

NOELLE CRUZ FAUSTINO DOS SANTOS

SÍNTESE BIOCATALÍTICA DO (*R*)-2-HIDRÓXI-4-FENILBUTANOATO DE
ETILA

Dissertação apresentada ao Instituto de
Química, Universidade Estadual Paulista,
como parte dos requisitos para obtenção do
título de Mestre em Química.

Orientador: Prof. Dr. Humberto Márcio Santos Milagre

Araraquara
2019

FICHA CATALOGRÁFICA

S237s Santos, Noelle Cruz Faustino dos
Síntese biocatalítica do (*R*)-2-hidroxi-4-fenilbutanoato de
etila / Noelle Cruz Faustino dos Santos. –
Araraquara : [s.n.], 2019
86 f. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista,
Instituto de Química
Orientador: Humberto Márcio Santos Milagre

1. Biocatálise. 2. Lipase. 3. Transesterificação. 4. Catálise
heterogênea. 5. Quiralidade. I. Título.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: "Síntese biocatalítica do (R)-2-hidróxi-4-fenilbutanoato de etila"

AUTORA: NOELLE CRUZ FAUSTINO DOS SANTOS

ORIENTADOR: HUMBERTO MÁRCIO SANTOS MILAGRE

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em QUÍMICA, pela Comissão Examinadora:



Prof. Dr. HUMBERTO MÁRCIO SANTOS MILAGRE
Departamento de Química Orgânica / Instituto de Química - UNESP - Araraquara



Prof. Dr. RAFAEL MAFRA DE PAULA DIAS
Departamento de Química Orgânica / Instituto de Química - UNESP - Araraquara



Prof. Dr. ALVARO TAKEO OMORI
Centro de Ciências Naturais e Humanas / Universidade Federal do ABC - UFABC - Santo André

Araraquara, 01 de março de 2019

DADOS CURRICULARES

Nome: Noelle Cruz Faustino dos Santos

Nome em citações bibliográficas: SANTOS, N. C. F.

ENDEREÇO PROFISSIONAL

Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Instituto de Química de Araraquara.

Departamento de Química Orgânica.

Rua Professor Francisco Degni, 55, Jardim Quitandinha.

CEP 14800060 - Araraquara, SP.

Telefone: (16) 33019551.

FORMAÇÃO ACADÊMICA/TITULAÇÃO

Bacharelado em Química pela Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP/Araraquara (2016).

PRODUÇÃO BIBLIOGRÁFICA

Apresentações de trabalho e/ou palestra:

- “Continuous Flow Enzymatic Kinetic Resolution of Benzylic Alcohols: Development of a Low Cost Homemade Bioreactor”, painel apresentado no 17th Brazilian Meeting on Organic Synthesis (BMOS), realizado no período de 21 a 24 de outubro de 2018.
- “Síntese, caracterização e atividade biológica de um bioconjugado c(RGDfK)-ácido jasmônico”, painel apresentado no XXVIII Congresso de Iniciação Científica da UNESP, realizado nos dias 3 e 4 de novembro de 2016.

PARTICIPAÇÃO EM EVENTOS CIENTÍFICOS

- Equipe de Apoio do Pint of Science Brasil, realizado em Araraquara, entre os dias 15,16 e 17 de maio de 2017, com carga horária de 15 horas;
- Colaboradora na aplicação do minicurso: “Biocatálise: fundamentos e imobilização de biocatalisadores” durante a 1^a Escola de Verão em Química, realizada no período de 26 de fevereiro a 02 de março de 2018 no Instituto de Química – UNESP Araraquara.

À minha família, Clemencio, Djane e William.

À Martin Barbosa.

AGRADECIMENTOS

Ao professor Doutor Humberto Márcio Santos Milagre, pela orientação, confiança, paciência e amizade.

À CNPq pela bolsa concedida.

À FAPESP, ao INCT-BioNat e ao CerSusChem pelo apoio financeiro ao grupo de pesquisa.

À CAPES, pela manutenção do portal de periódicos.

À UNESP e ao Instituto de Química pela infraestrutura concedida.

À professora Doutora Cíntia Duarte de Freitas Milagre, pelo apoio.

À meus pais Clemencio e Djane, e ao meu irmão William, pelo suporte, carinho e incentivo.

Aos amigos distantes, porém sempre presentes, Douglas, Pedro, Paloma, Barata, Larissa e Thalyne.

Aos amigos ainda próximos, Melany, Raul, Caio e Mayara.

Aos amigos e colegas de laboratório, Laiza, Gabriel, Iris, Maraylla, João e Everton, pelas risadas, ombros amigos e discussões no dia-a-dia.

Aos funcionários e técnicos do Instituto de Química, Naira, Alberto, Marquinhos, Nivaldo e Lucinéia.

À Martin, pelo amor e carinho.

“Ser forte não significa não chorar. Ser forte é chorar, mas depois se levantar e seguir em frente.”

(Dhener)

RESUMO

O (*R*)-2-hidróxi-4-fenilbutanoato de etila e seus derivados são peça chave para formação dos fármacos inibidores de enzima conversora de angiotensina (ACE) que são utilizados no tratamento de doenças crônicas do coração e hipertensão. A busca por uma metodologia simples e de baixo custo, que englobe reações rápidas, de elevada enantiosseletividade e que ocorram dentro dos parâmetros da química verde é de suma importância. Neste trabalho, foram exploradas diversas reações biocatalíticas visando atingir estes objetivos, tais como: i) resolução cinética catalisada por lipase de *Burkholderia cepacia*; ii) biorredução enantiosseletiva utilizando levedura *Saccharomyces cerevisiae*. No caso da biorredução, devido à presença de muitas enzimas em células íntegras, a reação levou a formação majoritária de um subproduto, o 3-fenilpropanol. Por outro lado, a resolução cinética apresentou conversão a apenas um produto, e diversas reações foram testadas, modificando parâmetros como solvente, quantidade de enzima e presença ou ausência de peneiras moleculares. Os resultados obtidos apresentaram baixa conversão, mas são estudos interessantes a respeito da interação deste substrato com a lipase.

ABSTRACT

Ethyl (*R*)-2-hydroxy-4-phenylbutanoate and its derivatives are key building blocks for the production of angiotensin converting enzymes (ACE) inhibitors, used as treatment for chronic heart diseases and hypertension. The search for a simple and low-cost methodology, that includes fast reactions, high enantioselectivity and in accordance with the principles of green chemistry is of major importance. In this work, we explored some biocatalytic reactions aiming these goals, like: i) kinetic resolution catalyzed by *Burkholderia cepacia* lipase; ii) enantioselective bioreduction using *Saccharomyces cerevisiae* yeast. In the case of bioreduction, the reaction led to a higher production of a subproduct, 3-phenylpropanol, due the high amount of enzymes in whole cells. In the kinetic resolution, only one product was formed and several reactions were tested, modifying parameters like solvent, amount of enzymes, presence or absence of molecular sieves. The results showed low conversion, but are interesting studies concerning the interaction of this substrate with lipase.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1.1 – Os 12 princípios da química verde.....	15
Figura 1.2 – Reação de hidrólise catalisada pela lipase com seu substrato natural, ésteres de triacilglicerol.....	17
Figura 1.3 – a) Esquema da reação no sítio catalítico da lipase; b) equilíbrio formação do intermediário acil-enzima.	19
Figura 1.4 – a) aproximação dos enantiômeros à cavidade do sítio ativo; b) encaixe dos enantiômeros à cavidade do sítio ativo.....	20
Figura 1.5 – Esquema e gráfico de energia de uma resolução cinética de álcoois.....	21
Figura 1.6 – Esquema e gráfico de energia de uma resolução cinética de álcoois, sem agente de racemização.	22
Figura 1.7 – Reações catalisadas pela enzima álcool desidrogenase	23
Figura 1.8 – O sítion 2-hidróxi-4-fenilbutanoato de etila e os fármacos pril.	24
Figura 1.9 – Enzima conversora de angiotensina com lisinopril ligado ao sítio ativo.....	25
Figura 1.10 – (<i>R</i>)-2-hidroxi-4-fenilbutanoato de etila e diversas estratégias para se obter este sítion.	26
Figura 2.1 – Esquemática dos objetivos do trabalho.....	28
Figura 3.1 – Síntese da molécula de interesse (1) e do substrato modelo (3).	29
Figura 3.2 – Redução de 4 com borohidreto de sódio.	30
Figura 3.3 – Cromatogramas a) do padrão racêmico e b) do padrão (<i>S</i>)-1-feniletanol na coluna com fase estacionária quiral.....	30
Figura 3.4 – Cromatograma do acetato de 1-feniletila na coluna com fase estacionária quiral..	32
Figura 3.5 – Comparação da cavidade de sítio ativo de diferentes lipases.....	33
Figura 3.6 – Resolução cinética de 3 catalisada por lipase.	34
Figura 3.7 – Cromatogramas da resolução cinética de 3	34
Figura 3.8 – Cromatogramas da resolução cinética de 3 analisados na coluna com fase estacionária quiral	35
Figura 3.9 - Conversão do (<i>R</i>)-1-feniletanol e excesso enantiomérico do (<i>S</i>)-1-feniletanol no decorrer da resolução cinética.	36
Figura 3.10 – Redução de 2 com borohidreto de sódio.	37
Figura 3.11 – Cromatograma da redução de 2 com borohidreto de sódio	37
Figura 3.12 – Espectro de massas de 1	38
Figura 3.13 – Produtos gerados na redução de 2 nas condições utilizadas.	39

Figura 3.14 – Esquema da dupla redução do composto 2 com borohidreto de sódio em etanol.	39
Figura 3.15 – Condições otimizadas para redução de 2	40
Figura 3.16 – Representação gráfica do controle cinético vs. controle termodinâmico.	41
Figura 3.17 – Separação dos enantiômeros na coluna quiral.....	41
Figura 3.18 – Biorredução de 2 catalisada por <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	42
Figura 3.19 – Cromatograma do material de partida (azul), padrão racêmico (rosa) e do produto da reação (preto), na coluna com fase estacionária quiral	43
Figura 3.20 – Esquema de redução de 2 pelas enzimas de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	44
Figura 3.21 – Espectro de massas do 3-fenilpropanol.....	45
Figura 3.22 – Esquema de reação de acilação de 1 catalisada por sulfato de cobre pentahidratado.....	46
Figura 3.23 – Mecanismo proposto para a acilação de 1 catalisada por $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$	46
Figura 3.24 – Cromatograma da acilação catalisada por sulfato de cobre pentahidratado (Coluna RTX-5®. Método: 80°C - 3 min. 80-280°C – 20°C min; 280°C – 5 min).	47
Figura 3.25 – Possível complexo formado entre o sulfato de cobre e o composto 1	47
Figura 3.26 – Acilação de 1 catalisado por iodo.....	48
Figura 3.27 – Mecanismo proposto para a acilação do composto 1 catalisada por iodo molecular.	48
Figura 3.28 – Cromatograma da acilação de 1 catalisada por iodo.....	49
Figura 3.29 – Resolução cinética de 1	50
Figura 3.30 – Representação gráfica da resolução cinética de 1	50
Figura 3.31 – Resolução cinética de 1 em acetato de vinila.	51
Figura 3.32 – Cromatogramas da resolução cinética de 1 em acetato de vinila.	52
Figura 3.33 – Resolução cinética de 1	52
Figura 3.34 – Resultados da resolução cinética de 1 com diferentes solventes.....	53
Figura 3.35 – Resolução cinética de 1 com diferentes quantidades de enzimas.....	54

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Asp.....Ácido aspártico

CAL-B.....Lipase B de Candida antarctica

CRL.....Lipase de Candida rugosa

GC-FID.....Cromatografia gasosa com detector de ionização por chama, em inglês

GC-MS.....Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas, em inglês

His.....Histidina

PCL.....Lipase de Pseudomonas cepacia

Ser.....Serina

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	14
1.1. Biocatálise.....	15
1.1.1. Lipases como biocatalisadores	16
1.1.2. Resoluções cinéticas	20
1.1.3. Células íntegras como biocatalisadores.....	22
1.2. Fármacos Pril.....	24
2. OBJETIVOS	28
2.1. Objetivos gerais	28
2.2. Objetivos específicos	28
3. RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	29
3.1. Estratégia de trabalho	29
3.2. Redução da acetofenona (4) por via química.....	30
3.3. Resolução cinética através da esterificação de 3 catalisada por lipase.....	31
3.4. Redução de 2 por via química.....	36
3.5. Biorredução de 2 catalisada por <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	42
3.6. Síntese do padrão racêmico do 2-acetóxi-4-fenilbutanoato de etila	45
3.7. Resolução cinética de 1	49
4. CONCLUSÃO.....	56
5. DESENVOLVIMENTO EXPERIMENTAL.....	57
5.1. Considerações gerais	57
5.1.1. Reagentes e Solventes.....	57
5.1.2. Métodos Cromatográficos.....	57
5.1.3. Espectroscopia no infravermelho (IV)	60
5.1.4. Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio e de Carbono (RMN de ^1H e ^{13}C)	60
5.2. Procedimentos experimentais	60
5.2.1. Redução de 4 com borohidreto de sódio	60
5.2.2. Resolução cinética de 3 com lipase.....	61
5.2.3. Redução de 2 com borohidreto de sódio	62

5.2.4.	Biorredução de 2 catalisada por <i>Saccharomyce cerevisiae</i>	63
5.2.5.	Acilação de 1 catalisada por $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	63
5.2.6.	Acilação de 1 catalisada por I_2	63
5.2.7.	Resolução cinética de 1 com lipase em heptano	64
5.2.8.	Resolução cinética de 1 com lipase em acetato de vinila	64
5.2.9.	Resolução cinética de 1 com lipase em tolueno	65
5.2.10.	Resolução cinética de 1 com lipase em acetato de etila	65
5.2.11.	Resolução cinética de 1 com excesso de lipase em heptano	65
6.	REFERÊNCIAS	66
7.	APÊNDICES.....	71
7.1.	Espectros do 2-hidroxi-4-fenilbutanoato de etila (composto 1)	71
7.2.	Espectros do 1-feniletanol (composto 3)	75
7.3.	Espectros de outros compostos	79

1. INTRODUÇÃO

A síntese de compostos quirais é de grande interesse da indústria de química fina e farmacêutica, pois geralmente estes compostos servem de blocos construtores para diversos produtos de alto valor agregado. A presença de um ou mais centros quirais faz com que a obtenção destas moléculas enantiomericamente puras seja complicada e implique em uma demanda energética e de recursos, tais como catalisadores, etapas de proteção e de desproteção, uso de grandes quantidades de solventes para separar uma mistura racêmica por recristalização diastereoisomérica, entre outros. Assim, estas indústrias costumam ser também as que mais causam impactos ambientais e geram a maior quantidade de resíduos por quantidade de produto final durante os processos de produção.¹⁻³

Estes danos ambientais tornaram-se forte preocupação para a população uma vez que os resíduos industriais passaram a ser encontrados no meio ambiente e bioacumulados em animais desde o século passado⁴. Isso acarretou em diversas reuniões entre os países para discutir e definir limites na geração desses resíduos e promover um desenvolvimento sustentável, tais como o Katowice Climate Change Conference COP 24, que ocorreu em dezembro de 2018, na Polônia.^{5,6}

Esta pressão governamental fez com que as indústrias passassem a buscar alternativas aos seus processos convencionais, levando ao surgimento do conceito de síntese sustentável ou química verde⁴. Nos anos 90, Paul Anastas e John Warner criaram diretrizes para servir como um guia para a síntese sustentável, os chamados “12 princípios da química verde”, ilustrados na figura 1.1.

Figura 1.1 – Os 12 princípios da química verde.



Fonte: Adaptado de Omori (2017).⁷

Estes princípios incentivam a produção de compostos mais seguros, o uso de reagentes e solventes biodegradáveis, de fontes renováveis e menos tóxicos, minimizando a geração de resíduos, uso de condições brandas de reações para economizar energia, uso de catalisadores para tornar os processos mais rápidos⁸. Com esses princípios em mente, uma ferramenta da síntese orgânica que aparece como ótima alternativa é a biocatálise.⁹

1.1. Biocatálise

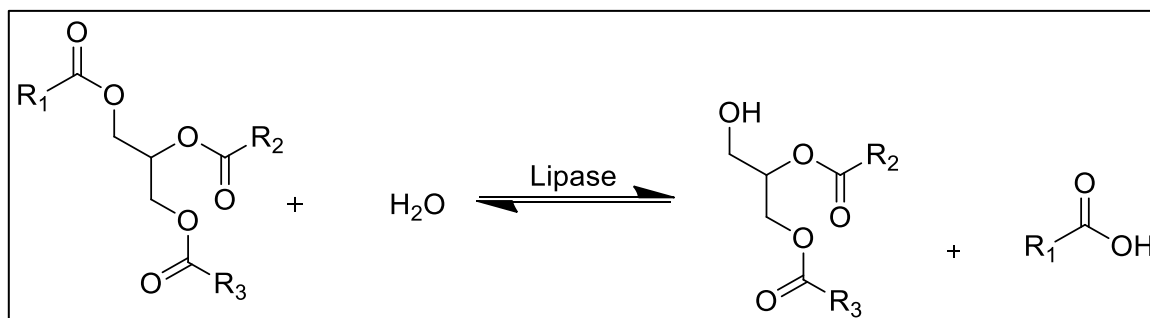
A biocatálise consiste no uso de catalisadores biológicos para realizar e acelerar diversos tipos de reações. Há uma grande variedade de biocatalisadores, que podem ser microrganismos integros^{10–12}, como bactérias e leveduras, anticorpos^{13–15} e enzimas isoladas^{16–18}. Os biocatalisadores estão de acordo com os princípios da química verde em diversos aspectos. Além de serem provenientes de fontes renováveis (organismos vivos) e biodegradáveis, as condições reacionais para estes catalisadores costumam ser brandas: temperaturas em torno de 30 °C e pH próximo da neutralidade, o que acarreta

em uma economia de energia por não necessitar de aquecimento e evitar as etapas de neutralização de pH¹⁹. A água é um solvente compatível com os biocatalisadores, o que faz com que não sejam utilizados solventes perigosos; entretanto, o tratamento de um efluente aquoso pode ser custoso e até impraticável, e seu destino final em corpos d'água pode ocasionar danos irreparáveis no ambiente¹⁹. Felizmente, os biocatalisadores conseguem atuar em diversos outros solventes, inclusive solventes considerados “verdes”, com baixo ponto de ebulição e atóxicos. Por último, os biocatalisadores apresentam alta quimio-, regio- e enantiosseletividade, o que evita etapas de proteção e desproteção e, por conseguinte, minimizando a produção de resíduos. Além de todas estas vantagens, há uma grande variedade de reações que os biocatalisadores conseguem executar.^{11,20}

1.1.1. Lipases como biocatalisadores

Dentre os biocatalisadores, as enzimas isoladas são de fácil operacionalidade e alta estabilidade. As enzimas são classificadas pela *Enzyme Commission* de acordo com as reações que catalisam naturalmente, divididas em: oxidoreduases (1), transferases (2), hidrolases (3), liases (4), isomerases (5), ligases (6) e translocases (7)²¹. Essas classes são divididas em sub-classes e estas por sua vez em sub-sub-classes. As lipases, por exemplo, são classificadas com o número 3.1.1.3, o que significa que são hidrolases (3), catalisam hidrólise de ligações ésteres (.1) carboxílicos (.1) e triacilglicerol hidrolases (.3), também conhecida como lipases. A enzima catalisa a reação apresentada na figura 1.2, bem como a reação inversa.²¹

Figura 1.2 – Reação de hidrólise catalisada pela lipase com seu substrato natural, ésteres de triacilglicerol.



As lipases apresentam alta estabilidade térmica, aceitam uma grande gama de substratos além do substrato natural (ésteres de triacilglicerol), o que significa que apresentam alta promiscuidade de substratos, e alta enantiosseletividade, especialmente a álcoois secundários. Também não necessitam de cofatores, moléculas essenciais para algumas enzimas realizarem reações, como doadores de hidreto no caso de reações de oxidorredução.²²

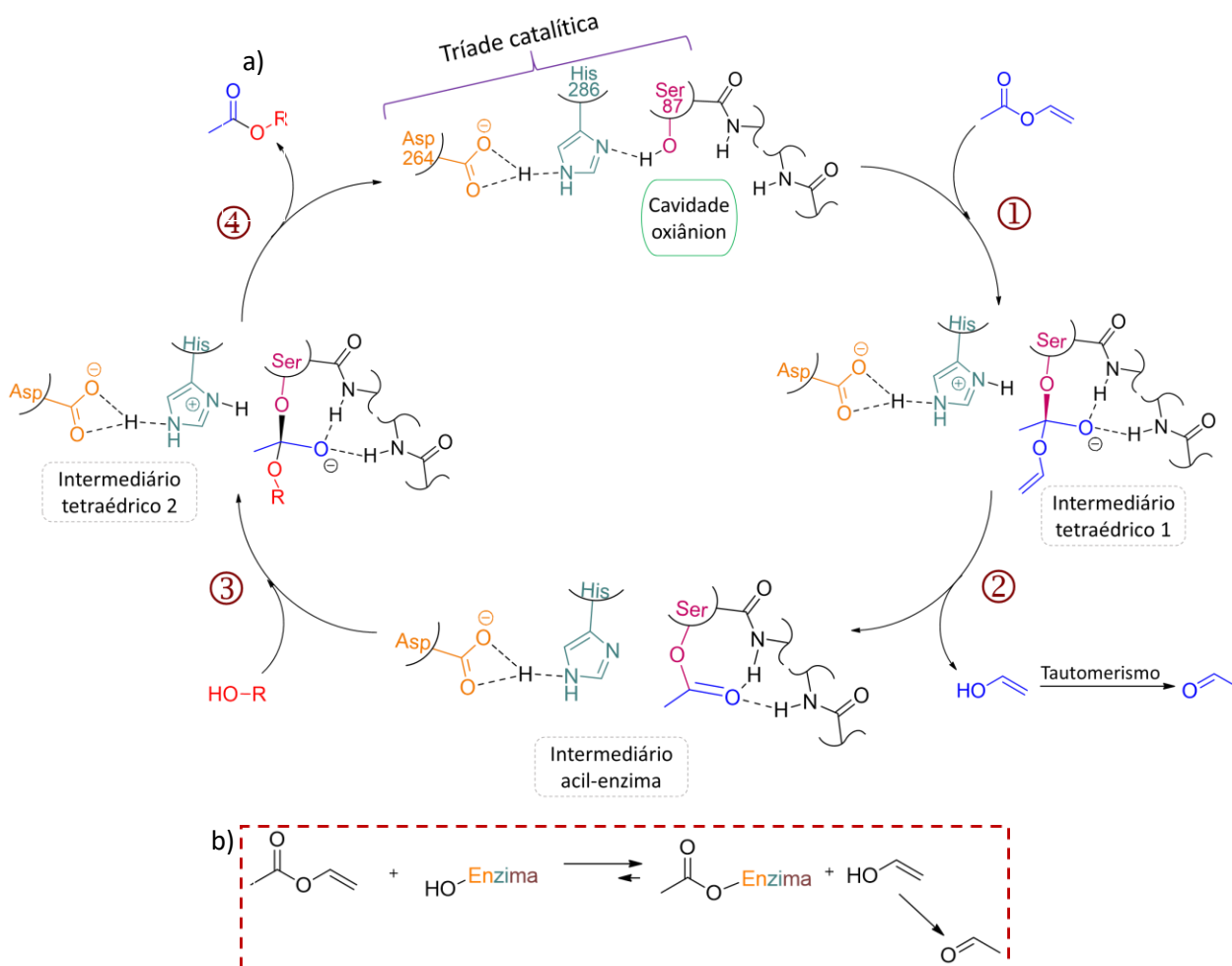
Estas enzimas catalisam uma série de reações além da hidrólise de ésteres carboxílicos e esterificação, tais como transesterificação, tioesterificação, epoxidação²³, adição de Michael²⁴ e até reações multicomponentes^{25,26}. Isso significa que apresentam também uma alta promiscuidade de reações. Todas estas vantagens supracitadas fazem com que as lipases sejam as enzimas mais utilizadas na indústria.¹⁸

As enzimas possuem o sítio ativo, região onde ocorre a catálise da reação. O mecanismo da reação é dependente tanto da sequência primária quanto da estrutura terciária da enzima, mas para ilustrar, aqui estão abordados apenas os aminoácidos diretamente envolvidos no sítio catalítico. No caso das lipases, o sítio ativo é composto pela tríade catalítica de aminoácidos Asp-His-Ser, além de uma cavidade oxiânion, que ajuda a estabilizar o intermediário formado. A cavidade oxiânion é formada por ligações de hidrogênio entre o intermediário e os nitrogênios das ligações peptídicas da estrutura enzimática. Na figura 1.3a há uma representação do sítio ativo da lipase de *Burkholderia cepacia*, que foi a lipase utilizada no desenvolvimento do trabalho, em que a posição dos

aminoácidos Asp-His-Ser do sítio ativo correspondem aos aminoácidos 264, 286 e 87, respectivamente, na estrutura primária da proteína²⁷. Para exemplificar, abaixo é descrita uma reação de transesterificação do acetato de vinila, éster bastante usado neste trabalho, catalisada por esta lipase.

Na primeira etapa, o acetato de vinila entra no sítio ativo da enzima e a carbonila desse sofre um ataque nucleofílico do oxigênio da cadeia lateral da Ser-87, enquanto a His-286 abstrai um próton da mesma. Nesta etapa é formado o **intermediário tetraédrico 1**, em que há uma separação de cargas, sendo a carga positiva estabilizada pela cadeia lateral do Asp-264 e a carga negativa estabilizada pela cavidade oxiânion. Na etapa 2, o par de elétrons desta carga negativa restaura a carbonila, liberando como produto um álcool. No caso exemplificado é liberado o etanol, que gera o etanal por tautomerismo. Esta característica é importante pois essa transformação faz com que um dos produtos da reação seja consumido, o que resulta no deslocamento do equilíbrio no sentido dos produtos (figura 1.3b). O outro produto da reação é o **intermediário acil-enzima**, que, na etapa 3, sofre um ataque nucleofílico de outro álcool, gerando o **intermediário tetraédrico 2**. Novamente, a cadeia lateral da His-286 abstrai um próton do álcool e o par de elétrons que antes estavam na carbonila, agora estão no oxigênio estabilizado pela cavidade oxiânion. Na etapa 4, estes elétrons vão restaurar a carbonila novamente, porém, o grupo abandonador desta vez é a cadeia lateral da Ser-87, que abstrai o próton da His-286 e restaura o catalisador, enquanto o produto final éster é liberado do sítio ativo²⁸.

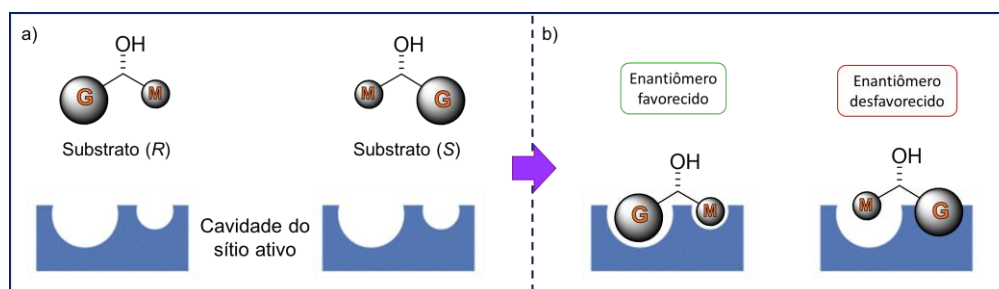
Figura 1.3 – a) Esquema da reação no sítio catalítico da lipase; b) equilíbrio formação do intermediário acil-enzima.



Outra informação importante sobre o sítio ativo das lipases é que esta apresenta cavidades que acomodam o substrato. O tamanho destas cavidades é característico de cada enzima, mas de uma forma geral, no sítio ativo há uma cavidade maior que outra. Assim, um substrato com um centro quiral, que apresenta grupos de tamanhos diferentes diretamente ligados ao centro quiral, pode ser melhor acomodado dependendo de como estes grupos estão ligados no centro quiral. Por exemplo, um álcool secundário *R*, com a hidroxila projetada para trás do plano (figura 1.4a), o maior ligante está para a esquerda e o de tamanho médio está à direita do centro quiral, enquanto o seu equivalente *S*, é ao

contrário. Um dos enantiômeros se encaixará com maior facilidade ao sítio ativo (figura 1.4b), e por isso seu produto será mais favorecido durante a reação, ou seja, a reação com este enantiômero será mais rápida do que com o outro enantiômero. Geralmente, a configuração favorecida nestes casos é esta em que com o centro quiral orientado pra trás do plano, o maior grupo está à esquerda do centro quiral e o grupo de tamanho médio está orientado à direita. Isto foi observado empiricamente, por Kazlauskas, e por isso isto ficou conhecido como Regra de Kazlauskas.¹¹

Figura 1.4 – a) aproximação dos enantiômeros à cavidade do sítio ativo; b) encaixe dos enantiômeros à cavidade do sítio ativo.

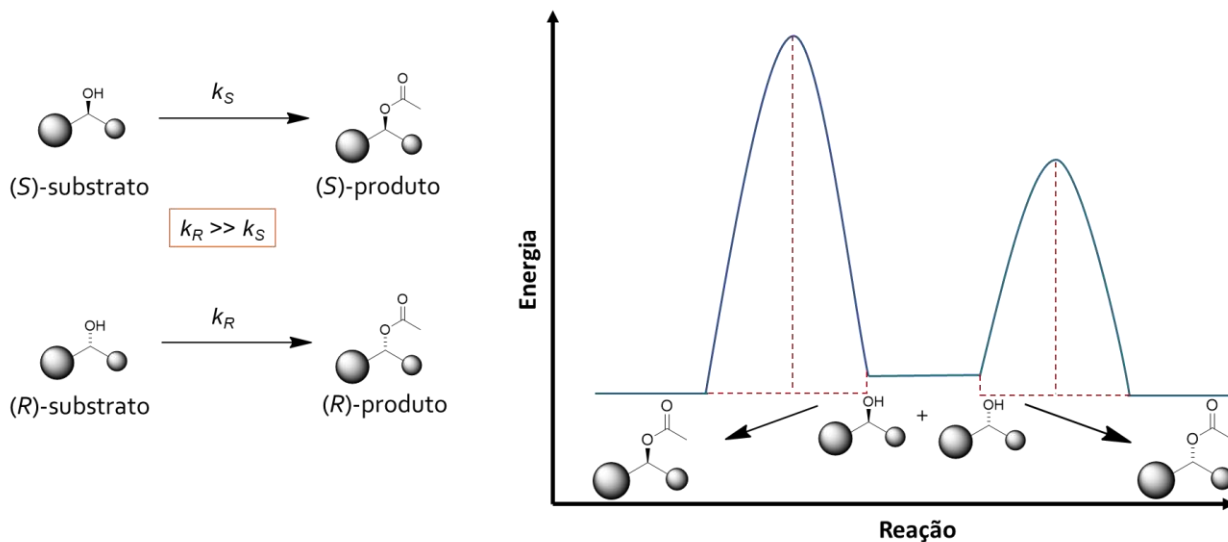


Fonte: Elaborado pela autora.

1.1.2. Resoluções cinéticas

Este conceito de velocidades diferentes para cada reação com cada enantiômero é utilizado na resolução cinética. A resolução cinética é uma das diversas maneiras de se obter um composto quiral enantiomericamente puro. A resolução cinética consiste em separar dois enantiômeros numa mistura racêmica, utilizando um catalisador que reagirá mais rapidamente com apenas um dos enantiômeros, gerando assim, um produto de um dos enantiômeros que pode ser separado do outro enantiômero, que estará na forma de substrato não reagido. Isto é explicado pois a energia de ativação para uma determinada reação com um dos enantiômeros com o catalisador é menor do que com o outro, ou seja, a velocidade de reação de um dos enantiômeros é superior à outra (figura 1.5). Neste conceito, o rendimento máximo possível é de 50 %, pois é a quantidade de um dos enantiômeros na mistura racêmica.²⁹

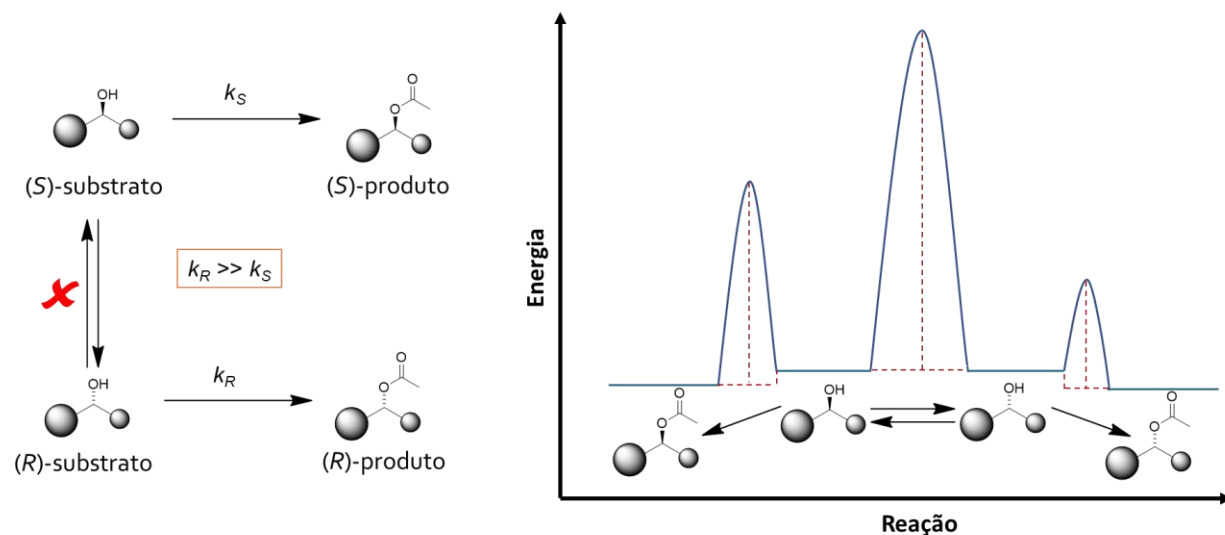
Figura 1.5 – Esquema e gráfico de energia de uma resolução cinética de álcoois.



Fonte: Adaptado de Ahn (2008)²⁹

Para se obter 100 % de um dos enantiômeros é necessário que haja um agente de racemização, que faz a interconversão de um enantiômero no outro. O agente irá diminuir a energia de conversão de um enantiômero no outro (figura 1.6). Assim, o enantiômero não reagido é transformado novamente numa mistura racêmica, enquanto o outro enantiômero é consumido.²⁹

Figura 1.6 – Esquema e gráfico de energia de uma resolução cinética de álcoois, sem agente de racemização.



Fonte: Adaptado de Ahn (2008)²⁹

1.1.3. Células íntegras como biocatalisadores

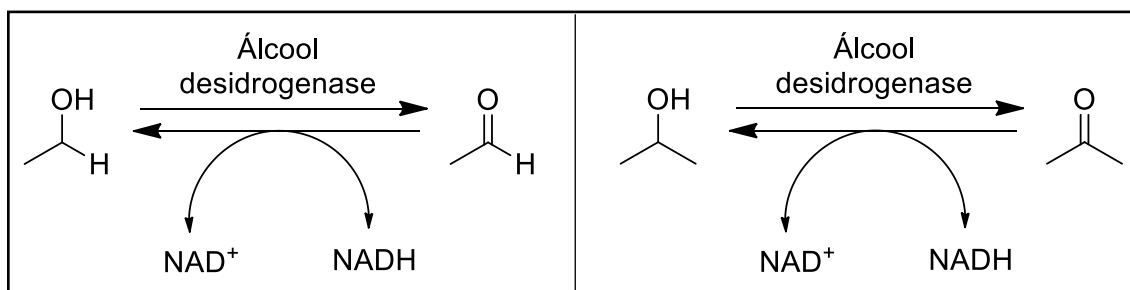
Além da resolução cinética, há diversas outras formas de se obter um composto enantiomericamente puro. Uma mistura racêmica pode ser separada por recristalização diastereoisomérica, se as condições forem propícias. Pode-se partir de precursores já enantiomericamente puros ou de substratos pró-quirais e realizar uma síntese assimétrica, gerando um centro quiral.

Um exemplo de síntese assimétrica é a biorredução de compostos pró-quirais. Um composto pró-quiral não apresenta um centro assimétrico mas pode ser convertido em um composto quiral em uma única etapa.³⁰ Os microrganismos são comumente utilizados nestas metodologias, pois estas requerem balanceamento redox, que geralmente é realizado por cofatores em reações de oxidorredução, por exemplo. Sem o metabolismo das células íntegras, é necessário adicionar estes cofatores no meio reacional, o que eleva muito o custo destas reações.

As principais características desses microrganismos para seu uso em reações é que estes não devem apresentar toxicidade e sejam de fácil manuseio e replicação. Dos microrganismos mais comumente usados em processos estão a *Escherichia coli* (linhagem não-patogênica) e o *Saccharomyces cerevisiae*. Este último, também conhecido como fermento de pão, já é utilizado na produção de etanol, cerveja, e como fermento biológico para bolos e pães. Além disso, é de baixo custo, fácil obtenção e necessita de condições brandas de temperatura para atuar em reações.³¹

O *S. cerevisiae* provou já ser capaz de realizar a redução de diversos compostos carbonilados³². Isto se deve à presença de muitas enzimas redutoras neste microrganismo^{32,33}. Destaca-se a álcool desidrogenase, que apresenta como classificação na *Enzyme Commission* o número 1.1.1.1, que são oxidoreductases que atuam em álcoois primários e secundários e necessitam de NAD^+ ou NADP^+ como cofatores e catalisam a reação de oxidação de um álcool primário a um aldeído e um álcool secundário a uma cetona, conforme esquematizado na figura 1.7. Esta é a principal classe de enzimas responsável pela redução de carbonilas em *Saccharomyces cerevisiae*.

Figura 1.7 – Reações catalisadas pela enzima álcool desidrogenase

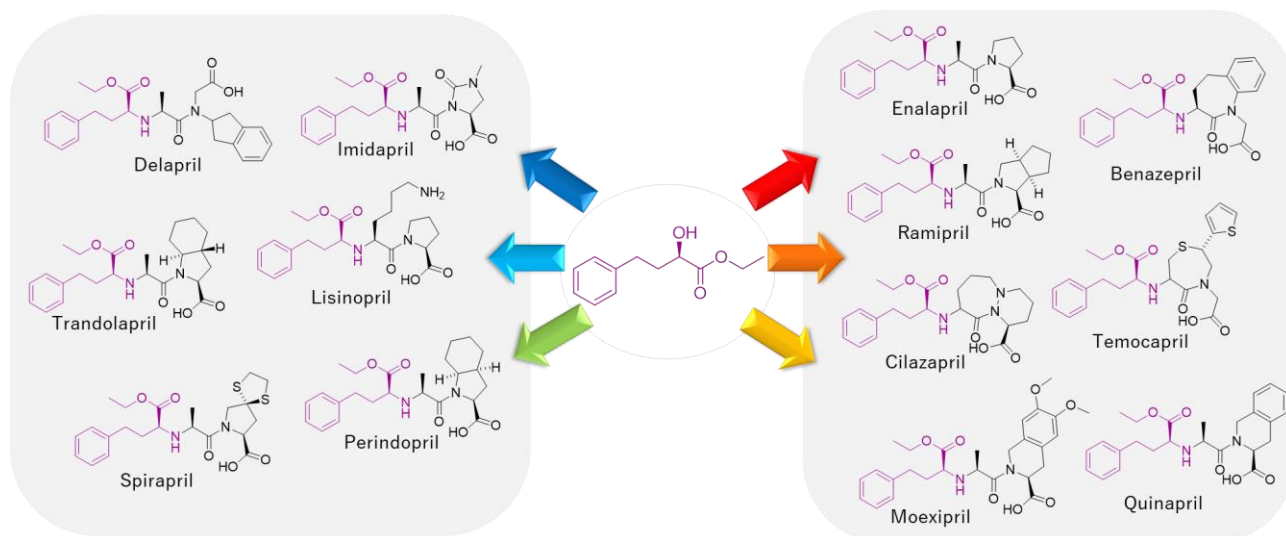


No caso dos hidroxi-ésteres, diversos estudos apresentaram resultados promissores, obtendo o composto reduzido com grande excesso enantiomérico^{31,34}. Esses resultados nos inspiraram a testar este microrganismo no desenvolvimento deste trabalho.

1.2. Fármacos Pril

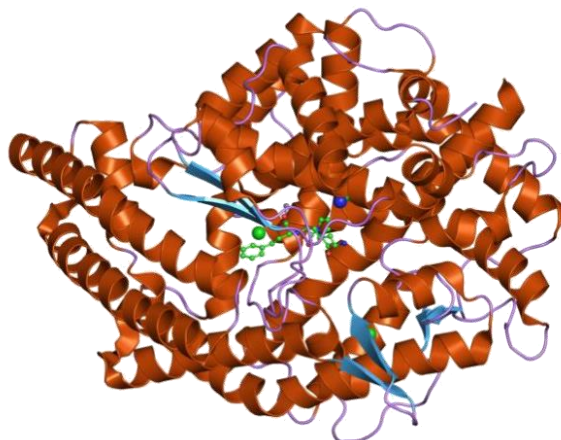
Conforme dito anteriormente, compostos quirais são de grande interesse para as indústrias de química fina e farmacêutica¹⁹. Neste trabalho, há o interesse de sintetizar um destes compostos, o (*R*)-2-hidróxi-4-fenilbutanoato de etila. Esta é a molécula apresentada na figura e que apresenta fundamental importância na indústria farmacêutica pois é imprescindível na etapa chave de compostos conhecidos como Fármacos Pril³⁵ (Figura 1.8). Estes apresentam utilidade no tratamento de hipertensão e doenças do coração pois inibem a atividade da enzima conversora de angiotensina, hormônio responsável pela contração dos vasos sanguíneos, diminuindo o diâmetro dos mesmos (figura 1.9).

Figura 1.8 – O sinton 2-hidróxi-4-fenilbutanoato de etila e os fármacos pril.



Fonte: Elaborado pela autora.

Figura 1.9 – Enzima conversora de angiotensina com lisinopril ligado ao sítio ativo.

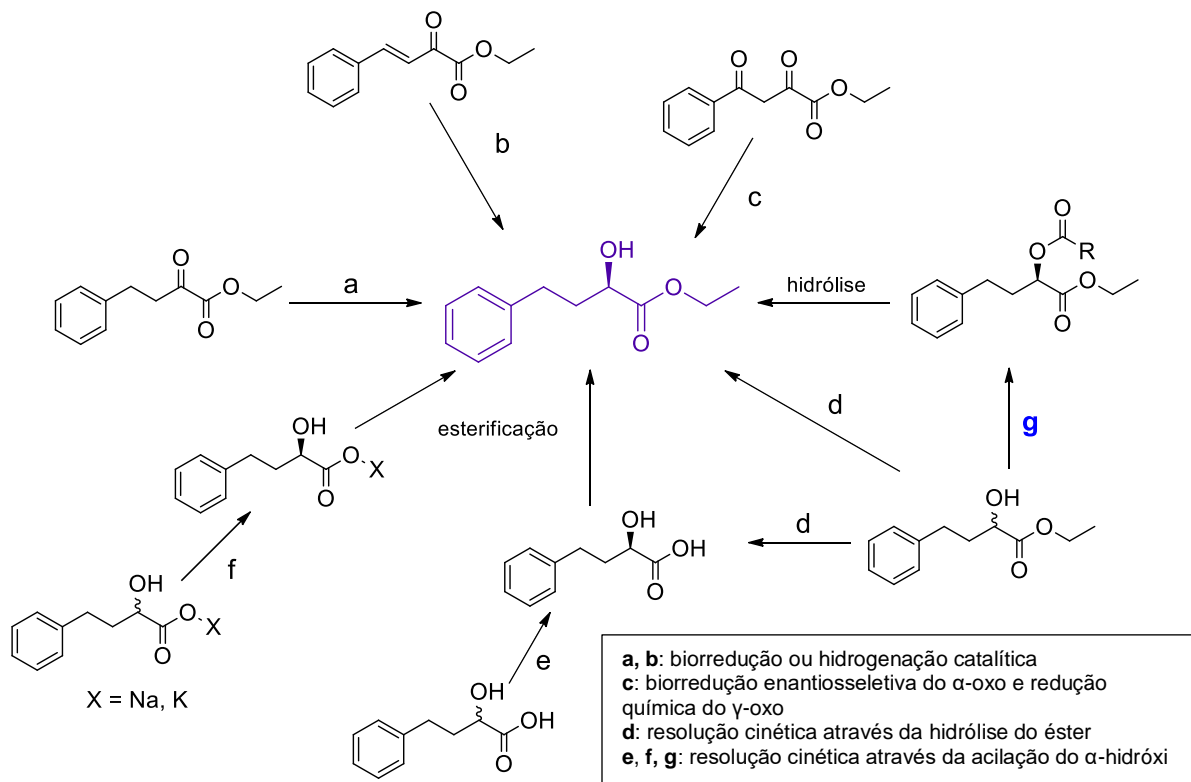


Fonte: Natesh (2003)³⁶.

Estes fármacos têm grande impacto econômico, pois as doenças cardiovasculares são a maior causa de morte no mundo todo e atingem mais de 1 bilhão de pessoas, atualmente, segundo dados da organização mundial de saúde.³⁷

Há diversas metodologias exploradas para a obtenção desta importante molécula. A mais comum delas é síntese a partir do precursor pró-quiral, como por exemplo a redução biocatalítica do precursor pró-quiral oxo-éster seja utilizando células íntegras^{38–41} ou com enzimas redutoras isoladas^{42,43} (figura 1.10a), a hidrogenação catalítica da carbonila pró-quiral^{44–46} (figura 1.10a) e da enona precursora⁴⁷ (figura 1.10b), e hidrogenação eletrocatalítica⁴⁸ do precursor pró-quiral. Há também vias quimioenzimáticas em que um precursor dioxo é primeiramente reduzido por via catalítica gerando um dos enantiômeros e uma redução química gerando o composto de interesse⁴⁹ (figura 1.10c). Através da resolução cinética, a metodologia mais explorada é a hidrólise do éster a partir da mistura racêmica^{50–53} (figura 1.10d). Uma alternativa ainda pouco explorada é a resolução cinética por esterificação da hidroxila. Alguns trabalhos realizaram a acilação da hidroxila da molécula na forma ácida^{54,55} (figura 1.10e) ou na forma de sal⁵⁶ (figura 1.10f).

Figura 1.10 – (R)-2-hidroxi-4-fenilbutanoato de etila e diversas estratégias para se obter este sinton.



Entretanto, metodologias em que a resolução cinética através da acilação da hidroxila ocorre na molécula em forma de éster ainda são pouco exploradas (figura 1.10g). Essa metodologia teria a vantagem do produto da reação manter o grupo etil ligado ao carboxil da molécula. Assim, a molécula estaria já na forma do bloco construtor usado na síntese dos fármacos prii⁵⁷⁻⁶⁰, diferente das metodologias que precisam de etapas adicionais de esterificação, em que as moléculas são obtidas primeiramente na forma ácida⁶¹⁻⁶³, como na resolução cinética pela hidrólise do éster.

Neste trabalho, exploramos a acilação da hidroxila de 2-hidróxi-4-fenilbutanoato de etila, através da resolução cinética catalisada por lipase, além da biorredução do 2-oxo-4-fenilbutanoato de etila por *Saccharomyces cerevisiae*. As duas metodologias apresentam vantagens e desvantagens com relação uma à outra. Conforme dito anteriormente, a resolução cinética apresenta um rendimento máximo de apenas 50%, dado que é realizado a partir de uma mistura racêmica, enquanto que a biorredução pode

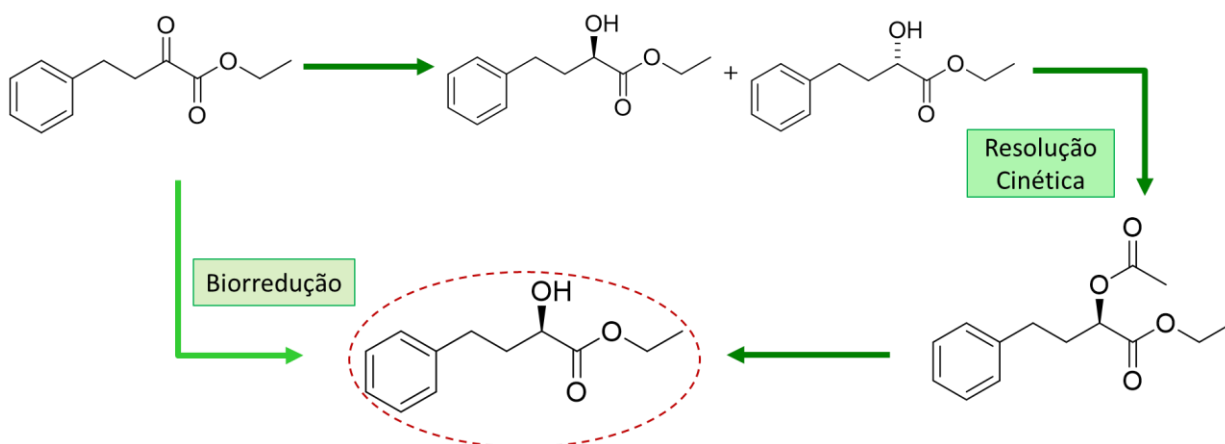
converter todo o material de partida pró-quiral em um dos enantiômeros desejados. Entretanto, a biorredução com um microrganismo apresenta diversos subprodutos provenientes do metabolismo do mesmo, o que necessita de uma purificação mais elaborada que na resolução cinética.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivos gerais

O objetivo deste trabalho foi a síntese do composto (*R*)-2-hidróxi-4-fenilbutanoato de etila por via biocatalítica, explorando a resolução cinética através da acilação catalisada por lipase e a biorredução a partir do precursor pró-quiral 2-oxo-4-fenilbutanoato de etila.

Figura 2.1 – Esquemática dos objetivos do trabalho



2.2. Objetivos específicos

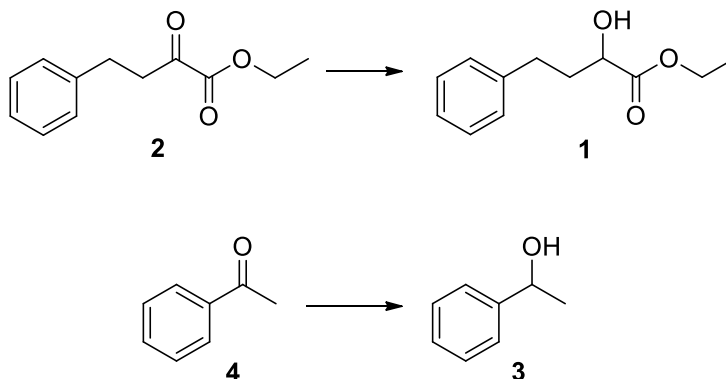
- Síntese e caracterização dos padrões do substrato modelo e do substrato de interesse, de seu acetato;
- Investigar a biorredução do 2-oxo-4-fenilbutanoato de etila com o uso de *Saccharomyces cerevisiae*;
- Exploração de parâmetros da resolução cinética do 2-hidroxi-4-fenilbutanoato de etila através da acilação catalisada por lipase de *Burkholderia cepacia*.

3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

3.1. Estratégia de trabalho

Para o desenvolvimento do trabalho, o padrão racêmico do composto de interesse (**1**) seria obtido a partir da redução por via química do seu precursor pró-quiral, o 2-oxo-4-fenilbutanoato de etila (**2**). Entretanto, devido ao custo deste composto, decidimos utilizar um substrato modelo para testar algumas metodologias. O substrato modelo escolhido foi o 1-feniletanol (**3**), pois apresenta semelhança com o composto de interesse e seu precursor é a acetofenona (**4**), um composto barato e bastante disponível no laboratório.

Figura 3.1 – Síntese da molécula de interesse (**1**) e do substrato modelo (**3**).



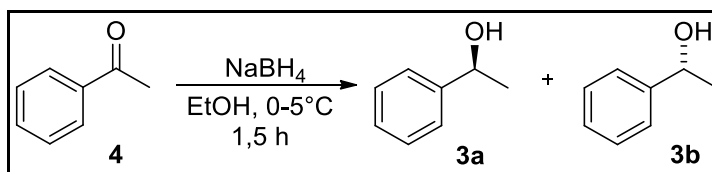
Desta forma, foi necessário sintetizar primeiramente o padrão racêmico do substrato modelo, caracterizá-lo e separá-lo em coluna quiral. Depois, este substrato pôde ser usado para se testar algumas metodologias.

Posteriormente, o padrão racêmico do composto **1** foi sintetizado, caracterizado e separado em coluna com fase estacionária quiral. Também foi necessário sintetizar e caracterizar o composto acilado (**8**), pois não havia padrão deste composto no laboratório. Em seguida, as metodologias foram testadas para o composto **1**.

3.2. Redução da acetofenona (4) por via química

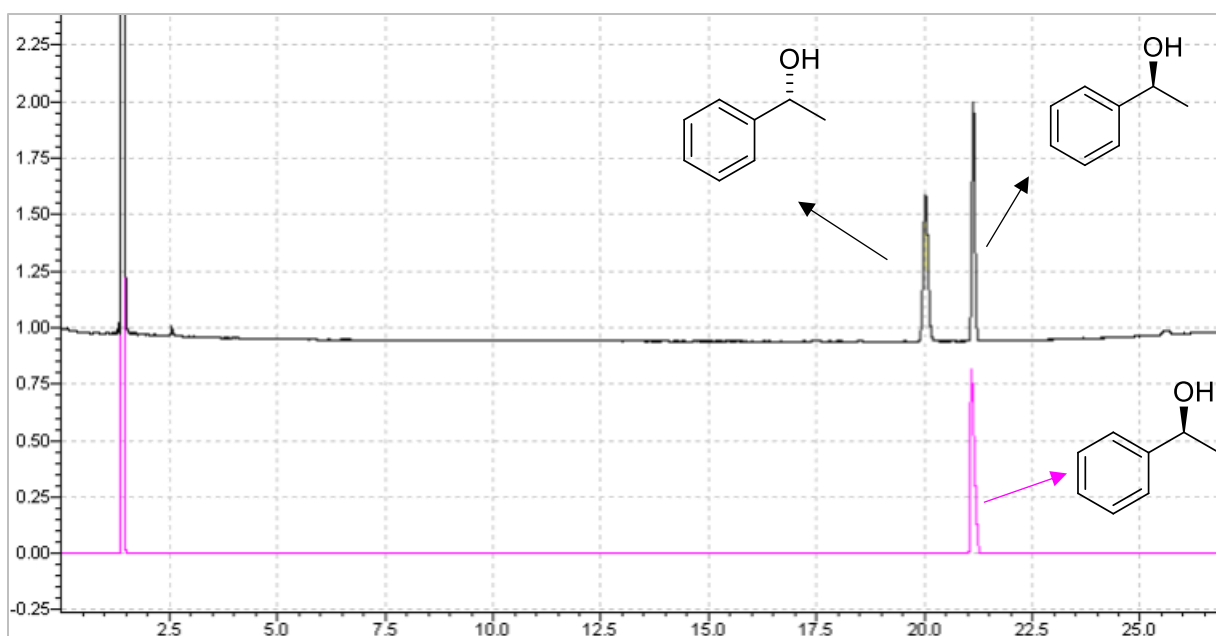
Para obtenção do padrão racêmico **3**, foi realizada a redução de **4** com borohidreto de sódio em etanol e banho de gelo, conforme esquema abaixo.

Figura 3.2 – Redução de **4** com borohidreto de sódio.



A reação foi monitorada por GC-FID e após toda a acetofenona ter sido consumida, a reação foi interrompida. O composto foi separado na coluna com fase estacionária quiral e, utilizando um padrão (S)-1-feniletanol (**3a**), foi possível determinar o tempo de retenção de cada enantiômero, conforme mostrado na figura abaixo.

Figura 3.3 – Cromatogramas a) do padrão racêmico e b) do padrão (S)-1-feniletanol na coluna com fase estacionária quiral (Coluna Hydrodex®. Método: 100°C – 3 min; 100-115°C - 1°C/min; 115°C – 2 min; 115-180°C – 10°C/min; 180°C – 10 min).



O composto foi caracterizado por espectrometria de massas, espectroscopia na região do IV e RMN de ^1H e ^{13}C (apêndices 5-8). O espectro de massas apresentou o sinal do íon molecular (m/z 122) e as fragmentações (m/z 107, 104, 91, 79, 77 e 51), resultados de acordo com a literatura⁶⁴. No caso do espectro de infravermelho, há a presença da banda larga em 3338 cm^{-1} devida à presença da hidroxila, e em 1058 cm^{-1} correspondente à absorção de dobramento C-O no caso de hidroxila adjacente a carbonos insaturados, além das bandas em 2972, 1412, 1256, 845, 758 e 605 cm^{-1} , dados que estão de acordo com a literatura⁶⁵.

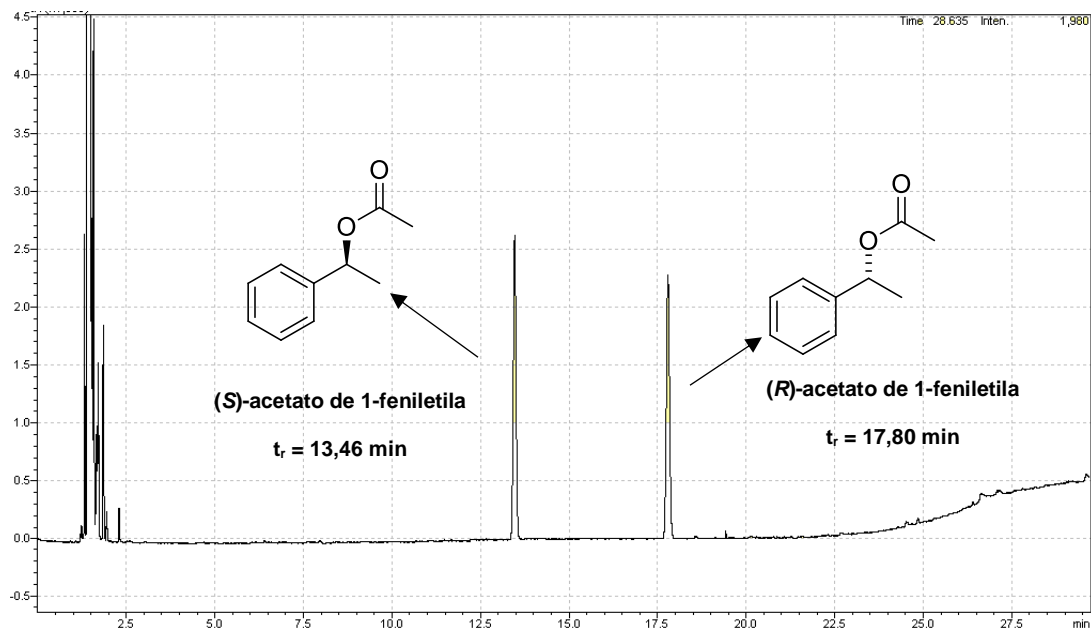
O espectro de RMN ^{13}C apresentou sinal positivo em 25,2 ppm correspondente ao carbono do grupo metil, em 70,5 ppm com sinal negativo do carbono metilênico ligado à hidroxila, sinais positivos em 125,4, 127,5 e 128,5 ppm correspondendo aos carbonos aromáticos não substituídos, e em 145,8 ppm o sinal negativo correspondendo ao carbono quaternário aromático.

No espectro de RMN ^1H , em 1,50 ppm há um duplete com constante de acoplamento de 6,0 Hz integrando para 3 hidrogênios, correspondente aos hidrogênios metílicos; em 4,90 ppm, um quarteto com constante de acoplamento 6,4 Hz integrando para 1 hidrogênio, correspondente ao hidrogênio metilênico adjacente à hidroxila; e em 7,25–7,40 ppm, um multiplete, integrando para 5 hidrogênios, sinal correspondente aos hidrogênios aromáticos.

3.3. Resolução cinética através da esterificação de 3 catalisada por lipase

O padrão racêmico de **4** havia sido previamente sintetizado, caracterizado e separado em coluna com fase estacionária quiral no grupo de pesquisa. Assim, foi possível partir para testes com o substrato modelo sem a necessidade desta etapa. O cromatograma está apresentado na figura abaixo.

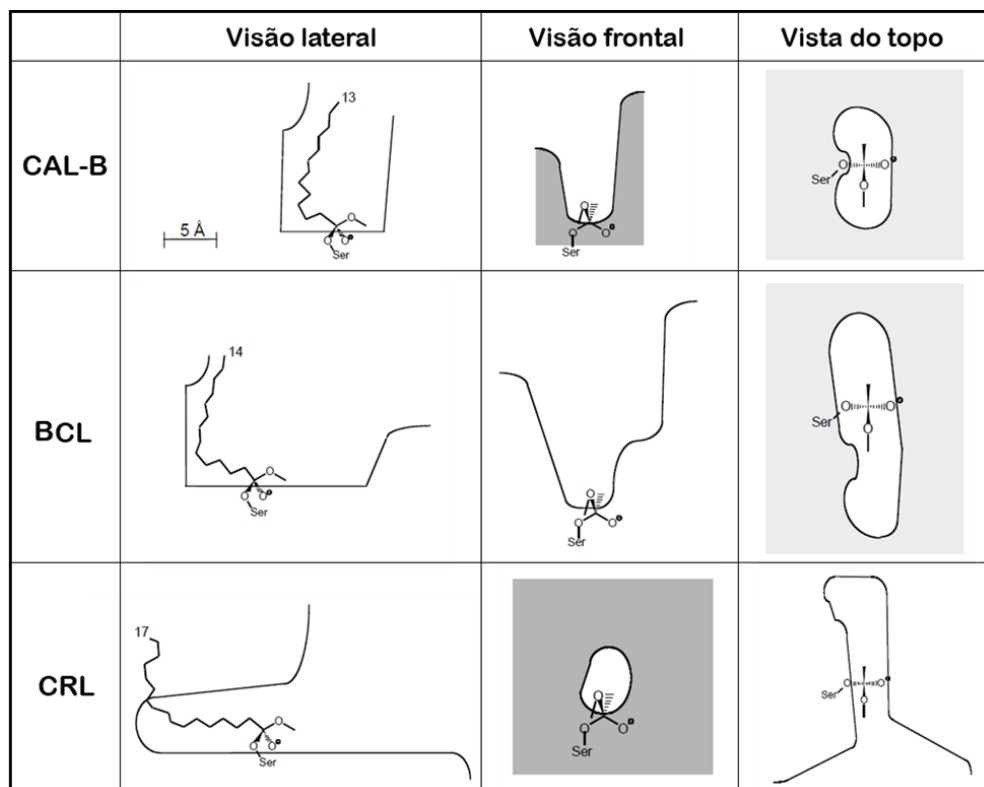
Figura 3.4 – Cromatograma do acetato de 1-feniletila na coluna com fase estacionária quiral (Coluna Hydrodex®. Método: 100°C – 3 min; 100-115°C - 1°C/min; 115°C – 2 min; 115-180°C – 10°C/min; 180°C – 10 min).



Partindo da mistura racêmica de **3** obtido como descrito no item anterior, foi realizada uma resolução cinética com a lipase de *Burkholderia cepacia* (BCL) em heptano. Esta reação promove a acilação de um dos enantiômeros do álcool com um doador de acila, quando esta é realizada em meio orgânico. Em presença de água, há a competição da reação de esterificação com a reação de hidrólise, sendo que em meio aquoso não ocorre esterificação.

Outra característica desta enzima, motivo pelo qual ela foi selecionada, é que além dela ser facilmente obtida comercialmente, ela apresenta um sítio ativo formado por uma cavidade de tamanho intermediário quando comparado à outras lipases comerciais, tornando-a mais promissora a atuar no substrato de interesse. Uma cavidade de tamanho muito grande, como por exemplo da lipase de *Candida rugosa* (CRL) pode fazer com que ela perca a seletividade, pois o substrato pode se acomodar facilmente com qualquer orientação no sítio ativo, e, portanto, ambos os enantiômeros podem reagir. Uma cavidade muito pequena como na lipase B de *Candida antarctica* (CAL-B) pode impedir que o substrato sequer entre no sítio ativo²².

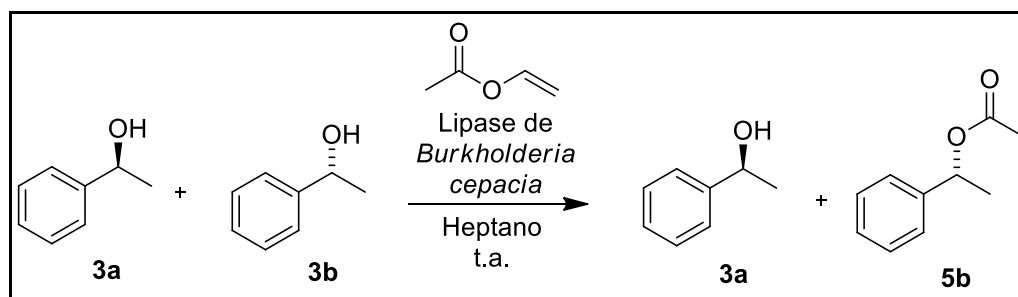
Figura 3.5 – Comparação da cavidade de sítio ativo de diferentes lipases.



Fonte: Bornscheuer (2006).²²

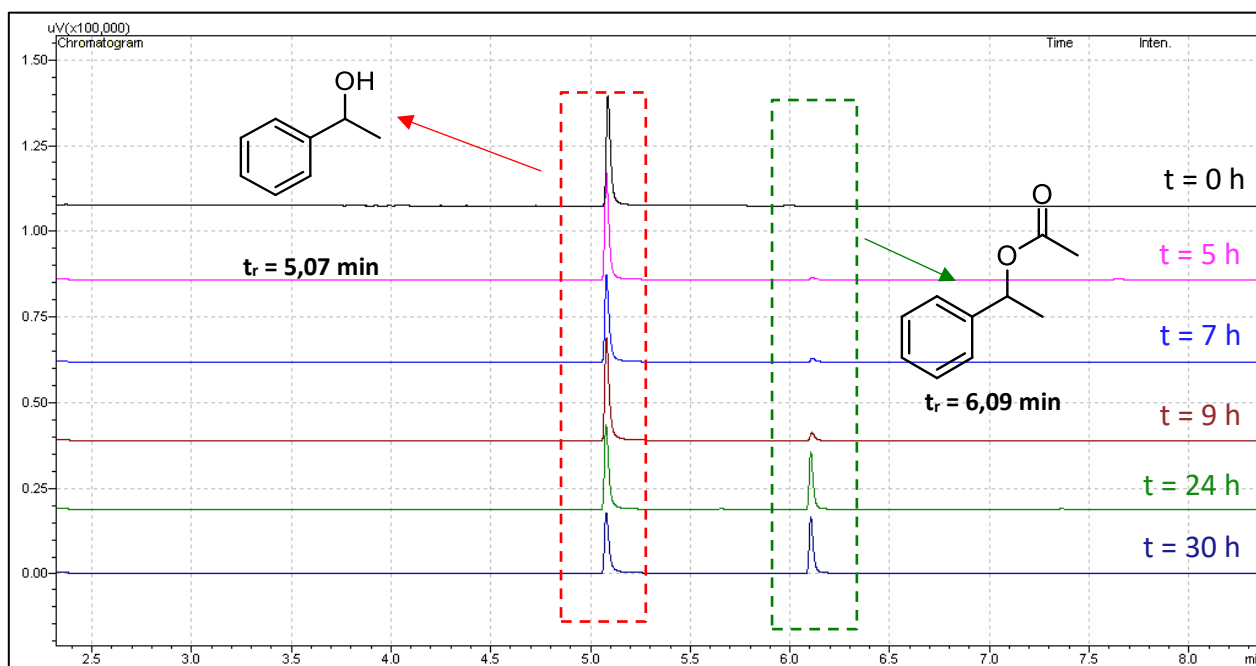
Os solventes comumente usados em resoluções cinéticas enzimáticas através de esterificação são tolueno, éteres ou hexanos, porém o heptano é uma escolha mais verde para este fim. Éteres e hexanos, além de caros, são difíceis de recuperar; no caso de éteres, há ainda o risco e cuidados especiais, devido à formação de peróxidos explosivos⁶⁶. O acetato de vinila foi selecionado como doador de acila. Esta enzima apresenta temperatura ótima em torno de 37°C⁶⁷, mas objetivando uma maior economia de energia, esta reação foi testada em temperatura ambiente, conforme equação abaixo.

Figura 3.6 – Resolução cinética de **3** catalisada por lipase.



A reação foi monitorada por GC-FID e pôde-se determinar a conversão do substrato em produto a cada intervalo de tempo: a intensidade do pico correspondente ao composto **3** diminui com o passar do tempo, enquanto há o aumento no pico correspondente ao composto **5**.

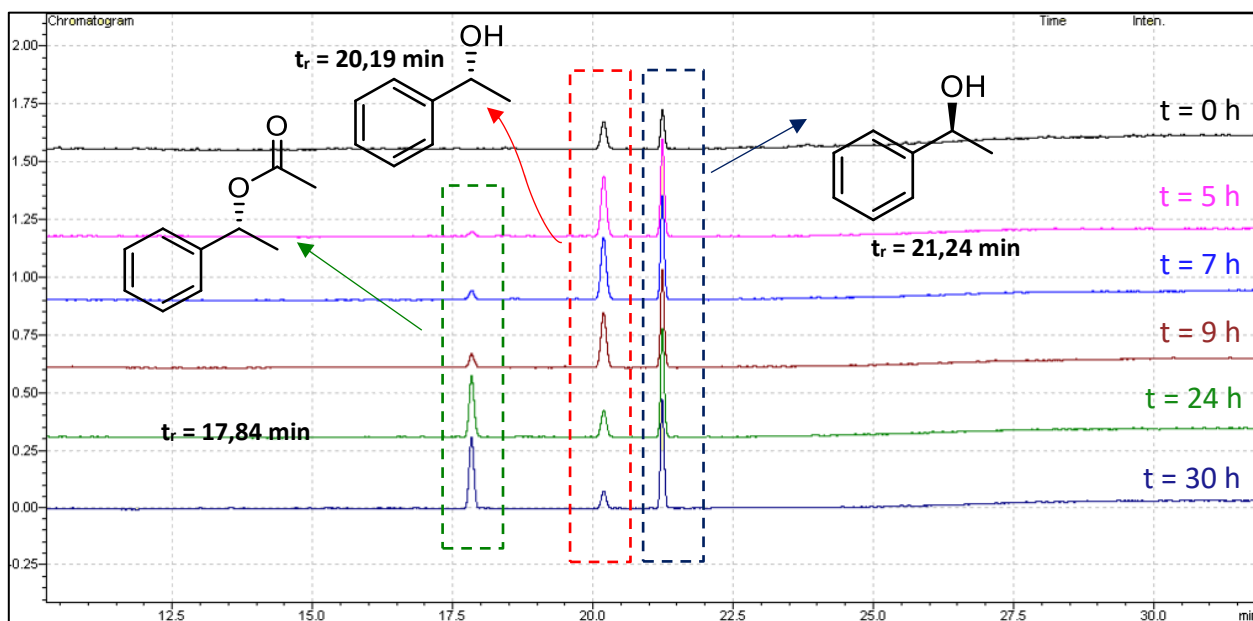
Figura 3.7 – Cromatogramas da resolução cinética de **3** (Coluna RTX-5®. Método: 80°C - 3 min. 80-280°C – 30°C min; 280°C – 5 min).



Analisando as mesmas alíquotas na coluna quiral tem-se a presença dos dois picos correspondentes aos enantiômeros **3a** e **3b**, e de um terceiro pico. Como a configuração absoluta já havia sido determinada previamente no grupo de pesquisa, sabe-se que este

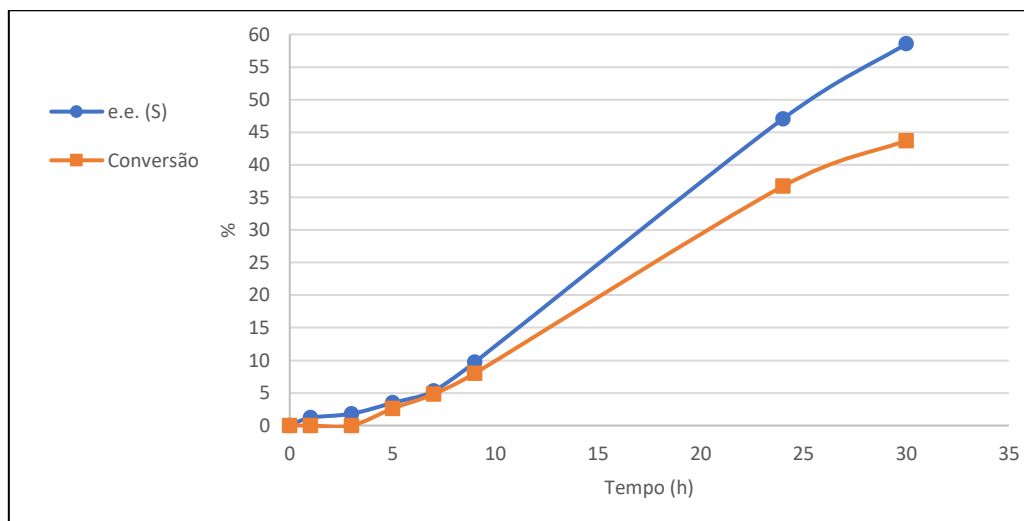
pico corresponde à **5b**. Como não há o aparecimento do pico correspondente a **5a** no cromatograma, a reação ocorreu de maneira enantiosseletiva e, como previsto, seguindo a regra de Kazlauskas. Os cromatogramas estão apresentados na figura 3.8.

Figura 3.8 – Cromatogramas da resolução cinética de **3** analisados na coluna com fase estacionária quiral (Coluna Hydrodex®. Método: 100°C – 3 min; 100-115°C - 1°C/min; 115°C – 2 min; 115-180°C – 10°C/min; 180°C – 10 min).



Assim, os dados de conversão e excesso enantiomérico foram calculados e estão sumarizados na figura 3.9.

Figura 3.9 - Conversão do (R)-1-feniletanol e excesso enantiomérico do (S)-1-feniletanol no decorrer da resolução cinética.



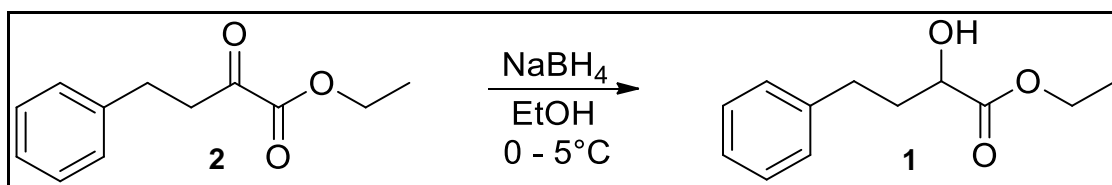
Pode-se observar que há um aumento na conversão e no excesso enantiomérico do (S)-feniletanol. O produto (R)-feniletanol acilado apresentou excesso enantiomérico de >99%, visto que não foi detectado a presença do produto (S).

O mesmo experimento foi realizado a 40°C, que é uma temperatura mais próxima da temperatura ideal da enzima. O comportamento obtido da reação foi melhor que em temperatura ambiente, conforme esperado. Após 24 h, todo o enantiômero R havia sido consumido (50% de conversão), e o produto apresentou excesso enantiomérico de >99% em todos os casos.

3.4. Redução de 2 por via química

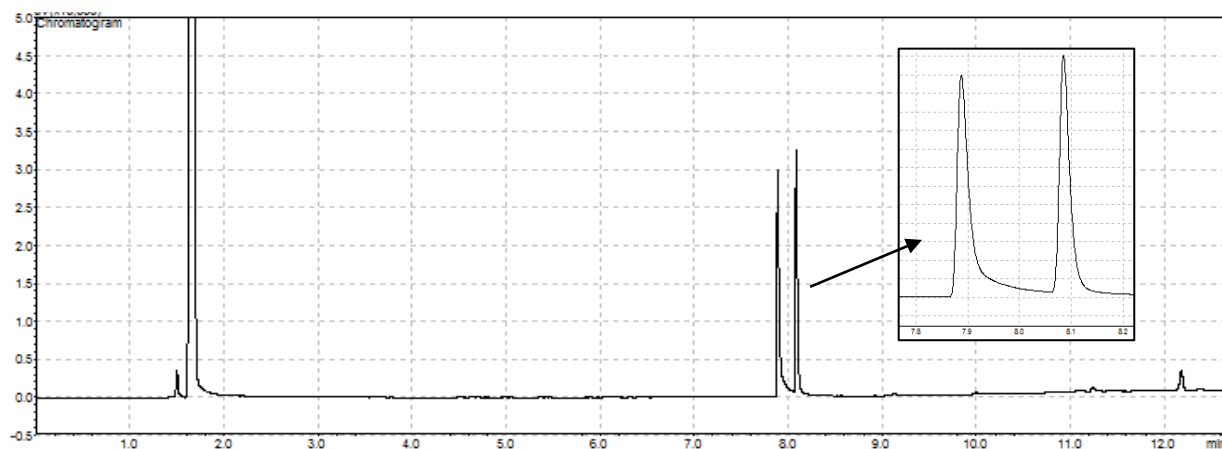
Para síntese do padrão racêmico **1**, foi testada a mesma metodologia utilizada para a síntese de **3** descrita no item 3.2, mas agora utilizando **2** como substrato, conforme equação abaixo.

Figura 3.10 – Redução de **2** com borohidreto de sódio.



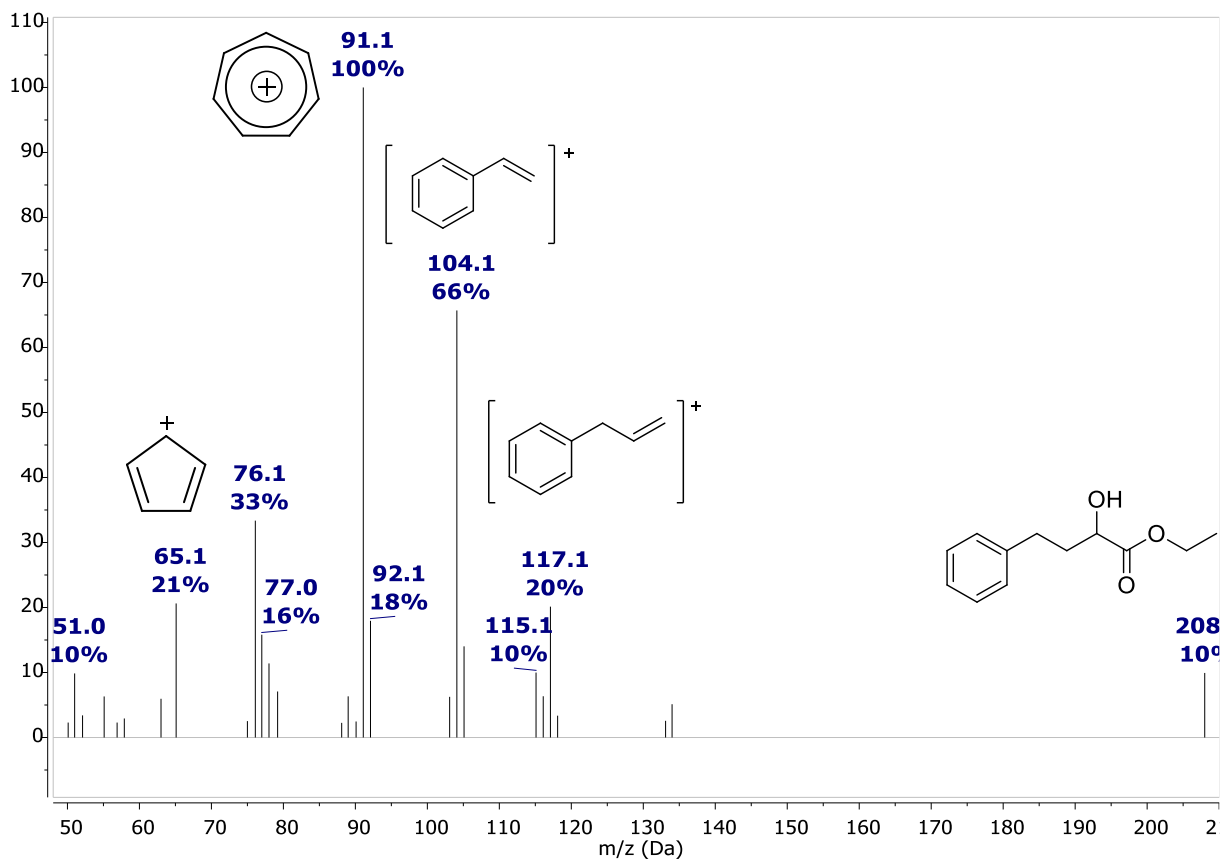
Após todo material de partida ser consumido, o cromatograma apresentava dois produtos, conforme mostrado na figura abaixo.

Figura 3.11 – Cromatograma da redução de **2** com borohidreto de sódio (Coluna RTX-5®. Método: 80°C - 3 min. 80-280°C – 20°C min; 280°C – 5 min).



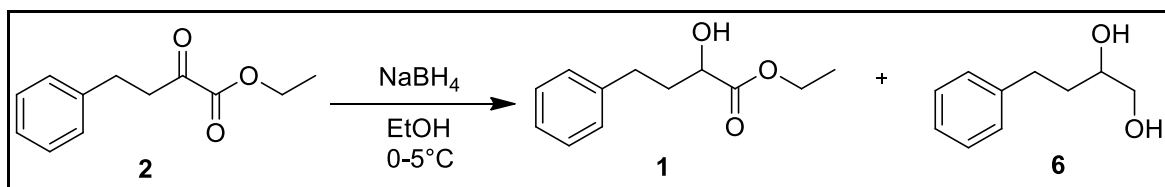
Analisando por GC-MS, foi possível observar que o composto com o tempo de retenção em 8,08 min apresentava um espectro de massas em que o sinal do íon molecular de (m/z 208) e a fragmentação correspondiam ao do composto **1**, conforme mostrado na figura 3.12.

Figura 3.12 – Espectro de massas de 1.



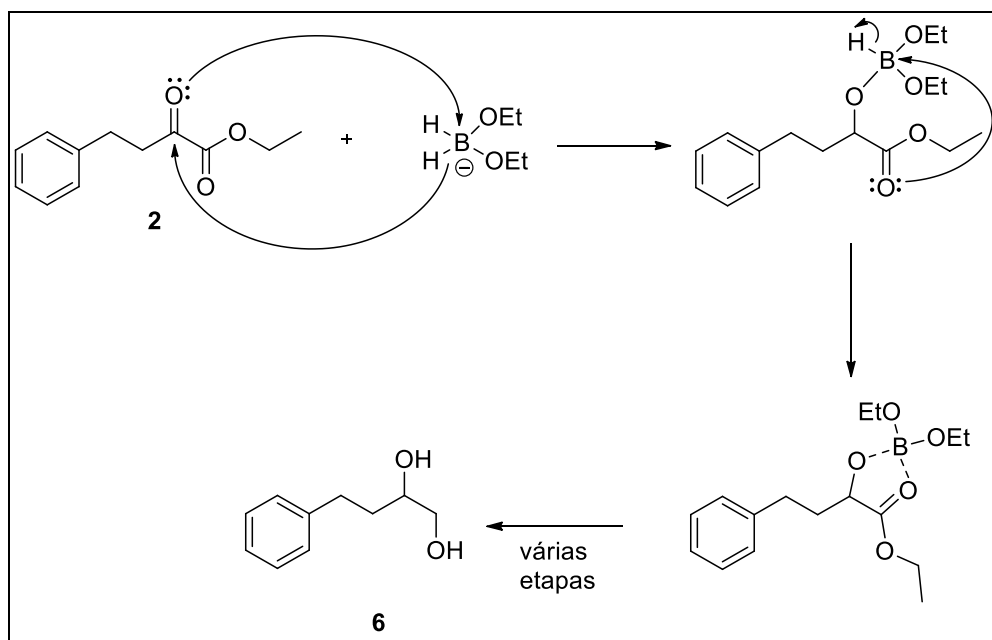
O composto em 7,88 min apresentou um espectro de massas (apêndice 11) cuja fragmentação nos levou a conjecturar que pudesse ter ocorrido uma dupla redução do substrato 2. Neste caso, o produto obtido na reação seria o 4-fenilbutano-1,2-diol (**6**), estrutura apresentada abaixo. Vale ressaltar que apesar de o pico íon molecular (m/z 166) não aparecer no espectro de massas, um sinal correspondente à fragmentação por perda de água ($[M - 18]^+ = 148$) está presente. Fragmentação por desidratação é comum para álcoois via mecanismo de eliminação 1,2 com aquecimento e para moléculas de cadeia linear com 4 ou mais carbonos contendo hidroxilas, em que a molécula sofre uma eliminação 1,4 ao chegar à fonte de ionização, sendo ambos os casos possíveis para o composto em questão.

Figura 3.13 – Produtos gerados na redução de **2** nas condições utilizadas.



Para chegar neste produto partindo do substrato **2** é necessária a redução não só da carbonila da cetona, como também da carbonila do éster, que é pouco reativa comparada à primeira. O motivo disto acontecer com um agente redutor como o borohidreto de sódio e nas condições utilizadas, segundo a literatura⁶⁸, é devido à formação de um complexo intermediário em que o boro se coordena com ambas as carbonilas, formando um anel de 5 membros, conforme mostrado na figura abaixo. Isto adicionado ao efeito indutivo da carbonila vizinha, torna a carbonila do éster mais reativa e suscetível à redução.

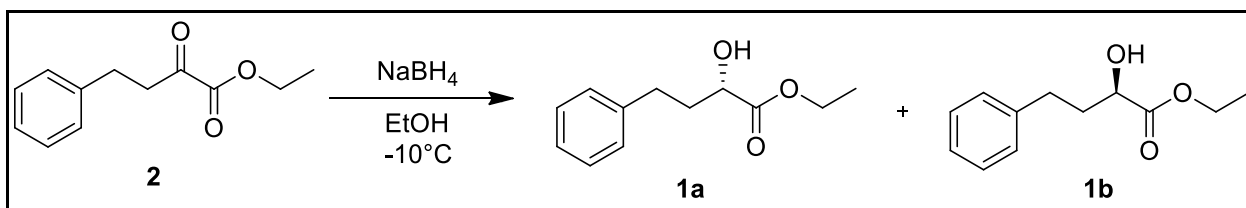
Figura 3.14 – Esquema da dupla redução do composto **2** com borohidreto de sódio em etanol.



Para obter o composto duplamente reduzido é necessário o uso de excesso de borohidreto de sódio ou de temperatura ambiente⁶⁸. Desta forma, uma nova metodologia

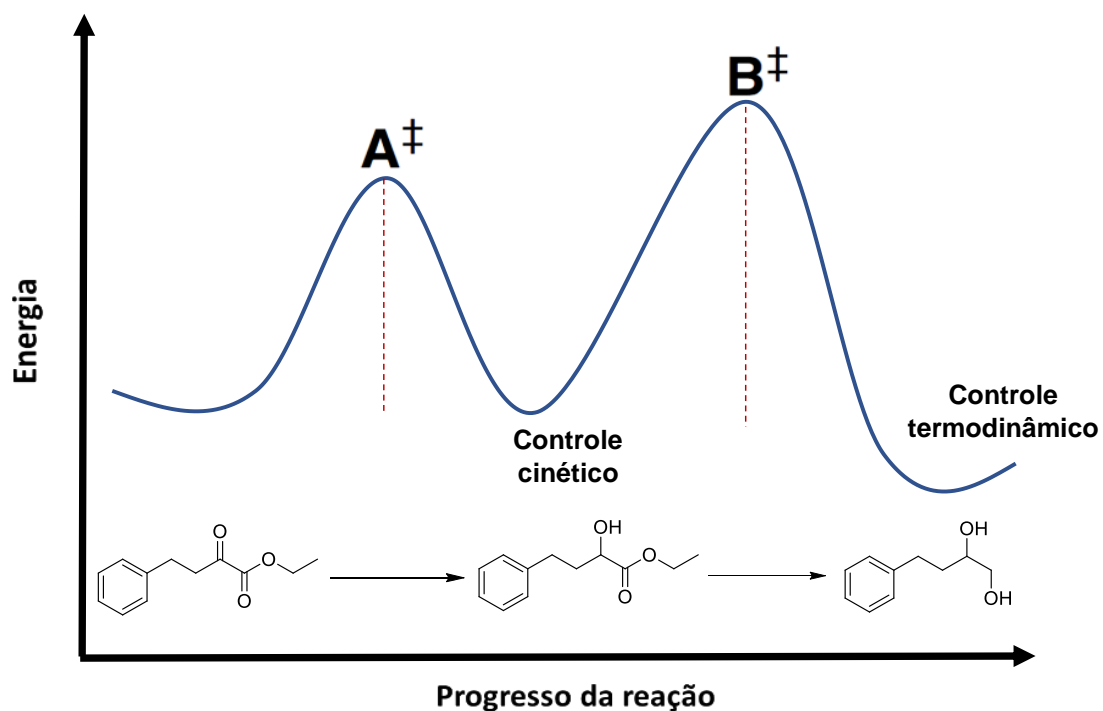
foi utilizada, usando também outros estudos como referência^{69,70}, em que a temperatura do sistema é mantida a -10°C durante toda a reação e durante a interrupção, que é realizada com a adição de uma solução de ácido acético 20%. A reação com condições otimizadas está representada no esquema a seguir.

Figura 3.15 – Condições otimizadas para redução de **2**.



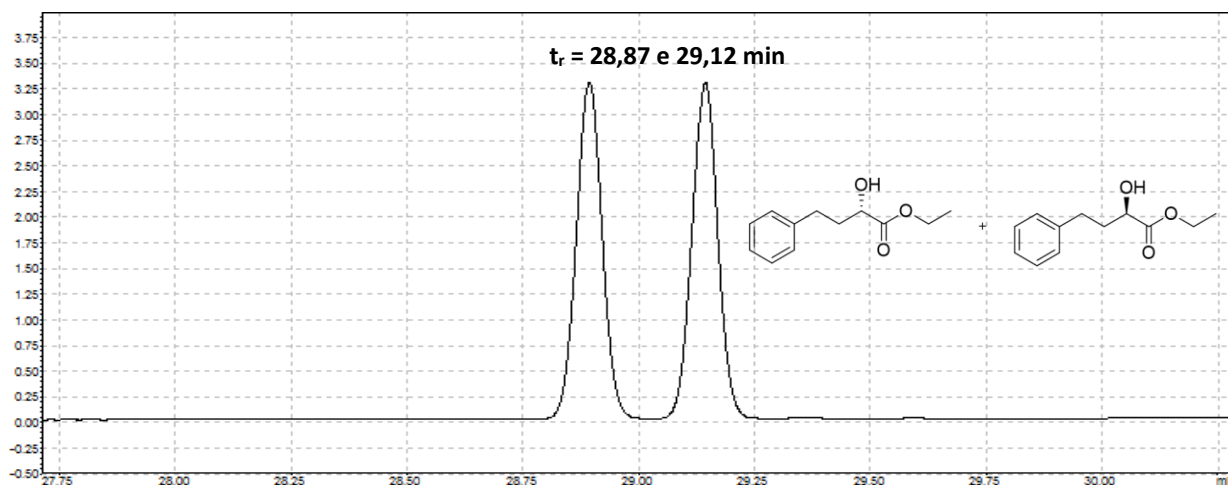
De fato, ao realizar a reação a uma temperatura mais baixa não foi observada a presença do diol. Esta é uma situação onde observou-se o controle cinético da reação. O uso de condições menos energéticas (menor temperatura) promove a obtenção do produto com menor energia de ativação, no caso, o 2-hidroxi-4-fenilbutanoato de etila e impede que uma outra barreira energética seja superada. Ao se utilizar condições mais energéticas (temperatura mais elevada) tem-se o controle termodinâmico, onde supera-se a energia de ativação do produto termodinâmico, que, no caso, é o 4-fenilbutano-1,2-diol, conforme mostrado na figura 3.16.

Figura 3.16 – Representação gráfica do controle cinético vs. controle termodinâmico.



Com o padrão racêmico obtido, um método foi desenvolvido para a separação dos enantiômeros da mistura racêmica na coluna quiral (Hydrodex®) do GC-FID e foi possível separar os enantiômeros na mesma, conforme o cromatograma apresentado na figura abaixo.

Figura 3.17 – Separação dos enantiômeros na coluna quiral (Coluna Hydrodex®. Método: 100°C – 3 min; 100-180°C - 3°C/min; 180°C – 10 min).

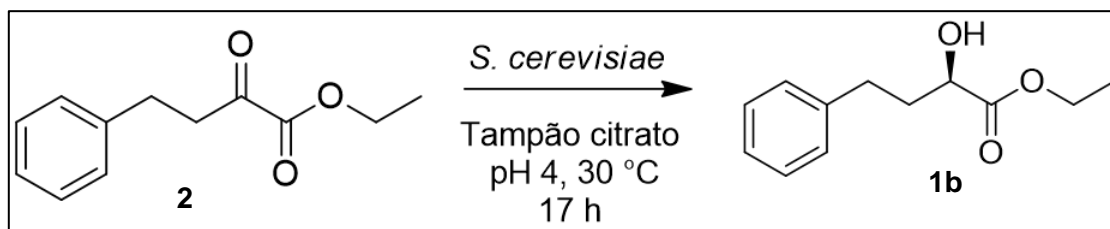


O 2-hidroxi-4-fenilbutanoato de etila também foi caracterizado por RMN ^1H , ^{13}C e IV (apêndices 2-4). No espectro de IV pode-se observar a presença da banda de absorção em 3473 cm^{-1} característico de estiramento de ligação O-H; além disso, o estiramento em 1727 cm^{-1} característico de carbonilas de ésteres. O espectro de RMN ^1H apresenta um tripleto em 1,28 ppm acoplado com um quarteto em 4,17 ppm ($J = 7,15\text{ Hz}$) correspondendo à etila; um multipletto entre 7,17 e 7,31 ppm correspondendo aos hidrogênios aromáticos; multipletos em 1,90-1,99 e 2,08-2,16 ppm correspondendo aos hidrogênios enantiotópicos, um multipletto em 2,70-2,80 correspondendo aos hidrogênios vizinhos ao anel aromático. No RMN ^{13}C , observa-se a presença de sinais negativos em 141,2 ppm e 175,2 ppm correspondentes ao carbono quaternário aromático e o carbono da carbonila respectivamente; Em 126,0, 128,4 e 128,6 ppm estão os sinais positivos dos CH_2 aromáticos; em 69,7 ppm há o sinal do carbono metínico da hidroxila; em 36,0 e 31,0 ppm estão os sinais negativos do carbonos metilênicos da cadeia alifática e em 14,2 e 69,7 ppm estão os sinais correspondentes a etila. Os dados estão de acordo com a literatura.⁷¹

3.5. Biorredução de **2** catalisada por *Saccharomyces cerevisiae*

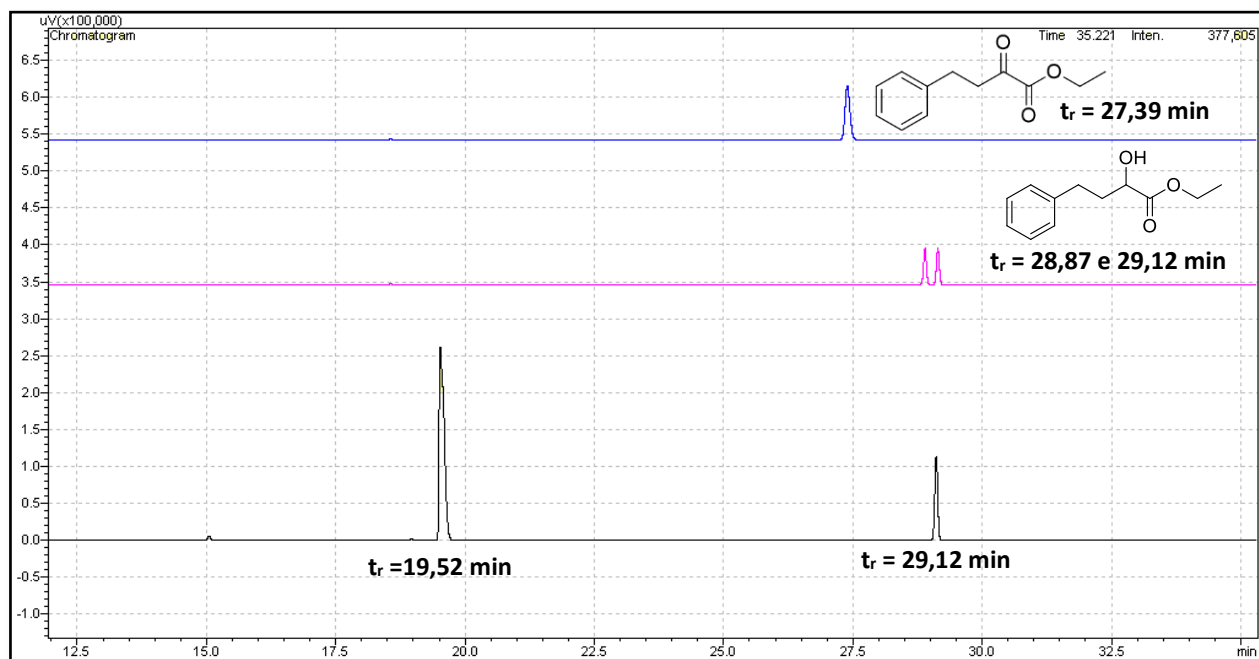
No trabalho de Lacerda *et al.*⁷² foi realizada a biorredução do 2-oxo-4-fenilbutanoato de etila por *Saccharomyces cerevisiae*. Inspirados neste trabalho, decidimos utilizar o mesmo biocatalisador, porém adaptamos a metodologia utilizada no trabalho. A reação está apresentada na figura 3.18.

Figura 3.18 – Biorredução de **2** catalisada por *Saccharomyces cerevisiae*.



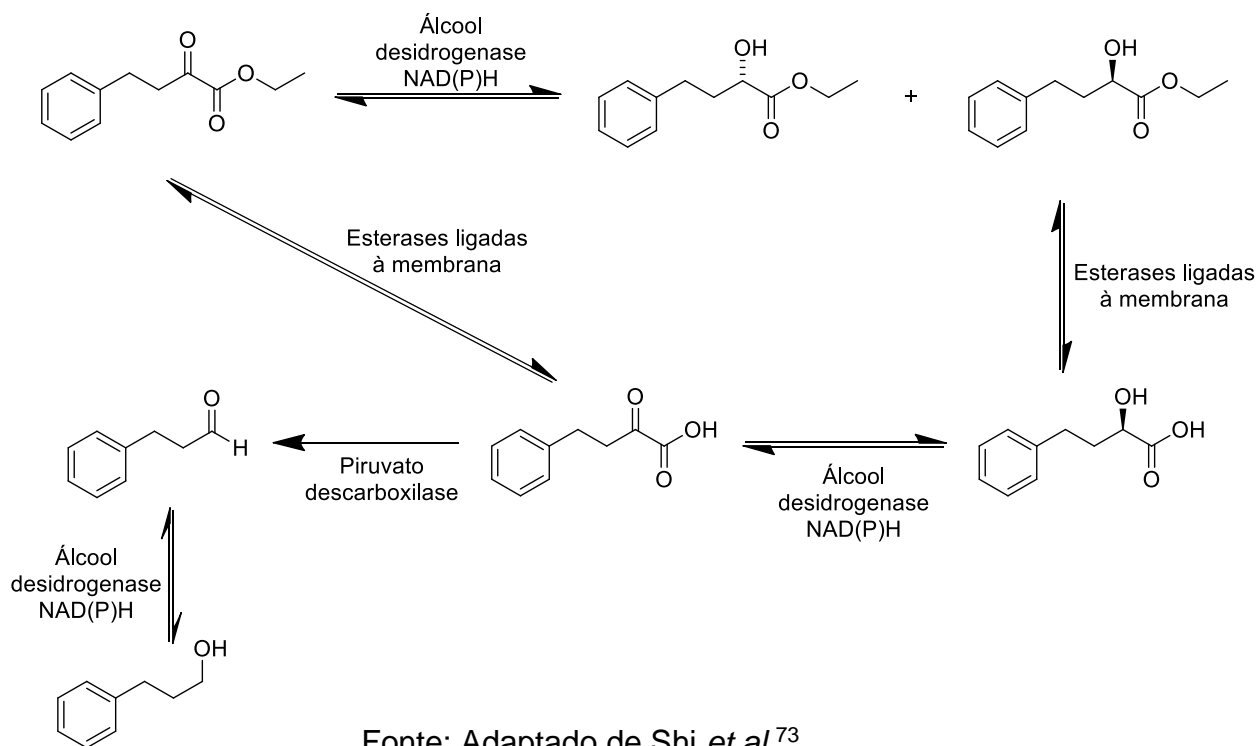
O perfil cromatográfico obtido está apresentado na figura 3.19.

Figura 3.19 – Cromatograma do material de partida (azul), padrão racêmico (rosa) e do produto da reação (preto), na coluna com fase estacionária quiral (Coluna Hydrodex®. Método: 100°C – 3 min; 100-180°C - 3°C/min; 180°C – 10 min).



Comparando os cromatogramas do material de partida, do padrão racêmico e do perfil da reação na coluna quiral, pode-se observar que 100% do material de partida foi consumido; entretanto, apenas 20,5% de um dos produtos corresponde a um dos enantiômeros, enquanto o restante, a um subproduto. Na literatura⁷³, estudos mostram que devido à presença de diversas enzimas, o composto é hidrolisado ao ácido, tanto antes como após a redução da carbonila. Depois, o ácido é descarboxilado irreversivelmente por uma piruvato descarboxilase a 3-fenilpropanal e posteriormente reduzido a 3-fenilpropanol, conforme esquema apresentado a seguir.

Figura 3.20 – Esquema de redução de **2** pelas enzimas de *Saccharomyces cerevisiae*.

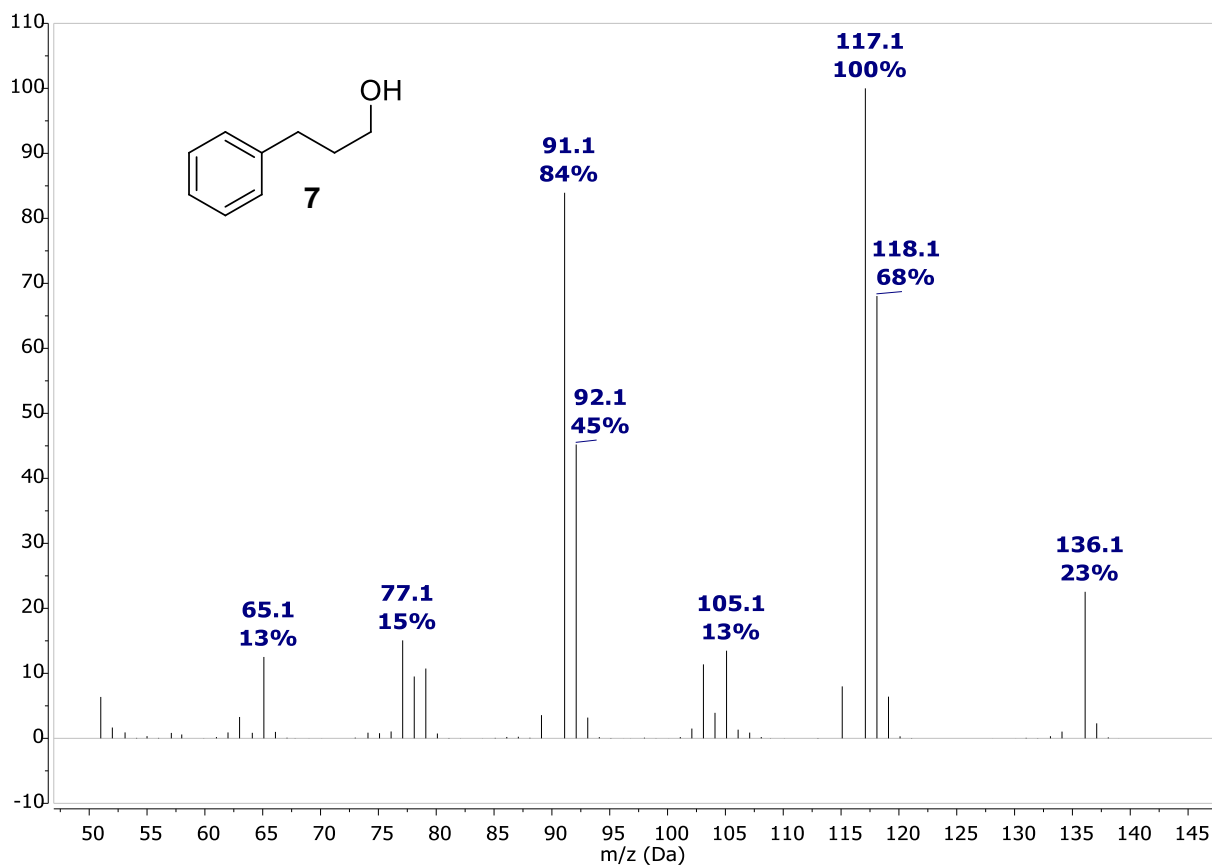


Fonte: Adaptado de Shi *et al.*⁷³

Como as enzimas da classe hidrolases pertencentes à *Saccharomyces cerevisiae* geralmente são *R* seletivas, o enantiômero detectado no cromatograma provavelmente deve corresponder ao enantiômero *S*, já que o enantiômero *R* foi hidrolisado e transformado no 3-fenilpropanol, conforme já mostrado na figura 3.20.⁷³

Para confirmar que o subproduto era o 3-fenilpropanol, a amostra foi caracterizada por GC-MS. O sinal do íon molecular (m/z 136) obtido no espectro e a fragmentação (118, 117, 105, 91, 77, 65) corroboram com a literatura^{74,75} (figura 3.21).

Figura 3.21 – Espectro de massas do 3-fenilpropanol.



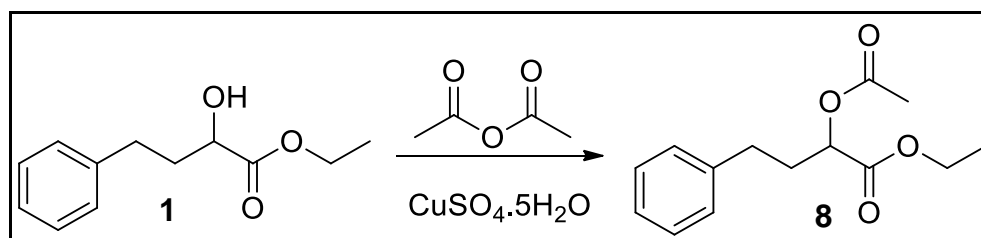
Os estudos mostram que é possível aumentar o rendimento do produto, utilizando inibidores das esterases⁷⁶, evitando que a etapa de hidrólise ocorra. Alguns estudos mostram também que a enantiosseletividade da reação pode ser modificada controlando a quantidade de glicose no meio. Entretanto, devido à complexidade de se trabalhar com parâmetros de reações com microrganismos e dado o tempo limitado disponível, decidimos optar por focar esforços nas metodologias de resolução cinética.

3.6. Síntese do padrão racêmico do 2-acetóxi-4-fenilbutanoato de etila

Para se obter o padrão racêmico e desenvolver um método de separação na coluna quiral do GC-FID, foi realizada a acilação de **1** por via química. Duas metodologias foram testadas.

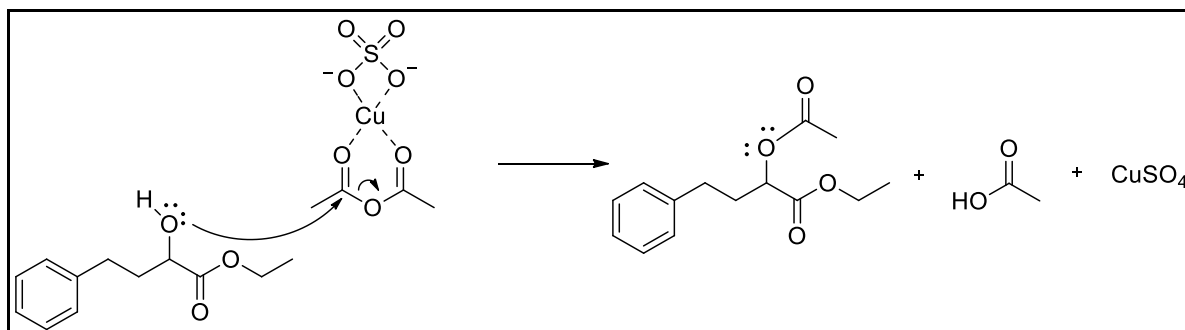
A primeira reação foi a acilação de hidroxilas catalisada por sulfato de cobre pentahidratado⁷⁷. Neste trabalho, álcoois secundários e terciários são acetilados com anidrido acético em períodos que variam de 1 a 24 h. O anidrido acético atua também como solvente de reação. O fato desta reação utilizar um catalisador heterogêneo, que é um reagente seguro e barato, e de não utilizar solvente faz com que esta rota esteja de acordo com os preceitos da química verde. O catalisador é um ácido de Lewis, que pode ser reciclado até 5 vezes antes de haver perda significativa na atividade catalítica. A reação está representada no esquema abaixo.

Figura 3.22 – Esquema de reação de acilação de **1** catalisada por sulfato de cobre pentahidratado.



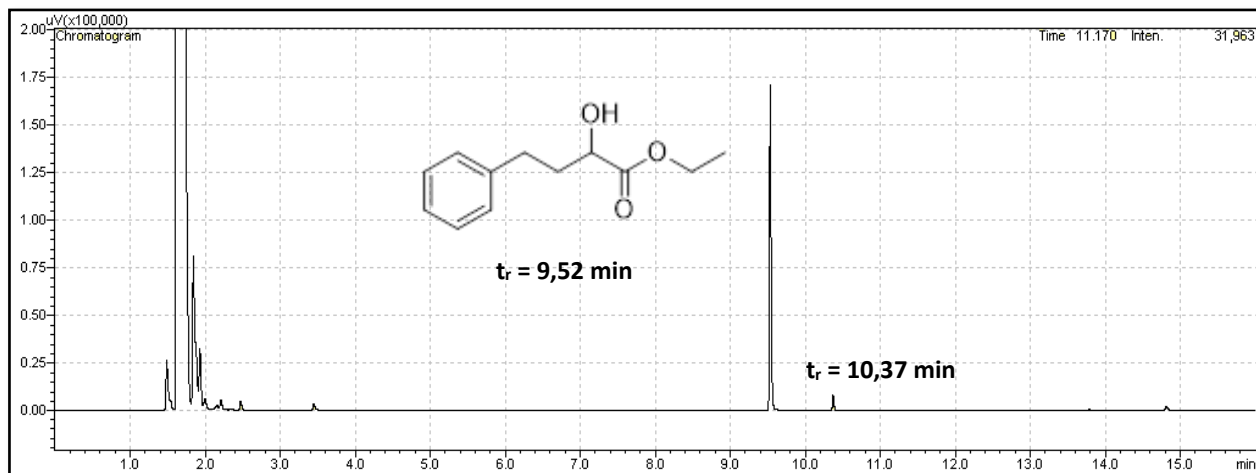
Um mecanismo proposto para esta reação, dado que o catalisador atua como um ácido de Lewis, está mostrado na figura a seguir.

Figura 3.23 – Mecanismo proposto para a acilação de **1** catalisada por $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$.



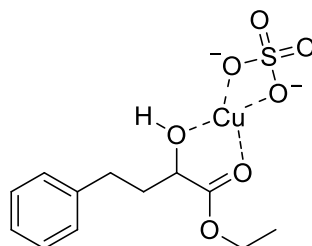
Após 17 horas, uma alíquota foi retirada e injetada no GC-FID e o cromatograma obtido é o apresentado a seguir.

Figura 3.24 – Cromatograma da acilação catalisada por sulfato de cobre pentahidratado (Coluna RTX-5®. Método: 80°C - 3 min. 80-280°C – 20°C min; 280°C – 5 min).



O perfil obtido apresenta o pico do material de partida com grande intensidade, e o aparecimento de um pico em 10,37 min. Não possuindo o padrão do composto acetilado, não podíamos afirmar se este era o produto desejado, mas se o fosse, a conversão estava apenas em 5%. Como a reação prosseguia de forma muito lenta, decidiu-se interromper a reação. A presença do grupo éster vizinho à hidroxila pode ter sido um fator que influenciou esta baixa conversão, visto que como o catalisador é um ácido de Lewis, a presença da carbonila pode complexar no metal juntamente com a hidroxila, conforme mostrado na figura abaixo, e impedir o ataque da mesma ao grupo acila do anidrido acético.

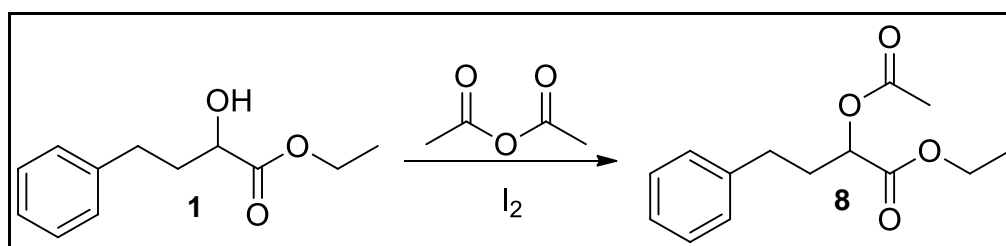
Figura 3.25 – Possível complexo formado entre o sulfato de cobre e o composto 1.



Uma nova metodologia foi testada, que ainda não foi reportada para este substrato, em que a acilação é catalisada por iodo molecular⁷⁸. Novamente, a reação é feita sem

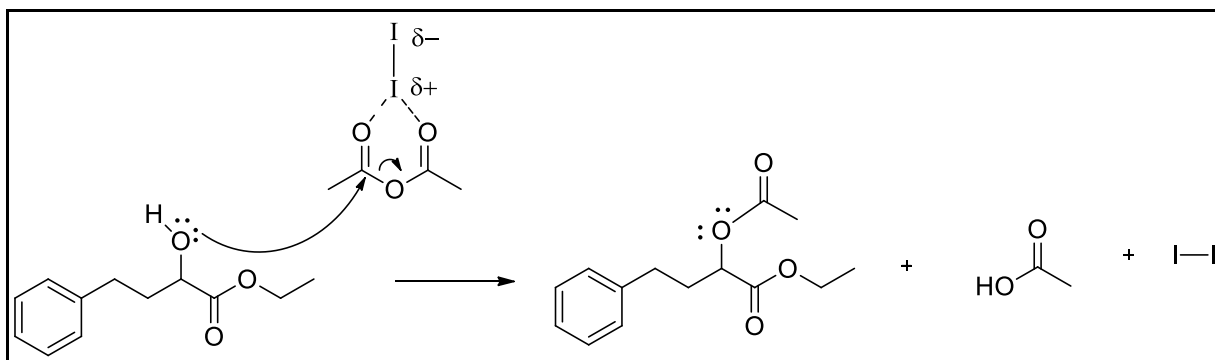
solvente, pois além do catalisador e do substrato, há apenas a presença do anidrido acético como doador de acila, que é utilizado em pouco excesso. O trabalho referenciado realiza a acilação de álcoois primários, secundários, terciários e um hidróxi-éster, mostrando o potencial desta metodologia. A reação está esquematizada abaixo.

Figura 3.26 – Acilação de **1** catalisado por iodo.



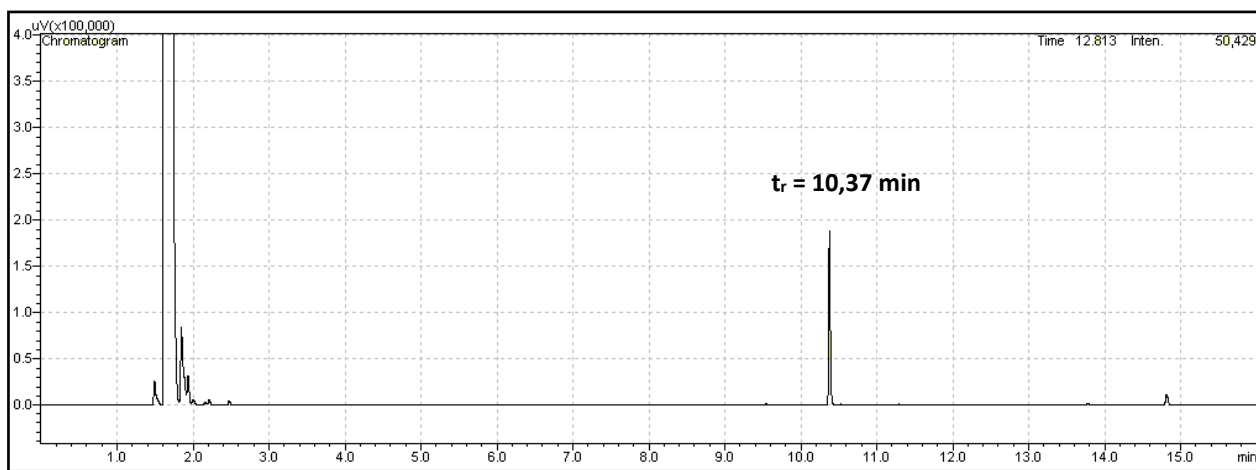
O mecanismo proposto para esta reação está apresentado na figura abaixo. Por ser um átomo de grande volume, o iodo tem alta polarizabilidade, em que a nuvem de elétrons pode ser deformada, de modo que a molécula de iodo apresente uma densidade de carga negativa em uma extremidade e positiva na outra⁷⁹. Assim, este pode se complexar com as carbonilas do anidrido acético, permitindo o ataque nucleofílico da hidroxila à um dos grupos acil, tornando o acetato um bom grupo de saída.

Figura 3.27 – Mecanismo proposto para a acilação do composto **1** catalisada por iodo molecular.



A reação foi monitorada através de GC-FID. Após 1 hora, todo o material de partida havia sido consumido. Após a extração, o perfil cromatográfico do produto apresentava o aspecto apresentado na figura 3.28.

Figura 3.28 – Cromatograma da acilação de **1** catalisada por iodo (Coluna RTX-5®. Método: 80°C - 3 min. 80-280°C – 20°C min; 280°C – 5 min).

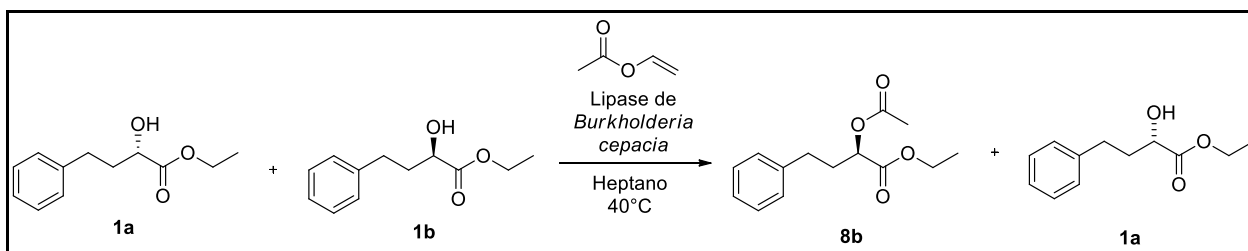


O composto de maior intensidade apresenta o mesmo tempo de retenção que o produto da reação anterior, inferindo que ambas chegaram no mesmo produto. Há ainda a presença de um pico de pequena intensidade no tempo de retenção do material de partida. Assim, o mesmo estava abaixo do limite de detecção da placa de CCD, mas foi detectado pelo GC-FID. O composto acilado foi caracterizado por GC-MS, RMN ^1H e ^{13}C (apêndices 14-16).

3.7. Resolução cinética de **1**

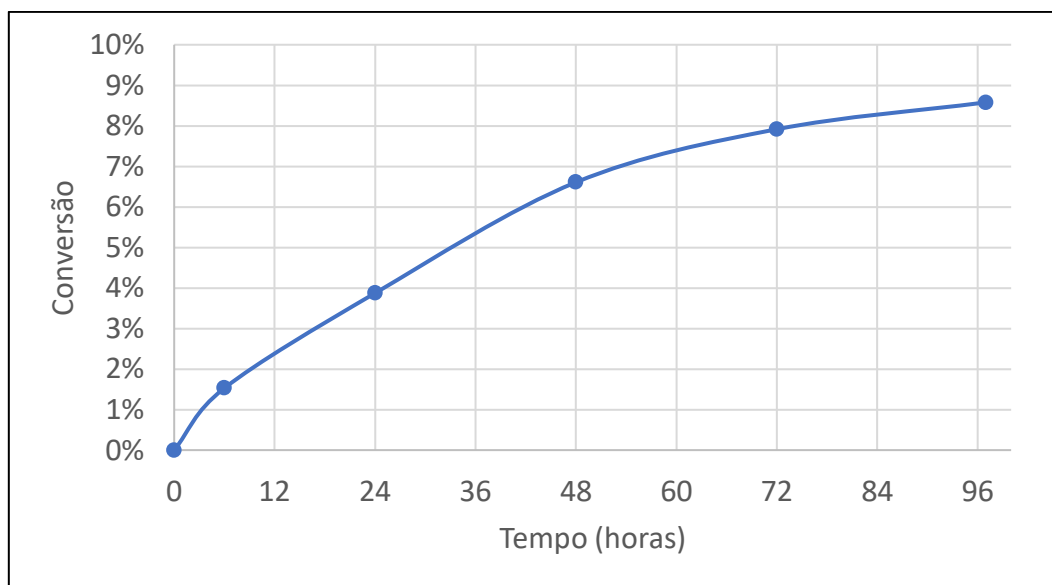
Como dito anteriormente, a lipase de *Burkholderia cepacia* foi selecionada devido ao tamanho da cavidade de seu sítio ativo para catalisar as reações de resolução cinética de **1**, além de ser a lipase mais disponível no laboratório. Inicialmente, a reação foi testada nas mesmas condições otimizadas para a resolução cinética de **3**, conforme o esquema abaixo.

Figura 3.29 – Resolução cinética de 1.



Esse foi o primeiro de uma série de experimentos de resolução cinética. As reações foram monitoradas por GC-FID. O resultado desta resolução cinética está apresentado a seguir.

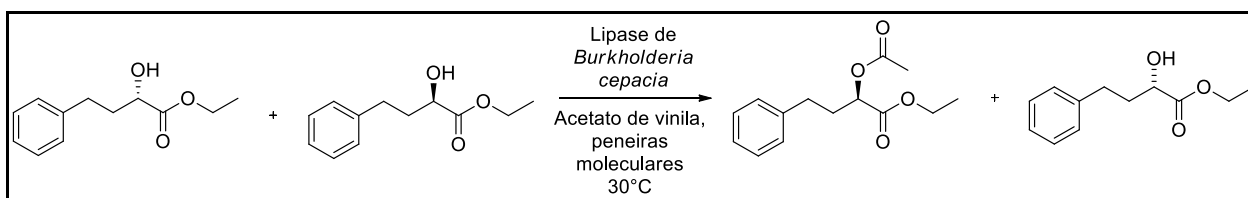
Figura 3.30 – Representação gráfica da resolução cinética de 1.



A conversão do 2-hidroxi-4-fenilbutanoato de etila em seu produto acilado ocorreu de maneira lenta. Comparando o composto com o 1-feniletanol, o substrato é muito maior e, portanto, pode ter mais dificuldade de acessar o sítio catalítico da enzima. Além disso, já apresenta um grupo éster, o que pode dificultar a ancoragem do substrato no sítio catalítico.

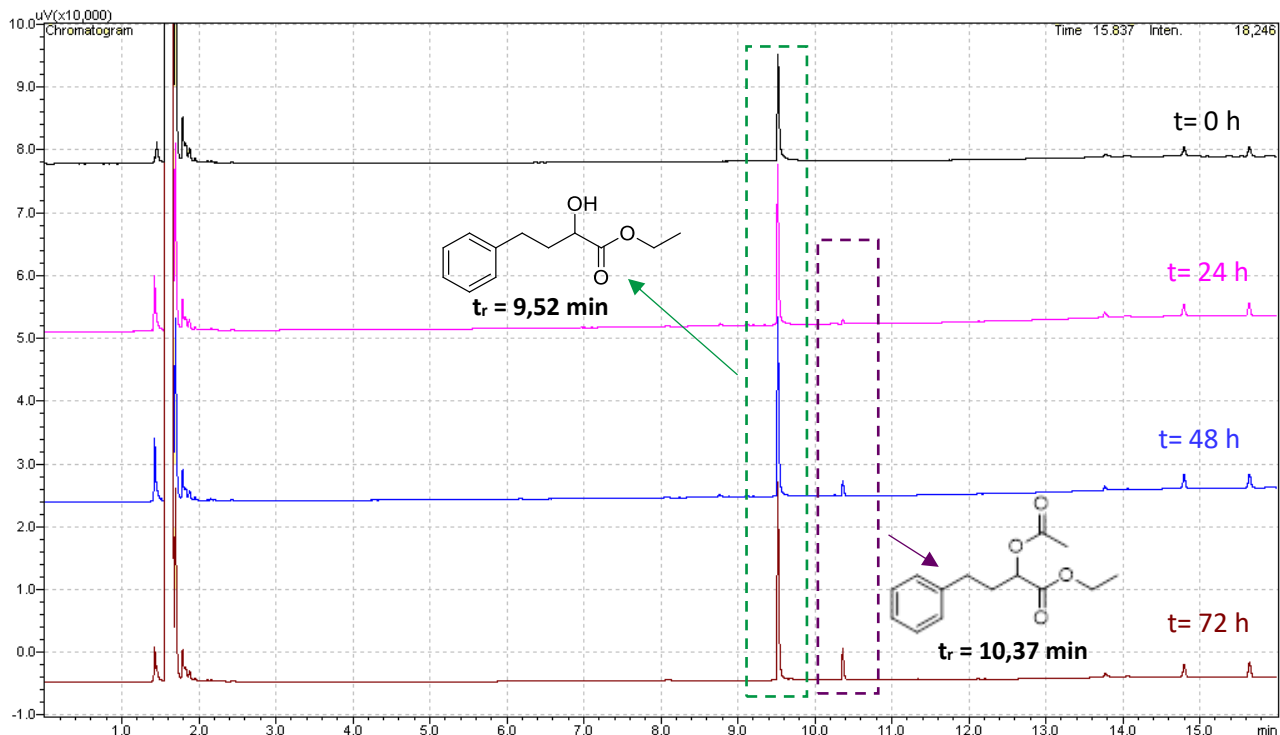
Decidimos modificar a metodologia, de modo a verificar, se esta melhoraria a conversão do substrato em produto. Primeiramente, testamos trocar o solvente pelo próprio doador de acila, fazendo com que a reação seja mais verde por ser sem solvente, além de o doador de acila estar em grande excesso. Foi usada como referência uma metodologia na literatura⁶⁹, que apresenta o mesmo objetivo de obter o produto **8** através de resolução cinética a partir de **1**, entretanto, usando uma lipase diferente da usada neste trabalho. Outro parâmetro diferente usado nesta referência é o uso de peneiras moleculares no meio reacional. As peneiras moleculares retiram as moléculas de água geradas nas reações de esterificação catalisadas pelas lipases, fazendo com que haja um deslocamento de equilíbrio no sentido dos produtos, além de diminuir a quantidade de água no meio, fazendo com que não haja inibição da reação por competição com a reação da hidrólise. A reação está mostrada no esquema abaixo.

Figura 3.31 – Resolução cinética de **1** em acetato de vinila.



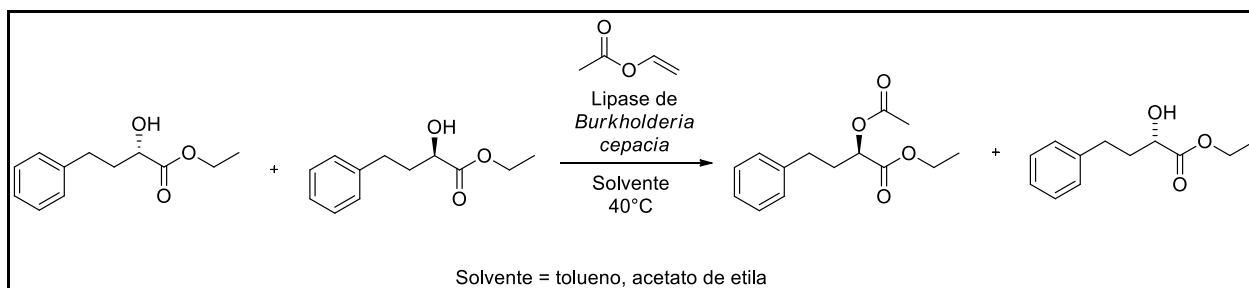
A temperatura utilizada também foi escolhida de acordo com a referência. Os resultados estão apresentados na figura abaixo.

Figura 3.32 – Cromatogramas da resolução cinética de **1** em acetato de vinila (Coluna RTX-5®).
Método: 80°C - 3 min. 80-280°C – 20°C min; 280°C – 5 min).



Os resultados foram similares ao da metodologia em heptano. Ainda objetivando observar o efeito do solvente, nós testamos a reação também em tolueno e acetato de etila.

Figura 3.33 – Resolução cinética de **1**.

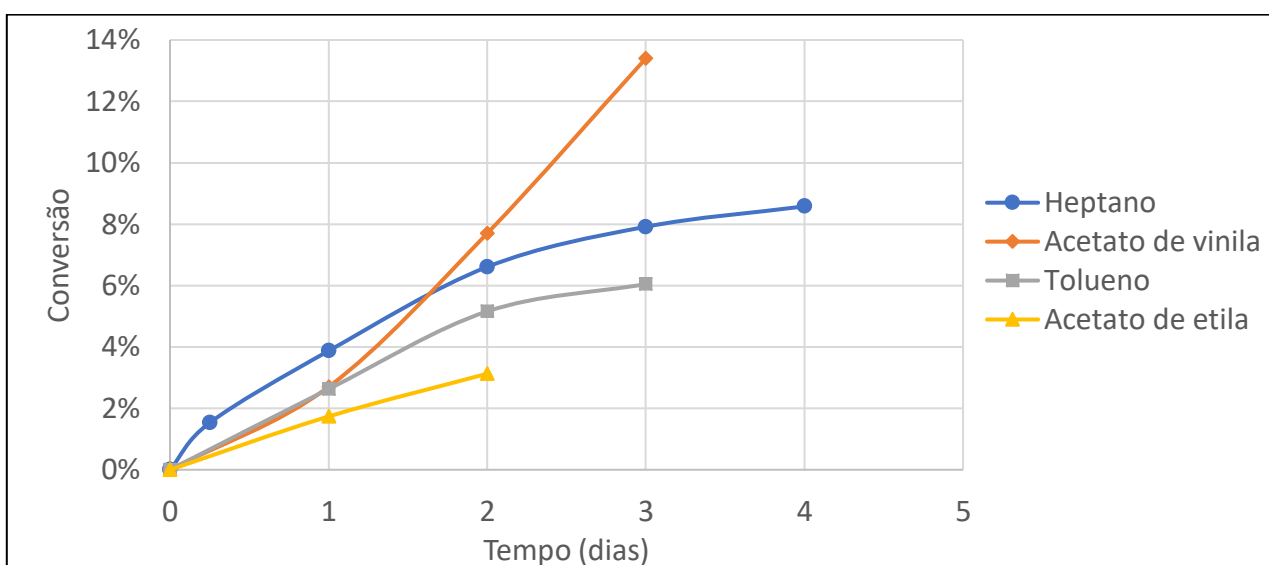


As reações foram monitoradas e os resultados estão comparados na figura 3.3 e na tabela 1.

Tabela 1 – Conversão da resolução cinética através da esterificação catalisada por lipase de *Burkholderia cepacia* do composto **1** em diversos solventes diferentes.

Solvente	Temperatura	Tempo	Conversão
Heptano	40 °C	96 h	8,7 %
Acetato de vinila	30 °C	72 h	13,4 %
Tolueno	40 °C	72 h	10,9 %
Acetato de etila	40 °C	48 h	3,1 %

Figura 3.34 – Resultados da resolução cinética de **1** com diferentes solventes.

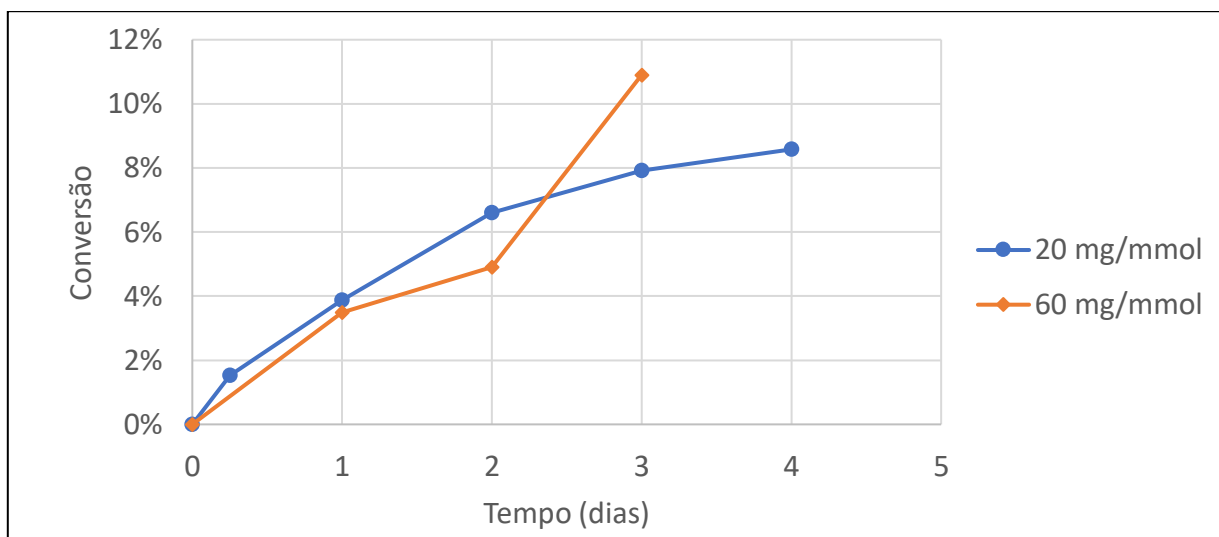


A reação em acetato de vinila forneceu o melhor resultado após 3 dias, de 13,4 % de conversão. Diversos parâmetros foram modificados que podem justificar esta melhora: o uso de peneira moleculares removendo água do meio, o excesso de doador de acila, são dois exemplos, além da quantidade de enzima com relação ao substrato. Um outro fator que pode ser relevante é que o solvente é muito volátil, e houve uma grande redução no volume da reação no decorrer dos dias. Isto pode explicar o motivo de no primeiro dia a conversão ter sido abaixo da do heptano, enquanto no segundo dia, em que boa parte do volume havia sido reduzido e, portanto, havia uma maior concentração de enzimas, havia uma maior conversão. Nós esperávamos que este resultado seria muito superior ao do heptano, porém, a diferença não foi muito significativa.

No caso do acetato de etila, devido à baixa conversão, a reação foi interrompida já no segundo dia. Quanto ao tolueno, este solvente é comumente usado em resoluções cinéticas, e, comparando com dados da literatura, para resolução cinética de hidróxi-ésteres similares (mandelatos de metila e etila, 2-hidróxi-3-fenilpropanoato de metila e 2-hidróxi-4-fenilbutanoato de metila) com lipases de *Burkholderia cepacia* imobilizada, é possível chegar próximo de 50% de conversão após 5 dias⁸⁰. Assim, o fato de o substrato **1** ter tido uma velocidade de reação menor pode ser justificada pelo tamanho do substrato não ser adequado para ser ancorado no sítio ativo da lipase de *Burkholderia cepacia*. Vale ressaltar também que a mudança do solvente e de suas interações intermoleculares, modificam o arranjo tridimensional da enzima, que é fundamental para a atuação da mesma; a maneira com que o solvente interage com a enzima e como o solvente interage com o substrato, são fatores importantes que afetam a velocidade das reações enzimáticas.³³

Por fim, um último experimento foi testado, modificando o parâmetro da quantidade de enzima com relação à quantidade de substrato. Para isto, a reação foi realizada novamente em heptano, que dos solventes utilizados anteriormente, é o mais verde que apresentou o melhor resultado. Os resultados foram apresentados na figura 3.35.

Figura 3.35 – Resolução cinética de **1** com diferentes quantidades de enzimas.



Novamente, a modificação deste parâmetro apresentou uma diferença pouco significativa, diferente do que era o esperado. Apesar de utilizar 3 vezes mais quantidade de enzima, a conversão permaneceu baixa, apenas 3% acima quando comparado à reação com 3 vezes menos enzima. Na resolução com 20 mg/ml de enzima, pode-se observar pela tendência que a reação já alcançava um platô, ou seja, a reação ia progredir de maneira muito lenta a partir deste ponto, enquanto que na reação com 60 mg/ml, esta tendência não é observada.

Os excessos enantioméricos de algumas alíquotas foram determinados apenas para os substratos não reagidos. Estes dados estão compilados na tabela 2.

Tabela 2 – Excessos enantioméricos da resolução cinética através da esterificação catalisada por lipase de *Burkholderia cepacia* do composto 1.

Solvente	Tempo	Conversão	ee_{subs}
Heptano	96 h	8,7%	19 %
Acetato de vinila	72 h	13,4%	18 %
Heptano (3x de enzima)	72 h	10,9%	16 %

Pode-se observar que utilizando 3 vezes mais enzima, apesar da conversão ter sido superior, o excesso enantiomérico foi menor. O excesso de enzima pode fazer com que o outro enantiômero também reaja com o catalisador. No caso do acetato de vinila, este foi o melhor resultado, pois mesmo com a maior conversão, o excesso ainda ficou próximo do heptano.

4. CONCLUSÃO

Foram exploradas algumas metodologias biocatalíticas para obtenção do 2-(*R*)-hidroxi-4-fenilbutanoato de etila. Primeiramente, foram realizadas a síntese de seu padrão racêmico e separação na coluna quiral e a síntese do 2-acetóxi-4-fenilbutanoato de etila, que foram caracterizados.

A biorredução catalisada por *Saccharomyces cerevisiae* do 2-oxo-4-fenilbutanoato de etila foi realizada, entretanto, não foi possível obter o composto de interesse, pois, diversas enzimas presentes no microrganismo rapidamente convertem o produto de interesse em um subproduto, o 3-fenilpropanol.

Quanto à resolução cinética, o composto de interesse foi acilado pela lipase de *Burkholderia cepacia* a uma velocidade muito lenta, apresentando conversão <15% após 3 dias utilizando heptano e tolueno como solventes, e 13% com acetato de vinila como solvente após este mesmo período. Mesmo aumentando em 3 vezes a quantidade de enzima, foi possível aumentar apenas 3% com relação a reação com quantidade menor. Além disso, o uso de uma quantidade muito excessiva de catalisador já faz com que a metodologia se torne menos sustentável.

Apesar de todos os obstáculos, foi possível realizar um estudo muito interessante das maneiras de se obter uma molécula importante para a indústria farmacêutica, utilizando vias biocatalíticas.

5. DESENVOLVIMENTO EXPERIMENTAL

5.1. Considerações gerais

5.1.1. Reagentes e Solventes

A lipase Amano PS da *Burkholderia cepacia* e o *Saccharomyces cerevisiae* foram ambos obtidos comercialmente da Sigma-Aldrich. O 2-oxo-4-fenilbutanoato de etila e a acetofenona utilizados foram obtidos comercialmente da Sigma-Aldrich. O borohidreto de sódio utilizado foi obtido comercialmente da Merck, usado sem purificação. O acetato de etila e o heptano utilizados foram obtidos comercialmente da marca Synth e NEON, respectivamente. O acetato de vinila foi obtido comercialmente, da marca Alfa Aesar. O etanol grau HPLC foi obtido comercialmente, da marca AppliChem Panreac.

5.1.2. Métodos Cromatográficos

5.1.2.1. Cromatografia em camada delgada

A cromatografia de camada delgada (CCD) foi usada para monitoramento de algumas reações e purificações. As análises foram realizadas em cromatoplasmas de alumínio da marca Macherey Nagel, com filme de sílica gel 60 com indicador UV₂₅₄. A revelação nas cromatoplasmas foi realizada incidindo-se radiação UV de 264 nm com lâmpada UV.

5.1.2.2. Cromatografia em camada delgada preparativa

A cromatografia preparativa em camada delgada foi realizada em placa de vidro de 20 x 20 cm com uma camada de 0,75 mm de sílica gel Kieselgel DF da marca Riedel-deHaën, em cuba de 200 ml, utilizando como fase móvel acetato de etila/heptano 1:4. A revelação dos compostos foi realizada com radiação UV de 264 nm. Os compostos

separados foram coletados, dissolvidos em acetato de etila e concentrados em frascos separados.

5.1.2.3. Cromatografia flash

A cromatografia flash em coluna com sílica seca foi realizada em coluna empacotada com sílica gel SiliaFlash® F60, tamanho de partícula 40-63 µm (230-400 mesh), da marca SiliCycle, com sistema de eluição gradiente de acetato de etila/heptano.

5.1.2.4. Cromatografia gasosa com detector de ionização por chama

A cromatografia gasosa acoplada ao detector de ionização por chama (GC-FID, em inglês) foi utilizada para análises, realizadas no cromatógrafo gasoso Shimadzu GC-2010 Plus, auto-injetor AOC-20i, detector de ionização por chama. Para monitoramento de reações utilizou-se coluna capilar de sílica fundida Restek Rtx®-5 coluna (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm, 5 % fenil e 95 % dimetilpolisiloxano). As temperaturas de injeção e de detecção foram de 230 °C e 300 °C, respectivamente. O fluxo de gás H₂ utilizado foi constante, de 1,22 ml min⁻¹. O volume de injeção foi de 1,0 µl de concentração de aproximadamente 0,5 mg/ml no modo split. Foram utilizados dois métodos de programação de temperatura, apresentados na tabela 3.

Tabela 3 – Programação de temperatura para a coluna RTX®-5.

	Taxa de aquecimento (°C/min)	Temperatura (°C)	Tempo de espera (min)	Tempo total de análise (min)
Método 1	-	80,0	3,00	12,67
	30,0	280	3,00	
Método 2	-	80,0	3,00	18,00
	20,0	280,0	5,00	

Os excessos enantioméricos foram determinados por GC-FID na coluna de fase quiral Hydrodex® β -3P (25 m x 0,25 mm x 0,25 μ m) da marca Macherey-Nagel. As temperaturas de injeção e de detecção foram de 200 °C e 220 °C, respectivamente. O fluxo de gás foi constante a 1,22 ml/min, volume de injeção de 1,0 μ l, na concentração de aproximadamente 0,5 mg/ml, modo split. As programações de temperatura utilizadas estão apresentadas na tabela 4.

Tabela 4 – Programação de temperatura para a coluna Hydrodex®.

	Taxa de aquecimento (°C/min)	Temperatura (°C)	Tempo de espera (min)	Tempo total de análise (min)
Método A	-	100,0	3,00	36,50
	1,00	115,0	2,00	
	10,00	180,0	10,00	
Método B	-	100,0	3,00	39,67
	3,00	180,0	10,00	

5.1.2.5. Cromatografia gasosa acoplada ao Espectrômetro de Massas (GC-MS)

Os espectros de massas foram obtidos através de um cromatógrafo gasoso GC-MS, modelo 7890B, Agilent, acoplado a um espectrômetro de massas Modelo 5977A, com fonte de ionização por elétrons com energia de ionização a 70 eV. A faixa de operação foi de 50-500 m/z. No cromatógrafo gasoso utilizou-se coluna capilar de sílica fundida HP-5 MS (30 m x 0,25 mm x 0,25 μ m, 5% fenil-metilsiloxano). Utilizou-se fluxo de gás He constante de 1 ml/min, temperatura de injeção de 280°C, volume de injeção de 1,0 μ l na concentração de 0,5 mg/ml. Utilizou-se programação de temperatura de 80°C por 3 minutos, 30°C/min até 280°C, mantidos por 3 minutos.

5.1.3. Espectroscopia no infravermelho (IV)

Os espectros de absorção na região do infravermelho foram obtidos no Laboratório Multiusuário I de Análises Químicas do Instituto de Química – UNESP Araraquara, em um espectrômetro da marca Bruker modelo Vertex 70 com transformada de Fourier, absorvendo na região 400 a 4000 cm^{-1} por meio de reflexão total atenuada em cristal diamante (ATR).

5.1.4. Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio e de Carbono (RMN de ^1H e ^{13}C)

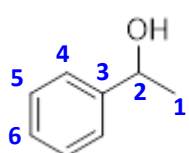
Os espectros de RMN de ^1H e ^{13}C foram registrados na Plataforma Instrumental de RMN do Instituto de Química - UNESP Araraquara, em espectrômetro Bruker Fourier 600 (B0 14,1 T) operando na frequência de 600,13 MHz para o núcleo de hidrogênio e 150,90 MHz para o núcleo de carbono-13. Os sinais de deslocamentos químicos (δ) foram registrados em ppm utilizando como padrão interno tetrametilsilano (TMS, $\delta = 0,00$) e padrão externo CDCl_3 ($\delta\text{H} = 7,24$; $\delta\text{C} = 77,23$).

5.2. Procedimentos experimentais

5.2.1. Redução de 4 com borohidreto de sódio

À 50,0 mg (0,42 mmol) de acetofenona foram adicionados 3,0 ml de etanol grau HPLC, em banho de gelo (temperatura 0-5°C). A seguir, foram adicionados lentamente 0,42 mmol de NaBH_4 e o sistema foi mantido sob agitação magnética por 3 horas. O sistema era mantido semiaberto, para permitir apenas a liberação do gás hidrogênio. A reação foi monitorada e analisada por GC-FID (Método 1, Tabela 1), a partir de 10 μl de amostra de reação. Após a reação, o solvente foi rotaevaporado, foi adicionado 15,0 ml de água e extraído com acetato de etila (3 x 15,0 ml). As fases orgânicas foram

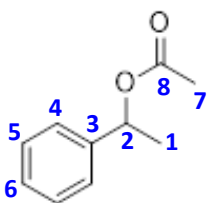
combinadas e secas com sulfato de magnésio anidro. A solução resultante foi filtrada e rotaevaporada.



1-Feniletanol. F.M. C₈H₁₀O; **MM** 122,16 g mol⁻¹; líquido incolor; **Rendimento:** 79%; **GC-FID:** t_R = 5,08 min (Rtx®-5 – Método 1); t_{R-(R)} = 20,21 min e t_{R-(S)} = 21,21 min (Hydrodex – Método A). EM (IE, 70 eV) m/z (abundância relativa %): 122 (35), 107 (100), 104 (39), 91 (8), 79 (84), 77 (59), 51 (24); **IV (ν_{max}) (cm⁻¹):** 3338, 2972, 1412, 1256, 1058, 845, 758, 605. **RMN de ¹H (600 MHz, CDCl₃) δ (ppm):** 1,50 (d, J = 6,0 Hz, 3H, H₁), 4,90 (q, J = 6,4 Hz, 1H, H₂), 7,25–7,40 (m, 5H, H₄₋₆). **RMN de ¹³C (150, MHz, DETPQ, CDCl₃) δ (ppm):** 25,2 (CH₃, C₁), 70,5 (CH, C₂), 125,4 (CH, C₄), 127,5 (CH, C₆), 128,5 (CH, C₅), 145,8 (C_o, C₃).

5.2.2. Resolução cinética de 3 com lipase

À 20,0 mg de lipase da *Burkholderia cepacia* foram adicionados 2,0 ml de heptano. À esta suspensão foi adicionada uma solução de 4,0 ml de heptano contendo 172,0 mg (2,0 mmol) de acetato de vinila e 122,0 mg (1,0 mmol) de feniletanol. A reação foi mantida sob agitação por 30 horas a temperatura ambiente ou por 24 horas a 40°C, monitorada e analisada por GC-FID (Método 1A), com 10 µl de amostra. A reação foi então filtrada, foi adicionado 20,0 ml acetato de etila e a solução foi lavada com água (3 x 20,0 ml). A fase orgânica foi seca com sulfato de magnésio anidro e rotaevaporada.

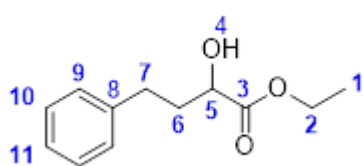


Acetato de 1-feniletila. F.M. C₁₀H₁₃O₂; **MM** 164,20 g mol⁻¹; líquido incolor; **GC-FID:** t_R = 6,09 min (Rtx®-5 - Método 1); t_{R-(R)} = 17,84 min (Hydrodex – Método A). **RMN de ¹H (600 MHz, CDCl₃) δ (ppm):** 1,54 (d, J = 6,58 Hz, 3H, H₁), 2,07 (s, 3H, H₇), 5,88 (q, J = 6,58 Hz, 1H, H₂), 7,27–7,37 (m, 5H, H₄₋₆). **RMN de ¹³C (150 MHz, DETPQ, CDCl₃) δ (ppm):** 21,2 (CH₃, C₁), 22,2 (CH₃, C₇), 72,3 (CH, C₂), 126,1, 127,9 e 128,5 (CH, C₄₋₆), 141,69 (C_o, C₃), 170,4 (C_o, C₈).

5.2.3. Redução de 2 com borohidreto de sódio

500,0 mg (2,5 mmol) de 2-oxo-4-fenilbutanoato de etila foram dissolvidos em 30,0 ml de etanol grau HPLC. A solução foi mantida sob agitação magnética e banho de gelo e sal (temperatura de -10) por 30 minutos. Após, foram adicionados lentamente 1 equivalente (94,0 mg) de NaBH₄, e a reação foi mantida sob agitação e banho de gelo e sal por 30 minutos. A reação foi monitorada por GC-FID (Método 2 e B).

Adicionou-se gota a gota uma solução de ácido acético 20% para terminar a reação, ainda em banho de gelo, até cessar o borbulhamento. Depois, a solução foi deixada agitando em temperatura ambiente por 15 minutos, em que foi adicionado um pequeno excesso da solução de ácido acético para garantir que não houvesse mais borbulhamento. Depois deste tempo, foram adicionados 60,0 ml de água destilada, e realizadas 3 extrações com acetato de etila (30,0 ml cada). As fases orgânicas foram combinadas e a solução resultante foi lavada com solução saturada de bicarbonato de sódio (2 x 30,0 ml) e seca com Na₂SO₄ anidro. A solução foi concentrada com auxílio de rotaevaporador.



2-hidróxi-4-fenilbutanoato de etila. **F.M.** C₁₂H₁₆O₃; **MM** 208,25 g mol⁻¹; líquido amarelado; **Rendimento:** 84%. **GC-FID:** t_R = 9,52 min (Rtx®-5 – Método 2); t_R = 28,87 e 29,12 min (Hydrodex – Método B). **EM** (IE, 70 eV) *m/z* (abundância relativa %): 208 (10), 134 (5), 117 (20), 104 (66), 91 (100), 77 (16), 76 (33), 65 (21), 51 (10); **IV (ν_{max}) (cm⁻¹):** 3473, 2963, 1727, 1171, 744, 698. **RMN de ¹H (600 MHz, CDCl₃) δ (ppm):** 1,28 (t, J = 7,15 Hz, 3H, H₁), 1,90-1,99 (m, 1H, H₆), 2,08-2,16 (m, 1H, H₆), 2,70-2,80 (m, 2H, H₇), 2,82-2,85 (d, 1H, H₄), 4,15-4,19 (q, J = 7,15 Hz, 2H, H₂), 4,19-4,24 (m, 1H, H₅), 7,17-7,31 (m, 5H, H₉₋₁₁). **RMN de ¹³C (150 MHz, DETPQ, CDCl₃) δ (ppm):** 14,2 (CH₃, C₁), 31,0 (CH₂, C₆), 36,0 (CH₂, C₇), 61,8 (CH₂, C₂), 69,7 (CH, C₅), 126,0, 128,42, 128,57 (CH₂, C₉₋₁₁) 141,18 (C₀, C₈), 175,22 (C₀, C₃).

5.2.4. Biorredução de 2 catalisada por *Saccharomyce cerevisiae*

A uma solução de 100,0 ml de tampão citrato 0,5 mol/L pH 4 e 2,00 g de glicose, foram adicionados 2,00 gramas de células de *Saccharomyces cerevisiae*. As leveduras foram ativadas durante 30 min em incubadora do tipo shaker a 30 rpm e 30°C. Após esse período, foram adicionados 100,0 mg de 2-oxo-4-fenilbutanoato de etila. A reação foi monitorada por GC-FID. Após todo o material de partida ser consumido, o meio foi centrifugado a 3200 rpm por 15 min. O sobrenadante foi extraído com acetato de etila (3 x 60,0 ml). A fase orgânica foi seca com Na₂SO₄ e o solvente rotaevaporado. Rendimento: >100%.

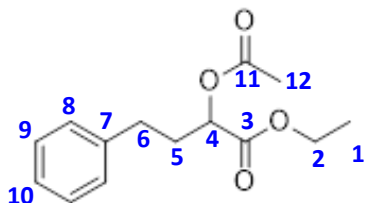
5.2.5. Acilação de 1 catalisada por CuSO₄·5H₂O

Uma mistura de 100,0 mg (0,5 mmol) de 2-hidróxi-4-fenilbutanoato de etila e 350 ul de anidrido acético foram adicionados a 13,0 mg (0,5 mmol) de sulfato de cobre pentahidratado. A reação foi deixada em temperatura ambiente e monitorada por TLC (20% AcOEt/Heptano). Após, foi realizado o *quenching* da solução adicionando uma solução saturada de bicarbonato de sódio. A solução foi extraída com acetato de etila (3 x 15,0 ml). A fase orgânica foi seca com sulfato de sódio anidro e o solvente foi rotaevaporado. O rendimento não foi determinado pois a reação teve baixa conversão.

5.2.6. Acilação de 1 catalisada por I₂

A uma mistura contendo 100,0 mg de 2-hidróxi-4-fenilbutanoato de etila (0,5 mmol) e 12,5 mg de iodo (0,05 mmol) foram adicionados 50 ul (0,525 mmol) de anidrido acético. A mistura foi deixada por 1 h em temperatura ambiente e monitorada por TLC (20% AcOEt/Heptano). O iodo foi então destruído com 5,0 ml de solução saturada de tiosulfato de sódio. A solução foi extraída com acetato de etila (3 x 10,0 ml). A fase orgânica foi lavada com solução saturada de bicarbonato de sódio (2 x 5,0 ml) e salmoura (2 x 5,0

ml). A fase orgânica foi então seca com sulfato de sódio anidro e o solvente foi rotaevaporado.



2-acetóxi-4-fenilbutanoato de etila. **F.M.** C₁₄H₁₈O₄; **MM** 250,29 g mol⁻¹; líquido amarelado; **Rendimento:** 95%. **GC-FID:** t_r 10,37 min (Rtx®-5 – Método 2). **EM** (IE, 70 eV) *m/z* (abundância relativa %): 190 (61), 144 (26), 135 (21), 117 (100), 104 (38), 91 (30). **RMN de ¹H (600 MHz, CDCl₃) δ (ppm):** 1,24 (t, J = 7,15 Hz, 3H, H₁), 2,18 (s, 3H, H₁₂), 2,19 (m, 2H, H₅), 2,76 (m, 2H, H₆), 4,22 (q, J = 7,15 Hz, 2H, H₂), 5,01 (dd, 1H, H₄), 7,26 (m, 5H, H₈₋₁₀). **RMN de ¹³C (150 MHz, DETPQ, CDCl₃) δ (ppm):** 14,1 (CH₃, C₁), 20,7 (CH₃, C₁₂), 31,4 (CH₂, C₅), 32,7 (CH₂, C₆), 61,4 (CH₂, C₂), 71,8 (CH, C₄), 126,3, 128,4, 128,6 (CH, C₈₋₁₀), 140,5 (C₀, C₉), 170,2 (C₀, C₃), 170,5 (C₀, C₇).

5.2.7. Resolução cinética de 1 com lipase em heptano

À 20,0 mg de lipase da *Burkholderia cepacia* foram adicionados 2,0 ml de heptano. À esta suspensão foi adicionada uma solução de 4,0 ml de heptano contendo 208,0 mg (1,0 mmol) de 2-hidróxi-4-fenilbutanoato de etila e 200,0 mg (2,5 mmol) de acetato de vinila. A reação foi mantida a 40°C sob agitação, monitorada e analisada por GC-FID (Método 2B). A reação foi então filtrada para retirar a enzima e o solvente foi rotaevaporado. Rendimento não determinado, pois a reação teve baixa conversão.

5.2.8. Resolução cinética de 1 com lipase em acetato de vinila

À 20,0 mg de lipase da *Burkholderia cepacia* foram adicionados 2,0 ml de acetato de vinila, 37,0 mg de 2-hidróxi-4-fenilbutanoato de etila (0,09 mol/L) e 200 mg de peneiras moleculares. A reação foi mantida a 30°C sob agitação, monitorada e analisada por GC-FID (Método 2B). A reação foi então filtrada para retirar a enzima e o solvente foi rotaevaporado.

5.2.9. Resolução cinética de 1 com lipase em tolueno

À 30,0 mg de lipase da *Burkholderia cepacia* foram adicionados 3,0 ml de tolueno, 104,0 mg (0,5 mmol) de 2-hidróxi-4-fenilbutanoato de etila e 100,0 mg de acetato de vinila. A reação foi mantida a 40°C sob agitação, monitorada e analisada por GC-FID (Método 2B). A reação foi então filtrada para retirar a enzima e o solvente foi rotaevaporado.

5.2.10. Resolução cinética de 1 com lipase em acetato de etila

À 30,0 mg de lipase da *Burkholderia cepacia* foram adicionados 3,0 ml de acetato de etila, 104,0 mg (0,5 mmol) de 2-hidróxi-4-fenilbutanoato de etila e 200 mg de peneiras moleculares. A reação foi mantida a 40°C sob agitação, monitorada e analisada por GC-FID (Método 2B). A reação foi então filtrada para retirar a enzima e o solvente foi rotaevaporado.

5.2.11. Resolução cinética de 1 com excesso de lipase em heptano

À 30,0 mg de lipase da *Burkholderia cepacia* foram adicionados 3,0 ml de heptano, 104,0 mg (0,5 mmol) de 2-hidróxi-4-fenilbutanoato de etila e 100 mg de acetato de vinila. A reação foi mantida a 40°C sob agitação, monitorada e analisada por GC-FID (Método 2B). A reação foi então filtrada para retirar a enzima e o solvente foi rotaevaporado/.

6. REFERÊNCIAS

1. SHELDON, R. A. Fundamentals of green chemistry: efficiency in reaction design. **Chem Soc Rev**, v. 41, n. 4, p. 1437–1451, 2012.
2. ANASTAS, P.; EGHBALI, N. Green Chemistry: Principles and Practice. **Chemical Society Reviews**, v. 39, n. 1, p. 301, 2009.
3. DUNN, P. J. The importance of Green Chemistry in Process Research and Development. **Chemical Society Reviews**, v. 41, n. 4, p. 1452–1461, 2012.
4. ANASTAS, P. T.; WARNER, J. C. *Green Chemistry: Theory and Practice*. (Oxford University Press, 1998).
5. UNITED NATIONS CLIMATE CHANGE CONFERENCE. COP24 KATOWICE 2018. 2018. Disponível em: <<https://cop24.gov.pl/>>.
6. CARBON BRIEF. COP24: Key outcomes agreed at the UN climate talks in Katowice. 2018. Disponível em: <<https://www.carbonbrief.org/cop24-key-outcomes-agreed-at-the-un-climate-talks-in-katowice>>.
7. OMORI, A. T. OS 12 PRINCÍPIOS DA QUÍMICA VERDE. *Práticas Química Verde UFABC* 2017. Disponível em: <<https://sites.google.com/site/praticasquimicaverdeufabc/my-forms>>.
8. ERYTHROPEL, H. C. et al. The Green ChemisTREE: 20 years after taking root with the 12 principles. **Green Chemistry**, v. 20, p. 1929–1961, 2018.
9. CIRIMINNA, R.; PAGLIARO, M. Green Chemistry in the Fine Chemicals and Pharmaceutical Industries. **Organic Process Research & Development**, v. 17, n. 12, p. 1479–1484, 2013.
10. BODLENNER, A. et al. Biocatalytic racemization of α -hydroxycarboxylic acids using a stereo-complementary pair of α -hydroxycarboxylic acid dehydrogenases. **Tetrahedron**, v. 65, n. 36, p. 7752–7755, 2009.
11. FABER, K. *Biotransformations in Organic Chemistry: A Textbook*. 6 ed. New York: Springer, 2011.
12. CORBO, M. R.; BEVILACQUA, A.; GALLO, M.; SPERANZA, B.; SINIGAGLIA, M. Immobilization and microencapsulation of *Lactobacillus plantarum*: Performances and in vivo applications. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 18, p. 196–201, 2013.
13. THORN, S. N.; DANIELS, R. G.; AUDITOR, M. M.; HILVERT, D. Large rate accelerations in antibody catalysis by strategic use of haptenic charge. **Nature**, v. 373, p. 228–230, 1995.
14. ACEVEDO, O. Role of Water in the Multifaceted Catalytic Antibody 4B2 for Allylic Isomerization and Kemp Elimination Reactions. **J. Phys. Chem. B**, v. 113, p. 15372–15381, 2009.
15. ARMACOST, K.; ACEVEDO, O. Exploring the Aldol Reaction using Catalytic Antibodies and ‘On Water’ Organocatalysts from QM/MM Calculations. **Journal of the American Chemical Society**, v. 136, p. 147–156, 2014.
16. ZHENG, Y.-G. et al. Recent advances in biotechnological applications of alcohol dehydrogenases. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 101, n. 3, p. 987–1001, 2017.
17. SHODA, S. I.; UYAMA, H.; KADOKAWA, J. I.; KIMURA, S.; KOBAYASHI, S. Enzymes as green catalysts for precision macromolecular synthesis. **Chemical Reviews**, v.

- 116, n. 4, p. 2307–2413, 2016.
18. SINGH, R.; KUMAR, M.; MITTAL, A.; KUMAR, P. Microbial enzymes: industrial progress in 21st century. **3 Biotech**, v. 6, p. 1–15, 2016.
 19. ROSENTHAL, K.; LÜTZ, S. Recent developments and challenges of biocatalytic processes in the pharmaceutical industry. **Current Opinion in Green and Sustainable Chemistry**, v. 11, p. 58–64, 2018.
 20. BOMMARIUS, A. S.; RIEBEL, B. R. Biocatalysis. Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2004.
 21. SWISS INSTITUTE OF BIOINFORMATICS. ENZYME - The Enzyme Data Bank. *ExPASy* 2018. Disponível em: <<https://enzyme.expasy.org/enzyme-byclass.html>>.
 22. BORNSCHEUER, U. T.; KAZLAUSKAS, R. J. Hydrolases in Organic Synthesis. Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2006.
 23. AOUF, C. et al. The use of lipases as biocatalysts for the epoxidation of fatty acids and phenolic compounds. **Green Chemistry**, v. 16, p. 1740–1754, 2014.
 24. ZHOU, L. et al. Lipase-catalyzed highly diastereoselective direct vinylogous Michael addition reaction of α,α -dicyanoolefins to nitroalkenes. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 109, p. 170–177, 2014.
 25. KLOSSOWSKI, S.; WIRASZKA, B.; BERLOZECKI, S.; OSTASZEWSKI, R. Model Studies on the First Enzyme-Catalyzed Ugi Reaction. **Organic Letters**, v. 15, n. 3, p. 566–569, 2013.
 26. DWIVEDEE, B. P. et al. Promiscuity of Lipase-Catalyzed Reactions for Organic Synthesis: A Recent Update. **ChemistrySelect**, v. 3, p. 2441–2466, 2018.
 27. SCHRAG, J. D. et al. The open conformation of a Pseudomonas lipase. **Structure**, v. 5, p. 187–202, 1997.
 28. EMA, T. Mechanism of Enantioselectivity of Lipases and Other Synthetically Useful Hydrolases. **Current Organic Chemistry**, v. 8, n. 11, p. 1009–1025, 2004.
 29. AHN, Y.; KO, S.; KIM, M.; PARK, J. Racemization catalysts for the dynamic kinetic resolution of alcohols and amines. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 252, p. 647–658, 2008.
 30. WILKINSON, A.; MCNAUGHT, A. D. IUPAC. Compendium of Chemical Terminology, 2nd ed. (the 'Gold Book'). *Blackwell Scientific Publications. Oxford* 1997. Disponível em: <<http://goldbook.iupac.org/html/P/P04859.html>>.
 31. NI, H.; GUAN, Y.; YAO, S. A combined process of biocatalysis and cell activity regeneration for the asymmetric reduction of 3-oxo ester with immobilized baker's yeast. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, v. 84, p. 186–191, 2009.
 32. PANIĆ, M.; DELAČ, D.; ROJE, M.; REDOVNIKOVIĆ, I. R.; BUBALO, M. C. Green asymmetric reduction of acetophenone derivatives: *Saccharomyces cerevisiae* and aqueous natural deep eutectic solvent. **Biotechnology Letters**, v. 41, n. 2, p. 253–262, 2019.
 33. GOSWAMI, A.; STEWART, J. D. Organic Synthesis Using Biocatalysis. Amsterdã: Elsevier, 2016.
 34. MU, J. G. X.; XU, Y. Integration of newly isolated biocatalyst and resin-based in situ product removal technique for the asymmetric synthesis of (R)-methyl mandelate. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 33, n. 7, p. 797–804, 2010.
 35. BLASER, H.; JALET, H.; SPINDLER, F. Enantioselective hydrogenation of α -

- ketoesters: comparison of homogeneous and heterogeneous catalysts. **Journal of Molecular Catalysis A: Chemical**, v. 107, p. 85–94, 1996.
36. NATESH, R.; SCHWAGER, S. L. U.; STURROCK, E. D.; ACHARYA, K. R. Crystal structure of the human enzyme – lisinopril complex. **Nature**, v. 421, p. 551–554, 2003.
 37. WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Cardiovascular disease. 2016. Disponível em: <https://www.who.int/cardiovascular_diseases/en/>.
 38. WANG, L. et al. Biocatalytic synthesis of ethyl (R)-2-hydroxy-4-phenylbutyrate with a newly isolated *Rhodotorula mucilaginosa* CCZU-G5 in an aqueous/organic biphasic system. **Bioresources and Bioprocessing**, v. 2, n. 6, p. 1–8, 2015.
 39. ZHANG, W. et al. Biocatalytic synthesis of ethyl (R)-2-hydroxy-4-phenylbutyrate with *Candida krusei* SW2026: A practical process for high enantiopurity and product titer. **Process Biochemistry**, v. 44, p. 1270–1275, 2009.
 40. QIAN, X. L. et al. Efficient production of ethyl (R)-2-hydroxy-4-phenylbutyrate using a cost-effective reductase expressed in *Pichia pastoris*. **Biochemical Engineering Journal**, v. 91, p. 72–77, 2014.
 41. NI, Y.; SU, Y.; LI, H.; ZHOU, J.; SUN, Z. Scalable biocatalytic synthesis of optically pure ethyl (R)-2-hydroxy-4-phenylbutyrate using a recombinant *E. coli* with high catalyst yield. **Journal of Biotechnology**, v. 168, p. 493–498, 2013.
 42. GONG, X.; ZHENG, G.; LIU, Y.; XU, J. Identification of a Robust Carbonyl Reductase for Diastereoselectively Building syn-3,5-Dihydroxy Hexanoate: a Bulky Side Chain of Atorvastatin. **Organic Process Research & Development**, v. 21, n. 9, p. 1349–1354, 2017.
 43. WU, X. et al. Enantioselective synthesis of ethyl (S)-2-hydroxy-4-phenylbutyrate by recombinant diketoreductase. **Tetrahedron: Asymmetry**, v. 20, n. 21, p. 2504–2509, 2009.
 44. XUE, X.; WANG, Y.; HAN, F. A thermoregulated phase-separable chiral Pt nanocatalyst for recyclable asymmetric hydrogenation of α -ketoesters. **Chem. Commun.**, v. 55, p. 3346–3349, 2017.
 45. LI, X.; WANG, H.; PAN, H.; WANG, Y. M.; WU, P. Pt nanoparticles entrapped in Al₂O₃@SBA-15 composites: Effective and recyclable catalysts for enantioselective hydrogenation of ethyl 2-oxo-4-phenylbutyrate. **Applied Catalysis A: General**, v. 488, p. 48–57, 2014.
 46. ZHANG, X.; LI, Q.; XIAO, M.; LIU, Y. Effective one-step reduction of Pt/alumina–carbon catalysts for asymmetric hydrogenation of α -ketoesters. **Applied Catalysis A: General**, v. 480, p. 50–57, 2014.
 47. MENG, Q.; ZHU, L.; ZHANG, Z. Highly Enantioselective Sequential Hydrogenation of Ethyl 2-Oxo-4-arylbut-3-enoate to Ethyl 2-Hydroxy-4-arylbutyrate. **Journal of Organic Chemistry**, v. 73, n. 6, p. 7209–7212, 2008.
 48. YANG, H.; FEN, Q.; WANG, H.; LU, J. Copper encapsulated alkaloids composite: An effective heterogeneous catalyst for electrocatalytic asymmetric hydrogenation. **Electrochemistry Communications**, v. 71, p. 38–42, 2016.
 49. D'ARRIGO, P.; PEDROCCHI-FANTONI, G.; SERVI, S. Chemo-enzymatic synthesis of ethyl (R)-2-hydroxy-4-phenylbutyrate. **Tetrahedron Asymmetry**, v. 21, n. 8, p. 914–918, 2010.
 50. VELASCO-LOZANO, S.; LÓPEZ-GALLEGO, F.; ROCHA-MMRTIN, J.; MANUEL, J.;

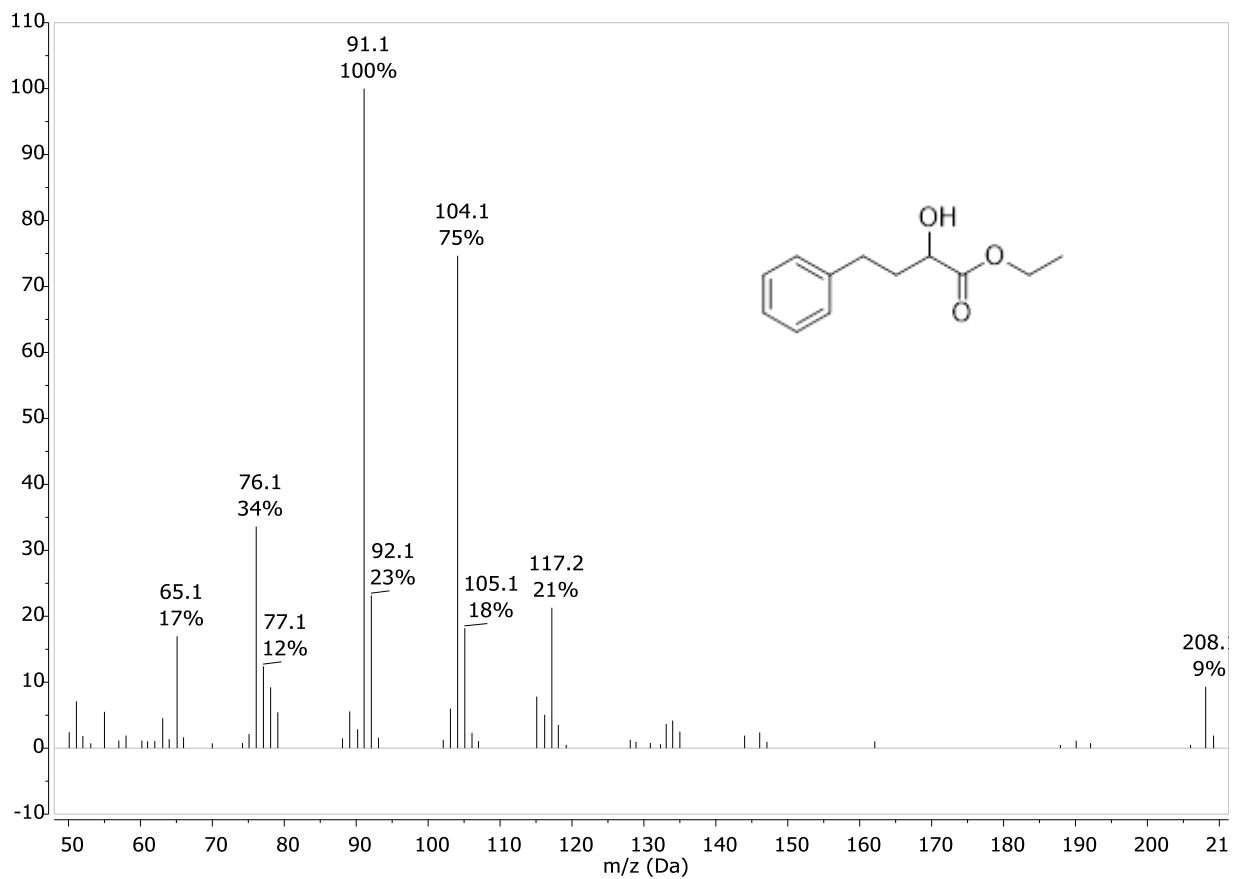
- FAVELA-TORRES, E. Improving enantioselectivity of lipase from *Candida rugosa* by carrier-bound and carrier-free immobilization. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 130, p. 32–39, 2016.
51. CHEN, B.; YIN, H.-F.; WANG, Z.-S.; LIU, J.-Y.; XU, J.-H. A new chemo-enzymatic route to chiral 2-hydroxy-4-phenylbutyrates by combining lactonase-mediated resolution with hydrogenation over Pd/C. **Chem. Commun.**, v. 46, p. 2754–2756, 2010.
 52. PEREZ, D. et al. A Novel Halophilic Lipase, LipBL, Showing High Efficiency in the Production of Eicosapentaenoic Acid (EPA). **PLoS ONE**, v. 6, n. 8, p. 1–11, 2011.
 53. WANG, P.-Y.; TSAI, S.-W.; CHEN, T.-L. Improvement of enantioselectivity and stability of *Klebsiella oxytoca* hydrolase immobilized on Eupergit C 250L. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, v. 83, n. May, p. 1518–1525, 2008.
 54. SUGAI, T.; OHTA, H. A Simple Preparation of (R)-2-Hydroxy-4-phenyl-butanoic Acid. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 55, n. 1, p. 293–294, 1991.
 55. CHADHA, A.; MANOHAR, M. Enzymatic Resolution of 2-Hydroxy-4-Phenylbutanoic Acid and 2-Hydroxy-4-Phenylbutenoic Acid. **Tetrahedron: Asymmetry**, v. 6, n. 3, p. 651–652, 1995.
 56. MA, B. DI et al. A thermostable and organic-solvent tolerant esterase from *Pseudomonas putida* ECU1011: Catalytic properties and performance in kinetic resolution of α -hydroxy acids. **Bioresource Technology**, v. 133, p. 354–360, 2013.
 57. WANG, H.; YAN, L.; WU, Y.; CHEN, F. Chloramphenicol base chemistry. Part 10: Asymmetric synthesis of α -hydroxy chiral alcohols via intramolecular Michael additions of γ -hydroxy- α,β -unsaturated enones with chloramphenicol base derived bifunctional urea organocatalysts. **Tetrahedron**, v. 73, n. 19, p. 2793–2800, 2017.
 58. SPINDLER, F.; PITTELKOW, U.; BLASER, H.-U. A Highly Enantioselective Rhodium Catalyst for the Hydrogenation of Aliphatic α -Keto Esters. **Chirality**, v. 3, p. 370–375, 1991.
 59. YANAGISAWA, H. et al. Angiotensin-Converting Enzyme Inhibitors: Perhydro-1,4-thiazepin-5-one Derivatives. **J. Med. Chem.**, v. 30, p. 1984–1991, 1987.
 60. IWASAKI, G.; KIMURA, R.; NUMAO, N.; KONDO, K. A Practical and Diastereoselective Synthesis of Angiotensin Converting Enzyme Inhibitors. **Chem. Pharm. Bull.**, v. 37, n. 2, p. 280–283, 1989.
 61. SHENG, B. et al. Efficient Production of (R)-2-Hydroxy-4-Phenylbutyric Acid by Using a Coupled Reconstructed D-Lactate Dehydrogenase and Formate Dehydrogenase System. **PLoS ONE**, v. 9, n. 8, p. e104204, 2014.
 62. ZHU, L. et al. Highly enantioselective hydrogenation of 2-oxo-4-arylbutanoic acids to 2-hydroxy-4-arylbutanoic acids. **Tetrahedron**, v. 67, n. 34, p. 6186–6190, 2011.
 63. ZHU, L.; MENG, Q.; FAN, W.; XIE, X.; ZHANG, Z. Direct Asymmetric Hydrogenation of 2-Oxo-4-arylbut-3-enoic Acids. **Journal of Organic Chemistry**, v. 75, p. 6027–6030, 2010.
 64. NIBBERING, N. M. M.; DE BOER, T. J. Mass spectrometry of aralkyl compounds with a functional group—VI: Mass spectra of 1-phenylethanol-1, 2-phenylethanol-1 and 1-phenylpropanol-2. **Organic Mass Spectrometry**, v. 1, n. 3, p. 365–390, 1968.
 65. DIESKAU, A. P.; BEGOUIN, J.; PLIETKER, B. $\text{Bu}_4\text{N}[\text{Fe}(\text{CO})_3(\text{NO})]$ -Catalyzed Hydrosilylation of Aldehydes and Ketones. **European Journal of Organic**

- Chemistry**, v. 2011, n. 27, p. 5291–5296, 2011.
66. POTERAŁA, M.; DRANKA, M.; BOROWIECKI, P. Chemoenzymatic Preparation of Enantiomerically Enriched (R)-(-)-Mandelic Acid Derivatives: Application in the Synthesis of the Active Agent Pemoline. **European Journal of Organic Chemistry**, v. 2017, n. 16, p. 2290–2304, 2017.
 67. ABDULLA, R.; RAVINDRA, P. Characterization of cross linked Burkholderia cepacia lipase in alginate and k -carrageenan hybrid matrix. **Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers**, v. 44, p. 545–551, 2013.
 68. KIM, J.; DE CASTRO, K. A.; LIM, M.; RHEE, H. Reduction of aromatic and aliphatic keto esters using sodium borohydride/MeOH at room temperature: a thorough investigation. **Tetrahedron**, v. 66, n. 23, p. 3995–4001, 2010.
 69. OU, Z. M.; LI, R. W. Kinetic Resolution of Ethyl-2-hydroxy-4-phenylbutyrate with Lipase AK as Catalyst. **Advanced Materials Research**, v. 560–561, p. 333–337, 2012.
 70. HUANG, S. H.; TSAI, S. W. Kinetic resolution of (R,S)-ethyl 2-hydroxyl-4-phenylbutyrate via lipase-catalyzed hydrolysis and transesterification in isooctane. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 28, n. 2–3, p. 65–69, 2004.
 71. RAN, N.; ZHAO, L.; CHEN, Z.; TAO, J. Recent applications of biocatalysis in developing green chemistry for chemical synthesis at the industrial scale. **Green Chemistry**, v. 10, n. 4, p. 361, 2008.
 72. LACERDA, P. S. B. DE et al. Microbial enantioselective reduction of ethyl-2-oxo-4-phenyl-butanoate. **Biochemical Engineering Journal**, v. 28, p. 299–302, 2006.
 73. SHI, Y.; FANG, Y. U. N.; WU, H.; LI, F.; ZUO, X. Improved production of ethyl-(R)-2-hydroxy-4-phenylbutyrate with pretreated *Saccharomyces cerevisiae* in water/organic solvent two-liquid phase systems. **Biocatalysis and Biotransformation**, v. 27, n. 3, p. 211–218, 2009.
 74. CHEN, G.; MA, S. Studies on electrophilic addition reaction of 2,3-allenoates with PhSeCl. **Tetrahedron**, v. 62, p. 4444–4452, 2006.
 75. SDBS. Spectral Database for Organic Compounds. 1999. Disponível em: <https://sdbs.db.aist.go.jp/sdbs/cgi-bin/direct_frame_top.cgi>.
 76. SHI, Y.; FANG, Y.; REN, Y.; GUAN, H. Applying alpha-phenacyl chloride to the enantioselective reduction of ethyl 2-oxo-4-phenylbutyrate with baker's yeast. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, v. 84, p. 681–688, 2009.
 77. HERAVI, M. M.; BEHBAHANI, F. K.; ZADSIRJAN, V.; OSKOOIE, H. A. Copper(II) Sulfate Pentahydrate (CuSO₄.5H₂O). A Green Catalyst for Solventless Acetylation of Alcohols and Phenols with Acetic Anhydride. **Journal of Brazilian Chemical Society**, v. 17, n. 5, p. 1045–1047, 2006.
 78. PHUKAN, P. Iodine as an extremely powerful catalyst for the acetylation of alcohols under solvent-free conditions. **Tetrahedron Letters**, v. 45, p. 4785–4787, 2004.
 79. BOSCO, J. W. J.; AGRAHARI, A.; SAIKIA, A. K. Molecular iodine catalyzed selective acetylation of alcohols with vinyl acetate. **Tetrahedron Letters**, v. 47, p. 4065–4068, 2006.
 80. CHEN, P.; YANG, W. Kinetic resolution of mandelate esters via stereoselective acylation catalyzed by lipase PS-30. **Tetrahedron Letters**, v. 55, p. 2290–2294, 2014.

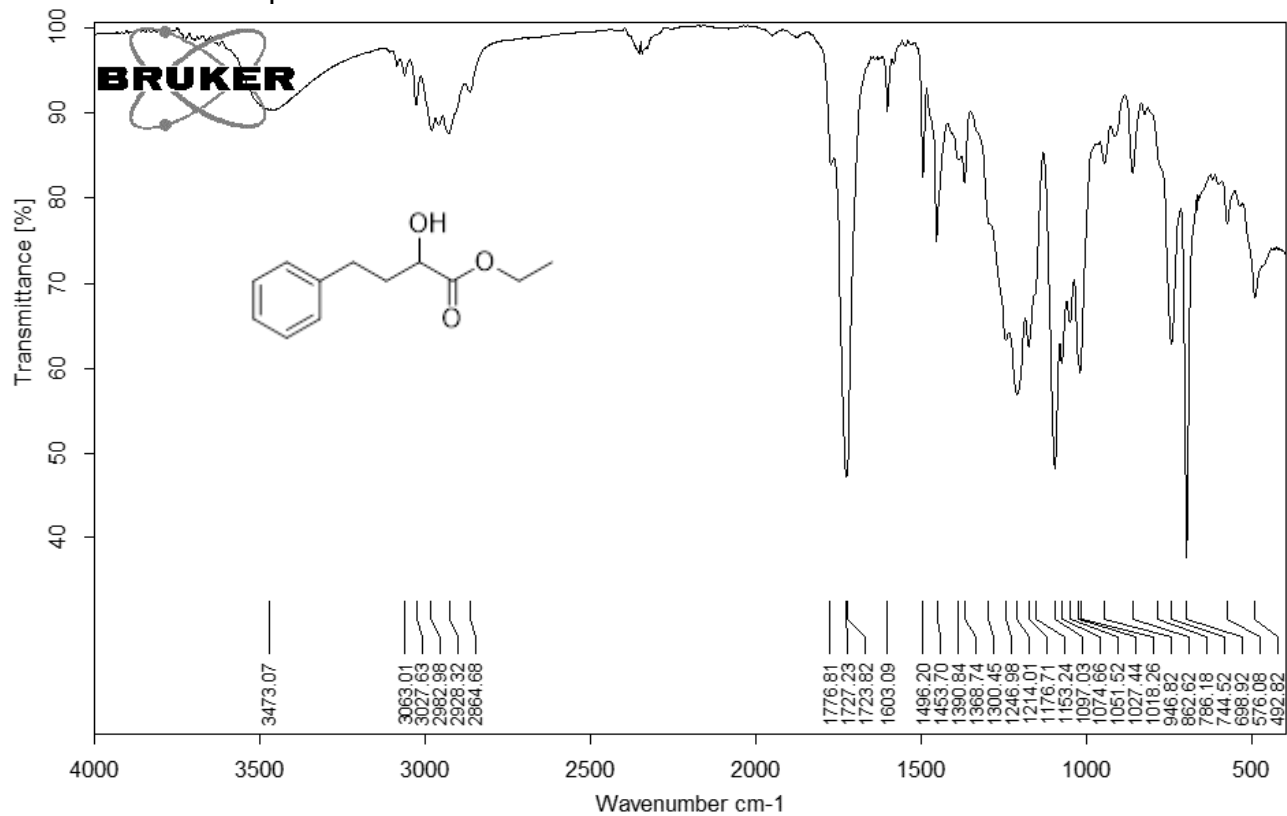
7. APÊNDICES

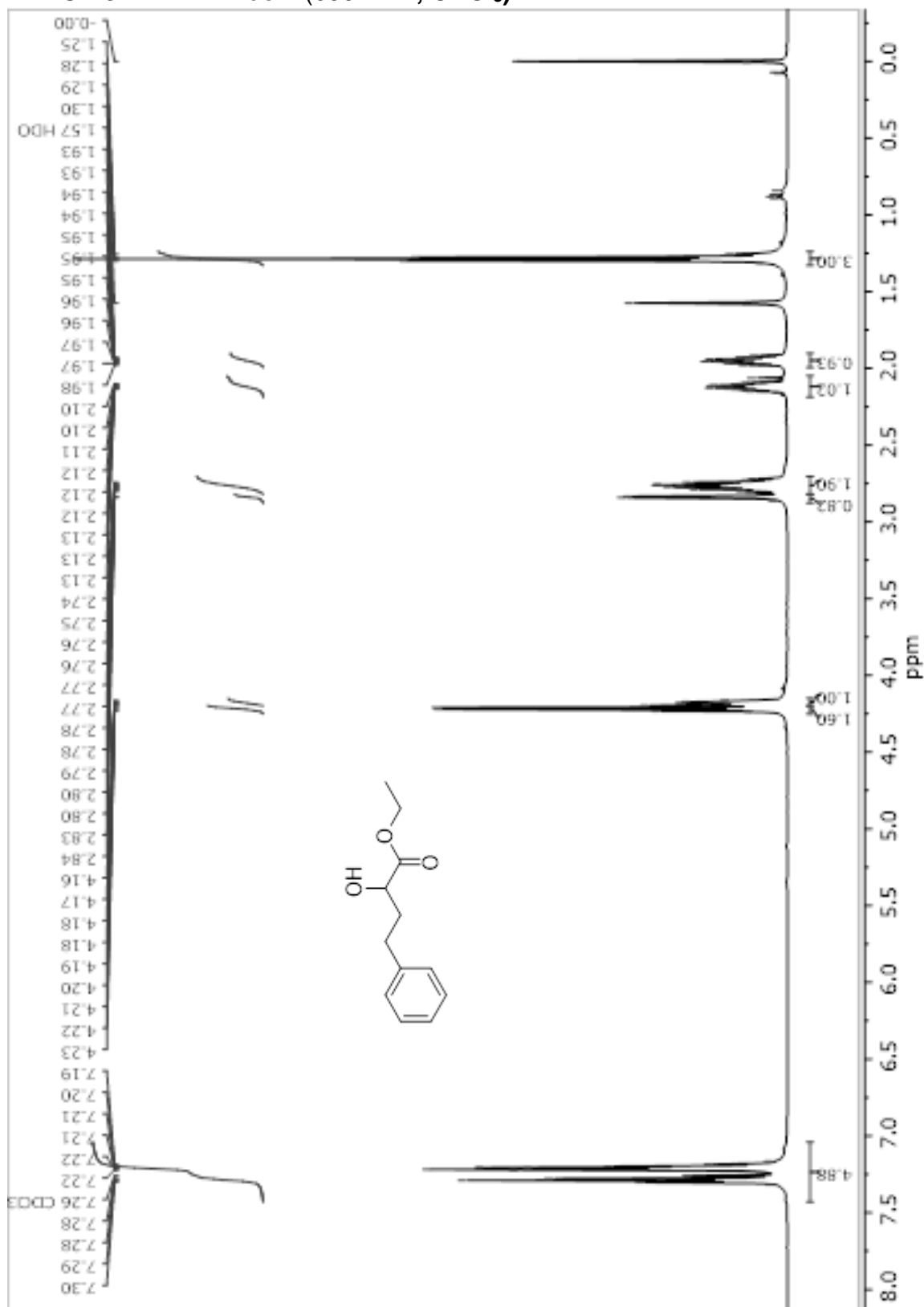
7.1. Espectros do 2-hidroxi-4-fenilbutanoato de etila (composto 1)

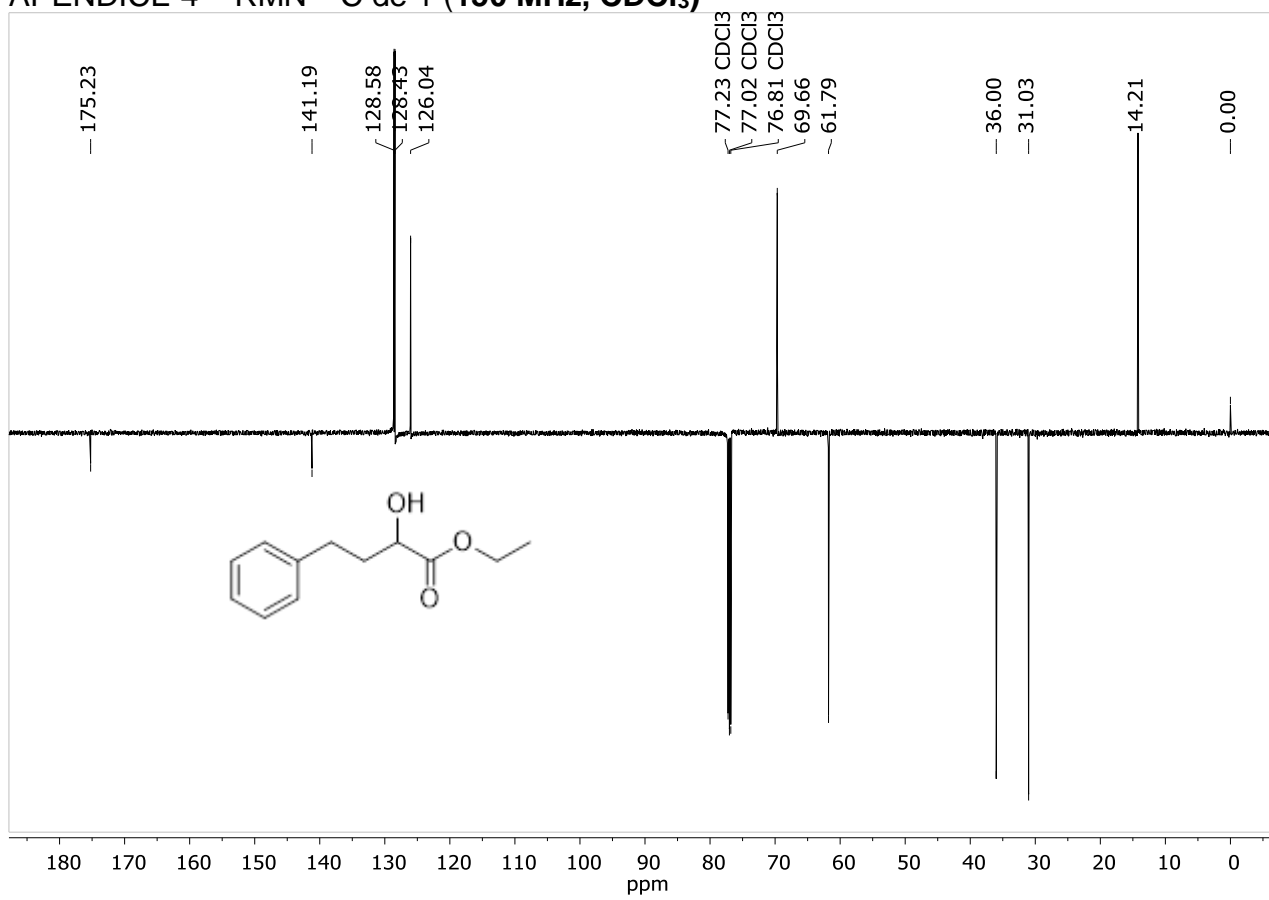
APÊNDICE 1 – Espectro de massas de 1



APÊNDICE 2 – Espectro de IV de 1

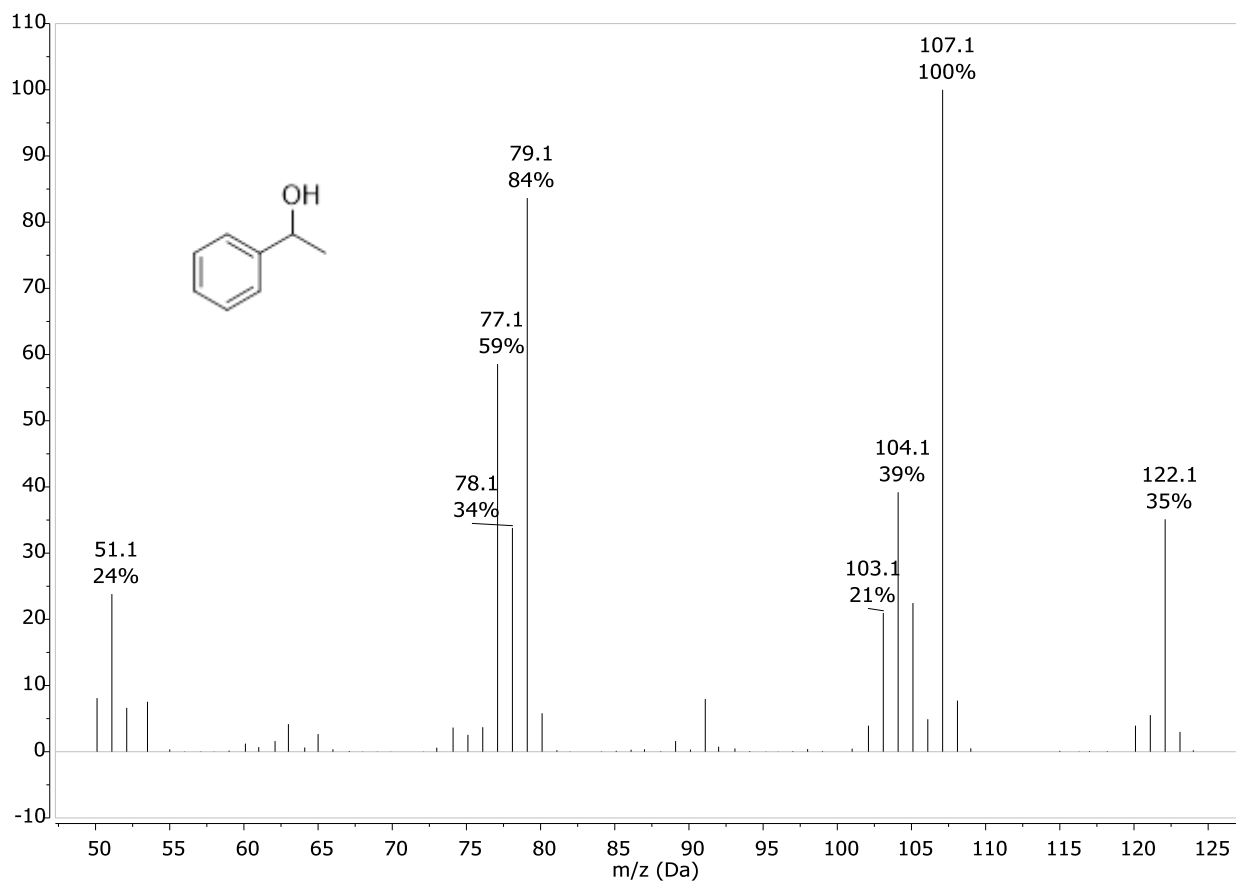


APÊNDICE 3 – RMN ^1H de 1 (600 MHz, CDCl_3)

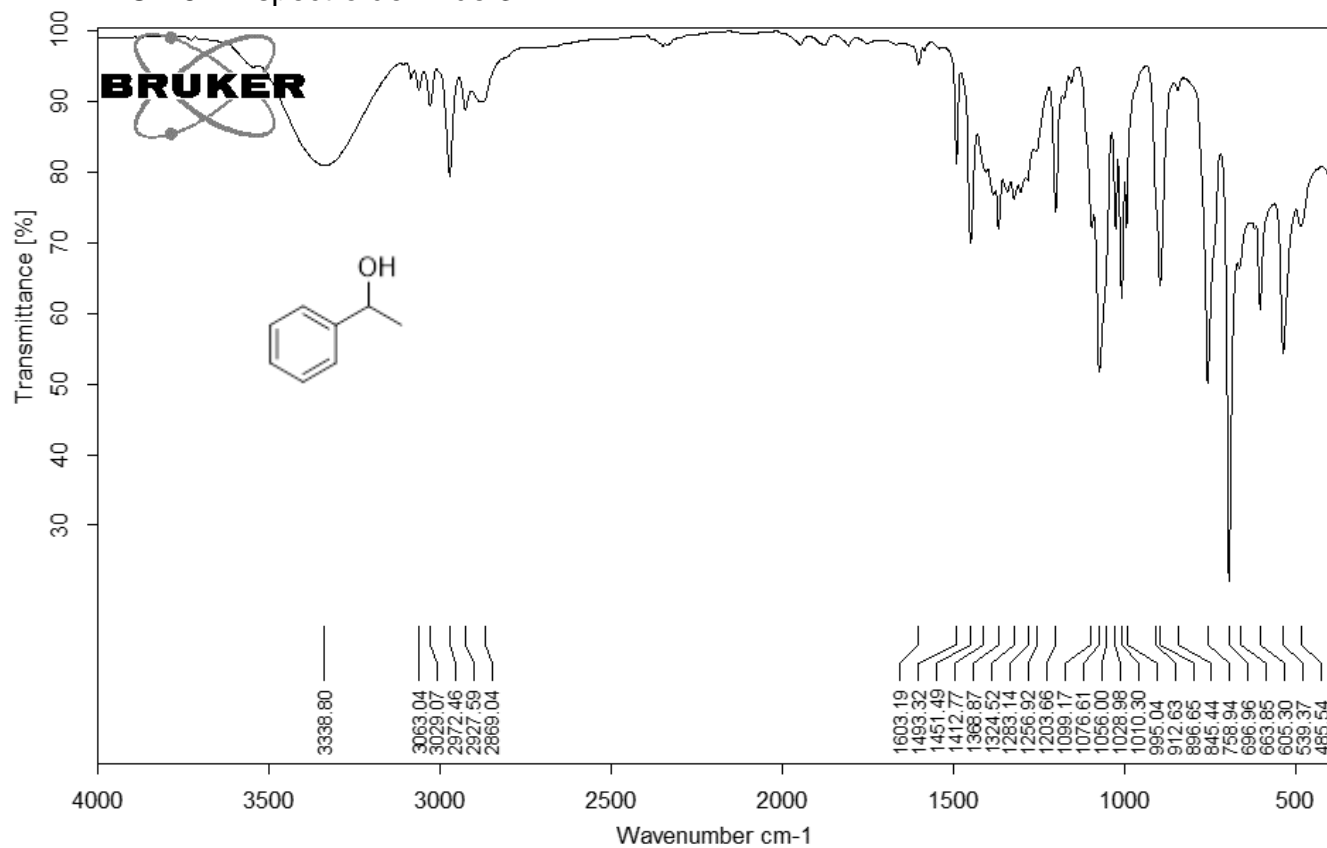
APÊNDICE 4 – RMN ^{13}C de 1 (150 MHz, CDCl_3)

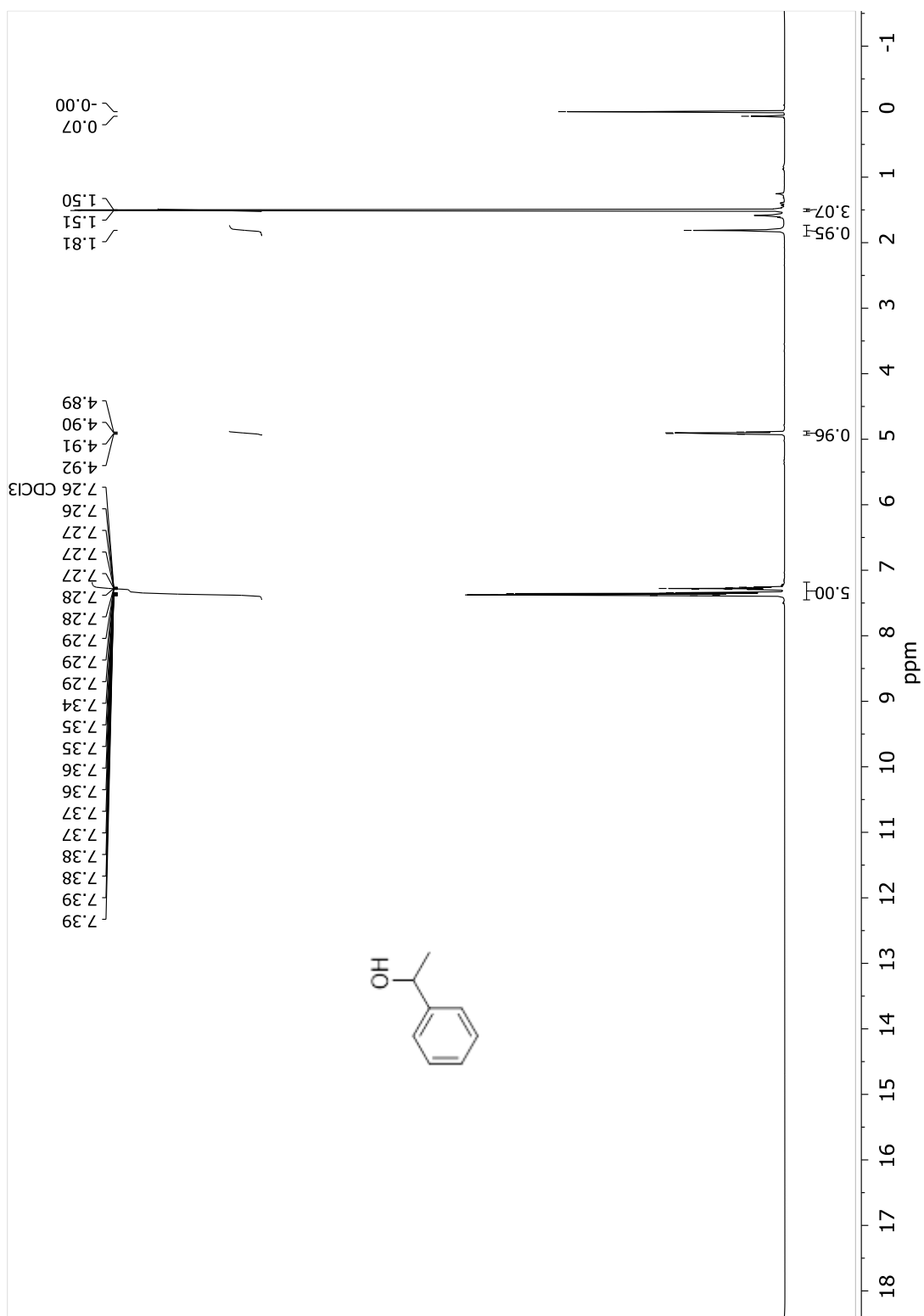
7.2. Espectros do 1-feniletanol (composto 3)

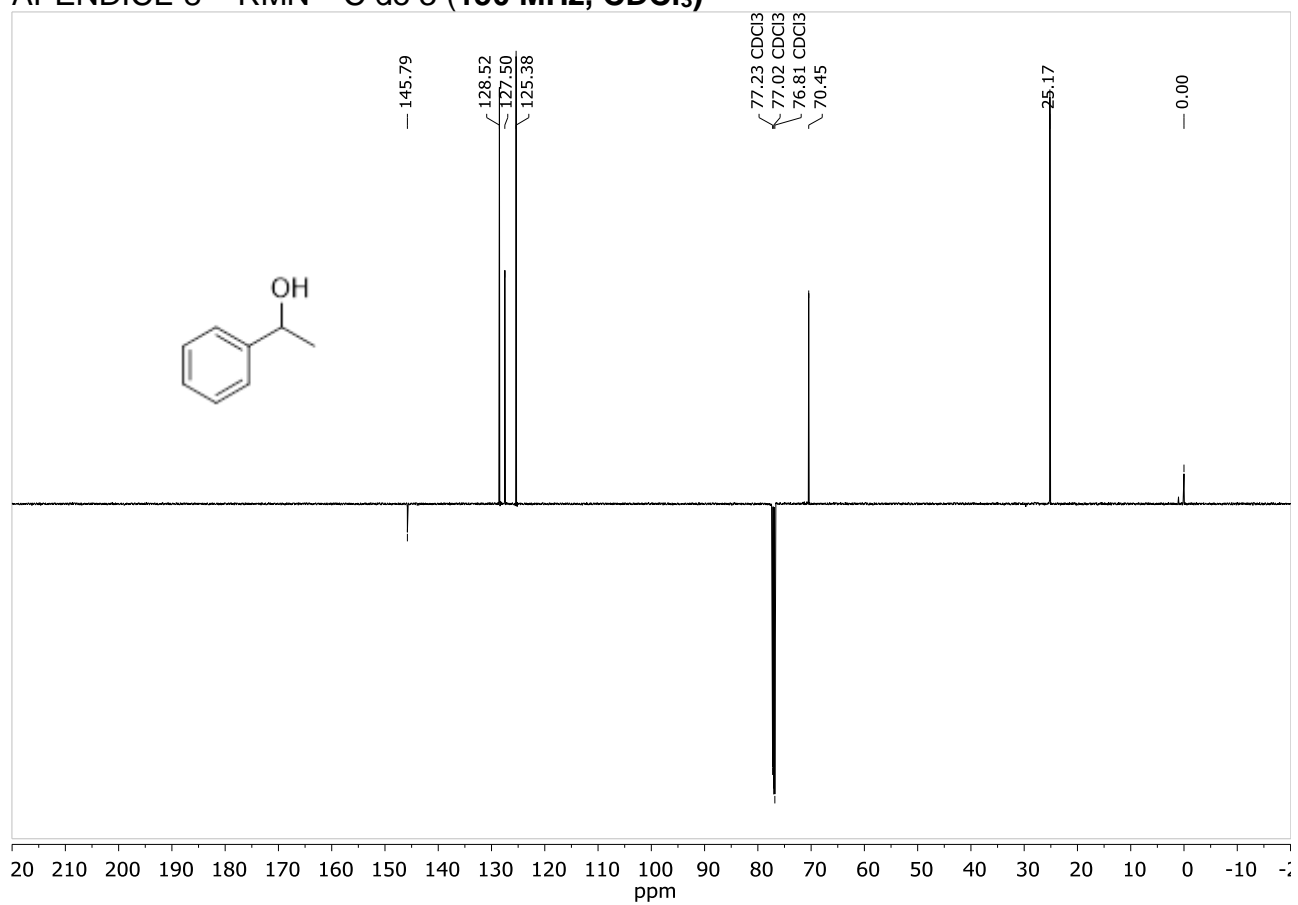
APÊNDICE 5 – Espectro de massas de 3



APÊNDICE 6 – Espectro de IV de 3

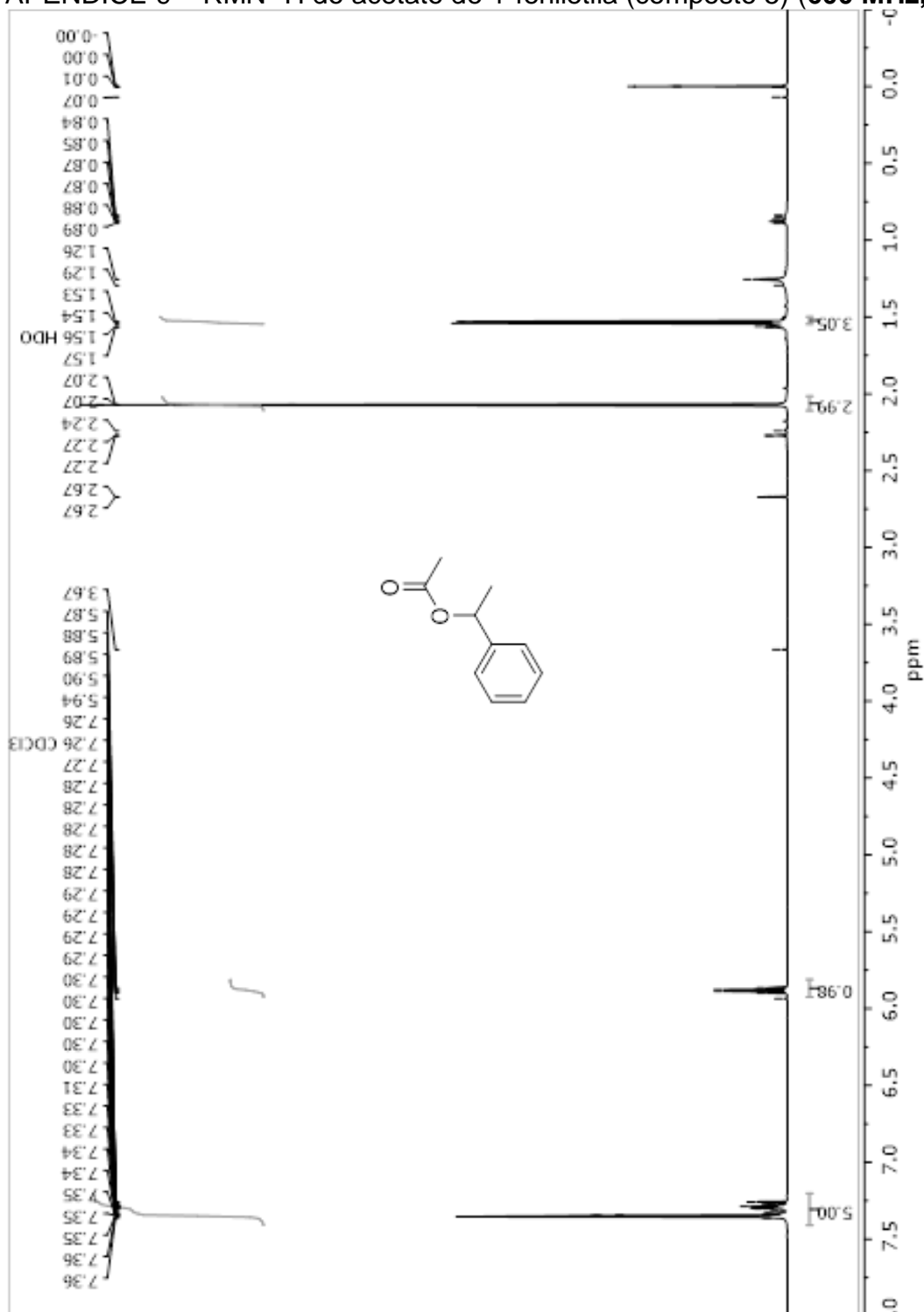


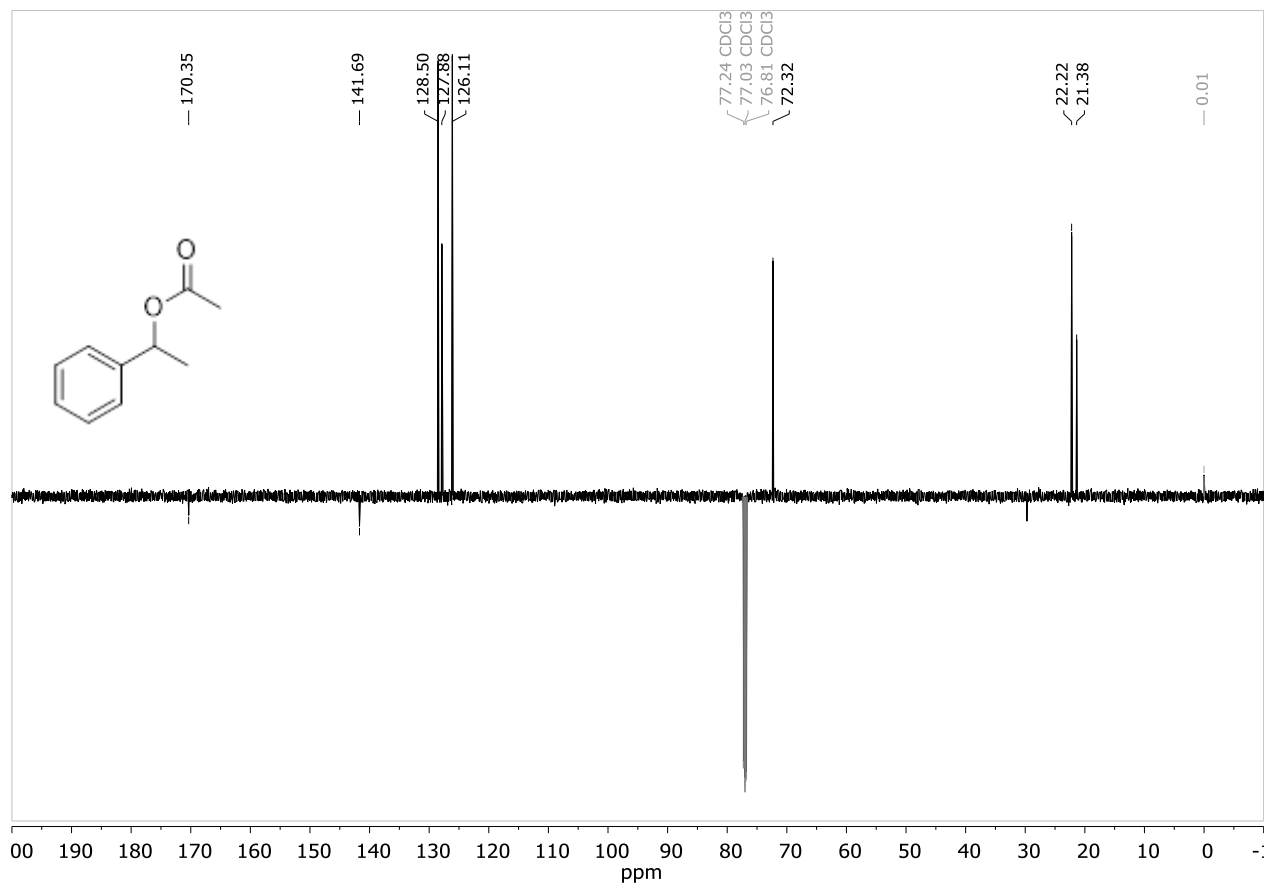
APÊNDICE 7 – RMN ^1H de 3 (600 MHz, CDCl_3)

APÊNDICE 8 – RMN ^{13}C de 3 (150 MHz, CDCl_3)

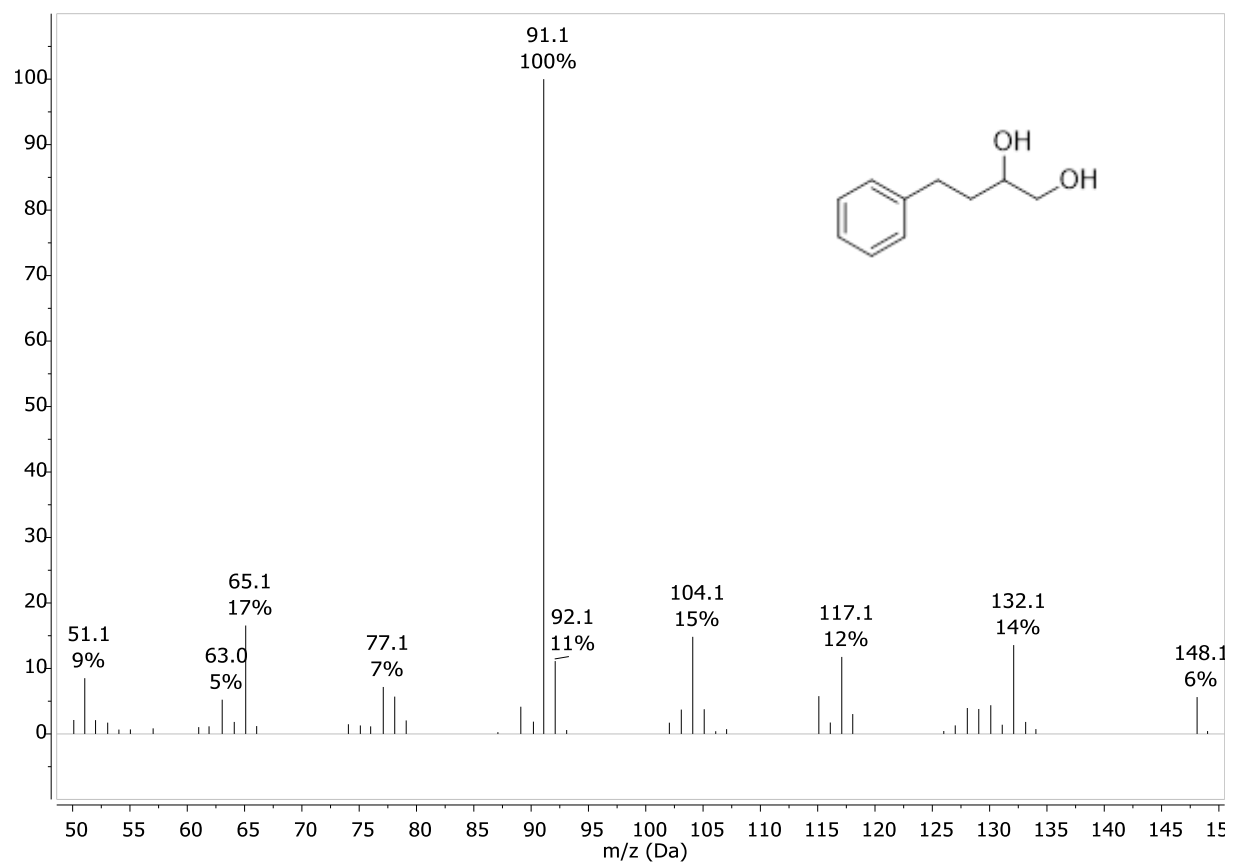
7.3. Espectros de outros compostos

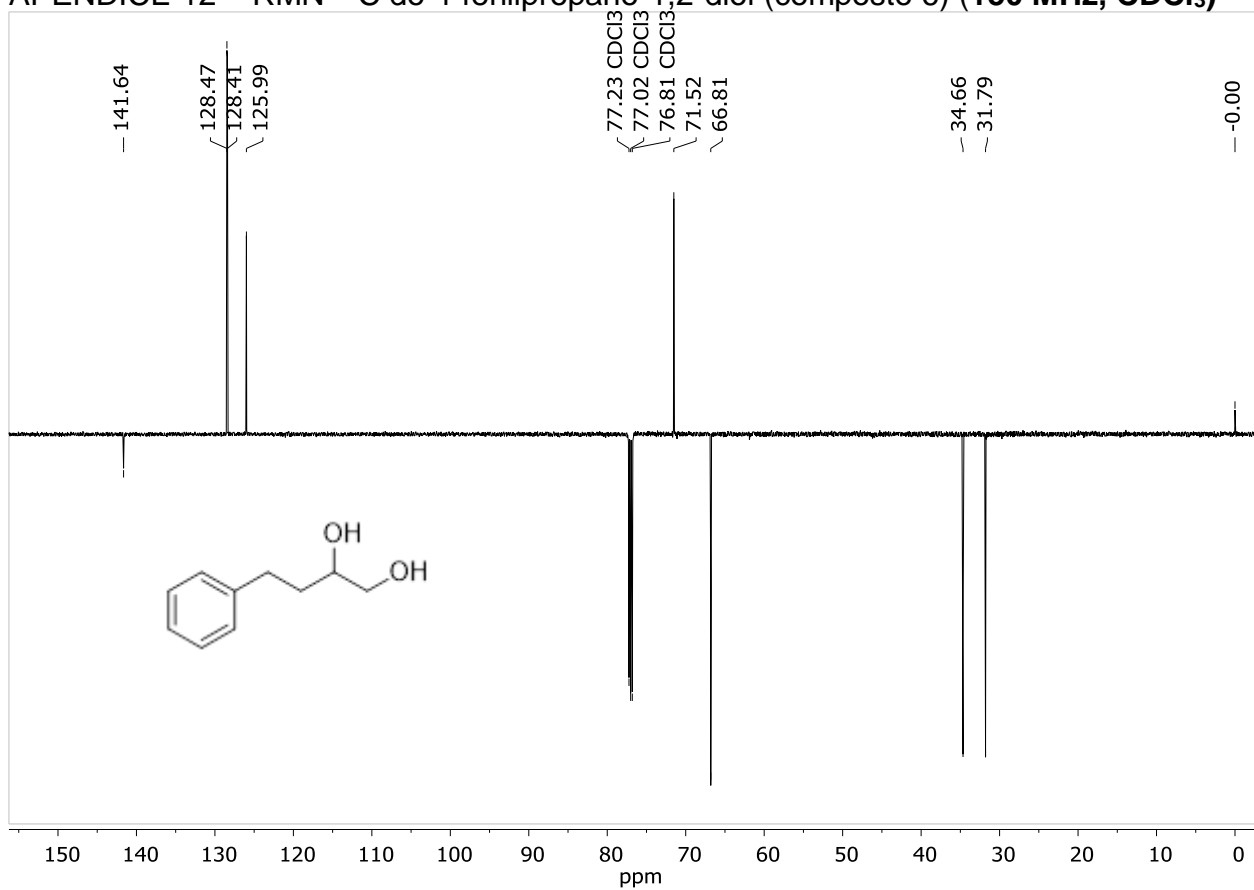
APÊNDICE 9 – RMN ^1H do acetato de 1-feniletila (composto 5) (600 MHz, CDCl_3)



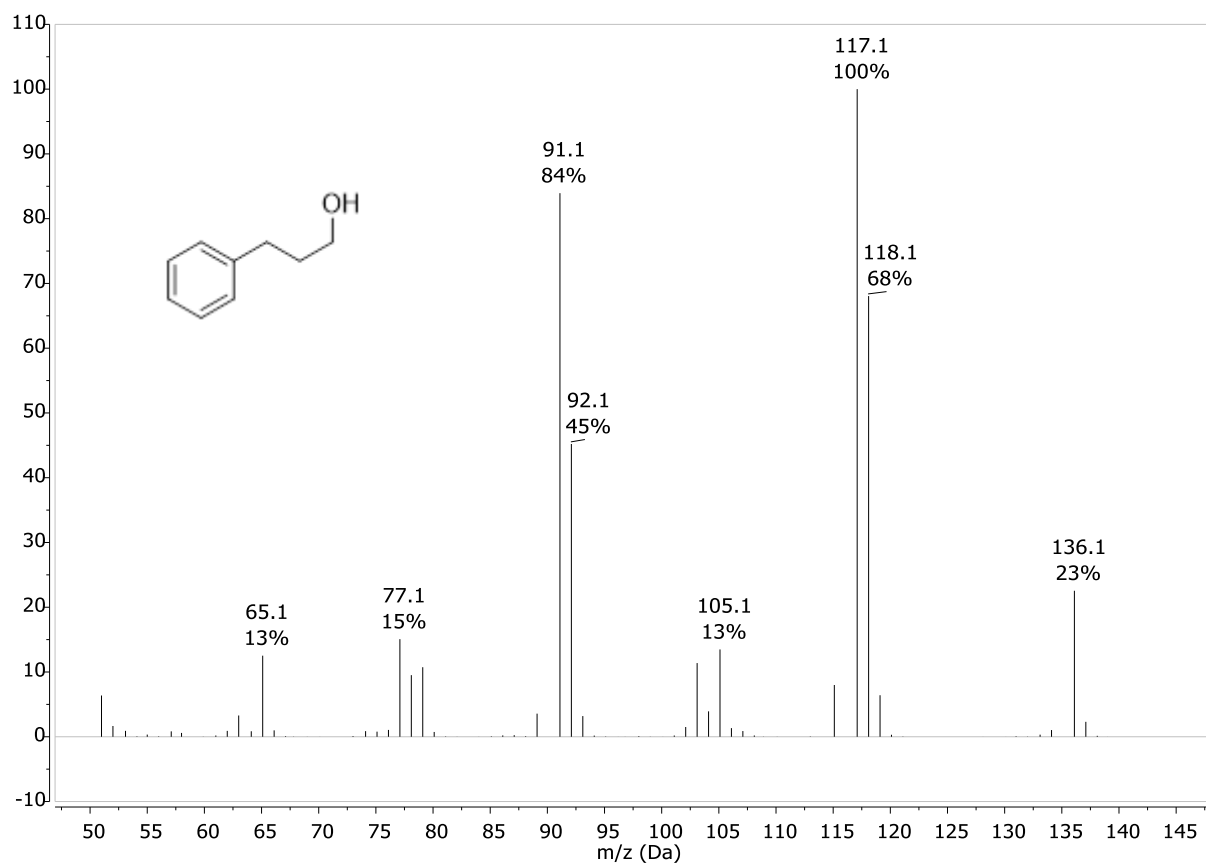
APÊNDICE 10 – RMN ^{13}C do acetato de 1-feniletila (composto 5) (150 MHz, CDCl_3)

APÊNDICE 11 – Espectro de massas do 4-fenilpropano-1,2-diol (composto 6)

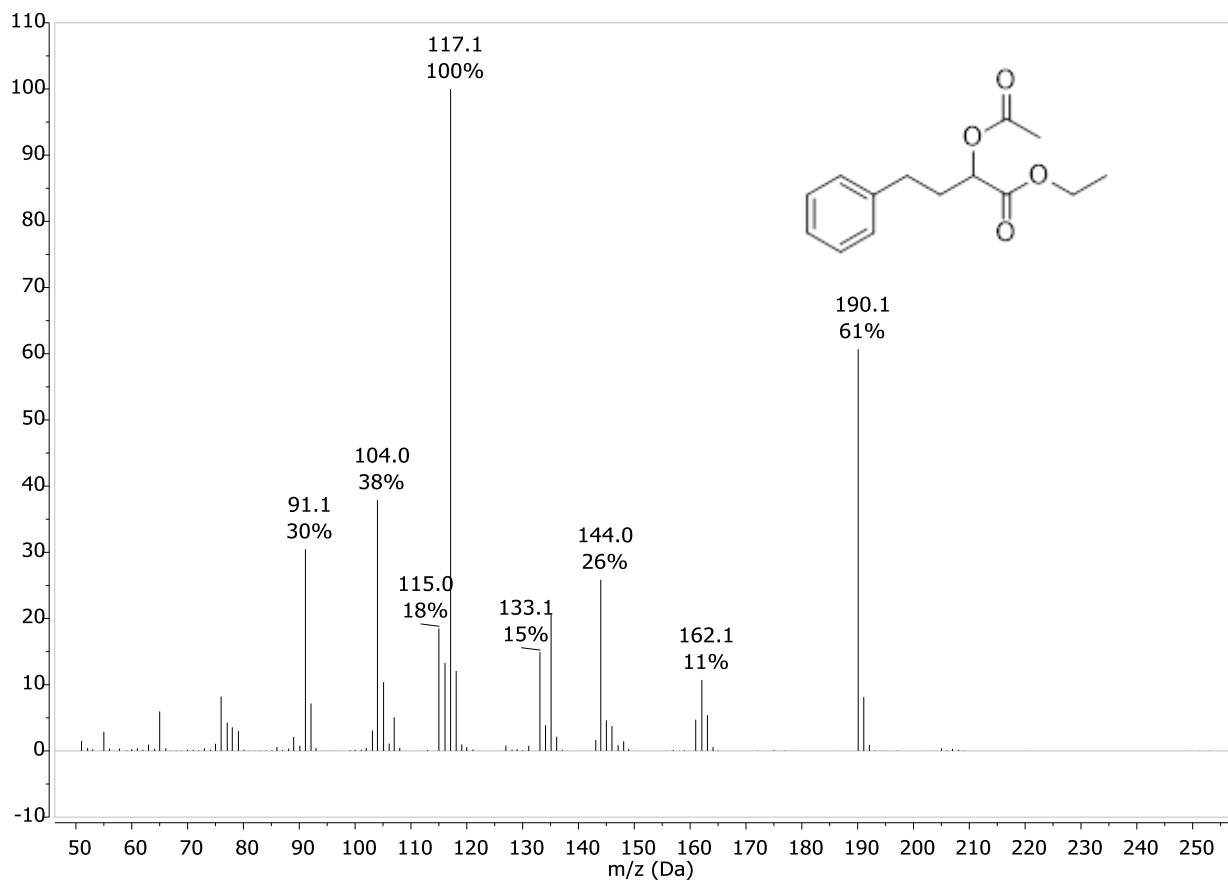


APÊNDICE 12 – RMN ^{13}C do 4-fenilpropano-1,2-diol (composto 6) (150 MHz, CDCl_3)

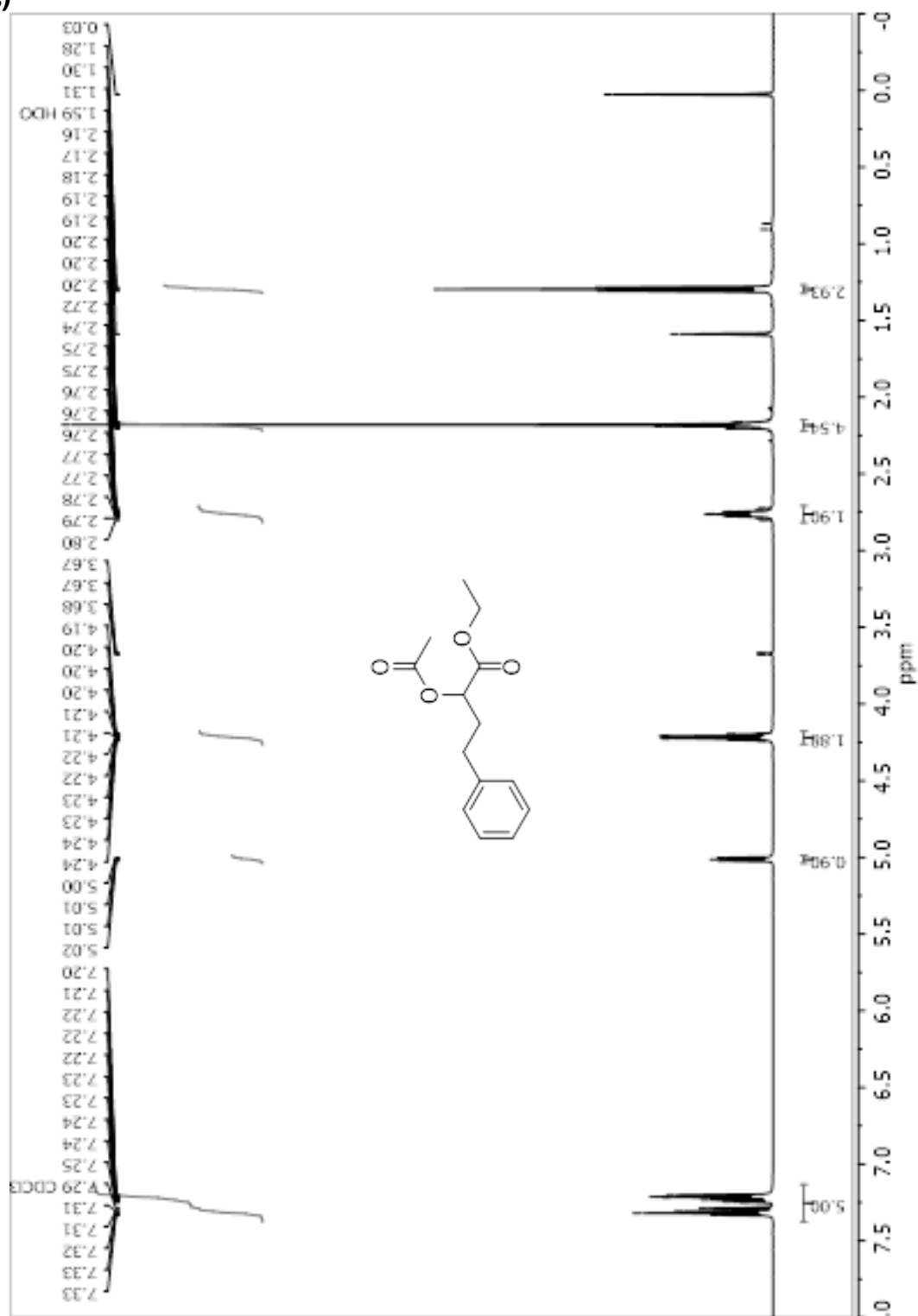
APÊNDICE 13 – Espectro de massas de 3-fenilpropanol (composto 7)



APÊNDICE 14 – Espectro de massas do 2-acetóxi-4-fenilbutanoato de etila (composto 8)



APÊNDICE 15 – RMN ^1H de 2-acetóxi-4-fenilbutanoato de etila (composto 8) (600 MHz, CDCl_3)



APÊNDICE 16 – RMN ^{13}C de 2-acetóxi-4-fenilbutanoato de etila (composto 8) (150 MHz, CDCl_3)

