

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ORGÂNICA E INORGÂNICA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO EM QUÍMICA ORGÂNICA

**Síntese quimioenzimática da (*S*)-5-hidroxi-2-(1-hidroxietil)-
nafto[2,3-*b*]furano-4,9-diona e emprego das leveduras *Candida*
tropicalis e *Pichia membranifaciens* na redução da acetofenona
e derivados**

**Tese de Doutorado submetida à coordenação do Programa de Pós-
graduação em Química como requisito necessário para a obtenção do
grau de Doutor em Química**

Daniel Marcos de Freitas Araujo

Prof. Dr. Marcos Carlos de Mattos
Orientador

Dr. Vicente Gotor Fernandez
Co-orientador

FORTALEZA – CEARÁ
2010

A687s Araujo, Daniel Marcos de Freitas

Síntese quimioenzimática da (S)-5-hidroxi-2-(1-hidroxietil)-nafto[2,3-*b*] furano-4,9-diona e emprego das leveduras *Candida tropicalis* e *Pichia membranifaciens* na redução da acetofenona e derivados / Daniel Marcos de Freitas Araujo, 2010.

219 f; il. color. enc.

Orientador: Prof. Dr. Marcos Carlos de Mattos

Co-orientador: Prof. Dr. Vicente Gotor Fernandez

Área de concentração: Química Orgânica

Tese (Doutorado) - Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências. Depto. de Química Orgânica e Inorgânica, Fortaleza, 2010.

1. Biocatálise 2. Resolução cinética 3. Biorredução I. Mattos, Marcos Carlos de (orient.) II. Fernandez, Vicente Gotor (Co-orient.) III. Universidade Federal do Ceará – Pós-Graduação em Química IV. Título

CDD 540

Esta Tese foi aprovada como parte dos requisitos necessários à obtenção do Grau de Doutor em Química Orgânica, outorgado pela Universidade Federal do Ceará, em cuja Biblioteca de Ciências e Tecnologia/UFC encontra-se à disposição dos interessados.

Daniel Marcos de Freitas Araújo

TESE APROVADA EM: 11/06/2010

EXAMINADORES:

Prof. Dr. Marcos Carlos de Mattos
Universidade Federal do Ceará - UFC

Prof. Dra. Mary Anne Sousa Lima
Universidade Federal do Ceará - UFC

Prof. Dra. Gilvandete Maria P. Santiago
Universidade Federal do Ceará - UFC

Prof. Dra. Angélica Maria Lucchese
Universidade Estadual de Feira de Santana - UEFS

Prof. Dr. Leandro Helgueira Andrade
Universidade de São Paulo – USP

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela vida e por proporcionar sempre a força e a vontade para a persistência nos momentos mais difíceis, resultando no amadurecimento pessoal e profissional.

À minha família pelo apoio e incentivo à minha formação acadêmica em especial ao meu pai, João Batista e minha mãe, Márcia Regina.

Ao professor Marcos, por toda a orientação ao longo destes anos, pela paciência e por acreditar que seria capaz de enfrentar os desafios e seguir em frente.

À professora Vânia do Departamento de Biologia por ceder os microrganismos para o desenvolvimento de parte deste trabalho.

Aos professores Vicente Gotor Santamaria e Gonzalo de Gonzalo da Universidade de Oviedo na Espanha por permitir que pudesse desenvolver este trabalho no Laboratório de Biorgânica e pela orientação.

A todos os companheiros e amigos do LABS e de outros laboratórios com os quais compartilhei bons momentos durante o Doutorado; Adriano, Andreza, Aretha, Bárbara, Bartholomeu, Bruna, Conceição, Érica, Fátima, Francisco, Jackson, Gizelle, Isabel, Karla, Michele, Natália, Pablo, Reinaldo, Renata, Rosa, Sebastião, Tasso e Thiago. Em especial, agradeço à Fátima, Gizelle, Natália e Reinaldo por todo o apoio e amizade.

À professora Telma Leda do LBPN e seus alunos Ayla, Luciana Bertini, Luciana Lucas, Luciana Gregório, Leonardo Carvalho, Leonardo Alcântara e Leila por estarem à disposição quando necessitamos de ajuda e também pela amizade.

A todos os companheiros que convivi do Laboratório de Biorgânica da Universidade de Oviedo (UNIOVI) na Espanha; Ana, Eduardo, Fabrício, Javier, Lara, Maria, Nico, Roberto, Saul, Sérgio e Tatiana pelos momentos de humor e ajuda no laboratório, em especial à Lara pela aquisição dos espectros de massa e pela amizade. Da mesma universidade, porém, do departamento de Engenharia Química, agradeço à Renata pela boa amizade e ajuda.

Aos professores que aceitaram compor a banca para correção deste trabalho em tão pouco tempo; Angélica Lucchese, Gilvandete Santiago, Leandro Andrade e Mary Anne Lima; agradeço pelas contribuições e sugestões.

Ao Francisco das Chagas e à Natália Saraiva pela aquisição dos espectros de massa.

SUMÁRIO

	PÁG.
RESUMO	12
ABSTRACT	13
LISTA DE FIGURAS	14
LISTA DE TABELAS	21
LISTA DE ABREVIATURAS	22
1. INTRODUÇÃO	25
2. REVISAO BIBLIOGRÁFICA	28
2. ENZIMAS COMO BIOCATALISADORES	28
2.1.1. Enzimas	28
2.1.2. Vantagens e desvantagens das enzimas como biocatalisadores	29
2.1.3. Enzimas isoladas <i>versus</i> sistemas de células íntegras	31
2.1.4. Emprego de microrganismos em biocatálise	31
2.1.5. Lipases	32
2.1.6. Oxidoredutases	34
2.1.7. Fonte de hidrogênio para regeneração da coenzima	35
2.2. SÍNTESE ASSIMÉTRICA	36
2.2.1. Metodologias para desenvolvimento de moléculas quirais	36
2.2.2. Álcoois quirais - os blocos de construção da química orgânica assimétrica	37
2.2.3. Regra de Prelog	38
2.2.4. Emprego de agentes biocatalíticos para obtenção de álcoois quirais através da redução de cetonas pró-quirais	38
2.2.5. Resolução cinética	50
2.2.6. Regra de Kazlaukas	53
2.2.7. Emprego da CAL-B em resoluções cinéticas	53
2.2.8. Emprego da PSC-I em resoluções cinéticas	75
2.3. QUINONAS COMO AGENTES TERAPÊUTICOS	94
2.3.1. Quinonas - Definição e propriedades	94
2.3.2. Emprego de <i>T. avellanadae</i> como agente antitumoral	95
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	100

3.1.	Estudo de processos enzimáticos catalisados pelas leveduras	100
3.1.1.	Preparação dos álcoois aromáticos padrões	100
3.1.2.	Reações de biorredução empregando células íntegras de leveduras	102
3.2.	Síntese quimioenzimática da naftoquinona (377)	111
3.2.1.	Síntese da 5-hidroxi-2-(1-hidroxietil)-nafto[2,3- <i>b</i>]furano-4,9-diona	111
3.2.2.	Desenvolvimento das metodologias para separação dos compostos estudados em HPLC ou CG	116
3.2.3.	Emprego de álcool desidrogenases comerciais para redução da cetona (376)	118
3.2.4.	Emprego de lipases para resolução cinética do álcool (\pm)-(377)	120
4.	PARTE EXPERIMENTAL	124
4.1.	Métodos cromatográficos	124
4.1.1.	Cromatografia em gel de sílica	124
4.1.2.	Cromatografia líquida de alta eficiência	124
4.1.3.	Cromatografia gasosa	124
4.2.	Métodos espectrométricos	125
4.2.1.	Espectrometria no Infravermelho (IV)	125
4.2.2.	Espectrometria de Ressonância Magnética Nuclear (RMN)	125
4.2.3.	Espectrometria de Massas (EM)	125
4.3.	Ponto de fusão	125
4.4.	Rotação óptica	126
4.5.	Reagentes e solventes utilizados	126
4.6.	Microrganismos empregados	127
4.7.	Meio de cultura empregado	128
4.8.	Procedimentos empregados no desenvolvimento das biotransformações mediadas pelas leveduras	128
4.8.1	Metodologia para identificação de enzimas do tipo álcool desidrogenase	128
4.8.2.	Procedimento para a reação de redução com boroidreto de sódio	128
4.8.3.	Procedimentos cromatográficos empregados na quantificação dos álcoois aromáticos	129
4.8.4.	Procedimento para obtenção de biomassa das leveduras	139
4.8.5.	Procedimento para reação de biorredução utilizando células íntegras de	139

	leveduras	
4.9.	Procedimentos empregados no desenvolvimento da síntese da (<i>S</i>)-5-hidroxi-2-(1-hidroxietil)-nafto[2,3- <i>b</i>]furan-4,9-diona	141
4.9.1.	Síntese da 5-hidroxi-naftoquinona	141
4.9.2.	Síntese da 2-(dimetilamino)-5-hidroxi-naftoquinona	141
4.9.3.	Síntese da 2,5-diidroxi-1,4-naftalenodiona	142
4.9.4.	Síntese do 2-acetil-2,3,4,9-tetrahidronafto[2,3- <i>b</i>]furano-4,9-diona	142
4.9.5.	Síntese do 2-acetil-4,9-diidronafto[2,3- <i>b</i>]furano-4,9-diona	143
4.9.6.	Síntese da 5-hidroxi-2-(1-hidroxietil)-nafto[2,3- <i>b</i>]furano-4,9-diona	144
4.9.7.	Síntese do acetato de 1-(5-hidroxi-4,9-dioxo-4,9-diidronafto[2,3- <i>b</i>]furan-2-il)-etila	145
4.9.8.	Procedimentos cromatográficos empregados na síntese da (<i>S</i>)-5-hidroxi-2-(1-hidroxietil)-nafto[2,3- <i>b</i>]furano-4,9-diona	145
4.9.9.	Procedimento para a biorredução da cetona (376) dependendo da ADH usada no processo enzimático	146
4.9.10.	Biorredução da quinona (376) utilizando células íntegras de leveduras	147
4.9.11.	Procedimento para a resolução cinética enzimática do álcool racêmico (377)	148
5.	DADOS FÍSICOS E ESPECTROMÉTRICOS	150
5.1.	Dados físicos e espectrométricos da 5-hidroxi-naftoquinona	150
5.2.	Dados físicos e espectrométricos da 2-(dimetilamino)-5-hidroxi-naftoquinona	153
5.3.	Dados físicos e espectrométricos da 2,5-diidroxi-1,4-naftalenodiona	156
5.4.	Dados físicos e espectrométricos da 2-acetil-2,3,4,9-tetrahidronafto[2,3- <i>b</i>]furano-4,9-diona	159
5.5.	Dados físicos e espectrométricos da 2-acetil-4,9-diidronafto[2,3- <i>b</i>]furano-4,9-diona	162
5.6.	Dados físicos e espectrométricos da 5-hidroxi-2-(1-hidroxietil)-nafto[2,3- <i>b</i>]furano-4,9-diona	165
5.7.	Dados físicos e espectrométricos do acetato de 1-(5-hidroxi-4,9-dioxo-4,9-diidronafto[2,3- <i>b</i>]furano-2-il)etila	168
5.8.	Dados espectroscópicos do 1-(fenil)etanol	171

5.9.	Dados espectroscópicos do 1-(2-nitrofenil)etanol	173
5.10.	Dados espectroscópicos do 1-(3-nitrofenil)etanol	175
5.11.	Dados espectroscópicos do 1-(4-nitrofenil)etanol	177
5.12.	Dados espectroscópicos do 1-(2-metoxifenil)etanol	179
5.13.	Dados espectroscópicos do 1-(3-metoxifenil)etanol	181
5.14.	Dados espectroscópicos do 1-(4-metoxifenil)etanol	183
5.15.	Dados espectroscópicos do 1-(4-clorofenil)etanol	185
5.16.	Dados espectroscópicos do 2-cloro-1-(fenil)etanol	187
5.17.	Dados espectroscópicos do 2-cloro-1-(3,4-diclorofenil)etanol	189
5.18.	Dados espectroscópicos do 1-(4-metilfenil)etanol	191
5.19.	Dados espectroscópicos do 1-(4-isopropilfenil)etanol	193
6.	CONCLUSÃO	196
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	198
8.	ANEXOS	207

RESUMO

Neste trabalho relatamos o emprego de lipases e álcool desidrogenases para produção de moléculas quirais através da resolução cinética de álcoois ou redução de cetonas, respectivamente. Na primeira parte do trabalho preparou-se uma naftoquinona com atividade citotóxica empregando uma rota quimioenzimática baseada em sete passos reacionais. A partir do 1,5-diidroxinaftaleno preparou-se a 5-hidroxi-2-(1-hidroxietil)-nafto[2,3-*b*]furano-4,9-diona, um álcool secundário que, foi submetido à resolução cinética empregando duas lipases comerciais, a lipase de *Candida antarctica* B (CAL-B) e a lipase de *Pseudomonas cepacia* (PS-C). Após 50% de conversão, o álcool foi recuperado com 42% de rendimento e excesso >99% (*S*) empregando a CAL-B com duas horas de reação. De maneira semelhante, com o emprego da PSC foi obtido o álcool com 45% de rendimento e excesso >99% (*S*). Em ambos os casos, o acetato correspondente foi recuperado com 43-44% de rendimento e pureza enantiomérica >99% (*R*). Alternativamente, o álcool foi obtido por meio da redução enantiosseletiva promovida por álcool desidrogenases. Empregou-se nesta ocasião, seis enzimas comerciais – A (*Rhodococcus ruber*), CP (*Candida parapsilosis*), LB (*Lactobacillus brevis*), PR2, RS1 (*Rhodococcus* sp.) e T (*Thermoanaerobacter* sp.). Um estudo detalhado e a otimização dos parâmetros nos conduziu ao emprego da enzima A com 48 horas de reação para obtenção do álcool (*S*) com 92% de conversão e excesso >99%. Na segunda parte do trabalho realizou-se um “screening” para obtenção de fontes enzimáticas microbianas para redução de compostos carbonílicos. Inicialmente, partiu-se de oito leveduras (duas linhagens de *Candida krusei*, *Candida guilliermondi*, *Candida rugosa*, *Candida tropicalis*, *Kluyveromyces lactis-similar*, *Pichia anomala* e *Pichia membranifaciens*) as quais foram submetidas a um teste colorimétrico para identificação de álcool desidrogenases (ADHs). Este ensaio revelou que todas as cepas testadas eram fontes de ADHs. Em seguida, foram empregadas como agentes para biorredução de um substrato carbonílico comum, a acetofenona. Os melhores resultados foram obtidos com as leveduras *Candida tropicalis* e *Pichia membranifaciens* com conversões de 62 e 75% e excessos de 98 e 99% (*S*), respectivamente. Empregando *C. tropicalis* e *P. membranifaciens* e as condições otimizadas, foram selecionados derivados da acetofenona para biorredução. Os melhores resultados foram encontrados para as nitroacetofenonas com conversões completas e excessos entre 90-99%.

ABSTRACT

Herein we report the employment of lipases and alcohol dehydrogenases for production of chiral molecules through kinetic resolution of secondary alcohols and reduction of ketones, respectively. In the first part of this work it was prepared a naphthoquinone with cytotoxic activity employing a chemoenzymatic route based on seven reactional steps. From 1,5-dihydroxynaphthalene we prepared 5-hydroxy-2-(1-hydroxyethyl)naphtho[2,3-*b*]furan-4,9-dione, a secondary alcohol that, was submitted to kinetic resolution employing two commercial lipases, lipase from *Candida antarctica* B (CAL-B) and lipase from *Pseudomonas cepacia* (PSC). After 50% of conversion, the alcohol was recovered with 42% yield and *ee* >99% (*S*) by the use of CAL-B in two hours of reaction. Similarly, using PSC the alcohol was recovered with 45% yield and >99% (*S*) of enantiomeric excess. Both cases, led to the corresponding acetate with 43-44% yield and enantiomeric purity >99% (*R*). Alternatively, the alcohol was obtained by the use of an enantioselective bioreduction method promoted by alcohol dehydrogenases. Six commercial enzymes were selected for this step - A (*Rhodococcus ruber*), CP (*Candida parapsilosis*), LB (*Lactobacillus brevis*), PR2, RS1 (*Rhodococcus* sp.) and T (*Thermoanaerobacter* sp.). A detailed investigation and optimization of the parameters led us to use ADH A to obtain alcohol (*S*) with 92% yield and *ee* >99%. In the second part of this work a screening was realized to select enzymatic microbial sources for reduction of carbonyl compounds. Initially, eight yeasts were chosen (two strains of *Candida krusei*, *Candida guilliermondi*, *Candida rugosa*, *Candida tropicalis*, *Kluyveromyces lactis-similar*, *Pichia anomala* and *Pichia membranifaciens*) which were submitted to a colorimetric assay for identification of alcohol dehydrogenases (ADHs). This revealed us that all strains are ADH producing sources. After that, these ones were employed as bioreducing agents of a standard substrate, acetophenone. The best results were obtained by using *Candida tropicalis* and *Pichia membranifaciens* as biocatalysts with conversions of 62 and 75% and enantiomeric excesses of 98% and 99% (*S*), respectively. Further, *C. tropicalis* and *P. membranifaciens* performed the reduction of some acetophenone derivatives. The best results were found to be for the nitro-compounds with complete conversions and *ee* between 96-99%.

LISTA DE FIGURAS		PAG.
Figura 2.1	Representação esquemática de um sistema bifásico	30
Figura 2.2	Distribuição percentual das formas de biocatalisadores empregadas nos últimos anos	32
Figura 2.3	Reações mediadas pelo emprego de lipases	33
Figura 2.4	Reciclagem de NADH usando álcool como fonte de hidrogênio para a redução	35
Figura 2.5	Fármacos obtidos a partir de álcoois quirais	37
Figura 2.6	Representação esquemática do ataque à uma carbonila	38
Figura 2.7	Proposta para a biotransformação da <i>orto</i> -flúor-acetofenona	39
Figura 2.8	Estruturas da (<i>R</i>)-(-)-efedrina, (<i>R</i>)-(-)-norefedrina e (<i>R</i>)-(-)-isoproterenol	41
Figura 2.9	Estrutura da akuamidina	45
Figura 2.10	Representação esquemática do sistema para resolução cinética	53
Figura 2.11	Piranoquinonas de interesse farmacológico	62
Figura 2.12	Estruturas do metoprolol e (2 <i>R</i> ,2' <i>S</i>)- β -hidroxihomometoprolol	65
Figura 2.13	Estrutura do ácido pinélico	66
Figura 2.14	Estruturas do curcumeno, curcufenol e do dímero do curcufenol	84
Figura 2.15	Estruturas da (+)-pilocarpina, (+)-isopilocarpina e (+)-pilosina	89
Figura 2.16	Estruturas da turmerona, bisacumol e himachaleno	91
Figura 2.17	Representação do sistema de oxirredução das quinonas	94
Figura 2.18	Naftoquinonas isoladas de <i>T. avellaneda</i>	96
Figura 3.1	Cromatograma da mistura acetofenona e 1-(fenil)etanol	101
Figura 3.2	Cromatograma do racêmico 1-(fenil)etanol	102
Figura 3.3	Cinética de conversão da acetofenona ao empregar a levedura <i>Candida tropicalis</i>	105
Figura 3.4	Cinética de conversão da acetofenona ao empregar a levedura <i>Pichia membranifaciens</i>	105
Figura 3.5	Proposta mecanística para formação de (372)	112
Figura 3.6	Proposta mecanística para formação de (373)	113
Figura 3.7	Proposta mecanística para formação de (374)	113
Figura 3.8	Proposta mecanística para formação de (375)	114

Figura 3.9	Proposta mecanística para formação de (376) a partir de (374)	115
Figura 3.10	Proposta mecanística para formação de (376)	116
Figura 3.11	Separação cromatográfica dos acetatos (\pm)-(378) por CLAE quiral	117
Figura 3.12	Separação cromatográfica dos álcoois (\pm)-(377) por CLAE quiral	117
Figura 3.13	Separação cromatográfica dos álcoois (\pm)-(377) e da cetona (376) por CLAE quiral	118
Figura 4.1	Cromatograma da separação aquiral acetofenona t_R 5,5 min e 1-(fenil)etanol t_R 8,5 min	129
Figura 4.2	Cromatograma da mistura racêmica do 1-(fenil)etanol t_R 10,2 min (<i>S</i>) e t_R 15,4 min (<i>R</i>)	129
Figura 4.3	Cromatograma da separação aquiral 4-metoxiacetofenona t_R 7,3 min e 1-(4-metoxifenil)etanol t_R 8,5 min	130
Figura 4.4	Cromatograma da mistura racêmica do 1-(4-metoxifenil)etanol t_R 13,4 min (<i>S</i>) e t_R 18,7 min (<i>R</i>)	130
Figura 4.5	Cromatograma da separação aquiral 4-isopropilacetofenona t_R 7,4 min e 1-(4-isopropilfenil)etanol t_R 8,0 min	131
Figura 4.6	Cromatograma da mistura racêmica do 1-(4-isopropilfenil)etanol t_R 11,7 min (<i>S</i>) e t_R 12,3 min (<i>R</i>)	131
Figura 4.7	Cromatograma da separação aquiral 4-nitroacetofenona t_R 9,6 min e 1-(4-nitrofenil)etanol t_R 11,8 min	131
Figura 4.8	Cromatograma da mistura racêmica do 1-(4-nitrofenil)etanol t_R 11,7 min (<i>R</i>) e t_R 13,6 min (<i>S</i>)	132
Figura 4.9	Cromatograma da separação aquiral 4-cloroacetofenona t_R 5,0 min e 1-(4-clorofenil)etanol t_R 5,6 min	132
Figura 4.10	Cromatograma da mistura racêmica do 1-(4-clorofenil)etanol t_R 7,5 min (<i>S</i>) and t_R 8,5 min (<i>R</i>)	132
Figura 4.11	Cromatograma da separação aquiral 4-metilacetofenona t_R 5,2 min e 1-(4-metilfenil)etanol t_R 6,6 min	133
Figura 4.12	Cromatograma da mistura racêmica 1-(4-metilfenil)etanol t_R 10,2 min (<i>S</i>) e t_R 12,4 min (<i>R</i>)	133
Figura 4.13	Cromatograma da separação aquiral 3-metoxiacetofenona t_R 5,2	134

	min e 1-(3-metoxifenil)etanol t_R 5,9 min	
Figura 4.14	Cromatograma da mistura racêmica do 1-(3-metoxifenil)etanol t_R 20,1 min (<i>S</i>) e t_R 29,6 min (<i>R</i>)	134
Figura 4.15	Cromatograma da separação aquiral 3-nitroacetofenona t_R 9,5 min e 1-(3-nitrofenil)etanol t_R 11,5 min	134
Figura 4.16	Cromatograma da mistura racêmica do 1-(3-nitrofenil)etanol t_R 12,8 min (<i>S</i>) e t_R 14,2 min (<i>R</i>)	135
Figura 4.17	Cromatograma da separação aquiral 3-bromoacetofenona t_R 5,1 min e 1-(3-bromofenil)etanol t_R 6,9 min	135
Figura 4.18	Cromatograma da mistura racêmica do 1-(2-bromofenil)etanol t_R 10,7 min (<i>S</i>) e t_R 14,6 min (<i>R</i>)	135
Figura 4.19	Cromatograma da separação aquiral 2-metoxiacetofenona t_R 6,4 min e 1-(2-metoxifenil)etanol t_R 7,1 min	136
Figura 4.20	Cromatograma da mistura racêmica do 1-(2-metoxifenil)etanol t_R 10,3 min (<i>S</i>) e t_R 16,8 min (<i>R</i>)	136
Figura 4.21	Cromatograma da separação aquiral 2-nitroacetofenona t_R 8,4 min e 1-(2-nitrofenil)etanol t_R 9,2 min	137
Figura 4.22	Cromatograma do racêmico 1-(2-nitrofenil)etanol t_R 22,1 min (<i>R</i>) e t_R 23,9 min (<i>S</i>)	137
Figura 4.23	Cromatograma da separação aquiral 2'-cloroacetofenona t_R 4,1 min e 2-cloro-1-(fenil)etanol t_R 4,3 min	138
Figura 4.24	Cromatograma da mistura racêmica do 2-cloro-1-(fenil)etanol t_R 13,3 min (<i>R</i>) e t_R 17,7 min (<i>S</i>)	138
Figura 4.25	Cromatograma da separação aquiral 2-cloro-1-(3,4-diclorofenil)etanona t_R 13,6 min e 2-cloro-1-(3,4-diclorofenil)etanol t_R 14,8 min	138
Figura 4.26	Cromatograma da mistura racêmica do 2-cloro-1-(3,4-diclorofenil)etanol t_R 13,1 min (<i>S</i>) t_R e 15,0 min (<i>R</i>)	139
Figura 5.1	Estrutura química do composto (372) - 5-hidroxinaftoquinona	150
Figura 5.2	Espectro de absorção na região do infravermelho do composto (372)	151
Figura 5.3	Espectro de Ressonância Magnética Nuclear de ^1H a 300 MHz em CDCl_3 do composto (372)	151

Figura 5.4	Espectro de Ressonância Magnética Nuclear de ^{13}C a 75 MHz em CDCl_3 do composto (372)	152
Figura 5.5	Espectro de Massa por ESI do composto (372)	152
Figura 5.6	Estrutura química do composto (373) - 2-(dimetilamino)-5-hidroxi-naftoquinona	153
Figura 5.7	Espectro de absorção na região do infravermelho do composto (373)	154
Figura 5.8	Espectro de Ressonância Magnética Nuclear de ^1H a 300 MHz em CDCl_3 do composto (373)	154
Figura 5.9	Espectro de Ressonância Magnética Nuclear de ^{13}C a 75 MHz em CDCl_3 do composto (373)	155
Figura 5.10	Espectro de Massa por ESI do composto (373)	155
Figura 5.11	Estrutura química do composto (374) - 2,5-diidroxí-1,4-naftalenodiona	156
Figura 5.12	Espectro de absorção na região do infravermelho do composto (374)	157
Figura 5.13	Espectro de Ressonância Magnética Nuclear de ^1H a 300 MHz em CDCl_3 do composto (374)	157
Figura 5.14	Espectro de Ressonância Magnética Nuclear de ^{13}C a 75 MHz em CDCl_3 do composto (374)	158
Figura 5.15	Espectro de Massa por ESI do composto (374)	158
Figura 5.16	Estrutura química do composto (375) - 2-acetil-2,3,4,9-tetrahidronafto [2,3- <i>b</i>]furano-4,9-diona	159
Figura 5.17	Espectro de absorção na região do infravermelho do composto (375)	160
Figura 5.18	Espectro de Ressonância Magnética Nuclear de ^1H a 300 MHz em CDCl_3 do composto (375)	160
Figura 5.19	Espectro de Ressonância Magnética Nuclear de ^{13}C a 75 MHz em CDCl_3 do composto (375)	161
Figura 5.20	Espectro de Massa por ESI do composto (375)	161
Figura 5.21	Estrutura química do composto (376) - 2-acetil-4,9-diidronafto[2,3- <i>b</i>]furano-4,9-diona	162
Figura 5.22	Espectro de absorção na região do infravermelho do composto	163

(376)

Figura 5.23	Espectro de Ressonância Magnética Nuclear de ^1H a 300 MHz em CDCl_3 do composto (376)	163
Figura 5.24	Espectro de Ressonância Magnética Nuclear de ^{13}C a 75 MHz em DMSO do composto (376)	164
Figura 5.25	Espectro de Massa por ESI do composto (376)	164
Figura 5.26	Estrutura química do composto (377) - 5-hidroxi-2-(1-hidroxietil)-nafto[2,3- <i>b</i>]furano-4,9-diona	165
Figura 5.27	Espectro de absorção na região do infravermelho do composto (377)	166
Figura 5.28	Espectro de Ressonância Magnética Nuclear de ^1H a 300 MHz em CDCl_3 do composto (377)	166
Figura 5.29	Espectro de Ressonância Magnética Nuclear de ^{13}C a 75 MHz em CDCl_3 do composto (377)	167
Figura 5.30	Espectro de Massa por ESI do composto (377)	167
Figura 5.31	Estrutura química do composto (378) - acetato de 1-(5-hidroxi-4,9-dioxo-4,9-diidronafto[2,3- <i>b</i>]furano-2-il)etila	168
Figura 5.32	Espectro de absorção na região do infravermelho do composto (378)	169
Figura 5.33	Espectro de Ressonância Magnética Nuclear de ^1H a 300 MHz em CDCl_3 do composto (378)	169
Figura 5.34	Espectro de Ressonância Magnética Nuclear de ^{13}C a 75 MHz em CDCl_3 do composto (378)	170
Figura 5.35	Espectro de Massa por ESI do composto (378)	170
Figura 5.36	Estrutura química do composto (379) - (<i>S</i>)-1-(fenil)etanol	171
Figura 5.37	Espectro de Ressonância Magnética Nuclear de ^1H a 300 MHz em CDCl_3 do composto (379)	172
Figura 5.38	Espectro de Ressonância Magnética Nuclear de ^{13}C a 75 MHz em CDCl_3 do composto (379)	172
Figura 5.39	Estrutura química do composto (380) - (<i>S</i>)-1-(2-nitrofenil)etanol	173
Figura 5.40	Espectro de Ressonância Magnética Nuclear de ^1H a 300 MHz em CDCl_3 do composto (380)	174
Figura 5.41	Espectro de Ressonância Magnética Nuclear de ^{13}C a 75 MHz	174

	em CDCl ₃ do composto (380)	
Figura 5.42	Estrutura química do composto (381) - (<i>S</i>)-1-(3-nitrofenil)etanol	175
Figura 5.43	Espectro de Ressonância Magnética Nuclear de ¹ H a 300 MHz em CDCl ₃ do composto (381)	176
Figura 5.44	Espectro de Ressonância Magnética Nuclear de ¹³ C a 75 MHz em CDCl ₃ do composto (381)	176
Figura 5.45	Estrutura química do composto (382) - (<i>S</i>)-1-(4-nitrofenil)etanol	177
Figura 5.46	Espectro de Ressonância Magnética Nuclear de ¹ H a 300 MHz em CDCl ₃ do composto (382)	178
Figura 5.47	Espectro de Ressonância Magnética Nuclear de ¹³ C a 75 MHz em CDCl ₃ do composto (382)	178
Figura 5.48	Estrutura química do composto (383) - (<i>S</i>)-1-(2-metoxifenil)etanol	179
Figura 5.49	Espectro de Ressonância Magnética Nuclear de ¹ H a 300 MHz em CDCl ₃ do composto (383)	180
Figura 5.50	Espectro de Ressonância Magnética Nuclear de ¹³ C a 75 MHz em CDCl ₃ do composto (383)	180
Figura 5.51	Estrutura química do composto (384) - (<i>S</i>)-1-(3-metoxifenil)etanol	181
Figura 5.52	Espectro de Ressonância Magnética Nuclear de ¹ H a 300 MHz em CDCl ₃ do composto (384)	182
Figura 5.53	Espectro de Ressonância Magnética Nuclear de ¹³ C a 75 MHz em CDCl ₃ do composto (384)	182
Figura 5.54	Estrutura química do composto (385) - (<i>S</i>)-1-(4-metoxifenil)etanol	183
Figura 5.55	Espectro de Ressonância Magnética Nuclear de ¹ H a 300 MHz em CDCl ₃ do composto (385)	184
Figura 5.56	Espectro de Ressonância Magnética Nuclear de ¹³ C a 75 MHz em CDCl ₃ do composto (385)	184
Figura 5.57	Estrutura química do composto (386) - (<i>S</i>)-1-(4-clorofenil)etanol	185
Figura 5.58	Espectro de Ressonância Magnética Nuclear de ¹ H a 300 MHz em CDCl ₃ do composto (386)	186
Figura 5.59	Espectro de Ressonância Magnética Nuclear de ¹³ C a 75 MHz	186

	em CDCl ₃ do composto (386)	
Figura 5.60	Estrutura química do composto (387) - (<i>R</i>)-2-cloro-1-(fenil)etanol	187
Figura 5.61	Espectro de Ressonância Magnética Nuclear de ¹ H a 300 MHz em CDCl ₃ do composto (387)	188
Figura 5.62	Espectro de Ressonância Magnética Nuclear de ¹³ C a 75 MHz em CDCl ₃ do composto (387)	188
Figura 5.63	Estrutura química do composto (388) - (<i>R</i>)-2-cloro-1-(3,4-diclorofenil)etanol	189
Figura 5.64	Espectro de Ressonância Magnética Nuclear de ¹ H a 300 MHz em CDCl ₃ do composto (388)	190
Figura 5.65	Espectro de Ressonância Magnética Nuclear de ¹³ C a 75 MHz em CDCl ₃ do composto (388)	190
Figura 5.66	Estrutura química do composto (389) - (<i>S</i>)-1-(4-metilfenil)etanol	191
Figura 5.67	Espectro de Ressonância Magnética Nuclear de ¹ H a 300 MHz em CDCl ₃ do composto (389)	192
Figura 5.68	Espectro de Ressonância Magnética Nuclear de ¹³ C a 75 MHz em CDCl ₃ do composto (389)	192
Figura 5.69	Estrutura química do composto (390) - (<i>S</i>)-1-(4-isopropilfenil)etanol	193
Figura 5.70	Espectro de Ressonância Magnética Nuclear de ¹ H a 300 MHz em CDCl ₃ do composto (390)	194
Figura 5.71	Espectro de Ressonância Magnética Nuclear de ¹³ C a 75 MHz em CDCl ₃ do composto (390)	194

LISTA DE TABELAS		PÁG.
Tabela 1	Biorredução das cetonas 11–15 por <i>Rhodothorula glutinis</i>	42
Tabela 2	Microrganismos empregados para biorredução do ácido fenilglioxílico (16)	43
Tabela 3	Seleção da cepa <i>A. alternata</i> para biorredução da acetofenona	46
Tabela 4	Emprego de <i>S. cerevisiae</i> na redução de heteroarilcetonas	49
Tabela 5	Transesterificação do 2-cloro-1-(2-furil)etanol (95) catalisada por lipase	59
Tabela 6	Emprego da lipase CAL-B para resolução cinética dos álcoois alílicos do ESQUEMA 16	61
Tabela 7	Rendimentos isolados dos álcoois obtidos e eluentes utilizados na purificação	101
Tabela 8	Resultados preliminares obtidos da biorredução da acetofenona empregando leveduras em crescimento como agentes biocatalíticos	104
Tabela 9	Resultados obtidos utilizando a levedura <i>Candida tropicalis</i> em biorreduções de cetonas aromáticas após nove dias de reação	106
Tabela 10	Resultados obtidos utilizando a levedura <i>Pichia membranifaciens</i> em biorreduções de cetonas aromáticas após oito dias de reação	107
Tabela 11	Comparação da rotação óptica específica dos álcoois obtidos com valores da literatura	109
Tabela 12	Biorredução da cetona (376) empregando ADHs comerciais	119
Tabela 13	Resultados otimizados empregando as ADHs comerciais A, RS1 e LB	119
Tabela 14	Resultados obtidos utilizando as lipases CAL-B e PSC I	121

LISTA DE ABREVIATURAS

- ADH A – Álcool desidrogenase de *Rhodococcus ruber*
ADH CP – Álcool desidrogenase de *Candida parapsilosis*
ADH LB – Álcool desidrogenase de *Lactobacillus brevis*
ADH RS1 – Álcool desidrogenase de *Rhodococcus* sp.
ADH T – Álcool desidrogenase de *Thermoanaerobacter* sp.
BD – Meio de Cultura Batata-Dextrose
BOC – *tert*-butiloxicarbonil
BSA – bis(trimetilsilil)acetamida
CAL-B – Lipase de *Candida Antarctica* B (LCA)
CAN – Nitrato cérico de amônio $(\text{NH}_4)_2\text{Ce}(\text{NO}_3)_6$
CCD – Cromatografia em Camada Delgada
CCL – Lipase de *Candida cylindracea*
CLAE – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CG – Cromatografia Gasosa
CBZ – Carbobenziloxi
CRL – Lipase de *Candida rugosa*
CSA – Ácido canfor sulfônico
DBU – 1,8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-eno
DCC – 1,3-Dicicloexilcarbodiimida
DCM – Diclorometano
DDQ – 2,3-Dicloro-5,6-diciano-1,4-benzoquinona
DEAD – Azodicarboxilato de dietila
DIAD – Azodicarboxilato de diisopropila
DIPE – Éter Diisopropílico
DMAP – 4-Dimetilaminopiridina
DMF – Dimetilformamida
DMP – Dimetoxipropano
DMSO – Dimetilsulfóxido
ee – excesso enantiomérico
EM – Espectrometria de Massas
J – Constante de Acoplamento
LDA – Diisopropilamida de lítio
McCl – Clorometanosulfonila

MML – Lipase de *Mucor meihei*
NAD – Nicotinamida adenina dinucleotídeo
NADPH – Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
NBS – N-Bromo-succinimida
NMO – Óxido de N-metil-morfolina
NMM – N-metil-morfolina
IV – Infravermelho
PMB – *p*-metoxibenzila
PCC – Clorocromato de piridínio
PDC – Dicromato de piridínio
PHMS – Poli(metilhidrosilano)
PIFA – bis(trifluoracetato)iodobenzeno
PLE – Esterase de fígado de porco
PPTS – *p*-tolueno-sulfonato de piridínio
PPL – Lipase de pâncreas de porco
PTSA – Ácido *p*-toluenosulfônico
PS-C – Lipase de *Pseudomonas cepacia* imobilizada em partículas de cerâmica
PS-D – Lipase de *Pseudomonas cepacia* imobilizada em partículas de diatomácea
RCM – Ring Closing Metathesis (Metátese de fechamento de anel)
RED-Al – Hidreto bis-(2-metoxietoxi) alumínio de sódio
RMN ¹³C – Ressonância Magnética Nuclear de Carbono 13
RMN ¹H – Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio 1
TBAI – Iodeto de tetrabutílamônio
TBAF – Fluoreto de tetrabutílamônio
TBDPSCI – Cloreto de *t*-butildifenilsilila
TBDMSCI – Cloreto de *t*-butildimetilsilila
TDSCI – Cloreto de *t*-butildimetilsilila
TMS – trimetilsilila
TEA – Trietilamina
TFA – Ácido trifluor acético
THF –Tetrahydrofurano
TPP – Trifenilfosfina
Tsdpen – N-(*p*-toluenosulfonil)-1,2-difeniletanodiamina
Msdpen – N-(metanosulfonil)-1,2-difeniletanodiamina

Capítulo 1

Introdução

1. INTRODUÇÃO

Nos últimos anos houve um aumento na demanda por processos envolvendo a produção de compostos quirais como um único enantiômero. A única e importante razão na qual se almeja a produção de um produto enantiomericamente puro é a sua diferença na atividade biológica para cada enantiômero. Devido a esta necessidade, a produção global de drogas quirais tem um acréscimo de 13% a cada ano envolvendo um montante de 133 bilhões de dólares. (GOTOR, 2002).

A utilização de intermediários quirais na síntese de fármacos tem tornado os processos biocatalíticos de elevada relevância, pois, mesmo apesar dos desenvolvimentos da Química Orgânica tradicional há ainda desafios a serem superados quanto à obtenção de compostos quirais com elevada pureza ótica e bons rendimentos. A síntese tradicional requer um número de passos indesejáveis, os quais tendem a reduzir os rendimentos, além de o custo ser elevado. (HANSON, 1997).

Neste contexto, a biocatálise tem sido empregada como um método eficiente no preparo de fármacos, e comparativamente aos catalisadores químicos possui a vantagem de não ser ecologicamente agressiva. Portanto, em alguns casos pode-se empregar uma metodologia estratégica envolvendo etapas químicas e enzimáticas. As enzimas nestes processos podem ser empregadas em sua forma isolada ou imobilizada obtidas comercialmente ou ainda em sistemas que sejam produtores das enzimas pelo uso de células íntegras de microrganismos ou vegetais. Há ainda a possibilidade de se empregar solventes orgânicos ou aquosos. (FABER, 2000).

Este trabalho relata o emprego de biocatalisadores para obtenção de compostos enantiomericamente puros através da metodologia da redução de cetonas pró-quirais ou resolução de racematos. A primeira parte deste trabalho relata o emprego de microrganismos como fontes enzimáticas a serem empregadas como biocatalisadores na redução da acetofenona e compostos derivados como parte da experiência que o grupo de pesquisa vem acumulando. Os produtos obtidos são álcoois quirais e podem ser empregados como blocos de construção na preparação de moléculas mais complexas. Ressalta-se que estas fontes enzimáticas são de origem microbiana e, por serem regionais, contribuem para o desenvolvimento científico e tecnológico local, sobretudo do Nordeste do Brasil.

Na segunda parte do trabalho, relatamos o emprego de lipases e álcool desidrogenases para preparação de uma quinona com atividade citotóxica. Este trabalho foi desenvolvido no laboratório de Biorgânica da Universidade de Oviedo - Espanha como parte um programa de colaboração acadêmica entre dois grupos de investigação no sub-campo da Química Orgânica, a Biocatálise.

Esta tese encontra-se dividida em sete capítulos: (1) Introdução, (2) Revisão Bibliográfica contemplando os itens (2.1) Enzimas Como Biotacalisadores, (2.2) Síntese Assimétrica e (2.3) Quinonas Como Agentes Terapêuticos, (3) Resultados e Discussão, (4) Parte Experimental, (5) Dados Espectroscópicos, (6) Conclusão, (7) Referências Bibliográficas e (8) Anexo.

Objetivos:

- Selecionar cepas de microrganismos (leveduras) para biorredução de compostos carbonílicos e aperfeiçoar condições para obtenção de altos valores de conversão e enantiosseletividade de álcoois quirais;
- Preparar quimicamente uma quinona com alta pureza enantiomérica empregando lipases ou álcool desidrogenases para as etapas chave de criação do centro estereogênico.

A digitação desta tese está de acordo com as normas para apresentação de trabalhos acadêmicos da Universidade Federal do Ceará (MELO *et al.*, 2007).

Capítulo 2

Revisão Bibliográfica

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. ENZIMAS COMO BIOCATALISADORES

2.1.1. Enzimas

Enzimas, quimicamente, são moléculas de alta complexidade molecular e estrutural, formadas por vários fragmentos de aminoácidos, sendo, portanto classificadas como proteínas. Do ponto de vista da biocatálise, são catalisadores biológicos que aumentam a velocidade das reações químicas que ocorrem nas células e organismos sem alteração de sua estrutura química. Cada enzima tem um caráter específico isto é, atua sobre um determinado substrato convertendo-o num determinado produto. As enzimas, como catalisadores biológicos apresentam diversas vantagens relevantes quando comparadas aos catalisadores químicos, pois são regio-, quimio-, e estereosseletivas conduzindo à formação de produtos enantiomericamente puros. Estes biocatalisadores são também eficientes do ponto de vista energético, pois operam a temperaturas moderadas e pHs brandos. (FABER, 2000).

A atividade enzimática depende de uma complexidade de fatores: a) da natureza do substrato: a substituição de um substrato por outros similares acarretará mudanças na velocidade da reação; b) cofatores: a enzima pode requerer a presença de cofatores, dependendo do caso o cofator pode ser orgânico ou inorgânico; c) natureza do solvente: a enzima pode ser inativada quando na presença de solventes orgânicos; d) pH: cada enzima tem um pH característico ou faixa na qual atua com a máxima eficiência; e) temperatura: a temperatura condiciona a velocidade da reação como em qualquer outro processo químico, a temperaturas elevadas as enzimas tendem a sofrer desnaturação. (FABER, 2000).

As enzimas que atuam em meio não aquoso tem sido largamente empregadas para a resolução de álcoois, ácidos ou lactonas por meio de reações de transesterificação usando enzimas hidrolíticas especialmente lipases. Estima-se que aproximadamente 90% do vasto número de enzimas ainda deve ser descoberta e usada. Contudo, somente uma pequena fração de enzimas já estudadas, cerca de 300, é comercialmente disponível. Atualmente são conhecidas milhares de enzimas diferentes e não seria viável o uso de nomes exclusivos para a sua identificação. Em 1961, a Comissão para Enzimas (Enzyme Commission – EC) da União Internacional de Bioquímica (IUB) estabeleceu

uma classificação e nomenclatura de enzimas. A EC dividiu as enzimas em seis classes, de acordo com a reação catalisada. As enzimas possuem como identificação um número de quatro dígitos 1, 2, 3 e 4, os quais indicam, respectivamente, o tipo de reação, o substrato ou tipo de molécula transferida, a natureza do co-substrato e o número individual da enzima. Por exemplo, a enzima 1.1.1.1 é uma oxidoreductase que catalisa a oxidação reversível do etanol ao acetaldeído com concomitante redução do cofator NADH. (FABER, 2000).

As enzimas hidrolíticas ou hidrolases possuem larga aplicação em sínteses quirais em solventes orgânicos e compreendem um percentual de 65% quando comparada às outras classes de enzimas. São enzimas com alta especificidade, comercialmente disponíveis e não requerem o uso de cofatores. Em segundo lugar encontram-se as enzimas do tipo oxidoreductases com 25%. Finalmente, há mais quatro classes de enzimas com menores percentuais de aplicação: liases (5%), transferases (5%), ligases (1%), e isomerases (1%). (GOTOR, 2002).

2.1.2. Vantagens e desvantagens das enzimas como biocatalisadores

As velocidades das reações mediadas por enzimas são aceleradas, quando comparadas àquelas não enzimaticamente correspondentes. Aceleram de 10^8 a 10^{10} vezes podendo exceder em alguns casos a até 10^{12} vezes. Tais valores são alcançados por catalisadores químicos em concentrações de 0,1 a 1%, enquanto que os catalisadores enzimáticos operam em concentrações de 10^{-3} a 10^{-4} %. (HANSON, 1997; FABER, 2000).

Diferentemente dos catalisadores convencionais, os quais são majoritariamente metais, as enzimas são completamente degradáveis pelo meio. As enzimas agem em pHs neutros e temperaturas brandas, reduzindo o risco de decomposição, isomerização, rearranjos e outros problemas ocorridos com o substrato ou o produto em metodologias convencionais. (HANSON, 1997; FABER, 2000).

Uma vez que as enzimas atuam nas mesmas condições, diversas reações biocatalíticas podem ser conduzidas como reações em cascata, num mesmo meio reacional. Estas reações seqüenciais são processadas por sistemas multienzimáticos com o objetivo de simplificar o processo global. (HANSON, 1997; FABER, 2000).

As enzimas são capazes de induzir a quiralidade dos compostos com desejável enantiosseletividade, porém, é impossível inverter a indução de um dado sistema enzimático. Diferentemente, com catalisadores químicos quirais pode-se inverter a enantiosseletividade. (HANSON, 1997; FABER, 2000).

A vantagem de se trabalhar em condições suaves pode se transformar em prejuízo para casos particulares, pois temperaturas elevadas, valores extremos de pH e ainda concentrações salinas elevadas tendem à desnaturação protéica (HANSON, 1997).

A água é o solvente mais apropriado para as reações biocatalíticas, porém a maioria dos compostos orgânicos são pouco solúveis no referido solvente. Conseqüentemente, a mudança do meio aquoso para o orgânico seria a alternativa mais viável, mas tal mudança pode acarretar na perda da atividade enzimática. Uma vez que as reações biocatalíticas são realizadas em meio aquoso, o problema da baixa solubilidade de inúmeros substratos é resolvido utilizando uma membrana de contato entre os meios orgânico e aquoso, permitindo que a enzima permaneça ativa e tão logo que o produto seja formado, seja deslocado para a fase orgânica (**Figura 2.1**). (FABER, 2000)

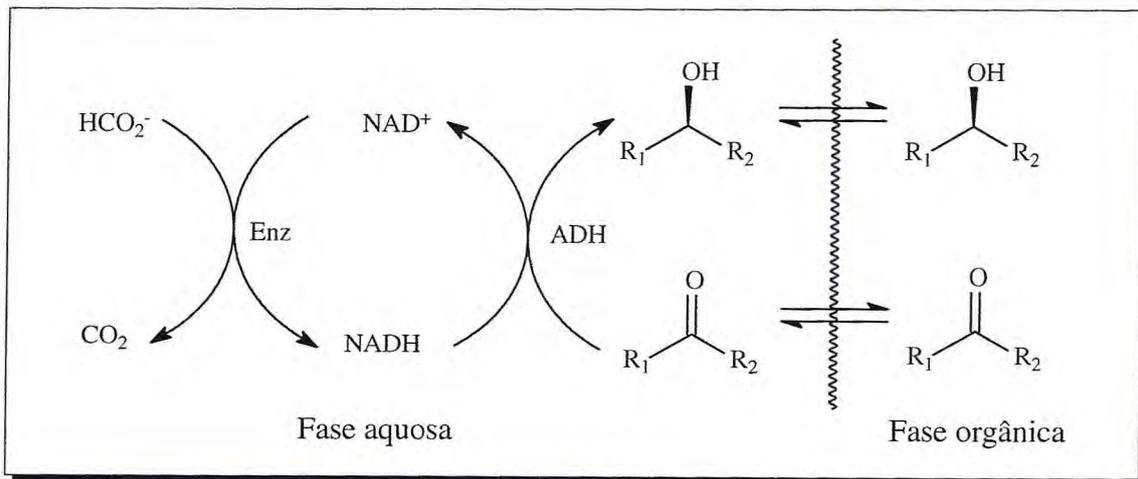


Figura 2.1 - Representação esquemática de um sistema bifásico

2.1.3. Enzimas isoladas *versus* sistemas de células íntegras

O uso de enzimas sejam elas em sua forma isolada, impura ou pura, ou na forma de células íntegras de origem animal, vegetal ou de microrganismos depende de alguns fatores preponderantes:

- (i) o tipo de reação;
- (ii) se há a necessidade de se renovar os cofatores;
- (iii) a escala na qual as biotransformações são realizadas.

O emprego de células íntegras comumente exhibe como vantagens o baixo custo e a presença de cofatores produzidos na própria célula e como desvantagens o fato de requerer um grande controle microbiológico e a quantidade de água no sistema reacional é excessiva. No caso da utilização de enzimas isoladas, os processos, geralmente são mais fáceis de controlar e monitorar, produzem apenas a reação desejada e o sistema é tolerante, em alguns casos, ao uso de solventes orgânicos, entretanto são de alto custo e ainda requerem, em alguns casos, a adição do cofator. (LABES; WHENDHAUSEN, 2008).

2.1.4. Emprego de microrganismos em biocatálise

A estereosseletividade de um biocatalisador, que é a sua principal característica, nem sempre é satisfatória para uso prático. Realizar a seleção ou “*screening*” de uma determinada enzima é um método clássico e ainda o melhor para identificar o sistema adequado para a biotransformação. As fontes enzimáticas usadas para biotransformação podem ser obtidas de microrganismos, animais ou plantas. A enantiosseletividade de uma biorredução, por exemplo, pode ser controlada modificando o substrato pelo fato de sua estrutura influenciar a natureza estereosseletiva de uma enzima. (GOTOR; ALFONSO; GARCIA-URDIALES, 2008).

Enzimas microbianas são frequentemente mais úteis que enzimas derivadas de plantas ou animais, pois possuem uma grande variedade de atividades catabólicas disponível, facilidade de manipulação genética, fornecimento de biomassa regular devido à inexistência de ciclos sazonais e rápido crescimento em meios que são, na maioria dos casos, de baixo custo. Embora haja um interesse muito grande no emprego de microrganismos com propósitos sintéticos em Química Orgânica, somente 2% do

total da microbiota é empregada como fontes enzimáticas. (HASAN; SHAH; HAMEED, 2006).

Ilustrativamente, o gráfico da **Figura 2.2** exibe um percentual aproximado das formas de biocatalisadores mais empregados na literatura nos últimos anos. (CARVALHO; FONSECA, 2006)

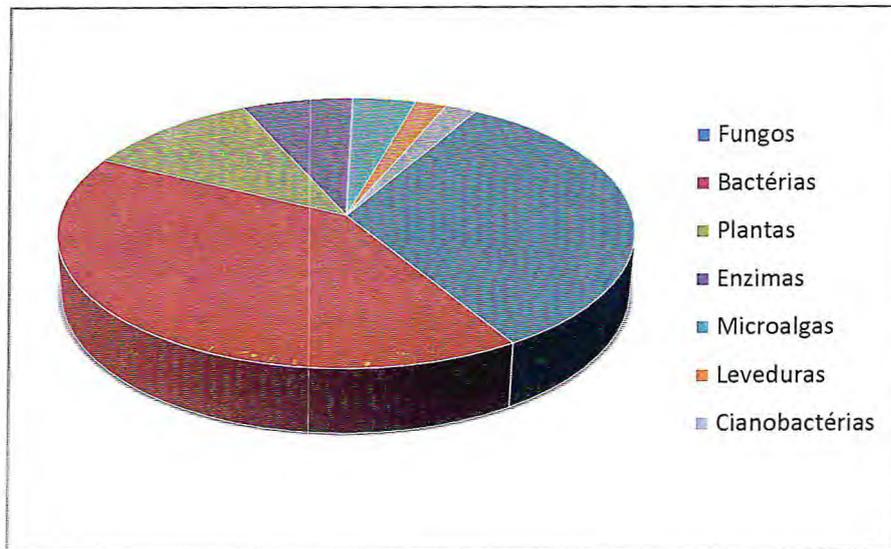


Figura 2.2 - Distribuição percentual das formas de biocatalisadores empregadas nos últimos anos

2.1.5. Lipases

As lipases (E.C. 3.1.1.3) são enzimas hidrolíticas presentes em diversos organismos, incluindo animais, plantas, fungos e bactérias. Em seu ambiente natural, estas enzimas possuem a função de catalisar a hidrólise de triacilgliceróis aos ácidos graxos correspondentes e glicerol. Além das funções metabólicas, as lipases possuem um papel importante em biotecnologia, principalmente na indústria do óleo e dos alimentos, e em síntese orgânica, na preparação de compostos enantiomericamente puros. (FABER, 2000).

As lipases são estáveis em solventes orgânicos, não requerem o uso de cofatores, possuem atividade frente a uma grande variedade de substratos e possuem alta enantiosseletividade. A união de todos estes fatores tornam as lipases como uma das sub-classes enzimáticas com um maior número de aplicações. (FESSNER; ANTHONSEN, 2008).

As lipases em meio não aquoso são úteis para resolução de álcoois, ácidos, ésteres ou lactonas empregando reações de transesterificação, assim como acilações regiosseletivas de compostos polihidroxilados e a preparação de aminoácidos enantiopuros. Processos como acilação de amins são úteis para a preparação de amidas através da resolução de amins. Como exemplo de outros processos empregando lipases pode-se citar a transesterificação, aminólises, amonólises, hidrazinólises e per-hidrólise de ésteres, nos quais o nucleófilo é substituído por um álcool, amina, amônia, hidrazina ou hidroperóxido (**Figura 2.3**). O doador acila mais apropriado depende do nucleófilo usado. No caso de resoluções de álcoois o acetato de vinila é o mais empregado, por outro lado o acetato de etila é mais empregado na resolução cinética de amins, ambos podem agir como doador de acila e solventes. (GOTOR, 2002).

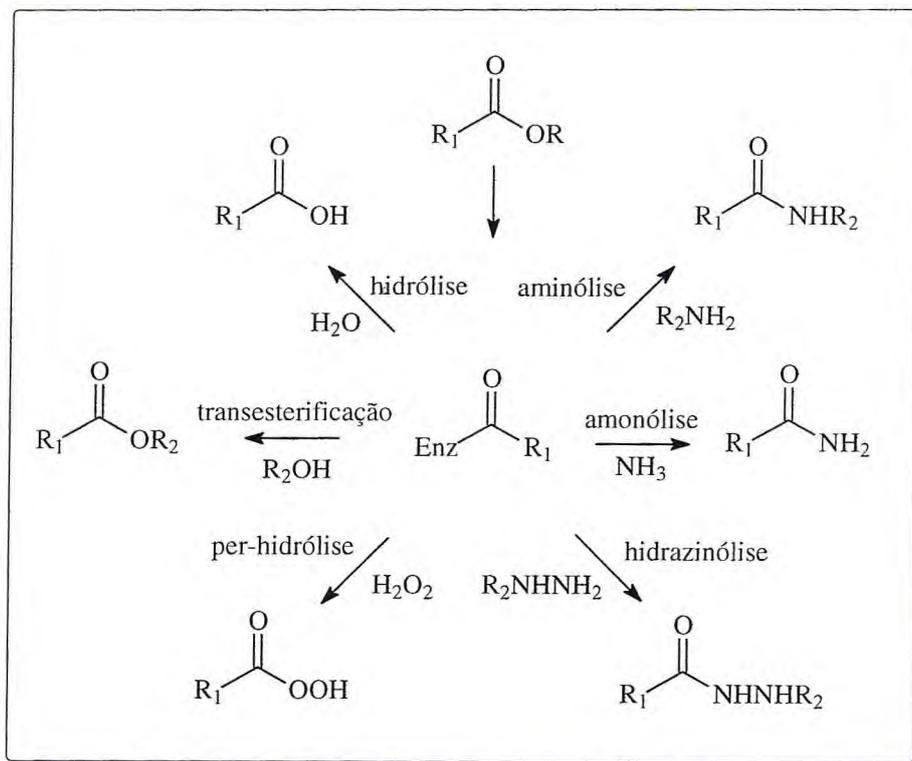


Figura 2.3 - Reações mediadas pelo emprego de lipases

O uso de solventes orgânicos é especialmente vantajoso na transformação de substratos que são praticamente insolúveis em água. Além disso, na ausência de água a síntese de ésteres e amidas por hidrolases (principalmente lipases ou proteases) podem ser favorecidas sobre hidrólises e outras reações paralelas. Variando o solvente orgânico é possível controlar a regio- e enantiosseletividade de uma determinada enzima. Por outro lado, embora as enzimas em meio orgânico exibam numerosas vantagens, sua

eficiência catalítica é, na maioria dos casos, mais baixa que em meio aquoso. Este comportamento pode ser explicado por diversos fatores como a concentração saturada do substrato, baixa estabilização do estado de transição do complexo enzimático, flexibilidade restrita e ainda distorção da enzima. (FESSNER; ANTHONSEN, 2008).

2.1.6. Oxidoreduções

Oxidoreduções são todas as enzimas que catalisam reações de oxidação-redução. São classificadas em sub-classes pois atuam em diferentes grupos doadores ou aceptores. As enzimas empregadas em reações do tipo redox são classificadas em três categorias: álcool desidrogenases, oxigenases e oxidases. O nome recomendado é desidrogenase, mas, redutase também pode ser empregado. Oxidase somente é empregado quando o oxigênio é usado comoceptor e como exemplo pode-se citar as Baeyer-Villiger monoxigenases. As oxidases atuam na introdução radicalar do oxigênio à cadeias carbônicas. Este grupo de enzimas são empregadas na redução de carbonilas de aldeídos ou cetonas e ligações duplas de carbono-carbono. (AEHLE, 2004)

A redução é uma das mais importantes, fundamentais e práticas reações para formação de compostos quirais. Após a redução de cetonas para formação de álcoois quirais os mesmos podem ser transformados quimicamente em diversas funcionalidades e desta maneira sintetizar moléculas de grande interesse farmacêutico e áreas afins. O catalisador para a redução assimétrica pode ser classificado em duas categorias, a química e a biológica, cada uma delas possuindo suas próprias peculiaridades o que nos permite desenvolver a melhor metodologia dependendo do catalisador empregado. (GOTOR; ALFONSO; GARCIA-URDIALES, 2008)

As enzimas desta classe usadas para redução de cetonas e oxidação de álcoois requerem o uso de cofatores, tais como NADH e NADPH. Como consequência, estes devem ser adicionados em excesso para permitir que o equilíbrio seja deslocado para a direção desejada. Uma das alternativas consiste em reciclar estes cofatores, de modo que uma segunda reação enzimática aconteça concomitantemente e que esta seja preferencialmente irreversível (**Figura 2.4**).

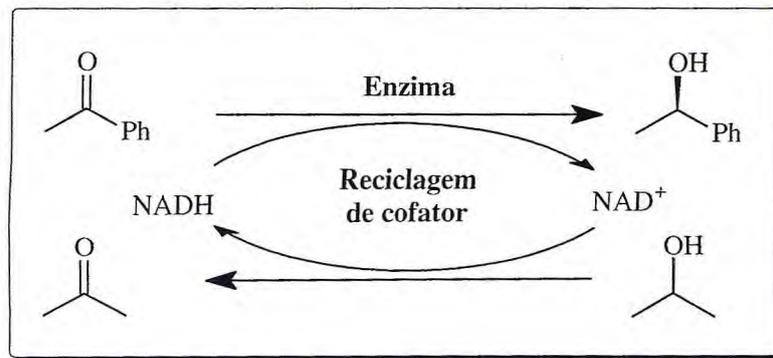


Figura 2.4 - Reciclagem de NADH usando álcool como fonte de hidrogênio para a redução

2.1.7. Fonte de hidrogênio para regeneração da coenzima

As enzimas que reduzem compostos carbonílicos geralmente necessitam de uma coenzima com a qual um hidreto é transferido para o átomo de carbono carbonílico. Uma vez que a redução do substrato está diretamente relacionada com a oxidação da coenzima e esta por sua vez possui custo elevado faz-se necessário a reciclagem e reutilização da forma oxidada da coenzima. Para que a forma oxidada da coenzima seja transformada em sua forma reduzida geralmente faz-se necessária a adição de um agente regenerador como fonte de hidrogênio. Para reduções biocatalíticas são empregados álcoois como o etanol e 2-propanol; açúcares como a glicose, glicose-6-fosfato, glicose-6-sulfato; ácido fórmico e o hidrogênio molecular. (GOTOR; ALFONSO; GARCIA-URDIALES, 2008)

O uso de enzimas puras implica no alto custo do cofator que está na faixa de US\$ 500 por mL de NADH a US\$ 200.000 por mL de NADPH. A alternativa neste caso é o emprego de fontes enzimáticas vegetais ou microbianas, neste caso o cofator encontra-se presente no sistema enzimático. (LABES; WHENDHAUSEN, 2008).

2.2. SÍNTESE ASSIMÉTRICA

2.2.1. Metodologias para desenvolvimento de moléculas quirais

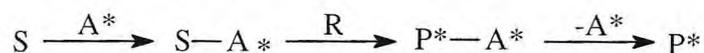
A necessidade em se produzir moléculas com atividade biológica como um enantiômero impulsionou o desenvolvimento de uma área dentro da Química Orgânica sintética. Dois enantiômeros podem apresentar ações diferenciadas sobre os organismos vivos, levando a diferentes sabores, odores, toxicidades e ações biológicas. Muitos medicamentos que anteriormente eram comercializados como racematos são hoje produzidos como um único enantiômero. A Síntese Orgânica Assimétrica amplia os conhecimentos da Química Orgânica tradicional e objetiva a formação de compostos quirais durante uma de suas etapas. (MACKIE; SMITH, 1982)

Para fins didáticos os métodos empregados para desenvolvimento de um composto quiral são divididos em quatro grupos: 1ª, 2ª, 3ª e 4ª metodologia.

- 1ª metodologia: A molécula a ser transformada possui um centro assimétrico definido, esta assimetria induz a formação de um ou mais novos centros. Porém, nem sempre a natureza produz moléculas com elevada pureza ótica, o que torna esta metodologia inviável em alguns casos.



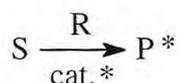
- 2ª metodologia: Esta metodologia propõe a utilização de um auxiliar quiral que é temporariamente incorporado ao substrato. Porém, possui como desvantagem ser economicamente inviável, pois neste caso há mais dois passos na síntese, a adição e a remoção do auxiliar quiral.



- 3ª metodologia: Este grupo compreende o emprego de um substrato pró-quiral, o qual é convertido em um composto assimétrico pelo uso de um reagente quiral através de uma reação enantiosseletiva.



- 4ª metodologia: Neste caso há o desenvolvimento da assimetria do substrato pró-quiral empregando quantidades catalíticas do agente quiral. Neste caso podem ser empregados os catalisadores químicos (organometálicos) ou os biológicos (enzimas isoladas, células íntegras de origem microbiana ou vegetal).



2.2.2. Álcoois quirais - os blocos de construção da química orgânica assimétrica

Dentre as metodologias para a produção de substâncias enantiomericamente puras, dois métodos são dignos de destaque empregando biocatalisadores: a resolução cinética de racematos mediada por lipases e o emprego de álcool desidrogenases para redução de cetonas pró-quirais. Em ambos os casos um alvo bastante comum são os álcoois quirais, compostos de grande interesse para as indústrias farmacêuticas. Há diversos relatos de álcoois quirais com propriedades biológicas, ou como blocos na construção de fármacos. A **Figura 2.5** ilustra alguns álcoois quirais utilizados na síntese de compostos biologicamente ativos. Os álcoois (1), (3) e (5) são utilizados como blocos de construção na síntese das drogas sertralina, nifenalol e (*S*)-propranolol, respectivamente. (KAMAL; SANDBHOR; SHAIK, 2004; RODRIGUES *et al.*, 2004).

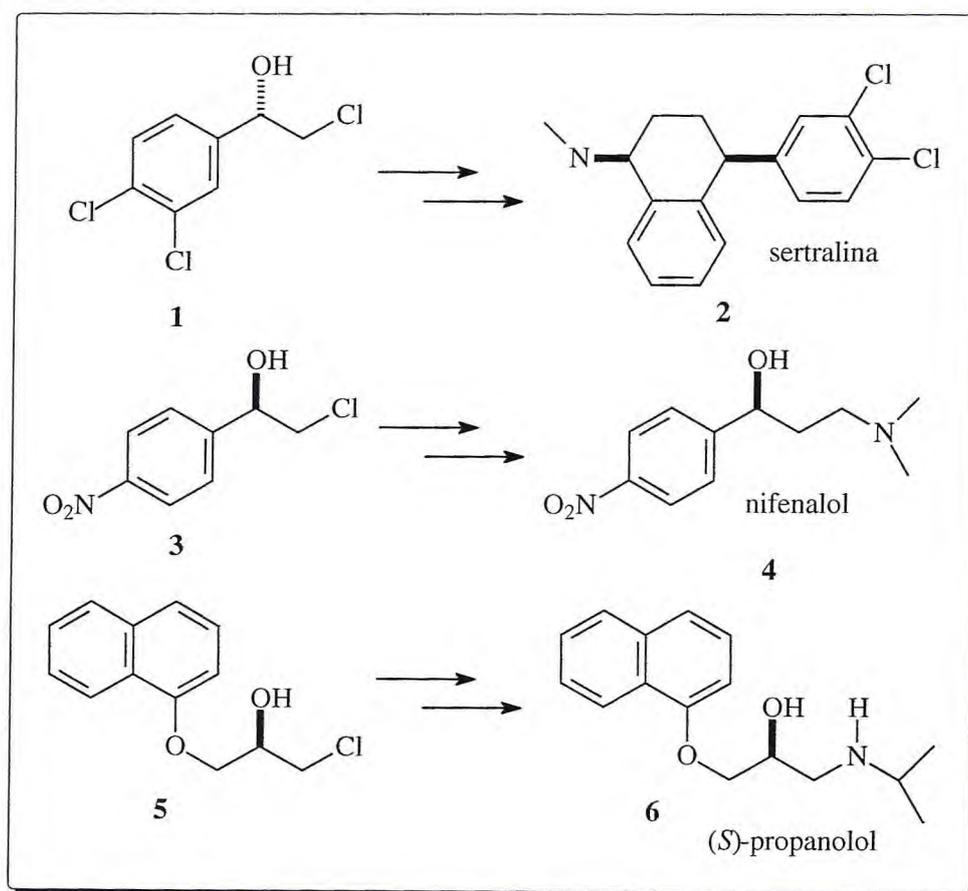


Figura 2.5 - Fármacos obtidos a partir de álcoois quirais

2.2.3. Regra de Prelog

As cetonas podem ser reduzidas estereosseletivamente usando álcool desidrogenases para gerar álcoois quirais. Durante o decorrer da reação, a enzima fornece hidreto preferencialmente para uma das faces da cetona, *re* ou *si* os quais geram, respectivamente os álcoois *S* e *R*. Para a maioria dos casos, o curso estereoquímico da reação pode ser predefinido como sendo *re* a face receptora do hidreto (**Figura 2.6**).

Embora a regra de Prelog declare que preferencialmente seja *re* a face da carbonila para introdução do hidreto, há relatos a respeito da disponibilidade de álcool desidrogenases com atividade anti-Prelog. Comercialmente disponíveis com especificidade de acordo com a regra de Prelog pode-se citar as álcool desidrogenases de *Saccharomyces cerevisiae*, de fígado de cavalo e de *Thermoanaerobium brockii*, para anti-Prelog a ADH de *Lactobacillus kefir*. (FABER, 2000).

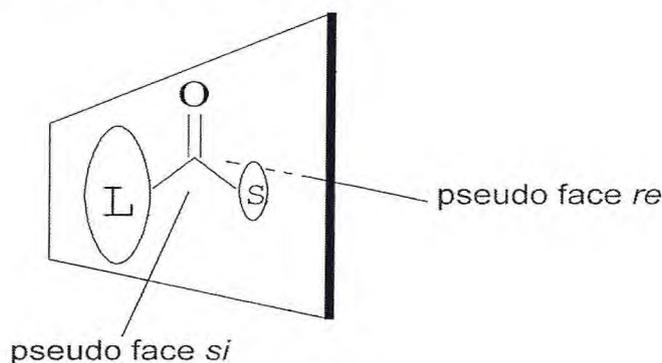


Figura 2.6 - Representação esquemática do ataque à uma carbonila

2.2.4. Emprego de agentes biocatalíticos para obtenção de álcoois quirais através da redução de cetonas pró-quirais

Em um estudo envolvendo biorredução de acetofenonas, Comasseto e colaboradores empregaram células íntegras de *Aspergillus terreus* CCT3320, *Aspergillus terreus* CCT4083 e *Rhizopus oryzae* CCT 4964 na obtenção de álcoois quirais. (COMASSETO *et al.*, 2003).

Foram utilizados como substratos acetofenonas contendo flúor como substituintes no anel aromático. A conversão da *orto*-flúor-acetofenona em seu álcool correspondente por *Aspergillus terreus* CCT3320 e *Aspergillus terreus* CCT 4083 proporcionou um resultado diferenciado das demais acetofenonas. Observou-se que há um aumento nos valores de conversão e decréscimo nos excessos enantioméricos ao proporcionar longos tempos reacionais. Em três dias de reação *A. terreus* CCT 3320

formou o enantiômero *S* com 63% de conversão e 53% de excesso enantiomérico, a partir do sétimo dia de reação o *ee* encontrava-se a favor do enantiômero *R*, obtendo-se 98% de conversão e 72% de *ee* no décimo sétimo dia. Este comportamento sugere que há oxidação do enantiômero *S* formado, enquanto que a formação de *R* é irreversível (Figura 2.7).

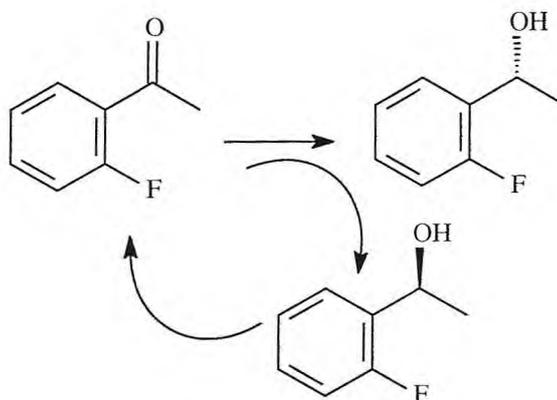


Figura 2.7 - Proposta para a biotransformação da *orto*-flúor-acetofenona

A redução da *meta*-flúor-acetofenona forneceu o produto anti-Prelog com 91% de conversão e 99% de *ee* empregando *Aspergillus terreus* CCT 3320 como biocatalisador. Obteve-se o produto de acordo com a regra de Prelog com *A. terreus* CCT 4083 com 75% de conversão e 83% de *ee* e com *R. oryzae* CCT 4964 o produto foi obtido com 92% de conversão e 62% de *ee*.

A redução da *para*-flúor-acetofenona forneceu valores de conversão de moderados a satisfatórios e bons excessos enantioméricos. Com *A. terreus* CCT 3320 obteve-se 42% de conversão e 95% de *ee* de (*S*), com *A. terreus* CCT 4083 58% de conversão e 78% de *ee* de (*S*) e com *R. oryzae* CCT 4964 84% de conversão e 69% de *ee* de (*R*). Este trabalho demonstrou como ambos os enantiômeros de um produto podem ser adquiridos por diferentes microrganismos.

Andrade e colaboradores estudaram as condições experimentais para biorredução de cetonas aromáticas usando células íntegras de microrganismos. Selecionaram quatro meios de cultura para crescimento dos microrganismos para avaliação dos sistemas enzimáticos em tais condições. A mais efetiva biotransformação foi mediada por *Epicoccum nigrum* SSP 1948, fornecendo a partir da acetofenona, o álcool (*S*)-1-feniletanol com 99% de conversão e 98% de *ee*. Os resultados demonstraram que mesmo empregando diversos meios de cultura, a enantiopreferência para a reação permanece a mesma, à exceção de *Pestalotiopsis* sp. Outros exemplos

mostraram que se pode obter a configuração *R* do álcool empregando outros microrganismos, como por exemplo, *Aspergillus foetidus* CCT 2683 com conversão entre 24 e 45% e excessos enantioméricos entre 53 e 89%. Um resultado bastante peculiar foi observado ao empregar *Pestalotiopsis* sp. SSP 1946, o qual forneceu ambos os enantiômeros do 1-feniletanol ao mudar de um meio de cultura para outro. Em um meio de cultura (A) contendo extrato de batata e glicose obtiveram uma conversão de 36% e 37% de *ee* do enantiômero (*S*), com o meio de cultura (B) contendo dextrose e peptona obtiveram 47 de conversão e 68% de *ee* de (*R*) (ANDRADE, *et al.*, 2004).

Com relação ao microrganismo *Emericella nidulans* CCT 3119, foram obtidos baixos rendimentos na redução da acetofenona. Contudo, com a introdução de alguns substituintes (4Cl-, 4Me-) no anel aromático, houve aumento na conversão, de 16 para 25 e 90%, respectivamente.

Os mesmos autores utilizaram células íntegras de fungos na redução de cetonas e desracemização de aril-etanóis. Previamente selecionados, os microrganismos *Rhizopus oryzae* CCT 4964, *Aspergillus terreus* CCT 4083 e *A. terreus* CCT 3320 foram eficientemente capazes de catalisar a redução de acetofenonas substituídas na posição 4 ou promover a desracemização dos álcoois formadas por métodos convencionais de redução (**Esquema 13**). (COMASSETO *et al.*, 2004).



Os melhores resultados dentre as reações de redução foram obtidos com *R. oryzae* CCT 4964, o qual forneceu rendimentos entre 70 e 90% e excessos superiores a 99% do enantiômero *S*. Com *A. terreus* CCT 4083 obtiveram produtos com a configuração *R*, entretanto, o curso reacional pode ser desviado para produzir o enantiômero *S* com o aumento do tempo reacional, de até 4 dias para os substratos contendo como substituintes o grupo nitro ou bromo. Este comportamento consiste em um processo dinâmico no qual o material de partida é reduzido a favor do enantiômero *R* com 91% de *ee* 1-(4-nitro-fenil)etanol e 53% de *ee* 1-(4-bromo-fenil)etanol. Contudo, os álcoois com configuração *R* são oxidados, permitindo o acúmulo do enantiômero *S*.

As reações de desracemização exibiram comportamentos diferenciados para cada microrganismo empregado. *A. terreus* CCT 4083 foi capaz de gerar o (*S*)-1-(4-nitrofenil)etanol a partir do racemato com 99% de *ee* e 86% de conversão, e o (*S*)-1-(4-bromofenil)etanol com 79% de conversão e *ee* de 99%. Menores valores de conversão foram obtidos pelo emprego de *A. terreus* CCT 3320, 63 e 65% de conversão e 74 e 99% de *ee* para os álcoois contendo como substituintes metoxila e cloro, respectivamente.

Antunes e colaboradores realizaram a biorredução de 2-azido e 2-halo-1-(1,3-benzodioxol-5-il)-1-etanones, empregando a levedura *Rhodothorula glutinis*. Esta cepa foi empregada por diversos autores como fonte enzimática para produção de monoxigenases, epóxido-hidrolases, invertases e para resolução de diversos compostos relevantes. O álcool obtido da etapa de biorredução pode ser empregado como uma alternativa para a preparação de catecolaminas como a (*R*)-(-)-efedrina (**7**), (*R*)-(-)-norefedrina (**8**) e (*R*)-(-)-isoproterenol (**9**) (**Figura 2.8**), que são compostos com atividades farmacológicas, como broncodilatadores, vasoconstritores e neurotransmissores do sistema nervoso. (ANTUNES, 2004).

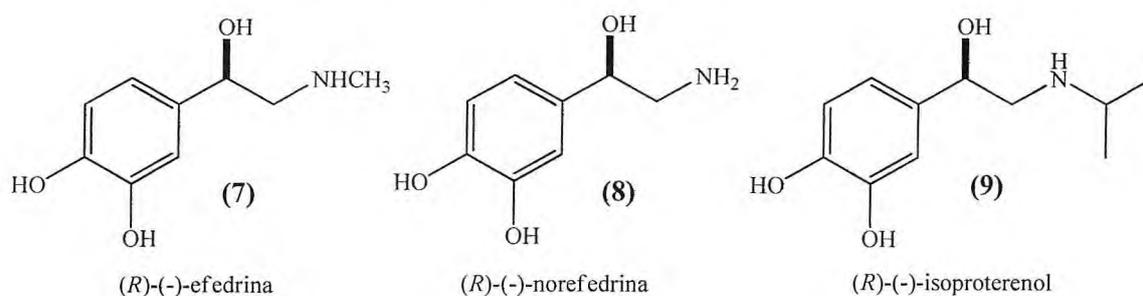
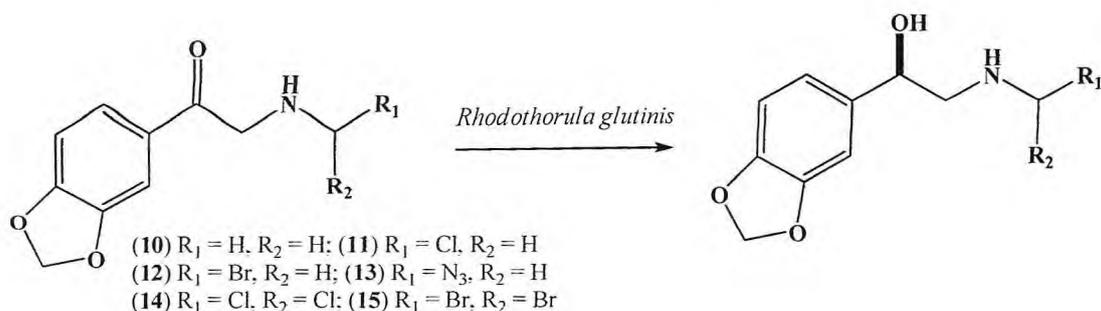


Figura 2.8 - Estruturas da (*R*)-(-)-efedrina, (*R*)-(-)-norefedrina e (*R*)-(-)-isoproterenol

Inicialmente, realizaram a derivatização da cetona (**10**). As cetonas cloradas (**11**) e (**14**) foram preparadas pela cloração da cetona (**10**) na presença cloreto de sulfurila. A primeira foi obtida mantendo-se a temperatura a 0°C, ao passo que a segunda foi preparada a 20°C. A cetona (**13**) foi preparada a partir de (**10**) na presença de NaN₃ em DMF. A bromação da cetona (**10**) levou aos produtos (**12**) e (**15**). A biorredução foi mediada pela levedura em meio de cultura de extrato de malte e levedura (YM) a 30°C (**ESQUEMA 1**, p.42).

ESQUEMA 1



Os resultados encontrados pelas biorreduções apresentam o grande potencial em empregar esta levedura em reações de biorredução. A presença de um grupo retirador de elétrons em posição α à carbonila a torna mais ativa, porém, deve-se destacar que a presença de dois grupos retiradores, substratos (14) e (15), os excessos obtidos são menores que seus análogos monossustituídos (Tabela 1).

Tabela 1 - Biorredução das cetonas 11–15 por *Rhodothorula glutinis*

Entrada	Substrato	Conversão (%)	ee (%)	Configuração
1	(11) $R_1 = Cl, R_2 = H$	98	99	(R)
2	(12) $R_1 = Br, R_2 = H$	57	99	(R)
3	(13) $R_1 = N_3, R_2 = H$	99	99	(R)
4	(14) $R_1 = Cl, R_2 = Cl$	88	76	(R)
5	(15) $R_1 = Br, R_2 = Br$	92	72	(R)

Xiao e colaboradores realizaram a redução do ácido fenilgloxílico (16) ao ácido (R)-(-)-mandélico (17) (ESQUEMA 2), um importante intermediário quiral de fármacos como o ciclandelato. Neste trabalho, foram selecionadas diversas linhagens de microrganismos para redução do referido composto. Um total de quarenta cepas das espécies *Saccharomyces cerevisiae*, *Lactoballius*, *Streptococcus faecalis* e *Candida albicans* foram submetidas como agentes biocatalíticos e deste total treze espécies foram capazes de transformar o ácido fenilgloxílico (16) ao álcool correspondente (Tabela 2). (XIAO, 2005).

ESQUEMA 2

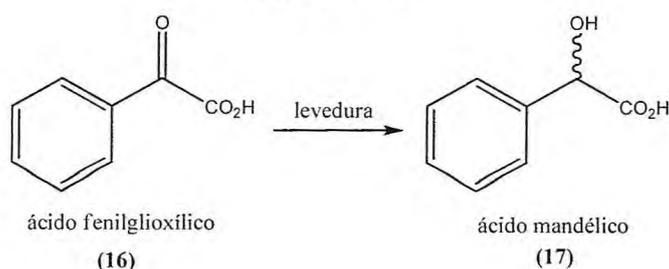


Tabela 2 - Microrganismos empregados para biorredução do ácido fenilgloxílico (16)

Espécie	Rendimento (%)	ee (%)	Configuração
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>			
FD11	70	86	R
FD14	30	57	R
FD03	28	64	R
FD04	42	68	S
FD05	45	74	R
FD06	30	72	S
FD12	23	65	R
FD18	19	75	R
<i>Candida albicans</i>			
Ca11	6	70	R
F101	11	82	R
<i>Streptococcus faecalis</i>			
F130	22	79	R
Lb01	13	62	R
<i>Lactoballius</i>			
Lb02	14	73	R

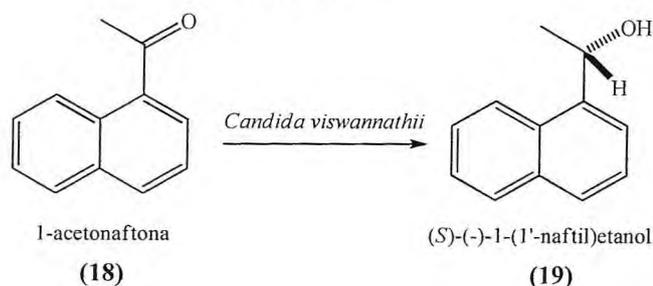
As reações foram realizadas em 10 mL de uma suspensão de células contando o substrato a 10 mM a 32 °C e 250 rpm.

Com base no ensaio inicial, a cepa de *Saccharomyces cerevisiae* FD11 foi estudada com maior detalhamento levando em consideração a concentração do substrato, pH, condições anaeróbicas e com demanda de oxigênio, além da taxa de glicose empregada. Com relação ao pH, demonstrou-se que pHs mais neutros conduzem à reação com melhores conversões, 80% a pH 6,5 enquanto que pHs mais ácidos (5,0) baixa a conversão drasticamente (25%). O emprego de temperaturas mais altas conduziu à diminuição da conversão e ee, a 32°C e 38°C, por exemplo, as conversões foram de 93 e 83%, enquanto os excessos foram de 95 e 86%, respectivamente. Estudando a quantidade de glicose adicionada ao meio de cultura, descobriram que, dentre as concentrações selecionadas (0; 0,0566; 0,0833; 0,222 e 1,11 mmol/mL de meio), a concentração de 0,0833 ofereceu o melhor resultado com conversão completa e ee de 97%. Ao empregar uma maior quantidade de glicose, há um decréscimo na conversão, pelo fato de haver inibição da enzima pelo álcool formado pela via de fermentação. A reação foi submetida às condições anaeróbicas, cuja reação forneceu o produto com 90% de rendimento enquanto que em condições aeróbicas foi obtido 72% de rendimento e ee de 95%. Com relação à quantidade de substrato, sete níveis de concentração foram empregados de 5 a 100 mM. O melhor intervalo encontrado para conversão foi de 30-40 mM, acima deste intervalo houve um decréscimo linear da conversão. Níveis extremamente altos de substrato conduzem à diminuição de ambos, conversão e excessos enantioméricos e, quando a concentração aproxima-se de 100

mM, esta diminuição leva a resultados desprezíveis. Estes ensaios mostraram o potencial desta cepa em empregá-la a nível industrial.

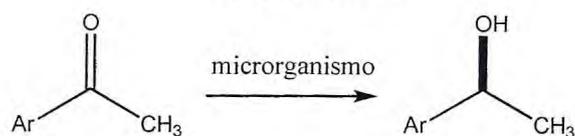
Kamble e colaboradores empregaram uma nova cepa de *Candida viswanathii* isolada de amostras do solo para mediar reações de biorredução. Como substrato empregaram a 1-acetonaftona (**18**) ao (*S*)-(-)-1-(1'-naftil)etanol (**19**) (ESQUEMA 3), o qual é um importante intermediário sintético de análogos do ácido mevínico (inibidor da redutase 3-hidroximetil glutaril coenzima A). A obtenção do referido composto encontra-se descrita na literatura empregando as cepas dos microrganismos *Rhizopus arrhizus*, *Geotrichum candidum*, *Merulius tremellosus* e células imobilizadas de *Daucus carota*, porém na maioria dos casos, o produto é obtido em baixos rendimentos ou requerem longos tempos para a reação. O método descrito por Kamble leva ao produto desejado com a vantagem do tempo de reação ser relativamente curto (12 h), alta tolerância ao substrato (>2g/L), uso de baixas concentrações de células (200g/L), excelente conversão (97%) e enantiosseletividade (>99%). (KAMBLE, 2005).

ESQUEMA 3



Soni e colaboradores empregaram células íntegras de microrganismos na redução de heteroarilmetilcetonas, tais como, 2-, 3-, e 4-acetil-piridinas (**20 – 22**), 2-acetil tiofeno (**23**), 2-acetil furano (**24**) e 2-acetil pirrolil (**25**) (ESQUEMA 4). (SONI, 2005).

ESQUEMA 4



20: R = 2-Piridil; **21:** R = 3-Piridil; **22:** R = 4-Piridil;
23: R = 2-Tienil; **24:** R = 2-Furil; **25:** R = 2-Pirrolil

Para encontrar o melhor agente biocatalítico, foram empregadas cinquenta cepas isoladas de amostras do solo e, dentre estas, três espécies *Candida viswanathii*, *Candida parapsilopsis* e *Candida melibiosa* apresentaram apreciáveis propriedades redutivas. A 2-acetilpiridina foi o melhor substrato, pois sua redução ocorreu em menor tempo quando comparada à das outras cetonas com conversão superior a 80% e excesso enantiomérico >99%. Com relação às 2, 3 e 4-acetil piridinas obtiveram conversões excelentes (98-100%) e excessos de 99%; vale ressaltar que a 3-acetilpiridina é um bloco de construção na síntese do alcalóide farmacologicamente ativo, akuamidina (**Figura 2.9**). Com os demais substratos não foram obtidos resultados relevantes, com conversões de apenas 2-3%.

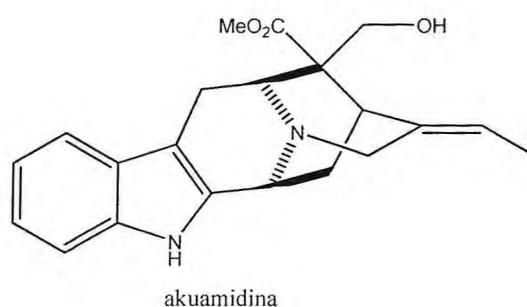


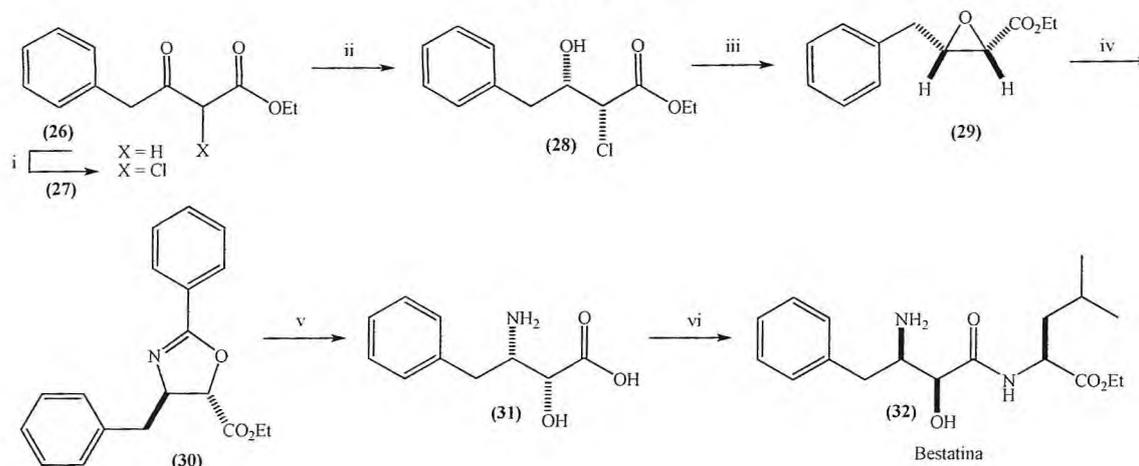
Figura 2.9 - Estrutura da akuamidina

A bestatina (**ESQUEMA 5, p.46**) foi isolada pela primeira vez em 1976 e é usada como medicamento para tratamento do câncer e no combate à infecções bacterianas. Neste trabalho, Feske e Stewart realizaram a preparação de um aminoácido precursor para este fármaco empregando a redução catalisada por enzimas para construção do centro estereogênico da molécula. (FESKE; STEWART, 2005).

Para a preparação do aminoácido, os autores empregaram inicialmente um β -ceto-éster (**26**) que foi clorado na presença de cloreto de sulfurila, SO_2Cl_2 , para fornecer o produto monohalogenado (**27**). Em seguida, este, foi submetido à redução empregando células de *Escherichia coli* como agente estereosseletivo redutor. A redução foi realizada empregando um fermentador de 1L contendo as células previamente cultivadas e, com as quais adicionou-se tampão Kpi enriquecido com glicose. A redução levou ao álcool correspondente com 82% de rendimento com alta pureza enantiomérica ($ee >98\%$ e $de >98\%$). Em seguida procederam com o fechamento de um anel de três membros que ocorreu na presença de K_2CO_3 . O epóxido (**29**) foi aberto por uma benzonitrila empregando quantidade estequiométrica de

$\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$, resultando no produto (30). A hidrólise ácida de (30) resultou no ácido (2*S*,3*R*)-2-hidroxi-3-amino-4-fenilbutírico (31), o aminoácido necessário para a síntese da bestatina (ESQUEMA 5).

ESQUEMA 5



Reagentes e condições: (i) SO_2Cl_2 , CHCl_3 , t.a., 3 h, 92%; (ii) *E.coli*; (iii) K_2CO_3 DMF, t.a., 5 h, 99%; (iv) PhCN, $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$, 0°C a t.a., 3 h, 78%; (v) HCl 6M, refluxo, 8h, 83%; (vi) a) BocCl b) DCC, L-Leu-OBz c) H_2 , Pd/C.

Kurbanoglu e colaboradores empregaram dez cepas de *Alternaria alternata* isoladas de amostras de plantas. Estas cepas foram avaliadas quanto ao potencial na redução da acetofenona ao 1-feniletanol (Tabela 3). A levedura *A. alternata* EBK-4 apresentou o melhor resultado com 62% de conversão e 78% de *ee* (*S*). (KURBANOGLU *et al.*, 2007).

Tabela 3 - Seleção da cepa *A. alternata* para biorredução da acetofenona

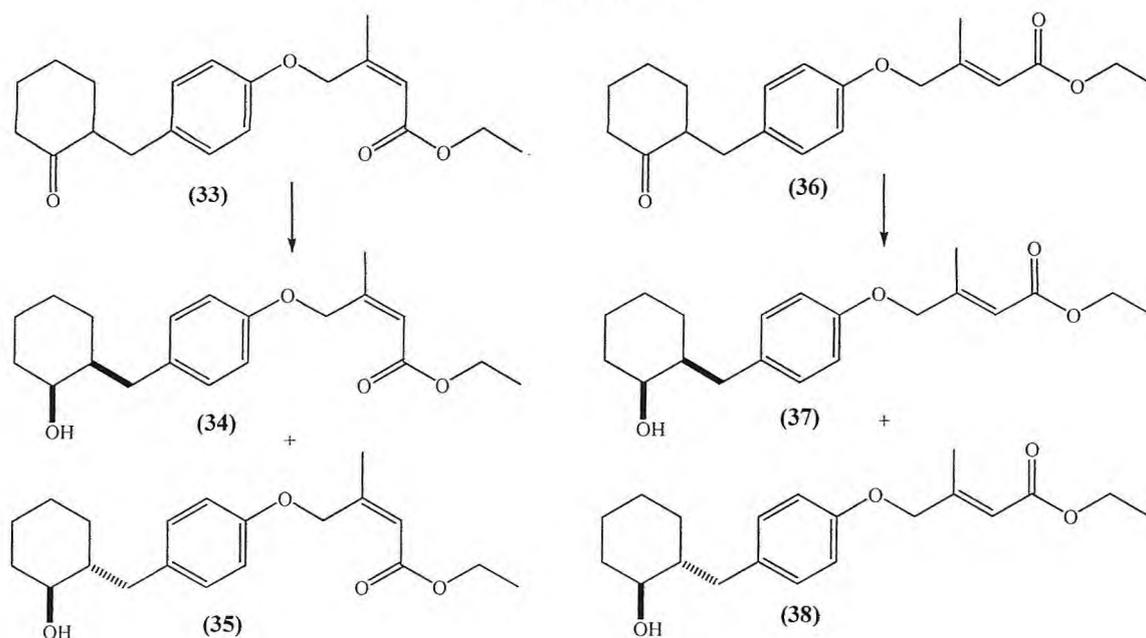
Microrganismo	Conversão	Ee (%)	Configuração
EBK-1	33	64	(<i>S</i>)
EBK-2	25	71	(<i>S</i>)
EBK-3	37	62	(<i>S</i>)
EBK-4	62	78	(<i>S</i>)
EBK-5	38	67	(<i>S</i>)
EBK-6	40	74	(<i>S</i>)
EBK-7	52	74	(<i>S</i>)
EBK-8	44	76	(<i>S</i>)
EBK-9	48	75	(<i>S</i>)
EBK-10	54	60	(<i>S</i>)

Condições para a reação: Temperatura 25°C, tempo 48 h, pH 7, agitação 150 rpm.

Em seguida, selecionaram a EBK-4 para posteriores ensaios variando pH e temperatura. Foram empregados seis pHs diferentes de 4,5 a 8,5 e verificaram que a pHs mais básicos não houve crescimento celular o suficiente para ocorrer biorredução (pH 8,0 e 8,5). Em pHs mais ácidos houve um decréscimo de conversão e excessos enantioméricos (a pH 4,5 obtiveram 20% de conversão e 20% de *ee*). À medida que o pH tornava-se mais neutro ambos conversão e *ee* tornavam-se apreciáveis e no pH (6,5) encontraram o melhor resultado, 90% de conversão e 93% de excesso. Empregando desta vez variações na temperatura (de 26 a 36°C) encontraram que em todos os casos a conversão foi excelente, porém a temperaturas mais altas favorece o decréscimo na enantiosseletividade da reação. Desta forma foi possível obter o álcool com 100% de conversão e excesso enantiomérico de 99% empregando o pH 6,5 e temperatura de 28°C.

Wimmer e colaboradores empregaram a cepa *Saccharomyces cerevisiae* DBM 2115 na redução dos isômeros racêmicos *Z*- (**33**) e *E*- (**36**) do 4-[(2-oxociclohexil)metil]fenoxi-3-metil-2-butenato de etila para preparar os estereoisômeros (1*S*,2*S*)- e (1*R*,2*S*)- do 4-[(2-hidroxiciclohexil)metil]fenoxi-3-metil-2-butenato de etila (**ESQUEMA 6, p.48**). As formas racêmicas destes compostos atuam como hormônio-miméticos, ou seja, são reguladores do crescimento de alguns insetos, capazes de interferir na morfologia e reprodução, porém, na literatura não há relatos da utilização das formas estereoisoméricas puras dos referidos compostos. (WIMMER *et al.*, 2005).

ESQUEMA 6



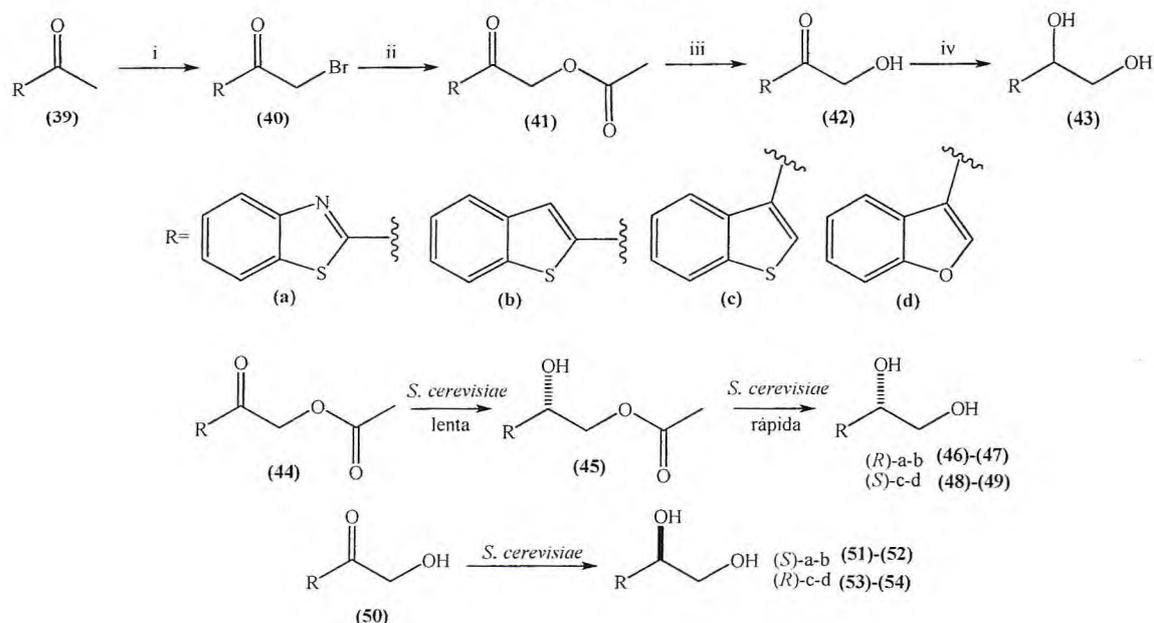
Para a reação empregaram a levedura com dois dias de crescimento e, então o substrato foi adicionado ao meio de cultura contendo a suspensão de células em crescimento; após sete dias o produto foi extraído do meio e analisado. Os produtos foram obtidos com a configuração desejada com bons rendimentos e excelentes estereosseletividades: o diastereoisômero (1*S*,2*S*) foi obtido com *ee* de 98% e rendimento de 48% ao passo que o diastereoisômero (1*R*,2*S*) foi obtido com *ee* >99% e rendimento de 45% pelo emprego da cetona *Z*. A redução da cetona *E* forneceu o (1*S*,2*S*) com *ee* de 98.5% e rendimento de 47%, enquanto que o (1*R*,2*S*) foi obtido com *ee* >99 e rendimento de 44%.

Podea e colaboradores empregaram células íntegras de *S. cerevisiae* na biorredução de 1-(heteroaril)-2-hidroxietanonas e 2-acetoxi-1-(heteroaril)etanonas para a síntese enantiosseletiva de ambos (*R*)- e (*S*)-benzofuranil-, benzo[*b*]tiofenil- e benzo[*d*]tiazolil-etano-1,2-diols. (PODEA *et al.*, 2008).

Como material de partida, as heteroaril etanonas (39 a-d) foram usadas, as quais foram bromadas empregando brometo cúprico em acetato de etila para cetona (39a) e, tribrometo de piridina em ácido acético glacial para as cetonas (39b-d). As bromocetonas foram convertidas em acetoxi metil cetonas pelo emprego de acetato de sódio em dioxano e o éter coroa 18C6 como catalisador de transferência de fase. Em seguida, prepararam as hidroximetil-cetonas correspondentes empregando a enzima Novozyme

435 e, finalmente foram reduzidas por boridreto de sódio aos respectivos heteroaril-etanolis racêmicos (etapa iv) (ESQUEMA 7).

ESQUEMA 7



Reagentes e condições: (i) (a) $\text{CuBr}_2/\text{CH}_3\text{COOC}_2\text{H}_5$, refluxo; (b–d) tribrometo de piridina / CH_3COOH , 50°C ; (ii) CH_3COONa , 18C6/dioxano, refluxo; (iii) Novozym 435/EtOH; (iv) $\text{NaBH}_4/\text{MeOH}$.

A redução das cetonas (Tabela 4) foi realizada empregando condições de fermentação e empregando 15 g de biomassa suspensas em solução aquosa contendo sucrose. As alíquotas da reação foram retiradas a cada 6 horas e analisadas em CLAE.

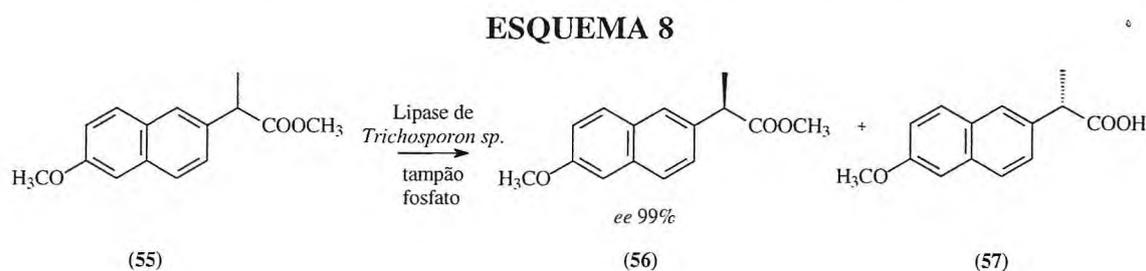
Tabela 4 - Emprego de *S. cerevisiae* na redução de heteroarilcetonas

Entrada	Substrato	Produto	Tempo (dias)	Conversão (%)	ee (%)
1	R=a	(R)-a (46)	5	92	99
2	R=b	(R)-b (47)	6	92	96
3	R=c	(R)-c (53)	3	94	89
4	R=d	(R)-d (54)	2	93	95
5	R=b	(R)-b (47)	5	91	96
6	R=c	(R)-c (53)	2	92	99
7	R=d	(R)-d (54)	2	94	99

2.2.5. Resolução cinética

Dentre os métodos de preparação de moléculas quirais há um número cada vez mais expressivo de sínteses quimioenzimáticas envolvendo resolução cinética de produtos racêmicos e, na maioria dos casos as lipases são as mais empregadas para esta aplicação em escalas laboratoriais e industriais.

A resolução cinética é a total ou parcial conversão de um dos enantiômeros de uma mistura racêmica. A resolução cinética é baseada na diferença de reatividade dos enantiômeros frente a um reagente quiral. Em um caso hipotético e ideal somente um dos enantiômeros reage para fornecer o produto. Muitos destes processos não exibem este comportamento ideal e geralmente a reação não se completa em 50% de conversão. Para obter o produto com alto excesso enantiomérico é necessário que a reação seja interrompida até que alcance 50% de conversão. Como exemplo, temos a resolução cinética do antiinflamatório naproxeno (**55**) pela lipase de *Trichosporon sp.* com a qual se obteve uma conversão de 50% e excesso enantiomérico superior a 99% do produto através de sua resolução cinética (**ESQUEMA 8**). (KOUL *et al.*, 2003).



A concentração de cada enantiômero não é constante durante a reação e o excesso enantiomérico do substrato e do produto sofrem variação de acordo com a conversão. O grau de enantiosseletividade (E) de uma reação pode ser facilmente calculado por meio dos valores de conversão da reação, do excesso enantiomérico do substrato ou do excesso enantiomérico do produto; $E = \ln[(1-c) \times (1-ee_s)] / \ln[(1-c) \times (1+ee_p)]$. Como regra geral, resoluções cinéticas com valores de E menores que 15 não são relevantes em síntese, valores entre 15 a 30 são considerados moderados e valores maiores que 30 são considerados como bons ou excelentes com aplicações úteis em síntese orgânica. (GOTOR; ALFONSO; GARCIA-URDIALES, 2008)

Dois importantes conceitos devem ser entendidos em reações catalisadas por enzimas, o excesso enantiomérico (*ee*) e a enantiosseletividade (E).

A pureza enantiomérica de alguns compostos é expresso em termos do valor de *ee*, que é definido como:

$$\%ee_{\text{do enantiômero majoritário}} = \frac{A - B}{A + B} \times 100$$

Onde A é a concentração do enantiômero majoritário e B é a concentração do enantiômero minoritário. Deste modo, o valor de *ee* para uma mistura racêmica é zero, diferentemente para um composto enantiomericamente puro, na qual o valor de *ee* é um (ou 100%).

Uma vez que as lipases são quirais, elas possuem a habilidade de distinguir entre os dois enantiômeros de um mistura racêmica. O parâmetro da escolha descreve a estereosseletividade ou a enantiosseletividade das reações catalisadas por lipases é chamado de enantiosseletividade, que também é conhecida como razão enantiomérica (*E*). O valor de *E* é definido como a proporção da constante específica dos dois enantiômeros:

$$E_{RS} = \frac{(K_{cat}/K_M)_R}{(K_{cat}/K_M)_S}$$

Onde K_{cat} é a constante da velocidade e K_M é a constante de Michaelis-Menten. Na literatura, a equação que descreve a enantiosseletividade de uma reação é calculada em termos do *ee* do produto (ee_p), substrato não reagido (ee_s) e a conversão (*c*). Deste modo, para uma reação reversível, o valor de *E* pode ser expresso por:

$$E = \frac{\ln [1 - (1 + K)c(1 + ee_p)]}{\ln [1 - (1 + K)c(1 - ee_p)]} = \frac{\ln [1 - (1 + K)(c + ee_s\{1 - c\})]}{\ln [1 - (1 + K)(c - ee_s\{1 - c\})]}$$

onde *K* é a constante de equilíbrio. Quando a reação é irreversível ou a reação reversível é insignificante ($K=0$), a equação é reduzida a:

$$E = \frac{\ln [1 - c(1 + ee_p)]}{\ln [1 - c(1 - ee_p)]} = \frac{\ln [(1 - c)(1 - ee_s)]}{\ln [(1 - c)(1 + ee_s)]}$$

onde *c* é expresso por:

$$c = \frac{ee_s}{ee_s + ee_p}$$

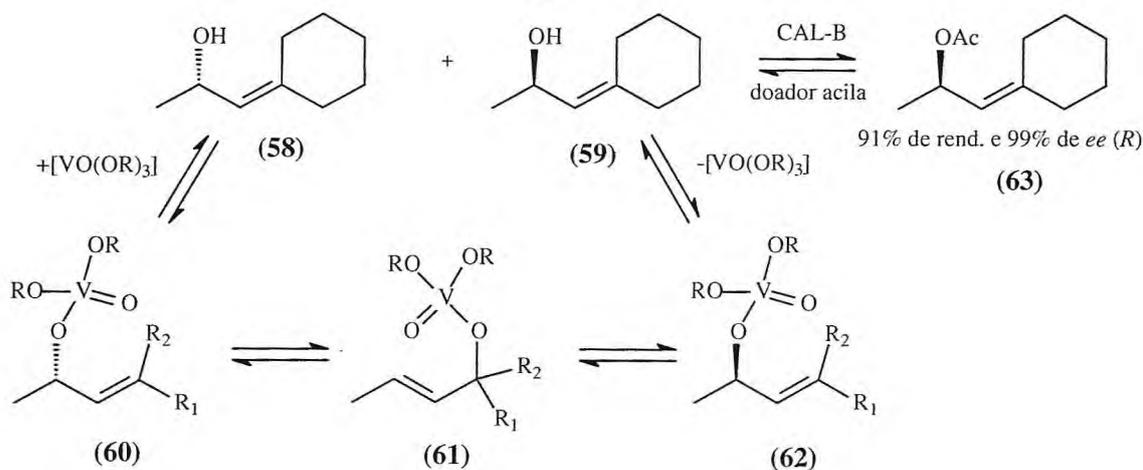
E também pode ser expresso em termos de ee_s e ee_p , somente por:

$$E = \frac{\ln \left[\frac{1 - ee_s}{1 + (ee_s/ee_p)} \right]}{\ln \left[\frac{1 + ee_s}{1 + (ee_s/ee_p)} \right]}$$

Resoluções cinéticas estão limitadas a um rendimento teórico de 50%, entretanto há estratégias para aumentar este rendimento utilizando como procedimento auxiliar o oposto da resolução cinética, no qual um dos enantiômeros é convertido na mistura racêmica. Este processo é conhecido como resolução cinética dinâmica e possui um rendimento teórico de 100%. A racemização pode ser realizada por um biocatalisador ou catalisador químico (**ESQUEMA 9**).

Para que a resolução cinética dinâmica possa ser empregada deve-se seguir certos requerimentos: (i) a resolução cinética deve ser muito seletiva ($E > 20$); (ii) a racemização deve ser rápida (pelo menos 10 vezes mais rápida que a resolução cinética do enantiômero não reativo); (iii) o catalisador da racemização não deve reagir com o produto da reação; (iv) a resolução cinética e a racemização devem ser compatíveis nas mesmas condições reacionais. (GOTOR; ALFONSO; GARCIA-URDIALES, 2008).

ESQUEMA 9



2.2.6. Regra de Kazlaukas

As lipases apresentam muito maior enantiosseletividade em resoluções cinéticas de álcoois secundários que álcoois terciários ou primários. A regra de Kazlaukas prediz o enantiômero que reage com a maior velocidade durante a acilação de álcoois racêmicos secundários. O modelo é representado pela **Figura 2.10**, onde o grupo mais volumoso possui prioridade sobre o grupo mediano e o álcool (*R*) reage para resultar no éster correspondente. O mesmo comportamento é observado para a hidrólise de ésteres, sendo que, neste caso, o álcool (*R*) é sempre obtido. Diversos relatos da literatura relatam o emprego de álcoois secundários racêmicos para a preparação de drogas quirais ou intermediários; a resolução pode envolver a acilação de álcoois ou a hidrólise de ésteres. A hidrólise enzimática e a reação de transesterificação podem ser processos complementares para obtenção dos referidos compostos enantiomericamente puros. (GOTOR, 2002).

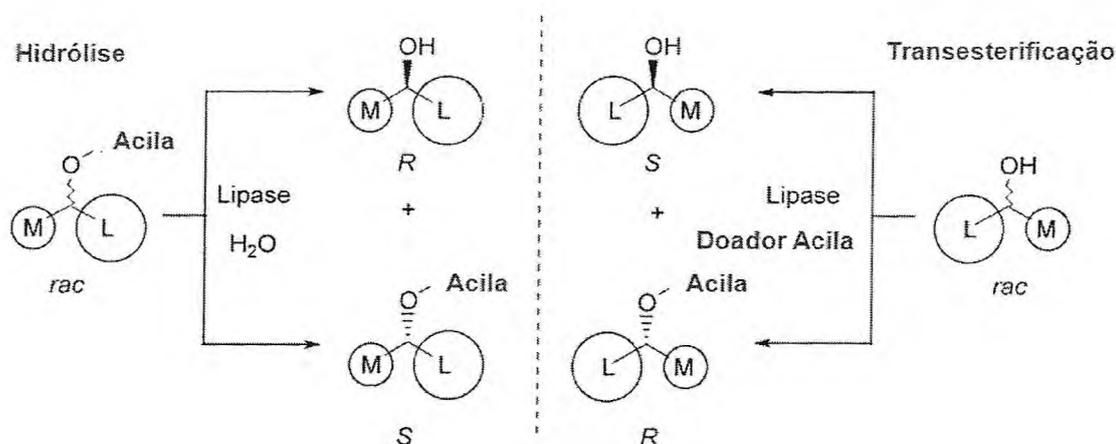


Figura 2.10 - Representação esquemática do sistema para resolução cinética

2.2.7. Emprego da CAL-B em resoluções cinéticas

Das várias lipases utilizadas em biocatálise, destaca-se a CAL-B. Esta enzima tem-se demonstrado particularmente útil na síntese de ésteres e aminas, sendo altamente regioseletiva na síntese de monoésteres de carboidratos, e enantioseletiva na resolução de inúmeros compostos, como aminas, álcoois e ácidos.

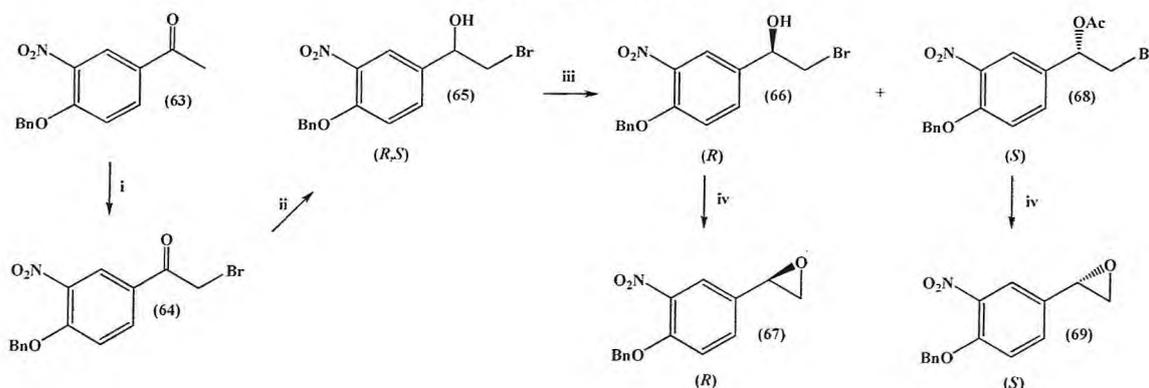
Existem várias formas da CAL-B disponíveis no mercado, na forma livre ou imobilizada através de ligações covalentes, mais indicadas para reações em meios aquosos, ou imobilizada através de ligação iônica, mais utilizada em meios não aquosos.

Quando imobilizada, a CAL-B apresenta elevada estabilidade térmica (60-80°C), por longos períodos. (GARCIA, 2005).

Neste sub-item (2.2.7) pretende-se destacar as principais aplicações da CAL-B em biocatálise desde 2000, especialmente em resoluções cinéticas para a preparação de moléculas quirais relevantes e de interesse biológico.

Os receptores agonistas β -adrenérgicos são eficientes broncodilatadores empregados na terapia contra asma e bronquite crônica. O (*R,R*)-formoterol (ESQUEMA 12, p.56) possui atividade relatada e é digno de atenção devido à sua rápida ação, ausência de efeitos colaterais e de tolerância aceitável. O formoterol é comercializado em sua forma racêmica, porém sabe-se que os estereoisômeros diferem entre si no que diz respeito ao seu potencial farmacológico; estudos indicam que o estereoisômero mais ativo é o *RR*, seguido de *RS* > *SR* > *SS*. Por esta razão, Campos e colaboradores desenvolveram a síntese do referido composto empregando protocolos químicos e enzimáticos. Inicialmente foi preparado o primeiro sinton quiral para o desenvolvimento da síntese. Desta maneira, os autores partiram de uma metil-cetona (63) para formação de uma mono-bromocetona (64), esta, por sua vez foi convencionalmente convertida ao respectivo álcool (65) pelo emprego de borano para, finalmente, ser usado como substrato para resolução cinética. O álcool (66) (*R*) foi recuperado com 48% de rendimento e 96% de *ee*, ao passo que o acetato (68) foi obtido após 50% de conversão com 77% de *ee* (ESQUEMA 10). (CAMPOS; BOSCH; GUERRERO, 2000).

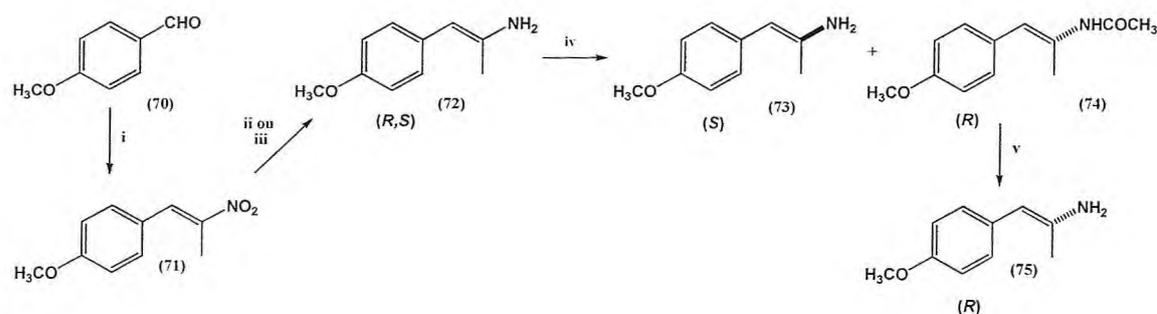
ESQUEMA 10



Reagentes e condições: (i) Br_2 , CHCl_3 , HBr , 25°C, 82%; (ii) $\text{BH}_3 \cdot \text{THF}$ (1.2 equiv.), THF , -20°C, 87%; (iii) lipase, *t*-BuOMe, acetato de vinila, 37°C; (iv) K_2CO_3 , MeOH, 25°C, 2.5 h, 89% para (*R*), 84% para (*S*).

Em seguida prepararam o segundo sinton para a síntese do produto final, desta maneira, o nitroestireno (**71**) foi preparado pela reação de Henry com anisaldeído e nitroetano na presença de acetato de amônio. A redução do grupo nitro com hidreto de lítio e alumínio forneceu o produto racêmico (**72**) como substrato almejado para a resolução cinética. Esta foi realizada a 30°C por 15 horas e forneceu a amina com 47% de rendimento e 68% de *ee*, enquanto que a amida, posteriormente hidrolisada, foi obtida com 32% de rendimento global e 84% de *ee*. (ESQUEMA 11).

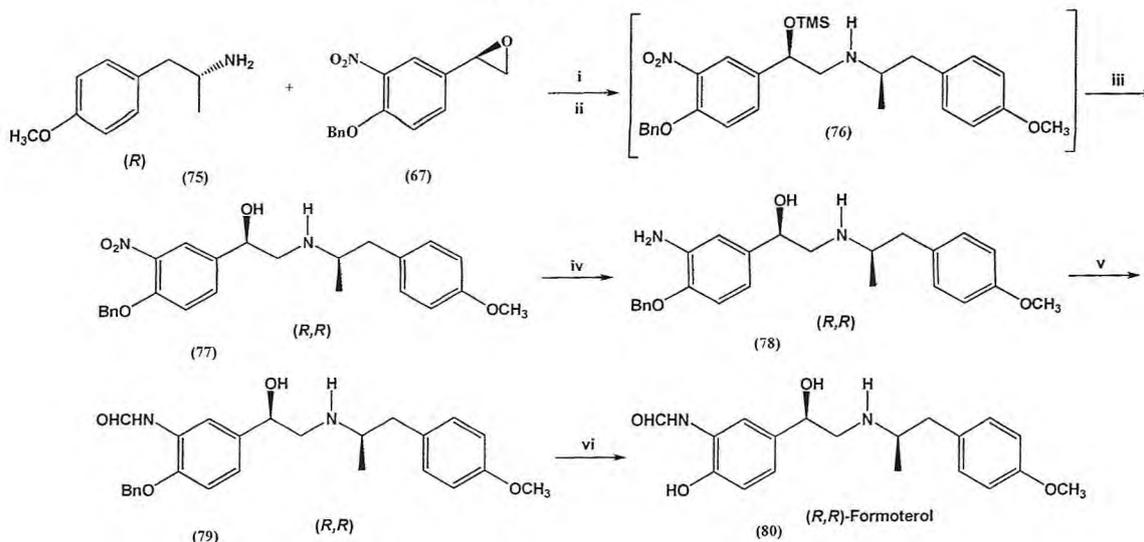
ESQUEMA 11



Reagentes e condições: (i) EtNO₂, NH₄AcO (1.25 equiv.), refluxo 35 min, 81%; (ii) LiAlH₄, Et₂O, refluxo 2 h, 78%; (iii) RED-Al, benzeno, refluxo 2.5 h, 54%; (iv) CAL-B, AcOEt, Et₃N cat., 30°C; (v) KOH 3M, refluxo, 3 h, 68%.

A amina (**75**) e o epóxido (**67**) ambos quirais, produzidos independentemente, finalmente são combinados na presença do bis-(trimetilsilil)acetamida na razão de 1:1 em equivalência. O produto desta reação (**76**) é submetido ao tratamento com alumina, em seguida tratado com ferro em meio ácido para redução do grupo nitro e formação da amina (**78**). Esta, por sua vez, na presença de ácido fórmico é convertida ao derivado formilado e finalmente o tratamento com H₂ em paládio promove a remoção do grupo benzila e formação do produto final (**80**) (ESQUEMA 12).

ESQUEMA 12

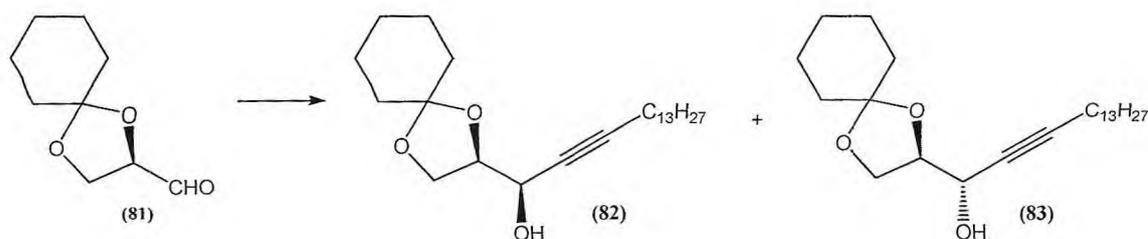


Reagentes e condições: (i) BSA, DMSO anidro, 25°C, 30 min; (ii) DMSO, 80°C, 87 h; (iii) Al₂O₃ neutro, 80%; (iv) Fe, 1M HCl, MeOH refluxo 45 min, 67%; (v) HCOOH, py, 60°C 6.5 h, 69%; (vi) H₂, Pd/C, EtOH, 3 kg/cm², t.a. 12h, 73%.

Glicoesfingolipídeos são importantes componentes das células eucarióticas e atuam no reconhecimento de interação entre célula-célula e célula e outros agentes biológicos. A maioria dos glicoesfingolipídeos contém a estrutura básica do amino álcool *D-eritro*-esfingosina, [(2*S*,3*R*,4*E*)-2-amino-3-hidroxiocetadec-4-en-1-ol], o qual é ligado a uma cadeia de ácido graxo por uma ligação glicosídica entre o nitrogênio e um carboidrato hidrofílico. A 3-*O*-benzoil-azidoesfingosina (**92**) (ESQUEMA 14, p.58) é um sintom extremamente versátil na preparação de diversos derivados de glicoesfingolipídeos e, neste trabalho o referido intermediário foi preparado por Compostella e colaboradores. (COMPOSTELLA *et al.*, 2002).

Inicialmente, partiram do aldeído (**81**) para formação dos diastereoisômeros (**82**) e (**83**) em uma proporção *sin/anti* em 4:6 em 90% de rendimento através da reação de Grignard (ESQUEMA 13, p.57).

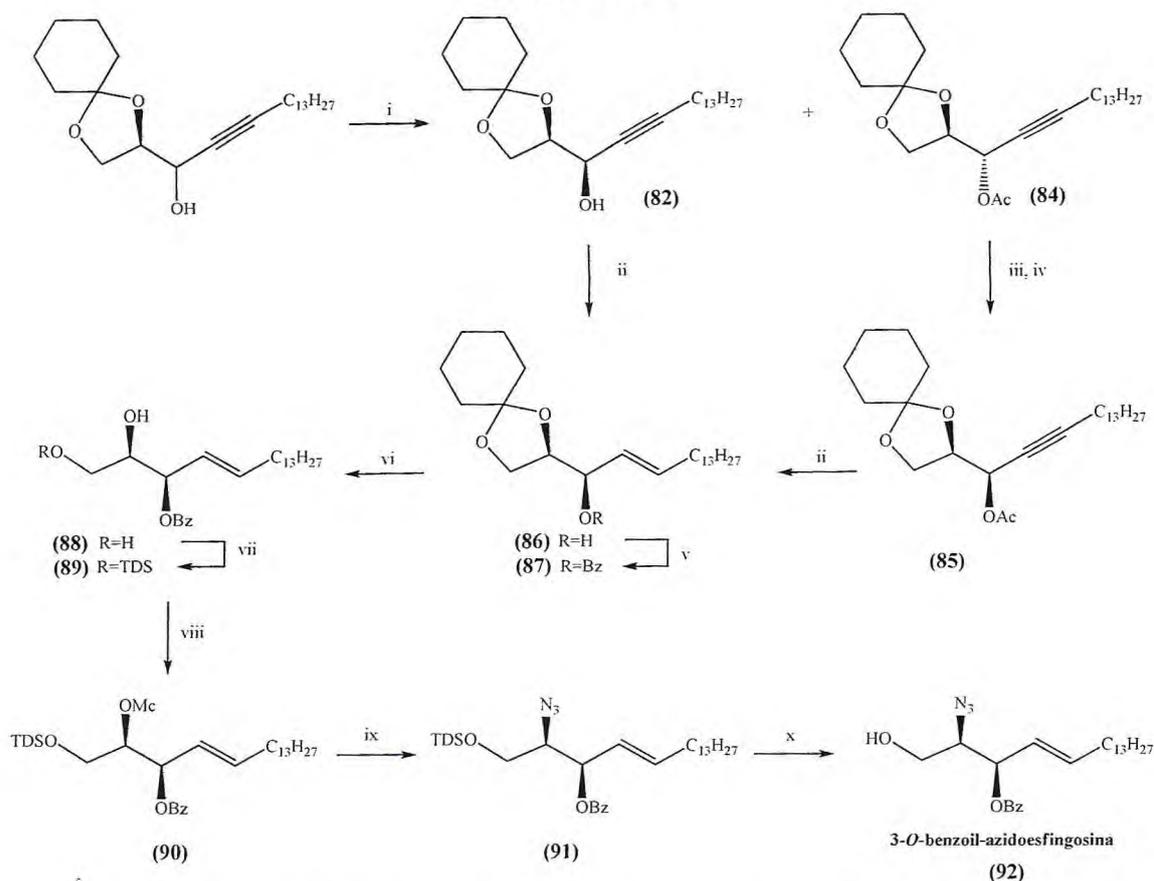
ESQUEMA 13



Reagentes e condições: (i) brometo de 1-pentadecinil magnésio, Et₂O, THF, -40°C, 90%, razão 4/6.

O produto racêmico da reação de Grignard foi submetido à resolução cinética na presença da lipase *Candida antarctica* tipo B em cicloexano e acetato de vinila como doador acila; o derivado acetilado *anti* foi obtido com 57% de rendimento enquanto que o álcool *sin* foi recuperado em 38% de rendimento. O produto *anti* foi desacetilado e convertido ao produto *sin* (**85**) através da reação de Mitsunobu e, em seguida foi reduzido com hidreto de lítio e alumínio. O produto bruto foi submetido à proteção do grupo hidroxila empregando cloreto de benzila e piridina. Na presença de ácido trifluoracético, o acetal (**87**) foi convertido no respectivo diol (**88**) e, na presença do cloreto de texildimetilsilila, a hidroxila primária foi regiosseletivamente protegida. Em seguida, a hidroxila secundária sofreu uma cloro-mesilação para ser convertida na azida (**91**). Finalmente, o tratamento do produto obtido com HF em THF/CH₃CN promove a remoção do grupo TDS e formação do produto almejado, 3-*O*-benzoil-azidoesfingosina (ESQUEMA 14).

ESQUEMA 14

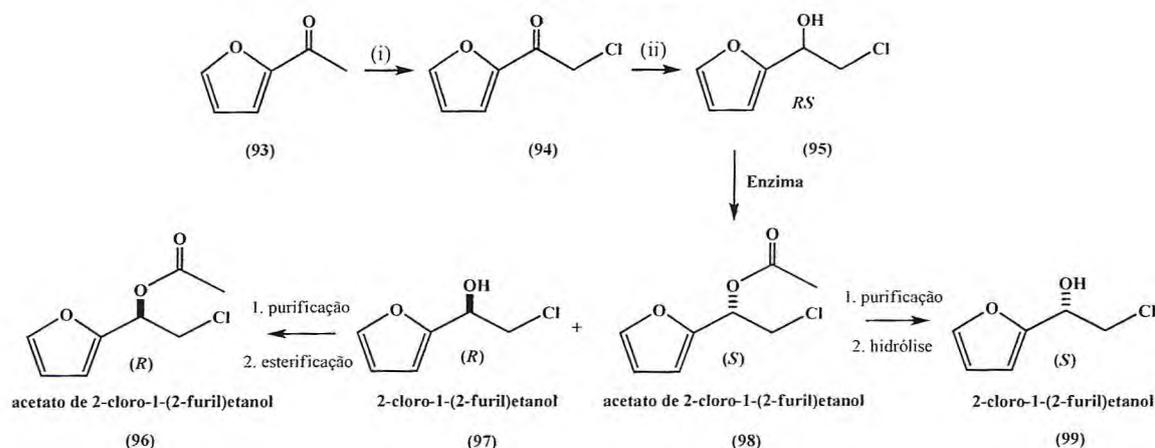


Reagentes e condições: (i) CAL-B, acetato de vinila, ciclo-hexano, 40°C, 95%; (ii) LiAlH₄, THF, 40°C; (iii) MeONa, MeOH; (iv) AcOH, PPh₃, DIAD, piridina, THF, 0°C a t.a., 72%; (v) BzCl, piridina, CH₂Cl₂, 80%; (vi) 60% ácido trifluoracético, 0°C; (vii) TDSCl (TDS=texildimetilsilil), piridina, 0°C a t.a., 80%; (viii) McCl (Mc=clorometanosulfonil), piridina 0°C a t.a., 86%; (ix) NaN₃, DMF, 85°C, 85%; (x) 2% aq. HF, THF, CH₃CN, 85%.

Compostos contendo anel furânico são úteis como blocos de construção para a síntese de diversos produtos naturais como α -aminoácidos, β -lactamas, quinolizidinas e alcalóides piperidínicos. O 2-cloro-1-(2-furil)etanol (ESQUEMA 15, p.59) e seu derivado acetilado são importantes precursores de várias moléculas biologicamente ativas. Na literatura somente um par de exemplos relata a obtenção de formas enantiomericamente puras dos compostos citados, ambas envolvem a redução enantiosseletiva da cetona correspondente pelo emprego de catalisadores quirais de rutênio ou de ródio. Baseados neste contexto, Gercek e colaboradores desenvolveram um protocolo baseado na resolução cinética empregando lipases para obtenção de ambos os enantiômeros do 2-cloro-1-(2-furil)etanol. Inicialmente, utilizaram a 1-(2-furil)etanona para obtenção da cloro cetona (94) na presença de SeO₂/TMSCl ou Ce-NH₄NO₃/CH₃COCl com 76-84% de rendimento. Em seguida, com 84% de rendimento,

foi obtido o álcool correspondente (**95**) pelo emprego de BH_3SMe_2 , para ser submetido à resolução cinética mediada por lipases. A hidrólise química do acetato (*S*) forneceu o álcool (*S*) com 83% de rendimento pelo emprego de $\text{K}_2\text{CO}_3/\text{MeOH}$, enquanto que o acetilado (*R*) foi obtido com 86% de rendimento (**ESQUEMA 15**). (GERCEK; KARAKAYA; DEMIR, 2005).

ESQUEMA 15



Reagentes e condições: (i) $\text{SeO}_2/\text{TMSCl}$ ou $\text{Ce-NH}_4\text{NO}_3/\text{CH}_3\text{COCl}$ (76-84%); (ii) BH_3SMe_2 84%.

Para a etapa da transesterificação foram empregadas as lipases *Pseudomonas cepacia*, *Candida antarctica*, Amano PS, *Rhizopus niveus*, *Muchor miehei*, *Candida cylindracea* e de pâncreas de porco, na presença de acetato de vinila e ausência de solventes. Os melhores resultados foram obtidos empregando as lipases de *Candida antarctica* e *Pseudomonas cepacia*. Os resultados obtidos estão sumariados na **Tabela 5**.

Tabela 5 - Transesterificação do 2-cloro-1-(2-furil)etanol (**95**) catalisada por lipase

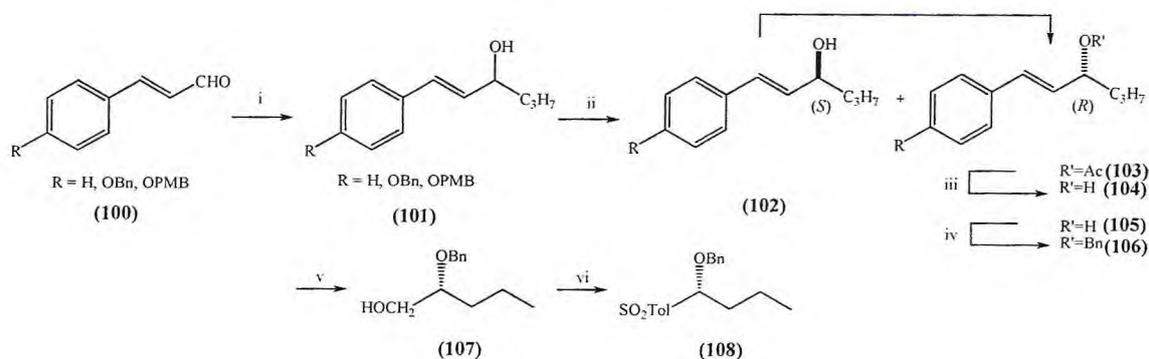
Entrada	Lipase	Tempo	ee substrato (%)	ee produto (%)	Conversão	E
1	<i>Pseudomonas cepacia</i>	115 h	64 (<i>R</i>)	96 (<i>S</i>)	40	95
2	<i>Candida antarctica</i>	90 h	86 (<i>S</i>)	99 (<i>R</i>)	46	>200
3	Amano PS	85 h	12 (<i>R</i>)	17 (<i>S</i>)	41	1.6
4	<i>Rhizopus niveus</i>	3 sem	38 (<i>S</i>)	39 (<i>R</i>)	49	3.2
5	<i>Muchor miehei</i>	52 h	22 (<i>S</i>)	30 (<i>R</i>)	42	2.3
6	<i>Candida cylindracea</i>	48 h	20 (<i>S</i>)	97 (<i>R</i>)	17	79
7	Pâncreas de porco	8 d	71 (<i>S</i>)	56 (<i>R</i>)	56	7.3

Adicionalmente, o 2-cloro-1-(2-furil)etanol (**97**) foi preparado em escala preparativa empregando as lipases CAL-B e PS. Com o emprego da CAL-B, o álcool foi obtido com 41% de rendimento e excesso de 96% (*S*) e, empregando a PS o álcool foi recuperado em 43% com excesso de 99% (*R*).

O ensaio bioguiado de um meio de cultura do fungo *Phoma herbarum* conduziu ao isolamento de dois nonenólídeos Herbarumina I e II. A Herbarumina III (ESQUEMA 17, p.61) apresenta relevantes efeitos fitotóxicos quando testados contra a espécie *A. hypochondriacus*, além de inibir a calmodulina, possuindo, assim efeitos fisiológicos de interesse medicinal e agroquímico. Neste trabalho Samik Nanda relatou a síntese enantiosseletiva da Herbarumina III empregando um método quimioenzimático empregando a lipase CAL-B. (NANDA, 2005).

Para a síntese foi empregado inicialmente o *trans*-cinamaldeído (100) e derivados. Adicionados ao brometo de propilmagnésio resultaram nos álcoois alílicos correspondentes (101). O produto racêmico foi submetido à resolução cinética empregando a CAL-B fornecendo o acetato (*R*) e o álcool (*S*). A melhor enantiosseletividade para a reação foi obtida quando R=*p*-metoxibenzila (Tabela 6). Em seguida, o álcool (*S*) convertido ao acetato (*R*) empregando a inversão de Mitsunobu. O grupo acetil do acetato (*R*) foi hidrolisado e, em seguida protegido com benzila (etapa iii). A ozonólise do produto formado forneceu o aldeído que, na presença de NaBH₄ formou o álcool (107) correspondente. Finalmente, o primeiro bloco de construção (108) foi montado após protocolo baseado em duas etapas: (1) tratamento do álcool com iodo e, (2) adição do sal de sódio do ácido *p*-toluenossulfênico (etapa vi) (ESQUEMA 16).

ESQUEMA 16



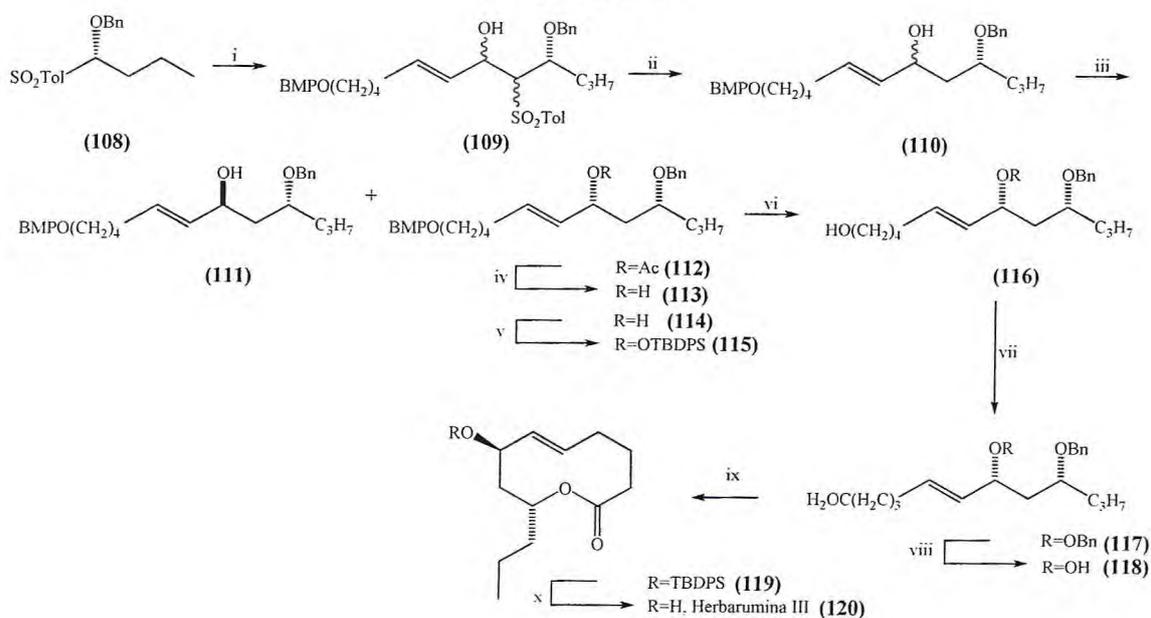
Reagentes e condições: (i) ⁿPrMgBr, éter, t.a.; (ii) (a) acetato de vinila, CAL-B, DIPE; (b) TPP, DIAD, AcOH, THF; (iii) K₂CO₃, MeOH; (iv) BnO(C=NH)CCl₃, CSA; (v) O₃, DCM, Me₂S; NaBH₄/MeOH, 82%; (vi) (i) I₂, TPP, 88%; (ii) TolSO₂Na, DMF, 65%.

Tabela 6 - Emprego da lipase CAL-B para resolução cinética dos álcoois alílicos do ESQUEMA 16

Substrato	Lipase	ee acetato (%)	ee álcool (%)	E
R=H	CAL-B	90	88	55
R=OBn	CAL-B	97	94	231
R=OPMB	CAL-B	98	96	412

A sulfona (**108**) obtida no **ESQUEMA 16** foi condensada na presença de LDA com *E*-7-(4-metoxibenziloxi)hept-2-enal que, após a adição alumínio e mercúrio o grupo *p*-toluenossulfênico foi removido. Em seguida, o produto (**110**) foi submetido à uma segunda transesterificação em acetato de vinila com o emprego da CAL-B. O álcool remanescente foi invertido pela reação de Mitsunobu ao acetato com rendimento global de 88%. Após criados os dois centros estereogênicos da molécula (C7 e C9), o passo seguinte consistiu na formação do anel lactônico. A estratégia iniciou-se com a remoção do grupo acetila e proteção com TBDPS. Em seguida, a remoção do grupo *p*-metoxibenzila (PMB) gerou o álcool que foi convertido no ácido correspondente por um protocolo baseado em duas etapas: (1) oxidação de Swern e (2) oxidação com NaClO₂/NaH₂PO₄. A remoção do grupo benzila pelo emprego de Li-NH₃ formou o hidroxiácido (**118**) precursor da lactona. Finalmente, aplicando o protocolo de Yamaguchi, ocorreu a lactonização do hidroxiácido quando tratado com cloreto de 2,4,6-triclorobenzoíla em refluxo. Para formação do produto final, Herbarumina III (**120**), a lactona obtida foi submetida à remoção do grupo TBDPS (**ESQUEMA 17**).

ESQUEMA 17



Reagentes e condições: (i) LDA, -78°C , *E*-7-(4-metoxibenziloxi)hept-2-enal, 78%; (ii) Al/Hg, THF, 60%; (iii) (a) CAL-B, acetato de vinila, DIPE; (b) TPP, DIAD, AcOH, 90% *de*; (iv) $\text{K}_2\text{CO}_3/\text{MeOH}$; (v) TBDPSCI, imidazol, DMF, 86%; (vi) DDQ, 82%; (vii) DMSO, $(\text{COCl})_2$, Et_3N , 88%; NaClO_2 , NaH_2PO_4 , 2-metil-2-buteno, 80%; (viii) Li-NH_3 , 3-hexino; (ix) acetato de vinila, $\text{Pd}(\text{OAc})_2$, lipase, TBME, 31%; Et_3N , DMAP, pH, 80°C , 83%.

As pirano-naftoquinonas são produtos naturais frequentemente isoladas de plantas e fungos. Dentre as várias atividades biológicas que a classe de compostos apresenta merecem destaque a atividade contra bactérias Gram-positivas, fungos e leveduras patogênicas, assim como atividade antiviral e por serem úteis na terapia contra o câncer. Suas estruturas contêm um anel pirânico dissubstituído nas posições 1,3 e, como exemplo, pode-se citar a eleuterina, tisanona, isoeleuterina, 6-hidroxi-7-metoxieleuterina e ventiloquinona E (**Figura 2.11**).

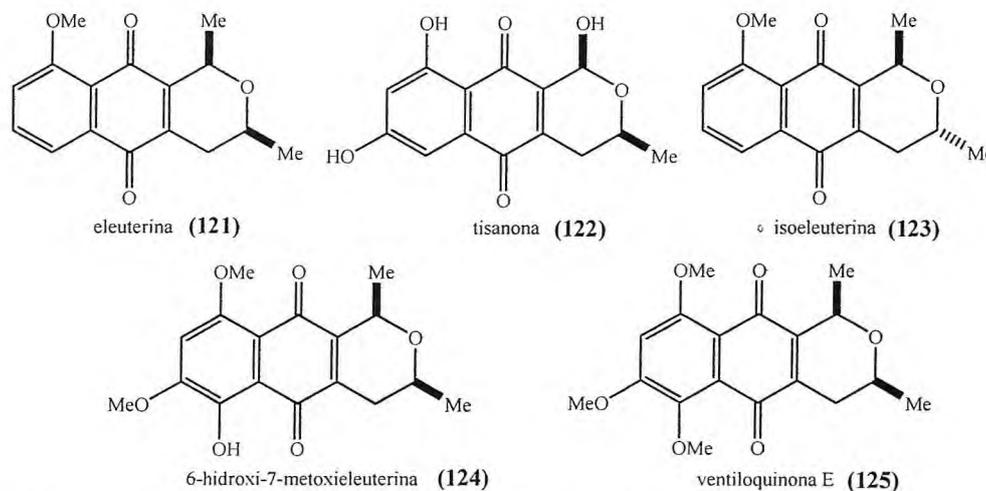
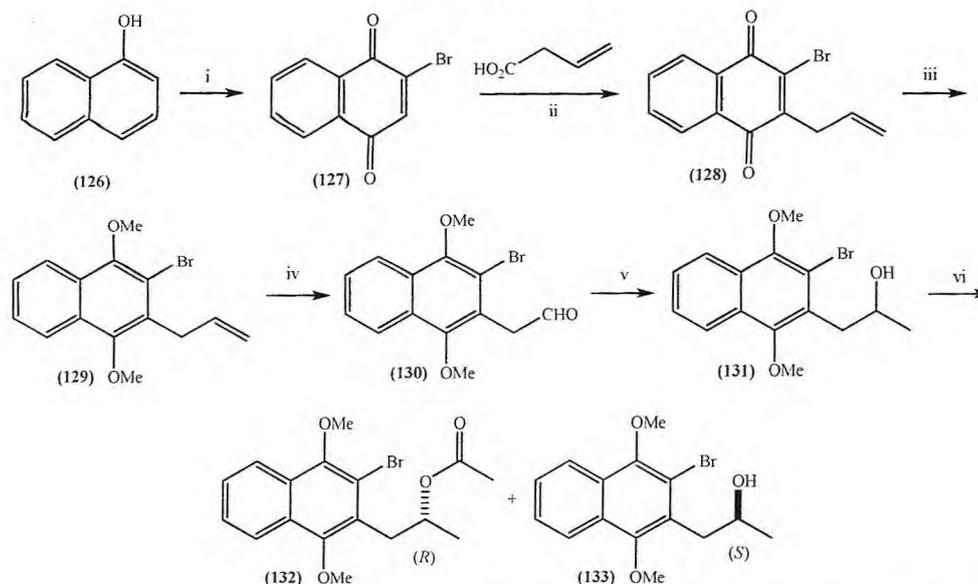


Figura 2.11 - Piranoquinonas de interesse farmacológico

Devido às importâncias biológicas destes compostos, neste trabalho, Bachu e colaboradores realizaram a síntese enantiosseletiva de três piranoquinonas, (-)-9-desmetoxieleuterina, (+)-9-desmetoxieleuterina e a 7,9-deoxitisanona. Partindo de uma bromação oxidativa do 1-naftol (**126**) obtiveram a 2-bromo-1,4-naftoquinona (**127**) que sofreu uma alilação radicalar na presença de AgNO_3 e $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$. Em seguida, a naftoquinona (**128**) sofreu uma metilação redutiva e, empregando ozônio forneceu o aldeído (**130**). A este produto, adicionaram iodeto de metilmagnésio para obtenção do álcool secundário racêmico (**131**). A resolução cinética do mesmo forneceu o álcool (**133**) (*S*) (40%, 93% *ee*) e o éster (**132**) (*R*) (45%, 99% *ee*) (**ESQUEMA 18**). (BACHU; SPERRY; BRIMBLE, 2008).

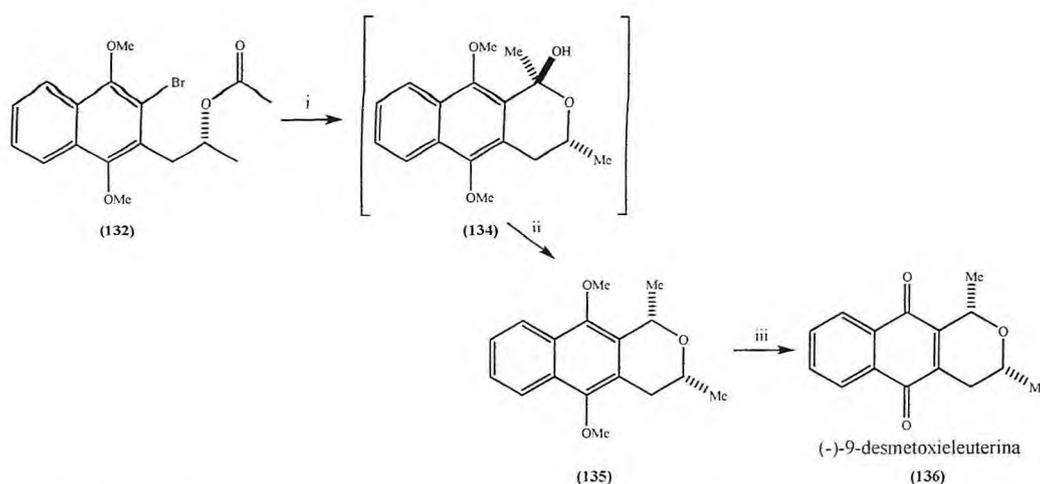
ESQUEMA 18



Reagentes e condições: (i) NBS, AcOH-H₂O, 1h, 45°C, 87%; (ii) AgNO₃, (NH₄)₂S₂O₈, MeCN e H₂O, 2h, 60°C, 67%; (iii) Na₂S₂O₄, THF, TBAI, KOH, Me₂SO₄, 4h, 95%; (iv) O₃, Sudan III, CH₂Cl₂, 15 min, -60°C, 72%; (v) MeMgI, Et₂O, 18 h, -78°C a t.a., 60%; (vi) Novozyme 435, acetato de *p*-clorofenila, tolueno, 60°C, 70 W, microondas, 6h, álcool (*S*) (40%, 93% *ee*), éster (*R*) (45%, 99% *ee*).

Após estabelecidas as condições para formação para formação do bromo éster (*R*) (132) e do álcool (*S*) (133), foram investigadas as condições para conversão nos produtos derivados. Partindo do éster (*R*) (132) realizaram a síntese da (-)-9-desmetoxieleuterina empregando as condições reacionais e reagentes descritos no **ESQUEMA 19**. O tratamento do material de partida com um butil lítio forçou a desejada, porém instável, ciclização intramolecular. A presença do silano Et₃SiH promoveu a redução e finalmente o tratamento com nitrato cérico de amônio (CAN) forneceu a (-)-9-desmetoxieleuterina (**ESQUEMA 19**).

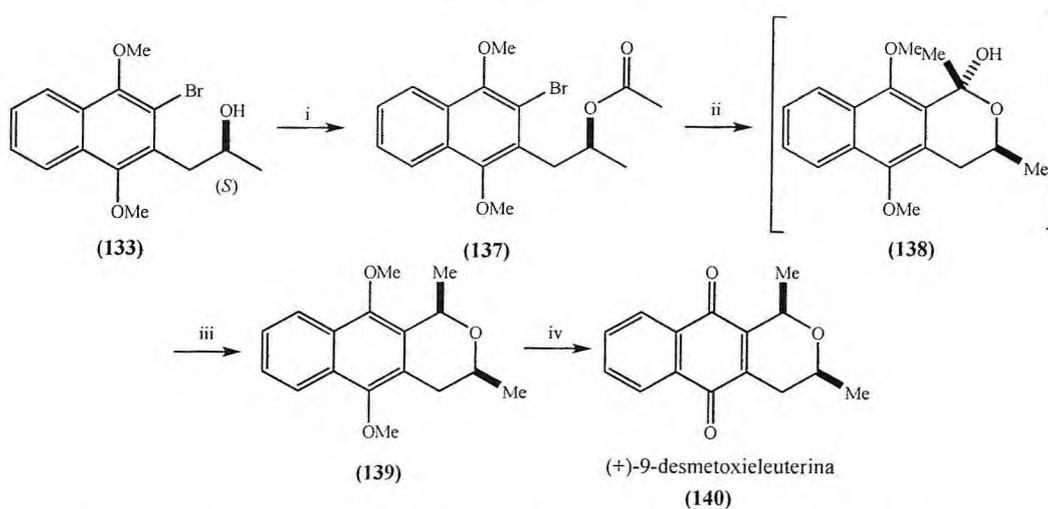
ESQUEMA 19



Reagentes e condições: (i) *t*-BuLi, THF, 2h, -78°C a t.a.; (ii) Et_3SiH , $\text{CF}_3\text{CO}_2\text{H}$, CH_2Cl_2 , 2h, -78°C a t.a., 70%; (iii) CAN, MeCN e H_2O , 10 min, t.a., 75%, 99% ee.

Obtendo sucesso na preparação da (-)-9-desmetoxieleuterina, os autores decidiram empregar a mesma metodologia para a síntese da (+)-9-desmetoxieleuterina. Partindo do bromoacetato (*S*), o qual foi preparado a partir do correspondente álcool (*S*) (133), empregaram as etapas descritas no ESQUEMA 20. O produto final foi obtido com 93% de excesso.

ESQUEMA 20

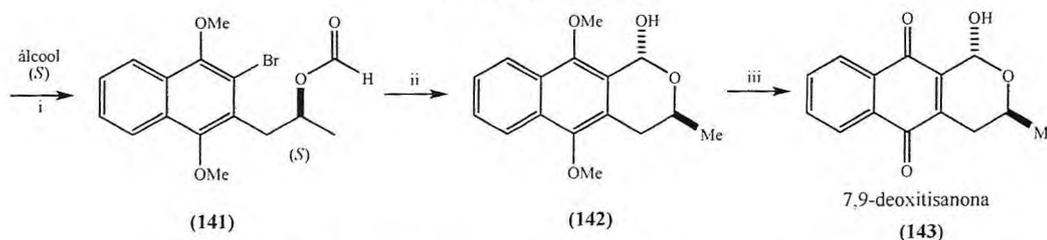


Reagentes e condições: (i) Ac_2O , CH_2Cl_2 , HClO_4 , 2h, t.a., 94%; (ii) *t*-BuLi, THF, 1h, -78°C ; (iii) Et_3SiH , $\text{CF}_3\text{CO}_2\text{H}$, 2h, t.a., 82%; (iv) CAN, MeCN e H_2O , 10 min, t.a., 72%.

Para a preparação da 7,9-deoxitisanona seguiram o protocolo empregado na preparação das naftoquinonas dos ESQUEMAS 19 e 20, porém não houve formação do produto de ciclização e apenas o derivado desbromado foi isolado. Alternativamente,

empregaram ácido fórmico e diclioexilcarbodiimida (DCC) na presença de quantidade catalítica de DMAP, na tentativa de mascarar a hidroxila com formiato para forçar a ciclização. Na presença de butil lítio a reação prosseguiu para formação do produto esperado com 76% de rendimento. Em seguida, na presença de CAN, com 74% de rendimento, a 7,9-deoxitisanona foi formada (**ESQUEMA 21**).

ESQUEMA 21



Reagentes e condições: (i) HCO₂H, DCC, DMAP, CH₂Cl₂, 24 h, 0°C a t.a., 85%; (ii) *t*-BuLi, THF, 1 h, -78°C, 76%; (iii) CAN, MeCN e H₂O, 10 min, 0°C, 74%.

Regla e colaboradores realizaram a síntese do (2*S*)-2-[[*(2R)*-2-hidroxi-3-[4-(2-metoxietil)fenoxi]propil]amino]-1-butanol, um análogo do anti-hipertensivo metoprolol, que apresenta atividade como a bradicardia e a hipotensão. Este novo composto foi nomeado como (2*R*,2'*S*)-β-hidroxihomometoprolol (**Figura 2.12**). (REGLA *et al.*, 2008).

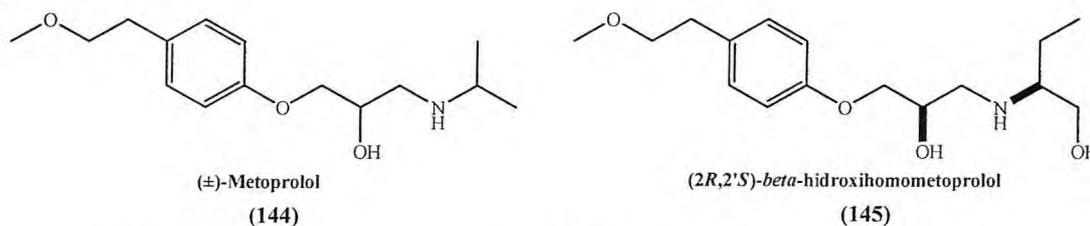
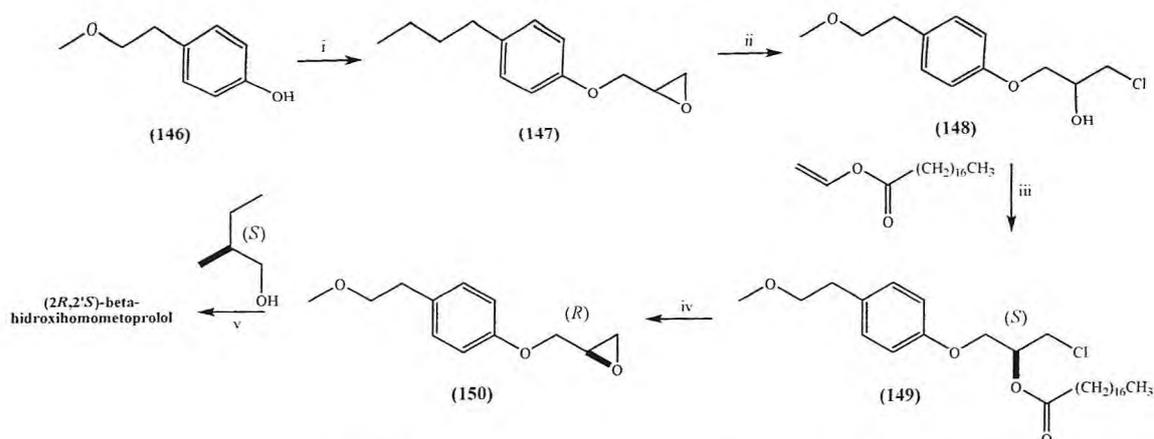


Figura 2.12 - Estruturas do metoprolol e (2*R*,2'*S*)-β-hidroxihomometoprolol

Em primeiro lugar, partiram do 4-(2-metoxietil)fenol (**146**), que na presença de base e (±)-epicloroidrina, o produto correspondente (**147**) foi formado com 90% de rendimento. Em seguida, o tratamento com cloreto de lítio e ácido acético forneceu a abertura regioseletiva da oxirana com excelente rendimento. Esta cloroidrina (**148**) foi submetida à resolução cinética empregando a CAL-B, hexano e acetona como solventes e os ésteres vinílicos dos ácidos acético, láurico, oléico e esteárico como doadores de acila. O derivado esteárico foi obtido com o melhor resultado e, este foi transesterificado com NaOH e MeOH para produção da oxirana (**150**) (*R*) com 96% de rendimento e 95% de excesso enantiomérico. Finalmente, a abertura nucleofílica do

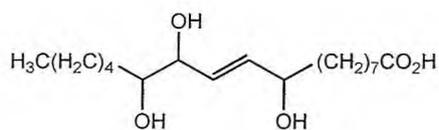
epóxido com (*S*)-2-amino-1-butanol conduziu à formação do desejado amino álcool diastereoisomérico (*R,S*) em 95% de rendimento (ESQUEMA 22).

ESQUEMA 22



Reagentes e condições: (i) KOH/MeOH; (\pm)-Epicloroidrina 90%; (ii) LiCl/AcOH, THF, 99%; (iii) Novozym 435, hexano-acetona 95:5, 24 h, 37°C, 35%; (iv) NaOH, MeOH, 96%; (v) 95%

Sharma e colaboradores realizaram a síntese quimioenzimática de dois estereoisômeros do ácido pinélico (ácido 9,12,13-triidroxi-10*E*-octadecenóico) (Figura 2.13). Entre os oito estereoisômeros possíveis do referido ácido, o enantiômero (9*S*,12*S*,13*S*) possui a maior atividade contra o vírus da Influenza e é um dos constituintes ativos isolados da *Pinelliae tuber*. Devido ao seu potencial farmacológico, diversas sínteses de seus estereoisômeros foram realizadas empregando a epoxidação assimétrica de Sharpless, a diidroxilação assimétrica de Sharpless ou empregando o ácido tartárico como indutor quiral. Por estas razões, uma nova síntese foi realizada visando à obtenção dos dois enantiômeros mais ativos. (SHARMA, 2009^a).



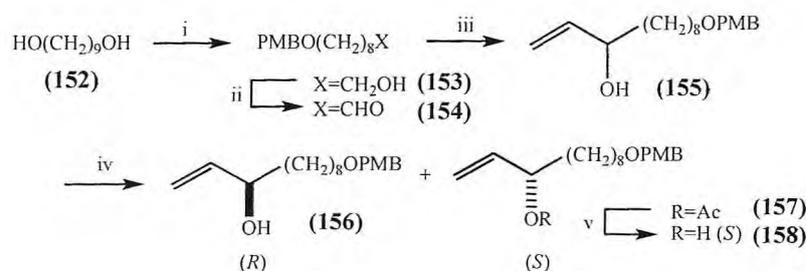
Ácido pinélico (151)

Figura 2.13 - Estrutura do ácido pinélico

Para o desenvolvimento inicial da síntese, foi empregado um diol comercial (1,9-nonanodiol) para monoproteção com cloreto de *p*-metoxibenzila e NaH. A oxidação com PCC converteu a hidroxila desprotegida no respectivo aldeído (154) para em seguida reagir com o brometo de vinilmagnésio. O produto (155) da reação de

Grignard foi submetido à reação de esterificação na presença da lipase Novozyme 435 (CAL-B). A resolução cinética produziu o acetato (*S*) com 41% e o álcool (*R*) com 38% em 97% e 95% de *ee*, respectivamente após 50% de conversão. O acetato foi hidrolisado para fornecer o álcool com configuração (*S*) com 86% de rendimento, enquanto que o álcool de configuração (*R*) foi convertido ao seu antípoda pela inversão de Mitsunobu com 87% (ESQUEMA 23).

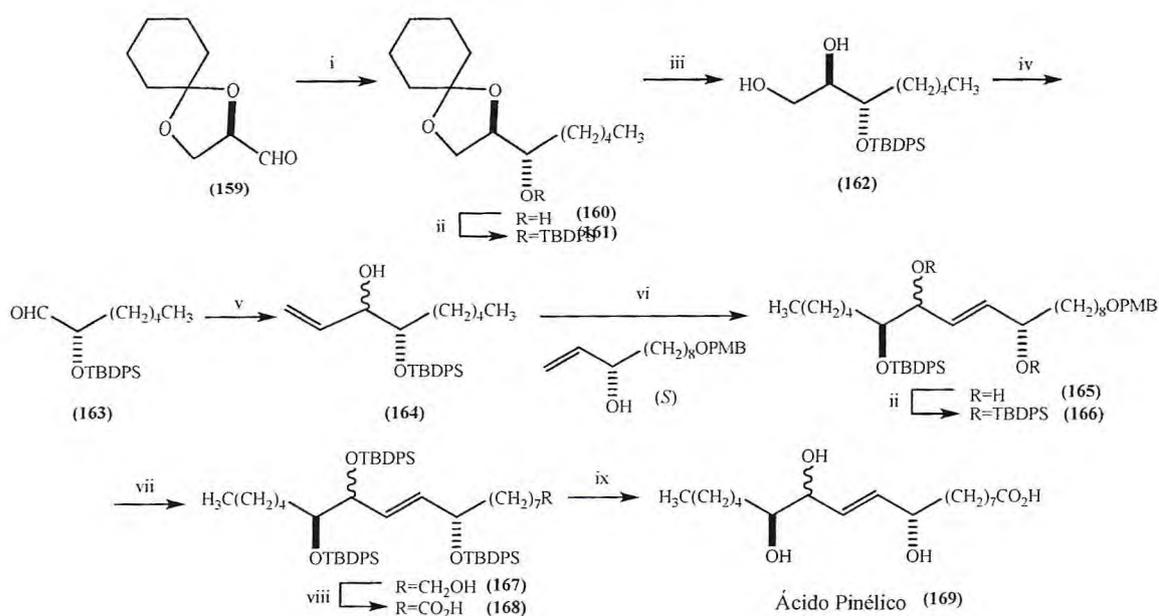
ESQUEMA 23



Reagentes e condições: (i) NaH/PMBCl/DMF/25°C/12h (71%); (ii) PCC/NaOAc/CH₂Cl₂/25°C/3h (92%); (iii) CH₂=CHMgBr/THF/25°C/3h (79%); (iv) acetato de vinila/Novozyme 435/éter diisopropílico /25°C/26h (50%); (v) K₂CO₃/MeOH/25°C/6h (86%).

Em continuação, os autores partiram do aldeído (**159**) que, na presença do organolítio CH₃(CH₂)₄Li forneceu o produto (**160**) que, na presença de cloreto de *ter*-butildifenilsilila (TBDPSCI) e posterior adição de ácido trifluoracético (TFA) formou-se o triol (**161**) monoprotetido. O tratamento com NaIO₄ conduz à clivagem do 1,2-diol fornecendo o aldeído (**163**) correspondente. Em mais uma etapa, empregaram o reagente de Grignard, brometo de vinilmagnésio, e então, o produto (*syn:anti* 78:22) foi submetido à reação de metátese de olefinas com o catalisador de Grubbs na presença do álcool de configuração (*S*) da resolução cinética. O produto triidroxilado (**165**) foi submetido à reação de proteção das hidroxilas na presença de TBDPSCI e, em seguida o grupo *p*-metoxibenzila (PMB) foi removido por uma oxidação seletiva empregando diclorodicianobenzoquinona (DDQ). O álcool formado foi oxidado ao respectivo ácido (**167**) pelo emprego de dicromato de piridina sendo, finalmente tratado com fluoreto de tetrabutílamônio para formação do produto final (**169**), o estereoisômero (9*S*,12*RS*,13*S*) do ácido pinélico (ESQUEMA 24, p.68).

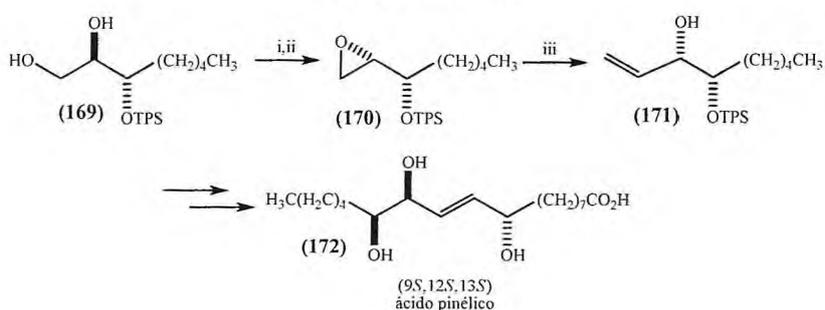
ESQUEMA 24



Reagentes e condições: (i) $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4\text{Li}/\text{THF}/25^\circ\text{C}/4\text{h}$ (87%); (ii) TBDPSCI, imidazol/DMAP/ $\text{CH}_2\text{Cl}_2/25^\circ\text{C}/18\text{h}$ (84% e 80%); (iii) 80% TFA aquoso/ $0^\circ\text{C}/3\text{h}$ (81%); (iv) $\text{NaIO}_4/\text{MeCN}-\text{H}_2\text{O}$ (6:4)/ $0^\circ\text{C}/2\text{h}$ (90%); (v) $\text{CH}_2=\text{CHMgBr}/\text{THF}/25^\circ\text{C}/3\text{h}$; (vi) $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{catalisador de Grubbs}/25^\circ\text{C}/18\text{h}$ (78%); (vii) $\text{DDQ}/\text{CH}_2\text{Cl}_2-\text{H}_2\text{O}/25^\circ\text{C}/12\text{h}$ (77%); (viii) $\text{PDC}/\text{DMF}/25^\circ\text{C}/24\text{h}$ (71%); (ix) $\text{Bu}_4\text{NF}/\text{THF}/0^\circ\text{C}/12\text{h}$ (89%).

Adicionalmente, os pesquisadores sintetizaram o estereoisômero (9*S*,12*S*,13*S*) do ácido pinélico, segundo a metodologia descrita no **ESQUEMA 25**.

ESQUEMA 25

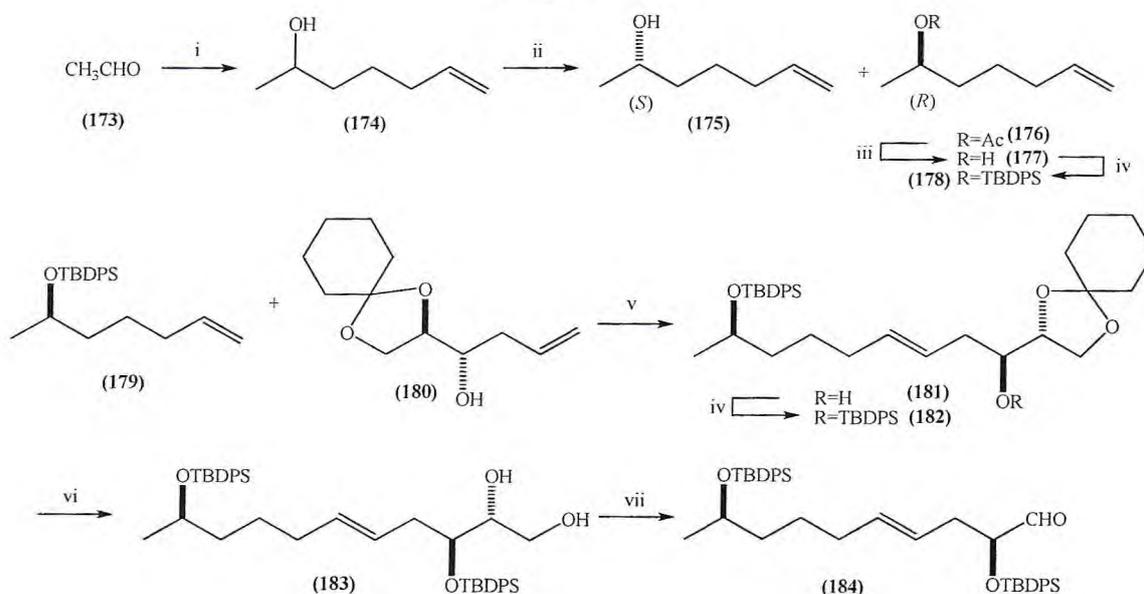


Reagentes e condições: (i) $\text{TMSCl}/\text{EtOAc}/-20^\circ\text{C}/20\text{min}$; $\text{MsCl}/\text{Et}_3\text{N}/-20^\circ\text{C}/30\text{min}$; $\text{HCl } 2\text{N}/25^\circ\text{C}/40\text{min}$ (78%); (ii) $\text{NaH}/\text{THF}/0-25^\circ\text{C}/3\text{h}$ (89%); (iii) $\text{Me}_3\text{Si}/\text{BuLi}/\text{THF}/-25^\circ\text{C}/1\text{h}/6\text{h}$ (84%).

Posteriormente, Sharma e colaboradores realizaram a síntese do (6*S*,13*R*)-6,13-diidroxitetradeca-(2*E*,4*E*,8*E*)-trienoato de metila e de seu derivado ácido hidroxilado (**ESQUEMA 27, p.70**). De acordo com relatos da literatura, estes compostos possuem atividade antibacteriana, inibindo o crescimento celular de cepas como *Escherichia coli*

e *Saccharomyces cerevisiae*. Estas substâncias foram isoladas do fungo *Mycosphaerella rubella*, cujo gênero exibe um grande potencial na produção de compostos com diversas atividades biológicas. Neste trabalho foi relatada sua síntese quimioenzimática em 11 etapas empregando a CAL-B para resolução cinética do álcool (174) (etapa ii), cuja metodologia resultou no acetato de configuração *R* com 96% de *ee* e no álcool com 87% de *ee* de *S* com 44% de conversão. O produto (179) desta etapa foi empregado na reação de metátese na presença do catalisador de Grubbs e do intermediário (180) (etapa v). Em seguida, a hidroxila livre é protegida pelo emprego de *ter*-butildifenilsilila, o acetal é removido por ácido trifluoroacético (TFA) e finalmente o primeiro intermediário (184) da síntese total é formado após clivagem oxidativa do diol empregando NaIO₄ (ESQUEMA 26). (SHARMA; GAMRE; CHATTOPADHYAY, 2009).

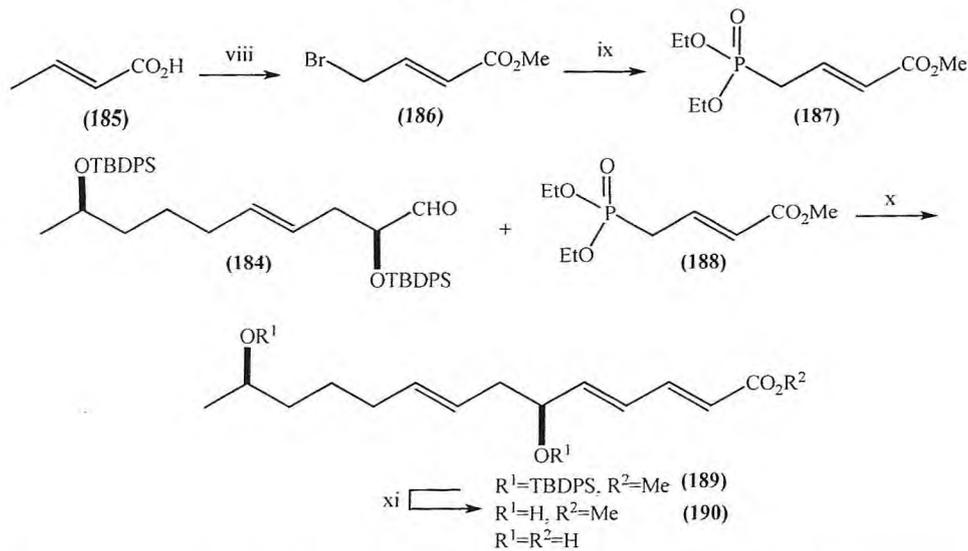
ESQUEMA 26



Reagentes e condições: (i) CH₂=CH(CH₂)₃MgBr/THF/25°C/3h (75%); (ii) acetato de vinila/Novozyme 435/éter diisopropílico/25°C/1h (40%); (iii) KOH/MeOH/25°C/ 6h (88%); (iv) TBDPSCI/imidazol/DMAP/CH₂Cl₂/25°C (83% e 88%); (v) Catalisador de Grubbs–Hoveyda segunda geração /CH₂Cl₂/25°C/4h (63%); (vi) TFA/0°C/3h (88%); (vii) NaIO₄/CH₃CN–H₂O/2h (91%).

Dando continuidade à síntese, a subunidade aquiral foi preparada a partir do ácido crotônico (185) na presença de N-bromosuccinimida (NBS) seguida de sua esterificação. O produto (186), na presença de fosfito de trietila, forneceu o fosfonato correspondente (187), que, ao reagir com o intermediário (184) produzido no ESQUEMA 26 levou ao produto final, (6*S*,13*R*)-6,13-diidroxitetradeca-(2*E*,4*E*,8*E*)-trienoato de metila e seu respectivo ácido (ESQUEMA 27).

ESQUEMA 27

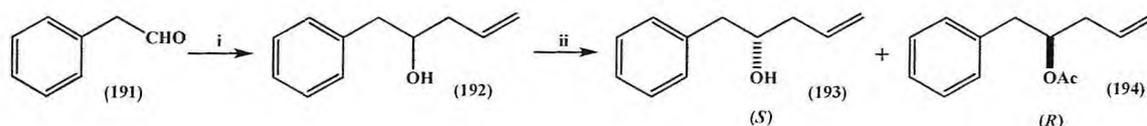


Reagentes e condições: (viii) NBS/CCl₄; MeOH/H₂SO₄/Δ; (ix) P(OEt)₃/Δ; (x) NaH/THF/25°C/18h (79%); (xi) Bu₄NF/THF/0°C/12h (87%).

Microrganismos marinhos são fontes promissoras de metabólitos biologicamente ativos e representam um grande passo para a descoberta de novas drogas. A espécie *Trichoderma*, encontrada em diferentes habitats ecológicos, é produtora de diversos metabólicos secundários, como, por exemplo, a (+)-Harzia lactona A (ESQUEMA 29, p.72). Esta lactona foi isolada do *Trichoderma harzianum* em sua forma (3*S*,5*S*) e apresenta modesta atividade citotóxica contra células P388. Considerando que os diferentes estereoisômeros de um composto apresentam comportamento biológico diferenciado, Kumar e colaboradores desenvolveram a primeira síntese quimioenzimática dos estereoisômeros desta lactona. (KUMAR; BHATT; CHATTOPADHYAY, 2009).

Inicialmente, realizaram a preparação de um álcool alílico (192) empregando 2-fenilacetaldeído na presença de Al/SnCl₂.2H₂O. Para a resolução do produto obtido foram empregadas lipases comerciais e o melhor resultado foi obtido pelo emprego da enzima CAL-B (Novozyme 435) em acetato de vinila e éter diisopropílico. O acetato (*R*) correspondente foi obtido com 47% de rendimento e ee de 97%, enquanto que o álcool (*S*) remanescente foi recuperado em 44% com 87% de ee após 26 horas de reação (ESQUEMA 28, p.71).

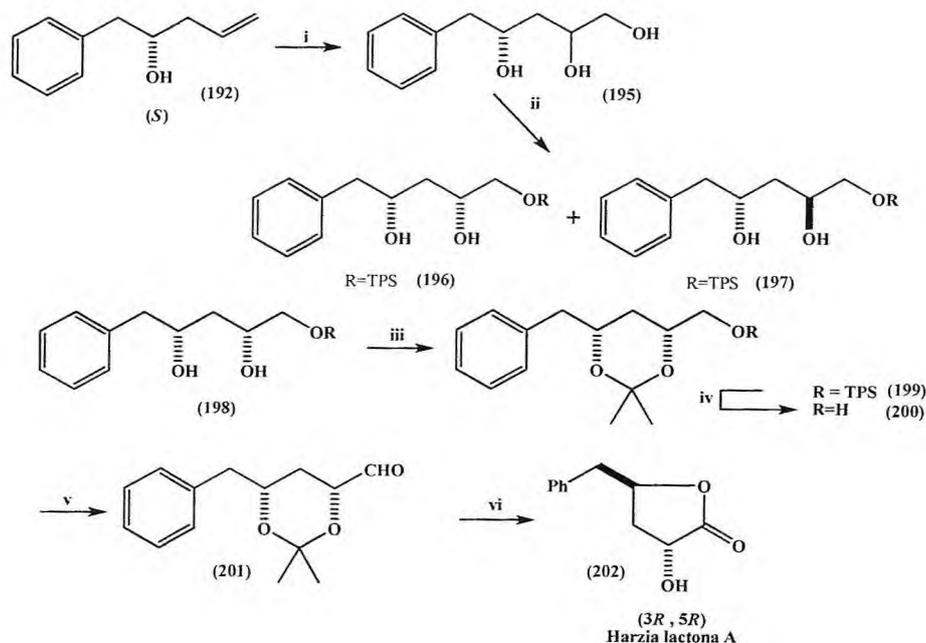
ESQUEMA 28



Reagentes e condições: (i) brometo de alila/ $\text{Al-p6}/\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}/\text{MeOH}-\text{H}_2\text{O}-\text{CH}_3\text{COOH}/25^\circ\text{C}/18\text{h}$ (84%), (ii) Novozyme 435/acetato de vinila/éter diisopropílico/ $25^\circ\text{C}/26\text{h}$.

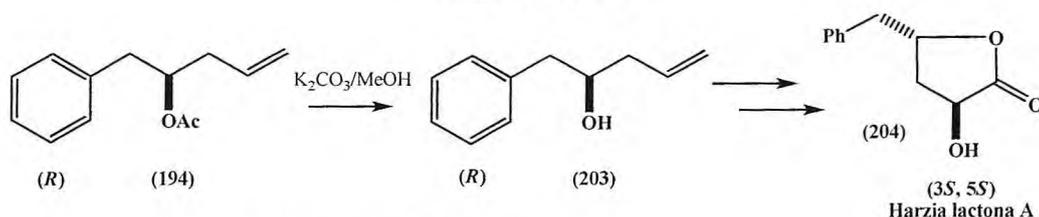
O emprego de OsO_4 promoveu a dihidroxilação do álcool alílico (192) de configuração (S), o produto formado (196) foi submetido à reação com cloreto de *ter*-butildifenilsilila (TPSCI) na presença de DMAP. Esta etapa protegeu a hidroxila primária e, em seguida, o diol (198) foi convertido no acetonídeo (200) com 2,2-dimetoxipropano (DMP) e *p*-toluenossulfonato de piridínio (PPTS). Posteriormente, a hidroxila protegida com TPS foi convertida à sua forma original, oxidada ao aldeído correspondente (201) pelo protocolo de Swern na presença de cloreto de oxalila e finalmente o tratamento com $\text{NaClO}_2/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ promoveu a formação do produto final, (3*R*,5*R*)-Harzia lactona A (ESQUEMA 29).

ESQUEMA 29



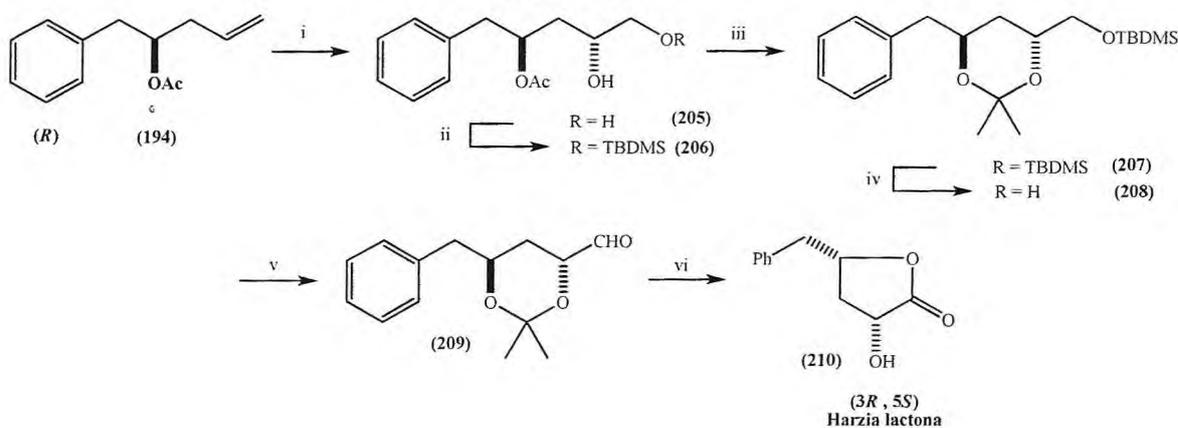
Reagentes e condições: (i) Polímero- $\text{OsO}_4/\text{NMO}/\text{tert-BuOH}-\text{H}_2\text{O}/12\text{h}$ (86%), (ii) TBDPSCI / TEA / DMAP/ $\text{CH}_2\text{Cl}_2/0^\circ\text{C}/25\text{h}$ (77%), (iii) DMP/PPTS/ $\text{CH}_2\text{Cl}_2/25^\circ\text{C}/3\text{h}$ (85%), (iv) $\text{Bu}_4\text{NF}/\text{THF}/-78^\circ\text{C}/6\text{h}$ (87%), (v) $(\text{COCl})_2/\text{DMSO}/\text{Et}_3\text{N}/\text{CH}_2\text{Cl}_2/25^\circ\text{C}/0.5\text{h}$ (95%), (vi) $\text{NaClO}_2/\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{DMSO}/\text{H}_2\text{O}/25^\circ\text{C}/22\text{h}$; HCl 3N (44%).

Paralelamente, preparou-se a Harzia lactona A (3*S*,5*S*) empregando o acetato (*R*) obtido da resolução cinética. A reação de hidrólise na presença de K_2CO_3 e MeOH formou o álcool (*R*) e seguindo as etapas do **ESQUEMA 30**, obteve-se o produto com a configuração desejada (**ESQUEMA 30**).

ESQUEMA 30

Reagentes e condições: $K_2CO_3/MeOH/25^\circ C/6h$ (98%).

O acetato de configuração (*R*) obtido da resolução cinética foi convertido à Harzia lactona (3*R*,5*S*) empregando uma metodologia alternativa com seis passos reacionais (**ESQUEMA 31**).

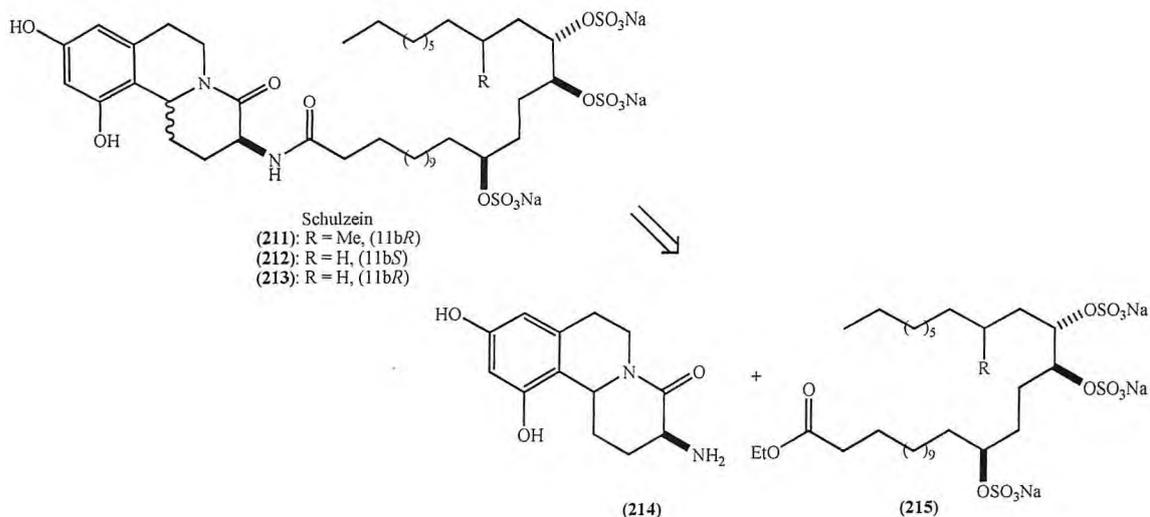
ESQUEMA 31

Reagentes e condições: (i) Ad-mix- β/t -BuOH- $H_2O/0^\circ C/14h$ (81%), (ii) TBDMSCI/ $Et_3N/DMAP/CH_2Cl_2/0^\circ C/18h$ (75%), (iii) $K_2CO_3/MeOH/25^\circ C/6h$ (91%); DMP/PPTS/ $CH_2Cl_2/25^\circ C/3h$ (88%), (iv) $Bu_4NF/THF/-78^\circ C/6h$ (84%), (v) $(COCl)_2/DMSO/Et_3N/CH_2Cl_2/25^\circ C/0.5 h$ (89%), (vi) $NaClO_2/NaH_2PO_4/DMSO/H_2O/25^\circ C/22h$; HCl 3N (42%).

Os alcalóides tetraisoquinolínicos são produtos naturais isolados de extratos hidrofílicos de esponjas marinhas de *Penares schulzei* e são agentes biológicos empregados na inibição da enzima de leveduras α -glicosidase e viral neuranimidase. Os inibidores da α -glicosidase são agentes terapêuticos potentes no tratamento de doenças causadas por vírus, combate ao câncer e diabetes. Estruturalmente, tais compostos

podem ser descritos como duas unidades estruturais ligadas entre um nitrogênio e um carbono carbonílico para formação de uma amida (ESQUEMA 32).

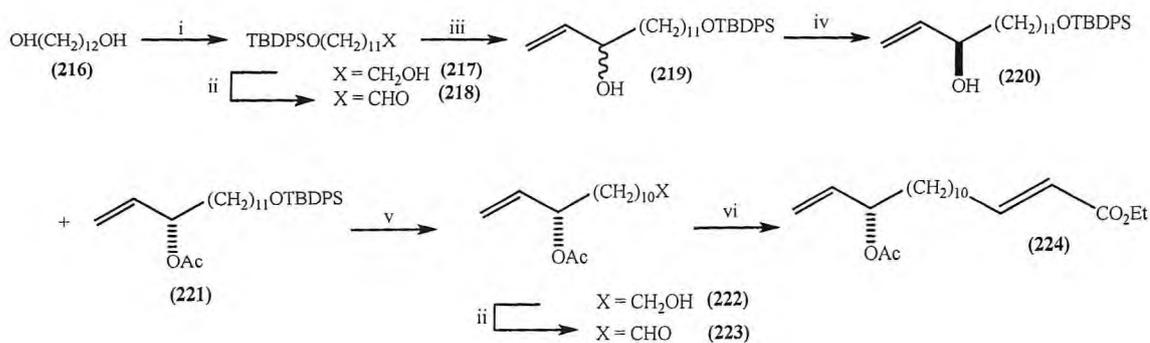
ESQUEMA 32



Neste trabalho, Biswas e colaboradores desenvolveram a síntese assimétrica do hidroxialquiléster (**70**), podendo ser empregado como intermediário para a síntese dos alcalóides B e C através de uma amidação da isoquinolina correspondente e, no estágio final a trissulfatação. (BISWAS; CHATTOPADHYAY; SHARMA, 2010).

O plano sintético inicial consistiu, inicialmente, na monoproteção de um diol (**216**) empregando o cloreto de *ter*-butildifenilsilila (TBDSCl) para, em seguida ser oxidado com clorocromato de piridínio (PCC). A reação com brometo de vinilmagnésio forneceu o álcool alílico (**219**) e, este, foi submetido à resolução cinética. O álcool (**219**) foi resolvido com 50% de conversão empregando a CAL-B e foram obtidos excessos de 96 e 91% do álcool (*R*) e do acetato (*S*), respectivamente. O tratamento do acetato com fluoreto de tetrabutilamônio forneceu o respectivo produto (**222**) desprotegido. Em seguida, o tratamento com PCC e posterior reação com fosfonoacetato de trietila forneceu o éster conjugado (**224**), o primeiro bloco de construção da síntese (ESQUEMA 33).

ESQUEMA 33

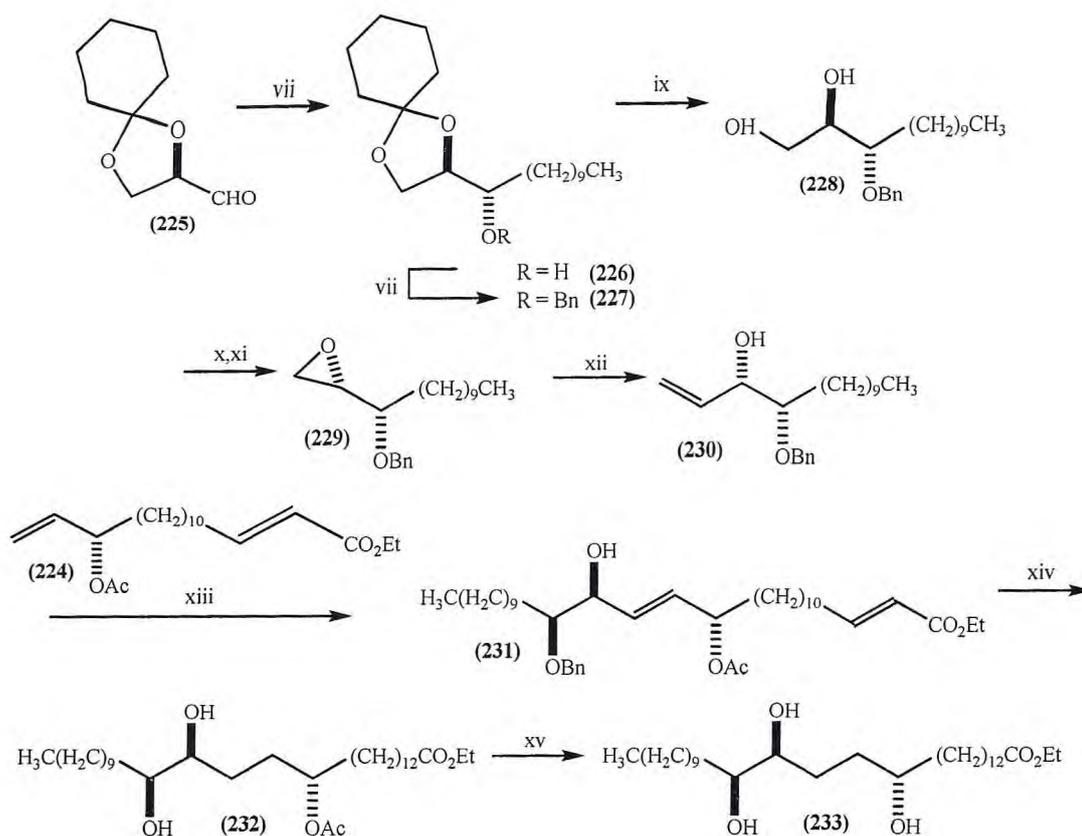


Reagentes e condições: (i) TBDPSCl/imidazol/DMAP/ $\text{CH}_2\text{Cl}_2/25^\circ\text{C}/8\text{h}$ (68%), (ii) PCC/NaOAc/ $\text{CH}_2\text{Cl}_2/25^\circ\text{C}/3\text{h}$ (92% e 88%), (iii) $\text{CH}_2=\text{CHMgBr}/\text{THF}/25^\circ\text{C}/6\text{h}$ (77%), (iv) acetato de vinila/Novozyme 435/ $25^\circ\text{C}/26\text{h}$ (50%), (v) $\text{Bu}_4\text{NF}/\text{THF}/0-25^\circ\text{C}/3\text{h}$ (93%), (vi) $\text{NaH}/\text{THF}/(\text{EtO})_2\text{P}(\text{O})\text{CH}_2\text{CO}_2\text{Et}/0^\circ\text{C}$ a $25^\circ\text{C}/18\text{h}$ (77%).

Para a síntese do segundo bloco de construção, os autores partiram do aldeído (225) que, na presença de $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_9\text{Li}$ forneceu o álcool (226) alquilado *anti* ($rd=96:4$). Em seguida, empregaram brometo de benzila e NaH para fornecer o produto (227) benzilado e, este por sua vez, na presença de ácido clorídrico gerou o triol monoprotetido (228) (etapa ix). Com o emprego de cloreto de trimetilsilila, seguida da mesilação com cloreto de mesila e tratamento com K_2CO_3 o epóxido (2*S*,3*S*) (229) foi formado. Este reagiu com uma sulforana gerada pela base butil-lítio e iodeto de trimetilsulfônio para fornecer o álcool alílico (230).

Na última sequência de reações, o álcool (230) foi submetido à metátese cruzada empregando o acetato alílico (224) obtido da resolução cinética (etapa xiii) com o reagente de Grubbs. O produto formado (231) foi submetido à hidrogenação com H_2 em paládio para formação do acetoxi éster (232), o qual foi, finalmente convertido à molécula alvo (233) empregando Amberlyst 15 para transesterificação do acetato com etanol (ESQUEMA 34, p.75).

ESQUEMA 34



Reagentes e condições: (vii) $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_9\text{Li}/\text{THF}/-78^\circ\text{C}/3\text{h}$ (81%), (viii) $\text{NaH}/\text{THF}/\text{BnBr}/\text{Bu}_4\text{NI}/\Delta/4\text{h}$ (93%), (ix) $\text{HCl } 2\text{M}/25^\circ\text{C}/6\text{h}$ (75%), (x) $\text{TMSCl}/\text{EtOAc}/-20^\circ\text{C}/20\text{ min}$; $\text{MsCl}/\text{Et}_3\text{N}/-20^\circ\text{C}/30\text{ min}$; $\text{HCl } 2\text{M}/25^\circ\text{C}/1\text{h}$ (79%), (xi) $\text{K}_2\text{CO}_3/\text{MeOH}/25^\circ\text{C}/3\text{h}$ (84%), (xii) $\text{Me}_3\text{Si}/\text{BuLi}/\text{THF}/-40^\circ\text{C}/1\text{h}$, e $25^\circ\text{C}/12\text{h}$ (80%), (xiii) catalisador de Grubbs de segunda geração/ $\text{CH}_2\text{Cl}_2/25^\circ\text{C}/22\text{h}$ (61%), (xiv) $\text{H}_2/10\% \text{ Pd-C}/\text{EtOH}/25^\circ\text{C}$ (88%), (xv) $\text{Amberlyst } 15/\text{EtOH}/25^\circ\text{C}/18\text{h}$ (91%).

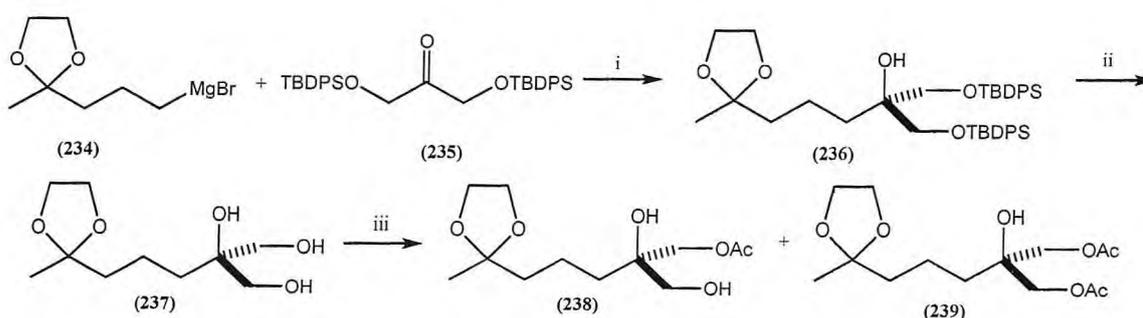
2.2.8. Emprego da PSC-I em resoluções cinéticas

A lipase de *Pseudomonas cepacia*, juntamente com a CAL-B, é uma das mais empregadas no campo da biocatálise para a preparação de moléculas quirais via resolução cinética. A lipase PS é uma enzima lipolítica distribuída em sua forma livre pela AMANO e imobilizada em partículas de cerâmica (PS-C) e em partículas de diatomáceas (PS-D). O pH ideal para se trabalhar com esta enzima situa-se entre 7,0 a 8,0 muito embora seja capaz de atuar em uma faixa bem maior (3,0 a 11,0). Neste capítulo relatamos alguns exemplos do emprego desta lipase no campo da biocatálise para obtenção de moléculas de interesse, sobretudo biológico.

A frontalina (ESQUEMA 36, p.76) é um feromônio de agregação de insetos da família *Dendroctonus*. Relatos da literatura indicam que este feromônio foi também

isolado de secreções da glândula temporal de elefantes e que a frontalina obtida do besouro *Dendroctonus frontalis* é uma mistura 85:15 do par enantiomérico (1*S*,5*R*) e (1*R*, 5*S*). O enantiômero (1*S*, 5*R*)-(-) é muito mais ativo que (1*R*, 5*S*)-(+) e, por haver poucas sínteses para o referido feromônio, Chenevet e Caron desenvolveram uma estratégia quimioenzimática para a síntese enantiosseletiva empregando a lipase PSC. A síntese teve como reagentes iniciais um composto organometálico de Grignard (**234**) e um derivado dihidroxilado da acetona (**235**). Após desproteção dos grupos hidroxila com TBAF, o produto obtido (**237**) foi submetido à desimetrização empregando a lipase de *Pseudomonas cepacia* e com a qual se obteve o monoéster (**238**) com 45% de rendimento e 90% de *ee* (*R*) (ESQUEMA 35). (CHÊNEVERT; CARON, 2002).

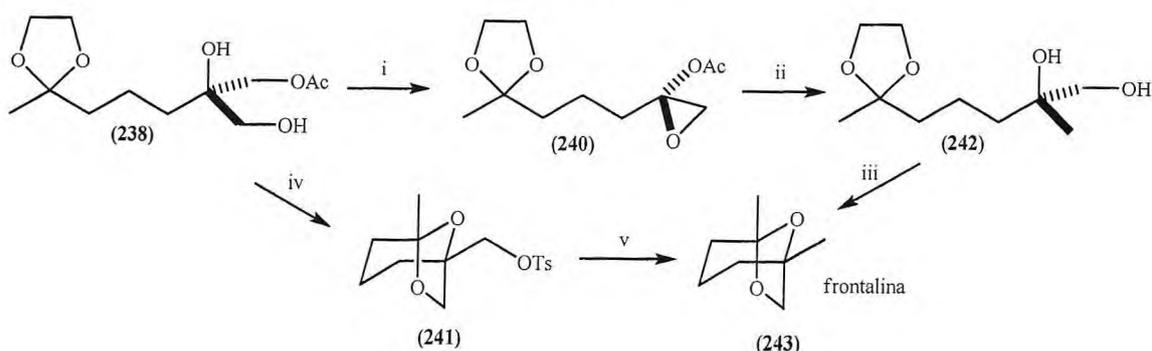
ESQUEMA 35



Reagentes e condições: (i) THF -78°C , 86%; (ii) TBAF, THF, 90%; (iii) lipase de *Pseudomonas* sp., acetato de vinila, benzeno.

O monoéster (**238**) proporcionou à síntese duas vias alternativas à obtenção da frontalina, uma delas foi composta por seis etapas com rendimento global de 26% e, alternativamente cinco etapas com rendimento global de 31% (ESQUEMA 36).

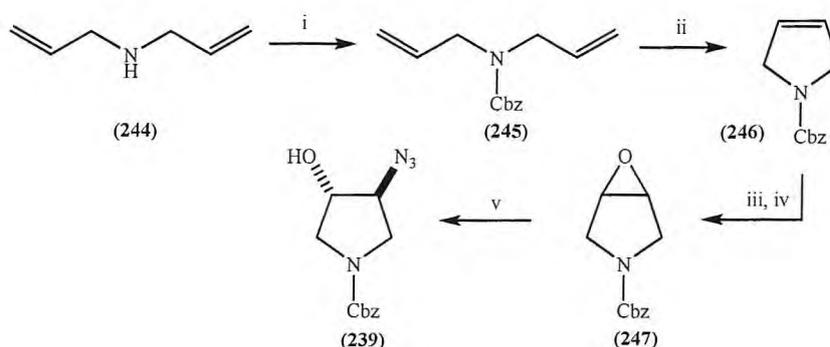
ESQUEMA 36



Reagentes e condições: (i) TsCl, Et₃N, DMAP, CH₂Cl₂, 90%; (ii) LiAlH₄, THF, 92%; (iii) TsOH, Et₂O, H₂O, 95%; (iv) TsCl, DMAP, piridina; TsOH, CH₂Cl₂, H₂O, 93%; (v) LiEt₃BH, THF, refluxo, 95%.

Kamal e colaboradores desenvolveram a preparação quimioenzimática da (3*S*,4*S*)-1-*tert*-butoxicarbonil-3-*tert*-butoxicarbonilamino-4-metoxipirrolidina (**254**). O referido composto é um intermediário chave na síntese do agente anti-tumoral AG-7352 e outros compostos heterocíclicos importantes do ponto de vista biológico (ESQUEMA 39, p.79). Desta maneira, realizaram a síntese de dois estereoisômeros - (3*S*,4*S*) e (3*R*,4*R*) - empregando a lipase de *Pseudomonas cepacia* para transesterificação do intermediário (**239**). Inicialmente, empregaram uma dialilamina comercial (**244**) para obtenção do racêmico (±)-*trans*-3-azido-1-Cbz-4-hidroxipirrolidina (**239**) após cinco passos reacionais (ESQUEMA 37). (KAMAL *et al.*, 2004^b).

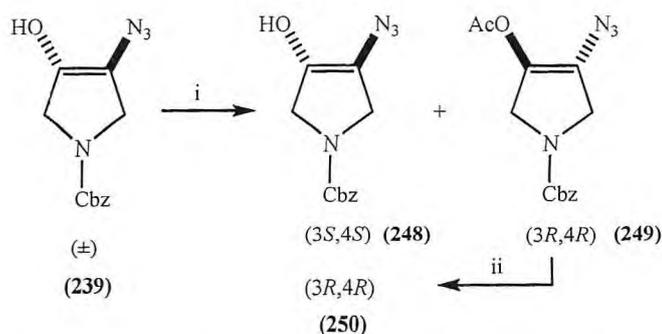
ESQUEMA 37



Reagentes e condições: (i) CbzCl, Et₃N, CH₂Cl₂ t.a., 10h, 98%; (ii) (Pcy₂)₂Cl₂Ru=CHPh, CH₂Cl₂, t.a., 6h, 96%; (iii) NBS, DMSO-H₂O, t.a., 2h, 89%; (iv) NaOH 1N, t.a., 1h, 76%; (v) NaN₃, 1,4-dioxano-H₂O, refluxo, 12h, 85%.

O produto (**239**) obtido foi submetido à resolução cinética na presença da lipase PS-C e acetato de vinila em éter diisopropílico fornecendo os produtos (3*S*,4*S*) com 46% de rendimento e excesso >99% e o (3*R*,4*R*) com 52% de rendimento e 81% de excesso enantiomérico. A desacetilação foi posteriormente conduzida na presença de K₂CO₃ em metanol para obtenção de ambos enantiômeros do substrato resolvidos (ESQUEMA 38, p.78).

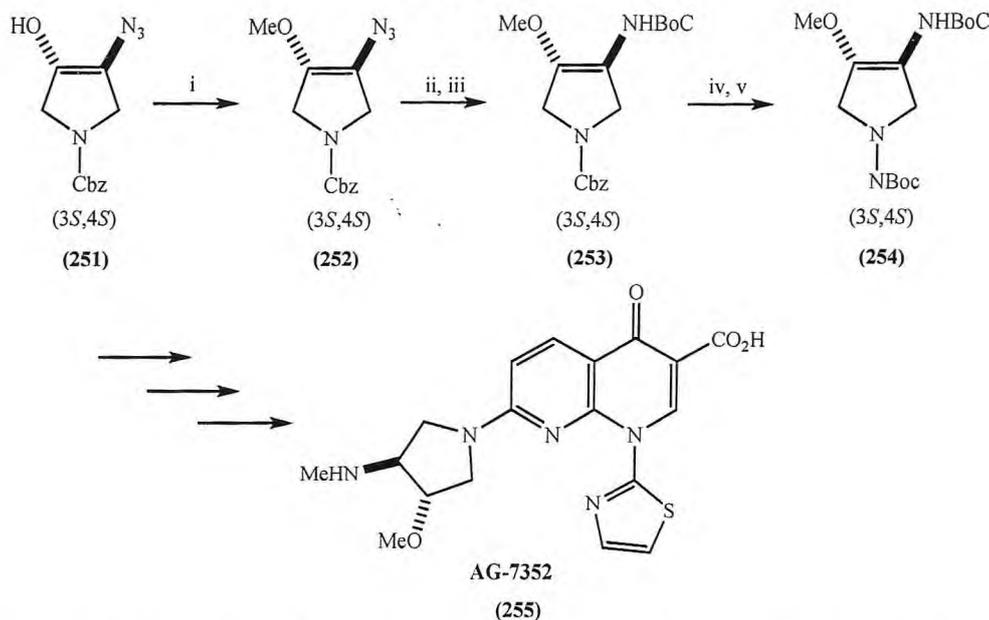
ESQUEMA 38



Reagentes e condições: (i) lipase PS-C, acetato de vinila, éter diisopropílico, 10h; (ii) K_2CO_3 , metanol, 2h.

O produto da etapa biocatalítica foi convertido ao respectivo éter metílico na presença de MeI e NaH e, posteriormente a azida foi reduzida a amina correspondente para proteção com $(Boc)_2O$. Desta maneira foi preparado o intermediário (3*S*,4*S*)-1-*tert*-butoxicarbonil-3-*tert*-butoxicarbonilamino-4-metoxipirrolidina (ESQUEMA 39) e seu antípoda (3*R*,4*R*) foi preparado de maneira similar.

ESQUEMA 39

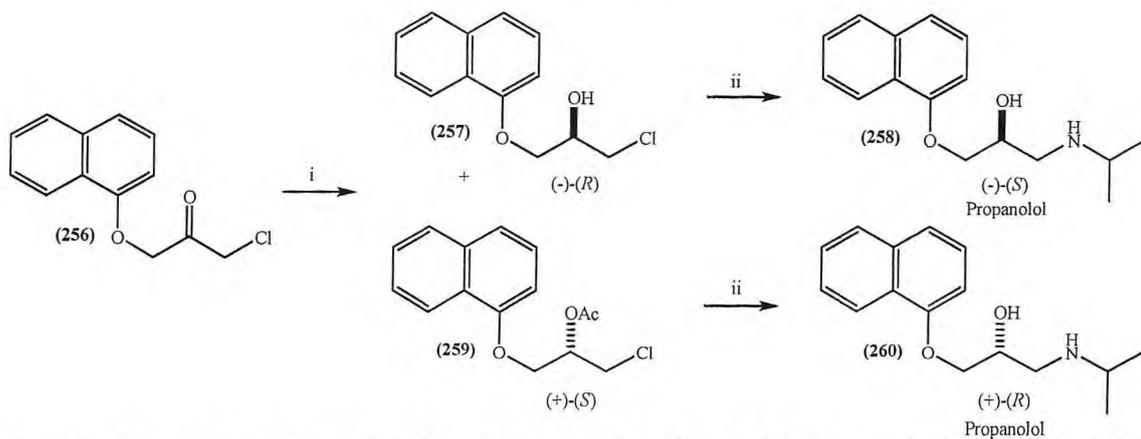


Reagentes e condições: (i) MeI, NaH, DMF, t.a., 6h, 72%; (ii) PPh_3 , THF- H_2O , t.a., 2h; (iii) $(Boc)_2O$, Et_3N , t.a., 6h, 93%; (iv) PHMS, 10% Pd/C, EtOH; (v) $(Boc)_2O$, Et_3N , t.a., 8h, 95%.

Kamal e colaboradores realizaram a síntese quimioenzimática dos biologicamente ativos propranolol e sotalol empregando a lipase de *Pseudomonas cepacia* (ESQUEMAS 40-41, p.79-80). O propranolol é um fármaco com diversas atividades biológicas clínicas tais como, no tratamento da angina peitoral, arritmia

cardíaca, feocromocitomas e hipertensão. Relatos indicam que o enantiômero ativo para o propranolol é o *S* por possuir uma maior afinidade com receptores β -1 e β -2. O sotalolol, por sua vez, é classificado como um antiarrítmico de classe III, sendo ambos enantiômeros ativos, porém a forma enantiomérica *levógira* é 20 vezes mais ativa que o seu antípoda. Neste trabalho foi relatada a preparação de ambos os enantiômeros dos referidos fármacos. Na preparação do propranolol a etapa de redução do material de partida foi realizada com subsequente adição da lipase no meio reacional, permitindo a resolução cinética do produto de redução obtendo-se 96% de *ee* do álcool e excesso superior a 99% do acetato (**ESQUEMA 40**). (KAMAL *et al.*, 2004^a).

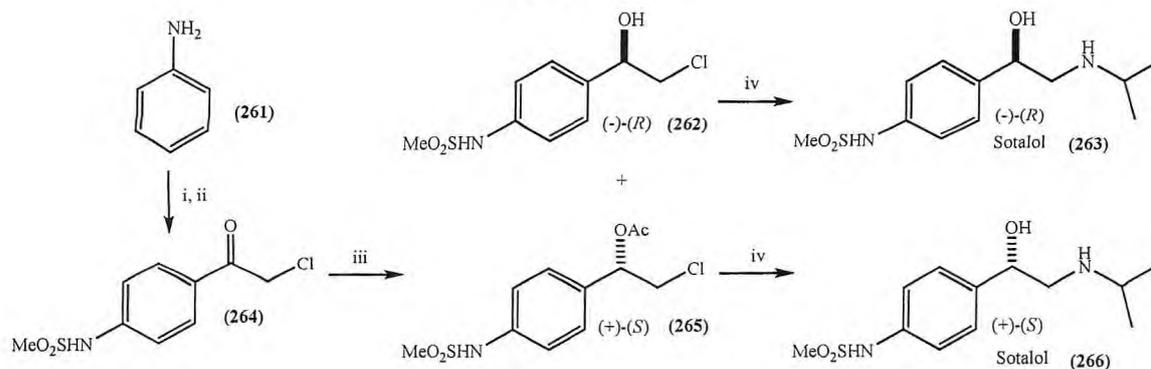
ESQUEMA 40



Reagentes e condições: (i) NaBH₄, Al₂O₃, éter diisopropílico, lipase PS-C, acetato de isopropenila, 40°C, 16 h; (ii) 10% NaOH aquoso, isopropilamina, isopropanol, t.a., 1 h, 95%.

Na preparação do sotalolol, o material de partida (anilina) foi convertido ao produto desejado ao final de quatro passos reacionais e, novamente, a redução foi acompanhada pela resolução cinética “one-pot”, obtendo-se excessos enantioméricos de 90 e 94%, do álcool e acetato, respectivamente (**ESQUEMA 41**).

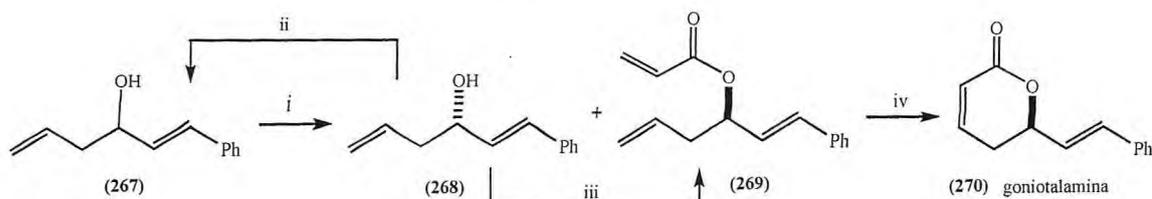
ESQUEMA 41



Reagentes e condições: (i) MeSO_2Cl , piridina, CH_2Cl_2 , t.a., 12 h, 94%; (ii) cloreto de cloroacetila, AlCl_3 , CH_2Cl_2 , t.a., 6 h, 75%; (iii) NaBH_4 , Al_2O_3 , éter diisopropílico, lipase PS-C, acetato de isopropenila, 40°C, 18 h; (iv) K_2CO_3 , MeOH, isopropilamina, t.a., 12 h, 80%.

A goniotalamina (**ESQUEMA 42, p.81**) é um constituinte natural isolado de plantas e animais marinhos e apresenta potencial biológico como anti-progestagênico e anti-estrogênico. Seu potencial de atividade contra células tumorais foi recentemente avaliado *in vitro* exibindo atividade anti-proliferativa. Por estas razões, Gruttadauria e colaboradores produziram o referido composto empregando etapas químicas e enzimáticas para a síntese enantiosseletiva. Como material de partida foi empregado um álcool alílico racêmico (267), a lipase de *Pseudomonas cepacia* e acrilato de vinila para promover a transesterificação. Estas condições promoveram a resolução cinética do álcool e com as quais obtiveram 48% de rendimento do álcool com 99% de *ee* e 48% de rendimento com 96% de *ee* do acetato. O álcool foi submetido à inversão de configuração empregando a reação de Mitsunobu com rendimento de apenas 21% e excesso de apenas 21%, por esta razão, a melhor alternativa consistiu na racemização promovida por DDQ e NaBH_4 em uma única etapa e com os quais foi obtido o produto racêmico com conversão completa. O acetato, finalmente foi submetido à condição de reação de metátese de olefinas na presença do catalisador de Grubbs (**ESQUEMA 42, p.81**) (GRUTTADAURIA; MEO; NOTO, 2004).

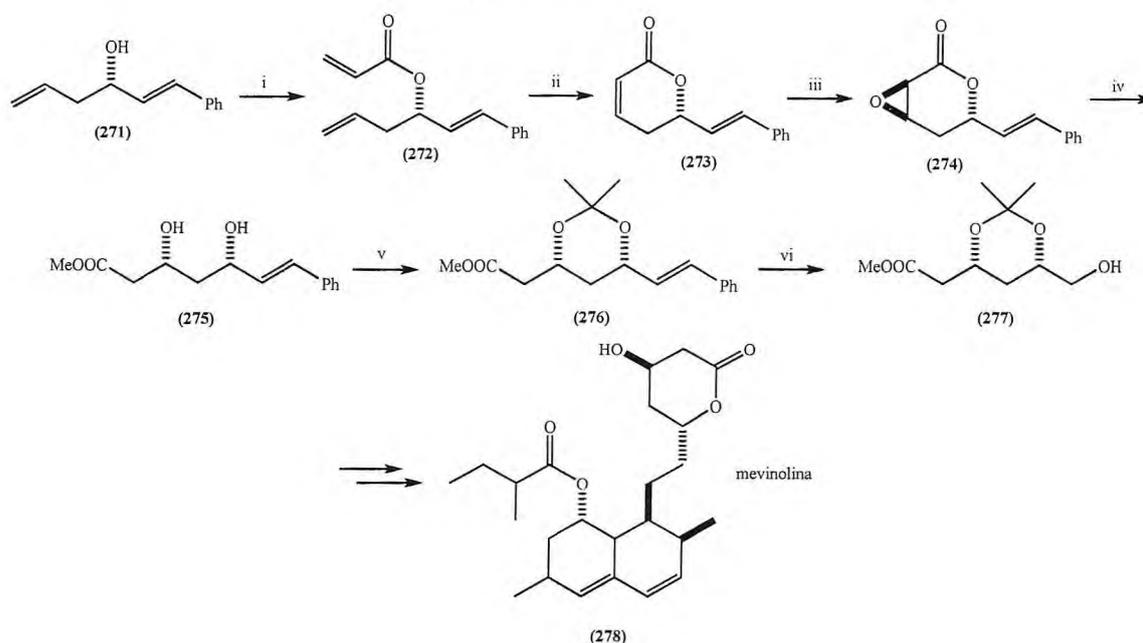
ESQUEMA 42



Reagentes e condições: (i) PS-C Amano II, tolueno, acrilato de vinila, 25°C, 24 h; (ii) (1) 2,3-dicloro-5,6-diciano-1,4-benzoquinona (DDQ), éter dietílico, (2) CH₃OH, NaBH₄, t.a., 95%; (iii) PPh₃, DEAD, ácido acrílico, tolueno, 0°C, t.a., 21%, 20% *ee*; (iv) (Pcy₃)₂Cl₂Ru=CHPh, Ti(OiPr)₄, CH₂Cl₂, 18 h, refluxo, 85%.

Paralelamente foi realizada a conversão do álcool enantiopuro de configuração (*S*) para que fosse possível a realização de testes biológicos relacionados ao antípoda da goniotalamina. Além disso, este produto foi empregado na preparação do bloco de construção da mevinolina (ESQUEMA 43), um potente inibitor da HMG-CoA redutase.

ESQUEMA 43

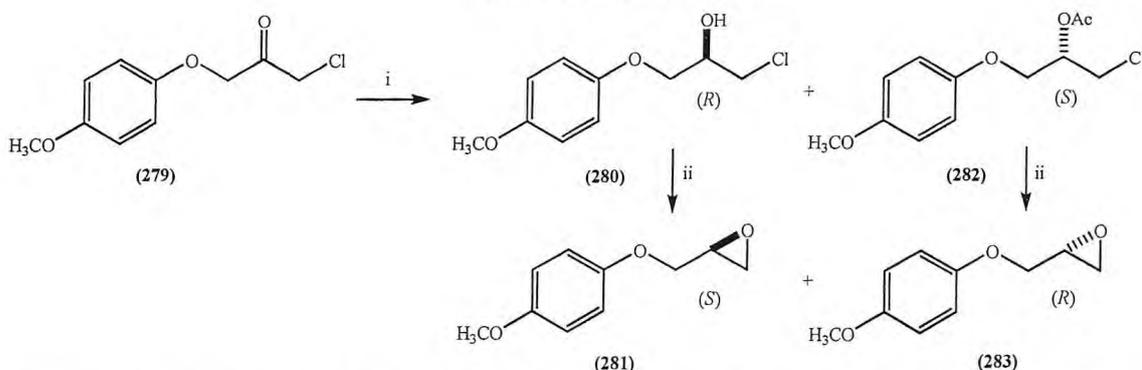


Reagentes e condições: (i) CH₂=CHCOCl, Et₃N, DMAP (cat.), 0°C, 90%; (ii) (Pcy₃)₂Cl₂Ru=CHPh, Ti(OiPr)₄, CH₂Cl₂, 18 h, refluxo, 80%; (iii) NaOH(aq), H₂O₂, MeOH, t.a., 75%; (iv) (PhSe)₂, NaBH₄, MeOH, t.a., 88%; (v) CH₃COCH₃, PTSA, CuSO₄, t.a., 85%; (vi) O₃, MeOH, 78°C, NaBH₄, t.a., 75%.

Kamal e colaboradores prepararam os enantiômeros (*R*) e (*S*) do *O*-(4-metoxifenil)-glicidol, através de uma redução química seguida pela resolução cinética

“one-pot” mediada pela lipase de *Pseudomonas cepacia* (PS-C) (ESQUEMA 44, p.82). Estes glicidóis quirais foram posteriormente empregados como precursores na síntese de 1,2-*O*-diacil-*sn*-gliceróis, com alta enantiosseletividade e facilidade na preparação quando comparados com outros métodos descritos anteriormente. A resolução cinética foi mantida por duas horas a 40°C e obtiveram excessos >99 e 92% do álcool e acetato, respectivamente (ESQUEMA 44). (KAMAL *et al.*, 2005^a).

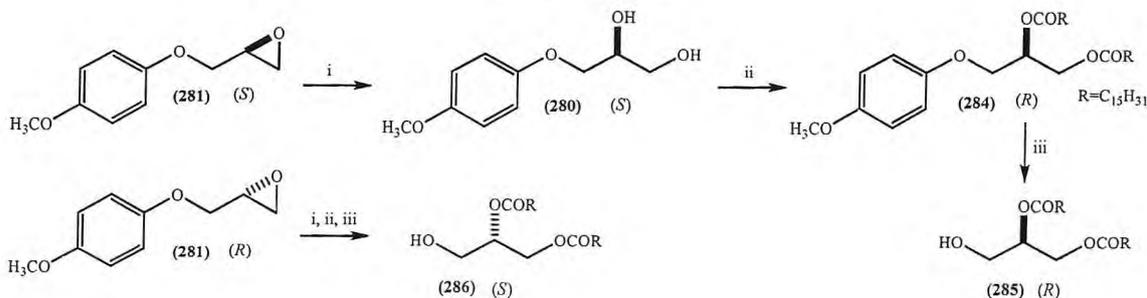
ESQUEMA 44



Reagentes e condições: (i) (a) NaBH₄, Al₂O₃, éter diisopropílico, 3h, 99%, (b) lipase PS-C, acetato de isopropenila, 40°C, 2h; (ii) 10% NaOH aquoso, t.a., 1h, 75%.

Os glicidóis gerados foram empregados na preparação de gliceróis derivados do ácido palmítico pelo tratamento dos dióis com ácido palmítico na presença de DCC e DMAP. Em seguida, utilizaram nitrato cérico de amônio (CAN) para desproteção do grupo PMP. Esta etapa forneceu os gliceróis (*R*) e (*S*) com excessos de 97 e 90%, respectivamente (ESQUEMA 45).

ESQUEMA 45

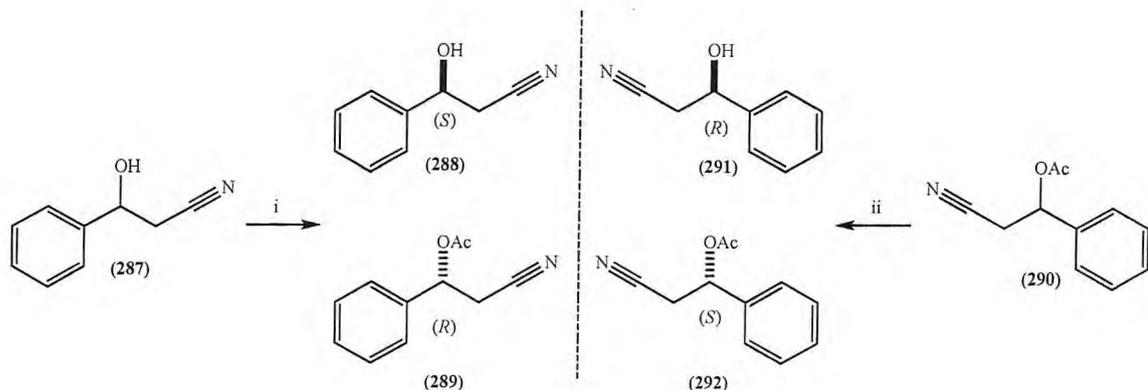


Reagentes e condições: (i) CBr₄, H₂O, refluxo, 4h, 80%; (ii) ácido palmítico (C₁₅H₃₁COOH), DCC, DMAP, CH₂Cl₂, t.a., 60 h, 89%; (iii) CAN, CH₃CN, H₂O, t.a., 12 h, 94%.

O levamisol (ESQUEMA 47, p.84) é um agente anti-helmíntico que possui propriedades imunomodulatória, imunestimulatória e atualmente é empregado também

na terapia contra o câncer e tratamento de doenças crônicas. Pelo fato de não haver muitas sínteses relacionadas à preparação do referido composto, Kamal e colaboradores realizaram a primeira síntese quimioenzimática empregando na etapa enzimática a lipase de *Pseudomonas cepacia*. O desenvolvimento do trabalho teve início com a resolução cinética de uma β -hidroxinitrila (**287**) ou, alternativamente o respectivo componente acetilado (**290**). A transesterificação da 3-hidroxi-3-fenilpropanonitrila foi conduzida na presença de acetato de vinila e obtiveram excesso superior a 99% do acetato e conversão próxima a 50%. Com a hidrólise da 3-acetoxi-3-fenilpropanonitrila em tampão fosfato foi possível obter 41% do álcool com 99% de excesso enantiomérico e o acetato com 40% de conversão e 99% de excesso em 14 horas de reação (**ESQUEMA 46**). (KAMAL *et al.*, 2005^b).

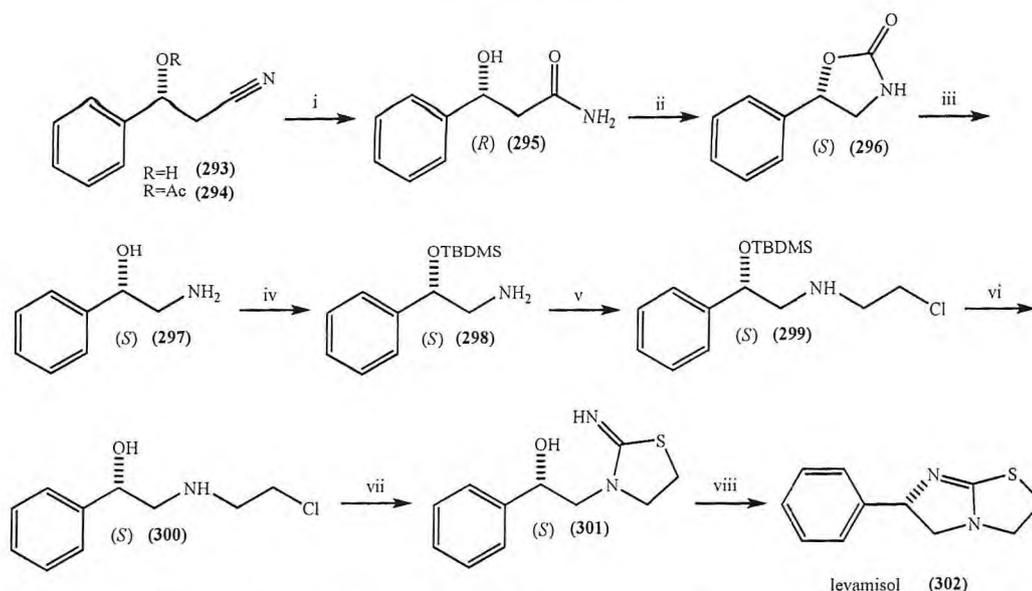
ESQUEMA 46



Reagentes e condições: (i) lipase de *Pseudomonas cepacia* (PS-C) imobilizada, acetato de vinila, éter diisopropílico; (ii) lipase de *Pseudomonas cepacia*, tampão fosfato (pH = 7.2).

O produto enantiopuro da resolução cinética foi empregado na preparação do levamisol após oito etapas reacionais (**ESQUEMA 47, p.84**).

ESQUEMA 47



Reagentes e condições: (i) H_2O_2 , NH_3 aquoso, rend. quant.; (ii) $\text{Pb}(\text{OAc})_4$, piridina, 80%; (iii) NaOH , $\text{EtOH-H}_2\text{O}$, refluxo, 79%; (iv) TBDMSCl , imidazol; (v) 1,2-dicloroetano, K_2CO_3 , éter coroa, 60%; (vi) TBAF , THF ; (vii) KSCN , $\text{EtOH-H}_2\text{O}$; (viii) SOCl_2 , CH_2Cl_2 , 50%.

O (+)-curcumeno (**303**) é um sesquiterpeno isolado do rizoma de *Curcuma aromatica salisb* e é reconhecido pelo seu odor característico de corais, por outro lado, o (+)-curcufenol é um constituinte majoritário de diferentes espécies de esponjas e é conhecido por possuir uma potente atividade inibitória da H/K-ATPase, antiplasmodial e atividade citotóxica. O seu antípoda, o (-)-curcufenol (**304**) possui atividade antibacteriana e, atualmente, dímeros de curcufenol (**305**) foram isolados e avaliados quanto às suas importâncias biológicas (Figura 2.14).

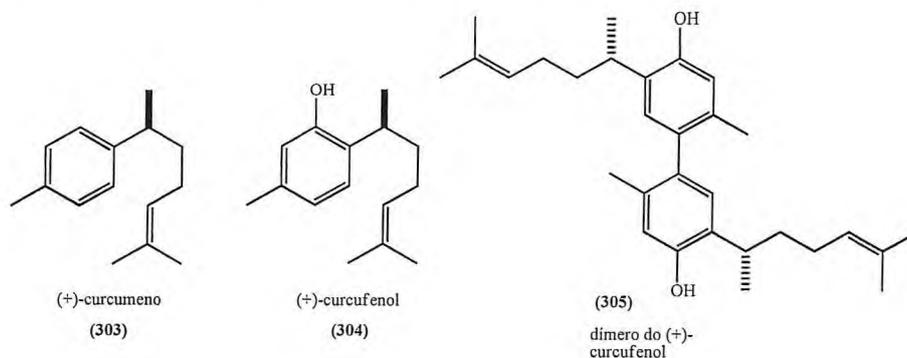
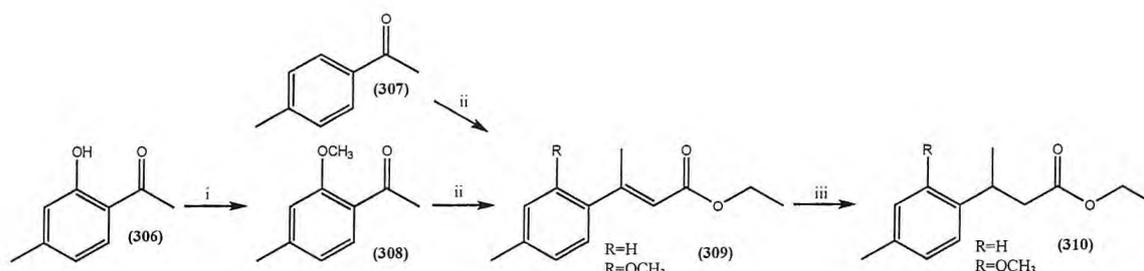


Figura 2.14 - Estruturas do curcumeno, curcufenol e do dímero do curcufenol

Kamal e seu grupo de colaboradores desenvolveram a preparação destas moléculas com alta pureza enantiomérica. Como material de partida empregaram a 2-

hidroxi-4-metil-acetofenona (**306**) e 4-metil-acetofenona (**307**). Estas acetofenonas foram convertidas ao éster α,β -insaturado (**309**) através da reação de Horner-Wadsworth-Emmons na presença de fosfonoacetato de trietila e hidreto de sódio para, em seguida, reagir com hidrogênio em paládio e formar o produto (**310**) (ESQUEMA 48). (KAMAL *et al.*, 2007^a).

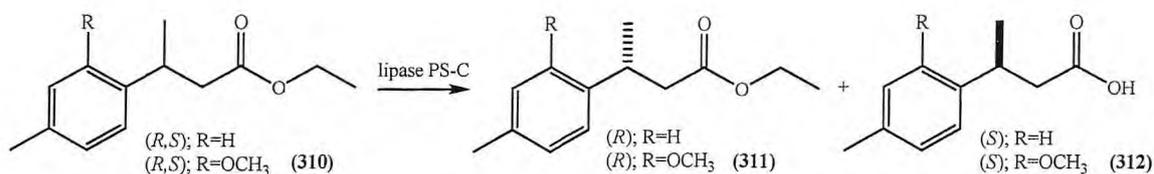
ESQUEMA 48



Reagentes e condições: (i) Me₂SO₄, K₂CO₃, acetona, 92%; (ii) NaH, (EtO)₂POCH₂CO₂Et, THF, 72-81%; (iii) H₂, 10% Pd-C, MeOH, 95-97%.

Em seguida, utilizaram o produto (**310**) obtido na hidrogenação como substrato para resolução cinética empregando dez lipases comerciais (ESQUEMA 49). As lipases de *Candida cylindracea* (CCL), pâncreas de porco (PPL) e *Candida rugosa* (CRL) não mostraram alta enantiosseletividade, ao passo que, as lipases de *Carica papaya* e Lipozyme (*Mucor miehei*) não mostraram qualquer conversão, mesmo após tempos reacionais prolongados.

ESQUEMA 49



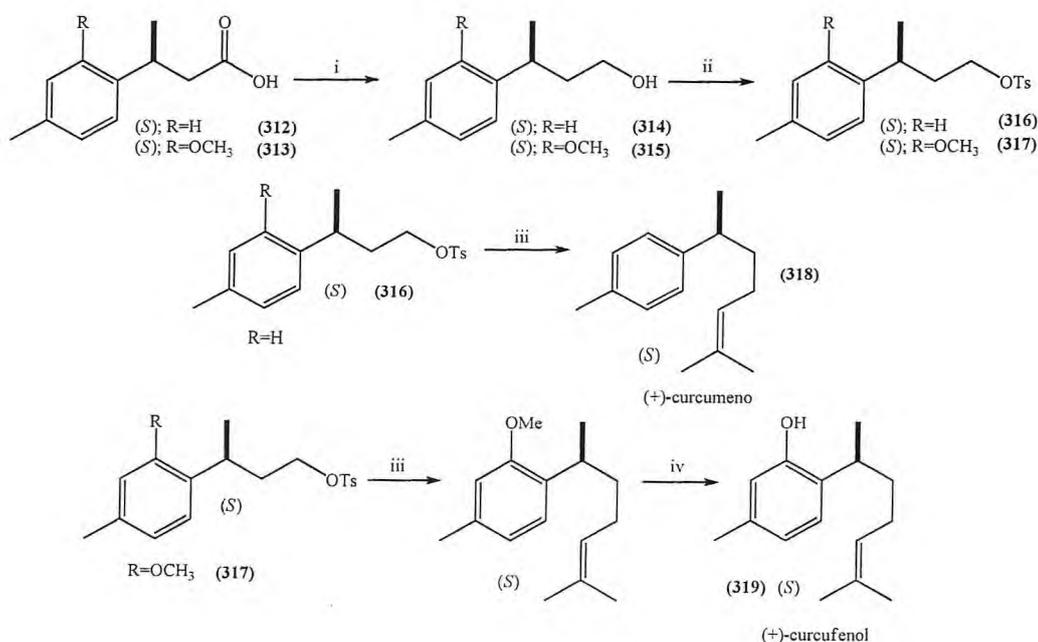
Reagentes e condições: (i) Lipase PS-C, tampão fosfato pH 7.

Os melhores resultados foram obtidos empregando a lipase de *Pseudomonas cepacia* e suas variações PSC e PS-D (imobilizadas em partículas de cerâmica e terra diatomácea, respectivamente) além da *Pseudomonas fluorescens* (AK-20, Amano). Entre estas, a enzima PS-D e a PS forneceram o ácido com 96 e 90% de *ee*, respectivamente; o éster por sua vez foi obtido com 72 e 81% de *ee*, respectivamente. Com o emprego das enzimas PS-C e AK-20 o éster foi obtido com 92 e 86% de *ee*,

enquanto que o ácido foi recuperado com excelente pureza enantiomérica (>99%) em ambos os casos.

Posteriormente, o ácido obtido da resolução cinética foi reduzido com hidreto de alumínio e lítio ao seu correspondente álcool primário, para em seguida ser convertido ao respectivo tosilato na presença de cloreto de tosilato e trietilamina como base. Por fim foi realizada o acoplamento do tosilato com brometo de 2-metil-1-propenil-magnésio catalisado por brometo de cobre e sulfeto de dimetila para formação do composto final (+)-curcumeno. O (+)-curcufenol foi preparado seguindo os mesmos procedimentos relatados e, ao final o éter metílico foi convertido ao respectivo hidroxilado pelo emprego de tribrometo de boro (ESQUEMA 50).

ESQUEMA 50



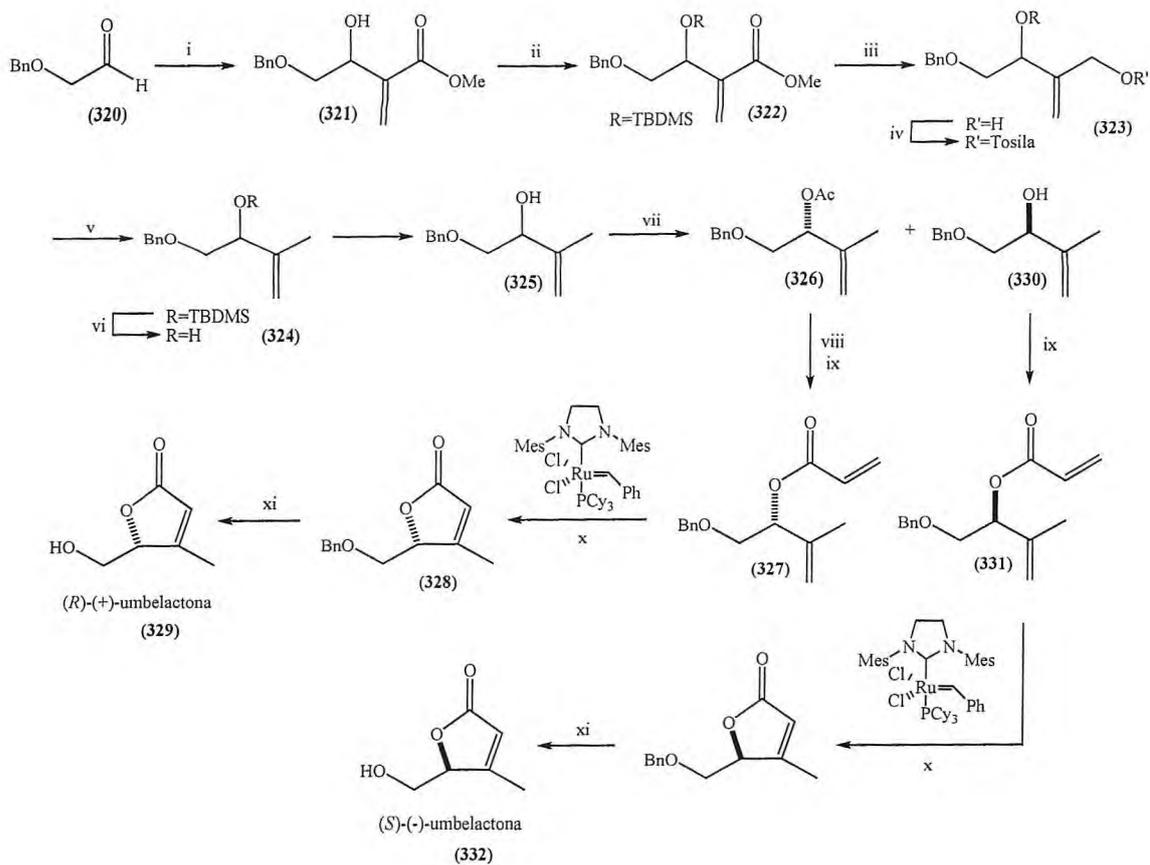
Reagentes: (i) LiAlH₄, THF, 92-93%; (ii) TsCl, TEA, DMAP, CH₂Cl₂, 82-84%; (iii) (CH₃)₂C=CHMgBr, CuBr.Me₂S, THF, 67-72%; (iv) BBr₃, CH₂Cl₂, 68%.

Os butenolídeos apresentam uma variedade de atividades biológicas, tais como, inseticida, bactericida, fungicida, antibiótico, anticâncer, antiinflamatória e antialérgica. A (*R*)-umbelactona (332) é um exemplo de produto natural desta classe de compostos γ -(hidroximetil)- α,β -butenolídeos isolados da planta *Memycelon umbelatum*. O extrato bruto desta planta mostrou-se promissor em diversas atividades biológicas como antiviral e espasmolítica. Por esta razão Kamal e colaboradores prepararam o referido produto natural empregando etapas químicas como o protocolo de Baylis-Hillman e a

reação de metátese (RCM) e enzimática empregando uma lipase para resolução cinética. (KAMAL *et al.*, 2007^b).

Inicialmente, os autores prepararam o éster (**321**) através da reação de Baylis-Hillman ao empregar o aldeído (**320**) na presença acrilato de metila e quinuclidina. Em seguida, a hidroxila foi protegida pelo emprego de TBDMSCl para posterior redução do éster com DIBAL-H. O álcool alílico (**323**) foi convertido no respectivo tosilato (etapa iv), reduzido com LiAlH₄ (etapa v) e, em seguida o grupo TBDMS foi removido para resolução cinética de (**325**) (etapa vii). Foram empregadas oito lipases comerciais: lipase de *Pseudomonas cepacia* imobilizada em partículas de cerâmica (PS-C), lipase de *Pseudomonas cepacia* imobilizada em diatomita (PS-D), lipase de *Pseudomonas cepacia* (PS Amano), lipase de *Mucor meihei* imobilizada (MML), lipase de *Pseudomonas fluorescens* imobilizada, lipase de *Candida antarctica* (CAL-B), lipase de *Candida cyclindracea* (CCL) e lipase de *Candida rugosa* (CRL). O melhor resultado foi obtido com a lipase *Pseudomonas cepacia* com rendimento do álcool em 46% e *ee* de 98%, o acetato foi obtido com 45% de rendimento e excesso de 99%. O álcool foi, então, esterificado usando cloreto de acrilóila e trietilamina (etapa ix) para ser usado na reação de metátese na presença do catalisador de Grubbs. O produto de condensação (**328**) foi tratado com TiCl₄ para desbenzilação e formação do produto final (*S*)-umbelactona. O seu antípoda foi preparado seguindo as etapas descritas no **ESQUEMA 51, p.88**.

ESQUEMA 51



Reagentes e condições: (i) acrilato de metila, quinuclidina, MeOH, 8h, 90%; (ii) TBDMSCl, imidazol, CH₂Cl₂, DMAP, 0°C a t.a., 6h, 96%; (iii) DIBAL-H, CH₂Cl₂, -78°C, 1h, 95%; (iv) TsCl, Et₃N, CH₂Cl₂, DMAP, t.a., 4h, 75%; (v) LiAlH₄, THF, 1h, 88%; (vi) TBAF, THF, 0°C a t.a., 2h, 85%; (vii) Lipase PS-C, acetato de vinila, hexano, 6h; (viii) K₂CO₃, MeOH, 0°C a t.a., 1h, 90%; (ix) cloreto de acrilofla, Et₃N, CH₂Cl₂, DMAP, 0°C a t.a., 30 min, 85%; (x) catalisador de Grubbs, CH₂Cl₂, 35°C, 48h, 65%; (xi) TiCl₄, CH₂Cl₂, 0°C a t.a., 10 min, 90%.

A pilocarpina (333) é um produto natural isolado das folhas de *Pilocarpus jaborandi*, assim como outros constituintes derivados como a (+)-isopilocarpina, (+)-pilocarpidina, (+)-pilosina e a (+)-isopilosina (Figura 2.15). Trata-se de um dos mais bem sucedidos compostos relatados na literatura, por possuir diversas atividades biológicas como, por exemplo, no emprego no tratamento da xerostomia, síndrome de Sjogren e glaucoma. Muitas sínteses descritas na literatura referem-se à obtenção da Pilocarpina em sua forma racêmica ou como misturas com outros isômeros, geralmente após várias etapas racionais levando a baixos rendimentos do produto final.

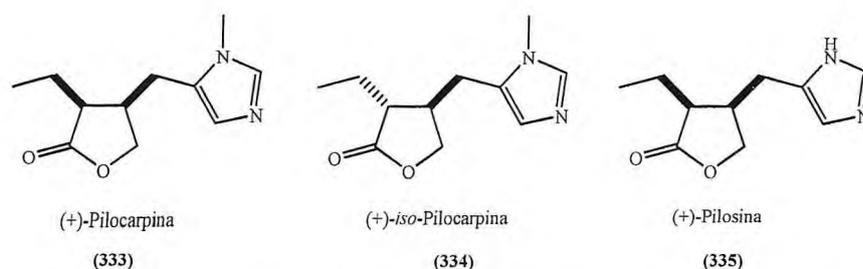
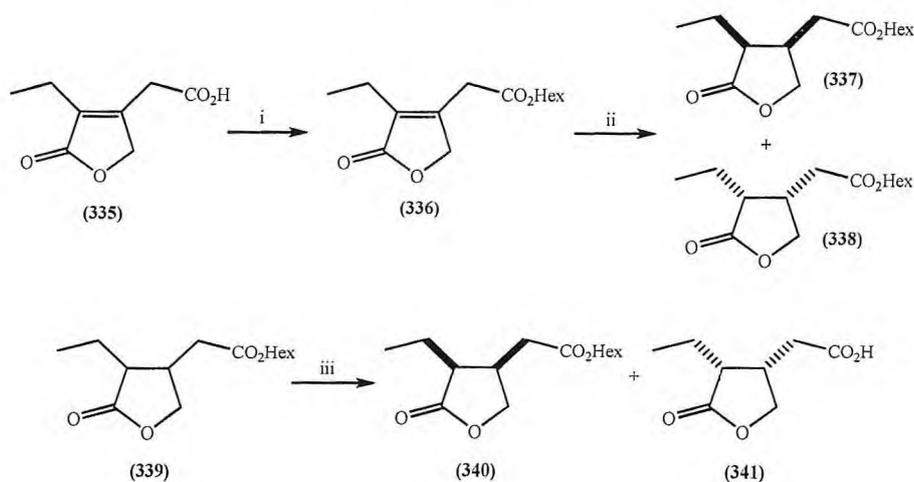


Figura 2.15 - Estruturas da (+)-pilocarpina, (+)-isopilocarpina e (+)-pilosina

Por esta razão, René Csuk e Barbara Woeste desenvolveram uma estratégia baseada na aplicação de lipases para síntese enantiosseletiva da pilocarpina com alta pureza enantiomérica. Inicialmente, empregaram o ácido (335) para conversão em seu respectivo éster (336) em rendimento quase quantitativo. Em seguida, o produto foi hidrogenado com H_2 na presença de ródio e óxido de alumínio para posterior resolução cinética. O tratamento do produto da reação de hidrogenação (339) com a lipase PS Amano forneceu o respectivo ácido com 42% de rendimento e $ee >99\%$ ao passo que o éster remanescente foi recuperado em 48% com excesso superior a 99%. Outras lipases foram empregadas, contudo, baixos valores de excessos enantioméricos foram obtidos empregando as lipases de *Candida lipolytica*, *Penicillium roqueforti*, lipase AY, Amano 10, lipolase 100, lipozyme, protease (tipo XXIII) de *Aspergillus oryzae*, PLE ou subtilisina (ESQUEMA 52). (CSUK; WOESTE, 2008).

ESQUEMA 52

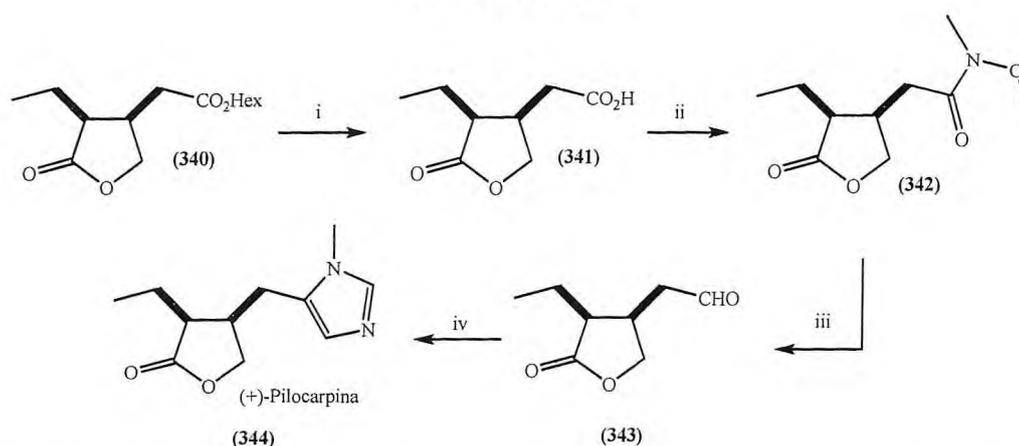


Reagentes e condições: (i) Hex-OH, $SOCl_2$, Δ , 98%; (ii) Rh/Al₂O₃/H₂, quant.; (iii) lipase PS, pH=7,48%

O éster (340) com pureza enantiomérica $>99\%$ foi hidrolisado pela esterase de fígado de porco (PLE) para evitar problemas relacionados à isomerização e desta

maneira o ácido correspondente (**341**) foi obtido em 96% de rendimento. O ácido foi submetido à reação de Weinreb na presença de N-metil-morfolina para formação do produto (**342**) o qual foi reduzido ao aldeído correspondente pelo emprego de hidreto de alumínio e lítio. Finalmente, o tratamento com metilamina e K_2CO_3 forneceu a correspondente base de Schiff, permitindo assim a cicloadição [3+2] com *p*-metiltosiliscianeto. Esta reação teve duração de sete dias para produção da pilocarpina com 60% de rendimento e *ee* >99% (ESQUEMA 53).

ESQUEMA 53



Reagentes e condições: (i) PLE, pH=7,96%; (ii) NMM, $ClCO_2$ -*i*-Bu, $H_3CNHOCH_3$, 85%; (iii) $LiAlH_4$, $-45^\circ C$, 95%; (iv) $CH_3NH_2/K_2CO_3/H_3CC_6H_4SO_2CH_2NC$, NEt_3 , 60%.

A (*S*)-(+)-turmerona (**345**) é um dos constituintes de óleos essenciais de rizomas de *Curcuma longa* e é relatado por possuir atividade citotóxica, anti-inflamatória e inibição da agregação de plaquetas. Seu isômero (*R*) tem sido utilizado no desenvolvimento de metodologias sintéticas e é também um precursor para outros sesquiterpenos tais como (*R*)-*ar*-himachaleno, um feromônio sexual do inseto *Aphthona flava*. O (7*S*,9*R*)-bisacumol é outro exemplo de sesquiterpeno derivado da rizoma de *Curcuma xanthorrhiza*, *Curcuma zedaria* e das folhas de *Baccharis dracunculifolia* e exibe potente atividade citotóxica particularmente contra a leucemia.

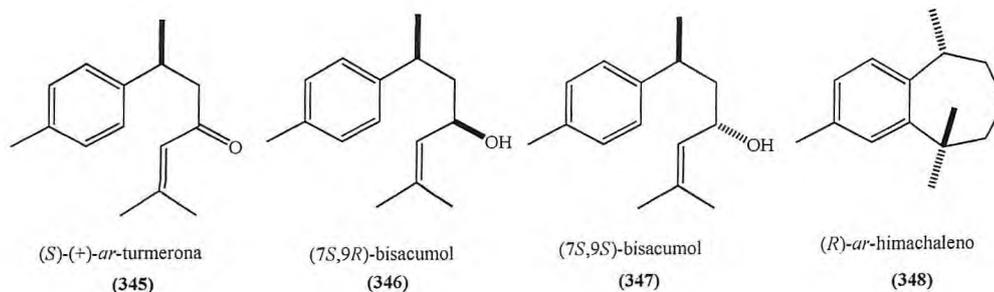
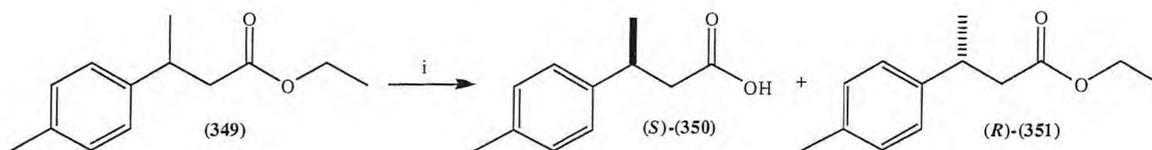


Figura 2.16 - Estruturas da turmerona, bisacumol e himachaleno

Recentemente, Kamal e colaboradores planejaram uma bem sucedida preparação da (*S*)-(+)-turmerona e ambos (*7S,9R*) e (*7S,9S*)-bisacumol empregando protocolos químicos e enzimáticos. Inicialmente, empregaram o éster racêmico (**349**) como material de partida para a resolução cinética mediada pela lipase de *Pseudomonas cepacia*. Esta notável etapa forneceu o respectivo ácido com *ee* de 99% (*S*) além do remanescente éster com *ee* de 92% (*R*) (**ESQUEMA 54**). (KAMAL *et al.*, 2009).

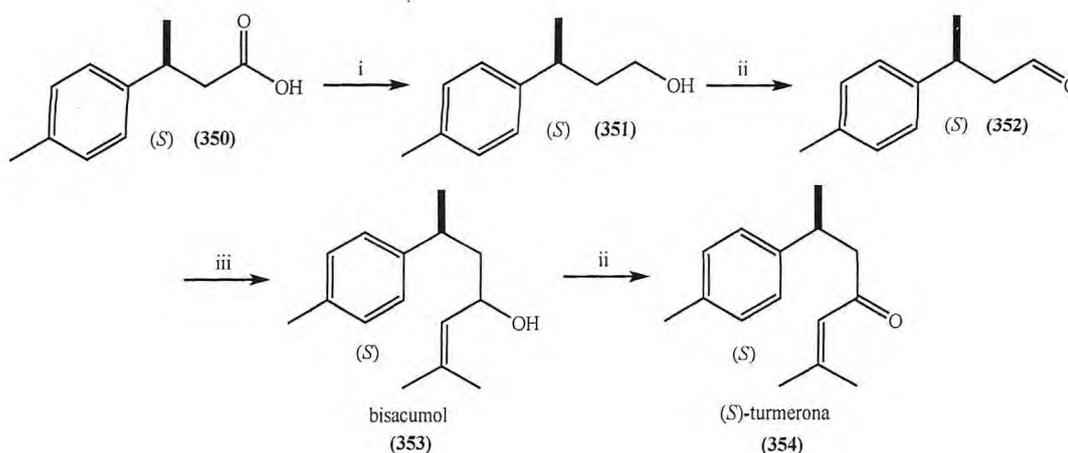
ESQUEMA 54



Reagentes e condições: (i) lipase PS-C, tampão fosfato, pH 7, 30°C.

O ácido (**350**) foi reduzido ao respectivo álcool primário (**351**) na presença de hidreto de lítio e alumínio (LiAlH_4) com rendimento quantitativo. Em seguida, o álcool (**351**) foi convertido ao aldeído (**352**) através de uma reação de oxidação de Swern para posterior adição nucleofílica empregando o reagente de Grignard (brometo de 2-metil-1-propenil-magnésio). Finalmente o produto (**353**) foi oxidado por cloreto de oxalila em dimetil-sulfóxido e assim, o produto almejado, (*S*)-turmerona, foi obtido (**ESQUEMA 55, p.92**).

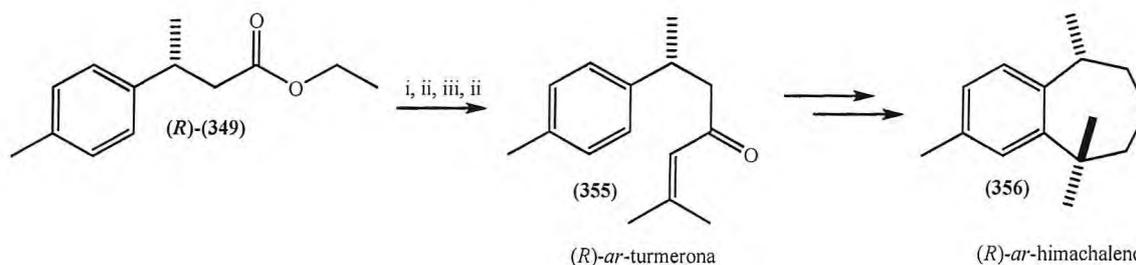
ESQUEMA 55



Reagentes e condições: (i) LiAlH_4 , THF, t.a., 93%; (ii) $(\text{COCl})_2$, DMSO, TEA, CH_2Cl_2 , -78°C , 83%; (iii) brometo de 2-metil-1-propenil magnésio, THF, -60°C , 72%.

De maneira similar, o éster enantiopuro (349) foi convertido à (*R*)-turmerona seguindo os mesmos passos reacionais empregados na preparação de seu antípoda. A turmerona preparada nesta etapa é um precursor na síntese do (*R*)-*ar*-himachaleno, o feromônio produzido pelo macho da espécie *Apthona flava* (ESQUEMA 56).

ESQUEMA 56

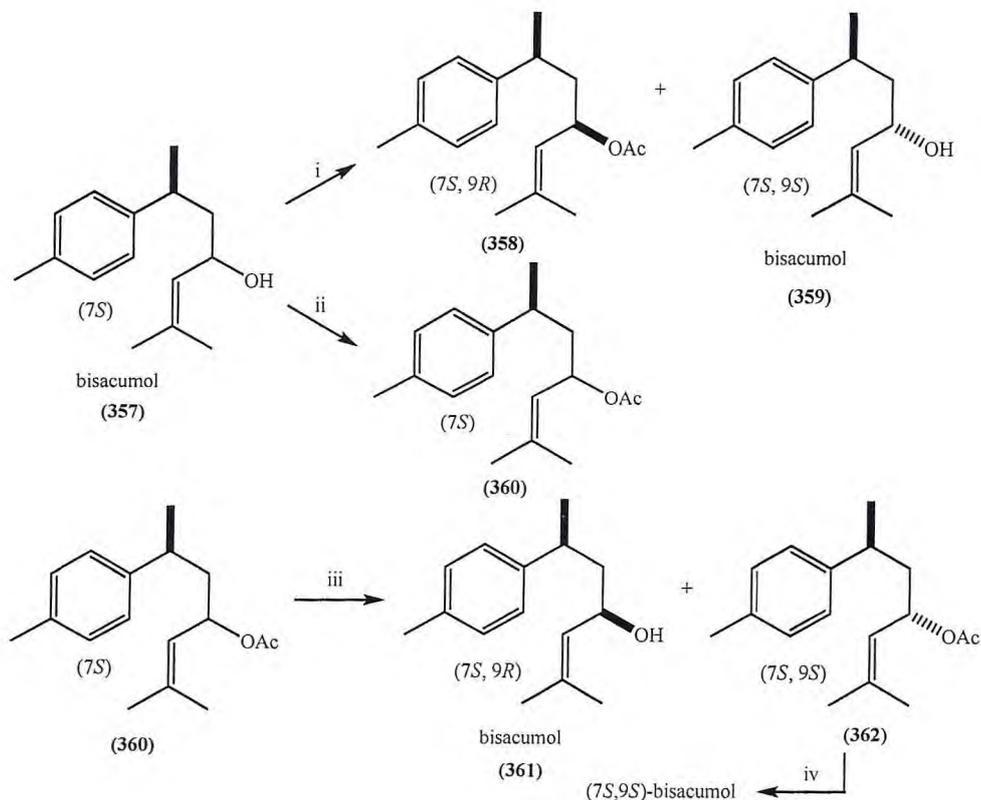


Reagentes e condições: (i) LAH, THF, t.a., 93%; (ii) $(\text{COCl})_2$, DMSO, TEA, CH_2Cl_2 , -78°C , 83%; (iii) brometo de 2-metil-1-propenil magnésio, THF, -60°C , 72%.

A mistura diastereoisomérica do bisacumol foi submetida à resolução cinética mediada por lipase para obtenção do produto (7*S*, 9*R*), porém, baixos rendimentos (5-7%) foram obtidos mesmo após um extensivo estudo para transesterificação em tempos de até oito dias empregando diversas lipases. Por esta razão, a melhor alternativa consistiu na hidrólise catalisada por lipase do acetato do Bisacumol preparado anteriormente na presença de anidrido acético, trietilamina e DMAP. Oito enzimas comerciais foram selecionadas para hidrólise do acetato racêmico e, dentre elas, as

lipases PS, PS-C e PS-D deram os melhores resultados. Com o emprego da lipase PS e PS-D o álcool foi obtido com 91 e 88% de *ed*, ao passo que o acetato foi recuperado com 60 e 42% de *ed*. A lipase PS-C forneceu o álcool (7*S*,9*R*) com 94% de *ed* e seu acetato (7*S*,9*S*) em 62% de *ed*. (ESQUEMA 57).

ESQUEMA 57



Reagentes e condições: (i) lipase, acetato de isopropenila (IPA), DIPE, 45°C; (ii) Ac₂O, Et₃N, DMAP, CH₂Cl₂, 92% (iii) lipase PS-C, tampão fosfato, pH 7, 30°C; (iv) K₂CO₃, MeOH, 92%.

2.3. QUINONAS COMO AGENTES TERAPÊUTICOS

2.3.1. Quinonas - Definição e propriedades

Quinonas são compostos orgânicos que podem ser considerados como produtos de oxidação de fenóis; da mesma forma, a redução de quinonas pode originar os correspondentes fenóis. Sua principal característica é a presença de dois grupos carbonílicos que formam um sistema conjugado com pelo menos duas ligações duplas C-C (**Figura 2.17**). As *o*- e *p*-quinonas são 1,2- e 1,4-dicetonas cíclicas conjugadas; *m*- ou 1,3-quinonas não existem.

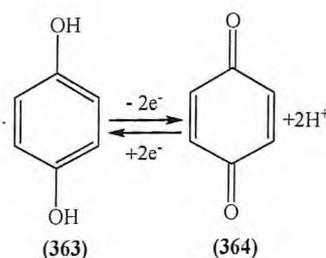


Figura 2.17 - Representação do sistema de oxirredução das quinonas

As quinonas são compostos que possuem diversas atividades biológicas e são empregadas desde a antiguidade como substâncias com propriedades antibacteriana, antitumoral, antiinflamatória, tripanossomicida, anticancerígena e ainda como corantes naturais. Elas podem ser encontradas em várias partes vegetativas de plantas superiores, algas, fungos e como subproduto do metabolismo de algumas bactérias. A unidade quinóide (1,4-dicetocicloexa-2,5-dieno ou 1,2-dicetocicloexa-3,5-dieno) ocorre com relativa abundância em substâncias de origem biológica. A nomenclatura das quinonas é definida pelo esqueleto do anel aromático, estabelecendo-se as posições dos grupos carbonílicos na molécula (1,2- ou *orto* e 1,4- ou *para*) e acrescentando-se o sufixo quinona. Em função do tipo de ciclo no qual encontra-se o sistema de duplas tem-se três grupos principais de quinonas naturais e sintéticas, as benzo-, nafto- e antraquinonas. Encontram-se também descritas na literatura, as quinonas terpênicas e policíclicas de estruturas mais complexas, como as diterpenoquinonas com esqueleto do tipo abietano e os pigmentos policíclicos relacionados com a hipericina. Nesta última, a função quinona se encontra em uma forma estendida, com as duas carbonilas em anéis diferentes e unidas por uma série de ligações duplas conjugadas. (SIMÕES *et al.*, 2004).

Apresentam-se geralmente como substâncias cristalinas de cor amarela ou vermelha, ocasionalmente podem ter cores azul, verde ou preta. Sua contribuição para a coloração natural dos organismos é pequena quando comparada com as antocianinas e carotenóides. A estrutura quinóide apresenta uma alta reatividade química e as quinonas são agentes fortemente oxidantes em processos que reduzem a 1,4-benzoquinona à hidroquinona. Essas reações de oxirredução são responsáveis pelo papel importante desta classe de compostos como carreadores de elétrons nos processos metabólicos das células. Assim, as atividades e propriedades das quinonas baseiam-se em sua capacidade de interagirem com sistemas redox ou de transferência de elétrons em ambientes químico ou biológico. Entre as quinonas, as antraquinonas são as mais estáveis. Em solução alcalina, as quinonas hidroxiladas adquirem cor intensa violeta ao formarem o ânion enolato correspondente. Este método pode ser utilizado como padrão de detecção de quinonas. As hidroxilas das quinonas têm acidez comparáveis a de ácidos orgânicos. (SIMÕES *et al.*, 2004).

2.3.2. Emprego de *T. avellanedae* como agente antitumoral

A planta *Tabebuia avellanedae* Lorentz ex Griseb é uma árvore tropical com ocorrência na América do Sul principalmente no Brasil e norte da Argentina. Tem sido utilizada pela medicina popular por suas diversas atividades biológicas. A casca do caule de *T. avellanedae* é utilizada como um agente diurético e adstringente e popularmente é empregado para o tratamento do câncer e outras doenças. Por esta razão *T. avellanedae* é digna de atenção devido seu alto poder terapêutico e seus constituintes devem ser extensivamente investigados quanto a uma proposta medicinal eficiente. Descobertas sobre o extrato etanólico da casca desta planta a identificaram como um potente agente antitumoral. Esta atividade está relacionada principalmente às naftoquinonas: (-)-5-hidroxi-2-(1'-hidroxietil)nafto[2,3-*b*]furano-4,9-diona (**365**), (±)-8-hidroxi-2-(1'-hidroxietil)nafto[2,3-*b*]furano-4,9-diona (**366**), lapachol (**367**) e β-lapachona (**368**) (**Figura 2.18**). (YAMASHITA *et al.*, 2007).

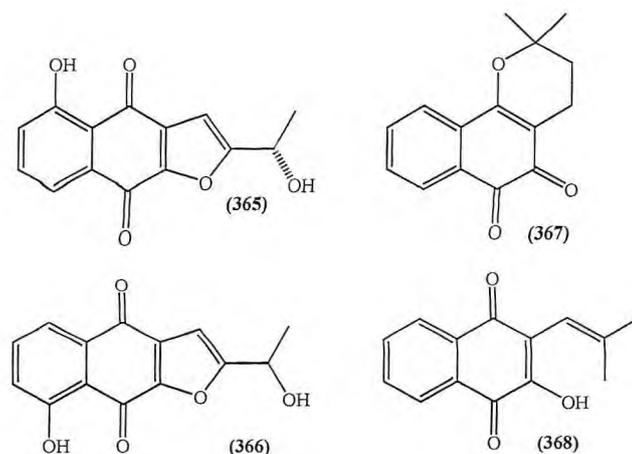
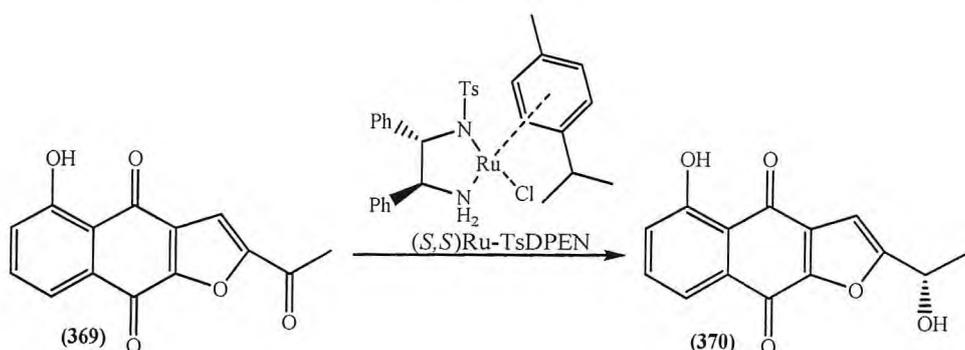


Figura 2.18 - Naftoquinonas isoladas de *T. avellaneda*

Estudos sobre os constituintes químicos de *T. avellaneda* mostraram que o rendimento partindo do extrato da casca da árvore é menos que 0,001%. Por outro lado, as naftoquinonas descritas somente podem ser obtidas com plantas de 20 anos de idade. Estas barreiras limitam estudos e desenvolvimentos acerca das atividades biológicas dos compostos citados. (YAMASHITA *et al.*, 2007).

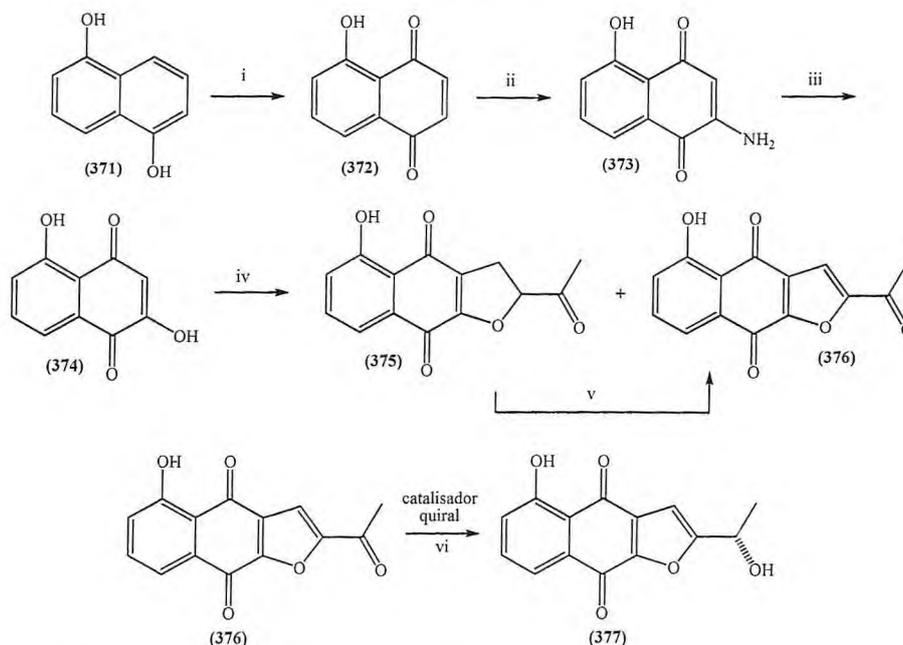
O número de relatos envolvendo a síntese da quinona (365) é limitado. Fujimoto e colaboradores obtiveram a quinona (365) em sua forma racêmica, os quais são inseparáveis por cromatografia em gel de sílica. A separação do racemato foi realizada através de etapas de derivatização e separação do produto por coluna cromatográfica. (FUJIMOTO *et al.*, 1991). Yamashita e colaboradores realizaram a síntese da referida quinona através de uma rota sintética envolvendo um catalisador quiral de Rutênio para redução da cetona correspondente e obtiveram rendimentos de 89-91% e 95-96% de excesso enantiomérico (*S*) (ESQUEMA 58). (YAMASHITA *et al.*, 2007).

ESQUEMA 58



Em primeiro lugar partiram do 1,5-diidroxinaftaleno, disponível comercialmente para a preparação da juglona (**371**) na presença de CuCl. Em seguida, o produto sofreu uma aminação oxidativa na presença de uma solução de dimetilamina (2 M em THF) a 40°C para formação da 2-dimetilaminojuglona (**373**). A reação com HCl aquoso forneceu o correspondente produto 2-hidroxi-1,4-naftoquinona (**374**) que, na presença da but-3-en-2-ona, bromo e DBU forneceu o naftodiidrofurano (**375**) em 79% de rendimento, além do diidrofurano (**376**) com 16% de rendimento. A quinona (**375**) foi tratada com dióxido de manganês e assim (**376**) foi formado com 51% de rendimento, além de 44% recuperado de (**375**). Finalmente, a cetona da molécula foi submetida à redução de Noyori para formação do centro estereogênico da molécula. Foram empregados dois catalisadores quirais de Rutênio, o Ru [(*S,S*)-Tsdpen] (*p*-cimeno), RuCl [(*S,S*)-Tsdpen] (*p*-cimeno), RuCl [(*S,S*)-Tsdpen] (mesitileno), RuCl [(*S,S*)-Msdpen] (*p*-cimeno). O álcool foi obtido com altos rendimentos químicos (89-91%) e excessos enantioméricos de 95-96% (ESQUEMA 59).

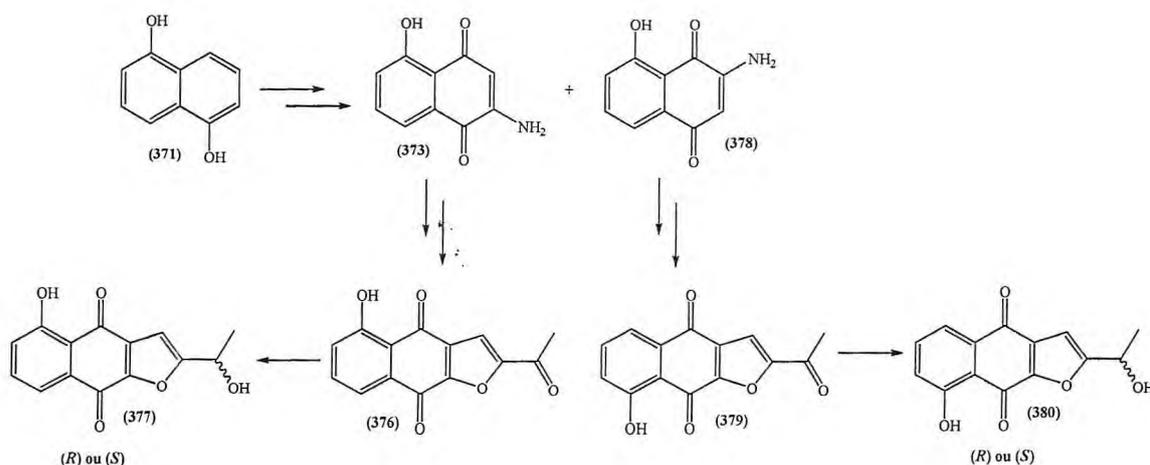
ESQUEMA 59



Reagentes e condições: (i) CuCl, CH₃CN, ar, t.a., 47%; (ii) Me₂NH, tolueno, THF, -40°C, 48%; (iii) 10% HCl, dioxano, refluxo, 97%; (iv) 3,4-dibromobutan-2-ona, DBU, THF, t.a., 79% e 16%; (v) MnO₂, CHCl₃, refluxo, 51%. (vi) catalisador de rutênio. Tsdpen = N-(*p*-toluenossulfonil)-1,2-difeniletanodiamina; Msdpen = N-(metanossulfonil)-1,2-difeniletanodiamina.

Mais recentemente, o mesmo grupo de pesquisa iniciou uma investigação para testes de atividades biológicas de outros isômeros e estereoisômeros da naftoquinona anteriormente preparada. Para preparação dos estereoisômeros (*R*) de (377) e de (380) foi empregado o catalisador quiral de rutênio Ru [(*R,R*)-Tsdpen] (*p*-cimeno), ao passo que para preparar o enantiômero (*S*) de (377) e de (380) foi empregado o Ru [(*S,S*)-Tsdpen] (*p*-cimeno) (ESQUEMA 60). (YAMASHITA *et al.*, 2009).

ESQUEMA 60



Com relação aos ensaios biológicos, ambos os enantiômeros da naftoquinona (377) atuam como potentes agentes quimiopreventivos do câncer *in vitro* com valores de IC_{50} de 33,2 e 38,9 para (*R*) e (*S*), respectivamente, sendo a curcumina o controle positivo com IC_{50} de 345. Os isômeros posicionais (*R*) e (*S*)-(380) apresentaram IC_{50} de 201,1 e 271,0 com atividades ainda menores que a curcumina, porém, menores que (*S*)-(377) sugerindo que a posição da hidroxila em C-5 fortemente influencia a atividade destas quinonas. Além disso, pelo fato de haver relatos da atividade antimicrobiana dos constituintes isolados de *Tabebuia avellanadae*, testaram as quinonas contra diversas bactérias Gram-positivas (0,78-6,25 $\mu\text{g/mL}$) e fungos (1,56-100,0 $\mu\text{g/mL}$), os quais se mostraram positivos em comparação com a penicilina G e a anfotericina B. (YAMASHITA *et al.*, 2009).

Capítulo 3



Resultados e Discussão

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Este trabalho encontra-se dividido em duas partes: (3.1) Estudo de processos enzimáticos catalisados pelas leveduras e (3.2) Síntese quimioenzimática da 5-hidroxi-2-(1-hidroxietil)-nafto[2,3-*b*]furano-4,9-diona empregando lipases ou álcool desidrogenases.

3.1. Estudo de processos enzimáticos catalisados pelas leveduras

Inicialmente realizou-se uma seleção para identificação das cepas produtoras de enzimas do tipo álcool desidrogenases (ADHs). A metodologia empregada encontra-se descrita no item 4.8.1. p.128. Com este teste preliminar identificou-se oito cepas produtoras de ADHs, *Candida krusei* (CE010), *Candida krusei* (CE012), *Candida guilliermondi* (CE013), *Candida rugosa* (CE016), *Candida tropicalis* (CE017), *Kluyveromyces lactis-similar* (CE026), *Pichia anomala* (CE009) e *Pichia membranifaciens* (CE015). Em continuação, as leveduras foram submetidas à condição de agentes biocatalíticos para redução de um substrato carbonílico comum, a acetofenona.

3.1.1. Preparação dos álcoois aromáticos padrões

Desenvolveu-se a síntese química dos álcoois (ESQUEMA 61), os quais serviram como padrão para as metodologias de separação em cromatografia em camada delgada, cromatografia gasosa e CLAE. Os produtos foram purificados por cromatografia *flash* e caracterizados por RMN ^1H e RMN ^{13}C . Os rendimentos destas reações, bem como os eluentes empregados na purificação encontram-se listados na Tabela 7, p.101.

ESQUEMA 61

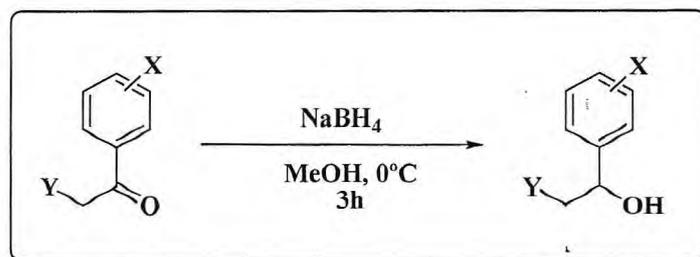


Tabela 7 - Rendimentos isolados dos álcoois obtidos e eluentes utilizados na purificação

Nº	X	Y	Rend. (%) ^a	Eluente
1	-----	H	88	Hexano:Acetato de etila 10%
2	4-OMe	H	96	Hexano:Acetato de etila 15%
3	4- ⁱ Pr	H	83	Hexano:Acetato de etila 10%
4	4-NO ₂	H	95	Hexano:Acetato de etila 20%
5	4-Cl	H	92	Hexano:Acetato de etila 10%
6	4-Me	H	89	Hexano:Acetato de etila 10%
7	3-OMe	H	86	Hexano:Acetato de etila 15%
8	3-NO ₂	H	95	Hexano:Acetato de etila 20%
9	3-Br	H	65	Hexano:Acetato de etila 30%
10	2-OMe	H	74	Hexano:Acetato de etila 15%
11	2-NO ₂	H	97	Hexano:Acetato de etila 20%
12	-----	Cl	83	Hexano:Acetato de etila 15%
13	3,4-Cl	Cl	90	Hexano:Acetato de etila 15%

^a Os produtos foram purificados por coluna cromatográfica empregando sílica-gel

Para fins de estudo com relação às análises dos possíveis compostos obtidos por biotransformação, os álcoois padrões preparados quimicamente foram submetidos à Cromatografia Gasosa (CG) e à Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) para separação da cetona e do álcool correspondente, bem como dos álcoois racêmicos via separação quiral em uma coluna apropriada. Exemplificando, temos o cromatograma da separação da acetofenona e 1-feniletanol em CLAE empregando a coluna aquiral Spherisorb (**Figura 3.1**) cujos tempos de retenção são 5,5 e 8,4 minutos para cetona e álcool respectivamente.

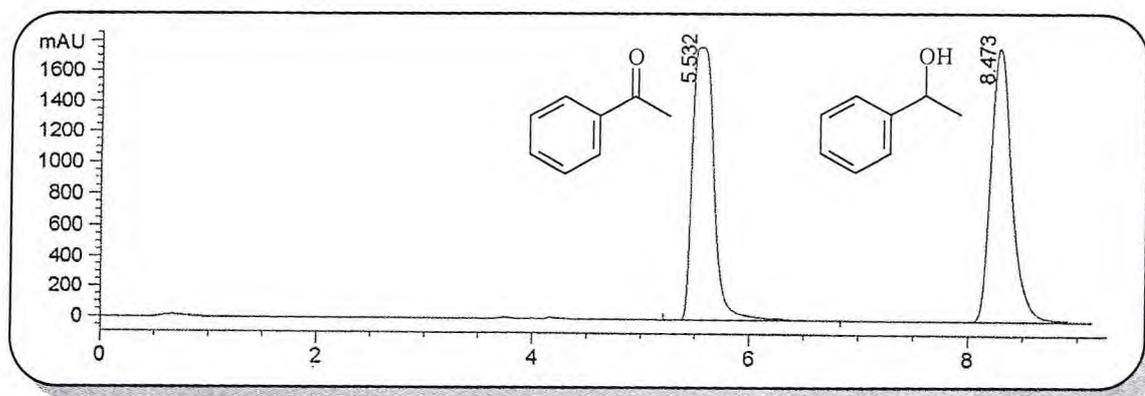


Figura 3.1 - Cromatograma da mistura acetofenona e 1-(fenil)etanol

Como exemplo para separação quiral temos o cromatograma do 1-(fenil)etanol racêmico em CLAE empregando a coluna OB-H com tempos de retenção de 10,2 e 15,4 minutos para os enantiômeros (*S*) e (*R*), respectivamente (**Figura 3.2**). O produto da reação de biotransformação foi isolado por coluna cromatográfica e através do valor da rotação óptica específica e comparação com a literatura foi possível identificar os picos relativos a cada enantiômero **Tabela 11 p.109**.

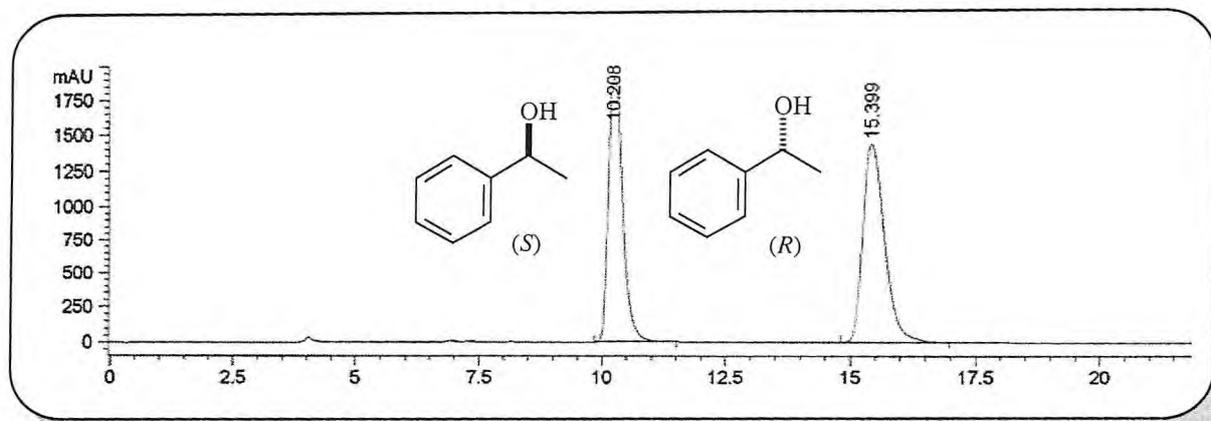


Figura 3.2 - Cromatograma do racêmico 1-(fenil)etanol

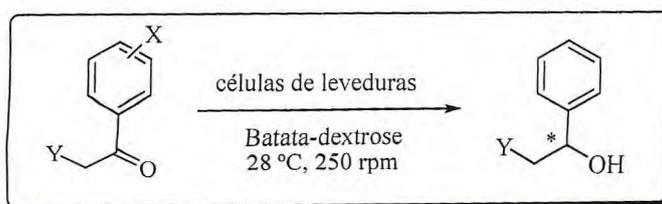
Os métodos de separação para os compostos estudados encontram-se descritos no item **4.8.3** a partir da **página 129**, assim como os demais cromatogramas.

3.1.2. Reações de biorredução empregando células íntegras de leveduras

Após o desenvolvimento dos métodos de separação em CLAE ou CG iniciou-se as reações de biocatálise para redução das cetonas estudadas. O procedimento encontra-se descrito nos itens **4.8.4. e 4.8.5. p.139-140**.

Inicialmente foi realizada a reação de redução da acetofenona (**ESQUEMA 62**) com as cepas selecionadas com a finalidade de serem avaliadas quanto à capacidade de conversão do substrato ao produto e enantiosseletividade do sistema enzimático. As reações foram realizadas em triplicata e os resultados encontram-se descritos na **Tabela 8, p.104**.

ESQUEMA 62



Para que seja de interesse prático, o excesso enantiomérico do produto deve ser sempre elevado, pois esse é o principal atrativo em se empregar agentes biocatalíticos para realizar reações que substituem catalisadores químicos devido a regio-, estereo, e enantiosseletividade observada. De acordo com os resultados listados na **Tabela 8** nota-se que a conversão está diretamente relacionada ao parâmetro tempo, havendo maiores conversões do produto ao prolongar a reação por tempos de até oito dias. Foram obtidas conversões de 81% para a levedura *Candida krusei* CE010, 79% para a levedura *Candida rugosa* CE016, 76% para *Pichia membranifaciens* CE015, 67% para a levedura *Kluyveromyces lactis-similar* CE026 e 62% para a levedura *Candida tropicalis* CE017.

Muito embora dentre as leveduras testadas cinco apresentem altos valores de conversão, deve-se analisar o excesso enantiomérico do produto obtido. Obteve-se um excesso de 40% (*S*) para a levedura *Candida krusei* CE012, 99% (*S*) para *Pichia membranifaciens* CE015, 41% (*S*) para a levedura *Candida rugosa* CE016, 53% para a levedura *Kluyveromyces lactis-similar* CE026 e 97% (*S*) para a levedura *Candida tropicalis* CE017. Os resultados demonstraram que as leveduras *Pichia membranifaciens* e *Candida tropicalis* são as fontes enzimáticas mais promissoras para investigações mais aprofundadas, pois, mostraram-se melhor levando-se em consideração ambos os parâmetros (conversão e excesso enantiomérico). É digno de se notar que os produtos obtidos estão de acordo com a regra de Prelog, pois possuem configuração (*S*). Realizou-se uma cinética mais detalhada para ambas as leveduras para, desta maneira, obter o máximo em conversão e enantiosseletividade proporcionado por ambas as leveduras (**Figuras 3.3 e 3.4, p.105**).

Tabela 8 - Resultados preliminares obtidos da biorredução da acetofenona empregando leveduras em crescimento como agentes biocatalíticos

Levedura	Tempo (dias)	Conversão (%) ^a	ee (%) ^b Configuração
CE009 <i>Pichia anomala</i>	5	11	82 (S)
	8	55	68 (S)
CE010 <i>Candida krusei</i>	2	24	4 (S)
	5	34	12 (S)
	8	81	40 (S)
CE012 <i>Candida krusei</i>	2	44	1 (R)
	8	52	33 (S)
CE013 <i>Candida guilliermondi</i>	2	8	11 (S)
	5	10	6 (S)
	8	53	20 (S)
CE015 <i>Pichia membranifaciens</i>	2	27	99 (S)
	5	67	98 (S)
	8	76	99 (S)
CE016 <i>Candida rugosa</i>	2	22	20 (R)
	5	38	6 (S)
	8	79	41 (S)
CE017 <i>Candida tropicalis</i>	5	38	97 (S)
	9	62	97 (S)
CE026 <i>Kluyveromyces lactis-similar</i>	2	8	22 (S)
	5	33	23 (S)
	8	67	53 (S)

^a Os valores de conversão foram obtidos por cromatografia gasosa

^b Os valores de excessos enantioméricos foram obtidos por CLAE quiral.

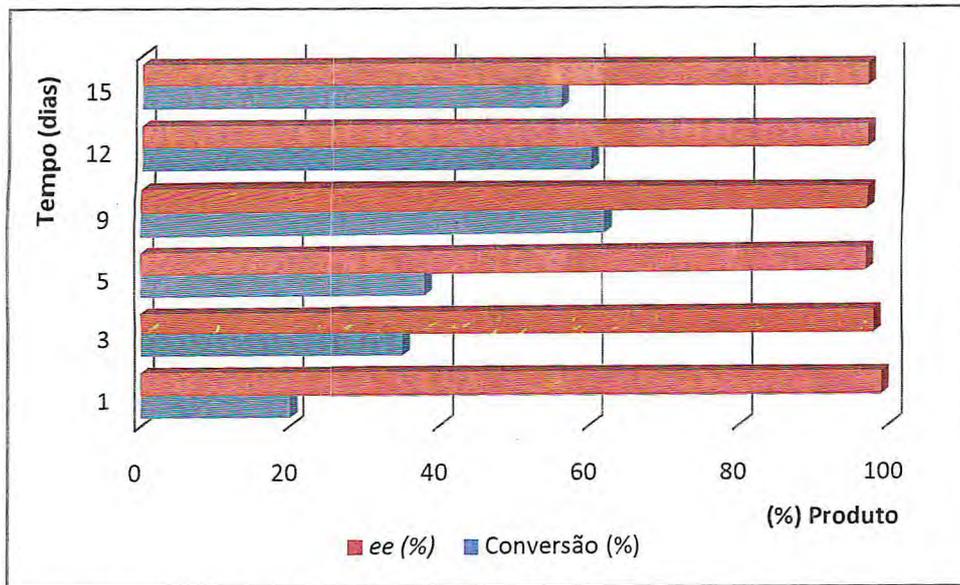


Figura 3.3 - Cinética de conversão da acetofenona ao empregar a levedura *Candida tropicalis*

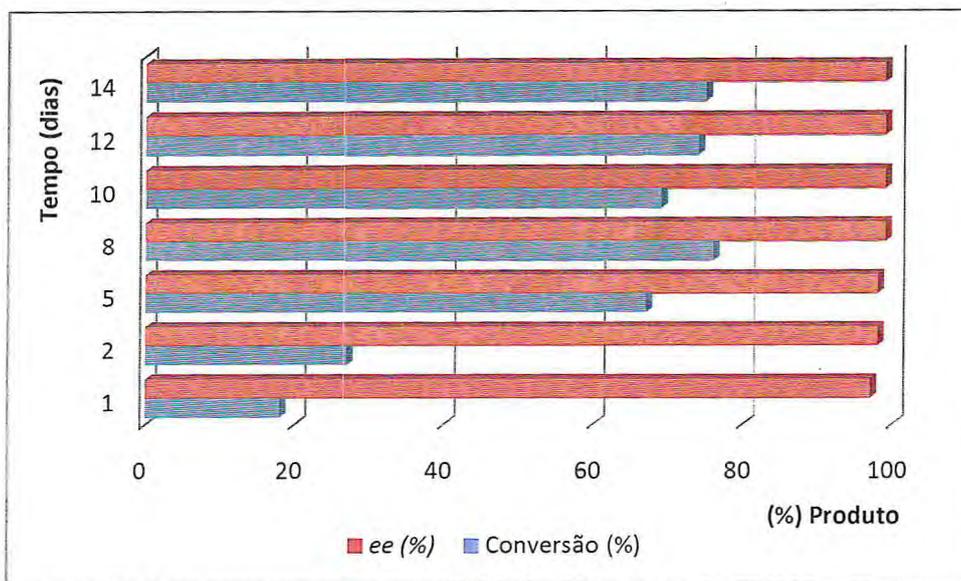


Figura 3.4 - Cinética de conversão da acetofenona ao empregar a levedura *Pichia membranifaciens*

A cinética de conversão da acetofenona para revelou que o melhor tempo foi de 9 (nove dias) empregando a levedura *Candida tropicalis* CE017. Obtivemos um resultado de 62% de conversão com excesso enantiomérico de 98% do enantiômero *S*. Com maiores tempos para biotransformação observou-se que há um decréscimo na conversão, indicando a presença de um sistema competitivo no qual há concomitante oxidação do produto formado (Figura 3.3). Com relação à levedura *P. membranifaciens* o 1-feniletanol foi obtido com 76% de conversão e excesso de 99% (*S*) para oito dias de

reação, cujo resultado permaneceu inalterado mesmo após tempos reacionais de até 14 dias (**Figura 3.4**). Os parâmetros encontrados para estas biotransformações foram utilizados no desenvolvimento das reações de redução de derivados da acetofenona para verificar a influência de substituintes no anel aromático. As reações foram realizadas em triplicata e os resultados obtidos encontram-se listados na **Tabela 9**.

Tabela 9 - Resultados obtidos utilizando a levedura *Candida tropicalis* em biorreduções de cetonas aromáticas após nove dias de reação

Nº	X	Y	Conversão (%) ^a	ee (%) ^b	Configuração do álcool
1	-----	H	62	97	S
2	4-OMe	H	7	9	S
3	4- ⁱ Pr	H	59	62	S
4	4-NO ₂	H	100	96	S
5	4-Cl	H	65	62	S
6	4-Me	H	26	90	S
7	3-OMe	H	35	80	S
8	3-NO ₂	H	100	99	S
9	3-Br	H	7	99	S
10	2-OMe	H	51	56	S
11	2-NO ₂	H	100	99	S
12	-----	Cl	12	89	R
13	3,4-Cl	Cl	63	90	R

^a Os valores de conversão foram determinados por Cromatografia Gasosa.

^b Os excessos enantioméricos dos álcoois opticamente ativos foram determinados por CLAE quiral.

Foram obtidos valores de conversão que variaram entre baixos (7%) a excelentes (99%) dependendo do substituinte no anel aromático. Comparando com a acetofenona foi possível observar que grupos doadores de elétrons no anel aromático influenciam drasticamente conversões e excessos dos produtos (Entradas 2, 3 e 10 – **Tabela 9**) levando a um decréscimo considerável. Por outro lado, os melhores resultados foram obtidos com os substratos contendo grupos nitro com conversões e excessos enantioméricos excelentes (Entradas 4, 8 e 11 – **Tabela 9**). Verificou-se também que a presença do cloro *alfa* à carbonila diminui o valor de conversão em relação à

acetofenona e que este decréscimo é menor na presença de dois átomos de cloro no anel aromático (Entradas 12 e 13 – **Tabela 9**). Após a realização das biorreduções, os produtos foram purificados para verificação da rotação óptica dos compostos obtidos. Os resultados demonstraram que a enzima atua de acordo com as regras de Prelog, pois os álcoois obtidos possuem configuração *S*. Devido às mudanças nas regras de prioridade foram obtidos dois álcoois com configuração *R* (Entradas 12 e 13 – **Tabela 9**).

Tabela 10 - Resultados obtidos utilizando a levedura *Pichia membranifaciens* em biorreduções de cetonas aromáticas após oito dias de reação

Nº	X	Y	Conversão (%) ^a	ee (%) ^b	Configuração do álcool
1	-----	H	76	99	<i>S</i>
2	4-OMe	H	12	18	<i>S</i>
3	4-NO ₂	H	100	90	<i>S</i>
4	3-OMe	H	61	72	<i>S</i>
5	3-NO ₂	H	97	99	<i>S</i>

^a Os valores de conversão foram calculados por cromatografia gasosa

^b Os valores de excessos enantioméricos foram calculados por CLAE quiral.

Com relação à levedura *Pichia membranifaciens* foram obtidos valores de conversão que variaram entre baixos a excelentes. Com os substratos contendo substituintes nitro as conversões foram bastante satisfatórias assim como os excessos enantioméricos. Com a presença do grupo metoxi no anel aromático, assim como no caso da *Candida tropicalis*, os valores de conversão e de enantiosseletividade decresceram (**Tabela 10**).

O grupo de pesquisa em biocatálise da Universidade Federal do Ceará vem trabalhando na busca por eficientes biocatalisadores da biota regional com potencial em biorredução e, desde então, diversos microrganismos foram analisados podendo-se destacar os fungos *Lasiodiplodia theobromae* e *Lentinus strigellus* como eficientes produtores de enzimas do tipo álcool desidrogenase. Cada um destes microrganismos apresenta particularidades (BARROS-FILHO *et al.*, 2009; BARROS-FILHO *et al.*, 2010). As leveduras *Candida tropicalis* e *P. membranifaciens* não apresentam uma enzima com afinidade aos substratos contendo metoxila no anel aromático. Em contraste, *L.theobromae* e *L. strigellus* catalisam a biorredução destas metoxi-acetofenonas com alta enantiosseletividade (87->99%). Por outro lado, *L. theobromae*

apresentou baixa seletividade para nitroacetofenonas (42-45% de *ee*) e com *Lentinus strigellus* foram obtidos excelentes enantiosseletividades (98->99%), porém moderada conversão (~48%), que não pôde ser melhorada após longos tempos reacionais. *Candida tropicalis* e *P. membranifaciens* apresentam a mais potente atividade de álcool desidrogenase para redução de nitro-acetofenonas com altos valores de conversão e enantiosseletividades. Na **Tabela 11** (p.109) encontram-se listados os valores de rotação óptica dos álcoois obtidos. Os valores referem-se aos álcoois obtidos das reações de biotransformação, na qual há predominância do enantiômero indicado, assim como os valores da literatura correspondente. Desta maneira, pode-se elucidar a configuração do álcool predominante na mistura enantiomericamente enriquecida da biotransformação.

A avaliação de microrganismos locais oferece uma oportunidade de grande valor para o desenvolvimento de metodologias alternativas. Estes sistemas enzimáticos desempenham um papel semelhante aos reagentes químicos convencionais com diversas peculiaridades.

Tabela 11 - Comparação da rotação óptica específica dos álcoois obtidos com valores da literatura

Entrada	Composto	Condições da literatura ^a	Condições analisadas	Referência
1	1-(fenil)etanol	c=1,08; -23,2; CH ₂ Cl ₂ , Enantiômero S	c=0,34; -28,2; CH ₂ Cl ₂ , Enantiômero S	(WANG <i>et al.</i> , 2007)
2	1-(4-metoxi)feniletanol	c=2,3; +49,4; CH ₂ Cl ₂ , Enantiômero R	c=0,5; -2,2; CH ₂ Cl ₂ , Enantiômero S	(DU <i>et al.</i> , 2006)
3	1-(4-isopropilfenil)etanol	c=0,90; +15,6; CHCl ₃ , Enantiômero R	c=0,6; -14,4; CHCl ₃ , Enantiômero S	(COZZI; KOTRUSZ, 2006)
4	1-(4-nitrofenil)etanol	c=1,13; +30,2; CHCl ₃ , Enantiômero R	c=0,5; -24,6; CHCl ₃ , Enantiômero S	(YANG <i>et al.</i> , 2006)
5	1-(4-clorofenil)etanol	c=1,8; +47,2; CH ₂ Cl ₂ , Enantiômero R	c=0,5; -32,4; CH ₂ Cl ₂ , Enantiômero S	(DU <i>et al.</i> , 2006)
6	1-(4-metilfenil)etanol	c=0,4; -13,0; CHCl ₃ , Enantiômero S	c=0,48; -26,1; CHCl ₃ , Enantiômero S	(UTSUKIHARA <i>et al.</i> , 2006)
7	1-(3-metoxifenil)etanol	c=0,85; -30,9; MeOH, Enantiômero S	c=0,34; -21,6; MeOH, Enantiômero S	(MORRIS; HAYES; WILLS, 2006)
8	1-(3-nitrofenil)etanol	c=0,86; +33,2; CHCl ₃ , Enantiômero R	c=0,5; -34,9; CH ₂ Cl ₂ , Enantiômero S	(MA <i>et al.</i> , 2003)
9	1-(3-bromofenil)etanol	c=0,8; +4,8; MeOH, Enantiômero R	c=0,5; -26,0; MeOH, Enantiômero S	(BOYD <i>et al.</i> , 2006)
10	1-(2-metoxifenil)etanol	c=1,5; +53,0; CH ₂ Cl ₂ , Enantiômero R	c=0,4; -4,5; CH ₂ Cl ₂ , Enantiômero S	(DU <i>et al.</i> , 2006)
11	1-(2-nitrofenil)etanol	c=0,23; +20; CHCl ₃ , Enantiômero S	c=0,4; +29,8; CHCl ₃ , Enantiômero S	(SEROR <i>et al.</i> , 2006)
12	2-cloro-1-feniletanol	c=0,87; -50,0; CH ₂ Cl ₂ , Enantiômero R	c=0,26; -18,8; CH ₂ Cl ₂ , Enantiômero R	(TANIS <i>et al.</i> , 2006)
13	2-cloro-1-(3,4-diclorofenil)etanol	c=1,0; -35,1; CHCl ₃ , Enantiômero R	c=0,5; -13,5; CHCl ₃ , Enantiômero R	(ZHU; MUKHERJEE; HUA, 2005)

^a Os valores referem-se a uma solução na qual há predominância de um enantiômero em uma mistura escalêmica

3.2. Síntese quimioenzimática da naftoquinona (377)

A segunda parte deste trabalho visa a obtenção de uma quinona com atividade citotóxica. Realizou-se a síntese via quimioenzimática empregando como etapas para geração do centro estereogênico, lipases ou álcool desidrogenases.

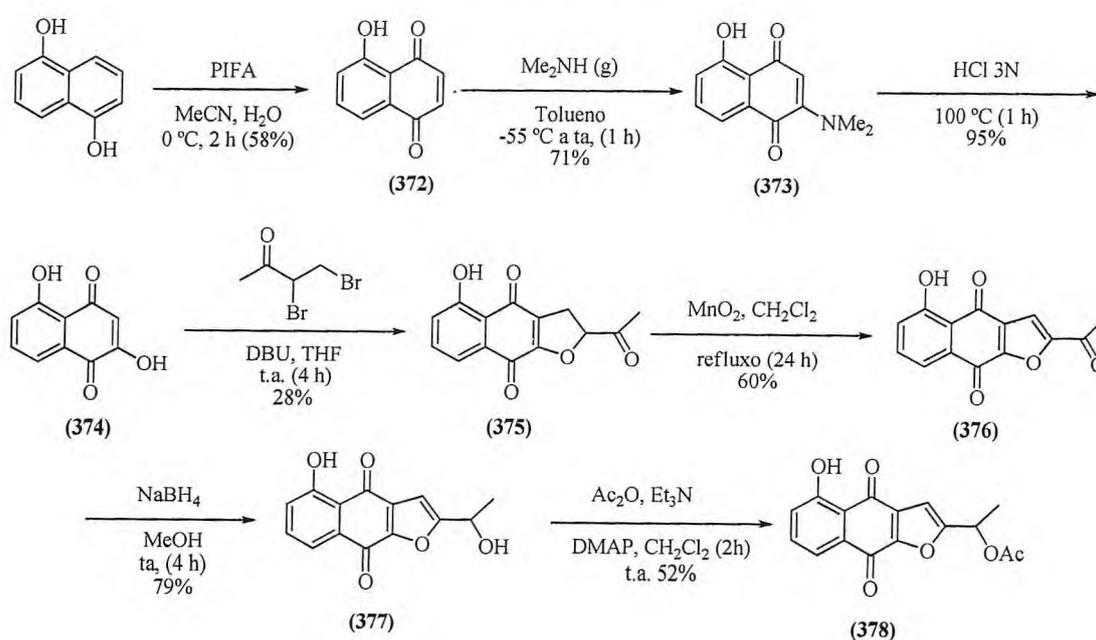
Este item encontra-se dividido em três partes: **I.** Síntese química da naftoquina (378); **II.** Emprego de lipases comerciais para resolução cinética do álcool (377); **III.** Emprego de álcool desidrogenases (ADH) comerciais para a etapa de redução da cetona (376).

O desenvolvimento do trabalho teve início com a síntese das quinonas (376) e (377) (ESQUEMA 63), as quais foram empregadas para as reações de biorredução e resolução cinética enzimática via acetilação, respectivamente. Os produtos das reações serviram como padrões para o desenvolvimento de métodos de separação em CG e CLAE. Os procedimentos utilizados na síntese encontram-se descritos nos itens 4.9.1. a 4.9.7. p.141-145.

3.2.1. Síntese da 5-hidroxi-2-(1-hidroxietil)-nafto[2,3-*b*]furano-4,9-diona

Para a síntese do naftofurano (377) partiu-se do 1,5-diidroxi-naftaleno comercialmente disponível, seguindo um procedimento adaptado de Yamashita e colaboradores. A partir de (377) realizou-se a esterificação para formação de (378) racêmico (ESQUEMA 63). (YAMASHITA *et al.*, 2009).

ESQUEMA 63



A síntese teve rendimento global de 12% ao passo que o rendimento global reportado teve rendimento global de 8%. A este acréscimo atribui-se às duas etapas iniciais da síntese com as quais obtivemos rendimentos de 58 e 71% ao passo que o método relatado apresentou rendimentos de 47 e 48%, respectivamente (YAMASHITA *et al.*, 2009). Obteve-se a quinona (**372**) utilizando uma metodologia para oxidação empregando o bis(trifluoroacetato)iodobenzeno (PIFA) em uma mistura de acetonitrila e água como solvente. (TOHMA *et al.*, 2001). O mecanismo para a reação envolve a adição do reagente PIFA ao substrato pela deslocalização eletrônica do sistema aromático, com posterior substituição da água e remoção do PIFA. A hidroxila recém incorporada ao substrato é então, oxidada por uma nova molécula de PIFA para formação da 5-hidroxi-naftoquinona (**372**) com 58% de rendimento. (Figura 3.5).

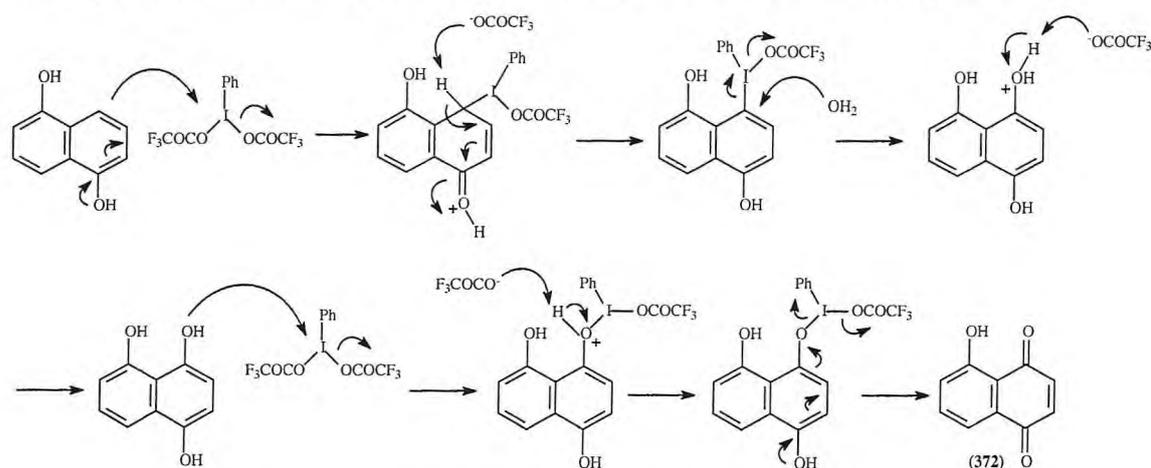


Figura 3.5 - Proposta mecanística para formação de (**372**)

A formação do produto esperado (**372**) foi confirmada pela presença dos sinais no espectro de RMN de ^{13}C com deslocamentos químicos em (184,1 e 190,2 δ) referentes aos dois carbonos carbonílicos do composto (Figura 5.4, p.152). O espectro de massas apresentou o pico base referente à razão m/z do íon *quasimolecular* em 175 [(M+H) $^+$, 100%] (Figura 5.5, p.152). No espectro de absorção na região de IV observa-se uma banda em 1642 cm^{-1} associada ao estiramento da ligação (C=O) (Figura 5.2, p.151).

Em seguida, o produto 2-(dimetilamino)-5-hidroxi-naftoquinona (**373**) foi obtido com 71% de rendimento ao empregar dimetilamina em tolueno a $-55\text{ }^\circ\text{C}$ na presença da 5-hidroxi-naftoquinona. A amina é incorporada ao substrato regioselectivamente a baixa temperatura. Segundo resultados da literatura (CHAKER; PAUTET; FILLION, 1994), empregando temperaturas elevadas o produto da reação consiste em uma mistura 1:1

dos regioisômeros de (373), enquanto que em temperaturas mais baixas o produto é exclusivamente substituído em somente uma das posições. O espectro de RMN de ^1H (Figura 5.8, p.154) apresentou um singlete referente aos seis hidrogênios da dimetilamina incorporados à estrutura da quinona com deslocamento químico de 3,22 ppm. No espectro de RMN ^{13}C (Figura 5.9, p.155) observa-se um sinal com deslocamento de 42,7 ppm atribuído aos carbonos metílicos. No espectro de massas (Figura 5.10, p.155) temos uma razão m/z em 218 confirmando a estrutura em questão. O mecanismo proposto para a reação é do tipo Michael e envolve a adição do reagente (dimetilamina) ao carbono mais eletrofílico do substrato (Figura 3.6).

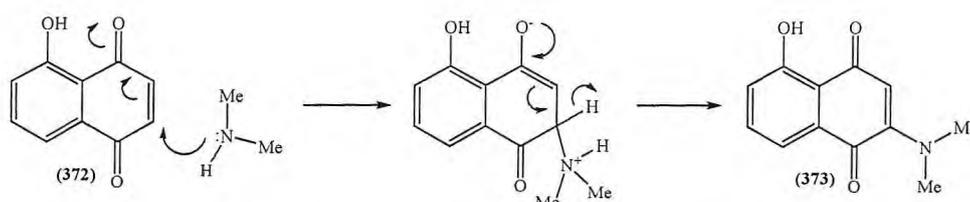


Figura 3.6 - Proposta mecanística para formação de (373)

O intermediário (373) foi posteriormente tratado com água e ácido clorídrico como catalisador sob condições de refluxo para substituição da porção amina por uma hidroxila, para formação da 2,5-diidroxi-1,4-naftalenodiona (374) com 95% de rendimento. Esta reação ocorre segundo o mecanismo proposto na Figura 3.7. A confirmação da formação do produto foi observada pela análise do espectro de massas (Figura 5.15, p.158) que apresentou uma razão m/z em 191 [(M+H)⁺, 100%], além do desaparecimento dos picos relativos ao grupamento -N(CH₃)₂ nos espectros de carbono e de hidrogênio (Figuras 5.13, p.157 e 5.14, p.158).

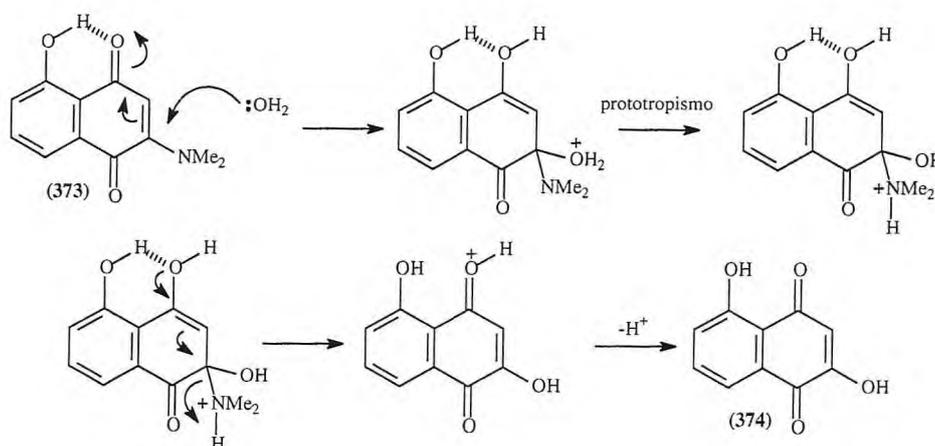


Figura 3.7 - Proposta mecanística para formação de (374)

Em seguida, preparou-se a 3,4-dibromo-2-butanona a partir da but-3-en-2-ona e bromo em pentano a -15°C . O produto bruto obtido nesta reação foi adicionado a uma solução contendo a naftoquinona (**374**) na presença do 1,8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-eno (DBU). Desta maneira obteve-se uma mistura dos furanos 2-acetil-2,3,4,9-tetrahidronafto[2,3-*b*]furano-4,9-diona (**375**) com 28% de rendimento e 2-acetil-4,9-diidronafto[2,3-*b*]furano-4,9-diona (**376**) e 37% de rendimento, os quais diferem entre si por uma dupla ligação (HAGIWARA *et al*, 2001). Para a formação do furano (**375**) foi proposto um mecanismo no qual há o ataque da hidroxila à 3,4-dibromo-2-butanona e posteriormente, a deslocalização eletrônica promove a ciclização com conseqüente regeneração da aromaticidade (**Figura 3.8**).

No espectro de RMN ^1H do produto (**375**) observou-se o aparecimento dos sinais com os seguintes deslocamentos químicos: um singlete em 2,41 ppm referente aos três hidrogênios do grupamento acetila, um dubleto em 3,42 ppm para 2 hidrogênios e um tripleto em 5,31 ppm para 1 hidrogênio do anel furânico (**Figura 5.18**, p.160). No espectro de RMN ^{13}C (**Figura 5.19**, p.161) observou-se dentre outros sinais, um com deslocamento químico em 87,1 ppm referente ao carbono oxigenado do anel furânico, dois sinais na região de carbonos saturados, um referente ao anel em 29,5 ppm e o outro em 29,5 do carbono alfa à carbonila, além de um sinal com δ em 204,3 ppm. Do espectro de massas (**Figura 5.20**, p.161) obtivemos uma razão m/z em 259 daltons, referente ao íon da molécula protonada $[(\text{M}+\text{H})^+, 100\%]$.

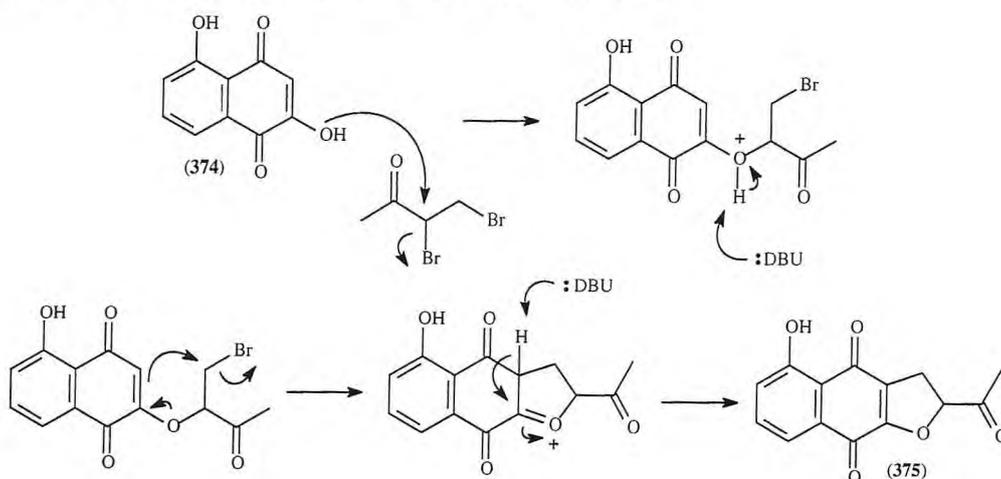


Figura 3.8 - Proposta mecanística para formação de (**375**)

Para a formação do produto (376) a partir de (374) foi proposto um mecanismo no qual inicialmente assemelha-se ao mecanismo da Figura 3.11, porém durante a formação do segundo intermediário forma-se uma cetona α,β -insaturada que, possui um sistema conjugado o suficiente para formação do aduto de ciclização (Figura 3.9).

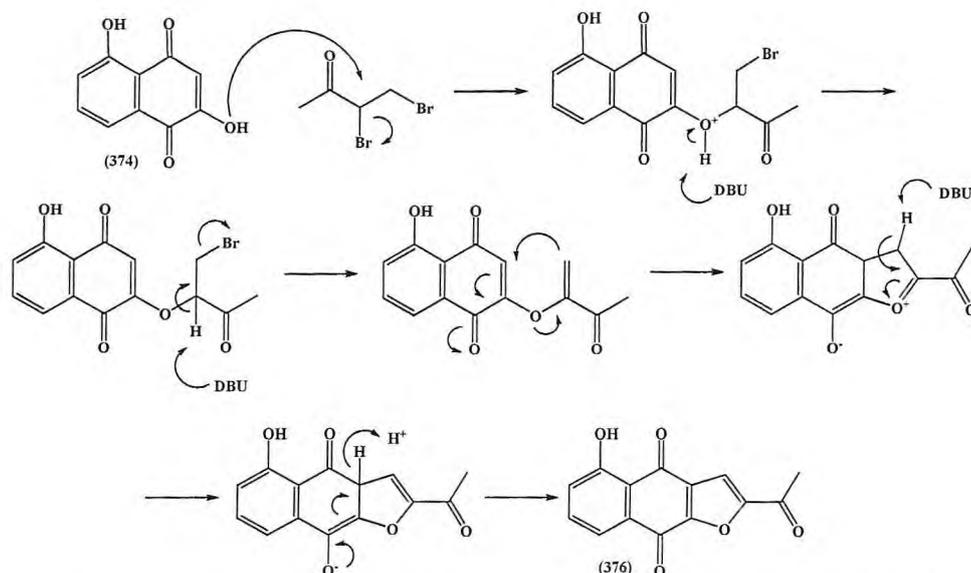


Figura 3.9 - Proposta mecanística para formação de (376) a partir de (374)

A 2-acetil-4,9-diidronafto[2,3-*b*]furano-4,9-diona (375) é obtida como um subproduto da reação para formação de (376) e para obtê-la em quantidades apreciáveis para as próximas etapas da rota sintética, o furano (375) é submetido a uma reação de oxidação na presença de dióxido de manganês (MnO_2) sob condições de refluxo. O mecanismo proposto envolve a adsorção do dióxido de manganês e coordenação, posteriormente um radical é gerado e, através de sucessivas quebras homolíticas é formada uma dupla ligação conjugada à carbonila (Figura 3.10). Para confirmação da formação do produto observa-se no espectro de RMN 1H o desaparecimento do dubleto em 3,40 ppm (2H) e do tripleto em 5,29 ppm (1H). Na ocasião, observa-se a presença de um singlete em 7,60 ppm referente ao hidrogênio da dupla conjugada do anel de cinco membros (Figura 5.23, p.163). Com relação ao espectro de RMN de ^{13}C pode-se observar o desaparecimento dos sinais em 26,5 e 87,4 ppm, cujos carbonos agora passam a ter deslocamento químico de 114,1 e 154,4 ppm (Figura 5.24, p.164). O espectro de massas apresentou uma razão m/z em 257 daltons $[(M+H)^+$, 17%] (Figura 5.25, p.164).

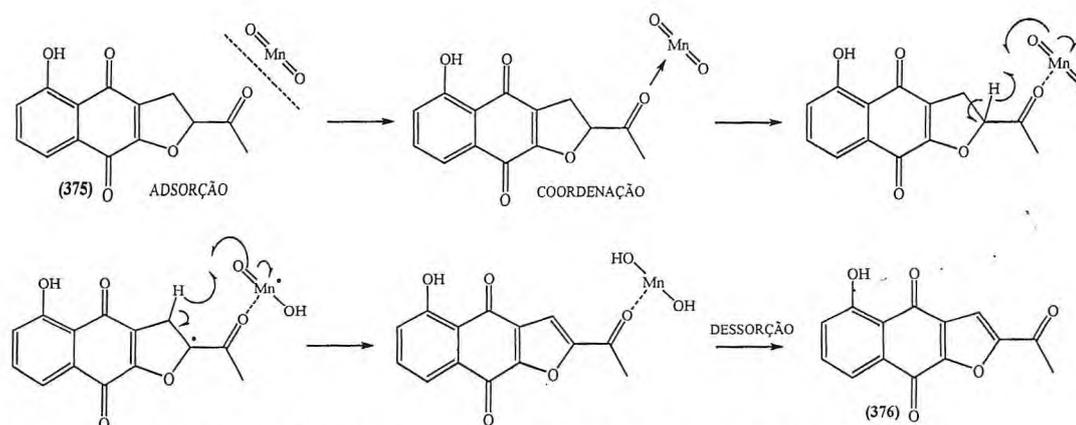


Figura 3.10 - Proposta mecanística para formação de (376)

Em uma tentativa de melhorar o rendimento de (376) a partir de (375) foram provados, além de MnO_2 , dois agentes oxidantes, SeO_2 e o ácido 2-iodoxibenzóico (IBX), cujos procedimentos estão descritos no item 4.9.5. p.144 porém, não houve formação do produto esperado em ambos os casos. Por fim, a quinona (376) é reduzida por boridreto de sódio em metanol para formação do álcool (377) com rendimento de 79%. No espectro de RMN 1H temos, dentre outros sinais, um dubleto para (3H) em 1,57 ppm e um quarteto para (1H) em 4,92 ppm referentes à porção da molécula modificada (Figura 5.28, p.166). No espectro de RMN ^{13}C observa-se sinal referente a um carbono oxigenado em 63,1 ppm em substituição ao carbono carbonílico em 173,2 ppm do substrato (Figura 5.29, p.167). O álcool (377) é acetilado na presença de anidrido acético, Et_3N e DMAP para formação do produto padrão racêmico (378) com 52% de rendimento. Observa-se um singleto para (3H) em 2,13 ppm referente aos hidrogênios do grupamento acetila no espectro de RMN 1H (Figura 5.33, p.169). O espectro de carbono apresenta um sinal em 20,9 ppm referente ao carbono metílico e um sinal em 169,8 ppm referente ao carbono carbonílico do grupamento acetila (Figura 5.34, p.170).

3.2.2. Desenvolvimento de metodologias para separação dos compostos estudados em HPLC ou CG

Para quantificação dos produtos das reações enzimáticas realizou-se a separação substrato/produto para o cálculo da conversão da reação e, paralelamente realizou-se a separação dos enantiômeros para calcular o excesso enantiomérico do produto. Os métodos de separação e colunas empregadas encontram-se descritos no item 4.9.8. p.146. Dependendo do tipo de reação empregada, redução ou resolução cinética,

utilizou-se um método de separação diferente, uma vez que na resolução cinética é necessário a separação de quatro enantiômeros, os acetatos (\pm)-(378) e os álcoois (\pm)-(377), por outro lado, na biorredução faz-se necessário a separação dos enantiômeros do álcool (\pm)-(377) e da cetona (376).

As Figuras 3.11, 3.12 e 3.13 referem-se aos cromatogramas obtidos nas separações. A Figura 3.11 apresenta a separação dos componentes acetilados quimicamente com tempos de retenção 19,2 min (*R*) e 24,5 min (*S*) e a Figura 3.12 refere-se à separação dos álcoois em 29.5 min (*R*) e 47.6 min (*S*).

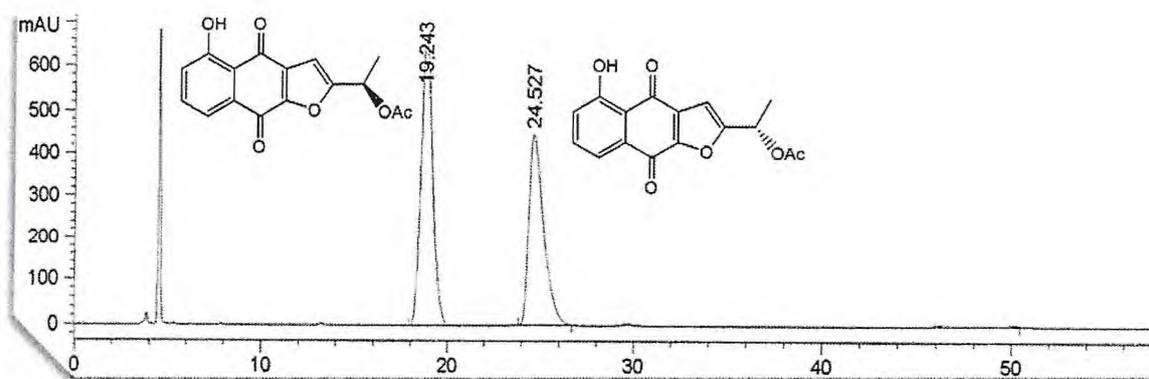


Figura 3.11 - Separação cromatográfica dos acetatos (\pm)-(378) por CLAE quiral

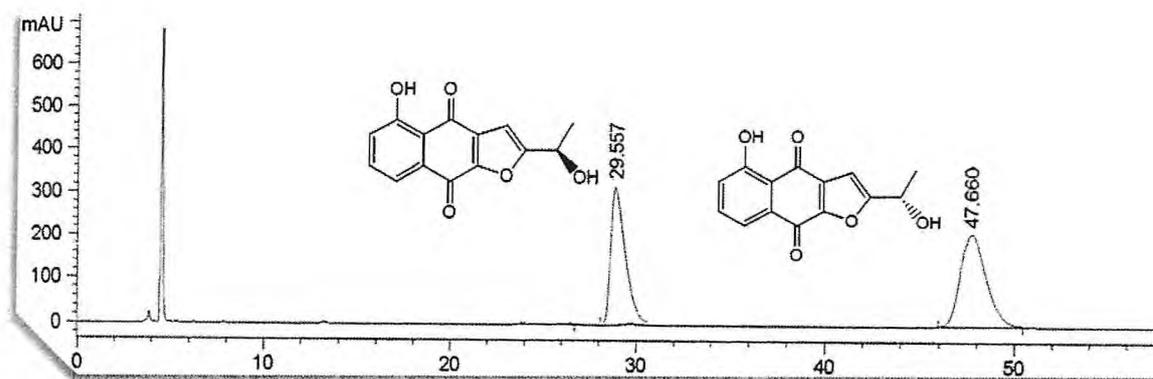


Figura 3.12 - Separação cromatográfica dos álcoois (\pm)-(377) por CLAE quiral

Para analisar as reações de biorredução foi desenvolvida uma metodologia de separação quiral diferenciada por questões de coeluição da cetona (376) e um dos enantiômeros do álcool (377). Tempos de retenção: álcoois 19,4 (*R*) e 30,1 (*S*) min e cetona 41,5 min (Figura 3.13).

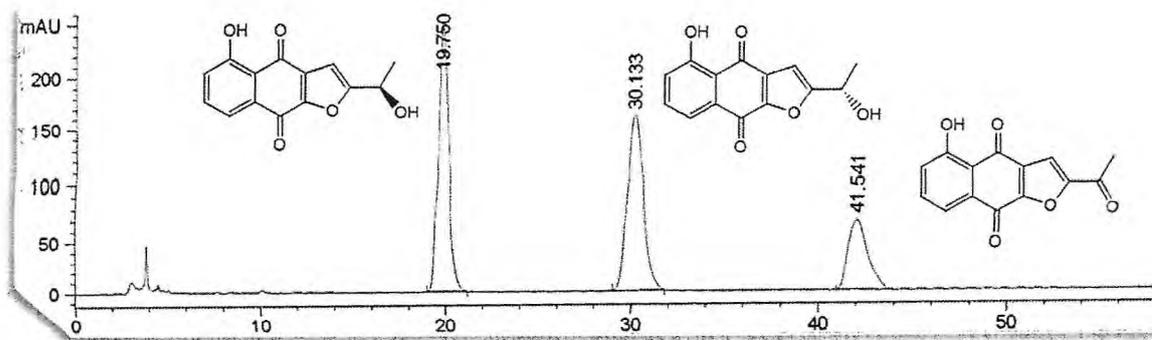
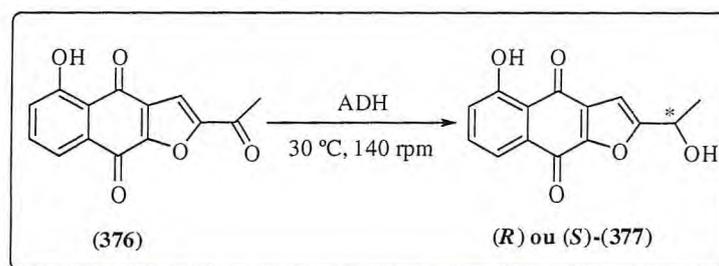


Figura 3.13 - Separação cromatográfica dos álcoois (\pm)-(377) e da cetona (376) por CLAE quiral

3.2.3. Emprego de álcool desidrogenases comerciais para redução da cetona (376)

Para o desenvolvimento das reações de biorredução da cetona (376) empregou-se a metodologia descrita no item 4.9.9. p.146 e segundo o ESQUEMA 64. Selecionou-se seis enzimas comerciais utilizando os mesmos parâmetros reacionais: temperatura (30°C), quantidade de substrato (5 mg) e enzima (1U), tempo de reação (24 h) e rotação (140 rpm) (Tabela 12). As enzimas selecionadas foram: A (*Rhodococcus ruber*), CP (*Candida parapsilosis*), LB (*Lactobacillus brevis*), PR2, RS1 (*Rhodococcus* sp.) e T (*Thermoanaerobacter* sp.).

ESQUEMA 64



As reações foram realizadas em “ependorf” em escala de miligramas e após um “screening” inicial selecionou-se três enzimas para um estudo mais aprofundado. Os resultados apresentados na Tabela 12 mostram que todas as enzimas foram enantiosseletivas com *ee* superior a 99%. Com relação aos excessos enantioméricos houve a formação do produto com a configuração desejada (*S*) em três dos casos analisados.

Tabela 12 - Biorredução da cetona (376) empregando ADHs comerciais

Enzima	Quantidade	Tempo (h)	Temp. (°C)	pH	Conversão (%) ^a	ee (%) ^b
A	0.5mg (1U)	24	30	7.5	10	>99 (S)
CP	3.0 µL (1U)	24	30	7.5	2	nd
LB	1.0 µL (1U)	24	30	7.5	4	>99 (R)
PR2	7.7 mg (1U)	24	30	7.5	2	nd
RS1	3.6 µL (1U)	24	30	7.5	16	>99 (S)
T	2.5 µL (1U)	24	30	7.5	8	>99 (S)

nd: não foi determinado

^a Os valores de conversão foram determinados por Cromatografia Gasosa.

^b Os excessos enantioméricos dos álcoois opticamente ativos foram determinados por CLAE quiral.

Com os resultados mais promissores realizou-se um estudo mais detalhado variando quantidade de enzima, pH e tempo reacional. Os resultados obtidos encontram-se na **Tabela 13**. Foram selecionadas as enzimas A, LB e RS1.

Tabela 13 - Resultados otimizados empregando as ADHs comerciais A, RS1 e LB

Enzima	Quantidade	Tempo (h)	Temp. (°C)	pH	Conversão (%) ^a	ee (%) ^b
A	0.5mg (1U)	24	30	7.5	10	>99 (S)
	2.0 mg (4U)	24	30	7.5	35	>99 (S)
	2.0 mg (4U)	48	30	7.5	92	>99 (S)
	2.0 mg (4U)	96	30	7.5	94	>99 (S)
	5.0 mg (10U)	24	30	7.5	55	>99 (S)
LB	1.0 µL (1U)	24	30	7.5	4	>99 (R)
	1.0 µL (1U)	96	30	7.5	9	>99 (R)
RS1	3.6 µL (1U)	24	30	7.5	16	>99 (S)
	3.6 µL (1U)	24	30	8.0	6	>99 (S)
	3.6 µL (1U)	24	30	9.0	2	>99 (S)
	3.6 µL (1U)	96	30	7.5	33	>99 (S)

^a Os valores de conversão foram determinados por Cromatografia Gasosa.

^b Os excessos enantioméricos dos álcoois opticamente ativos foram determinados por CLAE quiral.

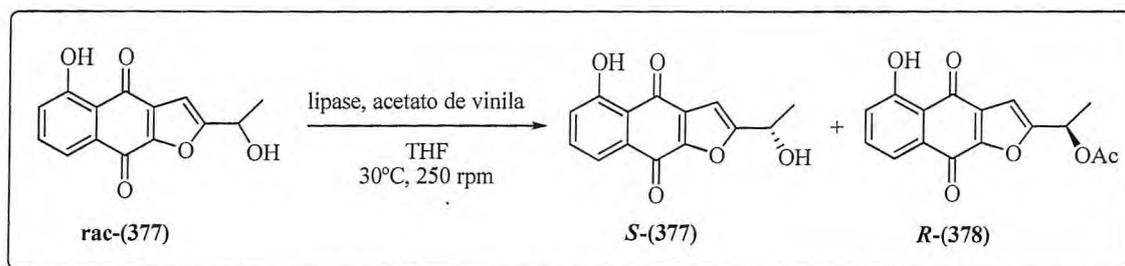
A otimização dos parâmetros reacionais permitiu a obtenção do álcool (**377**) em sua forma enantiopura, em todos os casos analisados. Obteve-se o álcool de configuração S com as enzimas A, CP, PR2, RS1 e T, ou seja, são enzimas com comportamento de acordo com a regra de Prelog. Com a enzima LB obteve-se o álcool com configuração R (anti-Prelog). Com a enzima LB, entretanto, não houve variação significativa de conversão mesmo após estendendo de um para quatro dias de reação. Com a enzima RS1 verificou-se uma dependência da conversão em função do pH. Para valores de pH mais básicos diminui a conversão, por outro lado, mantendo-se o pH de 7.5 após quatro dias de reação obteve-se uma conversão de 33%. Por razões econômicas a enzima A foi selecionada para biorredução empregando uma maior quantidade de enzima de 1 para 4U. Desta maneira, com a enzima A obteve-se a melhor conversão, 94% e $ee >99$ (S) após 96 horas de reação, por esta razão, variou-se novamente a quantidade de enzima presente no sistema enzimático com a finalidade de reduzirmos o tempo reacional (55% de conversão em 24 horas de reação). O resultado, porém, nos revela que a melhor alternativa seria empregar 4U de enzima em 48 horas de reação, uma vez que não há variação significativa de 48 para 96 horas. Para todos os parâmetros analisados, não houve variação do curso estereoquímico da reação, mantendo-se altamente enantiosseletivo.

Paralelamente foram realizadas duas metodologias alternativas para redução da cetona (**376**). A primeira delas consistiu no emprego da levedura *Saccharomyces cerevisiae* type II de procedência SIGMA-ALDRICH segundo o procedimento **4.9.10. p.148**, não houve formação do produto de redução. A segunda metodologia consistiu no emprego da levedura *Candida tropicalis* CE017 em crescimento para biorredução da cetona (**376**) segundo o procedimento **4.9.10. p.148**, obteve-se uma conversão de 21% e ee de 94 % (S) em cinco dias de reação.

3.2.4. Emprego de lipases para resolução cinética do álcool (\pm)-(377)

Objetivando uma rota alternativa à biorredução para obtenção do álcool (377)-(*S*) empregou-se duas lipases (CAL-B e PSC I) para resolução cinética do referido álcool. Realizou-se a reação empregando quantidades em massa 1:1 de enzima e substrato, em THF como solvente e como doador acila, o acetato de vinila conforme procedimento descrito no item 4.9.11. p.148 e ESQUEMA 65.

ESQUEMA 65



A reação foi mantida sob agitação e sob condições de atmosfera de nitrogênio retirou-se alíquotas de 1 μ L a cada hora para análise em CLAE. Com o emprego da lipase CAL-B obteve-se uma conversão de 50% e *ee* >99 com duas horas de reação. Com comportamento similar o mesmo resultado foi obtido pelo emprego da lipase PSC I com três horas de reação (Tabela 14). O resultado reflete o esperado pela regra de Kazlauskas, cujo álcool obtido por resolução cinética possui configuração *S*.

Tabela 14 - Resultados obtidos utilizando as lipases CAL-B e PSC I

Enzima	Tempo (h)	<i>ee</i> álcool (%) ^a	<i>ee</i> acetato (%) ^a	Conversão (%) ^b	\bar{E} ^c
CAL-B	1	92	>99	48	> 200
	2	>99 (42)	>99 (43)	50	> 200
PSC	1	72	>99	42	>200
	2	89	>99	47	>200
	3	>99 (45)	>99 (44)	50	>200

^a Excessos enantioméricos foram determinados por CLAE e rendimentos isolados em parênteses

^b $c = [eeS/(eeS + eeP)]$.

^c $E = \ln[(1-c) \times (1-eeS)] / \ln[(1-c) \times (1 + eeS)]$

Os produtos das reações foram submetidos à cromatografia *flash* para purificação e posterior análise por polarímetro para confirmação da configuração absoluta dos produtos obtidos e comparação com a literatura. O álcool (**377**) obtido apresentou uma rotação específica de -23,4 em metanol na concentração de 0,58 para um excesso superior a 99% de (*S*), enquanto que o valor da literatura relata -22,7 em metanol na concentração de 0,58 para 96% de excesso enantiomérico do enantiômero *S*. Desta maneira pode-se afirmar que a configuração do acetato obtido na resolução cinética possui configuração *R*. (YAMASHITA *et al.*, 2007). Álcool: $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -23,4$ ($c = 0,58$, MeOH); Acetato: $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = +134,4$ ($c = 0,58$, CH₂Cl₂)

Capítulo 4

Parte Experimental

4. PARTE EXPERIMENTAL

4.1. Métodos cromatográficos

4.1.1. Cromatografia em gel de sílica

As análises cromatográficas em camada delgada analítica (CCD) foram realizadas em cromatoplasmas de alumínio recobertas com gel de sílica 60 F₂₅₄ com CaSO₄ da MERCK. As cromatografias em coluna foram realizadas utilizando gel de sílica da VETEC (ϕ mm 0,063-0,200) cód. 195 e gel de sílica 60 da MERCK (ϕ mm 0,040-0,063). O comprimento e o diâmetro das colunas variaram de acordo com as quantidades de amostra a serem purificadas. A revelação das substâncias nas cromatoplasmas foi feita pela exposição das mesmas à radiação ultravioleta (254 e 365 nm), empregando-se uma lâmpada UV modelo UVSL-25 da MINERAL LIGHT ou pulverizadas com solução de vanilina, *p*-anisaldeído em ácido sulfúrico ou ainda solução de permanganato de potássio.

4.1.2. Cromatografia líquida de alta eficiência

As análises em Cromatografia Líquida de Alta Eficiência foram desenvolvidas em um Cromatógrafo HEWLETT PACKARD 1100 equipado com um detector de UV a 210 nm do Departamento de Química Orgânica e Inorgânica da Universidade de Oviedo – Espanha. As análises foram desenvolvidas variando as condições e a coluna dependendo do substrato. As colunas empregadas nas análises foram SPHERISORB, DAICEL CHIRALCEL OD, CHIRALPAK AS E CHIRAPALK IA.

4.1.3. Cromatografia gasosa

As análises por Cromatografia Gasosa foram realizadas em um Cromatógrafo Gasoso HEWLETT PACKARD 6890 Series II do Departamento de Química Orgânica e Inorgânica da Universidade de Oviedo – Espanha. Foi empregada uma coluna HP-1 HEWLETT PACKARD, (30 m de comprimento x 0,25 mm de diâmetro interno x 0,25 μ m de espessura de filme). Injetor (split/splitless), detector de ionização por chama (DIC). Condições utilizadas: Injetor e detector ambos a 250°C; Volume de injeção 1 μ L; Split 1/50; Pressão 70 Kpa; Gás de arraste H₂; Fluxo constante 1,0 mL/min; as análises foram realizadas variando as condições de temperatura dependendo do substrato.

4.2. Métodos espectrométricos

4.2.1. Espectrometria no Infravermelho (IV)

Os espectros de infravermelho foram obtidos utilizando o espectrômetro PERKIN-ELMER 1720-X FT, usando discos de NaCl para amostras líquidas solúveis em clorofórmio ou KBr para as amostras sólidas.

4.2.2. Espectrometria de Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

Os espectros de Ressonância Magnética Nuclear de Carbono e Hidrogênio (RMN ^1H e RMN ^{13}C) unidimensionais-(1D), foram obtidos em espectrômetros do tipo BRUKER modelos Avance DPX-300 ou DRX-500, operando na frequência de Hidrogênio a 300 MHz e a 500 MHz e na frequência do Carbono a 75 MHz e a 125 MHz, com pulso de frequência e transformada de Fourier (FT). Os deslocamentos químicos são dados em valores de delta (δ) e as constantes de acoplamento (J) em Hertz (Hz). O solvente utilizado na dissolução das substâncias foi clorofórmio deuterado com o deslocamento químico δ (7,27) para hidrogênio e para carbono em δ (77,0) ou dimetilsulfóxido deuterado com o deslocamento químico δ (2,49) para o hidrogênio e δ (39,5) para o carbono.

4.2.3. Espectrometria de Massas (EM)

Os espectros de massas foram obtidos em cromatógrafo acoplado a detector de massas OHP1100 (MS) por experimentos ESI^+ .

4.3. Ponto de fusão

Os valores de pontos de fusão foram obtidos no Departamento de Química Orgânica e Inorgânica da Universidade Federal do Ceará em um aparelho digital da MICROQUÍMICA EQUIPAMENTOS LTDA modelo MQAPF-302.

4.4. Rotação óptica

As medidas de rotação óptica dos compostos foram realizadas em um polarímetro PERKIN-ELMER 241 do Departamento de Química Orgânica e Inorgânica da Universidade de Oviedo.

4.5. Reagentes e solventes utilizados

- ✓ 1,5-diidroxinaftaleno de procedência FLUKA;
- ✓ 2-cloro-1-feniletanona de procedência SIGMA-ALDRICH;
- ✓ 2-cloro-1-(3,4-diclorofenil)etanona de procedência SIGMA-ALDRICH;
- ✓ 2-metoxiacetofenona de procedência SIGMA-ALDRICH;
- ✓ 2-nitroacetofenona de procedência SIGMA-ALDRICH;
- ✓ 3-bromoacetofenona de procedência SIGMA-ALDRICH;
- ✓ 3-metoxiacetofenona de procedência SIGMA-ALDRICH;
- ✓ 3-nitroacetofenona de procedência SIGMA-ALDRICH;
- ✓ 4-cloroacetofenona de procedência SIGMA-ALDRICH;
- ✓ 4-isopropilacetofenona de procedência SIGMA-ALDRICH;
- ✓ 4-metilacetofenona de procedência SIGMA-ALDRICH;
- ✓ 4-metoxiacetofenona de procedência SIGMA-ALDRICH;
- ✓ 4-nitroacetofenona de procedência SIGMA-ALDRICH;
- ✓ 4-dimetilaminopiridina (DMAP) de procedência ACROS ORGANICS;
- ✓ Acetato de vinila de procedência FLUKA;
- ✓ Anidrido acético (Ac_2O) de procedência SIGMA-ALDRICH;
- ✓ Acetofenona de procedência SIGMA-ALDRICH;
- ✓ Ácido 2-iodoxi-benzóico (IBX) de procedência ACROS ORGANICS;
- ✓ Ágar bacteriológico de procedência DIFCO LABORATORIES, DICKSON AND COMPANY;
- ✓ Álcool desidrogenases de procedência CODEXIS;
- ✓ Boroidreto de sódio (NaBH_4) de procedência RIEDE-DE HENAG SEELZE-HANNOVER;
- ✓ But-3-en-2-ona de procedência FLUKA;
- ✓ Celite de procedência FLUKA;
- ✓ Cloreto de sódio (NaCl) de procedência VETEC;
- ✓ Diazabiciclo[5.4.0]undec-7-eno (DBU) procedência ACROS ORGANICS;

- ✓ Dióxido de manganês (MnO_2) de procedência FLUKA;
- ✓ Dióxido de selênio (SeO_2) de procedência ACROS ORGANICS;
- ✓ Glicose desidrogenase de procedência CODEXIS;
- ✓ Lipase de *Candida antarctica* tipo B (CAL-B, Novozyme 435, 7300 PLU/g) de procedência NOVO NORDISK Co;
- ✓ Lipase de *Pseudomonas cepacia* PSL-C I (1638 U/g) de procedência SIGMA-ALDRICH;
- ✓ Meio de cultura batata-dextrose de procedência SIGMA-ALDRICH;
- ✓ NADP de procedência CODEXIS;
- ✓ PIFA de procedência FLUKA;
- ✓ *Saccharomyces cerevisiae* type II de procedência SIGMA-ALDRICH;
- ✓ Sulfato de sódio anidro (Na_2SO_4) de procedência VETEC;
- ✓ Trietilamina (Et_3N) de procedência SIGMA-ALDRICH;

Os solventes utilizados em cromatografias de coluna são de procedência MERCK ou SYNTH.

Os solventes utilizados em cromatografias líquidas de alta eficiência são de procedência MERCK de grau CLAE.

Os solventes empregados na síntese e resolução cinética foram secos, destilados e armazenados sob atmosfera de nitrogênio no Laboratório de Biorgânica da Universidade de Oviedo.

O THF foi seco com sódio, utilizando como indicador a benzofenona, enquanto que o diclorometano e o metanol foram secos com hidreto de cálcio.

4.6. Microrganismos empregados

As leveduras foram cedidas pelo Laboratório de Ecologia Microbiana e Biotecnologia da Universidade Federal do Ceará sob a supervisão da professora Vânia Maria Maciel Melo e encontra-se depositada sob ágar inclinado no Laboratório de Biotecnologia e Síntese Orgânica (LABS). As leveduras selecionadas para este trabalho foram: *Candida krusei* (CE010), *Candida krusei* (CE012), *Candida guilliermondi* (CE013), *Candida rugosa* (CE016), *Candida tropicalis* (CE017), *Kluyveromyces lactis-similar* (CE026), *Pichia anomala* (CE009) e *Pichia membranifaciens* (CE015).

4.7. Meio de cultura empregado

O meio para cultivo da levedura e obtenção da biomassa foi preparado segundo as recomendações do fabricante. Para cada litro de água destilada dissolveu-se 24 g do preparado sintético batata-dextrose de procedência SIGMA-ALDRICH.

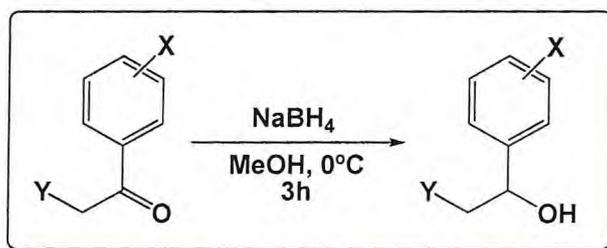
4.8. Procedimentos empregados no desenvolvimento das biotransformações mediadas pelas leveduras

4.8.1. Metodologia para identificação de enzimas do tipo álcool desidrogenase

Para identificação das cepas produtoras desta enzima preparou-se o meio de cultura batata-dextrose 24g/L. Em seguida adicionou-se o corante fucsina básica 0,01% ao meio e autoclavou-se a 121°C por 15 minutos. O meio contendo o corante foi vertido em placas de petri cada uma contendo 15 mL da solução e, em seguida o microrganismo foi inoculado e incubado por dois dias a 28°C. A presença da atividade de álcool desidrogenase foi visualizada pela coloração rosa ao passo que a coloração natural (branca) indicou ausência de atividade enzimática para esta enzima. (DELAMATER, 1948; PUCHTLER; MELOAN; BRETON, 1975; HILLOCKS, 1985).

4.8.2. Procedimento para a reação de redução com boroidreto de sódio

ESQUEMA 66



A uma solução da cetona (100 mg) em metanol anidro (5 mL) sob atmosfera de nitrogênio, NaBH₄ (39 mg, 1 mmol) foi adicionado a 0 °C sendo posteriormente conduzida à temperatura ambiente e mantida sob agitação magnética por 3 horas. Após o tempo reacional, o excesso de hidreto foi neutralizado adicionando cuidadosamente HCl aquoso 1 M (2 mL) e então o metanol foi evaporado. O produto foi extraído com AcOEt (3 × 2 mL). As fases orgânicas foram combinadas, secadas com Na₂SO₄ e o solvente foi evaporado a pressão reduzida. O produto da reação foi purificado por cromatografia *flash*. Os eluentes utilizados na purificação dos álcoois obtidos estão listados na **Tabela 7, p.101**. (GILBERT; MARTIN, 1998).

4.8.3. Procedimentos cromatográficos empregados na quantificação dos álcoois aromáticos

Para quantificação da conversão dos álcoois aromáticos e os respectivos excessos enantioméricos foram empregados a cromatografia gasosa ou a cromatografia líquida de alta eficiência dependendo do substrato de acordo com as condições descritas neste item.

1-(fenil)etanol

- Separação aquiral: CLAE, fluxo de 0,8 mL/min, Hexano:isopropanol (95:5), 20°C, 27 bar, 10 µL de injeção, cetona 5,5 min e álcool (8,4 min). Coluna Spherisorb.
- Separação quiral: CLAE, fluxo de 0,8 mL/min, Hexano: isopropanol (95:5), 20°C, 32 bar, 10 µL de injeção, 10,2 min (*S*) e 15,4 min (*R*). Coluna OB-H.

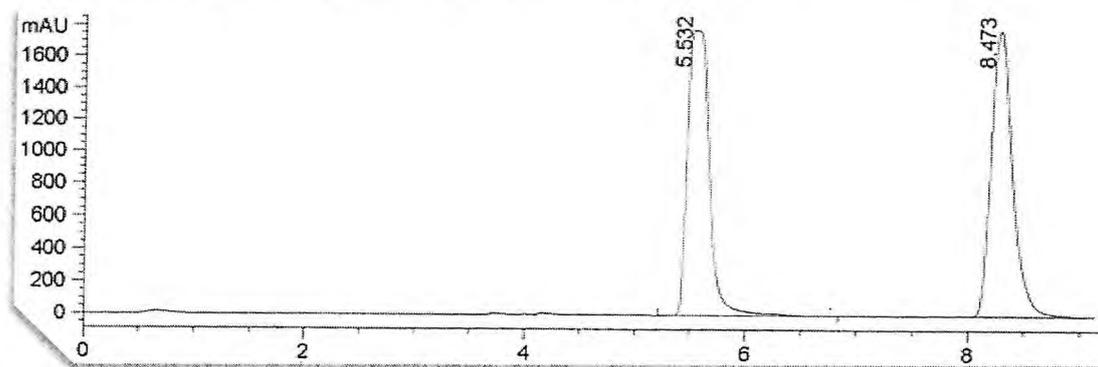


Figura 4.1 - Cromatograma da separação aquiral acetofenona t_R 5,5 min e 1-(fenil)etanol t_R 8,5 min

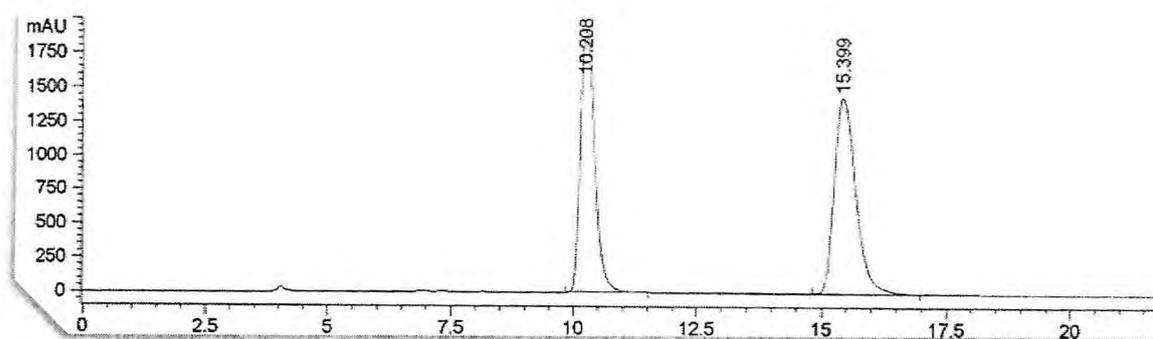


Figura 4.2 - Cromatograma da mistura racêmica do 1-(fenil)etanol t_R 10,2 min (*S*) e t_R 15,4 min (*R*)

1-(4-metoxifenil)etanol

- Separação aquiral: CLAE, fluxo de 0,8 mL/min, Hexano: isopropanol (95:5), 20°C, 29 bar, 10 µL de injeção, cetona 7,3 e álcool 8,5 min. Coluna Spherisorb.
- Separação quiral: CLAE, fluxo de 0,8 mL/min; Hexano: isopropanol (95:5); 20°C; 32 bar; 10 µL de injeção, 13,4 min (*S*) e 18,7 (*R*) min. Coluna OB-H.

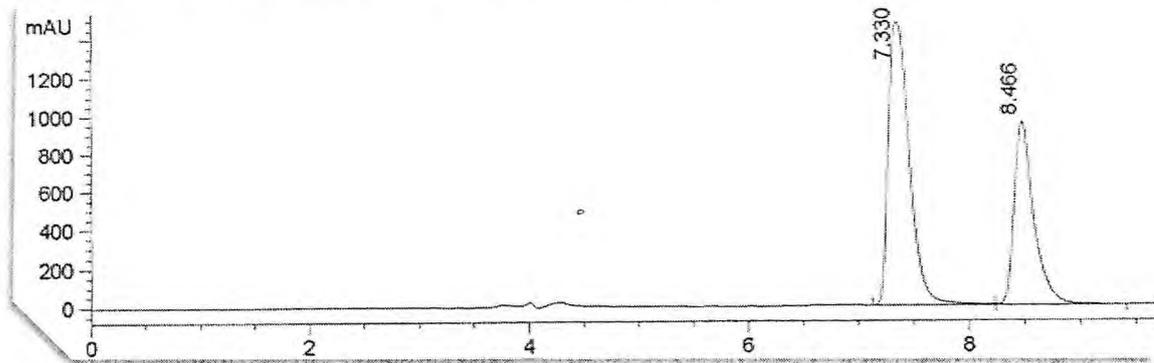


Figura 4.3 - Cromatograma da separação aquiral 4-metoxiacetofenona t_R 7,3 min e 1-(4-metoxifenil)etanol t_R 8,5 min

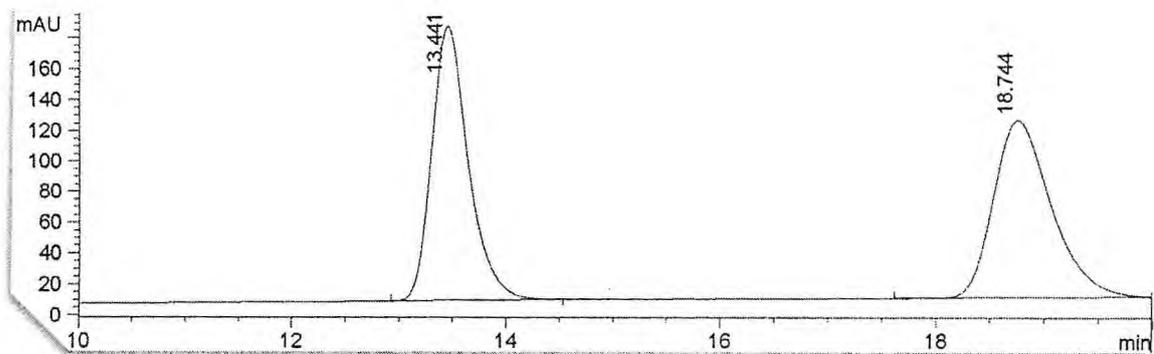


Figura 4.4 – Cromatograma da mistura racêmica do 1-(4-metoxifenil)etanol t_R 13,4 min (*S*) e t_R 18,7 min (*R*)

1-(4-isopropilfenil)etanol

- Separação aquiral: CG, Injetor 225°C, Detector 250°C, 1µL de injeção, 80°C (5°C/min) 180°C, álcool 7,4 min e cetona 8,0 min. Coluna HP1.
- Separação quiral: CLAE, fluxo de 0,8 mL/min, Hexano: isopropanol (97:3), 20°C, 25 bar, 10 µL de injeção, 11,7 min (*R*) e 12,3 min (*S*). Coluna IA.

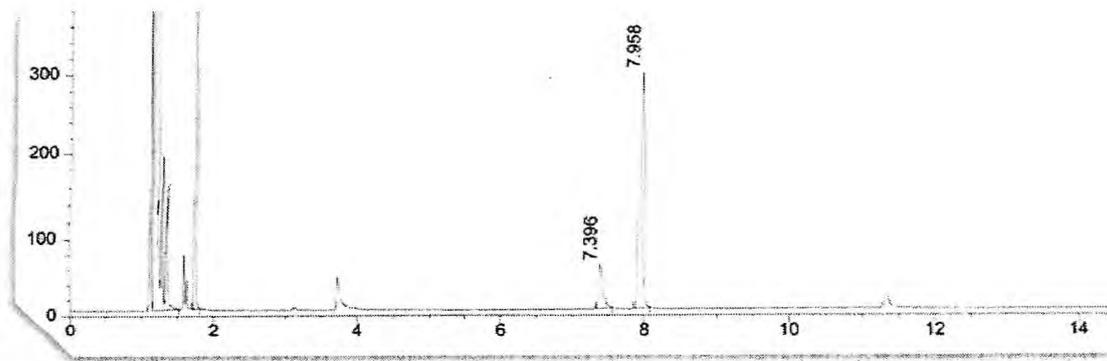


Figura 4.5 - Cromatograma da separação aquiral 4-isopropilacetofenona t_R 7,4 min e 1-(4-isopropilfenil)etanol t_R 8,0 min

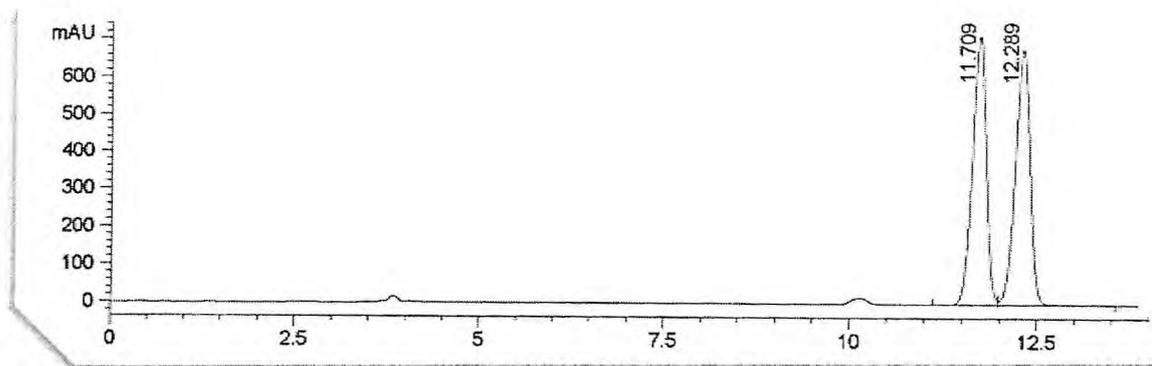


Figura 4.6 - Cromatograma da mistura racêmica do 1-(4-isopropilfenil)etanol t_R 11,7 min (*S*) e t_R 12,3 min (*R*)

1-(4-nitrofenil)etanol

- Separação aquiral: CG, Injetor 225°C, Detector 250°C, 1 μ L de injeção, 80°C (5°C/min) 180°C, cetona 9,6 min e álcool 11,8 min. Coluna HP1.
- Separação quiral: CLAE, fluxo de 0,8 mL/min, Hexano: isopropanol (95:5), 20°C, 19 bar, 10 μ L de injeção, 11,7 min (*R*) e 13,6 min (*S*). Coluna AS.

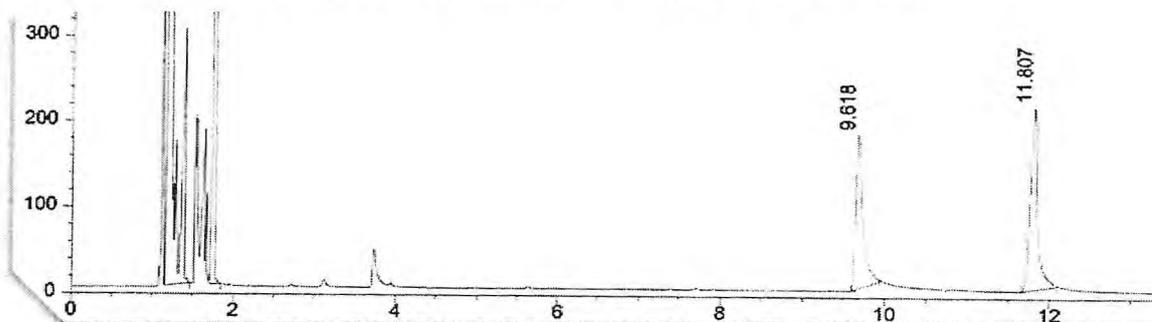


Figura 4.7 - Cromatograma da separação aquiral 4-nitroacetofenona t_R 9,6 min e 1-(4-nitrofenil)etanol t_R 11,8 min

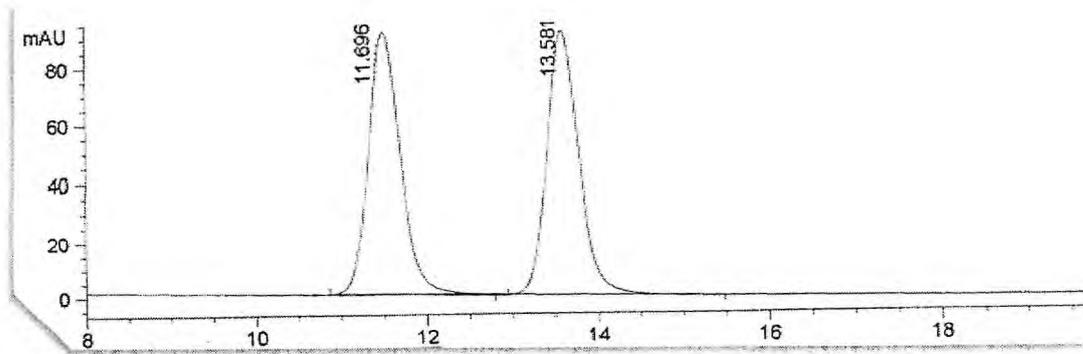


Figura 4.8 - Cromatograma da mistura racêmica do 1-(4-nitrofenil)etanol t_R 11,7 min (*R*) e t_R 13,6 (*S*) min

1-(4-clorofenil)etanol

- Separação aquiral: CG, Injetor 225°C, Detector 250°C, 1 μ L de injeção, 90°C (3°C/min) 105°C (5°C/min) 120 (20°C/min) 200°C, cetona 5,0 min e álcool 5,6 min. Coluna HPL.

- Separação quiral: CLAE, fluxo de 0,8 mL/min, Hexano: isopropanol (95:5), 20°C, 32 bar, 10 μ L de injeção, 7,5 min (*S*) e 8,5 min (*R*). Coluna OB-H.

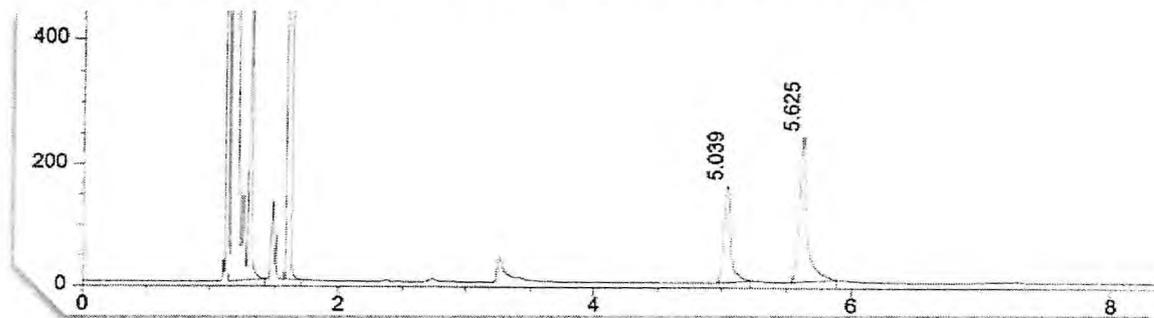


Figura 4.9 - Cromatograma da separação aquiral 4-cloroacetofenona t_R 5,0 min e 1-(4-clorofenil)etanol t_R 5,6 min

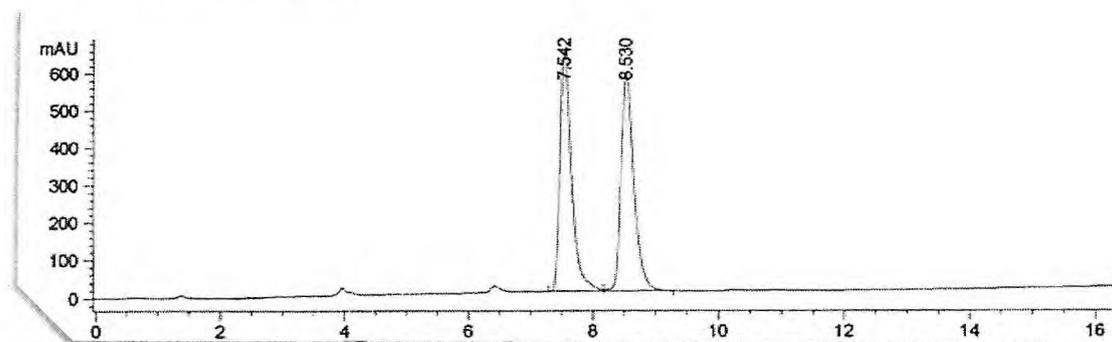


Figura 4.10 - Cromatograma da mistura racêmica do 1-(4-clorofenil)etanol t_R 7,5 min (*S*) and t_R 8,5 min (*R*)

1-(4-metilfenil)etanol

- Separação aquiral: CLAE, fluxo de 0,8 mL/min, Hexano: isopropanol (95:5), 20°C, 27 bar, 10 µL de injeção, cetona 5,2 min e álcool 6,6 min. Coluna Spherisorb.
- Separação quiral: CLAE, fluxo de 0,8 mL/min, Hexano: isopropanol (95:5), 20°C, 28 bar, 10 µL de injeção, 10,2 min (*S*) e 12,4 min (*R*). Coluna OB-H.

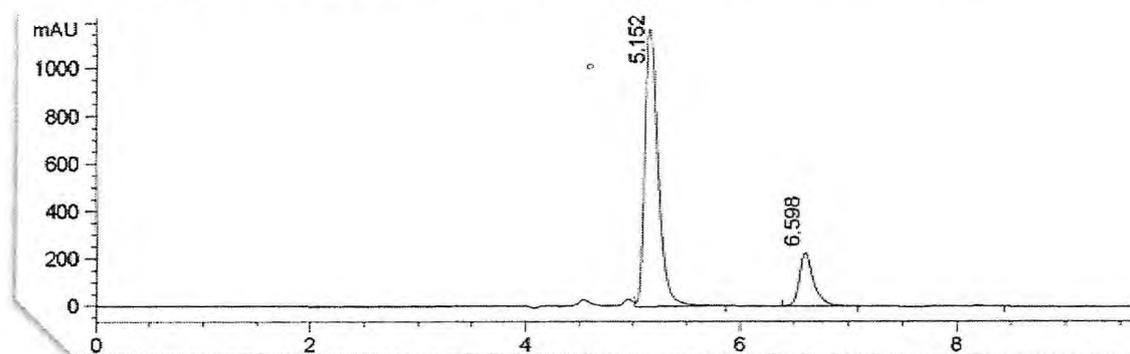


Figura 4.11 - Cromatograma da separação aquiral 4-metilacetofenona t_R 5,2 min e 1-(4-metilfenil)etanol t_R 6,6 min

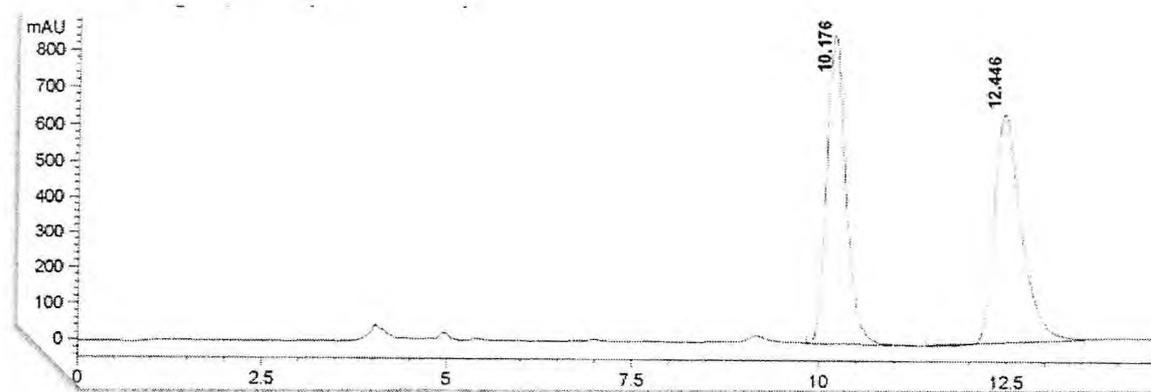


Figura 4.12 - Cromatograma da mistura racêmica 1-(4-metilfenil)etanol t_R 10,2 min (*S*) e t_R 12,4 min (*R*)

1-(3-metoxifenil)etanol

- Separação aquiral: CLAE, fluxo de 0,8 mL/min, Hexano: isopropanol (95:5), 20°C, 27 bar, 10 µL de injeção, cetona 5,2 min e álcool 5,9 min. Coluna Spherisorb.
- Separação quiral: CLAE, fluxo de 0,8 mL/min, Hexano: isopropanol (95:5), 20°C, 31 bar, 10 µL de injeção, 20,1 min (*S*) e 29,6 min (*R*). Coluna OB-H.

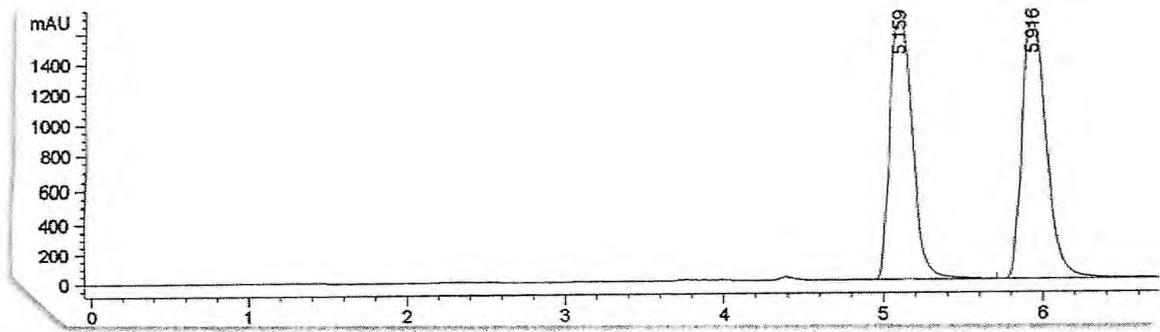


Figura 4.13 - Cromatograma da separação aquiral 3-metoxiacetofenona t_R 5,2 min e 1-(3-metoxifenil)etanol t_R 5,9 min

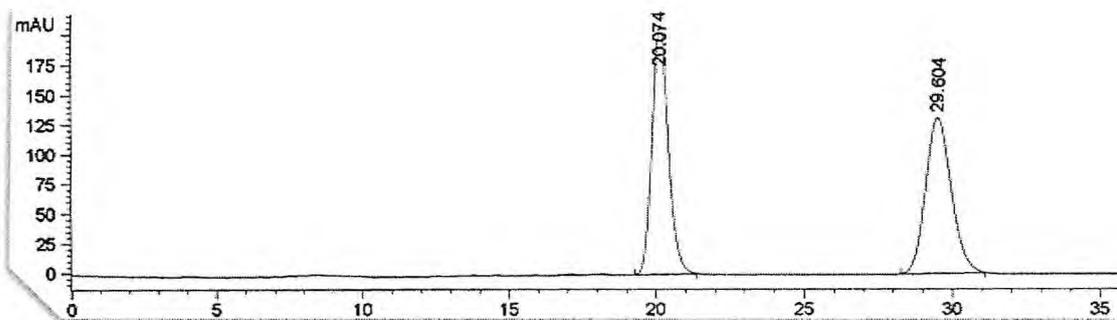


Figura 4.14 - Cromatograma da mistura racêmica do 1-(3-metoxifenil)etanol t_R 20,1 min (*S*) e t_R 29,6 min (*R*)

1-(3-nitrofenil)etanol

- Separação aquiral: CG, Injetor 225°C, Detector 250°C, 80°C (5°C min) 180°C, cetona 9,5 min e álcool 11,5 min. Coluna HP1.
- Separação quiral: CLAE, fluxo de 0,8 mL/min, Hexano: isopropanol (90:10), 20°C, 31 bar, 10 µL de injeção, 12,8 min (*S*) e 14,2 min (*R*). Coluna OB-H.

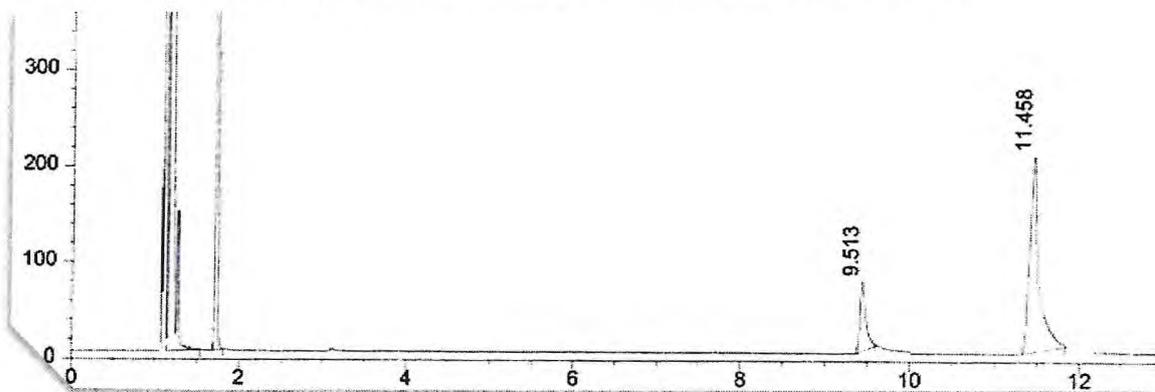


Figura 4.15 - Cromatograma da separação aquiral 3-nitroacetofenona t_R 9,5 min e 1-(3-nitrofenil)etanol t_R 11,5 min

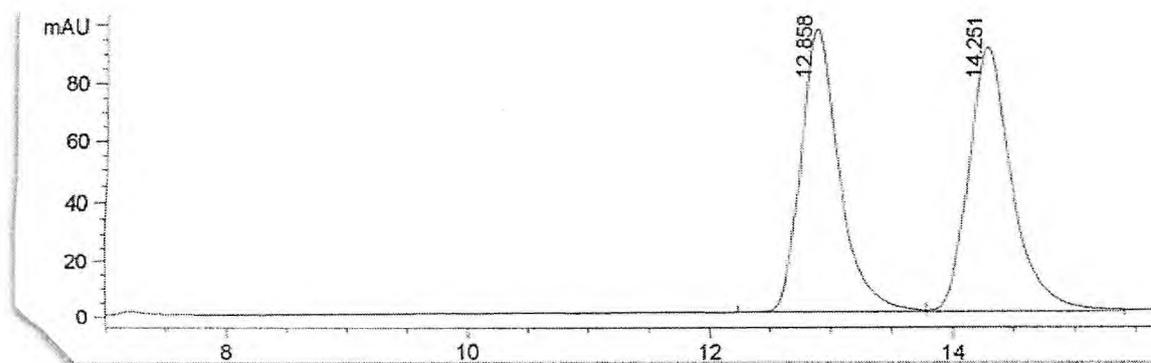


Figura 4.16 - Cromatograma da mistura racêmica do 1-(3-nitrofenil)etanol t_R 12,8 min (*S*) e t_R 14,2 min (*R*)

1-(3-bromofenil)etanol

- Separação aquiral: CLAE, fluxo de 0,8 mL/min, Hexano: isopropanol (95:05), 20°C, 27 bar, 10 μ L de injeção, álcool 5,1 min e cetona 6,9 min. Coluna Spherisorb.
- Separação quiral: CLAE, fluxo de 0,8 mL/min, Hexano: isopropanol (95:5), 20°C, 32 bar, 10 μ L de injeção, 10,7 min (*S*) e 14,6 min (*R*). Coluna OB-H.

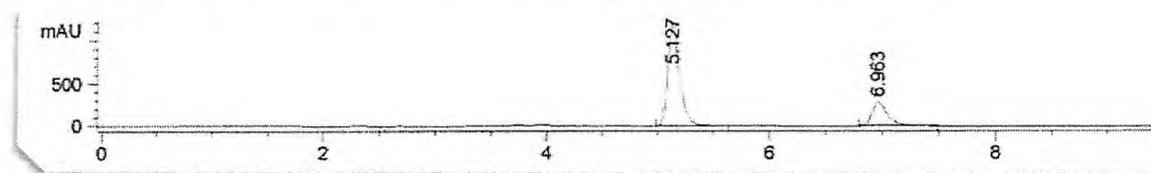


Figura 4.17 - Cromatograma da separação aquiral 3-bromoacetofenona t_R 5,1 min e 1-(3-bromofenil)etanol t_R 6,9 min

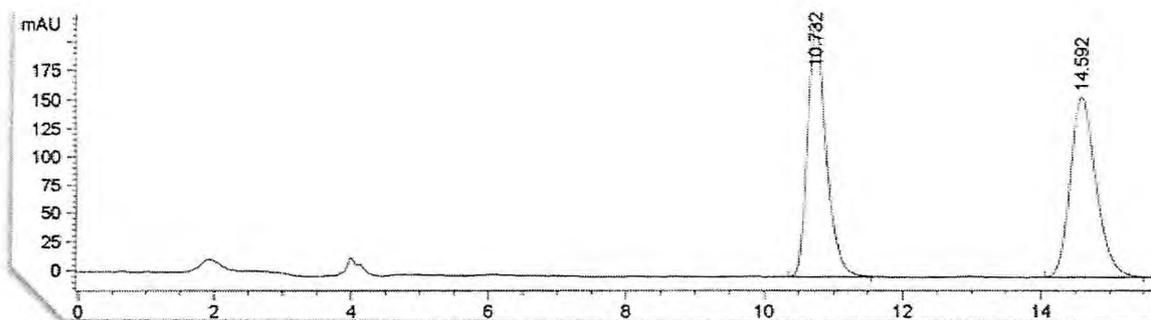


Figura 4.18 - Cromatograma da mistura racêmica do 1-(2-bromofenil)etanol t_R 10,7 min (*S*) e t_R 14,6 min (*R*)

1-(2-metoxifenil)etanol

- Separação aquiral: CLAE, fluxo de 0,8 mL/min, Hexano: isopropanol (95:5), 20°C, 29 bar, 10 μ L de injeção, cetona 6,4 min e álcool 7,1 min. Coluna Spherisorb.

- Separação quiral: CLAE, fluxo de 0,8 mL/min, Hexano: isopropanol (95:5), 20°C, 32 bar, 10 µL de injeção, 10,3 min (*S*) e 16,8 min (*R*). Coluna OB-H.

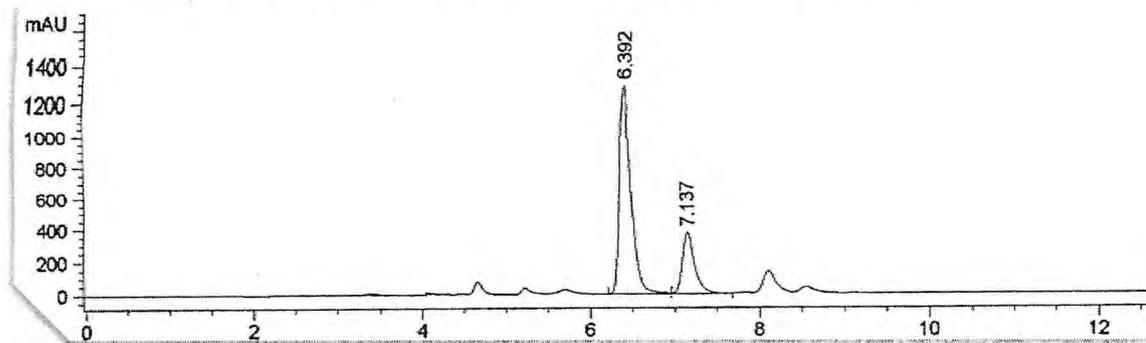


Figura 4.19 - Cromatograma da separação aquiral 2-metoxiacetofenona t_R 6,4 min e 1-(2-metoxifenil)etanol t_R 7,1 min

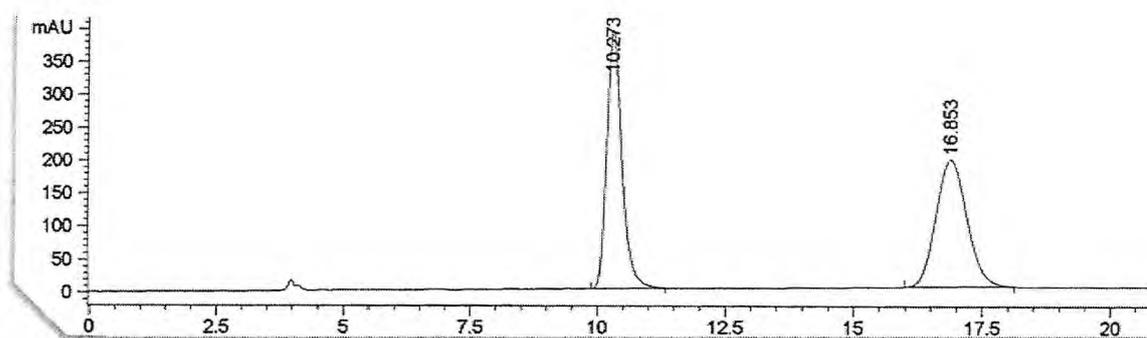


Figura 4.20 - Cromatograma da mistura racêmica do 1-(2-metoxifenil)etanol t_R 10,3 min (*S*) e t_R 16,8 min (*R*)

1-(2-nitrofenil)etanol

- Separação aquiral: CG, Injetor 225°C, Detector 250°C, 80°C (5°C min) 180°C, cetona 8,4 min e álcool 9,2 min. Coluna HP1.
- Separação quiral: CLAE, fluxo de 0,8 mL/min, Hexano: isopropanol (97:3), 20°C, 15 bar, 10 µL de injeção, 22,1 min (*R*) e 23,9 min (*S*). Coluna AS.

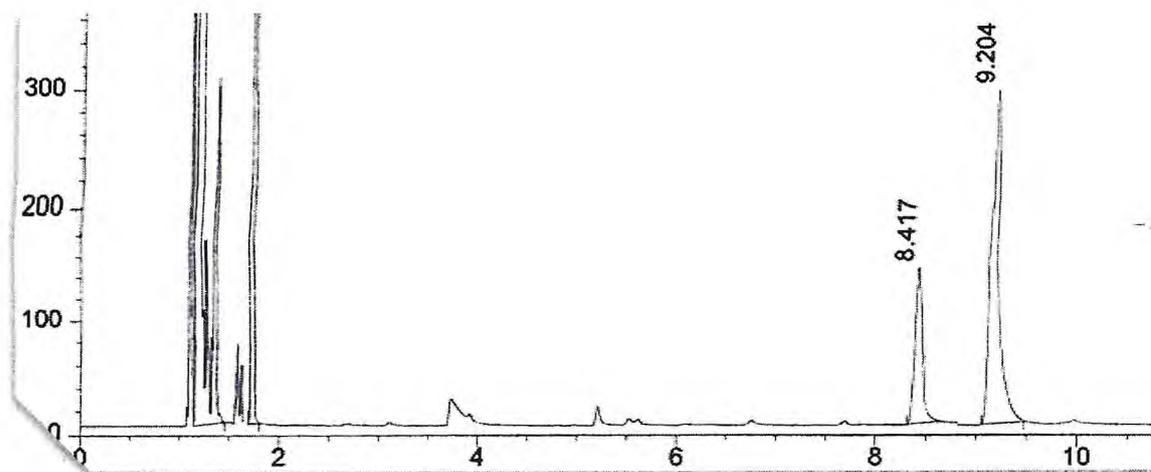


Figura 4.21 - Cromatograma da separação aquiral 2-nitroacetofenona t_R 8,4 min e 1-(2-nitrofenil)etanol t_R 9,2 min

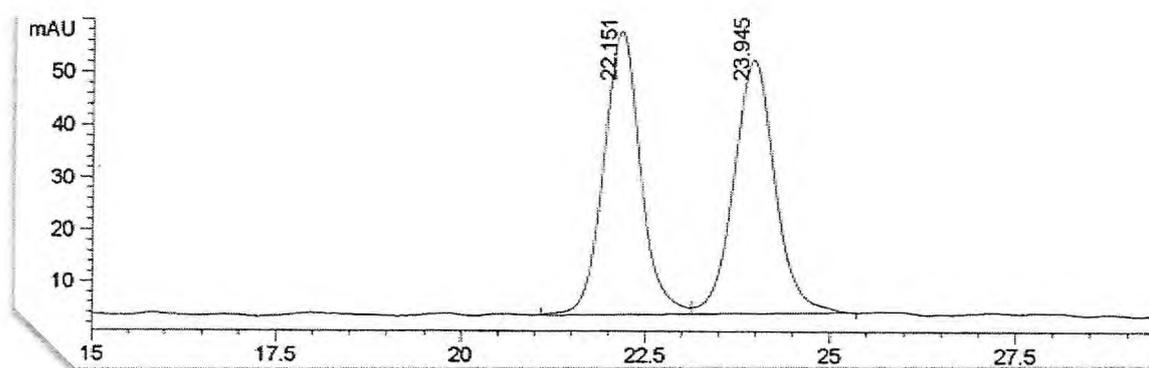


Figura 4.22 - Cromatograma do racêmico 1-(2-nitrofenil)etanol t_R 22,1 min (*R*) e t_R 23,9 min (*S*)

2-cloro-1-feniletanol

- Separação aquiral: CG, Injetor 225°C, Detector 250°C, 1 μ L de injeção, 90°C (3 °C/min) 105 °C (5 °C/min) 120 (20 °C/min) 200 °C, álcool 4,1 min e cetona 4,3 min. Coluna HP1.
- Separação quiral: CLAE, fluxo de 0,8 mL/min, Hexano: isopropanol (95:5), 20°C, 31 bar, 10 μ L de injeção, 13,3 min (*R*) e 17,7 min (*S*). Coluna OB-H.

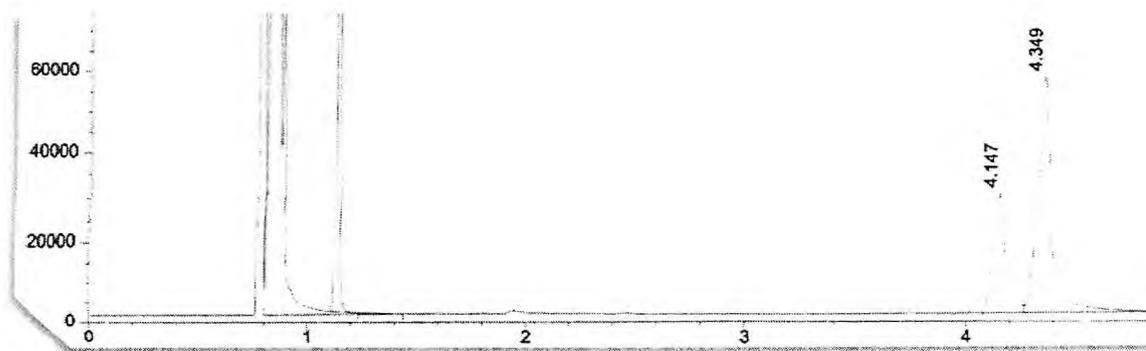


Figura 4.23 - Cromatograma da separação aquiral 2'-cloroacetofenona t_R 4,1 min e 2-cloro-1-(fenil)etanol t_R 4,3 min

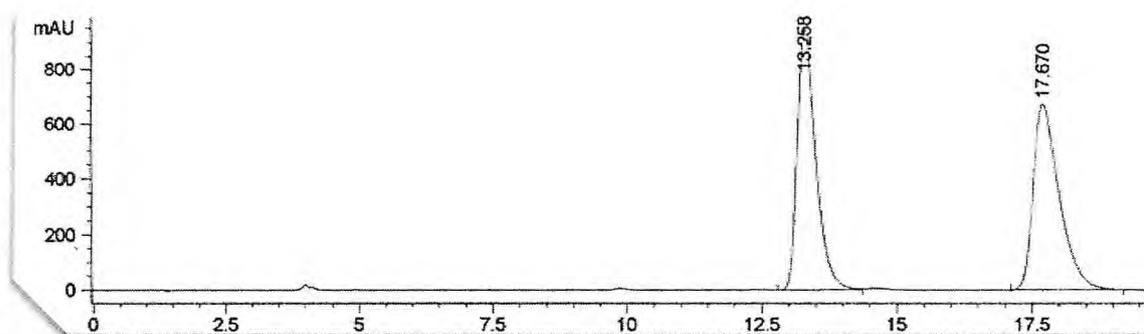


Figura 4.24 - Cromatograma da mistura racêmica do 2-cloro-1-(fenil)etanol t_R 13,3 min (*R*) e t_R 17,7 min (*S*)

2-cloro-1-(3,4-diclorofenil)etanol

- Separação aquiral: CG, Injetor 225°C, Detector 250°C, 1 μ L de injeção, 80°C (5°C/min) 180°C; cetona 13,6 min e álcool 14,8 min. Coluna HP1.
- Separação quiral: CLAE, fluxo de 0,8 mL/min, Hexano: isopropanol (95:5), 20°C, 25 bar, 10 μ L de injeção, 13,1 min (*S*) e 15,0 min (*R*). Coluna IA.

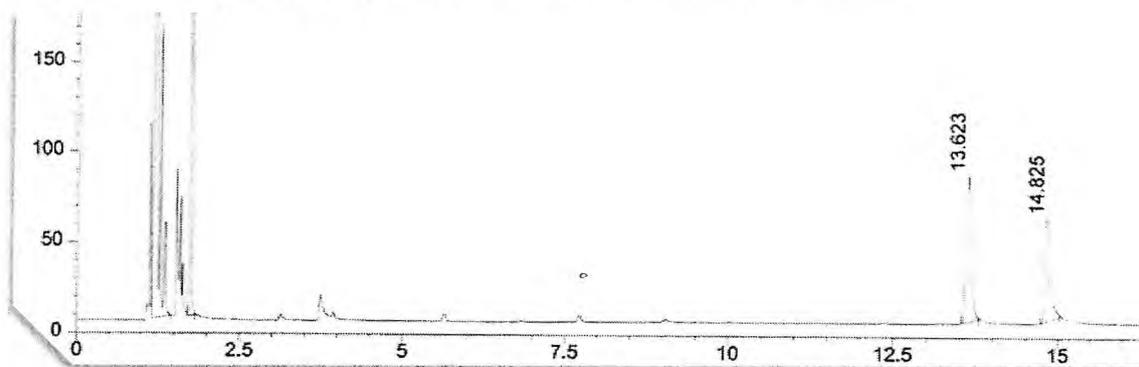


Figura 4.25 - Cromatograma da separação aquiral 2-cloro-1-(3,4-diclorofenil)etanona t_R 13,6 min e 2-cloro-1-(3,4-diclorofenil)etanol t_R 14,8 min

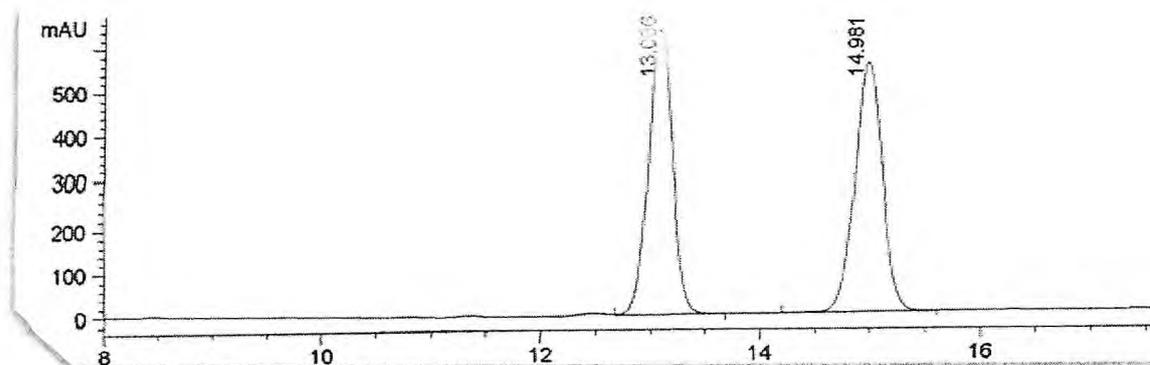


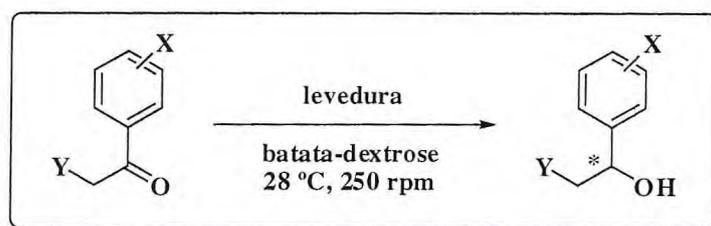
Figura 4.26 - Cromatograma da mistura racêmica do 2-cloro-1-(3,4-diclorofenil)etanol t_R 13,1 min (*S*) t_R e 15,0 min (*R*)

4.8.4. Procedimento para obtenção de biomassa das leveduras

Preparou-se o meio de cultura batata-dextrose de acordo com as recomendações do fabricante SIGMA-ALDRICH (24 g por litro de água destilada). O meio de cultura foi autoclavado a uma temperatura de 121 °C por 15 minutos. Em seguida, a levedura foi cultivada em 100 mL de meio de cultura de batata-dextrose e mantida sob agitação a 240 rpm durante 24 h a 28°C. Foi realizada uma leitura da absorbância da cultura e ajuste para um valor de 0,5 com solução salina 0,9% de NaCl previamente esterilizada. Como inóculo padrão utilizou-se 1 mL do meio de cultura com absorbância ajustada para 0,5 em erlenmeyers contendo 100 mL de meio de cultura Batata-dextrose (24g/L). Manteve-se sob agitação a 250 rpm por 24 h e 28 °C. Para *C. tropicalis*, o inóculo de 0,5 de absorbância correspondeu a 32×10^6 UFC/mL e para *P. membranifaciens* o inóculo de 0,5 correspondeu a 14×10^6 UFC/mL, cuja contagem foi feita pelo método *spread-plate*.

4.8.5. Procedimento para reação de biorredução utilizando células íntegras de leveduras

ESQUEMA 67



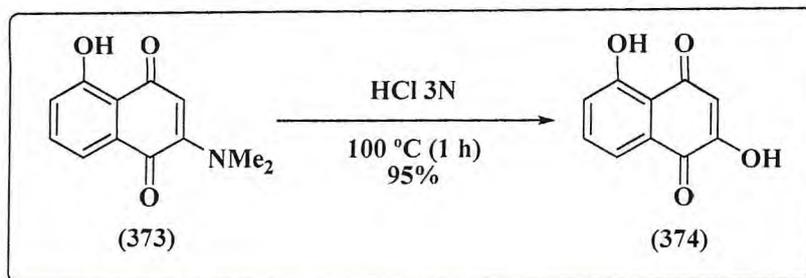
Após 24 h de incubação da levedura foi adicionado o substrato selecionado para conversão utilizando 20 μL ou 20 mg para cada 100 mL de meio de cultura. Após o

tempo reacional o produto foi extraído com AcOEt (3x50 mL), as fases orgânicas foram combinadas, secadas com Na₂SO₄ e filtradas. O solvente foi evaporado e o produto bruto da reação foi analisado pela técnica adequada (CLAE ou CG). Para análise quiral o produto foi previamente purificado por cromatografia *flash* e analisado pela técnica adequada. Em seguida, foi preparada uma solução com solvente orgânico para obtenção da rotação ótica específica dos compostos e comparação com a literatura para elucidação da estereoquímica do álcool obtido (**Tabela 11, p.109**).

cromatografia *flash* (100% CH₂Cl₂), resultando em 446 mg da quinona (**373**) com 71% de rendimento. (YAMASHITA *et al.*, 2007).

4.9.3. Síntese da 2,5-diidroxi-1,4-naftalenodiona

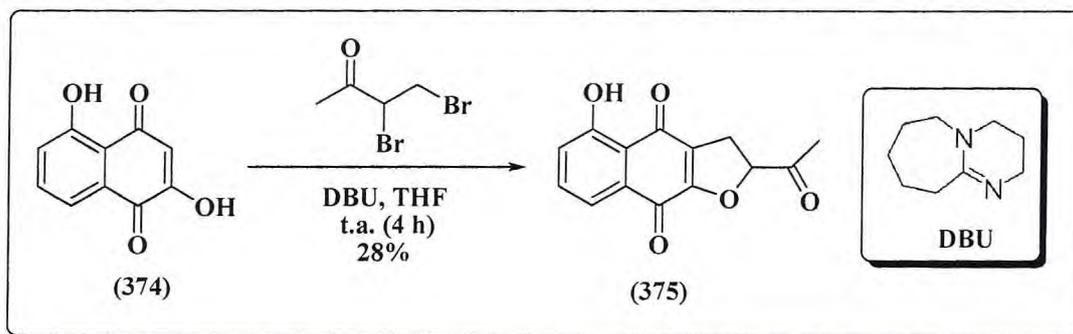
ESQUEMA 70



Uma solução de (**373**) (391 mg, 1,79 mmol) em HCl 3M (2 mL) foi mantida sob refluxo e acompanhada por CCD por 1 h até que o material de partida fosse completamente convertido no produto. A suspensão resultante foi extraída com CH₂Cl₂ (3×30 mL), o solvente foi evaporado e o produto foi purificado por cromatografia *flash* (4/1 CH₂Cl₂/MeOH) fornecendo 325 mg do composto (**374**) como um sólido laranja com 95% de rendimento. (YAMASHITA *et al.*, 2007).

4.9.4. Síntese do 2-acetil-2,3,4,9-tetrahidronafto[2,3-*b*]furano-4,9-diona

ESQUEMA 71

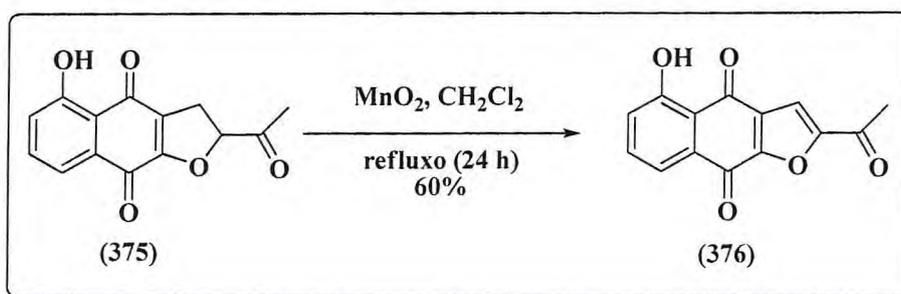


A uma solução da but-3-en-2-ona (210 µL, 2,5 mmol) em pentano (2 mL) foi adicionado bromo (134 µL, 2,6 mmol) a -15 °C. Após 20 minutos de agitação o solvente foi evaporado para obtenção da 3,4-dibromo-2-butanona. A uma solução da quinona (**374**) (100 mg, 0,53 mmol) em THF (5 mL) foi adicionada 550 µL (3,6 mmol) de diazabicyclo[5.4.0]undec-7-eno e a solução resultante foi mantida sob agitação magnética por 20 minutos a 0°C. Em seguida foi adicionada, sob atmosfera de nitrogênio, a 3,4-dibromo-2-butanona mantendo-se sob agitação magnética, à temperatura ambiente, por 2 h. Adicionou-se novamente DBU (75 µL, 0,49 mmol) e

manteve-se a mistura reacional sob agitação por 4 h. Em seguida, adicionou-se uma 2 mL de uma solução de cloreto de amônio saturada e o produto foi extraído com CH_2Cl_2 (3x50 mL). As fases orgânicas foram combinadas e secadas com Na_2SO_4 e então o solvente foi evaporado sob pressão reduzida. As naftoquinonas (375) e (376) foram isoladas após cromatografia *flash* (20% Hex/ CH_2Cl_2), com rendimentos de 28% (38 mg) e 37% (50 mg), respectivamente. (HAGIWARA *et al.*, 2001).

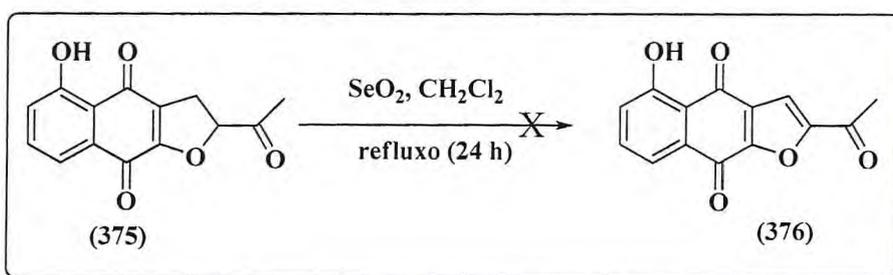
4.9.5. Síntese do 2-acetil-4,9-diidronafto[2,3-*b*]furano-4,9-diona

ESQUEMA 72



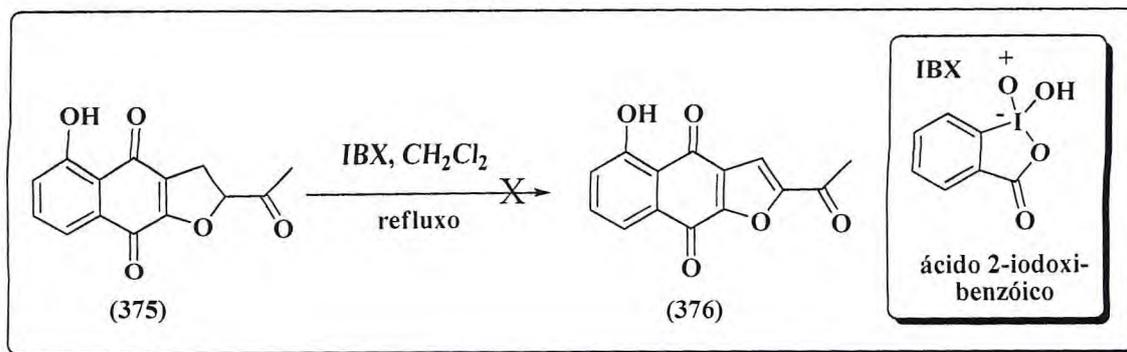
A uma solução da quinona (375) (158 mg, 0,61 mmol) em CH_2Cl_2 (10 mL) foi mantida sob refluxo com MnO_2 (534 mg, 6,1 mmol) por 24 h. A mistura foi filtrada utilizando uma camada de celite e o filtrado obtido foi concentrado sob pressão reduzida. O produto bruto foi purificado por cromatografia *flash* empregando como eluente (CH_2Cl_2 /Hexano 4/1) para fornecer 94 mg do produto (376) com 60% de rendimento. (AOYAMA, *et al.*, 1998).

ESQUEMA 73



Uma solução da quinona (375) (102 mg, 0,39 mmol) em 1,4-dioxano (4 mL) e água (0,1 mL) foi mantida sob refluxo com SeO_2 (43 mg, 0,39 mmol) por 24 h. A mistura foi filtrada utilizando uma camada de celite e o filtrado obtido foi concentrado sob pressão reduzida. O extrato reacional foi analisado por CCD empregando como eluente (CH_2Cl_2 /Hexano 4/1). Houve conversão completa a um produto que não foi caracterizado, porém não houve formação do produto (376).

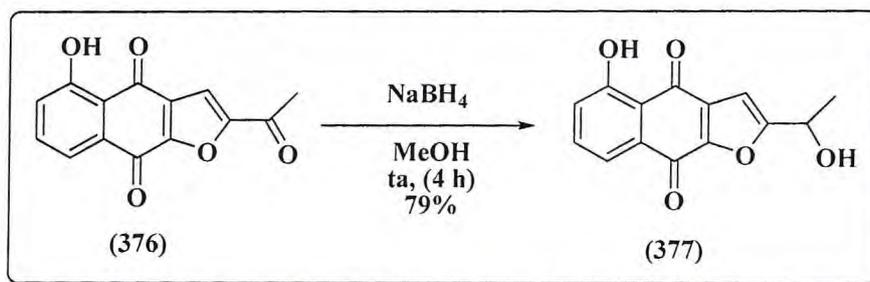
ESQUEMA 74



Uma solução da quinona (375) (40 mg, 0,15 mmol) em diclorometano (10 mL) foi mantida sob refluxo com IBX (94 mg, 0,33 mmol) a 70°C por 24 h. A mistura foi filtrada utilizando uma camada de celite e o filtrado obtido foi concentrado sob pressão reduzida. O extrato bruto foi purificado por cromatografia *flash* empregando como eluente (CH₂Cl₂/Hexano 4/1). Não houve formação do produto (376), sendo recuperado o material de partida em 78%. (NICOLAOU *et al.*, 2002).

4.9.6. Síntese da 5-hidroxi-2-(1-hidroxietil)-nafto[2,3-*b*]furano-4,9-diona

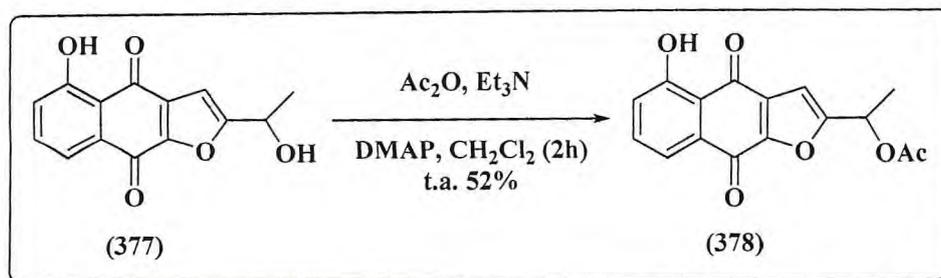
ESQUEMA 75



A uma solução da cetona (376) (134 mg, 0,52 mmol) em metanol seco (5 mL), sob atmosfera de nitrogênio, foi adicionado a 0 °C, NaBH₄ (39 mg, 1 mmol). A mistura foi mantida sob agitação magnética por 1h, à temperatura ambiente. O excesso de hidreto foi neutralizado cuidadosamente pela adição de HCl aquoso 1 N (2 mL) e então o MeOH foi evaporado. O produto foi extraído com AcOEt (3 × 2 mL). As fases orgânicas foram combinadas, secas com Na₂SO₄ e o solvente evaporado a pressão reduzida. O produto da reação foi purificado por cromatografia *flash* (4/1 CH₂Cl₂/Hexano) fornecendo 106 mg do álcool racêmico (377) com 79% de rendimento. (HAGIWARA *et al.*, 2001).

4.9.7. Síntese do acetato de 1-(5-hidroxi-4,9-dioxo-4,9-diidronafto[2,3-*b*]furan-2-il)-etila

ESQUEMA 76



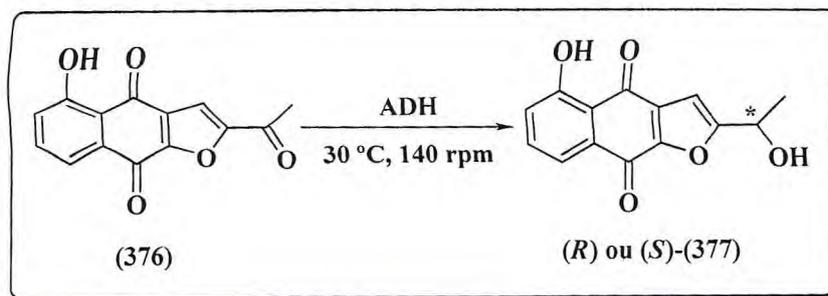
A uma solução do álcool (\pm)-(377) (26 mg, 0,1 mmol), sob atmosfera de nitrogênio em CH_2Cl_2 seco (1 mL), Et_3N (20,8 μL , 0,15 mmol), DMAP (3,7 mg, 0,03 mmol) e Ac_2O (14,2 μL , 0,15 mmol) foram sucessivamente adicionados. A reação foi mantida sob agitação magnética à temperatura ambiente e, acompanhada por CCD até que o material de partida fosse completamente convertido após 2 h de reação. O produto foi purificado por cromatografia *flash* (4/1 CH_2Cl_2 /Hexano) resultando em 15 mg de (\pm)-(378) com 52% de rendimento.

4.9.8. Procedimentos cromatográficos empregados na síntese da (*S*)-5-hidroxi-2-(1-hidroxi-2-etil)-nafto[2,3-*b*]furano-4,9-diona

As análises em CLAE foram desenvolvidas em um cromatógrafo Hewlett Packard 1100 equipado com um detector de UV a 210 nm usando uma Coluna Daicel Chiralcel OD (25 cm \times 4,6 mm I.D.) variando as condições dependendo da reação. Para a obtenção dos excessos enantioméricos das reações de acetilação foram empregadas as seguintes condições Hexano/isopropanol 90/10, 0,8 mL/min, 20°C, 14 bar, 20 μL de injeção. Tempos de retenção: acetatos (378) 23,1 min (*R*) e 24,5 min (*S*), álcoois (377) 29,5 min (*R*) e 47,6 min (*S*). Para calcular o excesso enantiomérico das reações de biorredução as condições foram: Hexano/ isopropanol 85/15 0,8 mL/min, 20°C, 20 μL de injeção, 14 bar. Tempos de retenção: álcoois (377) 19,7 min (*R*) e 30,1 min (*S*) e cetona (376) 41,5 min. As análises aquirais das reações foram analisadas por Cromatografia Gasosa (CG) empregando um cromatógrafo Hewlett Packard 6890 Series II equipado com uma coluna HP-1 Varian (30 m \times 0,25 mm \times 0,25 μm , 1.0 bar N_2) para determinação da conversão. Programa de temperatura: 150°C (5 min) 3°C/min 210°C (10 min). Tempos de retenção: cetona (376) 20,2 min, álcool (377) 23,4 min e acetato (378) 25,7 min.

4.9.9. Procedimento para a biorredução da cetona (376) dependendo da ADH usada no processo enzimático

ESQUEMA 77



ADH A. Em um eppendorf foi adicionado 2 mg (4 U) da enzima, 5 mg da cetona e 900 μL do tampão TRIS-HCl 0,1 M pH 7,0. Então, 100 μL de NADP 10 mM foi adicionado como cofator e 200 μL de 2-propanol para regeneração do cofator. A reação foi mantida sob agitação a 140 rpm e 30 °C, após 24 h de reação o produto foi extraído com EtOAc (3 x 400 μL) e seco com Na_2SO_4 .

ADH CP. Em um eppendorf foi adicionado 3 μL (1 U) da enzima, 5 mg da cetona e 700 μL do tampão TRIS-HCl 0,1 M pH 7,0. Então, 100 μL de NAD 10 mM foi adicionado como cofator e 200 μL de 2-propanol para regeneração do cofator. A reação foi mantida sob agitação a 140 rpm e 30 °C, após 24 h de reação o produto foi extraído com EtOAc (3 x 400 μL) e seco com Na_2SO_4 .

ADH LB. Em um eppendorf foi adicionado 1 μL (1 U) da enzima, 5 mg da cetona, 600 μL do tampão TRIS-HCl 0,1 M pH 7,0 e 100 μL de MgCl_2 10 mM. Então, 100 μL de NADP 10 mM foi adicionado como cofator e 200 μL de 2-propanol para regeneração do cofator. A reação foi mantida sob agitação a 140 rpm e 30 °C, após 24 h de reação o produto foi extraído com EtOAc (3 x 400 μL) e seco com Na_2SO_4 . (BUSTO; FERNANDEZ; GOTOR, 2006)

ADH PR2. Em um eppendorf foi adicionado 7,7 mg (1 U) da enzima, 5 mg da cetona e 800 μL do tampão Kpi 0,1 M pH 7,5. Então, 100 μL de NADP 10 mM foi adicionado como cofator e 200 μL de 2-propanol para regeneração do cofator. A reação foi mantida sob agitação a 140 rpm e 30 °C, após 24 h de reação o produto foi extraído com EtOAc (3 x 400 μL) e seco com Na_2SO_4 .

ADH RS1. Em um eppendorf foi adicionado 3,6 μL (1 U) da enzima, 5 mg da cetona, 10 mg de glicose e 1 mL do tampão TRIS-HCl 0,1 M pH 7,0. Então, 100 μL de NAD 10 mM foi adicionado como cofator e 2 μL (1U) de glicose desidrogenase para regeneração do cofator. A reação foi mantida sob agitação a 140 rpm e 30 °C, após 24 h de reação o produto foi extraído com EtOAc (3 x 400 μL) e seco com Na_2SO_4 .

ADH T. Em um eppendorf foi adicionado 2,5 μL (1 U) da enzima, 5 mg da cetona e 700 μL do tampão TRIS-HCl 0,1 M pH 7,0. Então, 100 μL of NADP 10 mM foi adicionado como cofator e 200 μL de 2-propanol para regeneração do cofator. A reação foi mantida sob agitação a 140 rpm e 30 °C, após 24 h de reação o produto foi extraído com EtOAc (3 x 400 μL) e seco com Na_2SO_4 . (BUSTO; FERNANDEZ; GOTOR, 2006)

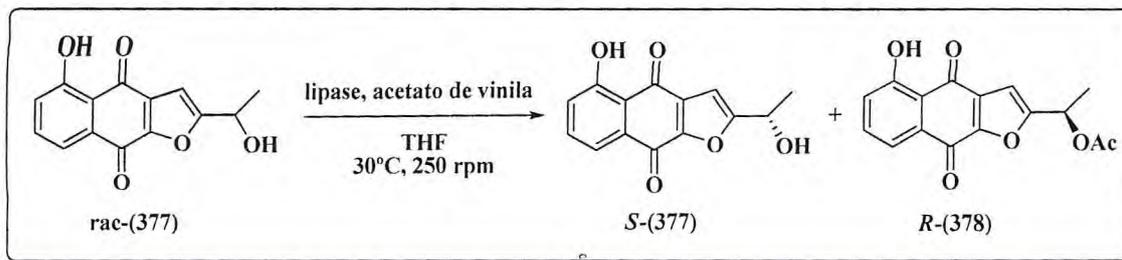
4.9.10. Biorredução da quinona (376) utilizando células íntegras de leveduras

***Candida tropicalis* CE017:** Em um erlenmeyer contendo 50 mL de meio de cultura Batata-Dextrose de Sigma-Aldrich, foi adicionado 1 mL de uma solução da levedura *Candida tropicalis* com 0,5 de absorbância, esta solução foi mantida sob agitação durante 24 horas a 250 rpm e 28°C. Em seguida, foi adicionado 5 mg de substrato. Após três dias de reação o produto foi extraído do meio reacional com AcOEt (3x20 mL) e seco com Na_2SO_4 . O solvente foi evaporado e o produto da reação foi analisado por CG.

***Saccharomyces cerevisiae* type II:** Em um erlenmeyer foram adicionados 5 mL de uma solução de glicose em água (15mg/mL), 120 μL de 2-propanol, 0,6 g da levedura “baker’s yeast” e 20 mg da cetona (376). Após 24 horas o produto da reação foi extraído com AcOEt (3 x 5mL) e seco com Na_2SO_4 . O solvente foi evaporado e o produto da reação foi analisado por CG. (BUSTO; FERNANDEZ; GOTOR, 2006)

4.9.11. Procedimento para a resolução cinética enzimática do álcool racêmico (377)

ESQUEMA 78



A uma solução do álcool (\pm)-(377) (25 mg, 0,1 mmol) em THF seco (1 mL) foram adicionados, a enzima correspondente (CAL-B or PSL-C I, razão 1:1 em massa com relação ao álcool) e acetato de vinila (17,2 μ L, 0,2 mmol). A reação foi mantida sob agitação a 250 rpm e 30°C. Retirou-se alíquotas em tempos pré-estabelecidos para serem analisados em CG até que se obtivesse um valor de conversão em torno de 50%. Em seguida, a enzima foi filtrada e o solvente evaporado para obtenção do produto. O produto da reação foi purificado por cromatografia *flash* (gradiente de eluição 4/1 CH₂Cl₂/Hexano e CH₂Cl₂/AcOEt 12/1) obtendo-se os produtos opticamente ativos (*R*)-(378) e (*S*)-377. (MONTERDE *et al.*, 2002).

Capítulo 5

Dados Físicos e Espectrométricos

5. DADOS FÍSICOS E ESPECTROMÉTRICOS

5.1. Dados físicos e espectrométricos da 5-hidroxi-naftoquinona

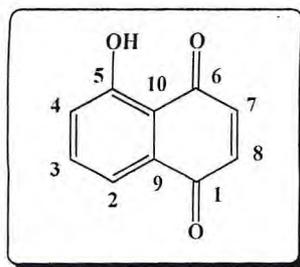


Figura 5.1 - Estrutura química do composto (372) - 5-hidroxi-naftoquinona

Ponto de fusão: 129-131 °C;

IV (disco de KBr): ν 3406, 3056, 2921, 1642, 1592, 1451, 1353, 1288, 1223, 1150, 1080, 839, 748 cm^{-1} ; (**Figura 5.2**)

^1H -RMN (CDCl_3 , 300,13 MHz) δ : 6,95 (2H, s, $\text{H}_7 + \text{H}_8$), 7,29 (1H, dd, $J=1,89$ e 7,70 Hz, H_2), 7,61-7,67 (2H, m, $\text{H}_3 + \text{H}_4$), 11,90 (1H, s, OH); (**Figura 5.3**)

^{13}C -RMN (CDCl_3 , 75,5 MHz) δ : 115,0 (C_{10}), 119,1 (C_2), 124,4 (C_4), 131,7 (C_9), 136,4 (C_3), 138,5 (C_7), 139,5 (C_8), 161,3 (C_5), 184,1 (C_1), 190,2 (C_6); (**Figura 5.4**)

EM (ESI^+ , m/z): 174 [$(\text{M})^+$, 100%]. (**Figura 5.5**)

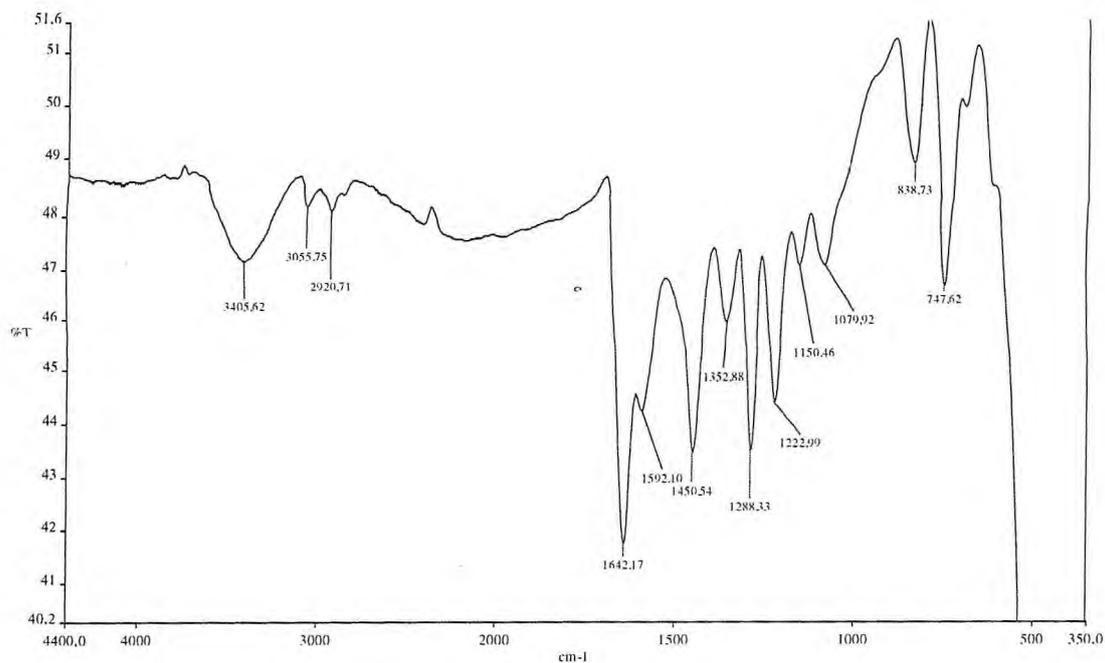


Figura 5.2 - Espectro de absorção na região do infravermelho do composto (372)

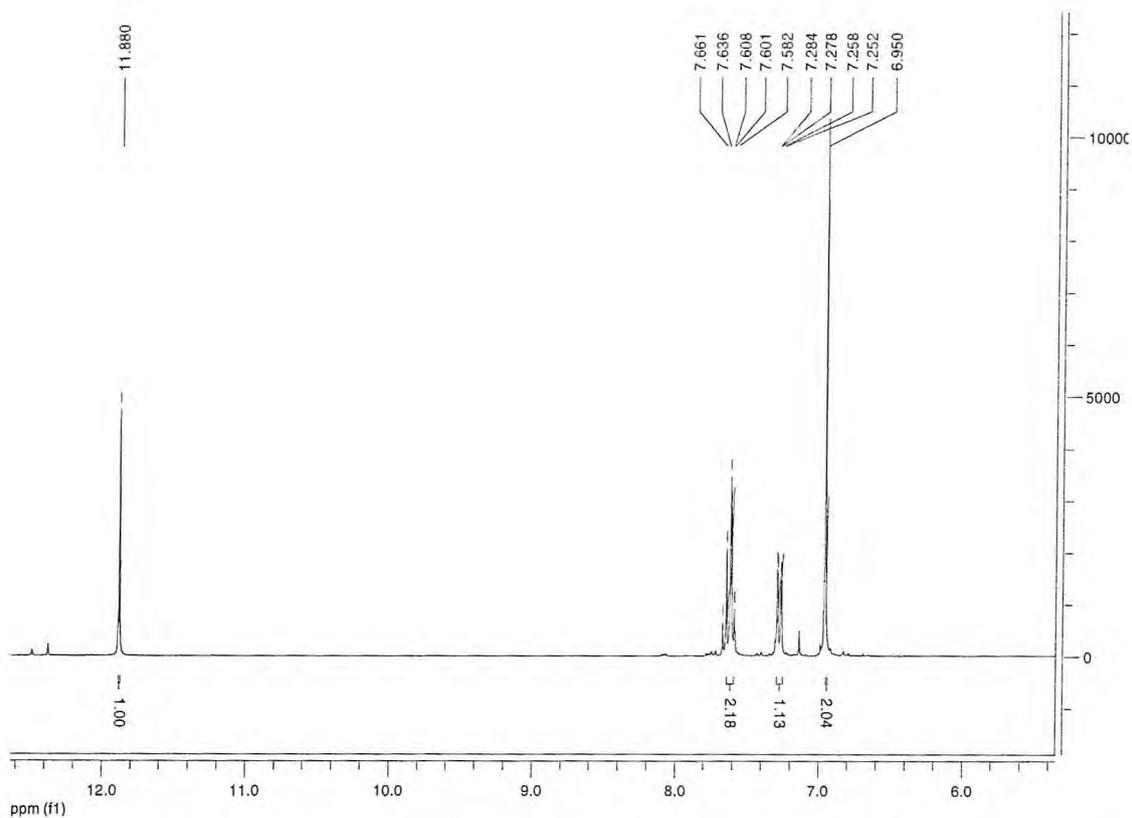


Figura 5.3 - Espectro de Ressonância Magnética Nuclear de ¹H a 300 MHz em CDCl₃ do composto (372)

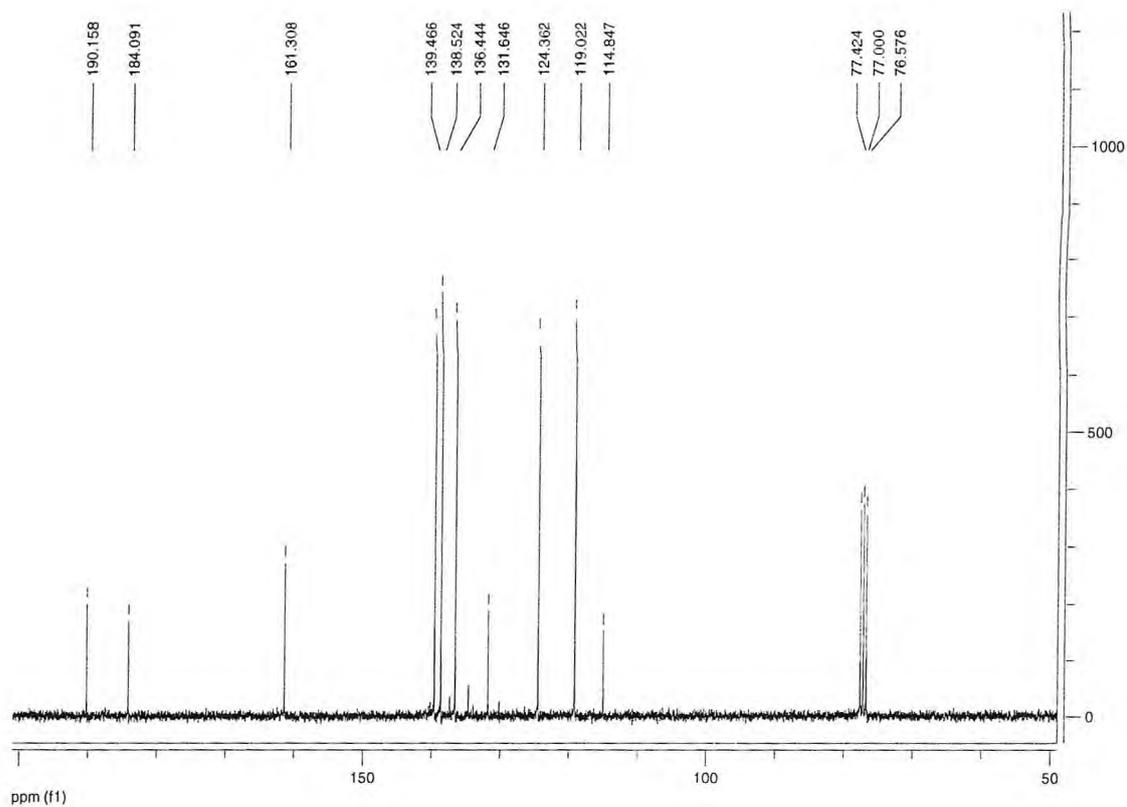


Figura 5.4 - Espectro de Ressonância Magnética Nuclear de ^{13}C a 75 MHz em CDCl_3 do composto (372)

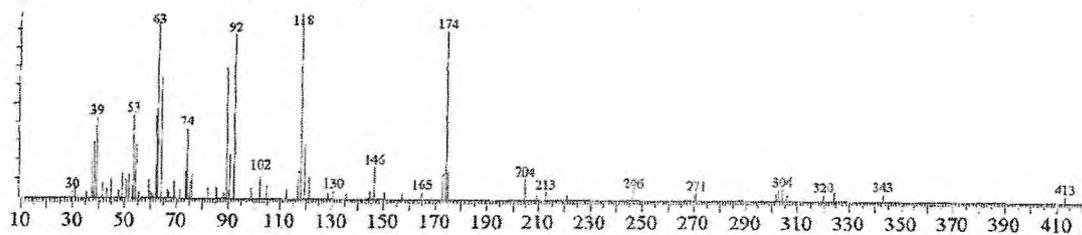


Figura 5.5 - Espectro de Massa por ESI do composto (372)

5.2. Dados físicos e espectrométricos da 2-(dimetilamino)-5-hidroxi naftoquinona

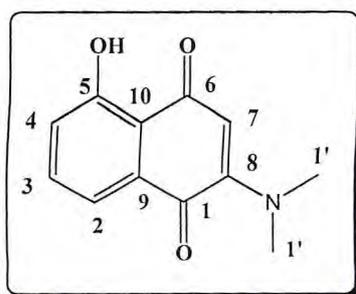


Figura 5.6 - Estrutura química do composto (373) - 2-(dimetilamino)-5-hidroxi naftoquinona

Ponto de fusão: 144-146 °C;

IV (disco de KBr): ν 3485, 3068, 2930, 1671, 1618, 1565, 1471, 1408, 1348, 1278, 1233, 1153, 1049, 926, 861, 766 cm^{-1} ; (**Figura 5.7**)

^1H -RMN (CDCl_3 , 300,13 MHz) δ : 3,22 (6H, s, $\text{H}_{1'}$), 5,66 (1H, s, H_7), 7,15 (1H, dd, $J_{\text{HH}}=2,3$ e 7,2 Hz, H_2), 7,39-7,46 (2H, m, $\text{H}_3 + \text{H}_4$), 12,93 (1H, s, OH); (**Figura 5.8**)

^{13}C -RMN (CDCl_3 , 75,5 MHz) δ : 42,7 ($\text{C}_{1'}$), 105,1 (C_7), 114,6 (C_{10}), 118,8 (C_2), 124,2 (C_4), 132,4 (C_9), 133,7 (C_3), 152,9 (C_8), 160,3 (C_5), 182,8 (C_1), 187,9 (C_6); (**Figura 5.9**)

EM (ESI^+ , m/z): 218 [$(\text{M}+\text{H})^+$, 100%]. (**Figura 5.10**)

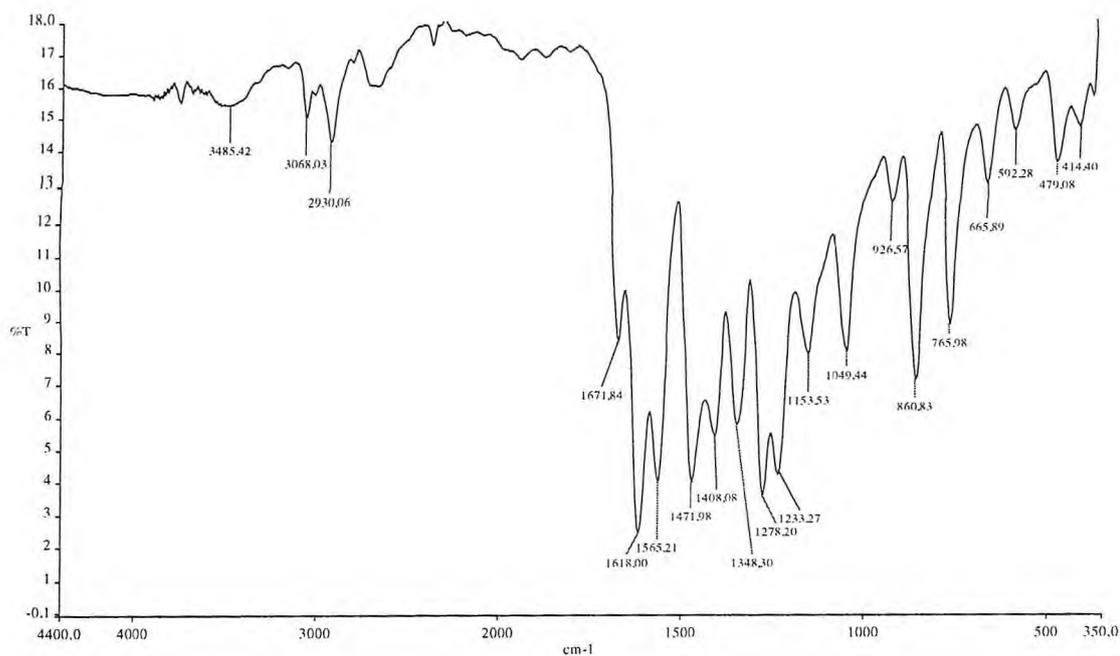


Figura 5.7 - Espectro de absorção na região do infravermelho do composto (373)

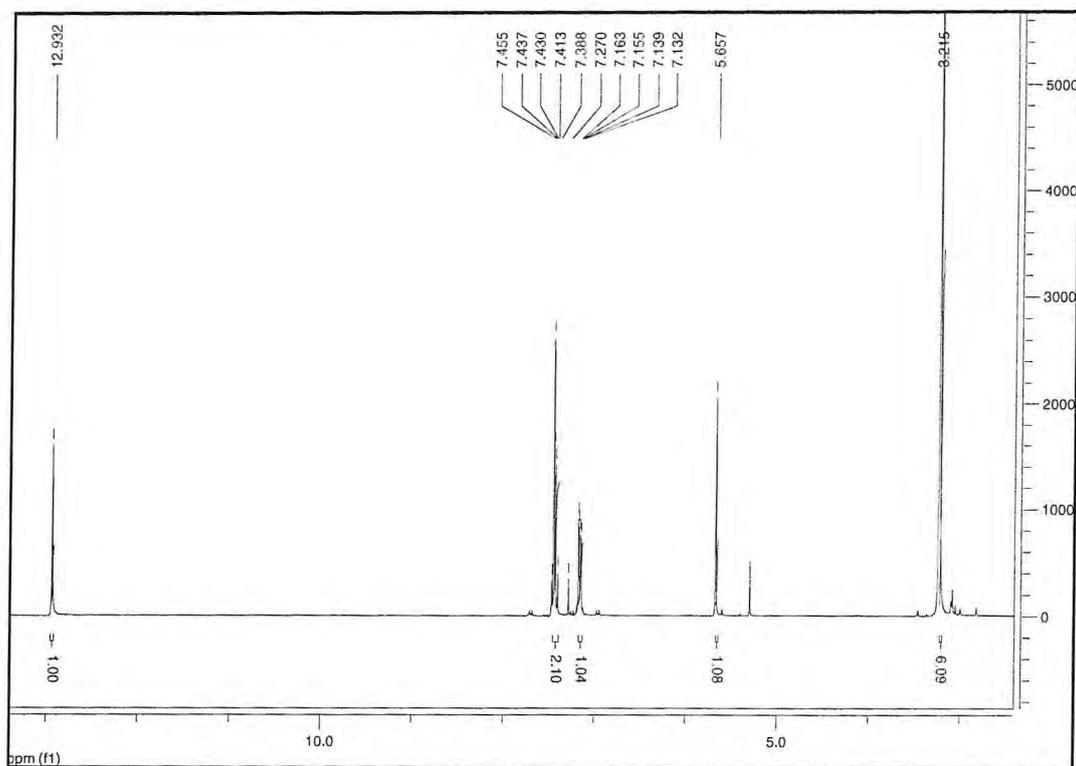


Figura 5.8 - Espectro de Ressonância Magnética Nuclear de ¹H a 300 MHz em CDCl₃ do composto (373)

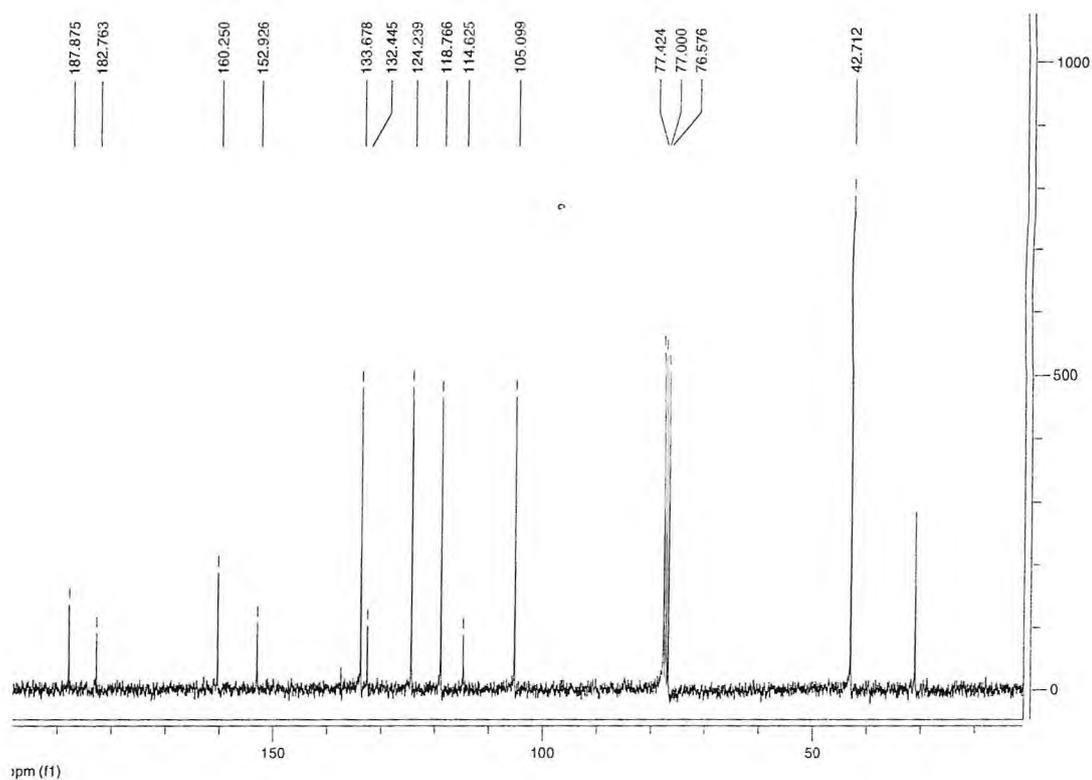


Figura 5.9 - Espectro de Ressonância Magnética Nuclear de ^{13}C a 75 MHz em CDCl_3 do composto (373)

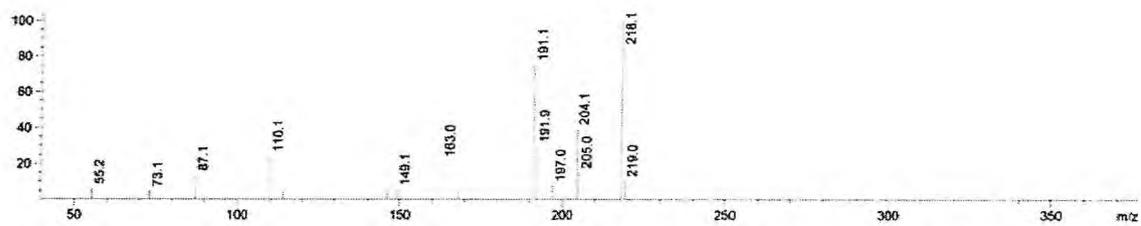


Figura 5.10 - Espectro de Massa por ESI do composto (373)

5.3. Dados físicos e espectrométricos da 2,5-diidroxi-1,4-naftalenodiona

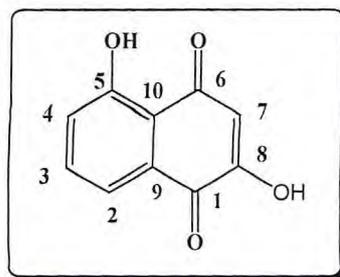


Figura 5.11 - Estrutura química do composto (374) - 2,5-diidroxi-1,4-naftalenodiona

Ponto de fusão: 216-219 °C (decomp.);

IV (disco de KBr): ν 3907, 3565, 3080, 2914, 2607, 1659, 1609, 1567, 1465, 1393, 1340, 1266, 1215, 1160, 1086, 1049, 847, 785, 703 cm^{-1} ; (**Figura 5.12**)

^1H -RMN (CDCl_3 , 300,13 MHz) δ : 6,31 (1H, s, OH), 7,27 (1H, s, OH), 7,33 (1H, dd, $J_{\text{HH}}=1,2$ e 8,4 Hz, H_2), 7,58 (1H, t, $J_{\text{HH}}=7,8$ Hz, H_3), 7,69 (1H, dd, $J_{\text{HH}}=1,0$ e 7,3 Hz, H_4), 12,32 (1H, s, OH); (**Figura 5.13**)

^{13}C -RMN (CDCl_3 , 75,5 MHz) δ : 111,5 (C_7), 116,5 (C_{10}), 120,1 (C_2), 126,5 (C_4), 132,2 (C_9), 134,7 (C_3), 155,8 (C_8), 161,7 (C_5), 182,3 (C_1), 192,3 (C_6); (**Figura 5.14**)

EM (ESI^+ , m/z): 191 [$(\text{M}+\text{H})^+$, 100%], 190 (M^+ , 14%). (**Figura 5.15**)

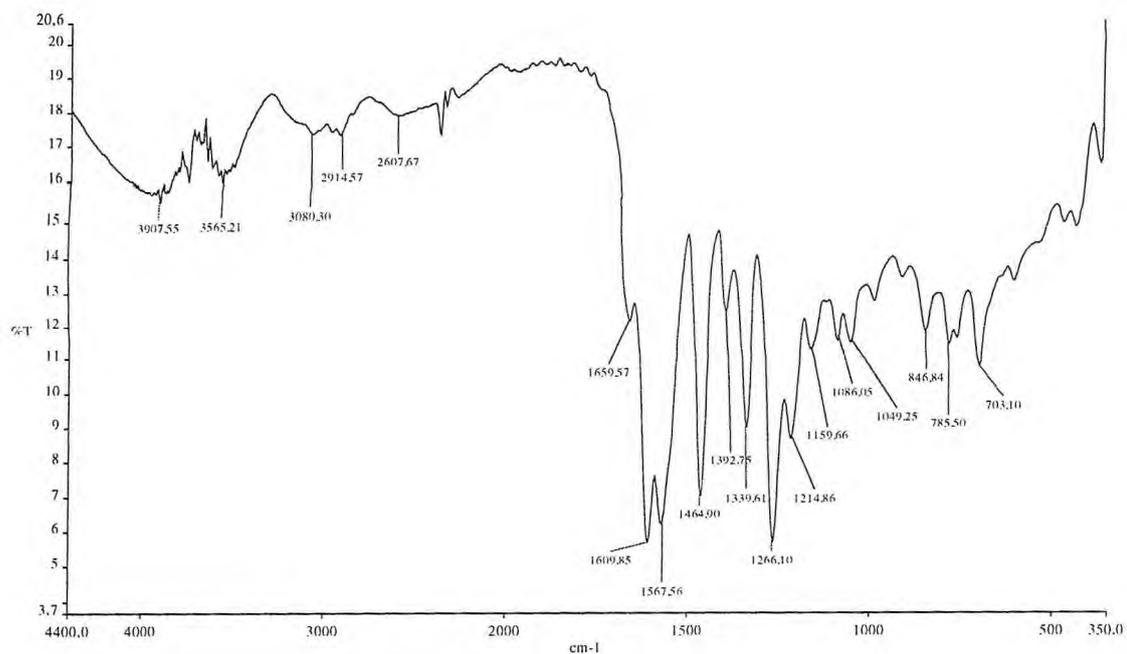


Figura 5.12 - Espectro de absorção na região do infravermelho do composto (374)

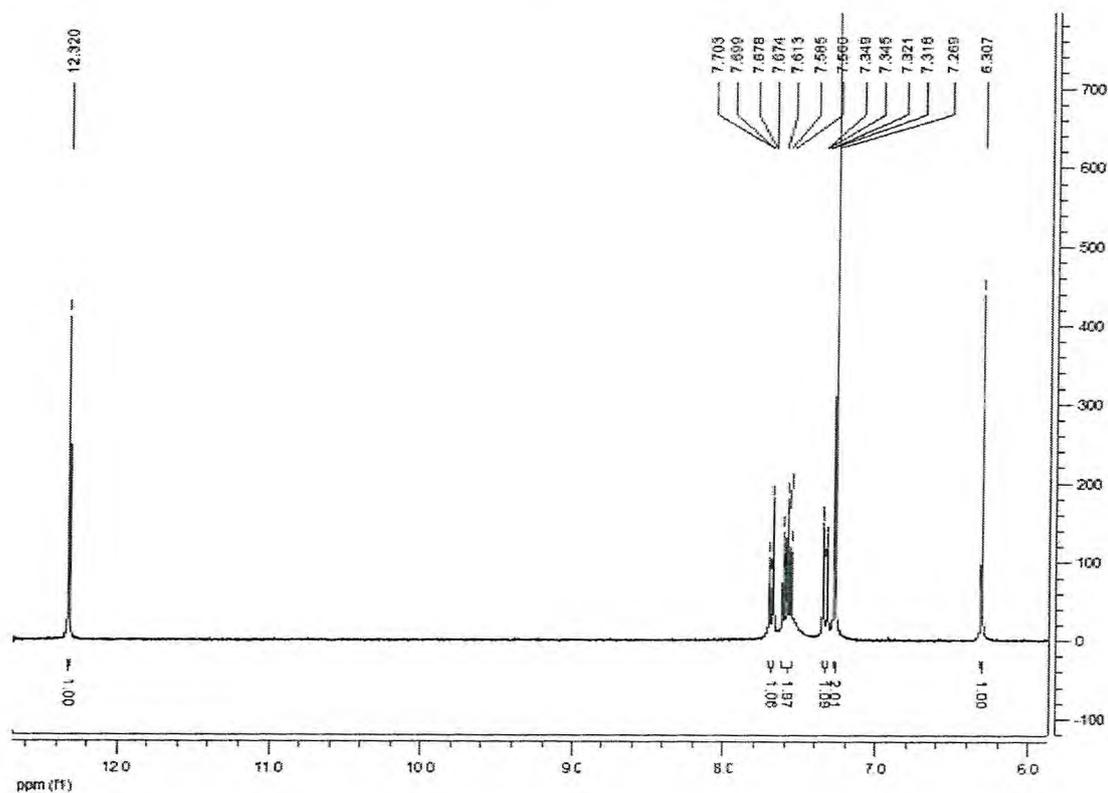


Figura 5.13 - Espectro de Ressonância Magnética Nuclear de ¹H a 300 MHz em CDCl₃ do composto (374)

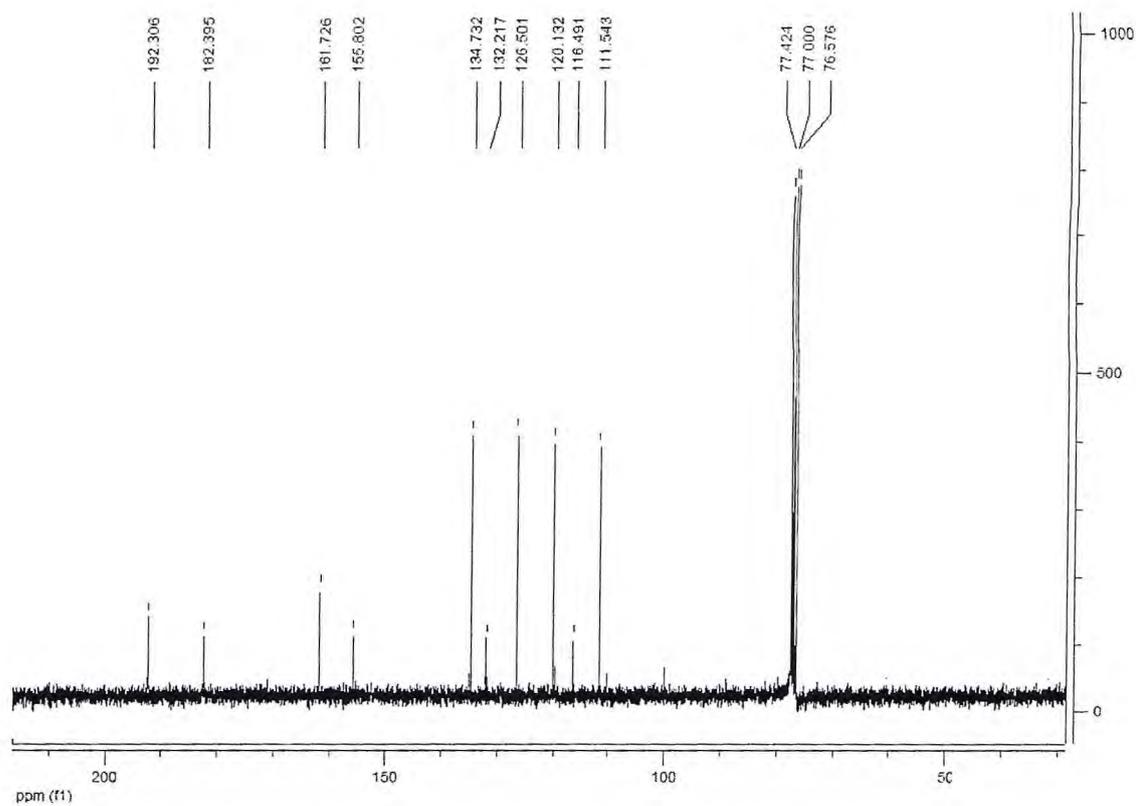


Figura 5.14 - Espectro de Ressonância Magnética Nuclear de ^{13}C a 75 MHz em CDCl_3 do composto (374)



Figura 5.15 - Espectro de Massa por ESI do composto (374)

5.4. Dados físicos e espectrométricos da 2-acetil-2,3,4,9-tetrahidronafto[2,3-*b*]furano-4,9-diona

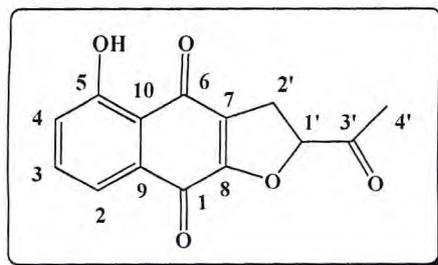


Figura 5.16 - Estrutura química do composto (375) - 2-acetil-2,3,4,9-tetrahidronafto [2,3-*b*]furano-4,9-diona

Ponto de fusão: 141-143 °C;

IV (disco de KBr): ν 3381, 2921, 1718, 1678, 1635, 1451, 1353, 1276, 1223, 1153, 1071, 1036, 874, 764 cm^{-1} ; (**Figura 5.17**)

^1H -RMN (CDCl_3 , 300,13 MHz) δ : 2,41 (3H, s, $\text{H}_{4'}$), 3,41 (2H, d, $J_{\text{HH}}=9,7$ Hz, $\text{H}_{2'}$), 5,31 (1H, t, $J_{\text{HH}}=9,5$ Hz, $\text{H}_{1'}$), 7,27 (1H, dd, $J_{\text{HH}}=0,9$ e 8,1 Hz, H_2), 7,57 (1H, t, $J_{\text{HH}}=7,9$ Hz, H_3), 7,65 (1H, dd, $J_{\text{HH}}=1,0$ e 7,3 Hz, H_4), 12,10 (1H, s, OH); (**Figura 5.18**)

^{13}C -RMN (CDCl_3 , 75,5 MHz) δ : 26,5 ($\text{C}_{4'}$), 29,5 ($\text{C}_{2'}$), 87,4 ($\text{C}_{1'}$), 114,7 (C_{10}), 119,6 (C_2), 123,5 (C_4), 125,9 (C_7), 131,7 (C_9), 135,4 (C_3), 159,9 (C_5), 161,3 (C_8), 176,3 (C_1), 187,5 (C_6), 204,2 ($\text{C}_{3'}$); (**Figura 5.19**)

EM (ESI^+ , m/z): 259 [$(\text{M}+\text{H})^+$, 100%] (**Figura 5.20**).

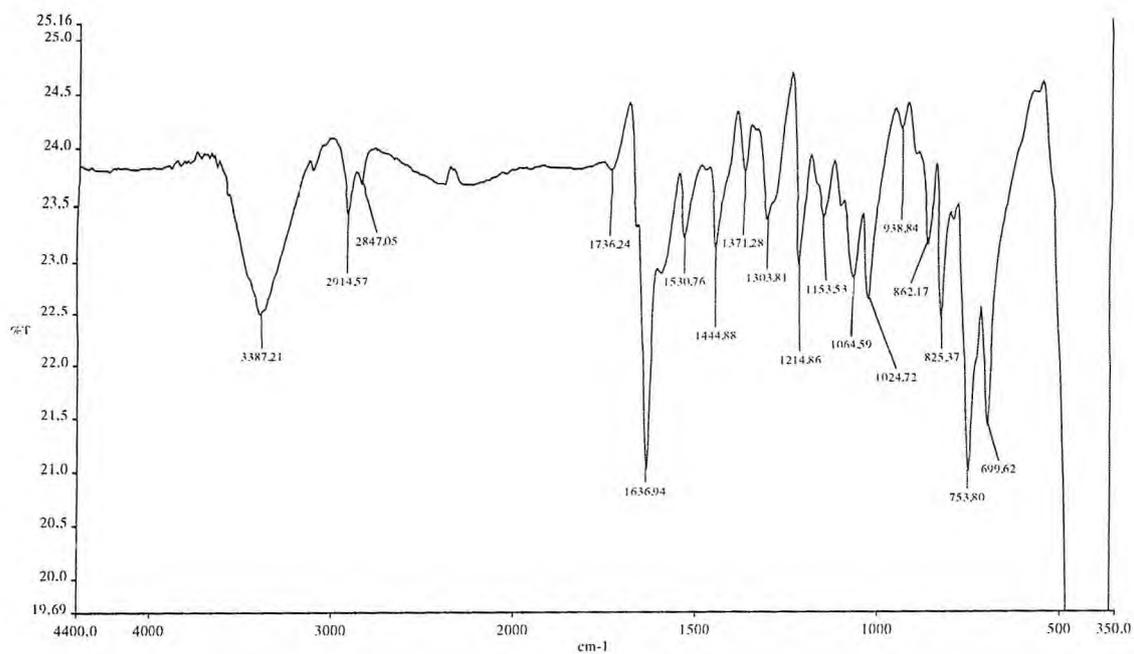


Figura 5.17 - Espectro de absorção na região do infravermelho do composto (375)

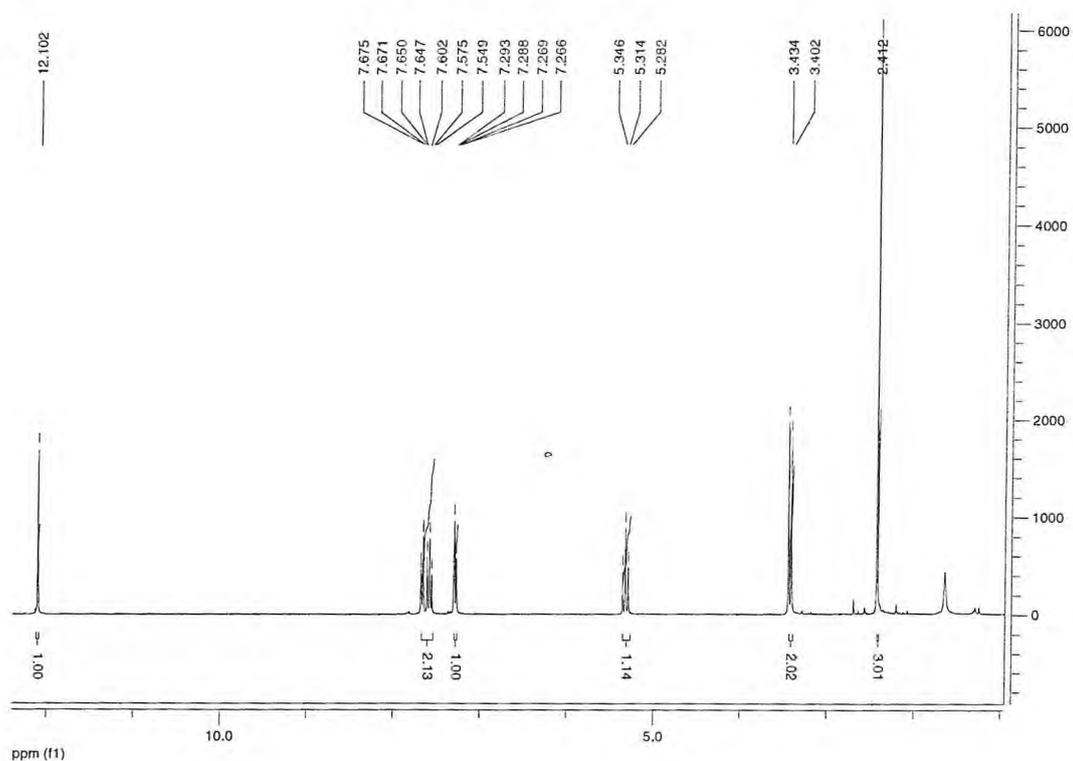


Figura 5.18 - Espectro de Ressonância Magnética Nuclear de ¹H a 300 MHz em CDCl₃ do composto (375)

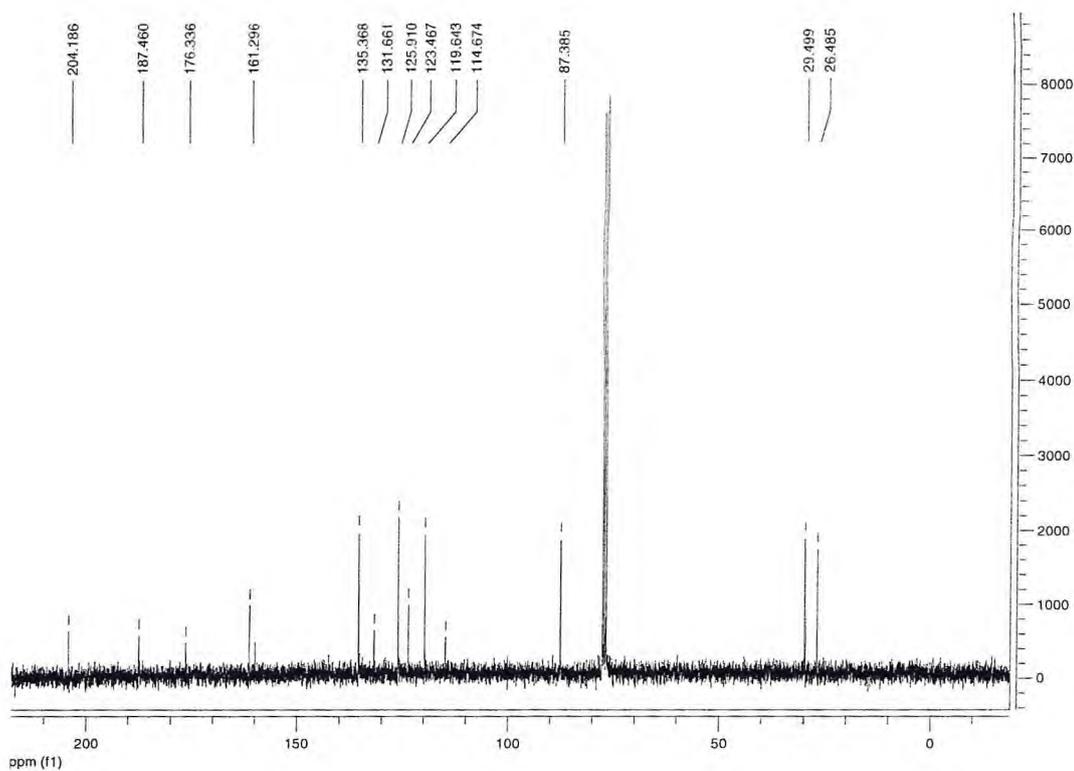


Figura 5.19 - Espectro de Ressonância Magnética Nuclear de ^{13}C a 75 MHz em CDCl_3 do composto (375)

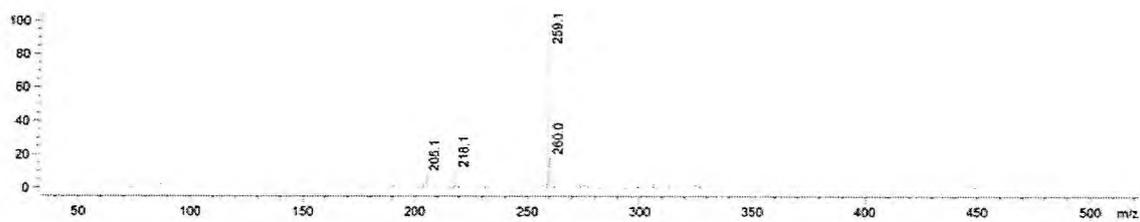


Figura 5.20 - Espectro de Massa por ESI do composto (375)

5.5. Dados físicos e espectrométricos da 2-acetil-4,9-diidronafto[2,3-*b*]furano-4,9-diona

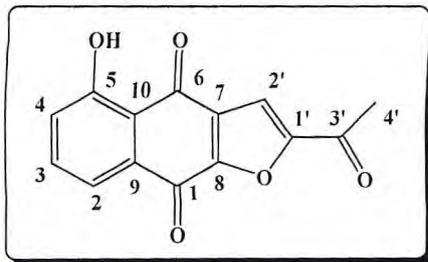


Figura 5.21 - Estrutura química do composto (376) - 2-acetil-4,9-diidronafto[2,3-*b*]furano-4,9-diona

Ponto de fusão: 229-231 °C;

IV (disco de KBr): ν 3369, 3099, 2921, 2110, 1669, 1643, 1567, 1446, 1350, 1291, 1236, 1196, 1071, 1028, 868, 834, 754 cm^{-1} ; (**Figura 5.22**)

$^1\text{H-RMN}$ (CDCl_3 , 300,13 MHz) δ : 2,67 (3H, s, $\text{H}_{4'}$), 7,34 (1H, dd, $J_{\text{HH}}=1,1$ e 7,4 Hz, H_2), 7,60 (1H, s, $\text{H}_{2'}$), 7,67 (1H, t, $J_{\text{HH}}=8,0$ Hz, H_3), 7,82 (1H, dd, $J_{\text{HH}}=1,1$ e 7,4 Hz, H_4), 12,1 (1H, s, OH); (**Figura 5.23**)

$^{13}\text{C-RMN}$ (DMSO, 75,5 MHz) δ : 28,4 ($\text{C}_{4'}$), 114,1 ($\text{C}_{2'}$), 115,5 (C_{10}), 119,6 (C_2), 125,2 (C_4), 128,7 (C_7), 132,9 (C_9), 136,8 (C_3), 153,2 (C_8), 154,4 ($\text{C}_{1'}$), 161,3 (C_5), 173,2 ($\text{C}_{3'}$), 185,5 (C_1), 187,1 (C_6) (**Figura 5.24**)

EM (ESI^+ , m/z): 257 [$(\text{M}+\text{H})^+$, 17%], 149 [$(\text{M}-\text{C}_6\text{H}_4\text{O}_2)^+$, 100%] (**Figura 5.25**)

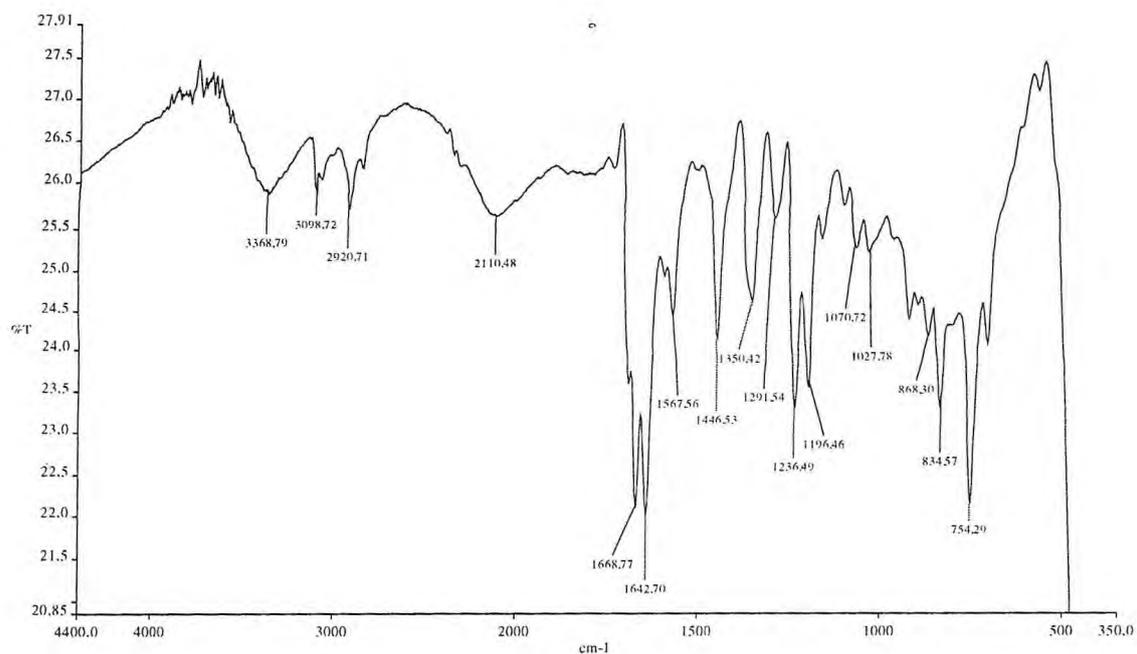


Figura 5.22 - Espectro de absorção na região do infravermelho do composto (376)

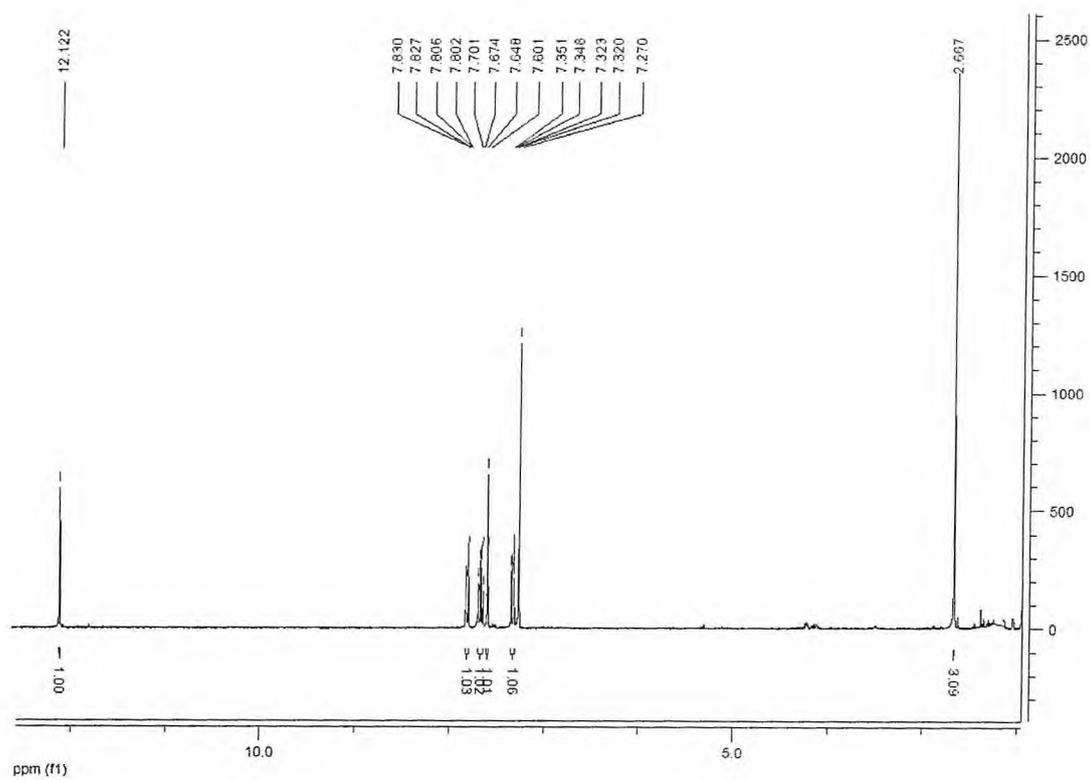


Figura 5.23 - Espectro de Ressonância Magnética Nuclear de ^1H a 300 MHz em CDCl_3 do composto (376)

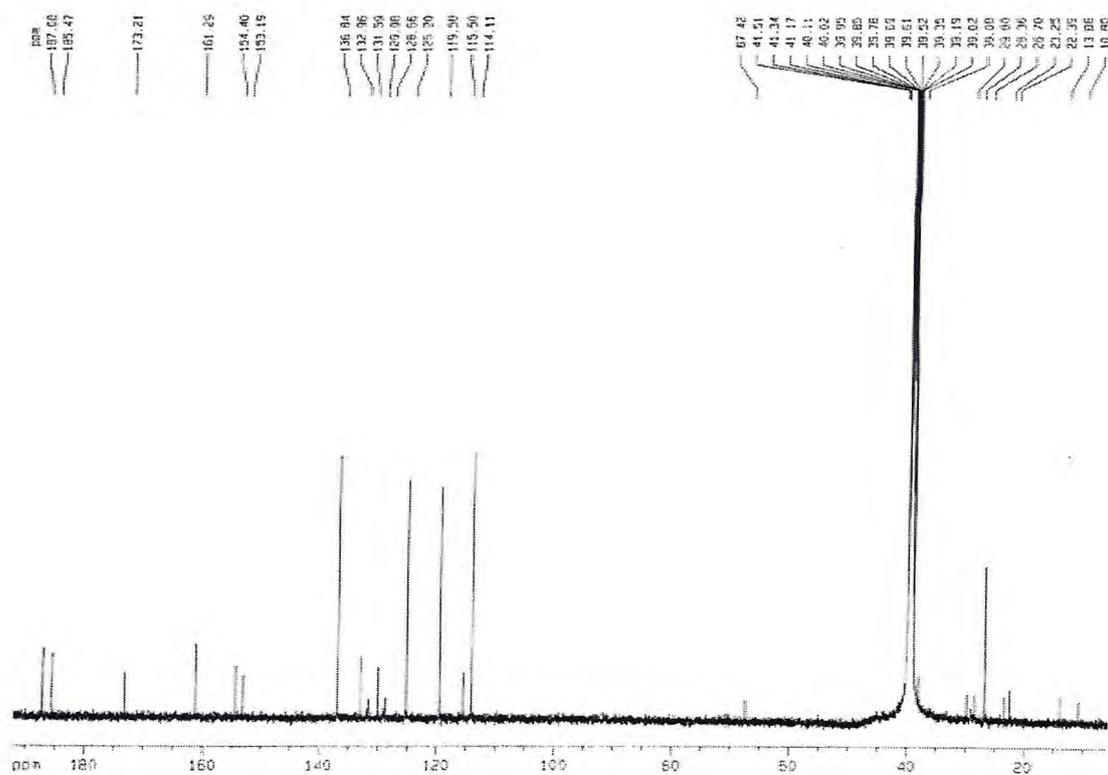


Figura 5.24 - Espectro de Ressonância Magnética Nuclear de ^{13}C a 75 MHz em DMSO do composto (376)

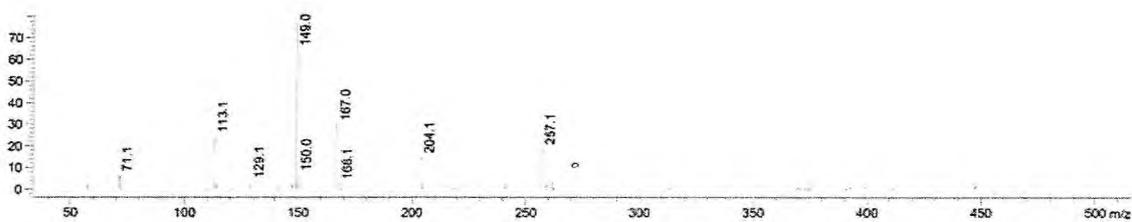


Figura 5.25 - Espectro de Massa por ESI do composto (376)

5.6. Dados físicos e espectrométricos da 5-hidroxi-2-(1-hidroxi-etil)-nafto[2,3-*b*]furano-4,9-diona

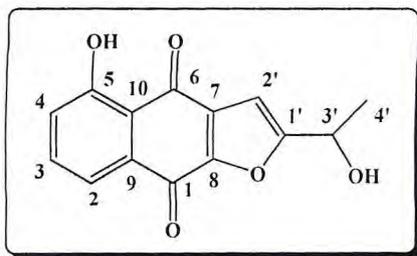


Figura 5.26 - Estrutura química do composto (377) - 5-hidroxi-2-(1-hidroxi-etil)-nafto[2,3-*b*]furano-4,9-diona

Ponto de fusão: 167-169 °C;

IV (disco de KBr): ν 3387, 2914, 2847, 1736, 1637, 1531, 1445, 1371, 1304, 1215, 1153, 1064, 1025, 939, 862, 825, 754, 700 cm^{-1} ; (**Figura 5.27**)

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 300,13 MHz) : 1,57 (3H, d, $J_{\text{HH}}=6,9$ Hz, $\text{H}_{4'}$), 2,94 (1H, s, OH), 4,92 (1H, q, $J_{\text{HH}}=6,6$ Hz, $\text{H}_{3'}$), 6,77 (1H, s, $\text{H}_{2'}$), 7,20 (1H, dd, $J_{\text{HH}}=1,2$ e 8,4 Hz, H_2), 7,55 (1H, t, $J_{\text{HH}}=7,8$ Hz, H_3), 7,67 (1H, dd, $J_{\text{HH}}=0,9$ e 7,5 Hz, H_4); (**Figura 5.28**)

$^{13}\text{C-RMN}$ (CDCl_3 , 75,5 MHz) δ : 21,1 ($\text{C}_{4'}$), 63,1 (C_8), 103,2 ($\text{C}_{2'}$), 115,0 (C_{10}), 119,9 (C_2), 125,1 (C_4), 131,1 (C_7), 132,6 (C_9), 136,2 (C_3), 151,7 ($\text{C}_{1'}$), 161,9 (C_5), 166,4 (C_6), 172,8 (C_1), 186,4 (C_6); (**Figura 5.29**)

EM (ESI^+ , m/z): 258 (M^+ , 100%); (**Figura 5.30**)

$[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -23,4$ ($c = 0,58$, MeOH) para $ee >99\%$.

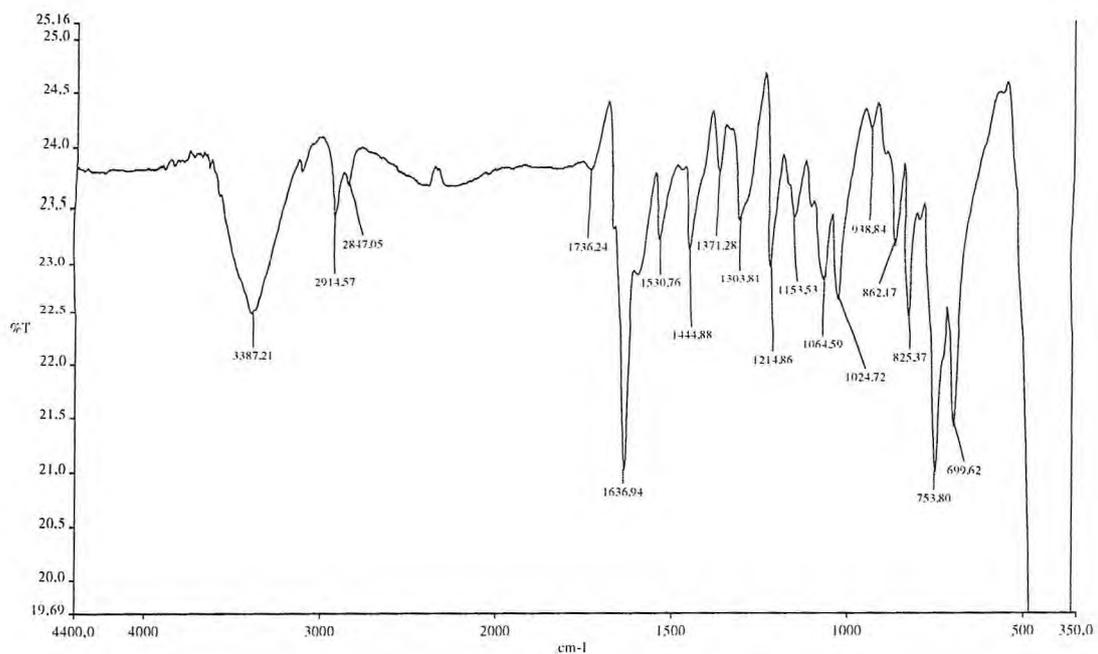


Figura 5.27 - Espectro de absorção na região do infravermelho do composto (377)

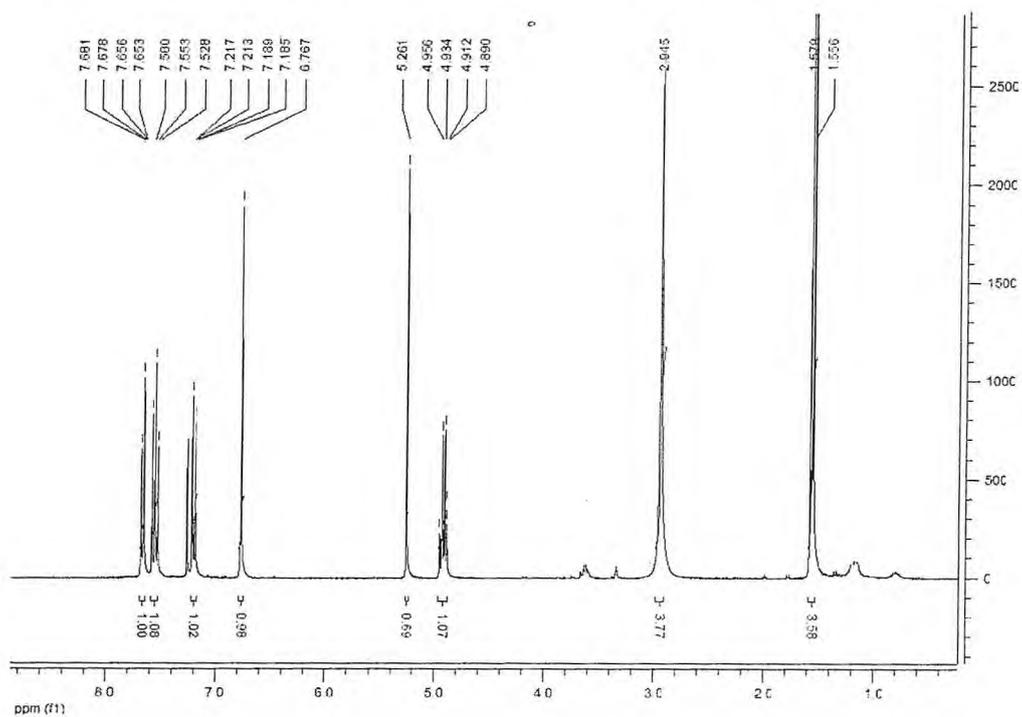


Figura 5.28 - Espectro de Ressonância Magnética Nuclear de ^1H a 300 MHz em CDCl_3 do composto (377)

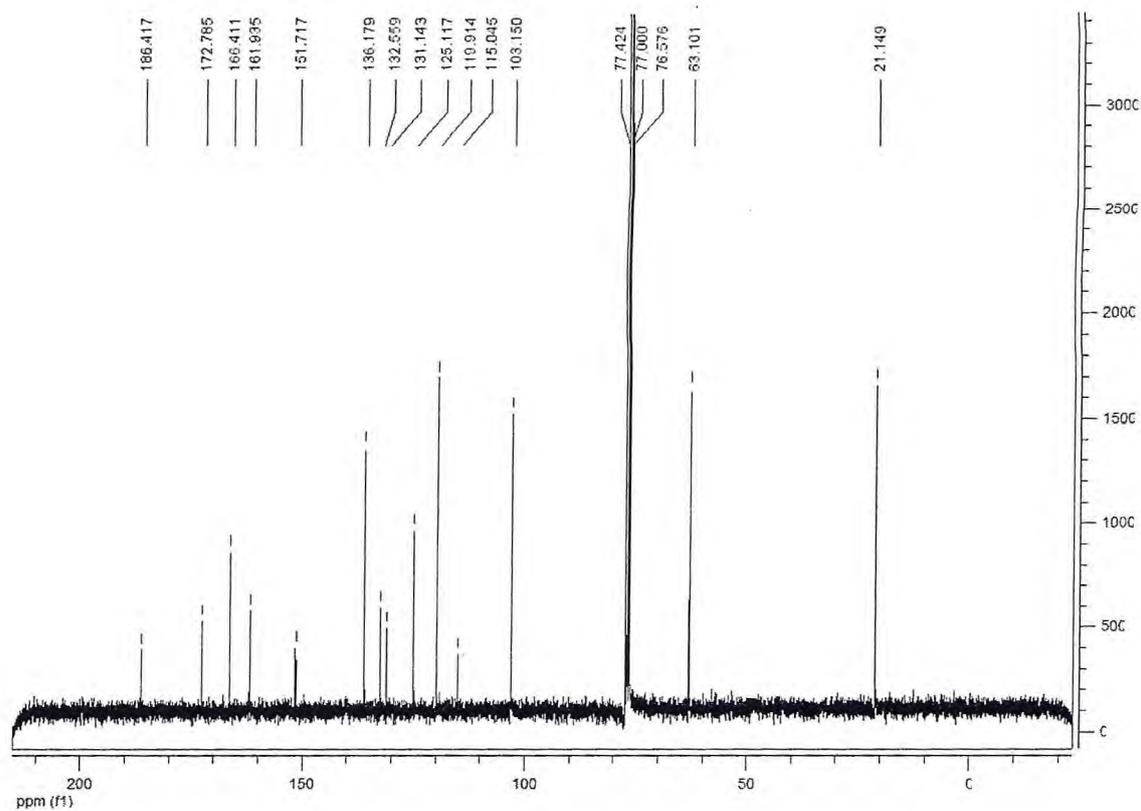


Figura 5.29 - Espectro de Ressonância Magnética Nuclear de ^{13}C a 75 MHz em CDCl_3 do composto (377)

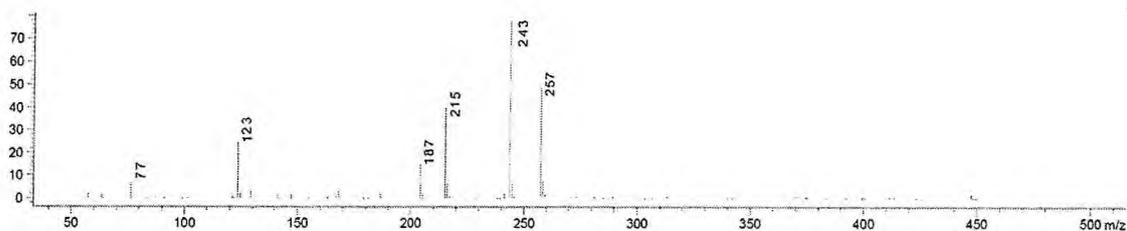


Figura 5.30 - Espectro de Massa por ESI do composto (377)

5.7. Dados físicos e espectrométricos do acetato de 1-(5-hidroxi-4,9-dioxo-4,9-diidronafto[2,3-*b*]furano-2-il)etila

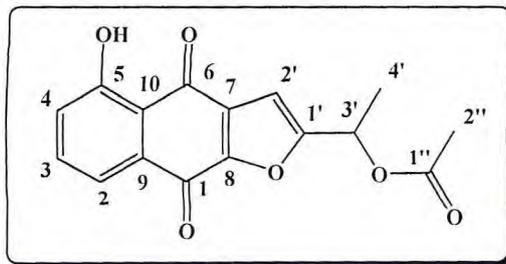


Figura 5.31 - Estrutura química do composto (378) - acetato de 1-(5-hidroxi-4,9-dioxo-4,9-diidronafto[2,3-*b*]furano-2-il)etila

Ponto de fusão: 135-137°C;

IV (disco de KBr): ν 3396, 3117, 2921, 1743, 1671, 1640, 1541, 1450, 1375, 1310, 1222, 1160, 1066, 1032, 934, 829, 756, 703 cm^{-1} ; (**Figura 5.32**)

^1H -RMN (CDCl_3 , 300,13 MHz) δ : 1,69 (3H, d, $J_{\text{HH}}=6,7$ Hz, $\text{H}_{4'}$), 2,13 (3H, s, $\text{H}_{2''}$), 6,04 (1H, q, $J_{\text{HH}}=6,6$ Hz, $\text{H}_{3'}$), 6,88 (1H, s, $\text{H}_{2'}$), 7,26-7,29 (1H, m, H_2), 7,63 (1H, t, $J_{\text{HH}}=7,9$ Hz, H_3), 7,76 (1H, dd, $J_{\text{HH}}=1,2$ e 7,5 Hz, H_4), 12,1 (1H, s, OH); (**Figura 5.33**)

^{13}C -RMN (CDCl_3 , 75,5 MHz) δ : 18,5 ($\text{C}_{4'}$), 20,9 ($\text{C}_{1''}$), 64,8 ($\text{C}_{3'}$), 105,5 ($\text{C}_{2'}$), 115,2 (C_{10}), 120,0 (C_2), 125,3 (C_4), 130,8 (C_7), 132,7 (C_9), 136,3 (C_3), 152,3 (C_1), 161,0 (C_5), 162,3 (C_8), 169,8 ($\text{C}_{2''}$), 172,6 (C_1), 186,3 (C_6); (**Figura 5.34**)

EM (ESI^+ , m/z): 301 [$(\text{M}+\text{H})^+$, 34%], 241 [$(\text{M}-\text{H}-\text{OCOCH}_3)^+$, 100%] (**Figura 5.35**).
 $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = +134,4$ ($c = 0,58$, CH_2Cl_2) para $ee >99\%$.

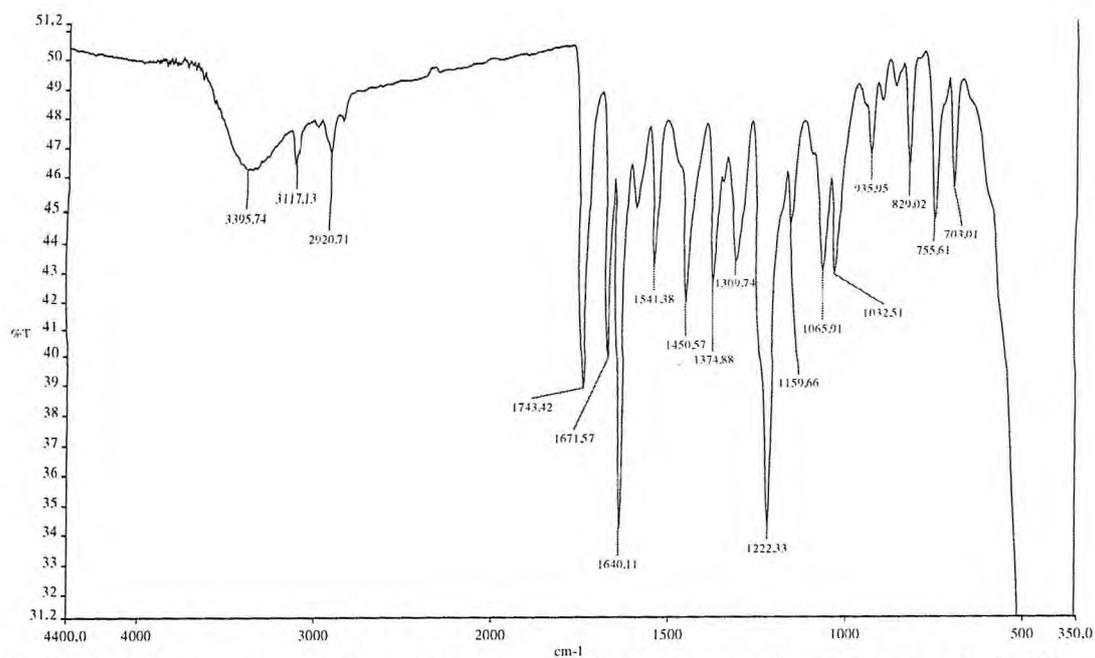


Figura 5.32 - Espectro de absorção na região do infravermelho do composto (378)

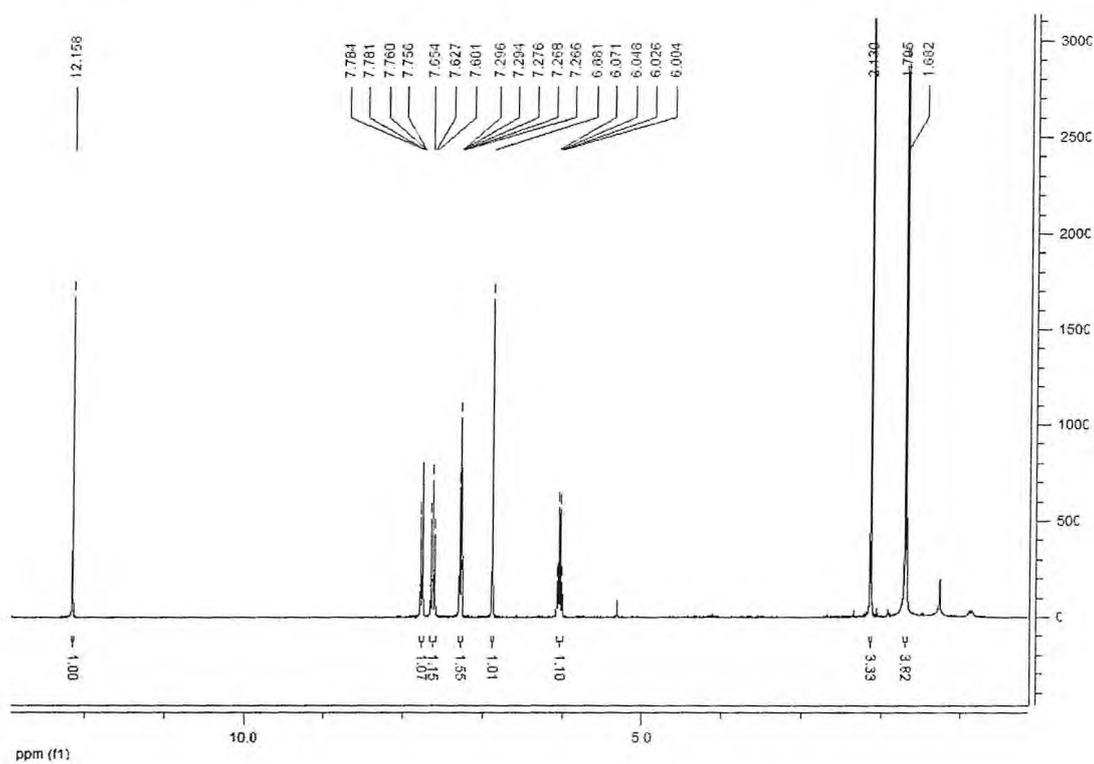


Figura 5.33 - Espectro de Ressonância Magnética Nuclear de ¹H a 300 MHz em CDCl₃ do composto (378)

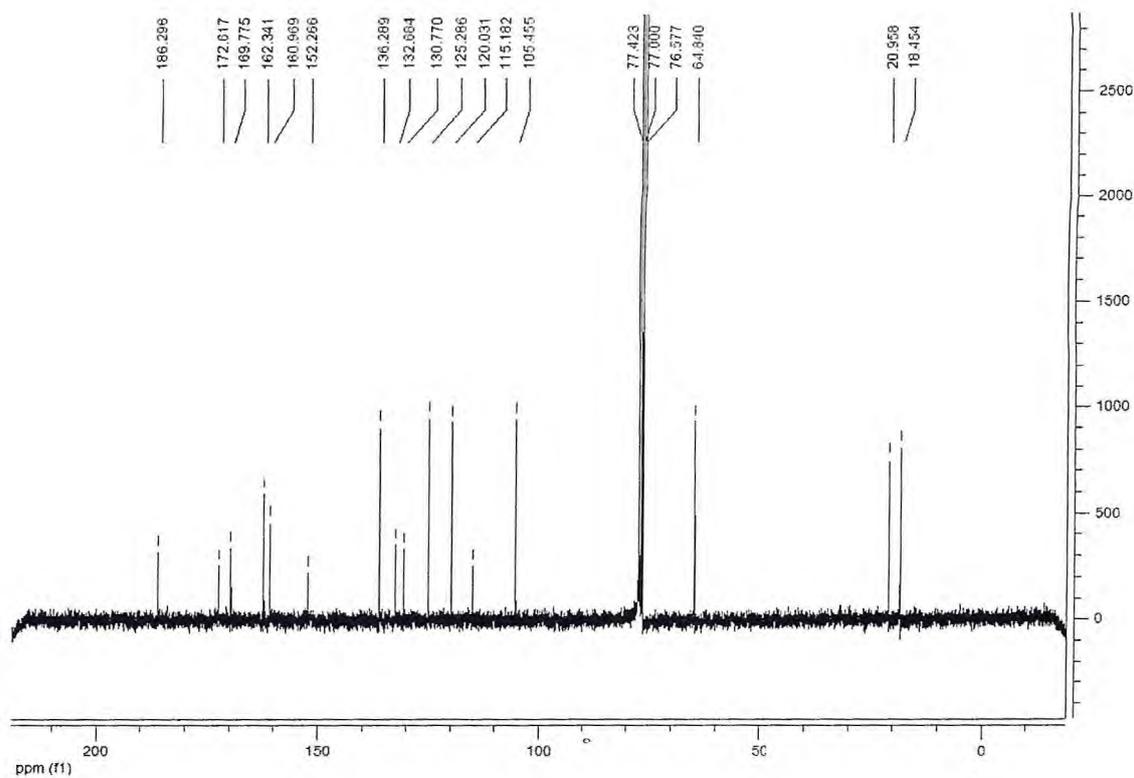


Figura 5.34 - Espectro de Ressonância Magnética Nuclear de ^{13}C a 75 MHz em CDCl_3 do composto (378)

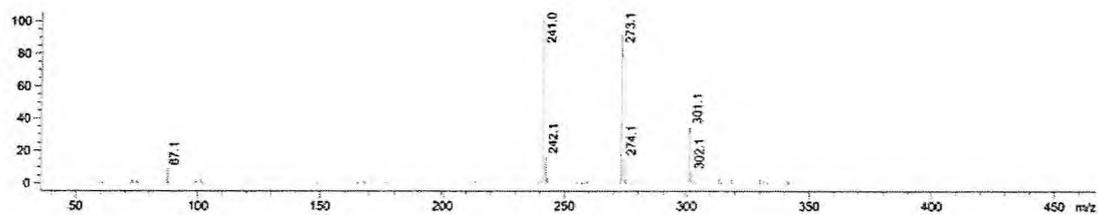


Figura 5.35 - Espectro de Massa por ESI do composto (378)

5.8. Dados espectroscópicos do 1-(fenil)etanol

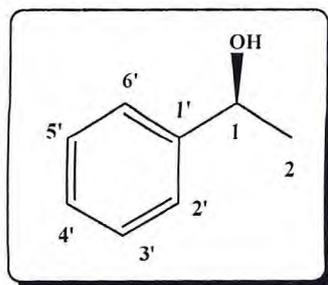


Figura 5.36 - Estrutura química do composto (379) - (S)-1-(fenil)etanol

RMN ^1H (CDCl_3 , 300,13 MHz): δ 1,39 (d, $J = 6,5$ Hz, 3H, H_2), 2,03 (s, 1H, OH), 4,77 (q, $J = 6,5$ Hz, 1H, H_1), 7,14-7,28 (m, 5H, $\text{H}_2' + \text{H}_3' + \text{H}_4' + \text{H}_5' + \text{H}_6'$); (**Figura 5.37**)

RMN ^{13}C (CDCl_3 , 75,5 MHz): δ 25,3 (C_2), 70,5 (C_1), 125,5 ($\text{C}_2' + \text{C}_6'$), 127,6 (C_4'), 128,6 ($\text{C}_3' + \text{C}_5'$), 146,0 (C_1'). (**Figura 5.38**)

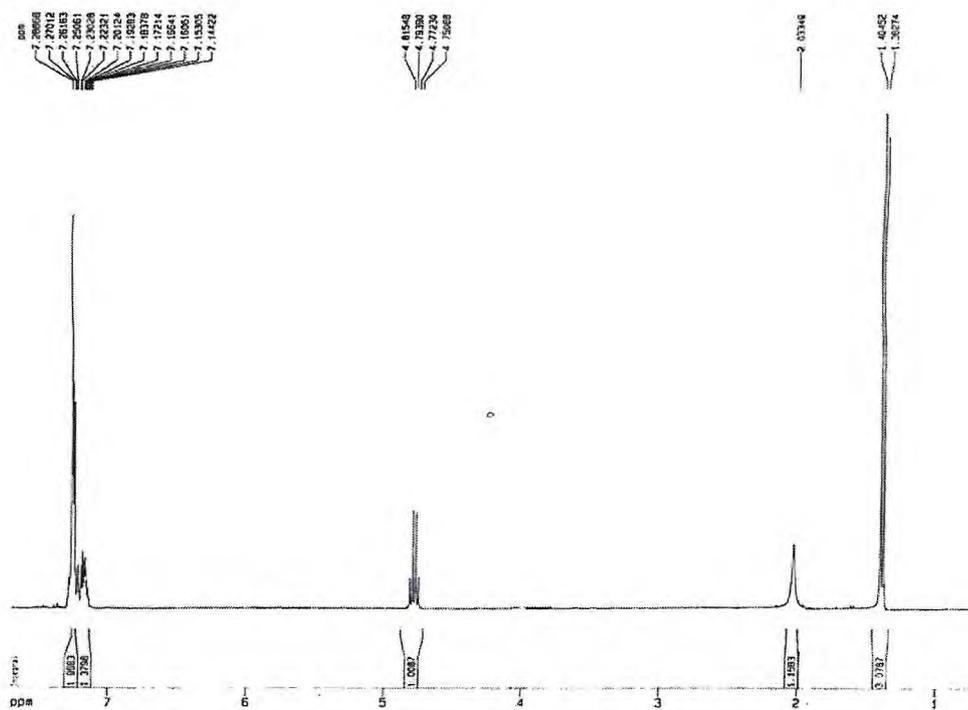


Figura 5.37 - Espectro de Ressonância Magnética Nuclear de ^1H a 300 MHz em CDCl_3 do composto (379)

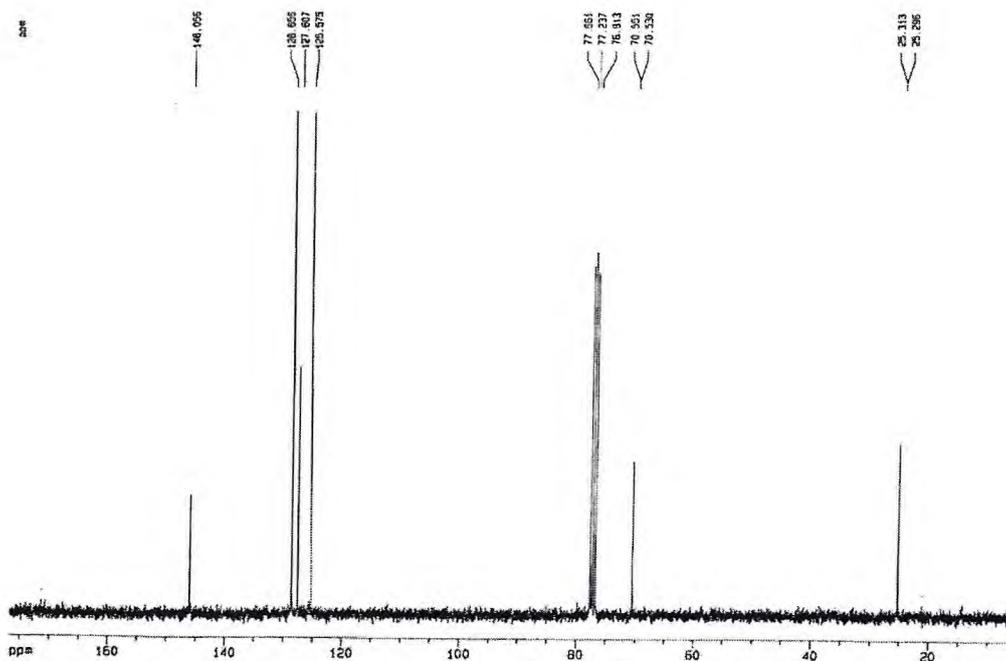


Figura 5.38 - Espectro de Ressonância Magnética Nuclear de ^{13}C a 75 MHz em CDCl_3 do composto (379)

5.9. Dados espectroscópicos do 1-(2-nitrofenil)etanol

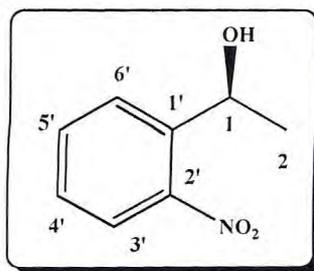


Figura 5.39 - Estrutura química do composto (380) - (S)-1-(2-nitrofenil)etanol

RMN ¹H (CDCl₃, 300,13 MHz): δ 1,55 (3H, d, *J* = 6,3 Hz, H₂), 5,40 (1H, q, *J* = 6,3 Hz, H₁), 7,41 (1H, dt, *J* = 8,1 e 1,2 Hz, H_{4'}), 7,63 (1H, dt, *J* = 8,1 e 1,5 Hz, H_{5'}), 7,82 (1H, dd, *J* = 8,1 e 1,2 Hz, H_{6'}), 7,88 (1H, dd, *J* = 8,1 e 1,5 Hz, H_{3'}); (**Figura 5.40**)

RMN ¹³C CDCl₃, 75,5 MHz): δ 24,2 (C₂), 65,4 (C₁), 124,2 (C_{3'}), 127,5 (C_{6'}), 128,0 (C_{4'}), 133,5 (C_{5'}), 140,9 (C_{1'} + C_{2'}). (**Figura 5.41**)

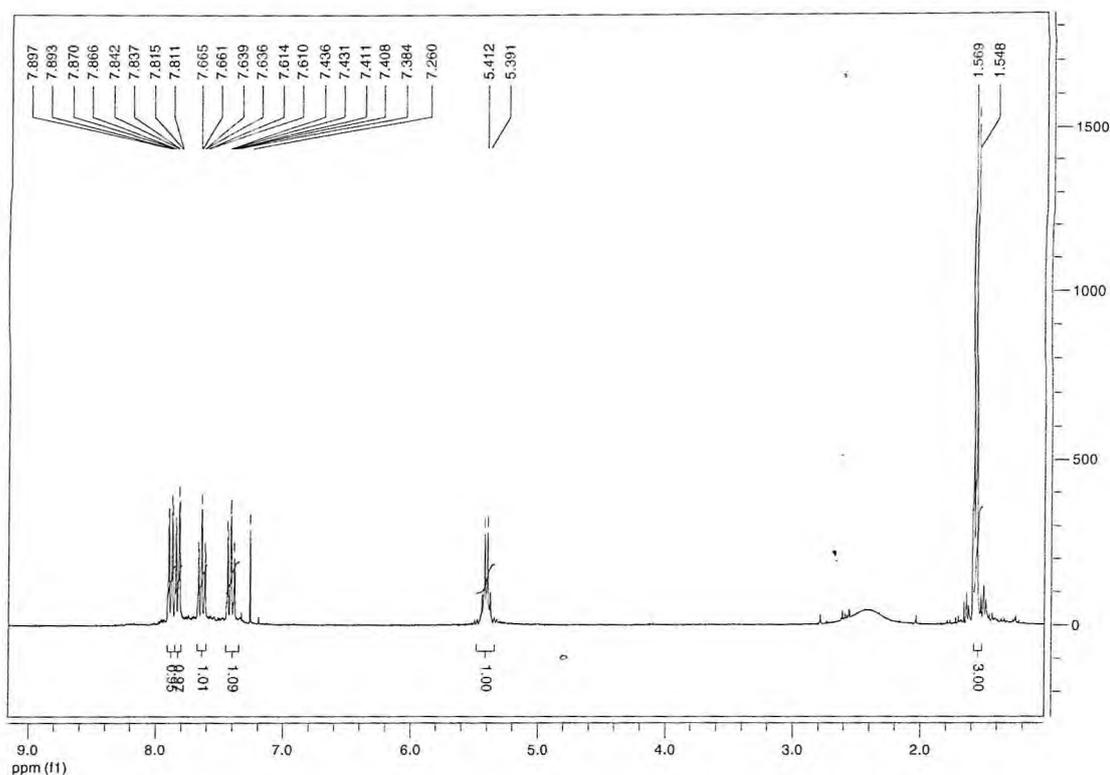


Figura 5.40 - Espectro de Ressonância Magnética Nuclear de ^1H a 300 MHz em CDCl_3 do composto (380)

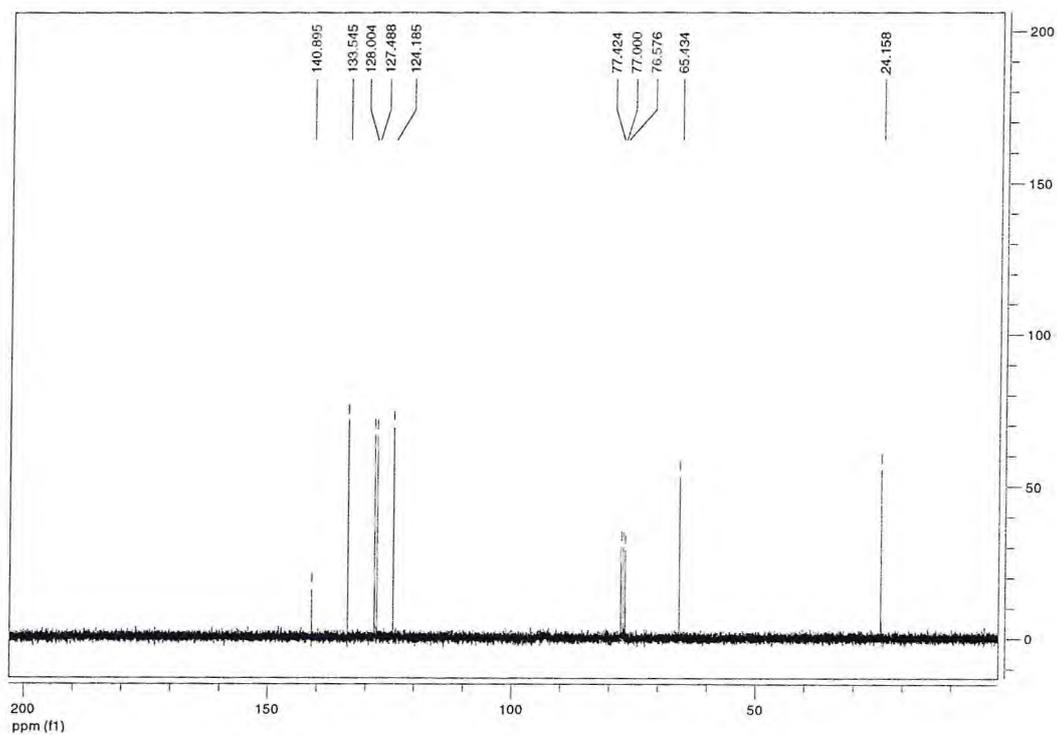
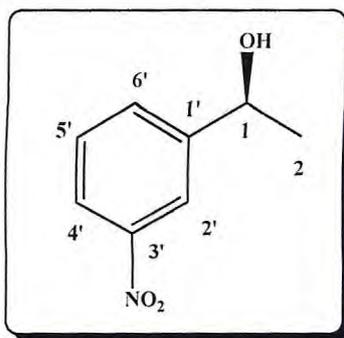


Figura 5.41 - Espectro de Ressonância Magnética Nuclear de ^{13}C a 75 MHz em CDCl_3 do composto (380)

5.10. Dados espectroscópicos do 1-(3-nitrofenil)etanol**Figura 5.42** - Estrutura química do composto (381) - (*S*)-1-(3-nitrofenil)etanol

RMN ^1H (CDCl_3 , 300,13 MHz): δ 1,49 (3H, d, $J = 6,6$ Hz, H_2), 4,97 (1H, q, $J = 6,6$ Hz, H_1), 7,47 (1H, t, $J = 7,8$ Hz, $\text{H}_{5'}$), 7,67 (1H, d, $J = 7,8$ Hz, $\text{H}_{6'}$), 8,04 (1H, ddd, $J = 8,3$, 2,1 e 0,9 Hz, $\text{H}_{4'}$), 8,18 (1H, t, $J = 1,8$ Hz, $\text{H}_{2'}$); (**Figura 5.43**)

RMN ^{13}C (CDCl_3 , 75,5 MHz): δ 25,2 (C_2), 69,1 (C_1), 120,2 ($\text{C}_{4'}$), 122,1 ($\text{C}_{2'}$), 129,3 ($\text{C}_{5'}$), 131,6 ($\text{C}_{6'}$), 147,8 ($\text{C}_{1'}$), 148,1 ($\text{C}_{3'}$). (**Figura 5.44**)

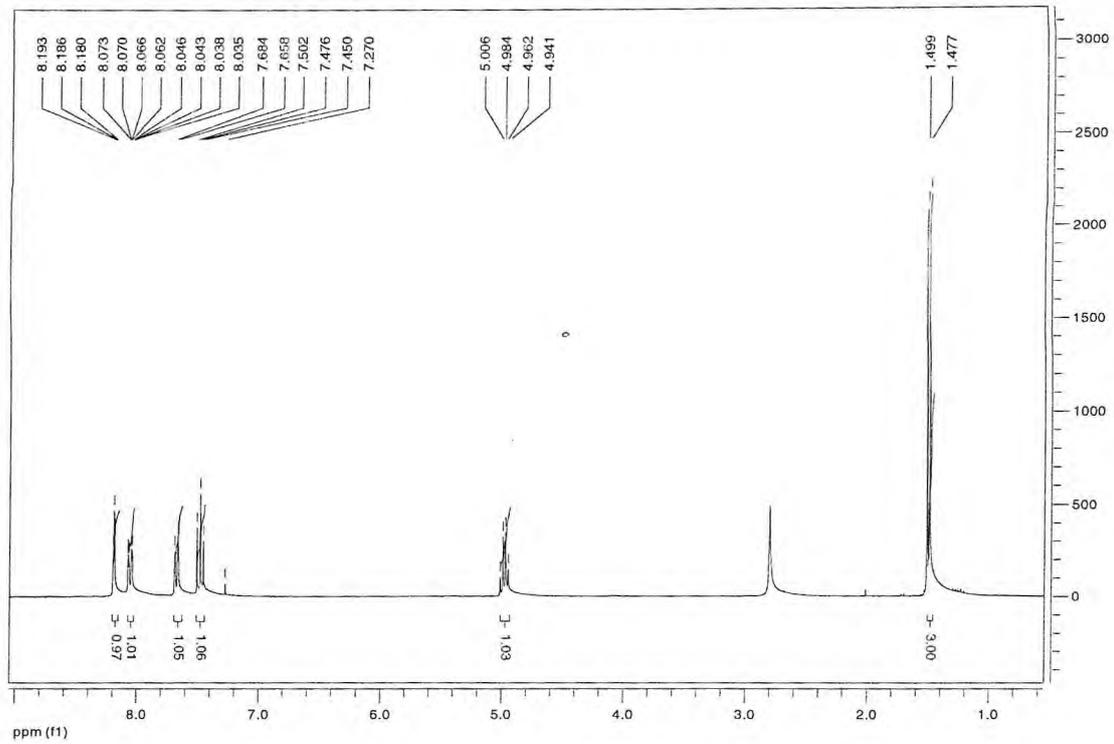


Figura 5.43 - Espectro de Ressonância Magnética Nuclear de ^1H a 300 MHz em CDCl_3 do composto (381)

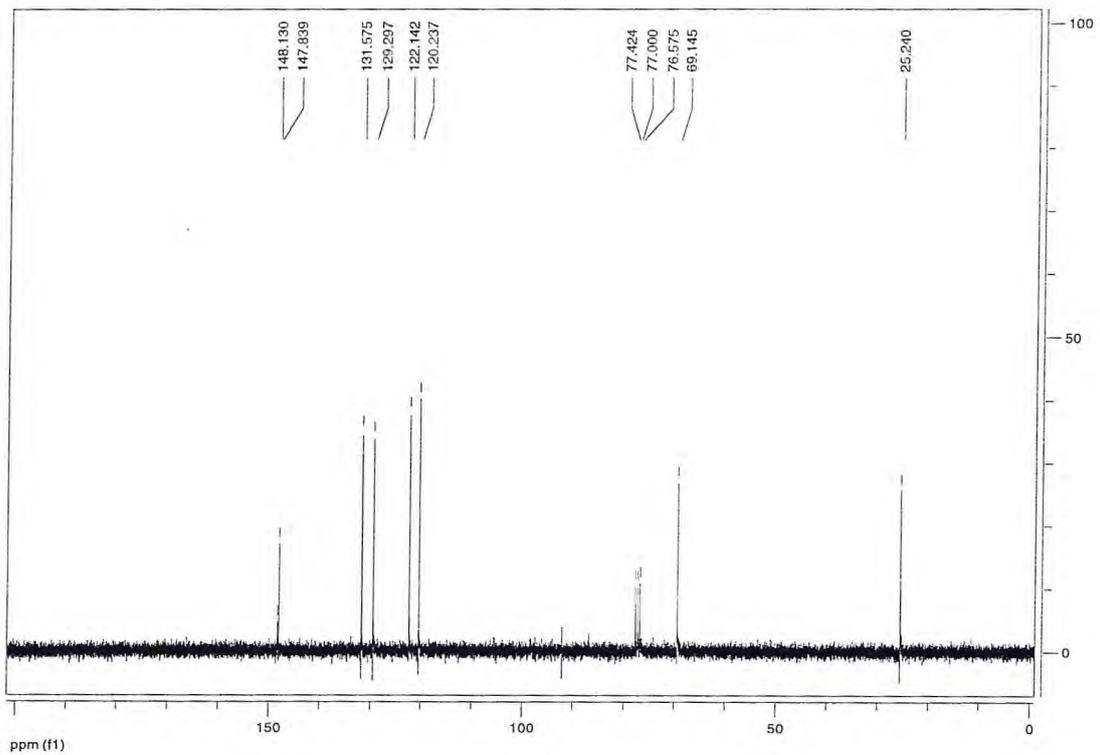


Figura 5.44 - Espectro de Ressonância Magnética Nuclear de ^{13}C a 75 MHz em CDCl_3 do composto (381)

5.11. Dados espectroscópicos do 1-(4-nitrofenil)etanol

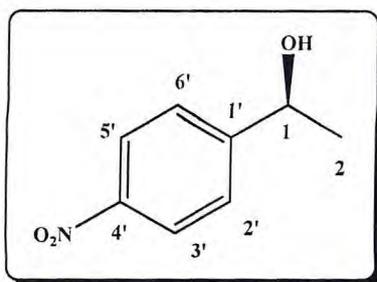


Figura 5.45 - Estrutura química do composto (382) - (*S*)-1-(4-nitrofenil)etanol

RMN ^1H (CDCl_3 , 300,13 MHz): δ 1,51 (3H, d, $J = 6,6$ Hz, H_2), 5,01 (1H, q, $J = 6,6$ Hz, H_1), 7,53 (2H, d, $J = 8,7$ Hz, $\text{H}_2' + \text{H}_6'$), 8,18 (2H, d, $J = 8,7$ Hz, $\text{H}_3' + \text{H}_5'$); (**Figura 5.46**)

RMN ^{13}C (CDCl_3 , 75,5 MHz): δ 25,3 (C_2), 69,5 (C_1), 123,6 ($\text{C}_2' + \text{C}_6'$), 126,0 ($\text{C}_3' + \text{C}_5'$), 147,0 (C_1'), 153,1 (C_4'). (**Figura 5.47**)

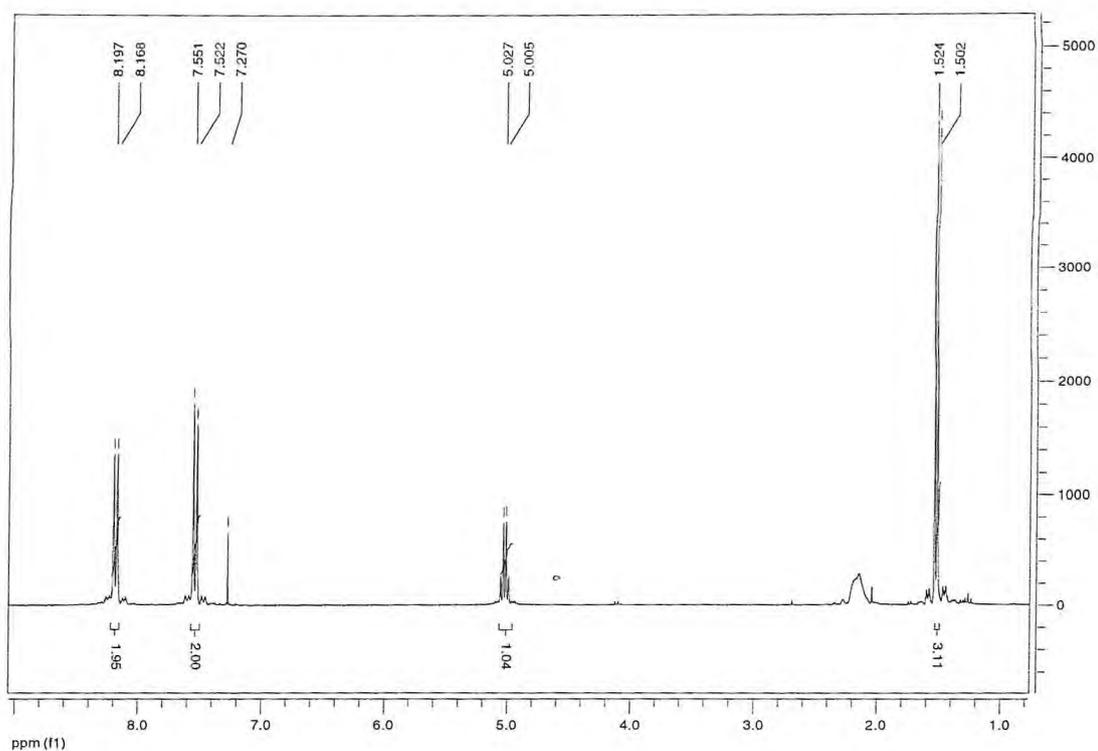


Figura 5.46 - Espectro de Ressonância Magnética Nuclear de ^1H a 300 MHz em CDCl_3 do composto (382)

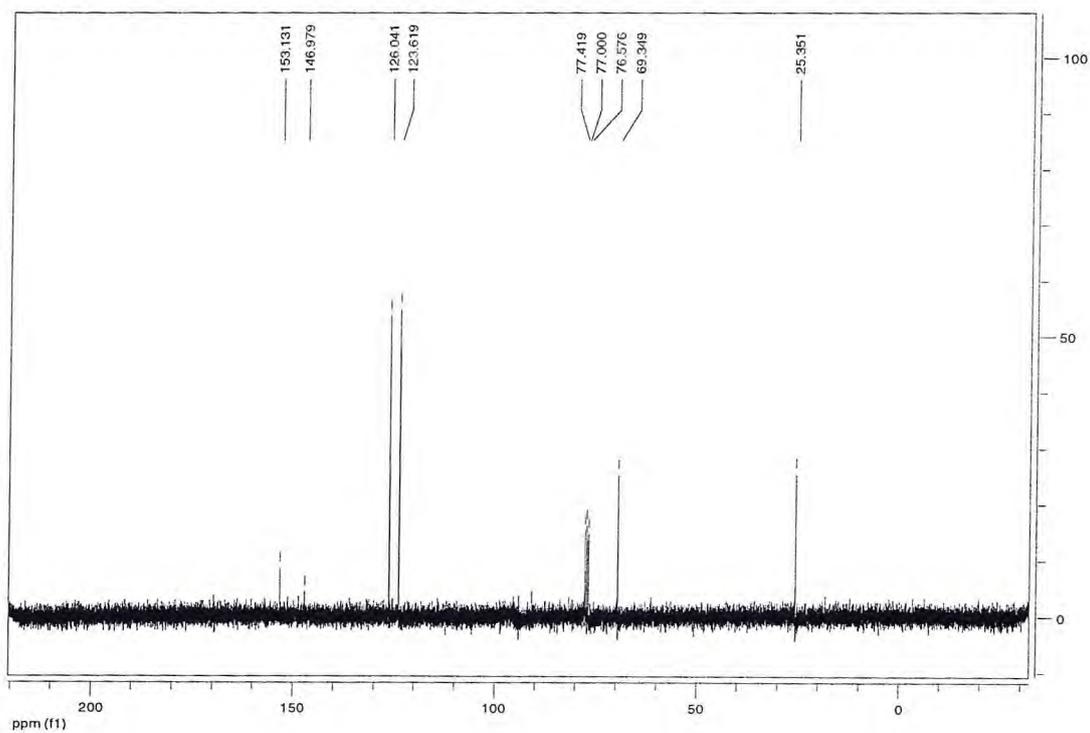


Figura 5.47 - Espectro de Ressonância Magnética Nuclear de ^{13}C a 75 MHz em CDCl_3 do composto (382)

5.12. Dados espectroscópicos do 1-(2-metoxifenil)etanol

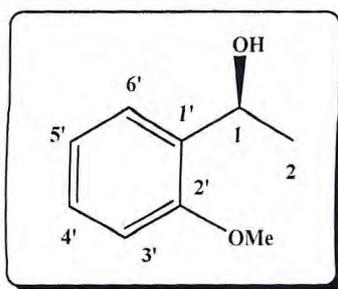


Figura 5.48 - Estrutura química do composto (**383**) - (*S*)-1-(2-metoxifenil)etanol

RMN ^1H (CDCl_3 , 300,13 MHz): δ 1,53 (3H, d, $J = 6,6$ Hz, H_2), 3,88 (3H, s, OCH_3), 5,11 (1H, q, $J = 6,6$ Hz, H_1), 6,90 (1H, dd, $J = 7,5$ e 1,5 Hz, $\text{H}_{3'}$), 6,98 (1H, dt, $J = 8,5$ e 1,5 Hz, $\text{H}_{5'}$), 7,29 (1H, dt, $J = 8,5$ e 1,5 Hz, $\text{H}_{6'}$), 7,36 (1H, dd, $J = 7,5$ e 1,5 Hz, $\text{H}_{4'}$); (**Figura 5.49**)

RMN ^{13}C (CDCl_3 , 75,5 MHz): δ 22,8 (C_2), 55,2 (OCH_3), 66,3 (C_1), 110,3 ($\text{C}_{3'}$), 120,7 ($\text{C}_{5'}$), 126,0 ($\text{C}_{6'}$), 128,2 ($\text{C}_{4'}$), 133,4 ($\text{C}_{1'}$), 156,4 ($\text{C}_{2'}$). (**Figura 5.50**)

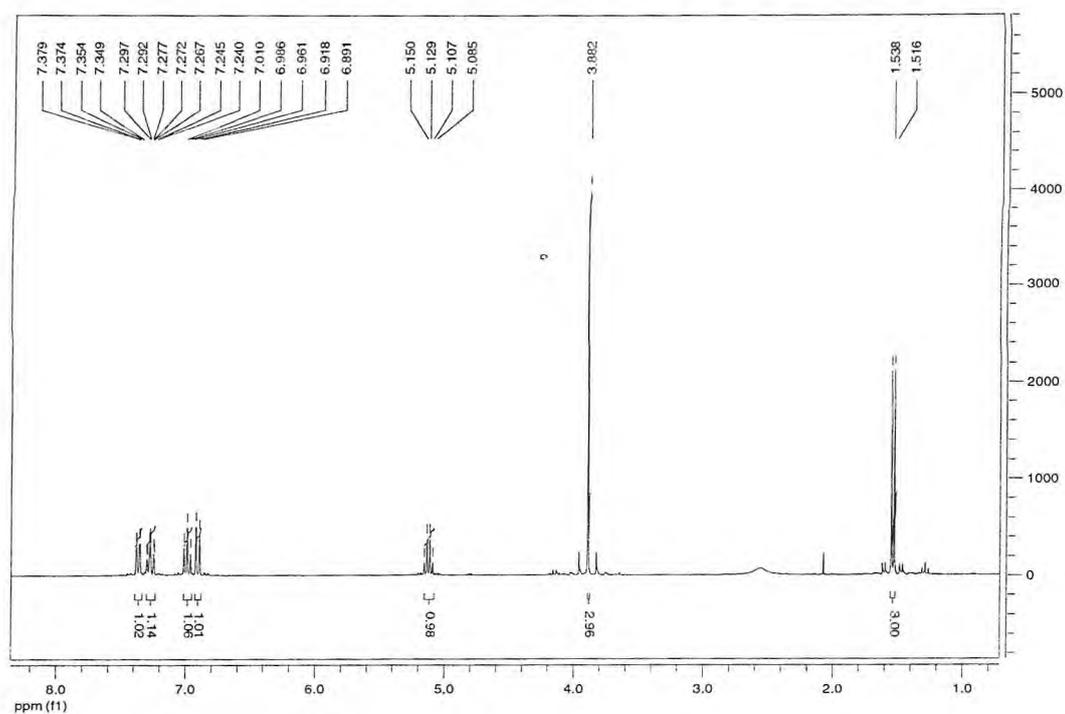


Figura 5.49 - Espectro de Ressonância Magnética Nuclear de ^1H a 300 MHz em CDCl_3 do composto (383)

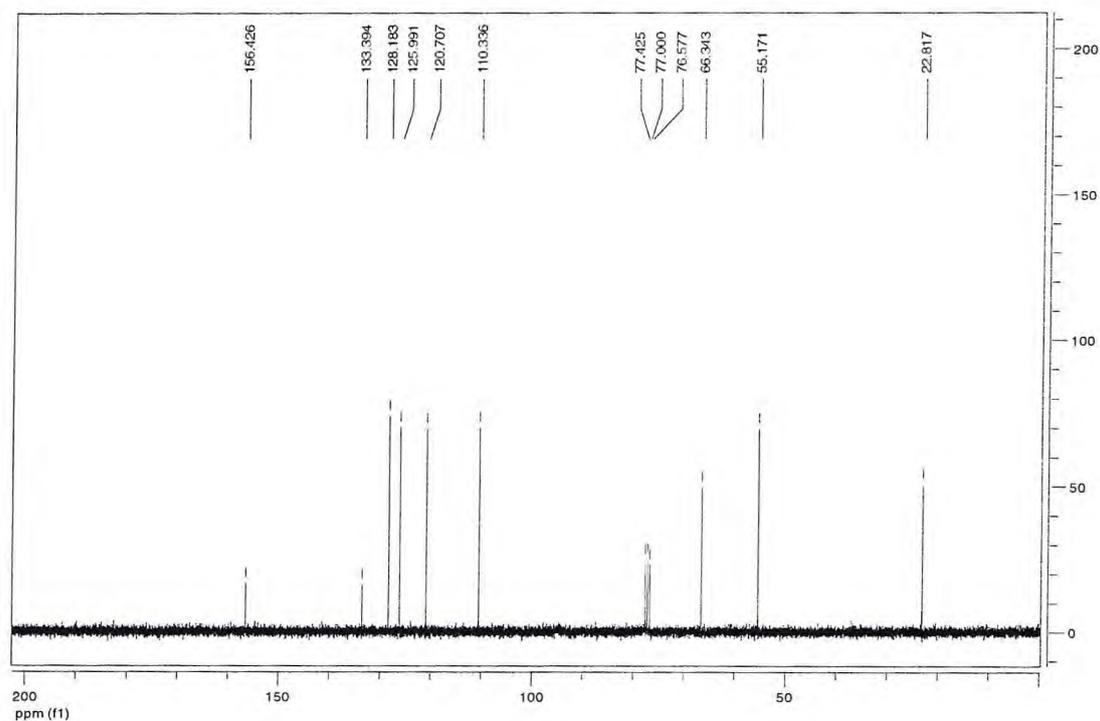


Figura 5.50 - Espectro de Ressonância Magnética Nuclear de ^{13}C a 75 MHz em CDCl_3 do composto (383)

5.13. Dados espectroscópicos do 1-(3-metoxifenil)etanol

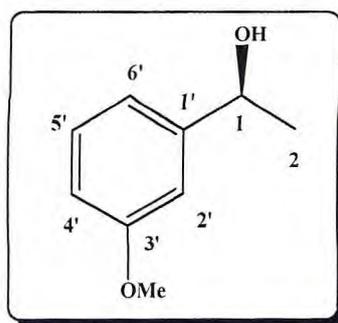


Figura 5.51 - Estrutura química do composto (384) - (*S*)-1-(3-metoxifenil)etanol

RMN ^1H (CDCl_3 , 300,13 MHz): δ 1,47 (3H, d, $J = 6,6$ Hz, H_2), 3,81 (3H, s, OCH_3), 4,85 (1H, q, $J = 6,6$ Hz, H_1), 6,81 (1H, dd, $J = 8,5$ e 1,2 Hz, $\text{H}_{6'}$), 6,93-6,95 (2H, m, $\text{H}_2 + \text{H}_4$), 7,26 (1H, t, $J = 8,5$ Hz, $\text{H}_{5'}$). (**Figura 5.52**)

RMN ^{13}C (CDCl_3 , 75,5 MHz): δ 25,0 (C_2), 55,0 (OCH_3), 70,0 (C_1), 110,8 ($\text{C}_{2'}$), 112,7 ($\text{C}_{4'}$), 117,6 ($\text{C}_{6'}$), 129,3 ($\text{C}_{5'}$), 147,6 ($\text{C}_{1'}$), 159,6 ($\text{C}_{3'}$). (**Figura 5.53**)

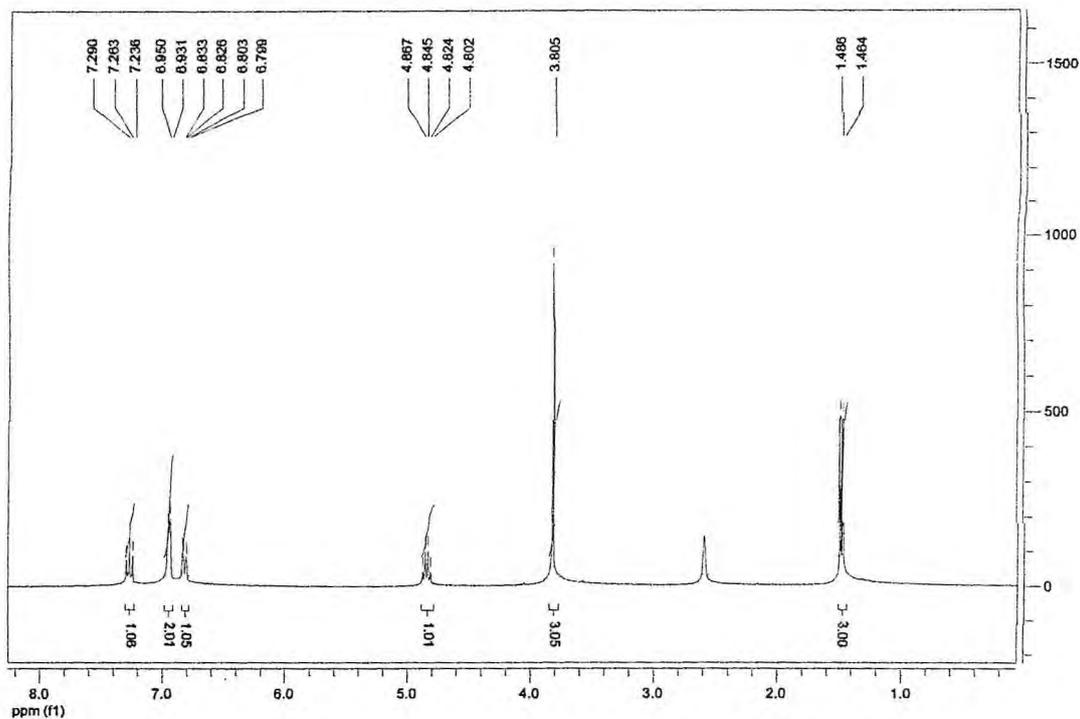


Figura 5.52 - Espectro de Ressonância Magnética Nuclear de ^1H a 300 MHz em CDCl_3 do composto (384)

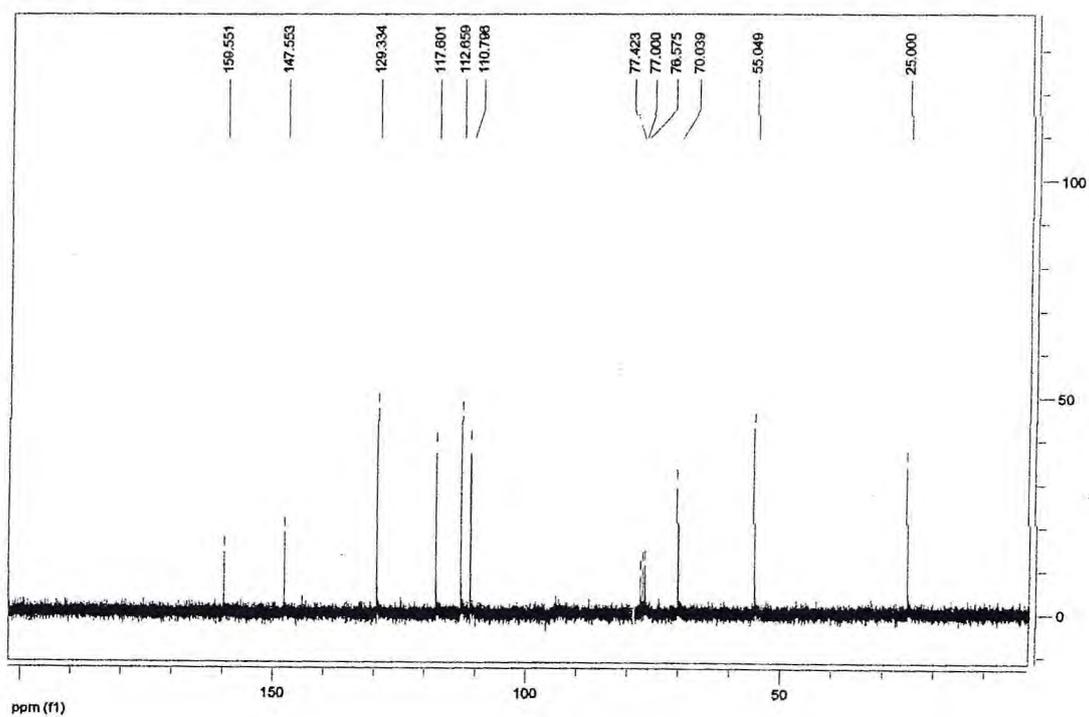


Figura 5.53 - Espectro de Ressonância Magnética Nuclear de ^{13}C a 75 MHz em CDCl_3 do composto (384)

5.14. Dados espectroscópicos do 1-(4-metoxifenil)etanol

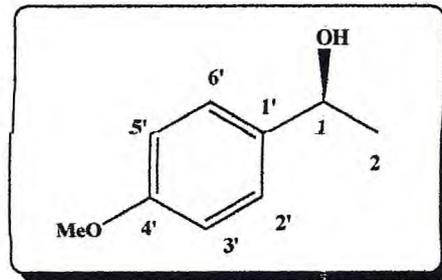


Figura 5.54 - Estrutura química do composto (385) - (*S*)-1-(4-metoxifenil)etanol

RMN ^1H (CDCl_3 , 300,13 MHz): δ 1,48 (3H, d, $J = 6,3$ Hz, H_2), 3,81 (3H, s, OCH_3), 4,85 (1H, q, $J = 6,3$ Hz, H_1), 6,88 (2H, d, $J = 8,7$ Hz, $\text{H}_3' + \text{H}_5'$), 7,30 (2H, d, $J = 8,7$ Hz, H_2' e H_6'); (**Figura 5.55**)

RMN ^{13}C NMR (CDCl_3 , 75,5 MHz): δ 27,4 (C_2), 57,7 (OMe), 116,2 (C_1), 129,1 ($\text{C}_2' + \text{C}_6'$), 129,1 ($\text{C}_3' + \text{C}_5'$), 140,4 (C_1'), 161,3 (C_4'). (**Figura 5.56**)

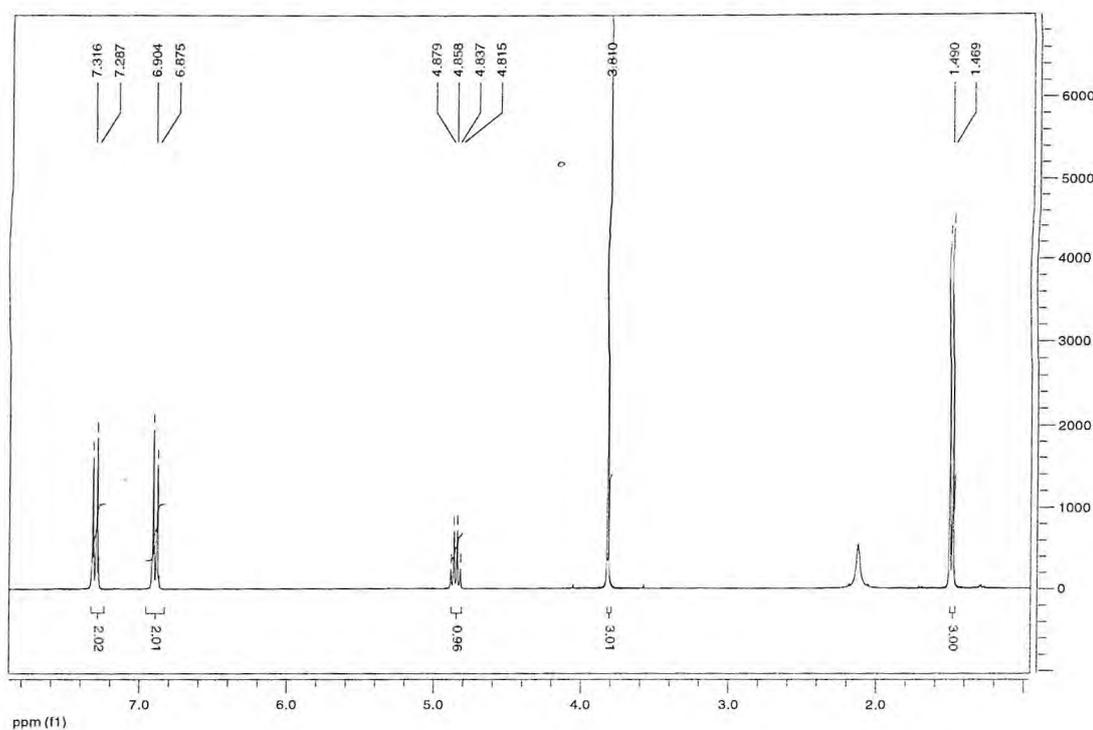


Figura 5.55 - Espectro de Ressonância Magnética Nuclear de ^1H a 300 MHz em CDCl_3 do composto (385)

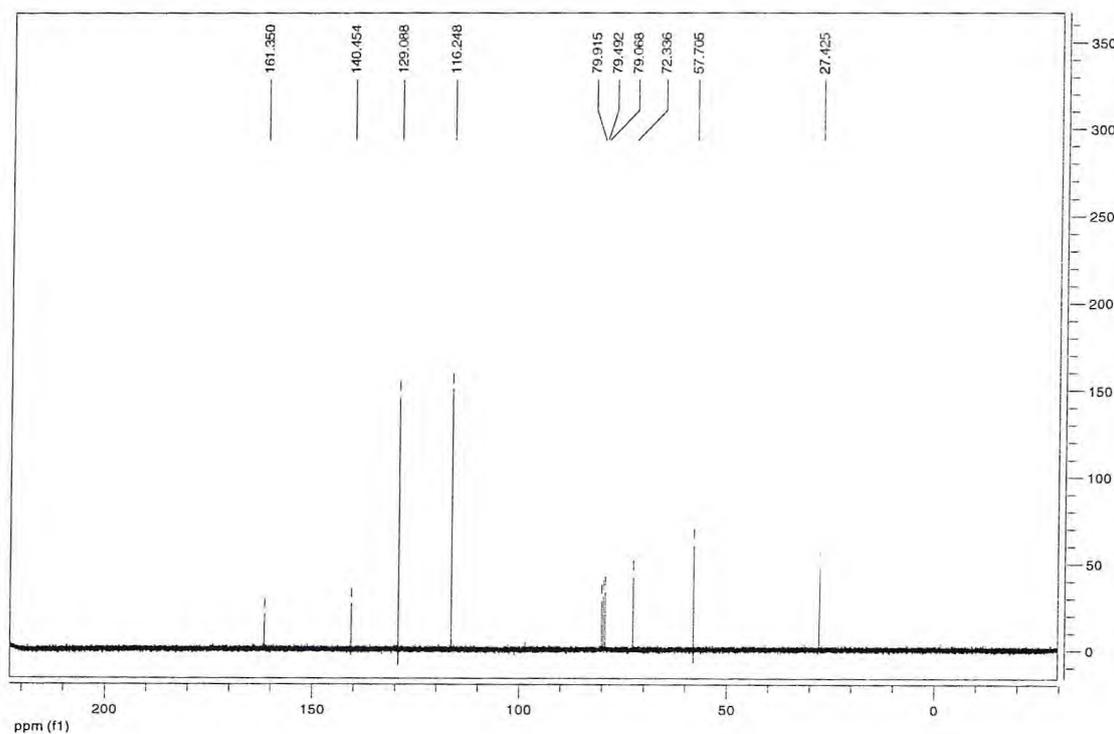


Figura 5.56 - Espectro de Ressonância Magnética Nuclear de ^{13}C a 75 MHz em CDCl_3 do composto (385)

5.15. Dados espectroscópicos do 1-(4-clorofenil)etanol

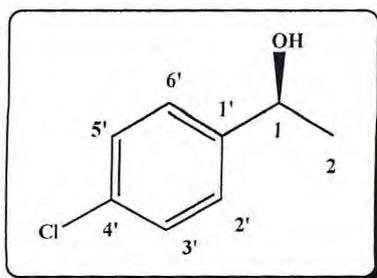


Figura 5.57 - Estrutura química do composto (386) - (*S*)-1-(4-clorofenil)etanol

RMN ^1H (CDCl_3 , 300,13 MHz): δ 1,46 (3H, d, $J=6,5$ Hz, H_1), 4,85 (1H, q, $J=6,5$ Hz, H_2), 7,23-7,36 (4H, m, $\text{H}_2' + \text{H}_3' + \text{H}_5' + \text{H}_6'$). (**Figura 5.58**)

RMN ^{13}C (CDCl_3 , 75,5 MHz): δ 25,1 (C_2), 69,6 (C_1), 126,7 (C_2'), 128,5 (C_3'), 132,9 (C_4'), 144,2 (C_1'). (**Figura 5.59**)

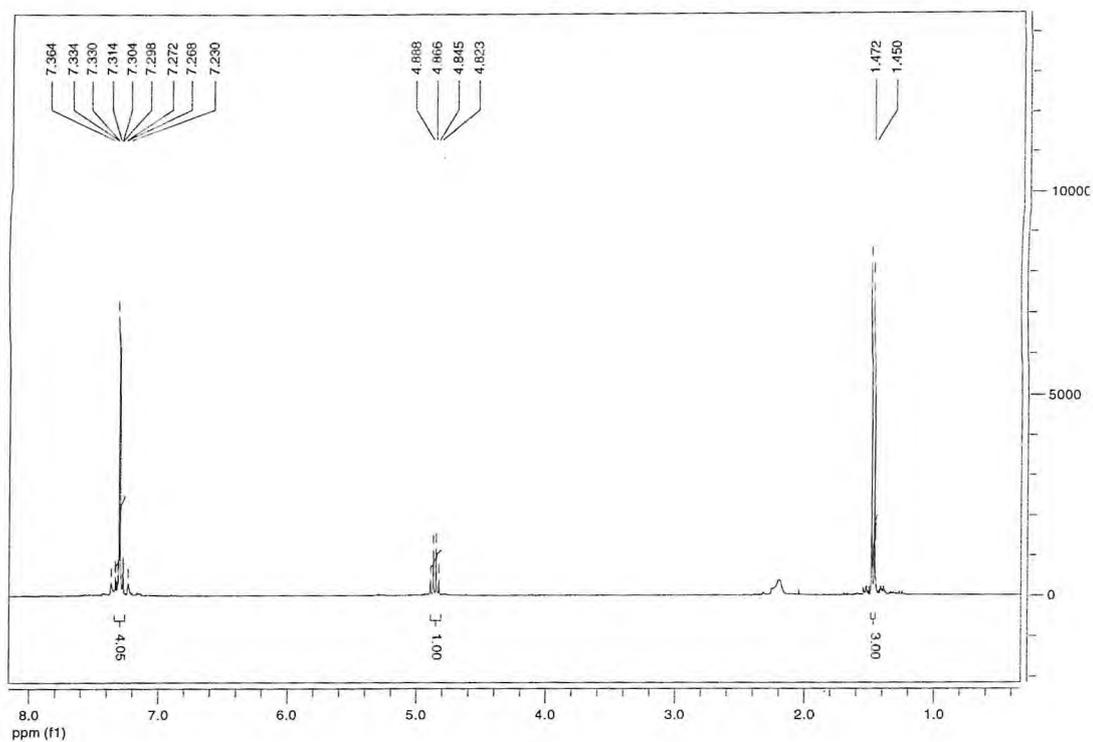


Figura 5.58 - Espectro de Ressonância Magnética Nuclear de ^1H a 300 MHz em CDCl_3 do composto (386)

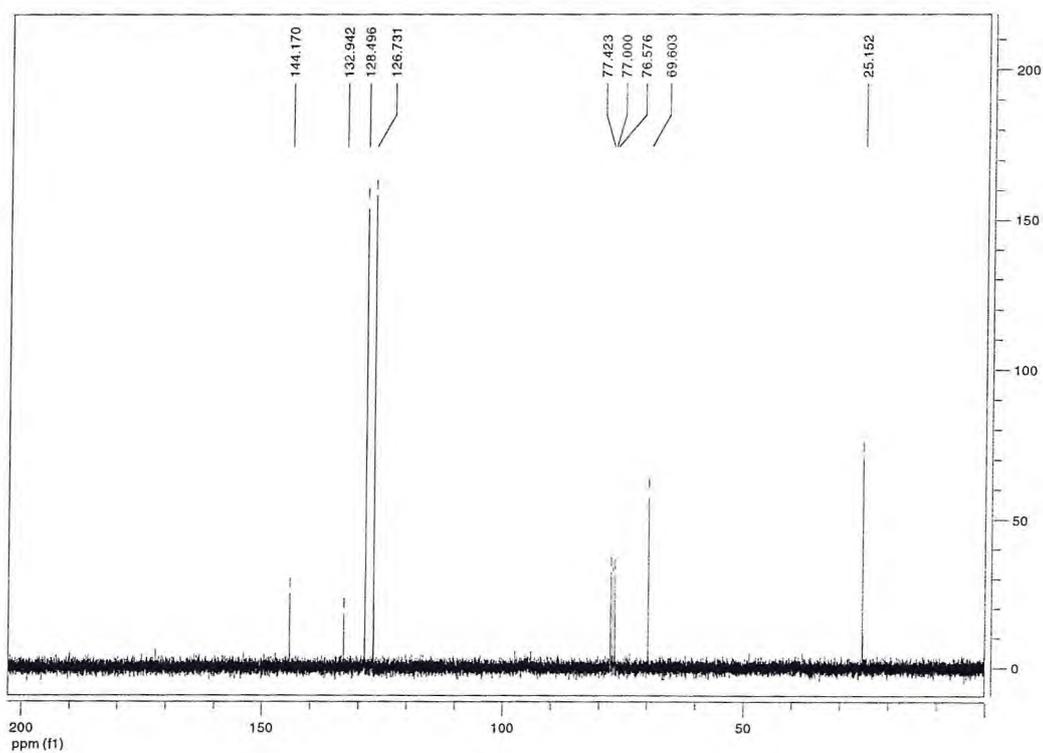


Figura 5.59 - Espectro de Ressonância Magnética Nuclear de ^{13}C a 75 MHz em CDCl_3 do composto (386)

5.16. Dados espectroscópicos do 2-cloro-1-(fenil)etanol

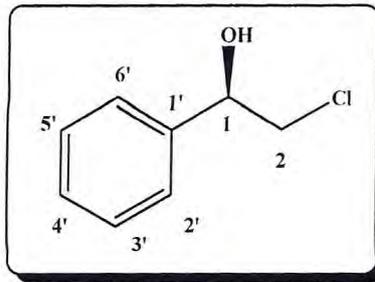


Figura 5.60 - Estrutura química do composto (387) - (*R*)-2-cloro-1-(fenil)etanol

RMN ^1H (CDCl_3 , 300,13 MHz): δ 3,56 (1H, dd, $J = 11,4$ e 3,3 Hz, H_2), 3,66 (1H, dd, $J = 11,4$ e 8,7 Hz, H_2), 4,81 (1H, dd, $J = 8,7$ e 3,6 Hz, H_1), 7,30 (5H, m, $\text{H}_{2'} + \text{H}_{3'} + \text{H}_{4'} + \text{H}_{5'} + \text{H}_{6'}$); (**Figura 5.61**)

RMN ^{13}C (CDCl_3 , 75,5 MHz): δ 50,8 (C_2), 74,0 (C_1), 126,0 ($\text{C}_{2'} + \text{C}_{6'}$), 128,4 e 128,6 ($\text{C}_{3'} + \text{C}_{5'}$), 139,9 ($\text{C}_{1'}$). (**Figura 5.62**)

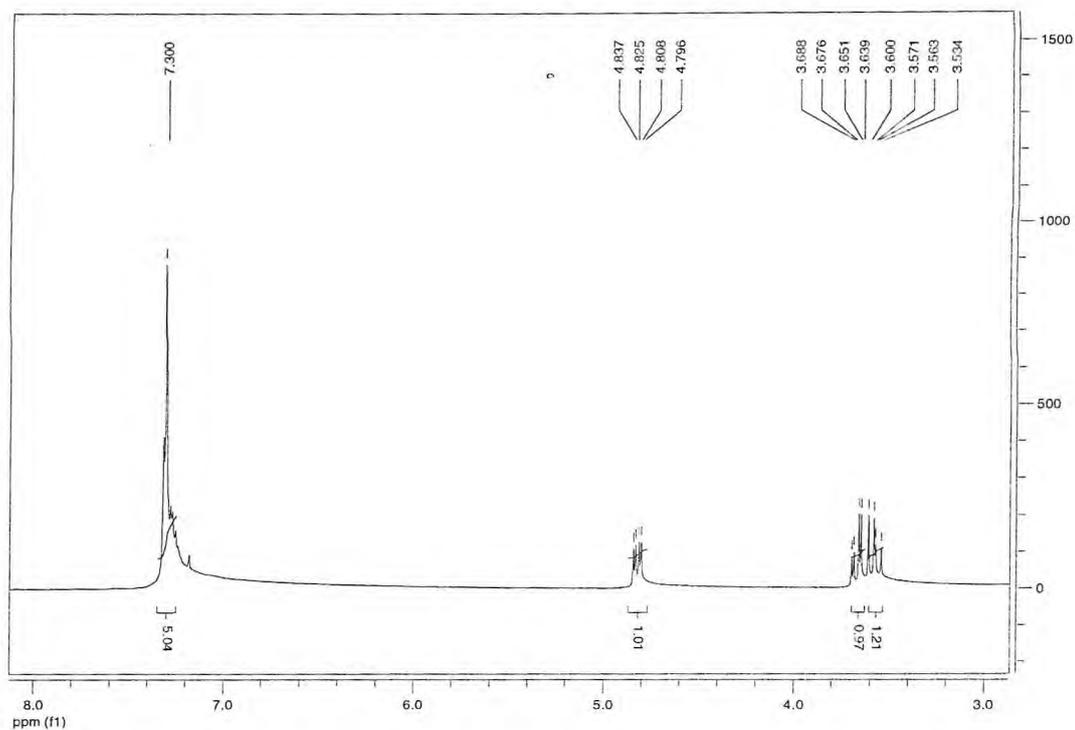


Figura 5.61 - Espectro de Ressonância Magnética Nuclear de ^1H a 300 MHz em CDCl_3 do composto (387)

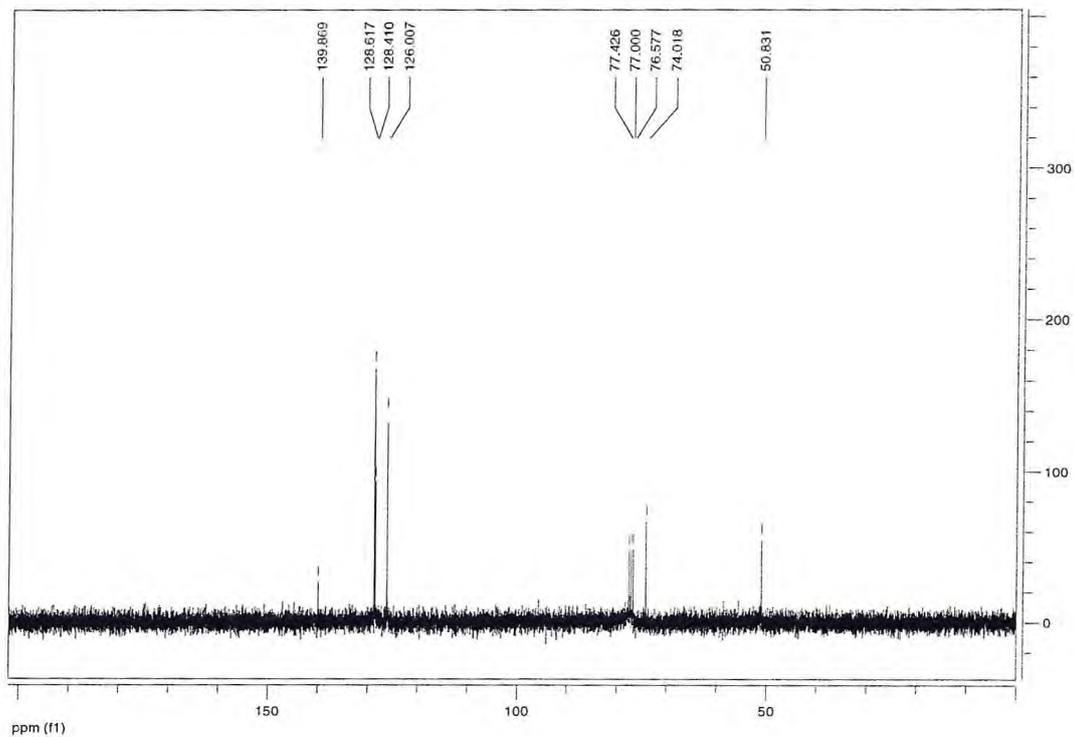


Figura 5.62 - Espectro de Ressonância Magnética Nuclear de ^{13}C a 75 MHz em CDCl_3 do composto (387)

5.17. Dados espectroscópicos do 2-cloro-1-(3,4-diclorofenil)etanol

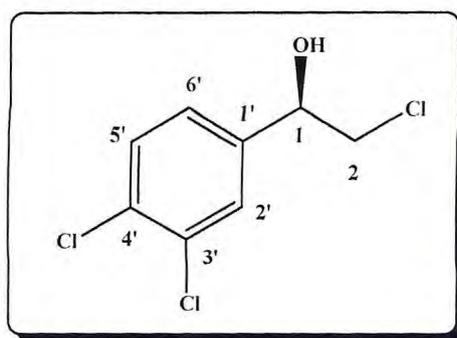


Figura 5.63 - Estrutura química do composto (388) - (*R*)-2-cloro-1-(3,4-diclorofenil)etanol

RMN ^1H (CDCl_3 , 300,13 MHz): δ 3,59 (1H, dd, $J = 11,4$ e 8,7 Hz, H_2), 3,72 (1H, dd, $J = 11,4$ e 3,6 Hz, H_2), 4,87 (1H, dd, $J = 8,7$ e 3,6 Hz, H_1), 7,21 (1H, dd, $J = 8,4$ e 1,8 Hz, $\text{H}_{6'}$), 7,43 (1H, d, $J = 8,4$ Hz, $\text{H}_{5'}$), 7,51 (1H, d, $J = 1,8$ Hz, $\text{H}_{2'}$); (**Figura 5.64**)

RMN ^{13}C (CDCl_3 , 75,5 MHz): δ 50,4 (C_2), 72,8 (C_1), 125,4 ($\text{C}_{6'}$), 128,1 ($\text{C}_{2'}$), 130,6 ($\text{C}_{5'}$), 132,4 ($\text{C}_{4'}$), 132,8 ($\text{C}_{3'}$), 140,0 ($\text{C}_{1'}$). (**Figura 5.65**)

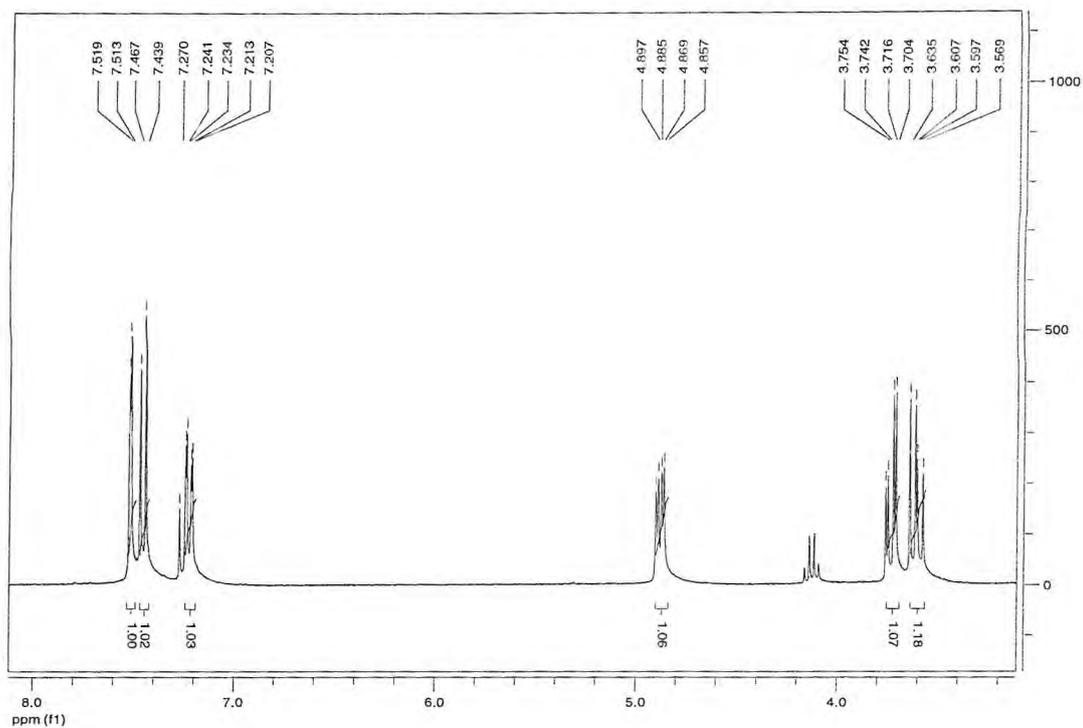


Figura 5.64 - Espectro de Ressonância Magnética Nuclear de ^1H a 300 MHz em CDCl_3 do composto (388)

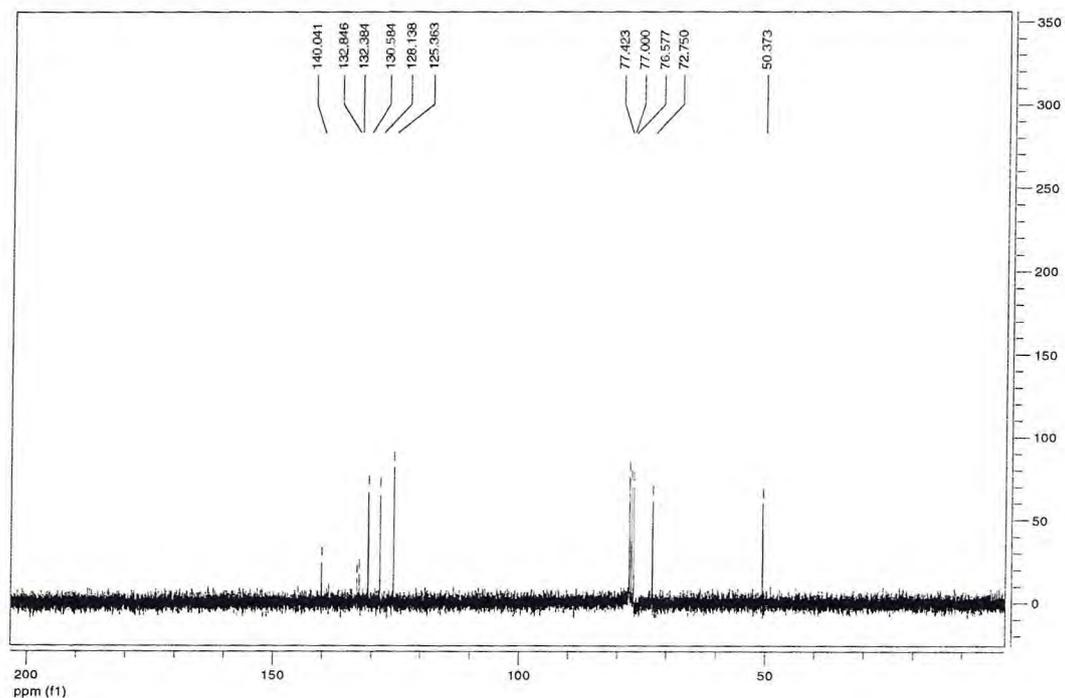


Figura 5.65 - Espectro de Ressonância Magnética Nuclear de ^{13}C a 75 MHz em CDCl_3 do composto (388)

5.18. Dados espectroscópicos do 1-(4-metilfenil)etanol

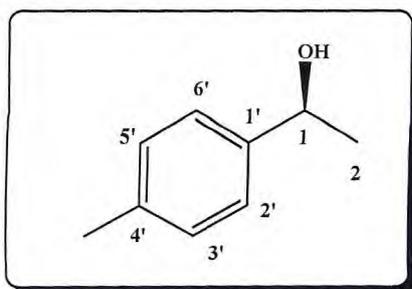


Figura 5.66 - Estrutura química do composto (389) - (S)-1-(4-metilfenil)etanol

RMN ^1H (CDCl_3 , 300,13 MHz): δ 1,49 (3H, d, $J = 6,3$, H_2), 2,39 (3H, s, CH_3), 4,84 (1H, q, $J = 6,3$ Hz, H_1), 7,18 (2H, d, $J = 7,8$ Hz, $\text{H}_3' + \text{H}_5'$), 7,28 (2H, d, $J = 8,1$ Hz, $\text{H}_2' + \text{H}_6'$); (**Figura 5.67**)

RMN ^{13}C (CDCl_3 , 75,5 MHz): δ 20,9 (CH_3), 24,9 (C_2), 69,9 ($\text{C}_{1'}$), 125,2 ($\text{C}_{2'} + \text{C}_{6'}$), 128,9 ($\text{C}_{3'} + \text{C}_{5'}$), 136,8 ($\text{C}_{4'}$), 142,8 ($\text{C}_{1'}$). (**Figura 5.68**)

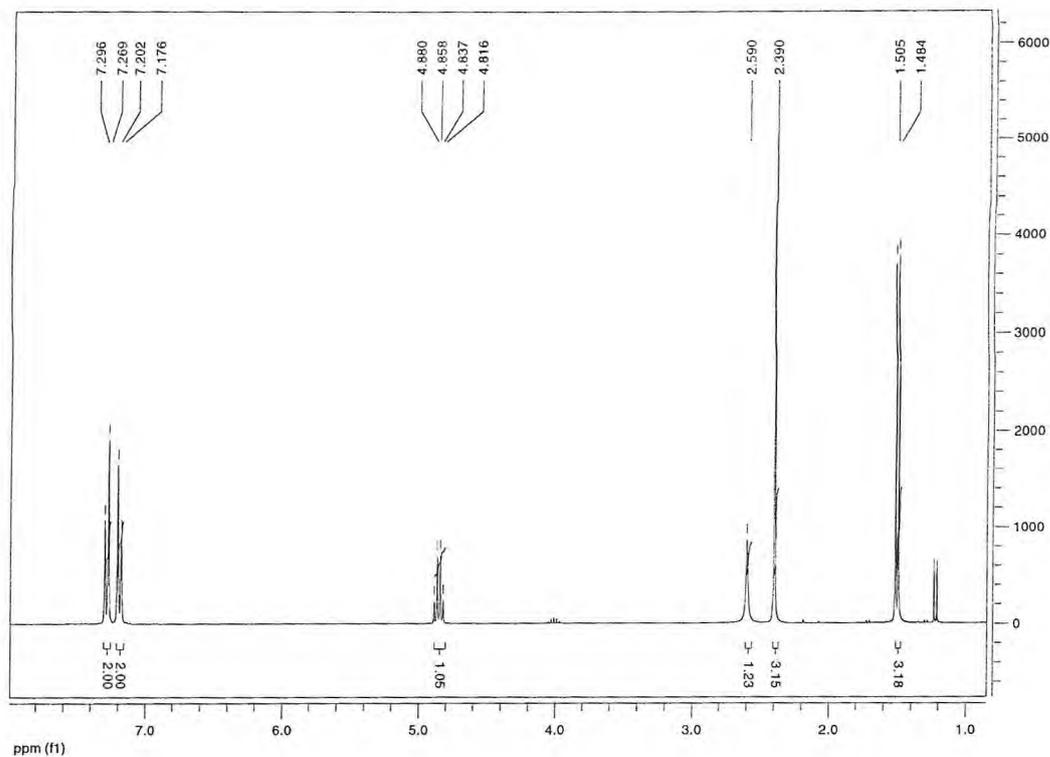


Figura 5.67 - Espectro de Ressonância Magnética Nuclear de ^1H a 300 MHz em CDCl_3 do composto (389)

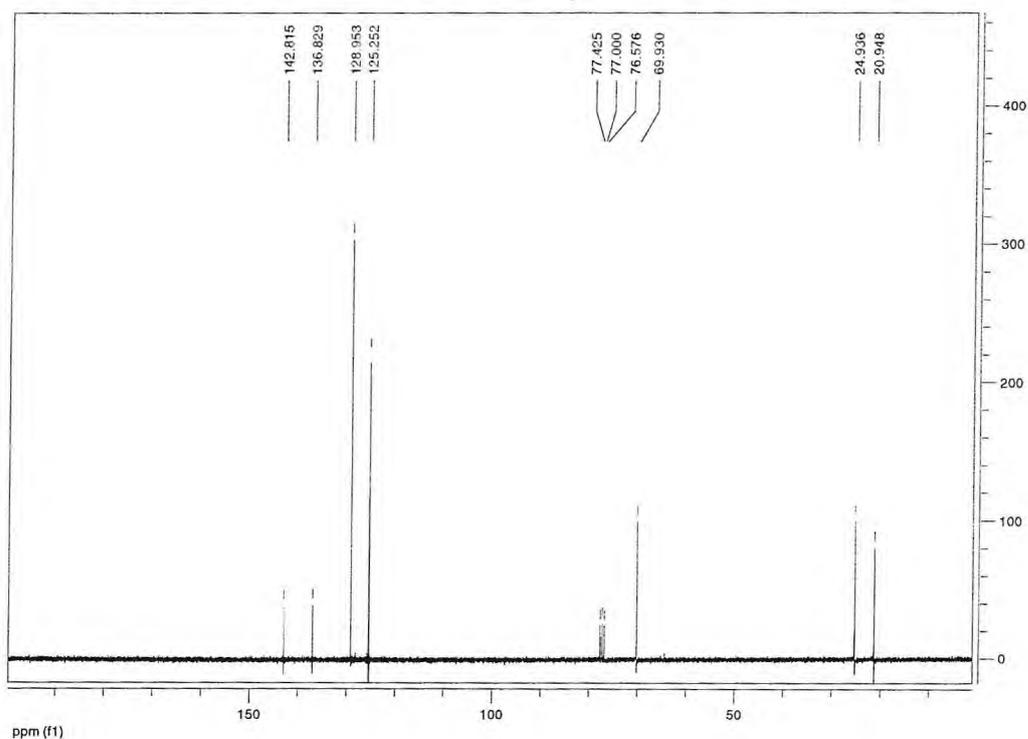
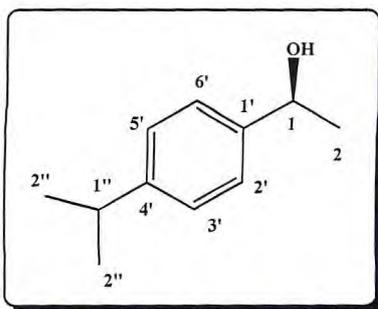


Figura 5.68 - Espectro de Ressonância Magnética Nuclear de ^{13}C a 75 MHz em CDCl_3 do composto (389)

5.19. Dados espectroscópicos do 1-(4-isopropilfenil)etanol**Figura 5.69** - Estrutura química do composto (390) - (*S*)-1-(4-isopropilfenil)etanol

RMN ^1H (CDCl_3 , 300,13 MHz): δ 1,30 (6H, d, $J = 6,9$ Hz, $\text{H}_{2''}$), 1,51 (3H, d, $J = 6,6$ Hz, H_2), 2,88-3,02 (1H, m, $\text{H}_{1''}$), 4,87 (1H, q, $J = 6,3$ Hz, H_1), 7,25 (2H, d, $J = 8,1$ Hz, $\text{H}_{3'} + \text{H}_{5'}$), 7,33 (2H, d, $J = 8,1$ Hz, $\text{H}_{2'} + \text{H}_{6'}$); (**Figura 5.70**)

RMN ^{13}C (CDCl_3 , 75,5 MHz): δ 23,9 ($\text{C}_{2''}$), 24,9 (C_2), 33,7 ($\text{C}_{1''}$), 70,1 (C_1), 125,4 ($\text{C}_{2'} + \text{C}_{6'}$), 126,4 ($\text{C}_{3'} + \text{C}_{5'}$), 143,1 ($\text{C}_{1'}$), 148,0 ($\text{C}_{4'}$). (**Figura 5.71**)

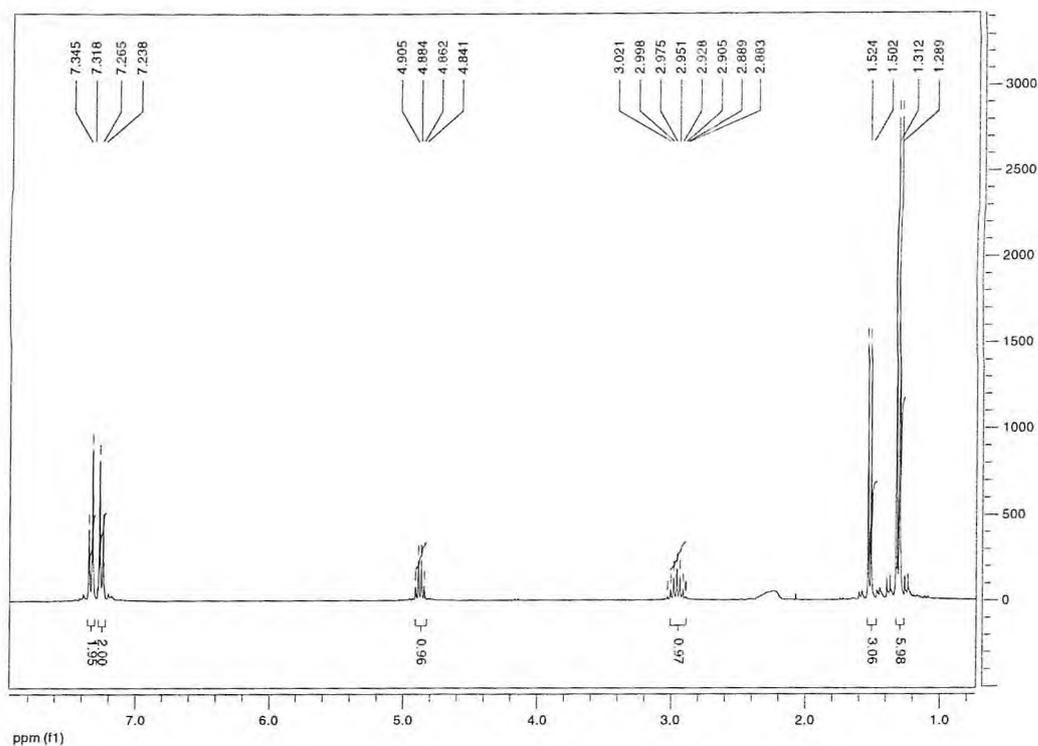


Figura 5.70 - Espectro de Ressonância Magnética Nuclear de ^1H a 300 MHz em CDCl_3 do composto (390)

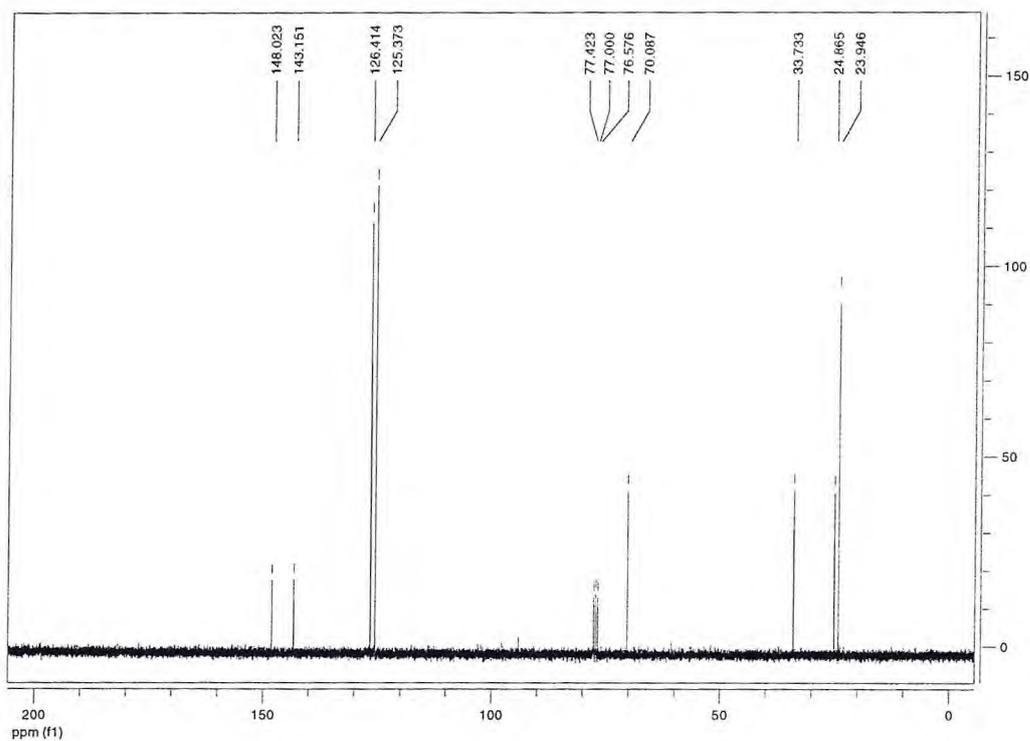


Figura 5.71 - Espectro de Ressonância Magnética Nuclear de ^{13}C a 75 MHz em CDCl_3 do composto (390)

Capítulo 6



Conclusão

6. CONCLUSÃO

Com relação ao emprego das leveduras *Candida tropicalis* e *Pichia membranifaciens* como agentes para biorredução: (1) Foram obtidos valores de conversão que variaram entre baixos (7%) a excelentes (99%) dependendo do substituinte no anel aromático (2) Os melhores resultados foram obtidos com as acetofenonas contendo os substituintes nitro com conversões superiores a 99% e *ee* de 96-98% do enantiômero *S*. Com os demais substratos foram obtidos conversões entre 7-65 e *ee* entre 56-92% e (3) Foram obtidos dois álcoois com configuração *R*, justificado pela mudança nas regras de prioridade em torno do átomo de carbono assimétrico da molécula.

Com relação à síntese do agente antitumoral (377): (1) Preparou-se quimicamente o referido composto segundo procedimentos adotados da literatura; (2) Com o emprego de lipases ou oxidoredutases foi possível a produção do composto opticamente ativo; (3) Empregando enzimas do tipo oxidoredutases obteve-se o produto com ambas as configurações dependendo da enzima empregada. Com a otimização das condições reacionais obteve-se uma conversão de até 93% e *ee* superior a 99% do enantiômero (*S*); (4) Com o uso das lipases CAL-B e PSC obteve-se uma conversão de 50% do álcool com *ee* superior a 99% do enantiômero (*S*). Os produtos foram isolados para confirmação da configuração absoluta, obtendo-se rendimentos próximos a 50 % do álcool (*S*) e acetato (*R*).

Capítulo 7

Referências Bibliográficas

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AEHLE, W. **Enzymes in Industry: Production and Applications**, 2^aed., WILEY-VCH, 2004
- ANDRADE, L. H.; KEPPLER, A. F.; SCHOENLEIN-CRUSIUS, I. H.; PORTO, A. L. M.; COMASSETO, J. V. Evaluation of acetophenone monooxygenase and alcohol dehydrogenase activities in different fungal strains by biotransformation of acetophenone derivatives. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v.31, p. 129-135, 2004
- ANTUNES, H.; FARDELONE, L. C.; RODRIGUES, J. A. R.; MORAN, P. J. S. Chemoenzymatic syntheses of (*R*)-2-bromo-, (*R*)-2-chloro- and (*R*)-2-azido-1-(1,3-benzodioxol-5-yl)-1-ethanol. **Tetrahedron: Asymmetry**, v.15, p.2615-2620, 2004
- AOYAMA, T.; SONODA, N.; YAMAUCHI, M.; TORIYAMA, K.; ANZAI, M.; ANDO, A.; SHIOIRI, T. Chemical Manganese Dioxide (CMD), an Efficient Activated Manganese Dioxide. Application to Oxidation of Benzylic and Allylic Alcohols. **Synlett**, v.1, p.35-36, 1998
- BACHU, P.; SPERRY, J.; BRIMBLE, M. Chemoenzymatic synthesis of deoxy analogues of the DNA topoisomerase II inhibitor eleutherin and the 3C-protease inhibitor thysanone. **Tetrahedron**, v.64, p.4827-4834, 2008
- BARRET, R.; DAUDON, M. Oxidation of phenols to quinones by bis(trifluoroacetoxy)iodobenzene. **Tetrahedron Letters**, v.31, p.4871-4872, 1990
- BARROS-FILHO, B. A.; OLIVEIRA, M. C. F.; LEMOS, T. L. G.; MATTOS, M. C.; DE GONZALO, G.; GOTOR-FERNANDEZ, V.; GOTOR, V. *Lentinus strigellus*: a new versatile stereoselective biocatalyst for the bioreduction of prochiral ketones. **Tetrahedron: Asymmetry**, v.20, p.1057-1061, 2009
- BARROS-FILHO, B. A.; NUNES, F. M.; OLIVEIRA, M. C. F.; LEMOS, T. L. G.; MATTOS, M. C.; DE GONZALO, G.; GOTOR-FERNANDEZ, V.; GOTOR, V. Bioreduction of prochiral ketones by growing cells of *Lasiodiplodia theobromae*: Discovery of a versatile biocatalyst for asymmetric synthesis. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v.65, p.37-40, 2010
- BISWAS, S.; CHATTOPADHYAY, S.; SHARMA, A. A chemoenzymatic asymmetric synthesis of the hydroxy acid segment of schulzeines B and C. **Tetrahedron: Asymmetry**, v.21, p.27-32, 2010
- BOYD, D. R., SHARMA, N. D., BOWERS, N. I., DALTON, H., GARRETT, M. D., HARRISON, J. S.; SHELDRAKE, G. N. Dioxygenase-catalysed oxidation of disubstituted benzene substrates: benzylic monohydroxylation versus aryl cis-dihydroxylation and the meta effect. **Organic & Biomolecular Chemistry**, v.4, p.3343-3349, 2006

- BUSTO, E.; FERNANDEZ, V. G.; GOTOR, V. Enantioselective Synthesis of 4-(Dimethylamino)pyridines through a Chemical Oxidation-Enzymatic Reduction Sequence. Application in Asymmetric Catalysis. **Adv. Synth. Catal.**, v.348, p.2626-2632, 2006
- CAMPOS, F.; BOSCH, M. P.; GUERRERO, A. An efficient enantioselective synthesis of (*R,R*)-formoterol, a potent bronchodilator, using lipases. **Tetrahedron: Asymmetry**, v.11, p.2705-2717, 2000
- CARVALHO, C. C. C. R.; FONSECA, M. M. R. Biotransformation of terpenes. **Biotechnology Advances**, v.24, p.134-142, 2006
- CHAKER, L.; PAUTET, F.; FILLION, H. Studies on the Oxidative Addition of *N,N*-Dimethylamine to Bromojuglones and Bromomethyljuglones. **Chem. Pharm. Bull.**, v.42, p.2238-2240, 1994
- CHÊNEVERT, R.; CARON, D. Chemoenzymatic enantioselective synthesis of (1*S*,5*R*)-(-)-frontalin. **Tetrahedron: Asymmetry**, v.13, p.339-342, 2002
- COMPOSTELLA, F.; FRANCHINI, L.; GIOVENZANA, G. B.; PANZA, L.; PROSPERI, D.; RONCHETTI, F. Chemoenzymatic stereoconvergent synthesis of 3-*O*-benzoyl azidosphingosine. **Tetrahedron: Asymmetry**, v.13, p.867-872, 2002
- 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**, v.14, p.711-715, 2003
- COMASSETO, J. V.; ANDRADE, L. H.; OMORI, A. T.; ASSIS, L. F.; PORTO, A. L. M. Deracemization of aryl ethanols and reduction of acetophenones by whole fungal cells of *Aspergillus terreus* CCT 4083, *A. terreus* CCT 3320 and *Rhizopus oryzae* CCT 4964. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v.29, p.55-61, 2004
- COZZI, P. G., KOTRUSZ, P. Highly Enantioselective Addition of Me₂Zn to Aldehydes Catalyzed by ClCr(Salen). **Journal of the American Chemical Society**, v.128, p.4940-4941, 2006
- CSUK, R.; WOESTE, B. A chemoenzymatic approach to (+)-pilocarpine. **Tetrahedron**, v.64, p.9384-9387, 2008
- DELAMATER, E. D. Basic fuchsin as a nuclear stain for Fungi. **Mycologia**, v.40, p.423-429, 1948
- DU, D.; FANG, T.; XU, J.; ZHANG, S. Structurally Well-Defined, Recoverable C₃-Symmetric Tris(β-hydroxy phosphoramidate)-Catalyzed Enantioselective Borane Reduction of Ketones. **Organic Letters**, v.8, n.7, p.1327-1330, 2006
- FABER, K. **Biotransformations in Organic Chemistry**, 4^aed., Spring, Berlin, 2000

- FESSNER, W. D.; ANTHONSEN, A. **Modern Biocatalysis: Stereoselective and Environmental Friendly Reactions**, University of York, York UK, 2008
- FESKE, B. D.; STEWART, J. D. Chemoenzymatic formal total synthesis of (-)-bestatin. **Tetrahedron: Asymmetry**, v.16, p.3124-3127, 2005
- FUJIMOTO, Y.; EGUCHI, T.; MURASAKI, C.; OHASHI, Y.; KAKINUMA, K.; TAKAGAKI, H.; ABE, M.; INAZAWA, K.; YAMAZAKI, K.; IKEKAWA, N.; YOSHIKAWA, O.; IKEKAWA, T. Studies on the structure and stereochemistry of cytotoxic furanonaphthoquinones from *Tabebuia impetiginosa*: 5- and 8-hydroxy-2-(1-hydroxyethyl)naphtho[2,3-*b*]furan-4,9-diones. **J. Chem. Soc. Perkin Trans.**, v.10, p.2323-2327, 1991
- GARCIA, S. M. P. **Biocatálise em meios não convencionais: solventes orgânicos, fluidos supercríticos e líquidos iônicos**. 2005. 136f. Tese de Doutorado em Bioquímica, Universidade Nova de Lisboa, Lisboa, 2005
- GERCEK, A.; KARAKAYA, D.; DEMIR, A. S. Chemoenzymatic synthesis of both enantiomers of 2-chloro-1-(2-furyl)ethanol. **Tetrahedron: Asymmetry**, v.16, p.1743-1746, 2005
- GILBERT, J. C.; MARTIN, S. F. **Experimental Organic Chemistry**, 2^aed., Saunders College Publishing, 1998
- GOTOR, V. Biocatalysis Applied to the Preparation of Pharmaceuticals. **Organic Process Research & Development**, v.6, p.420-426, 2002
- GOTOR, V.; ALFONSO, I.; GARCIA-URDIALES, E. **Asymmetric Organic Synthesis with Enzymes**, 1^aed., WILEY, Weinheim, 2008
- GRUTTADAURIA, M.; MEO, P. L.; NOTO, R. Short and efficient chemoenzymatic synthesis of goniotalamin. **Tetrahedron Letters**, v.45, p.83-85, 2004
- HANSON, J. R. **An Introduction in Biotransformations in Organic Chemistry**, Oxford University Press, New York, 1997
- HAGIWARA, H.; SATO, K.; NISHINO, D.; HOSHI, T.; SUZUKI, T.; ANDO, M. Domino Michael-*O*-alkylation reaction: one-pot synthesis of 2,4-diacylhydrofuran

- derivatives and its application to antitumor naphthofuran synthesis. **J. Chem. Soc. Perkin Trans.**, v.1, p.2946–2957, 2001
- HASAN, F.; SHAH, A. A.; HAMEED, A. Industrial applications of microbial lipases. **Enzyme and Microbial Technology**, v.39, p.235-251, 2006
- HILLOCKS, R. J. The effect of root-knot nematode on vascular resistance to *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* in the stems of cotton plants. **Annals of applied Biology**, v.107, p.213-218, 1985
- KAMAL, A.; SANDBHOR, M.; SHAIK, A. A. Chemoenzymatic synthesis of (*S*) and (*R*)-propranolol and sotalol employing one-pot lipase resolution protocol. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v.14, p.4581-4583, 2004^a
- KAMAL, A.; SHAIK, A. A.; SANDBHOR, M.; MALIK, M. S.; KAGA, H. Chemoenzymatic synthesis of (3*S*,4*S*)- and (3*R*,4*R*)-3-methoxy-4-methylamino pyrrolidine. **Tetrahedron Letters**, v.45, p.8057-8059, 2004^b
- KAMAL, A.; SANDBHOR, M.; SHAIK, A. A.; MALIK, M. S. A facile and convenient chemoenzymatic synthesis of optically active O-(4-methoxyphenyl)-glycidol and 1,2-diacyl-sn-glycerol. **Tetrahedron: Asymmetry**, v.16, p.1855-1859, 2005^a
- KAMAL, A.; KHANNA, G. B. R.; KRISHNAJI, T.; RAMU, R. A new facile chemoenzymatic synthesis of levamisole. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v.15, p.613-615, 2005^b
- KAMAL, A.; MALIK, A. S.; SHAIK, A. A.; AZEEZA, S. Enantioselective synthesis of (*R*)- and (*S*)-curcumene and curcuphenol: an efficient chemoenzymatic route. **Tetrahedron: Asymmetry**, v.18, p.2547-2553, 2007^a
- KAMAL, A.; KRISHNAJI, T.; REDDY, P. V. A new chemoenzymatic Baylis–Hillman approach for the synthesis of enantiomerically enriched umbelactones. **Tetrahedron Letters**, v.48, p.7232-7235, 2007^b
- KAMAL, A.; MALIK, M. S.; AZEEZA, S.; BAJEE, S.; SHAIK, A. A. Total synthesis of (*R*)- and (*S*)-turmerone and (7*S*,9*R*)-bisacumol by an efficient chemoenzymatic approach. **Tetrahedron: Asymmetry**, v.20, p.1267-1271, 2009

- KAMBLE, A.; SONI, P.; BANERJEE, U. C. Biocatalytic synthesis of S(-)-1-(1'-naphthyl) ethanol by a novel isolate of *Candida viswanathii*. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v.35, p.1-6, 2005
- KOUL, S.; PARSHAD, R.; TANEJA, S. C.; QAZI, G. N. Enzymatic resolution of naproxen. **Tetrahedron: Asymmetry**, v.14, p.2459-2465, 2003
- KUMAR, A. N.; BHATT, S.; CHATTOPADHYAY, S. Chemoenzymatic asymmetric synthesis of harzia lactone A stereomers. **Tetrahedron: Asymmetry**, v.20, p.205-209, 2009
- KURBANOGLU, E. B.; ZILBEYAZ, K.; KURBANOGLU, N. I.; TASKIN, M. Highly enantioselective reduction of acetophenone by locally isolated *Alternaria alternata* using ram horn peptone. **Tetrahedron: Asymmetry**, v.18, p.1529-1532, 2007
- LABES, J. R.; WHENDHAUSEN, R. Seleção de Microorganismos com ação sobre compostos carbonilados gerando álcoois quirais. **Dynamis**, n.14, v.1, p.73-79, 2008
- MA, Y.; LIU, H.; CHEN, L.; ZHU, J.; DENG, J. Asymmetric Transfer Hydrogenation of Prochiral Ketones in Aqueous Media with New Water-Soluble Chiral Vicinal Diamine as Ligand. **Organic Letters**, v.5, n.12, p.2103-2106, 2003
- MACKIE, R. K.; SMITH, D. M. **Guidebook to Organic Synthesis**, Longman London New York, 1982
- MELO, A. C.; MOURA, E.; ANSELMO, G.; MESQUITA, M.; AQUINO, M.; COSTA, R. M.; **Normas para Apresentação de Trabalhos Acadêmicos da Universidade Federal do Ceará**, Fortaleza: Imprensa Universitária, 2007.
- MONTERDE, M. I.; BRIEVA, R.; SANCHEZ, V. M.; GOTOR, V. Enzymatic resolution of the chiral inductor 2-methoxy-2-phenylethanol. **Tetrahedron: Asymmetry**, v.13, p.1091-1096, 2002
- MORRIS, D. J., HAYES, A. M., WILLS, M. The "Reverse-Tethered" Ruthenium (II) Catalyst for Asymmetric Transfer Hydrogenation: Further Applications. **Journal of Organic Chemistry**, v.71, p.7035-7044, 2006
- NANDA, S. Chemoenzymatic total synthesis of the phytotoxic lactone herbarumin III. **Tetrahedron Letters**, v.46, p.3661-3663, 2005

NICOLAOU, K. C.; GRAY, D. L. F.; MONTAGNON, T.; HARRISON, S. T. Oxidation of Silyl Enol Ethers by Using IBX and IBXN-Oxide Complexes: A Mild and Selective Reaction for the Synthesis of Enones. **Angew. Chem. Int.**, v.41, n.6, p.996-1000, 2002

PODEA, P. V.; PAIZS, C.; TOSA, M. I.; IRIMIE, F. D. Baker's yeast-mediated synthesis of (*R*)- and (*S*)-heteroaryl-ethane-1,2-diols. **Tetrahedron: Asymmetry**, v.19, p.1959-1964, 2008

PUCHTLER, H.; MELOAN, S. N.; BREWTON, B. R. On structural formulas of basic fuchsin and aldehyde-schiff reaction products. **Histochemistry and Cell Biology**, v.45, p.255-265, 1975

REGLA, I.; LUVIANO-JÁRDON, A.; DEMARE, P.; HONG, E.; TORRES-GAVILÁN, A.; LÓPEZ-MUNGUÍA, A.; CASTILLO, E. Chemoenzymatic synthesis of the potential antihypertensive agent (2*R*,2'*S*)- β -hydroxyhomometoprolol. **Tetrahedron: Asymmetry**, v.19, p.2439-2442, 2008

RODRIGUES, J. A. 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 Technol. Biotechnol.**, v.42, p.295-303, 2004

SEROR, S.; COLLIN, J.; FIAUD, J. C.; ZOUIOUECHE, L. A. A recyclable multi-substrates catalytic system for enantioselective reduction of ketones in water. **Journal of Molecular Catalysis A: Chemical**, v.256, 85-89, 2006

SHARMA, A.; MAHATO, S.; CHATTOPADHYAY, S. A chemoenzymatic asymmetric synthesis of (9*S*,12*S*,13*S*)- and (9*S*,12*RS*,13*S*)-pinellic acids. **Tetrahedron Letters**, v.50, p.4986-4988, 2009^a

SHARMA, A.; GAMRE, S.; CHATTOPADHYAY, S. A chemoenzymatic asymmetric synthesis of methyl (6*S*,13*R*)-6,13-dihydroxytetradeca-(2*E*,4*E*,8*E*)-trienoate, a component of *Mycosphaerella rubella*. **Tetrahedron: Asymmetry**, v.20, p.1164-1167, 2009^b

SIMÕES, C. M. O.; SHENKEL, E. P.; GOSMAN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da Planta ao Medicamento**, Porto Alegre: Ed. Universidade/UFRG/ 5ªed., 2004

SONI, P.; KAUR, G.; CHAKRABORTI, A. K.; BANERJEE, U. C. *Candida viswanathii* as a novel biocatalyst for stereoselective reduction of heteroaryl methyl ketones: a highly efficient enantioselective synthesis of (*S*)- α -(3-pyridyl)ethanol. **Tetrahedron: Asymmetry**, v.16, p.2425-2428, 2005

TANIS, S. P., EVANS, B. R., NIEMAN, J. A., PARKER, T. T., TAYLOR, W. D., HEASLEY, S. E., HERRINGTON, P. M., PERRAULT, W. R., HOHLER, R. A., DOLAK, L. A., HESTER, M. R., SEEST, E. P. Solvent and in situ catalyst preparation impacts upon Noyori reductions of aryl-chloromethyl ketones: application to syntheses of chiral 2-amino-1-aryl-ethanols. **Tetrahedron: Asymmetry**, v.17, p.2154-2182, 2006

TOHMA, H.; MORIOKA, H.; HASHIZUME, M.; KITA, Y. Novel and efficient synthesis of p-quinones in water via oxidative demethylation of phenol ethers using hypervalent iodine(III) reagents. **Tetrahedron Letters**, v.42, p.6899-6902, 2001

UTSUKIHARA, T.; MISUMI, O.; KATO, N.; KUROIWA, T.; HORIUCHI, C. A. Reduction of various ketones by red algae. **Tetrahedron: Asymmetry**, v.17, p.1179-1185, 2006

WANG, J.; FENG, J.; QIN, R.; FU, H.; YUAN, M.; CHEN, H.; LI, X. Asymmetric hydrogenation of aromatic ketones catalyzed by achiral monophosphine TPPTS-stabilized Ru in ionic liquids. **Tetrahedron: Asymmetry**, v.18, p.1643-1647, 2007

WIMMER, Z.; SAMAN, D.; ZAREVUCKA, M.; WIMMEROVÁ, M. Synthesis of the (1*S*,2*S*)- and (1*R*,2*S*)-stereoisomers of the respective *E*- and *Z*-isomers of ethyl 4-[(2-hydroxycyclohexyl)methyl]phenoxy-3-methyl-2-butenolate using yeast whole cell bioreduction of the parent ketones. **Tetrahedron: Asymmetry**, v.16, p.2810-2815, 2005

XIAO, M.; HUANG, Y.; SHI, X.; GUO, Y. H. Bioreduction of phenylglyoxylic acid to R(-)-mandelic acid by *Saccharomyces cerevisiae* FD11b. **Enzyme and Microbial Technology**, v.37, p.589-596, 2005

YANG, S. D.; SHI, Y.; SUN, Z.H.; ZHAO, Y.; LIANG, Y. Asymmetric borane reduction of prochiral ketones using imidazolium-tagged sulfonamide catalyst. **Tetrahedron: Asymmetry**, v.17, p.1895-1900, 2006

YAMASHITA, M.; KANEKO, M.; IIDA, A.; TOKUDA, H.; NISHIMURA, K. Stereoselective synthesis and cytotoxicity of a cancer chemopreventive naphthoquinone from *Tabebuia avellanedae*. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v.17, p.6417-6420, 2007

YAMASHITA, M.; KANEKO, M.; TOKUDA, H.; NISHIMURA, K.; KUMEDA, Y.; IIDA, A. Synthesis and evaluation of bioactive naphthoquinones from the Brazilian medicinal plant, *Tabebuia avellanedae*. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v.17, p.6286-6291, 2009

ZHU, D.; MUKHERJEE, C.; HUA, L. 'Green' synthesis of important pharmaceutical building blocks: enzymatic access to enantiomerically pure α -chloroalcohols. **Tetrahedron Asymmetry**, v.16, p.3275-3278, 2005

Capítulo 8

Anexos

Candida tropicalis CE017: A New Brazilian Enzymatic Source for the Bioreduction of Aromatic Prochiral Ketones

Gizelle A. B. Vieira,^a Daniel M. de Freitas Araujo,^a Telma L. G. Lemos,^a
Marcos Carlos de Mattos,^{*a} Maria da Conceição F. de Oliveira,^a Vânia M. M. Melo,^a
Gonzalo de Gonzalo,^b Vicente Gotor-Fernández^b and Vicente Gotor^{*b}

^aDepartamento de Química Orgânica e Inorgânica, Universidade Federal do Ceará,
60451-970 Fortaleza-CE, Brazil

^bDepartamento de Química Orgânica e Inorgânica, Instituto Universitario de Biotecnología de
Asturias, Universidad de Oviedo, c/ Julián Clavería 8, 33006, Oviedo, Spain

A reatividade e estereosseletividade apresentadas por uma nova cepa de *Candida tropicalis* na redução de cetonas pró-quirais foram comparadas com cepas de microrganismos, estudadas em nosso laboratório, provenientes da biodiversidade brasileira. Neste caso, *Candida tropicalis* demonstrou-se como um agente redutor versátil e estereosseletivo na biorredução de uma série de cetonas aromáticas. Estes compostos pró-quirais foram convertidos aos correspondentes álcoois opticamente ativos com moderada a excelente estereopreferência dependendo da estrutura do substrato. Entre as cetonas utilizadas, as nitroacetofenonas foram enzimaticamente reduzidas aos correspondentes (*S*)-álcoois enantiopuros com completa conversão.

The reactivity and stereoselectivity showed by a new strain of *Candida tropicalis* in the reduction of prochiral ketones have been compared with the ones previously attained in our laboratory using microorganisms from the Brazilian biodiversity. In this manner, *Candida tropicalis* has demonstrated its versatility as stereoselective agent in the bioreduction of a series of aromatic ketones. These prochiral compounds were converted into their corresponding optically alcohols with moderate to excellent stereopreference depending on the substrate structure. Among ketones tested, nitroacetophenones were enzymatically reduced to enantiopure (*S*)-alcohol with complete conversion.

Keywords: alcohol dehydrogenases, biocatalysis, *Candida tropicalis*, ketones, yeast

Introduction

Chiral alcohols are an important class of organic substrates due to their properties as bioactive compounds and as starting materials for the synthesis of various biologically active materials.¹ For example, enantiopure 1-phenylethanol is a chiral building block used in the fine chemical and pharmaceutical industries as an ophthalmic preservative, a solvatochromic dye, an inhibitor of cholesterol intestinal absorption and a mild floral fragrance.² In the synthesis of enantiopure chiral secondary alcohols, prochiral ketones are commonly used as starting materials using stereoselective chemical transformations or biocatalytic methods. Asymmetric reduction by chemical

methods usually involves the use of expensive reagents or heavy metal catalysts.³ By contrast, biocatalysis applied to industrial processes has been shown as a very advantageous alternative to conventional chemical methods, and is widely used for the preparation of enantiomerically pure pharmaceuticals and other high added value compounds.⁴

Enzymatic reduction of carbonyl groups represents one of the most important reactions employed in the synthesis of chiral alcohols. Enzymes that can be used for this transformation are oxidoreductases, which require the presence of a coenzyme, such as NADH or NADPH, which transfers the hydride anion to the carbonyl compound, being formed NAD⁺ or NADP⁺. Whole cells of microorganisms can be also used in the enzymatic reduction of the carbonyl group. Each cell represents a small factory fully equipped for the reduction of the substrate bearing

*e-mail: mcdmatto@ufc.br; vgs@fq.uniovi.es

the carbonyl moiety. In order to find optimal conditions for the action of cell factories, the process designer has only to plan in which way the ketonic substrate should be added, and which medium should be used for the designed reaction. Nowadays, a wide variety of cultured cells from microorganisms or vegetables are available for enzyme-mediated reduction of carbonyl compounds.⁵

It is well known that the screening of a wide variety of microorganisms living in the environment is an efficient method to obtain the desired enzyme towards an unnatural substrate. Acetophenone has been used as a model substrate for the isolation of microorganisms having ketone reductase activity.⁶ Recently, a new strain of *Candida tropicalis* PBR-2 MTCC 5158 has been reported as an efficient reducing agent to acetophenone and its derivatives.⁷

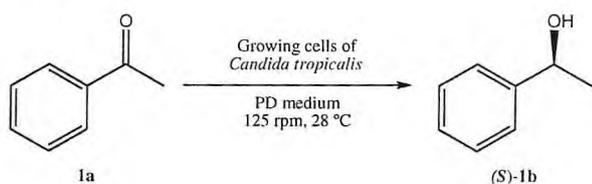
The use of microorganism new strains as biocatalysts may offer an alternative opportunity to investigate the local resources for the effective conduct of key synthetic transformations with significant economic and ecological implications.⁸

Our research interest is based on the development of chemoenzymatic methodologies to obtain chiral alcohols using Brazilian local sources of low cost. Herein, we report our current investigations in the study of the *Candida tropicalis* CE017 strain behavior as a novel stereoselective reducing agent of aromatic prochiral ketones to the corresponding chiral alcohols. The experimental results obtained will be compared to the one previously obtained by our research group using different Brazilian enzymatic sources.^{9,10}

Results and Discussion

Bioreduction of acetophenone using *C. tropicalis* CE017

Acetophenone **1a** was tested in the bioreduction using growing cells of the yeast as biocatalyst in a potato dextrose broth medium.



Scheme 1. Bioreduction of acetophenone **1a** by *C. tropicalis*.

Enzymatic reductions have been followed by analyzing the product **1b** formed after 1, 3, 6, 9, 12 and 15 days of reaction, being summarized the data in Table 1. (S)-1-phenylethanol **1b** was obtained with high optical

purities (97-99% *ee*) in all cases, observing the maximum conversion (62%, entry 4) after 9 days of reaction. Longer reaction times led to the formation of acetophenone due to an oxidizing activity showed by *Candida tropicalis*.

Table 1. Effect of incubation time on the reduction of acetophenone by *C. tropicalis* CE017 at 28 °C and pH 7.0

Entry	time / days	Conversion / (%) ^a	<i>ee</i> / (%) ^b
1	1	20	> 99 (S)
2	3	35	98 (S)
3	6	38	97 (S)
4	9	62	97 (S)
5	12	60	97 (S)
6	15	56	97 (S)

^aConversion was determined by GC. ^bDetermined by GC. By comparison with (S)- and (R)-1-phenylethanol standards was possible to verify that the major enantiomer formed in the enzymatic process possesses the S configuration.

In our efforts to improve the yield of (S)-1-phenylethanol **1b**, some other reaction parameters were analyzed as culture medium, pH, temperature and substrate concentration.

Culture medium

Acetophenone bioreductions were performed during 9 days, at 28 °C, using two different culture media to obtain whole cells of *C. tropicalis* CE017: (i) peptone 10 g L⁻¹, dextrose 20 g L⁻¹ pH 6.5,¹¹ and (ii) Czapeck: NaNO₃ (3 g L⁻¹), K₂HPO₄ (1.0 g L⁻¹), MgSO₄·7H₂O, KCl (0.5 g L⁻¹), FeSO₄ (0.01 g L⁻¹), dextrose (30 g L⁻¹), pH 8.5.¹² Additionally the bioreduction was performed adjusting the pH of both media to 5.5 with a sterile solution of tartaric acid 10%. The results obtained are listed in Table 2.

Table 2. Effect of culture medium on the bioreduction of acetophenone by *C. tropicalis* CE017

Entry	Culture medium	pH	Conversion / (%) ^a	<i>ee</i> / (%) ^a
1	Peptone/Dextrose	5.5	13	99 (S)
2	Peptone/Dextrose	6.5	13	99 (S)
3	Czapeck	8.5	11	99 (S)
4	Czapeck	5.5	12	99 (S)

^aConversion and enantiomeric excesses were determined by GC.

These results revealed that all the new culture media have similar effect in the enzymatic activity (11-13% conversion), allowing the recovery of (S)-1-phenylethanol in enantiomerically pure form. All these media led to notable lower isolated yields in comparison with potato dextrose medium (62% yield at pH 7.0).

pH Influence

Reactions were analyzed after 9 days using potato dextrose broth as culture medium in the following pHs: 4.0, 5.5, 7.0 and 8.0. The medium was adjusted to pH 8.0 and 7.0 with a sterile solution of NaOH 1.0 mol L⁻¹, and pH 4.0 was adjusted by using a sterilized 10% tartaric acid solution. The results were summarized in Table 3.

Table 3. Effect of pH on the bioreduction of acetophenone by *C. tropicalis* CE017

Entry	pH	Conversion / (%) ^a	ee / (%) ^a
1	4.0	50	98 (S)
2	5.5	60	98 (S)
3	7.0	62	98 (S)
4	8.0	42	98 (S)

^aConversion and enantiomeric excesses (*ee*) were determined by GC.

The optimal pH for this biocatalytic system varied from 5.5 to 7.0 (entries 2 and 3), observing a decrease of conversion when more acidic or basic media were employed (entries 1 and 4).

Temperature effect on *Candida tropicalis*

Reactions were performed using potato dextrose broth at higher temperatures (45 and 55 °C), as shown in Table 4.

Table 4. Effect of temperature on the bioreduction of acetophenone by *C. tropicalis* CE017

Entry	Temperature / (°C)	Days	Conversion / (%) ^a	ee / (%) ^a
1	45	3	16	97 (S)
2	45	9	51	97 (S)
3	55	9	14	68 (S)

^aConversion and enantiomeric excesses (*ee*) were determined by GC.

These results revealed that *C. tropicalis* does not present a good thermostability, as a decrease of the ketone reductase activity was observed by working at temperatures above 28 °C (entries 1 and 2), leading to a dramatic loss of yield and also of the enantiomeric excess especially over 45 °C (entry 3).

Quantity of substrate

Bioreduction reactions were performed during 9 days at 28 °C in potato dextrose broth using 6, 8, 10, 12, 14, 15, 20, 30 and 40 μL of acetophenone **1a** to obtain

(*S*)-1-phenylethanol in high to excellent enantiomeric excess (Table 5).

A slight improvement was observed in the conversion when less quantity of substrate (6-12 μL) was used, but in these conditions was observed a 85% *ee* in (*S*)-1-phenylethanol (entries 1-4). The conversion decreased when more quantity of substrate was used (entries 5-9), however higher concentrations of ketone led to better stereopreference values, being in this case 15-20 μL the appropriate quantity of ketone (entries 6-7).

Thus, a temperature of 28 °C, 9 days of reaction time, pH of 5.5, potato-dextrose broth as culture medium and 20 μL of acetophenone proved to be the optimum conditions to obtain (*S*)-1-phenylethanol (**1b**) in good yield (62%) and high enantiomeric excess (97% *ee*).

Table 5. Effect of the quantity of substrate on the bioreduction of acetophenone (**1a**) by *C. tropicalis* CE017

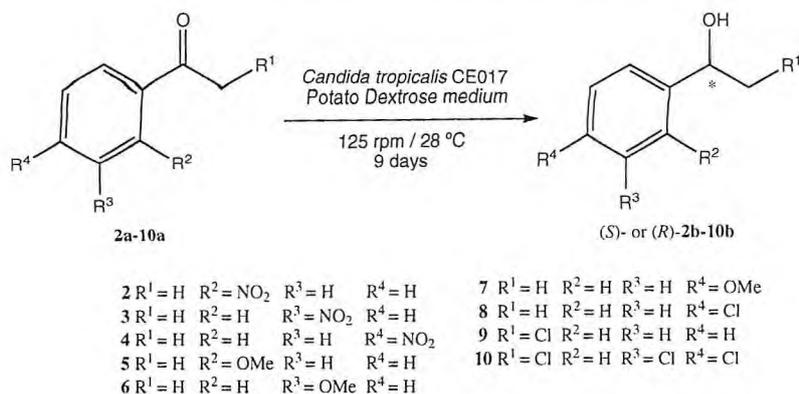
Entry	Quantity of 1a / μL	Conversion / (%) ^a	ee / (%) ^a
1	6	75	85
2	8	75	85
3	10	71	85
4	12	72	85
5	14	61	92
6	15	60	97
7	20	62	97
8	30	48	91
9	40	44	94

^aConversion and enantiomeric excesses (*ee*) were determined by GC.

Bioreduction of acetophenone derivatives

After these encouraging results, we decided to extend our studies toward the analysis of the bioreduction of substituted acetophenones. Thus, ketones **2a-10a** (Scheme 2) were reduced by growing cells of *C. tropicalis* CE017 using the optimal reaction conditions attained in the bioreduction of acetophenone. The results are summarized in Table 6.

The influence of an electron-donor (OMe) group and an electron-withdrawing (NO₂) group in *ortho*, *meta*- and *para*- position of the aromatic moiety was analyzed. Reduction of nitroacetophenones occurred with complete conversion yielding the corresponding alcohols (*S*)-**2b-4b** with excellent enantioselectivities (entries 1-3). The presence of the nitro group strongly increased the enzymatic activity when compared with acetophenone. Ketone **5a** having the methoxy group in the *ortho* position yielded the corresponding alcohol (*S*)-**5b** with moderate



Scheme 2. Bioreduction of prochiral aromatic ketones **2a-10a** using *C. tropicalis* CE017.

Table 6. *Candida tropicalis* CE017 biocatalyzed reduction of ketones **2a-10a** in potato-dextrose medium at 28 °C, 125 rpm and 9 days

Entry	Ketone	R ¹	R ²	R ³	R ⁴	Conversion / (%) ^a	ee / (%) ^a
1	2a	H	NO ₂	H	H	> 99	> 99 (S)
2	3a	H	H	NO ₂	H	> 99	> 99 (S)
3	4a	H	H	H	NO ₂	> 99	96 (S)
4	5a	H	OMe	H	H	51	56 (S)
5	6a	H	H	OMe	H	35	80 (S)
6	7a	H	H	H	OMe	7	9 (S)
7	8a	H	H	H	Cl	65	62 (S)
8	9a	Cl	H	H	H	12	89 (R)
9	10a	Cl	H	Cl	Cl	63	90 (R)

^aConversion and enantiomeric excesses (*ee*) were determined by HPLC or GC (see Experimental section). Absolute configuration of the optically alcohol in brackets.

conversion and selectivity (entry 4). When the methoxy group was located at *meta* position, the conversion was lower when compared with ketone **5a**, being achieved a higher selectivity (entry 5). A strongly decrease in the activity and selectivity was observed for the reduction of 4-methoxyacetophenone (entry 6). The presence of the methoxy group in the *para* position seemed to be worst for enzymatic activity and selectivity.

4-Chloroacetophenone **8a** yielded the (*S*)-**8b** with moderate conversion and selectivity (entry 7). The presence of the chlorine atom in the α -position to the carbonyl group produced a strong decrease in the product conversion with a good enantioselectivity, as shown in entry 8 for the preparation of alcohol (*S*)-**9b**, yielding in this case the (*R*)-alcohol due to CIP rules (entry 8).

Bioreduction of **10a**, compound presenting two chlorine atoms in the aromatic ring and one chlorine atom in the α -position to the carbonyl group, occurred with a similar conversion to acetophenone **8a** and a similar stereoselectivity compared to ketone **9a** (entry 9). Again, (*R*)-**10b** was obtained due to a change of priority in the CIP rules.

Our research group has been working to select several microorganisms from Brazilian biodiversity in order to perform selective bioreduction reactions using whole cells. We have found some interesting suppliers of alcohol dehydrogenases such *Lasiodiplodia theobromae*⁹ and *Lentinus strigellus*¹⁰ and now we can compare the results previously obtained in these manuscripts with *Candida tropicalis*. Each one is worth of attention due to their particularities. *Candida tropicalis* has not a good affinity for acetophenones bearing methoxy group moiety. Opposite, fungal cells of *L. theobromae* and *L. strigellus* catalyze the bioreduction of these methoxyacetophenones with higher enantioselectivities (87-99%). On the other hand, *L. theobromae* had poor selectivity for nitroacetophenones, **3a** (only 45% of *ee*) and **4a** (42% of *ee*). *Lentinus strigellus* had good enantioselectivities (98-99%) but moderate conversion of **2a** (48%), that could not be improved after longer reaction times. *Candida tropicalis* was the most successful among them to reduce nitroacetophenones with high to excellent conversion and enantioselectivity values. It must be emphasize that nitrocompounds are important building blocks in organic synthesis¹³ as well as precursors

of the corresponding amines after a reduction process.¹⁴ In addition, alcohol **6b** is a relevant compound in the synthesis of (*S*)-Rivastigmine¹⁵ and the alcohol **10b** can be used in the preparation of the pharmacological active Sertraline.¹⁶

In conclusion, all this family of chiral alcohols can be obtained by an enzymatic strategy, just selecting the best local microorganism in each specific case.

Conclusions

Growing cells of a new yeast strain, *C. tropicalis* CE017 in potato dextrose have been shown as an excellent and inexpensive biocatalyst for the introduction of chirality in bioreduction processes. When reducing substituted aromatic ketones, the presence of a nitro group in the aromatic moiety has a positive effect in the biocatalytic properties of *C. tropicalis* CE017, yielding the corresponding alcohols with complete conversion and *ee* > 95%. On the other hand, methoxyacetophenones seemed to be poorer substrates for this yeast. In all cases the biocatalyst has presented Prelog selectivity for the production of optically active alcohols. Comparison with two microorganisms previously studied in our group (*L. theobromae* and *L. strigellus*) revealed its particularities. In this case, *Candida tropicalis* was the most successful among them to reduce nitroacetophenones with great conversion and enantioselectivity. The evaluation of locally available microorganisms for a selection of standard organic chemical reactions of commercial significance could prove to be a very valuable economic endeavor. It may well offer new opportunities to expand the local resources as sustainable enzymatic systems where high-cost, unstable coenzymes are presently used.

Experimental

General

All reagents were purchased from Aldrich and used without further purification. Dry solvents were distilled over an adequate desiccant under nitrogen. *Flash* chromatographies were performed using silica gel 60 (230-240 mesh). High performance liquid chromatography (HPLC) analysis were carried out in a Hewlett Packard 1100 chromatograph UV detector at 210 nm using a Daicel Chiralcel OB-H, Chiralpak AS or Chiralpak IA column (25 cm × 4.6 mm I.D.) varying the conditions depending on the specific substrate, and using mixtures of hexane and 2-propanol (IPA). Gas chromatography (GC) analysis were performed on a Hewlett Packard 6890 Series II chromatograph equipped with a CP-Chiralsil DEX CB or a HP-1 column (30 m × 0.25 mm × 0.25 μm, 1.0 bar N₂) from

Varian for determining the optical purities. ¹H, ¹³C NMR, DEPT, and ¹H-¹³C heteronuclear experiments were obtained using AC-200 (¹H, 200.13 MHz and ¹³C, 50.3 MHz), AC-300 (¹H, 300.13 MHz and ¹³C, 75.5 MHz), DPX-300 (¹H, 300.13 MHz and ¹³C, 75.5 MHz) or AV-400 (¹H, 400.13 MHz and ¹³C, 100.6 MHz) Bruker spectrometers. The chemical shifts are given in delta (δ) values and the coupling constants (*J*) in Hertz (Hz). Optical rotations were performed in a Perkin-Elmer 241 polarimeter.

General procedure for preparation of racemic alcohols 1a-10a

To a solution of the corresponding ketone **1a-10a** (200 mg) in dry MeOH (4.0 mL) was slowly added sodium borohydride (4 equiv) at 0 °C under nitrogen atmosphere. The reaction was stirred at room temperature during 3 h and followed by TLC analysis (20% EtOAc/hexane) until complete disappearance of the starting ketone. Solvent was evaporated under reduced pressure and the resulting suspension was redissolved in H₂O and extracted with EtOAc (3 × 100 mL). Organic phases were combined and dried over anhydrous Na₂SO₄. After solvent distillation under reduced pressure, the resulting crude product was purified by flash chromatography [10% EtOAc/hexane for **1b** (88% yield) and **10b** (92% yield), 15% EtOAc/hexane for **5b** (74% yield), **6b** (86% yield), **7b** (96% yield), **8b** (83% yield), **9b** (90% yield) and 20% EtOAc/hexane for **2b** (97% yield), **3b** (95% yield), and **4b** (95% yield)].

Candida tropicalis strain CE017

The strain CE017 was previously isolated from an oil refinery wastewater located in Fortaleza city (Ceara state, Brazil) by enrichment cultivation.¹⁷ This strain was identified as *Candida tropicalis* according to micromorphological and biochemical characteristics.¹⁸ It is noteworthy that *C. tropicalis* CE017 showed a particular ability to degrade high phenol concentration and might be useful in bioremediation activities.¹⁷ This strain is deposited in the Culture Collection of the Microbial Ecology and Biotechnology Laboratory at Biology Department of the Federal University of Ceará, Brazil.

Culture conditions

For inoculums preparation, stock cultures were cultivated in potato broth (Potato 4 g L⁻¹, Dextrose 20 g L⁻¹, HIMEDIA) pH 5.5 for 24 h at 28 °C under shaking conditions (125 rpm). After this, the absorbance of the culture was adjusted with 0.15 mol L⁻¹ NaCl solution to

0.5 at 600 nm to obtain a suspension of 32×10^6 CFU mL⁻¹ determined by counting of colony forming units (CFU) on Potato Agar Plates. An aliquot of 1.0 mL of this suspension was inoculated in 250 mL Erlenmeyer flask containing 100 mL of Potato broth to produce biomass. When Peptone/Dextrose was used as medium the counting of CFU was 15×10^6 CFU mL⁻¹. In the case of Czapeck medium the CFU value was 57×10^3 CFU mL⁻¹.

Procedure for the bioreduction of acetophenone and its derivatives using Candida tropicalis

The growing cells of *C. tropicalis* CE017 were used for bioreduction reactions according literature procedure.¹⁹ Then, 20 mg of substrate were added into erlenmeyer flask and the reactions were shaken for 9 days of reaction. The content of each flask was saturated with sodium chloride, and then the aqueous phase was extracted with EtOAc (3 × 80 mL). The organic phase was dried over with Na₂SO₄ and then the solvent was evaporated under reduced pressure. The reaction crude was analyzed by the appropriate condition and purified by flash chromatography. All the bioreduction experiments were done in triplicate.

(S)-1-Phenylethanol, 1b

¹H NMR (CDCl₃, 300.13 MHz): δ 1.39 (d, *J* 6.5 Hz, 3H, H₂), 2.03 (s, 1H, OH), 4.77 (q, *J* 6.5 Hz, 1H, H₁), 7.25 (m, 5H, H₂ + H₃ + H₄ + H₅); ¹³C NMR (CDCl₃, 75.5 MHz): δ 25.3 (C₂); 70.5 (C₁), 125.5 (C₂ + C₆), 127.6 (C₄), 128.6 (C₃ + C₅), 146.0 (C₁). Conditions for determination of the conversion by HPLC: 0.8 mL min⁻¹, Hexane:IPA (95:5), 20 °C, *t*_R (1a) 5.8 min and *t*_R (1b) 8.4 min. Column Spherisorb. Conditions for determination of the *ee* by HPLC: 0.8 mL min⁻¹, hexane:IPA (95:5), 20 °C, *t*_R 10.2 (S) and *t*_R 15.4 (R) min. Column OB-H. [α]_D²⁵ = -47.0, *c* 1.1, CHCl₃, for 97% *ee* of (S)-enantiomer. lit.: [α]_D²² = -62.8 (*c* 1.0, CHCl₃), 98.5% *ee*.²⁰

(S)-1-(2-Nitrophenyl)ethanol, 2b

¹H NMR (CDCl₃, 300.13 MHz): δ 1.55 (3H, d, *J* 6.3 Hz, H₂), 5.40 (1H, q, *J* 6.3 Hz, H₁), 7.41 (1H, dt, *J* 8.1 and 1.2 Hz, H₄), 7.63 (1H, dt, *J* 8.1 and 1.5 Hz, H₅), 7.82 (1H, dd, *J* 8.1 and 1.2 Hz, H₆), 7.88 (1H, dd, *J* 8.1 and 1.5 Hz, H₃); ¹³C NMR (CDCl₃, 75.5 MHz): δ 24.2 (C₂), 65.4 (C₁), 124.2 (C₃), 127.5 (C₆), 128.0 (C₄), 133.5 (C₅), 140.9 (C₁ + C₂). Conditions for determination of the conversion by GC: Injector 225 °C, Detector 250 °C, 80 °C (5 °C min⁻¹) 180 °C (0 min), *t*_R (2a) 8.4 min and *t*_R (2b) 9.2 min. Column HP-1. Conditions for determination of the *ee* by HPLC: 0.8 mL min⁻¹, hexane:IPA (97:3), 20 °C, *t*_R 22.1 min (R) and

*t*_R 23.9 (S) min. Column AS. [α]_D²⁵ = +29.8, *c* 0.4, CHCl₃, for 99% *ee* of (S)-enantiomer.²¹

(S)-1-(3-Nitrophenyl)ethanol, 3b

¹H NMR (CDCl₃, 300.13 MHz): δ 1.47 (3H, d, *J* 6.6 Hz, H₂), 4.96 (1H, q, *J* 6.6 Hz, H₁), 7.47 (1H, t, *J* 7.8 Hz, H₅), 7.67 (1H, d, *J* 7.8 Hz, H₆), 8.04 (1H, ddd, *J* 8.3, 2.1 and 0.9 Hz, H₄), 8.18 (1H, t, *J* 1.8 Hz, H₂); ¹³C NMR (CDCl₃, 75.5 MHz): δ 25.2 (C₂), 69.1 (C₁), 120.2 (C₄), 122.1 (C₂), 129.3 (C₅), 131.6 (C₆), 147.8 (C₁), 148.1 (C₃). Conditions for determination of the conversion by GC: Injector 225 °C, Detector 250 °C, 80 °C (5 °C min⁻¹) 180 °C (0 min), *t*_R (3a) 9.5 min and *t*_R (3b) 11.4 min. Column HP-1. Conditions for determination of the *ee* by HPLC: 0.8 mL min⁻¹, hexane:IPA (90:10), 20 °C, *t*_R 12.8 min (S) and *t*_R 14.2 (R) min. Column OB-H. [α]_D²⁵ = -34.9, *c* 0.5 CH₂Cl₂, for 99% *ee* of (S)-enantiomer.²²

(S)-1-(4-Nitrophenyl)ethanol, 4b

¹H NMR (CDCl₃, 300.13 MHz): δ 1.50 (3H, d, *J* 6.6 Hz, H₂), 5.01 (1H, q, *J* 6.6 Hz, H₁), 7.53 (2H, d, *J* 8.7 Hz, H₂ + H₆), 8.17 (2H, d, *J* 8.7 Hz, H₃ + H₅); ¹³C NMR (CDCl₃, 75.5 MHz): δ 25.3 (C₂), 69.5 (C₁), 123.6 (C₂ + C₆), 126.0 (C₃ + C₅), 147.0 (C₁), 153.1 (C₄). Conditions for determination of the conversion by GC: Injector 225 °C, Detector 250 °C, 80 °C (5 °C min⁻¹) 180 °C (0 min), *t*_R (4a) 9.6 min and *t*_R (4b) 11.8 min. Column HP-1. Conditions for determination of the *ee* by HPLC: 0.8 mL min⁻¹, hexane:IPA (95:5), 20 °C, *t*_R 11.7 min (R) and *t*_R 12.8 (S) min. Column AS. [α]_D²⁵ = -24.6, *c* 0.5, CHCl₃, for 96% *ee* of (S)-enantiomer.²³

(S)-1-(2-Methoxyphenyl)ethanol, 5b

¹H NMR (CDCl₃, 300.13 MHz): δ 1.52 (3H, d, *J* 6.6 Hz, H₂), 3.88 (3H, s, OCH₃), 5.11 (1H, q, *J* 6.6 Hz, H₁), 6.90 (1H, dd, *J* 7.5 and 1.5 Hz, H₃), 6.98 (1H, dt, *J* 8.5 and 1.5 Hz, H₅), 7.29 (1H, dt, *J* 8.5 and 1.5 Hz, H₆), 7.36 (1H, dd, *J* 7.5 and 1.5 Hz, H₄); ¹³C NMR (CDCl₃, 75.5 MHz): δ 22.8 (C₂), 55.2 (OCH₃), 66.3 (C₁), 110.3 (C₃), 120.7 (C₅), 126.0 (C₆), 128.2 (C₄), 133.4 (C₁), 156.4 (C₂). Conditions for determination of the conversion by HPLC: 0.8 mL min⁻¹, hexane:IPA (95:5), 20 °C, *t*_R (5a) 6.3 min and *t*_R (5b) 7.1 min. Column Spherisorb. Conditions for determination of the *ee* by HPLC: 0.8 mL min⁻¹, hexane:IPA (95:5), 20 °C, *t*_R 10.3 (S) and *t*_R 16.8 (R) min. Column OB-H. [α]_D²⁵ = -4.5, *c* 0.4, CH₂Cl₂, for 56% *ee* of (S)-enantiomer.²⁴

(S)-1-(3-Methoxyphenyl)ethanol, 6b

¹H NMR (CDCl₃, 300.13 MHz): δ 1.47 (3H, d, *J* 6.6 Hz, H₂), 3.81 (3H, s, OCH₃), 4.83 (1H, q, *J* 6.6 Hz, H₁), 6.81 (1H, dd, *J* 8.5 and 1.2 Hz, H₆), 6.93 (2H, m, H₂ + H₄),

7.26 (1H, t, *J* 8.5 Hz, H₅); ¹³C NMR (CDCl₃, 75.5 MHz): δ 25.0 (C₂), 55.1 (OCH₃), 70.0 (C₁), 110.8 (C₂), 112.7 (C₄), 117.6 (C₆), 129.3 (C₅), 147.6 (C₁), 159.6 (C₃). Conditions for determination of the conversion by HPLC: 0.8 mL min⁻¹, hexane:IPA (95:5), 20 °C, *t*_R (6a) 5.1 min and *t*_R (6b) 5.9 min. Column Spherisorb. Conditions for determination of the *ee* by HPLC: 0.8 mL min⁻¹, hexane:IPA (95:5), 20 °C, *t*_R 20.1 min (*S*) and *t*_R 29.5 min (*R*). Column OB-H. [α]_D²⁵ = -21.6, c 0.34, MeOH, for 80% *ee* of (*S*)-enantiomer.²⁵

(S)-1-(4-Methoxyphenyl)ethanol, 7b

¹H NMR (CDCl₃, 300.13 MHz): δ 1.48 (3H, d, *J* 6.3 Hz, H₂), 3.82 (3H, s, OCH₃), 4.84 (1H, q, *J* 6.3 Hz, H₁), 6.88 (2H, d, *J* 8.7 Hz, H₃ + H₅), 7.30 (2H, d, *J* 8.7 Hz, H₂ + H₆); ¹³C NMR (CDCl₃, 75.5 MHz): δ 24.3 (C₂), 55.2 (OMe), 69.8 (C₁), 126.6 (C₂ + C₆), 113.8 (C₃ + C₅), 137.9 (C₁), 158.9 (C₄). Conditions for determination of the conversion by HPLC: 0.8 mL min⁻¹, Hexane:IPA (95:5), 20 °C, *t*_R (7a) 7.3 min and *t*_R (7b) 8.5 min. Column Spherisorb. Conditions for determination of the *ee* by HPLC: 0.8 mL min⁻¹; hexane:IPA (95:5); 20 °C, *t*_R 13.4 min (*S*) and *t*_R 18.7 min (*R*). Column OB-H. [α]_D²⁵ = -2.2, c 0.5, CH₂Cl₂, for 9% *ee* of (*S*)-enantiomer.²⁴

(S)-1-(4-Chlorophenyl)ethanol, 8b

¹H NMR (CDCl₃, 300.13 MHz): δ 1.45 (1H, d, *J* 6.5 Hz, H₁), 4.87 (q, *J* 6.5 Hz, H₂), 7.30 (m, 4H, H₂ + H₃ + H₅ + H₆); ¹³C NMR (CDCl₃, 75.5 MHz): δ 25.1 (C₂), 69.6 (C₁), 126.7 (C₂), 128.5 (C₃), 132.9 (C₄), 144.1 (C₁). Conditions for determination of the conversion by GC: Injector 225 °C, Detector 250 °C, 90 °C (3 °C min⁻¹) 105 °C (5 °C min⁻¹) 120 °C (20 °C min⁻¹) 200 °C (0 min), *t*_R (8a) 5.0 min and *t*_R (8b) 5.6 min. Column HP-1. Conditions for determination of the *ee* by HPLC: 0.8 mL min⁻¹, hexane:IPA (95:5), 20 °C, *t*_R 7. min (*S*) and *t*_R 8.5 min (*R*). Column OB-H. [α]_D²⁵ = -32.4, CH₂Cl₂, c 0.5, for 62% *ee* of (*S*)-enantiomer.²⁴

(R)-2-Chlorophenylethan-1-ol, 9b

¹H NMR (CDCl₃, 300.13 MHz): δ 3.56 (1H, dd, *J* 11.4 and 3.3 Hz, H₂), 3.66 (1H, dd, *J* 11.4 and 8.7 Hz, H₂), 4.81 (1H, dd, *J* 8.7 and 3.6 Hz, H₁), 7.30 (5H, m, H₂ + H₃ + H₄ + H₅ + H₆); ¹³C NMR (CDCl₃, 75.5 MHz): δ 50.8 (C₂), 74.0 (C₁), 126.0 (C₂ + C₆), 128.4 and 128.6 (C₃ + C₅), 139.9 (C₁). Conditions for determination of the conversion by GC: Injector 225 °C, Detector 250 °C, 90 °C (3 °C min⁻¹) 105 °C (5 °C min⁻¹) 120 (20 °C min⁻¹) 200 °C (0 min), *t*_R (9a) 4.1 min and *t*_R (9b) 4.3 min. Column HP-1. Conditions for determination of the *ee* by HPLC: 0.8 mL min⁻¹, hexane:IPA (95:5), 20 °C, *t*_R 13.2 (*R*) and *t*_R 17.2 (*S*) min. Column OB-H. [α]_D²⁵ = -18.8, c 0.26, CH₂Cl₂, for 89% *ee* of (*R*)-enantiomer.²⁶

(R)-2-Chloro-1-(3,4-dichlorophenyl)ethan-1-ol, 10b²⁷

¹H NMR (CDCl₃, 300.13 MHz): δ 3.59 (1H, dd, *J* 11.4, and 8.7 Hz, H₂), 3.72 (1H, dd, *J* 11.4 and 3.6 Hz, H₂), 4.87 (1H, dd, *J* 8.7 and 3.6 Hz, H₁), 7.21 (1H, dd, *J* 8.4 and 1.8 Hz, H₆), 7.43 (1H, d, *J* 8.4 Hz, H₅), 7.51 (1H, d, *J* 1.8 Hz, H₂); ¹³C NMR (CDCl₃, 75.5 MHz): δ 50.4 (C₂), 72.8 (C₁), 125.4 (C₆), 128.1 (C₂), 130.6 (C₅), 132.4 (C₄), 132.8 (C₃), 140.0 (C₁). Conditions for determination of the conversion by GC: Injector 225 °C, Detector 250 °C, 80 °C (5 °C min⁻¹) 180 °C (0 min); *t*_R (10a) 13.6 and *t*_R (10b) 14.8 min. Column HP-1. Conditions for determination of the *ee* by HPLC: 0.8 mL min⁻¹, hexane:IPA (95:5), 20 °C, *t*_R 13.0 min (*S*) and *t*_R 14.9 (*R*) min. Column IA. [α]_D²⁵ = -13.3, c 0.5, CHCl₃, for 90% *ee* of (*R*)-enantiomer.²⁸

Supplementary Information

Supplementary data for **1b-10b** alcohols are available free of charge at <http://jbcbs.sqb.org.br>, as a PDF file.

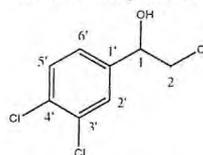
Acknowledgments

The authors thank to the Brazilian and Spanish agencies CAPES-DGU (Process: 149/07), CNPq, FUNCAP, PRONEX, Ministerio de Ciencia e Innovación (MICINN, Project CTQ 2007-61126) for fellowships and financial support. G. de G. and V. G.-F. thank MICINN for personal grants (Juan de la Cierva and Ramon y Cajal program, respectively).

References

- Kurbanoglu, E. B.; Zilbeyaz, K.; Kurbanoglu, N. I.; Kilic, H.; *Tetrahedron: Asymmetry* **2007**, *18*, 2332.
- Costa, L. F. A.; Lemos, F.; Ribeiro, F. R.; Cabral, J. M. S.; *Catal. Today* **2008**, *133-135*, 625.
- Andersson, P. G.; Munslow, I. J.; *Modern Reduction Methods*, Wiley: Weinheim, 2008.
- Daußmann, T.; Rosen, T. C.; Dünkelmann, P.; *Eng. Life Sci.* **2006**, *6*, 125; Matsuda, T.; Yamanaka, R.; Nakamura, K.; *Tetrahedron: Asymmetry* **2009**, *20*, 513.
- Jurcek, O.; Wimmerová, M.; Wimmer, Z.; *Coord. Chem. Rev.* **2008**, *252*, 767; Borges, K. B.; Borges, W. S.; Durán-Patrón, R.; Pupo, M. T.; Bonato, P. S.; Collado, I. G.; *Tetrahedron: Asymmetry* **2009**, *20*, 385.
- Patel, R. N.; *Stereoselective Biocatalysis*, Marcel Dekker: New York, 2000.
- Banerjee, C.; Soni, P.; *Biotechnol. J.* **2006**, *1*, 80.
- Liria, C. W.; Romagna, C. D.; Rodovalho, N. N.; Marana, S. R.; Miranda, M. T. M.; *J. Braz. Chem. Soc.* **2008**, *19*, 1574; Zanotto, S. P.; Romano, I. P.; Lisboa, L. U. S.; Duviosin Jr., S.;

- Martins, M. K.; Lima, F. A.; Silva, S. F.; Albuquerque, P. M.; *J. Braz. Chem. Soc.* **2009**, *20*, 1046.
9. Barros-Filho, B. A.; Nunes, F. M.; Oliveira, M. C. F.; Lemos, T. L. G.; Mattos, M. C.; de Gonzalo, G.; Gotor-Fernández, V.; Gotor, V.; *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, doi:10.1016/j.molcatb.2010.01.023.
10. Barros-Filho, B. A.; Oliveira, M. C. F.; Lemos, T. L. G.; Mattos, M. C.; de Gonzalo, G.; Gotor-Fernández, V.; Gotor, V.; *Tetrahedron: Asymmetry* **2009**, *20*, 1057.
11. Andrade, L. H.; Keppler, A. F.; Schoenlein-Crusius, I. H.; Porto, A. L. M.; Comasseto, J. V.; *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2004**, *31*, 129.
12. Almeida, A. C. S.; Araújo, L. A.; Costa, A. M.; Abreu, C. A. M.; Lima, M. A. G. A.; Palha, M. L. A. P. F.; *Eletron. J. Biotechnol.* **2005**, *8*, 55.
13. Silverman, R. B.; *The Organic Chemistry of Drug Design and Drug Action*. Academic Press: San Diego, 1992; Barret, G. M.; Graboski, G. G.; *Chem. Rev.* **1986**, *86*, 751.
14. Trost, B. M.; Fleming, I.; *Comprehensive Organic Synthesis*, Pergamon Press: New York, 1991, vol. 8; Ram, S.; Ehrenkauffer, R. E.; *Tetrahedron Lett.* **1984**, *25*, 3415; Yuste, F.; Saldana, M.; Walls, F.; *Tetrahedron Lett.* **1982**, *23*, 147.
15. Mangas-Sánchez, J.; Rodríguez-Mata, M.; Busto, E.; Gotor-Fernández, V.; Gotor, V.; *J. Org. Chem.* **2009**, *15*, 5304.
16. Barbieri, C.; Bossi, L.; D'arrigo, P.; Fantoni, G. P.; Servi, S.; *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2001**, *11*, 415.
17. Rocha, L. L.; Cordeiro, R. A.; Cavalcante, R. M.; Nascimento, R. F.; Martins, S. C. S.; Santaella, S. T.; Melo, V. M. M.; *Mycopathologia* **2007**, *164*, 183.
18. de Hoog, G. S.; Guarro, J.; Gene, J.; Figueras, M. J.; *Atlas of Clinical Fungi*, 2nd ed., Réus: Centraalbureau voor Schimmelcultures/Universitat Rovira i Virgili: Spain, 2000.
19. Andrade, L. H.; Comasseto, J. V.; Rodrigues, D. F.; Pellizari, V. H.; Porto, A. L. M.; *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2005**, *33*, 73.
20. Csajági, C.; Szatzker, G.; Toke, E. R.; Ürge, L.; Darvas, F.; Poppe, L.; *Tetrahedron: Asymmetry* **2008**, *19*, 237.
21. Seror, S.; Collin, J.; Fiaud, J. C.; Zouioueche, L. A.; *J. Mol. Catal. A: Chem.* **2006**, *256*, 85.
22. Ma, Y.; Liu, H.; Chen, L.; Zhu, J.; Deng, J.; *Org. Lett.* **2003**, *5*, 2103.
23. Yang, S. D.; Shi, Y.; Sun, Z. H.; Zhao, Y.; Liang, Y.; *Tetrahedron: Asymmetry* **2006**, *17*, 1895.
24. Du, D.; Fang, T.; Xu, J.; Zhang, S.; *Org. Lett.* **2006**, *8*, 1327.
25. Morris, D. J.; Hayes, A. M.; Wills, M.; *J. Org. Chem.* **2006**, *71*, 7035.
26. Tanis, S. P.; Evans, B. R.; Nieman, J. A.; Parker, T. T.; Taylor, W. D.; Heasley, S. E.; Herrington, P. M.; Perrault, W. R.; Hohler, R. A.; Dolak, L. A.; Hester, M. R.; Seest, E. P.; *Tetrahedron: Asymmetry* **2006**, *17*, 2154.
27. Alcohol **10b** is given as example of the numerical locants used for NMR assignment:



28. Zhu, D.; Mukherjee, C.; Hua, L.; *Tetrahedron: Asymmetry* **2005**, *16*, 3275.

Received: December 18, 2009

Web Release Date: April 15, 2010



Chemoenzymatic preparation of a biologically active naphthoquinone from *Tabebuia impetiginosa* using lipases or alcohol dehydrogenases

Daniel M. de Freitas Araujo^a, Gizelle A.B. Vieira^a, Marcos Carlos de Mattos^{a,*}, Telma L.G. Lemos^a, Maria da Conceição F. de Oliveira^a, Vânia M.M. Melo^a, Gonzalo de Gonzalo^b, Vicente Gotor-Fernández^b, Vicente Gotor^{b,**}

^a Departamento de Química Orgânica e Inorgânica, Laboratório de Biotecnologia e Síntese Orgânica (LABS), Laboratório de Biotransformações e Produtos Naturais (LBPN), Laboratório de Ecologia Microbiana e Biotecnologia (LemBiotech), Universidade Federal do Ceará, 60451-970 Fortaleza, Ceará, Brazil

^b Departamento de Química Orgânica e Inorgânica, Instituto Universitario de Biotecnología de Asturias, Universidad de Oviedo, c/ Julián Clavería 8, 33006 Oviedo, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 9 June 2009

Received in revised form 7 August 2009

Accepted 12 August 2009

Available online 19 August 2009

Keywords:

Alcohol dehydrogenases

Lipases

Quinones

Tabebuia impetiginosa

ABSTRACT

Cancer chemopreventive agent (*S*)-5-hydroxy-2-(1-hydroxyethyl)naphtho[2,3-*b*]furan-4,9-dione and its counterpart (*R*)-acetate have been obtained through a lipase-catalyzed transesterification process in organic solvent. *Candida antarctica* lipase B and *Pseudomonas cepacia* lipase have demonstrated their potential as excellent biocatalysts for the production of enantiomerically pure compounds under mild reaction conditions. At the same time different commercially available alcohol dehydrogenases have been tested in the bioreduction of the corresponding naphthoquinone in an aqueous system. Biologically active (*S*)-alcohol has been isolated in enantiopure form with different conversion values depending on the biocatalyst employed and the reaction conditions.

© 2009 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Tabebuia impetiginosa, also known as *Tabebuia avellanadae* Lorentz ex Griseb, or popularly called Pau d'arco, is a tree from the Bignoniaceae family distributed from northern of Mexico to northern of Argentina. It has been used with medicinal purposes for centuries and for example its inner bark has been employed in the treatment of pain, arthritis, inflammation of the prostate gland, fever, dysentery, boils, ulcers and a wide range of cancers [1], being nowadays commercialized as tablets, dried bark tea or tincture.

The isolation of secondary metabolites of this specie has been previously reported [2], identifying 5-hydroxy-2-(1-hydroxyethyl)naphtho[2,3-*b*]furan-4,9-dione (**1**) as an antitumor-active substance [3]. However as far as we now there are just a couple of examples describing the production of optically active (*S*)-5-hydroxy-2-(1-hydroxyethyl)naphtho[2,3-*b*]furan-4,9-dione (**1**), based on a preparative HPLC resolution [3] and alternatively a catalytic chemical approach relying on an asymmetric transfer hydrogenation process using a chiral ruthenium catalyst complex [4] (Fig. 1).

Nowadays biocatalysis is certainly considered as a useful tool for the preparation of optically active compounds. Along the last decades many strategies have been developed for the production of interesting intermediates for the fine chemical and pharmaceutical industry [5]. Lipases and oxidoreductases are by far the biocatalysts most widely employed in asymmetric biotransformations because of their versatility and simple work-up [6]. For this reason, in our ongoing project we have paid attention to the production of optically active naphthoquinones with applications in medicinal chemistry and herein we wish to report the chemoenzymatic synthesis of the cancer chemopreventive alcohol (*S*)-**1**, based on the use of biocatalyzed processes for the development of the stereoselective transformation. Lipases and alcohol dehydrogenases (ADHs), a class of oxidoreductases, have been tested in organic solvents or aqueous systems, respectively, for the preparation of 5-hydroxy-2-(1-hydroxyethyl)-naphtho[2,3-*b*]furan-4,9-dione (**1**) in enantiopure form.

2. Experimental

2.1. Materials and methods

Candida antarctica lipase type B (CAL-B, Novozyme 435, 7300 PLU/g) was a gift from Novo Nordisk Co. *Pseudomonas cepacia* lipase PSL-C I (1638 U/g) was acquired from Sigma–Aldrich. Alcohol dehydrogenases and glucose dehydrogenase were purchased

* Corresponding author. Tel.: +55 8533669369; fax: +55 8533669782.

** Corresponding author. Tel.: +34 985103448; fax: +34 985103448.

E-mail addresses: mcdmatt@ufc.br (M.C. de Mattos), vgs@fq.uiovi.es (V. Gotor).

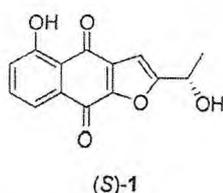


Fig. 1. Structure of antitumoral drug (S)-5-hydroxy-2-(1-hydroxyethyl)naphtho[2,3-b]furan-4,9-dione.

from Codexis. All other reagents were purchased from Acros Organics, Aldrich or Lancaster and used without further purification. Solvents were distilled over an adequate desiccant under nitrogen. Flash chromatographies were performed using silica gel 60 (230–240 mesh). Melting points were taken on samples in open capillary tubes and are uncorrected. IR spectra were recorded on using NaCl plates or KBr pellets in a Perkin-Elmer 1720-X FT. ^1H , ^{13}C NMR and DEPT were obtained using AC-300 (^1H , 300.13 MHz and ^{13}C , 75.5 MHz) or DPX-300 (^1H , 300.13 MHz and ^{13}C , 75.5 MHz) Bruker spectrometers. The chemical shifts are given in delta (δ) values and the coupling constants (J) in Hertz (Hz). HP1100 chromatograph mass detector was used to record mass spectra experiments (MS) through ESI⁺ experiments and HRMS spectra data were acquired on a Shimadzu LCMS-IT-TOF (225-07100-34): electrospray quadrupole ion trap-time of flight mass spectrometer. Measurement of the optical rotation was done in a Perkin-Elmer 241 polarimeter.

High performance liquid chromatography (HPLC) analyses were carried out in a Hewlett Packard 1100 chromatograph UV detector at 210 nm using a Daicel Chiralcel OD (25 cm \times 4.6 mm I.D.) varying the conditions depending on the specific substrate. For lipase-mediated acetylation reactions a Chiralcel OD column was used, employing a mixture of hexane/2-propanol (90:10) as eluent and a flow of 0.8 mL/min at 20 °C. Retention times are detailed: (a) acetate **8**: 23.2 for the (S)-enantiomer and 24.8 min for the (R)-enantiomer; (b) alcohol **1**: 29.3 for the (R)-enantiomer and 47.9 for the (S)-enantiomer. To analyze bioreduction reactions we used the same Chiralcel OD column but with an eluent composed by a mixture of hexane/2-propanol (85:15) and a 0.8 mL/min flow at 20 °C, obtaining the following retention times: (a) alcohol **1** 19.7 min for the (R)-enantiomer and 30.1 min for the (S)-enantiomer; (b) ketone **7** appeared at 41.3 min.

Gas chromatography (GC) analyses were performed on a Hewlett Packard 6890 Series II chromatograph equipped with a HP-1 column (30 m \times 0.25 mm \times 0.25 μm , 1.0 bar N_2) from Varian for the following of the reaction time courses: 150 °C (hold 5 min) 3 °C/min 210 °C (hold 10 min). Retention times were: (a) ketone 20.3 min; (b) alcohol 23.5 min; (c) acetate 25.8 min.

2.2. Preparation of 5-hydroxynaphthoquinone (**3**)

A solution of 1,5-dihydroxynaphthalene (1 g, 6.24 mmol) in a mixture of acetonitrile–water (2:1, v/v, 60 mL) was added dropwise PIFA (5.4 g, 12.48 mmol) in acetonitrile–water (2:1, v/v, 60 mL) under cooling 0 °C. The solution was stirred for 2 h, then the solvent was evaporated under reduced pressure and the resulting suspension was redissolved in H_2O and extracted with EtOAc (3 \times 200 mL). The organic layers were combined, dried over Na_2SO_4 and the solvent evaporated under reduced pressure. Reaction crude was finally purified by flash chromatography (50% CH_2Cl_2 /hexane), yielding 5-hydroxynaphthoquinone as a yellow solid (58%). R_f (1/1 hexane/ CH_2Cl_2): 0.42; Mp = 129–131 °C; IR (KBr): ν 3406, 3056, 2921, 1642, 1592, 1451, 1353, 1288, 1223, 1150, 1080, 839, 748 cm^{-1} ; ^1H NMR (CDCl_3 , 300 MHz) δ : 6.95 (2H, s), 7.29 (1H, dd, $J_{\text{HH}} = 1.89$ and 7.70 Hz), 7.61–7.67 (2H, m), 11.90 (1H, s); ^{13}C NMR

(CDCl_3 , 75.5 MHz) δ : 115.0, 119.1, 124.5, 131.8, 136.5, 138.6, 139.6, 161.5, 184.2, 190.3; MS (ESI⁺, m/z): 175 [(M+H)⁺, 100%], 174 (M⁺, 18%).

2.3. Preparation of 2-(dimethylamino)-5-hydroxynaphthoquinone (**4**)

A solution of the naphthoquinone **3** (510 mg, 2.93 mmol) in toluene (30 mL) was bubbled gas of dimethylamine (10 min) under cooling –55 °C. The reaction was stirred at room temperature during 1 h until complete consumption of the starting material, and then the solvent was evaporated under reduced pressure. Reaction crude was purified by flash chromatography (100% CH_2Cl_2), yielding quinone **4** as a red solid (71%). R_f (CH_2Cl_2): 0.46; Mp = 144–146 °C; IR (KBr): ν 3485, 3068, 2930, 1671, 1618, 1565, 1471, 1408, 1348, 1278, 1233, 1153, 1049, 926, 860, 765 cm^{-1} ; ^1H NMR (CDCl_3 , 300.13 MHz) δ : 3.22 (6H, s), 5.66 (1H, s), 7.15 (1H, dd, $J_{\text{HH}} = 2.3$ and 7.2 Hz), 7.39–7.46 (2H, m), 12.93 (1H, s); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 75.5 MHz) δ : 42.7, 105.1, 114.6, 118.8, 124.3, 132.5, 133.7, 152.9, 160.3, 182.8, 187.9; MS (ESI⁺, m/z): 218 [(M+H)⁺, 100%].

2.4. Preparation of 2,5-dihydroxy-1,4-naphthalenedione (**5**)

A solution of **4** (391 mg, 1.79 mmol) in HCl 3N (2 mL) under reflux was stirred during 1 h until complete consumption of the starting material. The suspension was extracted with CH_2Cl_2 (3 \times 30 mL) and the solvent was evaporated under reduced pressure yielding compound **5** as an orange solid (95%). R_f (4/1 CH_2Cl_2 /MeOH): 0.45; Mp = 216–219 °C (decomp.); IR (KBr): ν 3907, 3565, 3080, 2914, 2607, 1659, 1609, 1567, 1464, 1392, 1339, 1266, 1214, 1159, 1086, 1049, 846, 785, 703 cm^{-1} ; ^1H NMR (CDCl_3 , 300.13 MHz) δ : 6.30 (1H, s), 7.26 (1H, s), 7.33 (1H, dd, $J_{\text{HH}} = 1.2$ and 8.4 Hz), 7.58 (1H, t, $J_{\text{HH}} = 7.8$ Hz), 7.69 (1H, dd, $J_{\text{HH}} = 1.0$ and 7.3 Hz), 12.32 (1H, s); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 75.5 MHz) δ : 111.5, 116.5, 120.1, 126.5, 132.2, 134.7, 155.8, 161.7, 182.3, 192.3; MS (ESI⁺, m/z): 191 [(M+H)⁺, 100%], 190 (M⁺, 14%).

2.5. Preparation of 2-acetyl-2,3,4,9-tetrahydronaphtho[2,3-b]furan-4,9-dione (**6**)

To a stirred solution of but-3-en-2-one (210 μL , 2.5 mmol) in pentane (2 mL) was added bromine (134 μL , 2.6 mmol) at –15 °C. After being stirred for 20 min the reaction was quenched evaporating pentane under reduced pressure. To a solution of 2,5-dihydroxy-1,4-naphthalenedione (100 mg, 0.53 mmol) in THF (5 mL) was added DBU (550 μL , 3.6 mmol) and stirred for 20 min at 0 °C, then the crude 3,4-dibromo-2-butanone was added into the solution under nitrogen atmosphere. The resulting red solution was stirred at room temperature for 2 h. DBU (75 μL , 0.49 mmol) was added again and stirring was continued for 4 h. The reaction was quenched by addition of an aqueous solution of ammonium chloride (5 mL) and the product was extracted with CH_2Cl_2 (3 \times 5 mL) then the solvent was evaporated under reduced pressure. Corresponding naphthoquinone **6** was isolated after flash chromatography (20% hexane/ CH_2Cl_2) as a yellow solid (28%) and also naphthodihydrofuran **7** (37%). Data for compound **6** are R_f (92/8 CH_2Cl_2 /EtOAc): 0.36; Mp = 141–143 °C; IR (KBr): ν 3381, 2920, 1717, 1677, 1634, 1450, 1352, 1276, 1223, 1153, 1070, 1036, 874, 764 cm^{-1} ; ^1H NMR (CDCl_3 , 300.13 MHz) δ : 2.41 (3H, s), 3.40 (2H, d, $J_{\text{HH}} = 9.7$ Hz), 5.29 (1H, t, $J_{\text{HH}} = 9.5$ Hz), 7.27 (1H, dd, $J_{\text{HH}} = 0.9$ and 8.1 Hz), 7.57 (1H, t, $J_{\text{HH}} = 7.9$ Hz), 7.65 (1H, dd, $J_{\text{HH}} = 1.0$ and 7.3 Hz), 12.10 (1H, s); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 75.5 MHz) δ : 26.5, 29.5, 87.4, 114.7, 119.7, 123.5, 125.9, 131.7, 135.4, 159.9, 161.3, 176.4, 187.5, 204.2; MS (ESI⁺, m/z): 259 [(M+H)⁺, 100%].

Table 1Stereoselective bioreduction of ketone **7** at 30 °C and 140 rpm during 24 h (1 U of enzyme per 5 mg of substrate).

Entry	ADH	ee _P (%) ^a	c (%) ^b	Config. alcohol 1
1	T	>99	7.5	S
2	LB	>99	4	R
3	CP	>99	<3	S
4	PR2	–	<3	–
5	RS1	>99	16	S
6	A	>99	10	S

^a Enantiomeric excesses of the optically active alcohol were determined by chiral HPLC.^b Conversion values were calculated by gas chromatography.

2.6. Preparation of 2-acetyl-4,9-dihydronaphtho [2,3-b]furan-4,9-dione (**7**)

A stirred solution of **6** (158 mg, 0.61 mmol) in CH₂Cl₂ (10 mL) was heated with MnO₂ (534 mg, 6.1 mmol) at reflux for 24 h. The mixture was filtered through a pad of celite and the filtrate was concentrated in vacuum. The residue was purified by silica chromatography using as eluent (4/1 CH₂Cl₂/hexane), affording ketone **7** (60%) as yellow crystals. *R_f* (92/8 CH₂Cl₂/EtOAc): 0.72; Mp = 229–231 °C; IR (KBr): ν 3368, 3098, 2920, 2110, 1668, 1642, 1567, 1446, 1350, 1291, 1236, 1196, 1070, 1027, 868, 834, 754 cm⁻¹; ¹H NMR (CDCl₃, 300.13 MHz) δ: 2.66 (3H, s), 7.34 (1H, dd, *J*_{HH} = 1.1 and 7.4 Hz), 7.60 (1H, s), 7.67 (1H, t, *J*_{HH} = 8.0 Hz), 7.82 (1H, dd, *J*_{HH} = 1.1 and 7.4 Hz), 12.1 (1H, s); ¹³C NMR (DMSO, 75.5 MHz) δ: 26.7, 111.8, 118.3, 120.4, 125.9, 128.6, 129.7, 136.6, 151.9, 154.5, 161.1, 169.9, 170.6, 202.3; MS (ESI⁺, *m/z*): 257 [(M+H)⁺, 17%], 149 [(M–C₆H₄O₂)⁺, 100%].

2.7. Typical procedures for the bioreduction of ketone **7** depending on the ADH used in the enzymatic process (see Tables 1 and 2)

2.7.1. ADH T

In an Eppendorf tube were added 2.5 μL (1 U) of enzyme, 5 mg of **7** (0.0194 mmol, 19.4 mM) and 700 μL of TRIS–HCl 0.1 M buffer of pH 7.0. Then 100 μL of a NADP⁺ 10 mM solution were added as cofactor and 200 μL of 2-propanol for cofactor regeneration. Reaction was shaken at 140 rpm and 30 °C, and after 24 h the reaction was extracted with EtOAc (3 × 400 μL) and dried over Na₂SO₄.

2.7.2. ADH LB

In an Eppendorf tube were added 1 μL (1 U) of enzyme, 5 mg of **7** (0.0194 mmol, 19.4 mM) and 600 μL of TRIS–HCl 0.1 M buffer of pH 7.0 and 100 μL MgCl₂ 10 mM. Then 100 μL of a NADP⁺ 10 mM solution were added as cofactor and 200 μL of 2-propanol for cofactor regeneration. Reaction was shaken at 140 rpm and 30 °C, and after 24 h the reaction was extracted with (3 × 400 μL) and dried over Na₂SO₄.

2.7.3. ADH CP

In an Eppendorf tube were added 3 μL (1 U) of enzyme, 5 mg of **7** (0.0194 mmol, 19.4 mM) and 700 μL of TRIS–HCl 0.1 M buffer of pH 7.0. Then 100 μL of a NADP⁺ 10 mM solution were added as cofactor and 200 μL of 2-propanol for cofactor regeneration. Reaction was shaken at 140 rpm and 30 °C, and after 24 h the reaction was extracted with (3 × 400 μL) and dried over Na₂SO₄.

2.7.4. ADH PR2

In an Eppendorf tube were added 7.7 mg (1 U) of enzyme, 5 mg of **7** (0.0194 mmol, 17.6 mM) and 800 μL of a phosphate buffer 0.1 M pH 7.5. Then 100 μL of a NADP⁺ 10 mM solution were added as cofactor and 200 μL of 2-propanol for cofactor regeneration.

Table 2Stereoselective bioreduction of ketone **7** at 30 °C and 140 rpm.

Entry	ADH	Enzyme (U) ^a	t (h)	ee _P (%) ^b	c (%) ^c	Config. alcohol 1
1	LB	1	96	>99	9	R
2	RS1	1	96	>99	33	S
3	A	4	48	>99	92	S
4	A	4	96	>99	94	S

^a Units of enzyme per 5 mg of substrate.^b Enantiomeric excesses of the optically active alcohol were determined by chiral HPLC.^c Conversion values were calculated by gas chromatography.

Reaction was shaken at 140 rpm and 30 °C, and after 24 h the reaction was extracted with EtOAc (3 × 400 μL) and dried over Na₂SO₄.

2.7.5. ADH RS1

In an Eppendorf tube were added 3.6 μL (1 U) of enzyme, 5 mg of **7** (0.0194 mmol, 17.6 mM), 10 mg of glucose (0.0555 mmol, 0.05 mM) and 1 mL of TRIS–HCl 0.1 M buffer of pH 7.0. Then 100 μL of a NADP⁺ 10 mM solution were added as cofactor and 2 μL (1 U) of glucose dehydrogenase for cofactor regeneration. Reaction was shaken at 140 rpm and 30 °C, and after 24 h the reaction was extracted with EtOAc (3 × 400 μL) and dried over Na₂SO₄.

2.7.6. ADH A

In an Eppendorf tube were added 2 mg (4 U) of enzyme, 5 mg of **7** (0.0194 mmol, 16.2 mM) and 900 μL of TRIS–HCl 0.1 M buffer of pH 7.0. Then 100 μL of a NADP⁺ 10 mM solution were added as cofactor and 200 μL of 2-propanol for cofactor regeneration. Reaction was shaken at 140 rpm and 30 °C, and after 24 h the reaction was extracted with EtOAc (3 × 400 μL) and dried over Na₂SO₄.

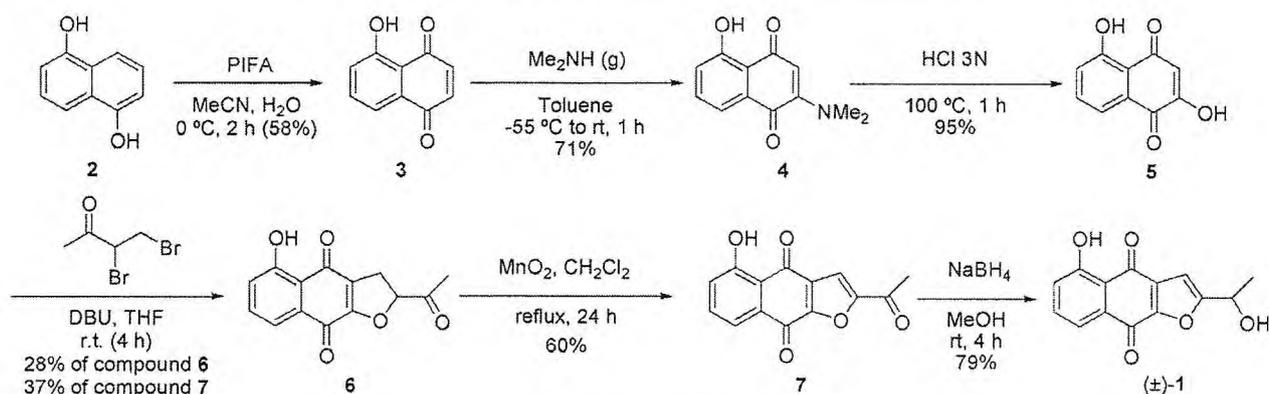
2.8. Preparation of racemic

5-hydroxy-2-(1-hydroxyethyl)-naphtho[2,3-b]furan-4,9-dione (**1**)

To a solution of ketone **7** (134 mg, 0.52 mmol) in dry MeOH (5 mL) under nitrogen atmosphere, NaBH₄ (39 mg, 1 mmol) was added at 0 °C. The mixture was left to warm until room temperature and stirred for 1 h. Hydride excess was destroyed carefully adding HCl aqueous 1N (2 mL) and MeOH was then evaporated. The mixture was extracted with EtOAc (3 × 2 mL). The organic layers were combined, dried over Na₂SO₄ and the solvent was evaporated under reduced pressure. The reaction crude was purified by flash chromatography (80% CH₂Cl₂/hexane) affording racemic alcohol **1** as a yellow solid (79%). *R_f* (92% CH₂Cl₂/EtOAc): 0.32; Mp = 167–169 °C; IR (KBr): ν 3387, 2914, 2847, 1736, 1636, 1530, 1444, 1371, 1303, 1214, 1153, 1064, 1024, 938, 862, 825, 753, 700 cm⁻¹; ¹H NMR (CDCl₃, 300.13 MHz) δ: 1.57 (3H, d, *J*_{HH} = 6.9 Hz), 2.94 (1H, s), 4.92 (1H, q, *J*_{HH} = 6.6 Hz), 5.26 (1H, s), 6.77 (1H, s), 7.20 (1H, dd, *J*_{HH} = 1.2 and 8.4 Hz), 7.55 (1H, t, *J*_{HH} = 7.8 Hz), 7.67 (1H, dd, *J*_{HH} = 0.9 and 7.5 Hz); ¹³C NMR (CDCl₃, 75.5 MHz) δ: 21.1, 63.1, 103.1, 115.0, 119.9, 125.1, 131.1, 132.6, 136.2, 151.7, 161.9, 166.4, 172.8, 186.4; HRMS (ESI) *m/z* calcd for C₁₄H₉O₅ (M–H)⁻: 257.0450. Found 257.0462. [α]_D²⁰ = –23.4 (c = 0.58, MeOH) for >99% ee.

2.9. Preparation of 1-(5-hydroxy-4,9-dioxo-4,9-dihydronaphtho [2,3-b]furan-2-yl) ethyl acetate (**8**)

Over a solution under nitrogen atmosphere of alcohol (±)-**1** (26 mg, 0.10 mmol) in dry CH₂Cl₂ (1.0 mL), Et₃N (20.8 μL, 0.15 mmol), DMAP (3.7 mg, 0.03 mmol) and Ac₂O (14.2 μL, 0.15 mmol) were successively added. The reaction was stirred at room temperature during 2 h, until complete consumption of the starting material was observed by TLC analysis (80%



Scheme 1. Chemical synthesis of racemic alcohol 1.

Table 3

Lipase-catalyzed acetylation of (\pm)-1 using vinyl acetate and THF at 30 °C and 250 rpm obtaining the (*S*)-alcohol 1 and the (*R*)-acetate 8.

Entry	Lipase	t (h)	ee _S (%) ^a	ee _P (%) ^a	c (%) ^b	E ^c
1	CAL-B	1	92.5	>99	48	>200
2	CAL-B	2	>99 (42)	>99 (43)	50	>200
3	PSL-C I	1	72	>99	42	>200
4	PSL-C I	2	94.5	>99	49	>200
5	PSL-C I	3	>99 (45)	>99 (44)	50	>200

^a Enantiomeric excesses were determined by chiral HPLC and isolated yields in brackets.

^b $c = [ee_S / (ee_S + ee_P)]$.

^c $E = \ln[(1-c) \times (1-ee_S)] / \ln[(1-c) \times (1+ee_S)]$ [12].

CH₂Cl₂/hexane). The solvent was then evaporated under reduced pressure affording a crude that was finally purified by flash chromatography (80% CH₂Cl₂/hexane), yielding (\pm)-8 as a yellow solid (52%). *R_f* (80% CH₂Cl₂/hexane): 0.42; Mp 135–137 °C; IR (KBr): ν 3395, 3117, 2920, 1743, 1671, 1640, 1541, 1450, 1374, 1309, 1222, 1159, 1065, 1032, 935, 829, 755, 703 cm⁻¹; ¹H NMR (CDCl₃, 300.13 MHz) δ : 1.69 (3H, d, *J*_{HH} = 6.9 Hz), 2.13 (3H, s), 6.04 (1H, q, *J*_{HH} = 6.6 Hz), 6.88 (1H, s), 7.28 (1H, dd, *J*_{HH} = 0.6 and 8.4 Hz), 7.63 (1H, t, *J*_{HH} = 7.9 Hz), 7.77 (1H, dd, *J*_{HH} = 1.2 and 7.4 Hz), 12.1 (1H, s); ¹³C NMR (CDCl₃, 75.5 MHz) δ : 18.5, 20.9, 64.8, 105.4, 115.2, 120.0, 125.3, 130.8, 132.7, 136.3, 152.3, 161.0, 162.3, 169.8, 172.6, 186.3; HRMS (ESI) *m/z* calcd for C₁₆H₁₃O₆ (M+H)⁺: 301.0712. Found 301.0990. Calcd for C₁₆H₁₂O₆Na (M+Na)⁺: 323.0532. Found 323.0527. [α]_D²⁰ = +134.4 (*c* = 0.58, CH₂Cl₂) for >99% ee.

2.10. Typical procedure for the enzymatic kinetic resolution of racemic alcohol 1

To a solution of alcohol (\pm)-8 (25 mg, 0.10 mmol) in dry THF (1.0 mL) was added the corresponding enzyme (CAL-B or PSL-C I, ratio 1:1 in weight respect to the alcohol), vinyl acetate (17.2 μ L, 0.20 mmol) was added and the reaction was shaken at 30 °C and 250 rpm. Aliquots were regularly analyzed by HPLC until conversion value reached around 50%, then the reaction was stopped, the enzyme filtered and the solvent was evaporated under reduced pressure. The reaction crude was finally purified by flash chromatography (eluent gradient 80% CH₂Cl₂/hexane and then 92% CH₂Cl₂/EtOAc) affording the corresponding optically active (*R*)-8 and (*S*)-1. See Table 3.

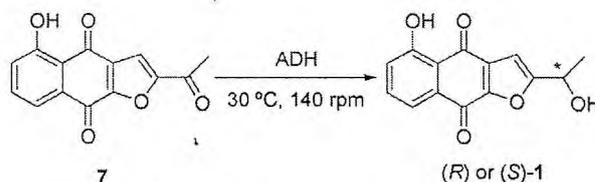
3. Results and discussion

Initially we carried out the synthesis of the naphthofuran 7 starting from commercially available 1,5-dihydroxynaphthalene

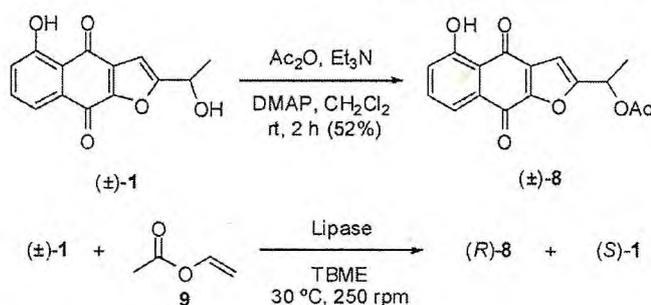
2, following in most of the cases adapting procedures already described in the literature. Thus, the chemoselective oxidation of 2 using bis(trifluoroacetoxy)iodobenzene in a system acetonitrile–water [7] led to the quinone 3 in moderate yield (Scheme 1) [8]. Dimethylamine gaseous was bubbled over a solution of 5-hydroxynaphthoquinone in toluene at –55 °C leading to 4 in 71% isolated yield [9]. Hydrolysis of 4 using an aqueous solution of HCl at 100 °C allowed the isolation of 5 in almost quantitative yield. Then the synthesis of 7 was performed in a similar manner than Hagiwara et al. described [10]. Reaction of 5 with 3,4-dibromobutan-2-one generated *in situ* from but-3-en-2-one and bromine, led in the presence of 8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-ene (DBU) to a mixture of furans 6 and 7. It must be highlighted the importance to perform the reaction in short reaction times as longer periods led to decomposition products as major compounds in the reaction crude. Then the recovered compound 6 was selectively oxidized to 7 using MnO₂ and CH₂Cl₂ as solvent, obtaining the desired ketone in moderate yield, due to the fact that conversion was low, recovering a high amount of the starting material. Final chemical reduction employing sodium borohydride led to the isolation of racemic alcohol (\pm)-1 in high yield.

In order to obtain enantiopure alcohol 1, several bioreduction processes were carried out using different commercially available ADHs (Scheme 2). In all the reactions 1 unit (U) of biocatalyst was employed for 5 mg (0.02 mmol) of starting ketone 7. Final data for the stereoselective reduction of ketone 7 when working at optimal conditions for each enzyme (see Section 2) are summarized in Table 1.

Low or moderate activities were found for the different ADHs, yielding alcohol 1 in enantiopure form in all cases except for ADH PR2, which led to the racemic alcohol (entry 4). From all the enzymes tested, ADH RS1 (entry 5) and ADH A (entry 6) showed the highest activity values, reaching 16 and 10% conversion value, respectively, after 24 h when the processes were carried out at 30 °C and 140 rpm. As expected, the (*S*)-enantiomer of alcohol 1 was achieved for the four Prelog ADHs [11] (entries 1, 3, 5 and 6) while an opposite stereopreference was observed for ADH LB, unique oxi-



Scheme 2. Bioreduction of 7 using ADH in aqueous systems.



Scheme 3. Synthesis of racemic acetate **8** and lipase-catalyzed transesterification processes of alcohol **1**.

doreductase that allowed the recovery of the alcohol (*R*)-**1** as shown in entry 2.

From this starting point, ADHs A, RS1 and LB were selected for further optimization in order to obtain higher conversion values, studying the effect of longer reaction times or more units of enzyme in the bioreduction process (Table 2). A slight increase in the conversion values was observed, yielding again in all cases the enantiopure (*R*)- or (*S*)-alcohol **1**. Thus, comparing the conversion values reached by ADH LB and ADH RS1 at 24 h (entries 2 and 5 of Table 1) with the results obtained after 4 days of reaction (entries 1 and 2 of Table 2), it can be observed that higher conversion of alcohol was obtained although far from an optimal synthetic point of view (maximum obtained 33% for ADH RS1). Oxidoreductases require redox cofactors in their mechanism action, being this issue and the corresponding cofactor recycling of crucial importance for the economy of the enzymatic process. Taking advantage of the easier and less expensive cofactor recycling system used by ADH A (isopropanol in a coupled-substrate method) versus ADH RS1 (glucose dehydrogenase in a coupled-enzyme method), we decided next to optimize the bioreduction of the ketone **7** using ADH A. Thus, we increased the amount of enzyme from 1 unit (entry 6 of Table 1) to 4 units and the reaction time was raised in additional 24 h (entry 3 of Table 2), leading to a 92% conversion in the enantiopure (*S*)-alcohol **1**. Unfortunately, much longer reaction times had almost no influence in the conversion value, as shown in entry 4 after 96 h.

Once that the bioreduction of ketone **7** was extensively studied and optimized in the production of enantiopure alcohol (*S*)-**1**, we decided to move forward and explore the lipase-catalyzed acetylation of the racemic alcohol **1** (Scheme 3). Lipase-mediated kinetic acylations allow the recovery of both enantiomers of the alcohol, one as the starting material and the other as the acylated product. This fact presents a remarkable importance for the pharmaceutical industry because both isomers of a racemate often display opposite therapeutic effects.

For all these reasons, first of all, the racemic acetate **8** was chemically prepared, and reliable chiral HPLC conditions were developed for the separation of alcohol (\pm)-**1** and acetate (\pm)-**8** enantiomers, in order to follow the reaction time courses (see Section 2). Enzymatic processes were carried out using two equivalents of vinyl acetate (**9**) and *Candida antarctica* lipase B (CAL-B) or *Pseudomonas cepacia* lipase (PSL-C I) as biocatalysts. All the experimental data have been summarized in Table 3. Reactions were performed at 30 °C observing that both lipases showed a complete stereopreference for the acetylation of the (*R*)-isomer although a higher reaction rate was observed for CAL-B (entries 1 and 2) rather than PSL-C I (entries 3–5). In this manner 50% conversion values were reached at 2 h for CAL-B and 3 h for PSL-C I. Acetate (*R*)-**8** and alcohol (*S*)-**1** were both isolated in enantiopure form with very high isolated yields (42–45%) after *flash* chromatography.

Assignments of the absolute configuration for the (*S*)-alcohol **1** and (*R*)-acetate **8** were tentatively done considering that the substituents size of the chiral center for alcohol **1** can be accepted in the Kazlauskas' rule model [13]. That was confirmed by comparison of the optical rotation value for the alcohol isolated after the lipase-catalyzed process $\{[\alpha]_D^{20} = -23.4 (c = 0.58, \text{MeOH})\}$ with the one previously reported in the literature for the (*S*)-alcohol $\{[\alpha]_D^{20} = -22.7 (c = 0.58, \text{MeOH})\}$ [4].

4. Conclusions

In summary, we have chemoenzymatically prepared the antitumoral agent (*S*)-5-hydroxy-2-(1-hydroxyethyl)naphtho[2,3-*b*]furan-4,9-dione based on an enzymatic process using lipases or oxidoreductases for the production of optically active compounds. The use of both class of enzymes led to the chiral alcohol **1** in enantiopure form. The optimization of the reaction conditions for the biocatalyzed reduction of ketone **7** employing different ADHs has allowed us to obtain the (*S*)-alcohol with an excellent conversion. The biocatalyzed acetylation of the synthesized racemic alcohol (\pm)-**1** by two well known lipases led to the recovery in high isolated yields of the (*S*)-alcohol and the corresponding (*R*)-acetate with high enantioselectivities and conversions close to 50%. This new synthetic strategy avoids the use of transition metal catalysts as source of chirality.

Acknowledgements

We thank Novo Nordisk Co. for the generous gift of the CAL-B (Novozyme 435). This work was supported by the Spanish Ministerio de Ciencia e Innovación (MICINN, Project CTQ 2007-61126). G.de G. and V.G.-F. thank MICINN for personal grants (Juan de la Cierva and Ramon y Cajal program respectively). The authors thank to the Brazilian and Spanish agencies CNPq, FUNCAP, PRONEX, CAPES-DGU (Process: 149/07) for fellowships and financial support. We thank LEMANOR-UFC (Laboratório de Espectrometria de Massa do Nordeste) for HRMS data.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at doi:10.1016/j.molcatb.2009.08.006.

References

- F.G.G. de Miranda, J.C. Vilar, I.A.N. Alves, S.C.H. Cavalcanti, A.R. Antonioli, *BMC Pharmacol.* 1 (2001) (Article 6).
- M.M. Rao, D.G.I. Kingston, *J. Nat. Prod.* 45 (1982) 600–604.
- Y. Fujimoto, T. Eguchi, C. Murasaki, Y. Ohashi, K. Kakinuma, H. Takagaki, M. Abe, K. Inazawa, K. Yamazaki, N. Ikekawa, O. Yoshikawa, T. Ikekawa, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* (1991) 2323–2327.
- M. Yamashita, M. Kaneko, A. Iida, H. Tokuda, K. Nishimura, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 17 (2007) 6417–6420.
- (a) M. Breuer, K. Ditrich, T. Habicher, B. Hauer, M. Kessler, R. Stuermer, T. Zelinski, *Angew. Chem. Int. Ed.* 43 (2004) 788–824; (b) J.M. Woodley, *Trends Biotechnol.* 26 (2008) 321–327.
- (a) U.T. Bornscheuer, R.J. Kazlauskas, *Hydrolases in Organic Synthesis: Regio- and Stereoselective Biotransformations*, 2nd ed., Wiley-VCH, Weinheim, 2006; (b) R.N. Patel, *Coord. Chem. Rev.* 252 (2008) 659–701; (c) V. Gotor, I. Alfonso, E. García-Urdiales, *Asymmetric Organic Synthesis with Enzymes*, Wiley, Weinheim, 2008.
- R. Barret, M. Daudon, *Tetrahedron Lett.* 31 (1990) 4871–4872.
- 5-Hydroxynaphthoquinone (**3**) is also available in different commercial sources although it is more expensive than 1,5-dihydroxynaphthalene (**2**).
- L. Chaker, F. Pauter, H. Fillion, *Chem. Pharm. Bull.* 42 (1994) 2238–2240.
- H. Hagiwara, K. Sato, D. Nishino, T. Hoshi, T. Suzuki, M. Ando, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* (2001) 2946–2957.
- V. Prelog, *Pure Appl. Chem.* 9 (1964) 119–130.
- C.S. Chen, Y. Fujimoto, G. Girdaukas, *C. J. Sih, J. Am. Chem. Soc.* 104 (1982) 7294–7299.
- R.J. Kazlauskas, A.N.E. Weissfloch, A.T. Rappaport, L.A. Cuccia, *J. Org. Chem.* 56 (1991) 2656–2665.