

LUNA SCHLITTLER DOS SANTOS

Sínteses quimioenzimáticas de moléculas bioativas: uma abordagem à química verde

Tese apresentada ao Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutora em Química.

Orientadora: Profa. Dra. Cíntia Duarte de Freitas Milagre
Coorientador: Prof. Dr. Humberto Márcio Milagre

Araraquara
2017

FICHA CATALOGRÁFICA

S237s Santos, Luna Schlittler dos
Sínteses quimioenzimáticas de moléculas bioativas : uma
abordagem à química verde / Luna Schlittler dos Santos. –
Araraquara : [s.n.], 2017
203 f. : il.

Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto
de Química
Orientador: Cintia Duarte de Freitas Milagre
Coorientador: Humberto Márcio Milagre

1. Biocatálise. 2. Síntese assimétrica. 3. *Saccharomyces
cerevisiae*. 4. Compostos heterocíclicos. 5. Química verde.
I. Título.

LUNA SCHLITTLER DOS SANTOS

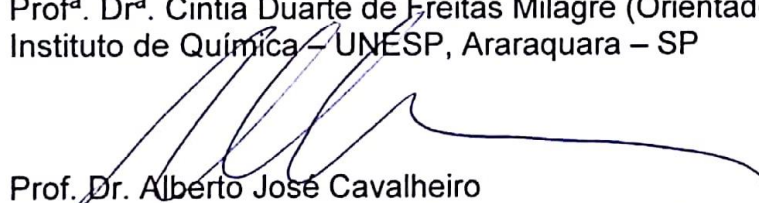
Tese apresentada ao Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutora em Química.

Araraquara, 04 de setembro de 2017.

BANCA EXAMINADORA



Prof^{fa}. Dr^a. Cintia Duarte de Freitas Milagre (Orientador)
Instituto de Química – UNESP, Araraquara – SP



Prof. Dr. Alberto José Cavaleiro

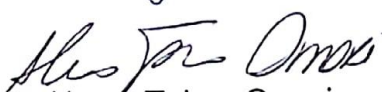
Instituto de Química – UNESP, Araraquara – SP



Prof. Dr. Ivan Castro Gamboa
Instituto de Química – UNESP, Araraquara – SP



Prof. Dr. José Augusto Rosario Rodrigues
Instituto de Química – UNICAMP, Campinas – SP



Prof. Dr. Alvaro Takeo Omori
Centro de Ciências Naturais e Humanas – UFABC, Santo André – SP

Dados Pessoais

Nome: Luna Schlittler dos Santos

Nome em citações bibliográficas: Santos, L. S.

Filiação: Reginaldo Bezerra dos Santos

Cristiane Tenan Schlittler dos Santos

Data de nascimento: 17 de outubro de 1988

Naturalidade: Descalvado/SP

Nacionalidade: Brasileira

Formação Acadêmica

- Graduada no curso de Bacharel em Química pela Universidade Federal do Espírito Santo (UFES) no período de 2007 a 2011.

- Mestre em química orgânica, área de concentração: Síntese Orgânica, Título: *“Estudos sobre síntese de novos fotossensibilizadores a partir de produtos naturais porfirinóides”* sob a orientação da Prof. Dr. Kleber Thiago de Oliveira, na Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), São Carlos, no período de 2011 a 2013 com bolsa do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

- Curso de pós-graduação modalidade Doutorado em química, área de concentração: Química Orgânica, Título: *“Sínteses quimioenzimáticas de moléculas bioativas – uma abordagem à Química Verde”* sob a orientação da Profa. Dra. Cíntia Duarte de Freitas Milagre, no Instituto de Química, UNESP, Araraquara, no período de 2013 a 2017 com bolsa do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

Estágios e Bolsas auxílio

- Estágio de Iniciação Científica “Síntese e Estudo das Propriedades Físico-Químicas do Biodiesel do Óleo da Nogueira-de-Iguape (*Aleurites moluccana* (L.) Wild)” sob a orientação do Prof. Dr. Reginaldo Bezerra dos Santos no Departamento de Química na Universidade Federal do Espírito Santo, no período de 2008 a 2009 com bolsa financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)

- Estágio de Iniciação Científica “Estudo da Variação do Ponto de Ebulição Médio de Diferentes Biodiesel por Análise Termogravimétrica” sob a orientação do Prof. Dr. Reginaldo Bezerra dos Santos no Departamento de Química na Universidade Federal do Espírito Santo, no período de 2009 a 2010 com bolsa financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação do Espírito Santo (FAPES).

- Bolsa de mestrado no período de 2011 a 2013, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

- Programa de Estágio Docente na disciplina Química Orgânica sob a orientação da Profa. Dra. Isabele Rodrigues Nascimento no Instituto de Química, UNESP, Araraquara, no período de 2014 a 2015.

- Programa de Estágio Docente na disciplina Química Orgânica Experimental sob a orientação da Profa. Dra. Lourdes Campaner dos Santos no Instituto de Química, UNESP, Araraquara, 2015.

Livros e Capítulos

SANTOS, L. S.; MILAGRE, H. M. S.; MILAGRE, C. D. F. Catálise enzimática em reações multicomponentes. In: Ivaldo Itabaiana Jr e Rodrigo O. M. A. de Souza. (Org.). Biocatálise e Biotransformação - Fundamentos e Aplicações. 1ed. Rio de Janeiro: Revolução eBook, 2016, v. 1, p. 1-36.

MILAGRE, C. D. F.; **SANTOS, L. S.**; MORAES, M. I.; CRUZ, R. S. Biocatálise: estratégias para obtenção de substâncias bioativas. In: Lourdes Campaner dos Santos; Maysa Furlan; Marcelo Rodrigues de Amorim. (Org.). Produtos naturais bioativos. 1ed. São Paulo: Cultura Acadêmica, 2016, v. 1, p. 197-228.

Apresentação de Trabalhos em Congressos

SANTOS, L. S.; MILAGRE, H. M. S.; MILAGRE, C. D. F. Chemo- and enantioselective bioreduction of α,β -unsaturated ketoesters. II Simposio Latinoamericano de Biocatálisis y Biotransformaciones/ V Encuentro Regional de Biocatálisis y Biotransformaciones, 2016, Montevideu.

SANTOS, L. S.; OLIVEIRA, K. O.; MILAGRE, H. M. S.; MILAGRE, C. D. F. One-Pot multicomponent synthesis of 4-thiazolidinones. BIOTRANS 2015, 2015, Viena.

SANTOS, L. S.; OLIVEIRA, K. O.; MILAGRE, C. D. F. One-pot three component synthesis of 4-thiazolidinone catalyzed by immobilized yeasts. VII Workshop on Biocatalysts and Biotransformations and 6º Encuentro Regional de Biocatálisis y Biotransformaciones, 2014, Búzios.

SANTOS, L. S.; SANTOS, T. C.; BROCKSOM, T. J.; OLIVEIRA, K. T. A synthetic approach to bacteriochlorin derivatives using natural chlorophyll a pigment. 14th Brazilian Meeting on Organic Synthesis, 2011, Brasília.

SANTOS, L. S.; Santos R.B; Lacerda Jr V.; Greco, S. J.; SILVA, R.; Castro, E. V. R. Estudo da Variação do Ponto de Ebulição Médio de Diferentes Biodiesel por Análise Termogravimétrica. 4º Congresso da Rede Brasileira de Tecnologia de Biodiesel, 2010, Belo Horizonte.

Santos R. B.; Lacerda Jr V.; BRUM, M. C.; **SANTOS, L. S.**; Greco, S. J.; SILVA, R.; Castro, E. V. R. Biodiesel metílico de dendê, soja, canola e babaçu. Estudo da estabilidade térmica por análise termogravimétrica. 4º Congresso da Rede Brasileira de Tecnologia de Biodiesel, 2010, Belo Horizonte.

BRUM, M. C.; Santos R. B.; Lacerda Jr V.; SILVA, R.; **SANTOS, L. S.**; Greco, S. J.; Castro, E. V. R. Preparação e caracterização de biodiesel metílico. Estudo de estabilidade térmica por análise termogravimétrica. 33ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2010, Águas de Lindóia.

CARNEIRO, G. F.; BRUM, M. C.; **SANTOS, L. S.**; SILVA, R.; Venâncio, T.; FREITAS, J.; Santos R.B.; Lacerda Jr V.; Castro, E. V. R. Low and high field NMR study of monguba (*Pachira aquatica* Aubl.) oil. 12th NUCLEAR MAGNETIC RESONANCE USERS MEETING / 3rd IBEROAMERICAN NMR MEETING, 2009, Angra dos Reis.

SANTOS, L. S.; BRUM, M. C.; Santos R.B.; Lacerda Jr V.; SILVA, R.; Castro, E. V. R.; Greco, S. J.; TOZETTO, L. Biodiesel de Nogueira-de-Iguape (*Aleurites moluccana* L. Wild.). Síntese e Estudo das Propriedades Físico-Químicas. III Congresso da Rede Brasileira de Tecnologia de BIODIESEL, 2009, Brasília.

BRUM, M. C.; **SANTOS, L. S.**; Santos R.B.; Lacerda Jr V.; SILVA, R.; Castro, E. V. R.; Greco, S. J. Biodiesel de Munguba. Síntese, Caracterização e Avaliação da Presença de Ácidos Graxos Ciclopropenoídicos. III Congresso da Rede Brasileira de Tecnologia de BIODIESEL, 2009, Brasília.

SANTOS, L. S.; BRUM, M. C.; Santos R. B.; Lacerda Jr V.; Castro, E. V. R.; Greco, S. J.; TOZETTO, L. Síntese e Estudo das Propriedades Físico-Químicas do Biodiesel do Óleo da Nogueira-de-Iguape (*Aleurites moluccana* L. Wild.). 32ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2009, Fortaleza.

BRUM, M. C.; **SANTOS, L. S.**; Santos R. B.; Lacerda Jr V.; Greco, S. J.; Castro, E. V. R. Biodiesel da Munguba (*Pachira aquatica* Aubl.). Síntese e Avaliação da Presença de Ácidos Graxos Ciclopropenoídicos. 32ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2009.

SANTOS, L. S.; BRUM, M. C.; Santos R. B.; Lacerda Jr V.; SILVA, R.; Castro, E. V. R.; Greco, S. J.; TOZETTO, L. Síntese e Estudo das Propriedades Físico-Químicas do Biodiesel do Óleo da Nogueira-de-Iguape (*Aleurites moluccana* L. Wild.). II Encontro Capixaba de Química, 2009, Vitória.

BRUM, M. C.; **SANTOS, L. S.**; Santos R.B.; Lacerda Jr V.; SILVA, R.; Castro, E. V. R.; Greco, S. J.; TOZETTO, L. Biodiesel da Munguba (*Pachira aquatica* Aubl.). Síntese e Avaliação da Presença de Ácidos Graxos Ciclopropenoídicos. II Encontro Capixaba de Química, 2009, Vitória.

CARNEIRO, G. F.; BRUM, M. C.; **SANTOS, L. S.**; SILVA, R.; FREITAS, J.; Santos R. B.; Lacerda Jr V.; Castro, E. V. R. Estudo do óleo da monguba (*Pachira aquatica* Aubl.) por RMN de baixo e alto campo. II Encontro Capixaba de Química, 2009, Vitória.

Participação em Eventos

II Simposio Latinoamericano de Biocatálisis y Biotransformaciones/ V Encuentro Regional de Biocatálisis y Biotransformaciones. 2016.

1º Workshop de Inovação e Empreendedorismo do Instituto de Química - Unesp. 2016.

Mulheres na Ciência 2016: o Gênero na Pós-Graduação. 2016.

Workshop "Inovações em análise de Enantiômeros". 2016.

12th BIOTRANS. 2015.

VII Workshop on Biocatalysis and Biotransformations/ I Simposio Latinoamericano de Biocatálisis y Biotransformaciones. 2014.

IV Escola Superior em Síntese Orgânica (IV ESSO). 2012.

14º Brazilian Meeting on Organic Synthesis (BMOS). 2011.

33ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química. 2010.

IV Congresso da Rede Brasileira de Tecnologia de Biodiesel. 2010.

XX Jornada de Iniciação Científica - UFES. 2010.

32ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química. 2009.

49ª Congresso Brasileiro de Química. 2009.

II Encontro Capixaba de Química. 2009.

III Congresso da Rede Brasileira de Tecnologia de Biodiesel. 2009.

XIX Jornada de Iniciação Científica - UFES. 2009.

I Encontro Capixaba de Química. 2008.

Coorientação concluída

Veridiana de Sá Gomes. Coleção de culturas microbianas: manutenção e prospecção enzimática de ene-redutases. 2014. Iniciação Científica. (Graduando em Farmácia e Bioquímica) - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho.

*Para Felipe
com muito amor*

Agradecimentos

Agradeço à minha família, pai, mãe, irmão e Felipe, por sempre estar ao meu lado apesar da distância e pelo apoio a cada nova decisão tomada. Obrigada por todo o amor, carinho e dedicação.

À Profa. Dra. Cintia Milagre, pela orientação, incentivo, paciência, confiança, compreensão e amizade ao longo destes 4 anos.

Ao Prof. Dr. Humberto M. S. Milagre, pela colaboração neste trabalho, pela coorientação, incentivo, confiança e pelas provocações que tanto contribuíram para a minha formação.

Às grandes e verdadeiras amizades aqui construídas. Bruno, Karina, Mariana, Carol, Larissa e Taís, muito obrigada!

Aos amigos e colegas de laboratório, pelo companheirismo e por tornar o dia-dia mais alegre. Em especial ao Bruno e a Karina que me receberam tão bem e me ensinaram tanto.

Ao Instituto de Química e à Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, pela oportunidade e infraestrutura fundamental à realização deste trabalho.

À Profa. Dra. Anita J. Marsaioli pelas análises de GC-FID quiral. Ao Matheus Bofinger por toda a ajuda durante a realização das análises.

À Profa. Dra. Lourdes C. dos Santos e Profa. Dra. Isabele Nascimento pelas análises de HPLC-PDA-CD. Também à Dra. Juliana Rodrigues, ao Dr. Marcos Donizete P. Pereira e a Camila pelo auxílio com o equipamento.

Ao Prof. Dr. André L. M. Porto, pelas análises de GC-MS.

Ao CNPq pela bolsa concedida (Processo 142498/2013-0) e pelo auxílio financeiro para o desenvolvimento deste trabalho.

Agradeço a todos que estiveram comigo durante todo esse tempo e que hoje comemoram esta vitória comigo, obrigada a todos.

RESUMO

O emprego da Biocatálise utilizando enzimas isoladas ou células íntegras fornece alternativas eficientes e potencialmente quimio-, regio- e estereosseletivas para a transformação de uma ampla variedade de compostos orgânicos. Neste trabalho aplicamos a Biocatálise na síntese quimioenzimática de derivados de α -metil- β -hidroxiéster utilizando a levedura *Saccharomyces cerevisiae* na redução de α -metileno- β -cetoésteres e também na síntese de 4-tiazolidinonas através de uma reação multicomponente *one-pot* combinada com o uso de biocatalisadores. Dessa forma esta tese é composta de três capítulos, sendo o primeiro uma introdução geral seguida de dois capítulos de trabalho experimental, resultados e discussão.

Os α -metil- β -hidroxiésteres são compostos importantes para a síntese orgânica assimétrica, onde são aplicados como blocos construtores para a síntese de diversos compostos. Nesse contexto, existe um grande interesse na busca por métodos convenientes e seletivos para sua síntese. Dentre as estratégias mais estudadas, a redução assimétrica de α -metileno- β -cetoésteres tem sido a via mais investigada. Neste trabalho, a rota sintética proposta para a obtenção dos substratos α -metileno- β -cetoéster consistiu na obtenção dos α -metileno- β -hidroxiésteres através da reação de Morita-Baylis-Hillman (rendimentos de 64 a 96%), seguida por uma reação de oxidação utilizando o ácido 2-iodoxibenzóico (IBX) (rendimentos de 88 a 95%). Os substratos α -metileno- β -cetoésteres foram submetidos a reação de redução utilizando a levedura *Saccharomyces cerevisiae*. Os α -metil- β -hidroxiésteres foram obtidos com conversões de 66 a 99%, diastereosseletividade de até 91:9 e excessos enantioméricos maiores que 99% para todos os diastereoisômeros. De maneira geral, podemos concluir que a levedura *S. cerevisiae* foi capaz de reduzir os α -metileno- β -cetoésteres à α -metil- β -hidroxiésteres com alta diastereo- e enantiosseletividade.

As 4-tiazolidinonas são um importante núcleo heterocíclico presente em diversos compostos biologicamente e farmacologicamente ativos. Portanto, há um grande interesse no desenvolvimento de metodologias adequadas para sintetizá-lo. A eficiência das reações multicomponentes combinadas com os aspectos sustentáveis da Biocatálise foram empregadas na síntese desta classe de compostos. Uma coleção de células microbianas, enzimas isoladas e a albumina de soro bovino foram triados para atividades catalíticas nesta reação. A influência do solvente, a relação estequiométrica dos substratos e os substituintes no anel aromático dos aldeídos também foram avaliados. Em relação à proporção estequiométrica de substratos os melhores resultados foram observados quando se utilizou uma proporção de 1: 1: 3 de aldeído:

amina: ácido carboxílico. A relação entre o substituinte do anel aromático dos aldeídos e a taxa de reação não ficou clara já que as conversões variam com os diferentes biocatalisadores testados. De maneira geral as 4-tiazolidinonas foram obtidas com rendimentos bons a moderados (52 a 69%), sob condições de reação suaves.

Palavras-chave: Biorredução, Adutos de Morita-Baylis-Hillman, *Saccharomyces cerevisiae*, Reações Multicomponentes, 4-Tiazolidinonas.

ABSTRACT

The application of biocatalysis using isolated enzymes and entire cells is a powerful tool to transform a wide range of organic compounds in chemo-, regio- and stereoselective mode. In this work, we applied the biocatalysis in the chemical enzymatic synthesis of α -methyl- β -hydroxy ester using *Saccharomyces cerevisiae* by the reduction of α -methylene- β -keto ester and 4-thiazolidinones by a one-pot multicomponent reaction combined biocatalysts. This work is composed by a general introduction followed by two chapters of experimental work, results and discussion.

The α -methyl- β -hydroxy ester is an important compound for asymmetric organic synthesis, where they are applied as building blocks to the synthesis of several compounds. This synthesis is getting attention following appropriate methodologies and high selectivity. In the most studied strategies, the asymmetric reduction of α -methylene- β -keto ester in the chemical or enzymatic path are one of the most investigated approaches. The synthesis route to the formation of α -methylene- β -keto ester was the conversion of α -methylene- β -hydroxy ester by Morita-Baylis-Hillman reaction (yields of 64 to 96%), followed by an oxidation reaction using IBX (yields of 88 to 95%). The α -methylene- β -keto ester substrates were exposed as a reactant to the reduction reaction applying *Saccharomyces cerevisiae*. The product α -methyl- β -hydroxy ester were produced with 66 to 99% of conversion, the diastereoselectivity of 91:9 and enantiomeric excess higher than 99% to all diastereoisomers. Concluding, the *S. cerevisiae* could reduce the α -methylene- β -keto ester to α -methyl- β -hydroxy ester with high diastereo- and enantioselectivity.

The 4-thiazolidinones are an important heterocyclic scaffolds present in many biologically and pharmacologically active compounds. Therefore, the development of a proper methodology to synthesize this compound is an actual concern. The efficiency of multicomponent reactions combined with the sustainable feature of biocatalysis were employed in the synthesis of these compounds. A collection of microbial cells, isolated enzymes and bovine serum albumin were screened for catalytic activities. The solvent influence, stoichiometric relations between substrates and the aromatic ring substitutes in the aldehydes were evaluated either. The stoichiometric relation were the greater in the proportion of 1 : 1 : 3 aldehyde : amine : carboxylic acid. The relation between the aldehyde aromatic ring substitutes and the reaction rate was not clear, since the conversions vary with the tested biocatalysts.

Summarizing, the 4-thiazolidinones were obtained with good and moderate yields (52 to 69%), under mild reaction conditions.

Keywords: Bioreduction, Morita-Baylis-Hillman adducts, *Saccharomyces cerevisiae*, Multicomponent reactions, 4-Thiazolidinones.

Apresentação geral da tese

A presente tese é composta de três capítulos, sendo o primeiro uma introdução geral seguida de dois capítulos de trabalho experimental, resultados e discussão.

A introdução geral da tese procura dar uma perspectiva sobre a potencialidades do uso da Biocatálise em síntese orgânica, relevando, sobretudo, as vantagens apresentadas em relação aos catalisadores químicos e o uso dos biocatalisadores nas formas de células íntegras e enzimas isoladas.

O segundo capítulo refere-se à síntese quimioenzimática de derivados de α -metil- β -hidroxiéster utilizando a levedura *Saccharomyces cerevisiae* na redução de α -metileno- β -cetoésteres.

O terceiro capítulo aborda a síntese de 4-tiazolidinonas através de uma reação multicomponente *one-pot* combinada com o uso de biocatalisadores.

Os capítulos 2 e 3 estão organizados nos seguintes itens: “Resumo”, “Introdução”, “Resultados e Discussão” e “Conclusões”. As “Conclusões gerais”, a “Parte Experimental”, as “Referências Bibliográficas” e os “Anexos” encontram-se no final da tese.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Classes de reações biocatalíticas mais aplicadas em escala industrial.	31
Figura 2. Exemplos representativos de compostos quirais obtidos através de reduções enantioespecíficas de ligações duplas C=C catalisadas por ERs (células íntegras e enzimas isoladas).	39
Figura 3. Reatividade dos α -metileno- β -hidroxiésteres frente a diferentes enzimas.	53
Figura 4. Conformação preferencial que leva ao produto <i>anti</i> .	65
Figura 5. Numeração dos hidrogênios dos α -metil- β -hidroxiésteres 13a - 13d.	65
Figura 6. Numeração dos hidrogênios dos α -metil- β -cetoésteres 12a – 12d.	67
Figura 7. Biorredução dos α -metileno- β -cetoésteres.	71
Figura 8. Estudo cinético da redução de 9a mediada por <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .	73
Figura 9. Estudo cinético da redução de 9b mediada por <i>Saccharomyces cerevisiae</i> e variação do excesso enantiomérico do α -metil- β -cetoéster 12b.	74
Figura 10. Estudo cinético da redução de 9c mediada por <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .	76
Figura 11. Estudo cinético da redução de 9d mediada por <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .	77
Figura 12. Representação do modelo para predição da diastereosseletividade mediada por <i>S. cerevisiae</i> .	79
Figura 13. Reação <i>one-pot</i> multicomponente.	88
Figura 14. Cromatograma do padrão <i>rac</i> -13a.	111
Figura 15. Cromatograma do padrão <i>rac</i> -13b.	112
Figura 16. Cromatograma do padrão <i>rac</i> -13c.	112
Figura 17. Cromatograma do padrão <i>rac</i> -13d.	113
Figura 18. Cromatograma do produto da reação de biorredução 13a.	117
Figura 19. Cromatograma do produto da reação de biorredução 13c.	117
Figura 20. Cromatograma do produto da reação de biorredução 13d.	118

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Vantagens e desvantagens da Biocatálise em comparação com a catálise química.	25
Tabela 2. Produção industrial de produtos farmacêuticos e produtos químicos finos utilizando biocatalisadores.	27
Tabela 3. Sínteses de produtos químicos finos por meio de biorreduções catalisadas por células íntegras.	37
Tabela 4. Adutos de Morita-Baylis-Hillman sintetizados.	49
Tabela 5. Reação de MBH do <i>p</i> -nitrobenzaldeído e acrilato de metila (bio)catalisada.	51
Tabela 6. Reação de MBH biocatalisada.	53
Tabela 7. Nova metodologia para a preparação dos α -metileno- β -acetoxiésteres 6a - d.	57
Tabela 8. Condições reacionais testadas para a obtenção do α -metileno- β -acetoxiéster 6b.	59
Tabela 9. Condições reacionais testadas na resolução cinética do α -metileno- β -hidroxiéster 3a.	60
Tabela 10. Oxidação dos α -metileno- β -hidroxiésteres com IBX.	63
Tabela 11. Preparação dos α -metil- β -hidroxiésteres racêmicos.	64
Tabela 12. Preparação dos α -metil- β -cetoésteres racêmicos (12a - 12c).	66
Tabela 13. Preparação dos α -metil- β -cetoésteres racêmicos (12a - 12d).	67
Tabela 14. Triagem enzimática de cetorredutases para os α -metileno- β -cetoésteres 9a – 9d.	69
Tabela 15. Resumo dos resultados obtidos nas reações de biorredução dos α -metileno- β -cetoésteres (9a – 9d).	71
Tabela 16. Resultados obtidos na reação de biorredução do α -metileno- β -cetoéster 9a.	73
Tabela 17. Resultados obtidos na reação de biorredução do α -metileno- β -cetoéster 9b.	74
Tabela 18. Resultados obtidos na reação de biorredução do α -metileno- β -cetoéster 9c.	75
Tabela 19. Resultados obtidos na reação de biorredução do α -metileno- β -cetoéster 9d.	77
Tabela 20. Otimização do solvente na síntese de 4-tiazolidinonas.	92
Tabela 21. Síntese multicomponente de 4-tiazolidinonas com diferentes biocatalisadores.	93

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1. Reações de biorredução de diferentes grupos funcionais.	31
Esquema 2. Classificação das oxidoredutases.	32
Esquema 3. Reações de redução catalisadas pelas desidrogenases.	33
Esquema 4. Redução do <i>n</i> -pentanal utilizando <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .	33
Esquema 5. Reduções de ligações C=O catalisadas por ADHs.	34
Esquema 6. Mecanismo simplificado proposto para a redução de ligação C=O por enzimas ADH.	36
Esquema 7. Exemplo de aplicação industrial de cetorredutases.	36
Esquema 8. Reduções de ligações C=C catalisadas por ERs.	38
Esquema 9. Reação de Morita-Baylis-Hillman.	40
Esquema 10. Diferentes perspectivas sobre a estrutura dos adutos de MBH.	41
Esquema 11. Aplicação dos adutos de MBH na síntese de produtos naturais.	42
Esquema 12. Estratégias atuais para a obtenção dos adutos de MBH quirais.	42
Esquema 13. Rotas sintéticas A e B para a obtenção de derivados dos adutos de MBH.	45
Esquema 14. Mecanismo inicialmente proposto para a reação de MBH.	46
Esquema 15. Proposta mecanística baseada nos estudos de McQuade e Aggarwal.	47
Esquema 16. Reação de Morita-Baylis-Hillman.	48
Esquema 17. Reação de MBH biocatalisada pela BSA.	50
Esquema 18. Mecanismo proposto para catálise proteica da reação de MBH.	50
Esquema 19. Reação de MBH catalisada por BioH esterase de <i>Escherichia coli</i> .	51
Esquema 20. Reação de MBH otimizada.	52
Esquema 21. Representação esquemática simplificada para as reações de oxidação, redução e hidrólise dos α -metileno- β -hidroxiésteres 3a e 3c.	54
Esquema 22. Triagem dos micro-organismos para diferentes atividades enzimáticas.	55
Esquema 23. Preparação do α -metileno- β -acetoxiésteres 6c.	56
Esquema 24. Mecanismo proposto para a formação do α -metileno- β -acetoxiésteres 6c.	56
Esquema 25. Reação de isomerização dos α -metileno- β -acetoxiésteres.	56
Esquema 26. Mecanismo proposto para a formação do α -metileno- α -acetoxiéster 7.	57
Esquema 27. Mecanismo proposto para a formação do α -metileno- α -acetoxiéster 7b.	58
Esquema 28. Resolução cinética dos α -metileno- β -hidroxiésteres racêmicos.	59
Esquema 29. Resolução cinética do 1-feniletanol utilizando a lipase BCL.	60

Esquema 30. Preparação dos α -metileno- β -cetoésteres.	61
Esquema 31. Síntese do ácido 2-iodoxibenzóico (IBX).	61
Esquema 32. Mecanismo proposto para oxidação de álcoois com IBX.	62
Esquema 33. Síntese do α -metileno- β -cetoéster 9c.	62
Esquema 34. Preparação dos α -metil- β -hidroxiésteres racêmicos.	64
Esquema 35. Biorredução dos α -metileno- β -cetoésteres 9a - 9d.	68
Esquema 36. Mecanismo simplificado proposto para a redução de ligação C=C por enzimas enoato redutases.	78
Esquema 37. Representação da racemização do centro estereogênico dos α -metil- β -cetoésteres.	78
Esquema 38. Mecanismo proposto para a seletividade na redução dos α -metileno- β -cetoésteres (9a – 9d) pela levedura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .	81
Esquema 39. Núcleos tiazol (I), tiazolidina (II), 4-tiazolidinonas (III).	85
Esquema 40. Atividade biológica das 4-tiazolidinonas.	86
Esquema 41. Mecanismo proposto para a síntese das 4-tiazolidinonas.	87
Esquema 42. Metodologia proposta para a síntese de 4-tiazolidinonas.	90
Esquema 43. Síntese multicomponente de 4-tiazolidinonas.	91
Esquema 44. Proposta de mecanismo para a biocatálise na síntese das 4-tiazolidinonas.	94
Esquema 45. Isômeros geométricos das 2,3-di-substituídas-4-tiazolidinonas.	95

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

ADH - Álcool desidrogenases

AINEs - Anti-inflamatórios não-esteroides

BCL - Lipase de *Burkholderia cepacia*

BSA - Albumina de soro bovino (*bovine serum albumin*)

CAL-B - *Candida Antarctica* do tipo B

CCD - Cromatografia em camada delgada

CD - Dicroísmo circular (*circular dichroism*)

CE - Extrato celular (*cell extract*)

CEIS - Centro de Estudos de Insetos Sociais

CR - Carbonil redutases

DABCO - 1,4-diazabicyclo[2.2.2]octano

DCC - N,N-dicicloexilcarbodiimida

DMAP - 4-dimetilaminopiridina

DMSO - Dimetilssulfóxido

DSC - Cromatografia em sílica seca (*dry silicon chromatography*)

EC - *Enzyme Commission*

ER - Enoato redutases

FDA - *Food and Drug Administration*

FMN - Mononucleotídeo de flavina

GC-FID - Cromatografia gasosa acoplada a detector de ionização em chama (*gas chromatography with flame ionization detector*)

HBTU - hexafluorofosfato de O-(benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametilurônico

HPLC - Cromatografia líquida de alta eficiência (*high performance liquid chromatography*)

IBA - Ácido 2-iodosobenzóico

IBX - Ácido 2-iodoxibenzóico

IV - Infravermelho

KRED - Cetorredutase

m/z - Relação massa/carga

MBH - Morita-Baylis-Hillman

MCR - Reações multicomponentes (*multicomponent reactions*)

MS - Espectrometria de massas (*mass spectrometry*)

NADH/NAD⁺ - Nicotinamida adenina dinucleotídeo

NADPH/NADP⁺ - Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato

OYE - *Old Yellow Enzyme*

Pd/C - Paládio suportado em carvão ativado

PDA - Detector de arranjo de fotodiodos (*photodiode array detector*)

PEG - Polietilenoglicol

PF - Ponto de fusão

ppm - Partes por milhão

REACH - *Registration, Evaluation, Authorization and Restriction of Chemicals*

RMN de ¹³C - Ressonância magnética nuclear de carbono 13

RMN de ¹H - Ressonância magnética nuclear de hidrogênio

t.a. - Temperatura ambiente

TMS - Tetrametilsilano

WLC - Células inteiras liofilizadas (*whole lyophilized cells*)

SUMÁRIO

Capítulo 1.	Introdução geral	23
Capítulo 2.	Sínteses quimioenzimáticas de derivados de β -hidroxiéster	30
2.1	RESUMO	30
2.2	INTRODUÇÃO	31
2.2.1	Reduções Biocatalíticas	31
2.2.2	Reduções enzimáticas de ligações C=O	34
2.2.3	Reduções enzimáticas de ligações C=C	38
2.2.4	A Reação de Morita-Baylis-Hillman - Considerações gerais	40
2.3	OBJETIVOS	44
2.3.1	Objetivo geral	44
2.3.2	Objetivos específicos	44
2.4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	45
2.4.1	Planejamento sintético	45
2.4.2	Síntese organocatalítica dos α -metileno- β -hidroxiéster	45
2.4.3	Síntese biocatalítica dos α -metileno- β -hidroxiéster	50
2.4.4	Triagem dos micro-organismos para diferentes atividades enzimáticas	53
2.4.5	Preparação dos α -metileno- β -acetoxiésteres – Rota A	55
2.4.6	Resolução Cinética dos α -metileno- β -acetoxiésteres	59
2.4.7	Preparação dos α -metileno- β -cetoésteres – Rota B	60
2.4.8	Preparação dos α -metil- β -hidroxiésteres racêmicos (13a – 13d)	64
2.4.9	Preparação dos α -metil- β -cetoésteres racêmicos (12a - 12d)	66
2.4.10	Triagem enzimática para detecção de cetorredutases (<i>kREDy-to-go plate assay</i> - Prozomix)	67
2.4.11	Biorredução dos α -metileno- β -cetoésteres	70
2.5	CONCLUSÕES	82
Capítulo 3.	Síntese multicomponente <i>one-pot</i> de 4-tiazolidinonas	84

3.1	RESUMO	84
3.2	INTRODUÇÃO	85
3.3	OBJETIVOS	90
3.3.1	Objetivo geral	90
3.3.2	Objetivos específicos	90
3.4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	91
3.5	CONCLUSÕES	96
4.	CONCLUSÕES GERAIS	98
5.	PARTE EXPERIMENTAL	100
5.1	Considerações gerais	100
5.2	Procedimento experimental e dados espectroscópicos dos compostos sintetizados	104
5.2.1	Procedimento geral para síntese dos adutos de MBH	104
5.2.2	Procedimento geral para a síntese dos compostos acetilados (6a – 6d)	106
5.2.3	Procedimento geral para a síntese do ácido 2-iodoxi-benzóico (IBX)	108
5.2.4	Procedimento geral para a síntese dos α -metileno- β -cetoésteres (9a – 9d)	109
5.2.5	Procedimento geral para obtenção de α -metil- β -hidroxiésteres	110
5.2.6	Procedimento geral para obtenção de α -metil- β -cetoésteres	113
5.2.7	Triagem enzimática para detecção de cetorredutases (<i>kREDy-to-go plate assay</i> – Prozomix)	115
5.2.8	Procedimento geral para a biorredução dos α -metileno- β -cetoésteres	115
5.2.9	Procedimento geral para a síntese das 2,3-diaril-4-tiazolidinonas (18a-18c)	118
6.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	121
7.	ANEXOS	127
7.1	Lista de Espectros	127

CAPÍTULO 1

Introdução geral

Capítulo 1. Introdução geral

“The art to make ‘impossible’ reactions work by using the most powerful catalysts on earth – enzymes – is known as BIOCATALYSIS.”

Professor Kurt Faber

Biocatalysis is the chemical process through which enzymes or other biological catalysts perform reactions between organic components.

Nature

Ao longo da história da humanidade os micro-organismos apresentaram uma enorme importância social e econômica. A aplicação de micro-organismos e enzimas microbianas para a preparação e conservação de alimentos e bebidas tem uma longa história (REETZ, 2013; SHELDON; PEREIRA, 2017).

Os seres humanos têm utilizado enzimas há milhares de anos em fermentações para produzir ou conservar alimentos, tais como queijo, vinho, vinagre e cerveja. Os sumérios e os babilônios utilizavam micro-organismos na fermentação de cerveja antes de 6000 a.C., referências à fabricação de vinhos podem ser encontradas no Livro de Gênesis e os egípcios usavam leveduras para fazer pão (SHELDON; PEREIRA, 2017; WANDREY; LIESE; KIHUMBU, 2000).

Os exemplos mais antigos do uso intencional de micro-organismos para conversões desejadas em escala industrial datam de 1815 e 1880, para a produção de ácido acético a partir de etanol e de ácido láctico (enantiopuro), respectivamente (WANDREY; LIESE; KIHUMBU, 2000).

Os micro-organismos são atualmente utilizados para a produção de diversos compostos químicos complexos: na produção de metabólitos primários como ácidos orgânicos, aminoácidos, nucleotídeos e vitaminas e metabólitos secundários como antibióticos, perfumes, corantes e pigmentos. A utilização de micro-organismos atualmente é especialmente atrativa para a produção de compostos enantiomericamente puros (CHIN-JOE, 2002).

O interesse pela síntese de compostos opticamente puros é cada vez mais frequente nas indústrias farmacêuticas, de química fina e alimentícias onde a importância da relação entre atividade biológica e estereoisomerismo destes compostos já está bem estabelecida. Contudo, apesar dos constantes progressos em síntese assimétrica, a obtenção de compostos

enantiomericamente puros ainda é, certamente, um dos desafios mais importantes para a síntese orgânica e, por consequência, para a indústria atualmente (CUNHA et al., 2015).

Na última década, o regulamento REACH (*Registration, Evaluation, Authorization and Restriction of Chemicals*), que tem como objetivo melhorar a proteção da saúde humana e do ambiente frente aos riscos que podem resultar dos produtos químicos tóxicos, e as restrições ambientais aprovadas pelos EUA, Japão e União Europeia, resultaram em um grande debate na indústria de produtos químicos finos sobre o seu futuro. De forma geral, o aumento das condições de segurança, qualidade e a minimização dos impactos ambientais nos processos industriais, apontaram a necessidade de um desenvolvimento mais sustentável e economicamente atraente para a síntese de compostos enantiomericamente puros (SOLANO et al., 2012).

A Química Verde, que visa minimizar os riscos ambientais dos processos químicos e seus produtos, pode ser definida como o desenho, desenvolvimento e implementação de produtos químicos e processos para reduzir ou eliminar o uso ou geração de substâncias nocivas à saúde humana e ao ambiente. Desde a sua introdução por Anastas, este princípio inspirou os pesquisadores a repensar criticamente a química, em relação ao seu potencial impacto causado ao meio ambiente. Em especial, os 12 Princípios da Química Verde têm sido fonte de inspiração e servem de orientação para este processo. A Biocatálise é amplamente considerada como uma das tecnologias-chave para o sucesso da implementação da Química Verde pois cumpre vários dos 12 princípios e é considerada como sendo química verde *per se*. Desta forma, a Química Verde, vem mudando paradigmas na pesquisa e desenvolvimento das indústrias. (McELROY et al., 2015; NI; HOLTSMANN; HOLLMANN, 2014; SHELDON, 2012, 2016, 2017; SHELDON; PEREIRA, 2017).

Diante do contexto apresentado, nas últimas décadas, observou-se um crescente interesse no emprego de biocatalisadores (enzimas e/ou micro-organismos) em sínteses orgânicas tanto no meio acadêmico como no setor industrial.

Os processos de síntese química tradicionais usualmente fornecem altos rendimentos, no entanto, eles podem não ser amigáveis com o meio ambiente e muitas vezes estão associados à produção de subprodutos indesejados, levando a uma redução de eficiência e aumentando os custos do processo. Em comparação com a catálise química clássica, a Biocatálise oferece algumas vantagens únicas, Tabela 1, e se apresenta como uma alternativa eficiente e ambientalmente amigável em relação a síntese química tradicional (LIN; TAO, 2017).

Tabela 1. Vantagens e desvantagens da Biocatálise em comparação com a catálise química.

Vantagens	- Potencial seletividade (regio-, quimio-, e estereosseletividade). - Alta eficiência catalítica. - Reações de várias etapas <i>one-pot</i> com regeneração dos cofatores (células íntegras). - Reuso às vezes é possível. - Condições operacionais mais suaves. - Ambientalmente amigável.
Desvantagens	- Estabilidade do catalisador: o biocatalisador pode ser suscetível à inibição pelo substrato ou pelo produto. - Pode ocorrer inativação a altas temperaturas, em condições extremas de pH, ou em solventes orgânicos. - A membrana celular pode atuar como uma barreira de transporte de massa. - Pode ocorrer a formação de subprodutos indesejáveis que dificultam a purificação do produto.

Fonte: Adaptado de Lin e Tao (LIN; TAO, 2017).

A principal vantagem apresentada pelos biocatalisadores é a sua alta seletividade. A alta seletividade de um catalisador, regio-, quimio- e estereosseletividade, é uma característica desejável na área de síntese orgânica, especialmente na síntese de moléculas complexas com diferentes grupos funcionais, e proporciona benefícios como o reduzido ou inexistente uso de grupos de proteção, minimizando reações secundárias de proteção e desproteção. Diversos exemplos mostram a capacidade dos biocatalisadores para promover reações difíceis ou impossíveis pelas vias sintéticas clássicas (HOLLMANN; ARENDS; HOLTSMANN, 2011).

As enzimas também são consideradas catalisadores eficientes do ponto de vista energético, pois operam a temperaturas e pressões brandas. Geralmente, o meio reacional é a água e o pH do meio situa-se numa faixa moderada, oferecendo condições reacionais desejadas. Adicionalmente, os biocatalisadores são catalisadores provenientes de fontes naturais e, portanto, causam um impacto ambiental menor comparados aos catalisadores sintéticos, os quais são, por muitas vezes, obtidos através de vias sintéticas complexas e poluentes (BOMMARIUS; RIEBEL, 2004). Além disso a maioria dos sistemas quimio-catalíticos empregam metais, e a sustentabilidade da oferta em termos de reservas e potenciais impactos geopolíticos precisam ser considerados. Atualmente já existem elementos definidos como críticos em relação ao alto risco de escassez de suprimento (em termos de abundância e/ou questões geopolíticas). Elementos como rutênio, ródio, platina e ouro correm risco de esgotamento dentro dos próximos 5-50 anos, enquanto elementos como paládio, níquel e cobre correm risco de esgotamento dentro dos próximos 50-100 anos (McELROY et al., 2015).

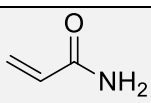
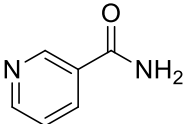
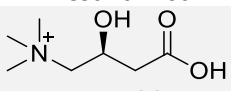
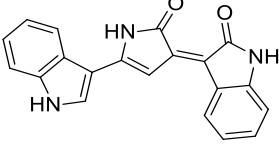
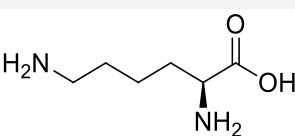
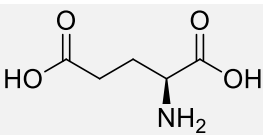
Os biocatalisadores podem ser utilizados de diferentes formas, como células íntegras, imobilizadas ou não, extratos enzimáticos brutos, ou ainda como enzimas puras, imobilizadas ou não. Os micro-organismos e enzimas utilizados podem ser selvagens ou modificados

geneticamente. Quando os biocatalisadores são utilizados na forma de células íntegras fornecem algumas vantagens únicas sobre o uso de extratos enzimáticos brutos, e de enzimas puras. Inicialmente, o uso de células íntegras é a forma mais econômica de uso dos biocatalisadores, especialmente quando há necessidade de cofatores, já que as células íntegras fornecem os cofatores necessários para as biotransformações e simplificam sua regeneração, geralmente tornando desnecessária a adição externa de cofatores, o que simplifica o procedimento e reduz os custos (WACHTMEISTER; ROTHER, 2016). O fornecimento e regeneração dos cofatores permite que os biocatalisadores na forma de células íntegras sejam aplicados com sucesso em reações em cascata, que abrangem múltiplas reações consecutivas (LADKAU; SCHMID; BÜHLER, 2014).

As células íntegras ainda fornecem o ambiente mais conhecido para as enzimas. A presença da membrana celular protege e ajuda na estabilização das enzimas, evitando alterações conformacionais na estrutura tridimensional proteica (CARVALHO, 2017; LIN; TAO, 2017; WACHTMEISTER; ROTHER, 2016).

Nas últimas décadas, muitos processos biocatalíticos utilizando células íntegras foram implementados para produzir uma grande variedade de produtos em grandes indústrias (Tabela 2) (CARVALHO, 2017).

Tabela 2. Produção industrial de produtos farmacêuticos e produtos químicos finos utilizando biocatalisadores.

Composto	Micro-organismo	Produção (ton/ano)	Empresa
 Acrilamida	<i>Rhodococcus rhodochrous J1</i>	30.000	Mitsubishi Rayon
 Nicotinamida	<i>Rhodococcus rhodochrous J1</i>	6.000	Lonza
 L-Carnitina	<i>Agrobacterium/Rhizobium HK1349</i>	180	Lonza
 Violaceina	<i>Iodobacter sp.</i>	-	Swissaustral
Vitamina B12	<i>Paracoccus denitrificans</i> <i>Propionibacterium shermanii</i>	35	Sanofi-Aventis, Hebei Huarong Pharmaceutical, NCPC Victor e Hebei Yuxing Bio-Engineering
 L-Lisina	<i>Corynebacterium glutamicum</i>	1,9 milhões	Ajinomoto
 L-Glutamato	<i>Corynebacterium glutamicum</i>	2,9 milhões	Ajinomoto

Fonte: Adaptado de Carvalho (CARVALHO, 2017)

A utilização de células íntegras como biocatalisadores apresenta importantes vantagens em relação às enzimas isoladas, porém também apresenta algumas desvantagens.

Reações biocatalisadas utilizando células íntegras podem apresentar, muitas vezes, um maior número de produtos secundários, já que outros sistemas enzimáticos presentes na célula podem catalisar reações indesejáveis no substrato ou ainda nos produtos da reação. O uso de solventes orgânicos ainda pode ser uma limitação, visto que estes podem danificar a membrana celular e desta forma inativar o sistema catalítico. A toxicidade do substrato para a célula e a capacidade de penetração do substrato na célula podem ser obstáculos à utilização de células íntegras como biocatalisadores. Outro fator a ser considerado é a recuperação do produto final, que pode ser complexa.

As enzimas isoladas apresentam como principais vantagens uma maior seletividade, facilidade na recuperação do produto ao final da reação e a possibilidade de usar cossolventes, sistema multifásicos ou mesmo, solventes orgânicos dependendo da estabilidade da enzima.

Contudo, a utilização de enzimas isoladas apresenta como desvantagens o elevado custo de produção, a baixa estabilidade de algumas enzimas e a necessidade de adição e regeneração dos cofatores (em enzimas dependentes de cofatores). Além disso, não são todos os catalisadores enzimáticos presentes nas células que podem ser isolados, existem alguns que não resistem aos processos de isolamento e purificação (BOMMARIUS; RIEBEL, 2004; HOLLMANN; ARENDS; HOLTMANN, 2011).

Como foi apresentado, os biocatalisadores na forma de células íntegras, ou na forma de enzimas isoladas apresentam vantagens e desvantagens, assim a escolha do biocatalisador deve ser analisada caso a caso.

CAPÍTULO 2

Síntesis quimioenzimáticas de derivados de β -hidroxiéster

Capítulo 2. Sínteses quimioenzimáticas de derivados de β -hidroxiéster

2.1 RESUMO

Os α -metil- β -hidroxiésteres são compostos importantes para a síntese orgânica assimétrica, onde são aplicados como blocos construtores para a síntese de diversos compostos com diferentes atividades biológicas e farmacológicas. Nesse contexto, existe um grande interesse na busca por métodos convenientes e seletivos para sua síntese. Dentre as estratégias mais estudadas, a redução assimétrica de α -metileno- β -cetoésteres tem sido a via mais investigada. As abordagens biocatalíticas tem se tornado cada vez mais interessantes para a obtenção dos α -metil- β -hidroxiésteres enantiomericamente enriquecidos, já que o uso dos biocatalisadores, seja na forma de enzimas isoladas ou na forma de células íntegras, é capaz de fornecer α -metil- β -hidroxiésteres com altas diastereo- e enantiosseletividades. Neste trabalho, a rota sintética proposta para a obtenção dos substratos α -metileno- β -cetoésteres consistiu na obtenção dos α -metileno- β -hidroxiésteres através da reação de Morita-Baylis-Hillman (MBH) (rendimentos de 64 a 96%), seguida por uma reação de oxidação utilizando o ácido 2-iodoxibenzóico (IBX) (rendimentos de 88 a 95%). Os substratos α -metileno- β -cetoésteres foram submetidos a reação de redução utilizando a levedura *Saccharomyces cerevisiae*. Os α -metil- β -hidroxiésteres foram obtidos com conversões de 66 a 99%, diastereosseletividade de até 91:9 e excessos enantioméricos maiores que 99% para todos os diastereoisômeros. Os tempos reacionais variaram de 6 a 48 horas de acordo com o substituinte no anel aromático. De maneira geral, podemos concluir que a levedura *S. cerevisiae* foi capaz de reduzir os α -metileno- β -cetoésteres à α -metil- β -hidroxiésteres com alta diastereo- e enantiosseletividade. Em relação à abordagem sintética proposta, trata-se de uma estratégia que atende a vários dos requisitos da Química Verde, como a elevada economia de átomos fornecida pela reação de MBH e consequente diminuição de resíduos gerados, o uso de um agente oxidante de iodo hipervalente que se apresenta com uma alternativa de metodologia branda e segura, além de uma opção econômica frente aos agentes oxidantes metálicos, e por fim o uso de enzimas como catalisadores biodegradáveis, oriundos de fontes renováveis, que operam em condições brandas de reação e em meio aquoso.

2.2 INTRODUÇÃO

2.2.1 Reduções Biocatalíticas

A seletividade inerente das enzimas já é amplamente conhecida há muitas décadas, e a aplicabilidade prática da Biocatálise sofreu melhorias significativas tornando-se uma verdadeira alternativa à catálise química clássica. No planejamento de uma síntese, onde uma das etapas envolva uma reação de redução em uma molécula polifuncionalizada, é interessante que se considere o uso de biocatalisadores nesta etapa, devido as suas potenciais seletividades.

As reações de biorredução, ao lado das reações de oxidação e de hidrólise, estão entre as classes de reações biocatalíticas mais aplicadas em escala industrial (Figura 1).

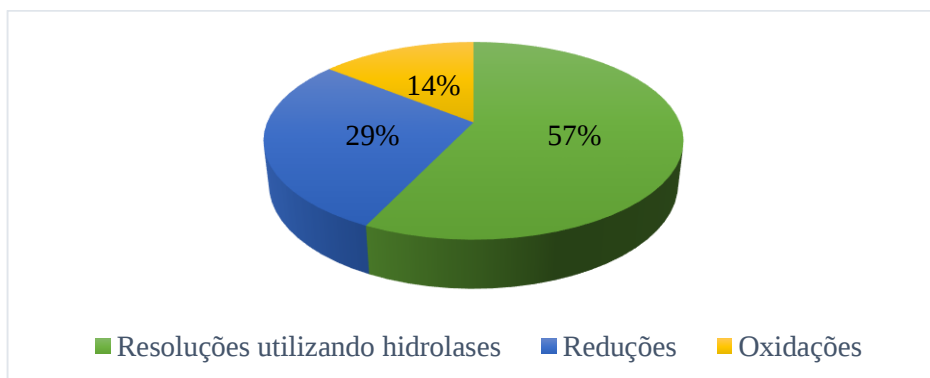
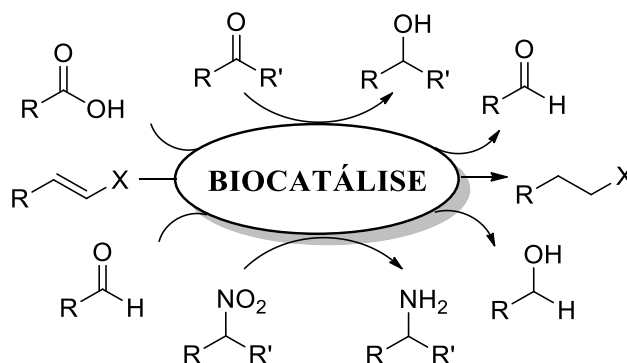


Figura 1. Classes de reações biocatalíticas mais aplicadas em escala industrial.

Fonte: Adaptado de Hollman e colaboradores (HOLLMANN; ARENDS; HOLTSMANN, 2011).

Diferentes grupos funcionais podem ser reduzidos em reações biocatalisadas, tais como aldeídos, cetonas, ácidos carboxílicos, olefinas e grupos nitro (Esquema 1).

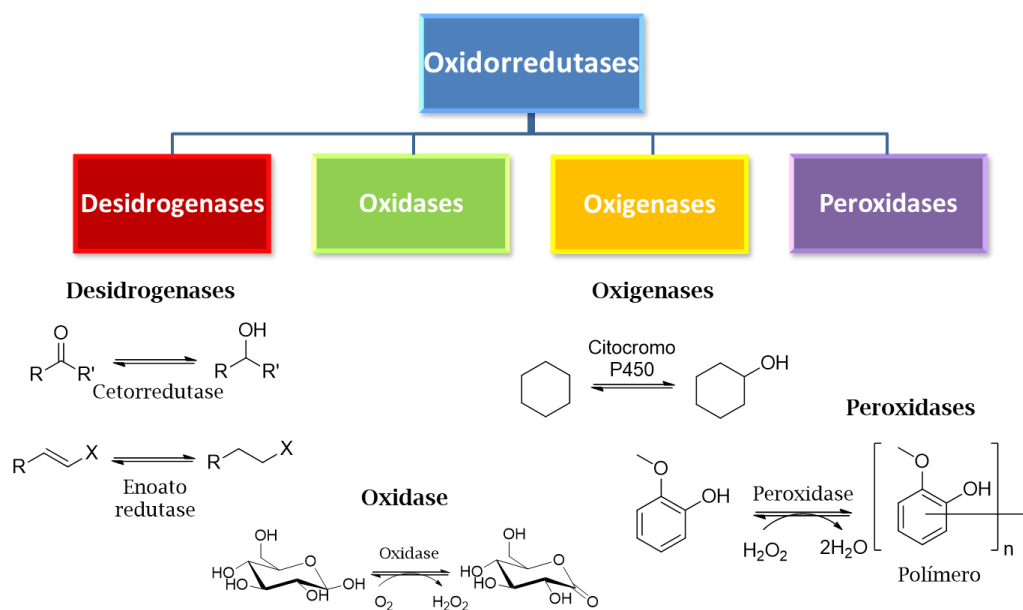
Esquema 1. Reações de biorredução de diferentes grupos funcionais.



As enzimas responsáveis por catalisar as reações de oxidação e redução são conhecidas como oxidorredutases. As oxidorredutases (EC 1), catalisam reações de oxidação/redução, transferindo hidreto, oxigênio e/ou elétrons entre moléculas, desempenham um papel central no metabolismo e na conversão de energia nas células. Atualmente representam cerca de 25% das enzimas conhecidas. Em 2006, aproximadamente 30% dos processos industriais realizados com o auxílio de biocatalisadores eram oxidações ou reduções, essa porcentagem apresenta uma forte tendência de aumento, isso porque o emprego de oxidorredutases é uma alternativa muito atraente do ponto de vista ambiental comparada com a utilização da química clássica de redução que geralmente utiliza catálise por metais de transição (LIESE; SEELBACH; WANDREY, 2006).

As oxidorredutases são classificadas em: desidrogenases (catalisam a transferência de hidreto), oxidases (catalisam a transferência de oxigênio molecular), oxigenases (catalisam a transferência de oxigênio a partir de oxigênio molecular) e peroxidases (catalisam a transferência de elétrons para peróxidos) (Esquema 2) (ARENDS; SHELDON; HANEFELD, 2007).

Esquema 2. Classificação das oxidorredutases.

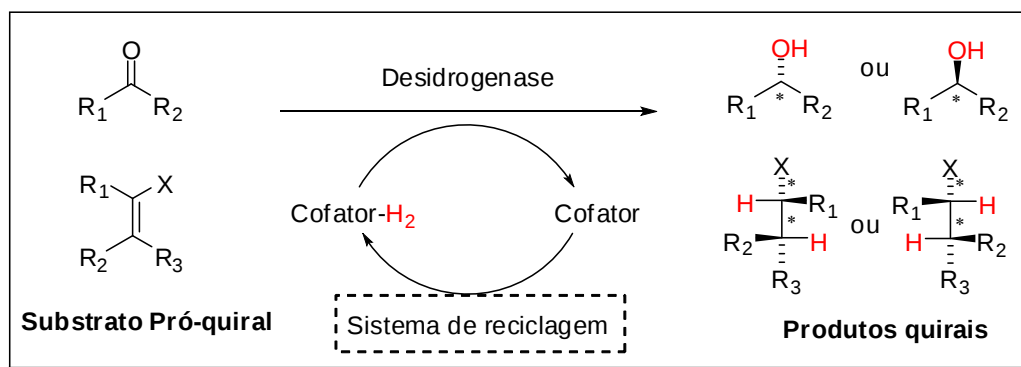


Fonte: Adaptado de Arends e colaboradores (ARENDS; SHELDON; HANEFELD, 2007).

As desidrogenases têm sido amplamente utilizadas para a redução de grupos carbonila de aldeídos ou cetonas e de ligações duplas C-C (Esquema 3). Uma vez que a reação de redução geralmente implica na transformação de carbono planar sp^2 em um carbono tetraédrico sp^3 , temos por consequência a geração de um centro estereogênico e, portanto, a perda de simetria

de compostos carbonílicos pró-quirais e das ligações duplas C-C. O controle da estereoquímica desta transformação é um desafio. As desidrogenases necessitam de cofatores, tais como nicotinamida adenina dinucleotídeo (NADH) e a respectiva molécula fosfatada (NADPH) (FABER, 2000).

Esquema 3. Reações de redução catalisadas pelas desidrogenases.

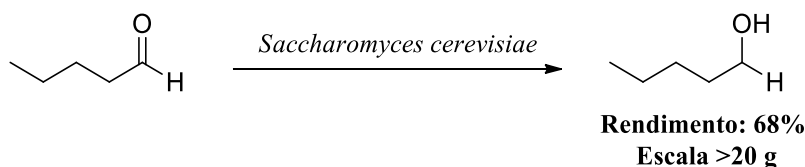


Fonte: Adaptado de Faber (FABER, 2000).

Atualmente já existe uma grande variedade de agentes redutores biocatalíticos disponíveis, dentre eles destaca-se o uso da levedura *Saccharomyces cerevisiae* (RODRIGUEZ; KAYSER; STEWART, 2001). Um subconjunto de aproximadamente 6000 proteínas, produzidas por esta levedura são capazes de catalisar reações de reduções de cetonas, aldeídos e de olefinas, muitas vezes com altas eficiências e estereosseletividade (GOFFEAU et al., 1996).

Em 1914, Neuberg e Nord mostraram, em um trabalho pioneiro, a redução do *n*-pentanal ao álcool correspondente com 68% de rendimento em uma escala >20 g, utilizando *Saccharomyces cerevisiae* (Esquema 4) (RODRIGUEZ; KAYSER; STEWART, 2001).

Esquema 4. Redução do *n*-pentanal utilizando *Saccharomyces cerevisiae*.



Desde então, a redução assimétrica de cetonas se tornou a aplicação mais comum da levedura *Saccharomyces cerevisiae* em síntese orgânica (BUQUE et al., 2002; CHAVES; MORAN; RODRIGUES, 2013; CLOSOSKI et al., 2007; MILAGRE et al., 2009;

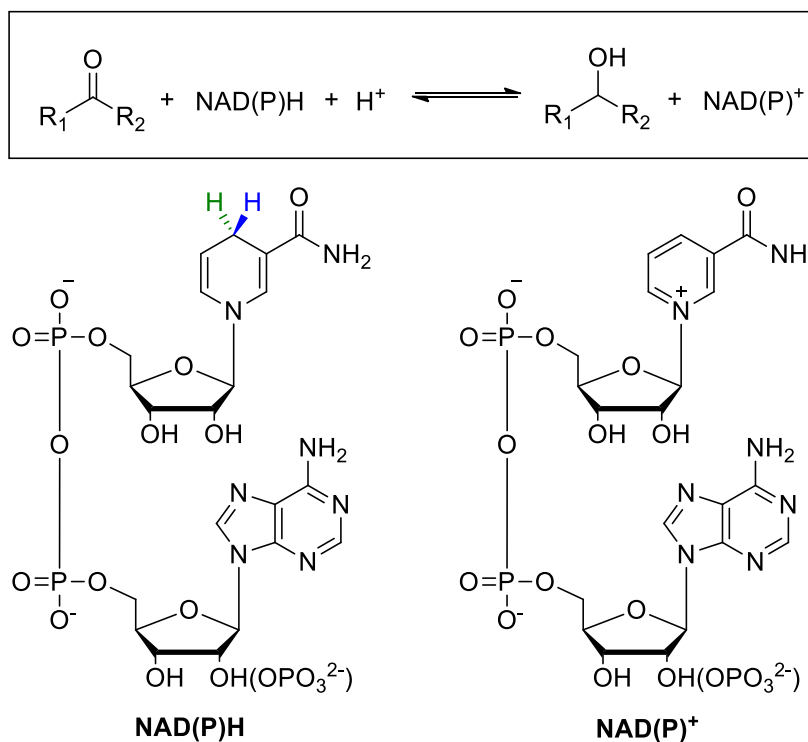
RODRÍGUEZ; KAYSER; STEWART, 1999; WOLFSON; DLUGY; TAVOR, 2013). Essas reduções são simples de execução, as células não são tóxicas nem patogênicas, são de baixo custo e prontamente disponíveis, já que são produzidas em larga escala para indústria de panificação, e a técnica é aplicável a uma ampla gama de compostos carbonílicos distintos. Além disso, as reduções geralmente são realizadas em soluções aquosas e o catalisador utilizado é inteiramente biodegradável, o que ajuda a minimizar o impacto ambiental das reações de redução em síntese orgânica.

2.2.2 Reduções enzimáticas de ligações C=O

Para aplicações industriais, o grupo de álcool desidrogenases (ADH), desidrogenases dependentes de nicotinamida (E.C. 1.1.1.1), também conhecido como cetorredutase (KRED) e carbonil redutases (CR), é de interesse primordial.

As ADHs são as enzimas mais amplamente usadas em redução de aldeídos e cetonas, e, de maneira simplificada catalisam a transferência de hidreto dos cofatores para o carbono carbonílico a ser reduzido (Esquema 5).

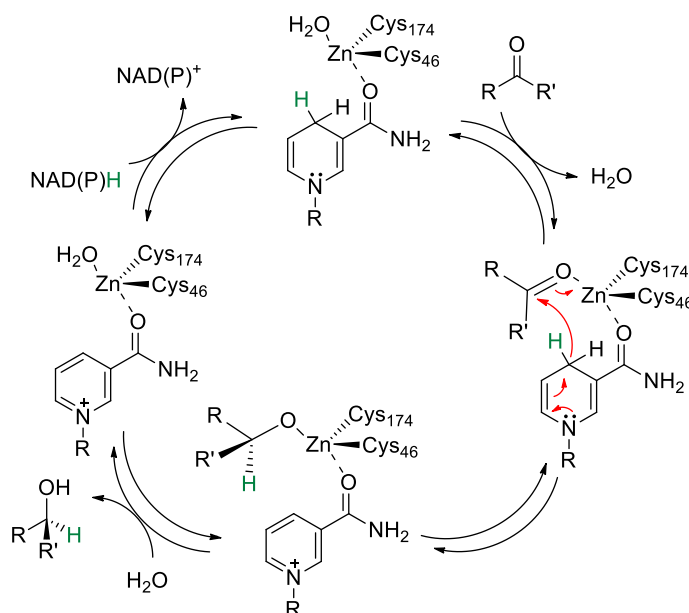
Esquema 5. Reduções de ligações C=O catalisadas por ADHs.



Uma vez oxidado a NAD(P)^+ , o NAD(P)H pode ser regenerado por uma via enzimática distinta. Por exemplo, dentro das células, o NAD(P)^+ pode ser regenerado na via glicolítica a partir da utilização de glicose (ou outros doadores de elétrons). Dessa forma, a regeneração do cofator não é um problema quando a reação é realizada com micro-organismos.

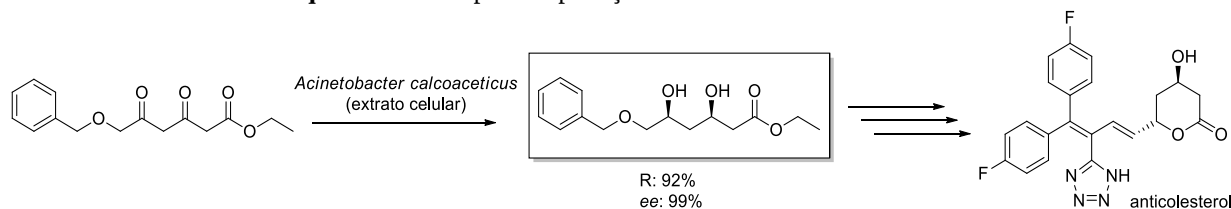
As ADHs dos micro-organismos *Saccharomyces cerevisiae*, *Thermoanaerobium brockii*, *Pseudomonas sp.*, *Bacillus sphaerisus*, são exemplos de ADHs disponíveis comercialmente, na realidade já existe um número significativo de ADHs que são comercializadas. Atualmente, aproximadamente 300 subclasses de ADH diferentes, presentes em milhares de organismos estão registradas, dando acesso a uma enorme variedade de substratos e produtos potenciais. Os substratos naturais dessas enzimas são álcoois tais como o etanol e o glicerol, e os compostos oxidados correspondentes. No entanto, cetonas não naturais também podem ser reduzidas enantiosseletivamente. Desta forma álcoois quirais, hidroxiácidos e seus ésteres ou aminoácidos, respectivamente, podem ser gerados (HOLLMANN; ARENDS; HOLTMANN, 2011).

O mecanismo proposto para a redução de ligação C=O por enzimas ADH é apresentado no Esquema 6. A primeira etapa do mecanismo proposto seria a ligação do substrato ao sítio ativo da enzima. Nesta etapa o oxigênio carbonílico do substrato complexa com o íon Zn^{2+} . A formação do complexo substrato-Zn resulta em uma maior densidade eletrônica em torno do oxigênio, como consequência o carbono carbonílico se torna parcialmente positivo (mais eletrofílico), ficando mais suscetível ao ataque nucleofílico do cofator. É importante ressaltar que os resíduos de aminoácidos do sítio ativo se projetam de forma que somente uma face do anel do cofator NAD(P)H fique acessível. Na segunda etapa da reação o par de elétrons disponível do nitrogênio presente na NAD(P)H se desloca no anel formando uma ligação dupla e liberando o íon hidreto para reestabelecer a aromaticidade. Uma vez que o anel é especificamente orientado, dos dois hidrogênios apenas o mais próximo do íon Zn^{2+} pode ser transferido na forma do íon hidreto. O íon hidreto realiza um ataque nucleofílico no carbono carbonílico do substrato reduzindo ao alcóxido. Na última etapa o ânion alcóxido é protonado por uma molécula de água complexada ao Zn^{2+} , formando o álcool como produto final da reação.

Esquema 6. Mecanismo simplificado proposto para a redução de ligação C=O por enzimas ADH.


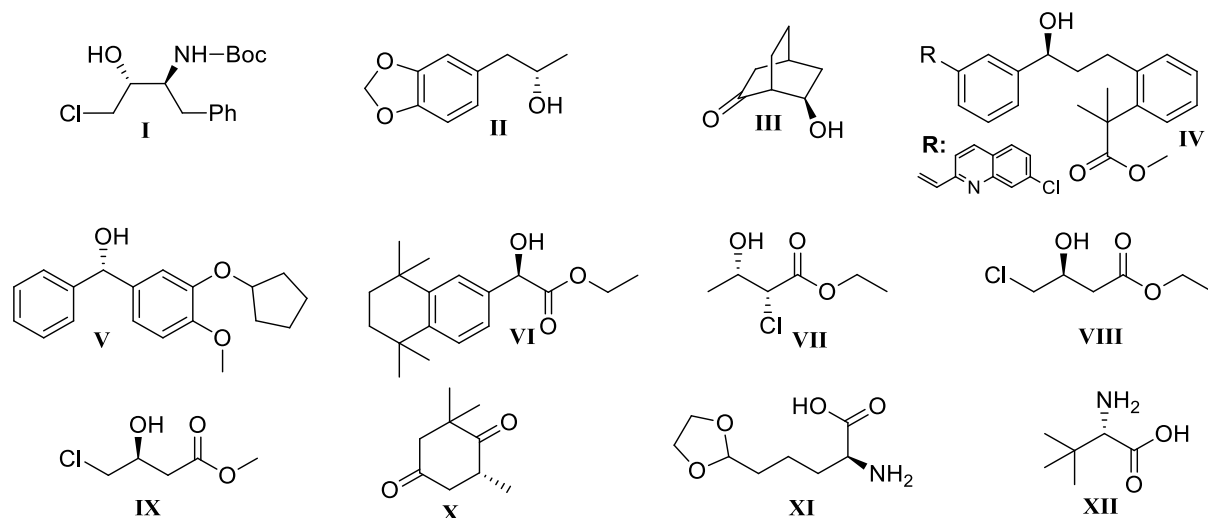
Fonte: Adaptado de Hollmann e colaboradores (HOLLMANN; ARENDS; HOLTSMANN, 2011).

A biorredução do 6-benziloxi-(3R,5S)-dioxoexanoato de etila (Esquema 7), desenvolvida pela indústria farmacêutica Bristol-Myers Squibb, é um processo importante porque permite a síntese do 6-benziloxi-(3R,5S)-diidroxixanoato de etila intermediário sintético de um inibidor da HMG-CoA redutase, utilizado para a diminuição dos níveis de colesterol no sangue. O processo químico para a obtenção do 6-benziloxi-(3R,5S)-diidroxixanoato de etila apresenta um rendimento global de 41%, enquanto o processo biocatalítico apresenta um rendimento de 92% e um excesso enantiomérico maior que 99% (SOLANO et al., 2012).

Esquema 7. Exemplo de aplicação industrial de cetorredutases.


Fonte: Adaptado de Solano e colaboradores (SOLANO et al., 2012).

Há uma grande quantidade deste tipo de reações descritas na literatura, a Tabela 3 apresenta exemplos industriais ou em escala preparativa de reduções catalisadas por células íntegras. Os exemplos apresentados na Tabela 3 mostram que muitos compostos estruturalmente diversos já são eficazmente reduzidos.

Tabela 3. Sínteses de produtos químicos finos por meio de biorreduções catalisadas por células íntegras.

Entrada	Produto	Biocatalisador	Parâmetros de produção	Fármaco	Empresa
1	I	<i>Rhodococcus erythropolis</i>	N.R. 95% rendimento 99% <i>ee</i>	Atazanavir (antirretroviral HIV)	Bristol-Myers squibb
2	II	<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>	kg 96% rendimento <i>ee_p</i> > 99%	Talampanel™ (benzodiazepínico)	Eli-Lilly and Company
3	III	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	100 g 97% rendimento <i>ee_p</i> > 99%	Antitumoral	Johanson y cols.
4	IV	<i>Microbacterium campoquemadoensis</i>	g N.R. <i>ee_p</i> > 99%	Montelukaste (antasma)	Merck & Co. Inc.
5	V	<i>Rhodotorula pilimanae</i>	16 g N.R. <i>ee_p</i> > 96%	Inibidor de fosfodiesterase (antasma)	Merck & Co. Inc.
6	VI	<i>Aureobasidium pullulans</i> SC 13849	5 g 99% rendimento <i>ee_p</i> > 97%	Moduladores de receptores de ácido retinóico	Bristol-Myers Squibb
7	VII	Rec. <i>E. coli</i> expressing enzyme from <i>P. finlandica</i>	4 g 50% rendimento <i>ee_p</i> > 98%	Anticolesterol	Lonza
8	VIII	<i>Escherichia coli</i>	300 g.L ⁻¹ 85% rendimento <i>ee_p</i> > 99%	Atorvastatina (cadeia lateral)	Kaneka Co.
9	IX	<i>Geotrichum candidum</i> SC 5469	Multi kg 95% <i>ee_p</i> > 99%	Atorvastatina (cadeia lateral)	Bristol-Myers Squibb
10	X	<i>E. coli</i> (<i>C. macedoniensis</i>)	5 g 87% rendimento <i>ee_p</i> = <97%	Carotenoides e vitaminas	Hoffmann- LaRoche
11	XI	<i>E. coli</i> (<i>Sporosarcina</i> <i>sp.</i>)	197 kg 91-97% yield <i>ee_p</i> > 98%	Omapatrilat (anti-hipertensivo)	Bristol-Myers Squibb
12	XII	<i>E. coli</i> (<i>T. intermedius</i>)	1 ton, 7 4% rendimento <i>ee_p</i> > 99%	Antitumoral Inibidor de endopeptidase de HIV	Degussa AG

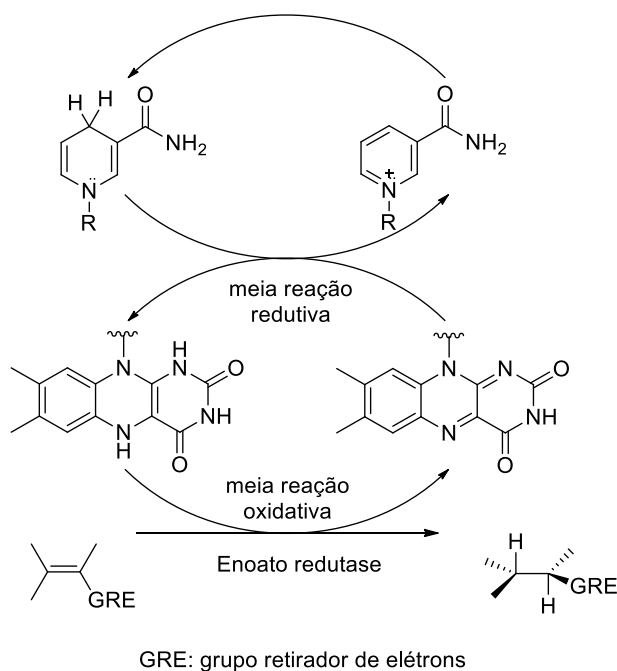
Fonte: Adaptado de Solano e colaboradores (SOLANO et al., 2012).

2.2.3 Reduções enzimáticas de ligações C=C

Os processos de hidrogenação assimétrica são importantes em síntese orgânica e muitas vezes são um passo crítico em uma síntese geral. A redução assimétrica das ligações C=C é uma ferramenta poderosa para a criação de até dois estereocentros. Tradicionalmente, tais reações são realizadas com catalisadores de metais de transição ou organocatalisadores (YANG et al., 2005). Uma abordagem alternativa para a redução assimétrica de ligações duplas C=C utiliza biocatalisadores da família *Old Yellow Enzyme* (OYE) (EC 1.6.99.1) (NESTL et al., 2014; WINKLER et al., 2012).

Os membros desta família, também referida como enoato redutases (ER), contêm um grupo prostético mononucleotídeo de flavina (FMN), que é responsável pela transferência de hidreto à ligação C=C, e são dependentes do cofator NAD(P)H. A reação ocorre em duas etapas: uma meia reação redutiva que envolve a redução do FMN pelo cofator NAD(P)H, e uma meia reação oxidativa que prossegue pela redução do alceno através da transferência de hidreto pelo FMN reduzido (Esquema 8). De maneira geral, como resultado, ocorre uma reação de *trans*-hidrogenação. Ainda assim, já foi relatada uma reação de *cis*-hidrogenação utilizando uma ER de *Nicotina tabacum*. Neste caso, no entanto, aparentemente a transferência de hidreto ocorre diretamente do cofator NAD(P)H (HOLLMANN; ARENDS; HOLTSMANN, 2011).

Esquema 8. Reduções de ligações C=C catalisadas por ERs.



Fonte: Adaptado de Nestl e colaboradores (NESTL et al., 2014)

Embora esta classe de enzimas seja conhecida há mais 75 anos, as ERs foram pouco exploradas como catalisadores sintéticos, sendo sua aplicação por muito tempo limitada às reações de redução mediadas por *Saccharomyces cerevisiae*. Possivelmente, isso se deve ao fato de que exemplos anteriores de ERs foram descritos a partir do micro-organismo anaeróbio *Clostridium*, sensível ao ar e, portanto, de difícil obtenção e manipulação. Especialmente graças ao trabalho recente de Faber e colaboradores, essa situação mudou completamente. Atualmente, várias ERs estáveis de diversas fontes estão disponíveis, inclusive em escala comercial. Os biocatalisadores preferidos para a redução enantiospecífica de ligações C=C são os micro-organismos *Saccharomyces cerevisiae* (OYE1-3), *Bacillus subtilis* (YqjM), *Lycopersicon Esculentum* (OPR 1-3) e *Zymomonas mobilis* (NCR) (HOLLMANN; ARENDS; HOLTMANN, 2011).

Em geral, esta classe de enzimas apresenta um escopo de substratos notavelmente amplo e catalisa a redução de diversos substratos estruturalmente distintos. Particularmente, aldeídos, cetonas e ácidos, bem como os seus derivados (ésteres, amidas e anidridos) α,β -insaturados representam os substratos mais frequentemente utilizados (STUERMER et al., 2007). Exemplos representativos de compostos quirais obtidos através de reduções de ligações duplas C=C (ligações em vermelho) enantiospecíficas catalisadas por ERs (células íntegras e enzimas isoladas) estão apresentados na Figura 2.

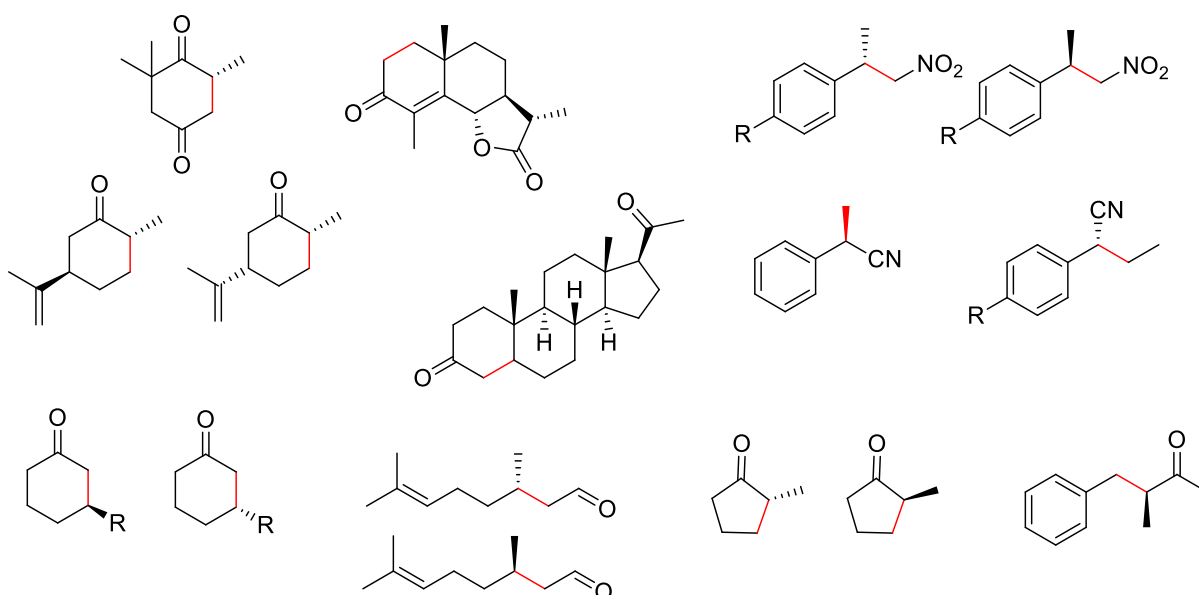


Figura 2. Exemplos representativos de compostos quirais obtidos através de reduções enantiospecíficas de ligações duplas C=C catalisadas por ERs (células íntegras e enzimas isoladas).

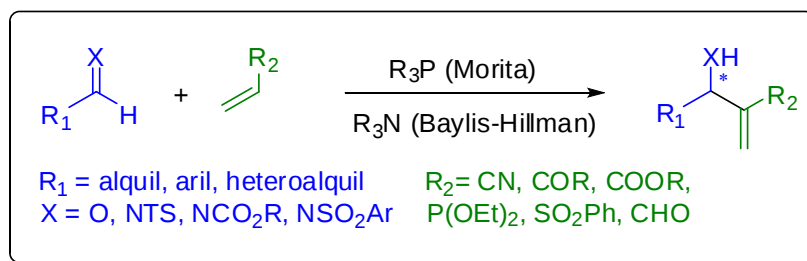
Fonte: Adaptado de Hollmann e colaboradores (HOLLMANN; ARENDS; HOLTMANN, 2011).

2.2.4 A Reação de Morita-Baylis-Hillman - Considerações gerais

A construção das ligações carbono-carbono (C-C) corresponde a um dos aspectos mais relevantes quando se considera o planejamento de uma rota sintética de qualquer complexidade. Desta forma, muita atenção tem sido dedicada à criação e ao desenvolvimento de reações químicas que promovam a formação de ligações C-C de maneira eficiente e estereosseletiva.

Dentre as diferentes metodologias para a formação de ligação C-C, a reação de Morita-Baylis-Hillman (MBH), é um dos processos mais eficientes e com maior economia de átomos, dessa forma, tornou-se uma das reações mais promissoras e com maior potencial de aplicação em síntese orgânica. O produto da reação de MBH é conhecido como aduto de MBH. Originalmente desenvolvida em 1968 pelo trabalho pioneiro de Morita (MORITA; SUZUKI; HIROSE, 1968) e, posteriormente, por Baylis e Hillman (BAYLIS; HILLMAN, 1972, 1973) em 1972, a reação corresponde à condensação de um carbono eletrofílico sp^2 , tipicamente aldeídos, e a posição α de uma olefina contendo um grupo retirador de elétrons, (Esquema 9), catalisada por uma amina terciária ou fosfina. Quando o grupo X é o N (tipicamente NTs) a reação é classificada como aza-MBH e os produtos são conhecidos como adutos de aza-MBH.

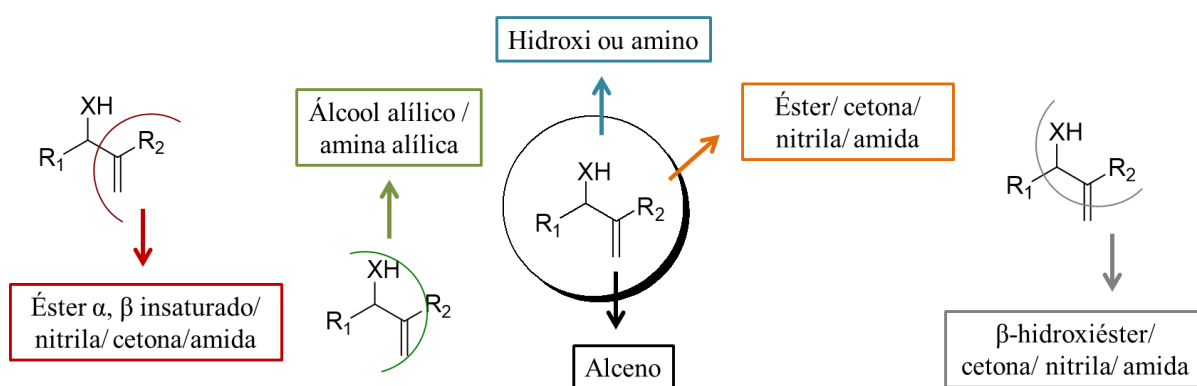
Esquema 9. Reação de Morita-Baylis-Hillman.



Especialmente nas últimas décadas a reação de MBH e suas aplicações têm recebido um notável interesse. O crescimento exponencial do número de artigos publicados sobre essa reação comprova a sua importância. O sucesso desta reação pode ser atribuído a: (i) os materiais de partida encontram-se comercialmente disponíveis e a reação é apropriada para produção em larga escala; (ii) elevada economia de átomos; (iii) flexibilidade possibilitando gerar uma ampla variedade de adutos estruturalmente distintos, além disso os adutos de MBH são compostos altamente funcionalizados sendo considerados importantes intermediários sintéticos; (iv) uso de organocatalisadores; (v) condições brandas de reação (BASAVAIAH; VEERARAGHAVAIAH, 2012; WEI; SHI, 2013).

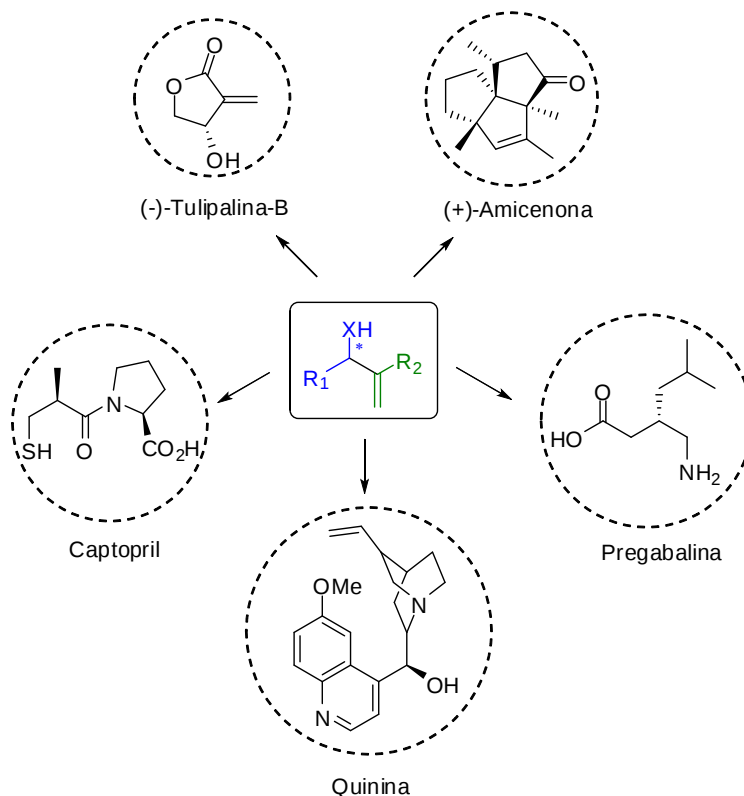
Os adutos de MBH são compostos altamente α,β funcionalizados, que contêm pelo menos três grupos funcionais próximos, sendo importantes intermediários sintéticos na produção de compostos bioativos como antimicrobianos, antitumorais, antifúngicos, hipolipidêmicos e leishmanicida (LIMA-JUNIOR; VASCONCELLOS, 2012). As diferentes perspectivas sobre a estrutura dessas moléculas polifuncionalizadas são apresentadas no Esquema 10 e explicam as inúmeras aplicações desses adutos nas mais diferentes sínteses (BASAVAIAH; VEERARAGHAIAH, 2012).

Esquema 10. Diferentes perspectivas sobre a estrutura dos adutos de MBH.



Todas essas perspectivas vêm sendo sistematicamente exploradas e diversas novas metodologias e estratégias para a obtenção de diferentes compostos, como compostos carbocíclicos, heterocíclicos e alcenos trissubstituídos vêm sendo desenvolvidas. Também existem na literatura inúmeros relatos do uso de adutos de MBH na síntese de diversos produtos naturais bioativos (Esquema 11).

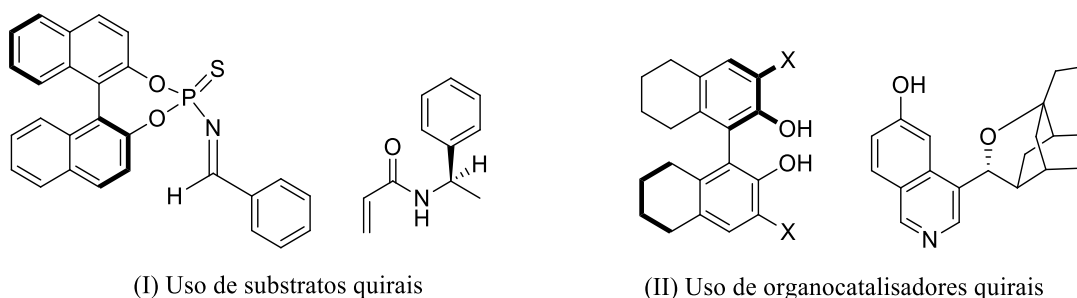
Esquema 11. Aplicação dos adutos de MBH na síntese de produtos naturais.



Embora os adutos de MBH já tenham sido extensivamente utilizados em uma infinidade de transformações sintéticas, os mesmos ainda oferecem uma margem enorme para o desenvolvimento e até mesmo a descoberta de novas transformações e estratégias em síntese orgânica.

Inúmeras estratégias sintéticas foram descritas na literatura para a formação de adutos de MBH, a partir de diferentes materiais de partida. Entretanto, as versões assimétricas desta reação ainda são pouco exploradas. As estratégias mais utilizadas para a obtenção do aduto de MBH quiral são: (I) o uso de substratos quirais (aldeídos ou cetonas quirais, acrilatos ou acrilamidas quirais) e (II) o uso de organocatalisadores quirais (BASAVAIAH; VEERARAGHAVIAH, 2012) (Esquema 12).

Esquema 12. Estratégias atuais para a obtenção dos adutos de MBH quirais.



A primeira estratégia torna o escopo da reação limitado, já que necessita de materiais de partida quirais que podem não ser de fácil acesso ou comercialmente disponíveis. Já a segunda é dependente do desenvolvimento de novos organocatalisadores quirais, isto é, da concepção, síntese e exploração de suas aplicações. Os organocatalisadores quirais atuais estão limitados a um pequeno número de substratos (HE et al., 2008).

Pfaltz e colaboradores recentemente relataram progressos no desenvolvimento de uma versão enantiosseletiva da reação de MBH. Os autores utilizaram espectrometria de massas, para realizar a triagem e a avaliação de catalisadores enantiosseletivos para a reação de MBH. Foi identificado o catalisador bifuncional (fosfina/tiouréia) como adequado para as condições reacionais. A metodologia testada se mostrou eficiente para a reação entre o acrilato de metila e aldeídos com características eletrônicas e estruturais distintas, fornecendo os adutos, de maneira geral com excessos enantioméricos moderados a ótimos (30 - 94%) (ISENEGGER; BÄCHLE; PFALTZ, 2016).

Apesar dos últimos avanços, ainda há grande necessidade de investigação de versões assimétricas, ambientalmente amigáveis e economicamente viáveis para a síntese de adutos de MBH quirais, biológica e/ou farmacologicamente ativos. Nesse contexto a Biocatálise pode ser aplicada na síntese dos adutos de MBH quirais de duas formas: na catálise enantiosseletiva da reação de MBH, e na biorredução enantiosseletiva dos adutos de MBH oxidados.

2.3 OBJETIVOS

2.3.1 Objetivo geral

Realizar a síntese assimétrica de moléculas bioativas, principalmente α -metil- β -hidroxiésteres, empregando células íntegras microbianas.

2.3.2 Objetivos específicos

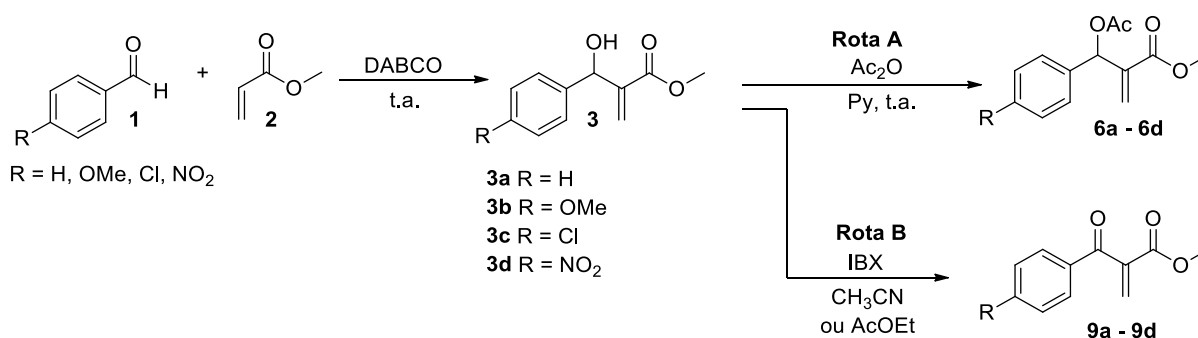
1. Realizar a síntese dos α -metileno- β -hidroxiésteres através da reação de MBH.
2. Realizar ensaios de triagens enzimáticas em micro-organismos da diversidade brasileira em busca de cetorredutases e enoato redutases enantiosseletivas a fim de produzir α -metil- β -hidroxiésteres;
3. Realizar a engenharia do meio reacional com o intuito de contribuir com o aumento no rendimento e enantiosseletividade das reações.

2.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

2.4.1 Planejamento sintético

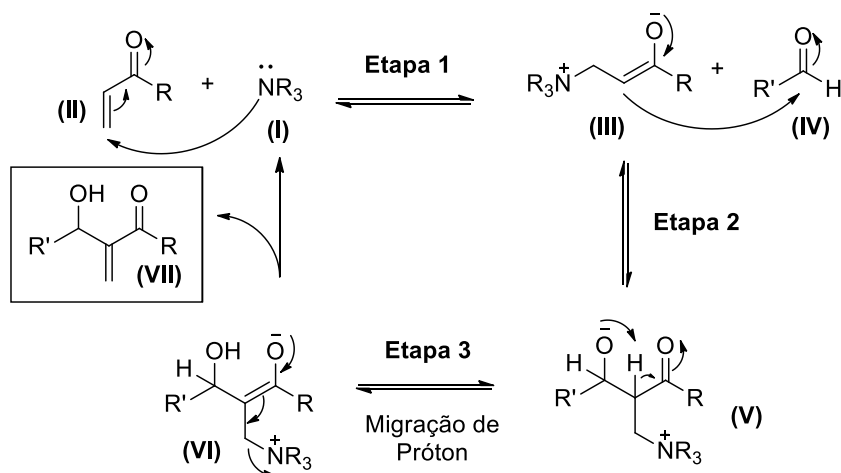
A abordagem sintética utilizada na preparação dos derivados dos adutos de MBH é apresentada no Esquema 13.

Esquema 13. Rotas sintéticas A e B para a obtenção de derivados dos adutos de MBH.



2.4.2 Síntese organocatalítica dos α -metileno- β -hidroxiéster

A reação de MBH constitui a primeira etapa da abordagem sintética proposta. O Esquema 14 apresenta um mecanismo inicialmente proposto para a reação (COELHO; ALMEIDA, 2000). A proposta mecanística apresentada no Esquema 14 foi embasada nos trabalhos publicados por Hoffman e por diferentes grupos de pesquisa, correspondendo a uma versão amina catalisada (FORT; BERTHE; CAUBERE, 1992), (DREWES; ROOS, 1988) (HOFFMANN; RABE, 1983). A primeira etapa do mecanismo dessa reação, considerada a etapa determinante, é a adição de Michael da amina terciária (**I**) ao sistema α,β -insaturado (**II**) levando ao azaenolato zwitteriônico (**III**). Subsequentemente, uma adição aldólica envolvendo o azaenolato (**III**) e o aldeído (**IV**) produz o *zwitterion* (**V**) que após migração interna do próton e eliminação do catalisador fornece o produto α -metileno- β -hidroxiéster (**VII**) (aduto de MBH).

Esquema 14. Mecanismo inicialmente proposto para a reação de MBH.

O mecanismo da reação de MBH ainda não está completamente elucidado, dessa forma diversos grupos de pesquisa têm dedicado esforços a este tema, com o intuito de otimizar uma condição experimental para a reação, diminuir os tempos reacionais e principalmente, estabelecer uma versão assimétrica eficiente (COELHO; ALMEIDA, 2000).

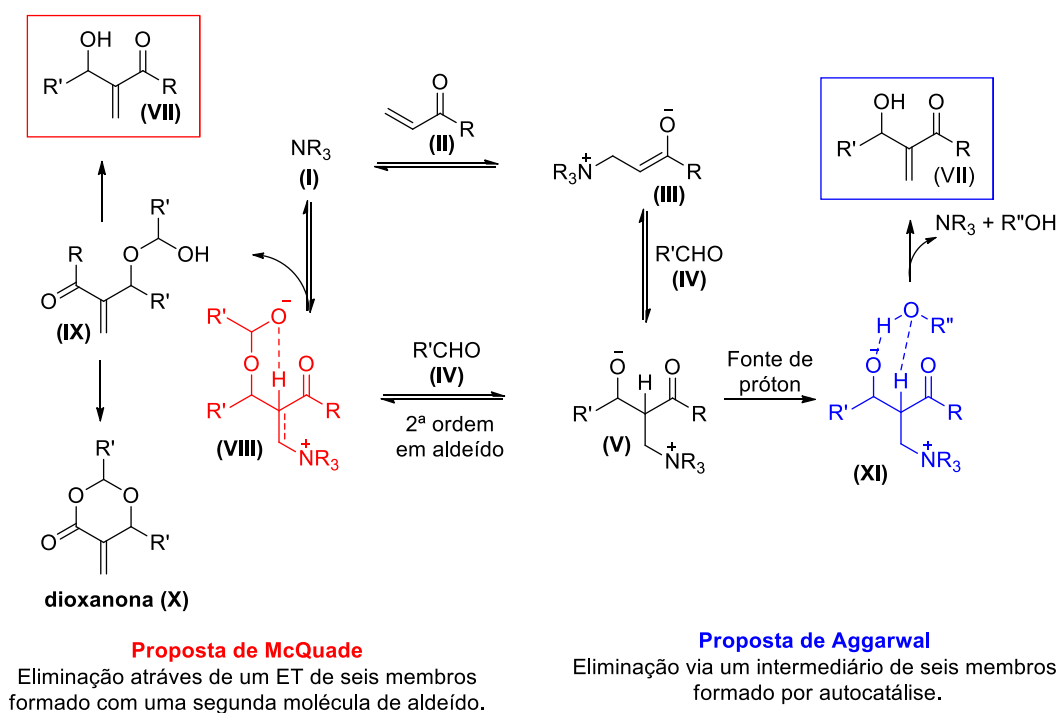
Em 1990, Jonathan S. Hill e Neil S. Isaacs (HILL; ISAACS, 1990) reportaram o primeiro estudo a respeito do mecanismo da reação de MBH, entre outras contribuições os autores atribuíram a adição aldólica como a etapa lenta do processo.

No ano de 2005, os pesquisadores D. Tyler McQuade e Varinder Aggarwal reportaram em trabalhos independentes inéditos, estudos cinéticos e teóricos com o objetivo de promover o esclarecimento das etapas chaves do mecanismo da reação. As evidências observadas pelos autores sugeriram que a etapa da abstração do próton seria a etapa determinante da velocidade da reação, e não a etapa de adição aldólica como havia sido sugerido nos estudos anteriores.

McQuade e colaboradores, reportaram um efeito isotópico cinético de primeira ordem significativo para a etapa de abstração do próton na posição α -carbonila e propuseram, desta maneira, que a etapa determinante da velocidade da reação não seria a etapa de adição aldólica. Os autores adicionalmente propuseram que a reação seria de segunda ordem em relação ao aldeído. Os estudos mostraram que o alcóxido (V) atacaria um segundo equivalente de aldeído formando um intermediário do tipo hemiacetal (VIII). O intermediário (VII) torna mais fácil a etapa de transferência de próton intramolecular via a formação de um estado de transição de seis membros que após decomposição leva a formação do aduto de MBH (Esquema 15) (DREWES et al., 1990), (PRICE et al., 2005), (PRICE et al., 2005).

Aggarwal e colaboradores publicaram evidências que se mostraram complementares ao trabalho anterior de McQuade e colaboradores. Os autores propuseram que a reação ocorria inicialmente como havia sido sugerido por McQuade e colaboradores, entretanto após aproximadamente 20% de conversão a reação seguiria por um caminho onde seria auto-catalisada, o próprio aduto de MBH poderia funcionar como catalisador, agindo como uma fonte de próton. Assim sendo, o H do aduto de MBH é abstraído pelo alcóxido (V) e simultaneamente o aduto de MBH abstrai o hidrogênio α -carbonila, gerando o intermediário (XI) através de um estado de transição cíclico de seis membros (Esquema 15) (ROBIETTE; AGGARWAL; HARVEY, 2007).

Esquema 15. Proposta mecanística baseada nos estudos de McQuade e Aggarwal.

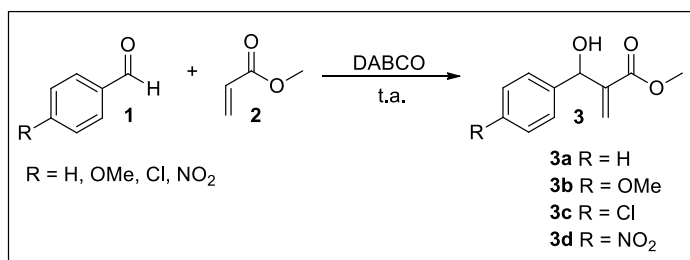


Fonte: Adaptado de Coelho e colaboradores (AMARANTE et al., 2009).

Em 2009, Coelho e colaboradores (AMARANTE et al., 2009), através de estudos utilizando espectrometria de massas, reportaram a identificação e caracterização estrutural dos intermediários chaves para a determinação da velocidade da reação, intermediário **VIII** (proposto por McQuade) e do intermediário **XI** (proposto por Aggarwal) no ciclo catalítico. Dessa forma, os autores chegaram à conclusão que as evidências experimentais obtidas sugerem que a reação de MBH apresenta um caráter dualístico, ou seja, pode acontecer através de dois intermediários distintos.

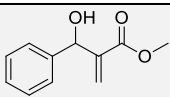
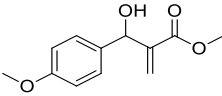
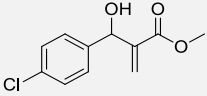
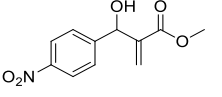
O aduto de MBH é o precursor comum das rotas sintéticas propostas. Os adutos foram preparados empregando uma metodologia já descrita da literatura (Esquema 16) (COELHO et al., 2002). Nesta o aldeído é colocado na presença de um excesso de acrilato de metila, que também possui a função de solvente da reação, e o 1,4-diazabicyclo[2.2.2]octano (DABCO) é empregado como catalisador.

Esquema 16. Reação de Morita-Baylis-Hillman.



Aldeídos aromáticos com diferentes substituintes na posição *para* do anel aromático foram utilizados. Os tempos reacionais variaram de acordo com a natureza do substituinte do anel. Aldeídos com substituintes retiradores de elétrons reagiram mais rapidamente, já que os grupos retiradores na posição *para* do anel aromático deixam a carbonila deficiente em elétrons (maior eletrofilicidade) favorecendo a reação de adição aldólica (Esquema 14, Etapa 2). Os maiores tempos reacionais são observados em aldeídos substituídos por grupos doadores de elétrons, já que os grupos doadores de elétrons deixam a carbonila menos deficiente em elétrons, desfavorecendo a etapa de adição aldólica diminuindo a taxa de velocidade da reação. Os dados referentes a tempos reacionais, conversões e rendimentos para os adutos sintetizados estão apresentados na Tabela 4.

Tabela 4. Adutos de Morita-Baylis-Hillman sintetizados.

Entrada ^a	Aduto de MBH	Tempo	Rendimentos (%) ^b
1	3a 	18 dias	86
2	3b 	30 dias	64
3	3c 	7 dias	96
4	3d 	4 horas	83

^a1 eq. de aldeído, 5 eq. de acrilato de metila, 0,65 eq. de DABCO, t.a.. ^b Rendimentos isolados após purificação. Conversão determinada por análise de GC-FID.

Os rendimentos obtidos foram de bons a excelentes (64-96%) e a formação dos adutos foi comprovada através da caracterização dos compostos por espectroscopia de absorção na região do infravermelho (IV), cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massas (GC-MS) e ressonância magnética nuclear (RMN) de ^1H e ^{13}C .

O espectro de IV dos adutos sintetizados apresenta sinais característicos importantes para a identificação dessas moléculas. Uma banda larga é observada entre 3342 - 3442 cm^{-1} referente ao estiramento O-H da hidroxila. Entre 1708 - 1712 cm^{-1} observamos a banda atribuída ao estiramento da carbonila da porção éster dos adutos de MBH.

No espectro de RMN de ^1H observa-se a ausência do sinal em $\sim 10,0$ ppm atribuído ao H do aldeído e a presença de sinais característicos a todos os adutos de MBH: dois simpletos na região de 5,83 - 6,35 ppm atribuídos aos hidrogênios metilênicos da ligação dupla e um duplete entre 5,52 - 5,64 ppm referente ao hidrogênio ligado ao carbono carbinólico, observa-se outro duplete referente ao hidrogênio da hidroxila. O simpleto referente a metoxila do acrilato também é observado entre 3,72 - 3,73 ppm. Ainda são observados sinais na região entre 6,86 - 8,23 ppm referentes ao anel aromático.

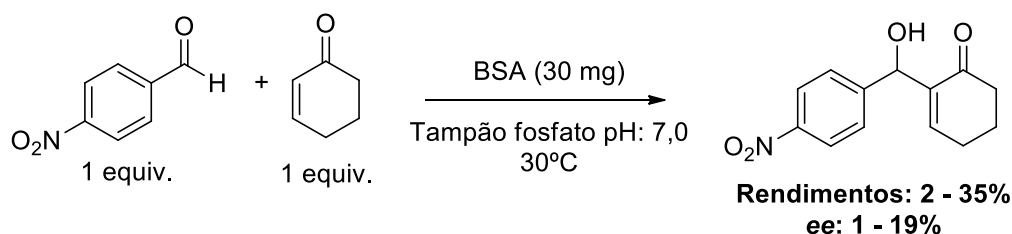
O espectro de ^{13}C caracteriza-se por apresentar sinais nas regiões de 72,9 - 73,4 ppm e ~ 125 ppm referentes ao carbono carbinólico e metilênico, respectivamente. O sinal referente à carbonila da porção éster é observado entre 166,5 - 167,0 ppm.

2.4.3 Síntese biocatalítica dos α -metileno- β -hidroxiéster

A reação de MBH é comumente catalisada por nucleófilos tais como fosfinas terciárias ou aminas, contudo, enzimas ou proteínas podem ser aplicadas como catalisadores desta reação.

Reetz e colaboradores (REETZ; MONDIÈRE; CARBALLEIRA, 2007) reportaram pela primeira vez a ação de diferentes proteínas na catálise da reação de MBH. Foram observadas baixas conversões quando se utilizou lipases e esterases como catalisadores (menos do que 10%) e conversões moderadas quando o biocatalisador utilizado foi a albumina de soro bovino (BSA) (35%). Foram observados excessos enantioméricos menores ou iguais a 19% (Esquema 17).

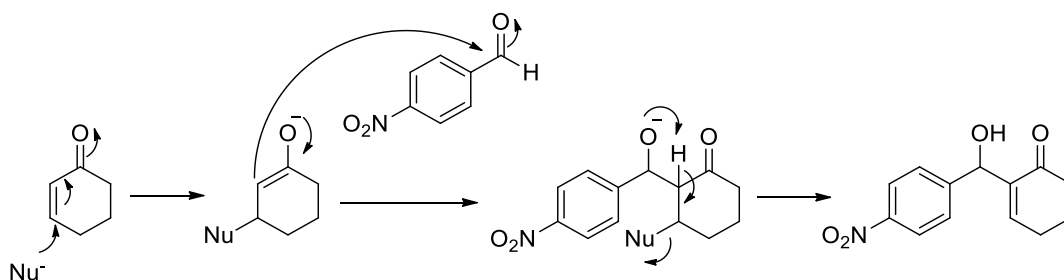
Esquema 17. Reação de MBH biocatalisada pela BSA.



Fonte: Adaptado de Reetz e colaboradores (REETZ; MONDIÈRE; CARBALLEIRA, 2007).

O mecanismo apresentado por Reetz e colaboradores (REETZ; MONDIÈRE; CARBALLEIRA, 2007), Esquema 18, propõem que diferentes porções nucleofílicas das cadeias laterais dos aminoácidos presentes nas proteínas poderiam vir a atuar como centros cataliticamente ativos. Os autores citam aminoácidos como a lisina, o grupo amino poderia funcionar como nucleófilo, histidina, o grupo imidazol seria o nucleófilo neste caso, e a serina, cuja a função álcool poderia desempenhar a função catalítica nesta reação.

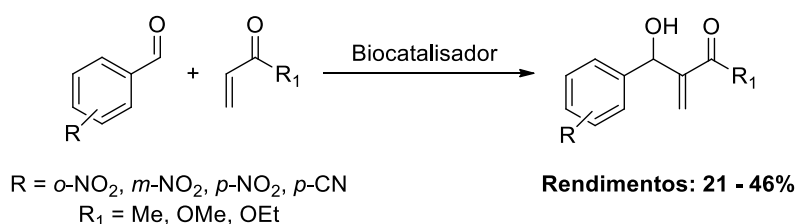
Esquema 18. Mecanismo proposto para catálise proteica da reação de MBH.



Fonte: Adaptado de Reetz e colaboradores (REETZ; MONDIÈRE; CARBALLEIRA, 2007).

Em 2014, Jiang e Yu (JIANG; YU, 2014) relataram a reação entre o *p*-nitrobenzaldeído e a metil-vinil-cetona catalisada pela enzima BioH esterase de *Escherichia coli* com um rendimento de 46%, outros quatro aldeídos e três alcenos foram testados afim de se determinar o escopo de substratos aceitos pela enzima. As estruturas de nove produtos obtidos foram confirmadas pela RMN de ^1H e os rendimentos dos produtos variaram de 21 a 46% (Esquema 19).

Esquema 19. Reação de MBH catalisada por BioH esterase de *Escherichia coli*.



Fonte: Adaptado de Jiang e Yu (JIANG; YU, 2014).

A reação modelo escolhida para a avaliação da capacidade catalítica dos biocatalisadores foi a reação entre o 4-nitrobenzaldeído e o acrilato de metila. Os biocatalisadores triados foram a proteína albumina de soro bovina (BSA), a lipase *Candida antarctica* do tipo B (CAL-B) livre e imobilizada (Novozym 435), a lipase de *Burkholderia cepacia* (BCL) e a levedura *Saccharomyces cerevisiae*. Foi realizado um experimento branco, sem a utilização de nenhum catalisador, e um experimento com o organocatalisador DABCO que é o catalisador tradicional para esta reação. Os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 5.

Tabela 5. Reação de MBH do *p*-nitrobenzaldeído e acrilato de metila (bio)catalisada.

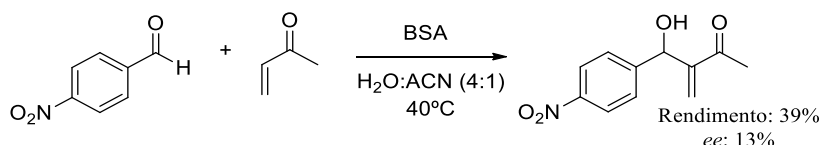
Entrada	(Bio)catalisador	Tempo (h)	Conversão (%)
1	BSA	120	-
2	BCL ^a	120	-
3	Novozym 435	120	-
4	Lipase CAL-B	120	-
5	<i>S. cerevisiae</i> ^b	120	-
6	-	120	-
7	DABCO ^c	4	90

Condições experimentais: 1 mL acetonitrila, 0,1 mmol aldeído, 0,5 mmol acrilato de metila, 30 mg biocatalisador; 30 °C. a) Temperatura: 65 °C b) 100 mg de *S. cerevisiae* c) 0,65 equiv. de DABCO.

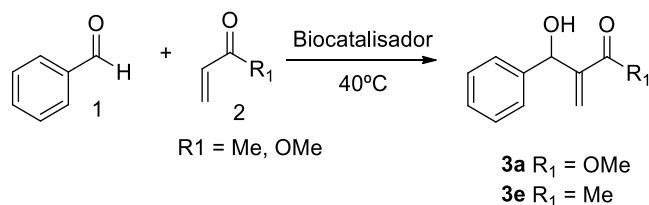
Para todos os biocatalisadores triados não foi observado o consumo do material de partida ao final do tempo reacional de 120 horas.

Nosso grupo desenvolveu uma otimização na condição experimental para a reação de MBH biocatalisada. Foram avaliados parâmetros como: o aumento da temperatura (40 °C); substituição do sistema de solvente (água destilada e acetonitrila em uma proporção de 4:1); além da estequiometria dos reagentes utilizada. A reação modelo foi a reação entre o *p*-nitrobenzaldeído e a metil-vinil-cetona, e o biocatalisador testado foi a BSA. Os resultados obtidos foram promissores. O aduto de MBH foi obtido com um rendimento de 39%, bem próximo aos rendimentos relatados na literatura para essa reação, e foi observado um modesto excesso enantiomérico de 13% (Esquema 20).

Esquema 20. Reação de MBH otimizada.



Afim de estudar e expandir o escopo desta nova condição experimental foram selecionadas duas reações modelos: a reação entre o benzaldeído e o acrilato de metila e a reação entre o benzaldeído e a metil-vinil-cetona. Foram testados como biocatalisadores a levedura *S. cerevisiae* e dois micro-organismos (*Candida shehatae* var. *insectosa* e N12AP2) que foram triados pelo grupo e apresentam alta atividade para hidrolases. Os dois micro-organismos fazem parte da coleção de micro-organismos do Centro de Estudos de Insetos Sociais (CEIS) e foram isolados de insetos sociais e de reservatório de água de bromélias, os mesmos foram utilizados como células inteiras liofilizadas (WLC) ou como extrato celular (CE). Os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 6.

Tabela 6. Reação de MBH biocatalisada.


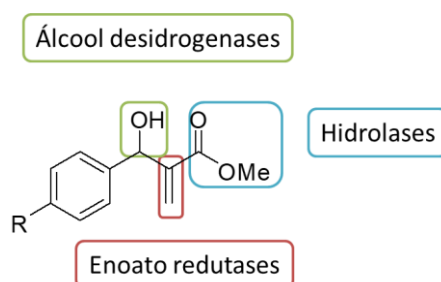
Entrada	Biocatalisador	Conversão (%) - 3a	Conversão (%) - 3e
1	<i>Candida shehatae</i> var. <i>insectosa</i> (WLC)	-	-
2	N12AP2 (WLC)	-	-
3	<i>Candida shehatae</i> var. <i>insectosa</i> (CE)	-	-
4	N12AP2 (CE)	-	-
5	<i>S. cerevisiae</i> ^b	-	-
6	-	-	-

Condições experimentais: 800 μL H_2O , 200 μL acetonitrila, 0,1 mmol aldeído, 0,1 mmol acrilato de metila ou metil-vinil-cetona, 40 $^\circ\text{C}$, 30 mg de biocatalisador, 20 mg de glicose. Tempo reacional: 30 dias.

Novamente para todos os biocatalisadores triados não foi observada a formação do produto, sendo o material de partida completamente recuperado ao final dos 30 dias. Os resultados obtidos até o momento são resultados preliminares, novos esforços, neste sentido, estão sendo investidos pelo Grupo Milagre.

2.4.4 Triagem dos micro-organismos para diferentes atividades enzimáticas

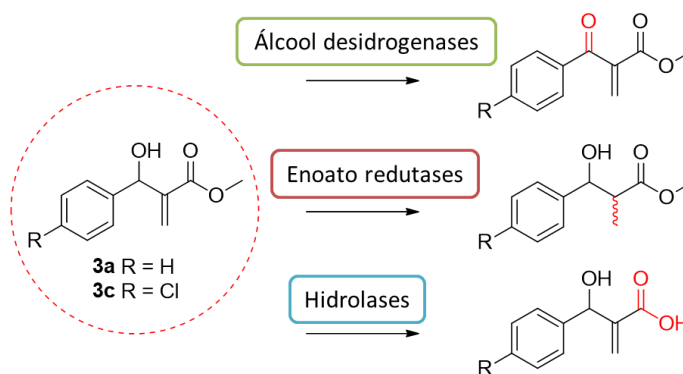
Os α -metileno- β -hidroxiésteres **3a** - **3d** são moléculas altamente polifuncionalizadas que apresentam três grupos funcionais adjacentes. Essa característica torna os α -metileno- β -hidroxiésteres reativos frente a diferentes enzimas, como álcool desidrogenases (EC 1.1.1.X), enoato redutases (EC 1.6.99.1) e hidrolases (EC 3.1.1.X) (Figura 3).


Figura 3. Reatividade dos α -metileno- β -hidroxiésteres frente a diferentes enzimas.

Fonte: o autor.

Nesse contexto foi realizada uma triagem enzimática para se avaliar o potencial dos micro-organismos para reações de oxidação (álcool desidrogenases), redução (enoato redutase) e hidrólise (hidrolases) dos α -metileno- β -hidroxiésteres **3a** e **3c** (Esquema 21).

Esquema 21. Representação esquemática simplificada para as reações de oxidação, redução e hidrólise dos α -metileno- β -hidroxiésteres **3a** e **3c**.



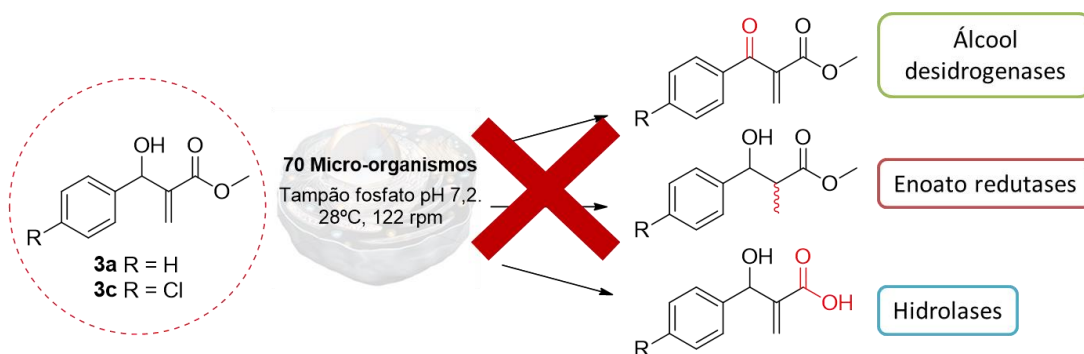
Os ensaios de triagem enzimática para detecção de álcool desidrogenases, enoato redutases e hidrolases foram realizados em formato miniaturizado, em placas *deep well* de 96 poços, com volume final de 1 mL. As principais vantagens do ensaio em formato miniaturizado são o reduzido consumo de reagentes e, por consequência, a pequena quantidade de resíduos gerados, redução de tempo e custo, e aumento na segurança do experimento.

Para a realização do ensaio de triagem enzimática, inicialmente 10 mL de meio GYMP foram autoclavados por 15 minutos a 121 °C e 1,1 atm. Após resfriamento foram inoculados 3 mL de suspensão de micro-organismo e este meio permaneceu a 28 °C por 20 horas sob agitação orbital (156 rpm). A suspensão microbiana foi transferida para um tubo falcon de 15 mL e centrifugada por 15 min a 3200 rpm, a fase aquosa foi descartada e a biomassa (após pesagem) foi ressuspensa em tampão Sorensen 100 mM (pH 7,1) contendo 1% de glicose até uma concentração de célula de 250 mg/mL. Adicionou-se à placa *deep well* – 96 poços 1 mL da suspensão celular e em seguida 1mg do material de partida – α -metileno- β -hidroxiésteres **3a** ou **3c**. A reação foi mantida em agitação orbital em um shaker (156 rpm) por 48 horas. Todas as reações foram conduzidas sob condições aeróbicas. Ao final do tempo estipulado a suspensão celular foi centrifugada e a fase aquosa extraída 2 vezes com acetato de etila, as fases orgânicas foram combinadas, secas com MgSO₄ e analisadas por GC-FID.

Ao todo foram testados 70 micro-organismos, 21 micro-organismos provenientes da biblioteca de micro-organismos do Grupo Milagre do IQ/UNESP, 42 micro-organismo da

Coleção de Micro-organismos do Centro de Estudos de Insetos Sociais (CEIS), e 7 micro-organismos comerciais adquiridos da Fundação André Tosello (Esquema 22).

Esquema 22. Triagem dos micro-organismos para diferentes atividades enzimáticas.



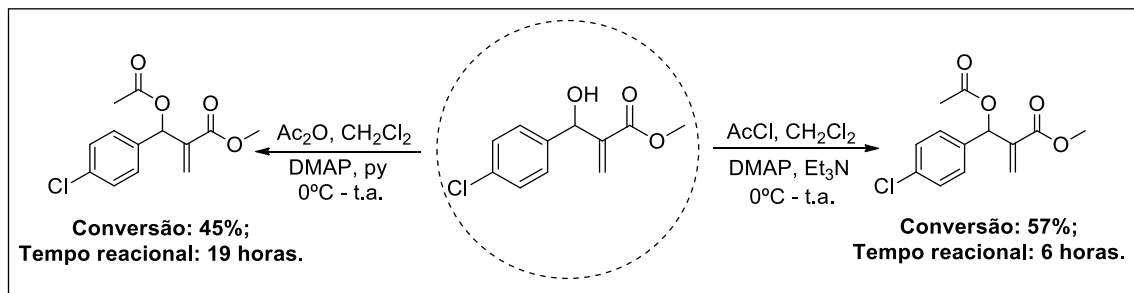
Os micro-organismos testados não foram capazes de converter os substratos, e dessa forma não se observou nenhum *hit* positivo na triagem enzimática. Triagens enzimáticas em micro-organismos selvagens nem sempre apresentam *hits* positivos, dessa forma o resultado obtido não foi totalmente inesperado.

2.4.5 Preparação dos α -metileno- β -acetoxiésteres – Rota A

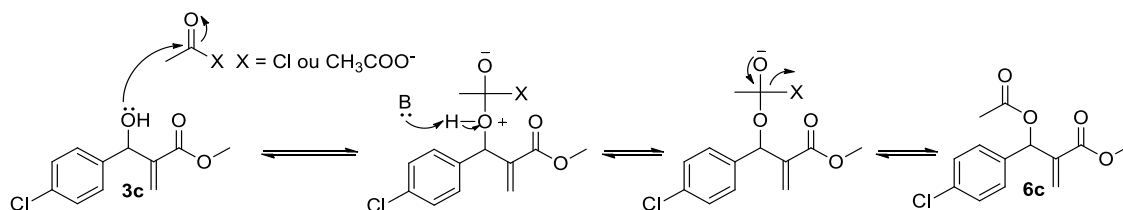
Após a síntese e caracterização dos adutos de MBH, a etapa seguinte foi uma reação de acetilação do α -metileno- β -hidroxiéster **3c**, segunda etapa da rota A.

Inicialmente a metodologia utilizada foi a reação de acetilação utilizando anidrido acético, 4-dimetilaminopiridina (DMAP) como catalisador e piridina em diclorometano anidro sob atmosfera inerte (Esquema 23). Através de análise por cromatografia gasosa com detector de ionização em chama (GC-FID) observou-se uma baixa conversão para o α -metileno- β -acetoxiéster **6c**, cerca de 45%, e o material de partida, **3c**, não foi completamente consumido após 19 horas de reação.

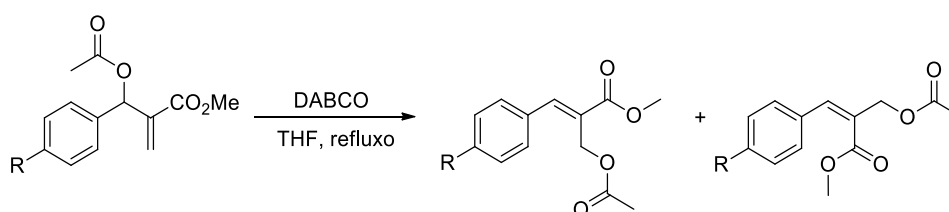
Desta forma uma segunda metodologia foi avaliada. O α -metileno- β -hidroxiéster **3c** foi submetido a reação de acetilação, utilizando-se cloreto de acetila, DMAP (cat.), trietilamina (Et_3N) em diclorometano anidro (Esquema 23). O produto α -metileno- β -acetoxiésteres **6c** foi isolado após 6 horas em um rendimento de 57%.

Esquema 23. Preparação do α -metileno- β -acetoxiésteres **6c**.

Comparando-se as duas metodologias testadas, temos que o cloreto de acetila é mais reativo frente ao ataque nucleofílico que o anidrido acético, isto por que em uma reação de substituição nucleofílica acílica o mecanismo se divide em duas etapas: formação e quebra do intermediário tetraédrico (Esquema 24). Quanto mais fraca for a base ligada ao grupo acila, mais facilmente ocorrem as duas etapas da reação. Ou seja, a reatividade do derivado de ácido carboxílico depende da basicidade do seu substituinte ligado ao grupo acila. Quanto menor a basicidade do substituinte, maior a reatividade do derivado de ácido carboxílico.

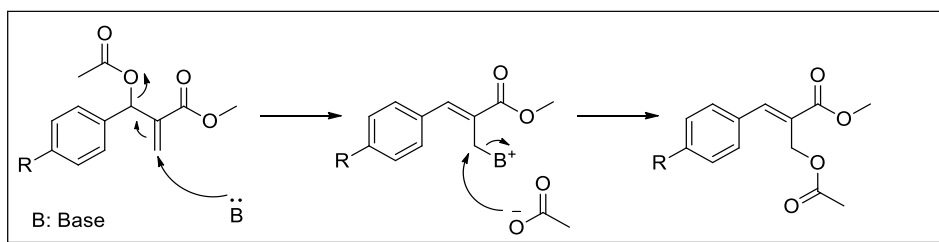
Esquema 24. Mecanismo proposto para a formação do α -metileno- β -acetoxiésteres **6c**.

Nas duas metodologias testadas, observamos a formação de um subproduto indesejado. Após análise de GC-MS o subproduto foi identificado como um isômero constitucional do produto desejado. O produto de isomerização já foi relatado na literatura, por Emslie e Mason (MASON; EM, 1994), Esquema 25.

Esquema 25. Reação de isomerização dos α -metileno- β -acetoxiésteres.

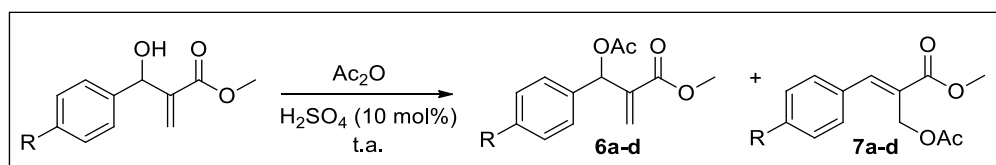
A reação de isomerização é catalisada pelo excesso de base, no Esquema 26, é proposto um possível mecanismo para a reação, numa primeira etapa ocorre o ataque nucleofílico da base ao carbono eletrofílico da ligação dupla C=C do α -metileno- β -hidroxiéster com consequente eliminação do grupo acetoxi, numa segunda etapa ocorre o ataque nucleofílico do grupo acetoxi, com concomitante eliminação da base e formação do isômero α -metileno- α -acetoxiéster 7.

Esquema 26. Mecanismo proposto para a formação do α -metileno- α -acetoxiéster 7.



Diante dos resultados insatisfatórios obtidos, uma nova metodologia foi testada para a reação de acetilação dos α -metileno- β -hidroxiésteres utilizando anidrido acético em excesso e ácido sulfúrico como catalisador. O anidrido acético em excesso funciona com solvente da reação (Tabela 7).

Tabela 7. Nova metodologia para a preparação dos α -metileno- β -acetoxiésteres **6a - d**.



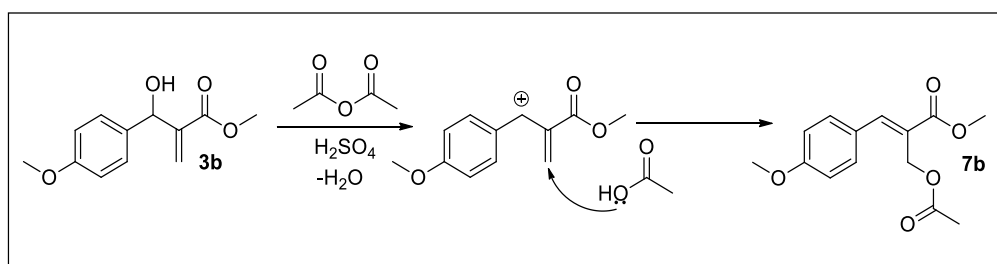
Entrada ^a	Aduto de MBH	Conversão 6 [Rend.] (%) ^b	Conversão 7 [Rend.] (%) ^b	Rendimentos Lit. (%) ^c
1	 3a	100 [75]	-	81
2	 3b	-	100 [80]	-
3	 3c	100 [86]	-	-
4	 3d	100 [95]	-	-

^a1 eq. MBH, 10 eq. de anidrido acético e 0,1 eq. de ácido sulfúrico. ^b Conversão determinada por GC - FID.

^cLiteratura

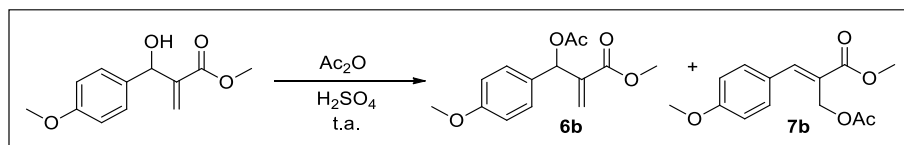
Para os α -metileno- β -hidroxiésteres **3a**, **3c** e **3d** os tempos reacionais foram de proximamente 5 minutos, as conversões foram de 100% e os rendimentos ficaram entre 75 - 95%. Para o α -metileno- β -hidroxiéster **3b** a reação foi instantânea e foi observada a conversão completa do material de partida para o isômero α -metileno- α -acetoxiéster **7b**. No Esquema 27, é proposto um possível mecanismo via formação de um carbocátion alílico, para a obtenção do α -metileno- α -acetoxiéster **7b**. O α -metileno- β -hidroxiéster **3b** possui um grupo substituinte metóxi na posição *para* do anel aromático. O substituinte metóxi, doador de elétrons, estabiliza por ressonância o carbocátion alílico formado, favorecendo a formação do α -metileno- α -acetoxiéster **7**.

Esquema 27. Mecanismo proposto para a formação do α -metileno- α -acetoxiéster **7b**.



O α -metileno- α -acetoxiéster **7b** foi caracterizado por análise de RMN de ^1H , no espectro observa-se o sinal característico da acetilação, um simpleto em 2,12 ppm referente aos 3 hidrogênios da metila do grupo acetila, um simpleto, integrado para 2 hidrogênios, em 4,98 referente ao grupo metileno e ainda um simpleto, integrado para 1 hidrogênio em 7,94 referente ao hidrogênio na posição α ao anel aromático. Os sinais observados tiveram seus deslocamentos químicos bem próximos aos observados na literatura (MASON; EM, 1994), é importante ressaltar também que os deslocamentos químicos observados são bem diferentes dos deslocamentos químicos observados para os adutos de MBH acetilados.

Para o α -metileno- β -hidroxiéster **3b** foram testadas mais duas condições, na primeira (Entrada 2, Tabela 8) não foi adicionado ao meio reacional nenhum catalisador e o número de equivalentes de anidrido acético utilizado foi metade da condição anterior (Entrada 1, Tabela 8), e após 3 dias observou-se uma conversão de 41% para o α -metileno- β -acetoxiéster desejado (**6b**). Uma segunda metodologia foi testada (Entrada 3, Tabela 8), utilizando-se novamente metade do número de equivalentes de anidrido acético e desta vez metade do número de equivalentes de ácido da condição anterior (Entrada 1, Tabela 8), após 12 horas observou-se o consumo total do material de partida e as conversões de 55 e 45% para o α -metileno- β -acetoxiéster **6b** e o isômero **7b** respectivamente.

Tabela 8. Condições reacionais testadas para a obtenção do α -metileno- β -acetoxiéster **6b**.

Entrada	Equiv. Ac ₂ O (mmol)	Equiv. H ₂ SO ₄ (mmol)	Conversão 6 (%) ^a	Conversão 7 (%) ^a
1 ^b	10	0,1	-	100
2 ^c	5	-	41	-
3 ^d	5	0,05	55	45

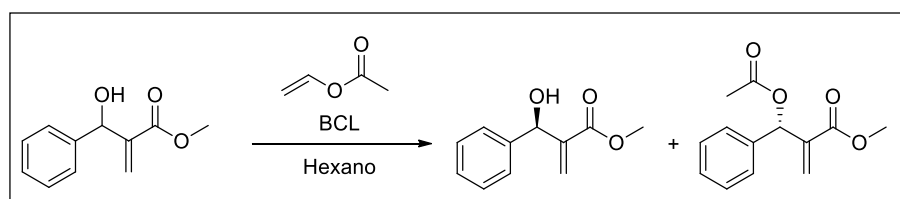
^a Conversão determinada por GC - FID. ^b Tempo reacional: 5 min. ^c Tempo reacional: 12 horas. ^d Tempo reacional: 3 dias.

A caracterização dos compostos **6a** - **6d** foi realizada por RMN de ¹H. No espectro de RMN de ¹H observa-se a ausência do duplete entre 2,86 – 3,33 ppm atribuído ao hidrogênio da hidroxila do aduto de MBH e a presença do sinal característico da acetilação, um simpleto entre 2,10 - 2,15 ppm referente aos 3 hidrogênios da metila do grupo acetila.

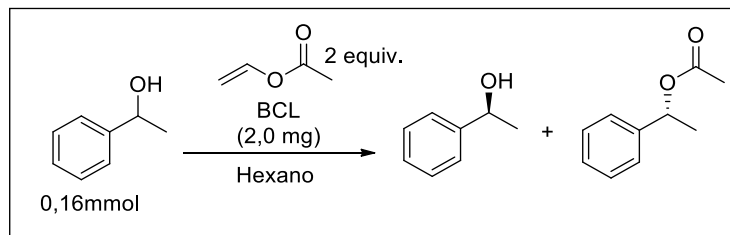
Os α -metileno- β -acetoxiéster (**6a** - **6d**) já sintetizados e caracterizados podem ser submetidos a uma resolução cinética enzimática utilizando uma enzima lipase com o objetivo de se obter os α -metileno- β -hidroxiésteres com excesso enantiomérico.

2.4.6 Resolução Cinética dos α -metileno- β -acetoxiésteres

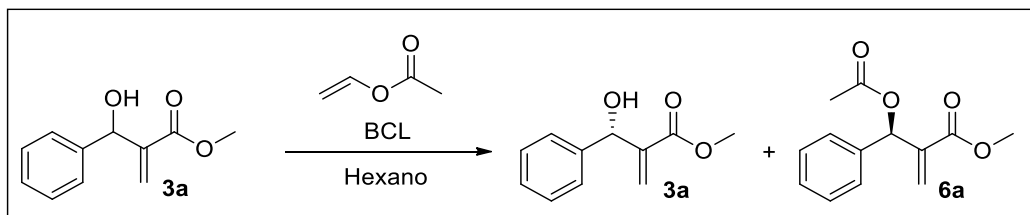
A fim de se obter os α -metileno- β -hidroxiésteres com excesso enantiomérico, a estratégia proposta foi realizar a reação de resolução cinética utilizando a lipase de *Burkholderia cepacia* (BCL) (Esquema 28).

Esquema 28. Resolução cinética dos α -metileno- β -hidroxiésteres racêmicos.

Inicialmente, elegemos como reação modelo a reação de resolução cinética do 1-feniletanol (Esquema 29) (SOUZA et al., 2009).

Esquema 29. Resolução cinética do 1-feniletanol utilizando a lipase BCL.


A reação modelo foi realizada com sucesso e após 24 horas observou-se uma conversão de 50% para o éster correspondente. Porém quando a reação com o α -metileno- β -hidroxiéster **3a** foi testada nas mesmas condições, não foi observado o consumo de material de partida mesmo após 7 dias. Dessa forma, foram realizadas algumas outras tentativas mostradas na Tabela 9.

Tabela 9. Condições reacionais testadas na resolução cinética do α -metileno- β -hidroxiéster **3a**.


Entrada	3a (mmol)	Equiv. Acetato de vinila (mmol)	BCL (mg)	Conversão 6 (%)
1 ^a	0,1	2	2,5	-
2 ^a	0,02	5	8,0	-
3 ^b	0,02	5	20,0	-
4 ^b	0,2	5	20,0	-

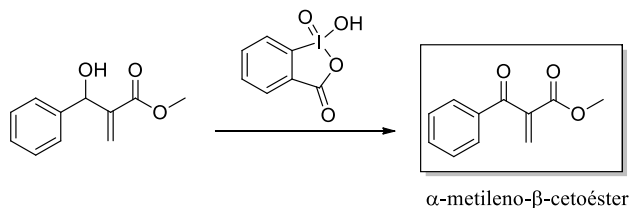
Conversão determinada por GC - FID. Tempo reacional: 7 dias. ^aTemperatura: 50°C. ^bTemperatura: 30°C.

Não foi obtido sucesso na resolução cinética do α -metileno- β -hidroxiéster **3a** utilizando as metodologias testadas.

2.4.7 Preparação dos α -metileno- β -cetoésteres – Rota B

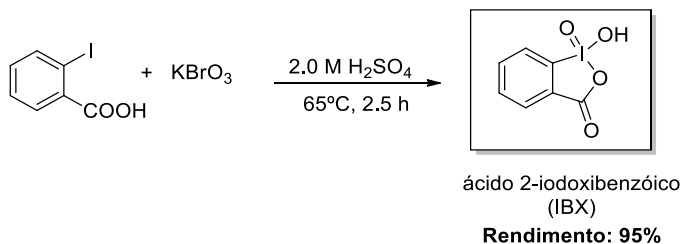
A primeira etapa da abordagem sintética proposta na Rota B é a oxidação da hidroxila do aduto de MBH. Dentre as diferentes várias opções de agente oxidante para a reação de oxidação da hidroxila, o ácido 2-iodoxibenzóico (IBX) foi o reagente escolhido (Esquema 30).

Esquema 30. Preparação dos α -metileno- β -cetoésteres.



A metodologia utilizada para a síntese do IBX foi a reação de oxidação do ácido iodobenzóico utilizando bromato de potássio (KBrO_3) como agente oxidante, em meio ácido (Esquema 31) (BOECKMAN; SHAO; MULLINS, 2003).

Esquema 31. Síntese do ácido 2-iodoxibenzóico (IBX).



O produto foi obtido com um rendimento de 95% e a caracterização do mesmo foi realizada por RMN de ^1H . No espectro de RMN de ^1H do IBX observa-se os sinais característicos nos seguintes deslocamentos químicos 7,84 (m, 1 H), 7,96–8,06 (m, 2H), 8,14 (d, 1H, $J = 7,6$ Hz) referentes aos hidrogênios do anel aromático. Também observamos a ausência de sinais na região de δ 7,71 (m, 1 H) referente ao intermediário 1-hidroxi-1,2-benziodoxol-3-(1H)-ona, e a ausência dos sinais δ 7,48 (m, 1 H) e 7,25 (m, 1 H) referente ao material de partida, o ácido 2-iodobenzóico (FRIGERIO; SANTAGOSTINO, 1994).

Os reagentes de iodo hipervalente são amplamente utilizados em síntese orgânica como uma alternativa de metodologia branda e segura, além de uma opção econômica frente aos agentes oxidantes metálicos (ZHDANKIN; STANG, 2008).

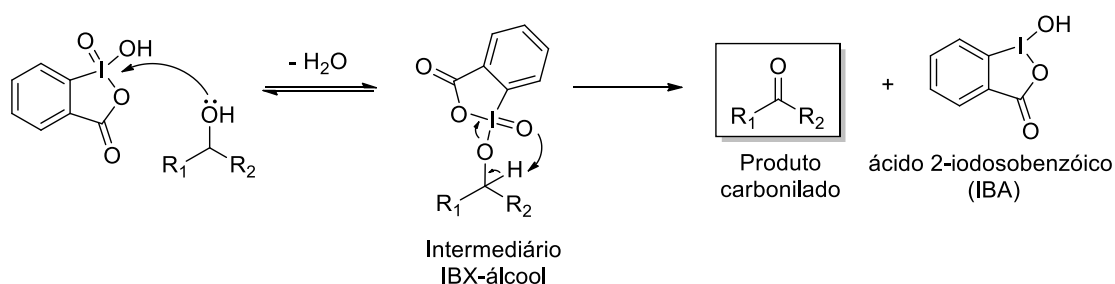
O ácido IBX é um agente oxidante eficiente para a oxidação de álcoois primários e secundários aos seus compostos carbonílicos correspondentes, assim como para uma diversidade de outras reações oxidativas.

O mecanismo proposto para a oxidação de álcoois com IBX, é composto por duas etapas, sendo a primeira etapa representada por um rápido pré-equilíbrio e a segunda etapa a etapa lenta da reação (Esquema 32). Na primeira etapa ocorre a troca de ligantes em torno do

átomo de iodo, o par de elétrons do oxigênio da hidroxila do álcool faz um ataque nucleofílico no iodo, simultaneamente também ocorre a liberação de uma molécula de água. O intermediário IBX-álcool foi detectado por Santagostino e colaboradores (De MUNARI et al., 1996) através de análise de RMN de ^1H . Estudos mostraram que a concentração do intermediário IBX-álcool está diretamente relacionada com a concentração de água, diminuindo com o aumento da mesma (De MUNARI et al., 1996).

Na segunda etapa, o oxigênio ligado ao iodo abstrai um próton do intermediário IBX-álcool, permitindo a eliminação do produto carbonilado e de uma molécula de ácido 2-iodosobenzóico (IBA) (FRIGERIO et al., 1995), (De MUNARI et al., 1996).

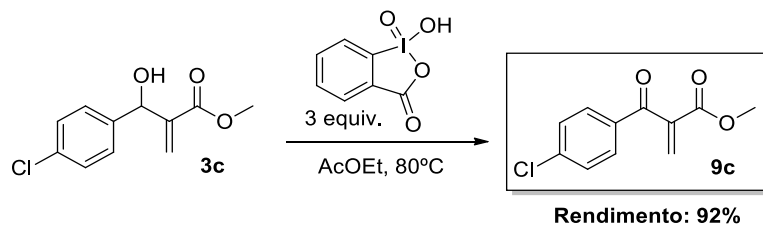
Esquema 32. Mecanismo proposto para oxidação de álcoois com IBX.



O IBX é insolúvel na grande maioria dos solventes orgânicos, com exceção ao dimetilssulfóxido (DMSO), no entanto isso não impede que oxidações sejam realizadas nesses solventes, desde que a temperaturas mais elevadas.

A metodologia inicialmente testada foi a desenvolvida por Finney (MORE; FINNEY, 2002) empregando três equivalentes de IBX e acetato de etila como solvente, a 80 °C (Esquema 33).

Esquema 33. Síntese do α -metileno- β -cetoéster **9c**.

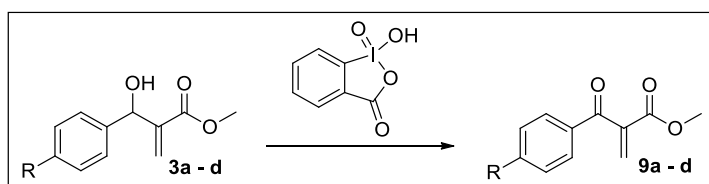


O α -metileno- β -cetoéster **9c** foi obtido após 3 horas de reação em 92% de rendimento. Não houve necessidade da etapa de purificação, já que no espectro de RMN de ^1H do produto bruto observou-se alto grau de pureza.

As primeiras reações foram realizadas utilizando a condição reacional descrita no Esquema 33, entretanto a fim de diminuir o número de equivalentes de IBX utilizado, uma nova metodologia (SANTOS; COELHO, 2012) foi testada utilizando apenas 1,5 equivalentes do agente oxidante, e acetonitrila como solvente. A nova metodologia testada apresentou excelentes rendimentos (88 a 95%) e alto grau de pureza do produto obtido. Nas duas metodologias empregadas a reação é realizada em meio heterogêneo, já que como foi dito o IBX é insolúvel em ambos os solventes. Após o término e resfriamento à temperatura ambiente, o meio reacional foi filtrado e o solvente evaporado à pressão reduzida.

A reação apresentou altos rendimentos e alto grau de pureza para todos os α -metileno- β -hidroxiésteres testados fornecendo os α -metileno- β -cetoésteres de interesse. Os resultados estão apresentados na Tabela 10.

Tabela 10. Oxidação dos α -metileno- β -hidroxiésteres com IBX.



Entrada	Produto	R	Condição Reacional	Rendimento (%)
1	9a	H	a	90
2	9a	H	b	92
3	9b	OMe	a	94
4	9c	Cl	a	95
5	9c	Cl	b	90
6	9d	NO ₂	a	88

a) 1,5 equiv. IBX, acetonitrila, 70 °C b) 3,0 equiv. IBX acetato de etila, 80 °C. Tempo reacional: 3 horas.

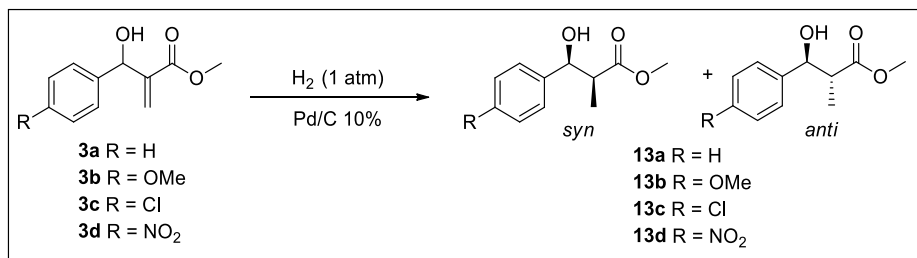
No espectro de RMN de ^1H dos compostos α -metileno- β -cetoésteres observamos a ausência dos sinais dupletos na região de 5,52-5,64 ppm correspondente à região característica do hidrogênio carbinólico do aduto de MBH.

Os α -metileno- β -cetoésteres sintetizados nessa etapa foram utilizados como materiais de partida para todas as reações de triagem enzimática para a detecção de cetorredutases.

2.4.8 Preparação dos α -metil- β -hidroxiésteres racêmicos (13a – 13d)

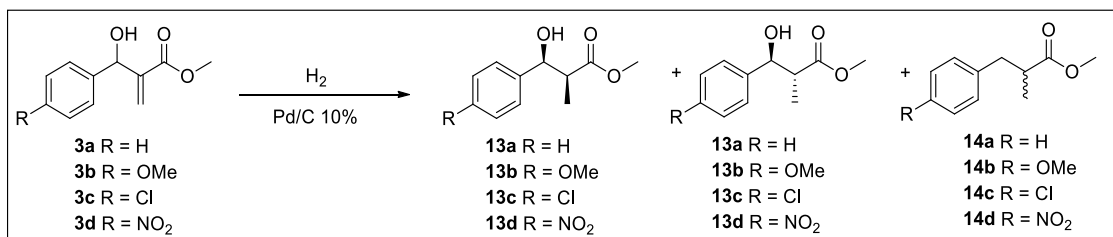
A síntese dos padrões racêmicos dos α -metil- β -hidroxiésteres foi realizada para o desenvolvimento dos métodos cromatográficos que foram utilizados na determinação dos excessos diastereoisoméricos e enantioméricos das reações biocatalíticas (Esquema 34).

Esquema 34. Preparação dos α -metil- β -hidroxiésteres racêmicos.



A metodologia utilizada nesta etapa consistiu em uma hidrogenação catalítica utilizando Pd/C em metanol a 1 atm, a reação foi monitorada por GC-FID e CCD. Além do produto de redução da ligação dupla C-C, foi observado o produto de hidrogenólise (**14**) que é descrito na literatura como subproduto da reação de hidrogenação desses compostos (MATEUS; ALMEIDA; COELHO, 2000). Os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 11.

Tabela 11. Preparação dos α -metil- β -hidroxiésteres racêmicos.



Entrada	R	<i>syn:anti</i>	Conversão	
			13 (%)	14 (%)
1	3a	H	50:50	75,0
2	3b	OMe	30:70	58,0
3	3c	Cl	40:60	61,4
4	3d	NO ₂	50:50	56,0

Na literatura foi relatado tempos reacionais de 2 a 3 horas para a reação de hidrogenação destes compostos (MATEUS; ALMEIDA; COELHO, 2000), porém após 30 minutos observou-se a formação de uma mistura complexa de produtos.

Na reação de hidrogenação do α -metileno- β -hidroxiéster **3d** que possui o grupo nitro na posição *-para*, além do produto de hidrogenólise também observamos a formação do produto com o grupo nitro reduzido a amina, como já havia sido relatado na literatura (MATEUS; ALMEIDA; COELHO, 2000).

Com exceção dos α -metileno- β -hidroxiésteres **3a** e **3d** (Entradas 1 e 4, Tabela 11), observou-se uma diastereosseletividade modesta para a hidrogenação desses compostos. Nos casos em que a diastereosseletividade foi observada, o produto *anti* é sempre o majoritário.

A estereoquímica dessa reação pode ser racionalizada com base numa conformação em que o substituinte aril ocupa a posição interior e a ligação carbono-oxigênio é paralela à ligação π . Isto reduz qualquer interação desestabilizadora entre o substituinte aril e o grupo carboxila. Esta conformação permite a adição *syn* do hidrogênio na mesma face do grupo hidroxila e conduz à formação preferencial do produto *anti* (Figura 4) (MATEUS; ALMEIDA; COELHO, 2000).

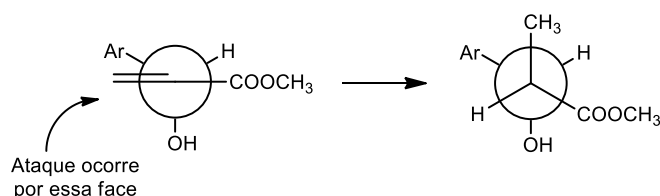


Figura 4. Conformação preferencial que leva ao produto *anti*.

Fonte: Adaptado de Coelho e colaboradores (MATEUS; ALMEIDA; COELHO, 2000).

Os α -metil- β -hidroxiésteres **13a** - **13d** (Figura 5) foram caracterizados por RMN de ^1H , observou-se a ausência dos dois simpletos na região de 5.83 - 6.35 ppm atribuídos aos hidrogênios metilênicos da ligação dupla, e a presença de um duplete na região de 0,97 - 1,14 ppm referente aos três hidrogênios da metila 11 (Figura 5), de um duplo duplete na região de 5,01 - 5,12 ppm referente ao hidrogênio 3 (Figura 5), e de um multiplete na região de 2,74 - 2,94 ppm referente ao hidrogênio 2 (Figura 5).

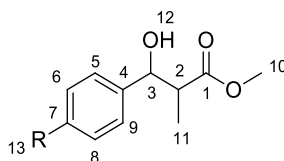


Figura 5. Numeração dos hidrogênios dos α -metil- β -hidroxiésteres **13a** - **13d**.

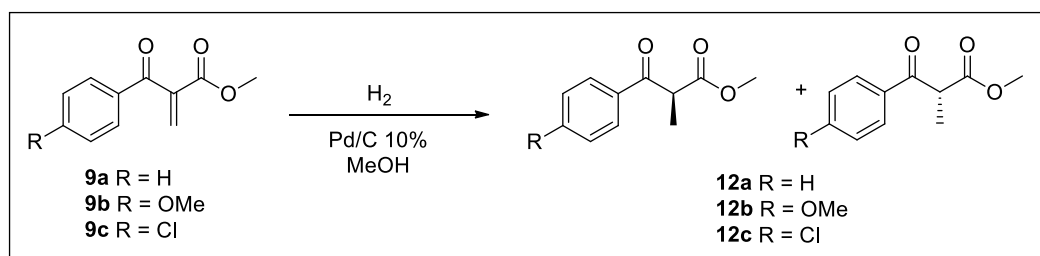
Fonte: o autor.

2.4.9 Preparação dos α -metil- β -cetoésteres racêmicos (12a - 12d)

A síntese dos padrões racêmicos dos α -metil- β -cetoésteres foi realizada para o desenvolvimento dos métodos cromatográficos que foram utilizados na determinação dos excessos enantioméricos das reações biocatalíticas.

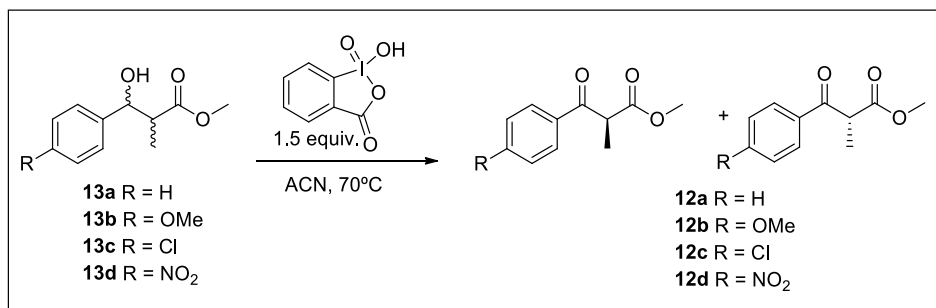
A primeira metodologia testada para a obtenção dos α -metil- β -cetoésteres foi uma hidrogenação catalítica utilizando Pd/C em metanol a 1 atm, a reação foi monitorada por GC-FID e CCD. Os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 12.

Tabela 12. Preparação dos α -metil- β -cetoésteres racêmicos (12a - 12c).



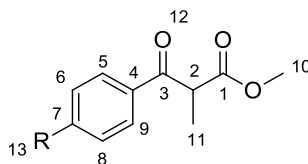
Entrada	Produto	R	Conversão 12 (%)
1	12a	H	45
2	12b	OMe	40
3	12c	Cl	-

Os tempos reacionais foram longos (até 48 horas) e as conversões foram baixas (0 - 45%). Para o composto **9c** surpreendentemente não foi observado o consumo de material de partida, sendo o mesmo recuperado após 48 horas. Dessa forma uma nova metodologia foi testada. Nessa nova estratégia foi realizada a oxidação da hidroxila dos α -metil- β -hidroxiésteres (**13a - 13d**).

Tabela 13. Preparação dos α -metil- β -cetoésteres racêmicos (**12a** - **12d**).

Entrada	Produto	R	Conversão 12 (%)
1	12a	H	92
2	12b	Cl	96
3	12c	NO ₂	94

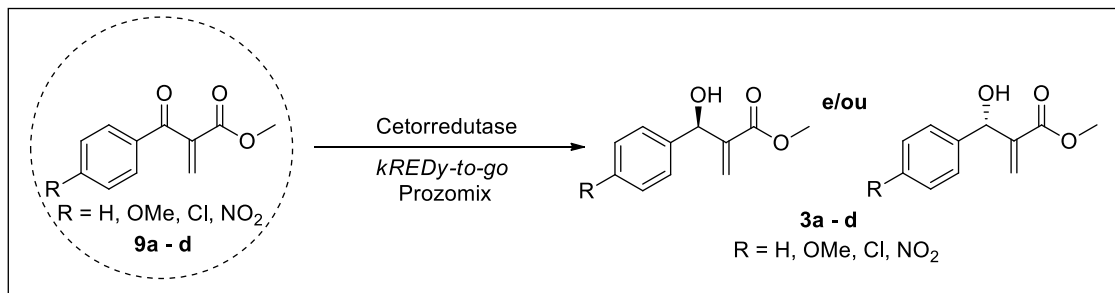
Os rendimentos foram excelentes (92 - 96%) e os tempos reacionais foram de 3 horas. Os α -metil- β -cetoésteres **12a** - **12d** (Figura 6) foram caracterizados por RMN de ¹H, observou-se a ausência do duplo duplete na região de 5,01 - 5,12 ppm referente ao hidrogênio 3 (Figura 6), e a presença de um quadruplete na região de 4,32 - 4,45 ppm referente ao hidrogênio 2 (Figura 6), e de um duplete na região de 1,48 - 1,52 ppm referente aos hidrogênios da metila 11 (Figura 6).

**Figura 6.** Numeração dos hidrogênios dos α -metil- β -cetoésteres **12a** - **12d**.

Fonte: o autor.

2.4.10 Triagem enzimática para detecção de cetorredutases (*kREDy-to-go plate assay* - Prozomix)

A triagem enzimática foi realizada a fim de se avaliar o potencial biorredutor das enzimas para a redução dos α -metileno- β -cetoésteres **9a** - **9d** (Esquema 35).

Esquema 35. Biorredução dos α -metileno- β -cetoésteres **9a - 9d**.

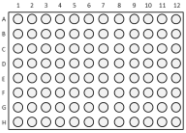
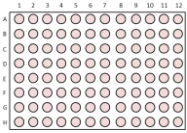
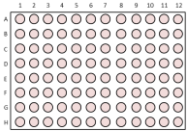
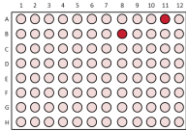
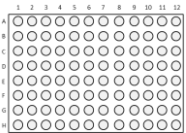
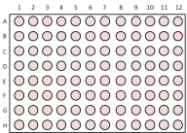
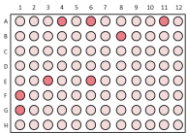
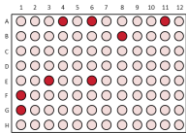
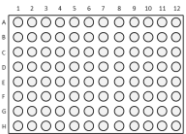
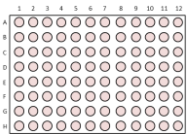
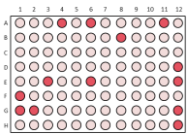
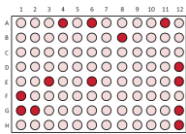
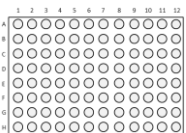
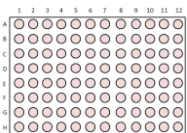
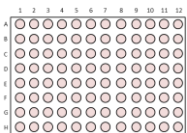
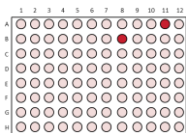
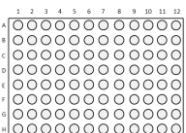
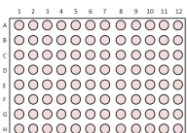
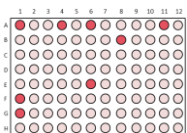
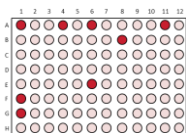
O ensaio de triagem enzimática para avaliação do potencial redutor das enzimas foi realizado utilizando o kit comercial *kREDy-to-go* que é um ensaio colorimétrico em um formato miniaturizado. O kit consiste em uma placa de 96 poços com diferentes enzimas ceto-redutases, e uma solução de composição não especificada, denominada solução INT. A vantagem deste ensaio está na pequena quantidade de resíduos gerados devido ao reduzido consumo de reagentes, uma vez que é realizado em escala miniaturizada. Além disso, o resultado da triagem pode ser detectado visualmente pela mudança de cor da solução final.

Para a realização do ensaio de triagem enzimática, adicionou-se 0,2 mmol do α -metileno- β -cetoéster (**9a - 9d**) em 10,0mL da solução INT. A mistura foi homogeneizada por agitação e então cuidadosamente foram adicionados 100 μ L da solução resultante em cada um dos 96 poços. Também foi realizado um experimento branco, neste experimento não foi efetuada a adição do α -metileno- β -cetoéster, adicionou-se apenas 100 μ L da solução INT em cada um dos 96 poços.

As placas foram mantidas ao abrigo de luz, sob agitação orbital a 25 °C e monitorada nos tempos $t = 0$, $t = 4$ h, $t = 12$ h e $t = 24$ h.

A inspeção da evolução do ensaio de atividade enzimática foi realizada visualmente, onde para resultados positivos se esperava uma mudança de coloração do branco para o vermelho. Os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 14.

Tabela 14. Triagem enzimática de cetorredutases para os α -metileno- β -cetoésteres **9a** – **9d**.

Entrada		Tempo (h)			
		0	4	12	24
1	-				
2	9a				
3	9b				
4	9c				
5	9d				

No experimento branco, (Entrada 1, Tabela 14), foram observados dois poços com coloração vermelha após 24 horas, poços A11 e B8, esses dois poços foram considerados falsos positivos nas análises de triagem enzimática utilizando os α -metileno- β -cetoésteres.

A triagem enzimática com o α -metileno- β -cetoéster **9a** (Entrada 2, Tabela 14), apresentou 6 *hits* positivos, com o α -metileno- β -cetoéster **9b** (Entrada 3, Tabela 14), foram obtidos 11 *hits* positivos. Quando o α -metileno- β -cetoéster utilizado na triagem de cetorredutases foi o composto **9c**, (Entrada 4, Tabela 14), não foi obtido nenhum *hit* positivo, os poços com coloração vermelha A11 e B8 são falsos positivos. O α -metileno- β -cetoéster **9d**, (Entrada 3, Tabela 14), apresentou 6 *hits* positivos triagem de cetorredutases.

As enzimas que se mostraram *hits* positivos para a redução dos α -metileno- β -cetoésteres poderão ser adquiridas para que seja possível a realização de um estudo sobre a quimio- e enantiosseletividades das mesmas.

2.4.11 Biorredução dos α -metileno- β -cetoésteres

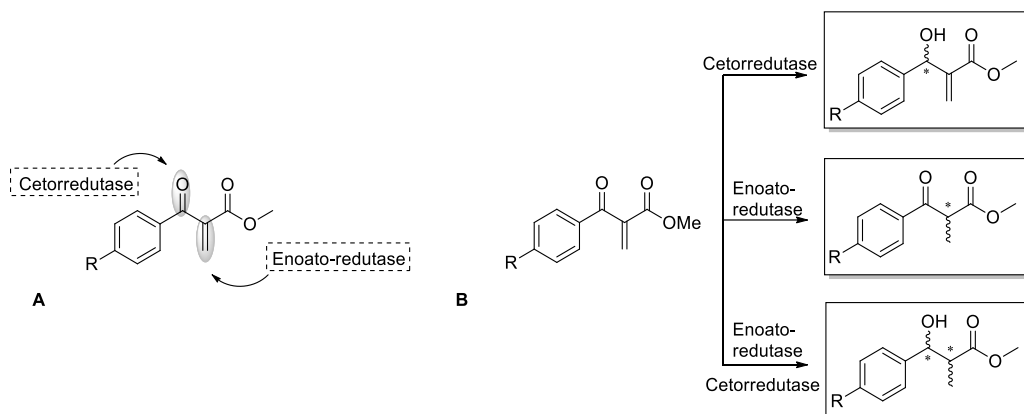
Os α -alquil- β -hidroxiésteres são compostos importantes para a síntese orgânica assimétrica, onde são aplicados como blocos construtores para a síntese de policetídeos, estatinas, inibidores de protease e outros produtos farmacêuticos importantes (KALAITZAKIS et al., 2005). Estes compostos apresentam baixa massa molecular, possuem dois centros estereogênicos e pelo menos dois grupos funcionais reativos (um álcool, um éster e outros grupos potencialmente reativos presentes na cadeia lateral do substituinte) (KALAITZAKIS et al., 2005).

A importância dos α -alquil- β -hidroxiésteres como blocos construtores para uma grande variedade de “alvos” moleculares tem estimulado a busca por métodos altamente seletivos para sua síntese (MORI, 1989), (PEREIRA, 1998). Várias estratégias químicas clássicas foram desenvolvidas e se mostraram particularmente úteis para síntese dessa classe de compostos (RODRÍGUEZ; KAYSER; STEWART, 2001). Dentre as estratégias mais estudadas, a redução assimétrica de β -cetoésteres tem sido a via mais investigada (RODRÍGUEZ et al., 2000).

As abordagens biocatalíticas tem se tornado cada vez mais interessantes para a obtenção dos α -alquil- β -hidroxiésteres enantiomericamente enriquecidos, dentre elas temos a utilização de enzimas isoladas ou o uso de células microbianas. Atualmente é conhecida uma grande variedade de agentes redutores biocatalíticos. Nesse contexto a levedura *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*) tem sido particularmente valiosa e ainda hoje é um dos biocatalisadores mais populares, principalmente por ser de fácil uso e acesso, baixo custo e não necessitar de muitos conhecimentos microbiológicos (CHAVES; MORAN; RODRIGUES, 2013; CLOSOSKI et al., 2007; KAWAI et al., 1994; RODRIGUEZ; KAYSER; STEWART, 2001).

Os substratos α -metileno- β -cetoésteres (**9a - 9d**), foram submetidos a reação de redução utilizando a levedura *S. cerevisiae*.

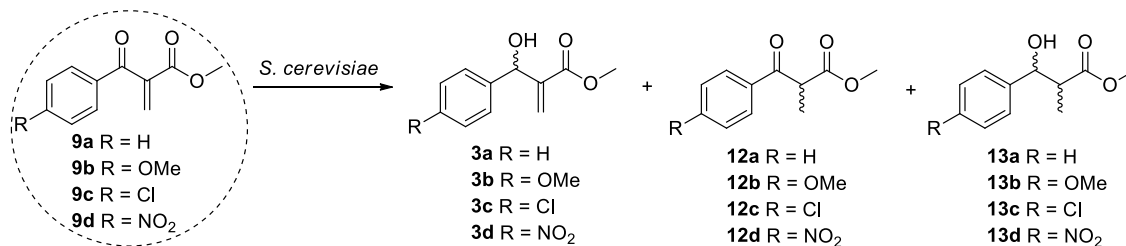
Os compostos em questão possuem dois centros reativos frente a reações de oxidorredução como destacado na Figura 7 **A**, dessa forma na redução dos α -metileno- β -cetoésteres utilizando a levedura *S. cerevisiae* (sistema multienzimático) é possível a obtenção de mais de um produto (Figura 7 **B**).


 Figura 7. Biorredução dos α -metileno- β -cetoésteres.

Fonte: o autor.

As reações de redução dos α -metileno- β -cetoésteres (**9a** - **9d**) utilizando a levedura *S. cerevisiae* foram realizadas em tampão citrato-fosfato, pH 6,6 (0,05M), com adição de glicose. Foram realizados experimentos controle sem a adição do substrato, onde não se observou a formação de nenhum produto de origem microbiana (metabólitos), e experimentos controle sem a adição do micro-organismo onde não se observou degradação do produto nestas condições experimentais.

As reações foram acompanhadas por GC-FID, os produtos foram caracterizados por GC-MS e os resultados obtidos estão resumidos na Tabela 15. Os excessos enantioméricos e a diastereosseletividade foram determinados por análise de GC utilizando coluna quiral. Os tempos de retenção dos produtos obtidos foram comparados com os já relatados na literatura (CHAVES; MORAN; RODRIGUES, 2013).

 Tabela 15. Resumo dos resultados obtidos nas reações de biorredução dos α -metileno- β -cetoésteres (**9a** - **9d**).


Entrada	R	Tempo reacional (h)	Conversão			% Composição 13 (% ee)	
			3 (%)	12 (%)	13 (%)	syn	anti
1	9a H	48	-	34,0	66,0	60,0	6,0
2	9b OMe	96	-	100	-	-	-
3	9c Cl	36	-	5,0	95,0	86,5 (99)	8,5 (99)
4	9d NO ₂	6	-	-	>99	88,0 (99)	12,0 (99)

Nas reações de biorredução dos α -metileno- β -cetoésteres, pode-se observar através da diferença dos tempos reacionais, que variaram de 6 a 96 horas, que os grupos substituintes do anel aromático influenciaram na velocidade da reação. Essa influência pode ser racionalizada pelo efeito de ressonância e pelo efeito indutivo dos mesmos em relação ao carbono *para* do anel aromático e consequente ativação ou desativação da carbonila benzílica e do grupo metileno na posição α a carbonila. Grupos retiradores de elétrons na posição *para* do anel aromático deixam a carbonila e o grupo metileno deficientes em elétrons por efeito de ressonância favorecendo o ataque nucleofílico do hidreto do cofator (NAD(P)H), tornando dessa forma as reações mais rápidas quando comparadas a reação utilizando o α -metileno- β -cetoéster sem substituição no anel aromático. O efeito contrário é observado para grupos doadores de elétrons, que doam elétrons por ressonância tornando a carbonila e o grupo metileno menos deficientes em elétrons e dessa maneira desfavorecem o ataque nucleofílico do hidreto do cofator diminuindo então a velocidade da reação de biorredução.

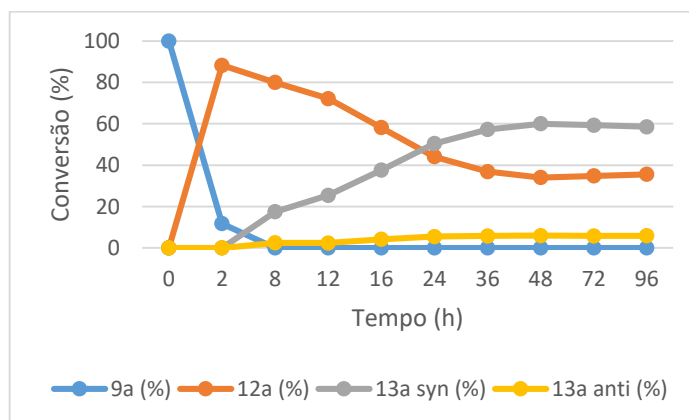
Na reação de biorredução do α -metileno- β -cetoéster **9a** observou-se inicialmente a formação do α -metil- β -cetoéster **12a**, referente a redução da ligação dupla C=C. Após 2 horas de reação, 88,2% do material de partida já havia sido convertido no α -metil- β -cetoéster **12a** (Entrada 1, Tabela 16). Com 8 horas de reação observou-se a formação do α -metil- β -hidroxiéster **13a**, referente a redução da ligação dupla C=O do α -metil- β -cetoéster **12a** (Entrada 2, Tabela 16). Quando a reação atingiu 24 horas (Entrada 5, Tabela 16), 65,9% do α -metil- β -cetoéster **12a** já havia sido convertido aos diastereoisômeros **13a**, os diastereoisômeros *syn* e *anti* foram formados numa proporção 90:10 respectivamente, os excessos enantioméricos foram maiores que 99%. Na Entrada 7 (Tabela 16) quando o tempo reacional atingiu 48 horas temos uma conversão de 66%, com uma proporção dos diastereoisômeros de 91:9 e excessos enantioméricos maiores que 99% para os dois diastereoisômeros obtidos. A reação ainda foi acompanhada até o tempo reacional de 96 horas, porém observou-se que a reação entrou em equilíbrio.

Tabela 16. Resultados obtidos na reação de biorredução do α -metileno- β -cetoéster **9a**.

CC(=O)C(=O)C1=CC=CC=C1 (9a) $\xrightarrow[\text{pH: 6.6}]{S. cerevisiae}$ CC(=O)C(O)C1=CC=CC=C1 (12a) + CC(=O)C(O)C1=CC=CC=C1 (13a syn) + CC(=O)C(O)C1=CC=CC=C1 (13a anti)

Entrada	T (h)	9a (%)	12a (%)	13a syn:anti	13a syn (%)	ee 13a syn (%)	13a anti (%)	ee 13a anti (%)
1	2	11,8	88,2	-	0	0	0	0
2	8	0	80,0	88:12	17,5	>99	2,5	>99
3	12	0	72,1	91:9	25,4	>99	2,4	>99
4	16	0	58,2	90:10	37,6	>99	4,2	>99
5	24	0	44,1	90:10	50,4	>99	5,5	>99
6	36	0	36,9	91:9	57,3	>99	5,9	>99
7	48	0	34,0	91:9	60,0	>99	6,0	>99

O estudo cinético da redução de **9a** mediada por *S. cerevisiae* é apresentado na Figura 8. Inicialmente observamos o consumo do material de partida **9a** e a formação do α -metil- β -cetoéster **12a**. Com o decorrer do tempo reacional observa-se o consumo do α -metil- β -cetoéster **12a** e a formação dos diastereoisômeros **13a syn** e **13a anti**.

**Figura 8.** Estudo cinético da redução de **9a** mediada por *Saccharomyces cerevisiae*.

Fonte: o autor.

Na reação de biorredução do α -metileno- β -cetoéster **9b**, após 15 minutos do início da reação, observou-se uma conversão de 74,5% do material de partida para o α -metil- β -cetoéster **12b** (Entrada 1, Tabela 17), através de análise por HPLC observou-se um razoável excesso enantiomérico de 45%. O excesso enantiomérico do α -metil- β -cetoéster **12b** observado na alíquota referente a 15 minutos de reação decaiu lentamente com o tempo, chegando a 10% quando a reação atingiu um tempo reacional de 8 horas. A reação continuou sendo monitorada

nos tempos de 16, 24, 48 e 96 horas, porém não se observou a formação do α -metil- β -hidroxiéster **13b**, referente a redução da ligação dupla C=O do composto **12b**.

Uma possível explicação para a não obtenção do α -metil- β -hidroxiéster **13b** seria a menor reatividade da carbonila, causada pelo efeito desativador de doação de prótons pelo grupo metóxi substituinte do anel aromático.

Tabela 17. Resultados obtidos na reação de biorredução do α -metileno- β -cetoéster **9b**.

Reaction scheme: **9b** (4-methoxy-3-methyl-2-oxobutanoate) reacts with *S. cerevisiae* at pH 6.6 to produce **12b** (4-methoxy-3-methyl-2-oxobutanoate), **13b syn** (4-methoxy-3-methyl-2-hydroxybutanoate), and **13b anti** (4-methoxy-3-methyl-2-hydroxybutanoate).

Entrada	T (min)	9b (%)	12b (%)	ee 12b (%)
1	15	25,5	74,5	45
2	45	13,7	86,3	44
3	60	11,0	89,0	44
4	120	0	100	40
5	240	0	100	28
6	480	0	100	10
7	960	0	100	0

O estudo cinético da redução de **9b** mediada por *S. cerevisiae* é apresentado na Figura 9. Observamos o consumo do material de partida **9b** e a formação do α -metil- β -cetoéster **12b** com o decorrer do tempo reacional. Também é apresentada a variação do excesso enantiomérico do α -metil- β -cetoéster **12b**.

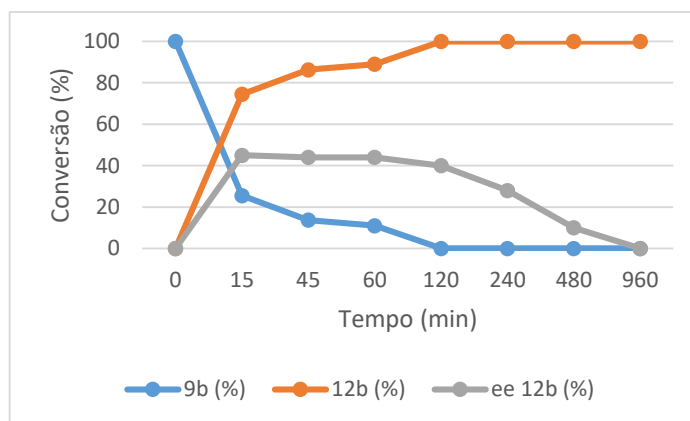


Figura 9. Estudo cinético da redução de **9b** mediada por *Saccharomyces cerevisiae* e variação do excesso enantiomérico do α -metil- β -cetoéster **12b**.

Fonte: o autor.

Na reação de biorredução do α -metileno- β -cetoéster **9c**, também se observou inicialmente a formação do α -metil- β -cetoéster **12c**, referente a redução da ligação dupla C=C. Após 30 minutos de reação, 100% do material de partida já havia sido convertido no α -metil- β -cetoéster **12c** (Entrada 1, Tabela 18), através de análise por HPLC observou-se um baixo excesso enantiomérico de 14%. O baixo excesso enantiomérico do α -metil- β -cetoéster **12c** observado na alíquota referente a 0,5 horas de reação decaiu com o tempo, chegando a 0 quando a reação atingiu um tempo reacional de 2 horas. Com 8 horas de reação observou-se a formação do α -metil- β -hidroxiéster **13c**, referente a redução da ligação dupla C=O do α -metil- β -cetoéster **12c** (Entrada 5, Tabela 18). Quando a reação atingiu 24 horas (Entrada 8, Tabela 18), 86,0% do α -metil- β -cetoéster **12c** já havia sido convertido aos diastereoisômeros **13c**, os diastereoisômeros *syn* e *anti* foram formados numa proporção 91:9 respectivamente e os excessos enantioméricos foram maiores que 99%. Na Entrada 9 (Tabela 18) quando o tempo reacional atingiu 36 horas temos uma conversão de 95%, com uma proporção dos diastereoisômeros de 91:9 e excessos enantioméricos maiores que 99% para os dois diastereoisômeros obtidos. A reação permaneceu sendo monitorada até o tempo reacional de 48 horas, porém observou-se que a reação entrou em equilíbrio.

Tabela 18. Resultados obtidos na reação de biorredução do α -metileno- β -cetoéster **9c**.

Reaction scheme: α -chlorobenzylidene- β -methylacrylate (**9c**) is converted by *S. cerevisiae* at pH 6.6 to α -chlorobenzyl- β -methylacrylate (**12c**), which then undergoes further reduction to form the *syn* and *anti* diastereoisomers of α -chlorobenzyl- β -methyl- β -hydroxyacrylate (**13c syn** and **13c anti**).

Entrada	T (h)	9c (%)	12c (%)	13c <i>syn:anti</i>	13c <i>syn</i> (%)	ee 13c <i>syn</i> (%)	13c <i>anti</i> (%)	ee 13c <i>anti</i> (%)
1	0,5	0	100	0	0	0	0	0
2	1	0	100	0	0	0	0	0
3	1,5	0	100	0	0	0	0	0
4	2	0	100	0	0	0	0	0
5	8	0	53,4	92:8	42,9	>99	3,7	>99
6	12	0	38,4	93:7	57,3	>99	4,3	>99
7	16	0	28,7	92:8	65,6	>99	5,7	>99
8	24	0	14,0	91:9	78,3	>99	7,7	>99
9	36	0	5,0	91:9	86,5	>99	8,5	>99

O estudo cinético da redução de **9c** mediada por *S. cerevisiae* é apresentado na Figura 10. Primeiro observamos o consumo do material de partida **9c** e a formação do α -metil- β -cetoéster **12c**. Em seguida, observa-se o consumo do α -metil- β -cetoéster **12c** e a formação dos diastereoisômeros **13c syn** e **13c anti** com o decorrer do tempo reacional.

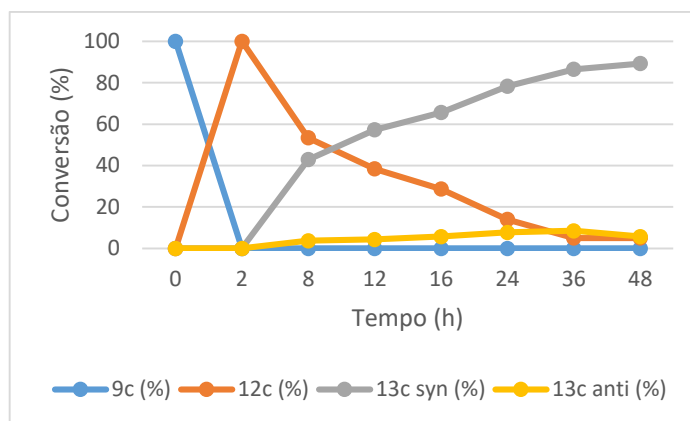


Figura 10. Estudo cinético da redução de **9c** mediada por *Saccharomyces cerevisiae*.
Fonte: o autor.

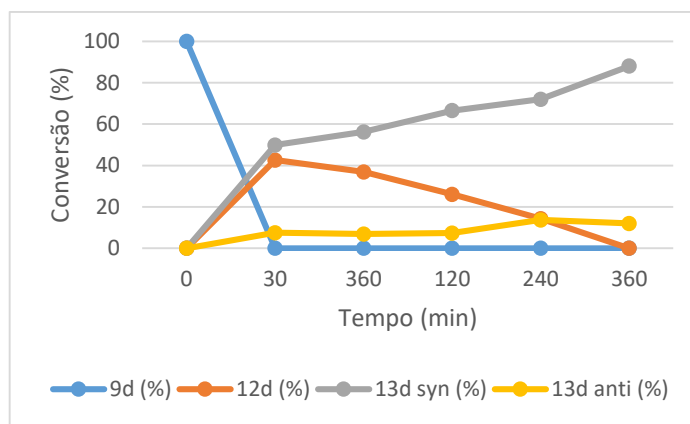
Na reação de biorredução do α -metileno- β -cetoéster **9d**, após 30 minutos de reação, 100% do material de partida já havia sido convertido no produto **12d** e 57,4% do α -metil- β -cetoéster **12d** já havia sido convertido no α -metil- β -hidroxiéster **13d** (Entrada 1, Tabela 19), a proporção dos diastereoisômeros *syn:anti* observada foi de 87:13, os excessos enantioméricos foram maiores que 99%. Os excessos enantioméricos para o composto **12d** foram investigados através de análise por HPLC porém não foi observado nenhum excesso. Com 6 horas de reação todo o α -metil- β -cetoéster **12d** havia sido convertido em **13d**, os diastereoisômeros *syn* e *anti* foram formados numa proporção 88:12 respectivamente e os excessos enantioméricos foram maiores que 99% (Entrada 5, Tabela 19).

Tabela 19. Resultados obtidos na reação de biorredução do α -metileno- β -cetoéster **9d**.

COC(=O)C(=C)C(=O)c1ccc([N+](=O)[O-])cc1 (9d)
 $\xrightarrow[\text{pH: 6.6}]{S. cerevisiae}$
COC(=O)C(C)C(=O)c1ccc([N+](=O)[O-])cc1 (12d)
 +
 COC(=O)C(O)C(O)C(=O)c1ccc([N+](=O)[O-])cc1 (13d syn)
 +
 COC(=O)C(O)C(O)C(=O)c1ccc([N+](=O)[O-])cc1 (13d anti)

Entrada	T (min)	9d (%)	12d (%)	13d (%)	13c syn:anti	13d syn (%)	ee 13d syn (%)	13d anti (%)	ee 13d anti (%)
1	30	0	42,6	57,4	87:13	49,9	>99	7,5	>99
2	60	0	36,9	63,1	89:11	56,2	>99	6,9	>99
3	120	0	26,1	73,9	90:10	66,5	>99	7,4	>99
4	240	0	14,3	85,7	84:16	72,0	>99	13,7	>99
5	360	0	0	100	88:12	88,0	>99	12,0	>99

O estudo cinético da redução de **9d** mediada por *S. cerevisiae* é apresentado na Figura 11. Observamos o consumo do material de partida **9d**, a formação e posterior consumo do α -metil- β -cetoéster **12d** e a formação dos diastereoisômeros **13d syn** e **13d anti** com o decorrer do tempo reacional.

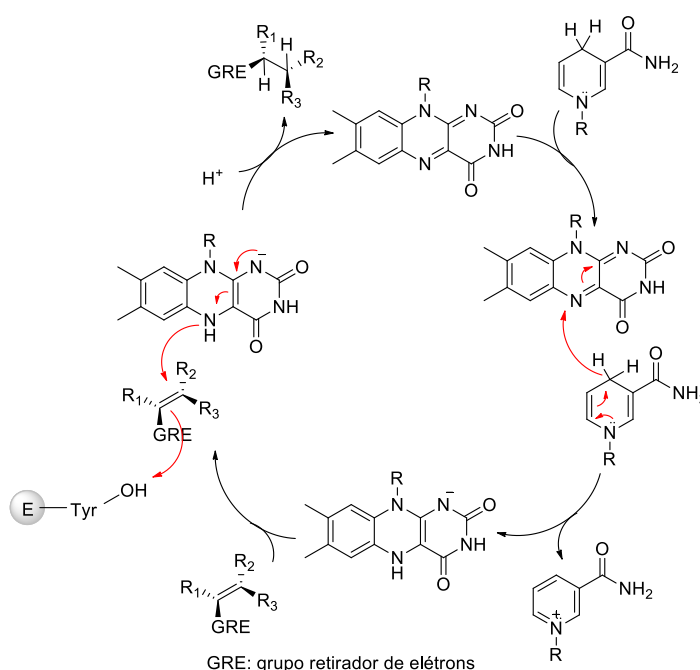
**Figura 11.** Estudo cinético da redução de **9d** mediada por *Saccharomyces cerevisiae*.

Fonte: o autor.

Em todas as reações de biorredução se observou inicialmente a redução da ligação dupla C=C. Sabe-se que cetonas α,β -insaturadas são geralmente reduzidas em duas etapas: primeiro a redução da ligação dupla C=C seguida por uma etapa lenta de redução da carbonila. Somente em casos raros, quando a ressonância das cetonas α,β -insaturadas é desestabilizada por grupos retiradores de elétrons (principalmente halogênios) ligados a ligação dupla, ocorre a redução da carbonila em primeiro lugar (PAULA et al., 2013).

A enoato redutase responsável pela redução da ligação dupla C=C presente na levedura *S. cerevisiae* pertence à família de enzimas *old yellow enzyme* (EC 1.6.99.1). O mecanismo proposto para a redução da ligação C=C pela enzima envolve uma reação de Michael, o grupo prostético flavina (FMNH₂), na sua forma reduzida, adiciona um hidreto no carbono β ao grupo retirador de elétrons. O ânion resultante abstrai um próton de um resíduo de tirosina presente no sítio ativo da enzima. Como resultado, ocorre uma reação geral de *trans*-hidrogenação (HOLLMANN; ARENDS; HOLTMANN, 2011).

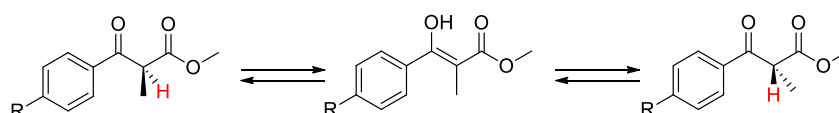
Esquema 36. Mecanismo simplificado proposto para a redução de ligação C=C por enzimas enoato redutases.



Fonte: Adaptado de Hollmann e colaboradores (HOLLMANN; ARENDS; HOLTMANN, 2011).

A biorredução dos α -metil- β -cetoésteres (**12a - d**) leva à formação dos produtos diastereoisoméricos *syn* e *anti*. Devido ao centro estereogênico na posição α da carbonila cetônica possuir um hidrogênio ácido, os produtos **12a - d** podem existir na forma de um tautomerismo ceto-enólico, levando a uma rápida racemização *in situ*, como demonstrado no Esquema 37.

Esquema 37. Representação da racemização do centro estereogênico dos α -metil- β -cetoésteres.



Essa racemização *in situ* devido a enolização dos compostos **12a** - **12d**, leva a uma resolução cinética dinâmica. Assim a proporção entre os produtos diastereoméricos *syn:anti* não é de 1: 1, mas é determinada pelas seletividades das enzimas envolvidas no processo de redução (DEOL; RIDLEY; SIMPSON, 1976). Sob condições ideais, pode até chegar a 100:0 (FABER, 2000).

A redução dos α -metil- β -cetoésteres (**12a** - **d**), foi observado para os α -metil- β -hidroxiéster **9b**, **9c** e **9d**. Os α -metil- β -hidroxiésteres (**13a**, **13c** e **13d**) foram obtidos com boas razões *syn/anti* para todos os produtos, com predominância do diastereoisômero *syn* sobre o *anti*, além de elevados excessos enantioméricos para ambos diastereoisômeros.

É conhecido que na biorredução de β -cetoésteres- α -monossustituídos, onde os grupos substituintes em α são pequenos observa-se o predomínio da formação do diastereoisômero *syn*. A diastereosseletividade é invertida quando os grupos substituintes em α são maiores. Independentemente do tamanho do substituinte em α , a seletividade para o novo centro estereogênico formado (álcool secundário) é sempre muito alta e a configuração absoluta é determinada pela regra de Prelog.

Essas observações levaram Faber (FABER, 2000) a propor um modelo para prever a diastereosseletividade em reduções biocatalíticas de β -cetoésteres- α -substituídos por *S. cerevisiae* (Figura 12). Quando os grupos substituintes em α são menores do que o grupo COOMe, os mesmos se encaixam no bolsão pequeno (P), e o grupo COOMe ocupa o bolsão grande (G), o diastereoisômero formado será o *syn*. O modelo indica que quanto maior a diferença entre o tamanho do substituinte na posição α (pequeno) e o grupo COOMe (grande), maior a preferência pelo produto *syn*. Se o substituinte em α e o grupo COOMe possuírem o mesmo tamanho, a preferência deixa de existir, e se o substituinte em α for maior que o grupo COOMe, a preferência é invertida. A seletividade variável é explicada pela presença de múltiplas desidrogenases com diferentes especificidades nas células da levedura *S. cerevisiae*.

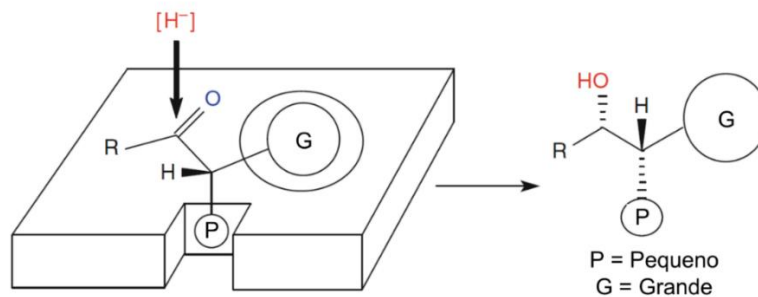
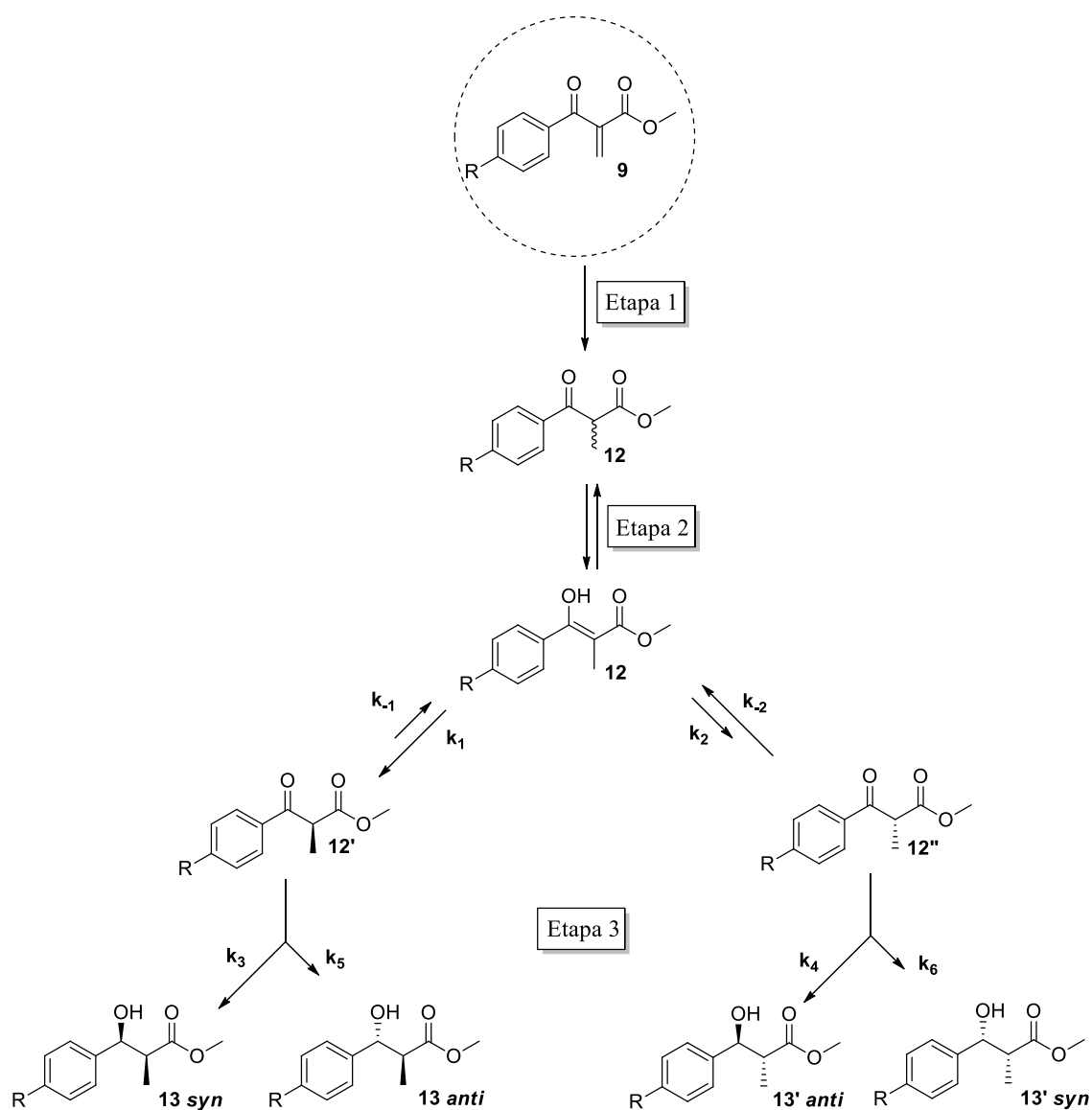


Figura 12. Representação do modelo para predição da diastereosseletividade mediada por *S. cerevisiae*.

Fonte: Adaptado de Faber. (FABER, 2000)

Dessa forma, propõe-se uma sequência reacional para a redução biocatalítica dos α -metileno- β -cetoésteres pela levedura *S. cerevisiae* (Esquema 38). Inicialmente (Etapa 1, Esquema 38), ocorre a redução da ligação C=C fornecendo os α -metil- β -cetoésteres, que podem sofrer uma racemização da metila na posição α em razão de um equilíbrio ceto-enólico (Etapa 2, Esquema 38). Em seguida, tem-se a redução da ligação C=O pela face *re*, que resulta em um alto excesso enantiomérico, como já relatado para reduções de cetonas aromáticas por *S. cerevisiae* (Etapa 3, Esquema 38). A racemização resultante da Etapa 2, promove uma resolução cinética dinâmica, que leva a uma boa diastereosseletividade dos produtos obtidos. Podemos afirmar que a velocidade de formação dos produtos *syn* é superior à velocidade de formação dos produtos *anti*. Então sugere-se que o composto **12'** seja consumido mais rapidamente, e que o equilíbrio representado no Esquema 38 esta deslocado para esquerda, ou seja k_1 e $k_{-2} > k_{-1}$ e k_2 .

Esquema 38. Mecanismo proposto para a seletividade na redução dos α -metileno- β -cetoésteres (**9a – 9d**) pela levedura *Saccharomyces cerevisiae*.



De maneira geral, podemos concluir que a levedura *S. cerevisiae* foi capaz de reduzir os α -metileno- β -cetoésteres à α -metil- β -hidroxiésteres com alta diastereo- e enantiosseletividade.

2.5 CONCLUSÕES

Os α -metil- β -hidroxiésteres são compostos importantes para a síntese orgânica assimétrica, onde são aplicados como blocos construtores para a síntese de diversos compostos com diferentes atividades biológicas e farmacológicas. Nesse contexto, existe um grande interesse na busca por métodos convenientes e altamente seletivos para sua síntese. Neste trabalho, a rota sintética utilizada para a obtenção dos substratos α -metileno- β -cetoésteres consistiu na obtenção dos α -metileno- β -hidroxiésteres através da reação de Morita-Baylis-Hillman (rendimentos de 64 a 96%), seguida por uma reação de oxidação utilizando IBX (rendimentos de 88 a 95%).

Os α -metileno- β -hidroxiésteres produtos da primeira etapa da rota sintética proposta são importantes intermediários sintéticos na produção de diversos compostos bioativos. O interesse na síntese assimétrica desses compostos é crescente. Neste contexto, estudamos neste trabalho a aplicação da Biocatálise na reação de Morita-Baylis-Hillman com o intuito de se obter α -metileno- β -hidroxiésteres de maneira enantiosseletiva, porém não encontramos um novo biocatalisador capaz de catalisar a reação de Morita-Baylis-Hillman nas condições testadas para as reações modelo escolhidas.

Adicionalmente realizamos o estudo da resolução cinética enzimática dos α -metileno- β -hidroxiésteres utilizando a lipase de *Burkholderia cepacia* (BCL), no entanto nas condições reacionais testadas não foi observada a catálise enzimática.

Apresentamos também o estudo de triagem enzimática a fim de se avaliar o potencial e 70 micro-organismos da coleção do grupo Milagre para reações de oxidação (álcool desidrogenases), redução (enoato redutases) e hidrólise (hidrolases) dos α -metileno- β -hidroxiésteres. Os micro-organismos testados não foram capazes de converter os substratos, e dessa forma não se observou nenhum *hit* positivo na triagem enzimática.

Os substratos α -metileno- β -cetoésteres foram submetidos a reação de biorredução utilizando a levedura *Saccharomyces cerevisiae*. Os α -metil- β -hidroxiésteres foram obtidos com conversões de 66 a 99%, diastereosseletividade de até 91:9 e excessos enantioméricos maiores que 99% para todos os diastereoisômeros. Os tempos reacionais variaram de 6 a 48 horas de acordo com o substituinte no anel aromático. De maneira geral, podemos concluir que a levedura *S. cerevisiae* foi capaz de reduzir os α -metileno- β -cetoésteres à α -metil- β -hidroxiésteres com alta diastereo- e enantiosseletividade.

CAPÍTULO 3

Síntese multicomponente one-pot de 4-tiazolidinonas

Capítulo 3. Síntese multicomponente *one-pot* de 4-tiazolidinonas

3.1 RESUMO

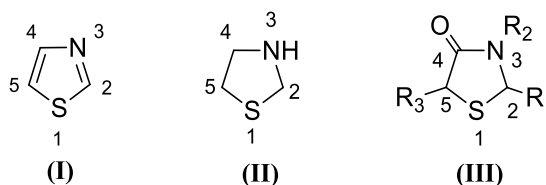
As 4-tiazolidinonas são um importante núcleo heterocíclico presente em diversos compostos biologicamente e farmacologicamente ativos. Portanto, há um grande interesse no desenvolvimento de metodologias adequadas para sintetizá-lo. A eficiência das reações multicomponentes combinadas com os aspectos sustentáveis da Biocatálise foram empregadas na síntese desta classe de compostos. Uma coleção de células microbianas, enzimas isoladas e a albumina de soro bovino foram triados para atividades catalíticas nesta reação. A influência do solvente, a relação estequiométrica dos substratos e os substituintes no anel aromático dos aldeídos também foram avaliados. Em relação a proporção estequiométrica de substratos os melhores resultados foram observados quando se utilizou uma proporção de 1: 1: 3 de aldeído: amina: ácido carboxílico. O estudo da influência do solvente mostrou que os melhores resultados foram observados quando o diclorometano foi utilizado. A relação entre o substituinte do anel aromático dos aldeídos e a taxa de reação não foi definida já que as conversões variaram com os diferentes biocatalisadores testados. De maneira geral as 4-tiazolidinonas foram obtidas com rendimentos bons a moderados (52 a 69%), sob condições de reação suaves.

3.2 INTRODUÇÃO

O design, síntese e produção de novas moléculas heterocíclicas como agentes terapêuticos são objetivos importantes da química orgânica e medicinal. Uma considerável quantidade de fármacos e moléculas biologicamente ativas são compostos heterocíclicos. Entre os sistemas heterocíclicos, uma importante classe, a classe das 4-tiazolidinonas, é composta por moléculas que apresentam anéis de cinco membros, com dois heteroátomos, esses núcleos estão presentes em inúmeras moléculas bioativas (SALIAN; NARAYANA; SAROJINI, 2017).

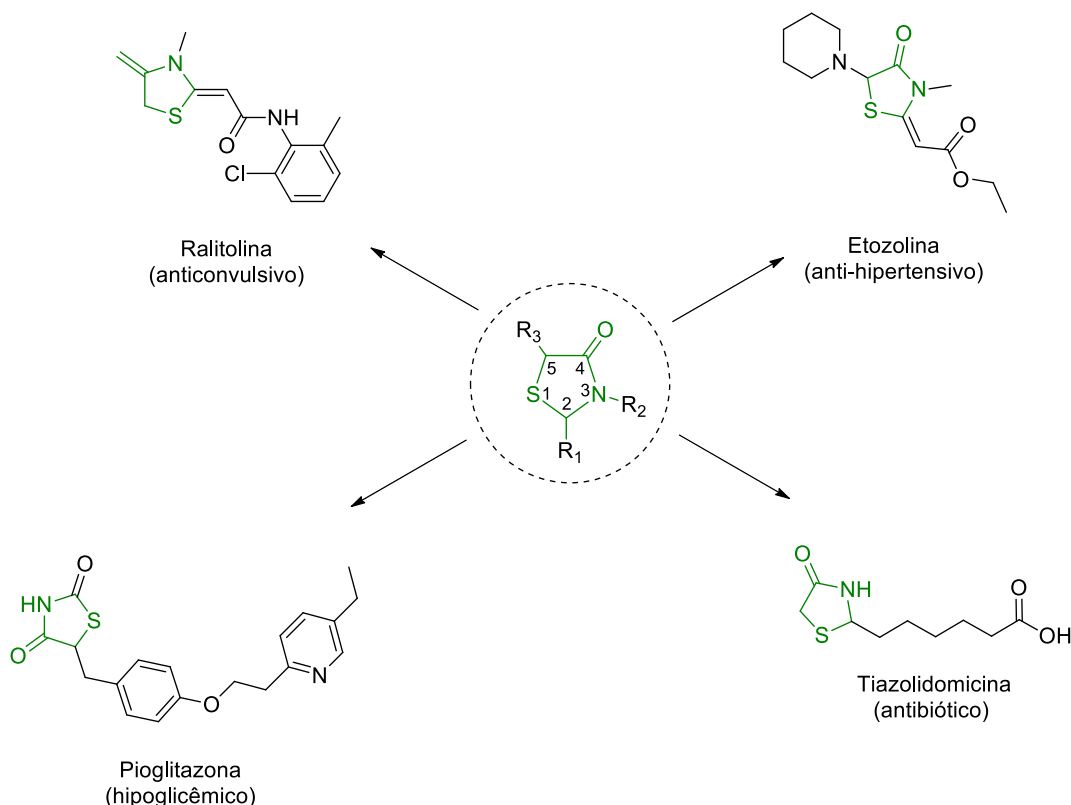
As 4-tiazolidinonas são derivados da tiazolidina, forma saturada do grupo tiazol, com um grupo carbonila na posição 4, também possuem um átomo de enxofre na posição 1 e um nitrogênio na posição 3 (Esquema 39).

Esquema 39. Núcleos tiazol (I), tiazolidina (II), 4-tiazolidinonas (III).



No passado, as 4-tiazolidinonas e seus derivados provocaram fascínio nos químicos medicinais e se tornaram um grupo importante de compostos heterocíclicos de enorme interesse devido às suas diversas aplicações em química medicinal. As 4-tiazolidinonas foram inclusive consideradas como um núcleo mágico (ou núcleo maravilhoso) por apresentar quase todos os tipos de potenciais biológicos (GUPTA, 2016). Esse núcleo exibe uma vasta gama de atividades biológicas e farmacológicas, tais como antitumoral, antiproliferativo, anti-inflamatórios, antiviral, anticonvulsivante, cardiovascular, AINEs (fármacos anti-inflamatórios não-esteroides), antidiabético, anti-hiperlipidêmico, antimicrobiana, antituberculose e antiparasitária. Compostos como ralitolina (anticonvulsivo), etozolina (anti-hipertensivo), pioglitazona (hipoglicêmico) e tiazolidomicina (antibiótico) com base neste grupo farmacofórico já estão no mercado (Esquema 40) (TRIPATHI et al., 2014). Além disso, os derivados das 4-tiazolidinonas também são precursores quimicamente importantes para a síntese de vários compostos bioativos úteis, tais como derivados de pirazolotazol, monofluoro β -lactamas e corantes de polimetina e cianina (PRASAD; PREETAM; NATH, 2012).

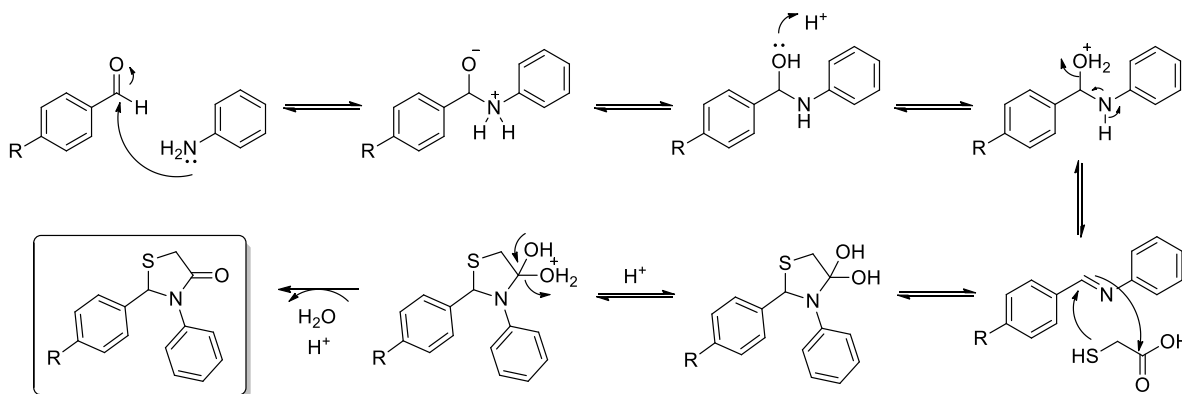
Esquema 40. Atividade biológica das 4-tiazolidinonas.



Portanto, o interesse em desenvolver metodologias sintéticas para estes compostos ganhou grande atenção de inúmeros pesquisadores desde o início da década de 60 (BROWN, 1961; EL AZAB; ABDEL-HAFEZ, 2015; HU et al., 2013; PRASAD; PREETAM; NATH, 2012; RAWAL et al., 2004; SRIVASTAVA; HAQ; KATTI, 2002; UNSAL-TAN et al., 2012).

As principais rotas sintéticas para a obtenção das 4-tiazolidinonas envolvem uma reação entre três componentes, um aldeído, uma amina e o ácido tioglicólico, quer em um processo que envolva uma ou duas etapas.

O mecanismo proposto envolve inicialmente a formação de uma imina (base de Schiff), em uma segunda etapa o par de elétrons do átomo de enxofre do ácido tioglicólico realiza um ataque nucleofílico na imina, seguida pela terceira etapa, uma ciclização intramolecular com a eliminação de uma molécula de água para a obtenção do produto desejado (Esquema 41) (BOLOGNESE et al., 2004).

Esquema 41. Mecanismo proposto para a síntese das 4-tiazolidinonas.

Acredita-se que a última etapa, ou seja, a eliminação da molécula de água seja a etapa determinante da velocidade da reação, sendo assim uma etapa essencial para a obtenção das 4-tiazolidinonas com altos rendimentos. Logo, várias estratégias foram desenvolvidas para que as moléculas de água eliminadas sejam removidas durante a reação de modo a se obter um maior rendimento do produto desejado. Dentre as estratégias desenvolvidas, a abordagem mais comum para a remoção da água do meio reacional envolve uma destilação azeotrópica utilizando um Dean Stark e benzeno ou tolueno como solventes da reação (PRASAD; PREETAM; NATH, 2012). De forma alternativa, vários agentes secantes, tais como peneiras moleculares, sulfato de sódio anidro (HOLMES et al., 1995), agentes desidratantes como N,N-dicicloexilcarbodiimida (DCC) (SRIVASTAVA; HAQ; KATTI, 2002), e o hexafluorofosfato de *O*-(benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametilurônico (HBTU) (RAWAL et al., 2004) e catalisadores do tipo ácidos de Lewis, como cloreto de zinco anidro (ZnCl₂) e cloreto de estanho (SnCl₂) também foram utilizados como metodologias para a obtenção de 4-tiazolidinonas com alto rendimentos (PRASAD; PREETAM; NATH, 2012).

Entretanto, a maioria dessas estratégias sintéticas está associada a uma série de desvantagens, que incluem o uso de solventes perigosos, catalisadores de alto custo, condições de reações adversas, como altas temperaturas, procedimentos de *work-up* complexos e a formação de subprodutos tóxicos.

Dessa maneira, surge a necessidade do desenvolvimento de protocolos sintéticos sustentáveis, simples, econômicos e mais eficientes para a síntese de 4-tiazolidinonas.

Diante do cenário apresentado, as reações multicomponentes (MCR) tornaram-se uma das estratégias mais promissoras para alcançar essa nova demanda (ALVIM; SILVA JÚNIOR; NETO, 2014; DE GRAAFF; RUIJTER; ORRU, 2012; HULME; GORE, 2003; SYAMALA, 2009; van der HEIJDEN; RUIJTER; ORRU, 2013).

Reações multicomponentes (MCR - *Multicomponent Reactions*) são aquelas nas quais o produto é formado a partir da combinação de três ou mais reagentes, com adição simultânea dos mesmos em uma única operação, no mesmo frasco reacional (*one-pot*) e, principalmente, com incorporação de todos os reagentes no esqueleto carbônico do produto (Figura 13).

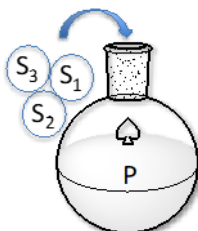


Figura 13. Reação *one-pot* multicomponente.

Fonte: O autor.

O conceito de MCR não é recente. Pelo contrário, a primeira MCR data de 1850 e corresponde à síntese de Strecker para a produção de α -aminoácidos a partir de α -aminocianetos (DÖMLING; UGI, 2000). Entretanto, o interesse pelas MCR ressurgiu nas últimas duas décadas como uma fonte promissora para diversidade molecular uma vez que apresentam maior eficiência quando comparadas às estratégias divergentes clássicas, não apenas pelos aspectos intrínsecos da reação como elevada eficiência atômica, seletividade, baixos níveis de formação de subprodutos, mas também devido aos aspectos extrínsecos como procedimentos e equipamentos mais simples, menores custos operacionais, menor consumo de solventes, tempo e energia além de aspectos ambientais mais amigáveis (BIGGS-HOUCK; YOUNAI; SHAW, 2010; RAMÓN; YUS, 2005).

As primeiras MCR foram realizadas em suas versões não catalíticas, recentemente, os esforços na busca de catalisadores adequados para as MCR foram intensificados. Como o controle estereoquímico das MCR é baixo e muitos adutos apresentam elevada atividade biológica mesmo na forma de misturas racêmicas, o desenvolvimento das versões assimétricas tem sido sub-explorado deixando em aberto um longo caminho a ser percorrido. A Biocatálise surge nesse contexto como uma metodologia interessante para a versão assimétrica das MCR, atualmente já existem diversos relatos na literatura da combinação de sucesso dessas duas estratégias sintéticas.

Nesse contexto, a reação *one-pot* tricomponente entre aldeídos, aminas e o ácido tioglicólico tem sido amplamente explorada na síntese de 4-tiazolidinonas. Acompanhando a tendência de metodologias sintéticas mais sustentáveis a Biocatálise se apresenta como uma

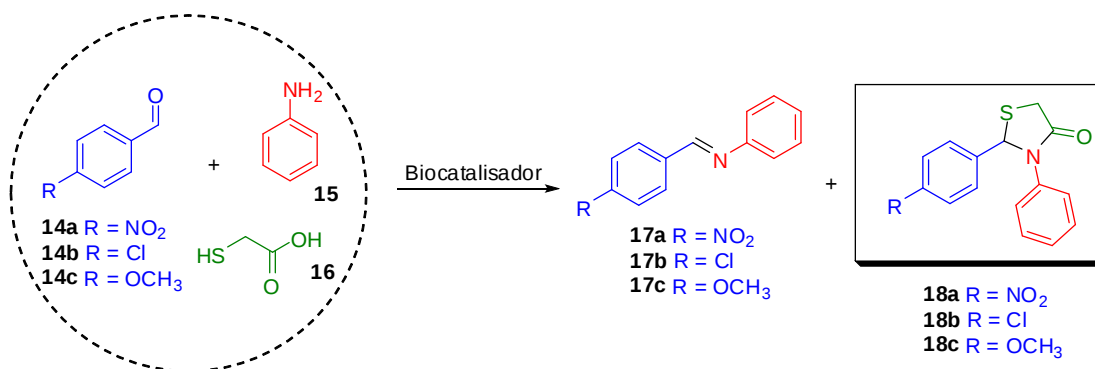
tecnologia que desempenha um papel central no contexto de Química verde. No entanto, ainda existem poucos exemplos na literatura em que as MCRs e a Biocatálise são combinadas para síntese de 4-tiazolidinonas e seus derivados (PRATAP et al., 2011; ZHENG et al., 2013).

3.3 OBJETIVOS

3.3.1 Objetivo geral

Realizar a síntese de 4-tiazolidinonas utilizando uma reação multicomponente entre um aldeído, a anilina e o ácido tioglicólico, combinada com biocatalisadores.

Esquema 42. Metodologia proposta para a síntese de 4-tiazolidinonas.



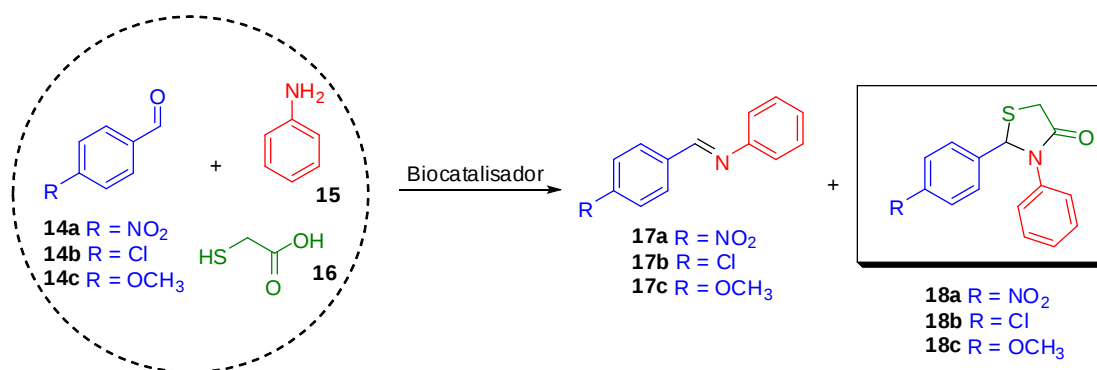
3.3.2 Objetivos específicos

1. Realizar ensaios de triagens enzimáticas em micro-organismos de uma coleção de leveduras isoladas de insetos sociais, de enzimas comercialmente disponíveis e da albumina de soro bovino (BSA) afim de expandir o número de biocatalisadores disponíveis para essa transformação química.
2. Avaliar a influência do solvente, a relação estequiométrica dos substratos e os substituintes no anel aromático dos aldeídos.

3.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

As 4-tiazolidinonas foram sintetizadas a partir de uma reação multicomponente entre um aldeído, a anilina e o ácido tioglicólico (Esquema 43).

Esquema 43. Síntese multicomponente de 4-tiazolidinonas.



A reação modelo escolhida foi a reação entre o 4-nitrobenzaldeído, a anilina e o ácido tioglicólico. Numa primeira etapa, foram realizadas reações testes para uma otimização das condições reacionais, onde foram avaliadas a proporção estequiométrica dos reagentes e o solvente.

A reação modelo foi realizada inicialmente em uma proporção estequiométrica de 1: 1: 1 de aldeído: amina: ácido carboxílico, na presença da levedura *S. cerevisiae*, em CH₂Cl₂ a 35°C, 700 rpm durante 40 h. Observou-se uma conversão de 70% para a 4-tiazolidinona **18a** desejada. Ao mudar a proporção estequiométrica de substratos a partir de 1: 1: 1 a 1: 1: 3, a taxa de conversão foi aumentada para 85%. Dessa forma, a proporção de 1: 1: 3 foi a utilizada nas reações de triagem dos biocatalisadores.

Usualmente as reações biocatalíticas são realizadas em sistemas aquosos tamponados. No entanto, os materiais de partida *p*-nitrobenzaldeído e anilina são muito pouco solúveis em água e, além disso, é bem conhecido que a água afeta negativamente esta reação. Para contornar este problema, foram avaliados três sistemas solventes orgânicos: CH₂Cl₂, THF e polietilenoglicol (PEG) 400. Os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 20.

Tabela 20. Otimização do solvente na síntese de 4-tiazolidinonas.

Entrada	Solvente	Catalisador	Conversão 17a (%) ^a	Conversão 18a (%) ^a
1	PEG	-	77	13
		<i>S. cerevisiae</i>	81	15
2	THF	-	45	7
		<i>S. cerevisiae</i>	67	8
3	CH ₂ Cl ₂	-	35	40
		<i>S. cerevisiae</i>	30	65

Condições experimentais: *p*-nitrobenzaldeído (0,2 mmol), anilina (0,2 mmol) e ácido tioglicólico (0,6 mmol), biocatalisador (40 mg), solvente (1 mL), 700 rpm, 35 °C, 24 h. ^aanálise de CG-FID.

O PEG 400 é uma opção atrativa de solvente verde devido a algumas de suas características como não ser tóxico nem volátil e sua estabilidade ao ar e a humidade. Os resultados obtidos na síntese multicomponente utilizando PEG 400 como solvente verde alternativo foram insatisfatórios, observou-se que a reação de ciclocondensação da base de Schiff não foi favorecida (Entrada 1, Tabela 20). O mesmo foi observado quando o solvente utilizado foi o THF (Entrada 2, Tabela 20). Quando se utilizou o diclorometano como solvente, a 4-tiazolidinona desejada **18a**, foi obtida com um bom rendimento (Entrada 3, Tabela 20).

Surpreendentemente, na condição não catalisada (experimento branco) foi observada uma conversão de 40% de **18a** (Entrada 3, Tabela 20). Dessa forma, decidiu-se investigar adicionalmente a influência do catalisador na reação de síntese das 4-tiazolidinonas. Portanto, realizou-se um experimento no qual o *p*-nitrobenzaldeído e a anilina (1: 1) em CH₂Cl₂ a 35°C, sem biocatalisador, foram agitados durante 24 h e foi observada uma conversão de 80% para a base de Schiff **17a**.

Os resultados obtidos revelaram que os biocatalisadores não desempenham um papel significativo na formação da base de Schiff. No entanto, eles catalisam a reação de ciclização.

Após a otimização das condições reacionais, foi realizada uma triagem de biocatalisadores e o estudo do escopo do substrato (aldeído). Foram utilizados diferentes biocatalisadores, algumas lipases comercialmente disponíveis, a BSA, a levedura *S. cerevisiae* e dois micro-organismos (*Candida shehatae* var. *insectosa* e N12AP2) que foram triados pelo grupo e apresentam alta atividade para hidrolases. Os dois micro-organismos pertencem a coleção de micro-organismos do grupo CEIS (Centro de Estudos de Insetos Sociais) do Instituto de Biociências da UNESP-Rio Claro, e foram fornecidos pelo Prof. Dr. Fernando Pagnocca. Os mesmos foram isolados de insetos sociais e de reservatório de água de bromélias, sendo

utilizados na forma de células inteiras liofilizadas. Os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 21.

Tabela 21. Síntese multicomponente de 4-tiazolidinonas com diferentes biocatalisadores.

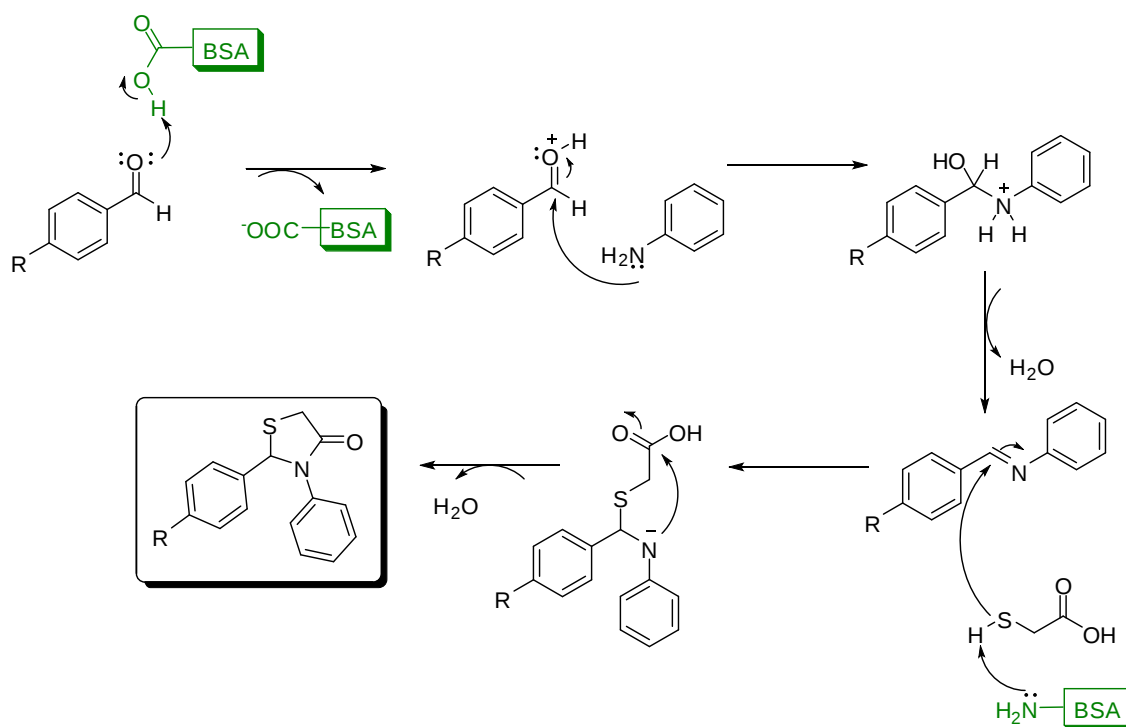
Entrada	Biocatalisador	Produto	Conversão 18a – c (%)
1	Lipase CALB-L	18a	55
		18b	69
		18c	65
2	Novozym 435	18a	67
		18b	54
		18c	52
3	BSA	18a	63
		18b	60
		18c	66
4	<i>S. cerevisiae</i> Type II	18a	64
		18b	62
		18c	65
5	<i>Candida shehatae</i> var. <i>insectosa</i>	18a	69
		18b	64
		18c	56
6	N12AP2	18a	61
		18b	66
		18c	67

Condições experimentais: aldeído (0,2 mmol), anilina (0,2 mmol) e ácido tioglicólico (0,6 mmol), diclorometano (1 mL), biocatalisadores: Novozyme 435 (5 mg); Lipase CALB-L (5 µL); BSA (5 mg); células inteiras liofilizadas (40 mg); 700 rpm, 35 °C, 24 h. ^aanálise de CG-FID.

Com relação ao *p*-nitrobenzaldeído os melhores resultados foram obtidos com a lipase comercial Novozym 435 (Entrada 2, Tabela 21) e com o micro-organismo *Candida shehatae* var. *insectosa* (Entrada 5, Tabela 21). Para o 4-clorobenzaldeído os melhores resultados foram obtidos quando se utilizou a lipase CALB-L (Entrada 1, Tabela 21) e o micro-organismo N12AP2 (Entrada 6, Tabela 21). Os melhores resultados para a reação com o anisalaldeído foram obtidos quando se utilizou o micro-organismo N12AP2 (Entrada 6, Tabela 21) e a BSA (Entrada 3, Tabela 21).

Para todos os aldeídos testados foi observada uma taxa de conversão para as 4-tiazolidinonas **18a-18c** de aproximadamente 40% nas reações sem o uso do biocatalisador. No entanto, a taxa de conversão dos produtos desejados aumentou em 15-20% quando os biocatalisadores foram utilizados (Tabela 21). A lipase comercial Novozyme 435 teve uma ligeira preferência pela reação de ciclização do intermediário contendo aldeído **14a**. Por outro lado, a lipase CALB-L mostrou preferência para os aldeídos **14b** e **14c** e o micro-organismo *Candida shehatae* var. *insectosa* para os aldeídos **14a** e **14b**. Nenhuma especificidade de substrato foi observada para os micro-organismos *S. cerevisiae* e N12AP2, e para a BSA. Existem na literatura propostas mecanísticas envolvendo uma catálise por lipase na reação de síntese da 4-tiazolidinonas (PRATAP et al., 2011). Porém os resultados observados com BSA e a falta de especificidade do substrato para essa reação sugerem que uma catálise proteica também pode ser considerada. (Esquema 44).

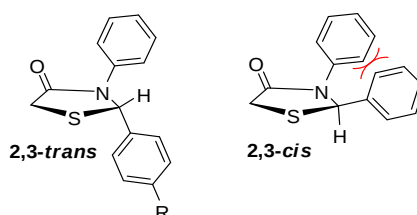
Esquema 44. Proposta de mecanismo para a biocatálise na síntese das 4-tiazolidinonas.



As 2,3-di-substituídas-4-tiazolidinonas podem existir na forma de 4 isômeros possíveis. Os isômeros geométricos com substituintes 2,3-*trans* são mais estáveis porque nessa configuração o impedimento estérico é minimizado (Esquema 45) (BARONE et al., 2001; TRIPATHI et al., 2014; VERMA; SARAF, 2008; VIGORITA et al., 1979). Os compostos **18a** e **18c** foram obtidos na forma de misturas racêmicas, enquanto o composto **18b** foi obtido com

um excesso enantiomérico modesto de 6% para o enantiômero (2*S*, 3*S*)-(-) (CIRILLI et al., 2010). A falta de enantiosseletividade pode ser racionalizada por uma catálise de proteína em vez de uma catálise específica por lipase. Ainda, supomos que ambos os enantiômeros 2,3-*trans* podem possuir energia torsional e de conformação semelhantes e, conseqüentemente, o ataque nucleofílico no nitrogênio na etapa de ciclização do intermediário poderia ocorrer em ambas as faces do carbono carboxílico, conduzindo dessa maneira a uma ausência de estereosseletividade.

Esquema 45. Isômeros geométricos das 2,3-di-substituídas-4-tiazolidinonas.



3.5 CONCLUSÕES

Em síntese, mostramos que os derivados de 2,3-diaril-4-tiazolidinonas podem ser sintetizados com bons rendimentos utilizando uma reação multicomponente entre um aldeído, a anilina e o ácido tioglicólico combinados com biocatalisadores em meio orgânico a 35 °C. A proporção estequiométrica de substratos que apresentou os melhores resultados foi a proporção de 1: 1: 3 de aldeído: amina: ácido carboxílico. O estudo da influência do solvente mostrou que os melhores resultados foram observados quando o diclorometano foi utilizado. A relação entre o substituinte do anel aromático dos aldeídos e a taxa de reação não ficou clara já que as conversões variam com os diferentes biocatalisadores testados.

Os resultados obtidos revelaram que os biocatalisadores não desempenharam um papel significativo na formação da base de Schiff, porém observou-se que papel do biocatalisador na etapa de ciclocondensação foi importante.

Por fim foi proposto um mecanismo que sugere uma catálise proteica, afim de explicar a baixa especificidade do substrato e ausência de enantiosseletividade observadas.

De maneira geral as 4-tiazolidinonas foram obtidas com rendimentos bons a moderados (52 a 69%), sob condições de reação suaves.

Em conclusão, os resultados apresentados neste capítulo evidenciam as potencialidades da catálise enzimática na síntese dos derivados de 2,3-diaril-4-tiazolidinonas e contribuem para o desenvolvimento de novas metodologias sintéticas mais sustentáveis para a preparação dessa classe de composto de tamanha importância.

Conclusões gerais

4. CONCLUSÕES GERAIS

No desenvolvimento deste trabalho, foi possível efetuar biorreduções enzimáticas quimio- e enantiosseletivas em α -metileno- β -cetoésteres e demonstrar as potencialidades da catálise enzimática na síntese dos derivados de 2,3-diaril-4-tiazolidinonas. Ambos substratos apresentam potencial interesse em síntese orgânica assimétrica.

No Capítulo 2, apresentamos a obtenção dos α -metil- β -hidroxiésteres com alta diastereo- e enantiosseletividades através de uma redução biocatalítica utilizando a levedura *Saccharomyces cerevisiae*. Os resultados apontados neste capítulo confirmaram as potencialidades da aplicação da Biocatálise e da levedura *Saccharomyces cerevisiae* na síntese dos α -metil- β -hidroxiésteres.

No Capítulo 3, mostramos que os derivados de 2,3-diaril-4-tiazolidinonas podem ser sintetizados com bons rendimentos empregando a eficiência das reações multicomponentes combinadas com os aspectos sustentáveis da Biocatálise. Os resultados apresentados neste capítulo evidenciaram as potencialidades da catálise enzimática na síntese dos derivados de 2,3-diaril-4-tiazolidinonas e podem contribuir para o desenvolvimento de novas metodologias sintéticas mais sustentáveis para a preparação dessa classe de compostos.

De maneira geral, demonstramos com este trabalho que o emprego da Biocatálise utilizando enzimas isoladas ou células íntegras é capaz de fornecer alternativas eficientes e potencialmente quimio- e estereosseletivas para a transformação de uma ampla variedade de compostos orgânicos.

Parte experimental

5. PARTE EXPERIMENTAL

5.1 Considerações gerais

Reagentes e solventes

Os reagentes foram adquiridos junto a empresa Sigma-Aldrich e utilizados sem purificação prévia. Os solventes foram utilizados em grau PA, HPLC ou *ultra-dry*.

Espectroscopia de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN de ^1H)

Os espectros de RMN de ^1H foram registrados no espectrômetro Bruker – Fourier 300 ($B_0 = 7,05\text{ T}$), operando a 300,19 MHz. Os deslocamentos químicos (δ) de hidrogênio foram registrados em ppm utilizando como referência interna tetrametilsilano (TMS, $\delta = 0,00$) e referência externa CDCl_3 ($\delta = 7,26$) ou $\text{DMSO}-d_6$ ($\delta = 3,30$). As constantes de acoplamento (J) foram medidas em Hertz (Hz) e os sinais foram caracterizados como: duplete (d), duplo duplete (dd), multiplete (m), simpleto (s), simpleto largo (sl) e tripleto (t).

Espectrometria de ressonância magnética nuclear de carbono (RMN de ^{13}C)

Os espectros de RMN de ^{13}C foram registrados no espectrômetro Bruker – Fourier 300, operando a 75,48 MHz. Os sinais de deslocamentos químicos de carbonos foram registrados em ppm, sendo $\delta\ 77,0$ para CDCl_3 .

Cromatografia gasosa acoplada a um detector de ionização em chamas (GC-FID)

As análises por CG-FID foram realizadas utilizando-se um cromatógrafo gasoso modelo Shimadzu GC-2010 Plus equipado com injetor automático AOC-20i e acoplado a um detector de ionização em chamas. O cromatógrafo operou a um fluxo constante de gás H_2 de $1\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$, temperatura do injetor igual a $260\text{ }^\circ\text{C}$, temperatura do detector igual a $300\text{ }^\circ\text{C}$. Utilizou-se coluna capilar de sílica fundida Restek Rtx®-5 ($30\text{ m} \times 0,25\text{ mm} \times 0,25\text{ }\mu\text{m}$, 5% fenil e 95% dimetilpolisiloxano). As injeções das amostras foram de $1\text{ }\mu\text{L}$ na concentração de 0,5 – 1 mg

mL⁻¹ no modo *splitless*. A programação utilizada foi 80 °C por 3 minutos, 80 – 280 °C com rampa de aquecimento à 30 °C.min⁻¹, e mantidas a 280 °C por 5 minutos.

As análises por GC-FID em fase quiral foram realizadas em um cromatógrafo gasoso modelo Agilent 6850 acoplado a um detector de ionização em chamas. O cromatógrafo operou a um fluxo constante de gás H₂ de 1 mL.min⁻¹, temperatura do injetor igual a 200 °C, temperatura do detector igual a 220 °C. As injeções das amostras foram de 1 mL na concentração de 0,5 – 1 mL.min⁻¹. As colunas quirais utilizadas foram a coluna Hydrodex® β-3P fase quiral heptakis-(2,6-di-O-metil-3-O-pentil)-β-ciclodextrina (25 m × 0,25 mm × 0,25 μm; Macherey-Nagel) e a coluna Lipodex® E fase quiral octakis-(2,6-di-O-pentil-3-O-butilil)-γ-ciclodextrina (28 m × 0,25 mm x 0,25 m).

Os métodos utilizados para a separação dos diastereoisômeros e enantiômeros foram:

- Coluna Hydrodex® β-3P (CHAVES; MORAN; RODRIGUES, 2013)

Método H1: 80°C (5 °C min⁻¹), 180°C - 10 min.

Método H2: 150°C - 30 min. (1°C min⁻¹), 170°C (10°C min⁻¹), 180 °C - 2 min.

- Coluna Lipodex® E (CHAVES; MORAN; RODRIGUES, 2013)

Método L1 120°C (1 °C min⁻¹), 150°C (15 °C min⁻¹), 180°C - 10 min.

Método L2 150°C (15 °C min⁻¹), 180°C - 30 min.

Cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massas (GC-MS)

As análises por Cromatografia Gasosa Acoplada ao Espectrômetro de Massas (GC-MS) foram realizadas utilizando-se um cromatógrafo gasoso GC/MS – Modelo 7890B – Agilent acoplado a um espectrômetro de massas Modelo 5977A cuja fonte de ionização por elétrons opera com energia de ionização a 70 eV. O espectrômetro de massas operou na faixa de *m/z* 45-500. Para GC foi utilizada uma coluna capilar de sílica fundida HP-5 MS (30 m x 0,25 mm x 0,25 m, 5% fenil-metilsiloxano). O cromatógrafo operou com fluxo constante de gás He de 1 mL/min, temperatura do injetor igual a 260 °C e a temperatura da interface igual a 280 °C. As injeções das amostras foram de 1 mL na concentração de 0,5 – 1 mg /mL. A programação de temperatura utilizada foi de 3 minutos a 80°C, seguida de rampa de aquecimento 80-280°C a 30°C/min e mantido em 280°C por 3 minutos.

Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC - DC)

As análises por Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) foram realizadas em um cromatógrafo JASCO® com controlador LC-NET II/ADC, detector de arranjo fotodiodos (DAD) modelo MD-2018 PLUS, bomba PU-2086 plus, injetor automático AS-2055 e detector de dicroísmo circular (DC-2095). As injeções das amostras foram de 10 µL na concentração de 1 mg.mL⁻¹.

Utilizou-se a coluna Diacel, de sílica encapada com celulose ligada a 3,5-dimetilfenilcarbamato (250 x 4,6 mm, 5 µm) e pré-coluna (10 x 4,6 mm, 5µm), modelo Chiralcel OD-H (fase normal). O cromatógrafo operou em modo isocrático com fase móvel composta por 70% hexano e 30% isopropanol, em um fluxo de 0,7 mL.min⁻¹.

Também foi utilizada a coluna Diacel, de sílica encapada com celulose ligada a 3,5-diclorofenilcarbamato (250 x 4,6 mm, 5 µm) e pré-coluna (10 x 4,6 mm, 5µm), modelo Chiralcel IC (fase normal). O cromatógrafo operou em modo isocrático com fase móvel composta por 90% hexano e 10% isopropanol, em um fluxo de 1,0 mL.min⁻¹.

A temperatura durante as separações foi ajustada para 25 °C e a detecção de UV foi realizada a 220 ou 245 nm.

Cromatografia em camada delgada e tubular

As reações foram acompanhadas por Cromatografia em Camada Delgada (CCD), em cromatoplasmas de 20x10 cm da Merck com suporte de alumínio com filme de sílica gel 60 F₂₅₄.

As placas cromatográficas em camada delgada preparativa (CCDP) foram preparadas com sílica gel da Sigma-Aldrich com 0.75 mm de espessura, sobre placas de vidro de 20 x 20 cm.

As cromatografias em DSC (*Dry Silica Column*) foram realizadas com sílica gel 230-400 mesh da marca Macherey-Nagel, com gradiente de eluição hexano/acetato de etila.

A revelação dos compostos com grupos cromóforos foi realizada utilizando radiação ultravioleta no comprimento de onda λ de 254 nm.

Espectroscopia no infravermelho (IV)

Os espectros de absorção na região do infravermelho foram registrados em um espectrofotômetro modelo Thermo Scientific Nicolet iS5, com transformada de Fourier, no modo Attenuated Total Reflectance (ATR) (4000 a 500 cm^{-1}).

Triagem enzimática dos micro-organismos

Biocatalisadores

Os micro-organismos utilizados na triagem enzimática são micro-organismos isolados de amostras de solo de diferentes pontos numa área da UNESP - Rio Claro que faz divisa com a FEENA (Floresta Estadual Edmundo Navarro de Andrade) uma área de proteção ambiental, cujo solo não sofreu ação antrópica. Também foram utilizados micro-organismos isolados de amostras de solo em diferentes pontos próximos à lagoa de decantação de água de manipueira da Fecularia Plaza (usina de beneficiamento de mandioca) e de solos de fazenda de plantações de cebolas na região de São José do Rio Pardo - SP. Os citados micro-organismos compõem a biblioteca de micro-organismos do Grupo Milagre do IQ/UNESP. Também foram utilizados micro-organismos da Coleção de Micro-organismos do Centro de Estudos de Insetos Sociais (CEIS), fornecidos pelo Prof. Dr. Fernando Carlos Pagnocca do Instituto de Biociências da UNESP - Rio Claro.

Armazenamento e preservação dos micro-organismos

Os micro-organismos foram repicados continuamente com o auxílio de uma alça metálica para pegar a amostra de células microbianas da placa de Petri e semear em tubo de ensaio com meio sólido adequado inclinado. Os tubos semeados foram transferidos para uma incubadora B.O.D a uma temperatura ótima de 28 °C e o crescimento dos micro-organismos foi acompanhado através de inspeção visual das placas. Após crescimento os tubos foram armazenados a 4 °C para uso de rotina.

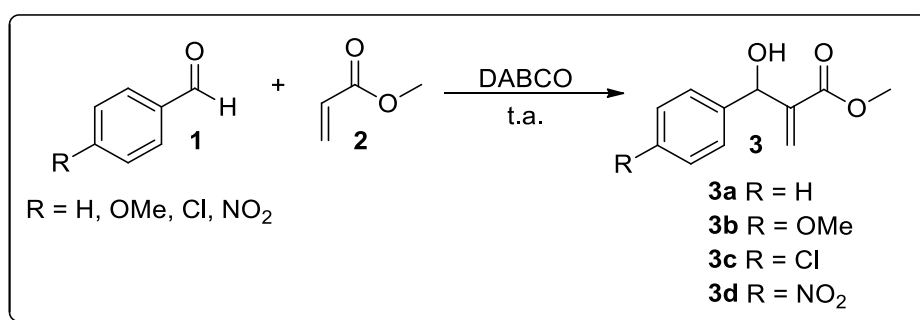
A preservação a curto prazo é de grande importância durante os estudos, pois os micro-organismos ficam sempre acessíveis para uso imediato. Nesta técnica o manuseio é simples, não requer altos custos para a manutenção e nem mesmo equipamentos específicos. O objetivo

da preservação a curto prazo é reduzir o metabolismo dos micro-organismos, para que estes permaneçam viáveis de 3 a 4 meses após o armazenamento a 4 °C.

Para a preservação e armazenamento em médio prazo, os micro-organismos foram preservados em microtubos contendo meio de cultura, sob solução aquosa de glicerol a 10% e armazenados a -20 °C. O glicerol foi utilizado como agente crioprotetor com a função de impedir a formação de cristais de gelo nas células microbianas que podem romper a membrana celular.

5.2 Procedimento experimental e dados espectroscópicos dos compostos sintetizados

5.2.1 Procedimento geral para síntese dos adutos de MBH



O aldeído de partida (5 a 15 mmol - 1 equivalente) foi dissolvido em acrilato de metila (5 equivalentes) e posteriormente adicionou-se DABCO (0,65 equivalentes). A reação permaneceu sob agitação magnética a temperatura ambiente e foi monitorada por CCD. Observou-se o aparecimento de uma mancha mais polar referente ao aduto de MBH. Ao término da reação, o acrilato de metila foi removido sob pressão reduzida e o resíduo foi dissolvido em acetato de etila (50 mL). A solução foi extraída com água destilada (2 x 50 mL) e com solução saturada de NaCl (50 mL). A fase orgânica foi separada, seca em sulfato de magnésio anidro e concentrada sob pressão reduzida. O produto bruto foi purificado por DSC.

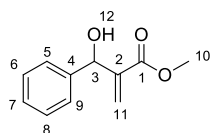
Quando o aldeído de partida foi o benzaldeído, o produto bruto foi purificado por DSC (50% Hex/EtOAc). Rendimento: 86%.

Quando o aldeído de partida foi o anisaldeído, o produto bruto foi purificado por DSC (40% Hex/EtOAc). Rendimento: 64%.

Quando o aldeído de partida foi o 4-clorobenzaldeído, o produto bruto foi purificado por DSC (60% Hex/EtOAc). Rendimento: 96%.

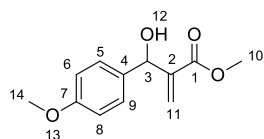
Quando o aldeído de partida foi o 4-nitrobenzaldeído, o produto bruto foi purificado por foi purificado por recristalização. Rendimento: 83%.

Procedimento para a recristalização: o produto bruto foi dissolvido na menor quantidade possível de acetato de etila pré-aquecido, em seguida adicionou-se hexano lentamente até a turvação do meio. A mistura foi colocada em geladeira e a cristalização completa ocorreu após 3 dias a 8°C.



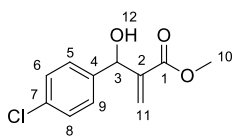
2-metileno-3-hidroxi-3-fenilpropanoato de metila 3a: **Tempo reacional:** 18 dias; **Rendimento:** 86%;. **FM** C₁₁H₁₂O₃; **MM** 192,2; **Característica:** óleo viscoso incolor; **IV** (ATR) $\nu_{\max}$ (cm⁻¹): 3422, 3030, 2953, 1708, 1628, 1438,

1271, 1146, 1039, 699; **EM** m/z (%): 192 (M⁺), 160 (43), 132 (59), 105 (100), 77 (40), 55 (16); **RMN de ¹H** (300,19 MHz, CDCl₃) δ : 7.40 – 7.29 (m, 5H, H-5 – H-9), 6.35 (s, 1H, H-11), 5.83 (s, 1H, H-11), 5.57 (s, 1H, H-3), 3.73 (s, 3H, H-10). **RMN de ¹³C** (75,48 MHz, CDCl₃) δ 166.9, 159.4, 142.3, 133.6, 128.0, 125.8, 114.0, 73.0, 55.4, 52.1.



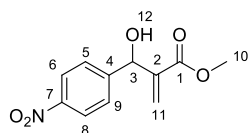
2-metileno-3-hidroxi-3-(p-metoxifenil)-propanoato de metila 3b: **Tempo reacional:** 30 dias; **Rendimento:** 64%;. **FM** C₁₂H₁₄O₄; **MM** 222,2; **Característica:** sólido branco; **PF:** 60 – 63 °C; **IV** (ATR) $\nu_{\max}$

(cm⁻¹): 3342, 3001, 2950, 2833, 1712, 1627, 1510, 1256, 1147, 1018, 830, 813, 577; **EM** m/z (%): 222 (M⁺), 190 (19), 162 (16), 135 (100), 108 (59), 94 (16), 77 (19); **RMN de ¹H** (300,19 MHz, CDCl₃) δ : 7.30 – 7.25 (m, 2H, H-6 e H-8), 6.87 (d, J = 8.7 Hz, 2H, H-5 e H-9), 6.31 (s, 1H, H-11), 5.83 (s, 1H, H-11), 5.52 (s, 1H, H-3), 3.79 (s, 3H, H-14), 3.71 (s, 3H, H-10). **RMN de ¹³C** (75,48 MHz, CDCl₃) δ 167.0, 159.4, 142.3, 133.6, 128.0, 125.8, 114.0, 73.0, 55.4, 52.1.



2-metileno-3-hidroxi-3-(p-clorofenil)-propanoato de metila 3c: **Tempo reacional:** 7 dias; **Rendimento:** 96%;. **FM** C₁₁H₁₁ClO₃; **MM** 226,6; **Característica:** óleo viscoso amarelado; **IV** (ATR) $\nu_{\max}$ (cm⁻¹): 3442,

3001, 1708, 1629, 1438, 1272, 1146, 1038, 698; **EM** m/z (%): 226 (M⁺), 194 (30), 166 (57), 141 (51), 139 (100), 115 (21), 77 (54); **RMN de ¹H** (300,19 MHz, CDCl₃) δ : 7.32 (s, 4H, H-5 – H-9), 6.34 (s, 1H, H-11), 5.83 (s, 1H, H-11), 5.53 (d, J = 5.3 Hz, 1H, H-3), 3.73 (s, 3H, H-10), 3.10 (d, J = 5.3 Hz, 1H, H-12). **RMN de ¹³C** (75,48 MHz, CDCl₃) δ 166.8, 141.7, 139.9, 133.7, 128.7, 128.1, 126.6, 72.9, 52.2.



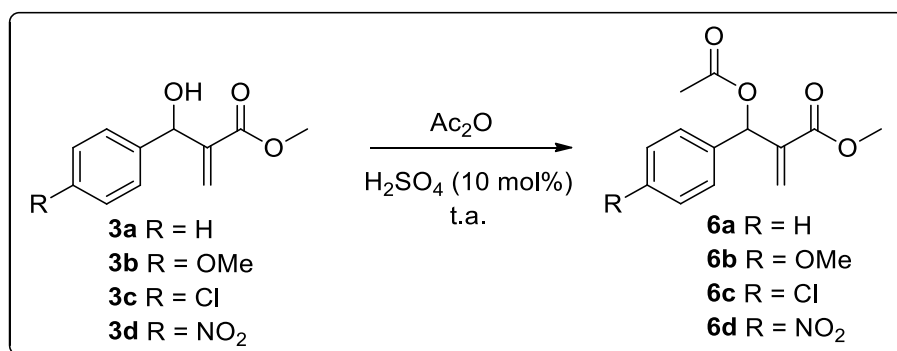
2-metileno-3-hidroxi-3-(p-nitrofenil)-propanoato de metila 3d: Tempo

reacional: 4 horas; **Rendimento:** 83%; **FM** C₁₁H₁₁NO₅; **MM** 237,2;

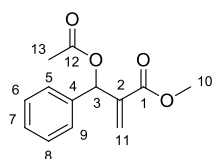
Característica: sólido amarelo; **PF:** 71 – 73 °C; **IV** (ATR) ν_{max} (cm⁻¹):

3422, 3030, 2953, 1708, 1628, 1438, 1271, 1146, 1039, 699; **EM** m/z (%): 237 (M⁺), 236 (20), 220 (61), 205 (45), 190 (25), 177 (100), 160 (20), 150 (91), 77 (30), 55 (23); **RMN de ¹H** (300,19 MHz, CDCl₃) δ : 8.21 (d, J = 8.8 Hz, 2H, H-6 e H-8), 7.58 (d, J = 8.9 Hz, 2H, H-5 e H-9), 6.40 (s, 1H, H-11), 5.87 (s, 1H, H-11), 5.63 (s, 1H, H-3), 3.75 (s, 3H, H-10). **RMN de ¹³C** (75,48 MHz, CDCl₃) δ 166.5, 148.7, 147.6, 141.0, 127.5, 123.8, 73.0, 52.4.

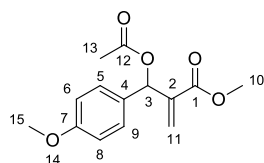
5.2.2 Procedimento geral para a síntese dos compostos acetilados (6a – 6d)



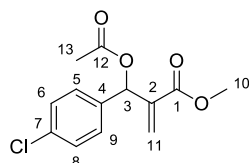
A uma mistura do aduto de MBH (3a – 3d) (0,22 mmol, 50 mg) e anidrido acético (10 equivalentes, 2 mmol, 230 μ L), adicionou-se ácido sulfúrico concentrado (0,1 equivalentes, 0,02 mmol, 1 μ L). A reação permaneceu sob agitação magnética a temperatura ambiente por 5 minutos. Ao término da reação, adicionou-se 2 mL de uma solução de NaOH 2M. A mistura resultante foi extraída com acetato de etila (3x 10 mL) e a combinação dos extratos lavados com solução de 10% aq. NaHCO₃ (3x 10 mL). A fase orgânica foi seca sob sulfato de magnésio anidro. Após filtração e concentração do solvente, o produto bruto foi submetido à purificação por placa preparativa.



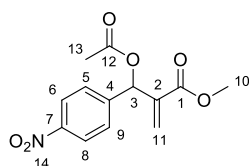
2-metileno-3-acetoxi-3-fenilpropanoato de metila 6a: **Tempo reacional**: 5 minutos; **Rendimento**: 75%; **FM** C₁₃H₁₄O₄; **MM** 234,3; **Característica**: óleo incolor; **RMN de ¹H** (300,19 MHz, CDCl₃) δ: 7.40 – 7.30 (m, 5H, H-5 – H-9), 6.68 (s, 1H, H-11), 6.40 (s, 1H, H-11), 5.86 (s, 1H, H-3), 3.71 (s, 3H, H-10), 2.11 (s, 3H, H-13). **RMN de ¹³C** (75,48 MHz, CDCl₃) δ: 169.6, 165.6, 139.8, 137.9, 128.6, 128.5, 127.8, 125.9, 73.2, 52.1, 21.2.



2-metileno-3-acetoxi-3-(p-metoxifenil)-propanoato de metila 6b: **Tempo reacional**: 5 minutos; **Rendimento**: 55%; **FM** C₁₄H₁₆O₅; **MM** 264,3; **Característica**: óleo incolor; **EM** *m/z* (%): 264 (M⁺), 221 (50), 189 (100), 190 (30), 173 (10), 161 (25), 145(33); **RMN de ¹H** (300,19 MHz, CDCl₃) δ 7.31 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H), 6.87 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H), 6.63 (s, 1H, H-11), 6.38 (s, 1H, H-11), 5.87 (s, 1H), 3.80 (s, 3H, H-15), 3.70 (s, 3H, H-10), 2.09 (s, 3H, H-13). **RMN de ¹³C** (75,48 MHz, CDCl₃) δ 169.7, 165.6, 159.8, 139.8, 129.9, 129.3, 125.3, 114.0, 73.0, 55.4, 52.1, 21.3.

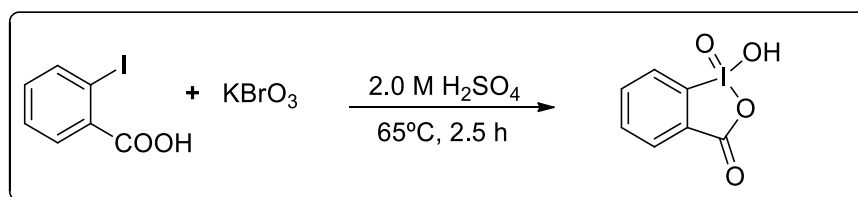


2-metileno-3-acetoxi-3-(p-clorofenil)-propanoato de metila 6c: **Tempo reacional**: 5 minutos; **Rendimento**: 86%; **FM** C₁₃H₁₃ClO₄; **MM** 268,7; **Característica**: óleo amarelo claro; **EM** (ESI-MS(/MS)) [M+H]⁺ *m/z* 269 **RMN de ¹H** (300,19 MHz, CDCl₃) δ 7.31 (s, 4H, H-5 – H-9), 6.63 (s, 1H, H-11), 6.40 (s, 1H, H-11), 5.89 (s, 1H, H-3), 3.71 (s, 3H, H-10), 2.10 (s, 3H, H-13).



2-metileno-3-acetoxi-3-(p-nitrofenil)-propanoato de metila 6d: **Tempo reacional**: 5 minutos; **Rendimento**: 95%; **FM** C₁₃H₁₃NO₆; **MM** 279,2; **Característica**: óleo amarelo claro; **EM** *m/z* (%): 248 (13), 236 (100), 220 (86), 204 (84), 188 (80), 177 (31), 150 (96), 134 (38), 115 (37); **RMN de ¹H** (300,19 MHz, CDCl₃) δ: 8.21 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H), 7.57 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H), 6.72 (s, 1H, H-11), 6.47 (s, 1H, H-11), 5.98 (s, 1H, H-3), 3.73 (s, 3H, H-10), 2.15 (s, 3H, H-13). **RMN de ¹³C** (75,48 MHz, CDCl₃) δ: 169.3, 165.1, 147.9, 145.2, 138.7, 128.6, 127.0, 123.9, 72.3, 52.4, 21.1.

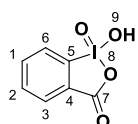
5.2.3 Procedimento geral para a síntese do ácido 2-iodoxi-benzóico (IBX)



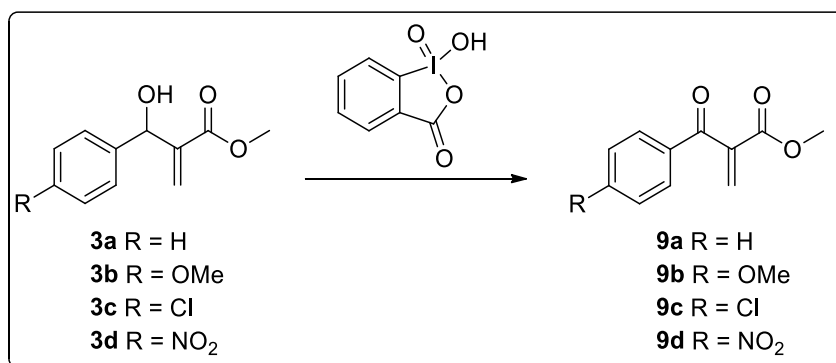
A um balão de 50mL de duas bocas adicionou-se uma solução 2,0M de H_2SO_4 (18,75 mL) e KBrO_3 (11 mmol, 2 g). A solução resultante foi posta em agitação magnética e sob aquecimento a 70 °C. Após a temperatura se estabilizar foi adicionado o ácido iodobenzóico (8 mmol, 2 g) na reação. A adição foi feita aos poucos e durou aproximadamente 40 min. A adição do ácido iodobenzóico libera Br_2 .

A solução se tornou alaranjada, assim como a atmosfera dentro do balão, observou-se a formação de um sólido branco.

Depois de completa a adição do ácido iodobenzóico, a reação foi aquecida a 75 °C. A mistura reacional foi mantida sob aquecimento e agitação por 2,5 horas. Após 2,5 horas a reação foi resfriada em um banho de gelo e então foi filtrada em um funil de Büchner. O sólido branco foi lavado com água deionizada gelada, com etanol absoluto gelado e por fim com acetona P.A. gelada.

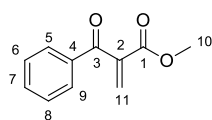


ácido 2-iodoxi-benzóico: **Tempo reacional:** 2,5 horas; **Rendimento:** 95%;. **FM** $\text{C}_7\text{H}_5\text{IO}_4$; **MM** 280,0; **Característica:** sólido branco; **IV** (ATR) ν_{max} (cm^{-1}): 3073, 1633, 1330, 1294, 774, 749, 595, 439; **RMN de ^1H** (300,19 MHz, DMSO) δ : 7,84 (m, 1 H, H-3), 7,96–8,06 (m, 2H, H-1 e H-2), 8,14 (d, 1H, J = 7,6 Hz, H-6).

5.2.4 Procedimento geral para a síntese dos α -metileno- β -cetoésteres (9a – 9d)

O aduto de MBH (0,2 mmol, 50 mg) foi dissolvido em acetonitrila até uma concentração final de 0,14M. Em seguida adicionou-se o ácido 2-iodoxi-benzóico (IBX) na reação (1,5 equivalentes, 0,3 mmol, 92,6 mg). A reação permaneceu sob agitação magnética a 70 °C por 4 horas. A reação foi monitorada por CCD e observou-se a formação de um produto menos polar em relação ao material de partida (eluente utilizado: Hex/EtOAc 9:1).

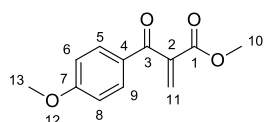
Ao término da reação, a mesma foi resfriada a temperatura ambiente, filtrada e concentrada sob pressão reduzida. Não foi necessária a etapa de purificação.



2-metileno-3-oxo-3-fenilpropanoato de metila 9a: Tempo reacional: 3

horas; Rendimento: 92%; FM C₁₁H₁₀O₃; MM 190,2; Característica: óleo amarelado; IV (ATR) $\nu_{\max}$ (cm⁻¹): 2954, 1729, 1673, 1596, 1448, 1235,

1142, 976, 688; EM m/z (%): 190 (M⁺), 158 (16), 130 (11), 105 (100), 77 (67), 51 (16); RMN de ¹H (300,19 MHz, CDCl₃) δ : 7.91 – 7.83 (m, 2H, H-5 e H-9), 7.66 – 7.55 (m, 1H, H-7), 7.47 (tt, J = 6.7, 1.3 Hz, 2H, H-6 e H-8), 6.73 (s, 1H, H-11), 6.06 (s, 1H, H-11), 3.77 (s, 3H, H-10). RMN de ¹³C (75,48 MHz, CDCl₃) δ 193.2, 165.0, 141.0, 136.2, 133.9, 131.8, 129.7, 128.8, 52.6.

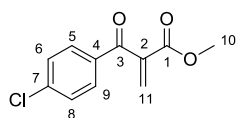


2-metileno-3-oxo-3-(p-metoxifenil)-propanoato de metila 9b: Tempo

reacional: 3 horas; Rendimento: 94%; FM C₁₂H₁₂O₄; MM 220,2;

Característica: óleo amarelado; IV (ATR) $\nu_{\max}$ (cm⁻¹): 2954, 1724,

1662, 1595, 1447, 1242, 1138, 976, 610; EM m/z (%): 220 (M⁺), 135 (100), 107 (16), 92 (11), 77 (19); RMN de ¹H (300,19 MHz, CDCl₃) δ : 7.86 (d, J = 9.0 Hz, 2H, H-5 e H-9), 6.94 (d, J = 9.0 Hz, 2H, H-6 e H-8), 6.68 (s, 1H, H-11), 5.99 (s, 1H, H-11), 3.88 (s, 3H, H-13), 3.77 (s, 3H, H-10). RMN de ¹³C (75,48 MHz, CDCl₃) δ 191.9, 165.0, 164.3, 141.1, 132.2, 130.9, 129.2, 114.0, 55.7, 52.6.

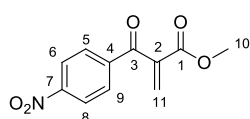


2-metileno-3-oxo-3-(p-clorofenil)-propanoato de metila 9c: Tempo

reacional: 5 horas; **Rendimento:** 95%;. **FM** C₁₁H₉ClO₃; **MM** 224,6;

Característica: óleo viscoso amarelado; **IV** (ATR) $\nu_{\max}$ (cm⁻¹): 2953,

1730, 1675, 1447, 1435, 1236, 1143, 970, 688; **EM** m/z (%): 224 (M⁺), 141 (35), 139 (100), 113 (11), 111 (30), 75 (11); **RMN de ¹H** (300,19 MHz, CDCl₃) δ : 7.80 (d, J = 8.7 Hz, 2H, H-5 e H-9), 7.45 (d, J = 8.7 Hz, 2H, H-6 e H-8), 6.73 (s, 1H, H-11), 6.07 (s, 1H, H-11), 3.77 (s, 3H, H-10); **RMN de ¹³C** (75,48 MHz, CDCl₃) δ 192.0, 164.7, 140.7, 140.4, 134.6, 132.1, 131.0, 129.1, 52.7.



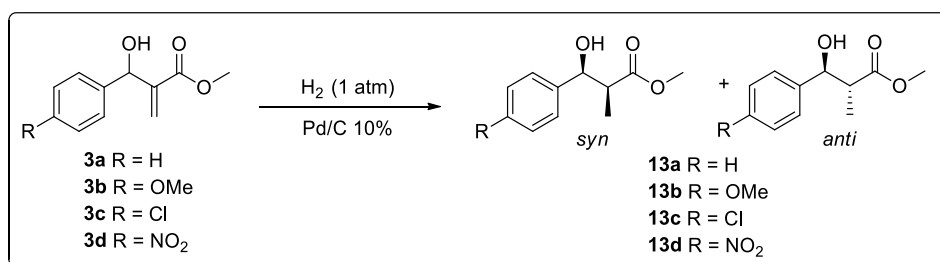
2-metileno-3-oxo-3-(p-nitrofenil)-propanoato de metila 9d: Tempo

reacional: 3 horas; **Rendimento:** 88%;. **FM** C₁₁H₉NO₅; **MM** 235,2;

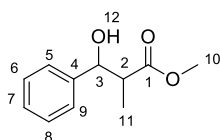
Característica: óleo viscoso amarelo; **IV** (ATR) $\nu_{\max}$ (cm⁻¹): 2954, 1729,

1673, 1596, 1448, 1235, 1142, 976, 688; **EM** m/z (%): 235 (M⁺), 220 (17), 203 (17), 175 (15), 150 (100), 120 (17), 104 (41), 92 (26), 76 (37), 59 (12); **RMN de ¹H** (300,19 MHz, CDCl₃) δ : 8.33 (d, J = 8.9 Hz, 2H), 8.00 (d, J = 8.9 Hz, 2H), 6.81 (s, 1H, H-11), 6.21 (s, 1H, H-11), 3.78 (s, 3H, H-10).

5.2.5 Procedimento geral para obtenção de α -metil- β -hidroxiésteres



0,01 mmol de Pd/C (5%) foram dissolvidos em 8 mL de metanol anidro e mantidos sob atmosfera de H₂ (“bexiga”, pressão ambiente) por 30 minutos. Após este período adicionou-se 0,2 mmol do α -metileno- β -hidroxiésteres (**3a** – **3d**) em 2 mL de metanol. O sistema foi mantido sob agitação magnética e temperatura ambiente por 30 minutos para obtenção dos α -metil- β -hidroxiésteres. A mistura foi filtrada através de um filtro de papel e o solvente evaporado, obtendo-se o produto desejado. O produto foi purificado por placa preparativa.



2-metil-3-hidroxi-3-fenil-propanoato de metila 13a: **Tempo reacional:** 30 minutos; **Rendimento:** 75%; **FM** C₁₁H₁₄O₃; **MM** 194,2; **Característica:** óleo amarelo claro; **EM** *m/z* (%): 194 (M⁺), 107 (80), 105 (36), 88 (100), 79 (44), 77 (34), 55 (21). **RMN de ¹H** (300,19 MHz, CDCl₃) *syn* δ 7.38 – 7.27 (m, 14H), 5.13 – 5.08 (m, 2H), 3.68 (s, 6H), 2.87 – 2.74 (m, 3H), 1.13 (d, *J* = 7.2 Hz, 6H). *anti* δ 7.38 – 7.27 (m, 14H), 4.75 (dd, *J* = 8.6, 4.2 Hz, 1H), 3.73 (s, 3H), 2.87 – 2.74 (m, 3H), 1.01 (d, *J* = 7.2 Hz, 3H). **RMN de ¹³C** (75,48 MHz, CDCl₃) δ 176.4, 141.5, 128.7, 128.4, 128.3, 127.6, 126.8, 126.1, 73.7, 52.0, 47.2, 46.5, 14.6, 10.8. A coluna e o método utilizados para a separação dos diastereoisômeros e enantiômeros foram a coluna Hydrodex® β-3P e o método H1: 80°C (5 °C min⁻¹), 180°C - 10 min. Tempos de retenção: (2*R*,3*R*): 37,636 min.; (2*S*,3*S*): 38,146 min.; (2*R*,3*S*): 38,406 min.; (2*S*,3*R*): 39,023 min. (Figura 14).

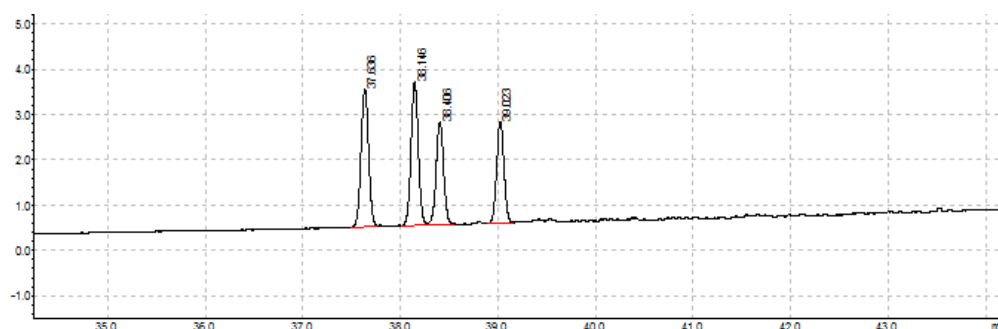
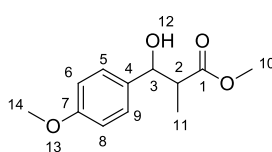


Figura 14. Cromatograma do padrão *rac*-13a.



2-metil-3-hidroxi-3-(*p*-metoxifenil)-propanoato de metila 13b: **Tempo reacional:** 30 minutos; **Rendimento:** 58%; **FM** C₁₂H₁₆O₄; **MM** 224,1; **Característica:** óleo amarelo claro; **EM** *m/z* (%): 224 (M⁺), 206 (10), 146 (11), 135 (17), 137 (100), 109 (24), 94 (14), 77 (21). **RMN de ¹H** (300,19 MHz, CDCl₃) *syn* d 7.26 (dd, *J* = 8.5, 1.8 Hz, 2H), 6.88 (dd, *J* = 8.8, 4.0 Hz, 2H), 5.08 – 4.97 (m, 1H), 3.80 (s, 3H), 3.66 (s, 3H), 2.84 – 2.72 (m, 1H), 1.15 (d, *J* = 7.1 Hz, 3H). *anti* d 7.26 (dd, *J* = 8.5, 1.8 Hz, 2H), 6.88 (dd, *J* = 8.8, 4.0 Hz, 2H), 4.71 (dd, *J* = 8.8, 3.9 Hz, 2H), 3.81 (s, 3H), 3.74 (s, 3H), 2.84 – 2.72 (m, 1H), 0.99 (d, *J* = 7.2 Hz, 3H). **RMN de ¹³C** (75,48 MHz, CDCl₃) δ 176.3, 159.1, 133.7, 128.0, 127.3, 114.0, 113.8, 76.2, 73.6, 55.4, 52.0, 47.3, 46.7, 14.6, 11.2. A coluna e o método utilizados para a separação dos diastereoisômeros e enantiômeros foram a coluna Hydrodex® β-3P e o método H2: 150°C - 30 min. (1°C min⁻¹), 170°C (10°C min⁻¹), 180 °C - 2 min. (Figura 15).

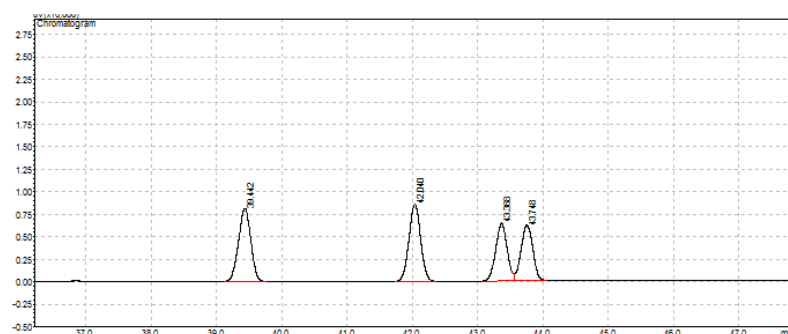
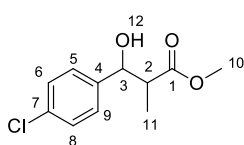


Figura 15. Cromatograma do padrão *rac*-13b.



2-metil-3-hidroxi-3-(*p*-clorofenil)-propanoato de metila 13c: Tempo

reacional: 30 minutos; **Rendimento:** 61%; **FM** C₁₁H₁₃ClO₃; **MM** 228,6;

Característica: óleo incolor; **EM** *m/z* (%): 228 (M⁺), 143 (21), 141 (66), 113 (17), 88 (100), 77 (37), 57 (20). **RMN de ¹H** (300,19 MHz, CDCl₃) *syn* δ 7.37 – 7.26 (m, 4H), 5.10 (t, *J* = 3.5 Hz, 1H), 3.74 (s, 3H), 3.04 (d, *J* = 3.2 Hz, 1H), 2.85 – 2.71 (m, 1H), 1.11 (d, *J* = 7.2 Hz, 3H). *anti* δ 7.37 – 7.26 (m, 4H), 4.75 (dd, *J* = 8.3, 4.5 Hz, 1H), 3.71 (s, 3H), 3.07 (dd, *J* = 4.5 Hz, 1H), 1.04 (d, *J* = 7.2 Hz, 3H). **RMN de ¹³C** (75,48 MHz, CDCl₃) δ 176.2, 140.2, 133.9, 128.8, 128.1, 75.8, 52.2, 47.1, 14.6. A coluna e o método utilizados para a separação dos diastereoisômeros e enantiômeros foram a coluna Lipodex® E e o método L1 120°C (1 °C min⁻¹), 150°C (15 °C min⁻¹), 180°C - 10 min. Tempos de retenção: (2*S*,3*R*): 31,179 min.; (2*R*,3*S*): 31,494 min.; (2*R*,3*R*): 31,704 min.; (2*S*,3*S*): 31,906 min. (Figura 16).

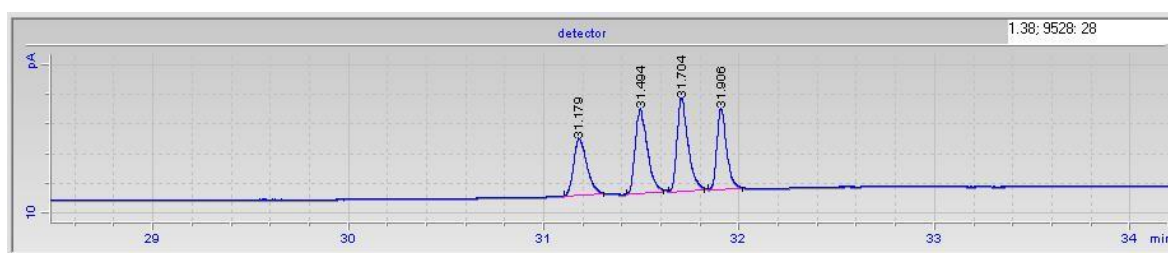
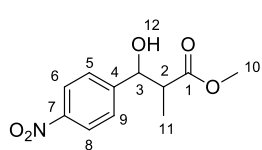


Figura 16. Cromatograma do padrão *rac*-13c.



2-metil-3-hidroxi-3-(p-nitrofenil)-propanoato de metila 13d:

Tempo reacional: 30 minutos; **Rendimento:** 56%; **FM** C₁₁H₁₃NO₅;

MM 239,2; **Característica:** óleo viscoso amarelo; **EM** *m/z* (%): 239

(M⁺), 152 (23), 106 (10), 88 (100), 77 (12), 57 (25). **RMN de ¹H** (300,19 MHz, CDCl₃) *syn* δ 8.27 – 8.18 (m, 2H), 7.54 (dd, *J* = 8.7, 1.8 Hz, 2H), 5.27 (t, *J* = 3.0 Hz, 1H), 3.75 (s, 3H), 3.39 (d, *J* = 5.2 Hz, 1H), 2.90 – 2.77 (m, 1H) 1.10 (d, *J* = 7.3 Hz, 3H). *anti* δ 8.27 – 8.18 (m, 2H), 7.54 (dd, *J* = 8.7, 1.8 Hz, 2H), 4.89 (dd, *J* = 7.5, 5.2 Hz, 1H), 3.73 (s, 3H), 3.30 (d, *J* = 3.0 Hz, 1H), 1.13 (d, *J* = 7.3 Hz, 3H) **RMN de ¹³C** (75,48 MHz, CDCl₃) δ 176.2, 175.8, 149.0, 148.7, 147.8, 147.5, 127.6, 127.0, 123.8, 123.7, 75.4, 72.6, 52.3, 46.8, 45.8, 14.6, 10.3. A coluna e o método utilizados para a separação dos diastereoisômeros e enantiômeros foram a coluna Lipodex® E e o método L2 150°C (15 °C min⁻¹), 180°C - 30 min. (Figura 17).

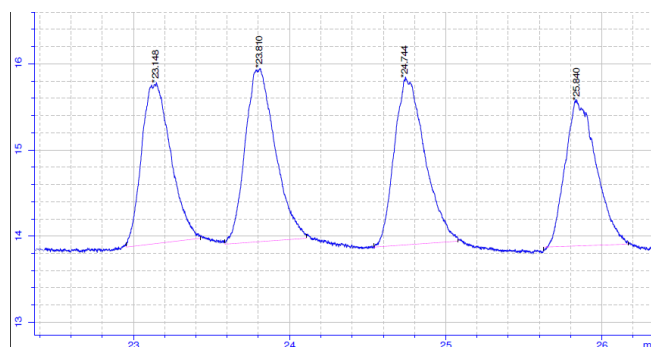
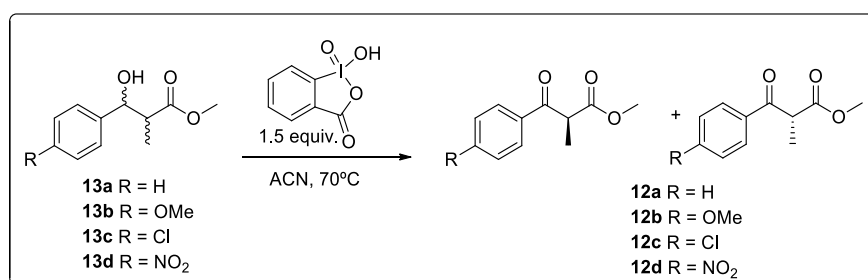
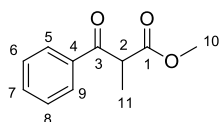


Figura 17. Cromatograma do padrão *rac*-13d.

5.2.6 Procedimento geral para obtenção de α-metil-β-cetoésteres



O α-metil-β-hidroxiéster (0,2 mmol, 50 mg) foi dissolvido em acetonitrila até uma concentração final de 0,14M. Em seguida adicionou-se o ácido 2-iodoxi-benzóico (IBX) na reação (1,5 equivalentes, 0,3 mmol, 92,6 mg). A reação permaneceu sob agitação magnética a 70 °C por 2 - 3 horas. A reação foi monitorada por GC-FID. Ao término da reação, a mesma foi resfriada a temperatura ambiente, filtrada e concentrada sob pressão reduzida. Não foi necessária a etapa de purificação.

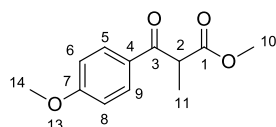


2-metil-3-oxo-3-fenilpropanoato de metila 12a: **Tempo reacional:** 2 horas;

Rendimento: 92%; **FM** C₁₁H₁₂O₃; **MM** 192,2; **Característica:** óleo óleo

incolor; **EM** *m/z* (%): 192 (M⁺), 105 (100), 106 (10), 77 (38), 51 (7). **RMN**

de ¹H (300,19 MHz, CDCl₃) δ 7.98 (dd, *J* = 8.4, 1.3 Hz, 2H, H-5 e H-9), 7.59 (dt, *J* = 8.7, 1.3 Hz, 1H, H-7), 7.53 – 7.45 (m, 2H, H-6 e H-8), 4.42 (q, *J* = 7.1 Hz, 1H, H-2), 3.69 (s, 3H, H-10), 1.50 (d, *J* = 7.1 Hz, 3H, H-11). **RMN de ¹³C** (75,48 MHz, CDCl₃) δ 196.0, 171.5, 135.9, 133.7, 128.9, 128.7, 52.7, 48.2, 14.0.

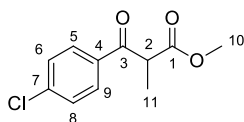


2-metil-3-oxo-3-(p-metoxifenil)-propanoato de metila 12b: **Tempo**

reacional: 2 horas; **Rendimento:** 40%; **FM** C₁₂H₁₄O₄; **MM** 222,2;

Característica: óleo incolor; **EM** *m/z* (%): 222 (M⁺), 135 (100), 107

(8), 92 (96), 77 (9). **RMN de ¹H** (300,19 MHz, CDCl₃) δ 7.97 (d, *J* = 8.9 Hz, 2H, H-6 e H-8), 6.95 (d, *J* = 8.9 Hz, 2H, H-5 e H-9), 4.37 (q, *J* = 7.1 Hz, 1H, H-2), 3.88 (s, 3H, H-14), 3.69 (s, 3H, H-10), 1.48 (d, *J* = 7.1 Hz, 3H, H-11). **RMN de ¹³C** (75,48 MHz, CDCl₃) δ 194.48, 171.71, 163.99, 131.16, 128.80, 114.09, 55.68, 52.65, 47.91, 14.12.

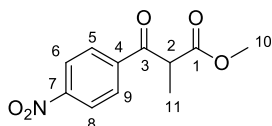


2-metil-3-oxo-3-(p-clorofenil)-propanoato de metila 12c: **Tempo**

reacional: 2 horas; **Rendimento:** 96%; **FM** C₁₁H₁₁ClO₃; **MM** 226,6;

Característica: óleo incolor; **EM** *m/z* (%): 226 (M⁺), 141 (33), 139

(100), 111 (37), 75 (24). **RMN de ¹H** (300,19 MHz, CDCl₃) δ 7.92 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H), 7.46 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H), 4.36 (q, *J* = 7.1 Hz, 1H, H-2), 3.69 (s, 3H, H-10), 1.50 (d, *J* = 7.1 Hz, 3H, H-11). **RMN de ¹³C** (75,48 MHz, CDCl₃) δ 194.7, 171.2, 140.2, 134.2, 130.2, 129.3, 52.8, 48.2, 13.9.



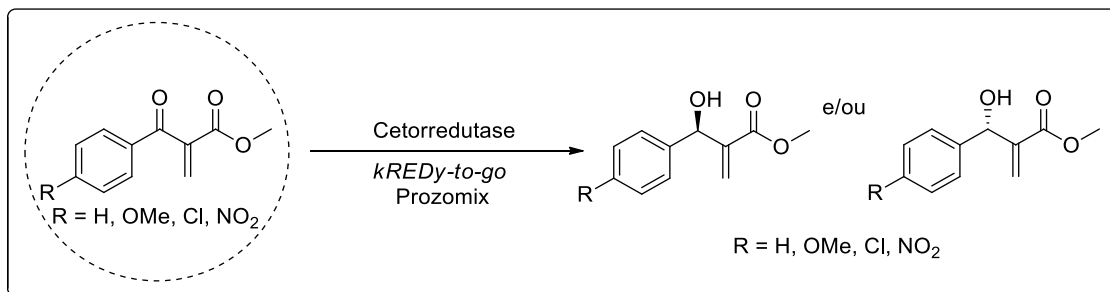
2-metil-3-oxo-3-(p-nitrofenil)-propanoato de metila 12d: **Tempo**

reacional: 3 horas; **Rendimento:** 94%; **FM** C₁₁H₁₁NO₅; **MM** 237,2;

Característica: óleo amarelo claro; **EM** *m/z* (%): 237 (M⁺), 150 (100),

120 (12), 104 (26), 76 (14). **RMN de ¹H** (300,19 MHz, CDCl₃) δ 8.35 (d, *J* = 9.0 Hz, 2H), 8.14 (d, *J* = 9.0 Hz, 2H), 4.41 (q, *J* = 7.0 Hz, 1H, H-2), 3.71 (s, 3H, H-10), 1.55 (d, *J* = 7.1 Hz, 3H, H-11). **RMN de ¹³C** (75,48 MHz, CDCl₃) δ 194.2, 170.6, 150.5, 140.3, 129.6, 124.0, 52.8, 48.6, 13.5.

5.2.7 Triagem enzimática para detecção de cetorredutases (*kREDy-to-go* plate assay – Prozomix)

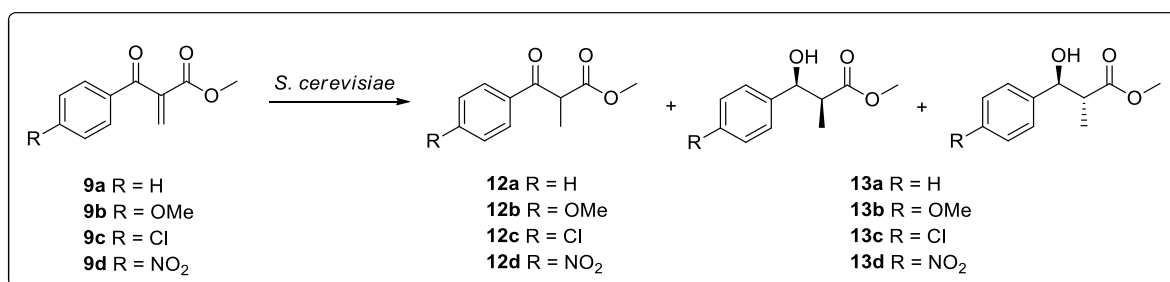


Em um tubo falcon de 15mL adicionou-se o α -metileno- β -cetoéster (0,2 mmol), seguida da adição da solução de INT (10,0mL). A mistura foi homogeneizada. Cuidadosamente foram adicionados 100 μ L desta solução em cada um dos 96 poços da microplaca de polipropileno. Os poços foram cuidadosamente homogeneizados e afim de não ocorrer contaminação nenhuma ponteira foi repetida.

A placa foi mantida ao abrigo de luz, sob agitação orbital em um shaker a 25 °C e monitorada nos tempos t=0, t=4 horas, t=12 horas e t=24 horas.

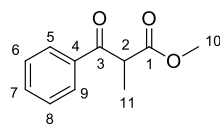
A inspeção da evolução do ensaio de atividade enzimática foi realizada visualmente, onde para resultados positivos se esperava uma mudança de coloração do branco para o vermelho.

5.2.8 Procedimento geral para a biorredução dos α -metileno- β -cetoésteres



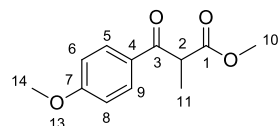
Saccharomyces cerevisiae liofilizado (10,0 g) foram suspensos em tampão citrato (pH 6,5, 200 mL) contendo glicose (12,5 g). As células foram ativadas por 1 h e em seguida adicionou-se os α -metileno- β -cetoésteres (0,1 mmol), a mistura reacional foi mantida sob agitação orbital em um *shaker* a 28 °C. A reação foi monitorada por GC-FID. Ao final da reação

a suspensão foi centrifugada e a fase aquosa extraída com acetato de etila (3 porções). As fases orgânicas foram combinadas, secas com sulfato de magnésio anidro e evaporadas. Os produtos foram identificados por análise de GC-MS.



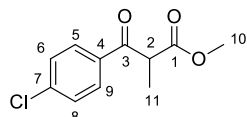
2-metil-3-oxo-3-fenilpropanoato de metila 12a: **FM** C₁₁H₁₂O₃; **MM** 192,2;

EM *m/z* (%): 192 (M⁺), 105 (100), 106 (10), 77 (38), 51 (7). **RMN de ¹H** (300,19 MHz, CDCl₃) δ 7.98 (dd, *J* = 8.4, 1.3 Hz, 2H, H-5 e H-9), 7.59 (dt, *J* = 8.7, 1.3 Hz, 1H, H-7), 7.53 – 7.45 (m, 2H, H-6 e H-8), 4.42 (q, *J* = 7.1 Hz, 1H, H-2), 3.69 (s, 3H, H-10), 1.50 (d, *J* = 7.1 Hz, 3H, H-11). **RMN de ¹³C** (75,48 MHz, CDCl₃) δ 196.0, 171.5, 135.9, 133.7, 128.9, 128.7, 52.7, 48.2, 14.0.



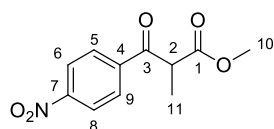
2-metil-3-oxo-3-(p-metoxifenil)-propanoato de metila 12b:

FM C₁₂H₁₄O₄; **MM** 222,2; **EM** *m/z* (%): 222 (M⁺), 135 (100), 107 (8), 92 (96), 77 (9). **RMN de ¹H** (300,19 MHz, CDCl₃) δ 7.97 (d, *J* = 8.9 Hz, 2H, H-6 e H-8), 6.95 (d, *J* = 8.9 Hz, 2H, H-5 e H-9), 4.37 (q, *J* = 7.1 Hz, 1H, H-2), 3.88 (s, 3H, H-14), 3.69 (s, 3H, H-10), 1.48 (d, *J* = 7.1 Hz, 3H, H-11). **RMN de ¹³C** (75,48 MHz, CDCl₃) δ 194.48, 171.71, 163.99, 131.16, 128.80, 114.09, 55.68, 52.65, 47.91, 14.12.



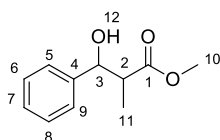
2-metil-3-oxo-3-(p-clorofenil)-propanoato de metila 12c:

FM C₁₁H₁₁ClO₃; **MM** 226,6; **EM** *m/z* (%): 226 (M⁺), 141 (33), 139 (100), 111 (37), 75 (24). **RMN de ¹H** (300,19 MHz, CDCl₃) δ 7.92 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H), 7.46 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H), 4.36 (q, *J* = 7.1 Hz, 1H, H-2), 3.69 (s, 3H, H-10), 1.50 (d, *J* = 7.1 Hz, 3H, H-11). **RMN de ¹³C** (75,48 MHz, CDCl₃) δ 194.7, 171.2, 140.2, 134.2, 130.2, 129.3, 52.8, 48.2, 13.9.



2-metil-3-oxo-3-(p-nitrofenil)-propanoato de metila 12d:

FM C₁₁H₁₁NO₅; **MM** 237,2; **EM** *m/z* (%): 237 (M⁺), 150 (100), 120 (12), 104 (26), 76 (14). **RMN de ¹H** (300,19 MHz, CDCl₃) δ 8.35 (d, *J* = 9.0 Hz, 2H), 8.14 (d, *J* = 9.0 Hz, 2H), 4.41 (q, *J* = 7.0 Hz, 1H, H-2), 3.71 (s, 3H, H-10), 1.55 (d, *J* = 7.1 Hz, 3H, H-11). **RMN de ¹³C** (75,48 MHz, CDCl₃) δ 194.2, 170.6, 150.5, 140.3, 129.6, 124.0, 52.8, 48.6, 13.5.



2-metil-3-hidroxi-3-fenil-propanoato de metila 13a:

FM C₁₁H₁₄O₃; **MM** 194,2; **EM** *m/z* (%): 194 (M⁺), 107 (80), 105 (36), 88 (100), 79 (44), 77 (34), 55 (21). Os *e.e.* e a razão *syn:anti* determinados por GC-FID com coluna quiral Hydrodex® β-3P, Método H1: 80°C (5 °C min⁻¹), 180°C - 10 min. Obteve-se um *e.e.* ≥ 99% para ambos os enantiomêros e uma razão *syn:anti* 91:9. Tempos de retenção: (2*S*,3*S*): 38,142 min.; (2*R*,3*S*): 38,406 min. (Figura 18).

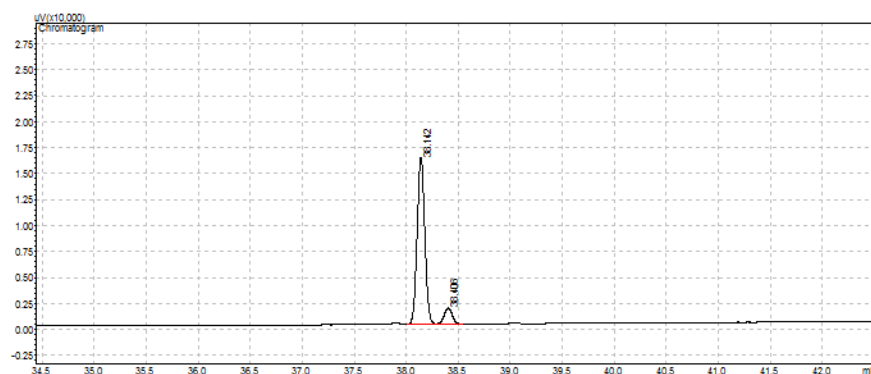
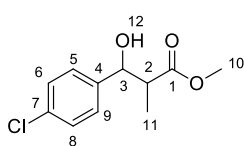


Figura 18. Cromatograma do produto da reação de biorredução 13a.



2-metil-3-hidroxi-3-(p-clorofenil)-propanoato de metila 13c:

FM C₁₁H₁₃ClO₃; **MM** 228,6; **EM** *m/z* (%): 228 (M⁺), 143 (21), 141 (66), 113 (17), 88 (100), 77 (37), 57 (20). Os *e.e.* e a razão *syn:anti* determinados por GC-FID com coluna quiral Lipodex® E, Método L1 120°C (1 °C min⁻¹), 150°C (15 °C min⁻¹), 180°C - 10 min. Obteve-se um *e.e.* ≥ 99% para ambos os enantiomêros e uma razão *syn:anti* 91:9. Tempos de retenção: (2*R*,3*S*): 31,585 min.; (2*S*,3*S*): 31,951 min. (Figura 19).

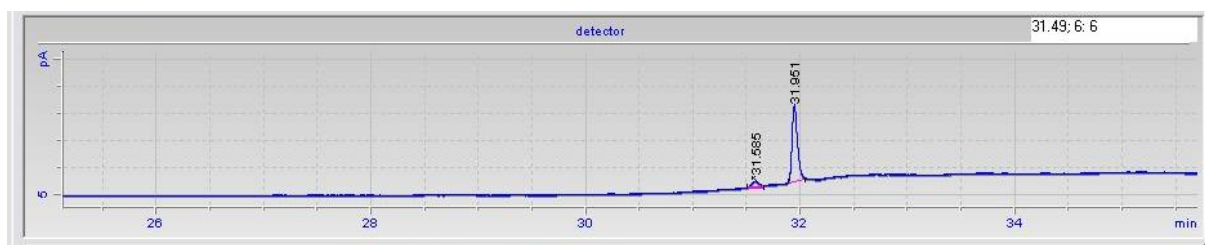
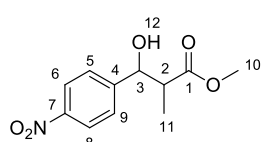


Figura 19. Cromatograma do produto da reação de biorredução 13c.



2-metil-3-hidroxi-3-(p-nitrofenil)-propanoato de metila 13d:

FM C₁₁H₁₃NO₅; **MM** 239,2; **EM** *m/z* (%): 239 (M⁺), 152 (23), 106 (10), 88 (100), 77 (12), 57 (25). **RMN de ¹H** (300,19 MHz, CDCl₃) *syn* δ 8.24 – 8.21 (m, 2H), 7.55 – 7.52 (m, 2H), 5.26 (d, *J* = 3.4 Hz, 1H), 3.74 (s, 3H), 2.83 – 2.80 (m, 1H), 1.09 (d, *J* = 7.2 Hz, 3H). Os *e.e.* e a razão *syn:anti* determinados por GC-FID com coluna quiral Lipodex® E, Método L2 150°C (15 °C min⁻¹), 180°C - 30 min. Obteve-se um *e.e.* ≥ 99% para ambos os enantiômeros e uma razão *syn:anti* 88:12 (Figura 20).

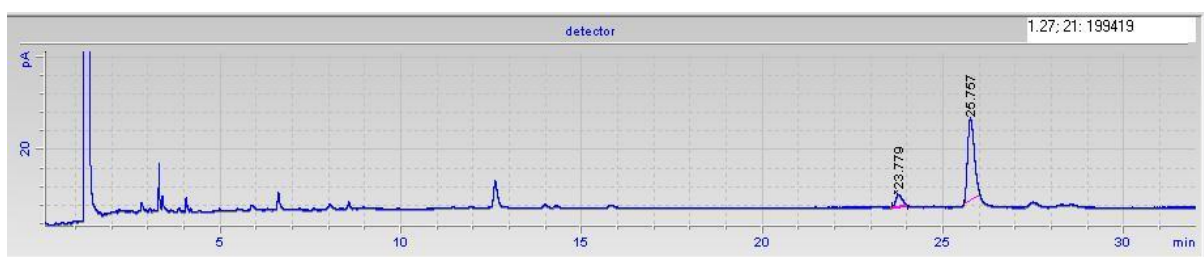
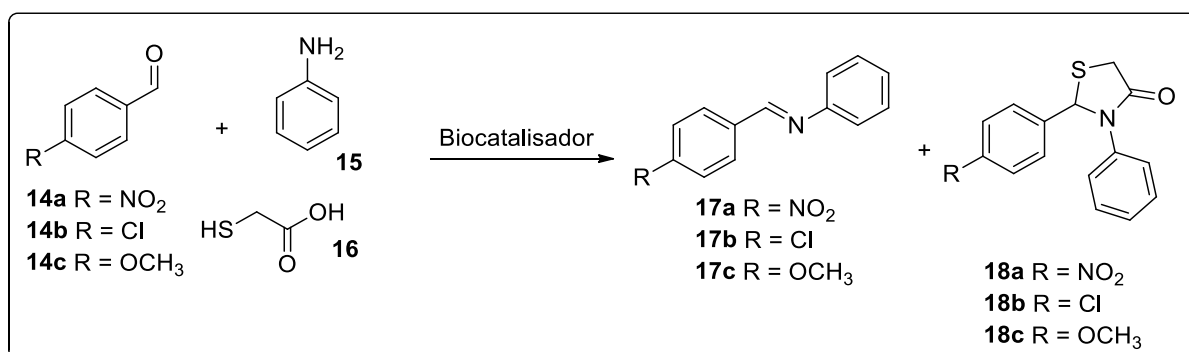
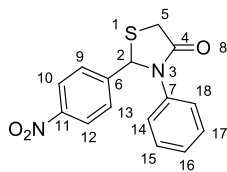


Figura 20. Cromatograma do produto da reação de biorredução 13d.

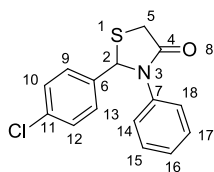
5.2.9 Procedimento geral para a síntese das 2,3-diaril-4-tiazolidinonas (18a-18c)



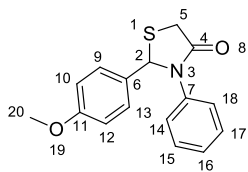
A uma solução de aldeído (0,2 mmol), anilina (0,2 mmol), e ácido tioglicólico (0,6 mmol) em diclorometano (1 mL), adicionou-se o biocatalisador (5 mg por Novozyme 435 e BSA, 5 µL para Lipase CALB L ou 40 mg das células inteiras liofilizadas) e a mistura resultante foi agitada a 700 rpm a 35 °C. A evolução da reação foi monitorada por GC-FID. Após 24 h a reação foi extraída com acetato de etila (0,5 mL; 3x). As fases orgânicas foram combinadas, lavadas com água, secas com sulfato de magnésio anidro e evaporadas. O produto em bruto foi purificado por CCD (30% Hex/EtOAc).



2-p-nitrofenil-3-fenil-1,3-tiazolidin-4-ona 18a: **Tempo reacional:** 24 horas; **FM** C₁₅H₁₂N₂O₃S; **MM** 300,3; **Característica:** óleo viscoso amarelado; **Rf** (30% Hex/EtOAc) 0,20; **RMN de ¹H** (300,19 MHz, CDCl₃) δ 8,16 (d, J = 8,8 Hz, 2H, H-10 e H-12), 7,48 (d, J = 8,8 Hz, 2H, H-9 e H-13), 7,31 (t, d, J = 15,0 Hz, 2H, H-14 e H-18), 7,19 (t, J = 7,7 Hz, 3H, H-15, H-16 e H-17), 6,20 (s, 1H, H-2), 4,01 (d, J = 15,9 Hz, 1H, H-5), 3,91 (d, J = 15,9 Hz, 1H, H-5); **HPLC** (Chiralcel OD-H, Hex/iPrOH = 7:3, fluxo = 0,7 mL / min, 254 nm λ): t_R = 23.4 min; t_R = 29.5 min.



2-p-clorofenil-3-fenil-1,3-tiazolidin-4-ona 18b: **Tempo reacional:** 24 horas; **FM** C₁₅H₁₂ClNOS; **MM** 289,8; **Característica:** óleo incolor; **Rf** (30% Hex/EtOAc) 0,25; **RMN de ¹H** (300,19 MHz, CDCl₃) δ 7,34 - 7,26 (m, 5H, H_{arom.}), 7,18 (ddt, J = 7,8, 5,6, 1,0 Hz, 4H, H_{arom.}), 6,09 (s, 1H, H-2), 4,00 (d, J = 15,8 Hz, 1H, H-5), 3,89 (d, J = 15,8 Hz, 1H, H-5); **HPLC** (Chiralcel OD-H, Hex/iPrOH = 7:3, fluxo = 0,7 mL / min, 254 nm λ): t_R = 13.2 min (+)-**18b**; t_R = 16.1 min (-)-**18b**.



2-p-metoxifenil-3-fenil-1,3-tiazolidin-4-ona 18c: **Tempo reacional:** 24 horas; **FM** C₁₆H₁₅NO₂S; **MM** 285,3; **Característica:** óleo viscoso amarelado; **Rf** (30% Hex/EtOAc) 0,27; **RMN de ¹H** (300,19 MHz, CDCl₃) δ 7,21 (ddt, J = 14,0, 9,7, 6,9 Hz, 7H, H_{arom.}), 6,79 (d, J = 8,8 Hz, 2H, H_{arom.}), 6,07 (1H, s, H-2), 3,98 (d, J = 15,8 Hz, 1H, H-5), 3,87 (d, J = 15,8 Hz, 1H, H-5), 3,75 (s, 3H, H-20); **HPLC** (Chiralcel OD-H, Hex/iPrOH = 7:3, fluxo = 0,7 mL / min, 220 nm λ): t_R = 27.2 min; t_R = 35.3 min.

Referências Bibliográficas

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALVIM, H. G. O.; SILVA JÚNIOR, E. N. da; NETO, B. A. D. What do we know about multicomponent reactions? Mechanisms and trends for the Biginelli, Hantzsch, Mannich, Passerini and Ugi MCRs. **RSC Advances**, v. 4, n. 97, p. 54282–54299, 2014.
- AMARANTE, G. W. et al. Dualistic nature of the mechanism of the Morita-Baylis-Hillman reaction probed by electrospray ionization mass spectrometry. **The Journal of Organic Chemistry**, v. 74, n. 8, p. 3031–3037, 2009.
- ARENDS, I. W. C. E.; SHELDON, R. A.; HANEFELD, U. Catalytic reductions. In: _____. **Green chemistry and catalysis**. Weinheim: Wiley-VCH, 2007. p. 91–132.
- BARONE, V. et al. Intramolecular C-H-O interaction between lactam oxygen and N-alkyl protons. **Journal of Molecular Graphics and Modelling**, v. 19, n. 3/4, p. 318–324, 2001.
- BASAVIAIAH, D.; VEERARAGHAVIAIAH, G. The Baylis-Hillman reaction: a novel concept for creativity in chemistry. **Chemical Society Reviews**, v. 41, p. 68–78, 2012.
- BIGGS-HOUCK, J. E.; YOUNAI, A.; SHAW, J. T. Recent advances in multicomponent reactions for diversity-oriented synthesis. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 14, n. 3, p. 371–382, 2010.
- BOECKMAN, R. K.; SHAO, P.; MULLINS, J. J. The Dess-Martin periodinane: 1,1,1-triacetoxy-1,1-dihydro-1,2-benziodoxol-3(1H)-one. **Organic Syntheses**, v. 10, p. 141–152, 2003.
- BOLOGNESE, A. et al. Thiazolidin-4-one formation. Mechanistic and synthetic aspects of the reaction of imines and mercaptoacetic acid under microwave and conventional heating. **Organic & Biomolecular Chemistry**, v. 2, p. 2809–2813, 2004.
- BOMMARIUS, A. S.; RIEBEL, B. R. Introduction to biocatalysis. In: _____. **Biocatalysis: fundamentals and applications**. Weinheim: Wiley-VCH, 2004. p. 1–18.
- BROWN, F. C. 4-Thiazolidinones. **Chemical Reviews**, v. 61, p. 463–521, 1961.
- BUQUE, E. M. et al. Immobilization affects the rate and enantioselectivity of 3-oxo ester reduction by baker's yeast. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 31, n. 5, p. 656–664, 2002.
- CARVALHO, C. C. C. R. de. Whole cell biocatalysts: essential workers from nature to the industry. **Microbial Biotechnology**, v. 10, n. 2, p. 250–263, 2017.
- CELANESE CORPORATION (New York). A. B. BAYLIS; M. E. D. HILLMAN. **Verfahren zur Herstellung von Acrylverbindungen**. DE 19712155113, 5 Nov. 1971, 10 Mai 1972.
- CELANESE CORPORATION (New York). A. B. BAYLIS; M. E. D. HILLMAN. **Reaction of acrylic type compounds with aldehydes and certain ketones**. US 3743669 A, 6 Nov. 1970, 3 July 1973.
- CHAVES, M. R. B.; MORAN, P. J. S.; RODRIGUES, J. A. R. Regio- and enantioselective bioreduction of methyleneketoesters using both polymeric resin and cellulose matrix. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 98, p. 73–77, 2013.
- CHIN-JOE, I. **Process development of enantioselective 3-oxo ester reduction by Baker's yeast**. 2002. 136 p. Thesis (Doctoral) - Delft University of Technology, Delft, 2002.
- CIRILLI, R. et al. Semipreparative HPLC enantioseparation, chiroptical properties, and absolute configuration of two novel cyclooxygenase-2 inhibitors. **Chirality**, v. 22, p. 56–62, 2010.

- CLOSOSKI, G. C. et al. Regio- and enantioselective reduction of methyleneketoesters mediated by *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 48, n. 3–4, p. 70–76, 2007.
- COELHO, F.; ALMEIDA, W. P. Reação de Baylis-Hillman: uma estratégia para a preparação de intermediários multifuncionalizados para síntese orgânica. **Química Nova**, v. 23, n. 1, p. 98–101, 2000.
- COELHO, F. et al. Ultrasound in Baylis-Hillman reactions with aliphatic and aromatic aldehydes: scope and limitations. **Tetrahedron**, v. 58, n. 37, p. 7437–7447, 2002.
- CUNHA, R. L. O. R. et al. Biocatalysis for desymmetrization and resolution of stereocenters beyond the reactive center: how far is far enough? **Biotechnology Advances**, v. 33, n. 5, p. 614–623, 2015.
- de GRAAFF, C.; RUIJTER, E.; ORRU, R. V. A. Recent developments in asymmetric multicomponent reactions. **Chemical Society Reviews**, v. 41, n. 10, p. 3969–4009, 2012.
- De MUNARI, S. et al. Hypervalent iodine oxidants: structure and kinetics of the reactive intermediates in the oxidation of alcohols and 1,2-diols by o-iodoxybenzoic acid (IBX) and Dess-Martin periodinane. A comparative 1H-NMR study. **The Journal of Organic Chemistry**, v. 61, n. 26, p. 9272–9279, 1996.
- DEOL, B. S.; RIDLEY, D. D.; SIMPSON, G. W. Asymmetric reduction of carbonyl compounds by yeast. II* Preparation of optically active a- and b-hydroxy carboxylic acid derivatives. **Australian Journal of Chemistry**, v. 11, n. 29, p. 2459–2467, 1976.
- DÖMLING, A.; UGI, I. Multicomponent reactions with isocyanides. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 39, p. 3168–3210, 2000.
- DREWES, S. E.; ROOS, G. H. P. Synthetic potential of the tertiary-amine-catalysed reaction of activated vinyl carbanions with aldehydes. **Tetrahedron**, v. 44, n. 15, p. 4653–4670, 1988.
- DREWES, S. E. et al. Facile diastereoselective synthesis of 2,6-dialkyl-5-methylene-1,3-dioxan-4-ones via a-activated vinyl esters. **Chemische Berichte**, v. 123, p. 1447–1448, 1990.
- EL AZAB, I. H.; ABDEL-HAFEZ, S. H. One-pot three-component microwave-assisted synthesis of novel thiazolidinone derivatives containing thieno[d]pyrimidine-4-one moiety as potential antimicrobial agents. **Russian Journal of Bioorganic Chemistry**, v. 41, n. 3, p. 315–323, 2015.
- FABER, K. **Biotransformations in organic chemistry**. 4th ed. Berlin: Springer-Verlag, 2000.
- FORT, Y.; BERTHE, M. C.; CAUBERE, P. The “Baylis-Hillman reaction” mechanism and applications revisited. **Tetrahedron**, v. 48, n. 31, p. 6371–6384, 1992.
- FRIGERIO, M.; SANTAGOSTINO, M. A mild oxidizing reagent for alcohols and 1,2-diols: o-iodoxybenzoic acid (IBX) in DMSO. **Tetrahedron Letters**, v. 35, n. 43, p. 8019–8022, 1994.
- FRIGERIO, M. et al. Oxidation of alcohols with o-iodoxybenzoic acid (IBX) in DMSO: a new insight into an old hypervalent iodine reagent. **The Journal of Organic Chemistry**, v. 60, n. 22, p. 7272–7276, 1995.
- GOFFEAU, A. et al. Life with 6000 genes. **Science**, v. 274, n. 5287, p. 546, 563–7, 1996.
- GUPTA, R. Recent advances in chemistry of condensed 4-thiazolidinones. **Journal of Heterocyclic Chemistry**, v. 53, n. 6, p. 1687–1696, 2016.
- HE, L. et al. Chiral bifunctional n-heterocyclic carbenes: synthesis and application in the aza-Morita-Baylis-Hillman reaction. **Synthesis**, n. 17, p. 2825–2829, 2008.
- HILL, J. S.; ISAACS, N. S. Mechanism of a-substitution reactions of acrylic derivatives. **Journal of Physical Organic Chemistry**, v. 3, n. 5, p. 285–288, 1990.
- HOFFMANN, H. M. R.; RABE, J. Preparation of 2-(1-hydroxyalkyl)acrylic esters; simple three-step synthesis of mikanecic acid. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 22, n. 10, p. 795–796, 1983.

HOLLMANN, F.; ARENDS, I. W. C. E.; HOLTSMANN, D. Enzymatic reductions for the chemist. **Green Chemistry**, v. 13, n. 9, p. 2217–2588, 2011.

HOLMES, C. P. et al. Strategies for combinatorial organic synthesis: solution and polymer-supported synthesis of 4-thiazolidinones and 4-metathiazanones derived from amino acids. **The Journal of Organic Chemistry**, v. 60, n. 22, p. 7328–7333, 1995.

HU, J. et al. Synthesis and biological evaluation of novel thiazolidinone derivatives as potential anti-inflammatory agents. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 64, p. 292–301, 2013.

HULME, C.; GORE, V. “Multi-component reactions: emerging chemistry in drug discovery” “from xylocain to crivivan”. **Current Medicinal Chemistry**, v. 10, p. 51–80, 2003.

ISENEGGER, P. G.; BÄCHLE, F.; PFALTZ, A. Asymmetric Morita-Baylis-Hillman reaction: catalyst development and mechanistic insights based on mass spectrometric back-reaction screening. **Chemistry - A European Journal**, v. 22, n. 49, p. 17595–17599, 2016.

JIANG, L.; YU, H. WEI. An example of enzymatic promiscuity: the Baylis-Hillman reaction catalyzed by a biotin esterase (BioH) from *Escherichia coli*. **Biotechnology Letters**, v. 36, n. 1, p. 99–103, 2014.

KALAITZAKIS, D. et al. Highly stereoselective reductions of α -alkyl-1,3-diketones and α -alkyl- β -keto esters catalyzed by isolated NADPH-dependent ketoreductases. **Organic Letters**, v. 7, n. 22, p. 4799–4801, 2005.

KAWAI, Y. et al. Asymmetric reduction of β -keto esters with an enzyme from Baker's yeast. **Bulletin of the Chemical Society of Japan**, v. 67, p. 524–528, 1994.

LADKAU, N.; SCHMID, A.; BÜHLER, B. The microbial cell-functional unit for energy dependent multistep biocatalysis. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 30, p. 178–189, 2014.

LIESE, A.; SEELBACH, K.; WANDREY, C. (Ed.). **Industrial biotransformations**. 2nd ed. Weinheim: Wiley-VCH, 2006.

LIMA-JUNIOR, C. G.; VASCONCELLOS, M. L. A A. Morita-Baylis-Hillman adducts: biological activities and potentialities to the discovery of new cheaper drugs. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 20, n. 13, p. 3954–3971, 2012.

LIN, B.; TAO, Y. Whole-cell biocatalysts by design. **Microbial Cell Factories**, v. 16, p. 1–12, 2017.

MASON, P. H.; EM, N. D. Some mechanistic and synthetic aspects of the DABCO catalysed rearrangement of allylic esters. **Tetrahedron**, v. 50, n. 41, p. 12001–12008, 1994.

MATEUS, C. R.; ALMEIDA, P.; COELHO, F. Diastereoselective heterogeneous catalytic hydrogenation of Baylis-Hillman adducts. **Tetrahedron Letters**, v. 41, p. 2533–2536, 2000.

McELROY, C. R. et al. Towards a holistic approach to metrics for the 21st century pharmaceutical industry. **Green Chemistry**, v. 17, n. 5, p. 3111–3121, 2015.

MILAGRE, C. D. F. et al. Screening and reaction engineering for the bioreduction of ethyl benzoylacetate and its analogues. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 56, p. 55–60, 2009.

MORE, J. D.; FINNEY, N. S. A simple and advantageous protocol for the oxidation of alcohols with *o*-iodoxybenzoic acid (IBX). **Organic Letters**, v. 4, n. 17, p. 3001–3003, 2002.

MORI, K. Synthesis of optically active pheromones. **Tetrahedron**, v. 45, n. 1, p. 3233–3298, 1989.

MORITA, K.; SUZUKI, Z.; HIROSE, H. A tertiary phosphine-catalyzed reaction of acrylic compounds with aldehydes. **Bulletin of the Chemical Society of Japan**, v. 41, p. 2815, 1968.

NESTL, B. M. et al. New generation of biocatalysts for organic synthesis. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 53, n. 12, p. 3070–3095, 2014.

- NI, Y.; HOLTSMANN, D.; HOLLMANN, F. How green is biocatalysis? To calculate is to know. **ChemCatChem**, v. 6, n. 4, p. 930–943, 2014.
- PAULA, B. R. S. de et al. Enantiodivergence in the reduction of α -methyl and α -halomethyl enones by microorganisms. **Tetrahedron Asymmetry**, v. 24, n. 17, p. 973–981, 2013.
- PEREIRA, R. D. S. The use of Baker's yeast in the generation of asymmetric centers to produce chiral drugs and other compounds. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 18, n. 1, p. 25–64, 1998.
- PRASAD, D.; PREETAM, A.; NATH, M. DBSA catalyzed, one-pot three-component "on water" green protocol for the synthesis of 2,3-disubstituted 4-thiazolidinones. **RSC Advances**, v. 2, n. 7, p. 3133–3140, 2012.
- PRATAP, U. R. et al. *Saccharomyces cerevisiae* catalyzed one-pot three component synthesis of 2,3-diaryl-4-thiazolidinones. **Tetrahedron Letters**, v. 52, n. 14, p. 1689–1691, 2011.
- PRICE, K. E. et al. Baylis-Hillman mechanism: a new interpretation in aprotic solvents. **Organic Letters**, v. 7, n. 1, p. 147–150, 2005.
- RAMÓN, D. J.; YUS, M. Asymmetric multicomponent reactions (AMCRs): the new frontier. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 44, n. 11, p. 1602–1634, 2005.
- RAWAL, R. K. et al. An expeditious synthesis of thiazolidinones and metathiazanones. **Journal of Chemical Research**, v. 76, n. 5, p. 368–369, 2004.
- REETZ, M. T. Biocatalysis in organic chemistry and biotechnology: past, present, and future. **Journal of the American Chemical Society**, v. 135, n. 34, p. 12480–12496, 2013.
- REETZ, M. T.; MONDIÈRE, R.; CARBALLEIRA, J. D. Enzyme promiscuity: first protein-catalyzed Morita-Baylis-Hillman reaction. **Tetrahedron Letters**, v. 48, n. 10, p. 1679–1681, 2007.
- ROBIETTE, R.; AGGARWAL, V. K.; HARVEY, J. N. Mechanism of the Morita-Baylis-Hillman reaction: a computational investigation. **Journal of the American Chemical Society**, v. 129, n. 50, p. 15513–15525, 2007.
- RODRÍGUEZ, S.; KAYSER, M.; STEWART, J. D. Improving the stereoselectivity of Baker's yeast reductions by genetic engineering. **Organic Letters**, v. 1, n. 8, p. 1153–1155, 1999.
- RODRÍGUEZ, S.; KAYSER, M. M.; STEWART, J. D. Highly stereoselective reagents for β -keto ester reductions by genetic engineering of Baker's yeast. **Journal of the American Chemical Society**, v. 123, n. 8, p. 1547–1555, 2001.
- RODRÍGUEZ, S. et al. Asymmetric synthesis of β -hydroxy esters and α -alkyl- β -hydroxy esters by recombinant *Escherichia coli* expressing enzymes from Baker's yeast. **The Journal of Organic Chemistry**, v. 65, n. 8, p. 2586–2587, 2000.
- SALIAN, V.; NARAYANA, B.; SAROJINI, B. N-(4-Nitrophenyl)-2-{2-[3-(4-chlorophenyl)-5-[4-(propan-2-yl)phenyl]-4,5-dihydro-1H-pyrazol-1-yl]-4-oxo-4,5-dihydro-1,3-thiazol-5-yl}acetamide. **Molbank**, v. 2017, n. 2, p. M943, 2017. doi:10.3390/M943.
- SANTOS, M. S.; COELHO, F. Oxidizing Morita-Baylis-Hillman adducts towards vicinal tricarbonyl compounds. **RSC Advances**, v. 2, n. 8, p. 3237–3241, 2012.
- SHELDON, R. A. Fundamentals of green chemistry: efficiency in reaction design. **Chemical Society Reviews**, v. 41, n. 4, p. 1437–1451, 2012.
- SHELDON, R. A. Green chemistry, catalysis and valorization of waste biomass. **Journal of Molecular Catalysis A: Chemical**, v. 422, p. 3–12, 2016.
- SHELDON, R. A. The E factor 25 years on: the rise of green chemistry and sustainability. **Green Chemistry**, v. 19, n. 1, p. 18–43, 2017.

- SHELDON, R. A.; PEREIRA, P. C. Biocatalysis engineering: the big picture. **Chemical Society Reviews**, v. 46, n. 10, p. 2678–2691, 2017.
- SOLANO, D. M. et al. Industrial biotransformations in the synthesis of building blocks leading to enantiopure drugs. **Bioresource Technology**, v. 115, p. 196–207, 2012.
- SOUZA, R. O. M. A. de et al. Kinetic resolution of rac-1-phenylethanol with immobilized lipases: a critical comparison of microwave and conventional heating protocols. **The Journal of Organic Chemistry**, v. 74, p. 6157–6162, 2009.
- SRIVASTAVA, T.; HAQ, W.; KATTI, S. B. Carbodiimide mediated synthesis of 4-thiazolidinones by one-pot three-component condensation. **Tetrahedron**, v. 58, p. 7619–7624, 2002.
- STUERMER, R. et al. Asymmetric bioreduction of activated C=C bonds using enoate reductases from the old yellow enzyme family. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 11, n. 2, p. 203–213, 2007.
- SYAMALA, M. Recent progress in three-component reactions. An update. **Organic Preparations and Procedures International**, v. 41, p. 1–68, 2009.
- TRIPATHI, A. C. et al. 4-Thiazolidinones: the advances continue. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 72, p. 52–77, 2014.
- UNSAL-TAN, O. et al. Molecular modeling, synthesis and screening of some new 4-thiazolidinone derivatives with promising selective COX-2 inhibitory activity. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 57, p. 59–64, 2012.
- van der HEIJDEN, G.; RUIJTER, E.; ORRU, R. V. A. Efficiency, diversity, and complexity with multicomponent reactions. **Synlett**, v. 24, n. 6, p. 666–685, 2013.
- VERMA, A.; SARAF, S. K. 4-Thiazolidinone - A biologically active scaffold. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 43, n. 5, p. 897–905, 2008.
- VIGORITA, M. G. et al. Ir and pmr spectra of 2-aryl-4-thiazolidinones. III. Stereochemical analysis of 2-aryl-3-(2-pyridyl)-4-thiazolidinones. **Journal of Heterocyclic Chemistry**, v. 16, n. 6, p. 1257–1261, 1979.
- WACHTMEISTER, J.; ROTHER, D. Recent advances in whole cell biocatalysis techniques bridging from investigative to industrial scale. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 42, p. 169–177, 2016.
- WANDREY, C.; LIESE, A.; KIHUMBU, D. Industrial biocatalysis: past, present, and future. **Organic Process Research & Development**, v. 4, n. 4, p. 286–290, 2000.
- WEI, Y.; SHI, M. Recent advances in organocatalytic asymmetric Morita-Baylis-Hillman/aza-Morita-Baylis-Hillman reactions. **Chemical Reviews**, v. 113, p. 6659–6690, 2013.
- WINKLER, C. K. et al. Asymmetric bioreduction of activated alkenes to industrially relevant optically active compounds. **Journal of Biotechnology**, v. 162, n. 4, p. 381–389, 2012.
- WOLFSON, A.; DLUGY, C.; TAVOR, D. Baker's yeast catalyzed asymmetric reduction of prochiral ketones in different reaction mediums. **Organic Communications**, v. 6, n. 1, p. 1–11, 2013.
- YANG, J. W. et al. Metal-free, organocatalytic asymmetric transfer hydrogenation of α,β -unsaturated aldehydes. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 44, n. 1, p. 108–110, 2005.
- ZHDANKIN, V. V.; STANG, P. J. Chemistry of polyvalent iodine. **Chemical Reviews**, v. 108, n. 12, p. 5299–5358, 2008.
- ZHENG, H. et al. Trypsin-catalyzed one-pot multicomponent synthesis of 4-thiazolidinones. **Catalysis Letters**, v. 143, n. 3, p. 298–301, 2013.

Anexos

7. ANEXOS

7.1 Lista de Espectros

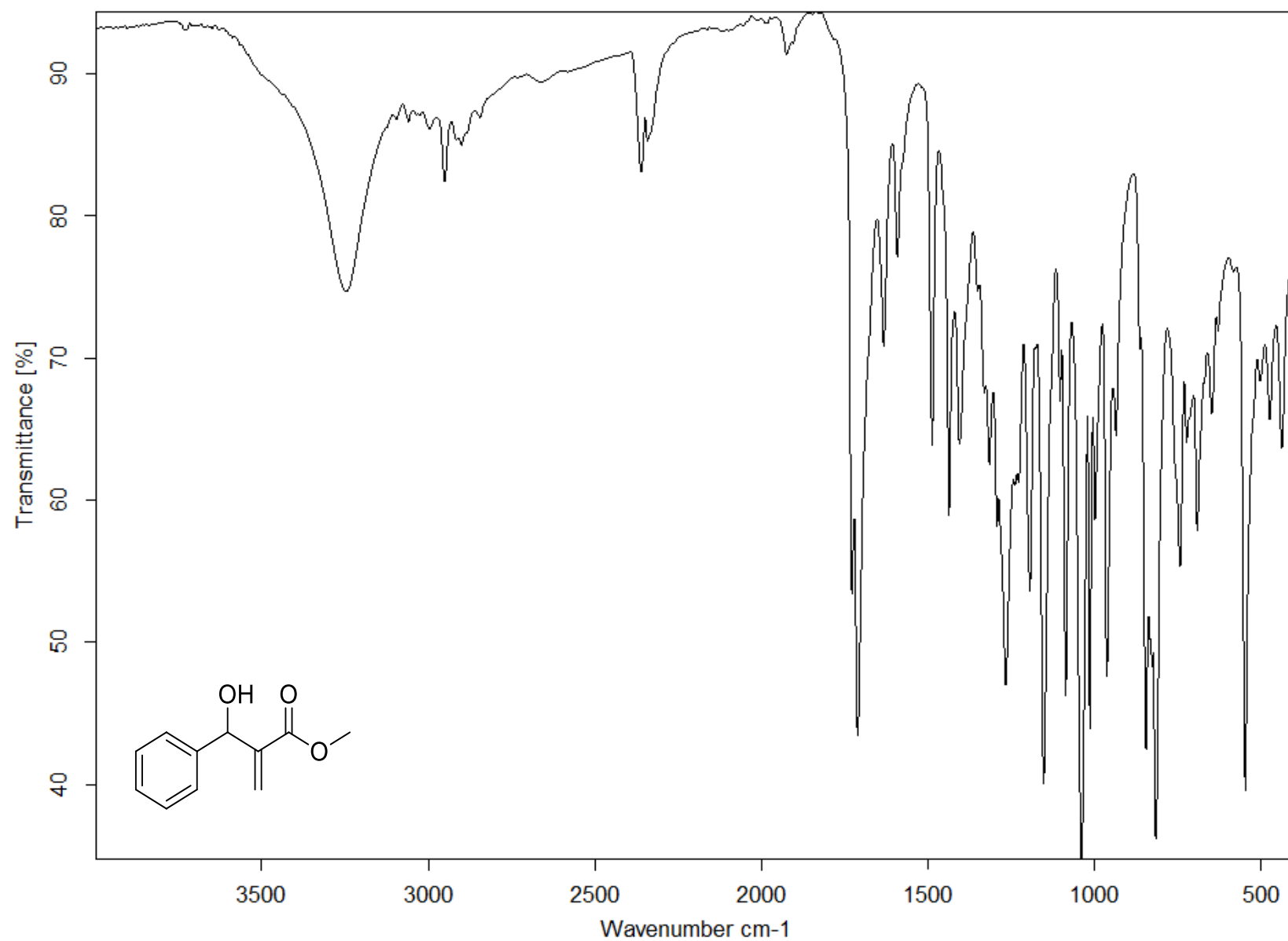
E01. Espectro no IV do 2-metileno-3-hidroxi-3-fenilpropanoato de metila 3a.	132
E02. Espectro de massas (EI, 70 eV) do 2-metileno-3-hidroxi-3-fenilpropanoato de metila 3a.	133
E03. Espectro de RMN de ^1H (300,19 MHz, CDCl_3) do 2-metileno-3-hidroxi-3-fenilpropanoato de metila 3a.	134
E04. Espectro de RMN de ^{13}C (75,48 MHz, CDCl_3) do 2-metileno-3-hidroxi-3-fenilpropanoato de metila 3a.	135
E05. Espectro no IV do 2-metileno-3-hidroxi-3-(<i>p</i> -metoxifenil)-propanoato de metila 3b...	136
E06. Espectro de massas (EI, 70 eV) do 2-metileno-3-hidroxi-3-(<i>p</i> -metoxifenil)-propanoato de metila 3b.	137
E07. Espectro de RMN de ^1H (300,19 MHz, CDCl_3) do 2-metileno-3-hidroxi-3-(<i>p</i> -metoxifenil)-propanoato de metila 3b.	138
E08. Espectro de RMN de ^{13}C (75,48 MHz, CDCl_3) do 2-metileno-3-hidroxi-3-(<i>p</i> -metoxifenil)-propanoato de metila 3b	139
E09. Espectro no IV do 2-metileno-3-hidroxi-3-(<i>p</i> -clorofenil)-propanoato de metila 3c.	140
E10. Espectro de massas (EI, 70 eV) do 2-metileno-3-hidroxi-3-(<i>p</i> -clorofenil)-propanoato de metila 3c.	141
E11. Espectro de RMN de ^1H (300,19 MHz, CDCl_3) do 2-metileno-3-hidroxi-3-(<i>p</i> -clorofenil)-propanoato de metila 3c.....	142
E12. Espectro de RMN de ^{13}C (75,48 MHz, CDCl_3) do 2-metileno-3-hidroxi-3-(<i>p</i> -clorofenil)-propanoato de metila 3c.....	143
E13. Espectro no IV do 2-metileno-3-hidroxi-3-(<i>p</i> -nitrofenil)-propanoato de metila 3d.	144
E14. Espectro de massas (EI, 70 eV) do 2-metileno-3-hidroxi-3-(<i>p</i> -nitrofenil)-propanoato de metila 3d.	145
E15. Espectro de RMN de ^1H (300,19 MHz, CDCl_3) do 2-metileno-3-hidroxi-3-(<i>p</i> -nitrofenil)-propanoato de metila 3d.	146
E16. Espectro de RMN de ^{13}C (75,48 MHz, CDCl_3) do 2-metileno-3-hidroxi-3-(<i>p</i> -nitrofenil)-propanoato de metila 3d.	147

E17. Espectro de RMN de ^1H (300,19 MHz, CDCl_3) do 2-metileno-3-acetoxi-3-fenilpropanoato de metila 6a.	148
E18. Espectro de RMN de ^{13}C (75,48 MHz, CDCl_3) do 2-metileno-3-acetoxi-3-fenilpropanoato de metila 6a.	149
E19. Espectro de massas (EI, 70 eV) do 2-metileno-3-acetoxi-3-(<i>p</i> -metoxifenil)-propanoato de metila 6b.	150
E20. Espectro de RMN de ^1H (300,19 MHz, CDCl_3) do 2-metileno-3-acetoxi-3-(<i>p</i> -metoxifenil)-propanoato de metila 6b.	151
E21. Espectro de RMN de ^{13}C (75,48 MHz, CDCl_3) do 2-metileno-3-acetoxi-3-(<i>p</i> -metoxifenil)-propanoato de metila 6b.	152
E22. Espectro de ESI(+)-MS do 2-metileno-3-acetoxi-3-(<i>p</i> -clorofenil)-propanoato de metila 6c.	153
E23. Espectro de RMN de ^1H (300,19 MHz, CDCl_3) do 2-metileno-3-acetoxi-3-(<i>p</i> -clorofenil)-propanoato de metila 6c.	154
E24. Espectro de massas (EI, 70 eV) do 2-metileno-3-acetoxi-3-(<i>p</i> -nitrofenil)-propanoato de metila 6d.	155
E25. Espectro de RMN de ^1H (300,19 MHz, CDCl_3) do 2-metileno-3-acetoxi-3-(<i>p</i> -nitrofenil)-propanoato de metila 6d.	156
E26. Espectro de RMN de ^{13}C (75,48 MHz, CDCl_3) do 2-metileno-3-acetoxi-3-(<i>p</i> -nitrofenil)-propanoato de metila 6d.	157
E27. Espectro de RMN de ^1H (300,19 MHz, CDCl_3) do (<i>E</i>)-2-metil-2-acetoxi-3-(<i>p</i> -metoxifenil)-2-propenoato de metila 7b.	158
E28. Espectro no IV do ácido 2-iodoxibenzóico (IBX).	159
E29. Espectro de RMN de ^1H (300,19 MHz, CDCl_3) do ácido 2-iodoxibenzóico (IBX).	160
E30. Espectro no IV do 2-metileno-3-oxo-3-fenilpropanoato de metila 9a.	161
E31. Espectro de massas (EI, 70 eV) do 2-metileno-3-oxo-3-fenilpropanoato de metila 9a.	162
E32. Espectro de RMN de ^1H (300,19 MHz, CDCl_3) do 2-metileno-3-oxo-3-fenilpropanoato de metila 9a.	163
E33. Espectro de RMN de ^{13}C (75,48 MHz, CDCl_3) do 2-metileno-3-oxo-3-fenilpropanoato de metila 9a.	164
E34. Espectro no IV do 2-metileno-3-oxo-3-(<i>p</i> -metoxifenil)-propanoato de metila 9b.	165
E35. Espectro de massas (EI, 70 eV) do 2-metileno-3-oxo-3-(<i>p</i> -metoxifenil)-propanoato de metila 9b.	166

E36. Espectro de RMN de ^1H (300,19 MHz, CDCl_3) do 2-metileno-3-oxo-3-(<i>p</i> -metoxifenil)-propanoato de metila 9b.	167
E37. Espectro de RMN de ^{13}C (75,48 MHz, CDCl_3) do 2-metileno-3-oxo-3-(<i>p</i> -metoxifenil)-propanoato de metila 9b.	168
E38. Espectro no IV do 2-metileno-3-oxo-3-(<i>p</i> -clorofenil)-propanoato de metila 9c.	169
E39. Espectro de massas (EI, 70 eV) do 2-metileno-3-oxo-3-(<i>p</i> -clorofenil)-propanoato de metila 9c.	170
E40. Espectro de RMN de ^1H (300,19 MHz, CDCl_3) do 2-metileno-3-oxo-3-(<i>p</i> -clorofenil)-propanoato de metila 9c.	171
E41. Espectro de RMN de ^{13}C (75,48 MHz, CDCl_3) do 2-metileno-3-oxo-3-(<i>p</i> -clorofenil)-propanoato de metila 9c.	172
E42. Espectro no IV do 2-metileno-3-oxo-3-(<i>p</i> -nitrofenil)-propanoato de metila 9d.	173
E43. Espectro de massas (EI, 70 eV) do 2-metileno-3-oxo-3-(<i>p</i> -nitrofenil)-propanoato de metila 9d.	174
E44. Espectro de RMN de ^1H (300,19 MHz, CDCl_3) do 2-metileno-3-oxo-3-(<i>p</i> -nitrofenil)-propanoato de metila 9d.	175
E45. Espectro de massas (EI, 70 eV) do 2-metil-3-oxo-3-fenilpropanoato de metila 12a.	176
E46. Espectro de RMN de ^1H (300,19 MHz, CDCl_3) do 2-metil-3-oxo-3-fenilpropanoato de metila 12a.	177
E47. Espectro de RMN de ^{13}C (75,48 MHz, CDCl_3) do 2-metil-3-oxo-3-fenilpropanoato de metila 12a.	178
E48. Espectro de massas (EI, 70 eV) do 2-metil-3-oxo-3-(<i>p</i> -metoxifenil)-propanoato de metila 12b.	179
E49. Espectro de RMN de ^1H (300,19 MHz, CDCl_3) do 2-metil-3-oxo-3-(<i>p</i> -metoxifenil)-propanoato de metila 12b.	180
E50. Espectro de RMN de ^{13}C (75,48 MHz, CDCl_3) do 2-metil-3-oxo-3-(<i>p</i> -metoxifenil)-propanoato de metila 12b.	181
E51. Espectro de massas (EI, 70 eV) do 2-metil-3-oxo-3-(<i>p</i> -clorofenil)-propanoato de metila 12c.	182
E52. Espectro de RMN de ^1H (300,19 MHz, CDCl_3) do 2-metil-3-oxo-3-(<i>p</i> -clorofenil)-propanoato de metila 12c.	183
E53. Espectro de RMN de ^{13}C (75,48 MHz, CDCl_3) do 2-metil-3-oxo-3-(<i>p</i> -clorofenil)-propanoato de metila 12c.	184

E54 Espectro de massas (EI, 70 eV) do 2-metil-3-oxo-3-(<i>p</i> -nitrofenil)-propanoato de metila 12d	185
E55. Espectro de RMN de ^1H (300,19 MHz, CDCl_3) do 2-metil-3-oxo-3-(<i>p</i> -nitrofenil)-propanoato de metila 12d	186
E56. Espectro de RMN de ^{13}C (75,48 MHz, CDCl_3) do 2-metil-3-oxo-3-(<i>p</i> -nitrofenil)-propanoato de metila 12d.	187
E57. Espectro de massas (EI, 70 eV) do 2-metil-3-hidroxi-3-fenil-propanoato de metila 13a.	188
E58. Espectro de RMN de ^1H (300,19 MHz, CDCl_3) do 2-metil-3-hidroxi-3-fenil-propanoato de metila 13a.....	189
E59. Espectro de RMN de ^{13}C (75,48 MHz, CDCl_3) do 2-metil-3-hidroxi-3-fenil-propanoato de metila 13a.....	190
E60. Espectro de massas (EI, 70 eV) do 2-metil-3-hidroxi-3-(<i>p</i> -metoxifenil)-propanoato de metila 13b.	191
E61. Espectro de RMN de ^1H (300,19 MHz, CDCl_3) do 2-metil-3-hidroxi-3-(<i>p</i> -metoxifenil)-propanoato de metila 13b.	192
E62. Espectro de RMN de ^{13}C (75,48 MHz, CDCl_3) do 2-metil-3-hidroxi-3-(<i>p</i> -metoxifenil)-propanoato de metila 13b.	193
E63. Espectro de massas (EI, 70 eV) do 2-metil-3-hidroxi-3-(<i>p</i> -clorofenil)-propanoato de metila 13c.	194
E64. Espectro de RMN de ^1H (300,19 MHz, CDCl_3) do 2-metil-3-hidroxi-3-(<i>p</i> -clorofenil)-propanoato de metila 13c.....	195
E65. Espectro de RMN de ^{13}C (75,48 MHz, CDCl_3) do 2-metil-3-hidroxi-3-(<i>p</i> -clorofenil)-propanoato de metila 13c.....	196
E66. Espectro de massas (EI, 70 eV) do 2-metil-3-hidroxi-3-(<i>p</i> -nitrofenil)-propanoato de metila 13d.	197
E67. Espectro de RMN de ^1H (300,19 MHz, CDCl_3) do 2-metil-3-hidroxi-3-(<i>p</i> -nitrofenil)-propanoato de metila 13d.	198
E68. Espectro de RMN de ^{13}C (75,48 MHz, CDCl_3) do 2-metil-3-hidroxi-3-(<i>p</i> -nitrofenil)-propanoato de metila 13d.	199
E69. Espectro de RMN de ^1H (300,19 MHz, CDCl_3) do <i>syn</i> -2-metil-3-hidroxi-3-(<i>p</i> -nitrofenil)-propanoato de metila 13d.....	200

E70. Espectro de RMN de ^1H (300,19 MHz, CDCl_3) do 2- <i>p</i> -nitrofenil-3-fenil-1,3-tiazolidin-4-ona 18a.....	201
E71. Espectro de RMN de ^1H (300,19 MHz, CDCl_3) do 2- <i>p</i> -clorofenil-3-fenil-1,3-tiazolidin-4-ona 18b.	202
E72. Espectro de RMN de ^1H (300,19 MHz, CDCl_3) do 2- <i>p</i> -metoxifenil-3-fenil-1,3-tiazolidin-4-ona 18c.	203



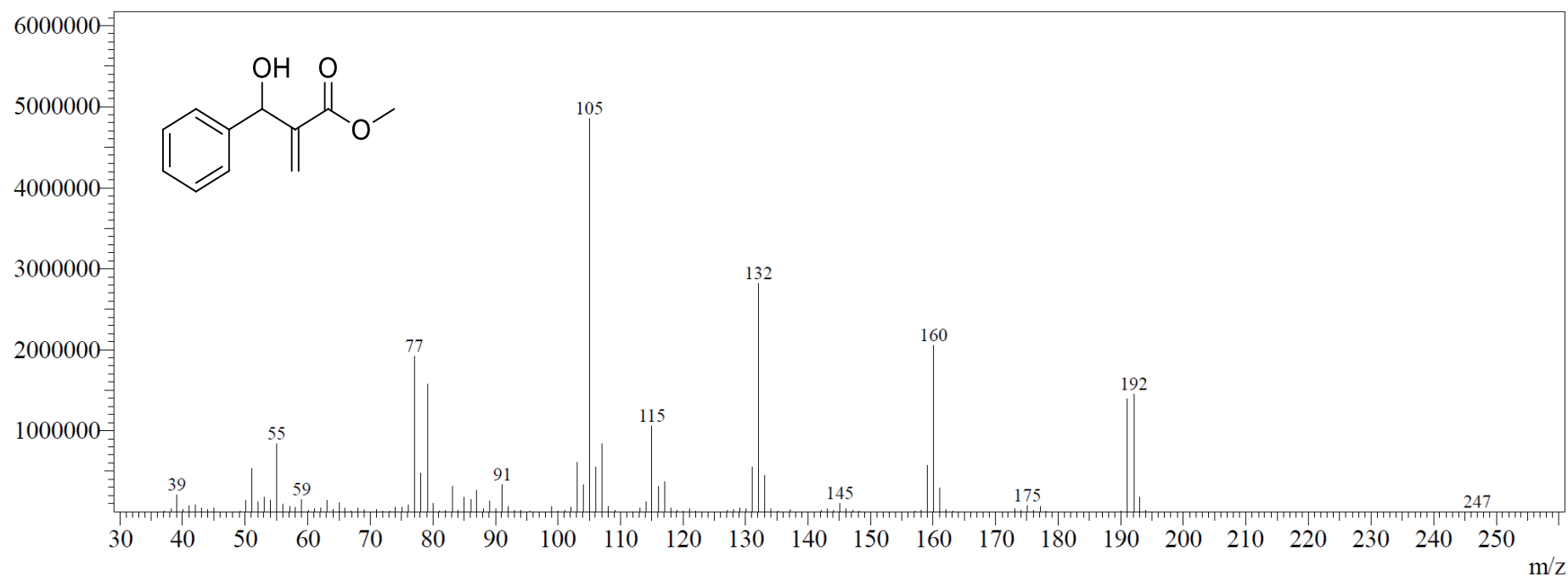
E01. Espectro no IV do 2-metileno-3-hidroxi-3-fenilpropanoato de metila **3a**.

Line#:1 R.Time:7.965(Scan#:994)

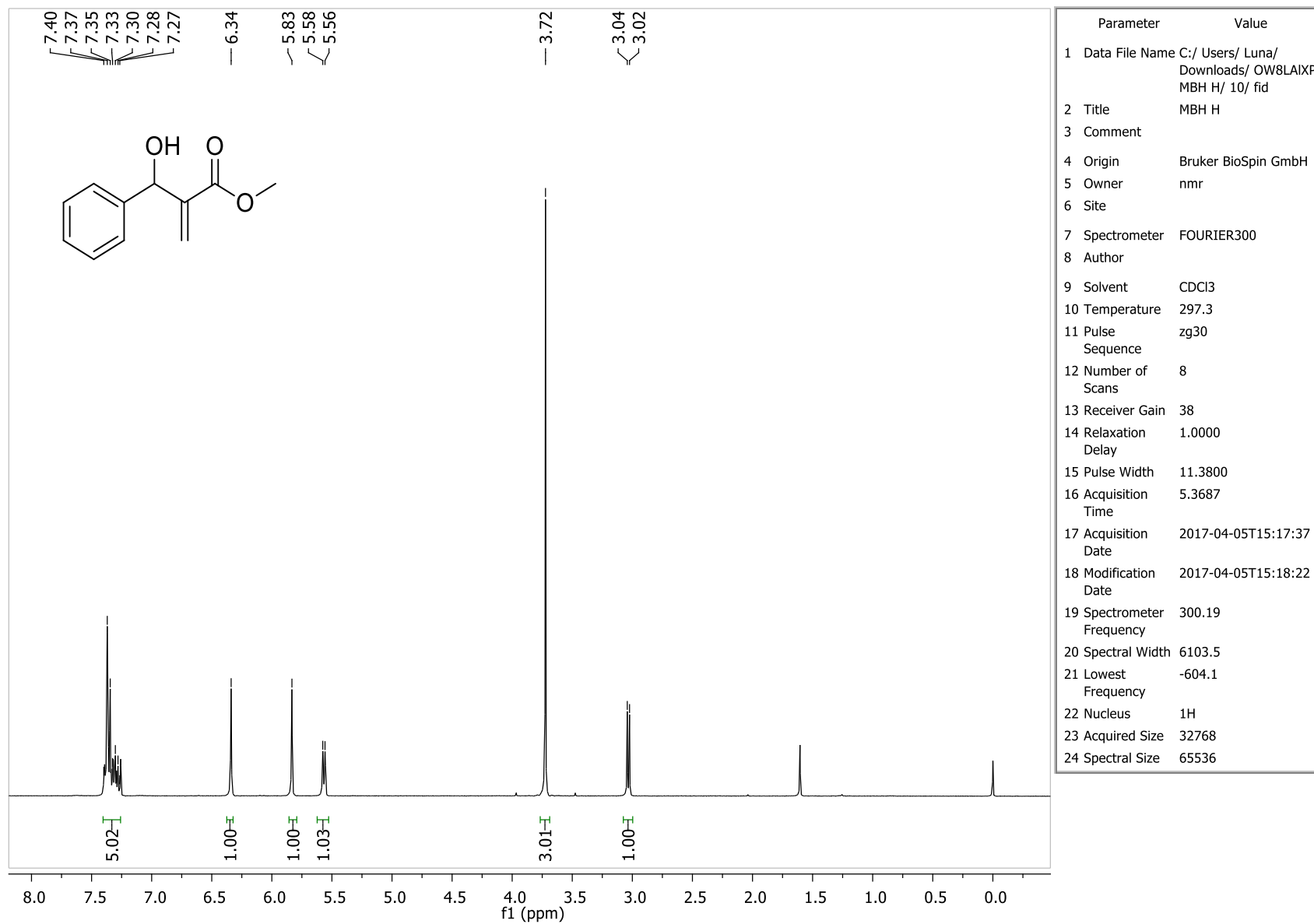
MassPeaks:125

RawMode:Single 7.965(994) BasePeak:105.05(4851984)

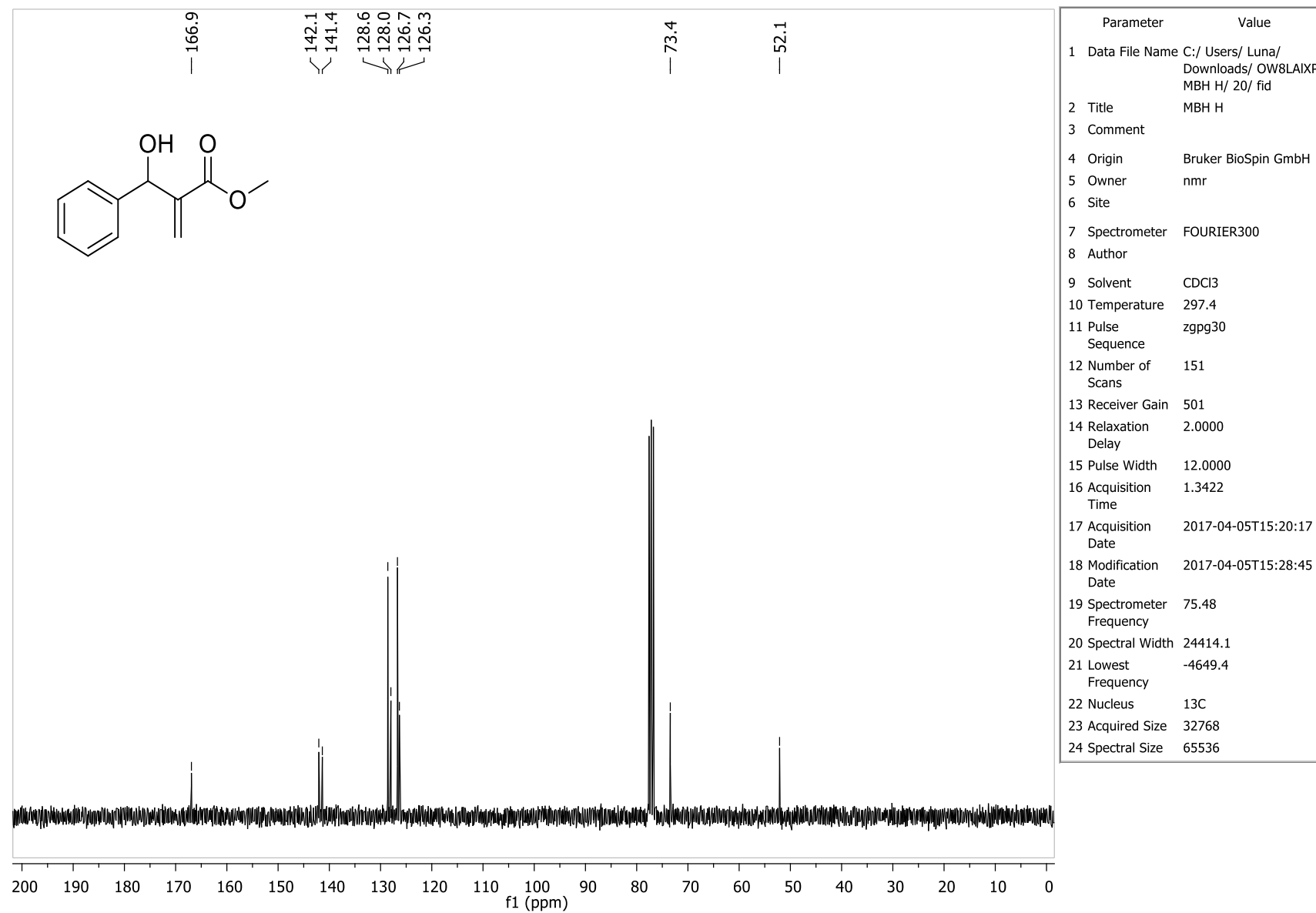
BG Mode:None Group 1 - Event 1



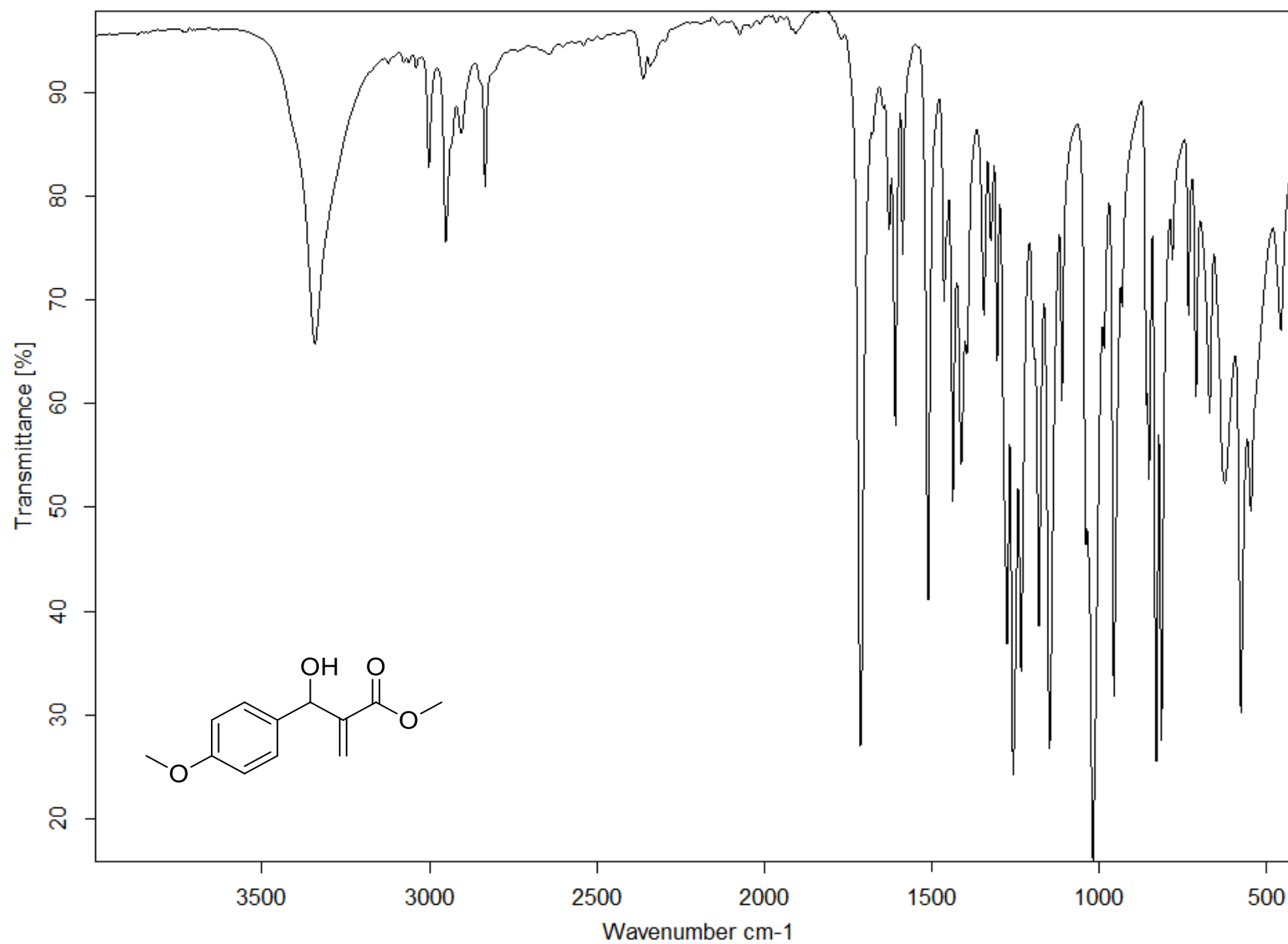
E02. Espectro de massas (EI, 70 eV) do 2-metileno-3-hidroxi-3-fenilpropanoato de metila **3a**.



E03. Espectro de RMN de ¹H (300,19 MHz, CDCl₃) do 2-metileno-3-hidroxi-3-fenilpropanoato de metila **3a**.



E04. Espectro de RMN de ¹³C (75,48 MHz, CDCl₃) do 2-metileno-3-hidroxi-3-fenilpropanoato de metila **3a**.



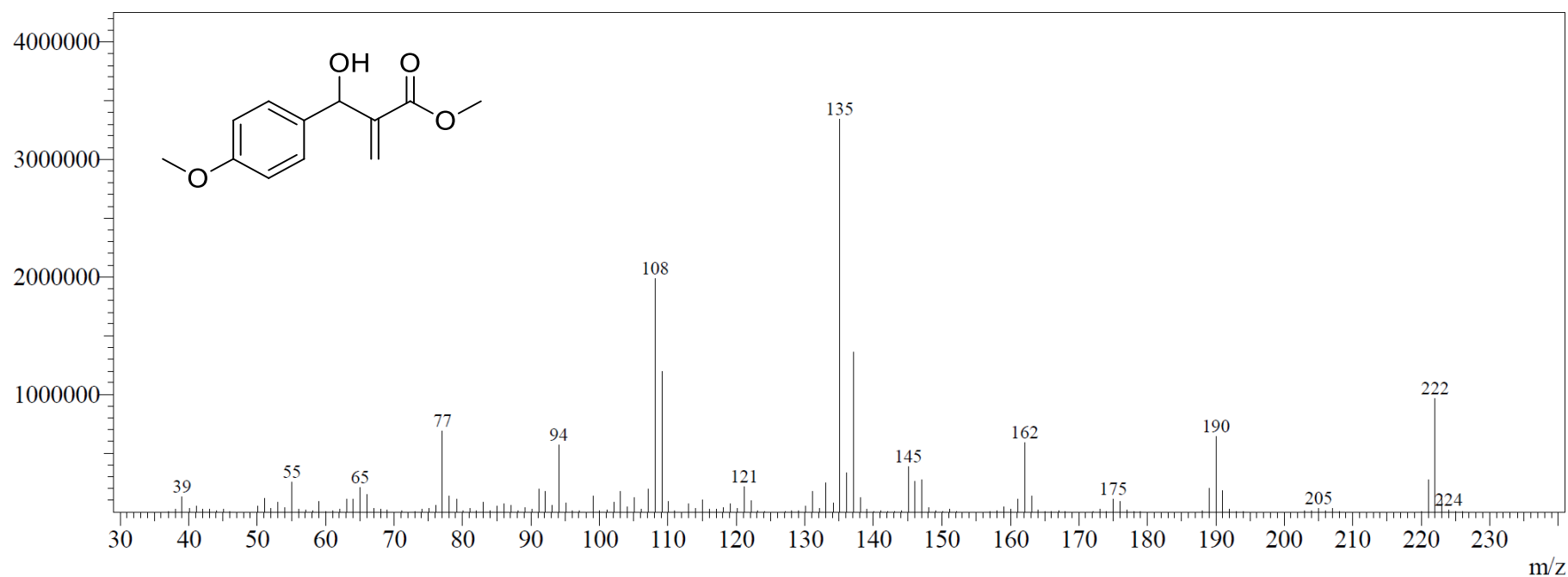
E05. Espectro no IV do 2-metileno-3-hidroxi-3-(*p*-metoxifenil)-propanoato de metila **3b**.

Line#:1 R.Time:9.000(Scan#:1201)

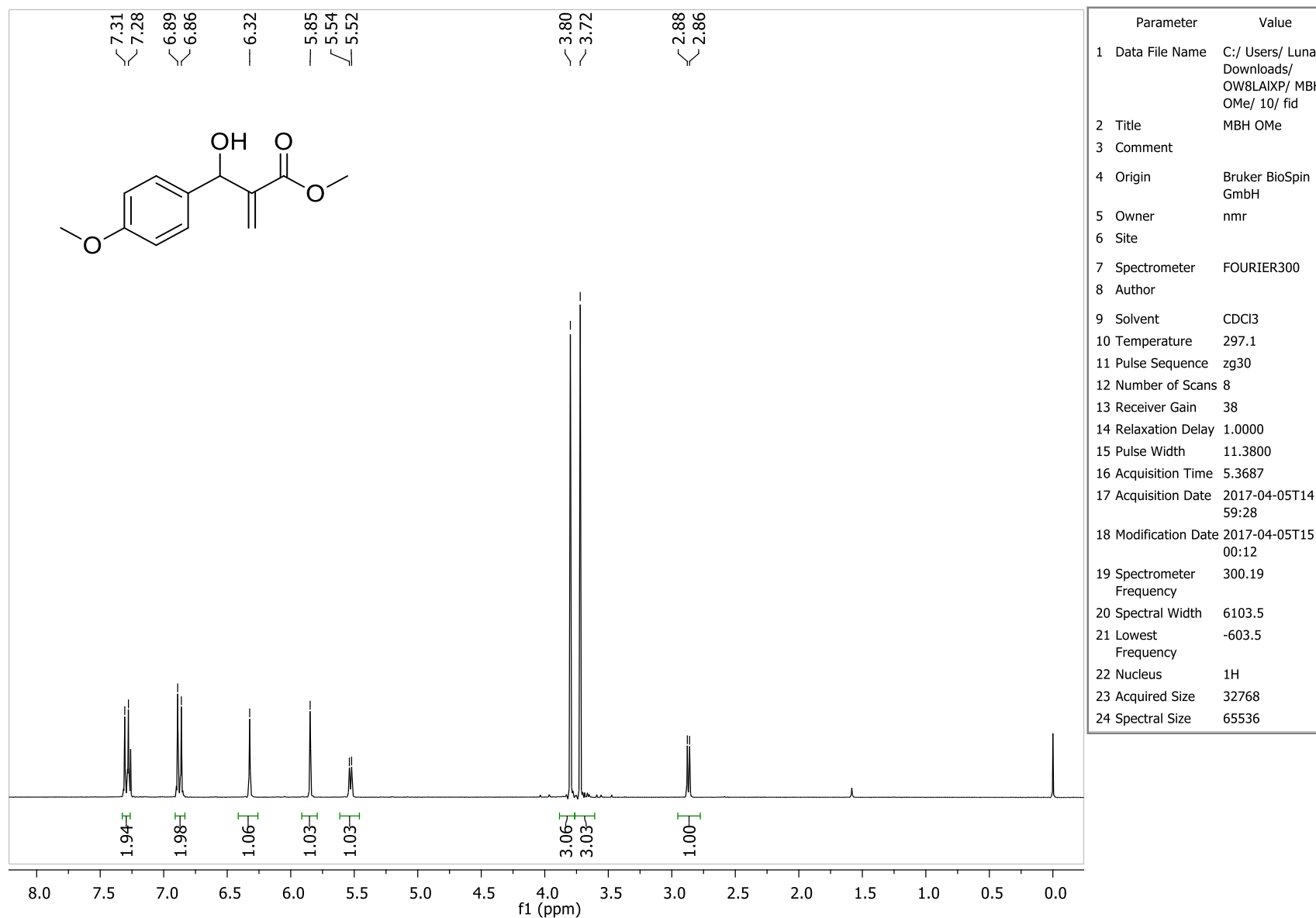
MassPeaks:156

RawMode:Single 9.000(1201) BasePeak:135.05(3340414)

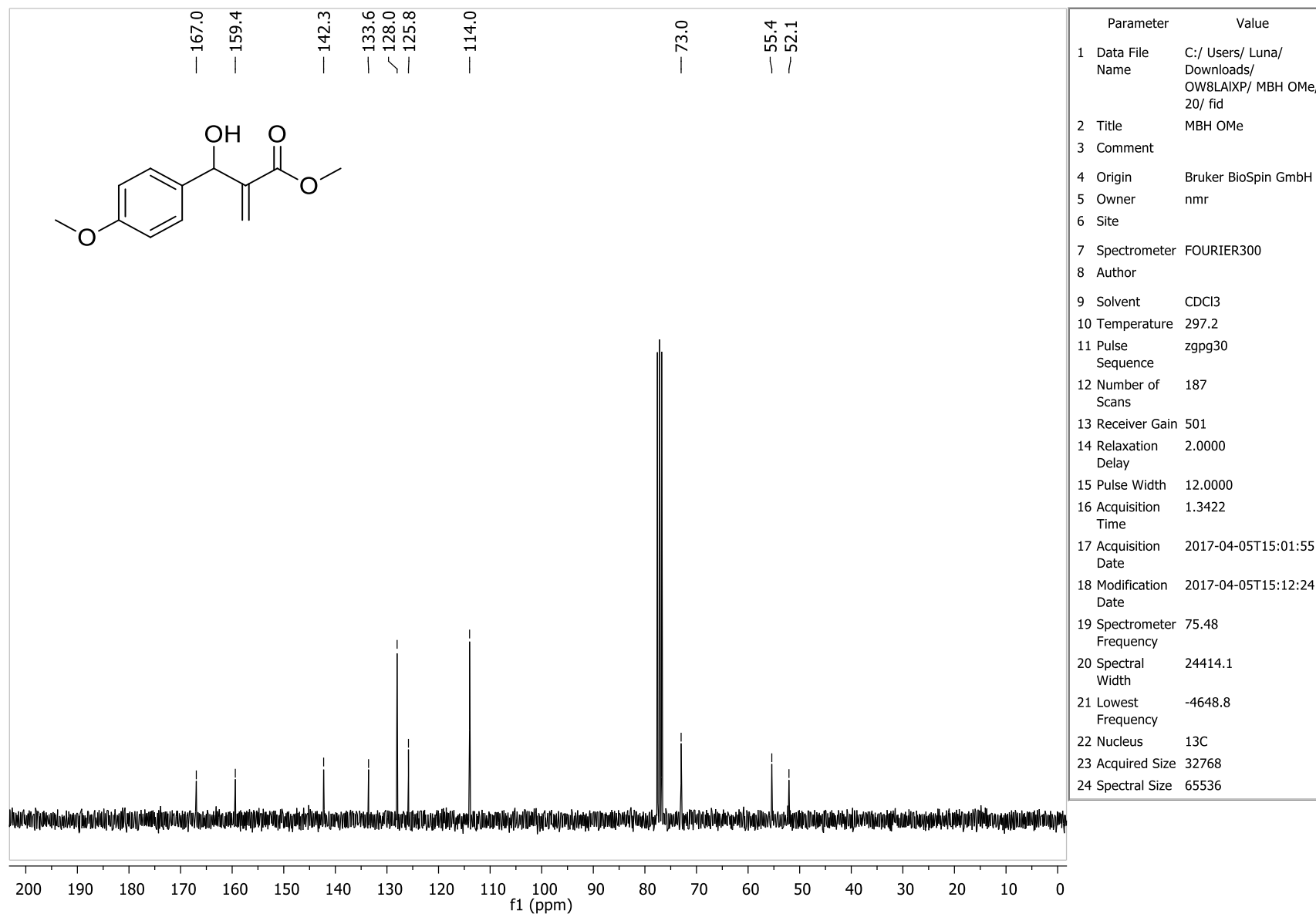
BG Mode:None Group 1 - Event 1



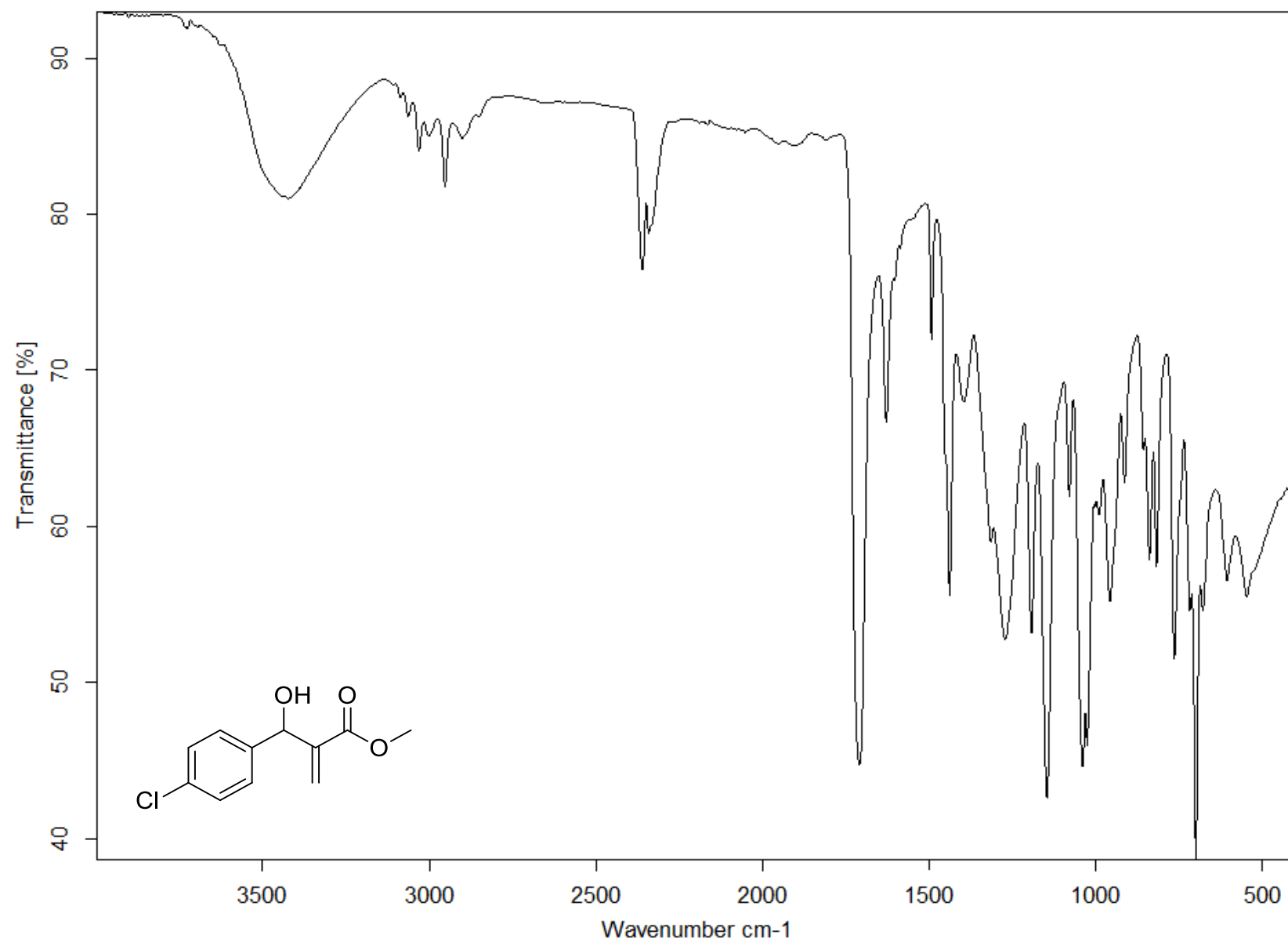
E06. Espectro de massas (EI, 70 eV) do 2-metileno-3-hidroxi-3-(*p*-metoxifenil)-propanoato de metila **3b**.



E07. Espectro de RMN de ¹H (300,19 MHz, CDCl₃) do 2-metileno-3-hidroxi-3-(*p*-metoxifenil)-propanoato de metila **3b**.



E08. Espectro de RMN de ^{13}C (75,48 MHz, CDCl_3) do 2-metileno-3-hidroxi-3-(*p*-metoxifenil)-propanoato de metila **3b**



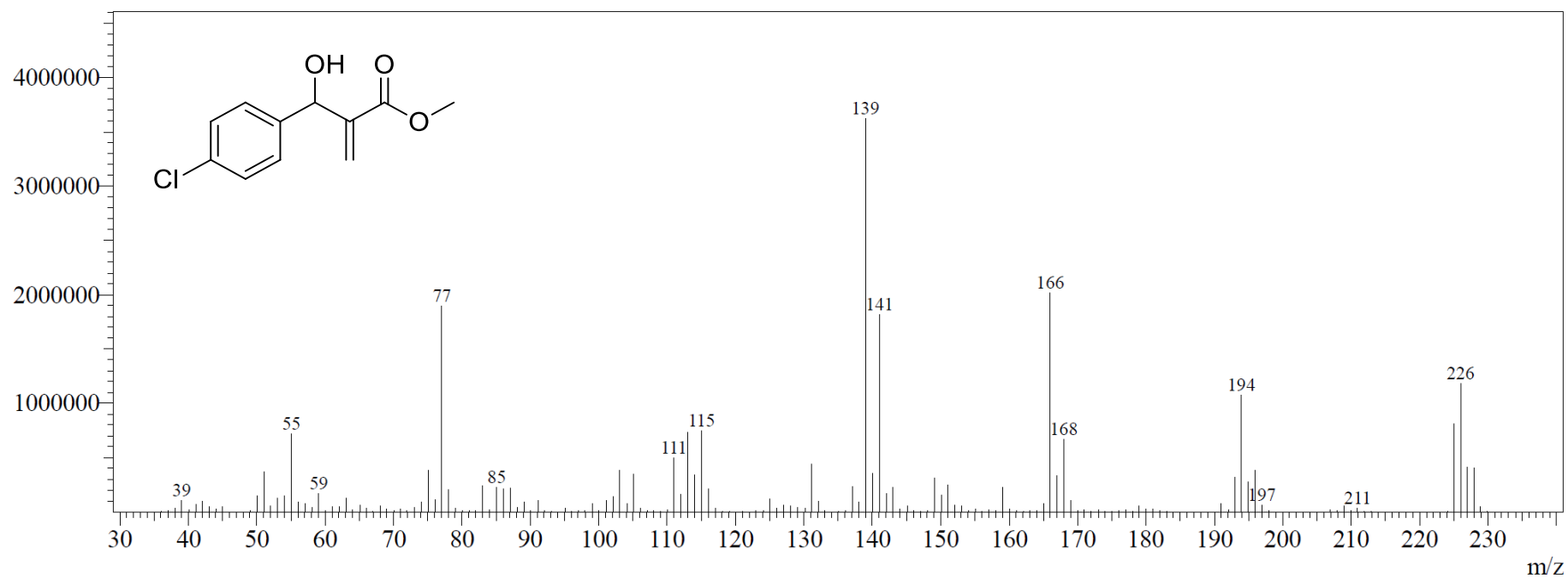
E09. Espectro no IV do 2-metileno-3-hidroxi-3-(*p*-clorofenil)-propanoato de metila **3c**.

Line#:1 R.Time:8.775(Scan#:1156)

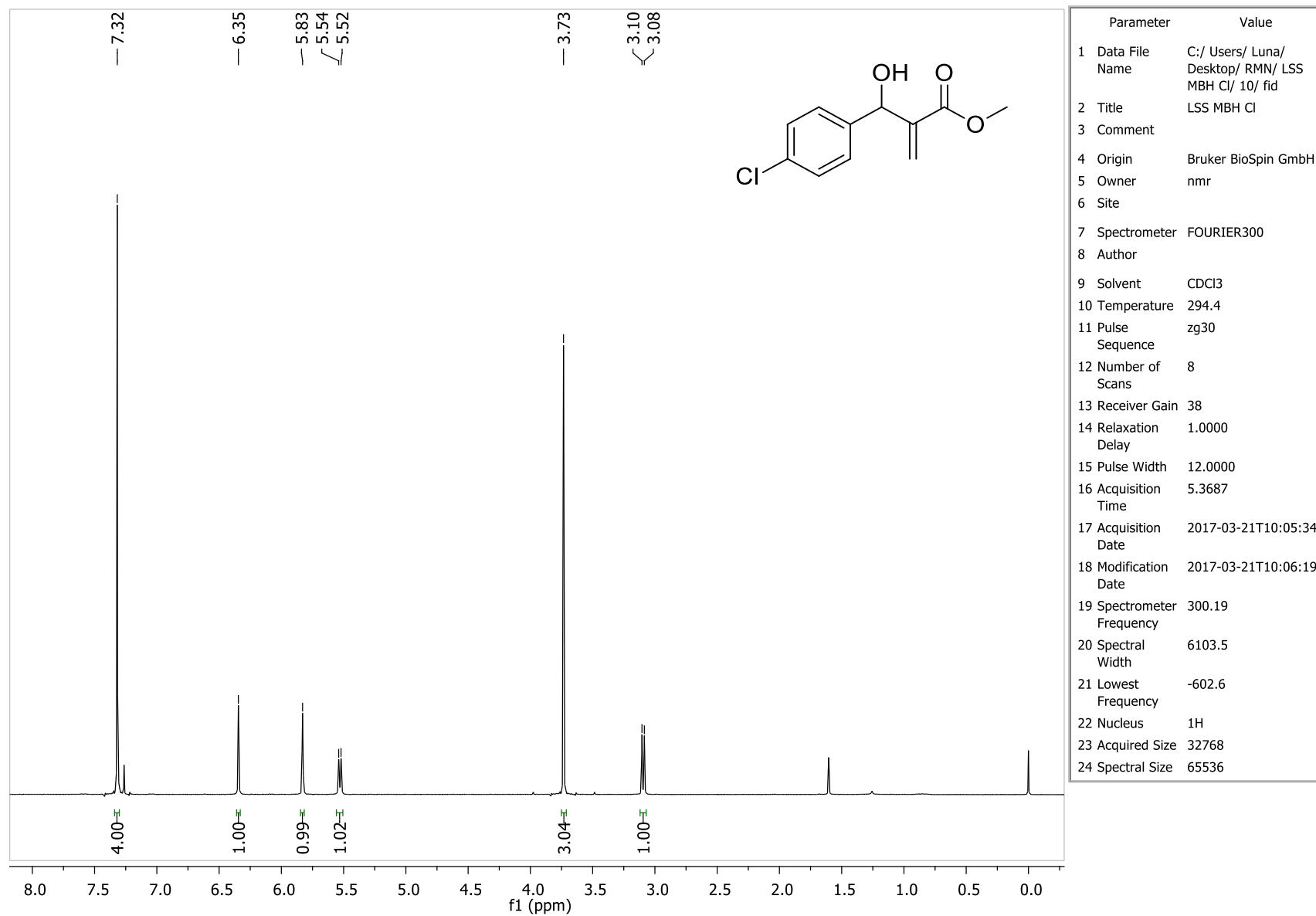
MassPeaks:172

RawMode:Single 8.775(1156) BasePeak:139.00(3621615)

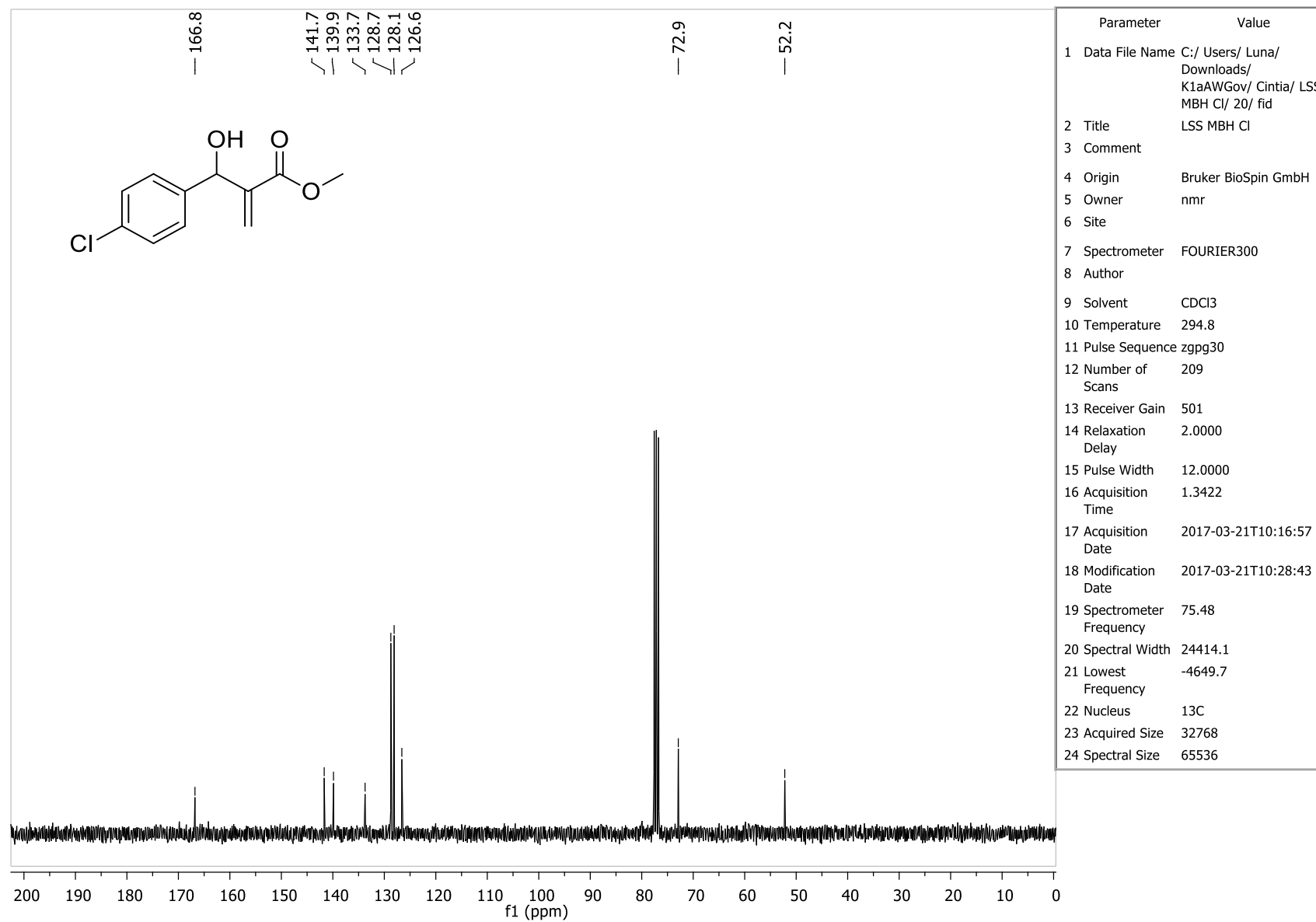
BG Mode:None Group 1 - Event 1



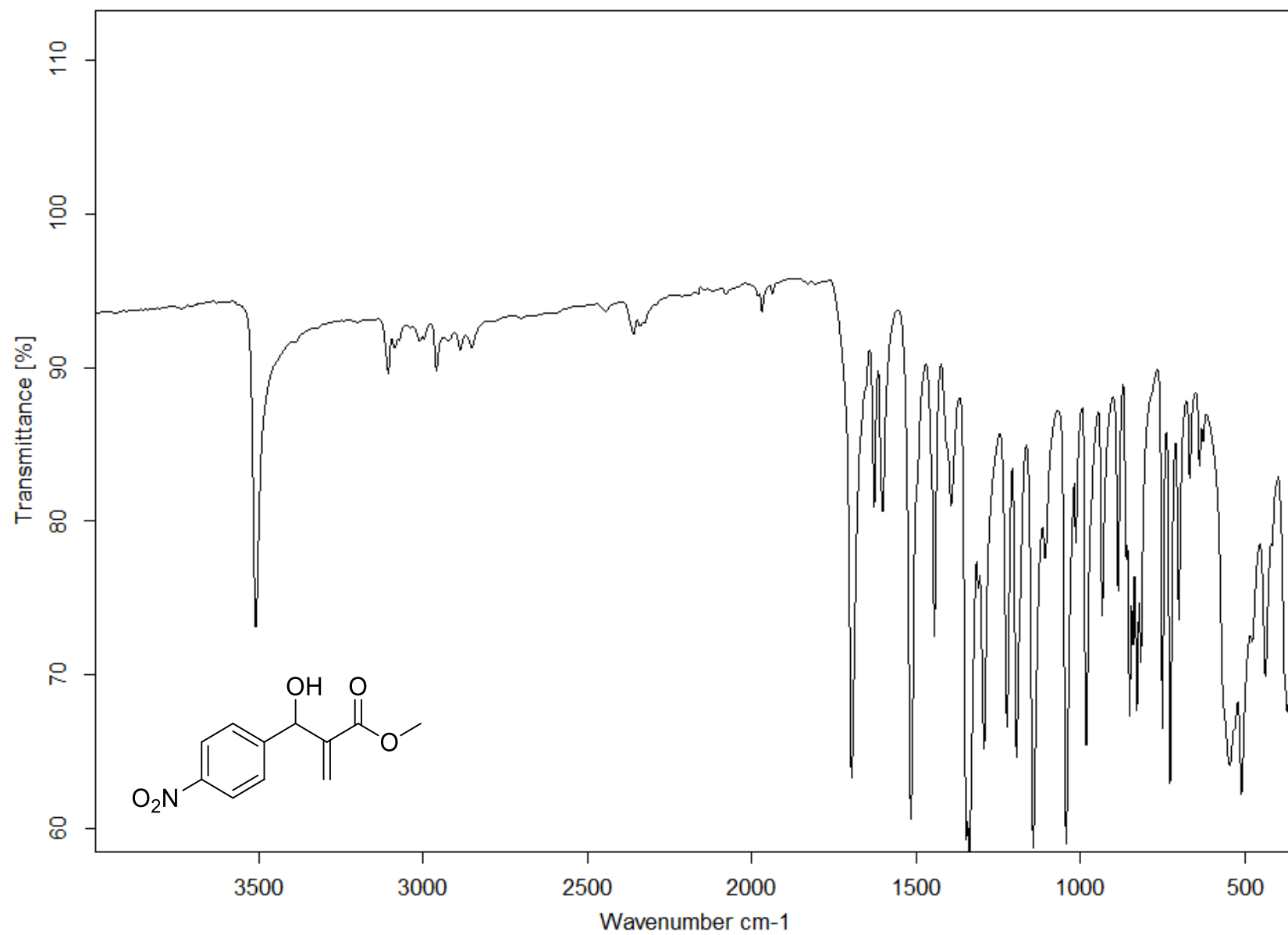
E10. Espectro de massas (EI, 70 eV) do 2-metileno-3-hidroxi-3-(*p*-clorofenil)-propanoato de metila **3c**.



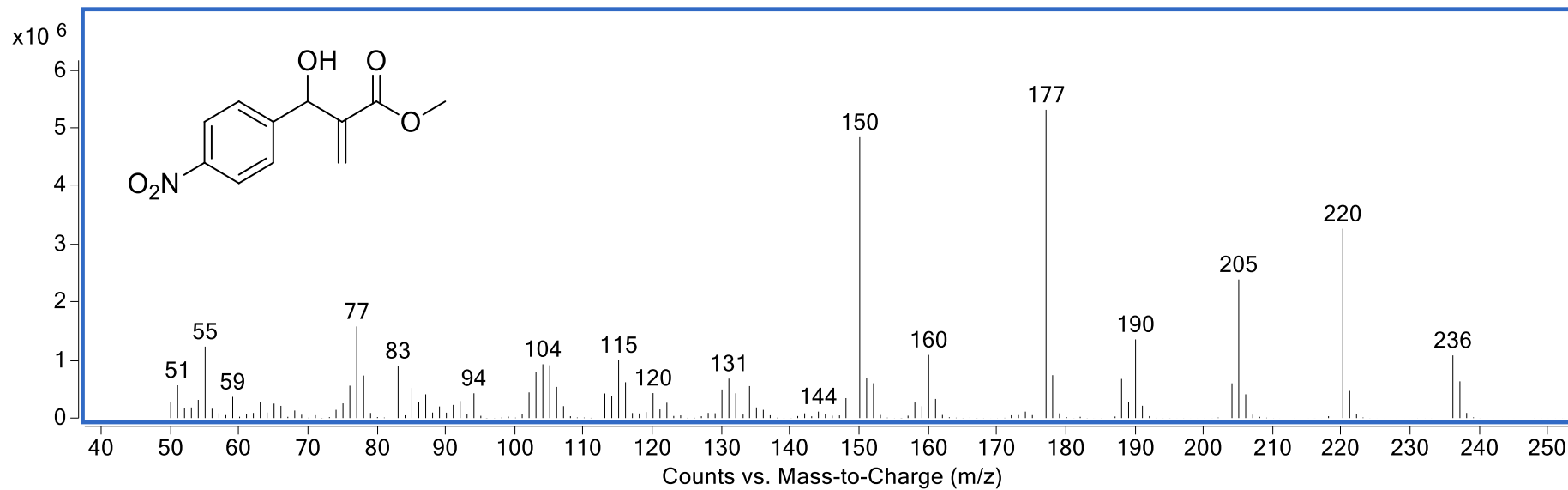
E11. Espectro de RMN de ^1H (300,19 MHz, CDCl_3) do 2-metileno-3-hidroxi-3-(*p*-clorofenil)-propanoato de metila **3c**.



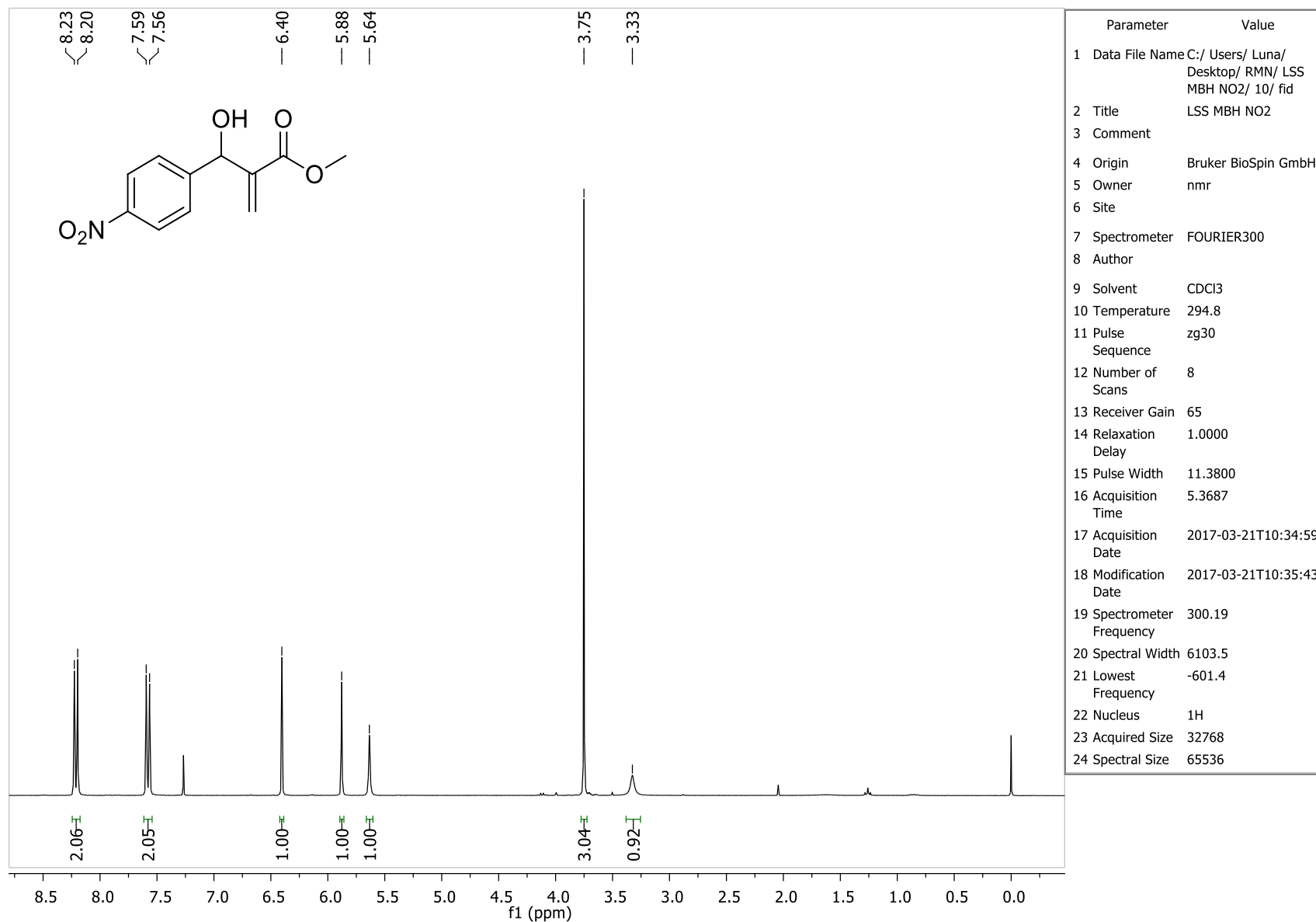
E12. Espectro de RMN de ¹³C (75,48 MHz, CDCl₃) do 2-metileno-3-hidroxi-3-(*p*-clorofenil)-propanoato de metila **3c**.



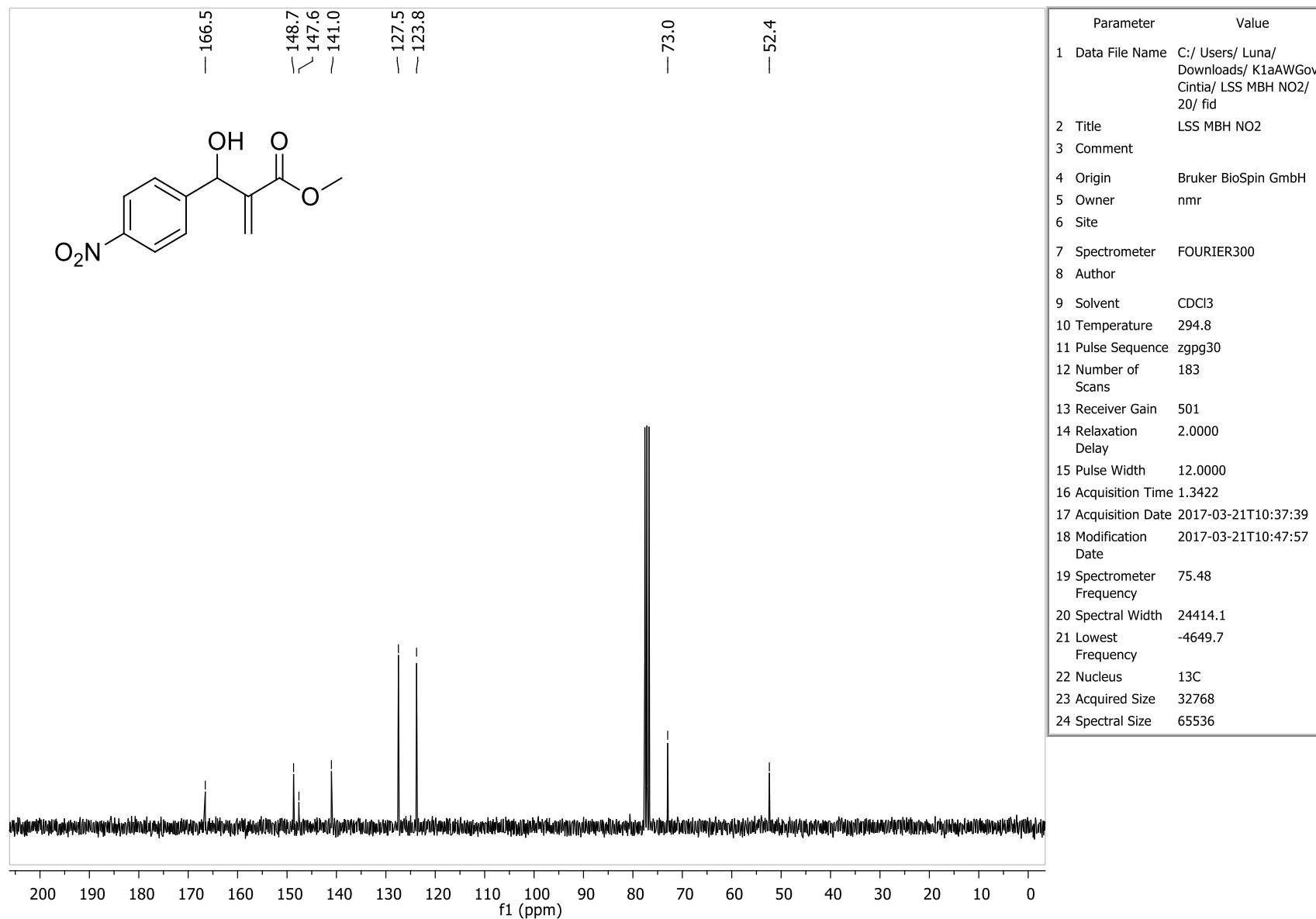
E13. Espectro no IV do 2-metileno-3-hidroxi-3-(*p*-nitrofenil)-propanoato de metila **3d**.



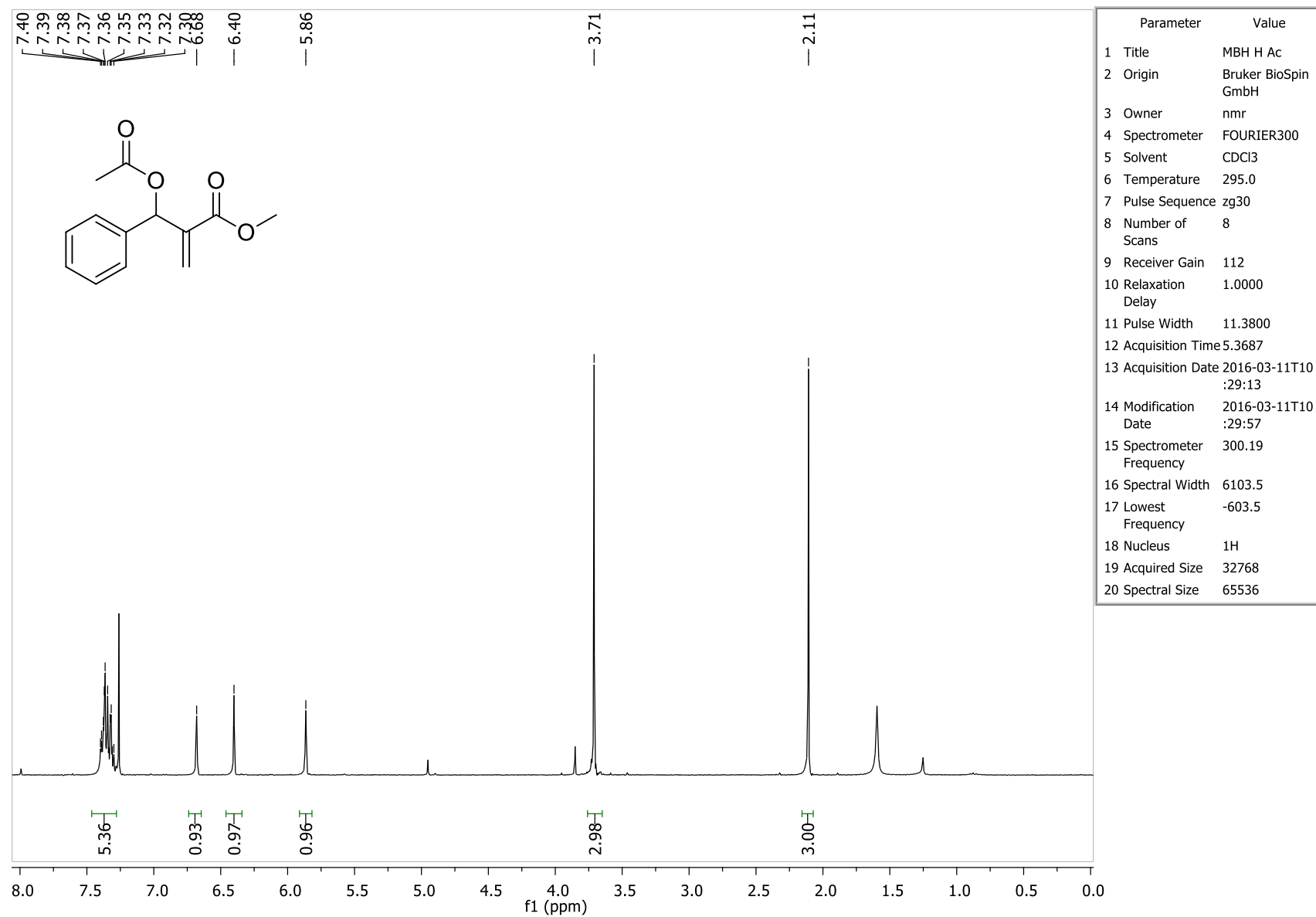
E14. Espectro de massas (EI, 70 eV) do 2-metileno-3-hidroxi-3-(*p*-nitrofenil)-propanoato de metila **3d**.



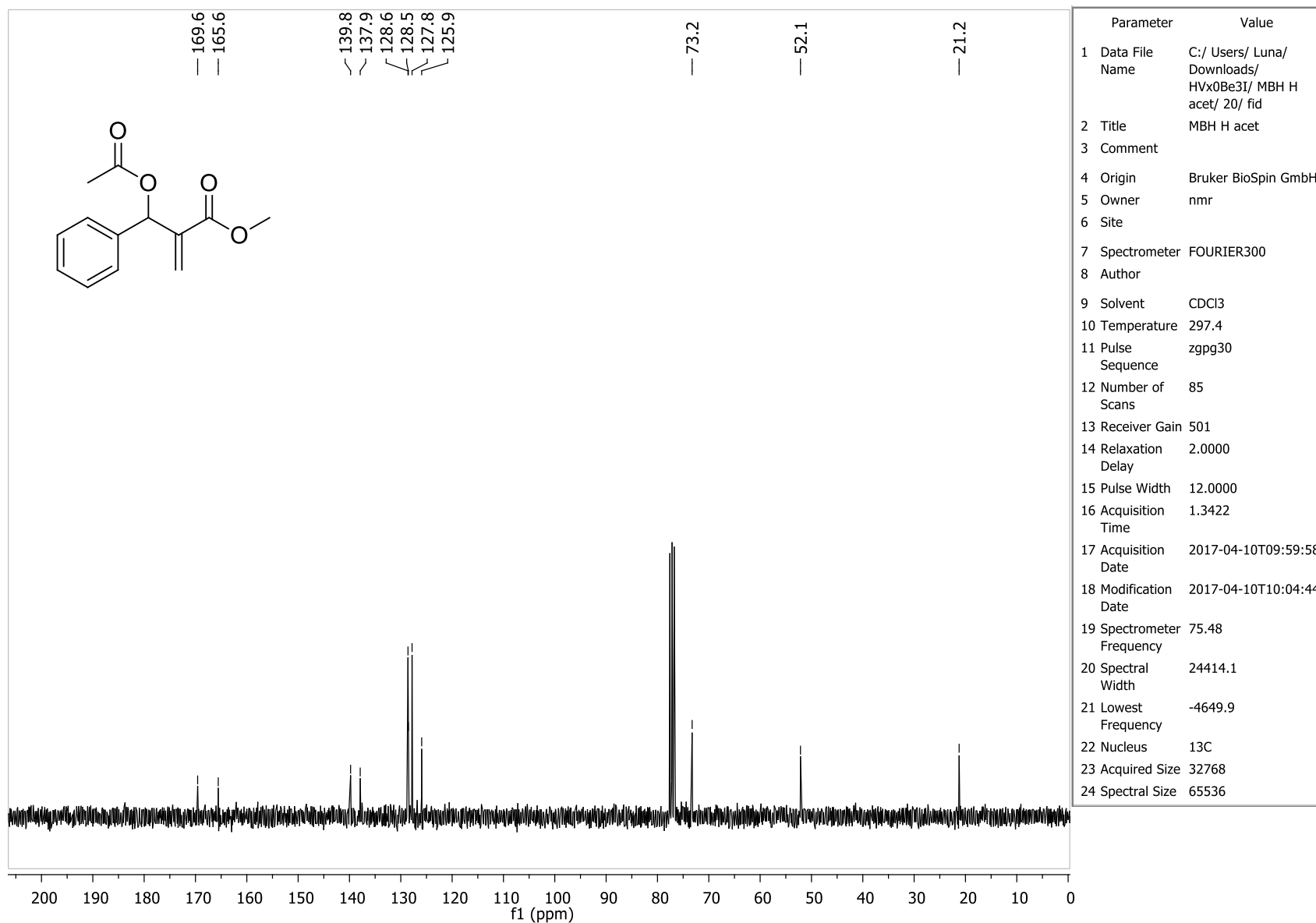
E15. Espectro de RMN de ¹H (300,19 MHz, CDCl₃) do 2-metileno-3-hidroxi-3-(*p*-nitrofenil)-propanoato de metila **3d**.



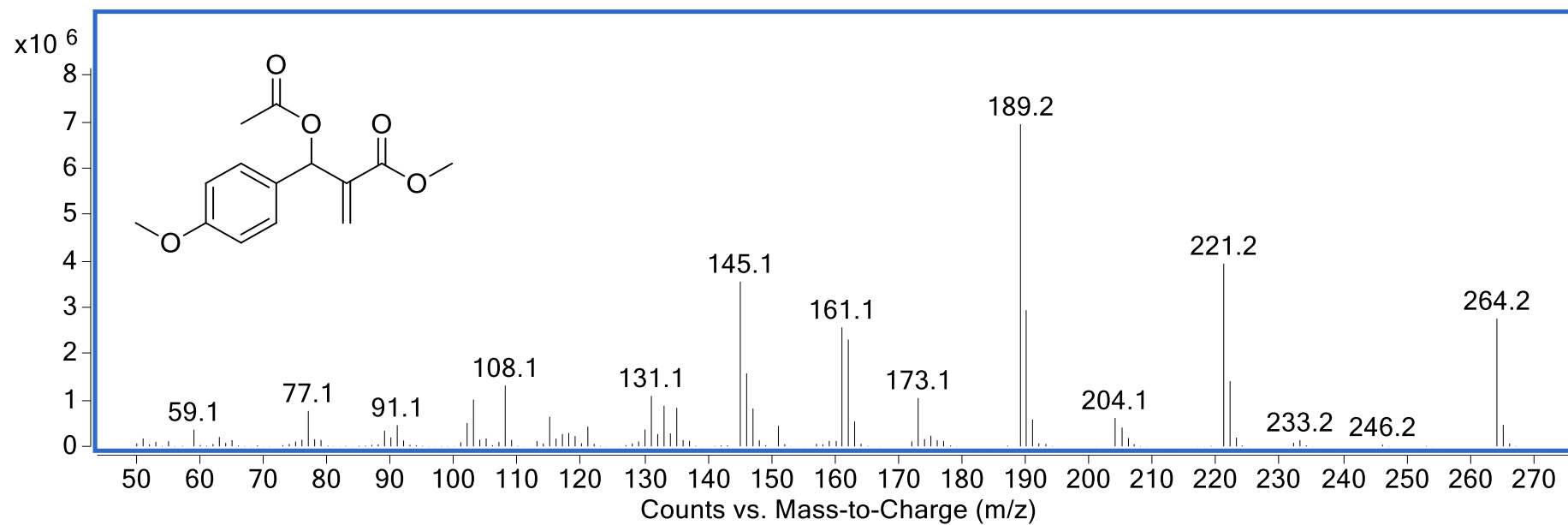
E16. Espectro de RMN de ¹³C (75,48 MHz, CDCl₃) do 2-metileno-3-hidroxi-3-(*p*-nitrofenil)-propanoato de metila **3d**.



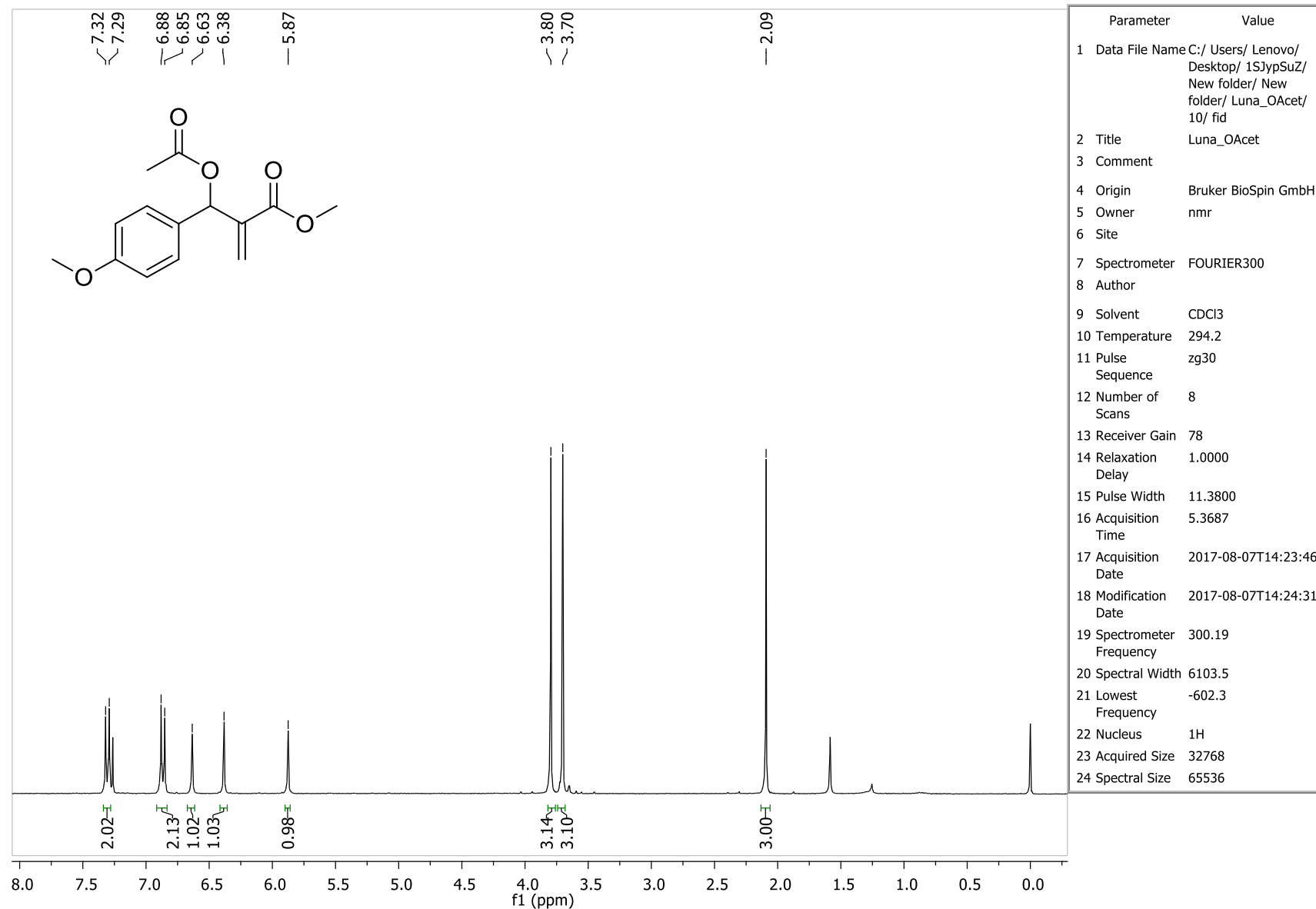
E17. Espectro de RMN de ¹H (300,19 MHz, CDCl₃) do 2-metileno-3-acetoxi-3-fenilpropanoato de metila **6a**.



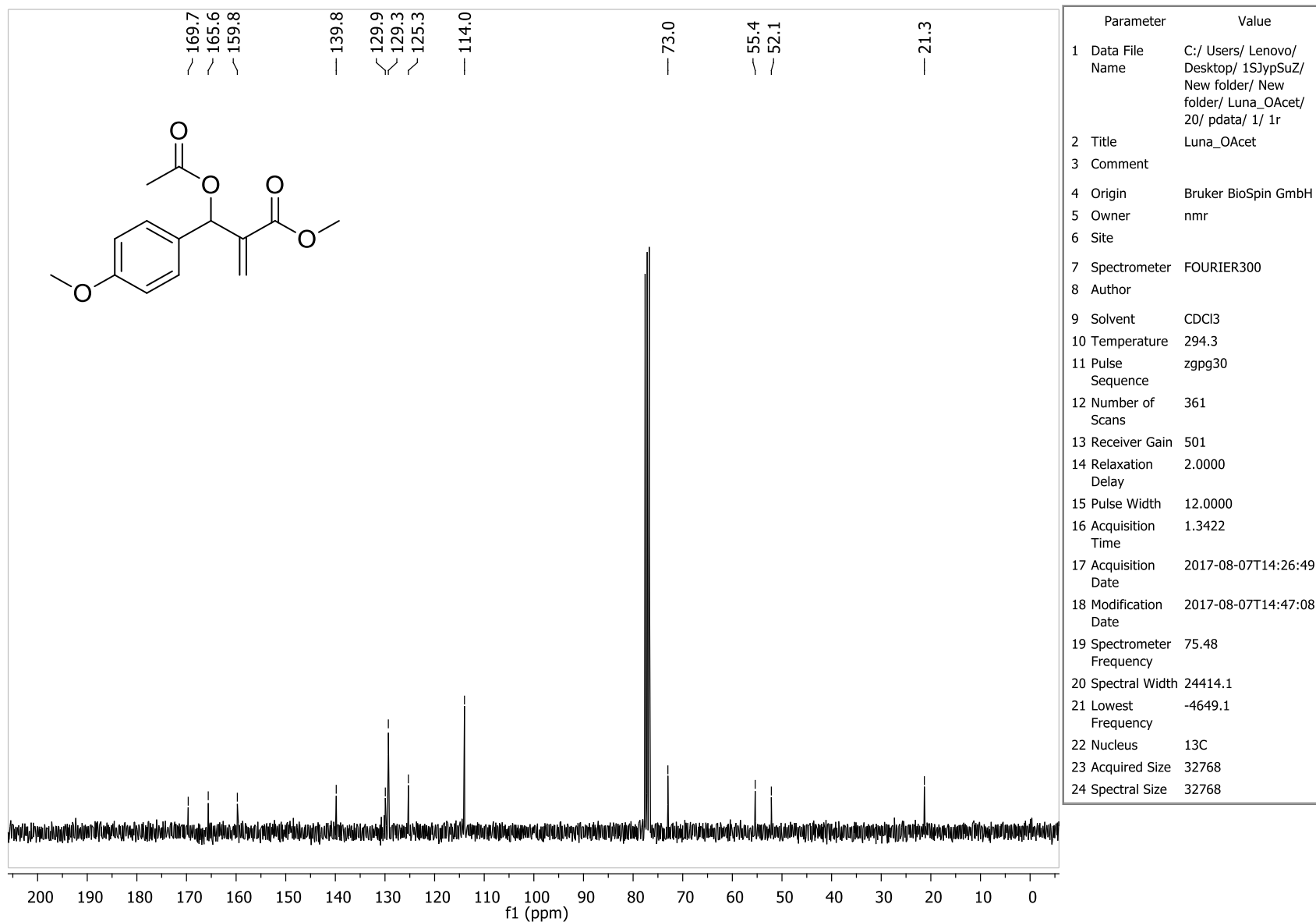
E18. Espectro de RMN de ¹³C (75,48 MHz, CDCl₃) do 2-metileno-3-acetoxi-3-fenilpropanoato de metila **6a**.



E19. Espectro de massas (EI, 70 eV) do 2-metileno-3-acetoxi-3-(*p*-metoxifenil)-propanoato de metila **6b**.

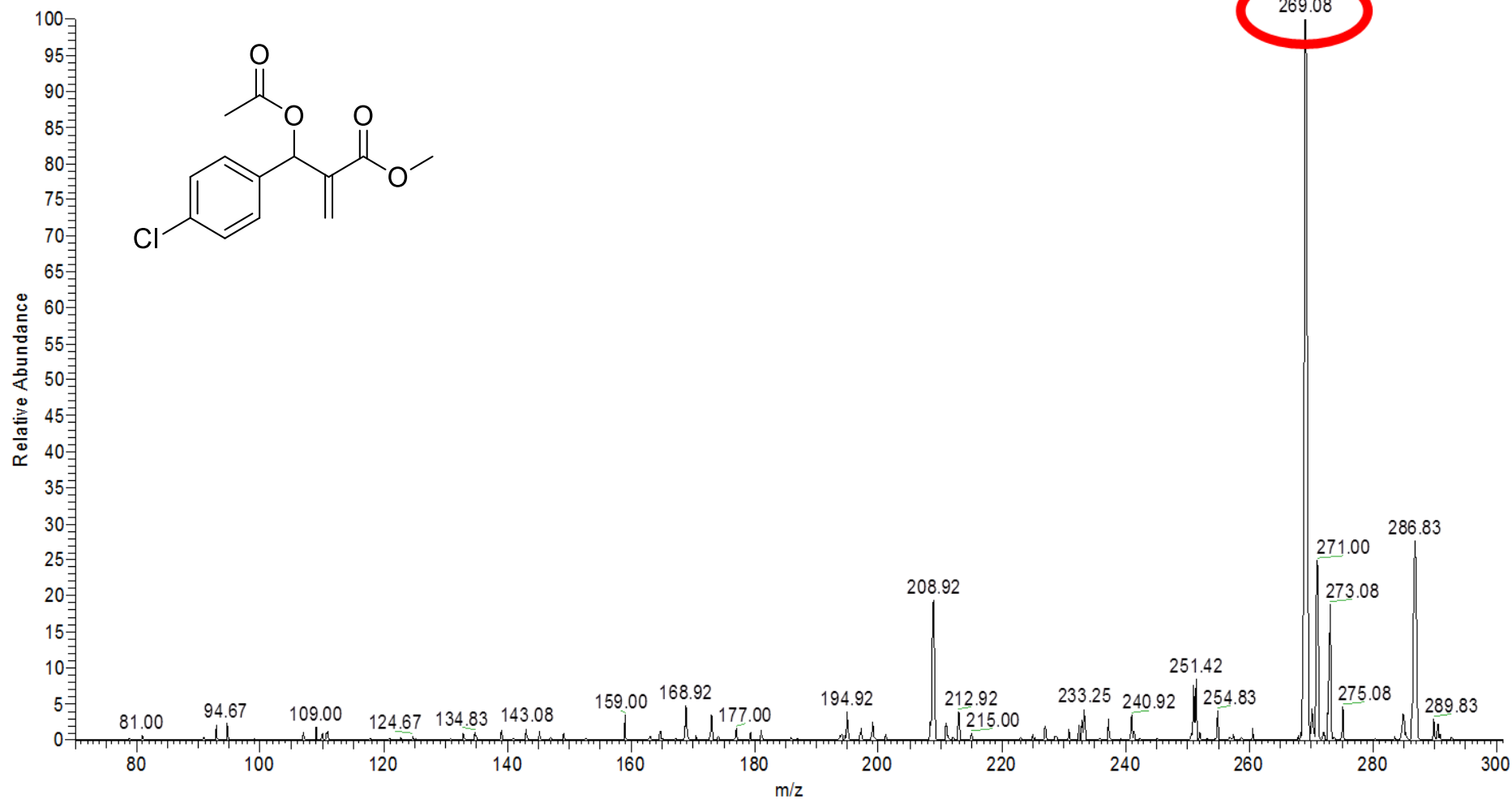


E20. Espectro de RMN de ¹H (300,19 MHz, CDCl₃) do 2-metileno-3-acetoxi-3-(*p*-metoxifenil)-propanoato de metila **6b**.

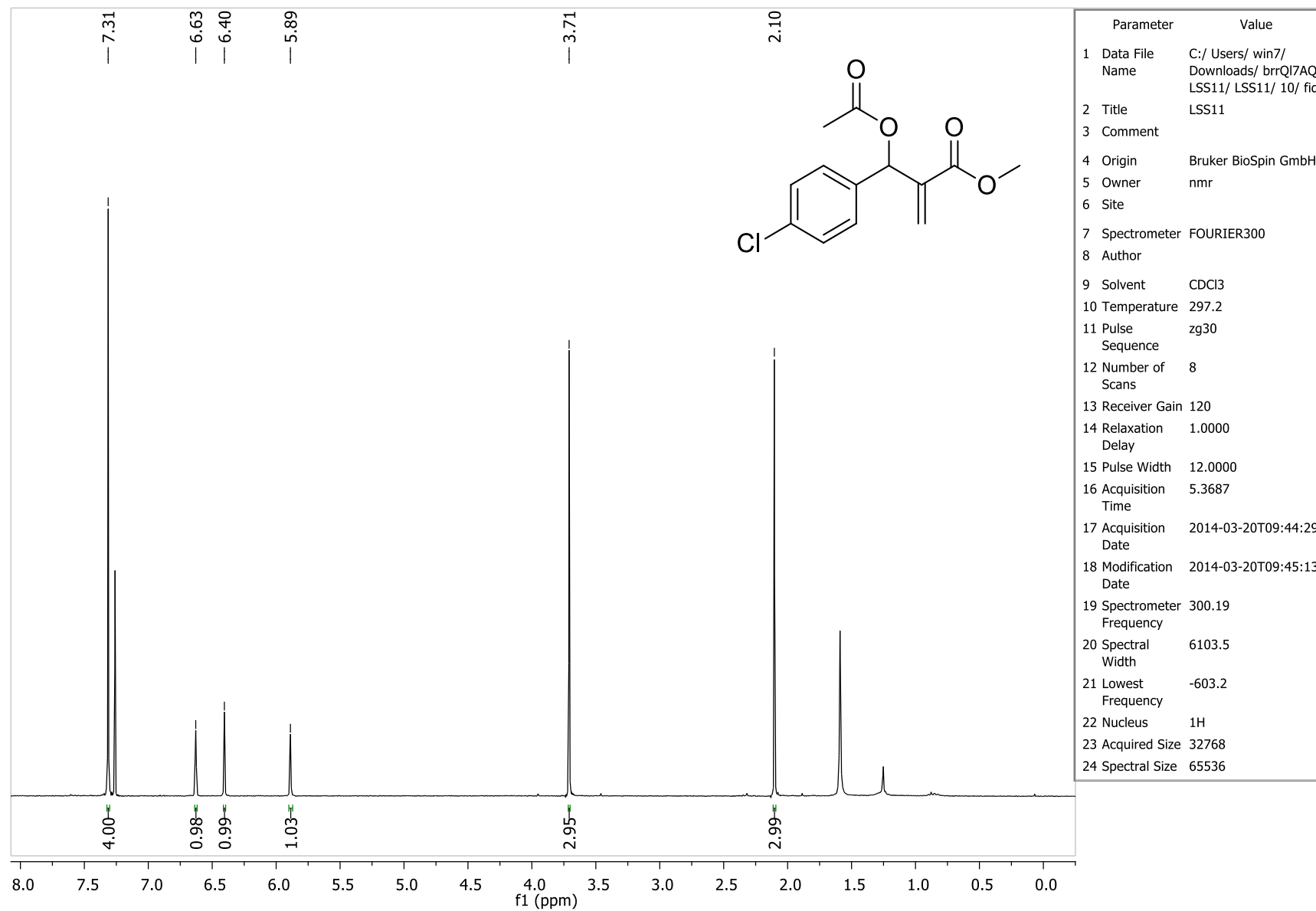


E21. Espectro de RMN de ¹³C (75,48 MHz, CDCl₃) do 2-metileno-3-acetoxi-3-(*p*-metoxifenil)-propanoato de metila **6b**.

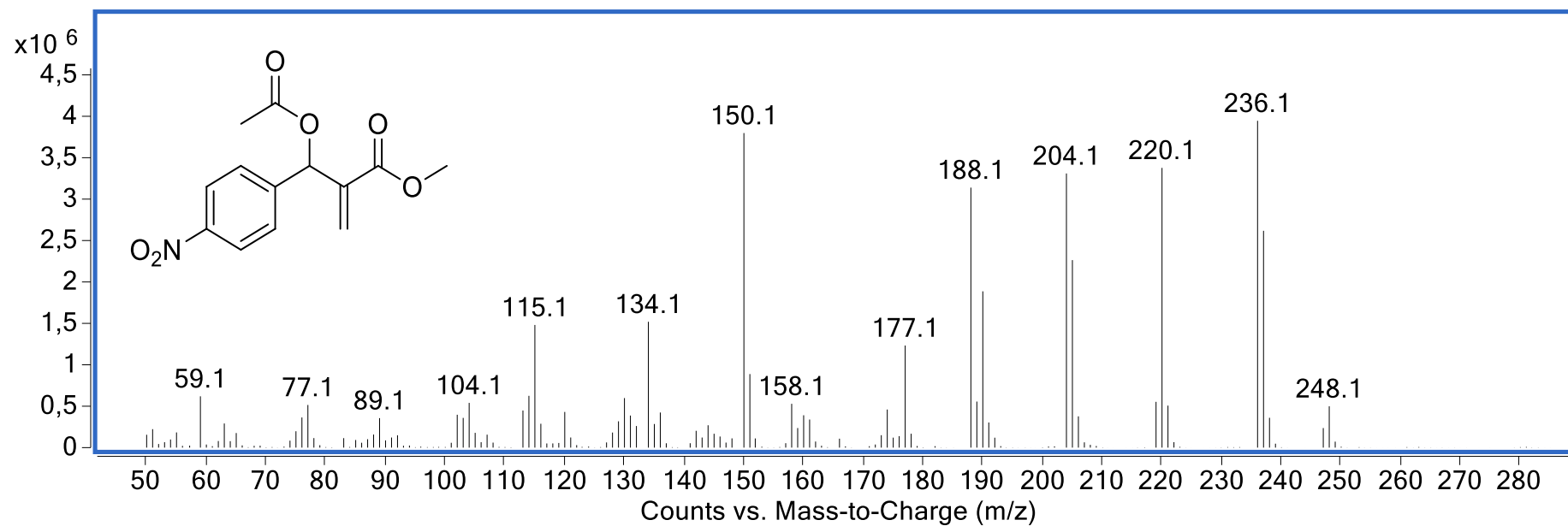
Luna_LSS11_pos_10ppm#866-891 RT: 5.81-6.36 AV: 26 NL: 3.90
T: ITMS + p ESI Full ms2 269.00@cid30.00 [70.00-1000.00]



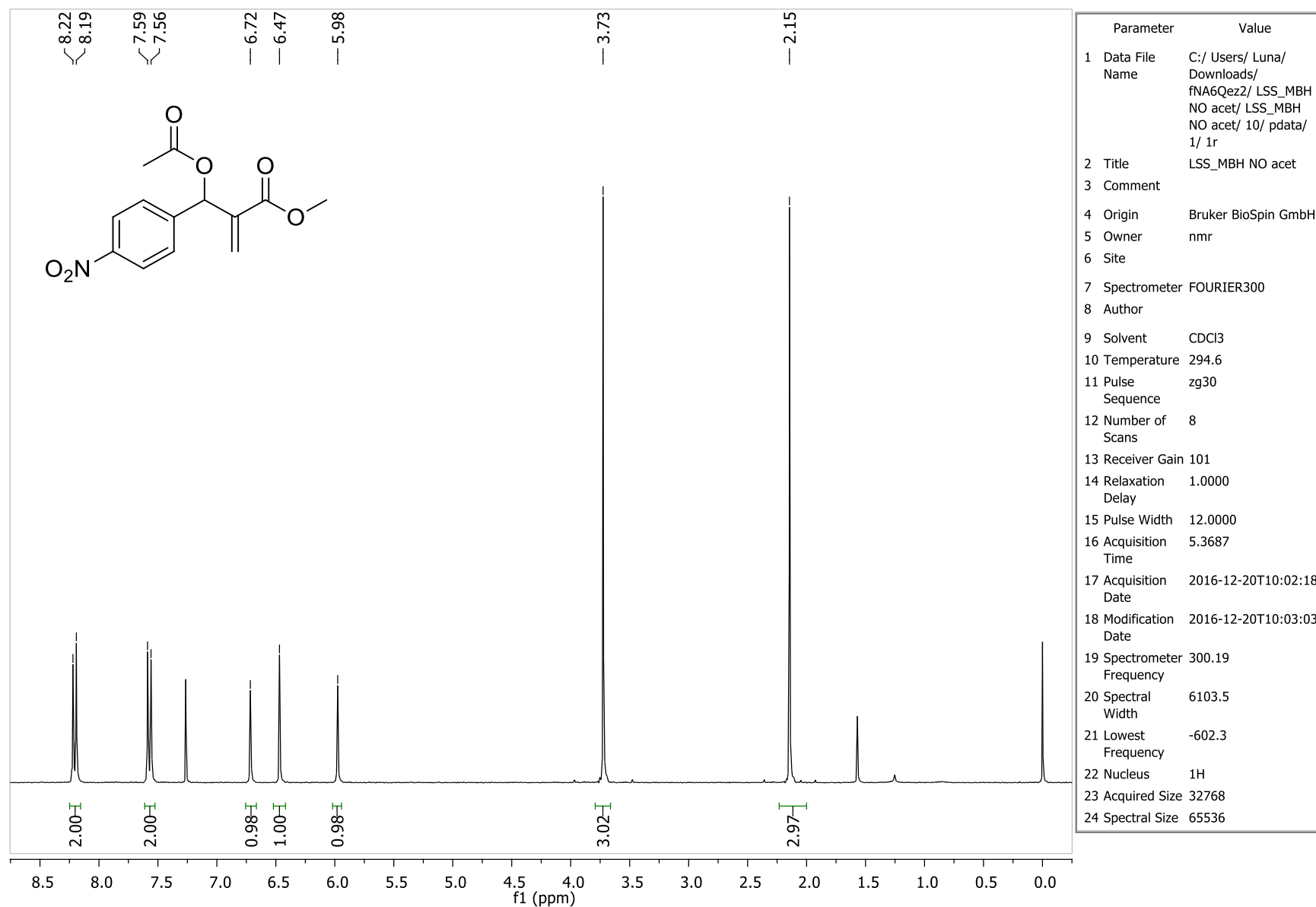
E22. Espectro de ESI(+)-MS do 2-metileno-3-acetoxi-3-(*p*-clorofenil)-propanoato de metila 6c.



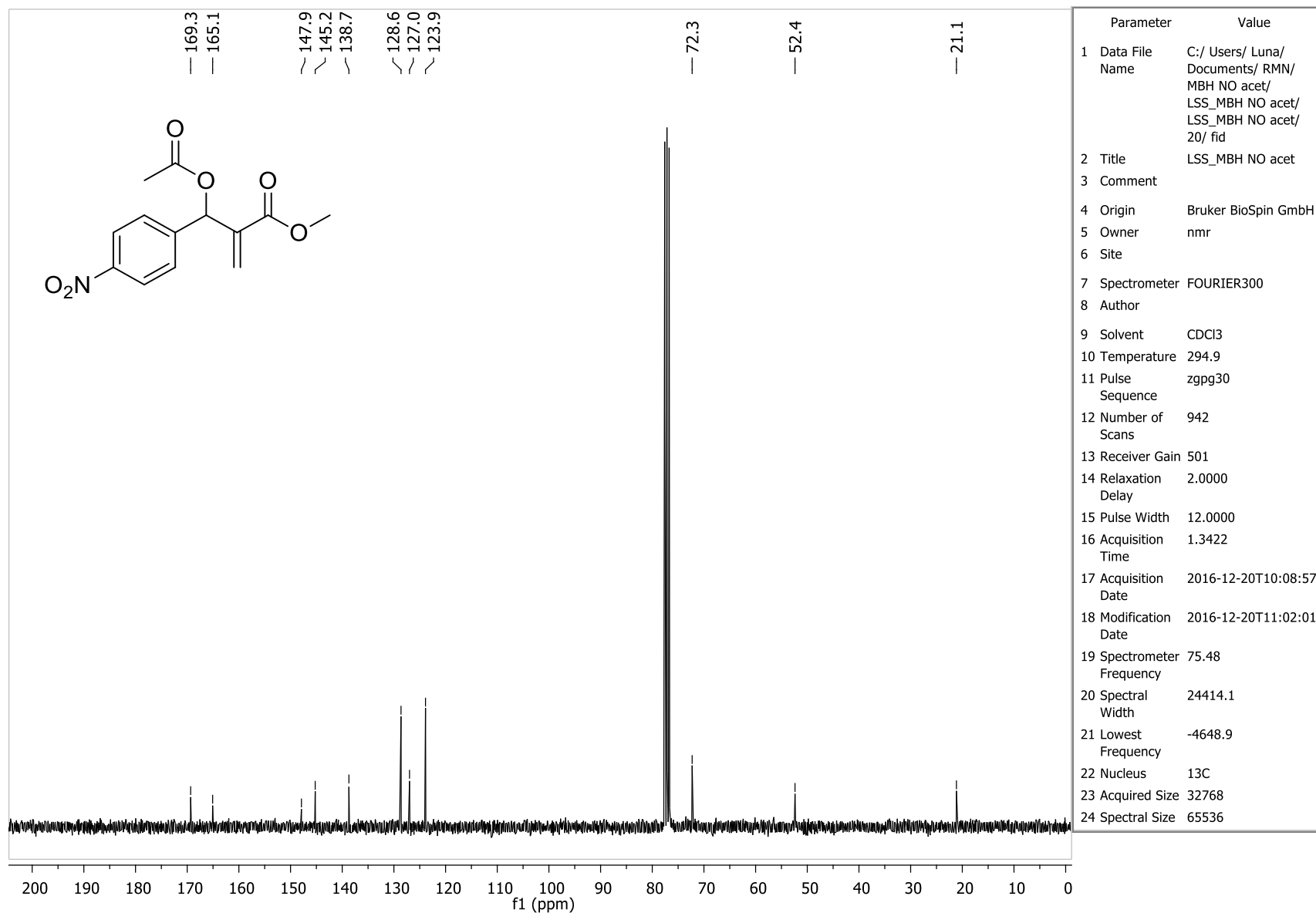
E23. Espectro de RMN de ¹H (300,19 MHz, CDCl₃) do 2-metileno-3-acetoxi-3-(*p*-clorofenil)-propanoato de metila **6c**.



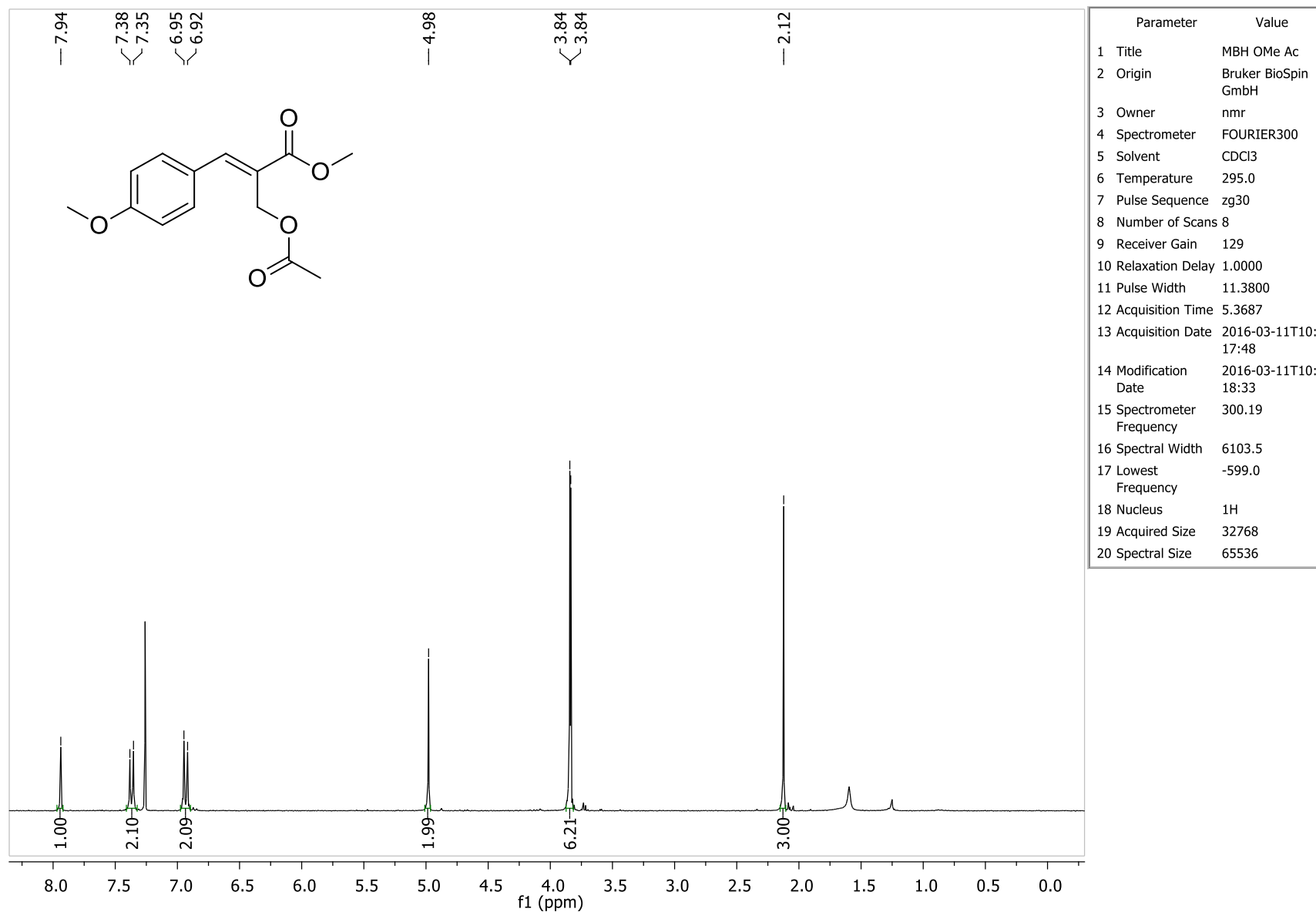
E24. Espectro de massas (EI, 70 eV) do 2-metileno-3-acetoxi-3-(*p*-nitrofenil)-propanoato de metila **6d**.



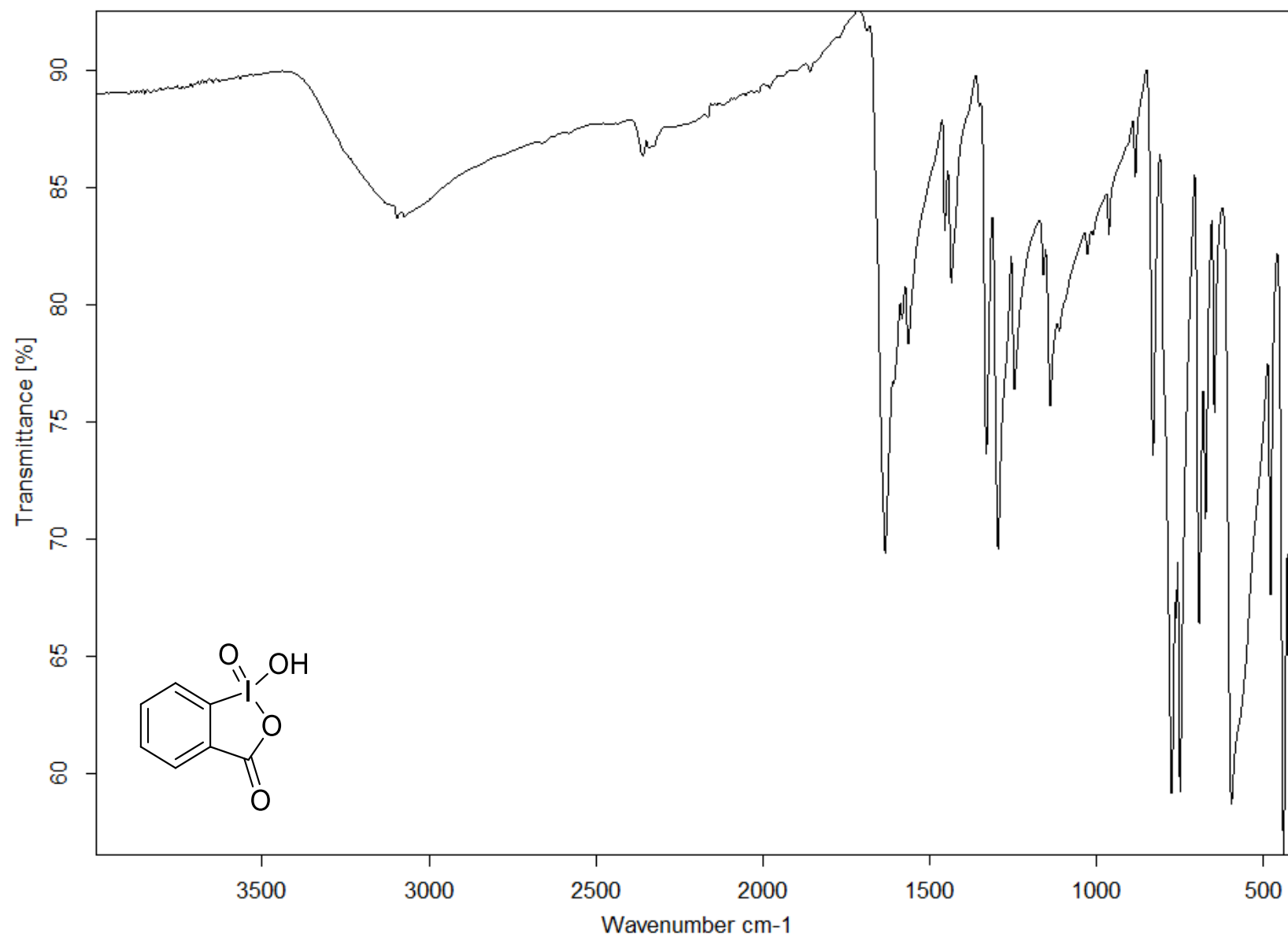
E25. Espectro de RMN de ¹H (300,19 MHz, CDCl₃) do 2-metileno-3-acetoxi-3-(p-nitrofenil)-propanoato de metila **6d**.



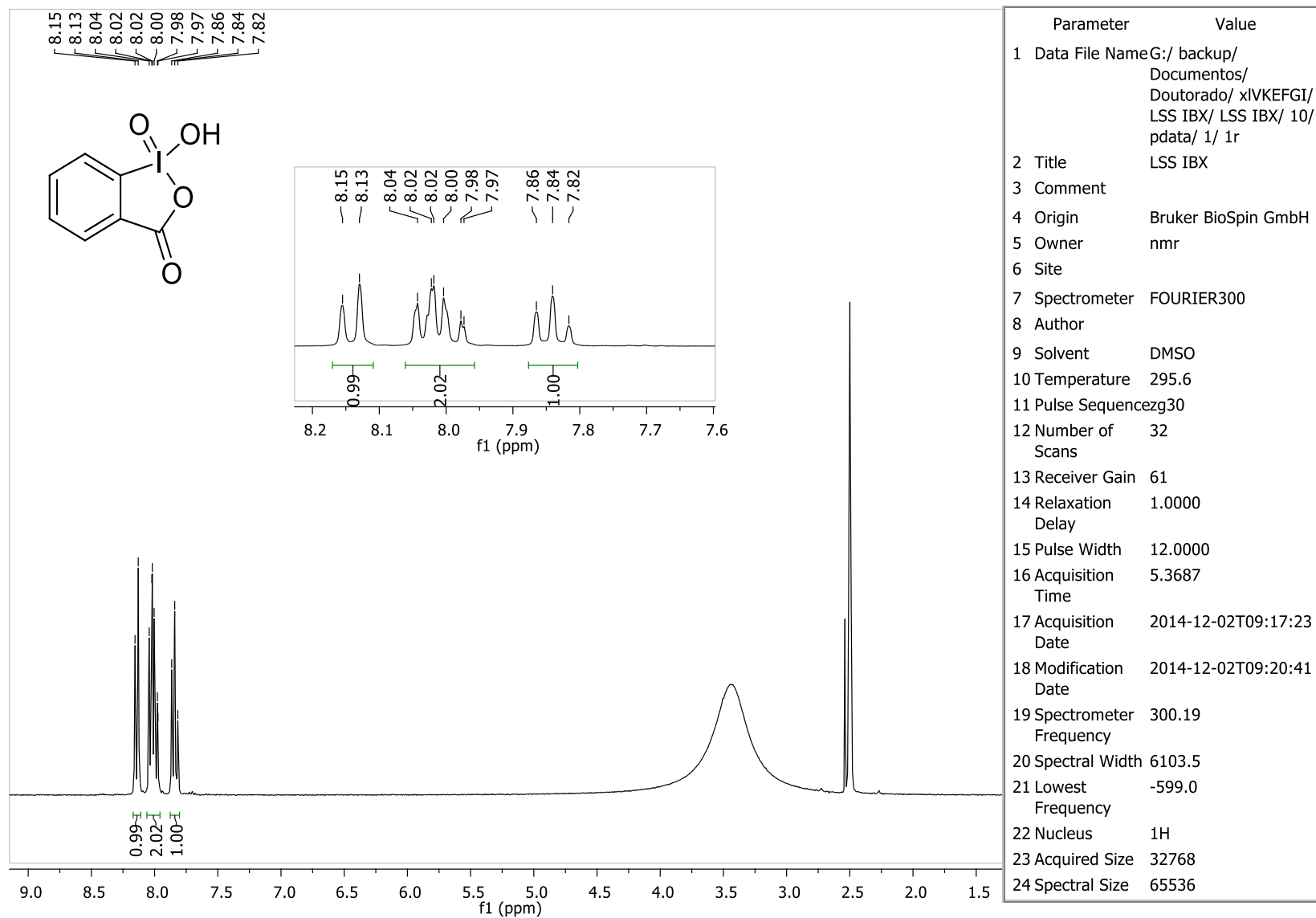
E26. Espectro de RMN de ^{13}C (75,48 MHz, CDCl_3) do 2-metileno-3-acetoxy-3-(*p*-nitrofenil)-propanoato de metila **6d**.



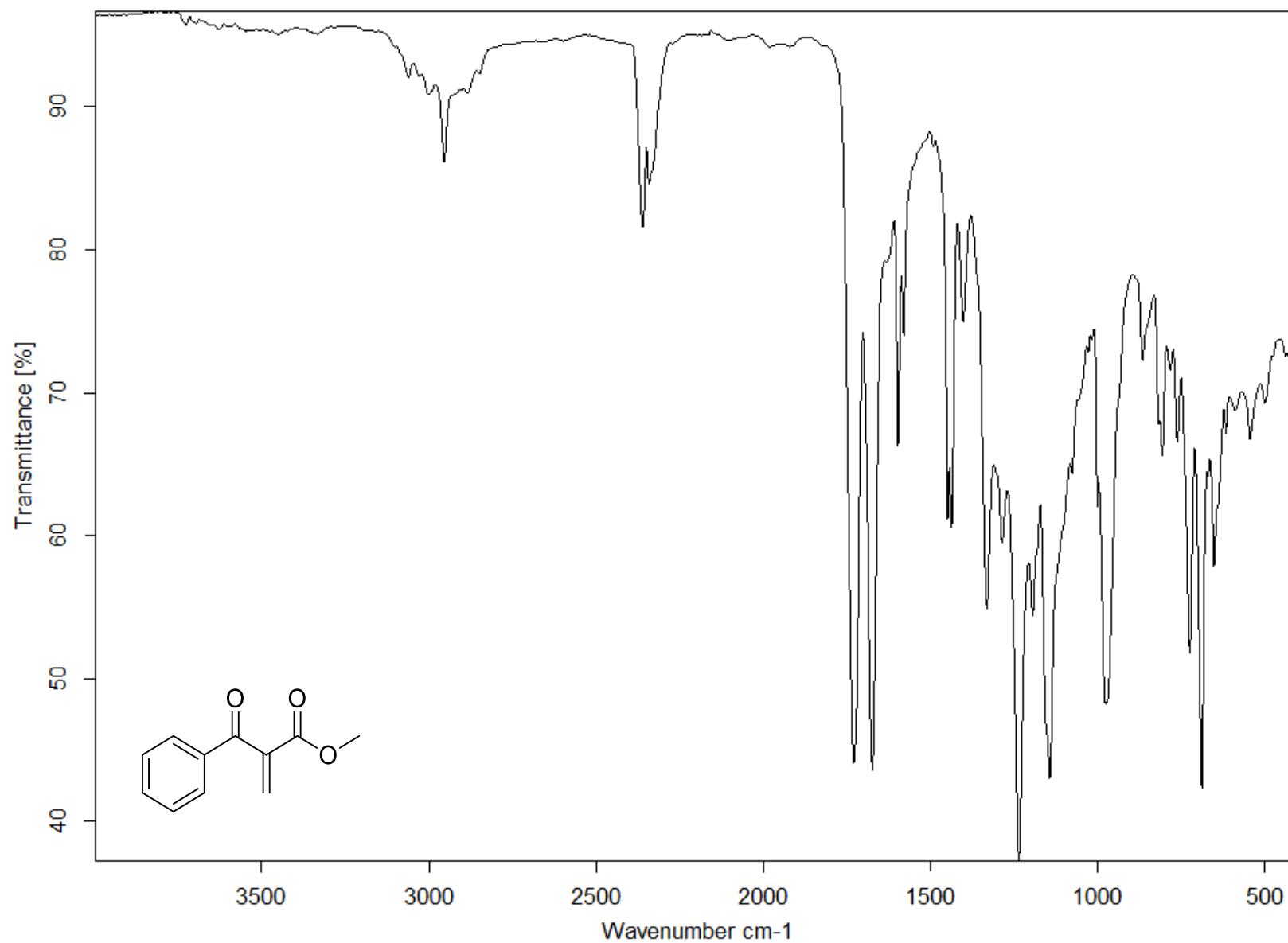
E27. Espectro de RMN de ¹H (300,19 MHz, CDCl₃) do (E)-2-metil-2-acetoxi-3-(p-metoxifenil)-2-propenoato de metila **7b**.



E28. Espectro no IV do ácido 2-iodoxibenzóico (IBX).



E29. Espectro de RMN de ¹H (300,19 MHz, CDCl₃) do ácido 2-iodoxibenzóico (IBX).



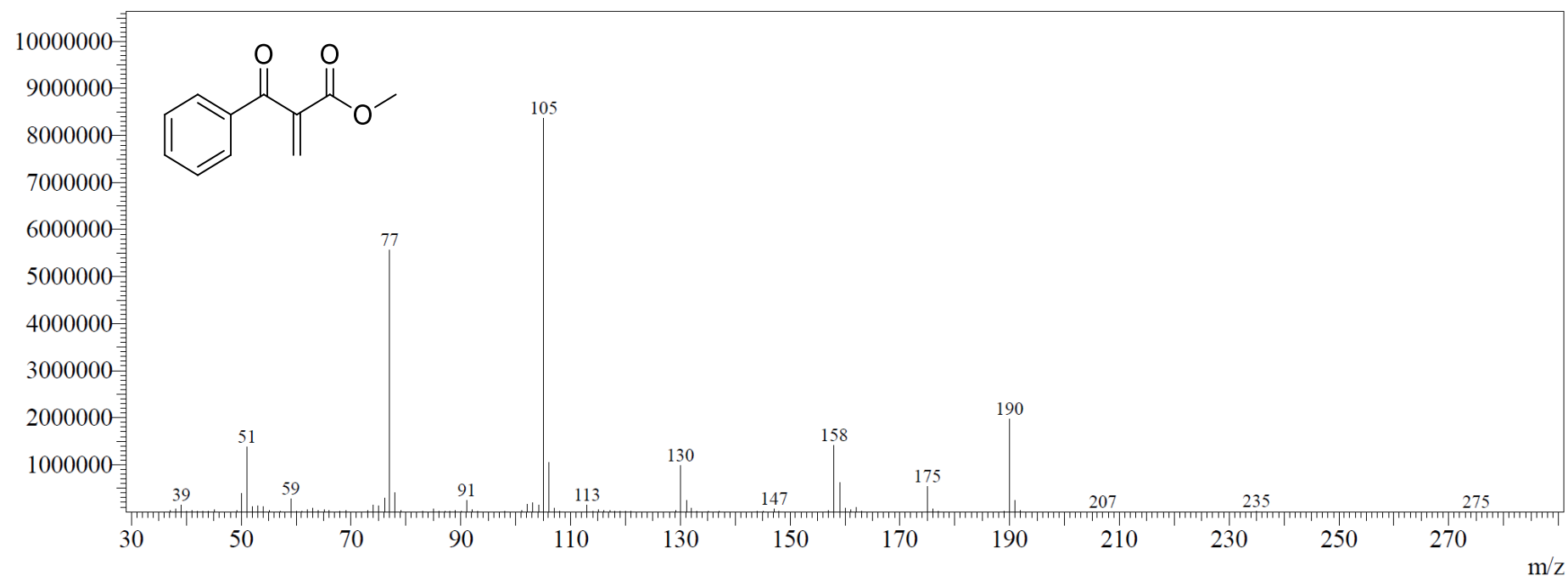
E30. Espectro no IV do 2-metileno-3-oxo-3-fenilpropanoato de metila **9a**.

Line#:1 R.Time:7.905(Scan#:982)

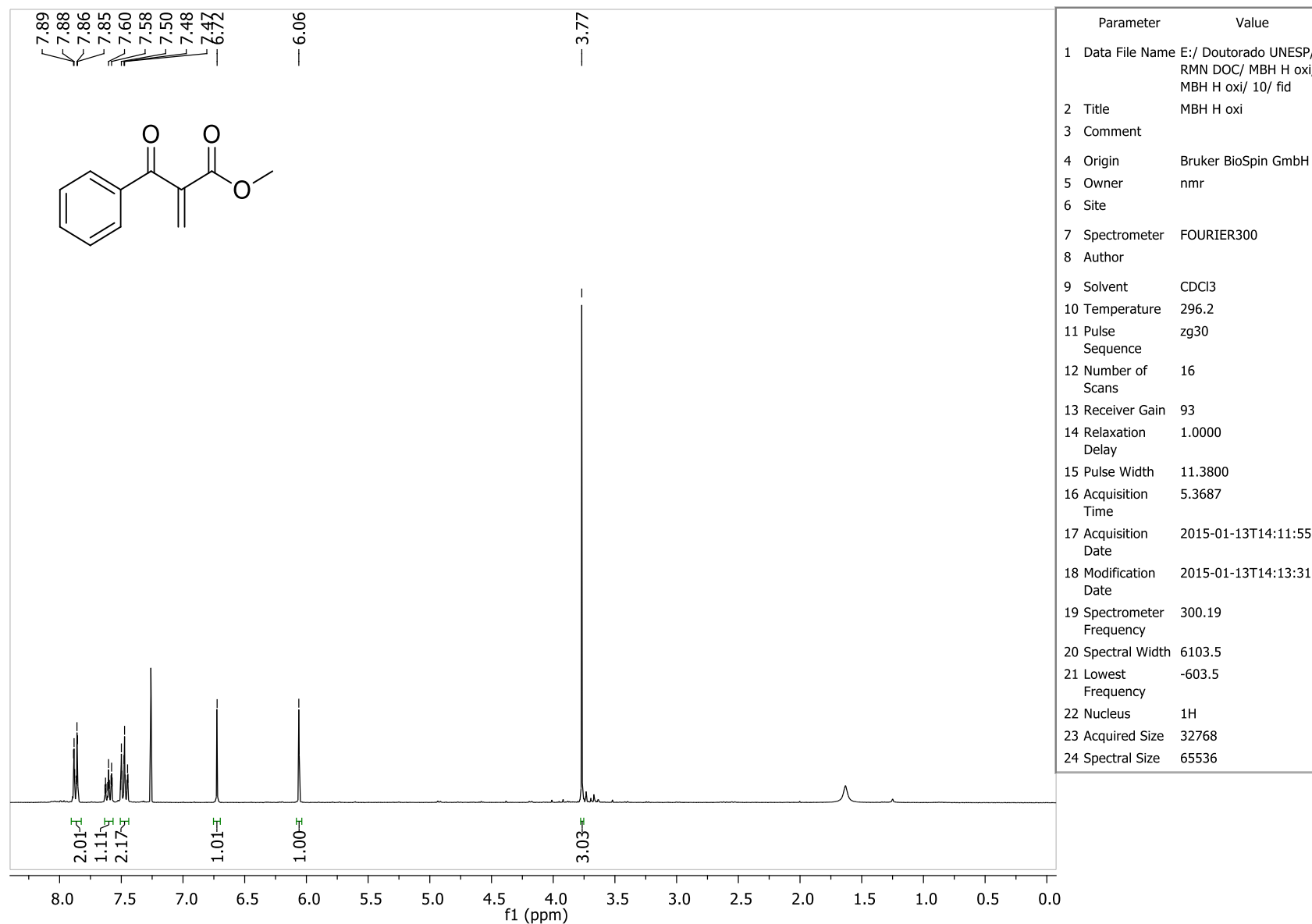
MassPeaks:115

RawMode:Single 7.905(982) BasePeak:105.10(8362682)

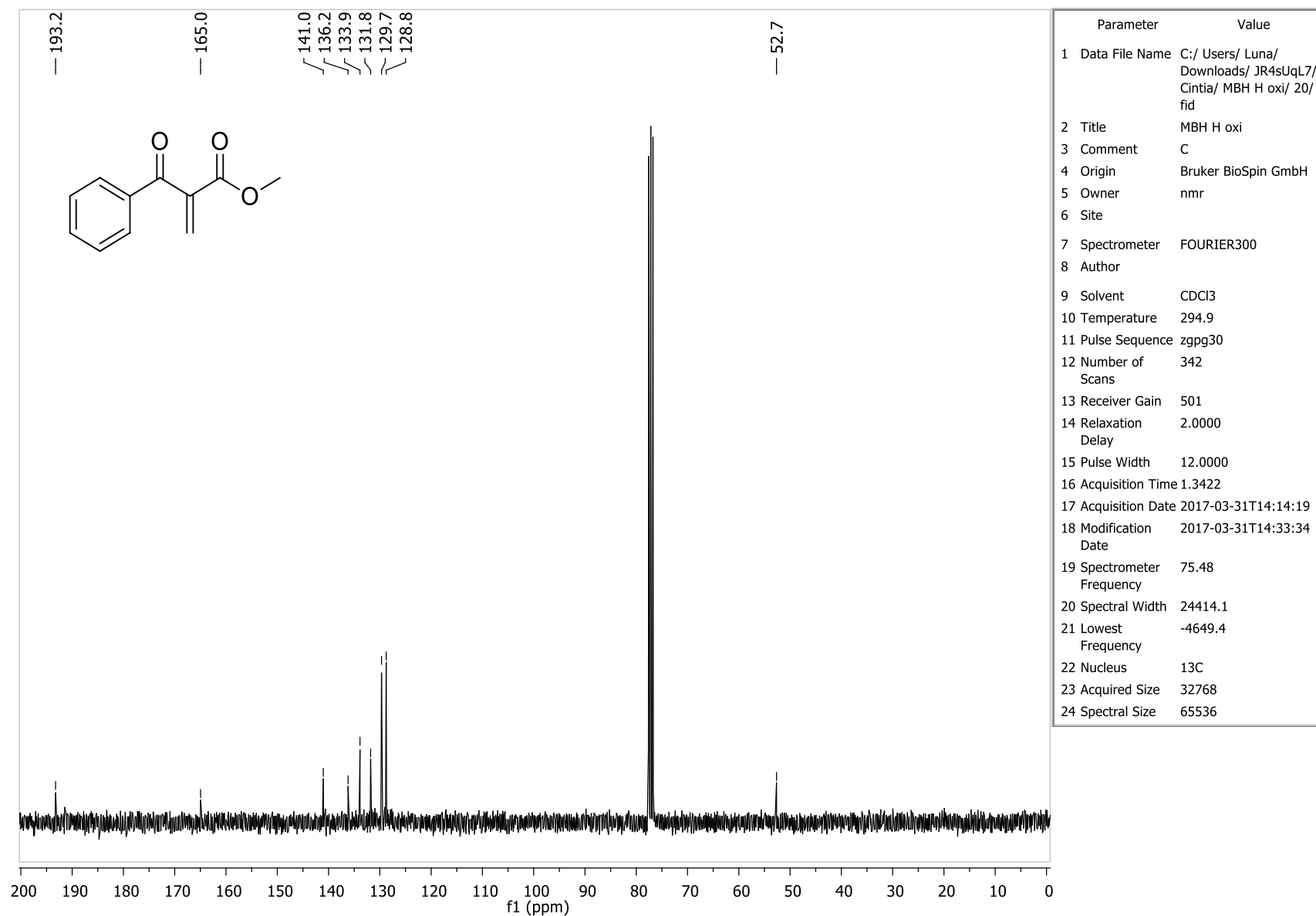
BG Mode:None Group 1 - Event 1



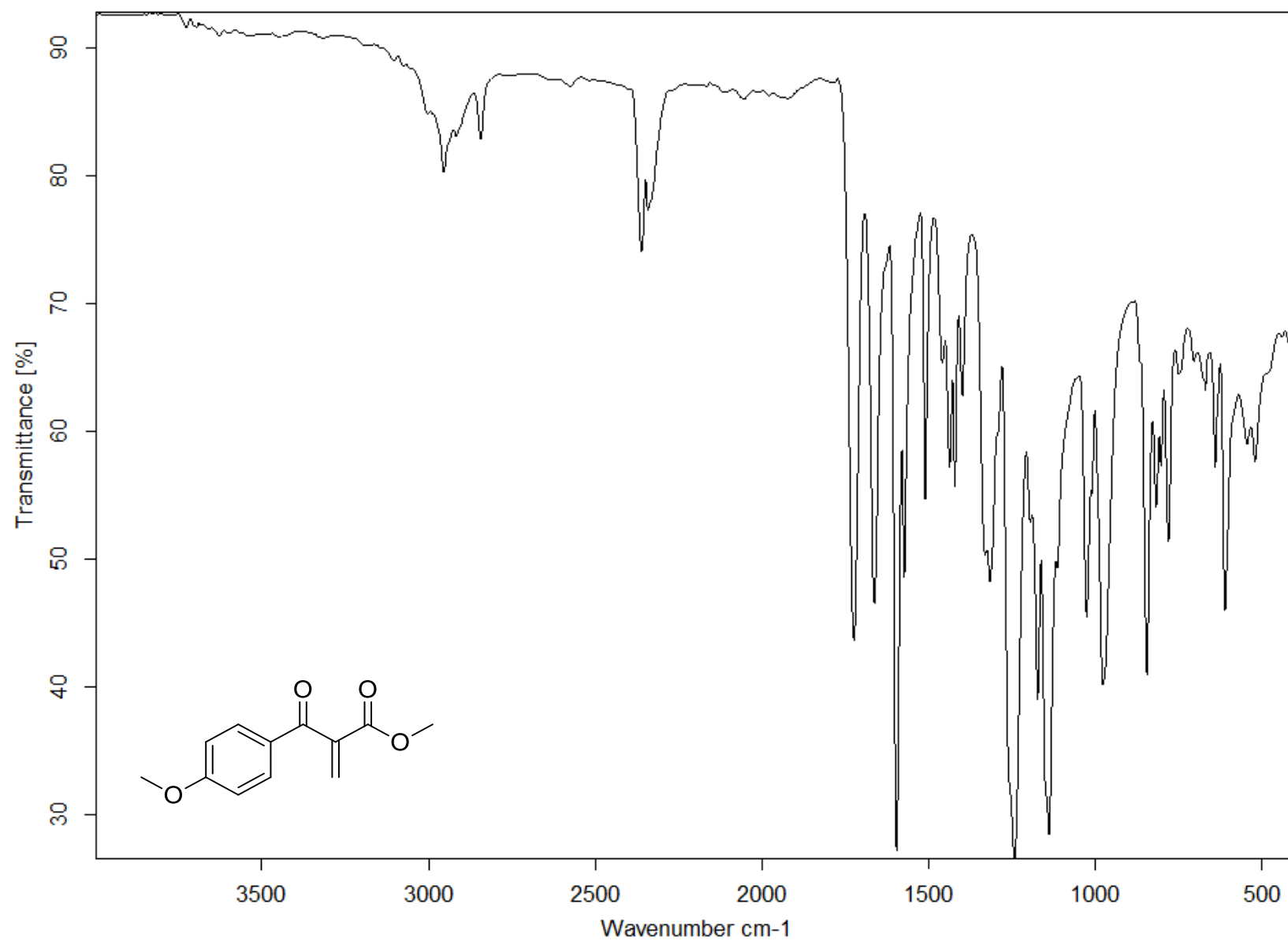
E31. Espectro de massas (EI, 70 eV) do 2-metileno-3-oxo-3-fenilpropanoato de metila **9a**.



E32. Espectro de RMN de ¹H (300,19 MHz, CDCl₃) do 2-metileno-3-oxo-3-fenilpropanoato de metila **9a**.



E33. Espectro de RMN de ¹³C (75,48 MHz, CDCl₃) do 2-metileno-3-oxo-3-fenilpropanoato de metila **9a**.



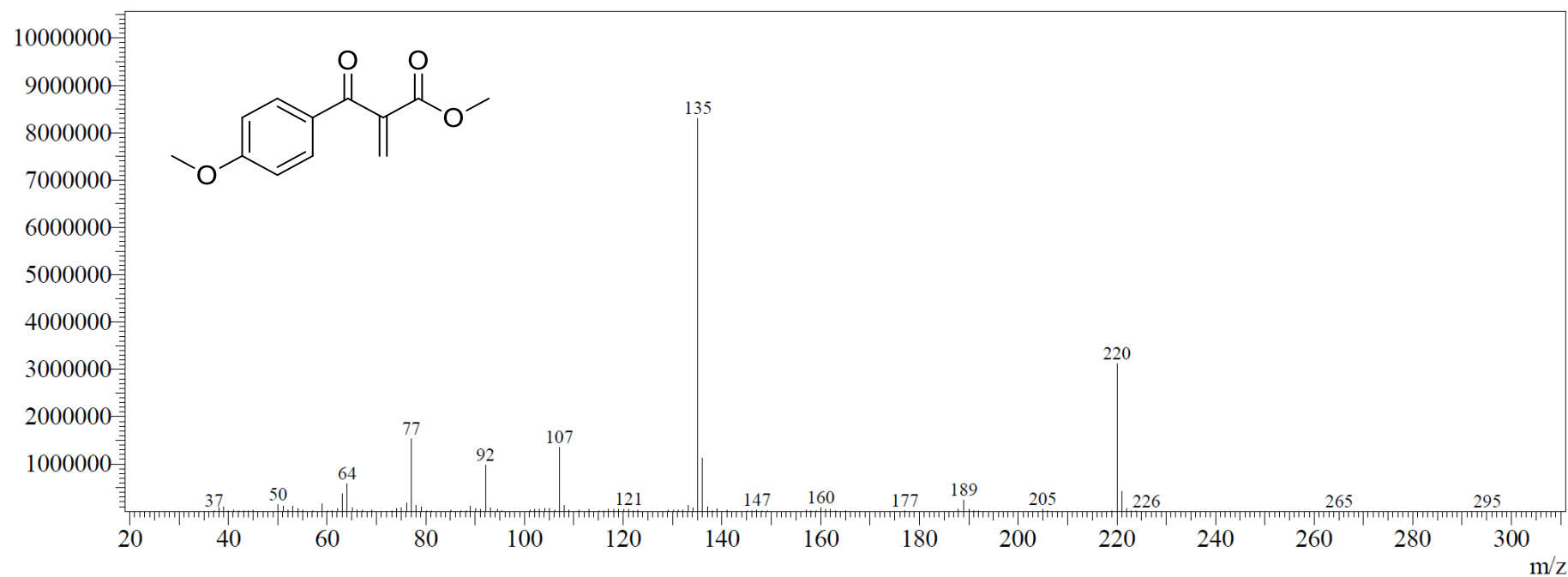
E34. Espectro no IV do 2-metileno-3-oxo-3-(*p*-metoxifenil)-propanoato de metila **9b**.

Line#:1 R.Time:9.105(Scan#:1222)

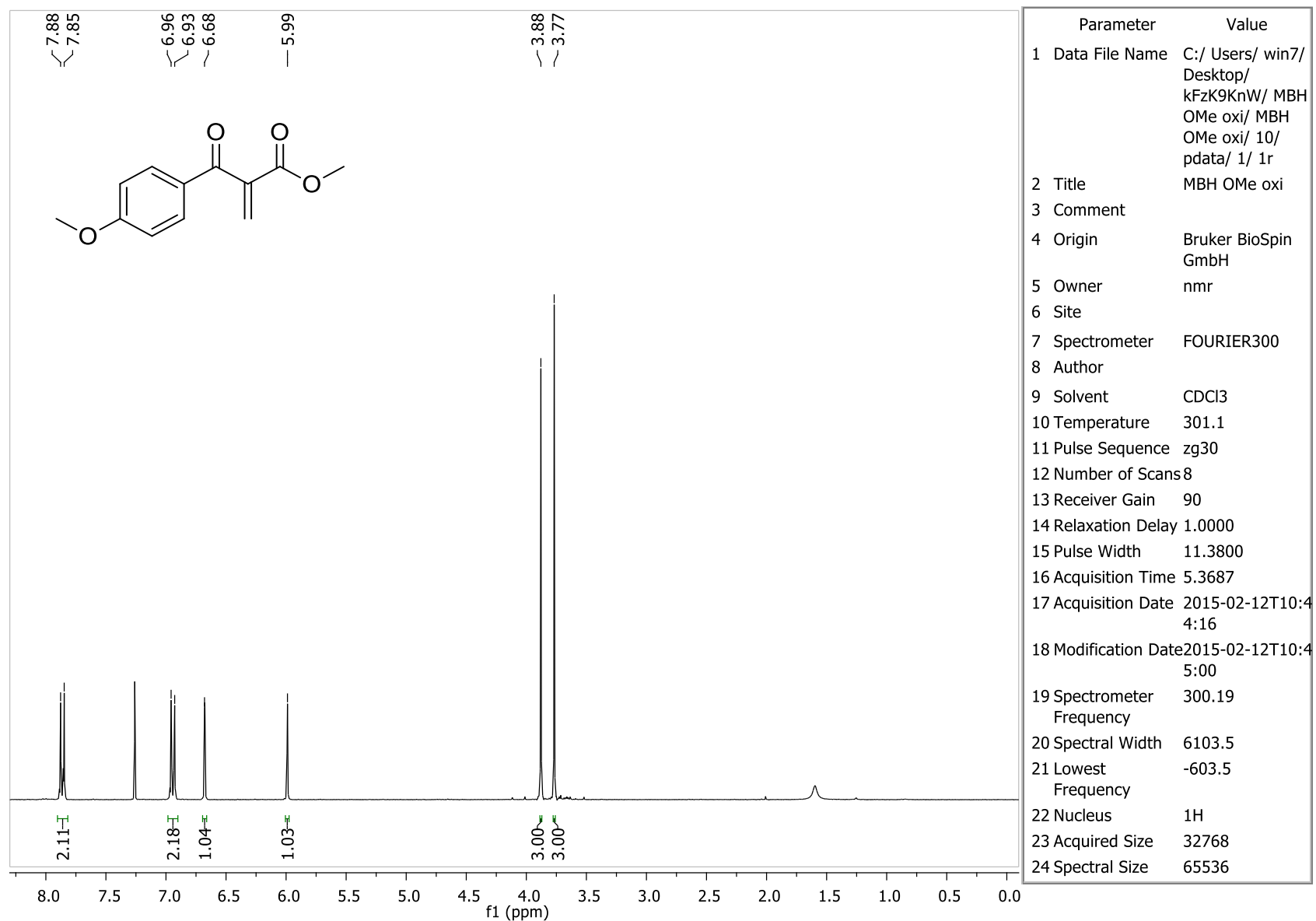
MassPeaks:140

RawMode:Single 9.105(1222) BasePeak:135.10(8297945)

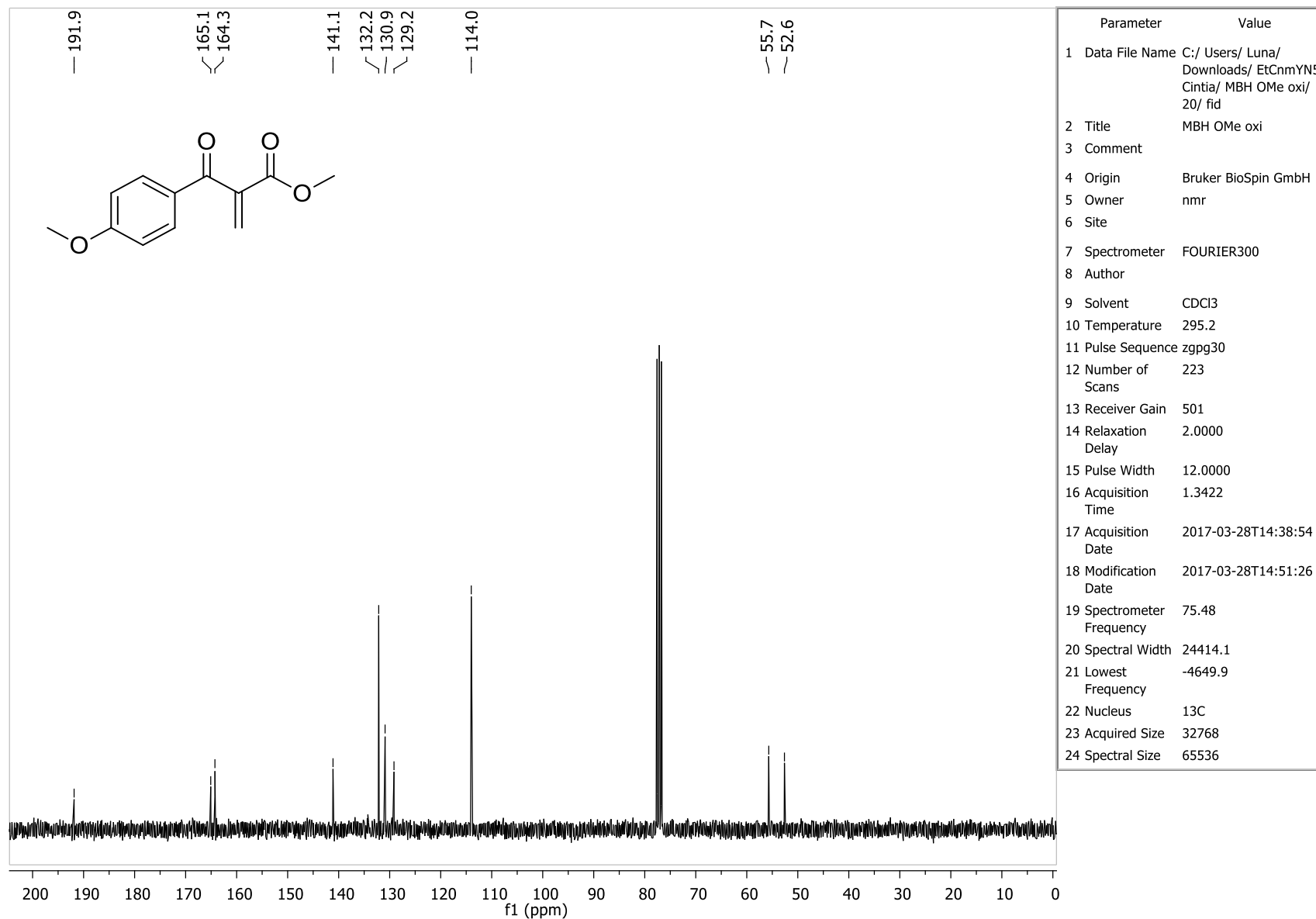
BG Mode:None Group 1 - Event 1



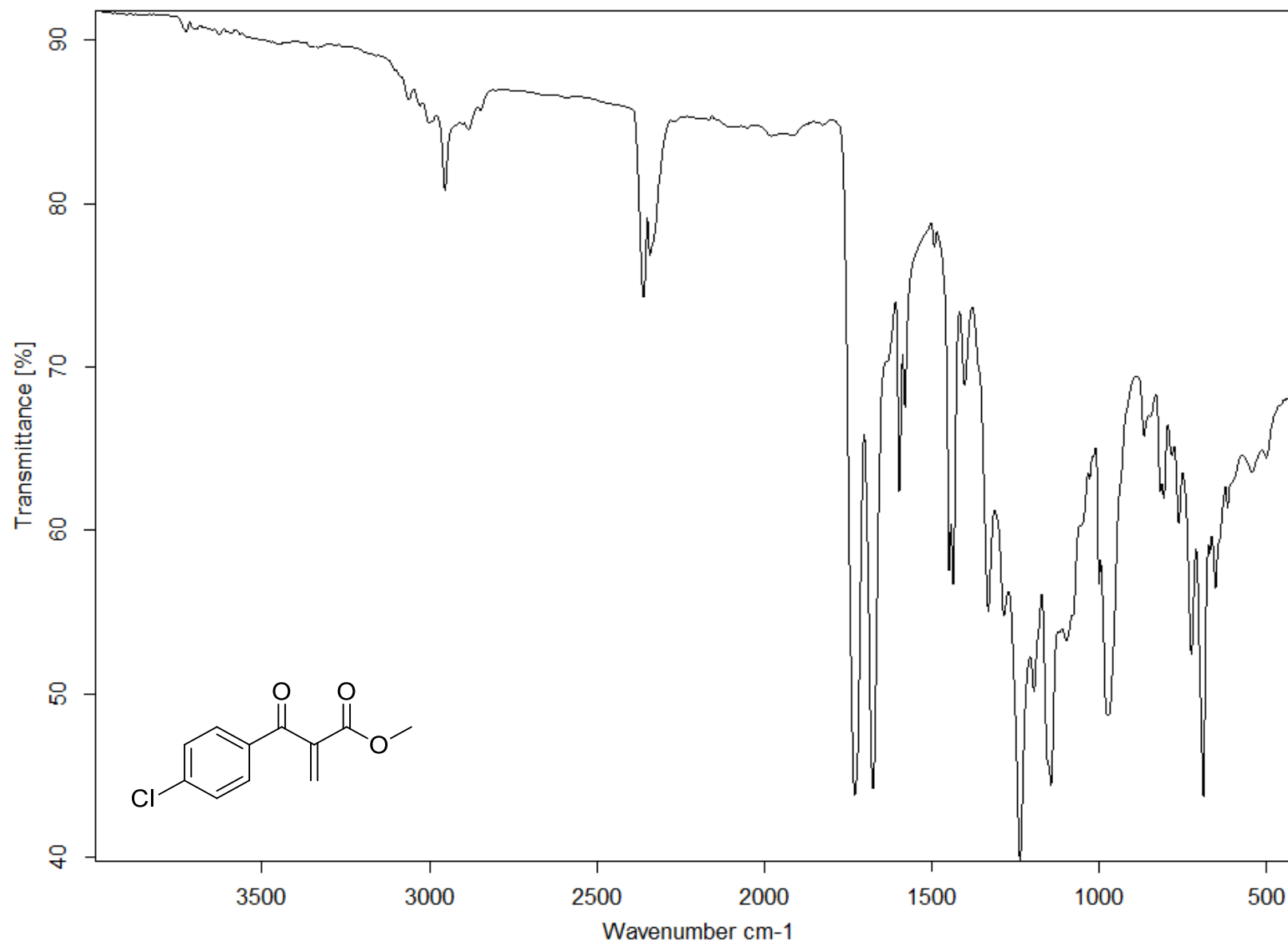
E35. Espectro de massas (EI, 70 eV) do 2-metileno-3-oxo-3-(*p*-metoxifenil)-propanoato de metila **9b**.



E36. Espectro de RMN de ¹H (300,19 MHz, CDCl₃) do 2-metileno-3-oxo-3-(*p*-metoxifenil)-propanoato de metila **9b**.



E37. Espectro de RMN de ¹³C (75,48 MHz, CDCl₃) do 2-metileno-3-oxo-3-(*p*-metoxifenil)-propanoato de metila **9b**.



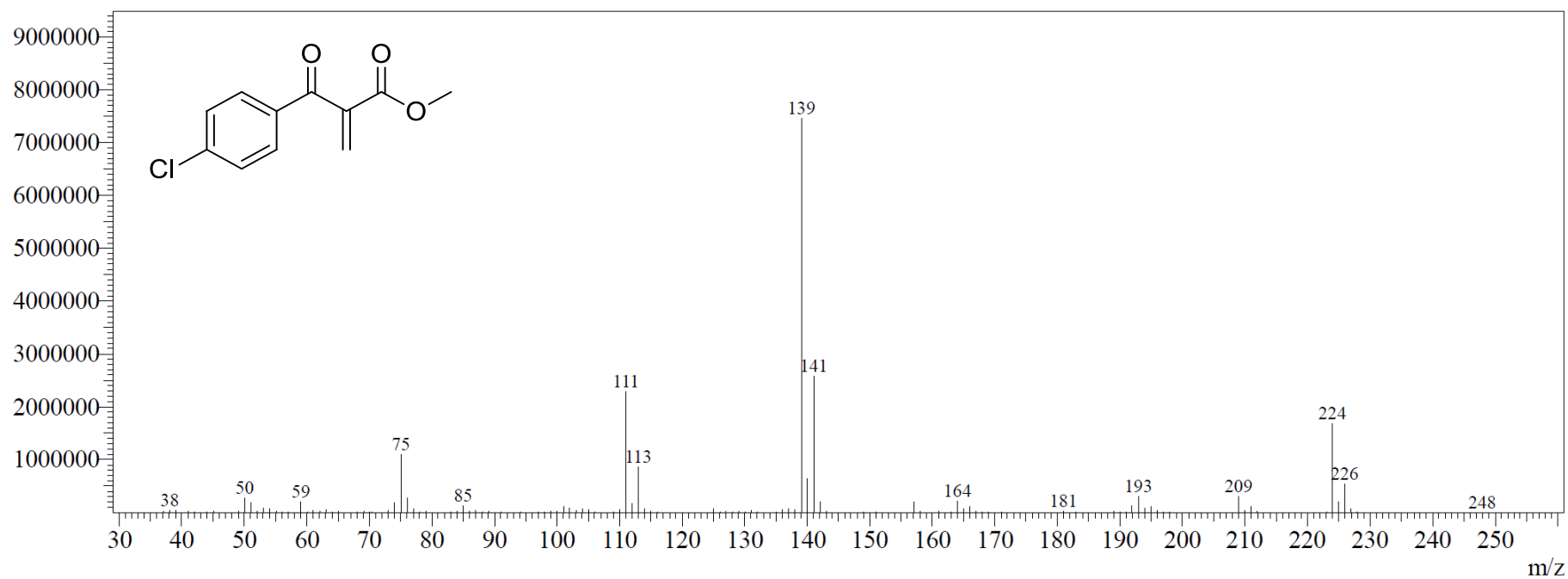
E38. Espectro no IV do 2-metileno-3-oxo-3-(*p*-clorofenil)-propanoato de metila **9c**.

Line#:1 R.Time:8.580(Scan#:1117)

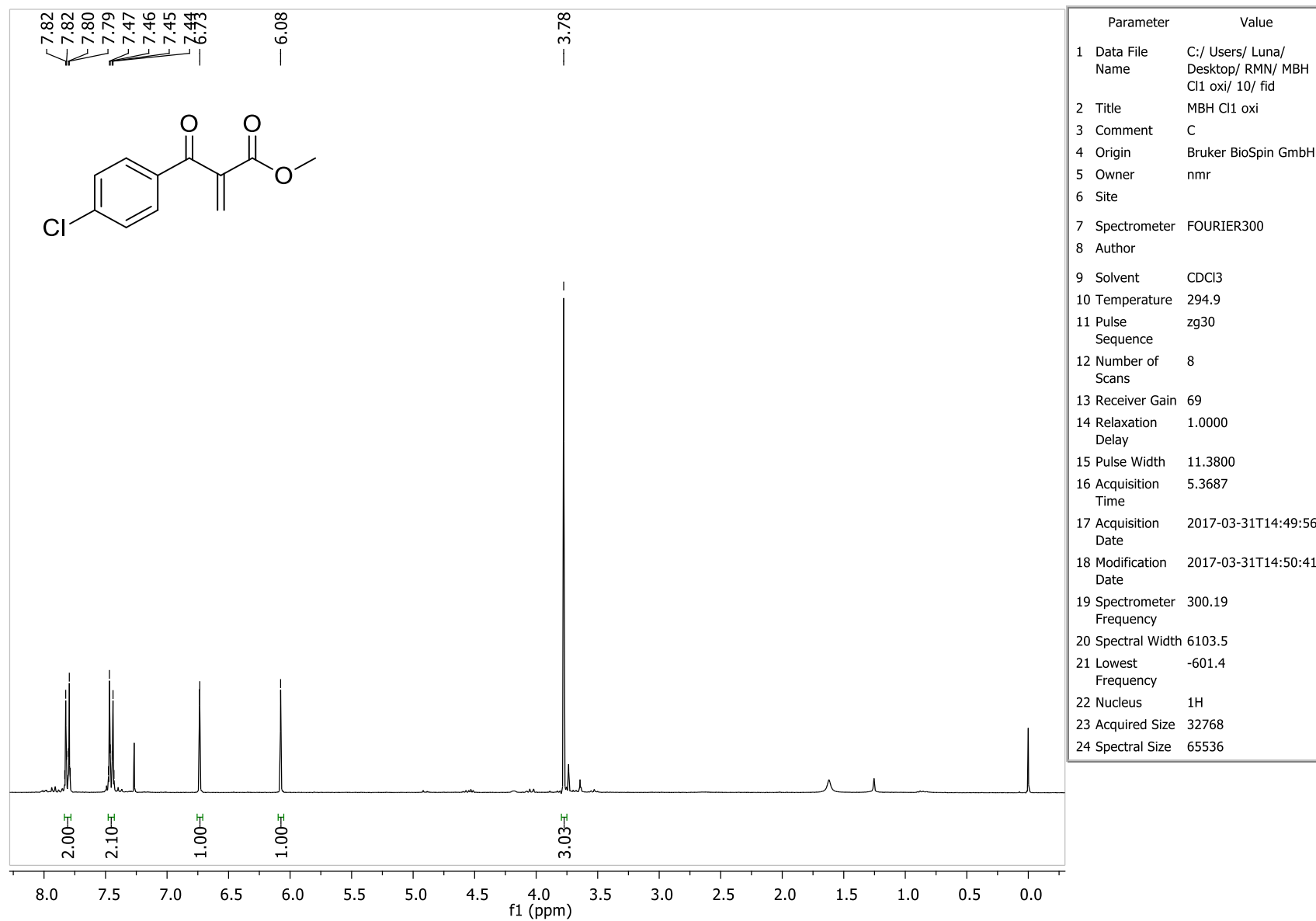
MassPeaks:159

RawMode:Single 8.580(1117) BasePeak:139.05(7454551)

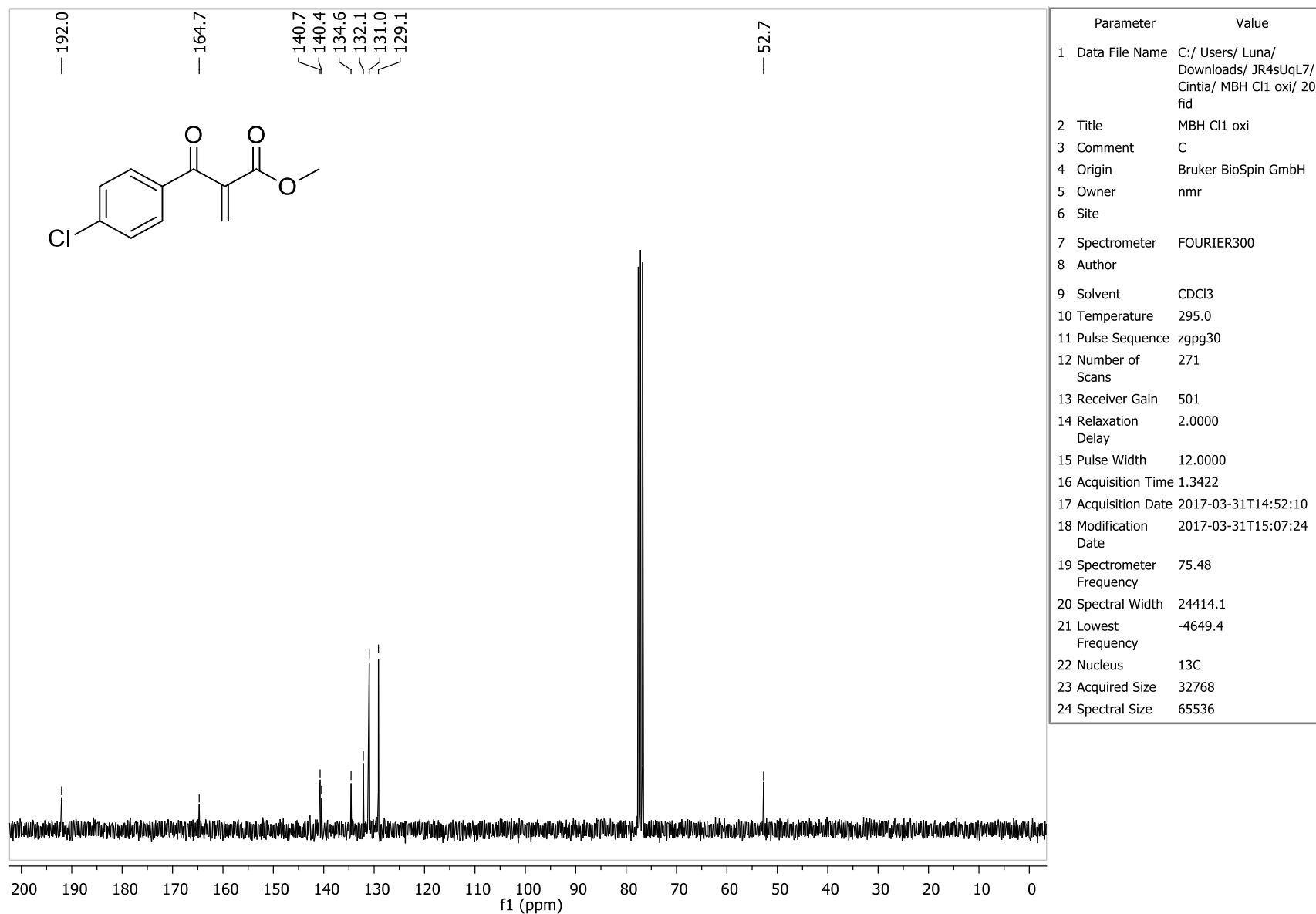
BG Mode:None Group 1 - Event 1



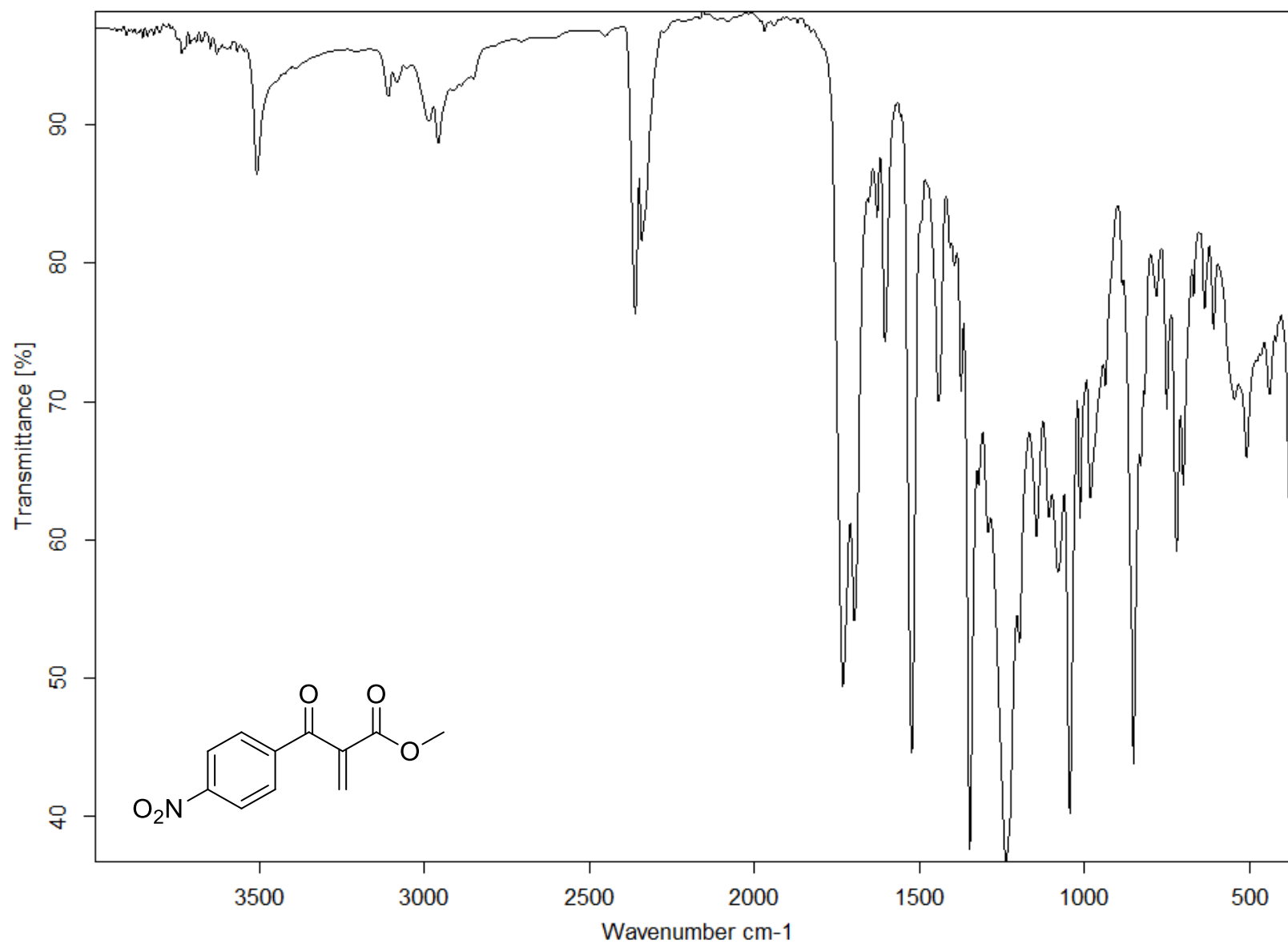
E39. Espectro de massas (EI, 70 eV) do 2-metileno-3-oxo-3-(*p*-clorofenil)-propanoato de metila **9c**.



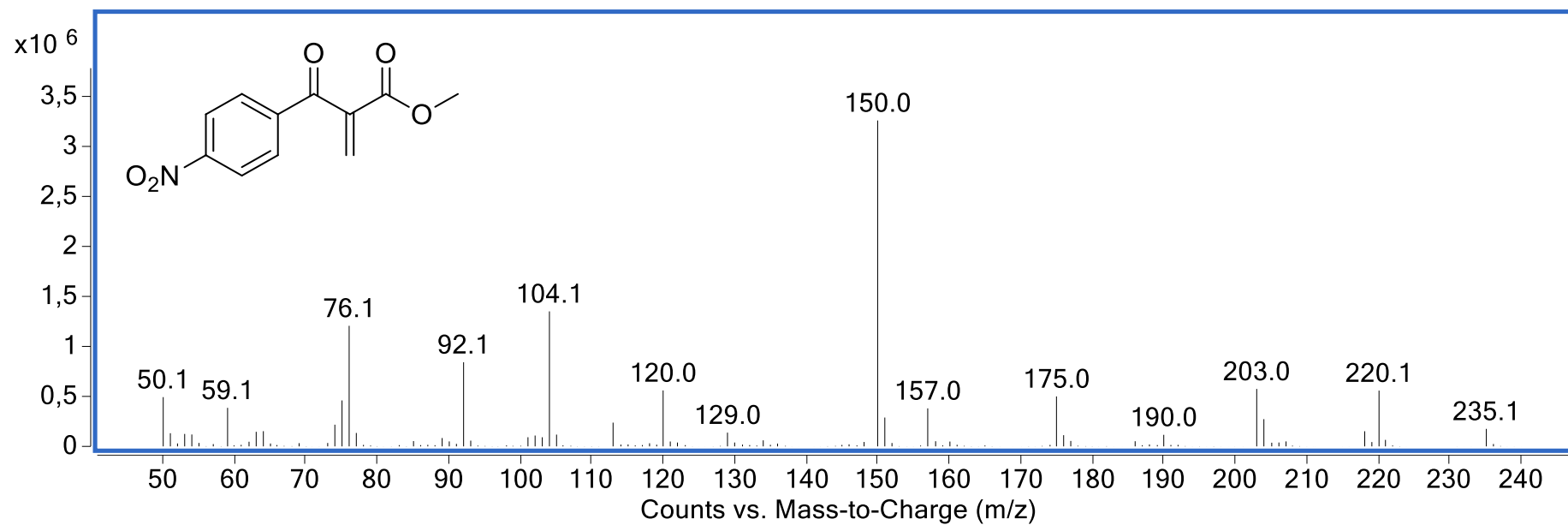
E40. Espectro de RMN de ¹H (300,19 MHz, CDCl₃) do 2-metileno-3-oxo-3-(*p*-clorofenil)-propanoato de metila **9c**.



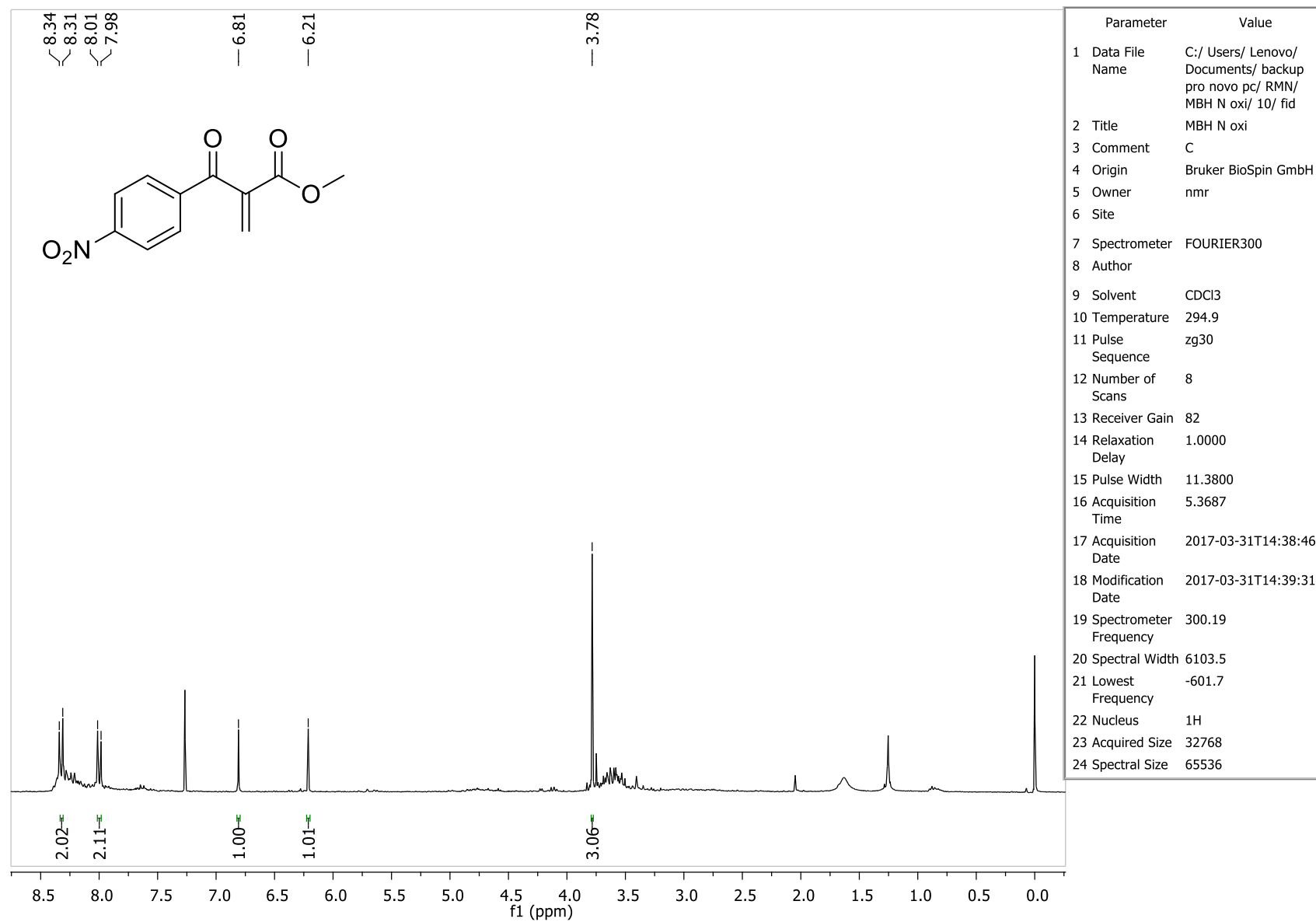
E41. Espectro de RMN de ¹³C (75,48 MHz, CDCl₃) do 2-metileno-3-oxo-3-(*p*-clorofenil)-propanoato de metila **9c**.



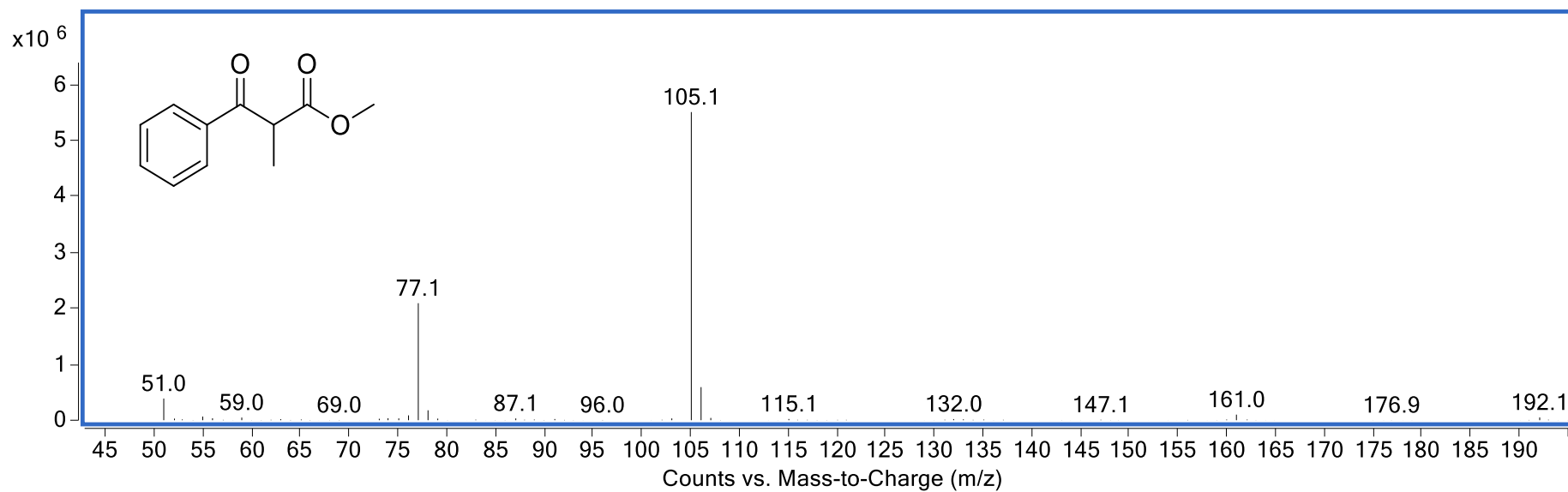
E42. Espectro no IV do 2-metileno-3-oxo-3-(*p*-nitrofenil)-propanoato de metila **9d**.



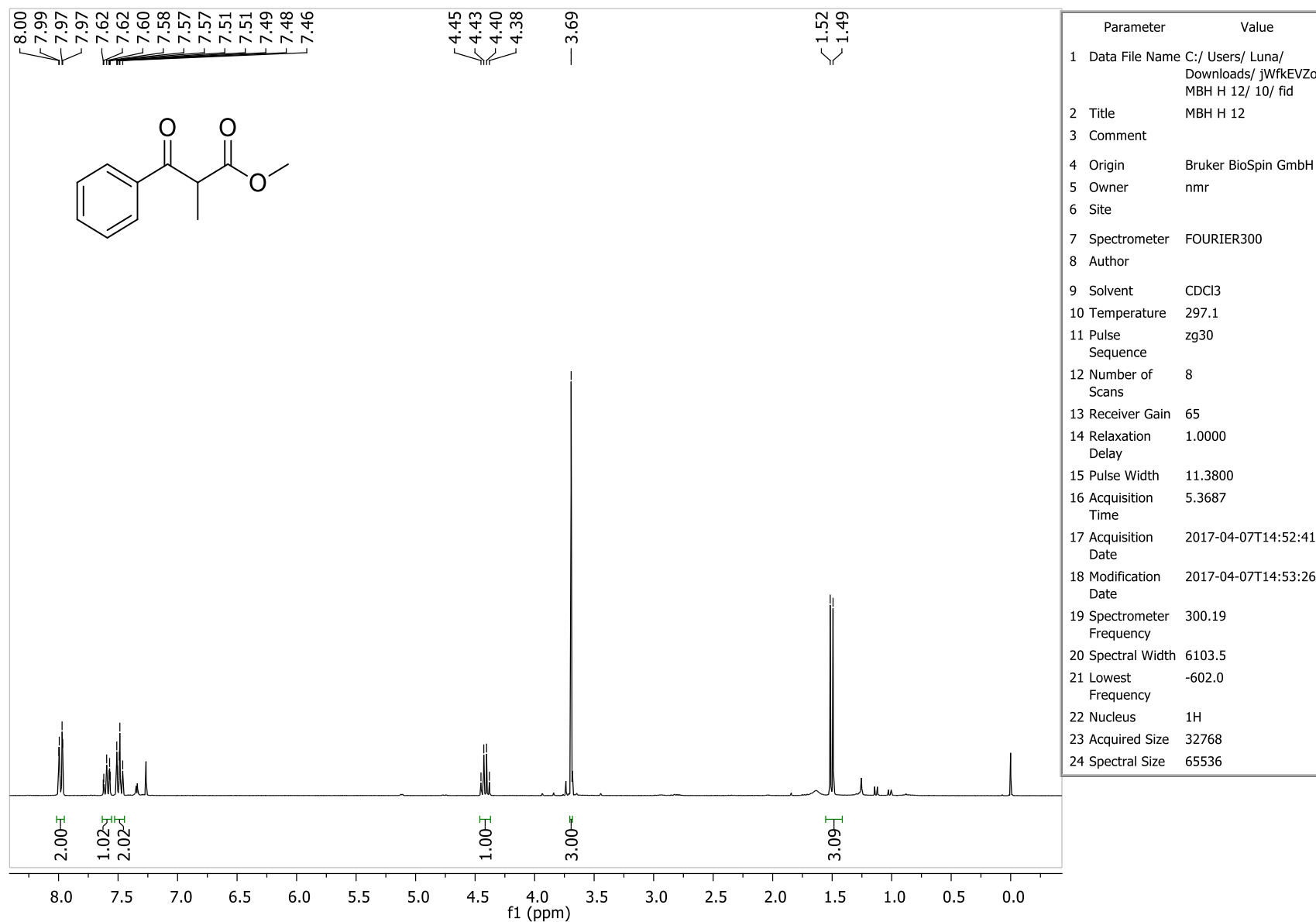
E43. Espectro de massas (EI, 70 eV) do 2-metileno-3-oxo-3-(*p*-nitrofenil)-propanoato de metila **9d**.



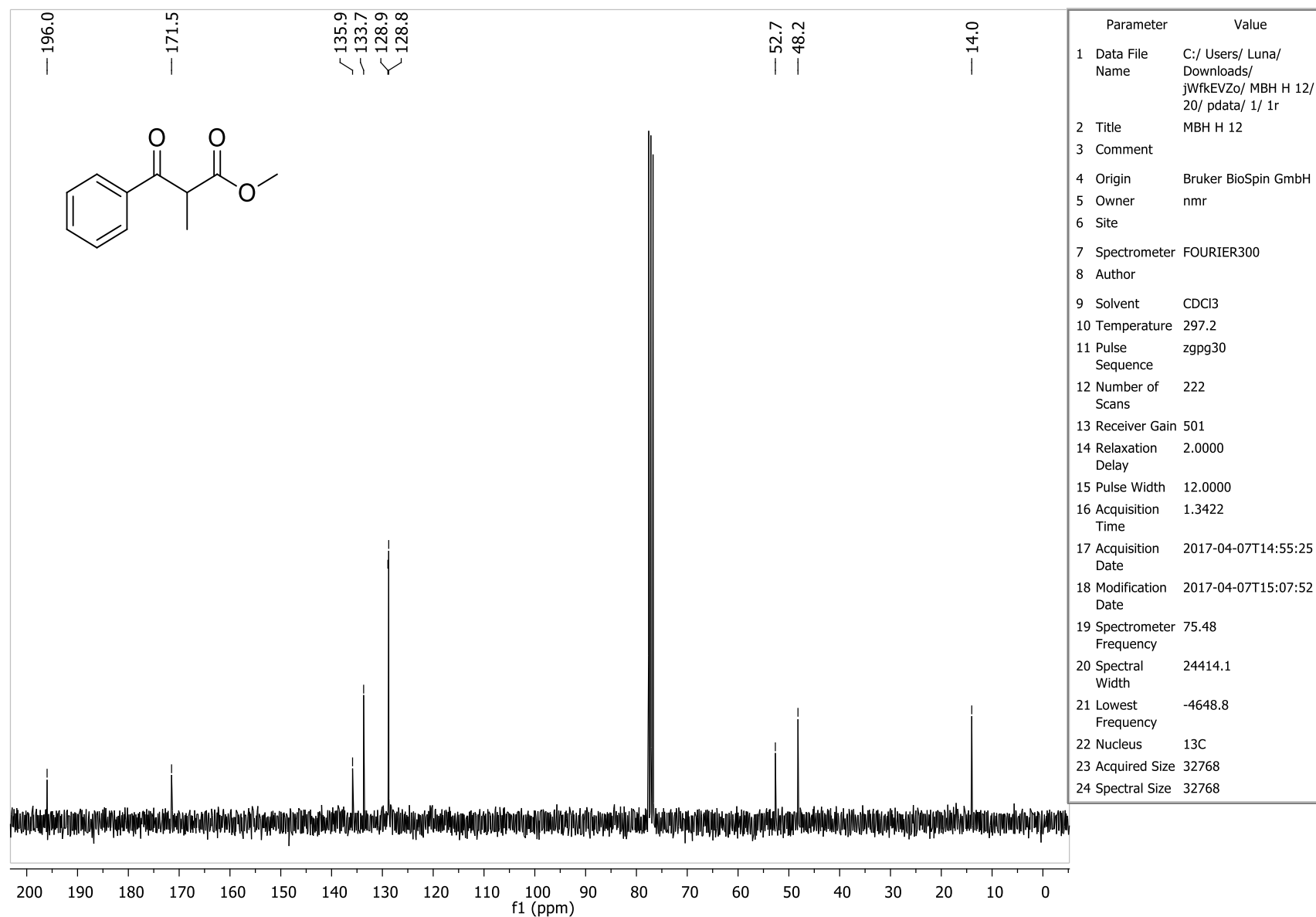
E44. Espectro de RMN de ¹H (300,19 MHz, CDCl₃) do 2-metileno-3-oxo-3-(*p*-nitrofenil)-propanoato de metila **9d**.



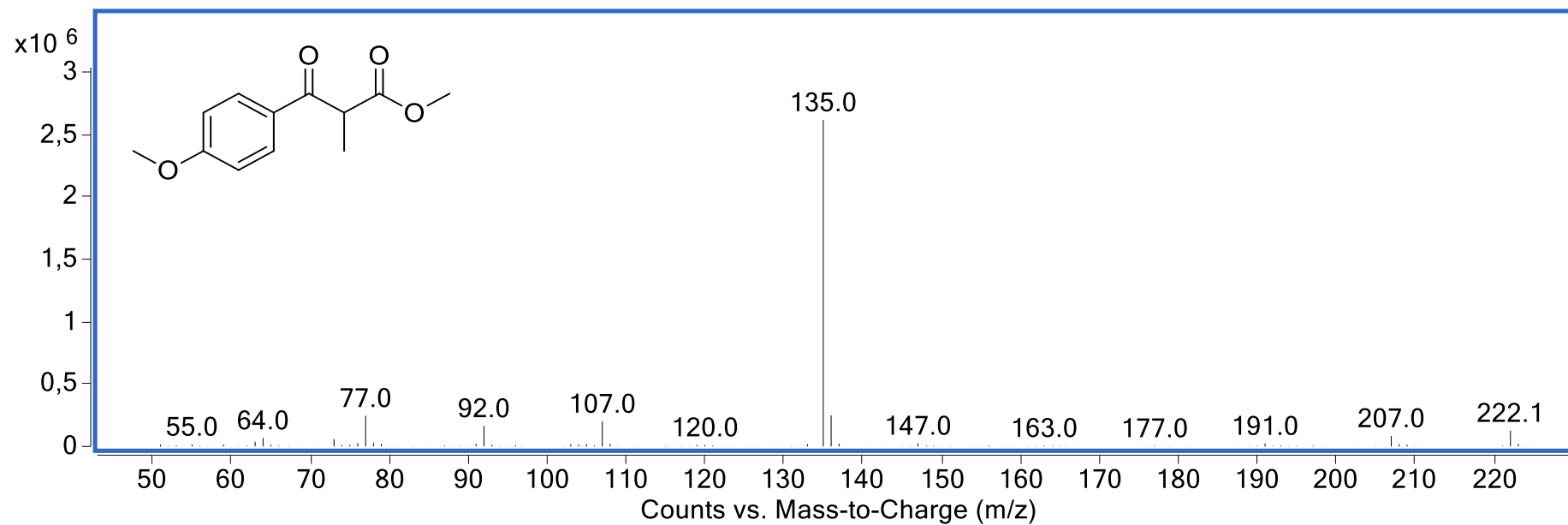
E45. Espectro de massas (EI, 70 eV) do 2-metil-3-oxo-3-fenilpropanoato de metila **12a**.



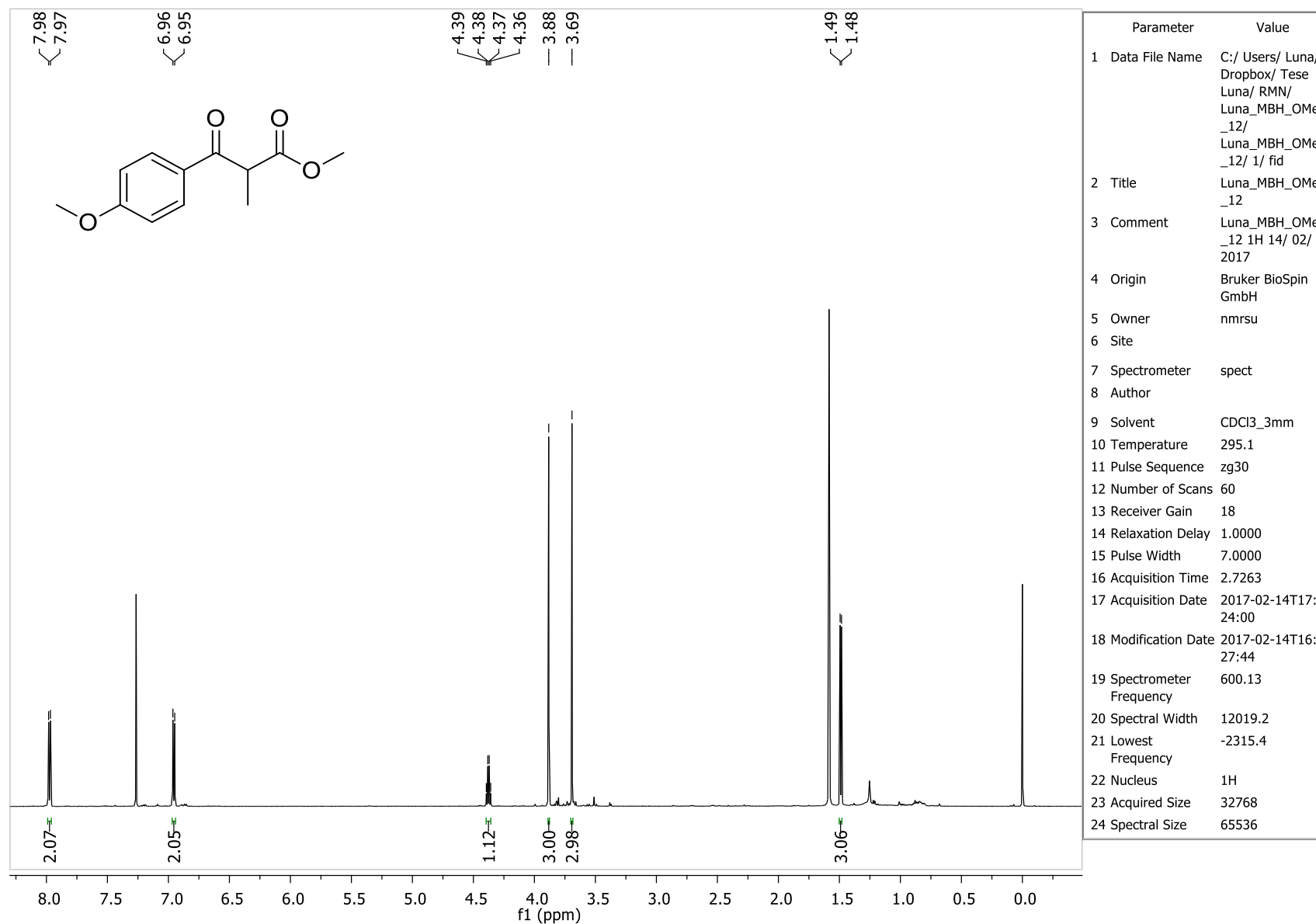
E46. Espectro de RMN de ¹H (300,19 MHz, CDCl₃) do 2-metil-3-oxo-3-fenilpropanoato de metila **12a**.



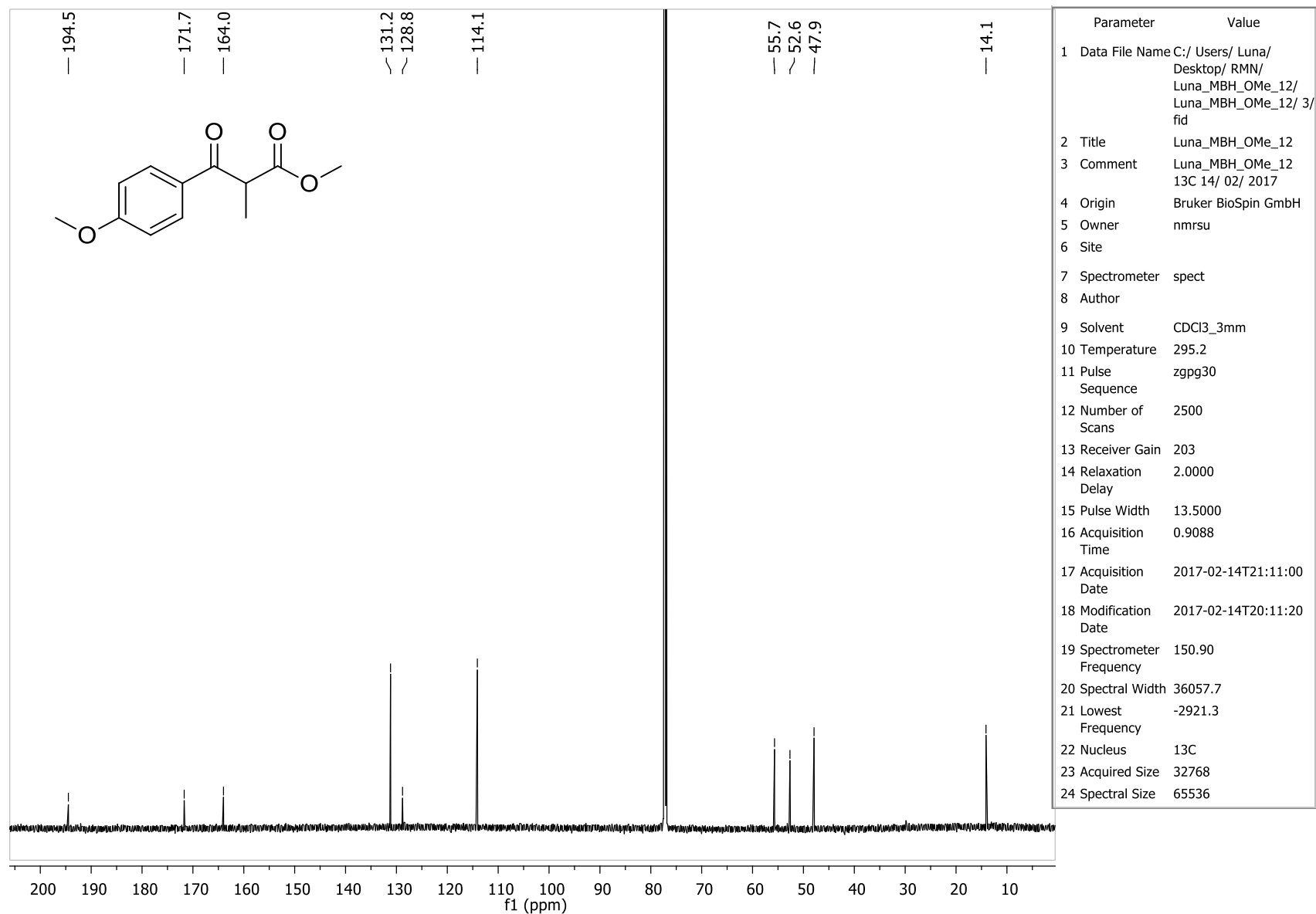
E47. Espectro de RMN de ¹³C (75,48 MHz, CDCl₃) do 2-metil-3-oxo-3-fenilpropanoato de metila **12a**.



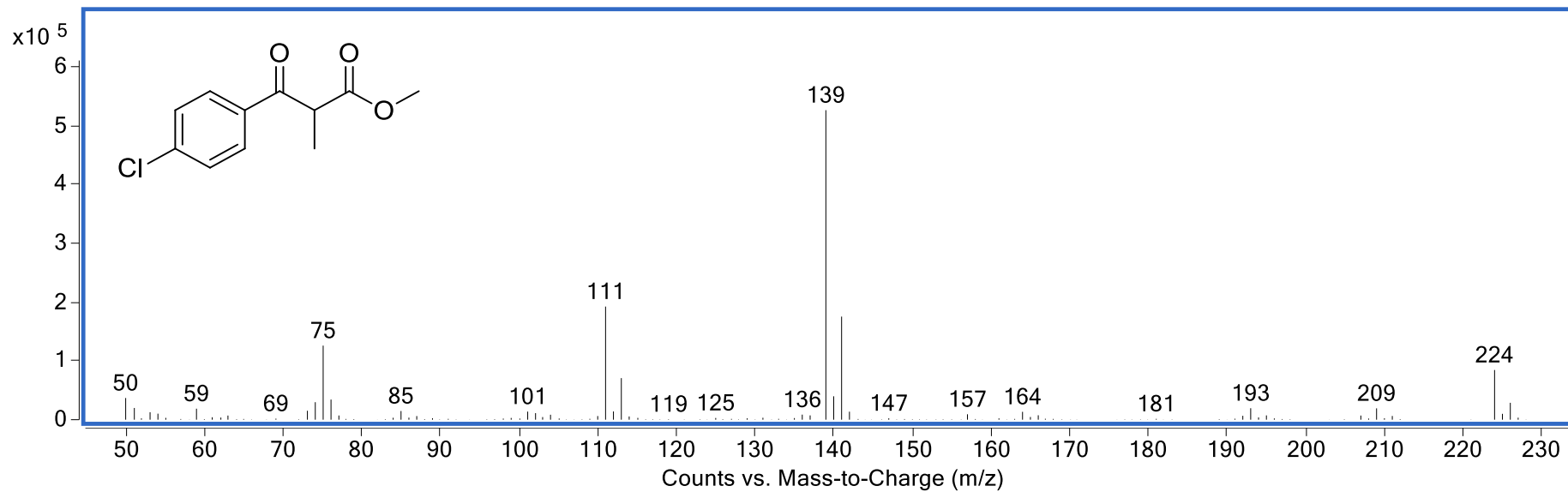
E48. Espectro de massas (EI, 70 eV) do 2-metil-3-oxo-3-(*p*-metoxifenil)-propanoato de metila **12b**.



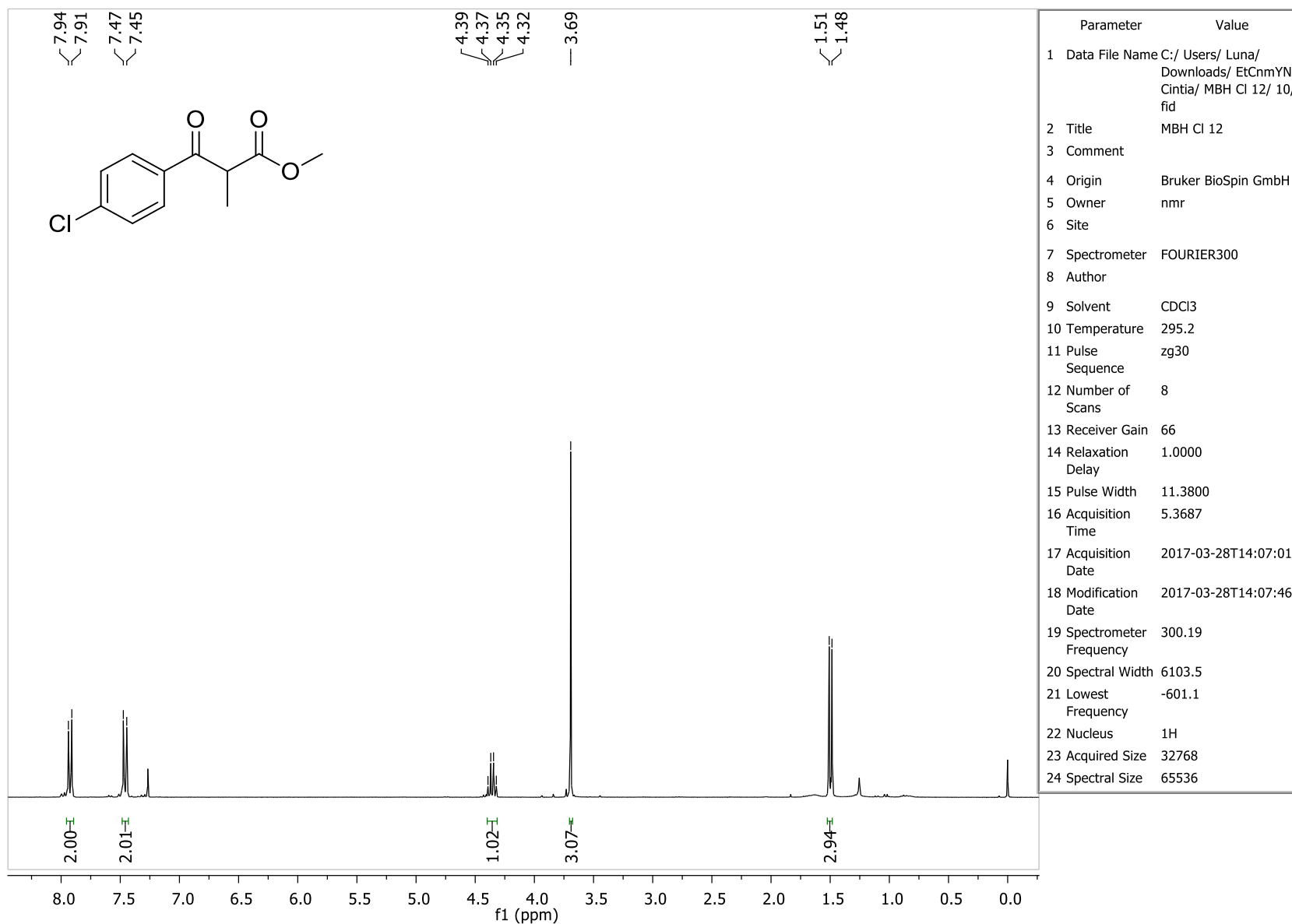
E49. Espectro de RMN de ¹H (300,19 MHz, CDCl₃) do 2-metil-3-oxo-3-(*p*-metoxifenil)-propanoato de metila **12b**.



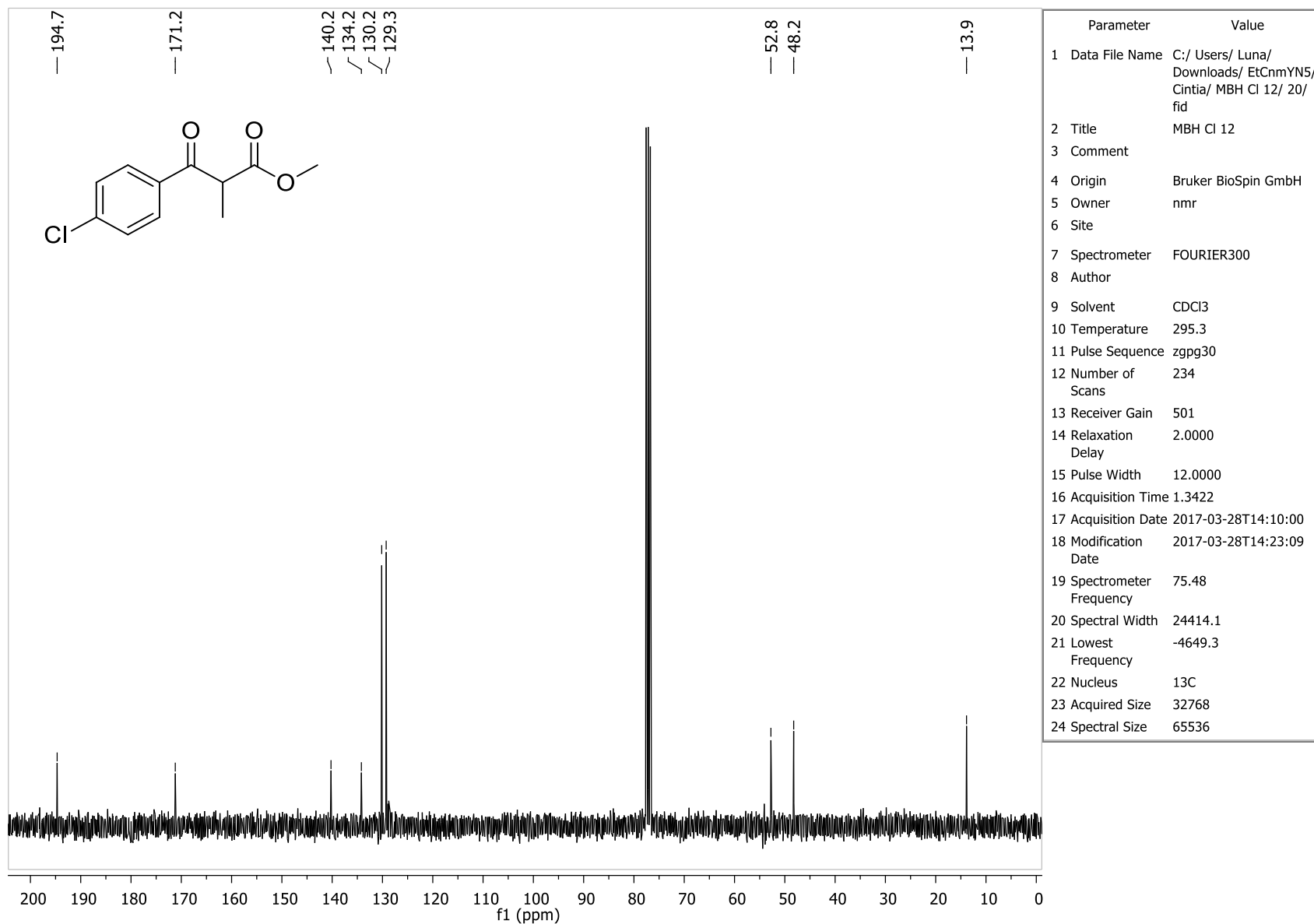
E50. Espectro de RMN de ¹³C (75,48 MHz, CDCl₃) do 2-metil-3-oxo-3-(p-metoxifenil)-propanoato de metila **12b**.



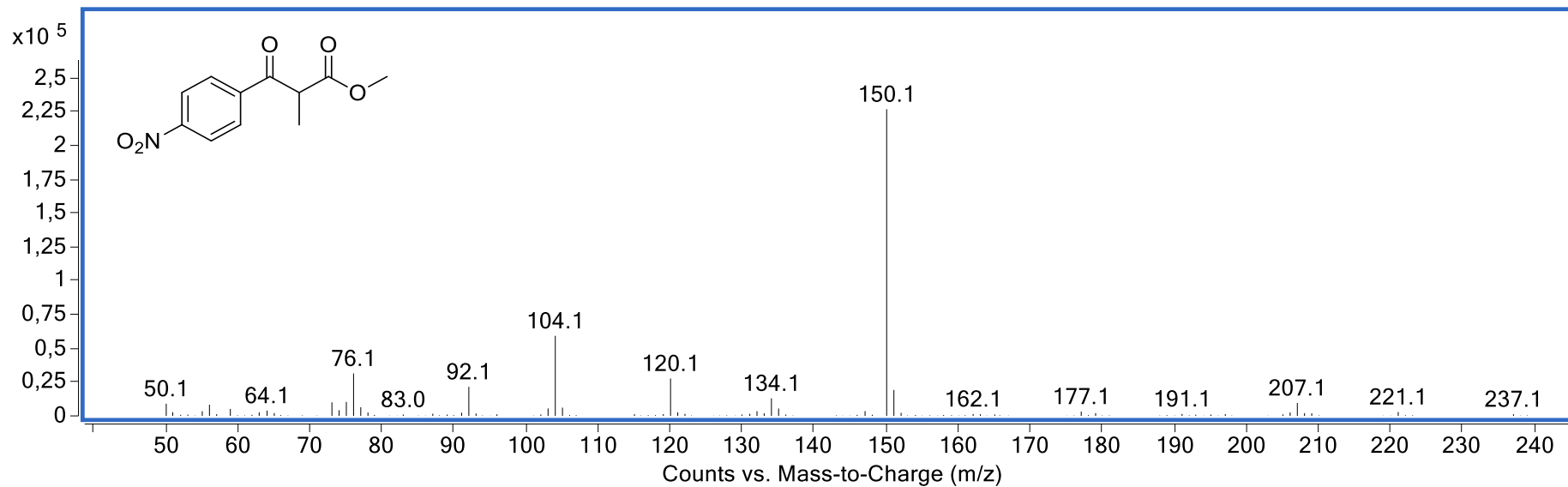
E51. Espectro de massas (EI, 70 eV) do 2-metil-3-oxo-3-(*p*-clorofenil)-propanoato de metila **12c**.



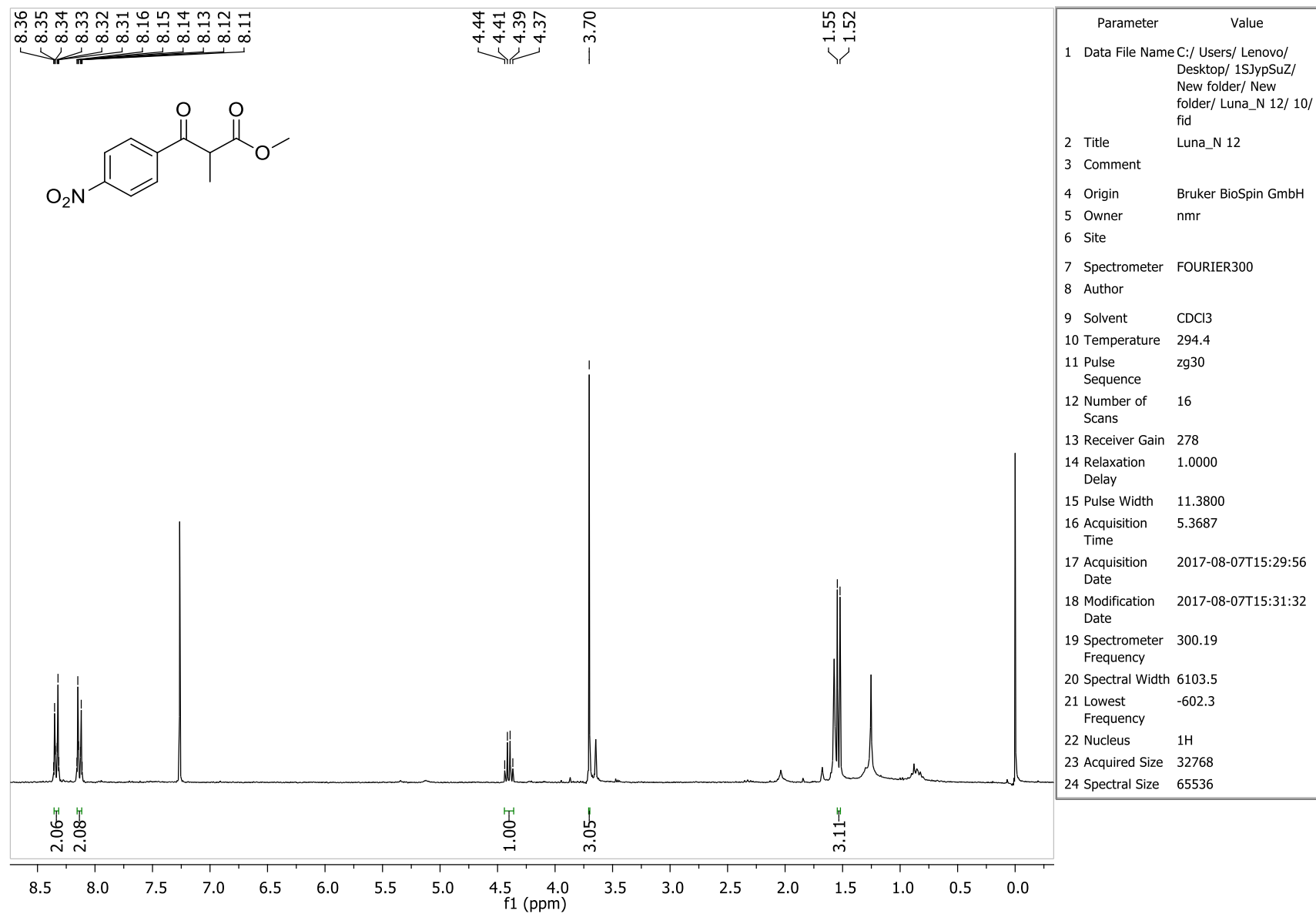
E52. Espectro de RMN de ¹H (300,19 MHz, CDCl₃) do 2-metil-3-oxo-3-(*p*-clorofenil)-propanoato de metila **12c**.



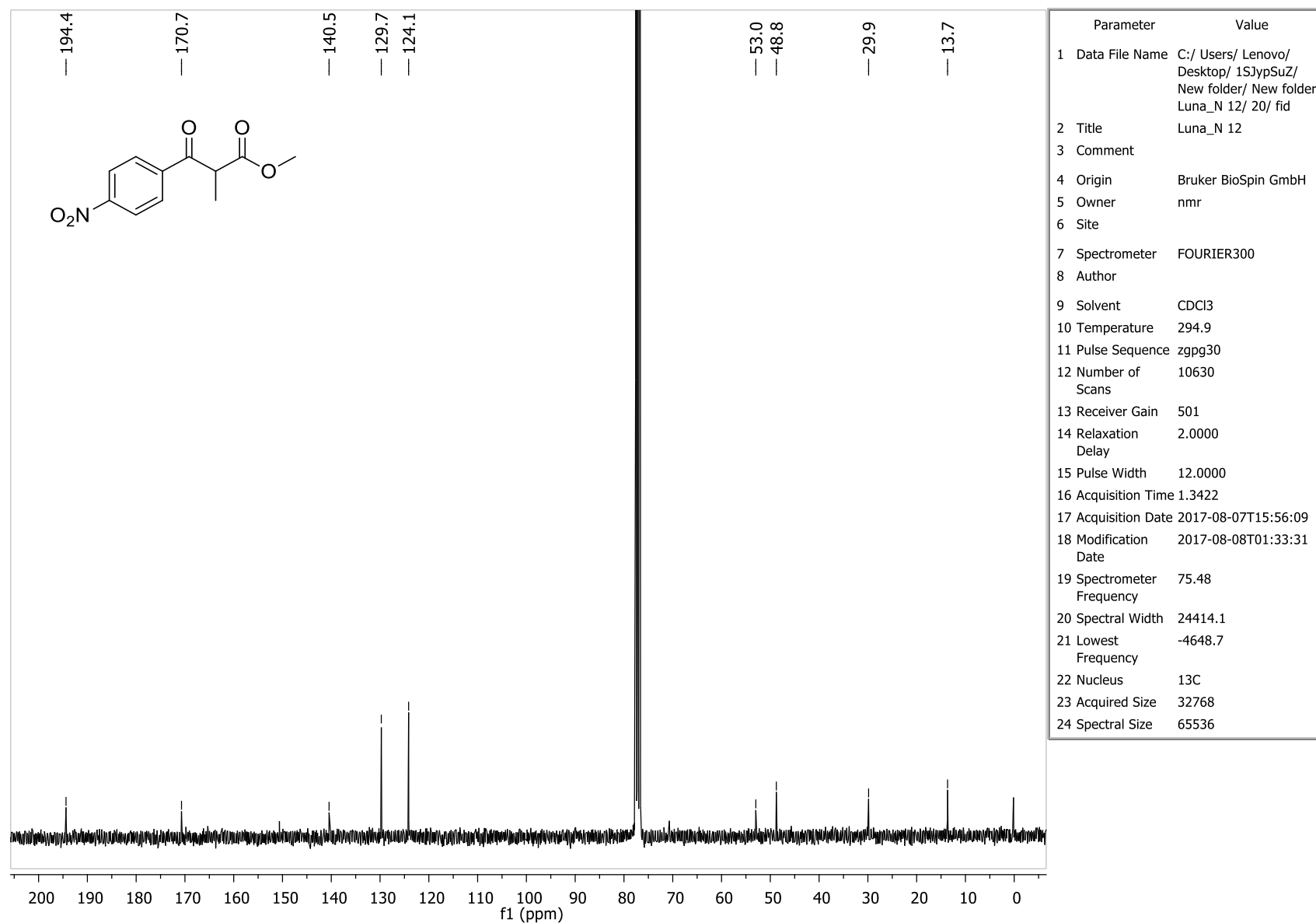
E53. Espectro de RMN de ¹³C (75,48 MHz, CDCl₃) do 2-metil-3-oxo-3-(*p*-clorofenil)-propanoato de metila **12c**.



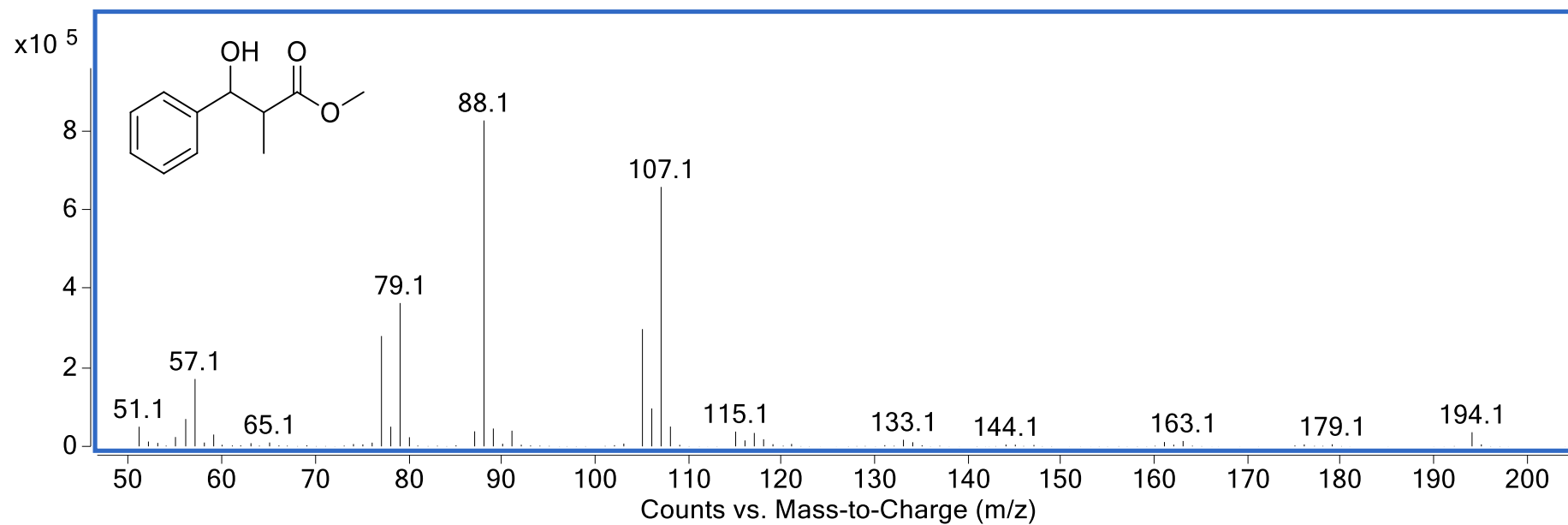
E54 Espectro de massas (EI, 70 eV) do 2-metil-3-oxo-3-(*p*-nitrofenil)-propanoato de metila **12d**



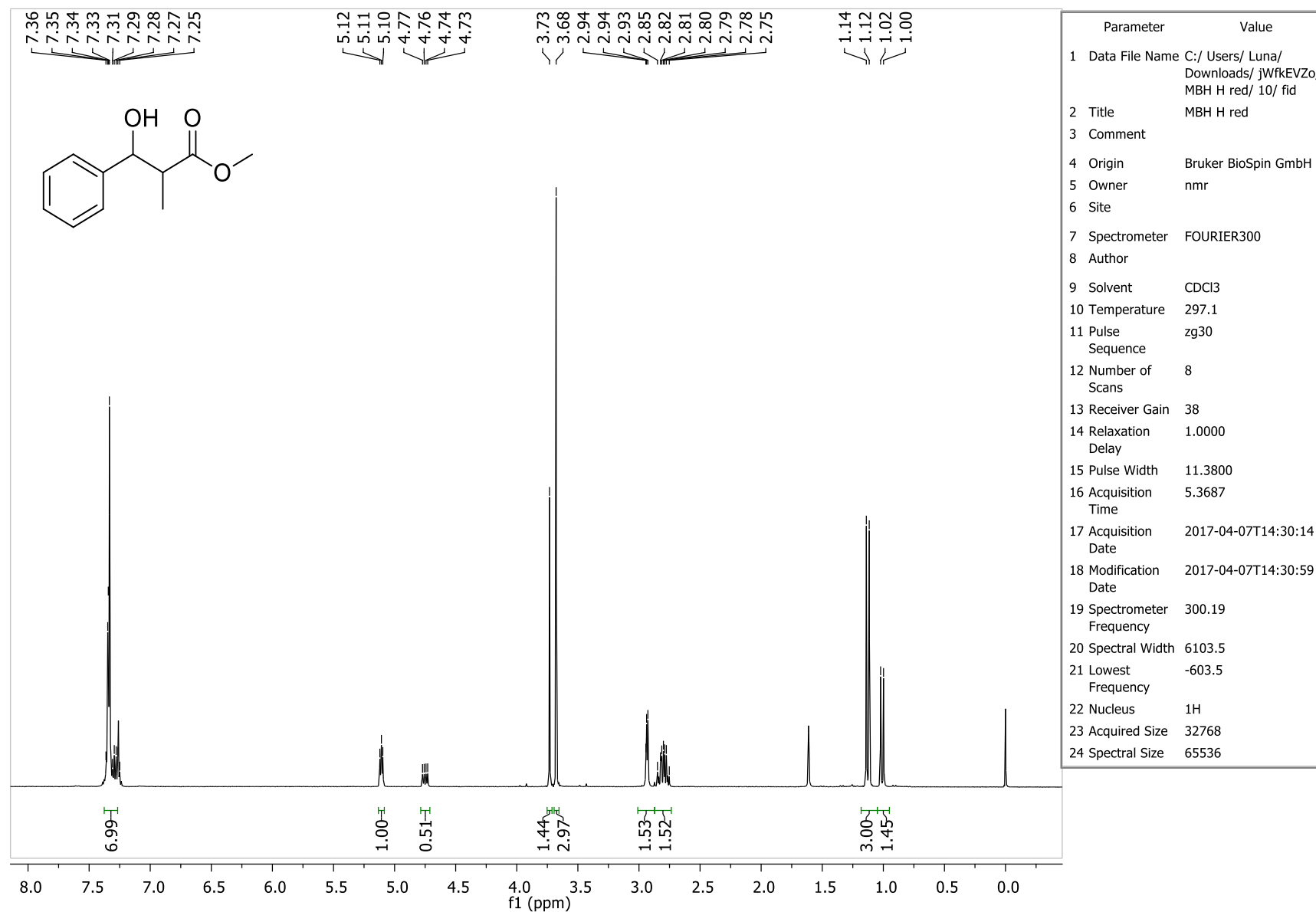
E55. Espectro de RMN de ^1H (300,19 MHz, CDCl_3) do 2-metil-3-oxo-3-(*p*-nitrofenil)-propanoato de metila **12d**



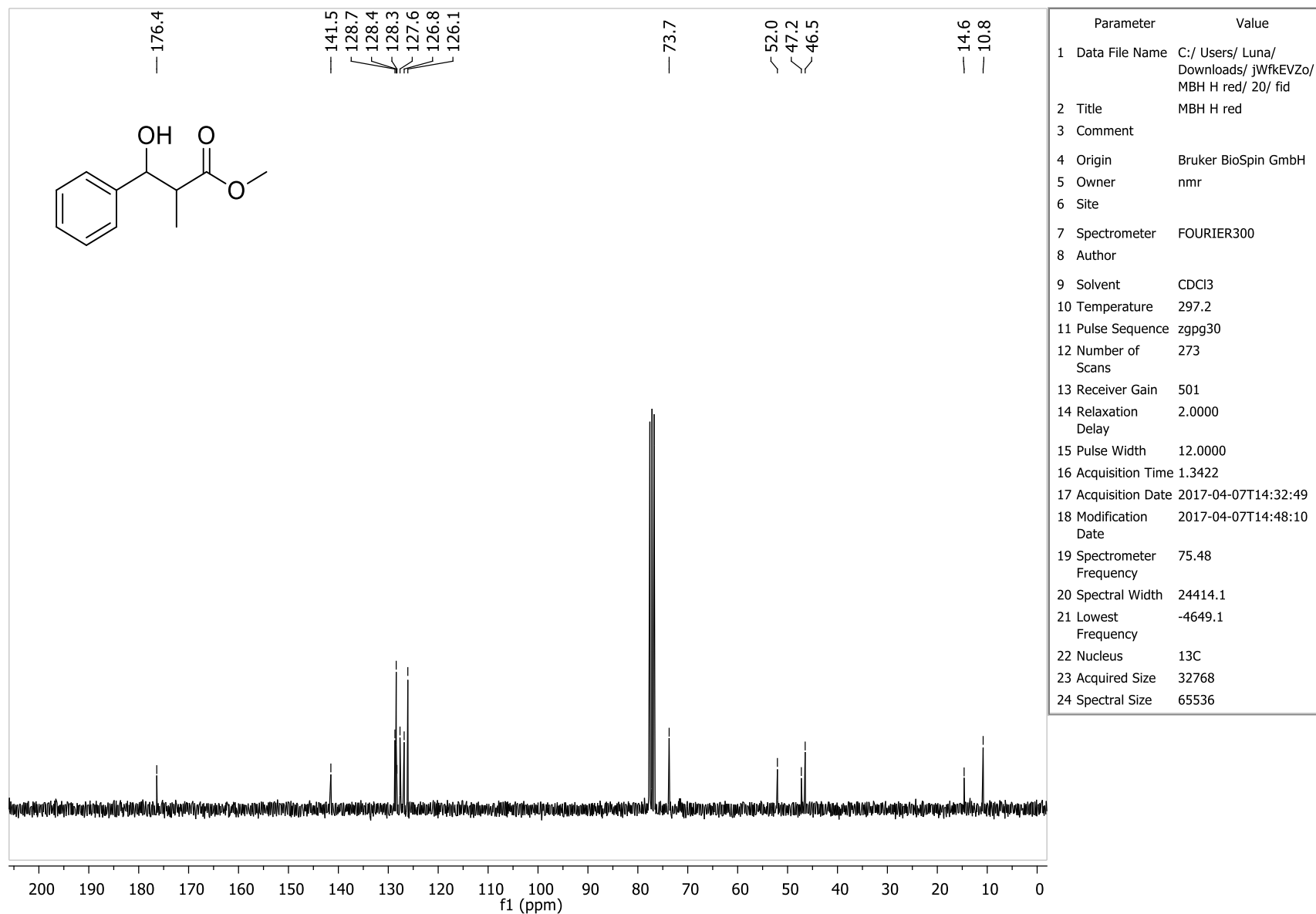
E56. Espectro de RMN de ¹³C (75,48 MHz, CDCl₃) do 2-metil-3-oxo-3-(*p*-nitrofenil)-propanoato de metila **12d**.



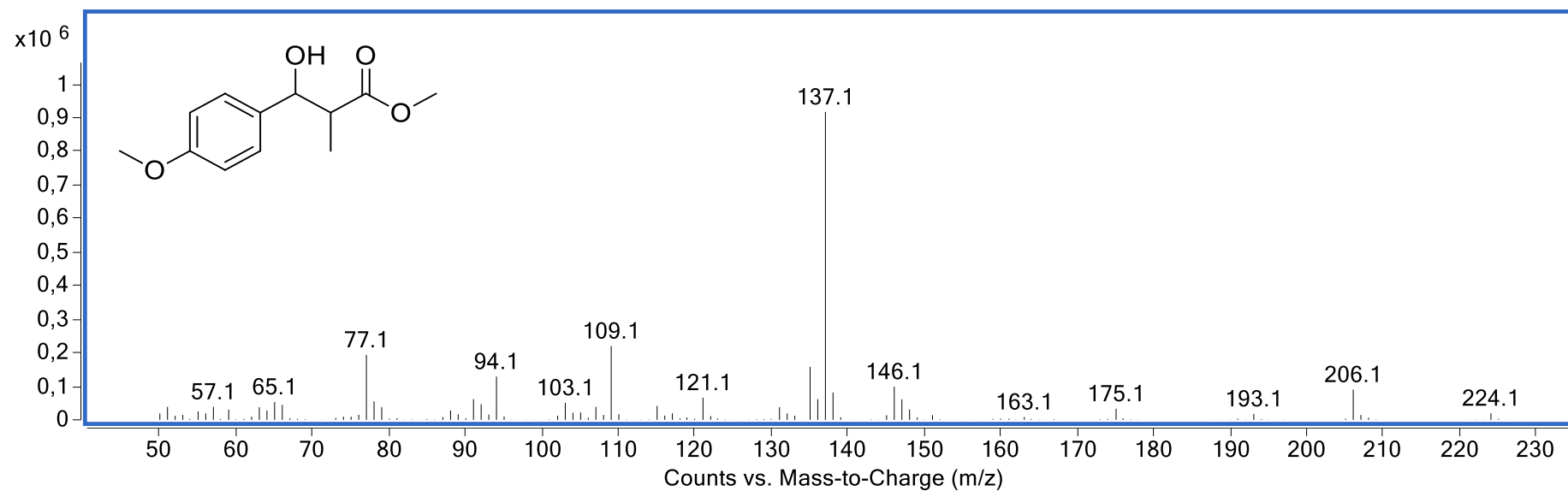
E57. Espectro de massas (EI, 70 eV) do 2-metil-3-hidroxi-3-fenil-propanoato de metila **13a**.



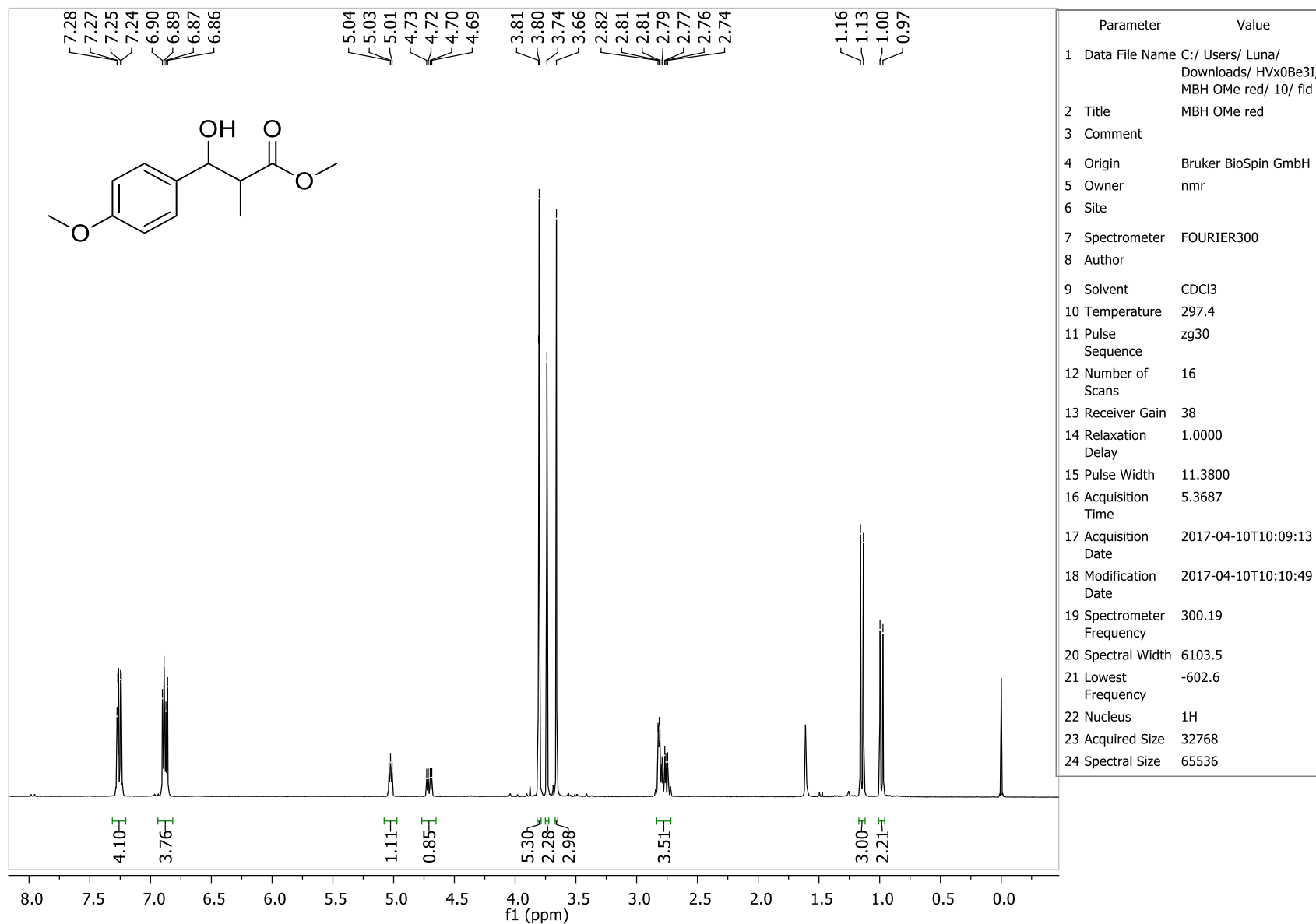
E58. Espectro de RMN de ¹H (300,19 MHz, CDCl₃) do 2-metil-3-hidroxi-3-fenil-propanoato de metila **13a**.



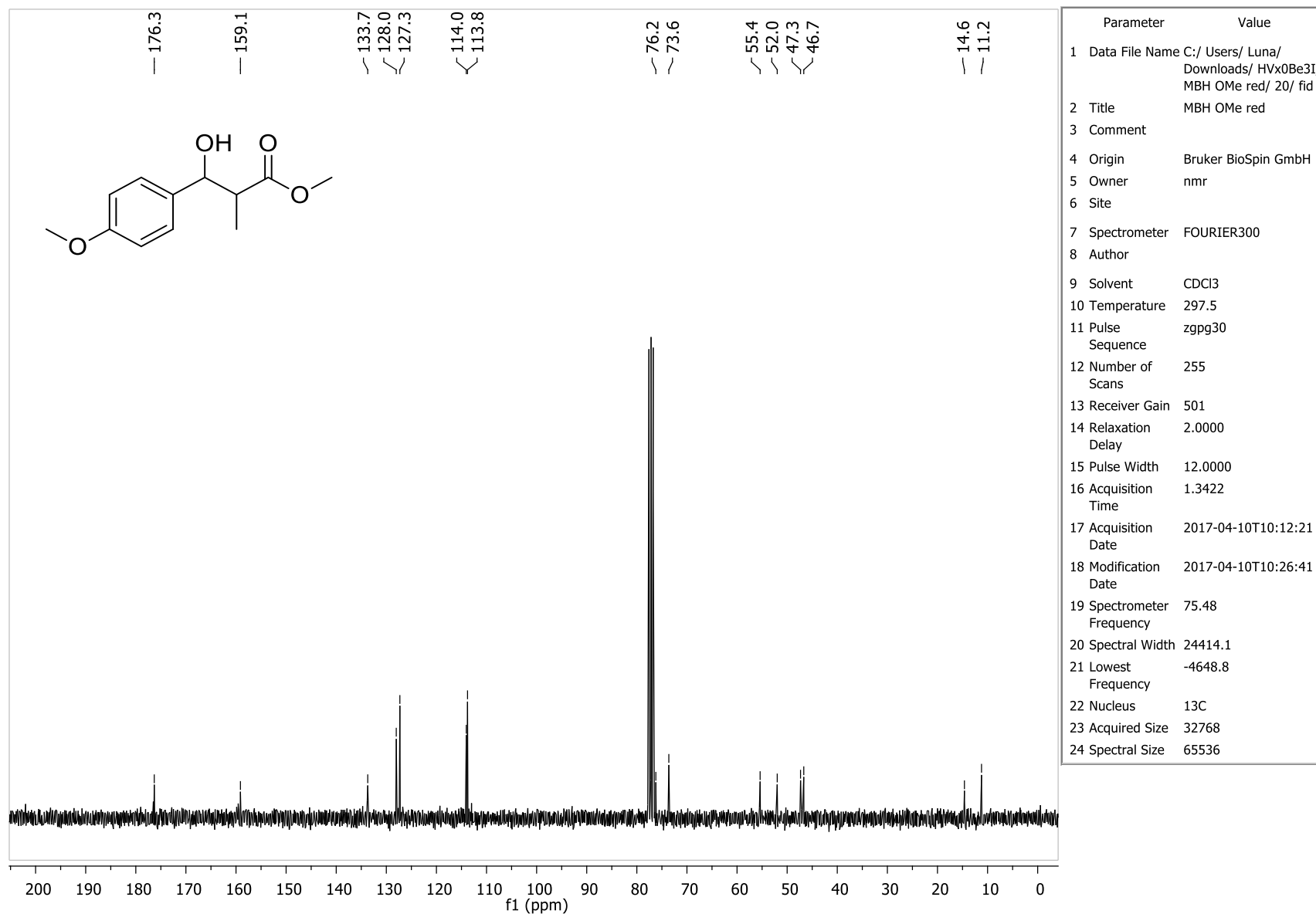
E59. Espectro de RMN de ¹³C (75,48 MHz, CDCl₃) do 2-metil-3-hidroxi-3-fenil-propanoato de metila **13a**.



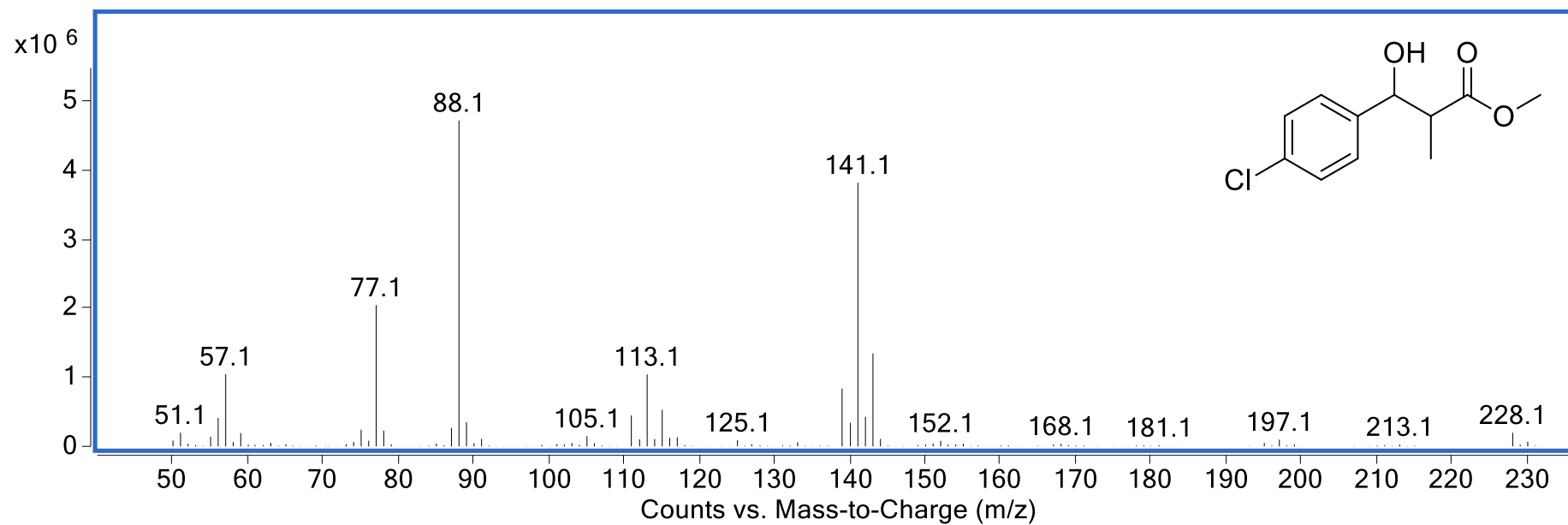
E60. Espectro de massas (EI, 70 eV) do 2-metil-3-hidroxi-3-(*p*-metoxifenil)-propanoato de metila **13b**.



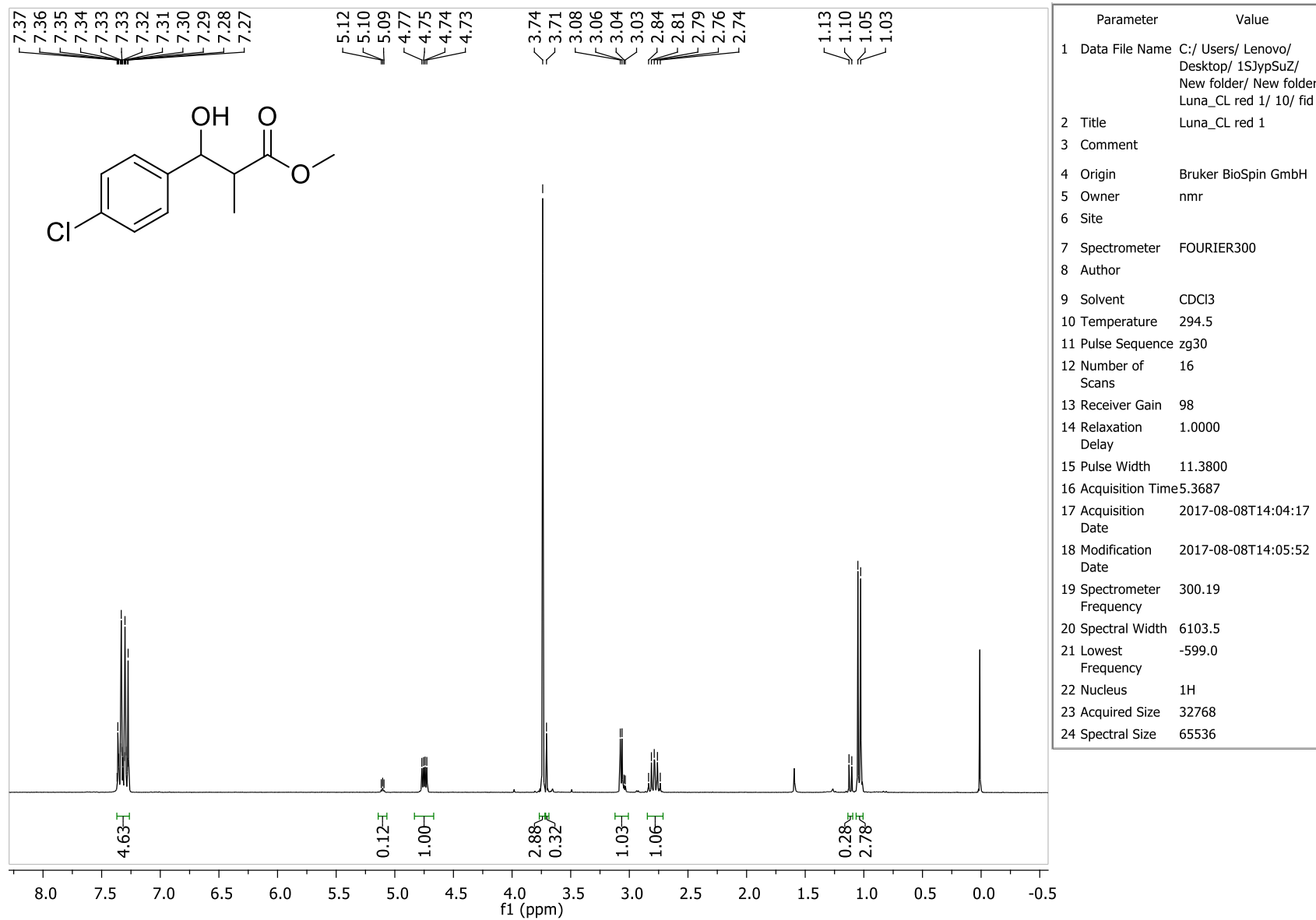
E61. Espectro de RMN de ¹H (300,19 MHz, CDCl₃) do 2-metil-3-hidroxi-3-(*p*-metoxifenil)-propanoato de metila **13b**.



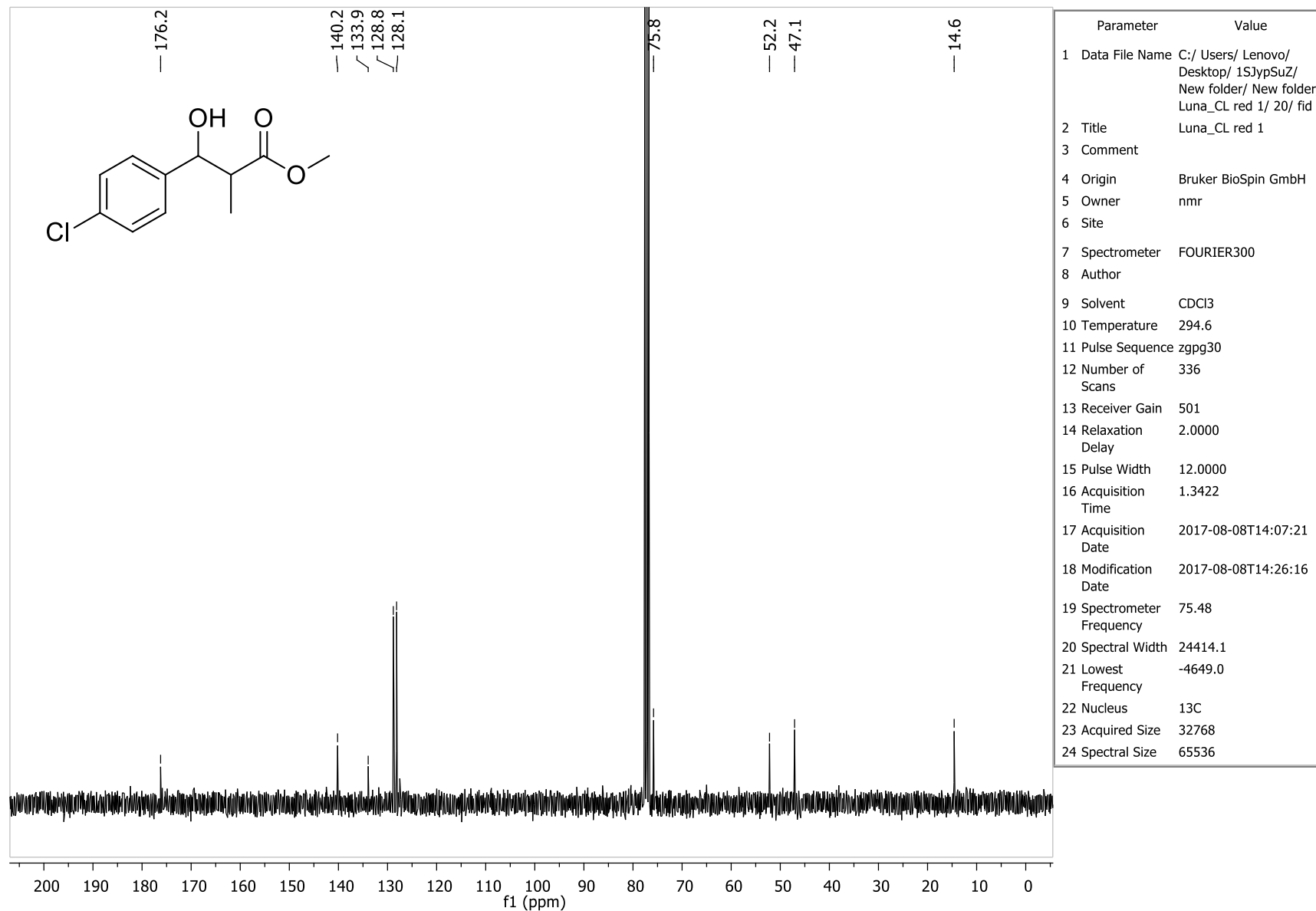
E62. Espectro de RMN de ¹³C (75,48 MHz, CDCl₃) do 2-metil-3-hidroxi-3-(*p*-metoxifenil)-propanoato de metila **13b**.



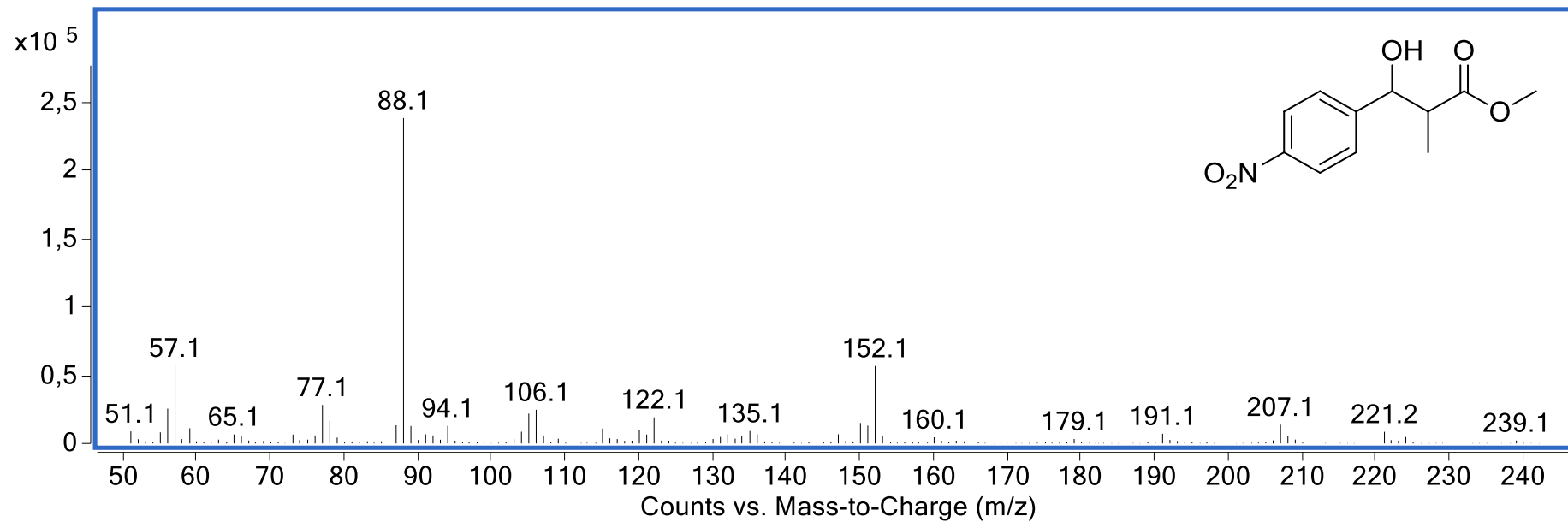
E63. Espectro de massas (EI, 70 eV) do 2-metil-3-hidroxi-3-(*p*-clorofenil)-propanoato de metila **13c**.



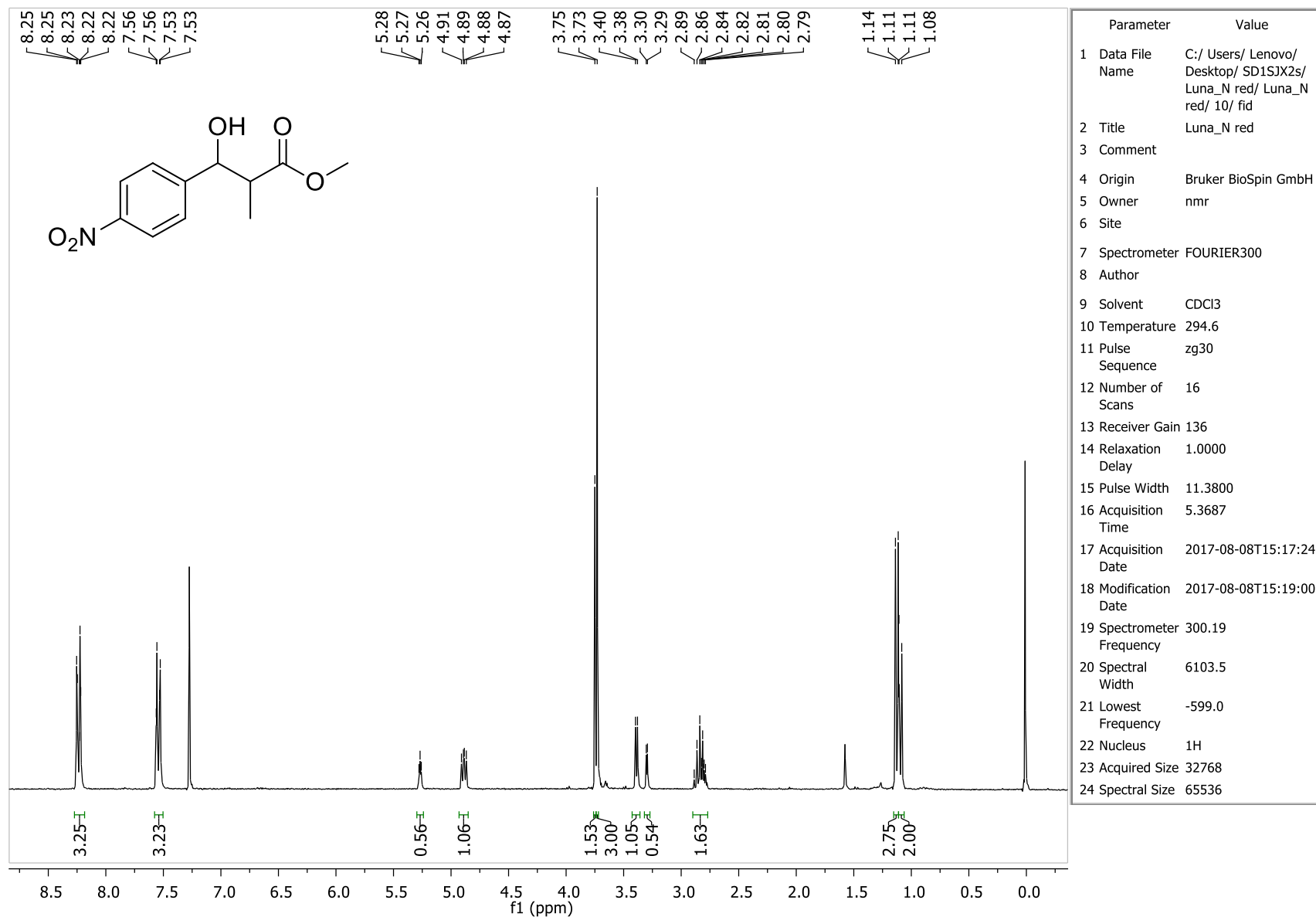
E64. Espectro de RMN de ¹H (300,19 MHz, CDCl₃) do 2-metil-3-hidroxi-3-(*p*-clorofenil)-propanoato de metila **13c**.



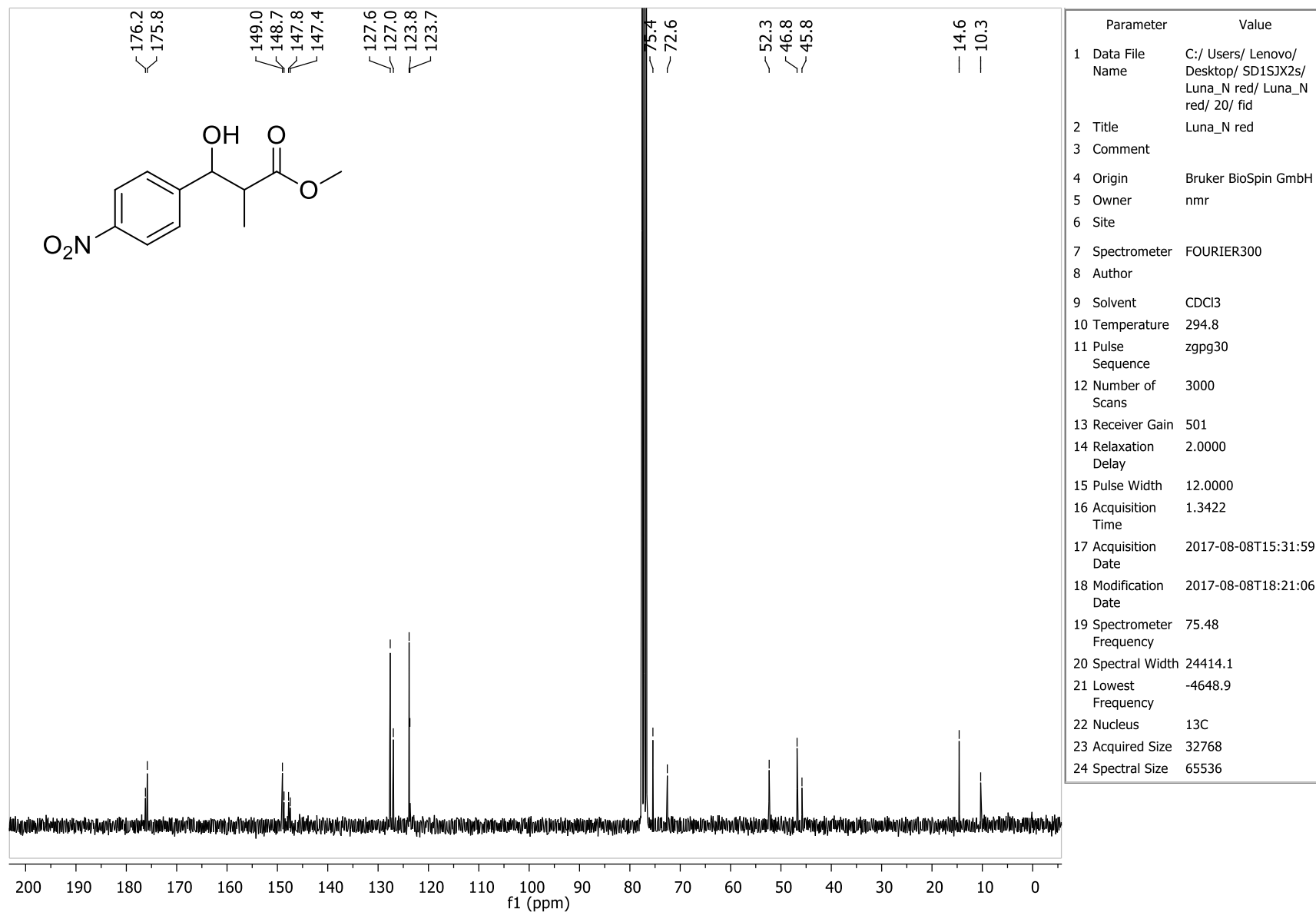
E65. Espectro de RMN de ^{13}C (75,48 MHz, CDCl_3) do 2-metil-3-hidroxi-3-(*p*-clorofenil)-propanoato de metila **13c**.



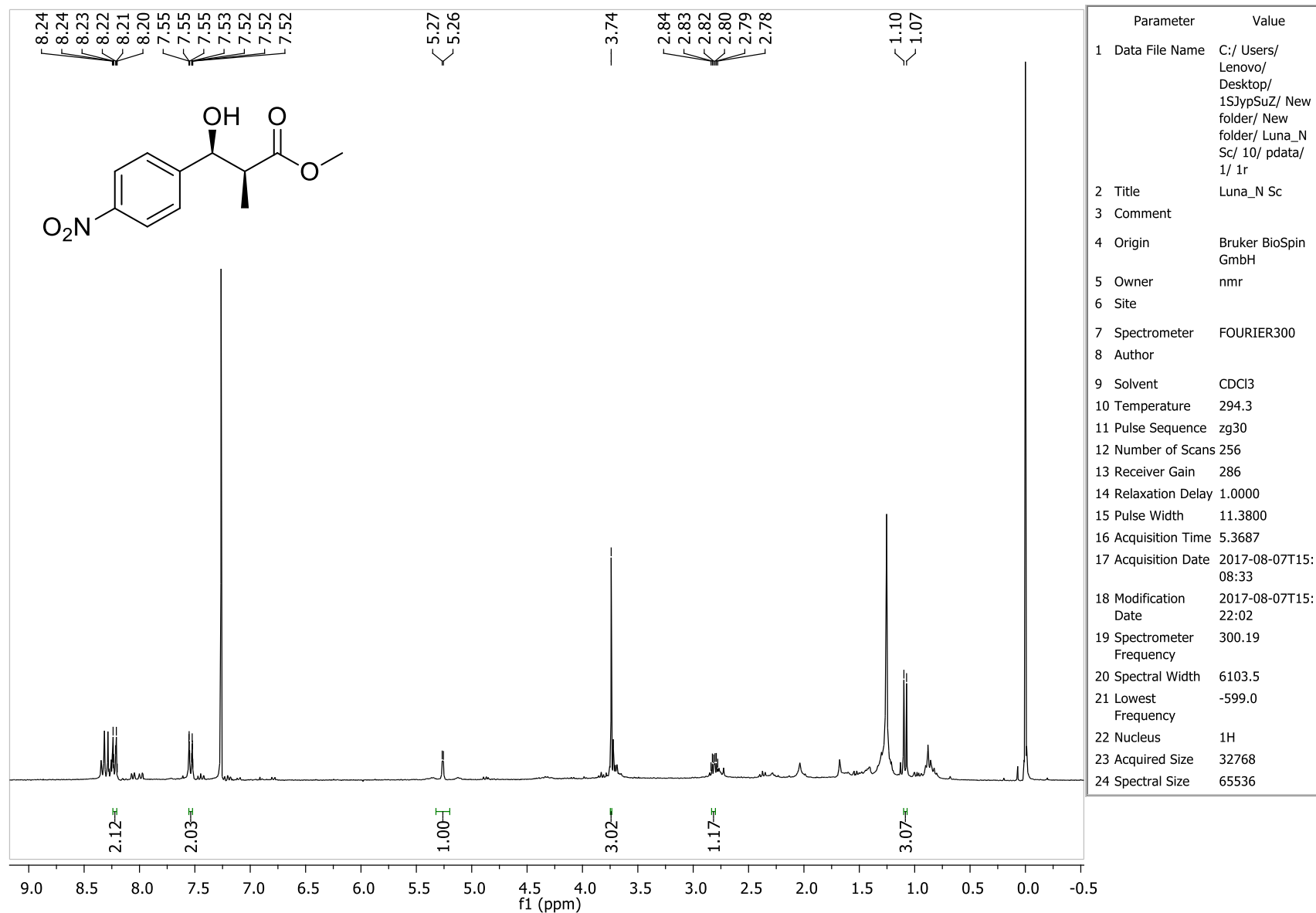
E66. Espectro de massas (EI, 70 eV) do 2-metil-3-hidroxi-3-(*p*-nitrofenil)-propanoato de metila **13d**.



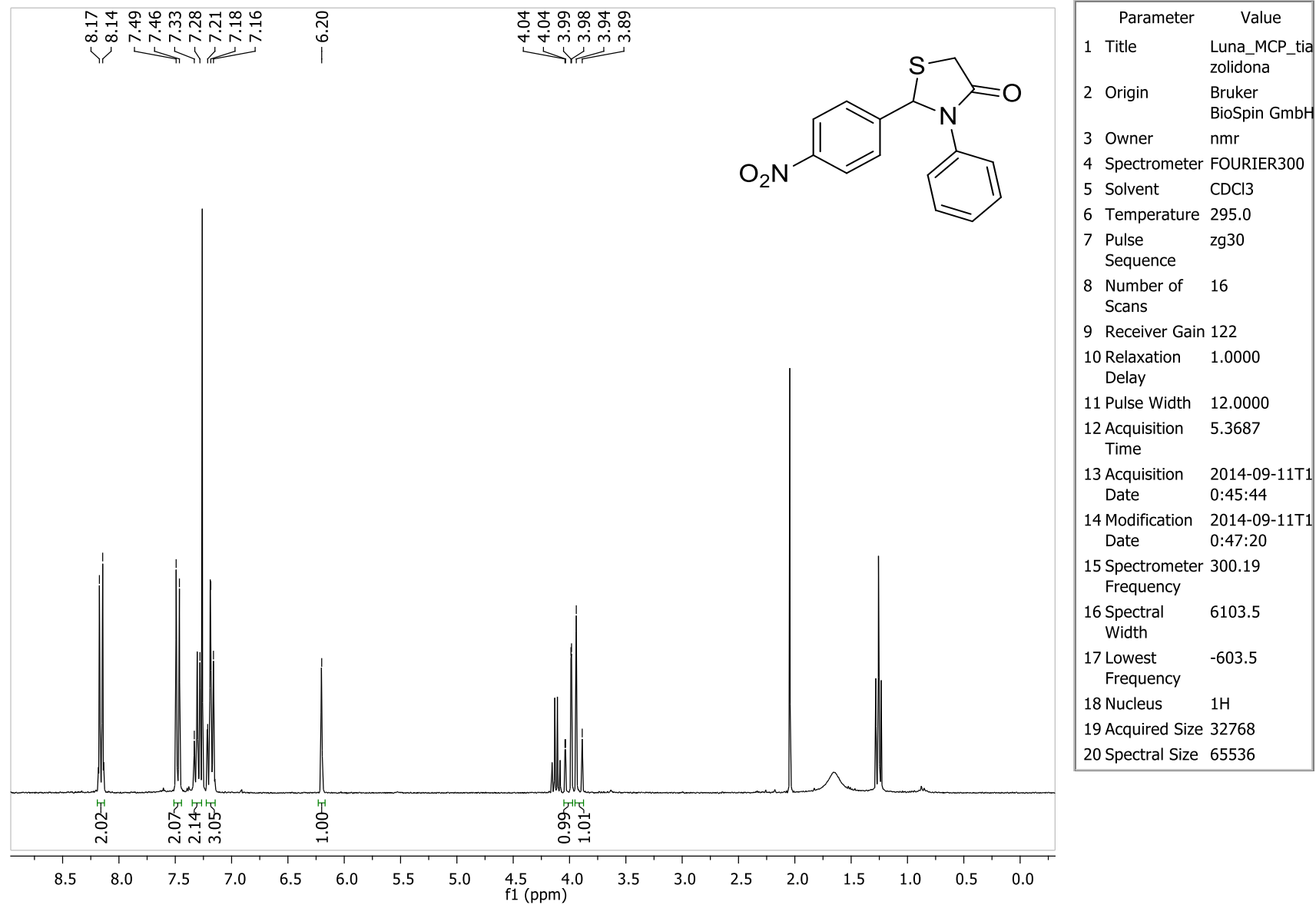
E67. Espectro de RMN de ¹H (300,19 MHz, CDCl₃) do 2-metil-3-hidroxi-3-(*p*-nitrofenil)-propanoato de metila **13d**.



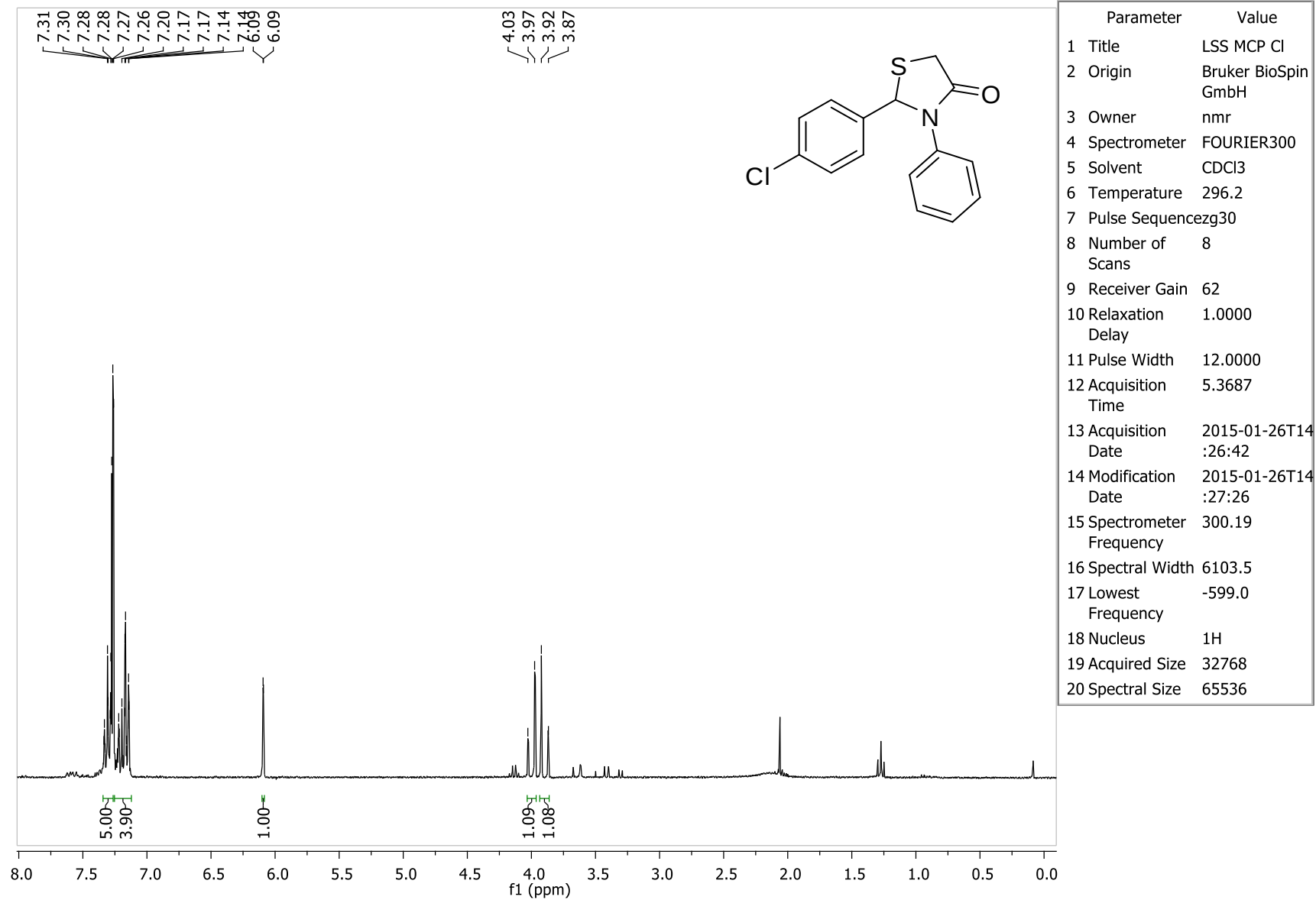
E68. Espectro de RMN de ^{13}C (75,48 MHz, CDCl_3) do 2-metil-3-hidroxi-3-(*p*-nitrofenil)-propanoato de metila **13d**.



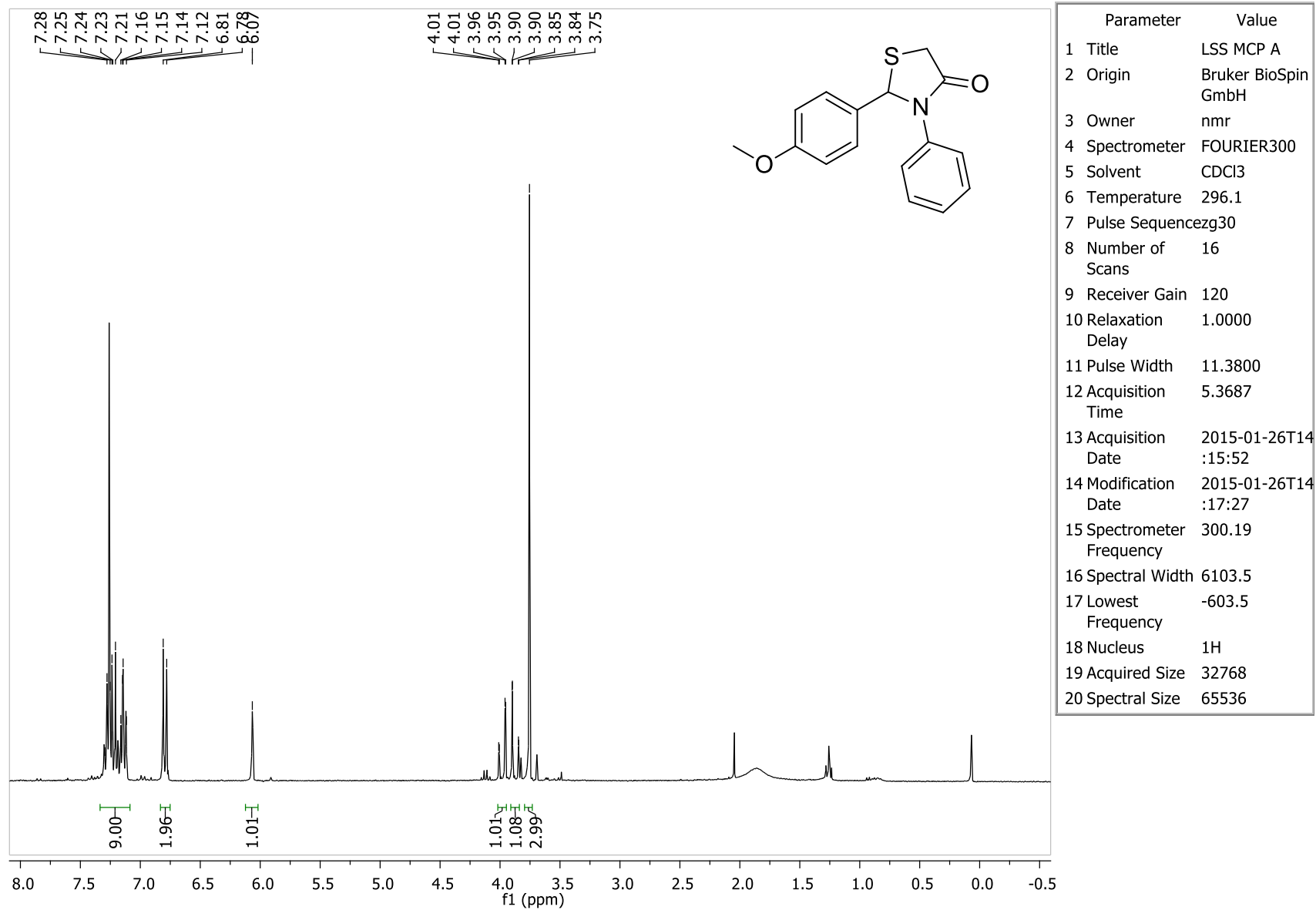
E69. Espectro de RMN de ¹H (300,19 MHz, CDCl₃) do *syn*-2-metil-3-hidroxi-3-(*p*-nitrofenil)-propanoato de metila **13d**.



E70. Espectro de RMN de ¹H (300,19 MHz, CDCl₃) do 2-*p*-nitrofenil-3-fenil-1,3-tiazolidin-4-ona **18a**.



E71. Espectro de RMN de ¹H (300,19 MHz, CDCl₃) do 2-*p*-clorofenil-3-fenil-1,3-tiazolidin-4-ona **18b**.



E72. Espectro de RMN de ¹H (300,19 MHz, CDCl₃) do 2-*p*-metoxifenil-3-fenil-1,3-tiazolidin-4-ona **18c**.