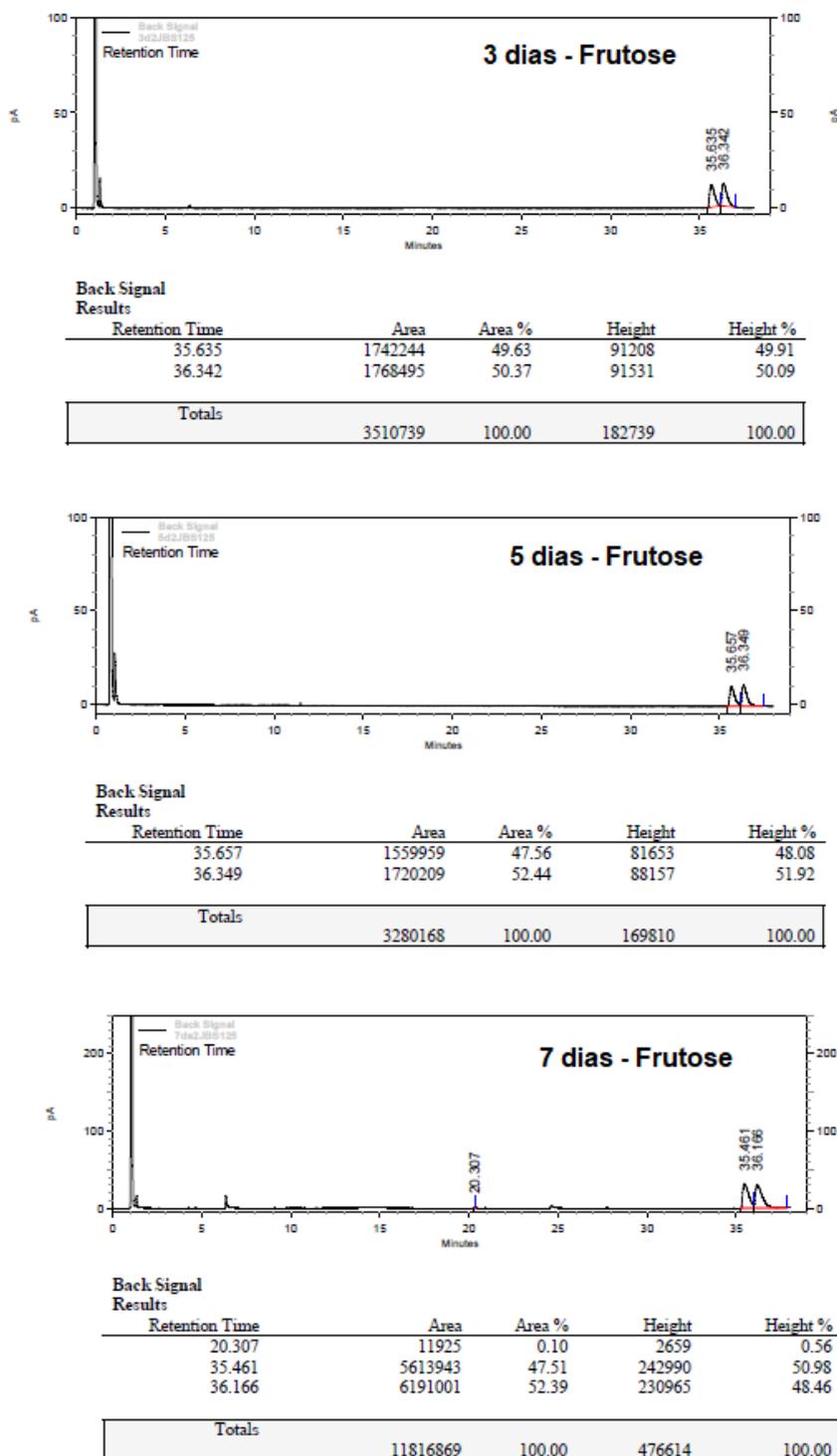


Figura 74: Cromatograma (3, 5 e 7 dias) referente a bio-oxidação do (*R/S*)-*p*-nitrofeniletanol (**3a**) [Tr(*R*)=35,39 e Tr(*S*)=36,13] utilizando frutose como aditivo obtido por cromatografia a gás com fase estacionária quiral; coluna Cyclosil B (28,5m x 0,25mm x 0,25µm de espessura de filme) e rampa de temperatura: 60°C por 1 minuto, 1°C/min – 100°C; detector (FID): 220°C; injetor: 220°C; em modo split (1/10) e gás de arraste (Hélio): 1,18mL/min.