



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS FÍSICAS E MATEMÁTICAS
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

Tese de Doutorado

**UTILIZAÇÃO DE ENZIMAS E MICRORGANISMOS
PARA A OBTENÇÃO DE COMPOSTOS OTICAMENTE
ATIVOS**

**Doutoranda: Sandra Patricia Zanotto
Orientadora: Dra. Maria da Graça Nascimento
Co-orientador: Dr. Paulo J. S. Moran**

Florianópolis - julho de 2003

À minha mãe Izair, por seu amor incondicional.

Ao meu afilhado Lucas, por me despertar.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a vida por ser maravilhosa.

À minha família: Pai, Mãe, Dani, Fabrício (Manão) e Luquinhas, obrigada por estarem em minha vida sempre me apoiando com amor, carinho, atenção e força. Vocês estão em meu coração

À minha orientadora Prof.^a Maria da Graça Nascimento, pela orientação dedicada neste trabalho e pelas oportunidades que me proporcionou, e em especial pela sua valiosa amizade. Minha imensa gratidão, respeito e carinho. Obrigada!

Ao Prof. Paulo J. S. Moran do Instituto de Química da UNICAMP pela co-orientação neste trabalho e acolhimento em seu laboratório, e aos seus orientandos pela ajuda.

Ao Prof. Marcus M. Sá e Luciano Fernandes, pelas sínteses dos produtos das reações de Baylis-Hillman, e valiosas contribuições.

Aos amigos do grupo de Biocatálise, pelos anos de trabalho, conversas, brincadeiras e verdadeiras amizades conquistadas, sendo muito mais que um simples ambiente de trabalho. Em especial à Sílvia, pela grande contribuição neste trabalho.

À minha querida amiga Soninha, por sua compreensão e amizade em todos os momentos.

Ao Prof. João Valdir Comasseto e Carlos Eduardo Costa, do IQ-USP, pelo interesse neste trabalho e nos estudos de biocatálise na química de Se e Te.

Aos secretários da pós-graduação, Graça e Jadir, por serem sempre tão prestativos e atenciosos, e pela grande amizade.

Aos professores, que além de transmitir seus conhecimentos, transmitiram a sua experiência, em especial ao Prof. Dino Zanette, Prof. Faruk Nome, Prof. Eduardo Humeres, Prof. Luiz Madureira, Prof.^a Marina Uieara, Prof. Miguel Caro, Prof.^a Maria da Graça Nascimento, Prof. Marcus M. Sá, Prof. Nito Debacher, Prof. Ricardo J. Nunes, Prof.^a Sonia Probst e Prof. Valdir Soldi. Meu carinho e gratidão!

Ao Prof. Boris U. Stambuk do Departamento de Bioquímica da UFSC, pela contribuição nos estudos da influência de açúcares no fermento de pão.

Aos grandes amigos que tiveram presença marcada nos bons momentos e também nos mais difíceis durante todos estes anos. Vocês com certeza estarão sempre no meu coração.

Aos professores, por terem gentilmente aceitado fazerem parte da banca examinadora deste trabalho. Exprimo aqui o meu reconhecimento.

Agradeço ao Departamento de Química e a Pós Graduação em Química da UFSC, pela oportunidade de realização deste trabalho.

Ao CNPq pelo suporte financeiro.

SUMÁRIO

SUMÁRIO.....	v
LISTA DE FIGURAS	viii
LISTA DE TABELAS	x
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xi
RESUMO.....	xii
ABSTRACT	xiv
1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Considerações Gerais	1
1.2 Enzimas	3
1.3 Vantagens e Desvantagens da Biocatálise.....	5
1.4 Diferentes Sistemas de Biotransformação.....	7
1.5 Imobilização de Biocatalisadores.....	9
1.5.1 Montemorilonita K10 e Poli (óxido de etileno) (PEO) como Suportes para Biocatalisadores.....	12
1.6 Parâmetros Quantitativos para a Determinação da Enantiosseletividade de Reações Biocatalisadas.....	14
1.7 Métodos Analíticos para a Determinação da Pureza Enantiomérica	17
1.7.1 Métodos Polarimétricos.....	18
1.7.2 Cromatografia Gasosa	19
1.8 Lipases	20
1.8.1 Lipases como Biocatalisadores em Meio Orgânico.....	25
1.9 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> em Síntese Orgânica.....	31
1.4.1 Influência da Adição de Açúcares em Reações de Redução por Fermento de Pão.	34
2.JUSTIFICATIVA	37
3.OBJETIVOS	39
3.1 Objetivo Geral.....	39
3.2 Objetivos Específicos.....	39
4.PARTE EXPERIMENTAL.....	41
4.1 Materiais	41

4.1.1	Reagentes Utilizados na Biotransformação com <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (FP).....	41
4.1.2	Reagentes Utilizado na Biotransformação com Lipase de <i>Pseudomonas sp</i>	41
4.2	Caracterização dos Compostos.....	43
4.2.1	Purificação e Identificação dos Produtos	43
4.2.2	Caracterizações Espectroscópicas (R,S)-3-Hidroxi-2-Metilenobutanoate de Metila (10).....	44
4.2.3	Caracterizações Espectroscópicas (R,S)-3-Hidroxi-2-Metilenohexanoato de Metila (11).....	45
4.2.4	Preparação e Caracterização Espectroscópicas do (R,S)-3-Hidroxi-2-Metileno-3-(2-Naftil)-Propanoato de Metila (12).....	45
4.2.5	Caracterizações Espectroscópicas (R,S)-3-Acetoxi-2-Metilenobutanoato de Metila (13).....	45
4.2.6	Caracterizações Espectroscópicas (R,S)-3-Acetoxi-2-Metilenohexanoato de Metila (14).....	46
4.3	Procedimentos de Proteção da Célula de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> para Utilização em Reações de Redução em Meio Orgânico.....	46
4.3.1	Procedimento Geral para a Adsorção e Recobrimento do FP	46
4.3.2	Procedimento Geral para a Reação de Redução do Acetoacetato de Etila	46
4.3.3	Procedimento para a Reutilização do Biocatalisador na Reação de Redução do Acetoacetato de Etila	47
4.4	Procedimento Geral para a Reação de Redução da α -Cloroacetofenona	47
4.4.1	Procedimento para a Reutilização do Biocatalisador na Reação de Redução da α -Cloroacetofenona	48
4.5	Procedimento Geral para Reações de Redução Enantiosseletiva de Diferentes Cetonas	48
4.6	Procedimento para as Reações Controle	49
4.7	Procedimentos para a Resolução Biocatalítica de α -Metileno- β -Hidroxi Ésteres – Produtos de Baylis Hillman	49

4.7.1 Imobilização da PS em Filme de Poli-oxi-etileno (PEO).....	49
4.7.2 Imobilização da PS em Sílica e K10.....	50
4.7.3 Procedimento Geral para Resolução Biocatalítica	50
4.7.4 Procedimento para Reutilização do Biocatalisador na Resolução Biocatalítica do (R,S)3-Hidroxi-2-Metilenobutanoato de Metila (10).....	50
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	52
5.1 Metodologias de Proteção das Células de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ..	52
5.1.1 Redução Enantiosseletiva do Acetoacetato de Etila Mediada por Fermento de Pão: Padronização das Metodologias de Imobilização.....	52
5.1.2 Redução Enantiosseletiva da α -Cloroacetofenona Mediada por Fermento de Pão	60
5.1.3 Redução Enantiosseletiva de Acetofenonas Mediada por Fermento de Pão.....	62
5.2 Influência da Adição de Sacarose e Trealose nas Reções de Redução Enantiosseletiva do Acetoacetato de Etila e α -Cloroacetofenona	65
5.2.1 Redução do Acetoacetato de Etila por Fermento de Pão (FP)	65
5.2.2 Redução da α -Cloroacetofenona por Fermento de Pão (FP).....	68
5.3 Resolução Biocatalítica dos Produtos das Reações de Baylis-Hillman ..	72
6 CONCLUSÕES	80
7. PERSPECTIVAS.....	84
8. REFERÊNCIAS BIBLOGRÁFICAS	85
9. ANEXOS.....	98

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Métodos de imobilização de enzimas.(Adaptado da ref. 11).....	10
Figura 2. Estrutura da montmorilonita.....	13
Figura 3. Comportamento catalítico das esterases e lipases.....	21
Figura 4. Representação esquemática da estrutura tridimensional da lipase de <i>Pseudomonas cepacia</i> (PcL). ⁵⁴	22
Figura 5. Representação esquemática do mecanismo de uma reação de transesterificação catalisada por lipase de <i>Humicola lanuginosa</i>	23
Figura 6. Resolução enzimática do ácido (\pm) cis- β -hidroxipicolínico (1).....	24
Figura 7. Resolução enzimática do 4-pentenol-2.....	24
Figura 8. Influência do solvente na resolução do acetato enólico catalisada por lipase de <i>Pseudomonas fluorescens</i>	27
Figura 9. Reação geral de Baylis-Hillman.....	27
Figura 10. Resolução biocatalítica de α -metileno- β -hidroxiésteres e cetonas..	28
Figura 11. Reações de hidrólise enantiosseletivas de acetatos racêmicos, produtos de reações de Baylis-Hillman, com PLAP.....	29
Figura 12. Reações de hidrólise enantiosseletivas de acetatos racêmicos, produtos de reações de Baylis-Hillman, com PLAP.....	29
Figura 13. Resolução Ótica dos Produtos de Baylis-Hillman por Transesterificação Enzimática.....	30
Figura 14. Resolução Ótica dos Produtos de Baylis-Hillman por Hidrólise Enzimática.....	30
Figura 15. Redução com fermento de β -oxo-ésteres em solvente orgânico....	33
Figura 16. Estrutura da trealose.....	35
Figura 17. Resoluções biocatalíticas, de α -metileno- β -hidroxi ésteres com lipase de <i>Pseudomonas sp</i> livre e imobilizada.....	42
Figura 18. Redução biocatalítica do acetoacetato de etila.....	52
Figura 19. Porcentagem de conversão (%c) do acetoacetato de etila em (S)-(+)-3-hidroxibutanoato de etila mediada por FP em diferentes sistemas de imobilização e em função do número de reutilizações, em hexano a 20°C.....	55

Figura 20. Porcentagem de conversão (%c) do acetoacetato de etila em (S)-(+)-3-hidroxi-butanoato de etila, mediada por FP, em diferentes sistemas de imobilização e em função do número de reutilizações, em hexano a 30 °C.....	57
Figura 21. Redução biocatalítica da α -cloroacetofenona.....	60
Figura 22. Estruturas das acetofenonas.....	62
Figura 23. Reação de biotransformação de diferentes acetofenonas, utilizando o FP como biocatalisador.....	63
Figura 24. Cromatograma obtido por CG de uma alíquota da reação de redução da p-nitroacetofenona com o sistema FP/K10/G/S, sobreposto com o reagente (padrão) utilizado para a reação. (20 ^o C e 30 dias).....	64
Figura 25. Reação de redução enantiosseletiva do acetoacetato de etila, com diferentes sistemas.....	65
Figura 26. Cromatograma obtido por CG de: (A) acetoacetato de etila; (B) álcool racêmico e (C) alíquota da reação de redução biocatalítica com o sistema FP/S à 20 ^o C, 24h. (ee=99% e %c=100%).....	66
Figura 27. Reação de redução enantiosseletiva da α -cloroacetofenona.....	68
Figura 28. Cromatograma obtido por CG para a alíquota da reação de redução da α -cloroacetofenona (A) com o sistema FP/T à 20 ^o C e 48h. O produto (C) da biotransformação está sobreposto com o padrão racêmico (B). (ee=80% e %c=45%).....	69
Figura 29. Variação da conversão, (%c) (A) e do ee, (%ee) (B) em função do tempo para a reação de redução da α -cloroacetofenona em diferentes sistemas, a 20 ^o C.....	70
Figura 30. Cromatograma para uma alíquota da reação do (R,S)-3-hidroxi-2-metilenobutanoato de metila (10) com acetato de vinila, catalisada por PS/PEO (35 ^o C, 72 horas, ee=99%).....	76

LISTA DE ABREVIATURAS

Siglas

IUBMB	= União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular
UFSC	= Universidade Federal de Santa Catarina
UNICAMP	= Universidade Estadual de Campinas

Abreviaturas

AcOH	= ácido acético
AcONa	= acetato de sódio
AK	= lipase de <i>Pseudomonas fluorescens</i>
ccd	= cromatografia de camada delgada
CG	= cromatógrafo gasoso
Col.	= colaboradores
%c	= porcentagem de conversão
DABCO	= 1,4-Diazabicyclo[2.2.2]octano
DEX CB	= β-ciclodextrina
ees	= excesso enantiomérico do substrato
eep	= excesso enantiomérico do produto
%ee	= porcentagem de excesso enantiomérico
FID	= detector de ionização de chama
FP	= fermento de pão
G	= gelatina
K10	= montmorilonita K-10
K_m	= constante de Michaelis-Menten
NADPH	= nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
NADH	= nicotinamida adenina dinucleotídeo na forma reduzida
PEO	= poli(oxi de etileno)
PLAP	= pig liver acetone powder
PS	= lipase de <i>Pseudomonas sp</i>
RMN ¹ H	= ressonância magnética nuclear de hidrogênio
S	= sacarose
T	= trealose
t	= tempo
TMS	= trimetilsilano
Temp.	= temperatura
$[\alpha]_D^T$	= rotação óptica específica

RESUMO

ZANOTTO, Sandra Patricia. Utilização de Enzimas e Microrganismos para a Obtenção de Compostos Óticamente Ativos. Florianópolis, 2003. 115f. Tese (Doutorado em Química Orgânica) – Programa de Pós Graduação em Química, UFSC, 2003.

Neste trabalho foram exploradas metodologias alternativas de imobilização de enzimas e microrganismos para a manutenção das atividades e estereosseletividades dos mesmos em meio orgânico. As células de *Saccharomyces cerevisiae* (FP) foram suportadas em montmorilonita (K10), recobertas ou não com gelatina (G), na presença ou ausência de sacarose (S) ou trealose (T). Estes sistemas foram utilizados para a redução enantiosseletiva do acetoacetato de etila e α -cloroacetofenona em hexano. Para a redução do acetoacetato de etila com os sistemas FP/K10/G/S e FP/K10/G/T o biocatalisador tornou-se mais estável em meio orgânico, formaram-se menos subprodutos e a atividade foi mantida. O S-(+)-álcool foi obtido com ee>99% até a quarta reutilização, com valores de %c de 19 e 20% a 20°C, que foi a temperatura mais adequada para evitar a desativação das células. Para a biorredução do acetoacetato de etila constatou-se que a função principal da sacarose, da mesma forma que a trealose e a água, é de proteção da parede celular do microrganismo. Os valores de ee e %c foram similares com todos os sistemas. Na redução da α -cloroacetofenona obteve-se o R-(-)-2-cloro-1-feniletano após 72h de reação com ee 78-79%, quando o sistema FP/K10/G/S foi utilizado a 20 e 30°C, respectivamente. A biorredução em presença do sistema FP/K10/G/S forneceu %c superiores e valores de ee(%) inferiores aos obtidos em presença do sistema FP/K10/G/T (99%). Estes resultados evidenciam a influência da difusão para este reagente e produtos nos sistemas mais protegidos, ao contrário do observado para o acetoacetato de etila. O sistema FP/T foi o que apresentou a maior conversão em R-(-)-2-cloro-1-feniletanol e após 48h de reação obteve-se o produto com ee 80% e conversão de 45%, a 20°C. Para este substrato pode-se constatar o papel importante da trealose como agente protetor. O FP, imobilizado ou não, não foi eficiente quando utilizado como biorredutor de acetofenonas que não possuíam grupos ativantes próximos à carbonila, e os produtos desejados não foram obtidos.

A resolução cinética dos produtos das reações de Baylis-Hillman é um dos métodos mais convenientes para obtenção de moléculas multifuncionais óticamente ativas. Realizou-se a transesterificação enantiosseletiva de diferentes α -metileno- β -hidroxi ésteres catalisada por lipase de *Pseudomonas sp* (PS) livre ou imobilizada em poli-oxietileno (PEO), sílica (S) e montmorilonita (K10), sob diferentes condições reacionais. Para a resolução do (R,S)-3-hidroxi-2-metilenobutanoato de metila (10) via transesterificação com acetato

de vinila, obteve-se os maiores valores de eep (99%) e %c (50%) quando foram empregados 100mg de PS imobilizada em PEO e hexano como solvente. Não foi observada racemização do substrato após 96h de reação e os valores de eep mantiveram-se constantes. Após armazenamento dos sistemas PS/livre e PS/PEO por 30 dias sob refrigeração, obteve-se o álcool (S)-10 com ee de 65% e 99%, respectivamente. Para a resolução do (R,S)-3-hidroxi-2-metilenohexanoato de metila (11), verificou-se um aumento significativo da %c quando a enzima foi imobilizada em PEO, sendo de 12 para 36% em 168h. O (R,S)-3-hidroxi-2-metileno-3(2-naftil)-propanoato de metila (12) não reagiu sob condições similares de reação, salientando a influência do tamanho do grupo R ligado ao centro reacional.

Palavras-chave: Microrganismos, lipase, imobilização, redução, resolução e enantiosseletividade.

ABSTRACT

ZANOTTO, Sandra Patricia. Utilização de Enzimas e Microorganismos para a Obtenção de Compostos Óticamente Ativos. Florianópolis, 2003. 115f. Tese (Doutorado em Química Orgânica) – Programa de Pós Graduação em Química, UFSC, 2003.

In this work, alternative methodologies were explored for the immobilization of enzyme and microorganisms in order to stabilize the biocatalyst and enhance the enantioselectivity in organic media. *Saccharomyces cerevisiae* (FP) cells were supported in montmorillonite (K10), recovered or not with gelatin (G) in the presence or absence of sucrose (S) or trehalose (T). These systems were used for the enantioselective reduction of ethyl acetoacetate and α -chloroacetophenone in hexane. In the ethyl acetoacetate reduction with FP/K10/G/S and FP/K10/G/T systems, the biocatalysts were more stable, producing less by-products and keeping their high activity. The corresponding *S*(+)-alcohol was obtained with ee > 99% until the fourth reutilization, with conversion of 19-20% at 20°C, which was the best temperature to avoid cell deactivation. In the bioreduction of ethyl acetoacetate it was observed that the main function of sucrose was the same as that of the trehalose and water, protecting the microorganism cell wall. The values of ee and %c were similar for all systems. In the reduction of the α -chloroacetophenone, *R*(-)-2-chloro-1-phenylethane was obtained after 72h with ee 78-79%, by using the FP/K10/G/S system at 20 and 30°C, respectively. Bioreductions making use of the FP/K10/G/S system showed higher %c, but the values of ee (%) were lower when compared with FP/K10/G/T (99%). These results reflected the diffusion influence of reagents and products on the systems that are more protected, contrary to what was observed with the ethyl acetoacetate. A large conversion (45%) to *R*(-)-2-chloro-1-phenylethanol was achieved when the FP/T system was used after 48h with ee 80%, at 20°C. For this substrate it was observed the importance of trehalose as a protection agent. FP, immobilized or not, was not as efficient as a bioreductor of acetophenone that does not have active groups next to the carbonyl group, therefore the desired products were not obtained.

Kinetic resolutions of α -methylene- β -hydroxy esters (Baylis-Hillman products) were performed via enzymatic enantioselective transesterification with *Pseudomonas sp.* lipase (PSL), free or immobilized in poly(ethylene) oxide (PEO), silica gel (S) and montmorillonite K10 (K10), under different reaction conditions. The corresponding *R*(+)-acetates from alkyl-substituted racemic alcohols were obtained with e.e. > 99% and excellent to moderate conversions, using the PSL/PEO system and vinyl acetate as an acylating agent, in hexane. Naphthyl-substituted hydroxy ester was inert under these experimental conditions. Word keys: Microorganisms, lipase, immobilization, reduction, resolution and enantioselectivity.

1. INTRODUÇÃO

1.1 Considerações Gerais

Atualmente, a produção de substâncias opticamente puras é um capítulo de destaque nos setores acadêmicos e industriais, preocupados com a pesquisa e o desenvolvimento de novos processos. Quando os químicos sintetizam produtos naturais e desenham novos alvos, a pureza enantiomérica dos produtos e sua relação com as propriedades biológicas é um tema de permanente discussão.¹

O crescente interesse por esse tipo de síntese promoveu um grande desenvolvimento na biocatálise. Contudo, ainda que a habilidade das enzimas e dos microorganismos para agir como catalisadores quirais específicos seja conhecida, principalmente pela indústria farmacêutica, a sua utilização rotineira em laboratórios de síntese orgânica só foi aceita nos últimos anos.²

A habilidade de conduzir transformações químicas que são impossíveis ou impraticáveis de outra forma, especialmente na área de obtenção de compostos enantiomericamente puros, aliada à necessidade de mudar os catalisadores hoje existentes (geralmente constituídos de metais pesados ou de transição, altamente nocivos ao ambiente) por catálises “ambientalmente corretas”, tornam o uso de biocatalisadores um dos maiores desafios da síntese orgânica na atualidade.^{3,4,5,6,7}

A possibilidade de atuar na catálise de reações em meios quase anidros ou micro-aquosos expandiu largamente o potencial de aplicações de enzimas e microorganismos em síntese orgânica. A ausência de fase aquosa contínua em torno do biocatalisador torna possível sua interação direta com o solvente, promovendo alterações de estabilidade, atividade e estereosseletividade.^{8,9} Além disso, nestas condições, as hidrolases por exemplo, são capazes de catalisar reações de esterificações e transesterificações com altos rendimentos.

A catálise enzimática é agora uma ferramenta estabelecida em química orgânica sintética estereosseletiva, com diversos livros texto^{3,10,11} e numerosos

artigos de revisão, exemplificados aqui por algumas publicações nos últimos dois anos.^{12,13,14,15,16,17,18}

As enzimas e os microrganismos estão sujeitos à inativação por fatores químicos, físicos ou biológicos decorrentes da estocagem ou mesmo durante o uso. Há, assim uma necessidade de estabilizar estes biocatalisadores como meio de evitar a inativação para uso em meio orgânico. Portanto, para a manutenção da atividade catalítica e do potencial de estereosseletividade, é necessário o desenvolvimento de métodos preventivos específicos.

Neste sentido, a técnica de imobilização em diferentes suportes é uma das mais utilizadas na biocatálise, sendo bastante aplicada para mediar reações de interesse sintético em solventes orgânicos.^{19,20} A imobilização do biocatalisador em um suporte, sem prejuízo de sua atividade por um razoável período de tempo, pode assegurar sua repetida utilização ou mesmo possibilitar o uso em reatores contínuos, resultando em economia nos processos industriais. Assim, de modo geral, a utilização de materiais imobilizados além de diminuir o custo por análise, aumenta a rapidez e a precisão do processo. Nos processos sintéticos, a facilidade de extração dos produtos do meio reacional, aliada à estabilidade do biocatalisador em reações de longa duração (ou com substratos nocivos), é de grande interesse nas biotransformações.^{21,22} Portanto, o paradigma de que enzimas são instáveis e tão caras para serem usadas em síntese orgânica está mudando rapidamente. Isto se deve principalmente aos eficientes métodos para imobilização, que as tornam mais estáveis e reduzem os custos de síntese, devido ao repetido uso do catalisador. Adicionalmente, as enzimas têm se tornado consideravelmente mais baratas, devido ao progresso feito na engenharia genética.¹⁰

1.2 Enzimas

As enzimas, conhecidas industrialmente como biocatalisadores, são geralmente proteínas, formadas por longas cadeias de aminoácidos com ligações peptídicas. Porém, existem algumas moléculas de RNA que catalisam a clivagem e síntese de ligações fosfodiéster, chamadas de ribozimas, e são mais difíceis de serem encontradas do que proteínas catalíticas. A maioria das enzimas sintetizadas por células são retidas para funções intracelulares. As enzimas extracelulares são subseqüentemente secretadas para fora dos limites da membrana celular. Enzimas estão presentes em todas as células vivas, onde exercem as funções vitais de controle dos processos de transformação dos nutrientes em energia e em material celular. Além disto, participam dos processos de quebra de nutrientes complexos em substâncias mais simples.

Embora alguns biocatalisadores sejam extraídos de tecidos animais e vegetais, as enzimas industriais são geralmente obtidas de microorganismos (bactérias, bolores e leveduras) e têm-se uma maior diversidade. Portanto, as pesquisas para a busca de novas enzimas começam pela análise de amostras de solo, água, ar, madeira, frutas em decomposição e outros materiais.

Apesar de um microorganismo ser capaz de produzir mais de mil enzimas distintas, é necessário um trabalho cuidadoso para o isolamento de espécies que produzam determinadas enzimas com as características desejadas.

As oportunidades sintéticas proporcionadas pelas enzimas se baseiam na especificidade com que catalisam a reação. As enzimas mais úteis para aplicação em síntese orgânica são aquelas que aceitam uma larga faixa de modificações estruturais no substrato, porém retendo a habilidade de operar estereoespecificamente em cada um em particular. Enzimas extraídas de mamíferos encaixam-se melhor nesses critérios. Apesar das obtidas de microorganismos não tolerarem muitas modificações estruturais, esse fato é compensado pela diversidade de microorganismos na natureza.

Mais de duas mil enzimas já foram isoladas de microorganismos, plantas e animais, estando disponíveis no mercado mais de sete mil preparações

enzimáticas em diferentes graus de pureza, inclusive misturas de biocatalisadores.¹

A classificação da União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular (IUBMB) divide as reações catalisadas por enzimas em seis grupos principais.²³

✓ **Oxidoreduases:** enzimas deste grupo catalisam reações de oxidação-redução envolvendo oxigenação, como $C-H \rightarrow C-OH$, ou remoção de hidrogênio como $CH(OH) \rightleftharpoons C=O$ e $CH-C \rightleftharpoons C=C$.

Subclasses: hidrogenases, oxidases, peroxidases, etc.

✓ **Transferases:** enzimas que mediam a transferência de grupos acil, açúcares, fosforil e grupos aldeídos ou cetonas, de uma molécula para outra.

Subclasses: transaldolases, transcetolases, etc.

✓ **Hidrolases:** enzimas que catalisam reações de hidrólise e formação de glicosídeos, anidridos e ésteres, bem como amidas, peptídeos e outras funções contendo a ligação C-N.

Subclasses: esterasas, lipases, peptidases, fosfatases, etc

✓ **Isomerases:** podem efetuar várias isomerizações, incluindo migração da ligação C=C, isomerização cis-trans e racemização.

Subclasses: racemases, epimerases, oxirredutases, mutases, etc.

✓ **Liases:** essas enzimas catalisam reações de adição, usualmente de HX, a duplas ligações como C=C, C=N, e C=O, e também os processos reversos.

Subclasses: descarboxilases, cetoácidoliasas, hidrolases

✓ **Ligases:** são também chamadas sintetases e mediam a formação ou clivagem de ligações C-C, C-O, C-S, C-N e ésteres de fosfato.

1.3 Vantagens e Desvantagens da Biocatálise

Em contraste com os catalisadores inorgânicos como ácidos, bases, metais pesados e óxidos metálicos, as enzimas têm alta especificidade, isto é, formam produtos seletivamente. Esta característica é muito útil nos processos industriais, porque se formam quantidades mínimas de produtos secundários, o que representa benefícios econômicos e ambientais, com a eliminação da necessidade de separação de subprodutos e com redução qualitativa e quantitativa de efluentes industriais.

As enzimas também ganharam um lugar de destaque para os químicos orgânicos por serem catalisadores seletivos. Elas se caracterizam por realizarem as reações com quimio, regio, e estereoseletividade. Além disso, o químico sintético considera uma grande vantagem a utilização de catalisadores que dispensem a proteção dos grupos lábeis dos reagentes.

Com relação a outros catalisadores, as enzimas apresentam as seguintes vantagens:¹¹

- ✓ **São catalisadores muito eficientes:** comparados aos processos químicos, os processos mediados por enzimas são mais efetivos.
- ✓ **São ambientalmente corretos:** diferentemente de catalisadores compostos de metais pesados, são completamente biodegradados.
- ✓ **As reações ocorrem em condições suaves:** porque atuam no metabolismo de células vivas, as enzimas agem à pressão atmosférica, temperatura ambiente ou superiores e pH próximo ao neutro. As reações enzimáticas minimizam os problemas como isomerização, racemização, epimerização e rearranjos que, muitas vezes, são fatores limitantes nos processos químicos.
- ✓ **São compatíveis entre si:** por agirem usualmente em condições similares, diversas reações biocatalíticas podem ser feitas em um mesmo meio reacional, proporcionando a possibilidade de conduzir reações seqüenciais usando sistemas multienzimáticos. Essa metodologia pode ser muito útil quando existe a possibilidade de formar um intermediário instável em um dos passos da biotransformação.

✓ **Aceitam substratos não naturais:** exibem larga tolerância a substratos não naturais e, se vantajoso para o procedimento, possibilitam o uso em solventes orgânicos, em substituição ao meio aquoso usualmente utilizado.

✓ **Apresentam os principais tipos de seletividade:**

Quimiosseletividade – uma vez que o propósito de uma enzima é atuar em um único tipo de grupo funcional, outras funcionalizações sensíveis que deveriam reagir normalmente com um certo grau sobre catálise química são preservadas.

Regiosseletividade e Diastereosseletividade – devido à sua estrutura tridimensional complexa, as enzimas conseguem distinguir entre grupos funcionais quimicamente iguais, situados em diferentes regiões da mesma molécula-substrato.

Enantioseletividade – as enzimas são quase todas formadas por L-aminoácidos, sendo portanto, catalisadores quirais. Como conseqüência, qualquer tipo de quiralidade ou pró-quiralidade presente no substrato é reconhecida durante a formação do complexo enzima-substrato. Desta forma, substratos pró-quirais podem ser transformados em produtos opticamente ativos e ambos os enantiômeros de um substrato racêmico reagem com velocidades diferentes, possibilitando a resolução cinética.

Porém, existem também algumas desvantagens no uso de biocatalisadores. As principais são:¹¹

✓ **São fornecidos pela natureza somente em uma forma enantiomérica:** desta forma torna-se impossível inverter a indução de uma reação biocatalisada pela escolha do outro enantiômero do biocatalisador, à semelhança do que é possível ao se utilizar um catalisador químico.

✓ **Exigem parâmetros de operação específicos:** a vantagem de operar sob condições suaves pode se tornar um obstáculo quando as reações biocatalisadas ocorrem apenas lentamente nas condições naturais de temperatura e pH.

- ✓ **Geralmente apresentam sua atividade catalítica máxima em água:** a maioria dos compostos orgânicos são pouco solúveis em água e a mudança para solventes orgânicos pode causar a perda da atividade da enzima.
- ✓ **São passíveis de sofrer inibição pelo substrato ou produto:** este fato é limitante do processo, mas pode ser contornado mantendo-se a concentração do substrato em níveis aceitáveis e retirando-se gradualmente o produto formado.

Estas desvantagens foram bastante amenizadas nos últimos tempos pelo aperfeiçoamento e desenvolvimento de diversas técnicas para reações biocatalisadas. Quando o processo não for satisfatoriamente seletivo, modificações simples nas condições experimentais podem influenciar tanto a estereoquímica como a enantiosseletividade. Algumas modificações mais comuns são o uso de solventes orgânicos, adição de inibidores, técnicas de imobilização e utilização de enzimas mais resistentes (extremoenzimas).²

1.4 Diferentes Sistemas de Biotransformação

O estado físico do biocatalisador usado para biotransformações pode ser muito diverso. A decisão final de quando utilizar enzimas isoladas mais ou menos purificadas ou microrganismos, ambos na sua forma livre ou imobilizada, depende de alguns fatores como tipo de reação, necessidade ou não de reciclar os cofatores e escala em que será procedida a biotransformação.

Alguns prós e contras no uso de enzimas ou microrganismos estão mostrados na **Tabela 1**.¹¹

Tabela 1. Vantagens e desvantagens do uso de enzimas e microorganismos como catalisadores em biotransformação.

Biocatalisador	Forma	Vantagens	Desvantagens
Enzimas Isoladas	Geral	Aparelhagem simples, fácil isolamento do produto, boa produtividade devido a alta tolerância à concentração do substrato.	Algumas classes de enzimas necessitam reciclagem de cofator
	Suspensas em meio aquoso	Alta atividade enzimática	Possibilidade de reações paralelas, insolubilidade do substrato, requer extração da enzima
	Suspensa em solvente orgânico	Reações fáceis de conduzir e de extrair o produto, fácil solubilização do substrato, fácil recuperação da enzima	Baixa atividade
	Imobilizada	Fácil recuperação da enzima	Possível perda de seletividade durante a imobilização
Microorganismos	Geral	Não necessita reciclar o cofator	Isolamento trabalhoso, grande volume, baixa produtividade devido à baixa tolerância à concentração do substrato, baixa tolerância a solventes orgânicos, subprodutos, e presença de metabólicos
	Células em crescimento	Alta atividade	Grande quantidade de biomassa, subprodutos, processo difícil de controlar
	Células em repouso	Fácil isolamento do produto, menos subprodutos	Baixa atividade
	Células Imobilizada	Possibilidade de reutilização do sistema	Baixa atividade

1.5 Imobilização de Biocatalisadores

Este tema começou a ser estudado no final do século passado, ao se observar que o carvão ativo ao qual havia sido adicionada uma preparação biológica com atividade invertásica mantinha a capacidade de hidrolisar sacarose mesmo após ser lavada.¹

A partir de 1960, houve um aumento muito grande no número de publicações sobre imobilização de enzimas, tendo em vista as potenciais vantagens econômicas e operacionais que a técnica oferece para a tecnologia enzimática. Em 1971, na primeira conferência em Engenharia Enzimática, estabeleceu-se o uso da terminologia “enzima imobilizada” para os biocatalisadores ligados a suportes insolúveis ou confinados em espaços físicos definidos.¹

Na prática três inconvenientes são freqüentemente encontrados em reações catalisadas por enzimas não imobilizadas.¹¹

- ✓ Muitas enzimas não são suficientemente estáveis dentro das condições operacionais, e elas podem perder a atividade catalítica devido a altas temperaturas, autooxidação, auto-digestão e/ou desnaturação pelo solvente, e solutos ou devido a danos físicos.
- ✓ Já que enzimas são moléculas solúveis em água, seu uso repetido, o qual é importante para viabilizar um processo econômico, é problemático devido ao fato que elas são difíceis de serem recuperadas deste meio além da separação dos substratos e produtos.
- ✓ A produtividade de processos industriais, medidas de rendimento em função do tempo, é freqüentemente baixa devido ao limite tolerado pela enzima para altas concentrações de substrato(s) e produto(s).

Estes problemas podem ser solucionados pela imobilização de enzimas e outros biocatalisadores.^{19,24,25,26} Deve-se sempre considerar que a atividade da enzima seja mantida após a imobilização, ou seja, não deverão ocorrer alterações estruturais que levem a mudanças no seu sítio ativo.

Estas técnicas de imobilização envolvem ou a ligação em um suporte sólido insolúvel em água (ligação em suporte) ou ligações cruzadas intermoleculares de enzimas por reagentes bifuncionais ou multifuncionais (ligações cruzadas). Alternativamente, o biocatalisador pode ser confinado em uma área restrita, onde permanece cataliticamente ativo (confinamento em uma matriz sólida ou uma membrana de comportamento restrito), **Figura 1**.

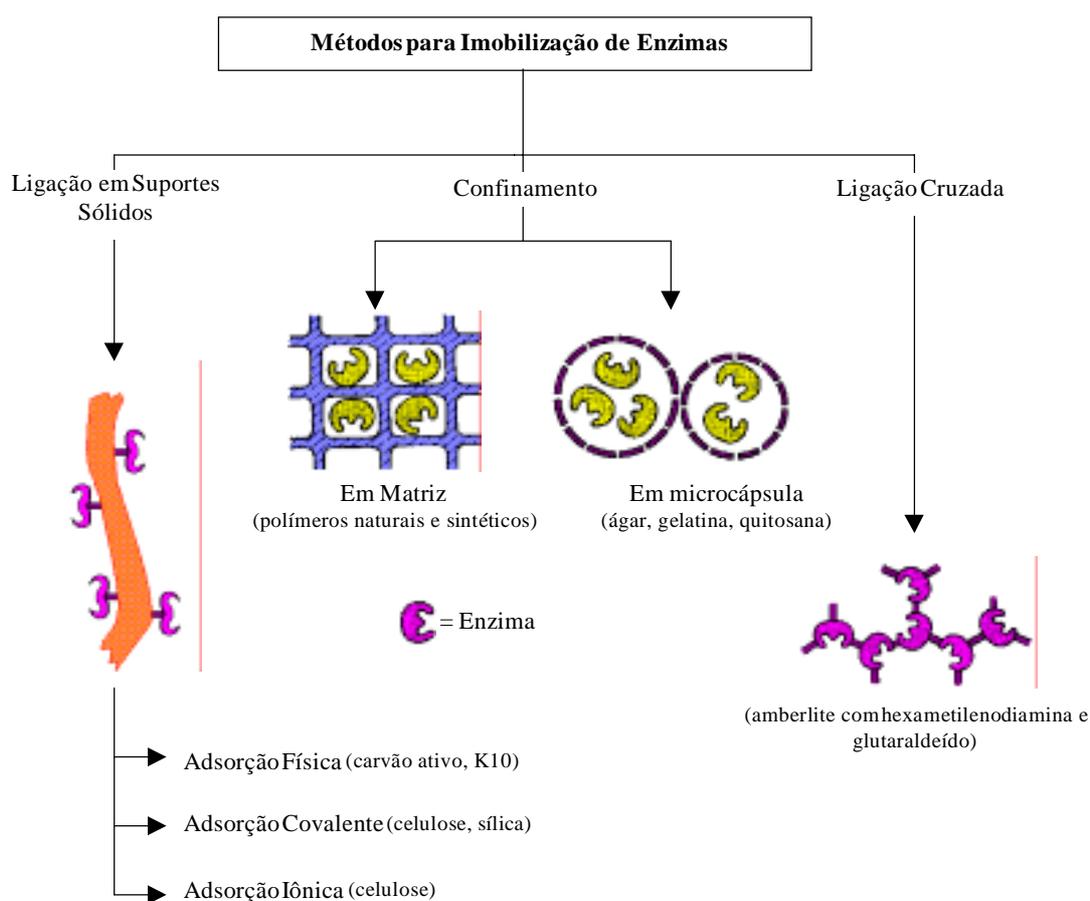


Figura 1. Métodos de imobilização de enzimas. (Adaptado da ref. 11)

Para imobilização via entrapamento (intercalação ou confinamento), materiais tais como zeolitas ou argilas com poros e cavidades bem definidos e polímeros são usados com alta confiabilidade.¹⁰

Como consequência, a catálise homogênea utilizando uma enzima nativa torna-se, então, uma catálise heterogênea quando biocatalisadores imobilizados são empregados. Portanto, as constantes cinéticas medidas com enzimas imobilizadas não são constantes cinéticas verdadeiras equivalentes as obtidas em reações homogêneas. Estas são apenas valores aparentes devido aos efeitos de difusão e partição.¹¹

Dependendo da técnica de imobilização, as propriedades do biocatalisador tais como: estabilidade, seletividade, valores de K_M , pH, e características de temperatura, podem ser alteradas significativamente, algumas vezes para melhor ou para pior.^{19,25,27} Como exemplo, a enzima quando imobilizada mantém a configuração estrutural devido às ligações de hidrogênio ou à formação de complexos que ocorrem na superfície do material. Estas interações facilitam a manutenção da estrutura original, causando um aumento da estabilidade térmica. Pode-se observar, também, que o micro ambiente da superfície do suporte e da enzima tem cargas que podem causar uma mudança no pH ótimo de até 2 unidades. Observa-se com isto um alargamento da região de pH na qual a enzima, em questão, atua. Isto permite ainda que as enzimas que normalmente não têm regiões de pH semelhantes, possam atuar em uma mesma reação, através dos “coquetéis enzimáticos”.^{19,25}

Portanto, têm-se as seguintes vantagens em utilizar enzimas ou microrganismos imobilizados:

- ✓ Podem ser reutilizados, inclusive em processos contínuos.
- ✓ Aumenta-se a estabilidade do biocatalisador, durante estocagens e mudanças de pH e temperatura.
- ✓ O isolamento e purificação dos produtos são facilitados.
- ✓ A reação pode ser interrompida em qualquer estágio por simples filtração do suporte com o biocatalisador.
- ✓ Em certos casos é possível utilizar dois diferentes biocatalisadores imobilizados para realizar duas reações sucessivas. Assim, o isolamento do produto intermediário pode não ser necessário.

A literatura fornece um amplo estudo de enzimas e microrganismos imobilizados em diferentes suportes e técnicas de imobilização, os quais incluem a adsorção em materiais insolúveis, confinamento dentro de géis poliméricos, encapsulamento em membranas, ligações cruzadas com reagentes bifuncionais ou multifuncionais e ligação a um suporte insolúvel.^{14,19,21,22,24,25,27,28,29}

1.5.1 Montemorilonita K10 e Poli (óxido de etileno) (PEO) como Suportes para Biocatalisadores.

Os silicatos que ocorrem naturalmente em camadas são geralmente denominados de argilas minerais. Essencialmente, elas são materiais cristalinos finamente particulados (comumente < 2 µm).

A montmorilonita ($M_x[Al_{2-x}Mg_x](Si_4)O_{10}(OH)_2$) é uma das argilas mais comumente usadas, sendo disponível comercialmente pela denominação “Mont-K10”. É uma esmectita composta de camadas de aluminossilicatos. Cada unidade da camada é constituída por três folhas de T-O-T isto é: uma central de alumina octaédrica entre duas de sílica tetraédrica, **Figura 2**. Entre as camadas, existem cátions intercambiáveis, normalmente com água de hidratação. A área superficial específica é da ordem de 600-800 m²/g. As argilas esmectitas podem ser consideradas como polieletrólitos, ou polímeros inorgânicos.³⁰

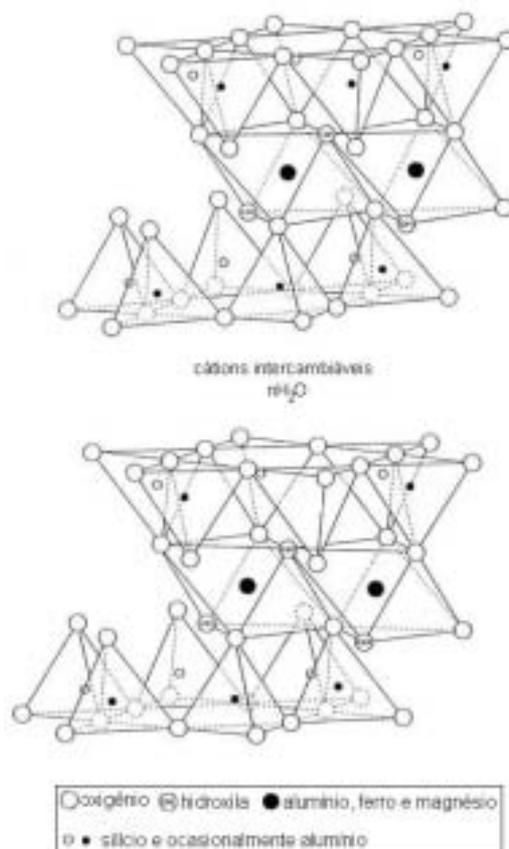


Figura 2. Estrutura da montmorilonita.³¹

A montmorilonita é uma argila também conhecida como bentonita, sendo o constituinte principal nas cinzas vulcânicas. Ela é um dos mais efetivos agentes desintoxicantes intestinais naturais disponíveis e é reconhecida como tal por séculos ao redor do mundo. É insolúvel em água, mas uma vez hidratada tem uma enorme área superficial e intumescer (incha) até doze vezes seu tamanho. Ao entumescer-se, abre-se como uma esponja altamente porosa. Esta esponja magnética puxa para dentro de seus espaços, por atrações elétricas, bactérias, vírus patogênicos, parasitas, formas de toxinas, pesticidas e herbicidas. As moléculas da montmorilonita apresentam duas superfícies amplas carregadas negativamente (superfície ácida), enquanto que as “bordas” são positivas.³²

As qualidades de adsorção, bem como as de absorção da montmorilonita, podem ser a chave para suas inúmeras habilidades.^{33,34}

Utilizando-se destas propriedades da montmorilonita, Sorriha e col., em 1992, realizaram os primeiros estudos utilizando-se este suporte em reações de biotransformação; reações de redução de fenilcetonas através do fermento de pão imobilizado em K10.³⁵

Mais recentemente Rodrigues e col.³⁶ utilizaram-se da metodologia de Sorriha e col.³⁵ para a biorredução de α -metilenocetonas.

Outro suporte de grande interesse são os polímeros que podem ser naturais, como o ágar, e sintéticos, como o poli (óxido de etileno) (PEO). O filme de PEO é um dos suportes citados para imobilização de enzimas.^{21,37,38} O poli (óxido de etileno) é constituído de unidades monoméricas: $(-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O}-)_n$.

Em comparação com outros suportes, tais como sílica, alumina e celite, os polímeros hidrofóbicos como o poli (óxido de etileno) e poli (propileno), levam a um aumento da atividade de enzimas da classe das lipases.^{39,40} Nestes suportes, as enzimas são facilmente adsorvidas. Estudos de microscopia eletrônica de varredura realizados por Crespo mostram que não há diferença na morfologia de fratura do filme de PEO puro e com lipases. A morfologia da superfície do filme de PEO com lipases revelou que as enzimas estão localizadas preferencialmente na superfície do material polimérico.³⁸

1.6 Parâmetros Quantitativos para a Determinação da Enantiosseletividade de Reações Biocatalisadas.

Um substrato racêmico, quando submetido a uma reação enzimática, sofre discriminação quiral entre os enantiômeros. Devido à quiralidade da enzima, o enantiômero que melhor se ajusta no seu sítio ativo é convertido em uma velocidade mais alta. Para assegurar uma alta seletividade para ambos os enantiômeros, a diferença na velocidade de reação dos enantiômeros individuais deve ser a maior possível. Em alguns casos ideais, a velocidade é tão extrema que o "bom" enantiômero é transformado rapidamente e o outro não é convertido. Então, a reação enzimática cessaria automaticamente em 50% de conversão, quando já não existe mais o enantiômero reativo.¹¹

O rendimento químico máximo de uma resolução cinética biocatalítica é 50% para cada enantiômero, isto é, quando apenas um dos enantiômeros reagiu completamente. Na prática, a maior parte das resoluções enzimáticas de substratos racêmicos não mostra uma situação ideal e a diferença na razão das velocidades de conversão dos enantiômeros não é infinita, mas mensurável. O que se observa nestes casos não é uma parada total da reação em 50% de conversão, mas uma acentuada diminuição na velocidade próxima a este valor. O resultado do processo é descrito pelo excesso enantiomérico do produto (ee_p) e do substrato que não reagiu (ee_s), sendo o rendimento fornecido pelo grau de conversão da reação (c).⁴¹ A velocidade de transformação de cada enantiômero varia com o grau de conversão (c), logo, a razão dos dois enantiômeros não permanece constante durante a reação.

Sih e col., em 1982, sentiram a necessidade de um método mais adequado para o tratamento quantitativo de dados bioquímicos, que permitisse a químicos sintéticos fazer predições úteis em seus trabalhos. Descreveram, então, formulações sob a base teórica de Sharpless e K. Fajans, da dependência de três parâmetros chaves: a extensão de conversão de substratos racêmicos (c), a pureza ótica ou grau de enantiosseletividade, expressa como excesso enantiomérico do produto (ee_p) ou do substrato (ee_s) que permanece sem reagir e a razão enantiomérica (E).⁴² O ee é definido como a proporção do maior enantiômero menos o menor, expressa como uma porcentagem.⁴³

A enantiosseletividade das enzimas na resolução cinética de substratos quirais é convenientemente expressa como a razão enantiomérica (E), que é um parâmetro quantitativo e qualitativo do sistema. Embora a qualidade do produto da resolução de um racemato seja caracterizada pelo excesso enantiomérico, a razão enantiomérica (E) é um parâmetro muito importante, pois descreve a dependência entre o grau de conversão (c) e o ee do substrato e produto.

Este parâmetro que descreve a seletividade de uma resolução foi introduzido como adimensional, o qual permanece constante durante a reação e é somente determinado pelo “ambiente” do sistema, ou seja enquanto o

excesso enantiomérico é uma propriedade do produto, a razão enantiomérica é característica do processo.

Para um processo irreversível, tal como hidrólise biocatalítica, pode-se determinar **E** quando **ee_s**, **ee_p** e **c** são medidos, utilizando-se das **Equações 1, 2 e 3**.

$$c = \frac{ee_s}{ee_s + ee_p} \quad \text{Eq. 1}$$

$$E = \frac{\text{Ln}[(1-c)(1-ee_s)]}{\text{Ln}[(1-c)(1+ee_s)]} \quad \text{Eq. 2}$$

$$E = \frac{\text{Ln}[1-c(1+ee_p)]}{\text{Ln}[1-c(1-ee_p)]} \quad \text{Eq. 3}$$

Em uma resolução biocatalítica, **E** é expresso como a razão das constantes de especificidade, k_{cat}/K_m , para dois enantiômeros (constante de velocidade aparente de segunda ordem para a reação entre uma enzima e um substrato em uma concentração infinitamente pequena, onde k_{cat} é a constante catalítica e K_m é a constante de Michaelis-Menten, que é a concentração de substrato na qual a velocidade de reação é a metade da máxima).¹¹

A relação entre os termos cinéticos, termodinâmicos e a enantiosseletividade (**E**) de uma biotransformação é fornecido pela **Equação 4**.^{43, 44}

$$E = \frac{(k_{\text{cat}} / K_m)_s}{(k_{\text{cat}} / K_m)_{s'}} = e^{\frac{\Delta\Delta G^\ddagger}{RT}} \quad \text{Eq.4}$$

Um valor elevado de **E** para um par “enzima-substrato” é essencial para o sucesso de uma resolução cinética, já que isto assegura não apenas um excesso enantiomérico elevado, mas também um rendimento proporcionalmente alto.

Para propósitos práticos, um valor de **E** abaixo de 10 para qualquer biotransformação torna-o inviável como um processo enantiosseletivo. Por outro lado, este pode ser considerado bom se apresentar valores entre 10 e 30 e, acima disto, é considerado excelente. Os valores de $E > 200$ não podem ser atribuídos precisamente como consequência das incertezas intrínsecas aos métodos analíticos de determinação de excessos enantioméricos (por exemplo, RMN, HPLC, ou CG). Acima destes valores, uma pequena variação no excesso enantiomérico do produto ou substrato provoca um aumento significativo no valor numérico de **E**.^{11,42}

1.7 Métodos Analíticos para a Determinação da Pureza Enantiomérica

Os enantiômeros tem propriedades físicas idênticas (ponto de ebulição e fusão, solubilidade), exceto o sentido da rotação do plano de polarização da luz. Apresentam propriedades químicas idênticas (comportamento cromatográfico e espectroscópicos), com exceção para reações com outros compostos opticamente ativos, ou seja, quando se tem uma influência quiral externa.

Isto é importante para determinar a proporção dos dois enantiômeros em uma mistura. A cromatografia gasosa e métodos espectroscópicos de análise devem ser modificados para se ter uma influência quiral externa.⁴⁵ Somente assim os enantiômeros terão comportamentos diferentes um do outro e a análise será possível.

O desenvolvimento de métodos não polarimétricos precisos para a determinação da pureza enantiomérica, o qual começou nos anos sessenta, tem sido decisivo no desenvolvimento da síntese assimétrica, permitindo uma avaliação precisa e de confiança do grau de seletividade conseguido em uma determinada reação.⁴³

1.7.1 Métodos Polarimétricos

O método clássico de determinação da pureza enantiomérica de uma amostra é medir sua pureza ótica usando um polarímetro. Determina-se assim o ângulo de rotação ótica experimental da amostra e este é convertido para a rotação ótica específica $[\alpha]$, grandeza característica de cada substância oticamente ativa, **Equação 5**.

$$[\alpha]_D^T = \frac{\alpha}{l \cdot c} \quad \text{Eq. 5}$$

Onde:

$[\alpha]_D^T$ = rotação ótica específica

α = rotação ótica observada

l = comprimento da cela polarimétrica, em dm

c = concentração da solução, em g de soluto por cm^3 de solvente

T = temperatura (graus Celsius)

D = comprimento de onda de emissão da linha D do sódio (589 nm)

A medida da rotação ótica de uma amostra deve ser realizada sob condições definidas de temperatura, solvente, concentração e em um dado comprimento de onda de incidência da luz plano polarizada. Estes valores podem ser comparados com rotações conhecidas de amostras enantiomericamente puras de alguns compostos, medidos sob condições idênticas. Este valor é comumente denominado de “pureza ótica”. Se a medida for realizada sob condições rigorosamente controladas e calibrações apropriadas, o valor pode ser igualado com o de “pureza enantiomérica”.⁴⁶

A porcentagem de pureza enantiomérica é freqüentemente chamada de “excesso enantiomérico” (**ee**) e ele é igual à “porcentagem de pureza ótica”. Deve-se sempre considerar que o termo “pureza ótica” é aplicado para um único enantiômero ou mistura deles e não deverá ser aplicado para misturas na qual outro composto estiver presente.⁴⁷ Pode-se, portanto, definir **ee** em termos de rotação específica, **Equação 6**.

$$ee = \frac{\text{rotação específica observada}}{\text{rotação específica do enantiômero puro}} \times 100 \quad \text{Eq. 6}$$

Existem dois grandes problemas com este método de análise. Primeiro, pureza ótica e pureza enantiomérica não são necessariamente equivalentes. Por exemplo, a rotação ótica não varia linearmente com composição enantiomérica do ácido 2-metil-2-etil-butanodióico em vários solventes apolares e existem relatos de variações não lineares até mesmo em solventes polares. Uma segunda limitação é que a literatura mostra muitos exemplos de valores de rotação ótica incorretos para compostos que eram considerados enantioméricamente puros.⁴⁶

1.7.2 Cromatografia Gasosa

Um método atrativo para a análise de mistura de enantiômeros é a cromatografia gasosa quiral (**CG**). Este método sensível não é afetado por traços de impurezas e é rápido e simples de ser realizado. Está baseado em associações moleculares que podem levar a um reconhecimento quiral suficiente que resulte em uma resolução enantiomérica. A razão dos picos fornece uma medida da composição enantiomérica da amostra precisa e quantitativa. Tais medidas podem ser realizadas com um alto grau de precisão ($\pm 0,05\%$).

O método utiliza uma fase estacionária quiral, a qual tem um agente que auxilia na resolução de alta pureza enantiomérica. O enantiômero a ser analisado é submetido a interações diastereoméricas rápidas e reversíveis com a fase estacionária e portanto, pode ser eluído em diferentes velocidades.

A resolução dos enantiômeros pela cromatografia baseia-se na diferença entre energias livres de formação dos intermediários diastereoisoméricos transitórios formados durante a eluição. A designação da configuração absoluta, portanto, envolverá a correlação da configuração

molecular com a ordem da eluição do enantiômero. Outro fator importante no parâmetro de CG é o da separação do pico, chamado de seletividade (α).

Existem certamente limitações para o método, algumas das quais são peculiares para a cromatografia gasosa. As amostras deverão ser suficientemente voláteis e termicamente estáveis e, é claro, deverá ser quantitativamente resolvida na fase quiral do **CG**.⁴³

As ciclodextrinas ou seus derivados (α , β , γ) tem sido aplicadas com muita ênfase na separação de enantiômeros pela cromatografia líquida ou gasosa, através do desenvolvimento de colunas com fases estacionárias quirais.^{48,49}

1.8 Lipases

As lipases (glicerol éster hidrolases, E.C.3.1.1.3) são enzimas hidrolíticas em seu ambiente natural. Estas possuem a função de catalisar a hidrólise de triacilgliceróis aos correspondentes ácidos graxos e glicerol. Elas representam um grupo de biocatalisadores acessíveis e de baixo preço, que em geral, são flexíveis quanto à sua especificidade.

Por um longo tempo as lipases foram consideradas como uma categoria especial de esterases, as quais são altamente eficientes e capazes de catalisar a hidrólise de moléculas agregadas em água.⁵⁰ Portanto, a diferença mais importante entre as lipases e outras hidrolases é a interação físico-química com seus substratos.

Em contraste com as esterases que apresentam comportamento cinético michaeliano, ou seja, a atividade aumenta com a concentração do substrato [S] até um limite por saturação, as lipases não apresentam atividade enquanto os substratos estão presentes na solução em estado monomérico.^{11,51}

Contudo, quando a concentração do substrato está próxima ou ultrapassa o seu limite de solubilidade, ocorre um rápido aumento na atividade. A razão pela qual uma lipase não hidrolisa substratos que estejam abaixo de uma concentração mínima (chamada concentração micelar crítica, CMC) e

somente em concentrações acima desta é chamada de ativação interfacial, **Figura 3.**¹¹

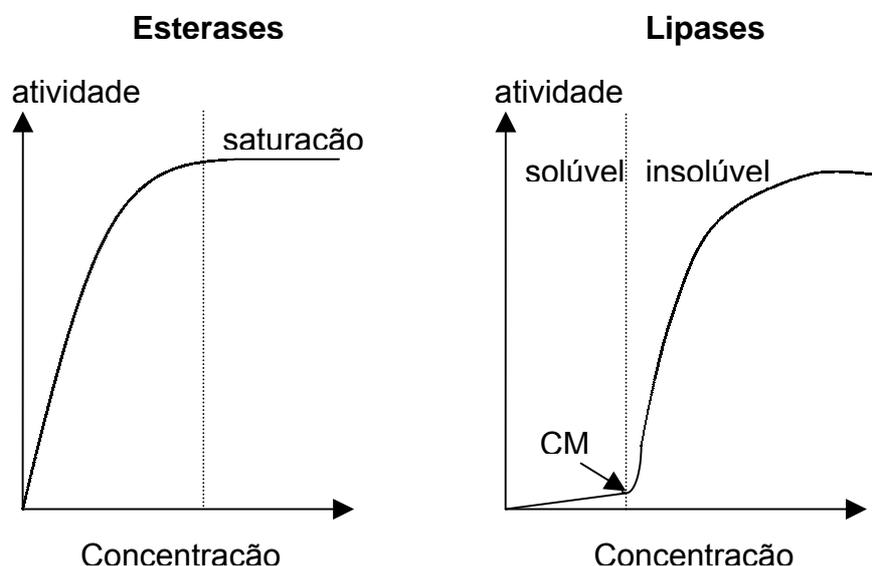


Figura 3. Comportamento catalítico das esterases e lipases.

O mecanismo de ativação interfacial está associado a mudanças conformacionais na enzima.

Uma maior compreensão sobre os mecanismos de ação de lipases somente foi obtida a partir de 1990, quando as duas primeiras estruturas foram resolvidas por cristalografia de raios-X.⁵⁰ Até o momento foram caracterizadas as estruturas tridimensionais de mais de doze lipases.^{50,52} Todas as lipases cujas estruturas foram elucidadas compartilham um padrão conformacional comum, denominado conformação α/β de hidrolase, onde está situada a tríade catalítica (Ser-Hist-Asp/Glut). Elas tem uma “arquitetura” comum composta de uma seqüência de α -hélice e β -pregueada.

Na **Figura 4**, pode-se observar a representação esquemática da estrutura tridimensional da lipase da *Pseudomonas cepacia* (PcL) na ausência de uma ligação inibitória usando cristalografia de raios-X. A estrutura mostra a lipase contendo uma prega alfa/beta-hidrolase e uma tríade catalítica compreendendo dos resíduos Ser87, His286 e Asp264.⁵³

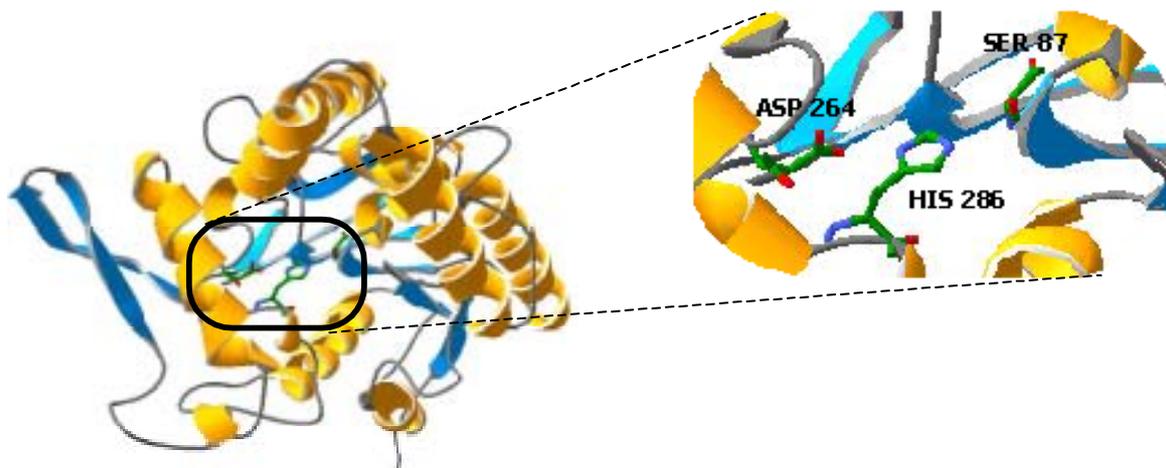


Figura 4. Representação esquemática da estrutura tridimensional da lipase de *Pseudomonas cepacia* (PcL).⁵³

Pode-se observar na **Figura 5** o mecanismo de uma reação de transesterificação catalisada por lipase, através da tríade catalítica. Nos estados de transição I e II, a carga negativa gerada sobre o oxigênio após o ataque nucleofílico é estabilizada através de ligações de hidrogênio pelos resíduos de Ser83 e Leu147, que formam a cavidade do oxiânion na lipase.⁴⁴

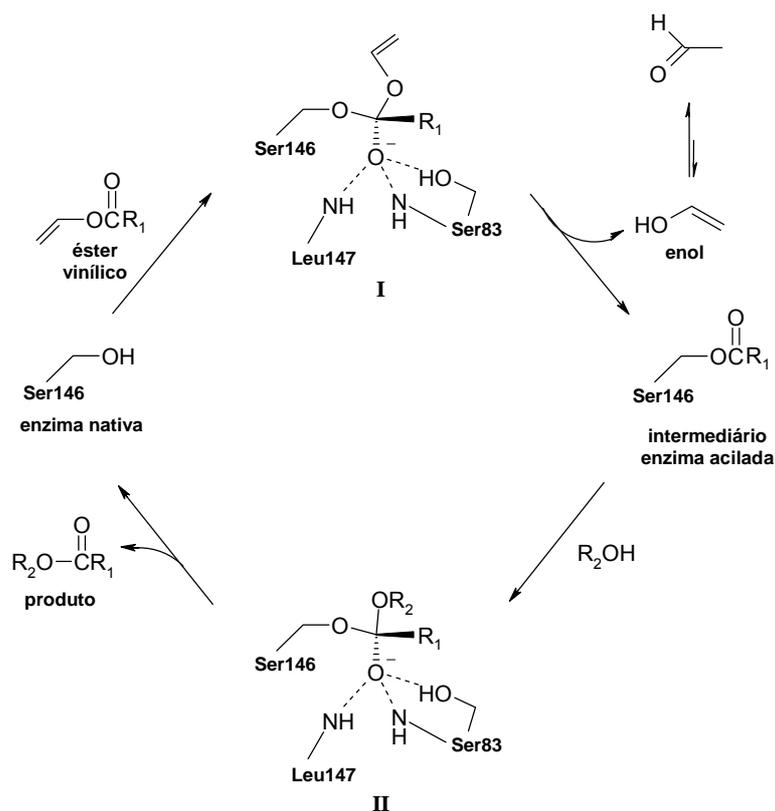


Figura 5. Representação esquemática do mecanismo de uma reação de transesterificação catalisada por lipase de *Humicola lanuginosa*.

É crescente o uso de enzimas hidrolíticas na indústria farmacêutica, sendo bem conhecido o uso das lipases. As características de enantio e estereosseletividade das lipases permitem sua utilização na resolução de misturas racêmicas e remoção seletiva de compostos do meio reacional de difícil realização por via química. Além disto, estas enzimas podem apresentar excelente estabilidade na presença de solventes orgânicos nos quais os substratos destas reações são solúveis.¹

Com exceção de certos álcoois estereamente impedidos, as lipases catalisam a acilação assimétrica de uma ampla faixa de substratos cíclicos e acíclicos com enantiosseletividade entre moderada e alta.^{50, 54}

Existem algumas metodologias biossintéticas que podem ser empregadas na resolução de compostos racêmicos através de lipases e outras hidrolases.²³ Conforme mostrado nos exemplos das **Figuras 6**⁵⁵ e **7**⁵⁶ o álcool

ROH e o acetato ROAc opticamente enriquecidos podem ser obtidos através da reação de transesterificação enzimática.

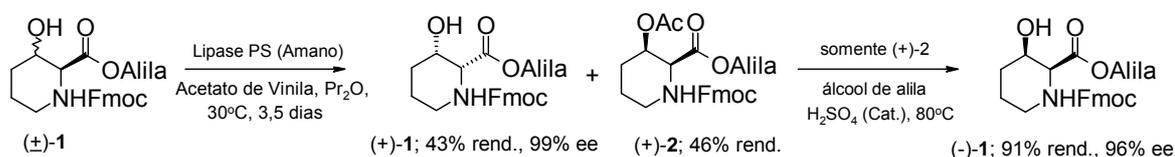


Figura 6. Resolução enzimática do ácido (±) cis-β-hidroxipicolínico (1).

Uma resolução enzimática eficiente do ácido (±)-1 foi obtida por Williams e colaboradores.⁵⁵ O composto (-)-1 é um intermediário chave na síntese do antibiótico atitumoral, tetrazomina, **Figura 6**.

Na **Figura 7**, o álcool enantiomericamente puro (3) foi usado como intermediário na síntese do (-)-cladospol A, catalisada por lipase B de *Candida antarctica*.⁵⁶

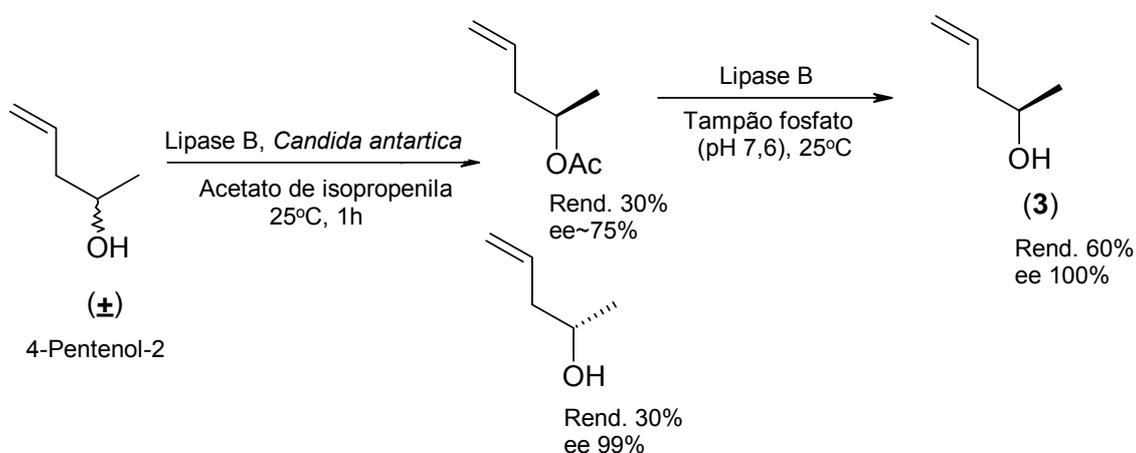


Figura 7. Resolução enzimática do 4-pentenol-2.

A resolução enantiomérica é sempre realizada na etapa biocatalítica. Dependendo da enzima, substrato e condições experimentais utilizadas podem ser obtidos diferentes enantiômeros de ROH e ROAc através do emprego destas técnicas. Portanto, diversos são os parâmetros que controlam a enantiosseletividade das lipases, tais como: meio reacional, solventes orgânicos, atividade da água, concentração e estrutura do substrato.^{9, 57}

1.8.1 Lipases como Biocatalisadores em Meio Orgânico

Para reações em química orgânica preparativa, a água é considerada um solvente ruim, pois muitos compostos são insolúveis na mesma. Este fato pode ser interpretado como uma limitação para o uso da biocatálise convencional.

Foi surpresa para muitos observar que algumas enzimas não são desnaturadas rapidamente por solventes orgânicos. Nos anos oitenta uma equipe de pesquisadores do “Massachusetts Institute of Technology” popularizou o uso de lipases em solventes orgânicos.²⁶

As lipases são extremamente estáveis em solventes orgânicos.^{9,15,58} A facilidade com que estas enzimas aceitam uma variedade de substratos não naturais e de tamanhos diversos sugere que a espinha dorsal da cadeia polipeptídica é flexível e pode adotar diferentes conformações.

Outra característica é que as reações de esterificação catalisadas em solventes orgânicos são freqüentemente mais enantiosseletivas que as correspondentes hidrolíticas em água.^{15,59,60}

O solvente pode alterar a especificidade, quimiosseletividade, regioseletividade, seletividade pró quiral e enantiosseletividade das lipases e outras hidrolases. Vários modelos foram propostos para explicar a mudança da seletividade destas enzimas em função do solvente. Estes foram baseados na alteração da flexibilidade conformacional do sitio ativo, na partição de grupos funcionais do substrato ou do número de moléculas de solvente dispostas interna e externamente à cavidade do sítio ativo e no tipo de solvente empregado. Dependendo do substrato, foram observados comportamentos diferentes para a mesma enzima. Nestes casos, foi sugerida a existência de mais de uma possibilidade de ligação do substrato com a superfície da enzima.

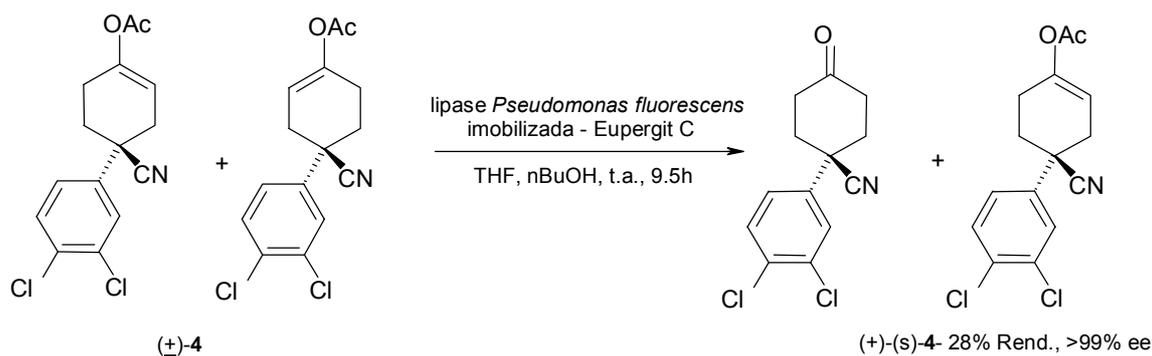
As reações biocatalíticas em meio orgânico realizadas com lipases tem as seguintes vantagens:^{16,50}

- ✓ Substratos não polares são transformados em maiores velocidades devido ao aumento na solubilidade.

- ✓ Equilíbrios termodinâmicos são em grande parte governados pela concentração dos reagentes e a hidrólise de ésteres catalisadas por lipases em água pode facilmente ser invertida, em meio não aquoso, na síntese de ésteres ou transesterificações.
- ✓ A imobilização é freqüentemente, se a imobilização é desejada por outros fatores, adsorções experimentalmente desnecessária pelo fato dela poder ser retirada do meio reacional por simples filtração após a reação, devido à sua insolubilidade em solventes orgânicos. Mas simples podem ser realizadas, sem problemas de dessorção.
- ✓ Ocorrem mudanças conformacionais na enzima durante a formação do complexo enzima-substrato, e numerosas ligações de hidrogênio são quebradas. Este processo é muito facilitado em um meio aquoso, o qual garante que as quebras das ligações sejam rapidamente substituídas por ligações de hidrogênio da água circundante. Por outro lado, este processo é dificultado em solventes orgânicos e, como conseqüência, as enzimas parecem estar mais “rígidas”.

Com isto, normalmente é possível controlar algumas das propriedades catalíticas das enzimas (químico, região e enantiosseletividade) pela variação dos solventes.

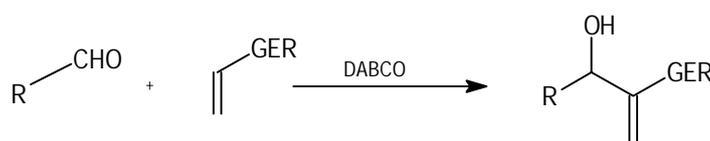
Sabe-se agora da enorme importância que tem a otimização das condições para serem realizadas uma biotransformação. Uma ampla faixa de enzimas, diferentes temperaturas reacionais, diversos métodos de imobilização e uma variedade de solventes devem ser testados antes de encontrar as condições ótimas para a biotransformação.^{57,61,62,63,64,65} Carnell e col.⁶⁶ realizaram todos estes testes para otimizar a biotransformação na obtenção do acetato enólico [(+)-(s)-4] enantiomericamente puro, que foi utilizado como intermediário para a síntese de um antagonista tacicinina NK-2. O efeito do solvente foi importante na enantiosseletividade, sendo que o valor de E variou de 1 (tampão fosfato) a 15 (THF), **Figura 8**.



solventes	Temp. reacional (h)	Conversão %	Ee (%)	E
THF	3,5	70	>99	15
EtOAc	2,5	41	48	9
Dioxano	4	72	94	7
Tolueno	4	52	61	6,5
Et ₂ O	1	66	85	6
CH ₃ CN	6,5	52	53	5
Hexano	6,5	55	5,7	1
Tampão fosfato	2,5	56	0	1

Figura 8. Influência do solvente na resolução do acetato enólico catalisada por lipase de *Pseudomonas fluorescens*.

Os α -metileno- β -hidroxi ésteres são blocos de construção versáteis para a síntese de muitos compostos importantes tais como produtos naturais (quijanolida,⁶⁷ micestericina E,⁶⁸ terpentocina,⁶⁹ ácido néxico,⁷⁰ terpenóides,⁷¹ feromônios de insetos),^{72,73} heterocíclicos contendo nitrogênio^{74,75,76} e outras moléculas biologicamente ativas.^{77,78} Estes compostos multifuncionais são obtidos por uma única transformação sintética envolvendo uma reação de catálise nucleofílica de ésteres α,β -insaturados com aldeídos, reação de Baylis-Hillman, **Figura 9.**^{79,80,81}



GER = Grupos Elétrons Retiradores
Ex. COOR', COR', CN, SO₂R'

Figura 9. Reação geral de Baylis-Hillman.

Recentemente, têm sido feito muitos esforços para se obter produtos de Baylis-Hillman opticamente ativos. Entretanto, a resolução cinética é um dos métodos mais úteis e convenientes. Alguns trabalhos realizados nos últimos anos demonstram a viabilidade deste método.

Em 1990, Burgess e col. realizaram estudos de resolução biocatalítica de α -metileno- β -hidroxi ésteres e cetonas. A lipase de *Pseudomonas AK* bruta mostrou melhor resolução através das acilações irreversíveis, via reação de transesterificação. Diferentes substratos foram utilizados, para identificar os fatores que influenciam na enantiosseletividade e no tempo da reação, (**Figura 10**).⁸²

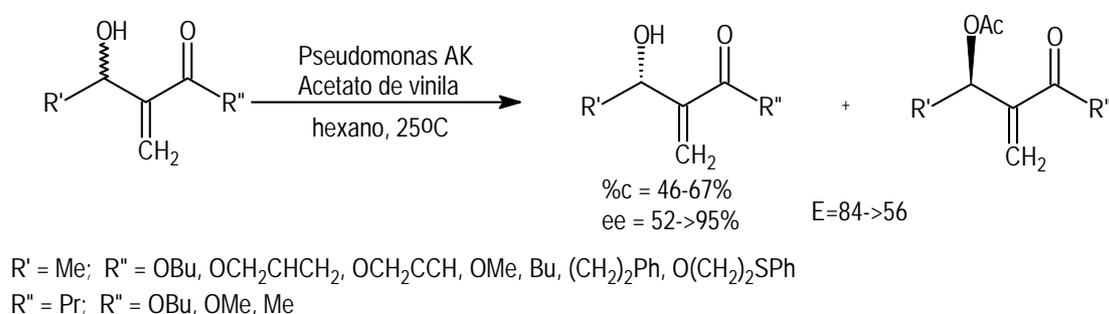


Figura 10. Resolução biocatalítica de α -metileno- β -hidroxiésteres e cetonas.

Este método é barato, experimentalmente simples e compatível com diversos grupos funcionais que não são tolerados em catálises de metal-transição e hidrogenação assimétrica.⁸²

Basavaih e col. realizaram reações de hidrólise enantiosseletiva de acetatos racêmicos, produtos de reações de Baylis-Hillman, com PLAP (Pig liver acetone powder), também com o objetivo de desenvolver um método viável para a síntese de produtos opticamente ativos, **Figuras 11 e 12**.⁸³

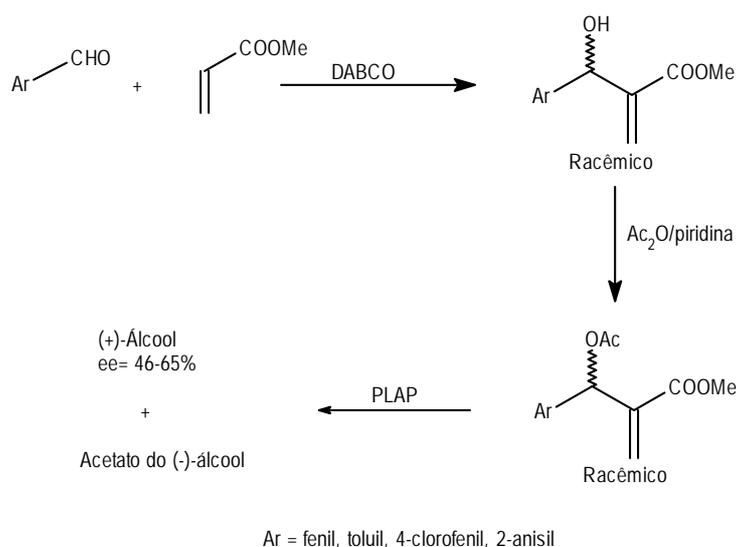


Figura 11. Reações de hidrólise enantiosseletivas de acetatos racêmicos, produtos de reações de Baylis-Hillman, com PLAP.

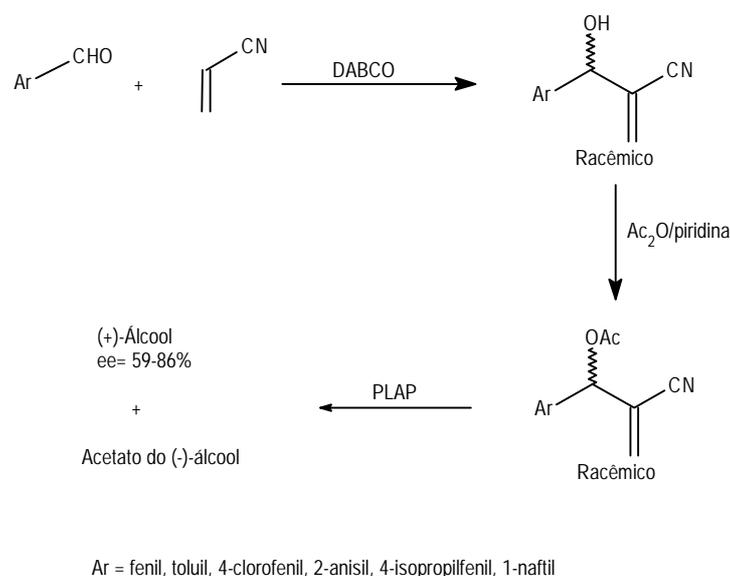


Figura 12. Reações de hidrólise enantiosseletivas de acetatos racêmicos, produtos de reações de Baylis-Hillman, com PLAP.

Embora a pureza enantiomérica dos álcoois produzidos não seja alta, este método é de alta utilidade, pois é possível obter álcoois homoquirais, ressubmetendo os acetatos dos álcoois enantioméricamente enriquecidos à hidrólise enzimática.⁸³

Recentemente, Tsuboi e col.⁸⁴ realizaram resoluções cinéticas através da catálise enzimática utilizando lipases PS e AK para vários produtos de Baylis-Hillman, como α -metileno β -hidroxi. Quando a lipase PS foi usada em acetonitrila, as reações de transesterificação dos ésteres racêmicos 3-hidróxi-2-metilenobutanoato de etila e 3-hidroxi-2-metilenopentanoato de etila ocorreram com altos valores de razão enantiomérica, bons rendimentos químicos e excessos enantioméricos, **Figura 13**.

A hidrólise dos derivados acetatos, etil 3-acetoxi-2-metilenopentanoato com a lipase AK, formou os álcoois (R) enantiomericamente puros com valores de $E > 321$, **Figura 14**.⁸⁴

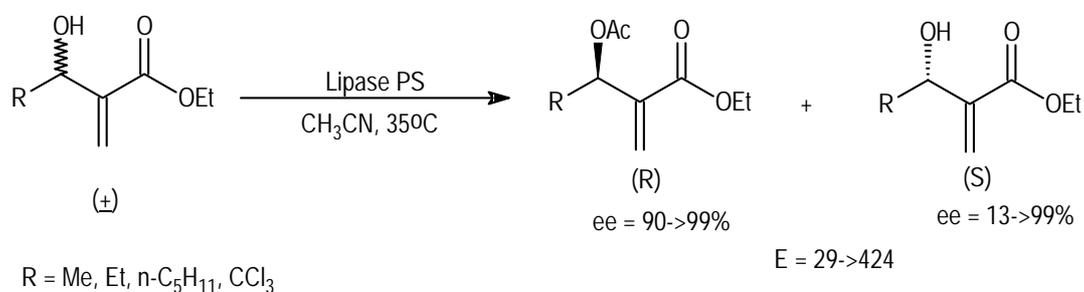


Figura 13. Resolução Ótica dos Produtos de Baylis-Hillman por Transesterificação Enzimática.

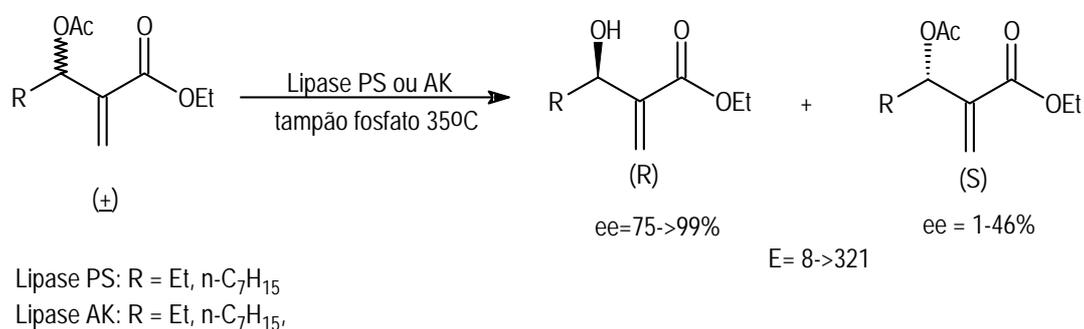


Figura 14. Resolução Ótica dos Produtos de Baylis-Hillman por Hidrólise Enzimática.

Estas moléculas multi funcionais estão presentes em muitas ocorrências naturais e compostos biologicamente ativos, tais como feromônios e α -metileno- β -hidroxi- γ -butilacetonas.⁸³

1.9 *Saccharomyces cerevisiae* em Síntese Orgânica

A *Saccharomyces cerevisiae*, que utiliza glicose ou sacarose como fonte de energia, é um dos biocatalisadores mais versáteis e baratos. A facilidade de manuseio, que não requer nenhum cuidado especial, a torna alvo de escolha quando se deseja conduzir reações de oxidação-redução. É preferencialmente utilizado na forma de célula inteira, ao invés de enzimas isoladas, evitando dessa forma o problema da dificuldade de reciclar o cofator, que é um passo necessário quando se usa a enzima pura. As células inteiras apresentam uma grande variedade de atividades enzimáticas. Portanto, o maior problema encontrado neste tipo de biocatálise é a baixa seletividade, devido à ação simultânea das várias enzimas presentes, que geralmente apresentam diferentes cinéticas e velocidades de conversão para um mesmo substrato⁸⁵.

No entanto, quando o processo não é satisfatoriamente seletivo, modificações simples nas condições experimentais podem ser realizadas no sentido de influenciar tanto a estereoquímica como a enantiosseletividade.⁸⁶ Algumas das modificações mais comuns são o uso de solventes orgânicos, a adição de inibidores ou co-substratos^{87,88} e as técnicas de imobilização^{20,35,89,90,91,92,93}, entre outras.²

Algumas enzimas hidrolíticas, como as lipases e as proteases, são reconhecidamente retentoras da atividade catalítica em solventes orgânicos. Entretanto, as dehidrogenases e redutases são diferentes das hidrolíticas e requerem quantidades estequiométricas da coenzima NADH ou NADPH. Devido ao alto custo, essas coenzimas são normalmente recicladas. A utilização de células inteiras é uma maneira de resolver o problema de reciclagem da coenzima. Porém, os solventes orgânicos freqüentemente acarretam danos na membrana hidrofóbica da célula do microrganismo.

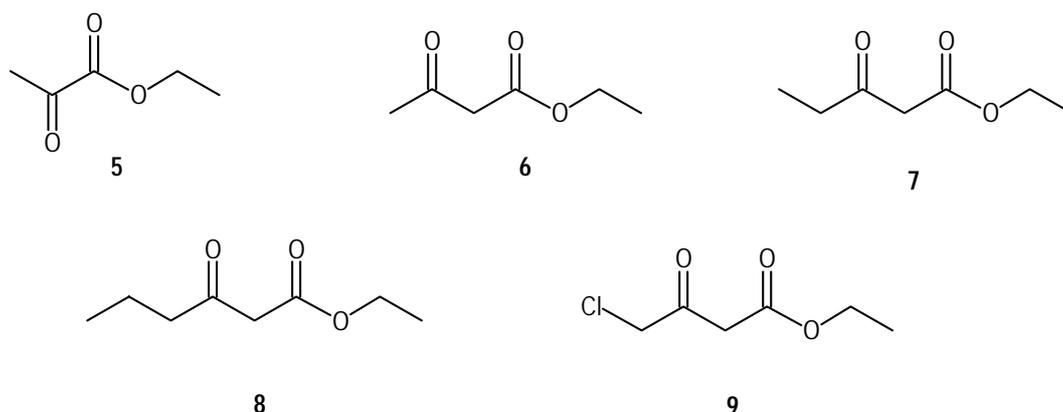
O uso de solventes orgânicos é vantajoso devido à solubilidade do substrato e à capacidade que possuem em impedir as reações laterais pela água. Além disso, a seletividade da enzima do fermento pelo substrato pode mudar em meio orgânico. A adição de pequenas quantidades de água é necessária sob tais condições de reação, para que a enzima se mantenha cataliticamente ativa.⁸ Já o isolamento de produtos de meios não aquosos é bem mais fácil do que de meios aquosos, sendo este mais um grande benefício.^{94, 95}

Nakamura e col. realizaram os primeiros estudos de redução de α -ceto ésteres com fermento de pão (FP) seco não imobilizado em benzeno e hexano. Observaram que a utilização controlada de gotas de água (0,4 equivalentes; mL H₂O/g FP) no sistema é indispensável para promover a redução. Já o excesso de água suprime radicalmente a redução.⁹⁴

Smallridge e col., em 1994, estenderam as investigações na redução de β -cetoésteres com FP em uma série de solventes polares e não polares, num estudo que foi completado verificando-se o efeito da influência da água na reatividade.⁹⁶ Estes resultados demonstraram clara e seguramente que a reação é afetada tanto pela natureza do solvente, quanto pela razão água/fermento (independente da razão água/solvente). Também foi constatado que a redução do acetoacetato de etila **5** com FP em solvente orgânico resultou na formação exclusiva de (*S*)-3-hidroxitirato de etila com ee de 96%, para todas as condições de reação empregadas. Estes resultados contrastam com os obtidos por Nakamura e col.⁹⁷, onde a redução de α -cetoésteres com FP em água formou o enantiômero-*S*, enquanto que em solvente orgânico obteve-se o enantiômero-*R*.⁹⁶

Rotthaus e col. estudaram a redução de α - e β -cetoésteres (**5-9**) com FP em hexano, tolueno, éter dietílico e acetato de etila.⁸ As reações de redução em solventes orgânicos ocorreram preferencialmente em tolueno e hexano, sendo que os melhores resultados foram obtidos para o composto **5** em hexano, e para o **6** em tolueno. A tendência do ee na redução dos compostos **5 a 9**, em solvente orgânico sugere que o aumento do comprimento da cadeia no lado ceto do substrato está relacionada diretamente ao aumento da

percentagem de produto com a configuração *R*. Estes resultados estão de acordo com a regra de Prelog.¹¹



Uma série de (*S*)- β -hidroxiésteres foi preparada por Smallridge e col. usando fermento de pão como mediador da redução de β -oxo-ésteres em éter de petróleo (40-60°C). Os produtos foram obtidos com rendimentos entre 56 e 96%, e alto grau de estereosseletividade (94-99% ee). Estes resultados são superiores aos descritos na literatura quando as mesmas reações foram conduzidas em fase aquosa (**Figura 15**).⁹⁸

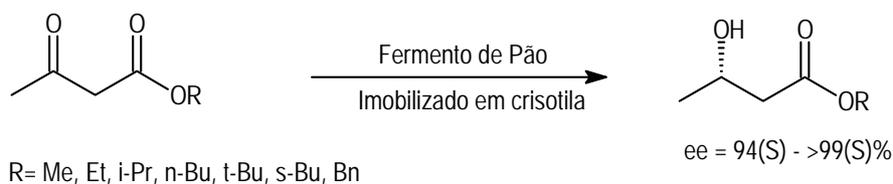


Figura 15. Redução com fermento de β -oxo-ésteres em solvente orgânico.

Mais recentemente, Kanda e col. verificaram que o duplo entrapamento da célula do fermento de pão com alginato de cálcio e pré-polímero uretano (PU-6) torna-a suficientemente protegida do solvente orgânico para repetidas reduções estereosseletivas, em reações de longa duração.⁹⁹

Uma das contribuições mais recentes para o avanço dos estudos de redução mediada por FP, em meio orgânico, foi realizada por Smallridge e col.¹⁰⁰ Eles observaram que a atividade do fermento decresce após 24 horas

de exposição a solventes orgânicos e investigaram os fatores associados com esta redução da atividade.

Em um estudo complementar, a facilidade de redução de β -ceto ésteres foi relacionada à variação do tamanho da cadeia carbônica ligada ao carbono ceto. A proximidade dos grupos mais volumosos à carbonila faz com que haja uma diminuição na facilidade de redução. Finalmente, as β -ceto amidas são consideravelmente menos reativas que os correspondentes β -ceto ésteres.¹⁰¹

Em outro trabalho, verificou-se que grupos metilênicos conjugados com carbonilas e nitrilas podem ser reduzidos com um alto grau de estereosseletividade e bons rendimentos.¹⁰² O fermento de pão também foi utilizado na redução de α -metilencetonas para obter as correspondentes α -metilcetonas com alta enantiosseletividade com excessos enantioméricos de 88-99%.¹⁰³

1.4.1 Influência da Adição de Açúcares em Reações de Redução por Fermento de Pão.

Açúcares, especialmente a trealose, e polióis são conhecidos como estabilizadores de membranas protéicas. Atuam também como pequenas moléculas anticongelantes produzidas por animais que vivem em ambientes inóspitos. Seus efeitos de anticongelamento são devido às propriedades coligativas “water-binding” e estas estão diretamente relacionadas à concentração delas.¹⁰⁴

A trealose, ou O- α -D-glicopiranosil-(1 \rightarrow 1) α -D-glicopiranosídeo é um dissacarídeo constituído por duas unidades de glicose e é um açúcar não redutor, (**Figura 16**).

Ela é produzida por uma grande variedade de organismos, e conhecida pela sua capacidade de proteção. Soluções de trealose também são muito utilizadas na conservação de vacinas.^{105,106}

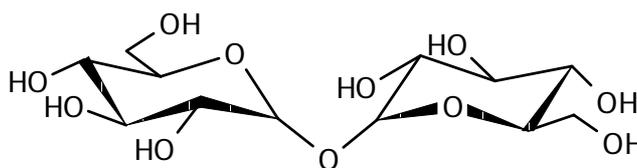


Figura 16. Estrutura da trealose.

Açúcares inibem o desdobramento das estruturas das proteínas durante a etapa de secagem na liofilização porque substituem as pontes de hidrogênio perdidas com a remoção da água.

O fato de a trealose atuar como estabilizador de membranas e protetora para as células de fermento sob condições de estresse está bem documentada na literatura.¹⁰⁷ Postula-se que os grupos OH dos aditivos, especialmente os equatoriais em moléculas de açúcares, podem ordenar as moléculas de água e aumentar a sua estruturação. Entretanto, não existem evidências de que as cabeças do grupo OH equatoriais em moléculas de açúcares estabilizem as membranas ou proteínas *in vivo*.¹⁰⁸

Anchordoquy e col. estudaram a manutenção da estrutura quaternária da lactato desidrogenase. Foi estudada a hibridização e recuperação da atividade catalítica no processo de liofilização durante o congelamento e o descongelamento utilizando polímeros (dextrana, Ficoll, polietileno-glicol), açúcares (sacarose, trealose e glicose) e surfactantes (Tween 80, Brij 35, β -ciclodextrina hidroxipropila). Os polímeros e principalmente os açúcares evitaram a dissociação da lactato desidrogenase durante estas etapas, resultando em uma grande recuperação da atividade da enzima após a liofilização e reidratação.¹⁰⁹

Com este exemplo fica claro que o papel principal dos açúcares nas reações em meio orgânico é substituir a água, que é necessária para atividade da enzima.

Estes efeitos benéficos são observados mesmo em sistemas que não formam sólidos vítreos durante o congelamento e descongelamento.

Na *Saccharomyces cerevisiae*, um dos maiores estoques de carboidratos é a trealose, que pode constituir 23% ou mais do peso seco da célula, dependendo das condições de crescimento e o estágio do ciclo de vida. As concentrações intracelulares da trealose têm um papel importante na habilidade de muitos organismos, incluindo fermentos, tolerarem condições ambiente adversas. Altos níveis de trealose em fermento têm também correlação com a resistência às condições de estresse do ambiente tais como: desidratação, congelamento e choque por etanol. Como resultado, tem sido proposto que a função principal da trealose é proteção contra as condições de estresse do ambiente e não como reserva de carboidratos.¹¹⁰

O choque por etanol induz a síntese de trealose intracelular e de ácidos graxos insaturados (na presença de oxigênio), bem como aumenta o total de lipídios na célula. Este aumento produz longas cadeias de ácidos graxos insaturados e um decréscimo das cadeias de ácidos graxos saturados curtas, ajudando assim a fortalecer as bicamadas de lipídios, resultando em maior integridade estrutural e em um aumento na resistência à toxicidade do etanol.¹⁰⁷

Também tem sido sugerido que o metabolismo respiratório confere maior tolerância aos estresses para o fermento. Isto pode ser atribuído ao fato de que mais trealose pode ser sintetizada durante a fermentação aeróbica do que durante a anaeróbica.¹⁰⁷

2.JUSTIFICATIVA

O desenvolvimento de métodos eficazes para obter separadamente os enantiômeros de um composto racêmico é fundamental, principalmente para obtenção de moléculas precursoras, blocos de construções quirais, que podem ser empregados na síntese de moléculas mais complexas como fármacos quirais. Um enantiômero pode ser obtido de maneira usual através da resolução de misturas racêmicas e de síntese assimétrica. Em ambos os métodos, o uso de enzimas ou microorganismos tem crescido significativamente. Sabe-se, no entanto, que os métodos enzimáticos apresentam limitações diante dos clássicos da química orgânica, mas representam uma ferramenta sintética poderosa para complementar outras metodologias na química orgânica sintética moderna.

A busca de uma metodologia mais eficiente para a utilização de enzimas e microorganismos em síntese orgânica nos levou a estudar sistemas alternativos que melhor se adaptassem às condições sintéticas desejadas. Muitas técnicas vêm sendo empregadas e apresentam vantagens e desvantagens em suas aplicações sintéticas na química orgânica.

A técnica de imobilização de enzimas foi escolhida, sendo investigadas várias metodologias para a proteção de células de *Saccharomyces cerevisiae* (FP), visando à sua utilização em reações de redução de compostos carbonílicos em meio orgânico, que são utilizados como blocos de construção quirais na síntese de vários produtos naturais (feromônios) ou fármacos. Neste mesmo sentido, estudou-se a influência da adição de sacarose e trealose na reação de redução do acetoacetato de etila e α -cloroacetofenona com FP imobilizado ou não, investigando a influência dos açúcares na proteção das células de *Saccharomyces cerevisiae* contra a toxicidade do solvente orgânico. Estes complementam os estudos já realizados por nosso Grupo de Pesquisa com relação a metodologias para a proteção das células de *Saccharomyces cerevisiae* do meio reacional.¹¹¹

A resolução cinética é considerada um dos métodos mais úteis e convenientes para obtenção de moléculas multifuncionais opticamente ativas.

Sendo assim, realizou-se a resolução enzimática com lipase de *Pseudomonas sp* livre e imobilizada de produtos racêmicos de reações de Baylis-Hillman, para avaliação e otimização do processo e utilização desta metodologia em trabalhos corriqueiros de químicos orgânicos sintéticos.

Este projeto foi desenvolvido em conjunto com o Grupo de Pesquisa do professor Paulo José S. Moran, do Instituto de Química da UNICAMP.

Os produtos racêmicos das reações de Baylis–Hillman foram sintetizados e caracterizados por Luciano Fernandes, e Prof. Dr. Marcus C. M. Sá, do Departamento de Química da UFSC.

3.OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Explorar metodologias de imobilização de enzimas e microorganismos para obter maior estabilidade na atividade e na estereosseletividade das mesmas em meio orgânico. Com isso, pretende-se obter compostos orgânicos enantiomericamente puros que atuem como precursores na síntese de moléculas com alto grau de complexidade estrutural. Por exemplo, cita-se a obtenção de halodrinas e α -metileno- β -hidroxi ésteres quirais, que podem ser usadas como blocos de construção para a síntese de vários produtos naturais ou fármacos oticamente ativos.

3.2 Objetivos Específicos

✓ Investigar diferentes metodologias para a proteção de células de *Saccharomyces cerevisiae* (FP), na reação modelo de redução do acetoacetato de etila, visando a padronização de metodologias de imobilização para reações de redução de compostos carbonílicos em meio orgânico.

✓ Verificar a eficiência dos sistemas de proteção em estudo quando se tem um substrato tóxico para o FP, como a α -cloroacetofenona, juntamente com a facilidade de sua extração do meio reacional.

✓ Utilizar as melhores metodologias de proteção das células de *Saccharomyces cerevisiae* (FP), para comparar a enantiosseletividade e porcentagem de conversão com fermento de pão livre para efetuar reações de redução biocatalisadas de cetonas pró quirais (ex.: acetofenona, p-nitroacetofenona, 4-hidroxiacetofenona, 4-metoxiacetofenona, 3-hidroxi-4,5-dimetilacetofenona, 3,4-dimetoxiacetofenona, 3,4,5-trimetoxiacetofenona).

-
- ✓ Investigar a influência da adição de trealose e sacarose em reações de redução, mediadas por fermento de pão, do acetoacetato de etila e da α -cloroacetofenona, para minimizar a toxicidade do solvente orgânico.

 - ✓ Avaliar os sistemas de proteção da célula do fermento de pão (FP/G, FP/G/S, FP/K10, FP/K10/S, FP/K10/G, FP/K10/G/S e FP/K10/G/T) e comparar com os sistemas não imobilizados (FP, FP/S e FP/T).

 - ✓ Realizar a resolução dos produtos recêmicos das reações de Baylis-Hillman (*R,S*)3-hidroxi-2-metilenobutanoato de metila, (*R,S*)3-hidroxi-2-metilenohexanoato de metila e (*R,S*)3-hidroxi-2-metileno-3-(2-naftil)-propanoato de metila, via transesterificação enantiosseletiva enzimática, utilizando lipase de *Pseudomonas sp* (PS) livre e imobilizada em poli (óxido de etileno) – PEO, sílica e montmorilonita K10 em solventes orgânicos, para obter compostos oticamente ativos.

4. PARTE EXPERIMENTAL

4.1 Materiais

4.1.1 Reagentes Utilizados na Biotransformação com *Saccharomyces cerevisiae* (FP)

Fermento de pão (FP) biológico, instantâneo e seco (*Saccharomyces cerevisiae*, EMULZINT – LTDA da Bélgica), foi utilizado como biocatalisador. As células foram imobilizadas em montmorilonita K10 (K10) (Aldrich Chemical Co.) e revestidas com gel de gelatina (G) (SIGMA G2500, Tipo A). Foram feitas adições aos suportes de soluções de sacarose (S) ou trealose (T). Acetoacetato de etila e α -cloroacetofenona (Carlo Erba) e as acetofenonas pró-quirais (Aldrich Chemical Co. e Riedel-de-Haem): acetofenona, p-nitroacetofenona, 4-hidroxiacetofenona, 4-metoxiacetofenona, 3-hidroxi-4,5-dimetilacetofenona, 3,4-dimetoxiacetofenona, 3,4,5 trimetoxiacetofenona foram utilizadas sem purificação. Os produtos racêmicos utilizados como padrões para CG quiral, (\pm)-3-hidroxi-butanoato de etila e (\pm)-2-cloro-1-fenil-etanol, foram obtidos através da reação de redução das respectivas cetonas com NaBH₄ (Aldrich Chemical Co.).¹¹²

4.1.2 Reagentes Utilizado na Biotransformação com Lipase de *Pseudomonas sp*

Os substratos utilizados nas resoluções biocatalíticas dos α -metileno- β -hidroxi ésteres, (R,S)3-hidroxi-2-metilenobutanoate de metila (**10**) e (R,S)3-hidroxi-2-metilenohexanoato de metila (**11**), foram preparados de acordo com a literatura pela reação do acrilato de metila (Aldrich) com o respectivo aldeído (acetaldeído, butiraldeído; Aldrich) na presença do catalisador DABCO (Aldrich), à temperatura ambiente por 5-7 dias, as caracterizações espectroscópicas estão de acordo com os dados publicados (ver ítems **4.2.2**, **4.2.3**).^{67,71,72}

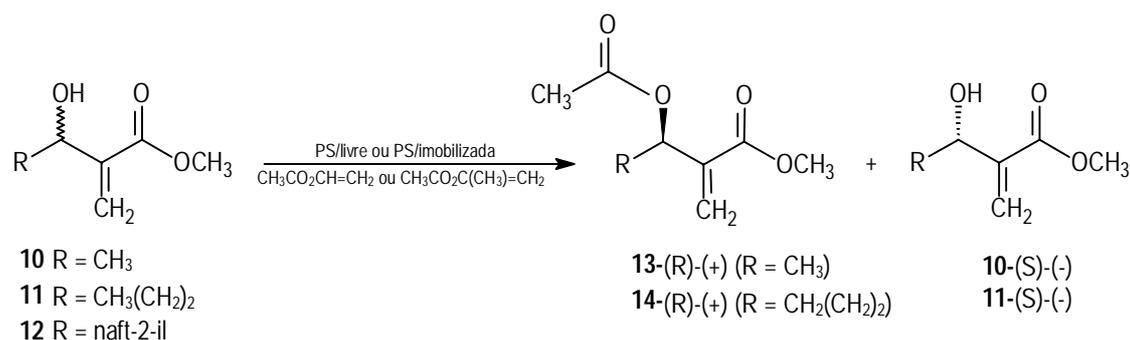


Figura 17. Resoluções biocatalíticas, de α -metileno- β -hidroxi ésteres com lipase de *Pseudomonas sp* livre e imobilizada.

O composto (*R,S*)-3-hidroxi-2-metileno-3-(2-naftil)-propanoato de metila (**12**), ainda não havia sido descrito na literatura, ele foi preparado e completamente caracterizado por dados espectroscópicos de IV e RMN (ver item 4.2.4).

Os acetatos racêmicos (**13**, **14**), usados como padrões para a análise no CG quiral, foram obtidos pelo tratamento dos compostos **10** e **11** com cloreto de acetila e trietilamina (MALLINCKROD) em CH₂Cl₂ (MALLINCKROD) a 0°C por 2h.^{70,71,73} Todos os compostos foram isolados com bons rendimentos (81% para o composto **13**), após purificação por coluna cromatográfica tipo flash (hexano/AcOEt 9:1). Forão completamente caracterizados por dados espectroscópicos de IV e RMN (ver item 4.2.5 e 4.2.6).

A enzima utilizada foi a lipase de *Pseudomonas sp.* (ou *Pseudomonas cepacia*) (30.000U/g, Amano 30). A lipase foi imobilizada em poli(óxido de etileno) – PEO (30.000 g/mol) (Aldrich Chemical Co.), montmorilonita K10 (Fluka) e sílica gel para cromatografia (Aldrich, 60-120 mesh). Os agentes acilantes utilizados foram o acetato de vinila e o acetato de iso-propenila (Fluka).

Em todas as reações utilizou-se hexano (Grupo Química) como solvente para o meio reacional. Este foi purificado através de lavagem com ácido sulfúrico e neutralização, seguida de destilação (p.e.=68°C; p.e.literatura=69°C).¹¹³ A pré-purificação dos produtos obtidos foi realizada por coluna cromatográfica de sílica (Carlo Erba, 0,05-0,20 mm).

4.2 Caracterização dos Compostos

Os espectros de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN¹H) foram obtidos em um espectrômetro da Bruker AC 200MHz, utilizando como referência interna tetrametilsilano (TMS, $\delta = 0,00$ ppm). O solvente utilizado nas análises foi clorofórmio deuterado.

Os cromatogramas e espectros de massas foram obtidos em um cromatógrafo a gás GC-MS-QP5000 da Shimadzu, equipado com coluna da Supelco (Simplicity 1 Capillary Column, 30 m x 0,25 mm x 0,25 μ m, N^o 11702-05B) instalado no Instituto de Química da UNICAMP. As determinações dos excessos enantioméricos dos produtos e substratos das reações de biocatálise foram realizadas no cromatógrafo gasoso da Shimadzu - GC-14B, com uma coluna capilar de fase estacionária quiral, CHROMPACK (chirasil - DEX CB 25m x 0,25mmID x 0,25 μ m). Nesta fase a molécula de β -ciclodextrina está quimicamente ligada ao filme de dimetilpolisiloxano. Esta ligação impede a ciclodextrina de migrar para as diferentes localidades na superfície do filme, pois está quimicamente ligada.

As condições de análise da CG-quiral foram determinadas para cada composto. Primeiramente, os padrões racêmicos previamente sintetizados foram submetidos a CG-quiral para obter as melhores condições de separação dos enantiômeros. Em seguida, os produtos de síntese foram analisados sob as mesmas condições. A programação utilizada para separar os enantiômeros dos substratos e produtos será mostrada quando os mesmos estiverem sendo citados.

As rotações ópticas específicas foram medidas em um Polarímetro-Polartronic E da Schmidt-Haensch.

4.2.1 Purificação e Identificação dos Produtos

As reações foram acompanhadas através de retiradas periódicas (intervalos de 24h) de alíquotas do meio reacional por análises por c.c.d, RMN¹H (200 MHz) e cromatografia gasosa (CG). Os produtos, identificados por

estas mesmas técnicas, também foram analisados por medidas de rotação óptica. As medidas de excessos enantioméricos foram determinadas por CG, com uma coluna quiral, e as condições de análises estão demonstradas na **Tabela 2**.

A purificação dos compostos de Baylis-Hillman e seus derivados acetatos racêmicos foi feita através de técnicas cromatográficas por cromatografia de coluna. Os rendimentos dos produtos foram determinados por análises quantitativas através do espectro de RMN ^1H e de cromatografia gasosa com fase quiral (β -CD).

Tabela 2. Condições de programação do GC-14B, para os diferentes substratos.

Parâmetros	Substratos*		
	Acetoacetato de etila	Acetofenonas	(R-S)- α -metileno- β -hidroxi ésteres
Temperatura Inicial	70 ⁰ C	90 ⁰ C	80 ⁰ C
Temperatura final	150 ⁰ C	150 ⁰ C	150 ⁰ C
Taxa de aquecimento	2 ⁰ C/ min.	3 ⁰ C/ min.	2 ⁰ C/ min.
Injetor: split, 200:1	250 ⁰ C	250 ⁰ C	250 ⁰ C
Detector: FID	275 ⁰ C	275 ⁰ C	275 ⁰ C
Pressão do gás carreador (H ₂)	75kPa	75kPa	75kPa
Volume da amostra	1 μL	1 μL	1 μL

* Utilizou-se hexano como solvente.

4.2.2 Caracterizações Espectroscópicas (R,S)-3-Hidroxi-2-Metilenobutanoate de Metila (10)

IV: 3426, 1734 and 1645 cm^{-1} ; RMN ^1H : δ 1.37 (d, 3H, J = 6.5 Hz), 2.79 (s, 1H), 3.78 (s, 3H), 4.62 (q, 1H, J = 6.5 Hz), 5.83 (s, 1H) e 6.21 (s, 1H).

4.2.3 Caracterizações Espectroscópicas (*R,S*)-3-Hidroxi-2-Metilenohexanoato de Metila (11)

IV: 3440, 2958, 2874, 1718 and 1630 cm^{-1} ; RMN ^1H : δ 0.94 (t, 3H, $J = 7.0$ Hz), 1.26-1.68 (m, 4H), 2.66 (broad s, 1H), 3.78 (s, 3H), 4.41 (t, 1H, $J = 6.0$ Hz), 5.80 (s, 1H) e 6.22 (s, 1H).

4.2.4 Preparação e Caracterização Espectroscópicas do (*R,S*)-3-Hidroxi-2-Metilen-3-(2-Naftil)-Propanoato de Metila (12)

Para uma solução contendo 260 mg de 2- naftaldeído (1,66 mmol) em 0,30 mL de acrilato de metila (3,33 mmol) foi adicionado 55 mg de DABCO (0,50 mmol), e a mistura foi deixada sob agitação por 72 h a 25°C. A reação foi então diluída em CH_2Cl_2 (10 mL), lavada com 5% HCl (5 mL) e H_2O (5 mL), seca com Na_2SO_4 e concentrada sob pressão reduzida. O resíduo sólido obtido foi filtrado em cromatografia tipo flash com sílica gel (hexano/AcOEt 9:1), e o solvente removido sob vácuo, fornecendo 325 mg do composto **12**, (81%); p.f. 98-99°C; IV: 3330, 3045, 1730 e 1645 cm^{-1} ; RMN ^1H (ppm): δ 3.71 (s, 3H); 5.73 (s, 1H); 5.87 (s, 1H); 6.37 (s, 1H); 7.47 (m, 3H) e 7.84 (m, 4H). Análise Elementar Calculada para $\text{C}_{15}\text{H}_{14}\text{O}_3$ (%): C, 74.36; H, 5.82. Encontrada: C, 74.13; H, 5.90.

4.2.5 Caracterizações Espectroscópicas (*R,S*)-3-Acetoxi-2-Metilenobutanoato de Metila (13)

IV: 1742 and 1634 cm^{-1} ; RMN ^1H : δ 1.40 (d, 3H, $J = 6.5$ Hz), 2.07 (s, 3H), 3.78 (s, 3H), 5.71 (q, 1H, $J = 6.5$ Hz), 5.82 (s, 1H) e 6.29 (s, 1H).

4.2.6 Caracterizações Espectroscópicas (*R,S*)-3-Acetoxi-2-Metilenohexanoato de Metila (14)

IV: 1726 and 1634 cm^{-1} ; RMN ^1H : δ 0.94 (t, 3H, $J = 7.0$ Hz), 1.30-1.70 (m, 4H), 2.08 (s, 3H), 3.71 (s, 3H), 5.62 (t, 1H, $J = 7.5$ Hz), 5.72 (s, 1H) e 6.27 (s, 1H).

4.3 Procedimentos de Proteção da Célula de *Saccharomyces cerevisiae* para Utilização em Reações de Redução em Meio Orgânico.

4.3.1 Procedimento Geral para a Adsorção e Recobrimento do FP

Uma suspensão com 2,0 g de FP seco e 6,0 g de montmorilonita K10, em aproximadamente 100 mL de água foi agitada vigorosamente por uma noite, à temperatura ambiente. A mistura de FP/K10 foi então filtrada a vácuo, seca sob corrente de ar e triturada até resultar em partículas finas. Uma solução de 0,5 g de gelatina em 5,0 mL de água foi aquecida até 50°C, e em seguida resfriada a $\pm 30^\circ\text{C}$ e misturada ao sólido FP/K10. A mistura FP/K10/G resultante foi seca sob corrente de ar.

4.3.2 Procedimento Geral para a Reação de Redução do Acetoacetato de Etila

Em um erlenmeyer foram colocados 100 mL de hexano, e em seguida o biocatalisador foi adicionado, sob agitação magnética. Para os sistemas com água ou solução de sacarose (S) ou trealose (T), esta foi gotejada lentamente sob agitação magnética vigorosa. Após a adição de 0,2 mL (1,57 mmoles) de acetoacetato de etila, as reações foram mantidas sob agitação em um banho termostatizado tipo Dubnoff a 20 e 30°C por 24 horas. As diferentes condições experimentais testadas estão mostradas na **Tabela 3**.

Todos os sistemas da **Tabela 3** foram comparados com o FP/T, FP/K10/G/T no qual o procedimento utilizado foi similar a adição de sacarose.

Tabela 3. Diferentes condições experimentais empregadas nas reações de redução de acetoacetato de etila em hexano^a.

Entradas	Sistemas	H ₂ O (mL)	FP ^b (g)	K10 ^c (g)	G ^d (g/mL)	Sacarose(S) (g)
1	FP	1,6	2,0	–	–	–
2	FP/S (ou T)	1,6	2,0	–	–	0,16
3	FP/G	1,6	2,0	–	0,1	–
4	FP/G/S (ou T)	1,6	2,0	–	0,1	0,16
5	FP/K10	1,6	2,0	6,0	–	-
6	FP/K10/S (ou T)	1,6	2,0	6,0	–	0,16
7	FP/K10/G	1,6	2,0	6,0	0,1	-
8	FP/K10/G/S (ou T)	1,6	2,0	6,0	0,1	0,16

a) Os experimentos foram realizados em duplicatas para comparação dos resultados; b) FP = fermento de pão; c) K10 = montmorilonita K-10; d) G = gelatina, temperaturas: 20 e 30°C.

4.3.3 Procedimento para a Reutilização do Biocatalisador na Reação de Redução do Acetoacetato de Etila

Após o término de cada reação e a filtragem a vácuo do sobrenadante e lavagem do suporte com hexano (3 x 30,0 mL), testou-se a reutilização dos sistemas. Foi adicionado novamente 0,2 g (1,57 mmoles) de acetoacetato de etila e 100 mL de hexano e colocado no banho termostatizado.

As reações de reutilização foram monitoradas conforme discutido no item 4.2.1.

4.4 Procedimento Geral para a Reação de Redução da α -Cloroacetofenona

Utilizaram-se as metodologias de adsorção e recobrimento já descritas. Todavia, as quantidades foram o dobro das utilizadas nos ensaios experimentais, pois verificou que para este substrato não há formação de produtos com as mesmas quantidades. Os melhores resultados foram obtidos

para a reação modelo com os sistemas FP/K10/G/S e FP/S. Estes dois sistemas determinaram portanto, os ensaios de redução da α -cloroacetofenona em diferentes tempos (24, 48 e 72 horas) e temperaturas (20 e 30°C). A estereosseletividade foi avaliada nestas condições. Para cada sistema (FP/K10/G e FP), foram adicionados 50 mL de hexano e estes submetidos à agitação magnética. Com uma bomba peristáltica e agitação magnética vigorosa, foram adicionadas vagarosamente uma solução de 0,32 g de sacarose ou trealose em 3,2 mL de água. Sob agitação tipo Dubnoff foram adicionados 0,2 g (1,3 mmoles) de α -cloroacetofenona. Após 24, 48 e 72 horas de reação, o meio reacional foi separado do suporte por filtração, pré-purificado em uma coluna cromatográfica de sílica para eliminar partículas provenientes do FP, e o solvente evaporado em evaporador rotatório. A análise da mistura reacional foi realizada por CG com fase estacionária quiral, utilizando-se o hexano como solvente.

4.4.1 Procedimento para a Reutilização do Biocatalisador na Reação de Redução da α -Cloroacetofenona

A reutilização dos dois sistemas foi testada, adicionando-se novamente 0,2 g (1,3 mmoles) de α -cloroacetofenona e 50 mL de hexano; após a filtragem a vácuo do sobrenadante e lavagem do suporte com hexano (3 x 30,0 mL) sob agitação magnética. Estas reações foram monitoradas conforme descrito no item 4.2.1.

4.5 Procedimento Geral para Reações de Redução Enantiosseletiva de Diferentes Cetonas

As reações de redução do acetoacetato de etila e α -cloroacetofenona foram estudadas utilizando FP livre e FP imobilizado em K10.¹¹¹ As melhores quantidades e condições foram utilizadas para outros substratos. Aos sistemas FP/K10/G e FP sem proteção, em 50 mL de hexano, foram adicionados 3,2 mL de solução de sacarose 10%(S). Os sistemas FP/K10/G/S e FP/S foram

utilizados nas reações de redução de diferentes acetofenonas pró-quirais: acetofenona, p-nitroacetofenona, 4-hidroxiacetofenona, 4-metoxiacetofenona, 3-hidroxi-4,5-dimetilacetofenona, 3,4-dimetoxiacetofenon e 3,4,5-trimetoxiacetofenona. Adicionou-se 1,3 mmols de substrato em 50 mL de hexano.

As reações foram mantidas sob agitação em banho de água termostaticado (tipo-Dubnoff) a 20°C e/ou 35°C. Foram coletadas alíquotas a cada 24h por 30 dias, as quais foram analisadas por CG quiral.

4.6 Procedimento para as Reações Controle

Para todas as biotransformações, as reações controle foram realizadas utilizando FP sem qualquer método de imobilização. O procedimento geral para estas reações foi a adição das mesmas quantidades de FP, solvente e reagentes que as utilizadas nas reações com o FP imobilizado. Como exemplo, estudou-se a redução do acetoacetato de etila 0,2 mL (1,57 mmoles) na presença de 2,0 g de FP em 50 mL de hexano (**Tabela 3, Entrada 1**).

4.7 Procedimentos para a Resolução Biocatalítica de α -Metileno- β -Hidroxi Ésteres – Produtos de Baylis Hillman

4.7.1 Imobilização da PS em Filme de Poli-oxi-etileno (PEO)

Solubilizou-se 500 mg de PEO em 25 mL de água, com agitação constante por 12 horas. Após este período, quantidades conhecidas (50-500 mg) da lipase de *Pseudomonas sp* (PS) foram adicionadas e o sistema foi mantido sob agitação constante por mais 4 horas. A seguir, esta mistura foi colocada em placa de petri e o solvente foi evaporado a temperatura ambiente para a formação do filme. Este foi cortado em pedaços de aproximadamente 3mm² e adicionado no meio reacional. A lipase de *Pseudomonas sp* é equivalente a *Pseudomonas cepacia*.^{114,115}

4.7.2 Imobilização da PS em Sílica e K10

Foi feita uma suspensão da lipase (PS) em água com concentração de 10 mg/mL. Esta foi misturada com sílica gel (500 mg) ou K10 (500 mg), em 10 mL de água, a temperatura ambiente. Após 5 horas de agitação a mistura foi filtrada e o sistema resultante (PS/sílica ou PS/K10) seco em corrente de ar por uma noite.

4.7.3 Procedimento Geral para Resolução Biocatalítica

A resolução enzimática dos α -metileno- β -hidroxi ésteres, obtidos da reação de Baylis-Hillman, foi realizada com os sistemas PS livre(PSL) e PS imobilizada em PEO, sílica ou K10 (PS/PEO, PS/sílica ou PS/K10). Com a PS livre em 50 mL de hexano, adicionou-se 21,6 mmoles do agente acilante (acetato de vinila e/ou de iso-propenila) e 7,8 mmol dos substratos.

Para o sistema PS/PEO, PS/sílica ou PS/K10 utilizou-se somente o acetato de vinila como agente acilante (21,6 mmoles) em 50 mL de hexano e 1,4 mmol de substrato. As reações foram realizadas em um banho termostatizado tipo Dubnoff a 35°C.

Para a determinação da porcentagem de conversão e excessos enantioméricos, fez-se uso da CG quiral, (item 4.2). A razão enantiomérica (E) foi obtida a partir das **Eq. 2 e 3**, p.16.

4.7.4 Procedimento para Reutilização do Biocatalisador na Resolução Biocatalítica do (R,S)3-Hidroxi-2-Metilenobutanoato de Metila (10)

Foram realizados testes preliminares para a reutilização da lipase PS livre. Após a utilização da PS/livre na resolução biocatalítica do (R,S)3-hidroxi-2-metilenobutanoato de metila (**10**), decantou-se o sobrenadante e lavou-se a enzima com hexano (4x) para retirar os reagentes ou produtos retidos. Esta avaliação foi feita por ccd.

A primeira reutilização foi feita após a enzima ter sido estocada em hexano (50 mL) por 24 horas sob refrigeração. A seguir, adicionou-se 21,6 mmoles de acetato de vinila e 7,8 mmol do (*R,S*)3-hidroxi-2-metilenobutanoato de metila (**10**). A segunda reutilização da PS/livre foi realizada após 30 dias de estocagem nas mesmas condições anteriores. Todas as reações foram monitoradas por CG quiral (item 4.2.1).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados serão apresentados e discutidos primeiramente para as diferentes metodologias de proteção das células de *Saccharomyces cerevisiae* (FP), verificando a eficiência dos sistemas em reações de redução de compostos carbonílicos. Na seqüência será apresentada e discutida a influência da adição de trealose e sacarose nas reações de redução mediadas por FP, em solvente orgânico. Posteriormente, serão apresentados os resultados obtidos para a resolução dos produtos das reações de Baylis-Hillman, via transesterificação enzimática.

5.1 Metodologias de Proteção das Células de *Saccharomyces cerevisiae*

5.1.1 Redução Enantiosseletiva do Acetoacetato de Etila Mediada por Fermento de Pão: Padronização das Metodologias de Imobilização

A reação de redução do acetoacetato de etila foi utilizada como modelo em todos os estudos dos processos de imobilização e recobrimento, com a finalidade de padronizar uma metodologia para os outros substratos, **Figura 18**.

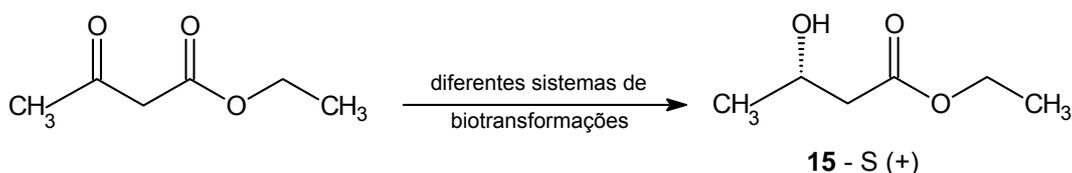


Figura 18. Redução biocatalítica do acetoacetato de etila.

Muitos detalhes desta reação modelo são bem conhecidos, principalmente considerando-se que o valor do excesso enantiomérico do álcool produzido pode ser facilmente monitorado por CG com uma coluna com fase estacionária quiral. Além disto, β -hidroxiésteres enantiomericamente puros tem sido usados como precursores importantes, que podem servir como intermediários ou

blocos de construção quirais (“chiral building blocks”) na síntese de diversos compostos de importância biológica.

Entre vários exemplos, o (S)-(-)-3-hidróxi-butanoato de etila é um dos álcoois quirais mais utilizados como precursor, por exemplo dos compostos: (S)-(+)-sulcatol que é um insumo importante para a síntese de outros produtos naturais; (R)-lavandulol que é um aditivo importante na indústria de perfumes e o (R)-(+)-recifeiolídeo, um macrolídeo natural isolado de *Cephalosporum recifei*.^{101,116}

Estudos anteriores realizados por Moran e col.^{35,91} demonstraram que a relação ideal de FP fresco (que contem 70% de umidade) e K10 é de 1:1. Neste trabalho foi usado o FP desidratado e a proporção biocatalisador : suporte, foi 1:3. Não foi observada qualquer diferença na obtenção do produto final, após a hidratação do FP, antes de sua adsorção em K10 com solução de KCl (2%) e sacarose (razão de sacarose/ FP 1:1).

Sabe-se que a utilização de água entre 0,2 a 1,2 mL de água por grama de fermento seco, adicionadas ao meio reacional é indispensável para que ocorra a reação.^{94,96, 97,101}

Foram realizados testes para estabelecer a quantidade ideal de água, dentro da faixa estipulada pela literatura como aceitável, que pode ser adicionada ao meio sem alterar a morfologia dos sistemas em estudo (FP, FP/K10, FP/G, FP/K10/G). O valor máximo de água adicionada foi de 0,8 mL por grama de FP, quantidade esta que ainda preserva a área superficial dos sistemas de ser diminuída por aglutinação.

Além do hexano como solvente, foi também testada uma mistura de acetato de etila/hexano (20:80). Neste caso, a formação de produto não foi detectada por CG quando utilizaram-se os sistemas FP/K10 e FP/K10/G (**Tabela 3, Entradas 5 e 7**, p. 46).

Porém, para o sistema de reação FP (**Tabela 3, Entrada 1**, p. 46) a porcentagem de conversão foi de apenas 42%. Isto ocorreu provavelmente devido à inativação das células causada pelo aumento da polaridade do

solvente. A interação entre o solvente orgânico e a água de hidratação das enzimas dependerá da natureza do solvente. Solventes hidrofílicos tendem a remover ou distorcer a proteção destas camadas de água. A água intracelular dos microorganismos tende a ser retirada por esta classe de solvente, inativando o sistema enzimático do microorganismo. Assim, os solventes hidrofóbicos interagem menos com a água e são os mais adequados para reações em meio não aquoso.^{96,97}

Realizaram-se os cálculos de rendimentos para a obtenção do (S)-(+)-3-hidróxi-butanoato de etila (**15**), utilizando os sistemas: FP/K10 e FP/K10/G (**Tabela 3, Entradas 5 e 7**, p. 46). As reações foram mantidas sob agitação magnética por 24 horas à 20°C.

Após 24 horas de reação, pode-se constatar, através das análises por CG-EM do produto final com os dois sistemas, que apenas o (S)-(+)-3-hidróxi-butanoato de etila havia sido formado. Através de pesagens em balança analítica obteve-se 27,2% do produto da reação com o sistema FP/K10/G e 19,9% com o sistema FP/K10.

A partir destes resultados, concluiu-se que o restante do produto da reação ficou retido nos sistemas FP/K10/G e FP/K10. Isto também foi confirmado quando realizou-se a lavagem do suporte com acetato de etila (através de agitação magnética 3 x 30,0 mL), para tentar extrair o máximo de produto que eventualmente teria ficado retido no suporte. Conseguiu-se extrair mais 45,9% e 41,8% de produto da reação de redução com os sistemas FP/K10/G e FP/K10, respectivamente. Estes resultados foram também confirmados por CG-EM. Os rendimentos totais obtidos foram de 73,1% utilizando o FP/K10/G e 61,7% com FP/K10.

Com este procedimento de lavagem para retirada dos produtos retidos nos suportes, verificou-se que estes sistemas não puderam ser mais reutilizados devido à inativação das células de *Saccharomyces cerevisiae* pelo acetato de etila. Então, adotou-se a lavagem com hexano (3 x 30,0 mL) sob agitação magnética, após o término de cada reação para obter um maior rendimento. Mesmo não sendo o melhor solvente para extração, ele garante

uma maior preservação das células para os estudos de reutilização. Como foi padronizada a metodologia para todos os sistemas, o erro ocorrido por não extrair todo o reagente e produto dos suportes, foi sistemático e não deverá influenciar na análise dos resultados.

Conforme esperado, não houve formação de produto quando a reação foi realizada na presença de K10 sem a adição de FP, ou com FP sem a adição de água, evidenciando a sua importância nas biotransformações.

Os resultados obtidos para a redução do acetoacetato de etila à 20°C, com os diferentes sistemas de imobilização do FP em função do número de reutilizações, estão apresentados na **Figura 19**.

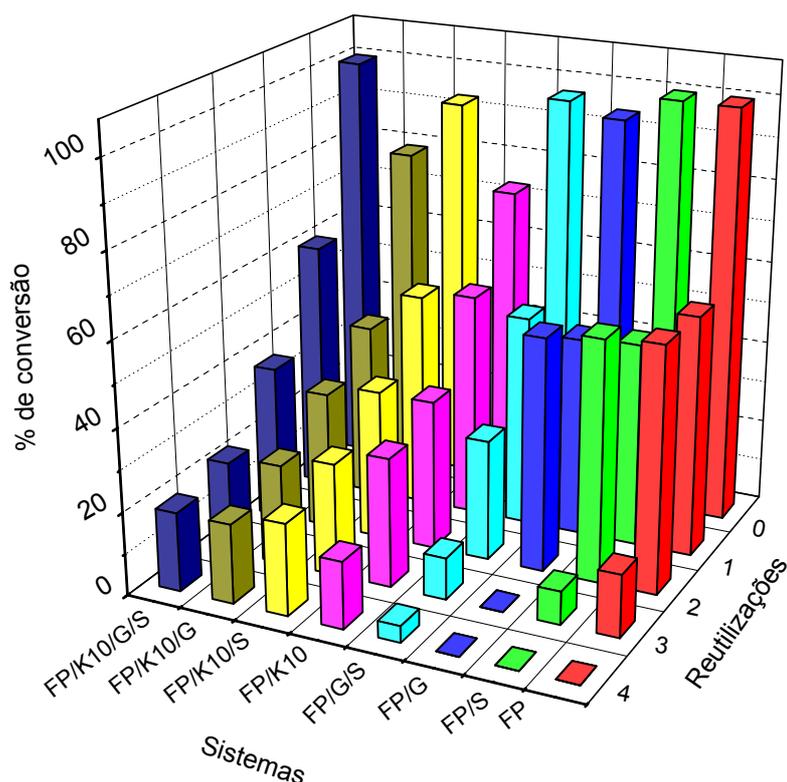


Figura 19. Porcentagem de conversão (%c) do acetoacetato de etila em (S)-(+)-3-hidroxi-butanoato de etila mediada por FP em diferentes sistemas de imobilização e em função do número de reutilizações, em hexano a 20°C.

Verificou-se por CG quiral que com os sistemas FP, FP/S e FP/K10/G/S a 20°C, após 24 horas de reação, obteve-se 100% de conversão ao produto (S)-(+)-3-hidroxi-butanoato de etila. Com os outros sistemas (FP/K10, FP/K10/S, FP/G, FP/G/S, FP/K10/G) foram também obtidas excelentes porcentagens de conversão, sendo de 73-94%. O melhor sistema de proteção das propriedades catalíticas das enzimas nas células de *Saccharomyces* foi FP/K10/G/S. Observou-se a biorredução do acetoacetato de etila para o **15**-(S)-(+), enantiomericamente puro, com conversão de 19% na quarta reutilização, sem a formação de subprodutos.

Nas reações efetuadas a 30°C, também foram obtidos 100% de conversão para o produto utilizando os sistemas FP, FP/S e FP/K10/G/S. Com o sistema FP o valor de %c diminuiu para 7% na primeira reutilização. Com o sistema FP/K10/G/S, obteve-se o produto com 19% de conversão na primeira reutilização, mostrando uma modesta proteção para as células do FP. Após a primeira reação, todos os sistemas foram avaliados em até quatro reutilizações.

Os resultados obtidos para a redução do acetoacetato de etila a 30°C, com os diferentes sistemas de imobilização do FP em função do número de reutilizações, estão apresentados na **Figura 20**.

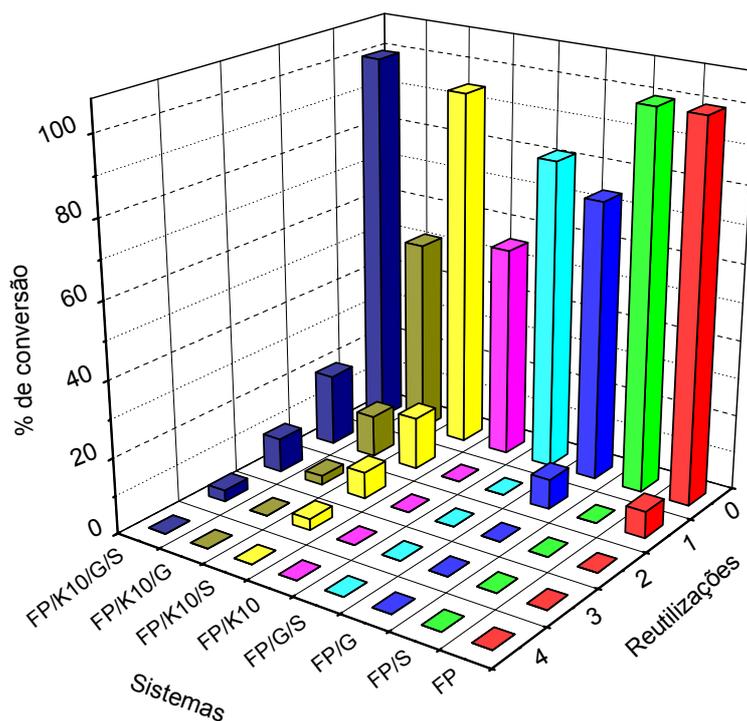


Figura 20. Porcentagem de conversão (%c) do acetoacetato de etila em (S)-(+)-3-hidroxi-butanoato de etila, mediada por FP, em diferentes sistemas de imobilização e em função do número de reutilizações, em hexano a 30 °C.

Através da análise das **Figuras 19 e 20**, pode-se verificar que a partir da segunda reutilização, ou seja a terceira reação a que o sistema foi submetido, as porcentagens de conversão diminuíram significativamente, principalmente a 30°C. Esta diminuição tornou-se menos acentuada quando sistemas de proteção, na presença de sacarose, foram empregados.

A temperatura exerceu influência na desativação das redutases do FP.⁹⁸ Como conseqüência, provavelmente ocorreu a desativação das enzimas após 24 horas e obtiveram-se valores de conversão menores do que quando as reações foram realizadas a 20 °C .

Independente do método de imobilização e da temperatura, os valores de ee, analisados por CG quiral, foram superiores a 99%. Em todos experimentos apenas um enantiômero foi detectado. As condições

cromatográficas pré-estabelecidas para a separação dos enantiômeros e as medidas de rotação ótica $[\alpha]_D^T$ (**Tabela 6**, p.66) indicaram a formação apenas do (S)-(+)-3-hidroxi-butanoato de etila.^{85,117}

A configuração absoluta dos produtos de redução por FP pode ser racionalizada pela regra de Prelog.¹¹ A adição de hidreto para o átomo de carbono carbonílico é estereocontrolada para que um dos enantiômeros do álcool secundário seja formado predominantemente. O modo preferencial de redução é geralmente estabelecido pelo tamanho dos substituintes ligados ao grupo carbonílico.⁷

Utilizando os sistemas FP/K10, FP/G e FP/K10/G sem a adição de sacarose, a %c diminuiu consideravelmente em relação aos mesmos com adição de sacarose, nas temperaturas de 20 e 30°C. Estes resultados podem estar associados ao fato de que a sacarose, da mesma forma que a trealose não está atuando somente como reserva de carboidrato, mas também como proteção para as células de *Saccharomyces cerevisiae* contra o estresse do meio reacional causado pela presença de solvente orgânico e aumento da temperatura.^{107,108,110} Os resultados são apresentados na **Tabela 4**.

Tabela 4. Porcentagem de conversão (%c) do acetoacetato de etila em (S)-(+)-3-hidroxi-butanoato de etila com FP imobilizado em diversos sistemas, em hexano.

Sistemas	c (%), 20 °C	c (%), 30 °C
FP	100	100
FP/S	100	100
FP/K10	73	56
FP/K10/S	93	95
FP/G	94	74
FP/G/S	97	82
FP/K10/G	79	52
FP/K10/G/S	100	100

Tempo reacional: 24 horas

Com os sistemas FP/K10 e FP/G as diferenças nas conversões ao produto foram as maiores, sendo de 73 e 94% respectivamente. Provavelmente, isto ocorreu devido a menor retenção do reagente e produto nas redes poliméricas da gelatina (G), quando comparado ao K10. Este resultado também pode estar associado à maior estabilidade do FP pela maior quantidade de água presente na estrutura da gelatina.

Constatou-se também que se o FP não imobilizado permanecer por mais de 24 horas em contato com o solvente orgânico, há o aparecimento de subprodutos, que foram detectados por análises cromatográficas. Porém, com o sistema FP/K10/G/S houve uma maior resistência quanto à formação de subprodutos. Estes não foram detectados por CG quiral. O aparecimento de subprodutos pode estar relacionado à possibilidade de rompimento da parede celular, devido ao lixiviamento desta pelo solvente orgânico ou pelo aumento da temperatura, fazendo com que o material intracelular migre para o meio reacional.

5.1.2 Redução Enantiosseletiva da α -Cloroacetofenona Mediada por Fermento de Pão

Os produtos obtidos na redução estereosseletiva de α -haloacetofenonas são de grande interesse. Eles podem ser usados para obtenção de halodrinas que são blocos de construção quirais para alguns produtos naturais e fármacos opticamente ativos.¹¹⁸

A biorredução da α -cloroacetofenona tem sido realizada com FP em meio aquoso e em diversos sistemas como exemplificado abaixo:^{91,118}

√Reações de redução com adição de pequenas quantidades de $ZnSO_4$, ou sem adição de sacarose, mas empregando uma grande quantidade de FP. O estudo da adição lenta do substrato foi efetuado para observar o efeito da concentração deste no meio reacional, sabe-se que à baixa concentração do substrato o rendimento químico aumenta mas a pureza ótica é moderada. Nestes casos o melhor sistema foi sem a adição de sacarose.^{18,119}

√Imobilização do FP em crisotila, com e sem adição da solução de KCl e sacarose. Neste caso, observou-se a mudança na estereoquímica do produto e após a reutilização do sistema imobilizado isolou-se o (S)-álcool.³⁵

Neste trabalho, a reação de redução foi realizada em meio orgânico, **Figura 21.**

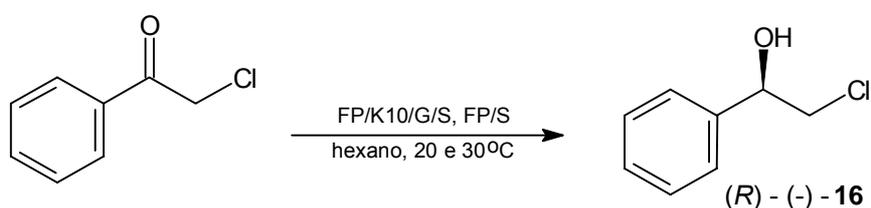


Figura 21. Redução biocatalítica da α -cloroacetofenona.

Os dados de %c e ee (%) para formação do (R)-(-)-2-cloro-1-feniletanol (**16**), estão mostrados na **Tabela 5.**

Tabela 5. Porcentagem de conversão da α -cloroacetofenona em *R*-(-)-2-cloro-1-feniletanol e os valores de ee obtidos em diferentes condições experimentais.

Sistemas	ee % ^a (%c) ^b 24h		ee % ^a (%c) ^b 48h		ee % ^a (%c) ^b 72h	
	20°C	30°C	20°C	30°C	20°C	30°C
FP/S	60 (30)	56 (19)	56 (26)	55 (39)	56 (26)	60 (35)
FP/K10/G/S	77 (10)	73 (9)	77 (15)	73 (10)	79 (10)	78 (19)

^a ee determinado por CG quiral.

^b determinados por RMN ¹H.

Os valores de ee obtidos com o sistema FP/K10/G/S (ee 73-79%) foram sempre maiores que para FP/S (ee 55-60%), independente do tempo e da temperatura. As porcentagens de conversão usando o sistema FP/K10/G/S (9-19%) foram menores que para FP/S (19-39%). Estes resultados também sugerem uma maior dificuldade de difusão do reagente e produto do suporte para o meio reacional e vice-versa, isto é causado pelo sistema duplo de proteção (G e K10).

Foram realizados testes para verificar se ocorria inversão de configuração ao reutilizar estes sistemas nestas condições experimentais, considerando que este resultado já foi observado em meio aquoso.^{35,91}

Entretanto, não foi constatado a inversão de configuração do álcool obtido quando os sistemas foram reutilizados, e que a %c foi menor que 5%.

Este resultado mostra que o sistema de proteção FP/K10/G/S para a parede celular ainda não foi eficiente quando um substrato tóxico como a α -cloroacetofenona foi utilizada em hexano, sugerindo a desativação das oxireductases.

5.1.3 Redução Enantiosseletiva de Acetofenonas Mediada por Fermento de Pão

Dando continuidade aos estudos de redução de compostos carbonílicos via biocatalítica, avaliou-se a eficiência desta metodologia para a redução de diversas acetofenonas. As estruturas dos compostos estudados estão representadas na **Figura 22**.

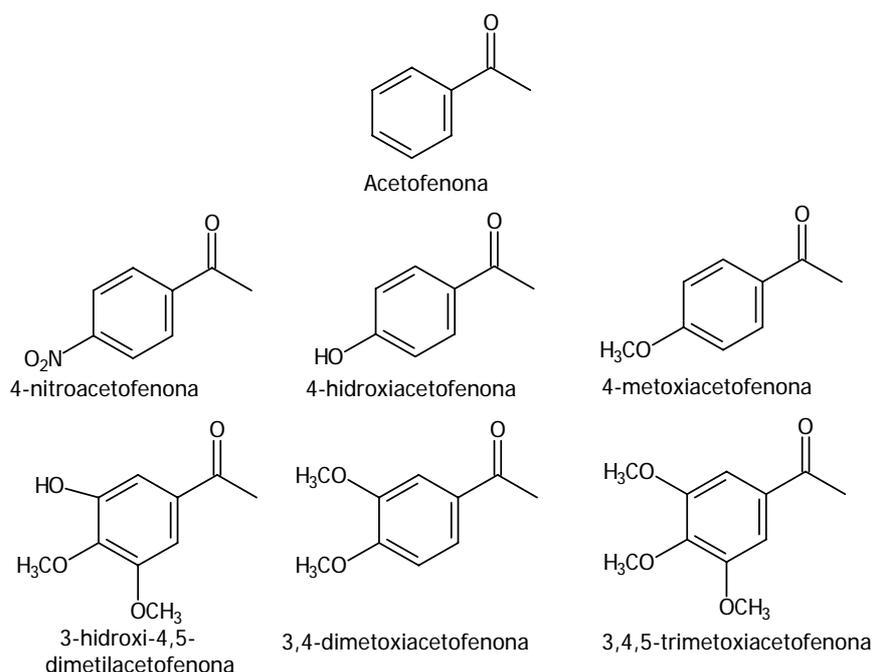


Figura 22. Estruturas das acetofenonas.

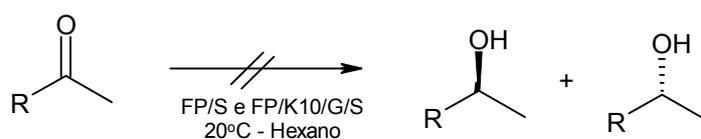
Os biocatalisadores catalisam reações muito específicas. Porém, este como qualquer outro será eficiente desde que não haja nenhum efeito estérico ou eletrônico que impeça que a reação ocorra.

Trabalhos recentes da literatura mostraram que as desidrogenases que atuam no FP aceitam uma faixa limitada de cetonas como substratos.¹²⁰ Cetonas de cadeias longas, tais como n-propil-n-butilcetonas e diversas fenil cetonas volumosas não são bons substratos.¹¹

Entretanto, neste trabalho foram obtidos resultados bastante satisfatórios com a α -cloroacetofena. Após 48 horas de reação, obteve-se o produto com ee de 80% e %c de 45% (item 5.2.2).

A α -cloroacetofenona possui um átomo de cloro próximo ao carbono carbonílico que foi reduzido. Devido à alta eletronegatividade do cloro, o caráter eletrofílico do carbono carbonílico é maior, e este foi atacado pelo hidreto com maior facilidade.

As outras acetofenonas submetidas à reação de redução não contém um grupo retirador de elétrons próximo ao centro reacional e apenas substituintes doadores e retiradores no anel aromático. Para estes substratos não foi observado a formação dos álcoois correspondentes, mesmo após 30 dias. (**Figura 24**).



R= fenil, 4-nitrofenil, 4-hidroxifenil, 4-metoxifenil, 3-hidroxi-4,5-dimetilfenil, 3,4-dimetoxifenil, 3,4,5-trimetoxifenil

Figura 23. Reação de biotransformação de diferentes acetofenonas, utilizando o FP como biocatalisador.

Para explicar estes resultados deve-se analisar cuidadosamente as estruturas dos substratos, uma vez que as reações foram realizadas nas mesmas condições da α -cloroacetofenona.

Postula-se que efeitos por impedimento estérico não devem ser os mais importantes, pois a α -cloroacetofenona possui estrutura semelhante às outras testadas. Portanto, os efeitos eletrônicos deverão ser os mais efetivos.

Grupos doadores de elétrons (OH, OMe) no anel aromático devem diminuir o caráter eletrofílico do carbono carbonílico, e portanto dificultar a reação de redução. Porém, seria esperado que a presença de um grupo

fortemente retirador na p-nitroacetofenona pudesse facilitar esta reação e formar o produto de redução. Nas condições experimentais testadas não foi verificada a formação do álcool correspondente, mesmo para este substrato.

A **Figura 24**, mostra o cromatograma para uma alíquota da reação de redução da p-nitroacetofenona com o sistema FP/K10/G/S após 30 dias a 20°C.

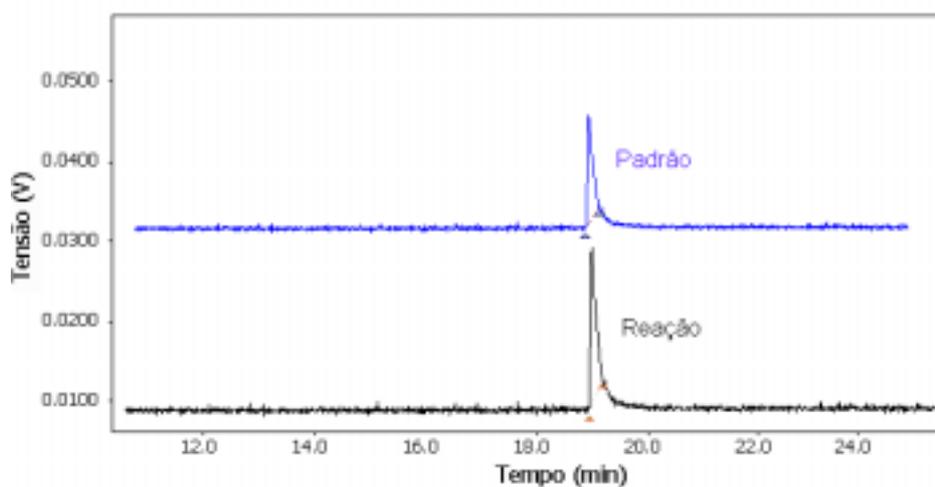


Figura 24. Cromatograma obtido por CG de uma alíquota da reação de redução da p-nitroacetofenona com o sistema FP/K10/G/S, sobreposto com o reagente (padrão) utilizado para a reação. (20°C e 30 dias)

Conforme mencionado anteriormente, para as outras acetofenonas os resultados foram semelhantes e não foi detectada a formação do produto de redução por CG quiral. Estes resultados evidenciam a importância dos efeitos eletrônicos próximos ao carbono carbonílico. Outras metodologias e/ou condições experimentais deverão ser testadas.

5.2 Influência da Adição de Sacarose e Trealose nas Reações de Redução Enantiosseletiva do Acetoacetato de Etila e α -Cloroacetofenona

Até o momento, nenhum estudo sistemático foi realizado para esclarecer a influência da adição de açúcares em reações de redução por fermento de pão (FP) de cetoésteres e α -haloacetofenonas em solventes orgânicos.

Moran e col. realizaram estudos da influência da adição de carboidratos em reações de redução de α -haloacetofenonas com FP em água. Assumiram que a presença de sacarídeos nas células de FP pode produzir NADH ou NADPH e conseqüentemente ter poder de redução mesmo sem a necessidade da adição complementar de sacarose.¹¹⁹

Os resultados aqui apresentados serão discutidos separadamente, analisando a influência dos açúcares em cada um dos substratos utilizados com os diferentes sistemas de imobilização.

5.2.1 Redução do Acetoacetato de Etila por Fermento de Pão (FP)

As reações de redução biocatalítica do acetoacetato de etila foram acompanhadas com a retirada de alíquotas em intervalos de 24 horas, e em paralelo foram realizados os ensaios de reutilização. Nestes, o tempo de reação foi de 24 horas, e a seguir adicionou-se ao sistema as mesmas quantidades de solvente e substrato, para avaliar assim sua eficiência, (**Figura 25**).

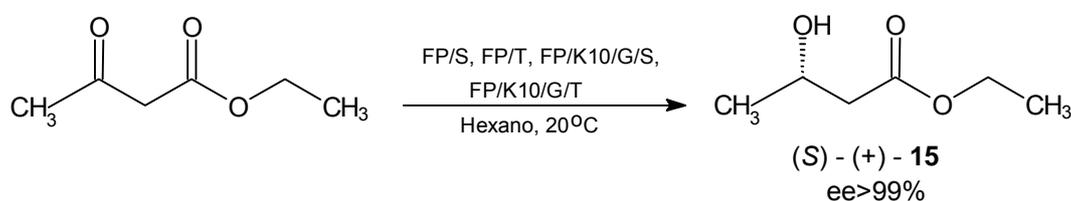


Figura 25. Reação de redução enantiosseletiva do acetoacetato de etila, com diferentes sistemas.

Os resultados de conversão (%c) e excessos enantioméricos (%ee) (obtidos a partir da razão das áreas entre substrato e produto nos cromatogramas) para a redução do acetoacetato de etila foram os mesmos para os vários sistemas utilizados. Nestes experimentos, o álcool (S)-(+)-3-hidroxi-butanoato de etila (**15**) sempre foi obtido com conversão e ee >99%.

Postula-se com estes resultados que a sacarose pode atuar como fonte de carbono e/ou proteção adicional para as células de *Saccharomyces cerevisiae*. Para todos os sistemas utilizados, apenas um dos picos dos enantiômeros foi detectado, como mostra a **Figura 26**.

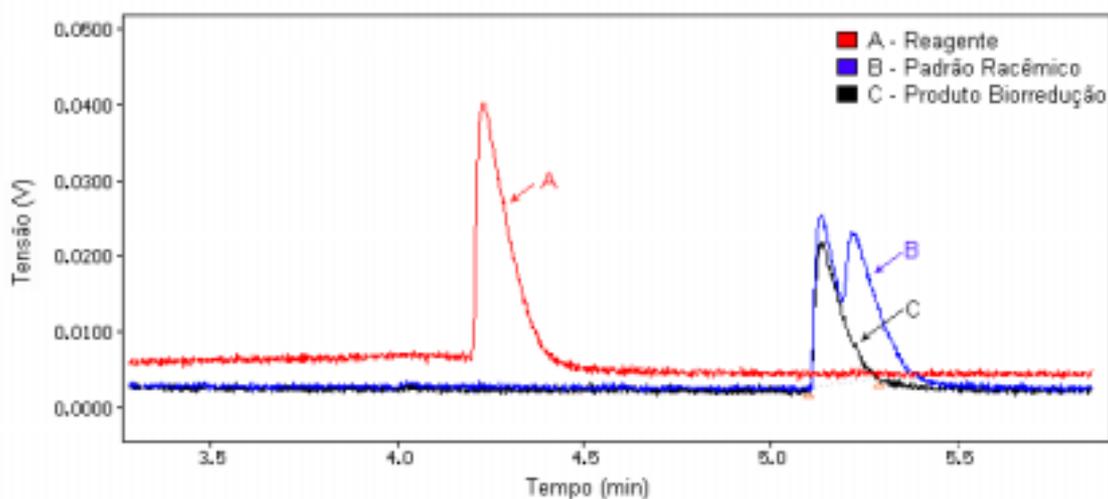


Figura 26. Cromatograma obtido por CG de: (A) acetoacetato de etila; (B) álcool racêmico e (C) alíquota da reação de redução biocatalítica com o sistema FP/S à 20°C, 24h. (ee=99% e %c=100%)

As condições cromatográficas pré-estabelecidas para a separação dos enantiômeros e as medidas de rotação ótica ($[\alpha]_D^T$), demonstrados na **Tabela 6**, indicaram a formação do (S)-(+)-3-hidroxi-butanoato de etila puro, de acordo com dados da literatura.^{85,117,121}

Tabela 6. $[\alpha]_D^{23}$ para o (S)-(+)-3-hidroxi-butanoato de etila em clorofórmio.

$[\alpha]_D^{23}$ Experimental	$[\alpha]_D^{20}$ Lit. ¹²¹
+41,8	+43

A reutilização dos suportes foi avaliada até quatro vezes. Observou-se que para todos os sistemas, após a primeira reutilização, a conversão diminuiu consideravelmente, como é mostrado na **Tabela 7**.

Tabela 7. Porcentagem de conversão para reação de redução do acetoacetato de etila em (S)-(+)-3-hidroxi-butanoato de etila, em sucessivas reutilizações.

Sistemas	CONVERSÃO (%)				
	Número de Reutilizações dos Sistemas				
	0	1	2	3	4
FP/K10/G/S	100	60	37	22	19
FP/K10/G/T	100	63	40	25	20
FP/S	100	65	26	7	2
FP/T	100	49	58	8	0

* Para todos os sistemas utilizados, e independente do número de reutilizações, os ee foram sempre >99%.

Quando se analisam os resultados da **Tabela 7**, pode-se constatar que o papel principal da sacarose é como agente protetor da parede celular do microorganismo exatamente da mesma forma que a trealose, não ocorrendo valores discrepantes de %c nos resultados obtidos. No entanto, observa-se que independente do açúcar e/ou método de imobilização, ocorreu uma diminuição na conversão do acetoacetato de etila ao correspondente (S)-(+)-

álcool, após a primeira reutilização. É evidente que a imobilização do fermento de pão em K-10, revestido com gelatina, resultou em uma maior estabilidade do biocatalisador, refletida nos valores de conversão. Após a imobilização também houve uma maior proteção das células da toxicidade do solvente orgânico.

5.2.2 Redução da α -Cloroacetofenona por Fermento de Pão (FP)

As reações de redução da α -cloroacetofenona foram também realizadas com o fermento de pão imobilizado nos diversos sistemas (**Figura 27**).

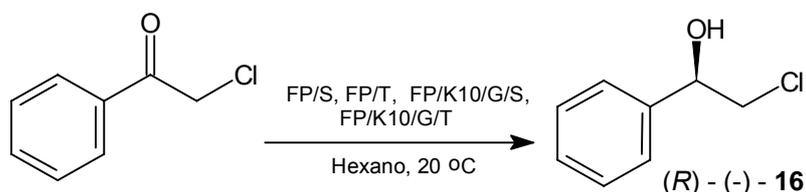


Figura 27. Reação de redução enantiosseletiva da α -cloroacetofenona.

As reações de redução foram acompanhadas por retiradas de alíquotas em intervalos de 24 h. Observa-se que para esta reação o sistema FP/K10/G/T foi eficiente para a proteção do FP, sendo que os produtos foram obtidos com altos valores de ee (>99%). No entanto, com este sistema foram obtidos baixos valores de %c (<10%), mesmo após 192 horas de reação.

Com o sistema de FP/T os resultados foram mais satisfatórios para a redução da α -cloroacetofenona. Após 48 horas de reação, obteve-se o produto com ee de 80% e %c de 45%, (**Figura 28**).

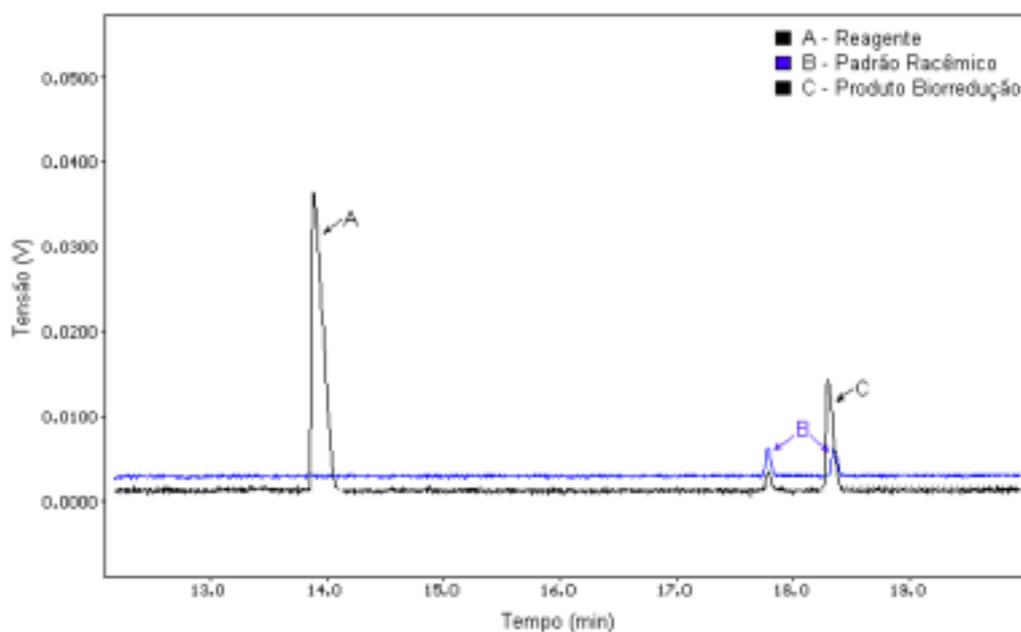


Figura 28. Cromatograma obtido por CG para a alíquota da reação de redução da α -cloroacetofenona (A) com o sistema FP/T à 20°C e 48h. O produto (C) da biotransformação está sobreposto com o padrão racêmico (B). (ee=80% e %c=45%)

Os valores de ee e %c variaram dependendo das condições experimentais e do sistema de proteção das células de FP como mostra a **Figura 29.**

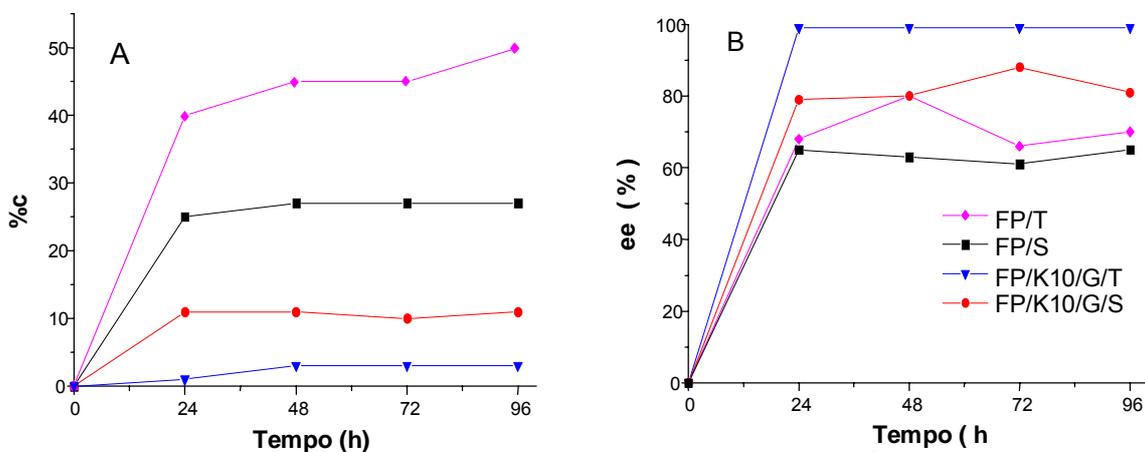


Figura 29. Variação da conversão, (%c) (A) e do ee, (%ee) (B) em função do tempo para a reação de redução da α -cloroacetofenona em diferentes sistemas, a 20^oC.

Utilizando o sistema FP/K10/G/T as porcentagens de conversão foram menores que para o sistema FP/K10/G/S, mas os valores de %ee sempre foram maiores que 99%, levando à formação do produto com alta pureza óptica. No entanto, a conversão foi baixa para os dois sistemas FP/K10/G/S e FP/K10/G/T, provavelmente devido à dificuldade da difusão. As células mais protegidas após imobilização, dificultam a entrada deste substrato e saída do produto, diferentemente da biorredução com acetoacetato de etila, onde os sistemas protegidos apresentam valores altos de %c. Porém, esta proteção é muito importante para a célula, pois aumenta a sua estabilidade em meio orgânico, e a enantiosseletividade é maior.

O efeito de proteção da trealose no sistema catalítico é evidenciado pelos resultados apresentados com o sistema FP/T, sendo que a maior conversão em (*R*)-(-)-2-cloro-1-feniletanol foi de 45% e ee de 80%, após 48h de reação.

Sabe-se que as células de *Saccharomyces cerevisiae* contêm várias enzimas oxi-redutases que podem atuar na redução de cetonas. Nakamura e col. isolaram algumas e testaram em reações de redução de cetonas adicionando o cofator NADH.¹²²

Uma das possibilidades para obter baixo valor de ee é a presença de redutases pró-R e pró-S, reduzindo o substrato ao mesmo tempo. Nesse caso, o efeito da concentração do substrato sobre a estereoseletividade poderá ser observado quando enzimas pró-R e pró-S apresentarem valores diferentes das constantes de Michaelis (K_M). A enantiosseletividade pode ser aumentada em baixa concentração do substrato, quando o K_M da enzima provavelmente é menor que as outras.¹²³

Portanto, considerando a maior dificuldade de difusão com os sistemas FP/K10/G/S e FP/K10/G/T, é prevista uma baixa concentração do substrato em contato com as enzimas redutoras, favorecendo as pró-R e formando o produto com altos valores de ee.

5.3 Resolução Biocatalítica dos Produtos das Reações de Baylis-Hillman

As lipases são catalisadores que podem ser utilizados para a resolução estereosseletiva de álcoois quirais sintéticos ou semi-sintéticos. Elas aceitam uma ampla faixa de substratos, os quais são geralmente convertidos com alta enantiosseletividade. Estas enzimas também apresentam alta estabilidade em solventes não aquosos.¹⁸

Os compostos **10-12** foram submetidos à resolução pela reação de transesterificação enzimática com acetato de vinila e/ou propenila, via lipase de *Pseudomonas sp* livre ou imobilizada em PEO, sílica gel ou K10, **Figura 10**, (p.28).

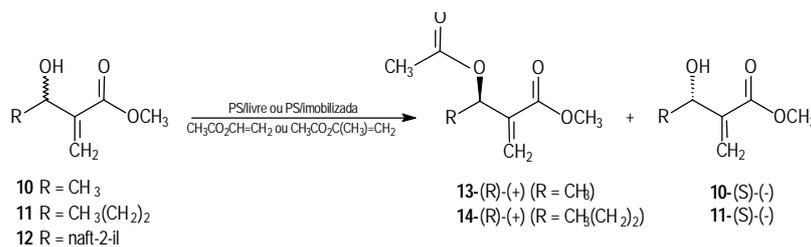
Os compostos **10-12** foram preparados conforme descrito na parte experimental, (item **4.1.2** e **Figura 17**, p.41 e 42).

Os excessos enantioméricos (**ee**) foram determinados pela razão das áreas dos picos obtidos em cromatografia gasosa utilizando uma coluna quiral. A razão enantiomérica (**E**) foi determinada a partir das **Eq. 1, 2 e 3**, (p.16).

Testes preliminares foram realizados sob diferentes condições reacionais (variação do solvente, reagente acilante e dos suportes para imobilização da PS), para verificar a melhor metodologia para estas reações.

A **Tabela 8**, mostra os valores de excessos enantioméricos obtidos para a resolução dos α -metileno- β -hidroxiésteres.

Tabela 8. Testes preliminares para as resoluções biocatalíticas dos compostos **10**, **11** e **12**.



Substratos Biocat./Suporte	Solventes	Reagentes Acilantes	Tempo(h)				%c ^b
			24 ee _s ^a (%)	48 ee _s (%)	72 ee _s (%)	168 ee _s (%)	
10-PS/livre ^c	Hexano	Acetato de vinila	52	77	87	91	48
	CH ₃ CN	Acetato de vinila	1	3	3	20	0.5
	Hexano	Acetato de isopropenila	17	27	40	90	40
10-PS/PEO ^d	Hexano	Acetato de vinila	57	90	99	99	50
10-PS/sílica ^e	Hexano	Acetato de vinila	0	0	0	0	0
10-PS/K10 ^e	Hexano	Acetato de vinila	0	0	0	0	0
11-PS/livre ^c	Hexano	Acetato de vinila	1	5	8	14	12
12-PS/livre ^c	Hexano	Acetato de vinila	0	0	0	0	0
	Hexano	Acetato de isopropenila	0	0	0	0	0

a) Determinado por CG quiral. b) Determinada por RMN ¹H. c) **PS** = 500 mg; **10** = 7.8 mmol. (d) Preparado pela dissolução do **PEO** (500 mg) e **PS** (100 mg) em água (25 mL), com posterior evaporação do solvente; **10**, **11**, **12** = 1.4 mmol. e) **PS** = 10 mg/mL e **sílica** ou **K10** = 500 mg, **10** = 1,4 mmol. Temperatura para todas as reações: 35°C.

Os resultados obtidos para os substratos **10-12**, podem ser discutidos em termos da estrutura do substrato, tempo de reação, agente acilante e efeitos do solvente.

Pode-se verificar pela **Tabela 8** que excelentes resultados foram obtidos para a resolução do álcool alílico **10** com acetato de vinila, empregando os sistemas PS/livre e PS/PEO, em hexano como solvente. Resultados mais detalhados para estes sistemas serão apresentados posteriormente.

A utilização do sistema PS/PEO é bastante promissora, sendo que obteve-se o acetato puro **13-(R)-(+)** e o álcool **10-(S)-(-)** com altos ee e %c (**Tabela 8**).

Entretanto, com a PS/livre o derivado n-propil **11** formou o acetilado **14-(R)-(+)** com baixa %c e ee. O derivado naftil **12** não foi reativo sob condições de reação semelhantes.

Estes resultados claramente mostram que o tamanho do grupo R influencia fortemente na resolução quando é utilizado a lipase de PS como biocatalisador.

Será verificado que a resolução do composto **11** poderá ser aumentada utilizando-se o sistema PS/PEO.

Pleiss e col.⁵² estudaram a anatomia dos sítios catalíticos de algumas lipases. Para as lipases de *Pseudomonas* postulou-se que o sítio catalítico assemelha-se a um “funil”, e é importante para ligações hidrofóbicas.

Estes resultados ajudam a explicar a especificidade das lipases e esterases pelos substratos. Estes modelos de sítios catalíticos, também apoiam que para uma dada reação, uma lipase apropriada deverá ser selecionada.⁵²

Assim, para os substratos estudados neste trabalho foi verificada a importância de efeitos estruturais nas reações biocatalisadas pela PS. Os substratos **10** e **11**, que apresentam em suas estruturas os grupos R metilas e iso-propila foram adequados; enquanto que o **12** que tem o grupo 2-naftil não reagiu nas mesmas condições experimentais.

Os agentes acilantes empregados foram eficientes. Porém, quando foi utilizado o acetato de vinila, observou-se que a pureza enantiomérica do produto foi maior. Com este resultado postulou-se que o acetato de vinila foi mais seletivo para este substrato, por apresentar um menor efeito estérico frente ao acetato de isopropenila.

Devido à dificuldade de solubilização dos substratos em solventes apolares, analisou-se o efeito da acetona na resolução do composto **10** e nas mesmas condições reacionais, (**Tabela 8**). Os valores de ee %c foram inferiores quando comparados com hexano como solvente. Este resultado é concordante com dados da literatura que mostram que os solventes mais adequados para a biocatálise são aqueles que apresentam $\log P \geq 2,0$.¹²⁴ Sabe-se também que nem sempre é observado uma correlação entre a hidrofobicidade e/ou propriedades físico químicas do solvente com a enantiosseletividade.⁵⁹

Quando foram utilizados sílica e K10 como suportes para imobilizar a PS não foi verificada a formação do produto.

Os sistemas PS/livre e PS/PEO foram testados até duas reutilizações, e apresentaram a mesma enantiosseletividade (ee>99%) para obtenção do álcool **10-(S)-(-)**.

Após estes testes, os sistemas foram armazenados por 30 dias à baixa temperatura (~10°C). Após este tempo, os mesmos foram submetidos a uma nova reação com o substrato **10**. Com o sistema PS/Livre, o isômero S do álcool **10-(S)-(-)** foi obtido com ee de 65%. Com o sistema PS/PEO, e nestas mesmas condições de estocagem, o produto foi obtido com ee>99%. Este foi um ótimo resultado quando comparado com a enzima não imobilizada, e salienta a importância da imobilização.

A **Figura 30** mostra um cromatograma obtido na resolução do composto **10**, onde se pode observar a eficiência da coluna quiral na separação dos isômeros dos padrões racêmicos (álcool e acetato) e do produto obtido, que mostra a predominância de apenas um dos enantiômeros.

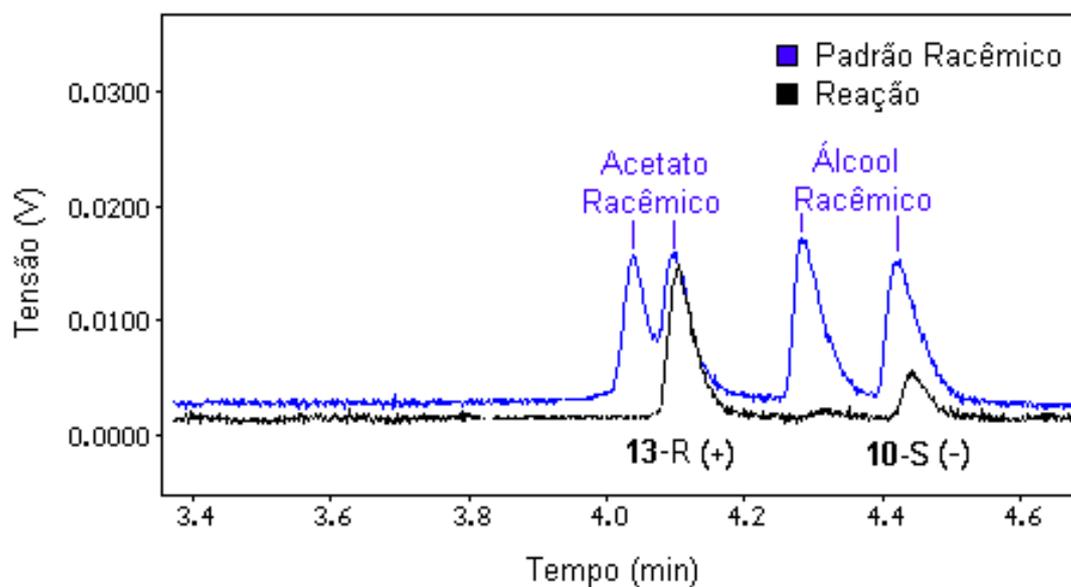


Figura 30. Cromatograma para uma alíquota da reação do (*R,S*)-3-hidroxi-2-metilenobutanoato de metila (**10**) com acetato de vinila, catalisada por PS/PEO (35°C, 72 horas, ee=99%).

A partir destes resultados preliminares, outras condições experimentais foram avaliadas para a resolução dos substratos **10** e **11**, utilizando o acetato de vinila como agente acilante e hexano como solvente.

Os resultados obtidos na resolução do (*R,S*)-3-hidroxi-2-metilenobutanoato de metila (**10**) e (*R,S*)-3-hidroxi-2-metilenohexanoato de metila (**11**), e os valores de excesso enantiomérico do substrato (ee_s), excesso enantiomérico do produto (ee_p), porcentagem de conversão (%c) e razão enantiomérica (*E*) obtidos na resolução são apresentados na **Tabela 9**.

Tabela 9. Resolução biocatalítica de compostos **10** e **11** com a lipase de *Pseudomonas sp* livre e imobilizada, em PEO.

Entradas	Substratos (mmol)	PS/Suporte (mg de PS)	Tempo (h)	ee _s ^a (%)	ee _p ^a (%)	Conversão ^b (%)	E ^c
1	10(7,8)	PS/Livre (500)	24	52	99	34	335
2			48	77	99	44	466
3			96	90	99	47	617
4			168	91	99	48	637
5	10(1,4)	PS/PEO (50)	24	23	99	19	249
6			48	38	99	28	289
7			96	65	99	40	391
8			168	81	99	45	500
9	10(1,4)	PS/PEO (75)	24	41	99	29	298
10			48	72	99	42	431
11			96	80	99	45	491
12			168	83	99	46	520
13	10(1,4)	PS/PEO (100)	24	57	99	37	354
14			48	90	99	48	617
15			96	99	99	50	1057
16			168	99	99	50	1057
17	11(7,8)	PS/Livre (500)	24	1	99	1	200
18			48	5	99	5	209
19			96	10	99	9	219
20			168	14	99	12	228
21	11(1,4)	PS/PEO (100)	24	29	99	23	264
22			48	40	99	29	295
23			96	54	99	35	342
24			168	56	99	36	350

Solvente: hexano, 35°C. Agente acilante: acetato de vinila. a) determinado por CG-quiral. B) determinado por ¹H-RMN. C) determinado pelas equações 2 e 3 p. 25.

Os dados da **Tabela 9**, mostram que foram obtidos bons resultados de razão enantiomérica (E=200-1057) e conversão na resolução dos álcoois alílicos **10** e **11**.

O reconhecimento molecular da lipase PS, para estes substratos foi extremamente alto.

Resultados semelhantes foram obtidos na resolução de mandelato de metila ($E > 200$)³⁹, 3-aryl-2-metilpropanol-2 ($E > 100$)⁵⁴ e o (\pm)-5-bromo-12-oxa-pentaciclo-[6.2.1.1^{6,9}.0^{2,7}.0^{2,10}]-dodeceno-4-endol-3 and (\pm)-5-bromo-13-oxa-pentaciclo-[6.2.2.1^{6,9}.0^{2,7}.0^{2,10}]-trideceno-4-endol-3.²⁹

Com os sistemas PS/livre e PS/PEO obtiveram-se os melhores resultados de biotransformação para o substrato (**10**). Verificou-se que para o substrato **10** a quantidade de enzima necessária para obter bons valores de ee e %c, quando imobilizada em PEO é de 100mg. Observou-se também, que com esta quantidade de enzima, houve uma diminuição no tempo de conversão da reação em comparação outras quantidades menores de PS ou quando utilizou-se a PS/livre (500 mg).

Outro parâmetro interessante a ser analisado, na resolução do substrato **10** com PS/PEO (100 mg) é que não foi observado a racemização do enantiômero. Para alíquotas analisadas após 96 e 168 horas, o produto foi obtido com 50% de conversão e ee_p>99%.

Em geral com relação ao tempo, foi observado que independente da estrutura do substrato e quantidade de biocatalisador, após 96h de reação o produto foi obtido com bom ee (>99%), razão enantiomérica ($E=200-1100$) e conversão. Acima de 168h, a conversão em produto aumentou mas o ee do enantiômero não reativo diminuiu significativamente. Por exemplo, para o substrato **10** após 288h a conversão em produto foi de 60% e o ee_s 54,8%. Este resultado pode ser analisado considerando que o enantiômero menos reativo do álcool está sendo racemizado ao mais reativo.

Observou-se um aumento da estereosseletividade e de conversão quando utiliza-se a PS imobilizada em PEO tanto para o substrato **10** como para o **11**, independente da quantidade de PS. Ficou evidente que o PEO,

como suporte polimérico para imobilizar a PS aumentou a atividade da enzima e que este sistema é muito mais conveniente e eficiente para resoluções enantiosseletivas do que a correspondente enzima na forma livre.

Estes resultados são concordantes com os obtidos por Queiroz e col.³⁹ na resolução do (*R,S*) mandelato de metila com a PS imobilizada em PEO. Foi observado uma melhora significativa nos valores de ee, %c e E, comparados com a mesma lipase imobilizada em gel de ágar ou na forma livre.

Deve-se considerar a dependência da atividade da enzima com as possíveis interações com o suporte, além da difusão dos reagentes e produtos. O gel de ágar, com um alto conteúdo de água, deve dificultar a difusão quando comparado com o filme de PEO. Recentemente foi relatado, que neste suporte a enzima fica adsorvida na superfície.^{38,39}

Estudos realizados da estabilidade da lipase PS imobilizada com PEO analisados por calorimetria de varredura diferencial (DSC), comprovaram que interação enzima-polímero aumentou a estabilidade.³⁸

Os resultados obtidos neste trabalho, salientam ainda mais a eficiência e a importância da imobilização de biocatalisadores para aplicações sintéticas, em meio orgânico.

Os substratos (*R*)-3-hidroxi-2-metilenobutanoato de metila (**10**) e (*R*)-3-hidroxi-2-metileno-hexanoato de metila (**11**), e os respectivos acetatos enantiomericamente puros poderão ser empregados na síntese de feromônios de interesse, tanto acadêmico como industrial. Até o momento não existe na literatura uma aplicação específica para estes compostos. Um dos fatores talvez tenha sido, justamente a dificuldade de obtê-los opticamente puros.

6 CONCLUSÕES

Quanto à avaliação do melhor sistema de proteção para células de *Saccharomyces cerevisiae* e à utilização para obtenção de compostos opticamente ativos, pode-se concluir que:

- ✓ Através dos testes preliminares estipulou-se que o valor máximo de água que pode ser adicionada ao meio reacional para preservar a área superficial do sistema de ser diminuída por aglutinação é de 0,8 mL/g FP, e que o melhor solvente para ser utilizado na reação é o hexano.
- ✓ O (S)-(+)-3-hidróxi-butanoato de etila (**15**) foi o único produto formado na reação de redução do acetoacetato de etila (reação modelo) em todos os sistemas utilizados. Para os sistemas FP/K10/G e FP/K10, os rendimentos foram de 73,1% e 61,7%, respectivamente.
- ✓ Verificou-se que uma parte do produto da reação ficou retido nos suportes. A lavagem com hexano (3x 30,0 mL) retirou o produto remanescente e garantiu a preservação das células para os estudos de reutilizações.
- ✓ O produto **15**-(S)-(+) foi obtido com 100% de conversão quando foram utilizados os sistemas FP, FP/S e FP/K10/G/S a 20 e 30°C.
- ✓ O sistema FP/K10/G/S foi o melhor para a proteção das células na reação modelo a 20°C. O FP manteve-se com alta atividade até a quarta reutilização (ee >99%, %c = 19%).
- ✓ Com este sistema, houve o aparecimento de um menor número de subprodutos, após 48 h de contato entre o reagente e suporte.
- ✓ A temperatura mais adequada para evitar desativação das células foi de 20°C.
- ✓ A metodologia estudada para a proteção das células de *Saccharomyces cerevisiae* do meio reacional, mostrou-se também bastante eficiente na obtenção de produtos enantiomericamente enriquecidos como o (R)-(-)-2-cloro-1-feniletanol (**16**) (ee=73-79% para FP/K10/G/S e ee=55-60% para FP/S, 24h até 72 h de reação, a 20 e 30°C).

- ✓ A *Saccharomyces cerevisiae* não foi eficiente quando utilizada como biorredutor de acetofenonas que não possuíam grupos ativantes próximos à carbonila, e os produtos de redução desejados não foram obtidos.

Quanto à influência da adição de sacarose e trealose nas reações de redução enantiosseletiva, conclui-se que:

- ✓ Obteve-se o álcool (S)-(+)-3-hidroxi-butanoato de etila (**15**) sempre com %c de 100% e ee >99%, com todos os sistemas estudados, e apenas um dos enantiômeros foi detectado por CG-quiral.
- ✓ Os sistemas FP/K10/G/S e FP/K10/G/T, foram os mais estáveis em meio orgânico. O produto **15**-(S)-(+) foi obtido com valores de %c de 19 e 20% respectivamente até a quarta reutilização.
- ✓ Para a redução do acetoacetato de etila, pode-se constatar que o papel principal da sacarose é como agente protetor da parede celular do microorganismo, de maneira similar à água e à trealose, não apresentando valores discrepantes nos resultados obtidos.
- ✓ Para redução da α -cloroacetofenona com o sistema FP/K10/G/S as %c foram superiores, mas os valores de %ee inferiores quando comparado ao sistema FP/K10/G/T que foram sempre maiores que 99%. Estes resultados mostram a influência do fenômeno de difusão, para o reagente e produto, em contraste com os resultados da biorredução com acetoacetato de etila, onde os sistemas protegidos tinham valores altos de %c.
- ✓ O **16**-(R)-(-) foi obtido com ee de 80% e %c de 45%, utilizando o sistema FP/T em 48 h de reação, a 20 °C. Mesmo com apenas a proteção da trealose a enantiosseletividade do sistema não ficou completamente comprometida

Utilizando a lipase de *Pseudomonas cepacia* (PS) livre e/ou imobilizada para resolução biocatalítica dos produtos das reações de Baylis-Hillman, conclui-se que:

- ✓ Nos testes preliminares, os melhores sistemas para a resolução do composto **10** via transterificação com acetato de vinila, foram PS/livre (ee = 91% e %c = 48) e PS/PEO (ee = 99% e %c = 50%), e hexano em 168 h de reação, Após este período os valores mantiveram-se constantes.
- ✓ Os sistemas PS/livre e PS/PEO foram reutilizados duas vezes, para a resolução do composto **10**, apresentando a mesma enantiosseletividade anterior.
- ✓ Após o armazenamento por 30 dias da PS/livre e PS/PEO, já utilizados, obteve-se o álcool **10**-(S)-(-) com ee de 65% e 99% respectivamente.
- ✓ O derivado **12** não reagiu, mostrando a influência do tamanho do grupo R na resolução com a lipase PS.
- ✓ Para o substrato **10** obteve-se os maiores valores de ee_p (99%) e %c (50%) quando 100 mg de enzima foi imobilizada em PEO. A partir de 96 h de reação não foi observado racemização do enantiômero.
- ✓ Os valores de E foram sempre >200. Este resultado excelente indicou que o reconhecimento molecular da lipase PS, para o substrato (*R/S*)-3-hidroxi-2-metilenobutanoato de metila nas reações de transesterificação foi extremamente alto.
- ✓ Para o substrato **11** verificou-se um aumento significativo da %c quando a enzima foi imobilizada em PEO, constatando-se o aumento da atividade da PS após a imobilização em PEO.
- ✓ As vantagens mais importantes adquiridas após à imobilização da enzima foram: o aumento da estabilidade térmica, a possibilidade de reutilização com alta atividade, a facilidade de separação do meio reacional e o aumento da estabilidade na presença de solvente orgânico.
- ✓ A resolução enzimática de α -metileno- β -hidroxiésteres, apresentados neste trabalho, é um método simples, brando e economicamente importante. A

enzima pôde ser reutilizada sem a perda de suas propriedades enantiosseletivas.

Os métodos empregados neste trabalho são suficientemente satisfatórios para serem utilizados em reações de redução enantiosseletivas e para uma aplicação efetiva em laboratórios de química orgânica.

7. PERSPECTIVAS

- ✓ Estudar o efeito da concentração do acetato de etila com os sistemas de biorredução.

- ✓ Avaliar o crescimento das células de *Saccharomyces cerevisiae* em ambientes “ricos” em lactato e isolar estas células por liofilização para a futura utilização em reações de biorreduções. (Trabalho realizado em colaboração com o Prof. Dr. Boris U. Stambuk do Departamento de Bioquímica da UFSC.)

- ✓ Realizar estudos de reduções da C=C, dos compostos obtidos pela reação de Baylis-Hillman via *Saccharomyces cerevisiae*, para a obtenção de mais um centro quiral.

- ✓ Realizar a resolução de outros derivados de produtos de Baylis-Hillman para comprovar a influência da estrutura do substrato nos seus rendimentos. Parâmetros experimentais tais como o uso de lipases de diversas procedências, solventes orgânicos, temperatura e suportes deverão ser cuidadosamente avaliados nestas reações.

8. REFERÊNCIAS BIBLOGRÁFICAS

1. BON, ELBA P. S.; PEREIRA JR., NEI. **Tecnologia enzimática**. Rio de Janeiro: Fundação Biblioteca Nacional, 1999, p. 113.
2. SANTANIELLO, E.; FERRABOSCHI, P; GRISENTI, P.; MANZOCCHI, A.; The biocatalytic approach to the preparation of enantiomerically pure chiral building blocks. **Chem. Rev.** v. 92, n. 5, p. 1071-1140, 1992.
3. ROBERTS, S. M.; TURNER, N. J.; WILLETTS, J.; TURNER, M. K. **Introduction to biocatalysis using enzymes and micro-organisms**. New York: Cambridge University Press, 1995.
4. HUDLICKY, T.; GONZALEZ, D.; GIBSON, D. T. Enzymatic dihydroxylation of aromatics in enantioselective synthesis: expanding asymmetric methodology. **Aldrichimica Acta**. v. 32, n. 2, p. 35-62, 1999.
5. DURAN, N.; CONTI, R. DE; RODRIGUES, J. A. R. Biotransformations by microorganisms, organisms and enzymes: state of art. **Bol. Soc. Chil. Quím 2000**. v. 45, p. 109-121, 2000.
6. STEWART, J. D. Organic transformations catalyzed by engineered yeast cells and related systems. **Curr. Opin. Biotech.** v. 11, n. 3, p. 344-348, 2000.
7. ROBERTS, S. M. Using microorganisms in synthetic organic chemistry. **J. Chem. Ed.** v. 77, n. 3, p. 363-368, 2000.
8. ROTTHAUS, D. K.; DEMUTH, M.; SCAFFNER, K. Reductions of keto esters with baker's yeast in organic solvents - a comparison with the results in water. **Tetrahedron**. v. 53, n. 3, p. 935-938, 1997.
9. CERNIA, E.; PALOCCI, C.; SORO, S. The role of the reaction medium in lipase-catalyzed esterifications and transesterifications. **Chem. Phys. Lipids**. v. 93, p. 157-168, 1998.
10. DE VOS, D. E.; VANKELECOM, I. F. J.; JACOBS, P. A.; **Chiral Catalyst Immobilization and Recycling**. Federal Republic of Germany: Wiley-VCH, 2000, p. 97.
11. FABER, K. **Biotransformations in Organic Chemistry**. Berlin: Springer-Verlag; 1997.

12. KOELLER, K. M.; WONG, C.; Enzymes for chemical synthesis. **Nature**, v. 409, n. 6817, p. 232-240, 2001.
13. MURAKAMI, Y.; Development of novel enzymic materials functioning in organic solvents and application to bioprocess involving extraction and separation. **Bunri Gijutsu**. v. 31, n. 2, p. 106-107, 2001.
14. LOUGHLIN, W. A.; Biotransformations in organic synthesis. **Bior. Technol.** v. 74, p. 49-62, 2000.
15. KLIBANOV, A. M.; Improving enzymes by using them in organic solvents. **Nature**. v. 409, p. 241-246, 2001
16. FABER, K.; PATEL, R.; Chemical biotechnology: A happy marriage between chemistry and biotechnology: asymmetric synthesis via green chemistry. **Curr. Opin. Biotechnol.** v. 11, n. 6, p. 517-519, 2000.
17. CARREA, G.; RIVA, S.; Properties and synthetic applications of enzymes in organic solvents. **Angew. Chem., Int. Ed. Engl.** v. 39, n. 13, p. 2226-2254, 2000.
18. ROBERTS, S. M; **Biocatalysts for fine chemicals synthesis**; John Wiley & Sons Ltd; England; 1999.
19. FERNADEZ-LAFUENTE, R.; ARMISÉN, P. *et al.* Immobilization of lipases by selective adsorption on hydrophobic supports. **Chem. Phys. Lipids**. v. 93, p. 185-197, 1998.
20. NARVÁTIL, M.; STURDIK, E. Bioactive components in productions using immobilized biosystems. **Biologia**. v. 54, p.635-648, 1999.
21. SLUIS, C.V der.; MULDER, A. N. T.; GROLLE, K. C. F.; ENGBERS, G. H. M.; SCHRE, E. G.; TRAMPER, J.; WIJFFELS, R. H. Immobilized soy-sauce yeasts: development and characterization of a new polyethylene-oxide support. **J. Biotechnol.** v. 80, p. 179-188, 2000.
22. CHARUSHEEA, A.; ARVIND, L. Enzyme catalyzed hydrolysis of esters using reversibly soluble polymer conjugated lipases. **Enzy. Microb. Technol.** v. 30, p. 19-25, 2002.
23. CASTRO, H. F.; ANDERSON, W. A. Fine chemicals by biotransformations using lipases. **Química Nova**, v. 18, n. 6, p. 544-554, 1995.

24. CASTILO, E.; DOSSAT, V.; MARTY, A.; CONDORET, J. S.; COMBES, D. The role of silica in lipase-catalyzed esterification reactions of high-polar substrates. **J. Org. Chem.** v. 74, n. 2, p. 77-85, 1997.
25. REETZ, M. T.; JAEGER, Karl-Erich. Overexpression, immobilization and biotechnological application of *Pseudomonas* lipases. **Chem. Phys. Lipids.** v. 93, p. 3-14, 1998.
26. ROBERTS, S. M. Preparative biotransformations. **J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1.** p. 1-21, 1999.
27. Disponível em: <http://www.esb.ucp.pt/~bungah/immob/immob.htm>. Acessada em 22 novembro 2002.
28. KLIBANOV; A. M. Immobilized enzymes and cells as practical catalysts. **Science.** V. 219, p.727, 1983.
29. MORRISSE, F. D. P.; COSTA, V. E. U. Kinetic resolution of (\pm)-5-bromo-12-oxa-pentacyclo-[6.2.1.1^{6,9}.0^{2,7}.0^{2,10}]-dodeca-4-ene-3-endo-ol and (\pm)-5-bromo-13-oxa-pentacyclo-[6.2.2.1^{6,9}.0^{2,7}.0^{2,10}]-trideca-4-ene-3-endo-ol via *Pseudomonas*-mediated lipase-catalyzed transesterification. **Tetrahedron: Asymmetr.** v. 12, p. 2641-2647, 2001.
30. IZUMI, Y.; URABE, K.; ONAKA, M.; **Zeolite, Clay, and Heteropoly Acid in Organic Reactions.** Tokyo (Japan): Kodansha Ltd., 1992. 49-50p.
31. Disponível em: <http://www.origins.rpi.edu/claycatalyzed.html>. Acessada em: 31 agosto 2002.
32. BALOGH, M.; LASZLO, P. **Organic Chemistry Using Clays.** Berlin Heidelberg New York: Springer-Verlag., 1993. 1-2p.
33. Disponível em: <http://www.curezone.com>. Acessada em: 07 janeiro 2003.
34. Disponível em: <http://mineral.galleries.com/minerals/silicate/clays.htm>. Acessada em: 07 janeiro 2003.
35. SORRILHA, A. E. P. M.; MARQUES, M.; JOEKES, I.; MORAN, P. J. S.; RODRIGUES, J. A. R. Reduction of phenylketones by immobilized baker's yeast. **Biorg. Med. Chem. Lett.** v. 2, n. 2, p. 191-196, 1992.
36. MANCILHA, M.; CONTI, R.; MORAN, P. J. S.; RODRIGUES, J. A. R. Bioreduction of α -methylene ketones. **Issue in Honor of Professor Rudy Abramovitch Biocatalysis.** ARKIVOC 2001 (vi).

37. NETO, P. R. C.; MAZZUCO, L. M., NASCIMENTO, M. G., Biotransformação de óleos e gorduras. **Biotecnologia & Ciência e Desenvolvimento**, v. 19, p. 28-31, 2001.
38. CRESPO, J. S. **Imobilização de lipases em materiais poliméricos**. Florianópolis, 1999, 79f. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Federal de Santa Catarina, UFSC.
39. QUEIROZ, N.; NASCIMENTO, M. G. *Pseudomonas sp.* lipase immobilized in polymers versus the use of free enzyme in the resolution of (*R,S*)-methyl mandelate. **Tetrahedron Lett.** v. 43, p. 5225-5227, 2002.
40. BRADY, K.; SIMOM, L. M.; SZAJÁNI, B. Lipase immobilized on a hydrophobic, microporous support for the hydrolysis of fats. **J. Am. Chem. Soc.** v. 65, p. 917-921, 1988.
41. ANTHONSEN, Henrik, W.; HOFF, B. H.; ANTHONSEN, Thorleif. A simple method for calculating enantiomer ratio and equilibrium constants in biocatalytic resolutions. **Tetrahedron: Asymmetr.** v. 6, n. 12, p. 3015-3022, 1995.
42. CHEN, C-S.; FUJIMOTO, Y.; GIRDAUKAS, G.; SIR, C. J. Quantitative analyses of biochemical kinetic resolutions of enantiomers. **J. Am. Chem. Soc.** v. 104, p. 7294-7299, 1982.
43. AITKEN, R. A.; KILÉNYI, S. N. **Asymmetric Synthesis**. London: Blackie Academic & Professional, 1992. p. 1-63.
44. COSTA, V. E. U.; AMORIM, H. L. N. O emprego de lipases como agentes de resolução cinética de enantiômeros em síntese orgânica: aspectos gerais sobre a influência do solvente. **Química Nova**, v. 22, n. 6, p. 863-873, 1999.
45. MORRISON, R. T.; BOYD, R. N. **Química Orgânica**. 11 ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 1994. p. 166-167.
46. PARKER, D. NMR Determination of enantiomeric purity. **Chem. Ver.** v. 91, n. 7, p. 1441-1457, 1991.
47. SOLOMONS, T. W. G. **Organic Chemistry**. 5 ed. New York: John Wiley & Sons, 1992. 186-187 p.

48. A guide to using cyclodextrin bonded phases for chiral separations by capillary gas chromatography. **ChiralDex Handbook**. Advanced Separation Technologies Inc. 5th Ed., USA, 1996 -1997.
49. MACHIDA, Y.; NISHI, H.; NAKAMURA, K.; NAKAI, H.; SATO, T. Enantiomer separation of amino compounds by a novel chiral stationary phase derived from crown ether. **J. chrom. A**. v. 805, p. 85-92, 1998.
50. SCHMID, R. D.; VERGER, R. Lipases: interfacial enzymes with attractive applications. **Angew. Chem. Int. Ed. Engl.** v. 37, p. 1608-1633, 1998.
51. KIRBY, A. J. Enzyme mechanisms, models and mimics. **Angew. Chem. Int. Ed. Engl.** v. 35, p. 707-724, 1996.
52. PLEISS, J.; FISCHER, M.; SCHMID, R. D. Anatomy of lipase binding sites: the scissile fatty acid binding site. **Chem. Phys. Lipids**. v. 93, p. 67-80, 1998.
53. Disponível em: www.expasy.ch/spdbv/text/getpc.htm. Acessada em: 10 dezembro 2002.
54. NORDIN, O.; NGUYEN, Ba-Vu; VÖRDE, C.; HEDENDTRÖM, E.; HÖGBERG, Hans-Erik. Kinetic resolution of primary 2-methyl-substituted alcohols via *Pseudomonas cepacia* lipase-catalyzed enantioselective acylation. **J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1**. p. 367-376, 2000.
55. SCOTT, J. D.; WILLIAMS, R. M. Synthetic studies on tetrazomine: lipase PS resolution of racemic *cis*- β -hydroxypipelic acid. **Tetrahedron Lett.** v. 41, p. 8413-8416, 2000.
56. BANWELL, M. G.; JOLLIFFE, K. A.; LOONG, D. T. J.; MCRAE, K. J.; VOUNATSOS, F. A chemoenzymatic synthesis of the 12-membered macrolide (-)-cladospolide A. **J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1**. p. 22-25, 2002.
57. BERGLUND, P. Controlling lipase enantioselectivity for organic synthesis. **Biomol. Eng.** v. 18, p. 13-22, 2001.
58. TSAI, S. W.; CHENG, I. C.; HUANG, C. M. Effects of hydrolysis and esterification side-reactions on the kinetic resolution of enzyme-catalyzed irreversible transesterification in organic solvents. **Chem. Eng. Sci.** v. 55, p. 4571-4582, 2000.

59. CARREA, G.; OTTOLINA, G.; RIVA, S. Role of solvents in the control of enzyme selectivity in organic media. **Tibtech**. v. 13, p. 63-70, 1995.
60. CHEN, C.S.; SIH, C. J. General aspects and optimization of enantioselective biocatalysis in organic solvents: the use of lipases. **Angew. Chem. Int. Ed. Engl.** v. 28, p. 695-707, 1989.
61. GUIEYSSE, D.; SALAGNAD, C.; MONSAN, P.; REMAUD-SIMEON, M. Resolution of 2-bromo-o-tolyl-carboxylic acid by transesterification using lipases from *Rhizomucor miehei* and *Pseudomonas cepacia*. **Tetrahedron: Asymmetr.** v. 12, p. 2473-2480, 2001.
62. PCHELK, B.K.; LOUPY, A.; PLENKIEWICZ, J.; PETIT, A.; BLANCO, L. Resolution of racemic 3-aryloxy-1-nitrooxypropan-2-ols by lipase-catalyzed enantioselective acetylation. **Tetrahedron: Asymmetr.** v. 12, p. 2109-2119, 2001.
63. MIYAZAWA, T.; YUKAWA, T.; KOSHIBA, T.; SAKAMOTO, H.; UEJI, S.; YANAGIHARA, R.; YAMADA, T. Resolution of 2-aryloxy-1-propanols via lipase-catalyzed enantioselective acylation in organic media **Tetrahedron: Asymmetr.** v. 12, p. 1595-1602, 2001.
64. GHANEM, A.; SCHURIG, V. Peracetylated β -cyclodextrin as additive in enzymatic reactions: enhanced reaction rate and enantiomeric ratio in lipase-catalyzed transesterifications in organic solvents. **Tetrahedron: Asymmetr.** v. 12, p. 2761-2766, 2001.
65. PÀMIES, O.; BÄCKVALL, J-E. Enzymatic kinetic resolution and chemoenzymatic dynamic kinetic resolution of δ -hydroxy esters. An efficient route to chiral δ -lactones. **J. Org. Chem.** v. 67, p. 1261-1265, 2002.
66. ALLAN, G.; CARNELL, A. J.; HERNANDEZ, M. L. E.; PETTMAN, A. Chemoenzymatic synthesis of a tachykinin NK-2 antagonist. **Tetrahedron**. v. 57, p. 8193-8202, 2001.
67. ROUSH, W. R.; BROWN, B. B. A highly diastereo- and enantioselective synthesis of top half of kijanolide. **J. Org. Chem.** v. 58, p. 2151-2161, 1993.

68. IWABUCHI, Y.; FURUKAWA, M.; ESUMI, T.; HATAKEYAMA, S. An enantio- and stereocontrolled synthesis of (-)-mycesterin E via cinchona alkaloid-catalyzed asymmetric Baylis-Hillman reaction **J. Chem. Soc., Chem. Comm.** p. 2030-2031, 2001.
- 69 BAILEY, M.; MARKÓ, I. E.; OLLIS, W. D., RASMUSSEN P. R. Stereoselective epoxidation of hidroxygenones the synthesis o the sidechain of clerocidin. **Tetrahedron Lett.** v. 31, p. 4509-4512, 1990.
- 70 AMEER, F.; DREWES, S. E.; HOOLE, R.; KAYE, P. T.; PITCHFORD, A. T. **J. Chem. Soc., Perkin 1.** p. 2713-2717, 1985.
71. (a) HOFFMANN, H. M. R.; RABE, J. DABCO-Catalyzed coupling of aldehydes with activated double bonds. Stereoselective synthesis of trisubstituted olefins and terpenoid building blocks via 2-(hydroxyalkyl-2-propenoic) esters. **J. Org. Chem.** v. 50, p. 3849-3859, 1985. (b) HOFFMANN, H. M. R.; RABE, J. **Helv. Chim. Acta.** v. 2, p. 413-415, 1984.
- 72 (a) CHESKIS, B. A.; MOISEENKOV, A. M.; SHPIRO, N. A.; STASHINA, G. A.; ZHULIN, V. M. Stereochemically controlled synthesis of racemic sitophilate, the aggregational pheromone of grain weevil. **Bull. Acad. Sci. USSR, Div. Chem. Sci. (Engl. Transl.)**, v. 39, p. 716-720, 1990. (b) MOISEENKOV, A. M.; CHESKIS, B. A.; SHPIRO, N. A.; STASHINA, G. A.; ZHULIN, V. M. High-pressure initiated synthesis of dominicalures 1 and 2 by the Baylis-Hillman method. **Bull. Acad. Sci. USSR, Div. Chem. Sci. (Engl. Transl.)**, v. 39, p. 517-521, 1990.
73. MATEUS, C. R.; FELTRIN, M. P.; COSTA, A. M.; COELHO, F.; ALMEIDA, W. P. Diastereoselectivity in heterogeneous catalytic hydrogenation of Baylis-Hillman adducts. Total synthesis of (\pm)-sitophilate. **Tetrahedron**, v. 57, p. 6901-6908, 2001.
74. ANNUNZIATA, R.; BENAGLIA, M.; CINQUINI, M.; COZZI, F.; RAIMONDI, L. 1,3-Dipolar cycloadditions to Baylis-Hillman adducts: Rationale for the observed diastereoselectivity. **J. Org. Chem.**, v. 60, p. 4697-4706, 1995.
75. KIM, J. N.; LEE, H. J.; LEE, K. Y.; KIM, H. S. Synthesis of 3-quinolinecarboxylic acid esters from the Baylis-Hillman adducts of 2-

- halobenzaldehyde *N*-tosylimines. **Tetrahedron Lett.** v. 42, p. 3737-3740, 2001.
76. RÄCKER, R.; DÖRING, K.; REISER, O. Combinatorial liquid-phase synthesis of [1,4] oxazepine-7-ones via the Baylis-Hillman reaction. **J. Org. Chem.** v. 65, p. 6932-6939, 2000.
77. BASAVIAIAH, D.; KUMARAGURUBARAN, N. The Baylis-Hillman chemistry in aqueous media: a convenient synthesis of 2-methylenealkanoates and alkanenitriles **Tetrahedron Lett.** v. 42, p. 477-479, 2001.
78. KUNDU, M. K.; SUNDAR, N.; KUMAR, S. K.; BHAT, S. V.; BISWAS, S.; VALECHA, N. Antimalarial activity of 3-hydroxyalkyl-2-methylene-propionic acid derivatives. **Bioorg. Med. Chem. Lett.**, v. 9, p. 731-736, 1999.
79. CIGANEK, E. **Organic Reactions.** John Wiley & Sons, N. Y. v. 51, 1997, 201-350 p.
80. BASAVIAIAH, D.; RAO, P. D.; HYMA, R. S. The Baylis-Hillman reaction. **Tetrahedron**, v. 52, p. 8001-8062, 1996.
81. DREWES, S. E.; ROOS, G. H. P. Synthetic potential of the tertiary-amine-catalysed reaction of activated vinyl carbanions with aldehydes. **Tetrahedron**, v. 44, n. 15, p. 4653-4670, 1988.
82. BURGESS, K.; JENNINGS, L. D. Biocatalytic resolutions of α -hydroxy esters and ketones. **J. Org. Chem.** v. 55, p. 1138-1139, 1990.
83. BASAVIAIAH, D.; RAO, P. D. Biocatalytic approach to optically active Baylis-Hillman reaction products. **Synth. Comm.** v. 34, n. 7, p. 917-923, 1994.
84. HAYASHI, N.; YANAGIHARA, K.; TSUBOI, S. Lipase-catalyzed kinetic resolution of Baylis-Hillman products. **Tetrahedron: Asymmetr.** v. 9, p. 3825-3830, 1998.
85. D'ARRIGO, P.; FANTONI, G.P.; SERVI, S.; STRINTI, A. The effect of absorbing resins on substrate concentration and enantiomeric excess in yeast reduction. **Tetrahedron: Asymmetr.** v. 8, n. 14, p. 2375-2379, 1997.

86. HAYAKAWA, R.; NOZAWA, K.; SHIMIZU, M.; FUJISAWA, T. Control of enantioselectivity in the bakers' yeast reduction of β -keto ester derivatives in the presence of a sulfur compound. **Tetraedron Lett.** v. 39, p. 67-70, 1998.
87. PEREIRA, R. S. The use of bakers' yeast in the generation of asymmetric centers to produce chiral drugs and others compounds. **Crit. Rev. Biotechnol.** v. 18, n. 1, p. 25-83, 1998.
88. DAHL, A. C.; MADSEN, J. O. Baker's yeast: production of D- and L-3-hydroxy esters. **Tetraedron: Asymmetr.** v. 6, p. 4395-4417, 1998.
89. BEKATOROU, A.; KOUTINAS, A. A.; KALIAFAS, A.; KANELAKI, M. Freeze-dried *Saccharomyces cerevisiae* cells immobilized on gluten pellets for glucose fermentation. **Proc. Biochem.** v. 36, p. 549-557, 2001.
90. GRUNWALD, P. Experimental treatment of the laws of heterogeneous catalysis with immobilized yeast cells (*Saccharomyces cerevisiae*) **Biochem. Ed.** v. 28, p. 96-99, 2000.
91. MORAN, P. J. S.; RODRIGUES, J. A. R.; JOEKES, I.; BRENELLI, E. C. S.; LEITE, R. A. Reduction of α -azidopropiophenone by immobilized baker's yeast. **Biocatalysis.** v. 9, p. 321-328, 1994.
92. NASCIMENTO, M. G.; LIMA, C.; SILVA, P. L. F.; REZENDE, M. C. The use of immobilized lipases on chrysotile for esterification reactions. **J. Braz. Chem. Soc.** v. 7, 173, 1996.
93. JESUS, P. C.; SILVA, P. L. F.; JOÃO, J. J.; NASCIMENTO, M. G. Enantioselective esterification of 2-methylpentanoic acid catalysed via immobilized lipases in chrysotile and microemulsion-based gels. **Synth. Comm.** v. 28, n. 15, 1998.
94. NAKAMURA, K.; KONDO, S. et al. Reduction by bakers' yeast in benzene. **Tetrahedron Lett.** v. 32, n. 48, p. 7075-7078, 1991.
95. LEÓN, R.; FERNANDES, P.; PINHEIRO, H. M.; CABRAL, J. M. Whole-cell biocatalysis in organic media **Enz. Microb. Technol.** v. 23, p. 483-500, 1998.

96. JAYASINGHE, L. Y.; KODITUWAKKU, D. *et al.* The use of organic solvent systems in the yeast mediated reduction of ethyl acetoacetate. **Bull. Chem. Soc. Jpn.** v. 67, n. 9, p. 2528-2531, 1994.
97. NAKAMURA, K.; KONDO, S. *et al.* Stereochemical control in microbial reduction. XXI. Effect of organic solvents on reduction of α -keto esters mediated by bakers' yeast. **Bull. Chem. Soc. Jpn.** v. 66, n. 9, p. 2738-2743, 1993.
98. MEDSON, C.; SMALLRIDGE, A. J.; TREWHELLA, M. A. The stereoselective preparation of β -hydroxy esters using a yeast reduction in an organic solvent. **Tetrahedron: Asymmetr.** v. 8, n. 7, p. 1049-1054, 1997.
99. KANDA, T.; MIYATA, N. *et al.* Doubly entrapped bakers' yeast survives during the long-term stereoselective reduction of ethyl 3-oxobutanoate in an organic solvent. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** v. 49, p. 377-381, 1998.
100. MEDSON, C.; SMALLRIDGE, A. J.; TREWHELLA, M. A. Baker's yeast activity in an organic solvent system. **J. Mol. Cat. B: Enz.**, v. 11, p. 897-903, 2001.
101. ATHANASIOU, N.; SMALLRIDGE, A. J.; TREWHELLA, M. A. Baker's yeast mediated reduction of β -keto esters and β -keto amides in an organic solvent system. **J. Mol. Cat. B: Enz.**, v. 11, p. 893-896, 2001.
102. DUMANSKI, P. G.; FLOREY, P.; KNETTIG, M.; SMALLRIDGE, A. J.; TREWHELLA, M. A. J. The baker's yeast-mediated reduction of conjugated methylene groups in an organic solvent. **J. Mol. Cat. B: Enz.** v. 11, p. 905-908, 2001.
103. FILHO, E. P. S.; RODRIGUES, J. A. R.; MORAN, P. J. S. Baker's yeast reduction of α -methylketones. **Tetrahedron: Asymmetr.** v. 12, p. 847-852, 2001.
104. WHARTON; D. Chemistry for life. **Chem. Brit.** October, p. 38-40, 2002.
105. MOYNIHAN, J. S.; BLAIR, J.; COOMBES, A.; D'MELLO, F.; HOWARD, C.R.; Enhanced immunogenicity of a hepatitis B virus peptide vaccine

- using oligosaccharide ester derivative microparticles. **Vaccine**. v. 20, p. 1870-1876, 2002.
106. ARYA, S. C.; Stabilization of vaccines: to be or not to be. **Vaccine**. v.19, p. 595-597, 2000.
107. MAJARA, M., O'CONNOR-COX, E. S. C., AXCELL, B. C. Trealose – a stress protectant and stress indicator compound for yeast exposed to adverse conditions. **J. Am. Soc. Brew. Chem.** v. 54, n. 4, p. 221-227, 1996
108. FUJII, S., OBUCHI, K., IWAHASHI, H., FUJII, T., AND KOMATSU, Y. Saccharides that protect yeast against hydrostatic pressure stress correlated to the mean number of equatorial OH groups. **Biosci. Biotechnol. Biochem.** v. 60, n. 3, p. 476-478, 1996.
109. ANCHORDOQUY, T. J.; IZUTSU, K-I.; RANDOLPH, T. W. ; CARPENTER J. F. Maintenance of quaternary structure in the frozen state stabilizes lactate dehydrogenase during freeze–drying, **Arch. Biochem. Biophys.** v. 390, p. 35-41, 2001.
110. SANO, F., ASAKAWA, N., INOUE, Y., AND SAKURAI, M. A dual role for intracellular trealose in the resistance of yeast cells to water stress **Cryobiology**, v. 39, p. 80-87, 1999.
111. NASCIMENTO, M. G.; ZANOTTO, S. P.; MELEGARI, S. P., MORAN, P. J. S. Estudos de proteção da célula de *Saccharomyces cerevisiae* para utilização em reações de redução em meio orgânico. **Química Nova.**, v. 25, n. 4, p.567-571, 2002.
112. FURNISS, B. S.; HANNAFORD, A. J.; ROGERS, V.; SMITH, P. W. G.; TATCHELL, A. R. **Vogel's Textbook of Practical Organic Chemistry**, 4th Ed.; Longman Group Limited; New York, 1978; 353 p.
113. **Handbook of Chemistry and Physics**; CRC Press; Boca Raton, 1979.
114. **Ficha técnica da Lipase PS-30**, fornecida pela Amano Enzymes USA Co.;Ltda em maio de 1999.
115. WOOLLEY, P.; PETERSEN S. B. **Lipases Their Structure, Biochemistry and Application**. Cambridge University Press, 1994.

- 116 TEMBA, E. S. C.; OLIVEIRA, I. M. F.; DONNICI, C. L. Álcoois quirais: métodos químicos e catalíticos de obtenção por redução assimétrica. **Química Nova**, v. 26, n. 1, p. 112-122, 2003.
117. WENDHAUSEN, R. JR.; MORAN, P. J. S. ; JOEKES, I. ; RODRIGUES, J. A. R. J. Continuous process for large-scale preparation of chiral alcohols with baker's yeast immobilized on chrysotile fibers. **J. Mol. Cat. B: Enz.** v. 5, p. 69-73, 1998.
118. BRENELLI, E. C. S.; CARVALHO, M.; OKUBO, M. T.; MARQUES, M.; MORAN, P. J. S.; RODRIGUES, J. A. R.; SORRILHA, A. E. P. M. Enantioselective synthesis of (R)-(-)-1-phenylethanolamines using baker's yeast reduction of some α -substituted methylphenyl ketones. **Ind. J. Chem.** v. 31B, p. 821-823, 1992.
119. CARVALHO, M.; OKAMOTO, M. T.; MORAN, P. J. S.; RODRIGUES, J. A. R. Baker's yeast reduction of α -haloacetophenones. **Tetrahedron**. v.47, n. 12/13, p. 2073-2080, 1991. b) ALEIXO, L. M.; CARVALHO, M.; MORAN, P. J. S.; RODRIGUES, J. A. R. Hydride transfer versus electron transfer in the baker's yeast reduction of α -haloacetophenones. **BioMed. Chem. Lett.** v. 3, p. 1637-1642, 1993. c) MORAN, P.J.S.; RODRIGUES, J.A.R.; CARVALHO, M.; BRENELLI, E.C.S. Some mechanistic considerations on the Baker's yeast reduction of α -substituted acetophenones and propiophenones. **Atualidades de Físico Química Orgânica**, Ed. E. Humeres, Florianópolis, 1995, 499 p.
120. RODRÍGUEZ, S.; KAYSER, M. M.; STEWART, J. D. Highly stereoselective reagents for β -keto ester reductions by genetic engineering of baker's yeast. **J. Am. Chem. Soc.** v. 123, n. 8, p. 1547-1555, 2001.
121. **Catalog of Organic and Fine Chemicals**, Acrós Organic, 2002/2003, Fisher Scientific, p. 1008.
122. NAKAMURA, K.; KAWAI, Y.; NAKAJIMA, N.; OHNO, A. Stereochemical control of microbial reduction. 17. A method for controlling the enantioselectivity of reductions with bakers' yeast. **J. Org. Chem.** v. 56, p. 4778, 1991.

123. KAWAI, Y.; SAITOU, K.; HIDA, K.; DAO, D.H.; OHNO, A. Stereochemical control in microbial reduction. XXVIII. Asymmetric reduction of α,β -unsaturated ketones with bakers' yeast. **Bull. Chem. Soc. Jpn.** v. 69, n. 9, p. 2633-2638, 1996.
124. LAANE, C.; BOEREN, S.; VOS, K.; VEEGER, C. Rules for Optimization of Biocatalysis in Organic solvents. **Biotechnol. Bioeng.** v. XXX, p. 81-87, 1987.

9. ANEXOS – Produção Acadêmica nos anos de 2000 - 2003

Artigos Publicados

- ✓ S.P.Zanotto, S.P.Melegari, M.G.Nascimento, P.J.S.Moran, **Estudos da Proteção da Célula de *Saccharomyces cerevisiae* para Utilização em Reações de Redução em Meio Orgânico**, Química Nova, Vol. 25, nº 4 p. 567-571, 2002.
- ✓ M.G.Nascimento, S.P.Zanotto, S.P.Melegari, L. Fernandes e M.M. Sá, **Resolution of α -Methylene- β -Hydroxy Esters Catalyzed by Free Immobilized *Pseudomonas sp* lipase**, Tetrahedron: Asymmetry, Vol. 14, p. 3111-3115, 2003.
- ✓ C.E.Costa, G.C.Clososki, S.P. Zanotto, M.G. Nascimento e J. V. Comasseto, **Enzymatic Resolution of (RS)-1-Phenylselenanyl-propan-2-ol in Organic Media**, submetido ao Tetrahedron Letters em 07/2003.

Trabalhos Apresentados em Congressos Nacionais e Internacionais

- ✓ COSTA, C. E.; CLOSOSKI, G. C.; ZANOTTO, S. P.; NASCIMENTO M. G.; COMASSETO, J. V. **Resolução Enzimática de β -Hidroxi-selenetos e β -Hidroxi-teluretos em Meio Orgânico**. In: 26^a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, Poços de Caldas - MG, **2003**
- ✓ COSTA, C. E.; CLOSOSKI, G. C.; ZANOTTO, S. P.; NASCIMENTO M. G.; COMASSETO, J. V. **Lipase-catalyzed enantioselective resolution of β -hidroxy selenides and β -hidroxy tellurides in organic media**. In: Biocat 1002 – International Congress on Biocatalysis - Hamburgo, Alemanha, Livro de resumos, **2002**.
- ✓ ZANOTTO, S. P.; MELEGARI, S. P.; NASCIMENTO, M. G.; MORAN, P. J. S.

Influência da adição de açúcares em reações de redução de compostos carbonílicos por fermento de pão em solvente orgânicos.

In: 25^a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, Poços de Caldas - MG, Livro de Resumos, QO-144, **2002**.

- ✓ ZANOTTO, S. P.; MELEGARI, S. P.; NASCIMENTO, M. G.; MORAN, P. J. S. **Estudos de redução enantiosseletiva da α -cloroacetofenona mediada por fermento de pão em meio orgânico.** In: 24^a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, Poços de Caldas - MG, Livro de Resumos, QO-141, **2001**.
- ✓ ZANOTTO, S. P.; MELEGARI, S. P.; NASCIMENTO, M. G.; SÁ, M. M.; FERNANDES, L. **Biocatalytic resolution of α -methylene- β -hydroxyesters.** In: 9th Brazilian Meeting on Organic Synthesis, Curitiba - PR, Livro de Resumos, PS-091, **2001**.
- ✓ MELEGARI, S. P.; ZANOTTO, S. P.; NASCIMENTO, M. G.; MORAN, P. J. S. **Estudos de Reduções Enantiosseletivas mediadas por fermento de pão em meio orgânico.** In: XI Seminário de Iniciação Científica, Florianópolis - SC, p. 50, **2001**
- ✓ ZANOTTO, S. P.; NASCIMENTO, M. G.; MORAN, P. J. S. **Estudos da proteção da célula de *saccharomyces cerevisiae* para utilização em reações de redução em meio orgânico.** In: 23^a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, Poços de Caldas - MG, Livro de Resumos, v. 2, QO-113, **2000**.

ESTUDOS DE PROTEÇÃO DA CÉLULA DE *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* PARA UTILIZAÇÃO EM REAÇÕES DE REDUÇÃO EM MEIO ORGÂNICO

Maria da Graça Nascimento*, Sandra Patricia Zanotto e Sílvia Pedroso Melegari

Departamento de Química, Universidade Federal de Santa Catarina, CP 476, 88040-900 Florianópolis - SC

Paulo J. S. Moran

Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, CP 6154, 13183-970 Campinas - SP

Recebido em 16/7/01; aceito em 3/10/01

PROTECTION STUDIES OF *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* CELLS FOR THE USE IN REDUCTION REACTIONS IN ORGANIC MEDIA. New methodologies for protection of *Saccharomyces cerevisiae* (FP) cells when supported in montmorillonite K10 (K10), recovered or not with gelatin (G) and in the presence or absence of sucrose (S) are presented. These systems were used for the enantioselective reduction of ethyl acetoacetate and α -chloroacetophenone in hexane, under FP/K10/G/S and FP/S at 20°C during 24 hours, affording *S*-(+)-ethyl-3-hydroxybutanoate in 100% conversion and 99% ee, and *R*-(-)-2-chloro-1-phenylethanol 79% and 78% ee at 20 and 30 °C, respectively.

Keywords: biotransformations; baker's yeast; enantioselective reduction.

INTRODUÇÃO

Atualmente, a importância na produção de substâncias opticamente puras é um capítulo de destaque nos setores acadêmicos e industriais, preocupados com a pesquisa e o desenvolvimento de novos processos. Quando os químicos sintetizam produtos naturais e desenham novos alvos, a pureza enantiomérica dos produtos, e sua relação com as propriedades biológicas, é um tema de permanente discussão¹.

O crescente interesse por esse tipo de síntese promoveu um grande desenvolvimento na biocatálise. Contudo, ainda que a habilidade das enzimas e dos microorganismos para agir como catalisadores quirais específicos, seja conhecida, principalmente pela indústria farmacêutica, os procedimentos bioquímicos apenas tornaram-se aceitos como técnicas experimentais rotineiras em laboratórios de síntese orgânica nos últimos anos².

Portanto, a habilidade de conduzir transformações químicas que são impossíveis ou impraticáveis de outra forma, especialmente na área de obtenção de compostos enantiomericamente puros; aliada à necessidade de mudar os catalisadores hoje existentes (geralmente constituídos de metais pesados ou de transição, altamente nocivos ao ambiente) por catálises "ambientalmente corretas", tornam o uso de biocatalisadores um dos maiores desafios da síntese orgânica na atualidade³⁻⁷.

A possibilidade de atuar na catálise de reações em meios quase anidros ou micro-aquosos expandiu largamente o potencial de aplicações de enzimas e microorganismos em síntese orgânica. A ausência de fase aquosa contínua em torno do biocatalisador torna possível sua interação direta com o solvente, promovendo alterações de estabilidade, atividade e estereosseletividade^{8,9}. Além disso, nestas condições as hidrolases, por exemplo, são capazes de catalisar reações de esterificações e transesterificações com altos rendimentos.

As enzimas e os microorganismos estão sujeitos à inativação por fatores químicos, físicos ou biológicos, como decorrência da estocagem ou mesmo durante o uso. Há assim, uma necessidade de

estabilizar estes biocatalisadores, como meio de evitar a inativação para uso em meio orgânico. Portanto, para a manutenção da atividade catalítica e do potencial de estereosseletividade, é necessário o desenvolvimento de métodos preventivos específicos.

Neste sentido, a técnica de imobilização em diferentes suportes é uma das mais utilizadas na biocatálise, sendo bastante aplicada para mediar reações de interesse sintético em solventes orgânicos^{10,11}. A imobilização do biocatalisador em um suporte, sem prejuízo de sua atividade por um razoável período de tempo, pode assegurar sua repetida utilização ou mesmo possibilitar o uso em reatores contínuos, resultando em economia nos processos industriais. Assim, de modo geral, a utilização de materiais imobilizados além de diminuir o custo por análise, aumenta a rapidez e a exatidão do processo. Nos processos sintéticos, a facilidade de extração dos produtos do meio reacional aliada à estabilidade do biocatalisador em reações de longa duração (ou com substratos nocivos) são de grande interesse nas biotransformações.

A célula de *Saccharomyces cerevisiae*, que utiliza glicose ou sacarose como fonte de energia, é um dos biocatalisadores mais versáteis e baratos. A facilidade de manuseio, que não requer nenhum cuidado especial, o faz alvo de escolha quando se deseja conduzir reações de oxidação-redução. É preferencialmente utilizado na forma de célula inteira, ao invés de enzimas isoladas, evitando dessa forma, o problema da dificuldade de reciclar o cofator, um passo necessário quando se usa a enzima pura. As células inteiras apresentam uma grande variedade de atividades enzimáticas. Por isso, o maior problema encontrado neste tipo de biocatálise é a baixa seletividade, devido à ação simultânea das várias enzimas presentes, que geralmente apresentam diferentes cinéticas e velocidades de conversão para um mesmo substrato¹². No entanto, quando o processo não é satisfatoriamente seletivo, modificações simples nas condições experimentais podem ser realizadas no sentido de influenciar tanto a estereoquímica como a enantioseletividade¹³. Algumas das modificações mais comuns são o uso de solventes orgânicos, a adição de inibidores ou co-substratos^{14, 15} e as técnicas de imobilização^{11,16,17}, entre outras².

Algumas enzimas hidrolíticas, como as lipases e as proteases, são reconhecidamente retentoras da atividade catalítica em solventes

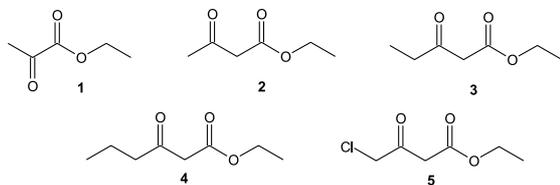
*e-mail: gracia@qmc.ufsc.br

orgânicos. Entretanto, as desidrogenases e redutases são diferentes das hidrolíticas e requerem quantidades estequiométricas das coenzimas NADH ou NADPH. Devido ao alto custo, essas coenzimas são normalmente recicladas. A utilização de células inteiras é uma maneira de resolver o problema de reciclagem da coenzima, porém os solventes orgânicos frequentemente acarretam danos na membrana hidrofóbica da célula do microorganismo.

O uso de solventes orgânicos é vantajoso devido à solubilidade do substrato e à capacidade que possuem em impedir as reações laterais pela água. Além disso, a seletividade da enzima do fermento pelo substrato pode mudar em meio orgânico. A adição de pequenas quantidades de água é necessária sob tais condições de reação, para que a enzima se mantenha cataliticamente ativa⁸. Já o isolamento de produtos de meios não aquosos é bem mais fácil do que de meios aquosos, sendo este mais um grande benefício^{18,19}.

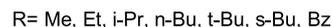
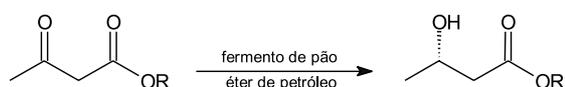
Nakamura e col. realizaram os primeiros estudos de redução de α -ceto ésteres com fermento de pão (FP) seco não imobilizado em benzeno e hexano. Observaram que a utilização controlada de gotas de água (0,4 equivalentes; mL H₂O/g FP) no sistema é indispensável para promover a redução. Já o excesso de água suprime radicalmente a redução¹⁸. Smallridge e col. em 1994, estenderam as investigações na redução de β -cetoésteres com FP em uma série de solventes polares e não polares, num estudo que foi completado verificando-se o efeito da influência da água na reatividade²⁰. Estes resultados demonstraram clara e seguramente que a reação é afetada tanto pela natureza do solvente, quanto pela razão água/fermento (independente da razão água/solvente). Também foi constatado, que a redução do acetoacetato de etila (**2**) com FP em solvente orgânico resultou na formação exclusiva de (*S*)-3-hidroxiacetato de etila com ee de 96%, para todas as condições de reação empregadas. Estes resultados contrastam com os obtidos por Nakamura e col.²¹, onde a redução de α -cetoésteres com FP em água formou o enantiômero-*S*, enquanto que em solvente orgânico obteve-se o enantiômero-*R*²⁰.

Rothaus e col. estudaram a redução de α - e β -cetoésteres (**1-5**) com FP em hexano, tolueno, éter dietílico e acetato de etila⁸. As reações de redução em solventes orgânicos ocorreram preferencialmente em tolueno e hexano, sendo que os melhores resultados foram obtidos para o composto **1** em hexano, e para o **2** em tolueno. A tendência do ee na redução dos compostos **1** a **5**, em solvente orgânico, sugere que o aumento do comprimento da cadeia no lado ceto do substrato está relacionada diretamente ao aumento da percentagem de produto com a configuração *R*. Estes resultados estão de acordo com a regra de Prelog²².



Uma série de (*S*)- β -hidroxiésteres foi preparada por Smallridge e col. usando fermento de pão como mediador da redução de β -oxoésteres em éter de petróleo (40-60 °C). Os produtos foram obtidos com rendimentos entre 56 e 96%, e alto grau de estereosseletividade (94-99% ee). Estes resultados são superiores aos descritos na literatura quando as mesmas reações foram conduzidas em fase aquosa²³ (Esquema 1).

Recentemente Kanda e col. verificaram que o duplo entrapamento da célula do fermento de pão com alginato de cálcio e pré-polímero uretano (PU-6), torna-a suficientemente protegida do solvente orgânico, para repetidas reduções estereosseletivas, em reações de longa duração²⁴.



Esquema 1

Uma das contribuições mais recentes, para o avanço dos estudos de redução mediada por FP em meio orgânico, foi realizada por Smallridge e col. Eles observaram que a atividade do fermento decresce após 24 horas de exposição a solventes orgânicos; e investigaram os fatores associados com esta redução da atividade²⁵. Num estudo complementar, a facilidade de redução de β -ceto ésteres foi relacionada à variação do tamanho da cadeia carbônica ligada ao carbono ceto. A proximidade dos grupos mais volumosos à carbonila proporciona uma redução mais rápida. Finalmente, as β -ceto amidas são consideravelmente menos reativas que os correspondentes β -ceto ésteres²⁶. Em outro trabalho, verificou-se que grupos metilênicos conjugados com carbonilas e nitrilas, podem ser reduzidos com um alto grau de estereosseletividade e bons rendimentos²⁷.

Em contribuição a estes estudos, neste trabalho foram investigadas várias metodologias para a proteção de células de *Saccharomyces cerevisiae*, visando a sua utilização em reações de redução de compostos carbonílicos em meio orgânico. A obtenção estereosseletiva de uma halodrina foi testada juntamente com a facilidade de sua extração do meio reacional, para verificar a eficiência dos sistemas de proteção em estudo, quando se tem um substrato tóxico para o FP, como a α -cloroacetofenona.

PARTE EXPERIMENTAL

Materiais

Os espectros RMN ¹H foram obtidos em um espectrômetro da Bruker AC 200 MHz. Os cromatogramas e espectros de massas foram obtidos em um cromatógrafo a gás GC-MS-QP5000 da Shimadzu, equipado com coluna da Supelco (Simplicity 1 Capillary Column, 30 m x 0,25 mm x 0,25 μ m, N^o 11702-05B). As determinações dos excessos enantioméricos foram realizadas em GC-14B Shimadzu, com coluna quiral CHROMPACK (chirasil - DEX CB 25m x 0,25). As rotações ópticas específicas foram medidas em um Polarímetro - Polartronic E. Fermento de pão (FP) biológico, instantâneo e seco (*Saccharomyces cerevisiae*, EMULZINT - LTDA da Bélgica), foi utilizado como biocatalisador. As células foram imobilizadas em montmorilonita K10 (K10) (Aldrich Chemical Co.) e revestidas com gel de gelatina (G) (SIGMA G2500, Tipo A). Acetoacetato de etila e α -cloroacetofenona (Carlo Erba) foram utilizados sem purificação. Os produtos racêmicos utilizados como padrões para CG quiral (\pm)-3-hidroxiacetato de etila e (\pm)-2-cloro-1-fenil-etanol foram obtidos através da reação de redução com NaBH₄ (Aldrich Chemical Co.)²⁸. O hexano (Grupo Química) foi purificado através de lavagem com ácido sulfúrico e neutralização, seguida de destilação (p.e._{exp} = 68°C; p.e._{lit.} = 69°C)²⁹. A pré-purificação dos produtos obtidos foi realizada por coluna cromatográfica de sílica (Carlo Erba, 0,05-0,20 mm)

Procedimento geral para a adsorção e recobrimento

Uma suspensão com 2,0 g de FP belga seco e 6,0 g de montmorilonita K10, em aproximadamente 100 mL de água foi agitada vigorosamente por uma noite, à temperatura ambiente. A mistu-

ra de FP/K10 foi então filtrada a vácuo, seca sob corrente de ar e triturada até resultar em partículas finas. Uma solução de 0,5 g de gelatina em 5,0 mL de água foi aquecida até 50 °C, e em seguida, resfriada a \pm 30 °C, e misturada ao sólido FP/K10. A mistura FP/K10/G resultante foi seca sob corrente de ar.

Procedimento geral para biotransformação

Em um erlenmeyer foram colocados 100 mL de hexano, e em seguida o biocatalisador foi adicionado, sob agitação magnética. Água ou solução de sacarose, foi gotejada lentamente sob agitação magnética vigorosa. Após a adição de 0,2 mL (1,57 mmoles) de acetoacetato de etila, a mistura reacional foi mantida sob agitação em um banho termostatizado tipo Dubnoff a 20 e 30 °C por 24 h (Tabela 1).

Procedimento para reutilização do biocatalisador

Após o término de cada reação, o sobrenadante foi filtrado a vácuo lavado com hexano (3 x 30,0 mL), ressuspendido em 100 mL de hexano e novamente 0,2 g (1,57 mmoles) de acetoacetato de etila foram adicionados. A mistura reacional foi mantida sob agitação em um banho termostatizado tipo Dubnoff a 20 e 30 °C por 24 h (Tabela 1).

Procedimento para as reações controle

As reações de controle foram realizadas, utilizando FP sem qualquer imobilização. O procedimento geral para estas reações foi a adição de 2,0 g de FP em 50 mL de hexano com 0,2 mL (1,57 mmoles) de acetoacetato de etila (Tabela 1, Entrada 1).

Procedimento geral para a reação de redução da α -cloroacetofenona

As metodologias de adsorção e recobrimento já descritas foram utilizadas, porém, verificou-se a necessidade de se usar o dobro das quantidades acima descritas. Os melhores resultados foram obtidos para a reação modelo com os sistemas FP/K10/G/S e FP/S. Estes dois sistemas determinaram, portanto, os ensaios de redução da α -cloroacetofenona em diferentes tempos (24, 48 e 72 horas) e temperaturas (20 e 30 °C). As estereosseletividades foram avaliadas nestas condições. Para cada sistema (FP/K10/G e FP), foram adicionados 50 mL de hexano e estes submetidos à agitação magnética. Com uma bomba peristáltica e agitação magnética vigorosa, foram adicionadas vagarosamente uma solução de 0,32 g de sacarose em 3,2 mL de água em cada um dos sistemas. Sob agitação tipo Dubnoff a

20 ou 30 °C, foram adicionados 0,2 g (1,3 mmoles) de α -cloroacetofenona. Após 24, 48 e 72 h de reação, o meio reacional foi separado do suporte por filtração, e pré-purificado em uma coluna cromatográfica de sílica para eliminar partículas provenientes do FP, o solvente foi evaporado. A análise da mistura reacional foi realizada por CG, com uma coluna quiral. A reutilização dos dois sistemas foi testada, adicionando-se novamente 0,2 g (1,3 mmoles) de α -cloroacetofenona e 50 mL de hexano; após a filtragem a vácuo do sobrenadante e a lavagem do suporte com hexano (3 x 30,0 mL) sob agitação magnética.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A reação de redução do acetoacetato de etila foi utilizada como um modelo em todos os estudos dos processos de imobilização e recobrimento, com a finalidade de padronizar uma metodologia para outros substratos. Muitos detalhes desta reação modelo são bem conhecidos, principalmente considerando-se que o valor do excesso enantiomérico do álcool produzido pode ser facilmente monitorado por cromatografia gasosa com uma coluna com fase estacionária quiral. Além disto, β -hidroxiésteres enantiomericamente puros, tem sido usados como materiais de partida em sínteses orgânicas (Esquema 2)²⁶.



Esquema 2

Estudos anteriores realizados por Moran e col.³⁰ demonstraram que a relação ideal de FP fresco (contém 70% de umidade) e K10 é de 1:1. Neste trabalho foi usado o FP desidratado e a proporção biocatalisador : suporte foi 3:1. Não foi observada qualquer diferença na obtenção do produto final, após a hidratação do FP antes de sua adsorção em K10, com solução de KCl (2%) e sacarose (razão de sacarose/ FP 1:1).

Sabe-se que a utilização de quantidades de água (entre 0,2 a 1,2 mL de água por grama de fermento) adicionadas ao meio reacional é indispensável para que ocorra a reação^{18,20,21,26}. Foram realizados testes para estabelecer a quantidade ideal de água, dentro da faixa estipulada pela literatura como aceitável, que pode ser adicionada ao meio sem alterar a morfologia dos sistemas em estudo (FP, FP/K10, FP/G, FP/K10/G). O valor máximo de água foi de 0,8 mL por grama de FP, quantidade esta que ainda preserva a área superficial dos sistemas de ser diminuída por aglutinação.

Tabela 1. Diferentes condições experimentais empregadas nas reações de redução de acetoacetato de etila mediadas por FP, em hexano^a

Entradas	Sistemas	H ₂ O (mL)	FP ^b (g)	K10 ^c (g)	G ^d (g/mL)	Sacarose(S) (g)
1	FP	1,6	2,0	–	–	–
2	FP/S	1,6	2,0	–	–	0,16
3	FP/G	1,6	2,0	–	0,1	–
4	FP/G/S	1,6	2,0	–	0,1	0,16
5	FP/K10	1,6	2,0	6,0	–	–
6	FP/K10/S	1,6	2,0	6,0	–	0,16
7	FP/K10/G	1,6	2,0	6,0	0,1	–
8	FP/K10/G/S	1,6	2,0	6,0	0,1	0,16

a) O meio reacional sofreu agitação tipo Dubnoff, e os experimentos foram realizados em duplicatas para comparação dos resultados; b) FP = fermento de pão; c) K10 = montmorilonita K-10; d) G = gelatina
Temperaturas: 20 e 30°C

Conforme esperado, não houve formação de produto quando a reação foi realizada na presença de K10 sem a adição de FP. Verificou-se por CG-quiral, com os sistemas FP, FP/S e FP/K10/G/S a 20 °C que, após 24 h de reação obteve-se 100% de conversão (%c) ao produto 3-hidroxi-butanoato de etila. (Figura 1).

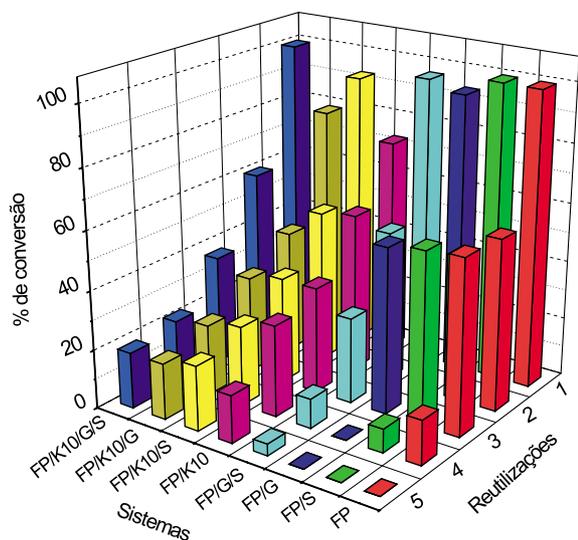


Figura 1. Porcentagem de conversão (%c) do acetoacetato de etila em (S)-(+)-3-hidroxi-butirato de etila mediada por FP em diferentes sistemas de imobilização e em função do número de reutilização, em hexano a 20 °C.

Nas reações efetuadas a 30°C, também foi obtido 100% de conversão para o produto utilizando os sistemas FP, FP/S e FP/K10/G/S. Para o sistema FP o valor de %c diminuiu para 7% na primeira reutilização. Com o sistema FP/K10/G/S, obteve-se o produto com 19% de conversão na primeira reutilização, mostrando uma modesta proteção para as células do FP. Após a primeira reação, todos os sistemas foram avaliados em até quatro reutilizações (Figura 2).

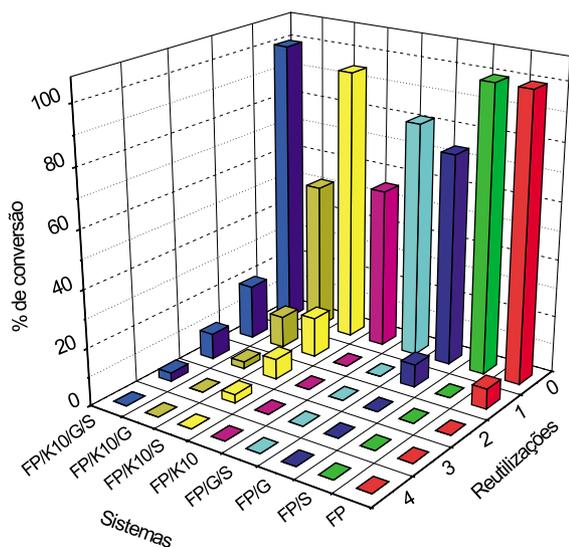


Figura 2. Porcentagem de conversão (%c) do acetoacetato de etila em (S)-(+)-3-hidroxi-butirato de etila mediada por FP em diferentes sistemas de imobilização e em função do número de reutilização, em hexano a 30 °C.

Através da análise das Figuras 1 e 2, pode-se verificar que a partir da segunda reutilização, ou seja, a terceira reação a que o sistema foi submetido, as áreas que correspondem aos produtos da reação diminuíram significativamente, principalmente à temperatura de 30 °C. A temperatura exerce uma influência na desativação da enzima redutase do FP²⁵. Como consequência, ocorreu a desativação da enzima após 24 h e obtiveram-se valores de conversão menores quando as reações foram realizadas a 30 °C.

Os valores de ee, analisados por CG-quiral, foram para todos os sistemas superiores a 99%. Para todos eles, apenas um dos enantiômeros foi detectado. As condições cromatográficas para a separação dos enantiômeros preestabelecidas e as medidas de rotação ótica $[\alpha]_D^T$ indicaram a formação do (S)-(+)-3-hidroxi-butanoato de etila puro de acordo com a literatura^{12,31}.

Para os sistemas FP/K10 e FP/K10/G sem a adição de sacarose, a %c diminuiu consideravelmente em relação aos mesmos sistemas com adição de sacarose, nas temperaturas de 20 e 30 °C. Estes resultados podem estar associados ao fato de que a sacarose pode atuar como fonte de carbono e proteção adicional para as células de *Saccharomyces cerevisiae* (Tabela 2).

Tabela 2. Porcentagem de conversão (%c) do acetoacetato de etila em (S)-(+)-3-hidroxi-butirato de etila nos sistemas com e sem sacarose, em hexano

Sistemas	% c (20 °C)	% c (30 °C)
FP/K10	73	56
FP/K10/S	93	95
FP/K10/G	79	52
FP/K10/G/S	100	100

Tempo reacional: 24 horas

Constatou-se também que o maior tempo de permanência do FP não imobilizado em solventes orgânicos está relacionado a um aparecimento de produtos secundários, detectados pelos cromatogramas. Porém, para o sistema imobilizado, ou seja, FP/K10/G/S, houve uma maior resistência quanto à formação de subprodutos indesejáveis.

A redução estereosseletiva de α -haloacetofenonas é potencialmente um excelente processo para obtenção de halodirinais quirais, que podem ser usadas como blocos de construção quirais para alguns produtos naturais e fármacos opticamente ativos³². A biorredução da α -cloroacetofenona tem sido realizada com FP em meio aquoso^{30,32,33}. Neste trabalho, esta reação foi realizada em meio orgânico (Esquema 3).



Esquema 3

Os dados de %c e ee (%) para formação do (R)-(-)-2-cloro-1-feniletanol estão na Tabela 3.

A Tabela 3 demonstra que os valores de ee para o sistema FP/K10/G/S (ee 73-79) foram sempre maiores que para FP/S (ee 55-60%), independente do tempo e da temperatura. Os dados de %c usando o sistema FP/K10/G/S foram menores que para FP/S. Estes resultados provavelmente mostram a maior dificuldade de difusão do reagente e do produto, no meio reacional, causada pela gelatina (G) e o K10.

Tabela 3. Porcentagem de conversão (%c) da α -cloroacetofenona em *R*-(-)-2-cloro-1-feniletanol e os valores de ee (%) obtidos em diferentes condições experimentais

Sistemas	ee % ^a (%c) ^b 24h		ee % ^a (%c) ^b 48h		ee % ^a (%c) ^b 72h	
	20 °C	30 °C	20 °C	30 °C	20 °C	30 °C
FP/S	60 (30)	56 (19)	56 (26)	55 (39)	56 (26)	60 (35)
FP/K10/G/S	77 (10)	73 (9)	77 (15)	73 (10)	79 (10)	78 (19)

^a ee calculado pela % de área (CG quiral).

^b determinados por RMN ¹H.

Foram realizados testes para verificar a ocorrência de inversão de configuração ao reutilizar estes sistemas nestas condições experimentais, considerando que isto ocorre em meio aquoso³⁰. Entretanto, observou-se que não houve a inversão de configuração do (*R*)-(-)-2-cloro-1-feniletanol quando os sistemas foram reutilizados, e que a %c foi menor que 5%. Este resultado mostra que o sistema de proteção FP/K10/G/S, para a parede celular, ainda não foi eficiente quando um substrato tóxico como a α -cloroacetofenona foi utilizado em hexano, sugerindo a desativação das oxido-redutases.

CONCLUSÕES

O sistema FP/K10/G/S foi o que melhor protegeu as células na reação modelo, produziu menos subprodutos e manteve-se com atividade (ee >99%) até a quarta reutilização com uma porcentagem de conversão de acetoacetato de etila para o (*S*)-(+)-3-hidroxi-butanoato (ee > 99%) de etila de 19% a 20°C.

A metodologia estudada para a proteção das células de *Saccharomyces cerevisiae* do meio reacional, mostrou-se também bastante eficiente na obtenção de produtos enantiomericamente puros como o (*R*)-(-)-2-cloro-1-feniletanol (ee 78%, 72h a 30°C). Uma grande vantagem deste método, está na facilidade de separação do produto desejado do meio reacional. Entretanto, a dificuldade de difusão dos reagentes e produtos pode levar à formação de produtos com baixos valores de %c.

O método é adequado para ser empregado em reações de redução enantiosseletivas em laboratórios de química orgânica.

AGRADECIMENTOS

Ao DQ-UFSC, IQ-UNICAMP e CNPq pelo suporte financeiro e bolsas concedidas (SPM, SPZ e MGN) e ao Dr. A. C. Siani (FIOCRUZ) pelas sugestões e revisão do manuscrito.

REFERÊNCIAS

- Bon, E. P. S.; Pereira Jr., N.; *Tecnologia Enzimática*; Fundação Biblioteca Nacional; Rio de Janeiro, RJ, 1999, p. 113.
- Santaniello, E.; Ferraboschi, P.; Grisenti, P.; Manzocchi, A.; *Chem. Rev.* **1992**, *92*, 1071.
- Roberts, S. M.; Turner, N. J.; Willetts, J.; Turner, M. K.; *Introduction to Biocatalysis using Enzymes and Micro-organisms*, Cambridge University Press: New York; 1995, p. 195.
- Hudlicky, T.; Gonzalez, D.; Gibson, D. T.; *Aldrichimica Acta* **1999**, *32*, 35.
- Duran, N.; Conti, R. De; Rodrigues, J. A. R.; *Bol. Soc. Chil. Quím.* **2000**, *45*, 109.
- Stewart, J. D.; *Curr. Opin. Biotechnol.* **2000**, *11*, 363.
- Stanley, M. R.; *J. Chem. Educ.* **2000**, *77*, 344.
- Rothaus, O.; Krüger, D.; Demuth, M.; Schaffner, K.; *Tetrahedron* **1997**, *53*, 935.
- Hudlicky, T.; Gonzalez, D.; Gibson, D. T.; *Aldrichimica Acta* **1999**, *32*, 35.
- Fernandez-Lafuente, R.; Armisen, P.; Sabuquillo, P.; Fernández-Lorente, G.; Guisán, J. M.; *Chem. Phys. Lipids* **1998**, *93*, 185.
- Narvátil, M.; Sturdik, E.; *Biologia* **1999**, *54*, 635.
- D'Arrigo, P.; Fantoni, G. P.; Servi, S.; Strintí, A.; *Tetrahedron: Asymmetry* **1997**, *8*, 2375.
- Hayakawa, R.; Nozawa, K.; Shimizu, M.; Fujisawa, T.; *Tetrahedron Lett.* **1998**, *39*, 67.
- Pereira, R. S.; *Crit. Rev. Biotechnol.* **1998**, *18*, 25.
- Dahl, A. C.; Madsen, J. O.; *Tetrahedron: Asymmetry* **1998**, *6*, 4395.
- Bekatorou, A.; Koutinas, A. A.; Kaliafas, A.; Kanellaki, M.; *Process Biochem.* **2001**, *36*, 549.
- Grunwald, P.; *Biochem. Educ.* **2000**, *28*, 96.
- Nakamura, K.; Kondo, S.; Kawai, Y.; Ohno, A.; *Tetrahedron Lett.* **1991**, *32*, 7075.
- León, R.; Fernandes, P.; Pinheiro, H. M.; Cabral, J. M.; *Enzyme Microb. Technol.* **1998**, *23*, 483.
- Jayasinghe, L. Y.; Kodituwakku, D.; Smallridge, A. J.; Trehwella, M. A.; *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1994**, *67*, 2528.
- Nakamura, K.; Kondo, S.; Kawai, Y.; Ohno, A.; *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1993**, *66*, 2738.
- Faber, K.; *Biotransformations in Organic Chemistry*, Springer-Verlag: Berlin 1997, p.p 402.
- Medson, C.; Smallridge, A. J.; Trehwella, M. A.; *Tetrahedron: Asymmetry* **1997**, *8*, 1049.
- Kanda, T.; Miyata, N.; Fukui, T.; Kawamoto, T.; Tanaka, A.; *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **1998**, *49*, 377.
- Medson, C.; Smallridge, A. J.; Trehwella, M. A.; *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2001**, *11*, 897.
- Athanasios, N.; Smallridge, A. J.; Trehwella, M. A.; *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2001**, *11*, 893.
- Dumanski, P. G.; Florey, P.; Knetting, M.; Smallridge, A. J.; Trehwella, M. A.; *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2001**, *11*, 905.
- Furniss, B. S.; Hannaford, A. J.; Rogers, V.; Smith, P. W. G.; Tatchell, A. R.; *Vogel's Textbook of Practical Organic Chemistry*, 4^a ed., Longman Group Limited: New York, 1978, p. 353.
- Handbook of Chemistry and Physics*, CRC Press: Boca Raton, 1979.
- Sorriha, A. E. P. M.; Marques, M.; Joekes, I.; Moran, P. J. S.; Rodrigues, J. A. R.; *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1992**, *2*, 191; Moran, P. J. S.; Rodrigues, J. A. R.; Joekes, I.; Brenelli, E. C. S.; Leite, R. A.; *Biocatalysis* **1994**, *9*, 321.
- Wendhausen, R. Jr.; Moran, P. J. S.; Joekes, I.; Rodrigues, J. A. R.; *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **1998**, *5*, 69.
- Brenelli, E. C. S.; Carvalho, M.; Okubo, M. T.; Marques, M.; Moran, P. J. S.; Rodrigues, J. A. R.; *Indian J. Chem.* **1992**, *31B*, 821; Barbieri, C.; Bossi, L.; D'Arrigo, P.; Fantoni, G. P.; Servi, S.; *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2001**, *11*, 415.
- Carvalho, M.; Okamoto, M. T.; Moran, P. J. S.; Rodrigues, J. A. R.; *Tetrahedron* **1991**, *47*, 2073; Aleixo, L. M.; Carvalho, M.; Moran, P. J. S.; Rodrigues, J. A. R.; *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1993**, *3*, 1637; Moran, P. J. S.; Rodrigues, J. A. R.; Carvalho, M.; Brenelli, E. C. S. de; *Atualidades de Física Química Orgânica*, Ed. E. Humeres: Florianópolis, 1995, p. 499.



Pergamon

SCIENCE @ DIRECT®

Tetrahedron: *Asymmetry* 14 (2003) 3111–3115TETRAHEDRON:
ASYMMETRY

Resolution of α -methylene- β -hydroxy esters catalyzed by free and immobilized *Pseudomonas* sp. lipase

M. G. Nascimento,* Sandra P. Zanotto, Sílvia P. Melegari, Luciano Fernandes and Marcus Mandolesi Sá

Departamento de Química, Universidade Federal de Santa Catarina, Trindade, Florianópolis, SC, Brazil 88040-900

Received 7 May 2003; accepted 7 August 2003

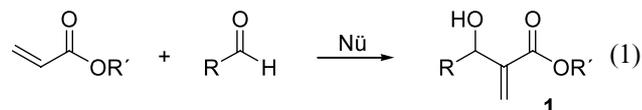
Abstract—Kinetic resolutions of α -methylene- β -hydroxy esters (Baylis–Hillman products) have been performed via enzymatic enantioselective transesterification with *Pseudomonas* sp. lipase (PSL), free or immobilized in poly(ethylene) oxide (PEO), silica gel and montmorillonite K10, under different reaction conditions. The corresponding (*R*)-(+)-acetates from alkyl-substituted racemic alcohols were obtained with e.e. >99% and excellent to moderate conversions using the PSL/PEO system and vinyl acetate as acylating agent, in hexane. A naphthyl-substituted hydroxy ester was inert under these experimental conditions.

© 2003 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

α -Methylene- β -hydroxy esters **1** are versatile building blocks for the synthesis of many important compounds such as natural products (kijanolide,¹ mycetericin E,² terpenicin,³ necic acids,⁴ terpenoids,⁵ insect pheromones),^{6,7} nitrogen-containing heterocycles^{8–10} and other biologically-active molecules.^{11,12} These multifunctional compounds **1** are readily available by a unique synthetic transformation involving a nucleophile-catalyzed reaction of α,β -unsaturated esters with aldehydes, the Baylis–Hillman reaction (Eq. (1)).^{13–15} A convenient access to optically-active α -methylene- β -hydroxy esters **1**, however, represents a challenging issue that has received increasing interest.^{2,16} Asymmetric versions of the Baylis–Hillman reaction using either chiral auxiliaries or chiral catalysts have been developed, but only in a few cases were the chemical yields and enantiomeric excess high.^{17–20} In addition, these methodologies usually employ rather expensive chiral sources and difficult experimental protocols with multi-step transformations that restrict their use. Racemic α -methylene- β -hydroxy esters **1** are easily prepared from inexpensive reagents, and therefore they are good candidates for kinetic resolution. Although chemical resolution carried out by selective hydrogenation or epoxidation of the C=C double bond present in

racemic **1** have been reported, these methods also present restrictions concerning the availability of the resolving reagents, multi-step synthesis, and low yields.^{20–23}



Lipases (glycerol ester hydrolases E.C. 3.1.1.3) are established catalysts for the stereoselective resolution of synthetic or semi-synthetic chiral alcohols.^{24,25} They accept a wide range of substrates, which are usually converted with high enantioselectivity. These enzymes also exhibit high stability in non-aqueous solvents. In most cases, enantiomerically pure alcohols are prepared from racemic or pro-stereogenic precursors and reactions are often performed via transesterification in organic solvents. To increase the reaction rate and to shift the equilibrium towards product synthesis, activated esters such as vinyl acetate are routinely employed.²⁶ Among the available lipases, those from *Pseudomonas* sp. have been used to enhance kinetic resolutions of ferrocene derivatives and starting materials for the synthesis of terpenoids and carotenoids, as well as in the stereoselective preparation of polyesters²⁷ and polycarbonates.²⁸

* Corresponding author. Tel.: +55-48-3319219; fax: +55-48-3319711; e-mail: graca@qmc.ufsc.br

The preparative-scale resolutions of (*RS*)-methyl mandelate and some bicyclic compounds by transesterification with vinyl acetate catalyzed by *Pseudomonas* sp. lipase (PSL) have recently been described.^{29,30} However, enzymatic kinetic resolution of racemic α -methylene- β -hydroxy esters^{31,32} using lipases such as PSL and *Pseudomonas* AK is limited to a few examples.^{33,34} While good to excellent enantiomeric excess (e.e.) was achieved in such resolutions, only modest enantiomeric ratio (*E*) values³⁵ were observed for alcohols **1** containing carbomethoxy groups ($R' = \text{CH}_3$)³³ or large side chains ($R > \text{C}_2\text{H}_5$).³⁴ Additionally, high quantities of enzyme were usually employed in these specific transformations without recycling the biocatalyst, therefore restricting the above methodologies.

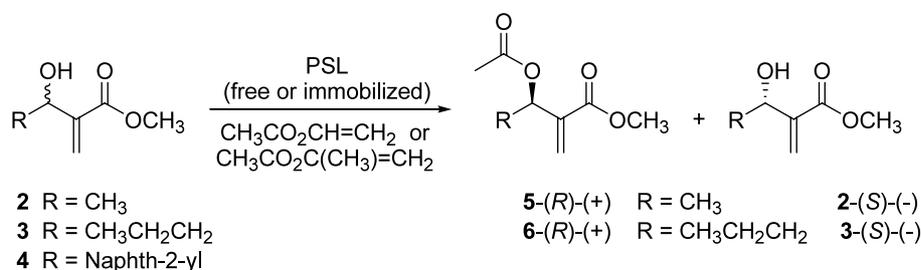
Herein, we report the preparation of racemic α -methylene- β -hydroxy esters and their resolution via enzymatic enantioselective transesterification with PSL, free or immobilized in poly(ethylene) oxide (PEO), silica gel and montmorillonite K10, under different conditions.

2. Results and discussion

Compounds **2** and **3** were prepared according to the literature by reacting methyl acrylate with the appropriate aldehyde in the presence of catalytic DABCO at room temperature for 5–7 days.^{1,5,7} The previously

unreported naphthyl allylic alcohol **4** was similarly obtained and was fully characterized by spectroscopic data. The racemic acetate derivatives **5** and **6** used as standards for GC chiral analysis were prepared by treating the corresponding alcohols **2** and **3** with acetyl chloride and triethylamine in CH_2Cl_2 at 0°C for 2 h.^{4,5,8} All compounds were isolated in good yields after purification by flash chromatography.

Enzymatic transesterification of compounds **2–4** was then investigated (Scheme 1). The reactions were monitored by gas chromatography using a chiral column (vide infra). A preliminary evaluation of various experimental conditions such as substrate structure, acylating agent, support for lipase, solvent and time revealed that transesterification was remarkably dependent on these reaction parameters (Table 1). The kinetic resolution of **2** was better achieved by using PSL immobilized in PEO, vinyl acetate as acylating reagent, and hexane as solvent, obtaining a conversion (%) of 50% and the corresponding acetate with e.e. higher than 99%.³⁶ On the other hand, immobilization of PSL in silica gel or montmorillonite K10 greatly decreased the enzymatic activity and no product was formed. For the resolution of substrates **2** and **3** using the PSL/free system, poorer conversions and e.e. values were achieved, even after a 168 h reaction. Furthermore, substrate **4** was inert under these experimental conditions.



Scheme 1.

Table 1. Preliminary screening for the biocatalytic resolutions of compounds **2**, **3** and **4**

Compound–catalyst	Solvent	Acylating reagent	Time (h)				% c ^b
			24 e.e. ^a (%)	48 e.e. (%)	72 e.e. (%)	168 e.e. (%)	
2 –PSL/free ^c	Hexane	Vinyl acetate	52	77	87	91	39
	CH ₃ CN	Vinyl acetate	1	3	3	20	0.5
	Hexane	Isopropenyl acetate	17	27	40	90	27
2 –PSL/PEO ^d	Hexane	Vinyl acetate	57	90	99	99	50
2 –PSL/silica ^d	Hexane	Vinyl acetate	0	0	0	0	0
2 –PSL/K10 ^d	Hexane	Vinyl acetate	0	0	0	0	0
3 –PSL/free ^c	Hexane	Vinyl acetate	1	5	8	14	12
	Hexane	Isopropenyl acetate	0	0	0	0	0
4 –PSL/free ^c	Hexane	Vinyl acetate	0	0	0	0	0
	Hexane	Isopropenyl acetate	0	0	0	0	0

^a Enantiomeric excess for the acetate, determined by chiral CG.

^b c = conversion determined by ¹H NMR (200 MHz).

^c PSL = 500 mg; substrate **2** or **3** = 7.8 mmol.

^d PSL = 100 mg; support (PEO, silica gel or montmorillonite K10) = 500 mg; substrate **2** = 1.4 mmol.

^e PSL = 500 mg; substrate **4** = 0.8 mmol.

The superior resolution obtained for (*RS*)-methyl 3-hydroxy-2-methylenebutanoate **2** using PSL/PEO is worthy of note. A clean conversion to the corresponding (*R*)-acetate **5** was observed, thus evidencing the high molecular recognition performed by the enzyme.

These preliminary findings prompted a more detailed investigation on the catalytic activity of PSL/PEO compared with free enzyme. Therefore, resolution of substrates **2** and **3** using vinyl acetate as the acylating agent and hexane as the solvent was evaluated with both PSL/PEO and PSL/free systems. As depicted in Table 2, excellent results were obtained for the resolution of the allylic alcohol **2** employing either PSL/free or PSL/PEO systems. In all cases, acylated products **5**-(*R*)-(+)- or **6**-(*R*)-(+)- were obtained with e.e. >99% and *E* >200 regardless of the time or the catalytic system employed. The use of polymer-supported enzyme PSL/PEO (100 mg of catalyst for 1.4 mmol of substrate) is noteworthy, improving the rate, the extent of conversion and the selectivity for both hydroxy esters **2** and **3**, in comparison with PSL/free mediated transformations (500 mg of catalyst for 7.8 mmol of substrate). In addition, when resolution promoted by PSL/PEO was stopped at a maximum conversion of 50% (by a simple filtration to separate the catalyst), enantiomerically pure alcohol **2**-(*S*)-(-) and acetate **5**-(*R*)-(+), ($[\alpha]_D^{25} = +18.0$; CHCl₃, *c* 5.0, 25°C) were produced and easily separated by preparative silica gel chromatography (entry 15 in Table 2). The fact that the resolution is effected under very mild conditions was demonstrated by entry 16 in Table 2. The reaction was carried out for longer periods after reaching the maximum conversion of 50%, but no

racemization was detected as the e.e. for substrate and product were unchanged from 96 to 168 h.

While substrate **2** was completely resolved in 3–4 days using PSL/PEO system, the chain-extended derivative **3** reached only 36% of conversion after 7 days. The corresponding (*R*)-(+)-acetate **6** was isolated in high enantiomeric purity, but the e.e. for the unreactive (*S*)-(-)-alcohol was poor (entry 24 in Table 2). These observations clearly show that the size of the R groups strongly influences the resolution using lipases as biocatalyst.³⁴

Another interesting feature presented by biocatalysis is the possibility of recycling and re-using the enzymes, undoubtedly a desirable property for economical and environmental concerns. Accordingly, when PSL/free and PSL/PEO were re-used twice to resolve hydroxy ester **2**, enantioselectivities comparable with those observed for freshly-used catalytic systems were attained. PSL/PEO was particularly advantageous in this case, since this catalyst can be easily recycled by simple filtration followed by thorough washings with hexane. Moreover, resolution of hydroxy ester **2** employing a re-used PSL/free stored for 30 days at low temperature (~10°C) furnished alcohol **2**-(*S*)-(-) with e.e. = 65%. Conversely, PSL/PEO under similar conditions promoted the resolution of **2**-(*S*)-(-) with e.e. = 99%, therefore attesting the superior stability and efficiency of the polymer-supported enzyme. Possible explanations for the enhancement of catalytic activity with PSL/PEO system could be related to a better diffusion of substrates and products through the poly-

Table 2. Biocatalytic resolutions of compounds **2** and **3** using free and immobilized PSL with vinyl acetate in hexane

Entry	Substrate (mmol)	PSL/support (mg of enzyme)	Time (h)	E.e.s. (%) ^a	E.e.p. (%) ^a	Conversion (%) ^b	<i>E</i>
1	2 (7.8)	PSL/free (500)	24	52	99	34	335
2			48	77	99	44	466
3			96	90	99	48	617
4			168	91	99	48	637
5	2 (1.4)	PSL/PEO (50)	24	23	99	19	249
6			48	38	99	28	289
7			96	65	99	40	391
8			168	81	99	45	500
9	2 (1.4)	PSL/PEO (75)	24	41	99	29	298
10			48	72	99	42	431
11			96	80	99	45	491
12			168	83	99	46	520
13	2 (1.4)	PSL/PEO (100)	24	57	99	37	354
14			48	90	99	48	617
15			96	99	99	50	1057
16			168	99	99	50	1057
17	3 (7.8)	PSL/free (500)	24	1	99	1	200
18			48	5	99	5	209
19			96	10	99	9	219
20			168	14	99	12	228
21	3 (1.4)	PSL/PEO (100)	24	29	99	23	264
22			48	40	99	29	295
23			96	54	99	35	342
24			168	56	99	36	350

^a Enantiomeric excesses for the substrate (e.e.s.) and for the product (e.e.p.) were determined by chiral CG.

^b Determined by ¹H NMR (200 MHz).

meric matrix and to conformational constraints adopted by the immobilized enzyme which might be closer to the transition state.^{29,37}

3. Conclusion

The enzymatic resolution of α -methylene- β -hydroxy esters with PSL/PEO presented here is a simple, mild and economically-important method, since the enantiomeric ratio (*E*) is excellent and enzymes can be recycled for further reutilization without significant loss of their catalytic activity. The influence of side chain groups in substrates **2–4** was also observed, but still requires additional investigations. This methodology should be applied successfully to other racemic Baylis–Hillman adducts and important synthetic targets such as hydroxyl-containing building blocks and insect pheromones.

4. Experimental

4.1. General considerations

All chemicals were of reagent grade and were used as received. Melting points are uncorrected. ¹H NMR (200 MHz) spectra were recorded in CDCl₃ solution, using tetramethylsilane as the internal standard. Infrared spectra were acquired using KBr for solids and film for liquid samples. Column chromatography utilized silica gel (Aldrich, 60–120 mesh particle size). PS lipase (30,000 U/g, Amano 30) was obtained from Amano Enzyme USA Co., Ltd.; PEO (300,000 g/mol) was purchased from SIGMA; montmorillonite K10 was supplied by Fluka. The reaction's progress and enantiomeric excess were determined by gas chromatography using a Shimadzu CG-14B equipped with a chiral column (CP-chirasil-Dex CB), and H₂ as a carrier gas, with a detector, an injection set at 275°C and a column set to temperatures of 80–140°C (2°C/min). The extent of conversion (%) was obtained by ¹H NMR integrals (200 MHz, CDCl₃). The enantiomeric ratio (*E*) values were calculated from the degree of conversion and the e.e. of the product, according to the Sih equation.³⁵

4.2. Preparation of the PSL/PEO film

The enzyme immobilization in PEO was performed by dissolving 500 mg of polymer and 50–100 mg of PSL in 20 mL of H₂O with further solvent evaporation at room temperature forming a film, which was then cut into several regular sections.

4.3. Immobilization of PSL in silica and K10

PSL (100 mg) was suspended in H₂O (10 mL), and the suspension was mixed with silica gel (500 mg) or K10 (500 mg) in 10 mL H₂O at room temperature. After 5 h of stirring, the mixture was filtered and the resulting system (PSL/silica or PSL/K10) was dried in the oven (100°C) and then stored in a desiccator, ready for use.

4.4. Preparation of racemic α -methylene- β -hydroxy esters and acetates

Compounds **2**, **3**, **5** and **6** were prepared according to the literature and purified by flash chromatography (hexane/AcOEt 9:1); their spectroscopic characterizations were in agreement with published data.^{1,4,5,7,8}

4.5. Methyl 3-hydroxy-2-methylenebutanoate **2**¹

IR: 3426, 1734 and 1645 cm⁻¹; ¹H NMR: δ 1.37 (d, 3H, *J*=6.5 Hz), 2.79 (s, 1H), 3.78 (s, 3H), 4.62 (q, 1H, *J*=6.5 Hz), 5.83 (s, 1H) and 6.21 (s, 1H).

4.6. Methyl 3-hydroxy-2-methylenehexanoate **3**^{5,7}

IR: 3440, 2958, 2874, 1718 and 1630 cm⁻¹; ¹H NMR: δ 0.94 (t, 3H, *J*=7.0 Hz), 1.26–1.68 (m, 4H), 2.66 (broad s, 1H), 3.78 (s, 3H), 4.41 (t, 1H, *J*=6.0 Hz), 5.80 (s, 1H) and 6.22 (s, 1H).

4.7. Methyl 3-acetoxy-2-methylenebutanoate **5**^{4,8}

IR: 1742 and 1634 cm⁻¹; ¹H NMR: δ 1.40 (d, 3H, *J*=6.5 Hz), 2.07 (s, 3H), 3.78 (s, 3H), 5.71 (q, 1H, *J*=6.5 Hz), 5.82 (s, 1H) and 6.29 (s, 1H).

4.8. Methyl 3-acetoxy-2-methylenehexanoate **6**^{5,8}

IR: 1726 and 1634 cm⁻¹; ¹H NMR: δ 0.94 (t, 3H, *J*=7.0 Hz), 1.30–1.70 (m, 4H), 2.08 (s, 3H), 3.71 (s, 3H), 5.62 (t, 1H, *J*=7.5 Hz), 5.72 (s, 1H) and 6.27 (s, 1H).

The previously unreported naphthyl allylic alcohol **4** was prepared as follows:

4.9. Methyl 3-hydroxy-2-methylene-3-(2-naphthyl)propanoate **4**

55 mg of DABCO (0.50 mmol) was added to a solution containing 260 mg of 2-naphthaldehyde (1.66 mmol) in 0.30 mL of methyl acrylate (3.33 mmol) and the mixture was allowed to stir for 72 h at 25°C. The reaction was then diluted in CH₂Cl₂ (10 mL), washed with 5% HCl (5 mL) and H₂O (5 mL), dried with Na₂SO₄, and concentrated under reduced pressure. The solid residue obtained was filtered in a plug of silica gel (hexane/AcOEt 9:1) and the solvents were removed in vacuo to give 325 mg of compound **5**, (85%); mp 98–99°C; IR: 3330, 3045, 1734 and 1645 cm⁻¹; ¹H NMR: δ 3.71 (s, 3H), 5.73 (s, 1H), 5.87 (s, 1H), 6.37 (s, 1H), 7.47 (m, 3H) and 7.84 (m, 4H). Anal. calcd for C₁₅H₁₄O₃ (%): C, 74.36; H, 5.82. Found: C, 74.03; H, 5.90.

4.10. General procedure for enzymatic resolution of racemic α -methylene- β -hydroxy esters with polymer-supported PSL

PSL/PEO system (75–100 mg) was added to a solution of racemic **2** or **3** (1.4 mmol) and vinyl acetate (21.6 mmol) in hexane (50 mL). The mixture was gently stirred at 35°C for 168 h, and was then filtered and

washed thoroughly with hexane. The filtrate was evaporated and the resulting residue was purified by column chromatography (ethyl ether/ethyl acetate 9:1) to give the corresponding (*R*)- α -methylene- β -acetoxy esters and (*S*)- α -methylene- β -hydroxy esters as colourless oils.

4.11. General procedure for enzymatic resolution of racemic α -methylene- β -hydroxy esters with free PSL

Free PSL (500 mg) was added to a solution of racemic **2** or **3** (7.8 mmol) and the acylating agent (vinyl or isopropenyl acetate, 21.6 mmol) in hexane (50 mL). After stirring at 35°C for 168 h, the reaction mixture was treated as above to give the corresponding α -methylene- β -acetoxy esters and α -methylene- β -hydroxy esters.

Acknowledgements

The authors are grateful to Central de Análises (Departamento de Química, UFSC) for spectroscopic analysis and to Amano Enzyme USA Co., Ltd., for kindly furnishing PSL. Financial support and scholarships to SPZ, SPM and MGN by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and to LF by CAPES are also acknowledged.

References

- Roush, W. R.; Brown, B. B. *J. Org. Chem.* **1993**, *58*, 2151–2161.
- Iwabuchi, Y.; Furukawa, M.; Esumi, T.; Hatakeyama, S. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **2001**, 2030–2031.
- Bailey, M.; Markó, I. E.; Ollis, W. D.; Rasmussen, P. R. *Tetrahedron Lett.* **1990**, *31*, 4509–4512.
- Ameer, F.; Drewes, S. E.; Hoole, R.; Kaye, P. T.; Pitchford, A. T. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1985**, 2713–2717.
- (a) Hoffmann, H. M. R.; Rabe, J. *J. Org. Chem.* **1985**, *50*, 3849–3859; (b) Hoffmann, H. M. R.; Rabe, J. *Helv. Chim. Acta* **1984**, *2*, 413–415.
- (a) Cheskis, B. A.; Moiseenkova, A. M.; Shpiro, N. A.; Stashina, G. A.; Zhulin, V. M. *Bull. Acad. Sci. USSR, Div. Chem. Sci. (Engl. Transl.)* **1990**, *39*, 716–720; (b) Moiseenkova, A. M.; Cheskis, B. A.; Shpiro, N. A.; Stashina, G. A.; Zhulin, V. M. *Bull. Acad. Sci. USSR, Div. Chem. Sci. (Engl. Transl.)* **1990**, *39*, 517–521.
- Mateus, C. R.; Feltrin, M. P.; Costa, A. M.; Coelho, F.; Almeida, W. P. *Tetrahedron* **2001**, *57*, 6901–6908.
- Kim, J. N.; Chung, Y. M.; Im, Y. J. *Tetrahedron Lett.* **2002**, *43*, 6209–6211.
- Annunziata, R.; Benaglia, M.; Cinquini, M.; Cozzi, F.; Raimondi, L. *J. Org. Chem.* **1995**, *60*, 4697–4706.
- Räcker, R.; Döring, K.; Reiser, O. *J. Org. Chem.* **2000**, *65*, 6932–6939.
- Basavaiah, D.; Kumaragurubaran, N. *Tetrahedron Lett.* **2001**, *42*, 477–479.
- Kundu, M. K.; Sundar, N.; Kumar, S. K.; Bhat, S. V.; Biswas, S.; Valecha, N. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1999**, *9*, 731–736.
- (a) Basavaiah, D.; Rao, A. J.; Satyanarayana, T. *Chem. Rev.* **2003**, *103*, 811–891; (b) Basavaiah, D.; Rao, P. D.; Hyma, R. S. *Tetrahedron* **1996**, *52*, 8001–8062.
- Ciganek, E. *Organic Reactions*; John Wiley & Sons: New York, 1997; Vol. 51, pp. 201–350.
- Drewes, S. E.; Roos, G. H. P. *Tetrahedron* **1988**, *44*, 4653–4670.
- Langer, P. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2000**, *39*, 3049–3052.
- Brzezinsky, L. J.; Rafel, S.; Leahy, J. W. *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 4317–4318.
- Yang, K.-S.; Chen, K. *Org. Lett.* **2000**, *2*, 729–731.
- Krishna, P. R.; Kannan, V.; Ilangovan, A.; Sharma, G. V. M. *Tetrahedron: Asymmetry* **2001**, *12*, 829–837.
- Iwabuchi, Y.; Nakatani, M.; Yokoyama, N.; Hatakeyama, S. *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 10219–10220.
- Trost, B. M.; Tsui, H.-C.; Toste, F. D. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 3534–3535.
- Kitamura, M.; Kasahara, I.; Manabe, K.; Noyori, R. *J. Org. Chem.* **1988**, *53*, 708–710.
- Brown, J. M. *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **1987**, *26*, 190–203.
- Roberts, S. M. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1999**, *1*, 1–21.
- Roberts, S. M. *Biocatalysis for Fine Chemical Synthesis*; John Wiley & Sons: New York, 1999.
- Yang, H.; Henke, E.; Bornscheur, U. T. *J. Org. Chem.* **1999**, *64*, 1709–1712.
- Kobayashi, S.; Uyama, H.; Namekawa, S.; Hayakawa, H. *Macromolecules* **1998**, 5655–5659.
- Al-Azemi, T. F.; Bisht, K. S. *Macromolecules* **1998**, 6536–6540.
- Morriso, F. D. P.; Costa, V. E. U. *Tetrahedron: Asymmetry* **2001**, *12*, 2641–2647.
- Queiroz, N.; Nascimento, M. G. *Tetrahedron Lett.* **2002**, *43*, 5225–5227.
- Adam, W.; Hoch, U.; Saha-Möller, C. R.; Schreier, P. *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **1993**, *32*, 1737–1739.
- Basavaiah, D.; Rao, P. D. *Synth. Commun.* **1994**, *24*, 913–917.
- Burgess, K.; Jennings, L. D. *J. Org. Chem.* **1990**, *55*, 1138–1139.
- Hayashi, N.; Yanagihara, K.; Tsuboi, S. *Tetrahedron: Asymmetry* **1998**, *9*, 3825–3830.
- Sih, C. J.; Wu, S.-H. *Top. Stereochem.* **1989**, *19*, 63–125.
- The absolute configurations tentatively assigned to hydroxy esters **2** and **3** and to acetates **5** and **6**, in Scheme 1, were based on related work³³ in which hydrogenation of the double bond afforded the corresponding α -methylene- β -hydroxy (or β -acetoxy) esters with known stereochemistry.²²
- Pleiss, J.; Fischer, M.; Schmidt, R. D. *Chem. Phys. Lipids* **1998**, *93*, 67–80.