

SHIRLEY ALVES CASTILHO

CASCATAS BIENZIMÁTICAS PARA A SÍNTESE DE β -HIDROXIAMIDAS QUIRAIS:
AVALIAÇÃO DE ESCOPO DE SUBSTRATOS

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

Orientadora: Profa. Dra. Cintia Duarte de Freitas Milagre

Araraquara

2022

C352c	Castilho, Shirley Alves Cascatas bienzimáticas para a síntese de β-Hidroxiamidas quirais : avaliação de escopo de substratos / Shirley Alves Castilho. -- Araraquara, 2022 95 f. : il. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Química, Araraquara Orientadora: Cintia Duarte de Freitas Milagre 1. Biocatálise. 2. Enzimas. 3. Síntese orgânica. 4. Química verde. 5. Quiralidade. I. Título.
-------	---

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca do Instituto de Química, Araraquara. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: "Cascatas Bienzimáticas para a Síntese de β -hidroxiamidas Quirais: Avaliação de Escopo de Substratos"

AUTORA: SHIRLEY ALVES CASTILHO

ORIENTADORA: CINTIA DUARTE DE FREITAS MILAGRE

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



Profa. Dra. CINTIA DUARTE DE FREITAS MILAGRE (Participação Virtual)
Departamento de Bioquímica e Química Orgânica / Instituto de Química UNESP Araraquara



Prof. Dr. BRUNO SERGIO DO AMARAL (Participação Virtual)
Departamento de Química / Instituto Federal de São Paulo - IFSP - São Paulo



Prof. Dr. Marcos Carlos de Mattos
Professor Titular - UFC
Depto de Química Orgânica e Inorg.
Campos do Pícl

Prof. Dr. MARCOS CARLOS MATTOS (Participação Virtual)
Departamento de Química / Universidade Federal do Ceará - IFCE

Araraquara, 31 de janeiro de 2022

DADOS CURRICULARES

Dados Pessoais

Nome: Shirley Alves Castilho

Nome em citações bibliográficas: CASTILHO, S. A.

Filiação: Amelia Moreira Alves

Luis Antônio Pinheiro Castilho

Data de nascimento: 20 de agosto de 1995

Naturalidade: Ouro Preto D'Oeste – RO

Nacionalidade: Brasileira

Formação Acadêmica

- Graduada em Licenciatura em Química, pela Faculdade de Ciências e Tecnologia Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (FCT – UNESP), campus de Presidente Prudente – SP, de 2013 a 2018.

Formação Complementar

- Curso de curta duração “Process Chemistry in the Pharmaceutical Industry” (Carga horária: 8h) na Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), 2019.

Estágios e Bolsas Auxílio

- Bolsista de mestrado pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), no período de março/2019 a agosto/2021. (Processo: 88887.341669/2019-00)

- Estágio à docência durante o segundo semestre de 2019 na disciplina Química Orgânica Experimental, disciplina obrigatória para a turma do segundo ano do bacharelado, sob supervisão da Profa. Dra. Isabelle Rodrigues Nascimento.

- Estágio em Iniciação Científica “Síntese e Estudo das Propriedades Ópticas e Estruturais de Complexos β -dicetonados de Eu(III) Luminescentes”, sob orientação da Profa. Dra. Ana Maria Pires, de 2015 a 2017, no Laboratório de Luminescência em Materiais e Sensores (LLuMeS)/FCT-UNESP.

Trabalhos publicados e/ou submetidos a periódicos indexados

- LEITE SILVA, C. M. B.; BISPO-JR, A. G.; CANISARES, F. S. M.; **CASTILHO, S. A.**; LIMA, S. A. M.; PIRES, A. M.; Eu³⁺- tetrakis β -diketonate complexes for solid-state lighting application. Luminescence. 2019;1–10. [https://doi.org/ 10.1002/bio.3686](https://doi.org/10.1002/bio.3686)

- **CASTILHO, S. A.**; MILAGRE, H. M. S.; MILAGRE, C. D. F.; Reações em cascata enzimática, quimioenzimática e fotoenzimática: perspectivas para uma síntese orgânica mais sustentável. Química Nova, 2021. <http://dx.doi.org/10.21577/0100-4042.20170829>

Trabalhos publicados em anais de eventos científicos

- **CASTILHO, S. A.**; TORDATO, E. A.; MILAGRE, C. D. F.; “Síntese bienzimática em cascata para a obtenção de b-hidroxiamidas quirais”, I Simpósio do ACS UFRJ Student Chapter, 2021.

- SILVA, C. M. B. L.; **CASTILHO, S. A.** ; LIMA, S. A. M.; PIRES, A. M.; “Influence of the amphiphilic counter ion in the intensity parameters of Eu³⁺ tetrakis complexes”, 18th International Conference on Luminescence - ICL, 2017, João Pessoa - PB.

- SILVA, C. M. B. L. ; **CASTILHO, S. A.** ; LIMA, S. A. M. ; PIRES, A. M.; “The influence of different amphiphilic counterions in Eu³⁺ Tetrakis β -diketonate complexes on optical properties”, XVIII BMIC - Brazilian Meeting on Inorganic Chemistry, 2016, São Pedro - SP.

- **CASTILHO, S. A.**; SILVA, C. M. B. L.; PIRES, A. M.; LIMA, S. A. M.; “Preparação e caracterização de complexos luminescentes tetrakis- β - dicetonatos de Eu³⁺”, CIC UNESP - Congresso de Iniciação Científica, 2016, Presidente Prudente - SP.

- NEVES, M. D.; YOSHIMURA, G. K.; **CASTILHO, S. A.** ; MESSIAS, I. A.; ARAYA, A. M. O.; “Meio Ambiente e Radiações Ionizantes e Não Ionizantes: Entrevista sobre

conhecimentos sobre radiação”, 8º Congresso de Extensão Universitária da UNESP, 2015, Presidente Prudente - SP.

Apresentações de trabalho e/ou palestra

- Produção de vídeo de difusão de conhecimento científico para o quadro Pesquisa CERSusChem, “Reações em cascata enzimática, quimioenzimática e fotoenzimática: Perspectivas para uma síntese orgânica mais sustentável”, disponível no canal do YouTube “CERSusChem – Difusão”, 2022. (<https://www.youtube.com/channel/UCrZVjDokUn1OwSw6t4MxtYQ/featured>)
- Apresentação de trabalho em modalidade oral: CASTILHO, S. A.; TORDARO, E. A.; MILAGRE, C. D. F.; “Cascatas bienzimáticas para a síntese b-hidroxiamidas quirais” no I Simpósio do ACS UFRJ Student Chapter, de 15 a 18 de março de 2021.
- Apresentação de trabalho: CASTILHO, A. A.; TORDATO, E. A.; MACHADO, L. C.; MILAGRE, C. D. F.; “Cascatas bienzimáticas para a síntese de hidroxiamidas quirais: avaliação do escopo de substratos” no II Workshop INCTBioNat, São Pedro-SP, de 13 a 15 de agosto de 2019.
- Apresentação de Trabalho: CASTILHO, S. A.; PIRES, A. M.; SILVA, C. M. B. L.; LIMA, S. A. M.; “Preparação e caracterização de complexos luminescentes tetrakis-b-dicetonados de Eu³⁺” no Congresso de Iniciação Científica (CIC), Presidente Prudente-SP, 2016.

Participação em eventos

- I Simpósio ACS Student Chapter – UFRJ, 2021.
- II Workshop INCTBioNat, São Pedro, 2019.
- II Simpósio de Pesquisa em Química, 2018.
- VII SEQUIPP – VII Semana da Química de Presidente Prudente, 2018.
- Congresso de Iniciação Científica – CIC, 2016.
- V SEQUIPP – V Semana da Química de Presidente Prudente, 2015.

- II SEQUIFISPP – II Semana da Química e Física de Presidente Prudente, 2013.

*Aos meus pais,
Amélia e Luis.*

AGRADECIMENTOS

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

À minha orientadora, Profa. Dra. Cintia Duarte de Freitas Milagre, pelo acolhimento, confiança e ensinamentos concedidos a mim ao longo destes anos.

Ao Prof. Dr. Humberto Marcio dos Santos Milagre, por todo apoio e contribuições diárias.

À FAPESP, CAPES, CNPq, CERSusChem e INCT-BioNat pelo apoio financeiro ao grupo de pesquisa.

Aos meus companheiros de laboratório, em especial os amigos: Iris, Laíza, Thaís e Laerte, por todo o companheirismo, apoio, conforto nos momentos difíceis, cafés juntos na cantina e muitas risadas nos momentos de descontração.

Aos colaboradores do IQ, em especial Albertinho, Marquinhos e Nivaldo, pelo auxílio cotidiano com as atividades da pesquisa.

À Profa. Dra. Isabele Rodrigues Nascimento, pela disponibilização de seu equipamento para a realização das análises de HPLC, e à Doutoranda Camila pelo auxílio com a operação do equipamento. À Profa. Dra. Lourdes Campaner dos Santos pelo empréstimo de colunas cromatográficas.

Ao Prof. Dr. Fernando Antônio Santos Coelho, pela disponibilização de seu equipamento para a realização das análises de HPLC, e ao Doutorando Lucas André Zeoly pela operação do equipamento.

Ao grupo NuBBE, pela disponibilização do espectrômetro de massas, e à Juliana e João pelo auxílio com as análises.

À minha família, em especial meus pais Amélia e Luis, e minhas irmãs Sheila e Sabrina, pelo amor de sempre e por seguirem me apoiando e acreditando em mim. Tudo o que sou é por vocês, sempre!

À minha segunda família, os companheiros de república que me trouxeram de volta o sentimento de lar quando eu mais precisei: Andressa, Felipe e Tamy. Obrigada pelas comidas, sonecas, filmes, bebidas, shows, conversas e amor... Obrigada por tudo e por sempre.

Aos meus queridos amigos: Yan, Natália, Talita, Pedro, Camila, Edineia, Letícia, Karol, Júlia, Silmara, Glauber, Heverton, Matheus, Renato, Karolaine, Koiti, Celso, Marina e tantos outros, por estarem sempre comigo, seja perto ou longe, me apoiando e me divertindo. Obrigada por tudo.

À minha amiga Andressa, um agradecimento especial por tantos dias e noites juntas, trabalhando, rindo, chorando... Obrigada pelas muitas horas online nas videochamadas, pelos vinhos, confidências e gargalhadas.

À minha amiga Natália, um agradecimento especial por tantas noites acordadas, rindo e chorando, pela companhia de estudos desde à graduação, e por estar sempre aqui.

Aos meus Pai e Mãe de Santo, Pai Weber e Mãe Marcia, e aos meus irmãos do Ilê Axé Ogum Mege Pai Joaquim de Aruanda, por serem sempre meu porto seguro. Asè. Epa Babá, Odoyá, Kaô Kabecilê! Laroyê Exu!

Aos meus companheiros de república João Antônio, Rodolpho e Alessandro, pela convivência ao longo da estadia em Araraquara. Aos nossos mascotes: o cachorro mais carinhoso do mundo, Nick, e aos meus gatos Sirius e Chico, que mesmo não estando mais presentes sempre foram meu conforto e afago, vocês estarão pra sempre em meu coração, obrigada por serem pra sempre amor.

Às minhas recentes, mas importantes amigas, que me deram todo o apoio que puderam na reta final deste trabalho, Amanda, Ariane, Letícia e Gabriela. Obrigada por se colocarem ao meu lado, mesmo com tão pouco tempo juntas, vocês foram essenciais.

Por fim, agradeço a todos os cientistas, professores e alunos que seguem acreditando e batalhando em prol da ciência e da educação, que seguem desenvolvendo trabalhos incríveis mesmo em meio aos desmontes arquitetados contra as instituições de pesquisa e ensino no Brasil. Não percam as esperanças de que dias melhores virão, obrigada por permanecerem.

O presente trabalho foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

“Não sou esperançoso por pura teimosia, mas por imperativo existencial e histórico. [...]Minha esperança é necessária mas não é suficiente. Ela, só, não ganha a luta, mas sem ela a luta fraqueja e titubeia. Precisamos da esperança crítica, como o peixe necessita de água despoluída.”

“Num país como o Brasil, manter a esperança viva é, em si, um ato revolucionário.”

– Paulo Freire

RESUMO

A sociedade, bem como as indústrias química e farmacêutica modernas, têm exigido o desenvolvimento e a implementação de metodologias sintéticas que sejam eficientes dos pontos de vista energético, produtivo e ambiental. A fim de atender parte desta demanda, propomos neste trabalho o estudo de sistemas enzimáticos em cascata que possam ser aplicados na síntese de β -hidroxiamidas quirais de interesse econômico. A opção pelo uso de catalisadores enzimáticos atende ao princípio da química verde que recomenda o desenvolvimento de reações em condições catalíticas em detrimento às reações em condições estequiométricas, sempre que possível. Algumas vantagens competitivas são inerentes ao uso de biocatalisadores como o fato de serem originários de fontes renováveis de matéria-prima, serem biodegradáveis, requererem condições reacionais brandas, além de utilizarem solventes não tóxicos como os sistemas aquosos tamponados. Como os biocatalisadores são potencialmente regio-, quimio- e enantiosseletivos, o número de etapas reacionais é reduzido por não requerer etapas de proteção/desproteção de grupos funcionais. Aliado às estas vantagens, o uso de sistemas multienzimáticos em cascata ainda propicia menor geração de resíduos, uma vez que dispensa o isolamento e purificação dos intermediários sintéticos. Um trabalho anterior desenvolvido em nosso grupo de pesquisa estudou sistemas em cascata sequencial e simultânea para a síntese das β -hidroxiamidas quirais a partir da benzoilacetonitrila, tendo resultados bastante promissores utilizando as enzimas nitrilas hidratases e cetorredutases como catalisadores. Buscando avaliar o escopo de substratos para as cascatas desenvolvidas, o presente trabalho trata da avaliação das influências estereoeletrônicas de grupos doadores e retiradores de elétrons ligados nas posições *orto*, *meta* e *para* do anel aromático da benzoilacetonitrila sobre a atividade das enzimas envolvidas nas cascatas desenvolvidas anteriormente. Através das reações em cascata apresentadas neste trabalho, foi possível observar a supressão da atividade da cetorredutase frente à substratos *orto* e *meta* substituídos, sugerindo impedimentos estéricos, observados também para as nitrilas hidratases avaliadas. Assim, os substratos para-substituídos foram submetidos às reações em cascata, onde as β -hidroxiamidas para-substituídas foram obtidas com conversões acima de 87%.

Palavras-chave: biocatálise; reação em cascata; β -hidroxiamidas; NHase; KRED.

ABSTRACT

Society, as well as the modern chemical and pharmaceutical industries, have demanded the development and implementation of synthetic methodologies that are efficient from an energy, production and environmental point of view. In order to meet part of this demand, we propose in this work the study of cascade enzyme systems that can be applied in the synthesis of chiral β -hydroxyamides of economic interest. The option to use enzymatic catalysts meets the principle of green chemistry, which recommends the development of reactions under catalytic conditions instead of reactions under stoichiometric conditions, whenever possible. Some competitive advantages are inherent to the use of biocatalysts, for example, these catalysts originate from renewable sources of raw material, are biodegradable, require mild reaction conditions in terms of pH, temperature and pressure, in addition to using non-toxic solvents such as buffered aqueous systems. As biocatalysts are potentially regiochemo- and enantioselective, the number of reaction steps is reduced as they do not require functional group protection/deprotection steps. Allied to these advantages, the use of cascaded multienzymatic systems also provides less waste generation, as it does not require the isolation and purification of synthetic intermediates. Previous work developed in our research group studied sequential and simultaneous cascade systems for the synthesis of chiral β -hydroxyamides from benzoylacetone nitrile, with very promising results using the enzymes nitrile hydratase and ketoreductase as catalysts. Seeking to evaluate the scope of substrates for the developed cascades, the present work deals with the evaluation of the stereoelectronic influences of electron donor and withdrawn groups linked in the ortho, meta and para positions of the benzoylacetone nitrile substrate's aromatic ring, on the activity of enzymes involved in the developed cascades previously. Through the cascade reactions presented in this work, it was possible to observe the suppression of ketoreductase activity against ortho and meta substituted substrates, suggesting steric impediments, also observed for the evaluated nitrile hydratases. Thus, the para-substituted substrates were subjected to cascade reactions, where the para-substituted β -hydroxyamides were obtained with conversions above 87%.

Keywords: biocatalysis; cascade reaction; β -hydroxyamides; NHase; KRED.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Estrutura molecular do Levamisol, Fluoxetina e análogos.....	22
Figura 2 – Esquema geral para uma cascata (a) simultânea e (b) sequencial	26
Figura 3 – Representação estrutural de uma NHase ferro-dependente	30
Figura 4 – Representação estrutural de uma cetorredutase	33
Figura 5 – Cromatograma (CG-FID) obtido para o produto 2g	53
Figura 6 – Cromatograma (GC-FID) obtido para o produto 2e	55
Figura 7 – Cromatograma (CG-FID) obtido para o produto <i>rac</i> -3g em coluna Restek® RTX-5	57
Figura 8 – Cromatograma (HPLC-DAD) obtido para o produto <i>rac</i> -3g em coluna quiral Chiralpak® IB.....	59
Figura 9 – Cromatogramas (HPLC-DAD) obtidos em coluna quiral Chiralpak® IB para os produtos <i>rac</i> -3g e 3g.....	61
Figura 10 – Cromatograma (CG-FID) obtido para o produto <i>rac</i> -4f	64

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Programação dos métodos cromatográficos em CG-FID utilizando as colunas A e B	40
Tabela 2 – Programação dos métodos cromatográficos em HPLC-UV, em modo isocrático.....	42
Tabela 3 – Dados obtidos para a síntese dos produtos 2a-h.....	53
Tabela 4 – Conversão dos substratos em 2a-h utilizando NHase 0257 e NHase 016...54	
Tabela 5 – Dados das sínteses dos compostos <i>rac</i> -3a-h	58
Tabela 6 – Conversão dos substratos 1a-h catalisada por KRED recombinante	60
Tabela 7 – Avaliação da atividade da KRED em 8 horas de reação.....	62
Tabela 8 – Dados obtidos para a síntese dos produtos <i>rac</i> -4f-h.....	64
Tabela 9 – Resultados obtidos na avaliação dos sistemas em cascata	66

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1 – Esquema geral para a obtenção das β -hidroxiamidas (4a–h).....	22
Esquema 2 – Representação geral da cascata multienzimática para a síntese da L-ribulose	25
Esquema 3 – Síntese de β -hidroxiamidas catalisada por complexo de rutênio	26
Esquema 4 – Síntese de β -hidroxiamidas por via quimioenzimática	27
Esquema 5 – Reações em cascata sequencial e simultânea para a obtenção da β -hidroxinitrila de interesse	28
Esquema 6 – Hidratação de nitrilas para a obtenção de amidas através da enzima NHase	29
Esquema 7 – Uma das propostas mecanísticas para a hidratação de uma nitrila promovida pela enzima NHase	32
Esquema 8 – Reação geral para a redução de carbonilas por KRED	33
Esquema 9 – Mecanismo da redução da carbonila promovida por uma KRED	34
Esquema 10 – Reação geral para a síntese dos produtos 2a-h	52
Esquema 11 – Esquema geral para as reações dos substratos 1a-h com a NHase	54
Esquema 12 – Reação geral para a síntese dos produtos <i>rac</i> -3a-h	57
Esquema 13 – Biorredução de 1a-h catalisada por KRED recombinante.....	59
Esquema 14 – Esquema geral para a hidratação de β -hidroxinitrilas para a obtenção de β -hidroxiamidas.....	63

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

CCD – Cromatografia em Camada Delgada

DMSO – Dimetilsulfóxido

DSC – Do inglês *Dry Silica Chromatography* – Cromatografia em sílica seca

ee – Excesso enantiomérico

GC-FID – Do inglês *Gas Chromatography – Flame Ionization Detector* – Cromatografia gasosa acoplada ao detector de ionização em chama

GC-MS – Do inglês *Gas Chromatography – Mass Spectrometry* – Cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massas

HPLC – Do inglês *High Performance Liquid Chromatography* – Cromatografia Líquida de Alta Performance

HRMS – Do inglês *High Resolution Mass Spectrometry* – Espectrometria de Massas de Alta Resolução

IPA – Do inglês *Isopropyl alcohol* – Álcool isopropílico

IUBMB – Do inglês *International Union of Biochemistry and Molecular Biology* – União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular

J – Constante de acoplamento

KRED – Do inglês *Ketoreductases* – Cetorredutases

m/z – Razão massa carga

NADH – Dinucleotídeo de nicotinamida e adenina

NADPH – Fosfato de dinucleotídeo de nicotinamida e adenina

NHases – Nitrila Hidratases

PBS – Do inglês *Phosphate-Buffered Saline* – Tampão fosfato-salino

ppm – Partes por milhão

RMN de ^1H – Ressonância magnética nuclear de hidrogênio

RMN de ^{13}C – Ressonância magnética nuclear de carbono

rpm – Rotações por minuto

t.a. – Temperatura ambiente

TMS – Tetrametilsilano

t_R – Tempo de retenção

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	22
1.1	Aspectos Gerais	22
1.2	Resultados anteriores.....	27
1.3	Sobre as Enzimas.....	29
1.3.1	Nitrila Hidratase (NHase).....	29
1.3.2	Cetorreductase (KRED).....	32
2	OBJETIVOS.....	36
2.1.1	Estratégia para o desenvolvimento do trabalho.....	36
3	PARTE EXPERIMENTAL	37
3.1	Considerações Gerais.....	37
3.1.1	Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio e de Carbono (RMN de ^1H e ^{13}C)	37
3.1.2	Espectrometria de Massas de Alta Resolução (HRMS)	37
3.1.3	Métodos Cromatográficos.....	38
3.1.3.1	Cromatografia em Camada Delgada (CCD)	38
3.1.3.2	Cromatografia Flash em Sílica Seca (DSC)	38
3.1.3.3	Cromatografia Gasosa Acoplada ao Detector de Ionização em Chama (GC-FID)	38
3.1.3.4	Cromatografia Gasosa Acoplada a Espectrometria de Massas (GC-MS)	40
3.1.3.5	Cromatografia Líquida de Alta Performance (HPLC)	41

3.1.4	Biocatalisadores	42
3.1.5	Reagentes e Solventes.....	42
3.2	Procedimentos Experimentais	43
3.2.1	Síntese das β -cetoamidas (2a-h).....	43
3.2.1.1	Via química.....	43
3.2.1.2	Via enzimática	43
3.2.1.3	Dados espectroscópicos e espectrométricos	44
3.2.2	Síntese das β -hidroxinitrilas (3a-h)	46
3.2.2.1	Via química.....	46
3.2.2.2	Via enzimática	47
3.2.2.3	Dados espectroscópicos e espectrométricos	47
3.2.3	Síntese das β -hidroxiamidas (4f-h).....	48
3.2.3.1	Via química.....	48
3.2.3.2	Via enzimática: Reações em Cascata	48
3.2.3.2.1	Cascata Simultânea.....	48
3.2.3.2.2	Cascata Sequencial.....	49
3.2.3.2.3	Dados Espectroscópicos e espectrométricos	50
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	51
4.1	Síntese das β -cetoamidas (2a-h)	52
4.1.1	Via Química	52
4.1.2	Via Enzimática	54

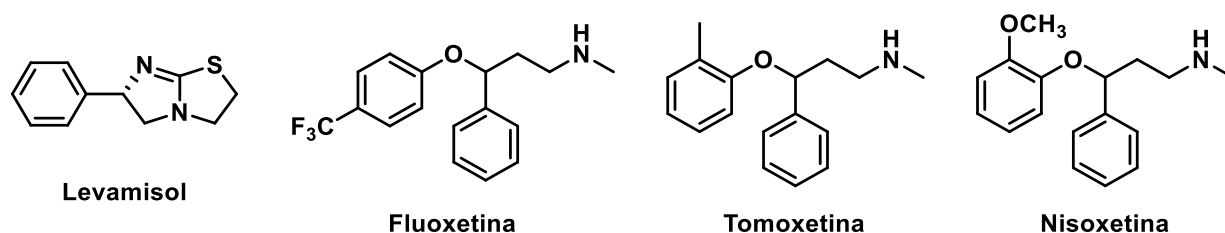
4.2	Síntese das β -hidroxinitrilas (3a-h)	56
4.2.1	Via Química	56
4.2.2	Via Enzimática	59
4.3	Síntese das β -hidroxiamidas (4f-h)	63
4.3.1	Via Química	63
4.3.2	Via enzimática: Avaliação dos sistemas em cascata	65
5	CONCLUSÕES	68
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	70
6	APÊNDICE	75
6.1	Cromatogramas	75
6.2	Espectros de Massas	78
6.3	Espectros de RMN	90

1 INTRODUÇÃO

1.1 Aspectos Gerais

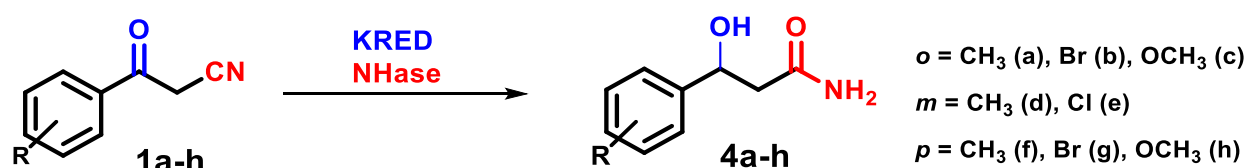
A obtenção de β -hidroxiamidas quirais tem sido de grande interesse para a indústria química, visto que a relativa facilidade de transformação de seus grupos funcionais torna possível a síntese de diversos materiais economicamente atrativos, como polímeros (SANZ SHARLEY; WILLIAMS, 2017; SATHE et al., 2018) e heterociclos (GONZÁLEZ-FERNÁNDEZ et al., 2016). Dentre as aplicações, estes compostos contam ainda com interesse especial da indústria farmacêutica, onde são considerados blocos construtores viabilizando a síntese de fármacos amplamente utilizados como, por exemplo, o levamisol (KAMAL et al., 2005), a fluoxetina e análogos (KAMAL; KHANNA; RAMU, 2002; SCHRITTWIESER et al., 2009; XU et al., 2013) (Figura 1).

Figura 1 – Estrutura molecular do Levamisol, Fluoxetina e análogos



Para este fim, uma das estratégias de obtenção destes compostos dá-se através da redução de cetonas pró-quirais e hidratação de nitrilas. Um anel aromático contendo diferentes grupos funcionais como substituintes proporciona, ainda, uma maior variedade quanto às possibilidades de produtos formados, visando a síntese de compostos já conhecidos, ou mesmo novos produtos. Assim, os substratos de interesse no desenvolvimento deste trabalho são derivados *orto*-, *meta*-, e *para*- substituídos da benzoilacetonitrila (**1a–h**) (Esquema 1).

Esquema 1 – Esquema geral para a obtenção das β -hidroxiamidas (**4a–h**)



Contudo, a obtenção destes compostos via síntese química possui alguns aspectos pouco atrativos do ponto de vista econômico e ambiental. Isto porque, de maneira geral, as metodologias já descritas contam, em sua grande maioria, com a utilização de condições reacionais drásticas em termos de temperatura, pH e pressão, reagentes tóxicos e escassos, associadas a etapas de purificação (GONZÁLEZ-FERNÁNDEZ et al., 2016; GONZÁLEZ-FERNÁNDEZ; CROCHET; CADIerno, 2016; VARJOSAARI et al., 2018). Além disso, um dos maiores desafios das reações de redução de carbonilas pró-quirais à suas respectivas hidroxilas é alcançar uma elevada estereosseletividade, em casos que requerem produtos enantiomericamente puros, visto que as metodologias mais comuns levam à produtos racêmicos ou com excessos enantioméricos moderados (GONZÁLEZ-FERNÁNDEZ et al., 2016; KITANOSONO; XU; KOBAYASHI, 2014). Na síntese química de amidas primárias a partir de nitrilas, o desafio é a seletividade da reação, uma vez que o respectivo ácido carboxílico pode ser formado como subproduto e consequente redução dos rendimentos (ZHAN et al., 2018). Assim, além de não garantir resultados plenamente satisfatórios quanto aos produtos, estas metodologias ainda demandam de uma elevada utilização de recursos, tornando altos os custos envolvidos nos processos e gerando uma grande quantidade de resíduos, ambos causando impactos preocupantes ao meio ambiente.

Frente a isto, além da constante busca pela redução de custos, a comunidade científica tem se mostrado cada vez mais empenhada na otimização de suas metodologias visando também a redução dos impactos ambientais causados pelos processos químicos, utilizados em larga escala atualmente. Deste modo, em 1998, foram postulados pelos pesquisadores John Warner e Paul Anastas os doze princípios da química verde, cujos fundamentos incluem a modificação dos processos mais tradicionais por métodos que empreguem a utilização de catalisadores, condições reacionais mais brandas, compostos oriundos de fontes renováveis, prevenção à geração de resíduos, entre outros (ANASTAS; EGHBALI, 2010).

Assim, definida como a transformação de um substrato não-natural através de etapas catalisadas por células íntegras, enzimas isoladas ou outros catalisadores biológicos, a biocatálise tornou-se uma ferramenta atrativa na busca de processos sintéticos mais ambientalmente amigáveis (SHELDON; WOODLEY, 2018). Isto porque

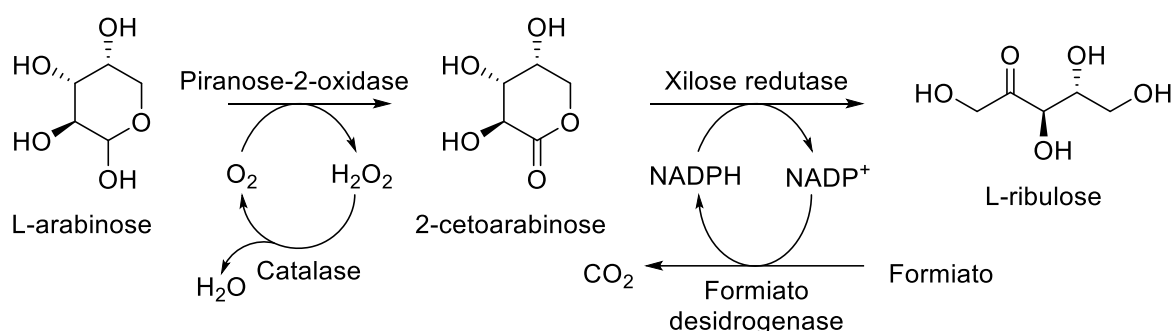
as enzimas utilizadas costumam funcionar em condições reacionais brandas, como temperatura e pressão ambiente, soluções aquosas tamponadas com pH próximo ao fisiológico, além da utilização de pouca ou nenhuma quantidade de cossolvente para a solubilização do substrato. Além dos requerimentos de condições reacionais brandas, as enzimas possuem ainda a vantagem de serem biodegradáveis e oriundas de fontes renováveis de matéria-prima, podendo ainda ser regio-, quimio- e enantiosseletivas frente a transformação de substratos polifuncionalizados. A junção destes aspectos possibilita que sínteses mais elaboradas sejam realizadas com relativa facilidade, já que evita etapas de proteção e desproteção comumente necessárias nas sínteses por vias químicas, além de prevenir a formação de subprodutos como isômeros ou produtos de rearranjos indesejados (JEGANNATHAN; NIELSEN, 2013), como por exemplo a transformação de amidas em seus respectivos ácidos carboxílicos ou a redução da cetona de forma racêmica na obtenção das β -hidroxiamidas alvos deste estudo, resultando, portanto, em uma redução significativa de custos e esforços além da consequente redução de resíduos gerados no processo.

Outra ferramenta promissora para o desenvolvimento de rotas sintéticas mais ambientalmente amigáveis para sínteses com múltiplas etapas de transformação são as reações em cascata, que consistem em proporcionar condições para que mais de uma reação aconteça em um mesmo frasco reacional (SCHRITTWIESER et al., 2018; SPERL; SIEBER, 2018). Em células, transformações devem ocorrer de maneira sinérgica para a promoção das sínteses ou decomposições necessárias à manutenção do metabolismo celular, e inspirando-se nestes sistemas, diversos estudos vêm sendo reportados acerca do desenvolvimento de reações artificiais em cascata, possibilitando o acesso a compostos de interesse comercial de difícil acesso, podendo ser eles até mesmo instáveis ou tóxicos (CASTILHO; MILAGRE; MILAGRE, 2021; RICCA; BRUCHER; SCHRITTWIESER, 2011) . Apesar do desafio de um sistema reacional unificado, onde todos os componentes devem ser compatíveis entre si, a utilização de sistemas reacionais em cascata demonstra ser uma ferramenta bastante vantajosa na busca por processos mais verdes, pois a junção das etapas reacionais evita a extração e purificação dos intermediários sintéticos. Assim, além da prevenção à diminuição dos rendimentos devido às perdas nos processos de isolamento dos mesmos, há uma redução

significativa na geração de resíduos e custos relacionados ao seu tratamento e, consequentemente, o consumo de recursos como solventes, energia, espaço e tempo.

A exemplo disto, recentemente Chuaboon e colaboradores (2019) desenvolveram um elegante sistema multienzimático em cascata para síntese de L-ribulose a partir da L-arabinose (Esquema 2), utilizando quatro enzimas, onde o produto foi obtido com cerca de 80% de rendimento em aproximadamente 7 horas reacionais, contornando os problemas de operação e custo reportados anteriormente para a síntese deste produto em metodologias mais usuais, inclusive as que dispunham de enzimas em etapas isoladas (CHUABOON et al., 2019).

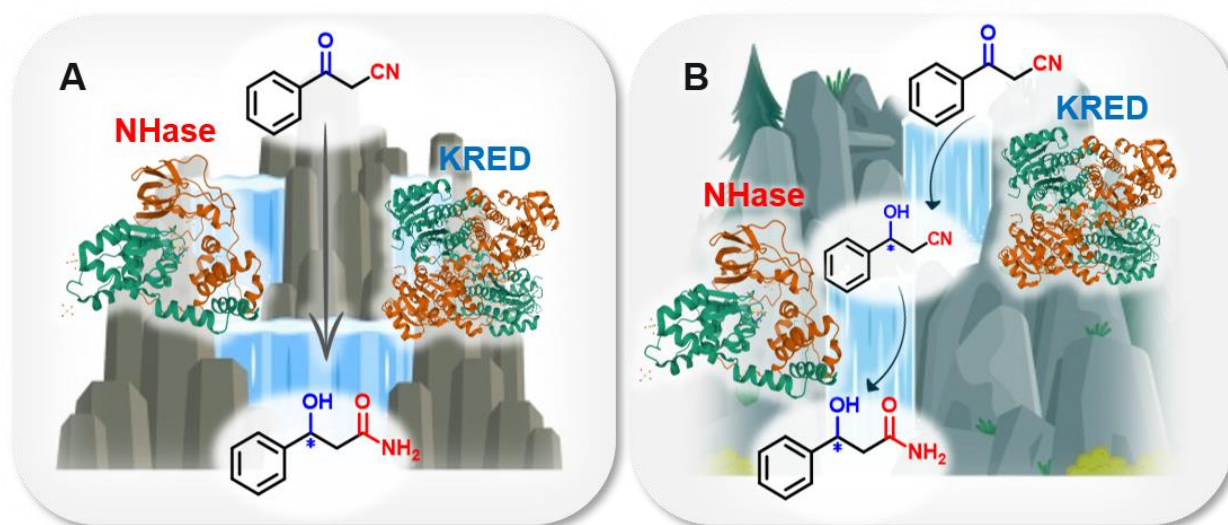
Esquema 2 – Representação geral da cascata multienzimática para a síntese da L-ribulose



Fonte: Adaptado de (CASTILHO; MILAGRE; MILAGRE, 2021)

As reações em cascata podem ser classificadas por vários parâmetros, indo desde o número de etapas, tipos de reações envolvidas, até o número e tipos de catalisadores utilizados (CASTILHO; MILAGRE; MILAGRE, 2021). No presente trabalho foram empregadas duas enzimas, nitrila hidratase (NHase) e cetorredutase (KRED) como catalisadores em duas diferentes configurações de cascata, objetivando avaliar o efeito da cronologia frente às reações de interesse. Para isto, avaliou-se um sistema em cascata simultânea, isto é, quando as duas enzimas são adicionadas ao frasco reacional ao mesmo tempo (Figura 2a), além de uma cascata sequencial, quando a segunda enzima é adicionada ao frasco reacional somente após a completude da primeira transformação. (Figura 2b).

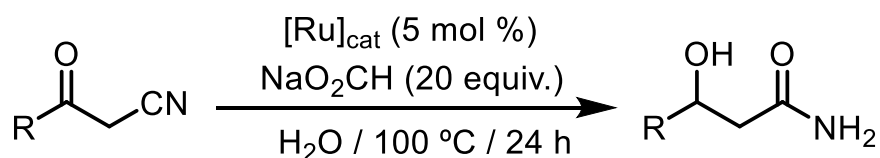
Figura 2 – Esquema geral para uma cascata (a) simultânea e (b) sequencial



Fonte: Adaptado de (CASTILHO; MILAGRE; MILAGRE, 2021).

Abordagens envolvendo processos catalíticos em cascatas e/ou enzimáticos já vem sendo objeto de estudo inclusive para a síntese de β -hidroxiamidas. Como um exemplo disto, em uma estratégia recente, González-Fernández e colaboradores (2016) conseguiram realizar a síntese tandem de β -hidroxiamidas em meio aquoso utilizando um catalisador metálico à base de rutênio combinado com formiato de sódio (Esquema 3). Contudo, apesar do aspecto promissor quanto aos bons rendimentos (>70%) e sem utilização de solventes orgânicos, a metodologia conta com a necessidade de um sistema reacional sob atmosfera inerte, temperaturas elevadas, além de uma grande quantidade de formiato de sódio e do alto custo dos compostos de rutênio (GONZÁLEZ-FERNÁNDEZ; CROCHET; CADIerno, 2016).

Esquema 3 – Síntese de β -hidroxiamidas catalisada por complexo de rutênio

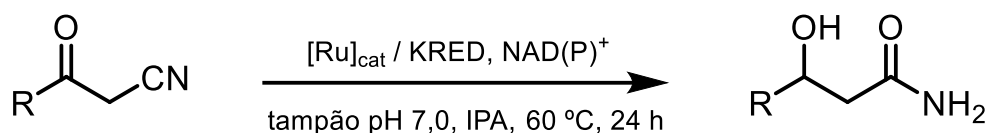


Fonte: Adaptado de (GONZÁLEZ-FERNÁNDEZ; CROCHET; CADIerno, 2016).

Uma segunda estratégia publicada recentemente demonstra a utilização de um catalisador metálico juntamente com uma enzima para a obtenção das β -hidroxiamidas.

Liardo e colaboradores (2018) conseguiram, através da utilização de um complexo de rutênio e variando diferentes cetorredutases (KRED), sintetizar diferentes β -hidroxiamidas com conversões a partir de 74% e com ee >99% (Esquema 4). Estes compostos foram obtidos em meio tamponado e por meio de uma cascata simultânea. Contudo, para um bom desempenho do catalisador metálico foi necessário que o sistema atuasse sob a temperatura de 60 °C (LIARDO et al., 2018a). Assim, novamente o custo elevado deste tipo de catalisador, somado a necessidade de temperaturas relativamente elevadas, além de promover um maior gasto energético pode ocasionar a desnaturação da estrutura enzimática dependendo da estabilidade térmica da enzima em questão.

Esquema 4 – Síntese de β -hidroxiamidas por via quimioenzimática

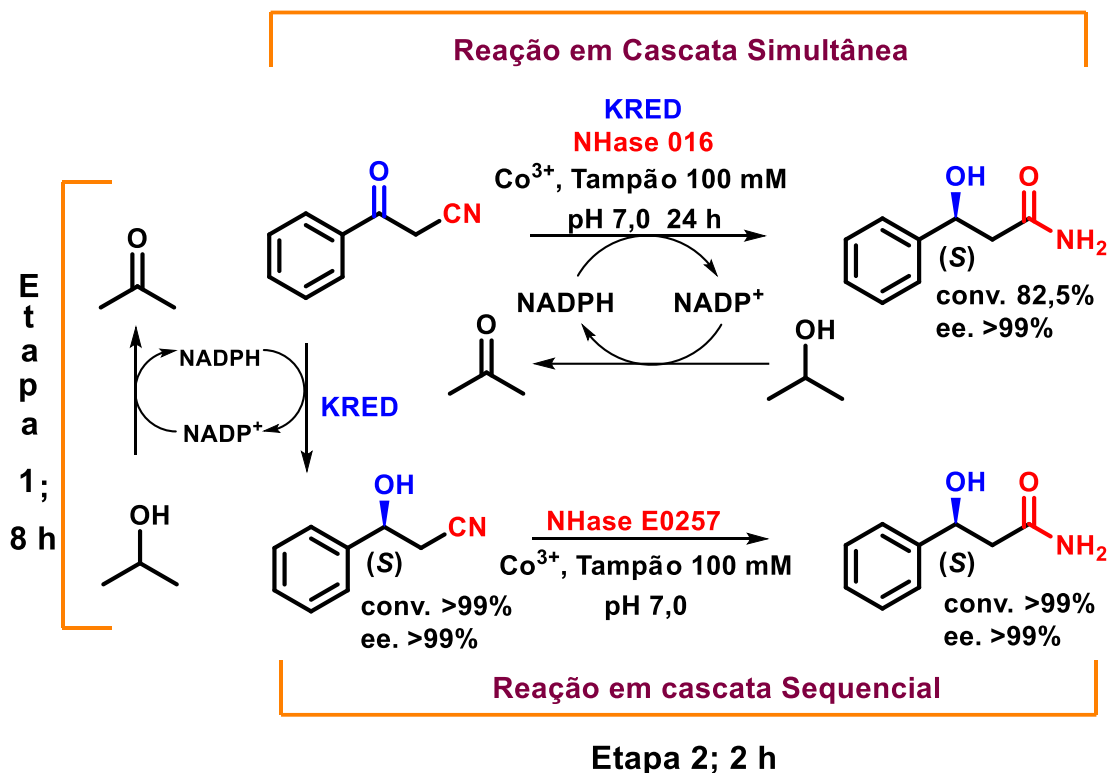


Fonte: Adaptado de (LIARDO et al.; 2018).

1.2 Resultados anteriores

Diante da busca pelo aprimoramento dos processos para obtenção destes compostos, recentemente em nosso grupo desenvolveu-se um trabalho cujo objetivo foi avaliar a utilização de cascatas enzimáticas sequenciais e simultâneas envolvendo transformações no substrato benzoilacetonitrila, cuja estrutura não possui substituintes ligados ao anel aromático, empregando para isto as enzimas nitrilas hidratases (NHases), cetorredutase (KRED) e ω -transaminases (ω -TA). No trabalho em questão, foram realizadas triagens de atividades enzimáticas frente ao substrato benzoilacetonitrila, entre elas a avaliação de 13 diferentes NHases, além de 3 diferentes KRED isoladas, para posterior desenvolvimento de reações em cascatas simultâneas e sequenciais. Resultados bastante positivos foram obtidos para ambos os sistemas em cascata utilizando NHases e KRED, nos quais obtiveram-se elevadas conversões e excessos enantioméricos para o produto de interesse (Esquema 5).

Esquema 5 – Reações em cascata sequencial e simultânea para a obtenção da β -hidroxinitrila de interesse



Fonte: Adaptado de (TORDATO, E. A.; 2018).

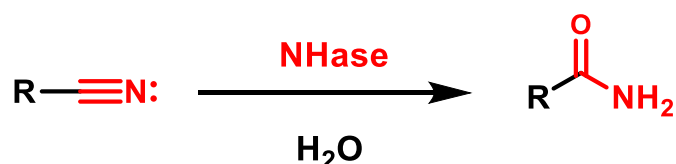
Entretanto, ainda não se tem o conhecimento acerca do comportamento enzimático observado frente a substratos análogos substituídos no anel aromático e, nos casos promissores, como será a influência destes grupos substituintes quanto ao andamento da reação. Assim, o presente trabalho segue em continuidade ao estudo anterior, na intenção de avaliar os efeitos estereoeletrônicos de substituintes doadores e retiradores de elétrons nas posições *orto*, *meta* e *para* do anel aromático em relação à cetonitrila, sendo também o primeiro estudo a ser reportado envolvendo a utilização de KRED e NHase em sistemas reacionais em cascata para a obtenção de β -hidroxiamidas (Esquema 1).

1.3 Sobre as Enzimas

1.3.1 Nitrila Hidratase (NHase)

Classificada pela União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular (IUBMB, do inglês *International Union of Biochemistry and Molecular Biology*) como EC 4.2.1.84, a Nitrila Hidratase, cuja presença foi identificada pela primeira vez em 1980, em *Rhodococcus rhodochrous* J1 (ASANO; TANI; YAMADA, 1980), é uma importante enzima para a indústria química. Sua atividade, responsável por promover a reação de hidratação de uma nitrila em sua amida correspondente (Esquema 6), sem ocasionar a formação do seu respectivo ácido carboxílico, despertou o interesse em sua utilização para a síntese de compostos de interesse comercial. Neste sentido, as NHases tornaram-se uma importante ferramenta para a indústria na produção em larga escala de produtos como a acrilamida e nicotinamida (ASANO et al., 1982; MATHEW et al., 1988; PRASAD; SHARMA; BHALLA, 2005).

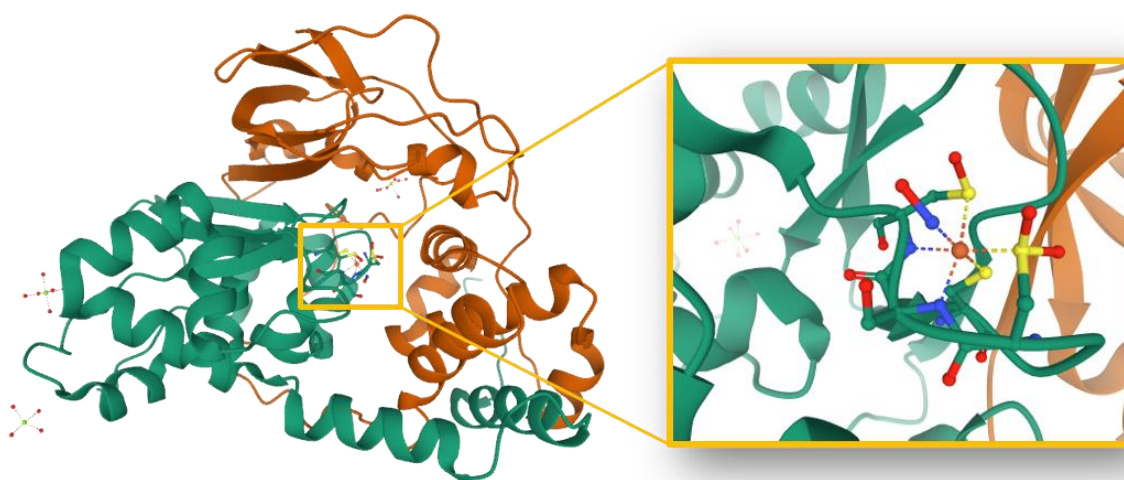
Esquema 6 – Hidratação de nitrilas para a obtenção de amidas através da enzima NHase



Em termos estruturais, trata-se de uma enzima que contém duas subunidades heterólogas α e β , que normalmente são observadas com massas moleculares similares e equimolares, podendo variar dependendo de sua fonte (CHENG; XIA; ZHOU, 2020). É também uma metaloenzima, contendo como outra variável de sua origem a presença em sua estrutura de um grupo ferro não-heme (Fe^{3+}) ou cobalto não-corrinóide (Co^{3+}) no centro catalítico (Figura 3), contando com algumas exceções como a NHase de *Rhodococcus jostii*, que possui três íons (Co, Cu e Zn) em seu sítio ativo, enquanto outros exemplos podem conter íons manganês, por exemplo (OKAMOTO; ELTIS, 2007). Tendo como função auxiliar a hidratação das nitrilas, além de poder auxiliar no dobramento da enzima (CHENG; XIA; ZHOU, 2020), a identificação do centro metálico de uma NHase é uma característica importante também por ser responsável por definir se a enzima será ou não suscetível à fotoativação, visto que este é um fenômeno observado somente para

as NHases do tipo ferro. Isto ocorre porque o complexo não-heme promove a fotoativação através de uma alteração conformacional na subunidade β , o que faz com que a molécula de óxido nítrico presente na forma endógena seja liberada a partir do centro metálico não-heme, tornando a enzima ativada ao ligar-se agora a uma molécula de água ou íon hidróxido, de acordo com o pH do meio (KAYANUMA et al., 2016; SUPREETHA et al., 2019)

Figura 3 – Representação estrutural de uma NHase ferro-dependente



Fonte: Protein Data Bank (PDB) – Nitrosylated Fe-type nitrile hydratase – 2ZPB

O sítio ativo das NHases, sejam elas dependentes de ferro ou cobalto, é constituído por quatro resíduos de aminoácidos conservados pertencentes à subunidade α , sendo eles três cisteínas e uma serina, que desempenham o papel de coordenar-se ao centro metálico, de forma que os átomos de enxofre de dois resíduos de cisteína ligam-se ao metal equatorialmente, enquanto o terceiro liga-se na direção axial (YANO; OZAWA; MASUDA, 2008). Pode-se observar também um resíduo de tirosina na região de ligação do substrato e, proveniente da subunidade β , os resíduos de Arg56 e Arg141, fornecendo estabilidade ao sítio ativo por meio de ligações de hidrogênio (SUPREETHA et al., 2019).

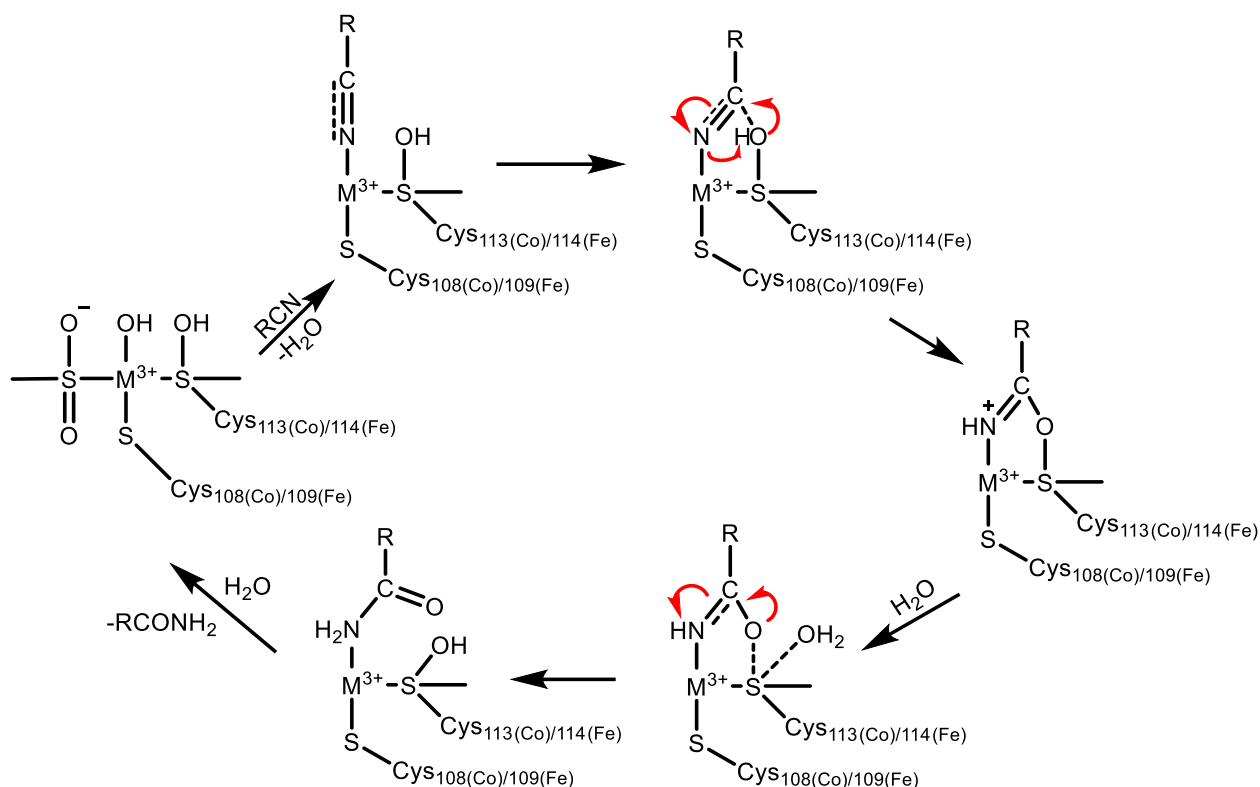
O mecanismo catalítico das NHases (Esquema 7) ainda não foi completamente elucidado e, diante disto, diversas propostas mecanísticas foram reportadas, incluindo

três hipóteses mais convencionais (CHENG; XIA; ZHOU, 2020). Dentre estas, as propostas mais recentes sugerem que a primeira etapa do mecanismo se dá através da aproximação do substrato ao centro metálico do sítio ativo, cuja ligação ocorre a partir do nitrogênio nitrílico, substituindo assim a molécula de água ou hidróxido anteriormente ligados ao íon metálico (HOPMANN; GUO; HIMO, 2007). Diante disto, o carbono nitrílico sofre um ataque para dar origem ao intermediário cíclico, sendo propostos por diferentes autores três possibilidades de aminoácidos conservados para exercer o papel de nucleófilo, sendo β Tyr72, α Ser e α Cys-SOH (HOPMANN; HIMO, 2008; MITRA; HOLZ, 2007; YAMANAKA et al., 2015).

A partir destas hipóteses, Shigeta e colaboradores (2015) desenvolveram um estudo buscando avaliar as etapas iniciais deste mecanismo, e os resultados obtidos não só suportaram a teoria de Hopmann (2008) de que a transformação se inicia com a formação do intermediário cíclico, como também determinaram que o ataque nucleofílico ao substrato é realizado pelo resíduo de aminoácido Cys114-SO⁻ (KAYANUMA et al., 2016). Este resultado vai, ainda, de encontro com um interessante estudo publicado posteriormente por Nelp e colaboradores (2016), em que um isótopo do oxigênio (¹⁸O) foi utilizado como marcador no monitoramento de uma transformação promovida pela NHase, que concluiu que o oxigênio incorporado à nitrila do substrato para dar origem à amida provém da proteína (NELP et al., 2016).

Posteriormente, foi reportada ainda por Shigeta e colaboradores (2016) uma análise das etapas seguintes desta transformação, desta vez divergindo da proposta de Hopmann (2008) que ilustra a formação de um segundo intermediário dissulfeto, sugerindo a formação do intermediário ácido imídico através do ataque direto da molécula de água ao enxofre da α Cys114 (KAYANUMA et al., 2016). Assim, após a abstração do segundo próton pelo nitrogênio do substrato, o produto é liberado, e o sítio ativo da enzima é restaurado para a disposição de um novo ciclo catalítico (PREJANÒ et al., 2017).

Esquema 7 – Uma das propostas mecanísticas para a hidratação de uma nitrila promovida pela enzima NHase



Fonte: Adaptado de (CHENG; XIA; ZHOU, 2020)

1.3.2 Cetorredutase (KRED)

Também conhecida como álcool desidrogenase (ADH) ou carbonil redutase (CR), a cetorredutase (KRED) (Figura 4) é uma enzima pertencente à classe das oxidorredutases (EC 1.1.1.1), responsável por catalisar a reação de redução da carbonila de aldeídos e de cetonas, formando álcool primário e secundário, respectivamente (Esquema 8). Para possibilitar esta transformação, contudo, as cetorredutases são dependentes dos cofatores NAD(P)H, (fosfato de dinucleotídeo de nicotinamida e adenina) ou FADH (dinucleotídeo de flavina e adenina), podendo também utilizar a forma oxidada dos cofatores para catalisar as reações inversas, promovendo a formação de aldeídos e cetonas a partir dos respectivos álcoois (HOLLMANN; ARENDS; HOLTMANN, 2011). Sua utilização é considerada atrativa devido à sua regio- e enantiosseletividade,

cujos resultados normalmente superam os obtidos através de catalisadores químicos (ZEROR et al., 2010).

Esquema 8 – Reação geral para a redução de carbonilas por KRED

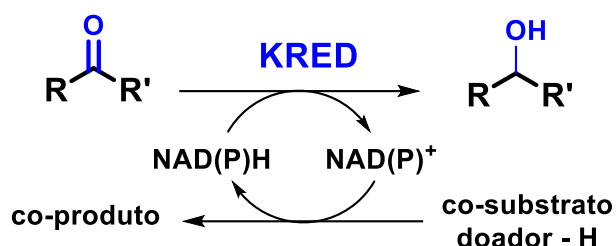
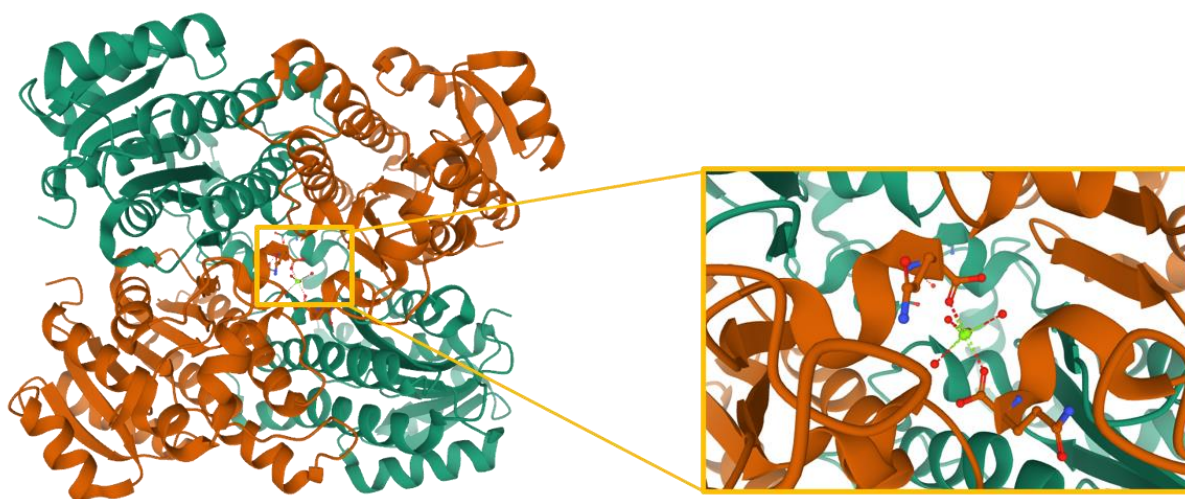


Figura 4 – Representação estrutural de uma cetorredutase

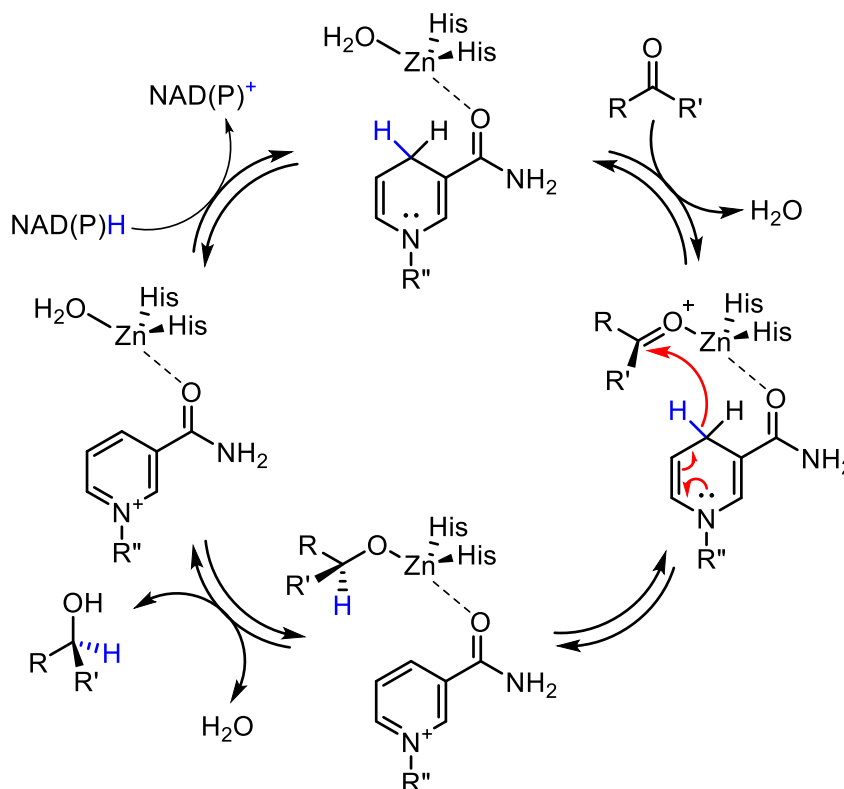


Fonte: Protein Data Bank (PDB) – Crystal structure of ketoreductase from *Lactobacillus kefir* – 4RF4

Apesar de constituírem uma superfamília com componentes que apresentam baixa identidade em sua estrutura primária, existem regiões conservadas entre elas, como uma região envolvida por duas ou três α -hélices de cada lado, onde se liga ao cofator (HANUKOGLU, 2015).

Seu mecanismo (Esquema 9) é dado através de uma transferência reversível de hidreto para o carbono carbonílico do substrato a partir do cofator, que se oxida a $\text{NAD}^+/\text{NADP}^+$. Em mecanismos de KRED dependentes de um íon metálico, o processo se inicia quando o íon (neste caso, Zn^{2+}) se complexa ao oxigênio carbonílico, fazendo com que este fique com uma densidade eletrônica positiva, tornando o carbono carbonílico mais eletrofílico. Assim, este carbono torna-se mais suscetível a um ataque nucleofílico promovido pelo hidreto do cofator. Frente a isto, o par de elétrons não-ligantes presentes no nitrogênio do cofator é deslocado a fim de manter a aromaticidade do anel, possibilitando a transferência do hidreto para o substrato, resultando no respectivo alcóxido, sendo, desta forma, a etapa enantiosseletiva da transformação, na qual a determinação da configuração do centro estereogênico formado é dada pelo impedimento estérico dos resíduos de aminoácidos presentes no sítio ativo. Por fim, uma molécula de água complexada ao metal realiza a protonação do alcóxido, dando origem ao produto hidroxilado, que é liberado do sítio ativo encerrando o ciclo catalítico (HOLLMANN; ARENDS; HOLTMANN, 2011).

Esquema 9 – Mecanismo da redução da carbonila promovida por uma KRED



Fonte: Adaptado de (HOLLMANN; ARENDS; HOLTMANN, 2011)

É válido ressaltar aqui a reversibilidade deste mecanismo como um todo, possibilitando, como mencionado anteriormente, a obtenção de aldeídos ou cetonas partindo do respectivo álcool quando utilizado o cofator em sua forma oxidada.

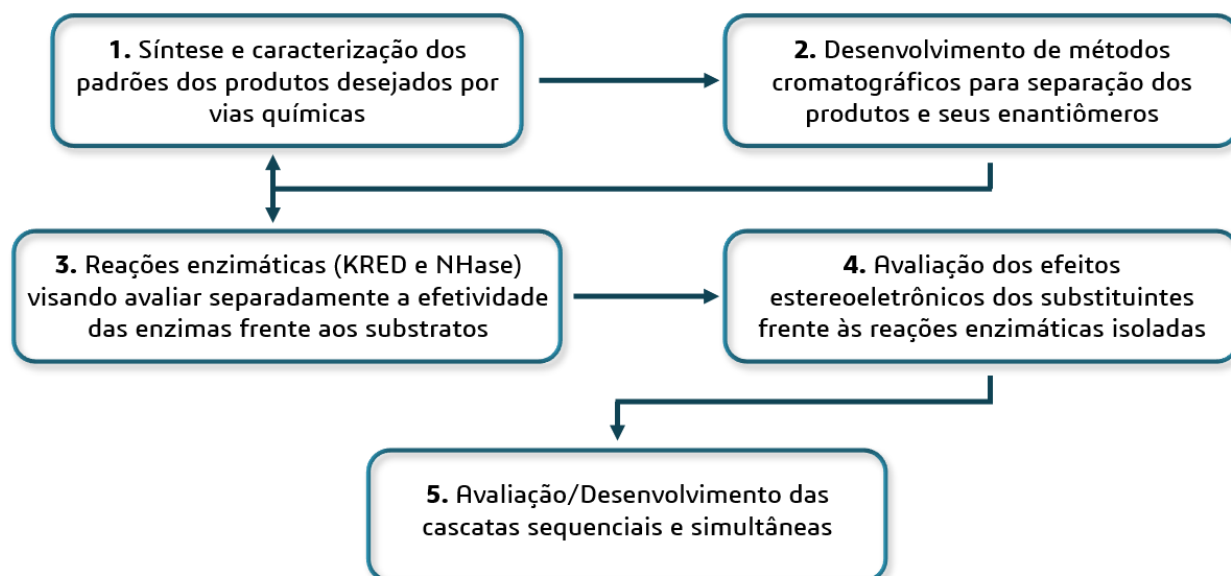
2 OBJETIVOS

Avaliar o escopo de substrato para a cascata bienzimática, sequencial e simultânea, de nitrila hidratase (NHase)/cetorreductase (KRED) na síntese de β -hidroxiamidas quirais através de metodologias em conformidade com os princípios da química verde, conforme apresentado no Esquema 1.

2.1.1 Estratégia para o desenvolvimento do trabalho

A estratégia proposta para o desenvolvimento deste trabalho encontra-se ilustrada no fluxograma a seguir:

Fluxograma 1 – Estratégias para o desenvolvimento do trabalho



A estratégia propõe a síntese preliminar de todos os compostos envolvidos (intermediários e produtos finais) por vias químicas, de forma que estes possam ser caracterizados e atuarem como produto-referência no desenvolvimento dos métodos cromatográficos para sua identificação. Desta forma, os substratos são submetidos às transformações enzimáticas ao fim das caracterizações de seus respectivos produtos da

via química, podendo ser identificados a partir dos métodos cromatográficos desenvolvidos anteriormente, para a avaliação das atividades enzimáticas.

3 PARTE EXPERIMENTAL

3.1 Considerações Gerais

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

Para as análises de espectroscopia de ressonância magnética nuclear de ^1H e ^{13}C , utilizou-se espectrofotômetro Bruker Fourier 300 (B_0 7,1 T) operando a 300,19 MHz em núcleo de hidrogênio e 75,48 MHz em núcleo de carbono. Registraram-se os deslocamentos químicos (δ) em ppm, tendo o tetrametilsilano (TMS) como referência interna e dimetilsulfóxido (DMSO-d_6) como referência externa. As constantes de acoplamento (J) foram calculadas Hertz (Hz) e definidas como: duplete (d), duplo duplete (dd), duplo tripleto (dt), multiplete (m), quarteto (q), simpleto (s), simpleto largo (sl), tripleto (t) e sexteto (st).

3.1.2 Espectrometria de Massas de Alta Resolução (HRMS)

Para as análises de espectrometria de massas de alta resolução, utilizou-se o espectrômetro de massas XEVO G2 XS, da marca Waters (Milliford, EUA), equipado com fonte de ionização por eletrospray com configuração ESI-QqTOF, sendo este um equipamento híbrido contendo um analisador quadrupolo em linha com célula de colisão e analisador TOF. Este equipamento pertence ao Núcleo de Bioensaios, Biossíntese e Ecofisiologia de Produtos Naturais (NuBBE), localizado no Departamento de Bioquímica e Química Orgânica do Instituto de Química da UNESP (IQ/Unesp – Araraquara-SP).

3.1.3 Métodos Cromatográficos

3.1.3.1 Cromatografia em Camada Delgada (CCD)

Para o monitoramento das reações, as análises de cromatografia em camada delgada foram realizadas com a utilização de cromatoplasmas da marca Macherey Nagel em suporte de alumínio e filme em sílica gel 60, com 20 x 20 cm de dimensão e indicador UV254. Para a revelação das amostras, foi utilizada irradiação por lâmpada UV254, além de soluções de ácido fosfomolibídico e anisaldeído como reveladores, contando com o aquecimento rápido com pistola de ar quente a aproximadamente 300 °C,

3.1.3.2 Cromatografia Flash em Sílica Seca (DSC)

Para os procedimentos de purificação dos compostos por DSC, utilizou-se sílica gel da marca Macherey Nagel (230-300 mesh), com gradiente de eluição constituído por acetato de etila:heptano ou diclorometano:heptano.

3.1.3.3 Cromatografia Gasosa Acoplada ao Detector de Ionização em Chama (GC-FID)

Realizaram-se no Laboratório Milagre as avaliações das amostras por meio de Cromatografia Gasosa Acoplada ao Detector de Ionização em Chama (GC-FID), utilizando um cromatógrafo gasoso Shimadzu – Modelo GC-2010 Plus, acoplado a um detector de ionização por chamas, sendo que o sistema conta ainda com o auxílio de um injetor automático AOC – 20i. Para as análises de monitoramento reacional ou identificação dos produtos de interesse, bem como o cálculo de suas conversões e purezas, utilizou-se uma coluna capilar de sílica fundida Restek RTX®-5 (Coluna A) (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm, 5% fenil e 95% dimetilpolisiloxano). Durante as análises, manteve-se no cromatógrafo a temperatura do injetor e detector a 260 °C e 280 °C, respectivamente, operando com fluxo constante de gás H₂ de 1,17 – 1,22 mL/min. As amostras solubilizadas em solventes grau HPLC foram injetadas com volume de 1 µL e

concentração de 0,5 – 1,0 mg/mL, em modo *Split* (100:1). Os parâmetros de operação dos métodos utilizados encontram-se na Tabela 1.

No mesmo equipamento, realizaram-se as análises para a determinação de excessos enantioméricos (ee), contudo, utilizando a coluna Hydrodex® β -3P fase quiral heptaquis-(2,6-di-O-metil-3-O-pentil)- β -ciclodextrina (25 m x 0,25 mm x 0,25 μ m; Macharey-Nagel) (coluna B). O volume de injeção, concentração e modo split utilizados foram os mesmos descritos para a coluna RTX-5. Os parâmetros de operação dos métodos utilizados encontram-se na Tabela 1.

Para os cálculos das conversões baseou-se nas áreas obtidas para cada composto no cromatograma, da seguinte forma:

$$conv.(%) = [A_{\text{produto}} / (A_{\text{substrato}} + A_{\text{produto}})] \times 100\%$$

Da mesma maneira, para os cálculos dos excessos enantioméricos (ee), baseou-se nas áreas obtidas:

$$ee (\%) = (A_{\text{maior}} - A_{\text{menor}}) / (A_{\text{maior}} + A_{\text{menor}}) \times 100\%$$

Tabela 1 – Programação dos métodos cromatográficos em CG-FID utilizando as colunas A e B

Coluna	Programação de Temperatura			Tempo total do método (min)	Composto
	Taxa de Aquecimento (°C/min)	Temperatura (°C)	Tempo de espera (min)		
A	-	80	2	13,67	1a-h
					2a-h
	30	280	5		3a-h 4f-h
B	Isoterma 180 °C			25,00	<i>rac-3a</i> <i>rac-3d</i>
	Isoterma 180 °C			48,00	<i>rac-3c</i>
	Isoterma 180 °C			55,00	<i>rac-3b</i> <i>rac-3e</i>

3.1.3.4 Cromatografia Gasosa Acoplada a Espectrometria de Massas (GC-MS)

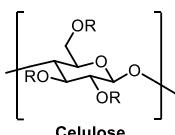
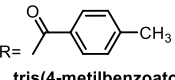
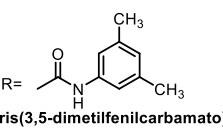
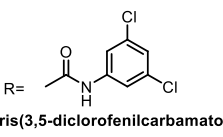
As análises de espectrometria de massas (GC-MS) foram realizadas utilizando o equipamento multiusuário do Instituto de Química de Araraquara (IQAr/UNESP). Trata-se de um cromatógrafo gasoso da marca Agilent (Modelo 7890B) acoplado a um espectrômetro de massas (Modelo 5977A), tendo fonte de ionização por elétrons, cuja energia de ionização é de 70 eV. O equipamento foi programado para abranger íons de m/z 45–500, utilizando uma coluna capilar de sílica fundida HP-5 MS, empregando-se os mesmos parâmetros adotados para a coluna Restek RTX®-5 do Laboratório Milagre.

3.1.3.5 Cromatografia Líquida de Alta Performance (HPLC)

Quanto à técnica de Cromatografia Líquida de Alta Performance (HPLC), as análises foram realizadas em cromatógrafo Agilent® 1260 Infinity Quaternary LC, com detector de arranjo de fotodiodos (DAD) G4212B, pertencente ao laboratório coordenado pelo Prof. Dr. Fernando Antônio Santos Coelho, localizado no Departamento de Química Orgânica do Instituto de Química da UNICAMP (IQ/UNICAMP – Campinas-SP). Para as análises foram utilizadas as colunas Chiralcel® OJ-3 (15 × 0,46 cm, 3 µm) (Coluna C), com fase estacionária composta por tris(4-metilbenzoato) de celulose adsorvida em sílica gel (3 µm), além da coluna Chiralpak® IB (25 × 0,46 cm, 3µm) (Coluna D), com fase estacionária composta por tris(3,5-dimetilfenilcarbamato) de celulose, ambas pertencentes ao mesmo grupo de pesquisa.

Utilizou-se também o cromatógrafo JASCO®, controlador LC-NET II/ADC, com detector de arranjo de fotodiodos (DAD) MD-2018 PLUS, contando com bomba PU-2086 plus, injetor automático AS-2055 e detector de dicroísmo circular (DC-2095), pertencente ao laboratório coordenado pela Profa. Dra. Isabelle Rodrigues Nascimento, localizado no Departamento de Bioquímica e Química Orgânica do Instituto de Química da UNESP (IQ/Unesp – Araraquara-SP). Para as análises utilizou-se a coluna cromatográfica Chiralpak® IC (25 × 0,46 cm, 3 µm) (Coluna E) com fase estacionária composta por tris(3,5-diclorofenilcarbamato) de celulose, cedida pela Profa. Dra. Lourdes Campaner dos Santos.

Tabela 2 – Programação dos métodos cromatográficos em HPLC-UV, em modo isocrático

Programação de Injeção					Tempo de injeção (min)	Composto
Coluna  Celulose	Proporção da fase móvel (hexano : isopropanol)	T (°C)	Fluxo (mL.min ⁻¹)	λ (nm)		
OJ-3 (C)  tris(4-metilbenzoato)	90:10	40	0,7	216	25	3f
	95:05	40	1,0	216	30	4f
IB (D)  tris(3,5-dimetilfenilcarbamato)	90:10	25	1,0	216	35	3g
IC (E)  tris(3,5-diclorofenilcarbamato)	90:10	25	1,0	210	30	4g
	85:15	25	1,0	210	40	3h
	85:15	25	1,0	210	80	4h

3.1.4 Biocatalisadores

As NHases utilizadas foram adquiridas via kit da empresa Prozomix®. A KRED recombinante em *E. coli* foi adquirida através da empresa Sigma-Aldrich®.

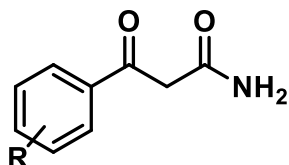
3.1.5 Reagentes e Solventes

Os reagentes, solventes e substratos **1a-h** utilizados neste trabalho foram adquiridos através da empresa Sigma-Aldrich® (Merck).

3.2 Procedimentos Experimentais

3.2.1 Síntese das β -cetoamidas (2a-h)

3.2.1.1 Via química



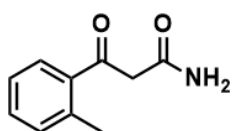
Utilizando um balão de fundo redondo (25 mL) o substrato **1a-h** (1 mmol) foi solubilizado em diclorometano anidro (CH_2Cl_2) (4,0 mL). Com o composto já solubilizado sob agitação magnética suave e em temperatura ambiente, gotejou-se ácido sulfúrico 98% (H_2SO_4) (1,7 mL; 3,128 g; 32 mmol). A velocidade da agitação foi alterada de suave para vigorosa, na qual foi mantida por aproximadamente 6 horas. Dado este tempo, o meio reacional foi basificado em banho de gelo com hidróxido de sódio (NaOH) 10 mol.L⁻¹, até atingir pH ~ 12,0. O sólido resultante foi solubilizado em 10 mL de água destilada e procedeu-se a extração com EtOAc (3 × 10 mL). Combinou-se as fases orgânicas, que foram lavadas com solução saturada de cloreto de sódio ($\text{NaCl}_{(\text{aq})}$). Por fim, a fase orgânica foi seca com sulfato de magnésio anidro (MgSO_4), e evaporada utilizando rotaevaporador. Após a evaporação do solvente, o produto foi solubilizado em metanol grau HPLC para análise em GC-FID.

3.2.1.2 Via enzimática

Foi adicionado a um microtubo (2,0 mL) tampão fosfato de sódio (1,0 mL; 200 mM, pH 7,0), solução traços (4 mg/L) de Co^{3+} (1 μL) e 5 μL de enzima NHase. O sistema foi mantido por 2 minutos em termomixer a 25 °C e 1000 rpm. Em seguida, foi adicionado ao microtubo o substrato (**1a-h**, 1 mg) solubilizado em dimetilsulfóxido (DMSO, 100 μL). Manteve-se o microtubo em termomixer nas mesmas condições anteriores por 24 horas. Dado este tempo, a solução foi centrifugada e extraída com AcOEt (3 × 0,5 mL). Combinou-se as fases orgânicas, que foram secas com sulfato de magnésio anidro. Após a evaporação do solvente, o produto foi solubilizado em metanol grau HPLC para análise em GC-FID.

3.2.1.3 Dados espectroscópicos e espectrométricos

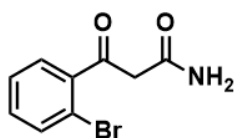
3-oxo-3-(*o*-toluil)propanamida (**2a**)



$C_{10}H_{11}NO_2$ (177,07 g.mol⁻¹); GC-FID: t_R = 5,819 min (Restek® - RTX5, Método A); HRMS (TOF MS ES⁺): calculado para $C_{10}H_{12}NO_2$ $[M + H]^+$: 178,0868; encontrado: 178,0865. As demais

caracterizações foram determinadas por analogia com os dados da literatura (HIROTA et al., 1994).

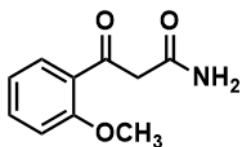
3-(2-bromofenil)-3-oxopropanamida (**2b**)



$C_9H_8BrNO_2$ (240,97 g.mol⁻¹); GC-FID: t_R = 5,816 min (Restek® - RTX5, Método A); HRMS (TOF MS ES⁺): calculado para $C_9H_9BrNO_2$ $[M + H]^+$: 241,9817; encontrado: 241,9816. RMN ¹H (CD₃OD, 300,19

MHz): δ (ppm) = 7,71 (dt, 1H, J = 8.0, 1.9 Hz), 7.47 (m, 3H), 3.35 (s, 2H); RMN ¹³C (CD₃OD, 75,5 MHz): δ (ppm) = 197.62, 170.46, 140.19, 132.87, 131.78, 128.33, 128.15, 120.52, 50.30.

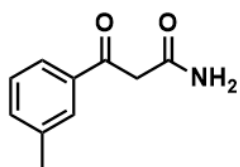
3-(2-metoxifenil)-3-oxo-propanamida (**2c**)



$C_{10}H_{11}NO_3$ (193,07 g.mol⁻¹); GC-FID: t_R = 4,899 min (Restek® - RTX5, Método A); HRMS (TOF MS ES⁺): calculado para $C_{10}H_{12}NO_3$ $[M + H]^+$: 194,0817; encontrado: 194,0815. RMN ¹H (CD₃OD, 300,19

MHz): δ (ppm) = 7,62 (ddd, 1H, J = 21.7, 7.7, 1.8 Hz), 7.42 (m, 1H), 7.02 (m, 2H), 3.84 (m, 5H); RMN ¹³C (CD₃OD, 75,5 MHz): δ (ppm) = 195.69, 169.17, 157.86, 134.63, 131.86, 123.07, 120.87, 112.46, 56.13, 51.13.

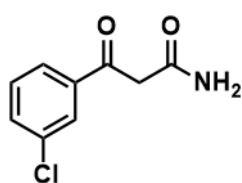
– 3-oxo-3-(*m*-toluil)propanamida (**2d**)



$C_{10}H_{11}NO_2$ (177,07 g.mol⁻¹); GC-FID: t_R = 5,140 min (Restek® - RTX5, Método A); HRMS (TOF MS ES⁺): calculado para $C_{10}H_{12}NO_2$ $[M + H]^+$: 178,0868; encontrado: 178,0865. As demais

caracterizações foram determinadas por analogia com os dados da literatura.(GOTOR; LIZ; TESTERA, 2004)

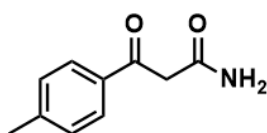
– 3-(3-clorofenil)-3-oxopropanamida (**2e**)



$C_9H_8ClNO_2$ (197,02 g.mol⁻¹); GC-FID: t_R = 5,492 min (Restek® - RTX5, Método A); HRMS (TOF MS ES⁺): calculado para $C_{10}H_{12}NO_2$ $[M + H]^+$: 198,0322; encontrado: 198,0319. As demais caracterizações

foram determinadas por analogia com os dados da literatura.(GOTOR; LIZ; TESTERA, 2004)

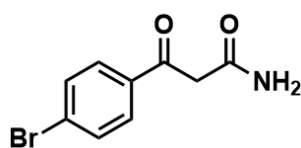
– 3-oxo-3-(*p*-toluil)propanamida (**2f**)



$C_{10}H_{11}NO_2$ (177,07 g.mol⁻¹); GC-FID: t_R = 5,213 min (Restek® - RTX5, Método A); HRMS (TOF MS ES⁺): calculado para $C_{10}H_{12}NO_2$ $[M + H]^+$: 178,0868; encontrado: 178,0865 As demais

caracterizações foram determinadas por analogia com os dados da literatura.(GOTOR; LIZ; TESTERA, 2004)

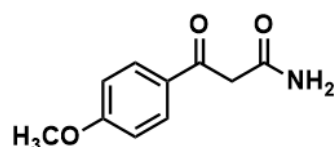
– 3-(4-bromofenil)-3-oxopropanamida (**2g**)



$C_9H_8BrNO_2$ (240,97 g.mol⁻¹); GC-FID: t_R = 6,041 min (Restek® - RTX5, Método A); HRMS (TOF MS ES⁺): calculado para $C_9H_9BrNO_2$ $[M + H]^+$: 241,9817; encontrado: 241,9815. RMN ¹H

(CD₃OD, 300,19 MHz): δ (ppm) = 7.46 (m, 2H), 7.30 (m, 2H), 2.54 (m, 2H); RMN ¹³C (CD₃OD, 75,5 MHz): δ (ppm) = 194.49, 168.65, 135.86, 132.22, 130.85, 127.70, 47.23.

– 3-(4-metoxifenil)-3-oxopropanamida (**2h**)

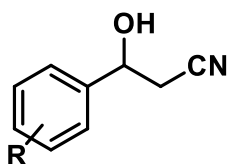


C₁₀H₁₁NO₃ (193,0739 g.mol⁻¹); GC-FID: *t*R = 6,259 min (Restek® RTX5, Método A); HRMS (TOF MS ES⁺): calculado para C₁₀H₁₂NO₂ [M + H]⁺: 194,0817; encontrado: 194,0816. As demais caracterizações foram determinadas por analogia com

os dados da literatura.(GOTOR; LIZ; TESTERA, 2004)

3.2.2 Síntese das β -hidroxinitrilas (**3a-h**)

3.2.2.1 Via química



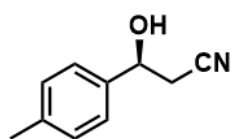
Utilizando um balão de fundo redondo (25 mL) o substrato **1a-h** (1 mmol) foi solubilizado em metanol grau HPLC (4,0 mL), a temperatura ambiente. Após a solubilização completa, o sistema foi colocado em banho de gelo por cerca de 5 minutos, até atingir 0 °C. Posteriormente adicionou-se boro-hidreto de sódio (NaBH₄) (1 mmol), dividindo esta quantidade em pequenas porções ao longo de 15 minutos. O sistema foi mantido sob agitação lenta por cerca de 45 minutos com retorno gradual à temperatura ambiente. O excesso de boro-hidreto de sódio foi neutralizado com ácido clorídrico (HCl) 2 mol.L⁻¹, e o solvente foi evaporado em rotaevaporador. O composto presente no balão foi solubilizado em 5,0 mL de água destilada e extraído com AcOEt (3 × 5 mL). Combinou-se as fases orgânicas, que foram secas com sulfato de magnésio (MgSO₄) anidro, e novamente evaporadas em rotaevaporador. Após a evaporação do solvente, o produto foi solubilizado em AcOEt grau HPLC para análise em GC-FID. Os compostos foram purificados por DSC, com gradiente de eluição composto por acetato de etila:heptano ou diclorometano:heptano.

3.2.2.2 Via enzimática

Utilizando um microtubo **A** (2,0 mL) solubilizou-se o cofator NADPH (1 mg) em solução tampão de fosfato de sódio (2,0 mL; 100 mM; pH 7,0) contendo Mg^{2+} (1,0 mM). Em um segundo microtubo **B** (1,5 mL), o substrato **1a-h** (1,0 mg) foi solubilizado em álcool isopropílico (IPA; 50 μ L), adicionando-se posteriormente 500 μ L da solução contida no microtubo **A**. Em um terceiro microtubo **C** (1,5 mL) adicionou-se a enzima KRED recombinante (1 μ L) juntamente com solução tampão fosfato de sódio (pH 7,0, 500 μ L). Os microtubos **B** e **C** foram levados ao termomixer (25 °C; 1000 rpm) por 2 minutos, e em seguida o conteúdo do microtubo **B** foi vertido completamente no microtubo **C**. Desta forma, o microtubo **C** foi mantido em termomixer (25 °C; 1000 rpm) por 24 horas, quando foi centrifugado (12.000 rpm / 4 minutos) e a solução extraída com acetato de etila (3 x 0,5 mL), combinando as fases orgânicas. Estas foram secas com sulfato de magnésio anidro ($MgSO_4$). Após a evaporação do solvente, o produto foi solubilizado em AcOEt grau HPLC-DAD para análise em GC-FID.

3.2.2.3 Dados espectroscópicos e espectrométricos

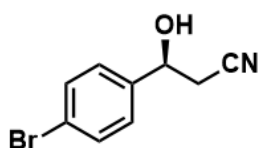
– (S)-3-hidroxi-3-(*p*-toluil)propanonitrila (**3f**)



$C_{10}H_{11}NO$ (161,08 g.mol⁻¹); GC-FID: t_R = 6,893 min (Restek® - RTX5, Método A); HPLC: t_R = 13,494 min (S), 15,503 min (R) (Chiralcel® OJ-3); GC-MS (IE, 70 eV) m/z (%): encontrado(calculado) = 161,100(161,084). As demais caracterizações foram determinadas

por analogia com os dados da literatura.(LIARDO et al., 2018b; VÁZQUEZ-VILLA et al., 2011; ZHENG; ASANO, 2020)

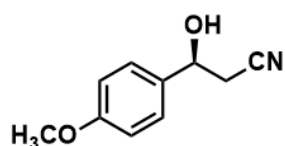
– (S)-3-(4-bromofenil)-3-hidroxipropanonitrila (**3g**)



C_9H_8BrNO (224,97 g.mol⁻¹); GC-FID: t_R = 7,902 min (Restek® - RTX5, Método A); HPLC: t_R = 25,796 min (S) (Chiralpak® IB); GC-MS (IE, 70 eV) m/z (%): encontrado(calculado) = 225,000(224,978).

As demais caracterizações foram determinadas por analogia com os dados da literatura. (SAITO et al., 2021; VÁZQUEZ-VILLA et al., 2011)

– (S)-3-hidroxi-3-(4-metoxifenil)propanonitrila (**3h**)

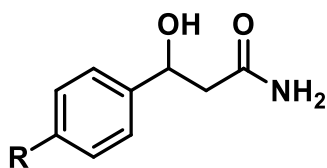


$C_{10}H_{11}NO_2$ (177,07 g.mol⁻¹); GC-FID: t_R = 7,615 min (Restek® - RTX5, Método A); HPLC: t_R = 25,808 min (S) (Chiralpak® IC); GC-MS (IE, 70 eV) m/z (%): encontrado(calculado) = 177,100(177,079). As demais caracterizações foram

determinadas por analogia com os dados da literatura. (SAITO et al., 2021; ZHENG; ASANO, 2020)

3.2.3 Síntese das β -hidroxiamidas (**4f-h**)

3.2.3.1 Via química



Utilizando um balão de fundo redondo (5 mL) o substrato **4f-h** (1 mmol) foi solubilizado em DMSO (13,8 equivalentes), seguido da adição de H₂O₂ 35% (13,8 equivalentes) e K₂CO₃ (0,3 equivalentes). Sob agitação magnética, procedeu-se a reação por cerca de 6 horas, quando a reação foi encerrada pela adição de 2,0 mL de água destilada e o produto extraído com diclorometano (3 × 1,5 mL). As fases orgânicas foram combinadas e lavadas com água destilada (3 × 1,0 mL), o solvente foi seco com sulfato de magnésio anidro (MgSO₄), evaporado e o produto resultante foi solubilizado em metanol grau HPLC para análise em GC-FID.

3.2.3.2 Via enzimática: Reações em Cascata

3.2.3.2.1 Cascata Simultânea

Em um microtubo **A** (2 mL), o cofator NADPH (1 mg) foi solubilizado em 2 mL de solução tampão de fosfato de sódio contendo Mg²⁺ (1,0 mM). Em um microtubo **B** (2 mL)

solubilizou-se o substrato **1a-h** (1 mg) em 100 μL de isopropanol, e em seguida adicionou-se 500 μL da solução tampão contendo o cofator (microtubo **A**). Em outro microtubo **C** (2 mL), a enzima KRED foi adicionada (1 μL) e suspendida em tampão fosfato de sódio (250 μL ; 100 mM; pH 7,0). A um quarto microtubo **D** (2 mL), adicionou-se 1 μL da solução traços de cobalto (4 mg.L^{-1}), a enzima NHase (5 μL), e solução tampão fosfato de sódio (250 μL ; 100 mM; pH 7). Os microtubos **B**, **C** e **D** foram levados ao termomixer (25 °C, 1000 rpm) por 2 minutos para homogeneização das soluções. Após isso, o conteúdo dos microtubos **C** e **D** foi transferido para o microtubo **B**, e este foi mantido em termomixer (25 °C, 1000 rpm) por 24 horas, quando foi centrifugado (12.000 rpm / 4 minutos) e a solução extraída com diclorometano ($3 \times 0,5 \text{ mL}$), combinando as fases orgânicas. Estas foram secas com sulfato de magnésio anidro (MgSO_4). Após a evaporação do solvente, o produto foi solubilizado em metanol grau HPLC para análise em GC-FID.

3.2.3.2.2 Cascata Sequencial

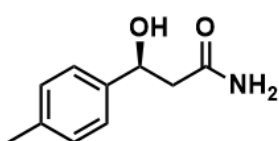
Em um microtubo **A** (2 mL), o cofator NADPH (1 mg) foi solubilizado em 2 mL de solução tampão de fosfato de sódio contendo Mg^{2+} (1,0 mM). Em um microtubo **B** (2 mL) solubilizou-se substrato **1a-h** (1 mg) em 100 μL de isopropanol, e em seguida adicionou-se 500 μL da solução tampão contendo o cofator (microtubo **A**). Em outro microtubo **C** (2 mL), a enzima KRED foi adicionada (1 μL) e suspendida em tampão fosfato de sódio (350 μL ; 100 mM; pH 7,0). Os microtubos **B** e **C** foram levados ao termomixer (25 °C, 1000 rpm) por 2 minutos para a homogeneização das soluções, e após isto o conteúdo do microtubo **C** foi transferido para o microtubo **B**. Este foi mantido em termomixer por 8 horas (25 °C, 1000 rpm).

A um quarto microtubo **D** (2 mL), adicionou-se 1 μL da solução traços de cobalto (4 mg.L^{-1}), a enzima NHase (5 μL), e solução tampão fosfato de sódio (150 μL ; 100 mM; pH 7). Passadas as 8 horas de reação, o conteúdo do microtubo **D** foi transferido para o microtubo **B**, que foi mantido em termomixer (25 °C, 1000 rpm) por mais 2 horas. Por fim, a solução foi centrifugada (12.000 rpm / 4 minutos) e o sobrenadante extraído com

diclorometano ($3 \times 0,5$ mL), combinando as fases orgânicas, que foram secas com sulfato de magnésio anidro (MgSO_4). Após a evaporação do solvente, o produto foi solubilizado em metanol grau HPLC para análise em GC-FID.

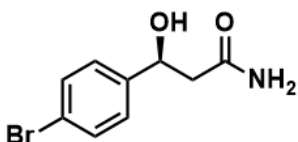
3.2.3.2.3 Dados Espectroscópicos e espectrométricos

– (S)-3-(4-metil)-3-hidroxiopropanamida (**4f**)



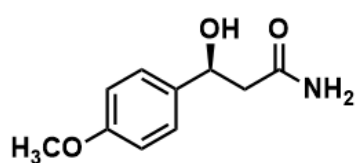
$\text{C}_{10}\text{H}_{13}\text{NO}_2$ ($179,09 \text{ g.mol}^{-1}$); GC-FID: $t_R = 8,055$ min (Restek® - RTX5, Método A); HPLC: $t_R = 23,199$ min (S) (Chiralcel® OJ-3); HRMS (TOF MS ES⁺): calculado para $\text{C}_{10}\text{H}_{13}\text{NNaO}_2$ $[\text{M} + \text{Na}]^+$: 202,0844; encontrado: 202,0842 As demais caracterizações foram determinadas por analogia com os dados da literatura.(GONZÁLEZ-FERNÁNDEZ; CROCHET; CADIerno, 2016; LIARDO et al., 2018b).

– (S)-3-(4-bromofenil)-3-hidroxiopropanamida (**4g**)



$\text{C}_9\text{H}_9\text{BrNO}_2$ ($242,09 \text{ g.mol}^{-1}$); GC-FID: $t_R = 8,874$ min (Restek® - RTX5, Método A); HPLC: $t_R = 14,600$ min (S) (Chiralpak® IC); $[\alpha]_{\text{D}}^{24} -17,86$ ($c = 0,7$, CH_3OH). HRMS (TOF MS ES⁻): calculado para $\text{C}_9\text{H}_9\text{BrNO}_2$ $[\text{M} - \text{H}]^-$: 241,9817; encontrado: 241,9811. RMN ^1H (CD_3OD , 300 MHz): δ (ppm) = 7,49 (d, 2H, $J = 8,4$ Hz), 7,33 (d, 2H, $J = 8,4$ Hz), 6,03 (m, 1H), 5,05 (dd, 1H), 2,66-2,48 (m, 2H); RMN ^{13}C (CD_3OD): $\delta = 174,7, 143,3, 131,0, 127,5, 120,6, 69,8, 44,5$. As demais caracterizações foram determinadas por analogia com os dados de HPLC da literatura HPLC.(GONZÁLEZ-FERNÁNDEZ; CROCHET; CADIerno, 2016)

– (S)-3-(4-metoxifenil)-3-hidroxiopropanamida (**4h**)



$C_{10}H_{13}NO_3$ (195,22 g.mol⁻¹); GC-FID: t_R = 8,643 min (Restek® - RTX5, Método A); HPLC: t_R = 69,950 min (S) (Chiralpak® IC); HRMS (TOF MS ES⁺): calculado para $C_{10}H_{13}NNaO_3$ [M + Na]⁺: 218,0793; encontrado: 218,0791. As

demais caracterizações foram determinadas por analogia com os dados da literatura (LIARDO et al., 2018b).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para utilização como padrões dos produtos nas reações enzimáticas, os compostos intermediários β -hidroxinitrilas e β -cetoamidas, bem como os produtos-alvo β -hidroxiamidas foram sintetizados seguindo as mesmas vias empregadas no estudo anterior (TORDATO, E. A.; 2018). A partir da síntese dos compostos, foram desenvolvidos métodos de análises cromatográficas para identificação dos produtos, além de métodos quirais para posterior determinação dos excessos enantioméricos, via CG-FID, GC-MS e HPLC-DAD.

Tratando-se das sínteses enzimáticas, para este estudo foram selecionadas as enzimas que demonstraram melhores resultados para o desenvolvimento das cascatas utilizando benzoilacetoneitrila como substrato. Assim, para a síntese das amidas, as reações foram realizadas utilizando as enzimas NHase 0257 e NHase 016 (Prozomix®), cujas conversões para a benzoilacetoneitrila foram >99% e 44%, respectivamente. Para a redução das cetonas, utilizou-se a enzima KRED recombinante em *E. coli* (Sigma-Aldrich®), cujo resultado foi o único positivo dentre as enzimas KREDs testadas para a transformação na benzoilacetoneitrila fornecendo, contudo, conversão >99%, ee >99% (S) (TORDATO E. A., 2018). Ainda no estudo anterior, foi constatada a supressão da atividade enzimática da KRED frente ao intermediário contendo o grupo amida. Assim, para a efetividade das reações em cascatas, a KRED deve atuar inicialmente na conversão dos substratos β -cetonitrilas (**1a-h**) para os intermediários β -hidroxinitrilas (**3a-**

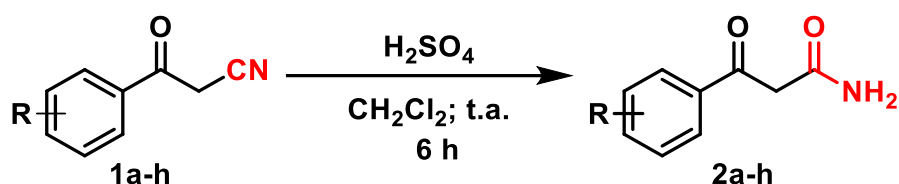
h), para posterior atuação das nitrilas hidratases na conversão destes intermediários nos produtos β -hidroxiamidas (**4a-h**).

4.1 Síntese das β -cetoamidas (**2a-h**)

4.1.1 Via Química

Assim como no estudo anterior, os intermediários **2a-h** foram sintetizados pela metodologia descrita por Gonzáles-Vera e colaboradores, via hidrólise ácida de nitrilas utilizando ácido sulfúrico (GONZÁLEZ-VERA; GARCÍA-LÓPEZ; HERRANZ, 2005).

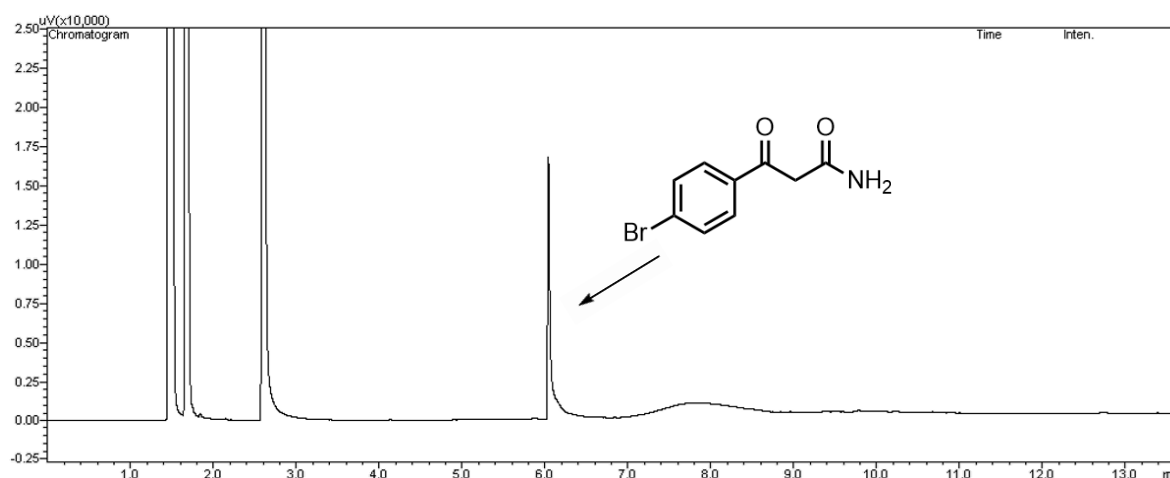
Esquema 10 – Reação geral para a síntese dos produtos **2a-h**



As reações foram mantidas sob agitação vigorosa e monitoradas por CCD e GC-FID. Após aproximadamente 6 h todo o material de partida havia sido consumido, procedendo-se então a extração. Os produtos foram analisados por GC-FID em coluna Restek® RTX-5, para avaliar o tempo de retenção dos compostos gerados, e os dados obtidos através destas sínteses encontram-se dispostos na Tabela 3. Como exemplo, a Figura 5 mostra o cromatograma obtido para o produto **2g**.

Tabela 3 – Dados obtidos para a síntese dos produtos **2a-h**

R	Prod.	Conversão (%)	GC-FID	
			T _R (min) 1a-h	T _R (min) 2a-h
<i>o</i> -CH ₃	2a	73	6,667	5,819
<i>o</i> -Br	2b	>99	7,273	5,816
<i>o</i> -OCH ₃	2c	>99	7,209	4,899
<i>m</i> -CH ₃	2d	>99	6,837	5,140
<i>m</i> -Cl	2e	>99	7,182	5,492
<i>p</i> -CH ₃	2f	>99	6,937	5,213
<i>p</i> -Br	2g	>99	7,649	6,041
<i>p</i> -OCH ₃	2h	>99	7,538	6,259

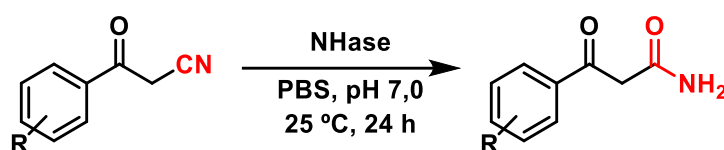
Figura 5 – Cromatograma (CG-FID) obtido para o produto **2g**

As β-cetoamidas sintetizadas foram submetidas também à análise por espectrometria de massas de alta resolução, via análise por UPLC-MS (TOF MS), e em todos dos casos foi possível observar o valor esperado diante da estrutura proposta. Como exemplo disto, para o composto **2g** (ES⁺, C₉H₉BrNO₂ [M + H]⁺) o resultado encontrado foi de 241,9815, valor este que é coerente com o calculado, 241,9817.

4.1.2 Via Enzimática

Assim como no estudo anterior, utilizou-se a metodologia descrita por Amaral (AMARAL, 2015). A reação geral para as reações com NHase encontra-se no Esquema 11.

Esquema 11 – Esquema geral para as reações dos substratos **1a-h** com a NHase



Substratos (1 mg), DMSO (100 μ L), tampão fosfato de sódio (1,0 mL), NHase 0257 (5 μ L)

As conversões foram calculadas utilizando as áreas obtidas em CG-FID, e na Tabela 4 estão dispostos os resultados obtidos para as reações com esta enzima.

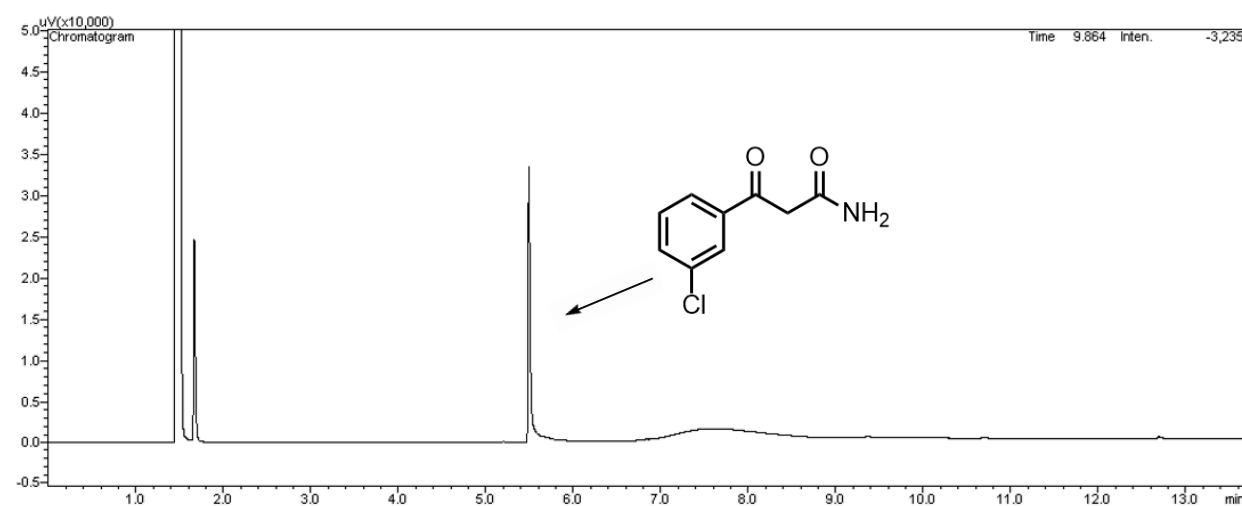
Tabela 4 – Conversão dos substratos em **2a-h** utilizando NHase 0257 e NHase 016

R	Prod.	Conversão (%)	
		NHase E0257	NHase 016
<i>o</i> -CH ₃	2a	82	71
<i>o</i> -Br	2b	67	0
<i>o</i> -OCH ₃	2c	>99	26
<i>m</i> -CH ₃	2d	>99	>99
<i>m</i> -Cl	2e	>99	>99
<i>p</i> -CH ₃	2f	>99	>99
<i>p</i> -Br	2g	>99	36
<i>p</i> -OCH ₃	2h	>99	>99

É possível notar que a NHase E0257 demonstrou ser bastante eficaz para a conversão das nitrilas em suas respectivas amidas, resultando no produto esperado com

conversão >99% para a maioria dos substratos analisados. Nota-se, entretanto, que a atividade enzimática foi menor frente aos substratos **1a** e **1b**, onde foram observadas conversões de 82% e 67%, respectivamente. De forma semelhante, a utilização da NHase 016 também proporcionou a obtenção de conversões elevadas para a maior parte dos substratos, tendo, contudo, sua atividade reduzida frente aos substratos **1a-c** e **1g**. A Figura 6 representa um exemplo de cromatograma obtido com a utilização destas enzimas, ilustrando o resultado observado para o composto **2e** com a utilização da NHase E0257.

Figura 6 – Cromatograma (GC-FID) obtido para o produto **2e**



Sabendo que estas transformações ocorrem através da hidratação da nitrila presente no substrato, pode-se considerar que o grupo em questão se encontra distante o suficiente do anel aromático para não ser significativamente afetado pelo efeito eletrônico dos substituintes. Assim, buscando explicar estes resultados, pode-se supor que haja uma influência mais significativa de efeitos estéricos. Isto porque, com exceção do substrato **1g**, todos os compostos que tiveram conversões diminuídas possuem seu substituinte em posição *orto*, sugerindo um maior impedimento estérico entre os substituintes nesta posição e as cadeias laterais dos resíduos de aminoácidos presentes na estrutura enzimática.

Comparando a atividade geral destas duas NHases, pode-se notar também que, mesmo possuindo comportamentos semelhantes quanto à possibilidade de impedimento

estérico, menores conversões foram observadas com a utilização da NHase 016. Isto sugere que esta enzima pode possuir um sítio ativo menos espaçoso, o que limitaria sua atividade frente a substratos mais volumosos, levando às diminuições bruscas de conversão observadas para os substratos contendo bromo ($-\text{Br}$) e metoxila ($-\text{OCH}_3$) como substituintes na posição *orto*, enquanto o substrato contendo a metila ($-\text{CH}_3$), um grupo de menor volume, teve sua diminuição menos pronunciada.

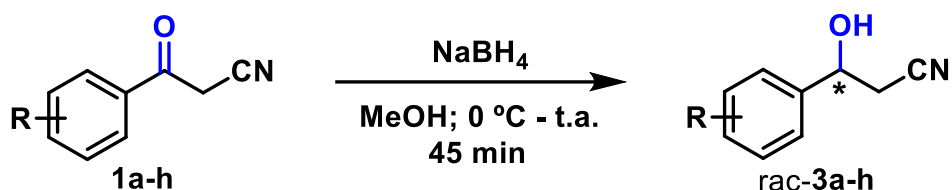
Ainda analisando comparativamente os grupos mais volumosos, deve-se levar em conta a presença do átomo de oxigênio no grupo metoxila, o que confere a estes compostos a possibilidade de realizar ligações de hidrogênio com as cadeias laterais dos resíduos de aminoácidos presentes no sítio ativo. Este comportamento poderia, portanto, explicar a obtenção de conversões mais elevadas para os compostos metoxilados em relação aos bromados, mesmo que ambos sejam volumosos. Isto pode ser ilustrado tanto pelos resultados obtidos para os compostos **2b** e **2c**, com ambas as NHases, quanto para os compostos **2g** e **2h** para a NHase 016, que apesar de ser aparentemente mais estericamente impedida, ainda promoveu a transformação quantitativa do substrato contendo metoxila em posição *para*, enquanto o produto contendo bromo em posição *para* foi obtido com 36% de conversão.

4.2 Síntese das β -hidroxinitrilas (**3a-h**)

4.2.1 Via Química

Ainda seguindo as metodologias já estudadas, os compostos *rac*-**3a-h** foram sintetizados a partir dos substratos **1a-h**, empregando a metodologia descrita por Kamila e colaboradores (KAMILA et al., 2006) e Coady e colaboradores (COADY et al., 2015). Esta metodologia baseia-se na utilização do boro-hidreto de sódio (NaBH_4) (Esquema 12) como agente de redução da carbonila presente nos substratos.

Esquema 12 – Reação geral para a síntese dos produtos *rac-3a-h*



As reações foram monitoradas por CCD e GC-FID e após aproximadamente 45 minutos de seu início todo o material de partida havia sido consumido. Os dados obtidos através destas sínteses encontram-se dispostos na Tabela 5. Os produtos racêmicos foram analisados por CG-FID, primeiramente em coluna Restek® RTX-5, afim de avaliar a conversão obtida, seguida da análise quiral em CG-FID e HPLC, para a resolução dos enantiômeros. Como exemplo, a Figura 7 mostra o cromatograma obtido para o produto *rac-3g*.

Figura 7 – Cromatograma (CG-FID) obtido para o produto *rac-3g* em coluna Restek® RTX-5

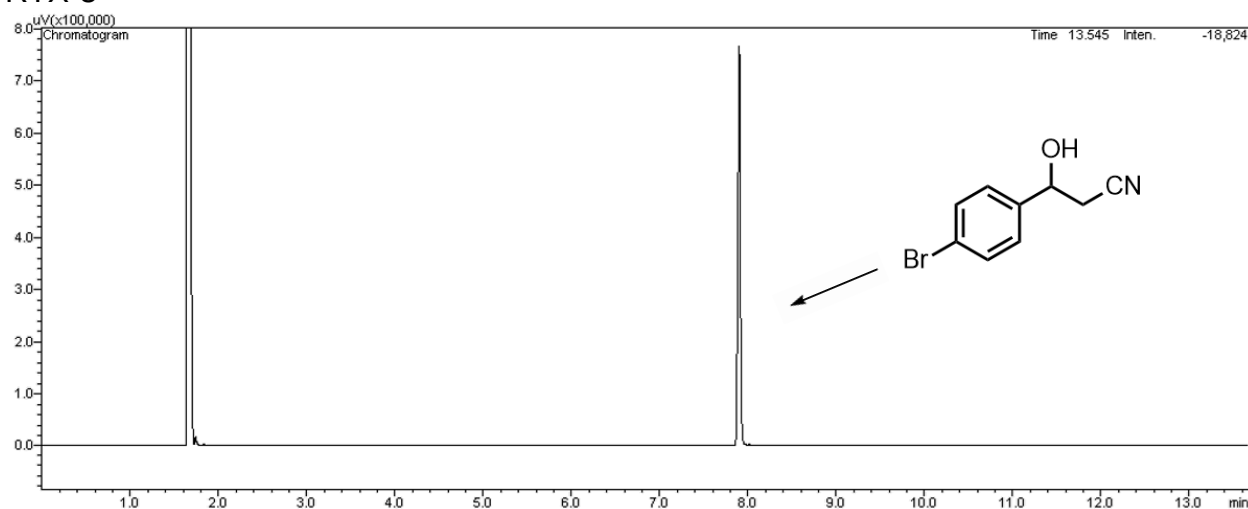


Tabela 5 – Dados das sínteses dos compostos *rac-3a-h*

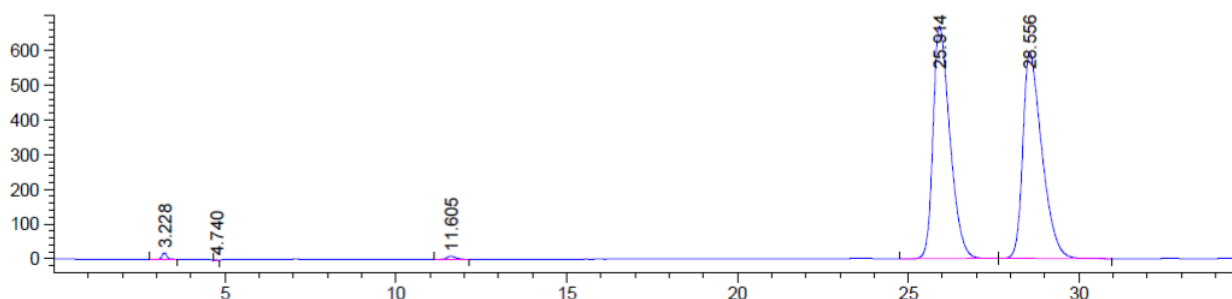
R	Prod.	Conversão (%)	GC-FID - T _R (min)		Análise Quiral T _R (min)	
			T _R - 1a-h	T _R - 3a-h	T _R (min) 1	T _R (min) 2
<i>o</i> -CH ₃	<i>rac-3a^a</i>	97	6,667	6,924	18,710	19,148
<i>o</i> -Br	<i>rac-3b^a</i>	82	7,273	7,597	48,024	49,435
<i>o</i> -OCH ₃	<i>rac-3c^a</i>	>99	7,209	7,301	24,339	25,475
<i>m</i> -CH ₃	<i>rac-3d^a</i>	>99	6,837	7,869	18,806	19,227
<i>m</i> -Cl	<i>rac-3e^a</i>	>99	7,182	7,407	45,249	47,236
<i>p</i> -CH ₃	<i>rac-3f^b</i>	>99	6,937	6,893	13,555 (S)	15,503 (R)
<i>p</i> -Br	<i>rac-3g^b</i>	99	7,649	7,902	25,914 (S)	28,555 (R)
<i>p</i> -OCH ₃	<i>rac-3h^b</i>	83	7,538	7,660	25,825 (S)	29,042 (R)

^a Análise quiral por CG-FID; ^b Análise quiral por HPLC

As β -hidroxinitrilas sintetizadas foram submetidas também à análise por espectrometria de massas via impacto de elétrons (70 eV), podendo-se em todos os casos observar os picos referentes aos íons moleculares, além de seus fragmentos característicos. No caso do *rac-3g* (Apêndice 15), o sinal referente ao íon molecular pôde ser identificado com m/z (%) 225(12) além da presença de outros fragmentos característicos do produto esperado, com m/z (%) 207 (4), 185 (100), 155 (15).

Ainda para o composto *rac-3g*, em seguida realizou-se análise em HPLC com coluna quiral Chiralpak® IB, utilizando as condições analíticas descritas por Saito e colaboradores (SAITO et al., 2021), afim de observar a separação de seus respectivos enantiômeros (Figura 8).

Figura 8 – Cromatograma (HPLC-DAD) obtido para o produto *rac*-**3g** em coluna quiral Chiralpak® IB



Fazendo uma analogia à ordem de eluição dos enantiômeros reportada na literatura (SAITO et al., 2021), é possível atribuir a configuração absoluta *S* ao enantiômeros com $t_R = 25,914$ min, enquanto a configuração *R* é atribuída ao sinal com $t_R = 28,555$ min. A mesma analogia foi utilizada para definir a configuração absoluta dos enantiômeros dos compostos **3f** (LIARDO et al., 2018a) e **3h** (SAITO et al., 2021).

4.2.2 Via Enzimática

Nos estudos preliminares, foram testadas três enzimas KRED de diferentes fontes, sendo que somente a KRED de *E. coli* recombinante demonstrou ser efetiva na redução do grupo carbonílico presente no substrato à sua respectiva hidroxila. Assim, os substratos foram submetidos à reação com esta mesma enzima, cujo tempo reacional padronizado foi de 24 horas. O esquema desta reação encontra-se a seguir:

Esquema 13 – Biorredução de **1a-h** catalisada por KRED recombinante

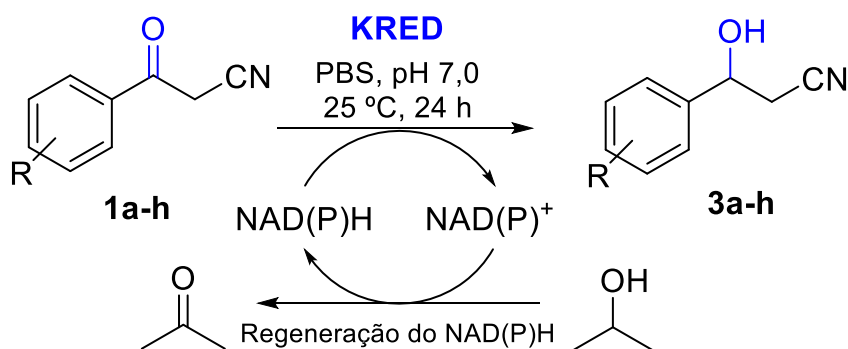


Tabela 6 – Conversão dos substratos **1a-h** catalisada por KRED recombinante

R	Prod.	Conversão ^a	ee (%)	HPLC – T _R (min)	Conf.
<i>o</i> -CH ₃	3a	0	n.d.	-	n.d.
<i>o</i> -Br	3b	0	n.d.	-	n.d.
<i>o</i> -OCH ₃	3c	0	n.d.	-	n.d.
<i>m</i> -CH ₃	3d	0	n.d.	-	n.d.
<i>m</i> -Cl	3e	8	>99 ^a	-	n.d.
<i>p</i> -CH ₃	3f	>99	>99 ^b	13,494	S
<i>p</i> -Br	3g	>99	>99 ^b	25,796	S
<i>p</i> -OCH ₃	3h	>99	>99 ^b	25,808	S

^aDeterminado por GC-FID, ^bDeterminado por HPLC

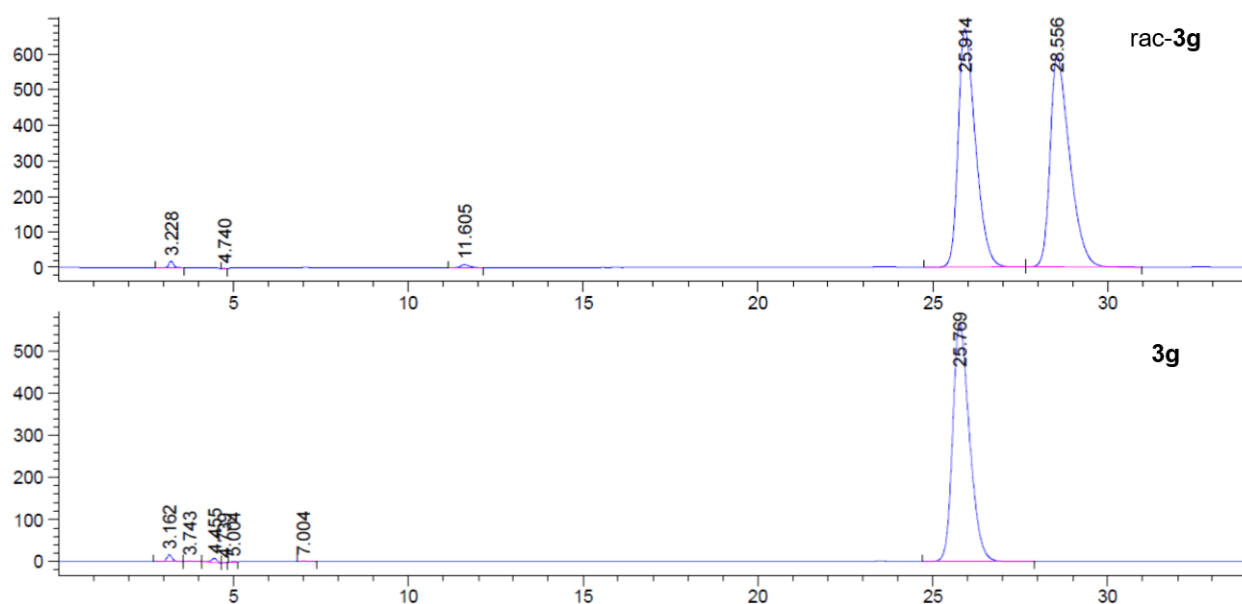
Analisando os dados obtidos, pode-se notar que nas reações com os substratos cujos substituintes encontram-se na posição *orto*, nenhuma conversão foi observada. Uma conversão baixa pôde ser obtida nas reações com os substratos contendo substituintes em posição *meta*. Já nos substratos com os substituintes em posição *para*, obteve-se conversão maior que 99% para os três diferentes substituintes. Assim, é possível sugerir que substituintes mais próximos à carbonila onde ocorre o ataque nucleofílico podem dificultar a interação do substrato com o sítio ativo, devido aos efeitos estéricos entre os substituintes e os resíduos de aminoácidos da enzima.

Quanto aos efeitos eletrônicos, para os substituintes em posição *meta* foram observados diferentes resultados, sendo que, com o substrato contendo um grupo metila nenhuma conversão foi observada, enquanto 8% foi observada para o substrato contendo um átomo de cloro. Sabe-se que halogênios possuem a característica de atuarem como retiradores de densidade eletrônica em um anel aromático por efeito indutivo, devido à sua eletronegatividade. Ao contrário, o grupo metila promove a doação de densidade eletrônica por efeito indutivo. Visto que o mecanismo catalítico da KRED ocorre com o ataque nucleofílico do hidreto proveniente do cofator NAD(P)H ao carbono

carbonílico do substrato, espera-se que grupos retiradores de elétrons favoreçam a ação enzimática, uma vez que sua presença torna este carbono mais suscetível ao ataque pelo hidreto. Assim, pode-se dizer que os resultados obtidos corroboram o esperado para o mecanismo desta enzima.

Para avaliar a enantioespecificidade da enzima, os produtos **3f-h** da reação enzimática foram analisados por HPLC em coluna quiral, utilizando o mesmo método empregado para o respectivo produto racêmico sintetizado anteriormente (Tabela 6). A Figura 9 mostra a comparação dos cromatogramas obtidos para os compostos *rac*-**3g** e **3g** obtido através da enzima.

Figura 9 – Cromatogramas (HPLC-DAD) obtidos em coluna quiral Chiralpak® IB para os produtos *rac*-**3g** e **3g**



Em todos os casos em que foi observada a conversão do material de partida em produto, foram obtidos ee acima de 99% (Tabela 6), demonstrando que a enzima foi capaz de converter o substrato em um único enantiômero.

4.2.2.1 Avaliação da atividade da KRED frente aos substratos **1f-h** em 8 horas de reação

Diante dos resultados obtidos na avaliação da atividade enzimática da KRED, definiram-se somente os substratos *para* substituídos como objetos de estudo para a aplicação dos sistemas em cascata, visto que os substratos **1a-e**, *orto* e *meta* substituídos, apresentaram baixa ou nenhuma conversão pela KRED, enquanto conversões quantitativas foram observadas para **1f-h** (>99%). Buscando avaliar a aplicabilidade destes substratos em ambos os sistemas em cascata desenvolvidos por Tordato (TORDATO, 2018), sequencial e simultâneo, realizou-se um estudo da atividade da KRED frente a estes compostos em 8 horas de reação, sendo este o tempo definido para a presença desta única enzima no sistema em cascata sequencial. Os dados obtidos encontram-se dispostos na Tabela 7.

Tabela 7 – Avaliação da atividade da KRED em 8 horas de reação

R	Prod.	1g-1i (%)	3g-3i (%)
<i>p</i> -CH ₃	3f	0	>99
<i>p</i> -Br	3g	0	>99
<i>p</i> -OCH ₃	3h	5	95

Anteriormente, comparando a atividade enzimática frente aos substratos com substituintes em diferentes posições, foi possível observar uma influência marcante do efeito estérico quanto à efetividade da reação. Contudo, ao observar os resultados obtidos na análise da atividade enzimática frente aos substratos *para*-substituídos, pode-se sugerir que os efeitos estéricos são pouco pronunciados, visto que não foram obtidas diferenças significativas de conversão entre os três substratos, tendo uma conversão reduzida em somente 5% para o produto **3h**, enquanto que o produto **3g**, que também conta com um substituinte volumoso, foi obtido com conversão >99%. Diante destes resultados, pode-se supor também uma demonstração de efeitos eletrônicos já que, conforme discutido anteriormente, o composto halogenado pode ter sua conversão favorecida frente à KRED, visto que o efeito de retirada de

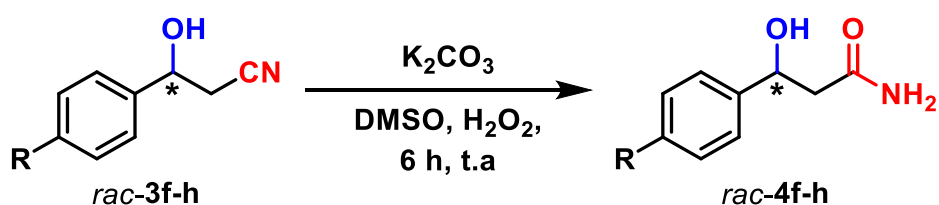
densidade eletrônica promovida pelo átomo de bromo possibilitaria uma maior suscetibilidade da carbonila ao ataque nucleofílico promovido pelo hidreto, justificando assim a obtenção de uma conversão maior para o composto **3g** em relação ao **3h**. Assim, pode-se dizer que os resultados observados condizem, novamente, com o esperado pelo mecanismo enzimático, além de serem ainda bastante promissores para a possibilidade de realização das cascatas em configuração sequencial e simultânea, visto que para os três substratos foram obtidas elevadas conversão neste tempo reacional.

4.3 Síntese das β -hidroxiamidas (**4f-h**)

4.3.1 Via Química

No estudo anterior (TORDATO, E. A., 2018), o padrão racêmico β -hidroxiamida foi sintetizado segundo a metodologia de Kamal e colaboradores (KAMAL; KHANNA; RAMU, 2002). Considerando a atividade da KRED frente aos substratos avaliados anteriormente (item 4.2.2), somente os substratos **1f-h** demonstraram potencial para aplicação neste sistema reacional, visto que elevadas conversões foram obtidas para estes compostos, enquanto nenhuma ou baixas conversões foram obtidas para os substratos **1a-e**, que foram, portanto, excluídos das etapas seguintes deste estudo. Desta forma, os padrões racêmicos *rac-4f-h* foram sintetizados seguindo a mesma metodologia, utilizando os padrões *rac-3f-h* como material de partida.

Esquema 14 – Esquema geral para a hidratação de β -hidroxinitrilas para a obtenção de β -hidroxiamidas

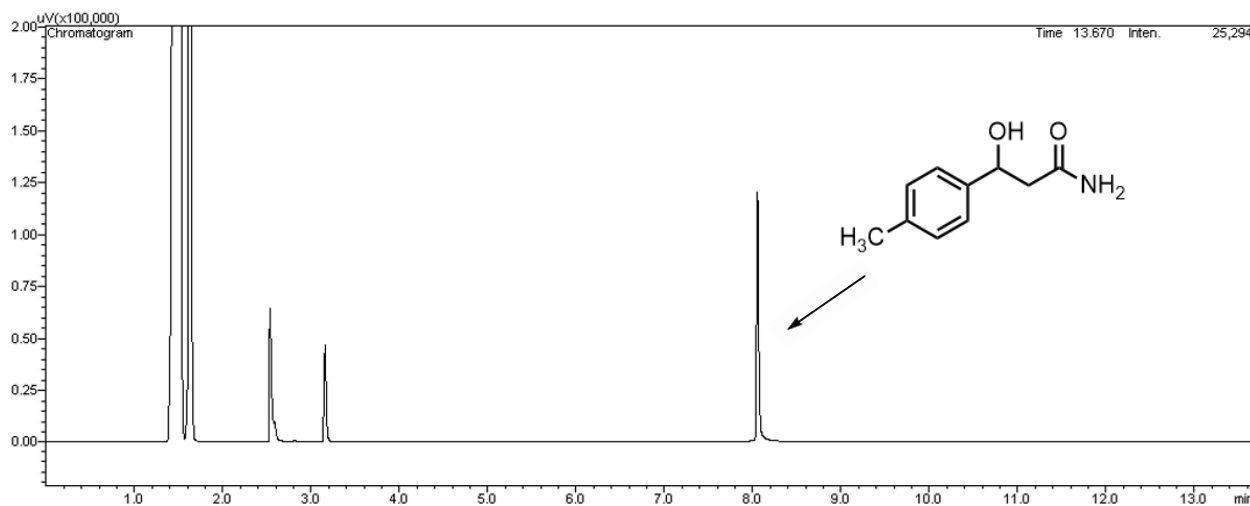


O meio reacional foi mantido em agitação e monitoramento por CCD e GC-FID, sendo encerrada após aproximadamente 6 horas desde o seu início. Finalizadas as reações, os produtos foram analisados por CG-FID em coluna Restek® RTX-5, resultando nos dados presentes na Tabela 8. Como exemplo, a Figura 10 mostra o cromatograma obtido para o produto *rac-4f*:

Tabela 8 – Dados obtidos para a síntese dos produtos *rac-4f-h*

R	Prod.	Conversão (%)	GC-FID	
			T _R (min) <i>rac-3f-h</i>	T _R (min) <i>rac-4f-h</i>
<i>p</i> -CH ₃	<i>rac-4f</i>	>99	6,887	8,055
<i>p</i> -Br	<i>rac-4g</i>	92	7,857	8,874
<i>p</i> -OCH ₃	<i>rac-4h</i>	>99	7,660	8,643

Figura 10 – Cromatograma (CG-FID) obtido para o produto *rac-4f*



Posteriormente, as β -hidroxiamidas sintetizadas foram avaliadas por espectrometria de massas de alta resolução, em UPLC-MS (TOF MS). Para os três casos foi possível obter resultados coerentes com os esperados para a estrutura proposta. No

caso do *rac*-**4f** (ES+), $C_{10}H_{13}NNaO_2 [M + Na]^+$, o valor encontrado foi de 202,0844, coincidindo exatamente com o valor calculado.

4.3.2 Via enzimática: Avaliação dos sistemas em cascata

Diante dos dados obtidos nas etapas de avaliação das atividades enzimáticas frente a cada substrato, constatou-se que, mesmo com as elevadas conversões obtidas pela NHase para os substratos com substituintes em posição *orto*, *meta* e *para*, somente os substratos contendo os grupos *para*-localizados demonstraram ser adequados para a que a KRED utilizada promovesse a transformação.

Conforme constatado no trabalho desenvolvido anteriormente neste grupo de pesquisa (TORDATO, 2018), a atividade desta KRED é completamente suprimida pela presença do grupo amida na estrutura dos compostos, não sendo capaz de converter as b-cetoamidas em b-hidroxiamidas. Diante disto, é possível dizer que a atividade da NHase frente ao substrato é determinante para definir qual o tipo de cascata adequada para cada substrato, visto que para o sucesso da síntese das b-hidroxiamidas através destes sistemas, a KRED deve atuar primeiro sob o substrato convertendo-o no intermediário **3f-h**, para a posterior atuação da NHase para a transformação deste intermediário em **4f-h**. Desta forma, para que seja possível executar esta síntese através de uma cascata simultânea, a KRED deve apresentar uma rápida conversão do substrato, enquanto a NHase deve promover sua transformação de forma mais lenta. Esta característica foi observada principalmente para o substrato **1g** (contendo –Br em posição *para*) quando avaliado com a NHase 016, cuja conversão observada foi de 36% após 24h reacionais. Contudo, devido à elevada conversão obtida também para o substrato **1f** (contendo –CH₃ em posição *para*) frente à KRED, definiu-se que este também seria submetido à avaliação em cascata simultânea, visto que uma conversão rápida promovida por esta enzima poderia acarretar em um bom resultado, caso as NHases promovessem sua transformação em seguida. Assim, definiu-se que todos os substratos seriam submetidos à dois sistemas em cascata sequencial, com ambas as NHases (016 e E0257), além da avaliação de cascatas simultâneas para os substratos **1f** e **1g** com a NHase 016. Na Tabela 9 encontram-se os dados obtidos.

Tabela 9 – Resultados obtidos na avaliação dos sistemas em cascata

R	Código	NHase	Config.	1f-h (%)	2f-h (%)	(S)3f-h (%)	(S)4f-h (%)	ee 4f-h (%)
<i>p</i> -CH ₃	f	E2057	Seq.	0	0	0	>99	>99
		016	Seq.	0	0	13	87	>99
		016	Simult.	0	4	0	96	>99
<i>p</i> -Br	g	E0257	Seq.	0	0	0	>99	>99
		016	Seq.	0	0	0	>99	>99
		016	Simult.	0	0	0	>99	>99
<i>p</i> -OCH ₃	h	E0257	Seq.	0	0	5	95	>99
		016	Seq.	0	0	0	>99	>99

Foi possível observar que os sistemas em cascata desenvolvidos foram bastante eficazes para as sínteses dos produtos **4f-h**. De modo geral, os resultados obtidos corroboram o esperado por cada enzima avaliada anteriormente, demonstrando ainda uma aparente afinidade das NHases pela transformação dos intermediários **3f-3h** em produtos **4f-4h**, já que os intermediários **2f-2h** não foram observados em quantidades significativas ao final das reações, mesmo para o substrato **1g**, cuja conversão no intermediário **2g** avaliada anteriormente foi de 36% para a NHase 016 em 24h reacionais (item 4.2.1), enquanto seu intermediário formado pela KRED foi quantitativamente consumido e transformado em produto **4g** em todos os sistemas em cascata propostos, inclusive nas cascatas sequenciais, com apenas 2 horas de ação das NHases. Este comportamento pode sugerir, portanto, que a substituição do grupo carbonila pela hidroxila ocasionaria um aumento das possibilidades de realização de ligações de hidrogênio entre os substratos e os resíduos de aminoácidos presentes no sítio ativo. Isto porque, para realizar este tipo de interação, o grupo carbonila dependeria da presença

de resíduos de aminoácidos com hidrogênios disponíveis para tal (como serina ou tirosina, por exemplo) e em posições favoráveis para que a interação ocorresse. Já a hidroxila, por sua vez, poderia realizar ligações de hidrogênio com os nitrogênios presentes no próprio esqueleto enzimático (*backbone*), conferindo então a este grupo uma maior probabilidade de estabilização do complexo enzima-substrato, favorecendo assim a transformação. Contudo, para maiores esclarecimentos acerca das possíveis interações responsáveis pelos efeitos observados, estudos de ancoragem molecular devem ser realizados.

Para a determinação da configuração absoluta e excessos enantioméricos, foram realizadas análises quirais em HPLC utilizando as colunas e condições analíticas já reportadas na literatura (LIARDO et al., 2018a; SAITO et al., 2021), tanto para os padrões racêmicos quanto para os produtos enzimáticos. Assim, a identificação do enantiômero obtido foi dada através da comparação entre a ordem de eluição obtida e os dados dos respectivos referenciais bibliográficos, onde o produto de configuração *S* com excesso enantiomérico >99% foi observado para os produtos quirais **3f-h**, **4f** e **4h**, indo de encontro com o esperado diante dos estudos anteriores para a atividade da KRED utilizada neste trabalho (TORDATO, 2018).

Sendo o único composto deste escopo a não ter sua configuração absoluta reportada na literatura, o produto **4g** foi submetido à análise por derivatização de Mosher, utilizando o (*R/S*)-MTPA como agente de derivatização. Contudo, os resultados obtidos por esta técnica não foram conclusivos. Assim, o produto **4g** também foi submetido à análise de $[\alpha]_D^{24}$, onde o valor obtido foi de -17,86 (*c* = 0,7, CH₃OH), resultado que está em concordância com os dados já reportados para os compostos análogos (LIARDO et al., 2018a; VÁZQUEZ-VILLA et al., 2011). Além disto, foi constatado através da avaliação da pureza ótica dos intermediários **3f** e **3h**, e produtos **4f** e **4h** que a transformação catalisada pelas NHases utilizadas não possui a capacidade de alterar a configuração do centro estereogênico, definido anteriormente pela KRED. Logo, pode-se assumir que o mesmo comportamento ocorra na obtenção do produto **4g**, que, quando analisado em HPLC nas mesmas condições que seus análogos, demonstrou constância do comportamento quanto à ordem de eluição obtida para os compostos (*S*)-**4f** e (*S*)-**4h** (LIARDO et al., 2018a), além de ir de encontro ao resultado obtido para seu intermediário ((*S*)-**3g**) (SAITO et al., 2021). Baseando-se nestas constatações, pode-se dizer então

que, assim como os demais produtos obtidos neste trabalho, o produto (S)-**4g** foi observado com ee >99%.

5 CONCLUSÕES

Inicialmente, foram sintetizados os respectivos padrões para cada produto de interesse, que foram caracterizados e comparados com os produtos obtidos via síntese enzimática, constatando a eficácia da ação dos biocatalisadores para a obtenção destes compostos, de forma eficiente e sustentável.

Para as sínteses dos intermediários β -hidroxinitrilas, promovidas pela KRED, foi possível observar uma influência bastante pronunciada de efeitos estéricos, visto que os produtos *para*-substituídos, **3f-h**, foram obtidos com conversão acima de >99%, enquanto os produtos *orto*- e *meta*-substituídos demonstraram baixa ou nenhuma conversão frente a esta enzima.

Quanto à avaliação das NHases na síntese dos intermediários β -cetoamidas, observou-se também a influência de efeitos estéricos para ambas as NHases, visto que os produtos obtidos com conversões reduzidas possuem substituintes *orto*-localizados, sugerindo que esta posição é mais estericamente impedida que as posições *meta* e *para*. Com exceção a estes casos, observou-se uma elevada conversão para o produto **2c**, que apesar de possuir um grupo metoxila localizado em posição *orto* no anel aromático, foi obtido com conversão >99% para a NHase E0257, comportamento este que pode supor a formação de ligações de hidrogênio entre o átomo de oxigênio da metoxila com os resíduos de aminoácidos presentes no sítio ativo desta enzima, o que estabilizaria o complexo enzima-substrato, favorecendo a conversão. De modo oposto, o produto **2g**, que possui um átomo de bromo em posição *para* foi obtido com conversão de 36% utilizando a NHase 016, sugerindo um sítio ativo menos espaçoso para a acomodação de substratos substituídos também nesta posição, além da posição *orto*, em comparação à NHase E0257.

De modo geral, os resultados obtidos evidenciaram que ambas as NHases avaliadas neste estudo são opções válidas para o desenvolvimento de cascatas sequenciais para os substratos **1f-h**. Para as cascatas simultâneas, os produtos **4f** e **4g** foram obtidos com

conversões >99% demonstrando que, conforme o esperado, a NHase 016 foi uma excelente alternativa para este tipo de sistema.

Assim, foi possível constatar que os sistemas em cascata desenvolvidos foram bastante eficientes para a síntese de β -hidroxiamidas *para*-substituídas, tratando-se de uma nova rota elegante e sustentável para a promoção destas transformações, indo de encontro aos princípios da química verde.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMARAL, B. S. Síntese quimioenzimática do levetiracetam e análogos. 2015. 212 f. Dissertação (mestrado) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2015.

ANASTAS, P.; EGHBALI, N. Green chemistry: Principles and practice. **Chemical Society Reviews**, v. 39, n. 1, p. 301–312, 2010.

ASANO, Y. et al. A New Enzymatic Method of Acrylamide Production. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 46, n. 5, p. 1183–1189, 1982.

ASANO, Y.; TANI, Y.; YAMADA, H. A new enzyme “Nitrile hydratase” which degrades acetonitrile in combination with amidase. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 44, n. 9, p. 2251–2252, 1980.

CASTILHO, S.; MILAGRE, H.; MILAGRE, C. Reações em cascata enzimática, quimioenzimática e fotoenzimática: Perspectivas para uma síntese orgânica mais sustentável. **Química Nova**, publicação online, 2021.

CHENG, Z.; XIA, Y.; ZHOU, Z. Recent Advances and Promises in Nitrile Hydratase: From Mechanism to Industrial Applications. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 8, n. April, p. 1–18, 2020.

CHUABOON, L. et al. One-Pot Bioconversion of l-Arabinose to l-Ribulose in an Enzymatic Cascade. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 58, n. 12, p. 2428–2432, 2019.

COADY, T. M. et al. Substrate evaluation of *Rhodococcus erythropolis* SET1, a nitrile hydrolysing bacterium, demonstrating dual activity strongly dependent on nitrile sub-structure. **European Journal of Organic Chemistry**, v. 2015, n. 5, p. 1108–1116, 2015.

GONZÁLEZ-FERNÁNDEZ, R. et al. Chlorophosphines as auxiliary ligands in ruthenium-catalyzed nitrile hydration reactions: Application to the preparation of β -ketoamides. **Catalysis Science and Technology**, v. 6, n. 12, p. 4398–4409, 2016.

GONZÁLEZ-FERNÁNDEZ, R.; CROCHET, P.; CADIerno, V. Ruthenium-Catalyzed

Synthesis of β -Hydroxyamides from β -Ketonitriles in Water. **Organic Letters**, v. 18, n. 23, p. 6164–6167, 2016.

GONZÁLEZ-VERA, J. A.; GARCÍA-LÓPEZ, M. T.; HERRANZ, R. Molecular diversity via amino acid derived α -amino nitriles: Synthesis of spirocyclic 2,6-dioxopiperazine derivatives. **Journal of Organic Chemistry**, v. 70, n. 9, p. 3660–3666, 2005.

GOTOR, V.; LIZ, R.; TESTERA, A. M. Preparation of *N*-unsubstituted β -ketoamides by *Rhodococcus rhodochrous*-catalysed hydration of β -ketonitriles. **Tetrahedron**, v. 60, n. 3, p. 607-618, 2004.

HANUKOGLU, I. Proteopedia: Rossmann fold: A beta-alpha-beta fold at dinucleotide binding sites. **Biochemistry and Molecular Biology Education**, v. 43, n. 3, p. 206–209, 2015.

HIROTA, A. et al. New Indophenol-reducing 1,3-Dicarbonyl Compound from *Streptomyces*. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 58, n. 4, 792-793, 1994.

HOLLMANN, F.; ARENDS, I. W. C. E.; HOLTSMANN, D. Enzymatic reductions for the chemist. **Green Chemistry**, v. 13, n. 9, p. 2285–2313, 2011.

HOPMANN, K. H.; GUO, J.-D.; HIMO, F. Theoretical Investigation of the First-Shell Mechanism of Nitrile Hydratase. **Inorganic Chemistry**, v. 46, n. 12, p. 4850–4856, 2007.

HOPMANN, K. H.; HIMO, F. On the Role of Tyrosine as Catalytic Base in Nitrile Hydratase. **European Journal of Inorganic Chemistry**, v. 2008, n. 22, p. 3452–3459, 2008.

JEGANNATHAN, K. R.; NIELSEN, P. H. Environmental assessment of enzyme use in industrial production-a literature review. **Journal of Cleaner Production**, v. 42, p. 228–240, 2013.

KAMAL, A. et al. A new facile chemoenzymatic synthesis of levamisole. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 15, n. 3, p. 613–615, 2005.

KAMAL, A.; KHANNA, G. B. R.; RAMU, R. Chemoenzymatic synthesis of both enantiomers of fluoxetine, tomoxetine and nisooxetine: Lipase-catalyzed resolution of 3-aryl-3-hydroxypropanenitriles. **Tetrahedron Asymmetry**, v. 13, n. 18, p. 2039–2051, 2002.

KAMILA, S. et al. Unexpected stereorecognition in nitrilase-catalyzed hydrolysis of β -hydroxy nitriles. **Organic Letters**, v. 8, n. 20, p. 4429–4431, 2006.

KAYANUMA, M. et al. Catalytic Mechanism of Nitrile Hydratase Subsequent to Cyclic Intermediate Formation: A QM/MM Study. **Journal of Physical Chemistry B**, v. 120, n. 13, p. 3259–3266, 2016.

KITANOSONO, T.; XU, P.; KOBAYASHI, S. Heterogeneous versus homogeneous copper(II) catalysis in enantioselective conjugate-addition reactions of boron in water. **Chemistry - An Asian Journal**, v. 9, n. 1, p. 179–188, 2014.

LIARDO, E. et al. Strengthening the Combination between Enzymes and Metals in Aqueous Medium: Concurrent Ruthenium-Catalyzed Nitrile Hydration - Asymmetric Ketone Bioreduction. **ChemCatChem**, v. 10, n. 20, p. 4676–4682, 2018a.

MATHEW, C. D. et al. Nitrilase-Catalyzed Production of Nicotinic Acid from 3-Cyanopyridine in *Rhodococcus rhodochrous* J1. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 54, n. 4, p. 1030–1032, 1988.

MITRA, S.; HOLZ, R. C. Unraveling the Catalytic Mechanism of Nitrile Hydratases. **Journal of Biological Chemistry**, v. 282, n. 10, p. 7397–7404, 2007.

NELP, M. T. et al. A Protein-derived Oxygen Is the Source of the Amide Oxygen of Nitrile Hydratases. **Journal of Biological Chemistry**, v. 291, n. 15, p. 7822–7829, 2016.

OKAMOTO, S.; ELTIS, L. D. Purification and characterization of a novel nitrile hydratase from *Rhodococcus* sp. RHA1. **Molecular Microbiology**, v. 65, n. 3, p. 828–838, 2007.

PRASAD, S.; SHARMA, D. R.; BHALLA, T. C. Nitrile- and Amide-hydrolysing Activity in *Kluyveromyces thermotolerans* MGBY 37. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 21, n. 8–9, p. 1447–1450, 2005.

PREJANÒ, M. et al. Reaction Mechanism of Low-Spin Iron(III)- and Cobalt(III)-Containing Nitrile Hydratases: A Quantum Mechanics Investigation. **Inorganic Chemistry**, v. 56, n. 21, p. 13390–13400, 2017.

RICCA, E.; BRUCHER, B.; SCHRITTWIESER, J. H. Multi-enzymatic cascade reactions: Overview and perspectives. **Advanced Synthesis and Catalysis**, v. 353, n. 13, p. 2239–2262, 2011.

SAITO, A. et al. Direct Catalytic Asymmetric Addition of Alkyl nitriles to Aldehydes with Designed Nickel–Carbene Complexes. **Angewandte Chemie - International Edition**, v. 133, n. 16, p. 8821–8825, 2021.

SANZ SHARLEY, D. D.; WILLIAMS, J. M. J. A selective hydration of nitriles catalysed by a Pd(OAc)₂-based system in water. **Tetrahedron Letters**, v. 58, n. 43, p. 4090–4093, 2017.

SATHE, P. A. et al. Tandem synthesis of aromatic amides from styrenes in water. **Tetrahedron Letters**, v. 59, n. 29, p. 2820–2823, 2018.

SCHRITTWIESER, J. H. et al. Biocatalytic cascade for the synthesis of enantiopure β -azidoalcohols and β -hydroxynitriles. **European Journal of Organic Chemistry**, n. 14, p. 2293–2298, 2009.

SCHRITTWIESER, J. H. et al. Artificial Biocatalytic Linear Cascades for Preparation of Organic Molecules. **Chemical Reviews**, v. 118, n. 1, p. 270–348, 2018.

SHELDON, R. A.; WOODLEY, J. M. Role of Biocatalysis in Sustainable Chemistry. **Chemical Reviews**, v. 118, n. 2, p. 801–838, 2018.

SPERL, J. M.; SIEBER, V. Multienzyme Cascade Reactions - Status and Recent Advances. **ACS Catalysis**, v. 8, n. 3, p. 2385–2396, 2018.

SUPREETHA, K. et al. Advances in cloning, structural and bioremediation aspects of nitrile hydratases. **Molecular Biology Reports**, v. 46, n. 4, p. 4661–4673, 2019.

TORDATO, E. A. Cascatas multienzimáticas aplicadas na síntese estereosseletiva de beta-hidroxiamidas. 2018. 100 f. Dissertação (mestrado) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2018.

VARJOSAARI, S. E. et al. Enantioselective metal-free reduction of ketones by a user-friendly silane with a reusable chiral additive. **Tetrahedron Letters**, v. 59, n. 29, p. 2839-2843, 2018.

VÁZQUEZ-VILLA, H. et al. Iridium diamine catalyst for the asymmetric transfer hydrogenation of ketones. **Angewandte Chemie - International Edition**, v. 50, n. 38, p. 8979-8981, 2011.

XU, G. C. et al. Stereocomplementary bioreduction of β -ketonitrile without ethylated byproduct. **Organic Letters**, v. 15, n. 21, p. 5408–5411, 2013.

YAMANAKA, Y. et al. Time-Resolved Crystallography of the Reaction Intermediate of Nitrile Hydratase: Revealing a Role for the Cysteinesulfenic Acid Ligand as a Catalytic Nucleophile. **Angewandte Chemie**, v. 127, n. 37, p. 10913–10917, 2015.

YANO, T.; OZAWA, T.; MASUDA, H. Structural and Functional Model Systems for Analysis of the Active Center of Nitrile Hydratase. **Chemistry Letters**, v. 37, n. 7, p. 672–677, 2008.

ZEROR, S. et al. Enantioselective ketoester reductions in water: A comparison between microorganism-and ruthenium-catalyzed reactions. **Tetrahedron Asymmetry**, v. 21, n. 9–10, p. 1211–1215, 2010.

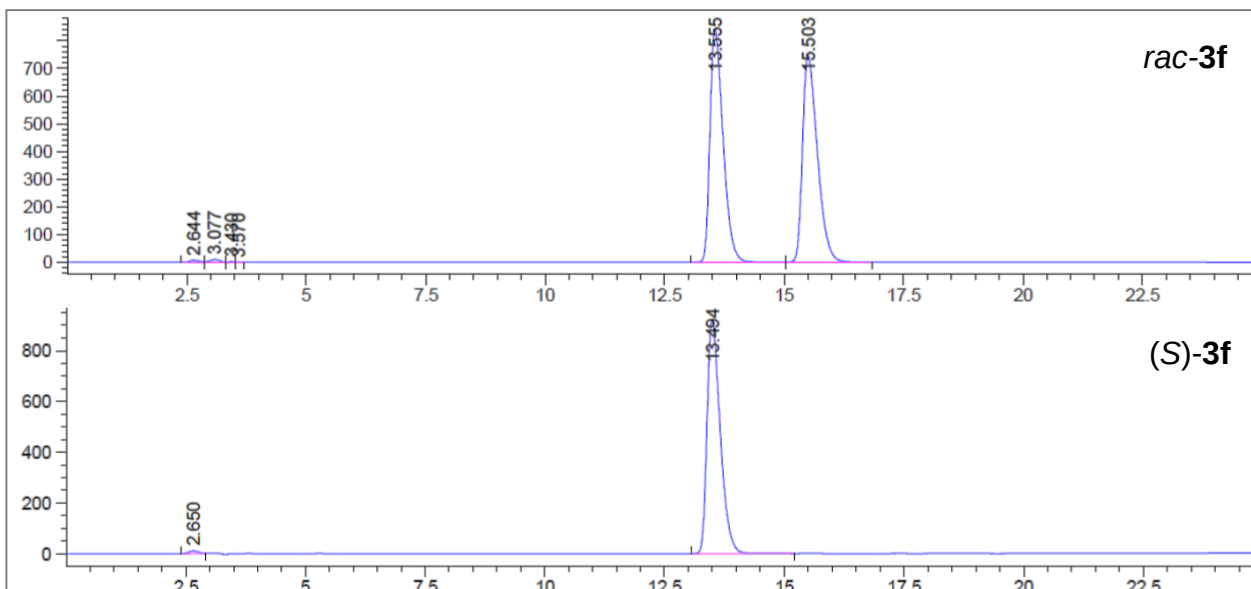
ZHAN, W. et al. A continuous-flow synthesis of primary amides from hydrolysis of nitriles using hydrogen peroxide as oxidant. **Tetrahedron**, v. 74, n. 13, p. 1527–1532, 2018.

ZHENG, D.; ASANO, Y. Biocatalytic asymmetric ring-opening of dihydroisoxazoles: a cyanide-free route to complementary enantiomers of β -hydroxy nitriles from olefins. **Green Chemistry**, v. 22, p. 4930-4936, 2020.

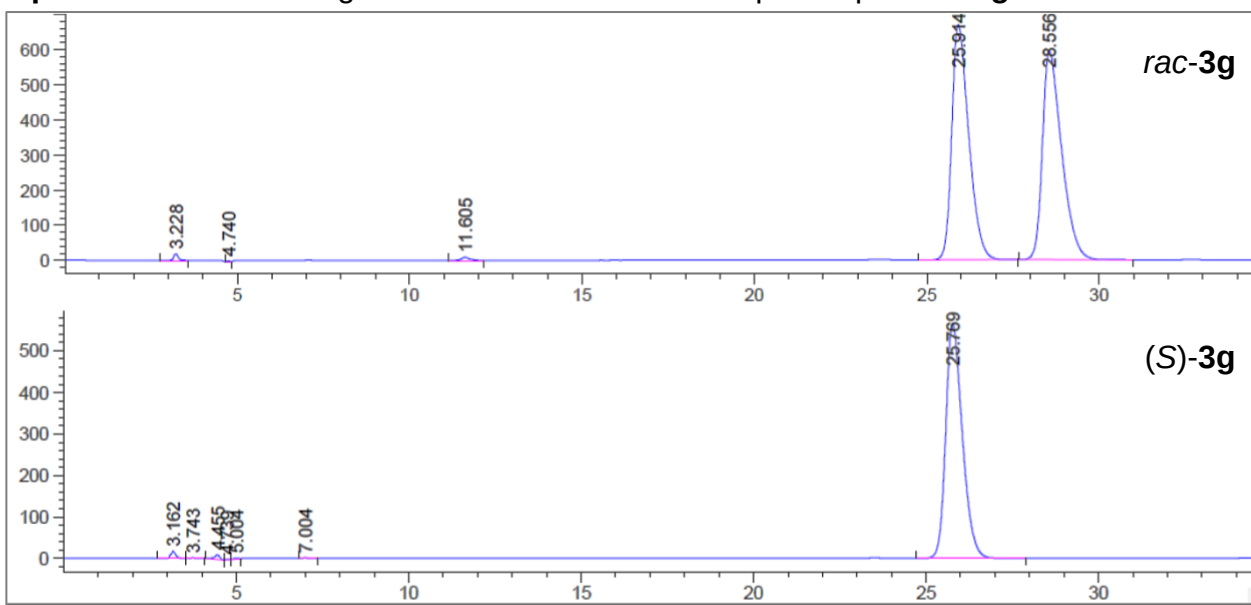
6 APÊNDICE

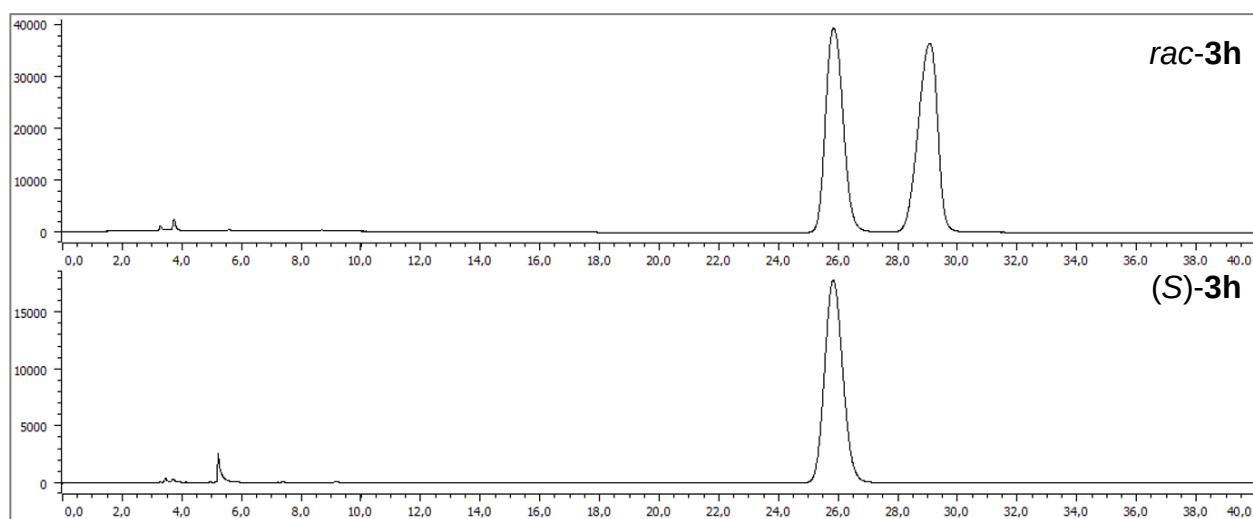
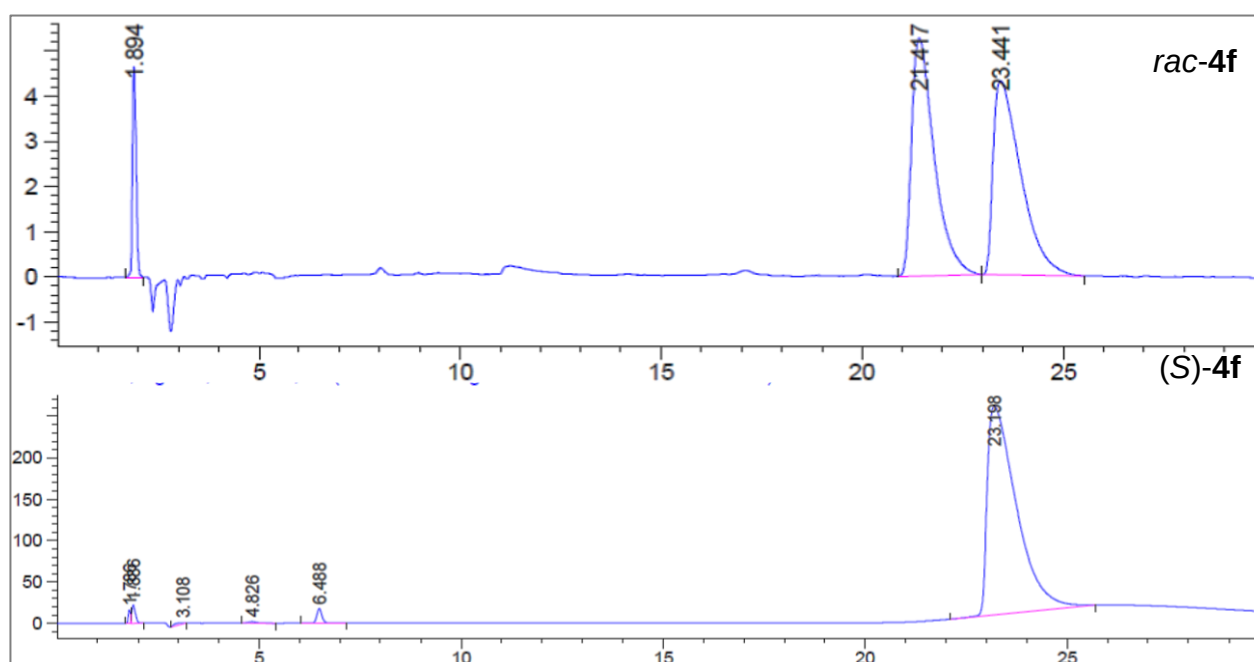
6.1 Cromatogramas

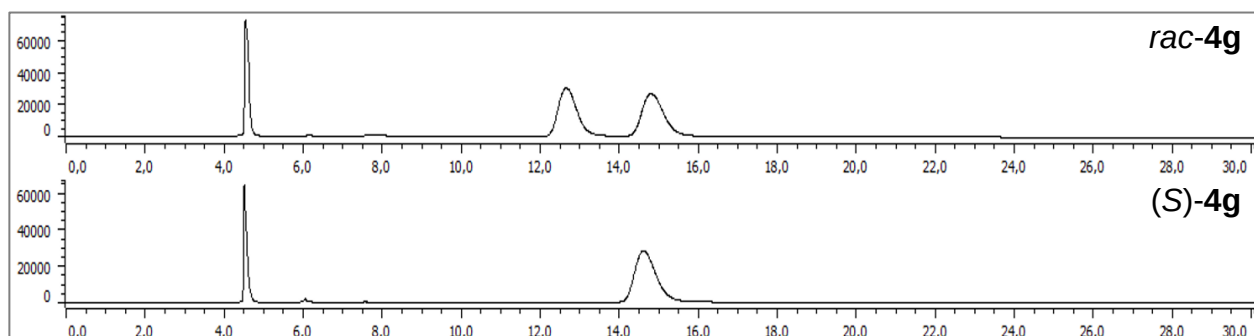
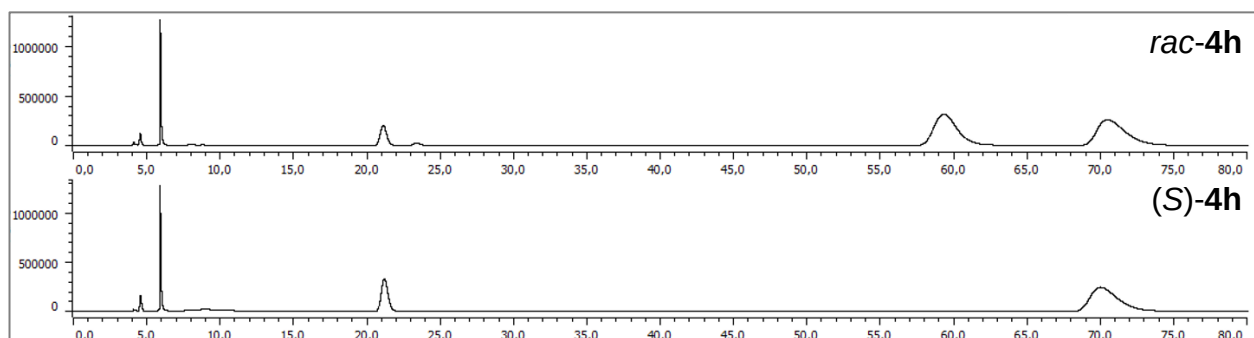
Apêndice 1 – Cromatograma obtido via HPLC-DAD para o produto **3f**



Apêndice 2 – Cromatograma obtido via HPLC-DAD para o produto **3g**

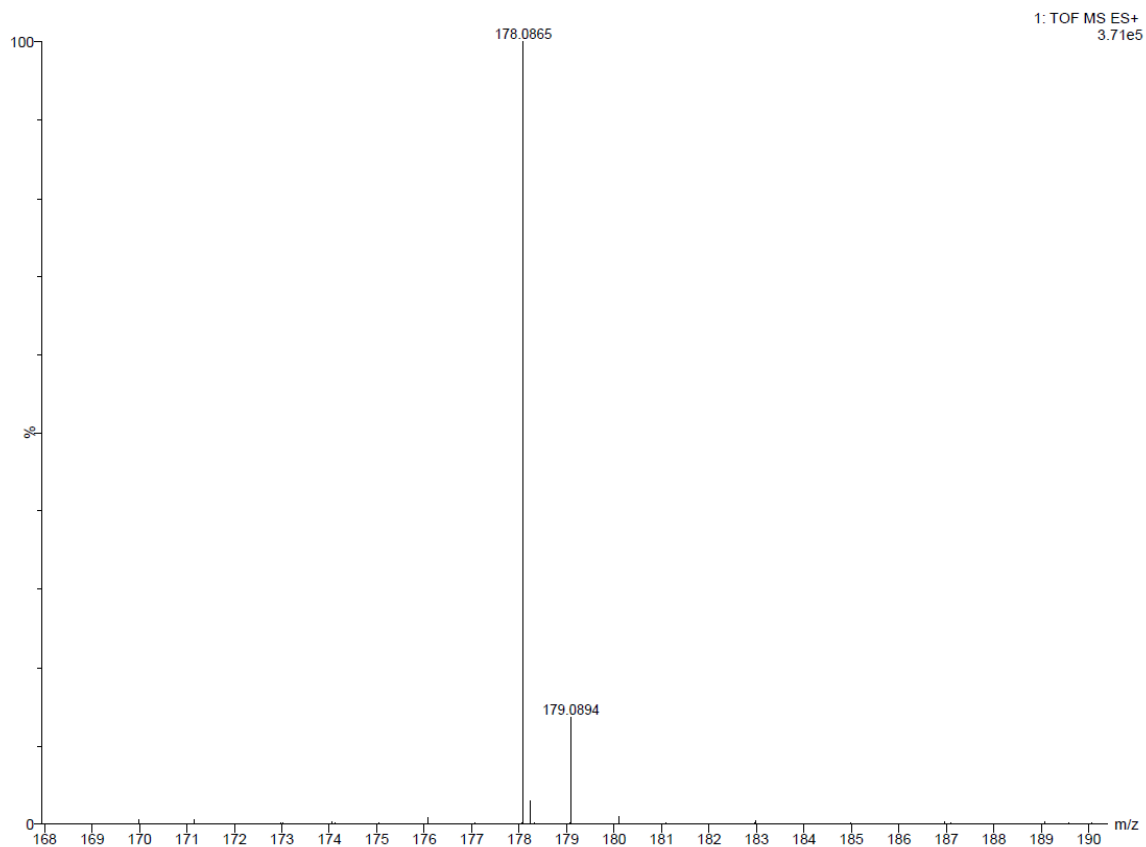


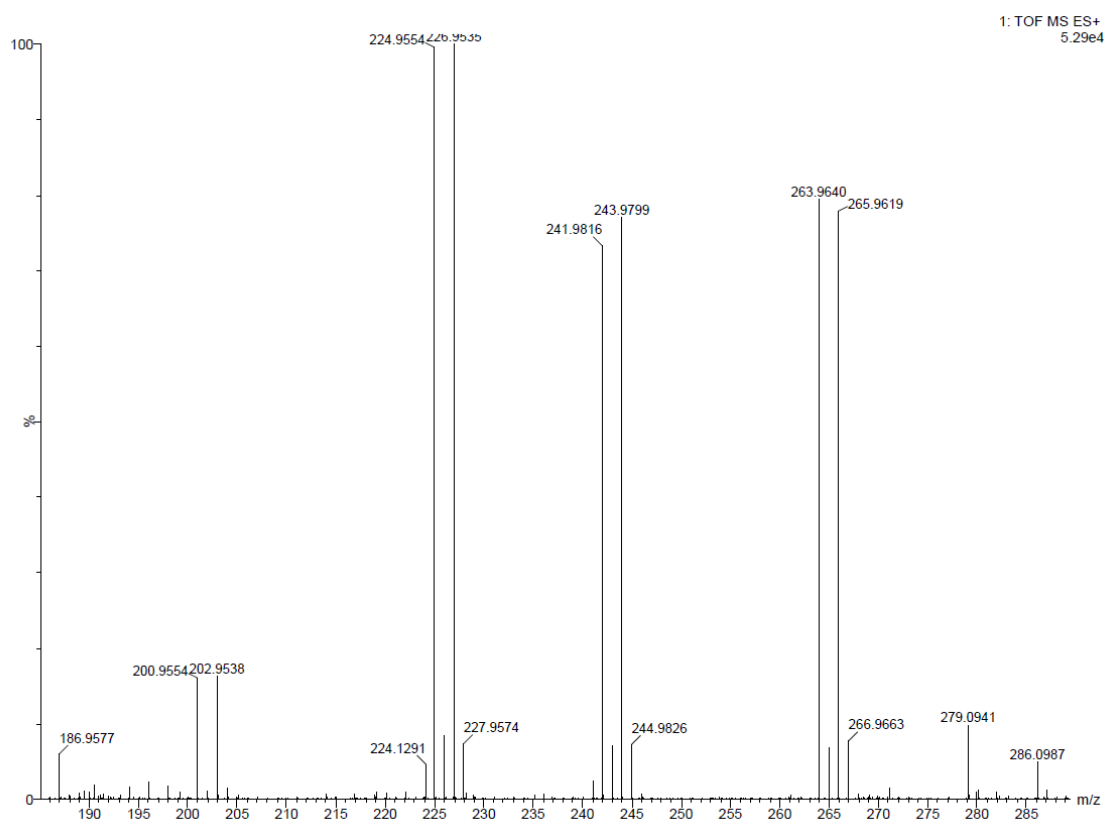
Apêndice 3 – Cromatograma obtido via HPLC-DAD para o produto 3h**Apêndice 4 – Cromatograma obtido via HPLC-DAD para o produto 4f**

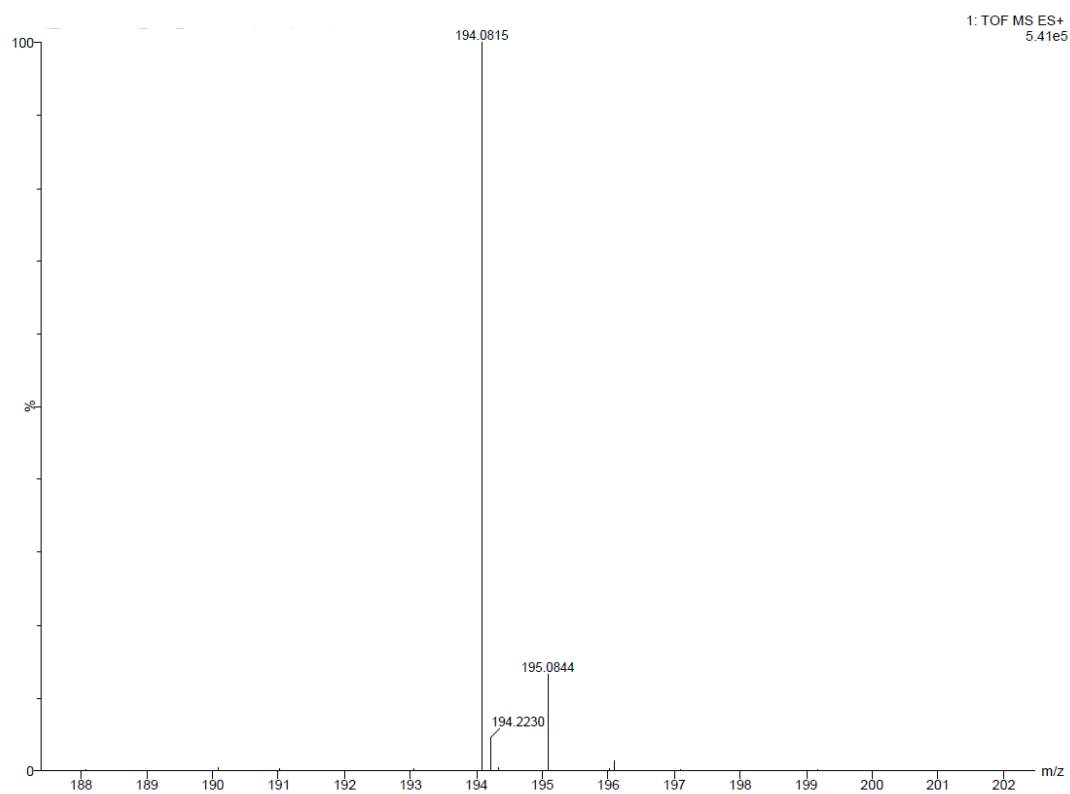
Apêndice 5 – Cromatograma obtido via HPLC-DAD para o produto 4g**Apêndice 6 – Cromatograma obtido via HPLC-DAD para o produto 4h**

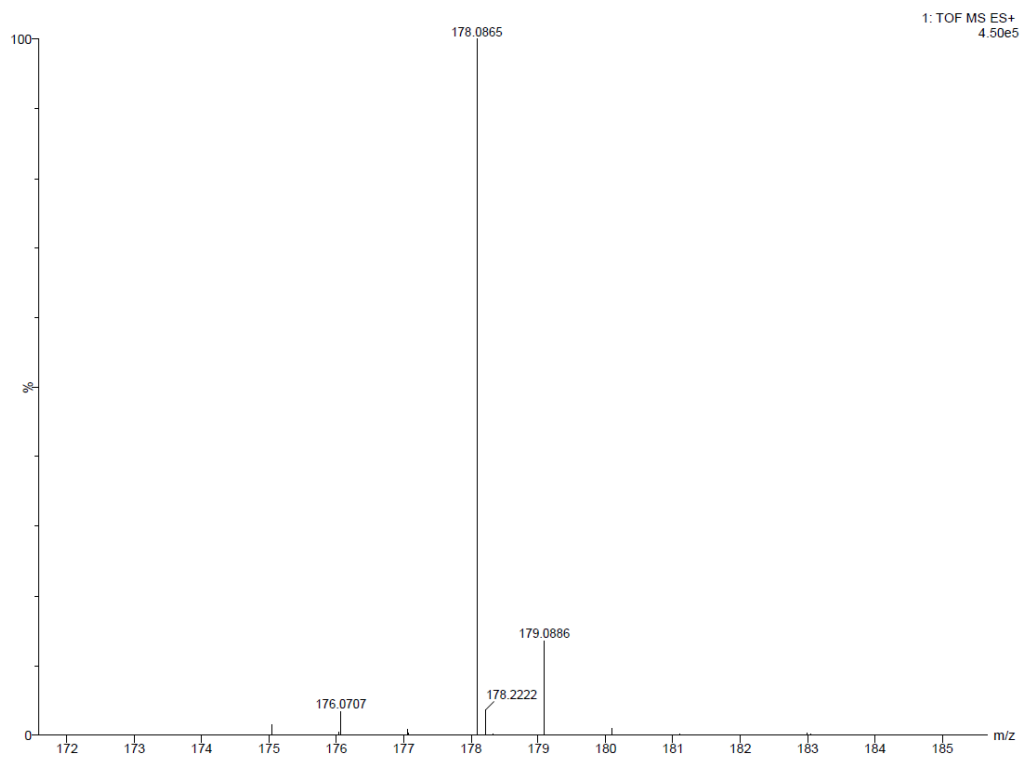
6.2 Espectros de Massas

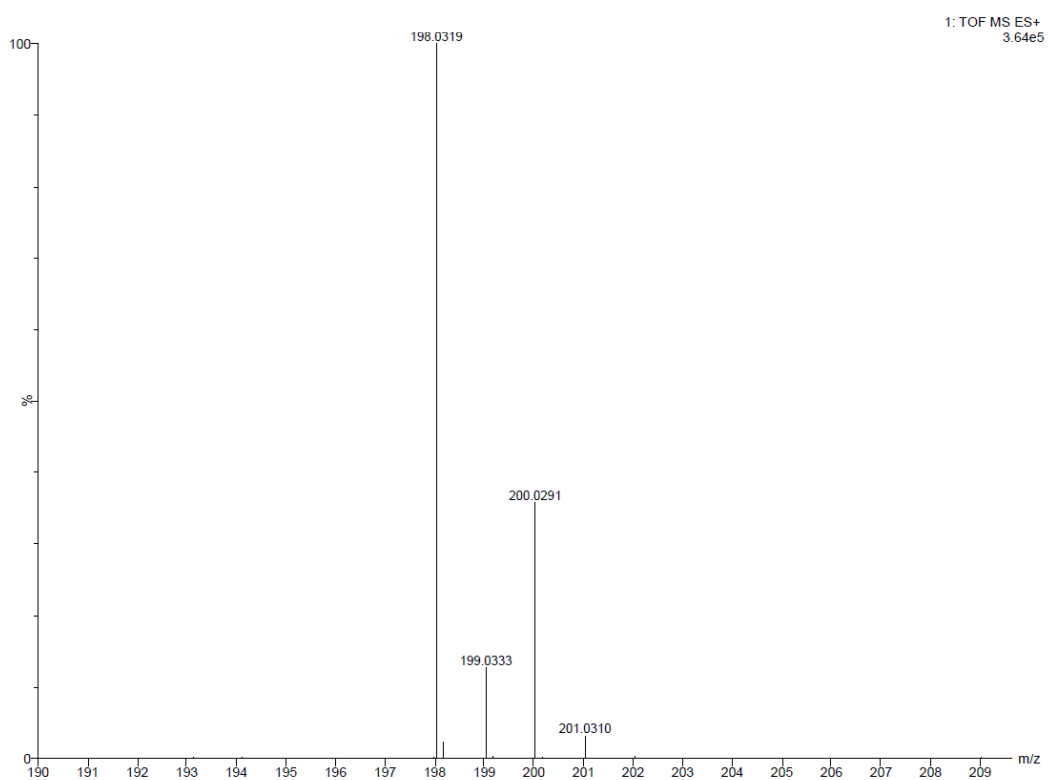
Apêndice 7 – Espectro de massas (HRMS) obtido para o produto **2a**

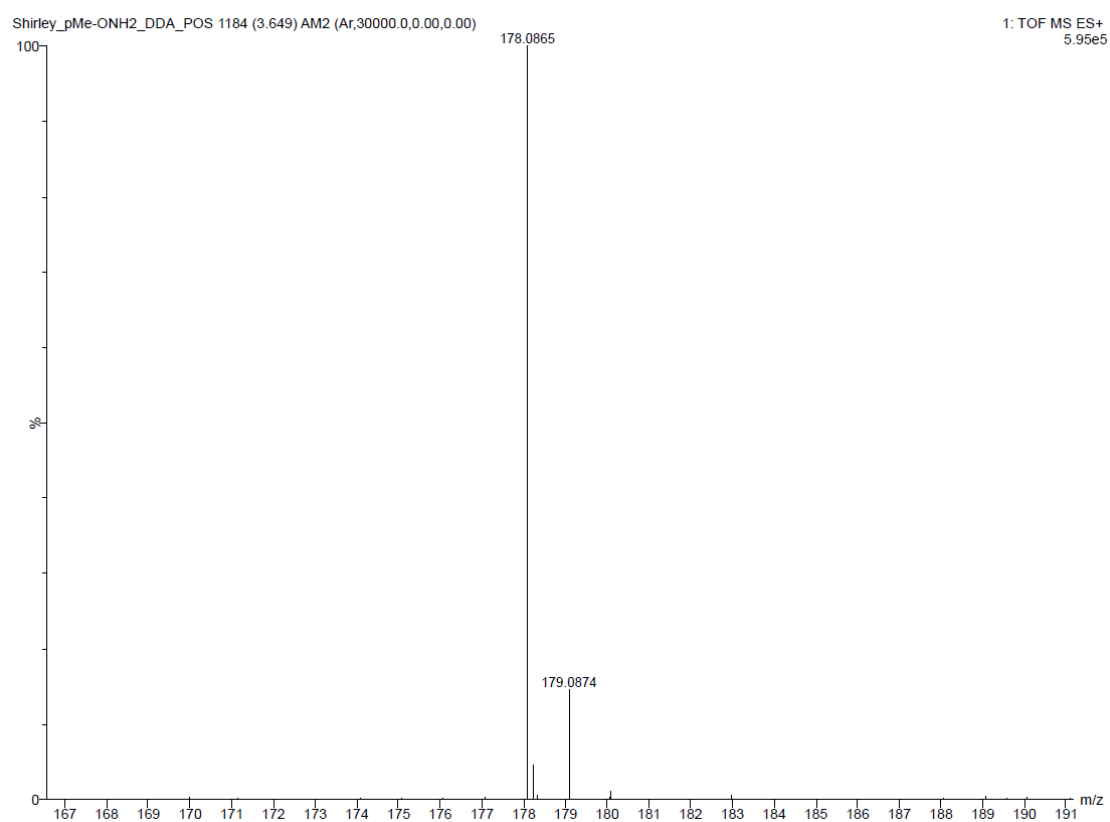


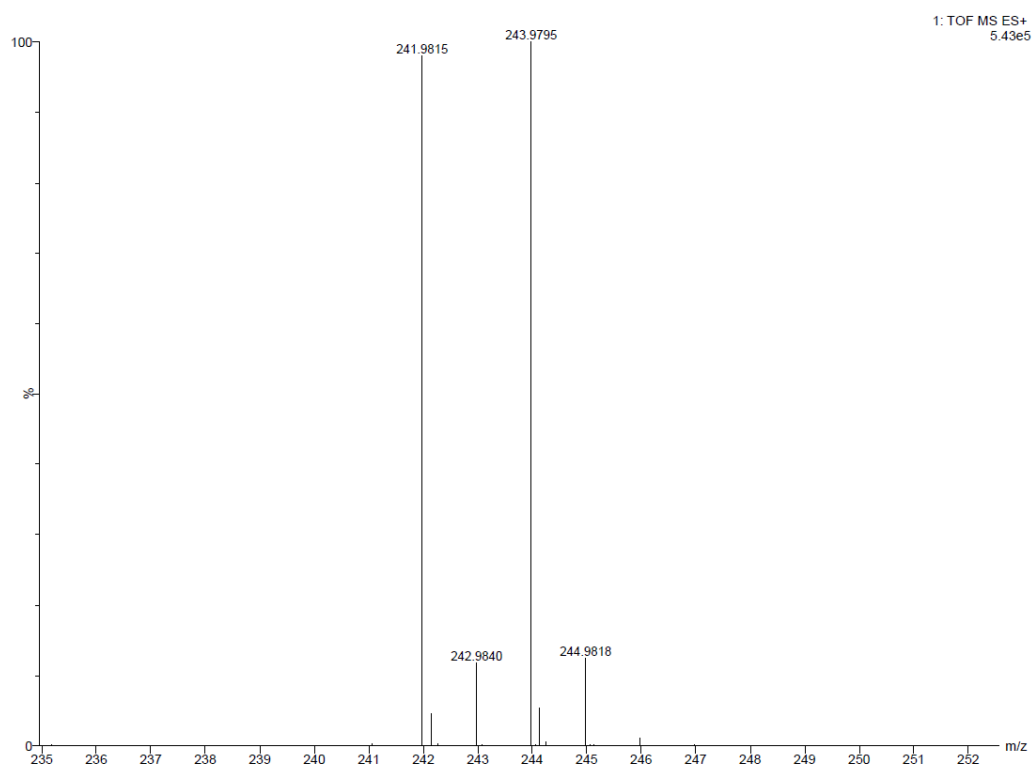
Apêndice 8 – Espectro de massas (HRMS) obtido para o produto 2b

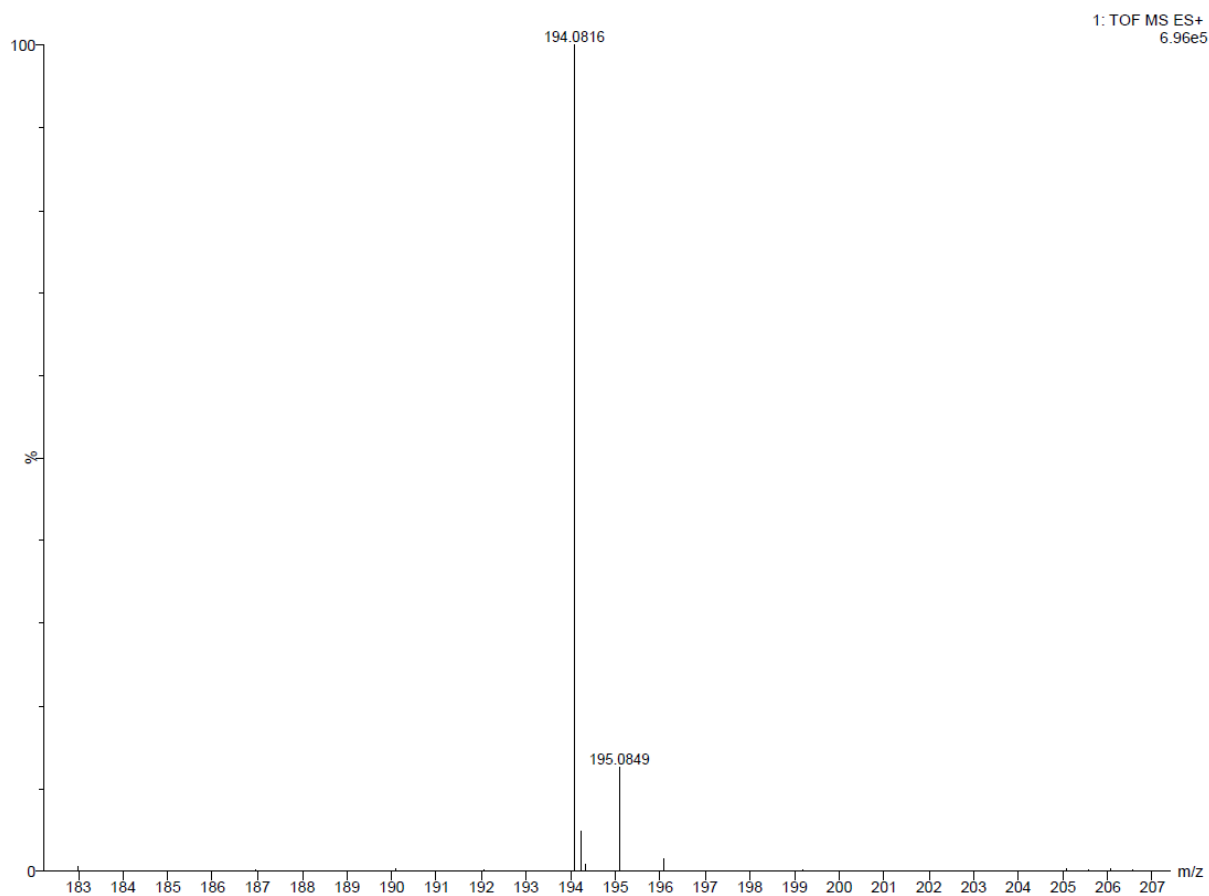
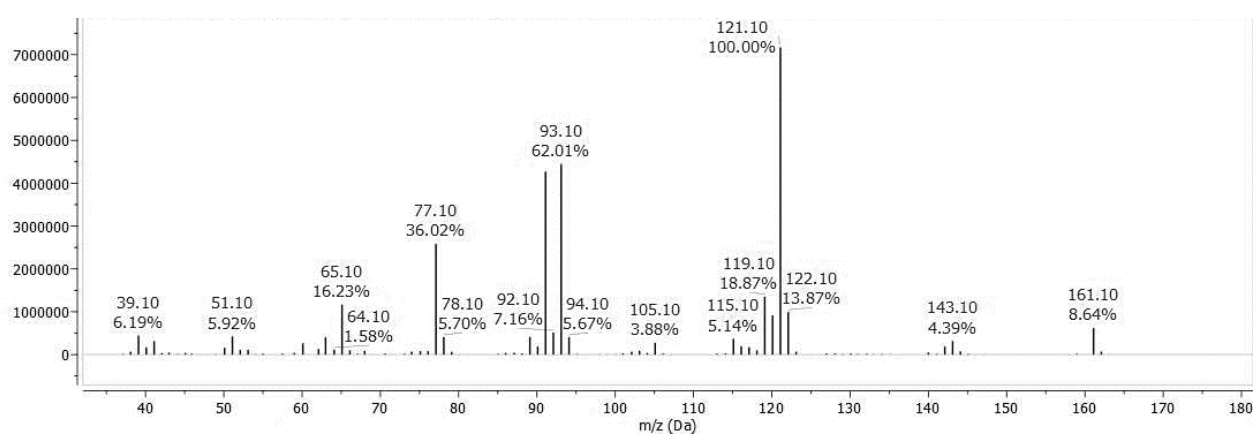
Apêndice 9 – Espectro de massas (HRMS) obtido para o produto 2c

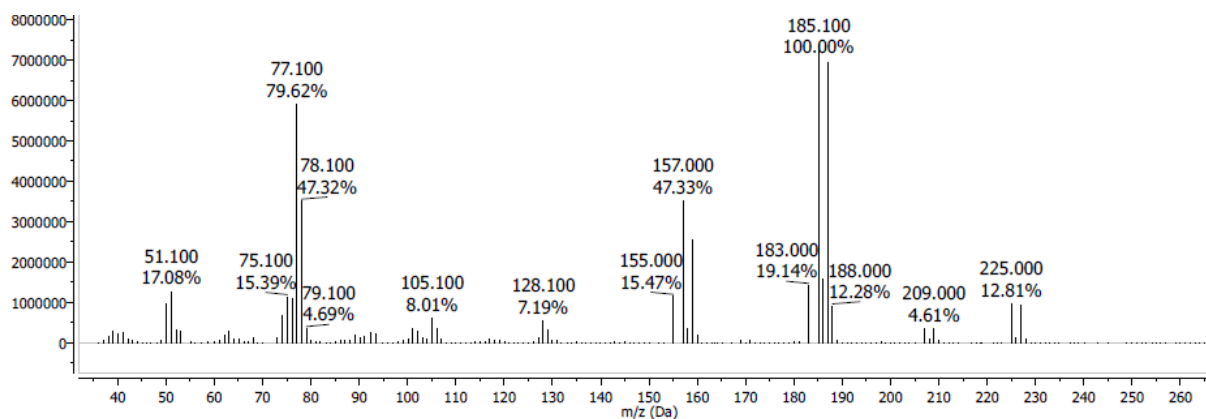
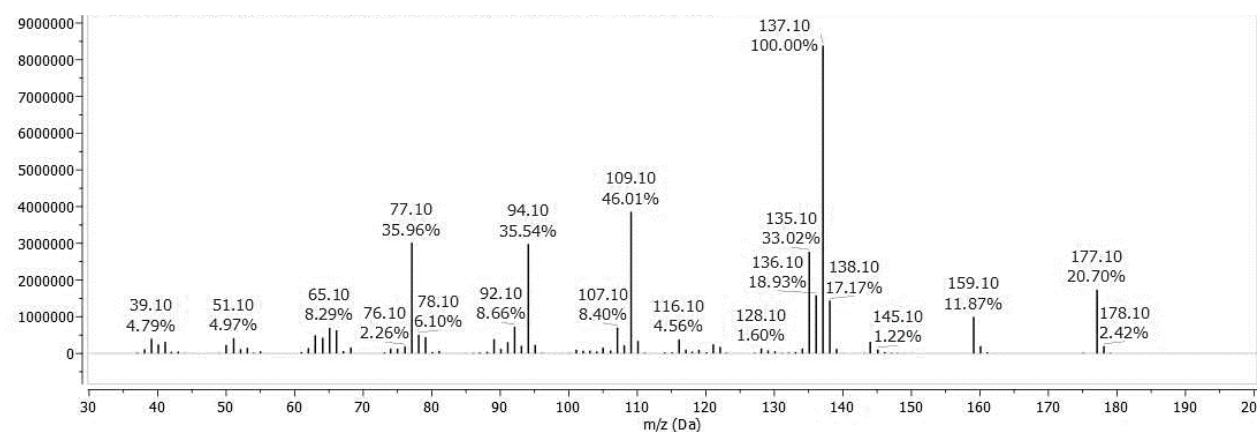
Apêndice 10 – Espectro de massas (HRMS) obtido para o produto 2d

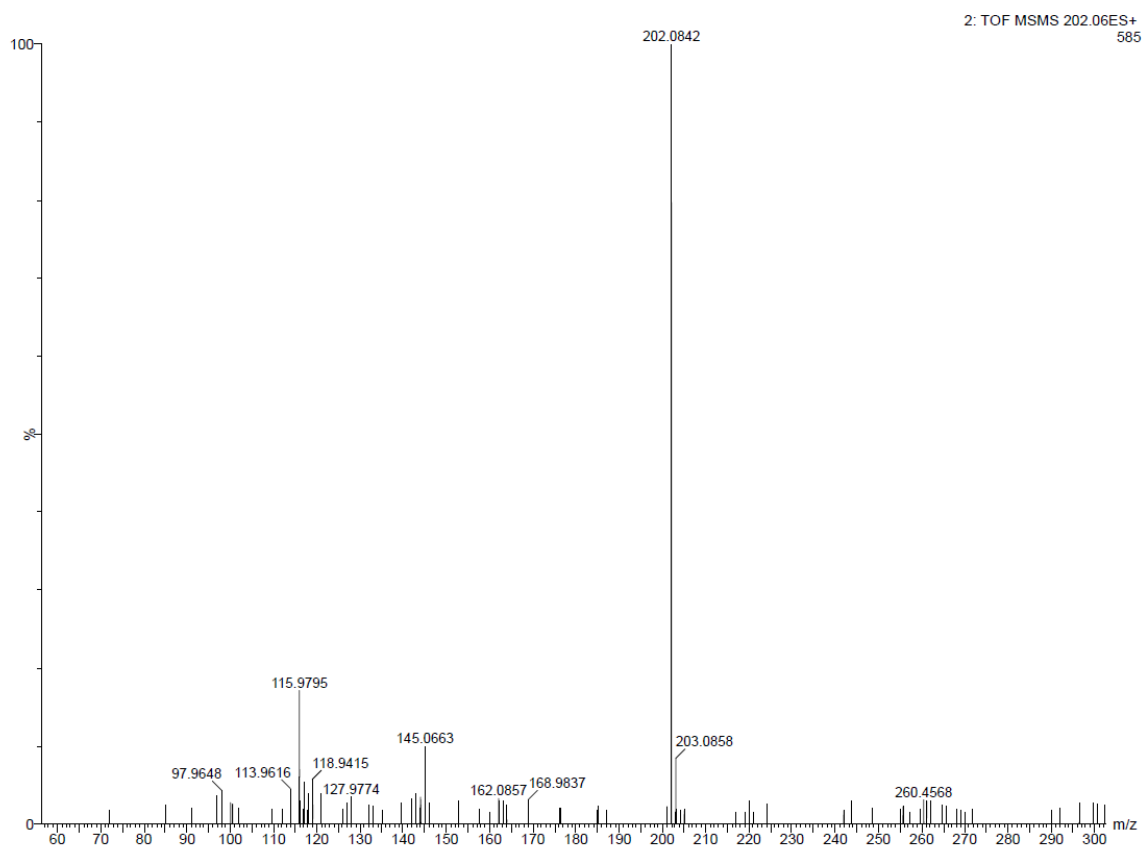
Apêndice 11 – Espectro de massas (HRMS) obtido para o produto 2e

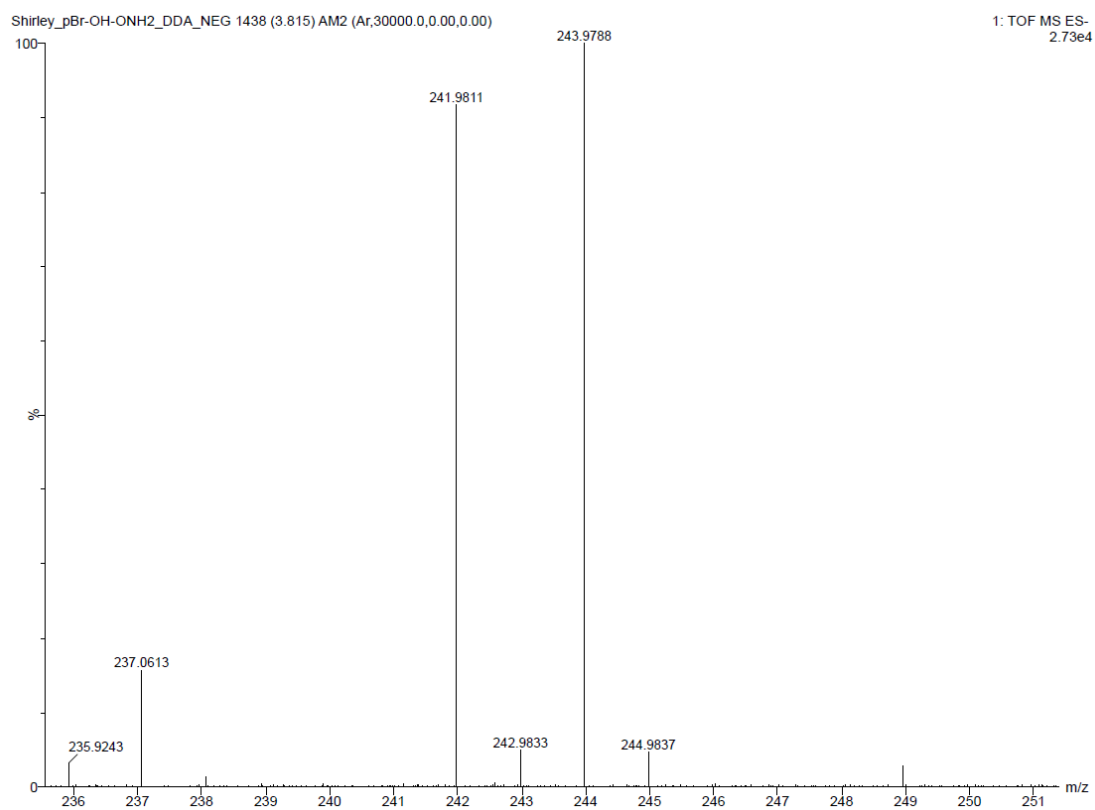
Apêndice 12 – Espectro de massas (HRMS) obtido para o produto 2f

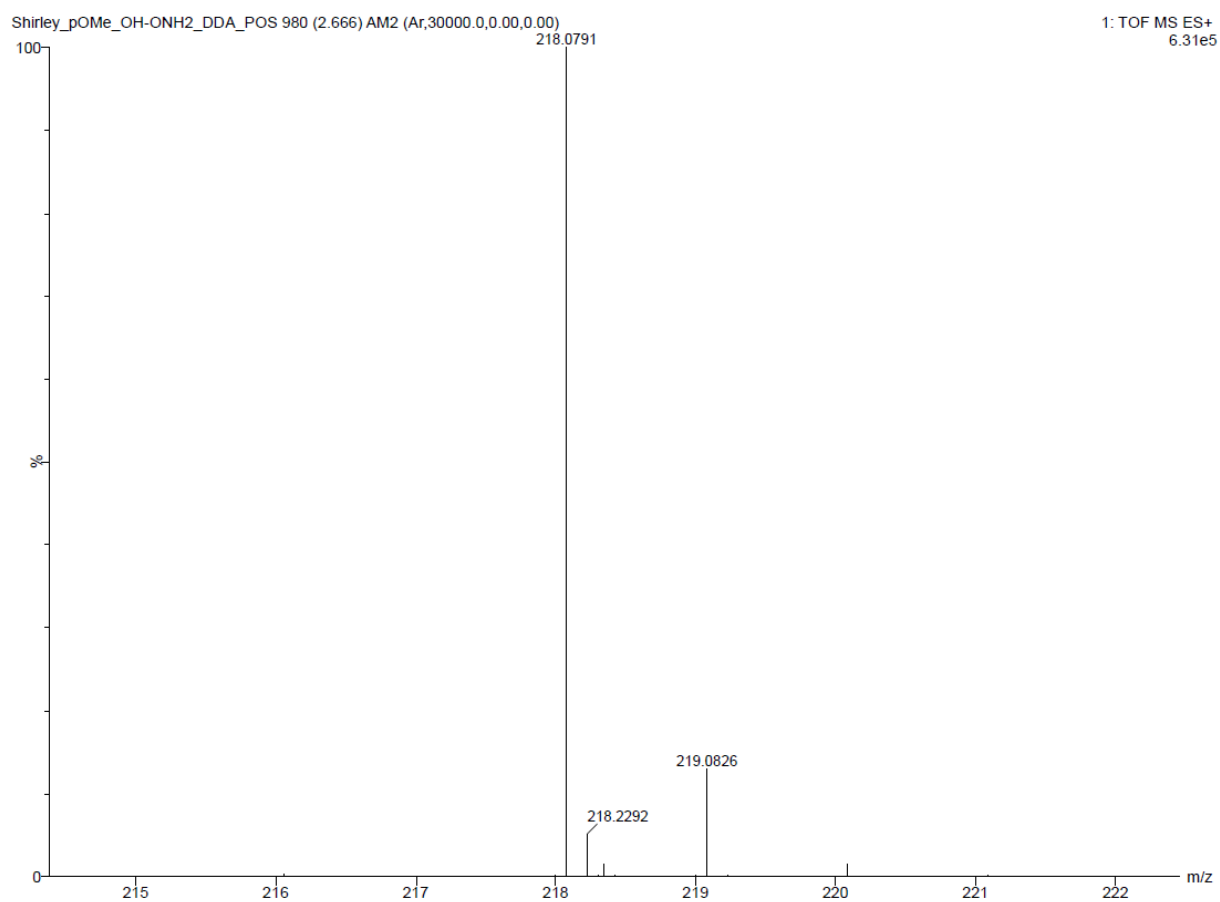
Apêndice 13 – Espectro de massas (HRMS) obtido para o produto 2g

Apêndice 14 – Espectro de massas (HRMS) obtido para o produto 2h**Apêndice 15 – Espectro de massas (GC-MS) obtido para o produto 3f**

Apêndice 16 – Espectro de massas (GC-MS) obtido para o produto 3g**Apêndice 17 – Espectro de massas (GC-MS) obtido para o produto 3h**

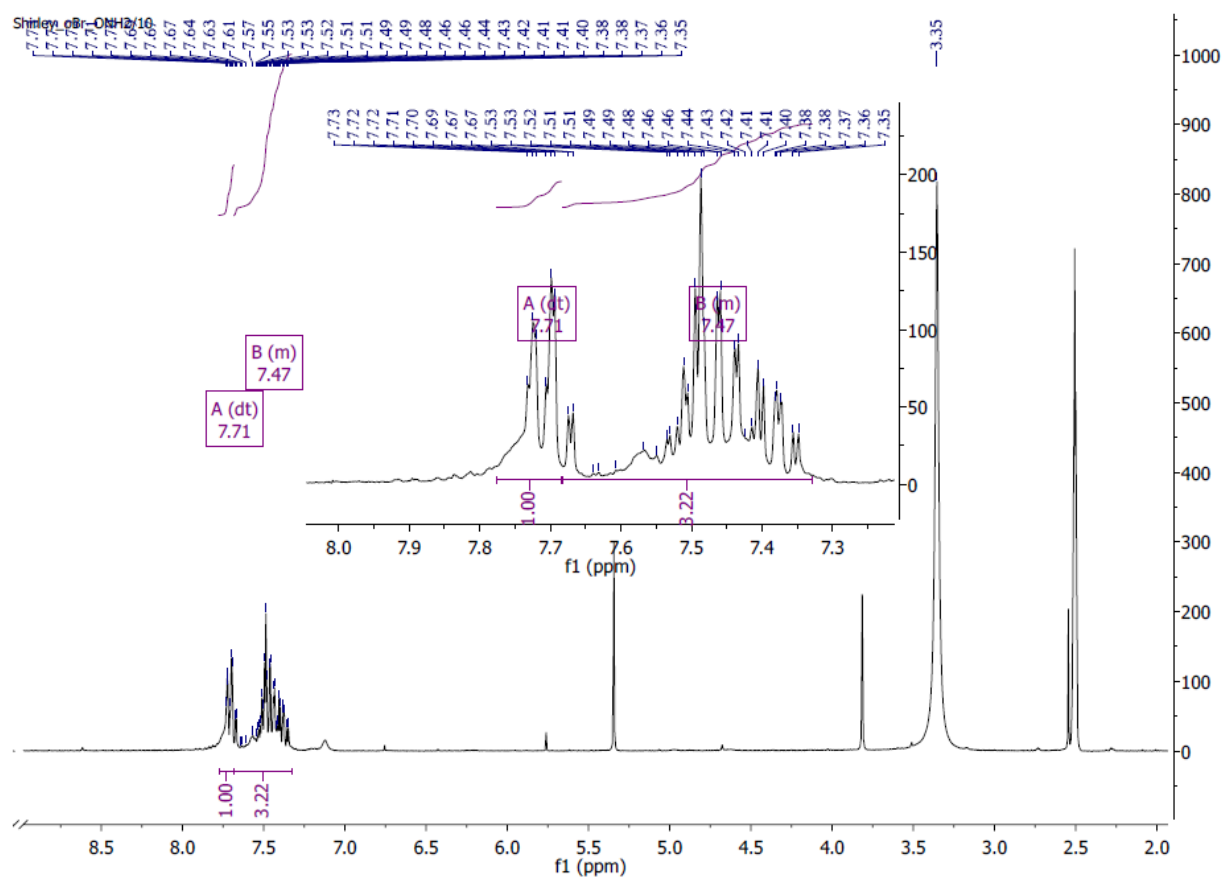
Apêndice 18 – Espectro de massas (HRMS) obtido para o produto 4f

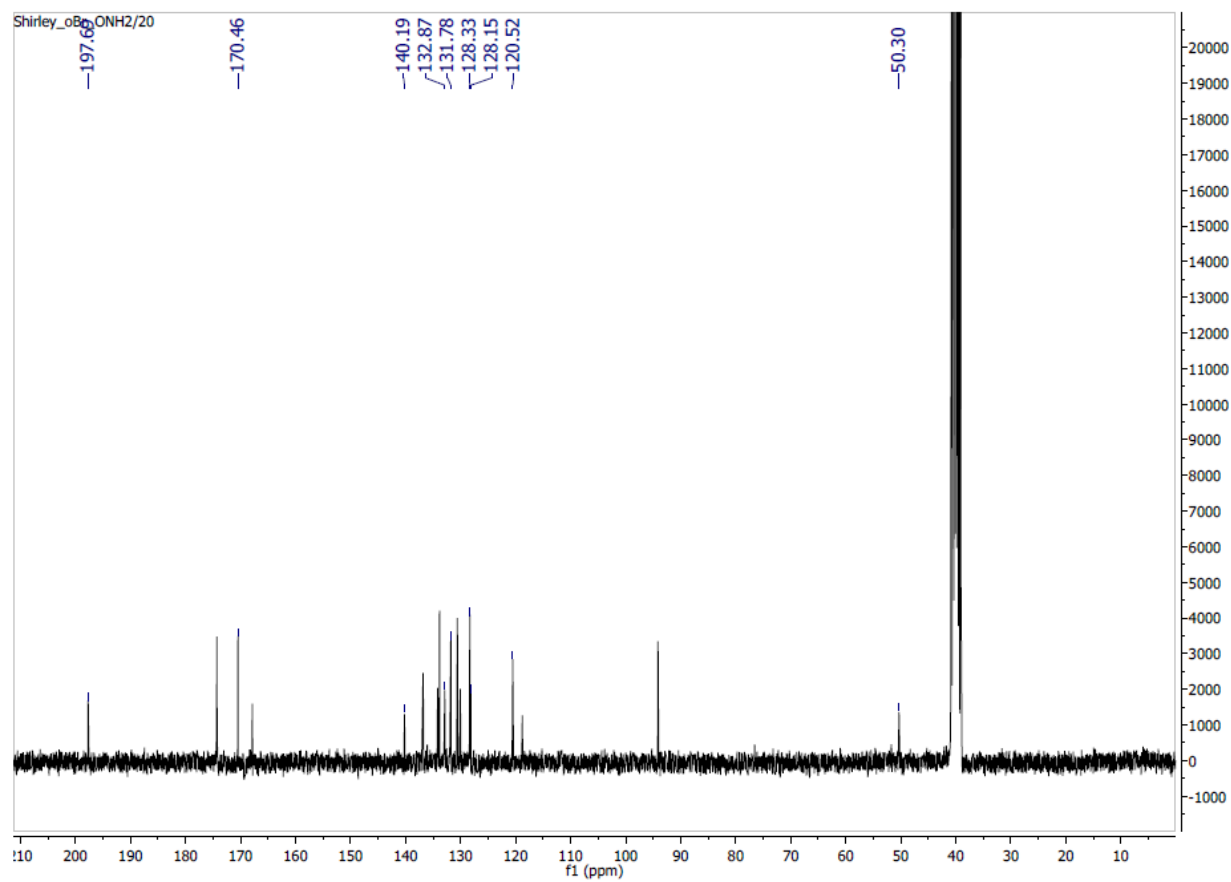
Apêndice 19 – Espectro de massas (HRMS) obtido para o produto 4g

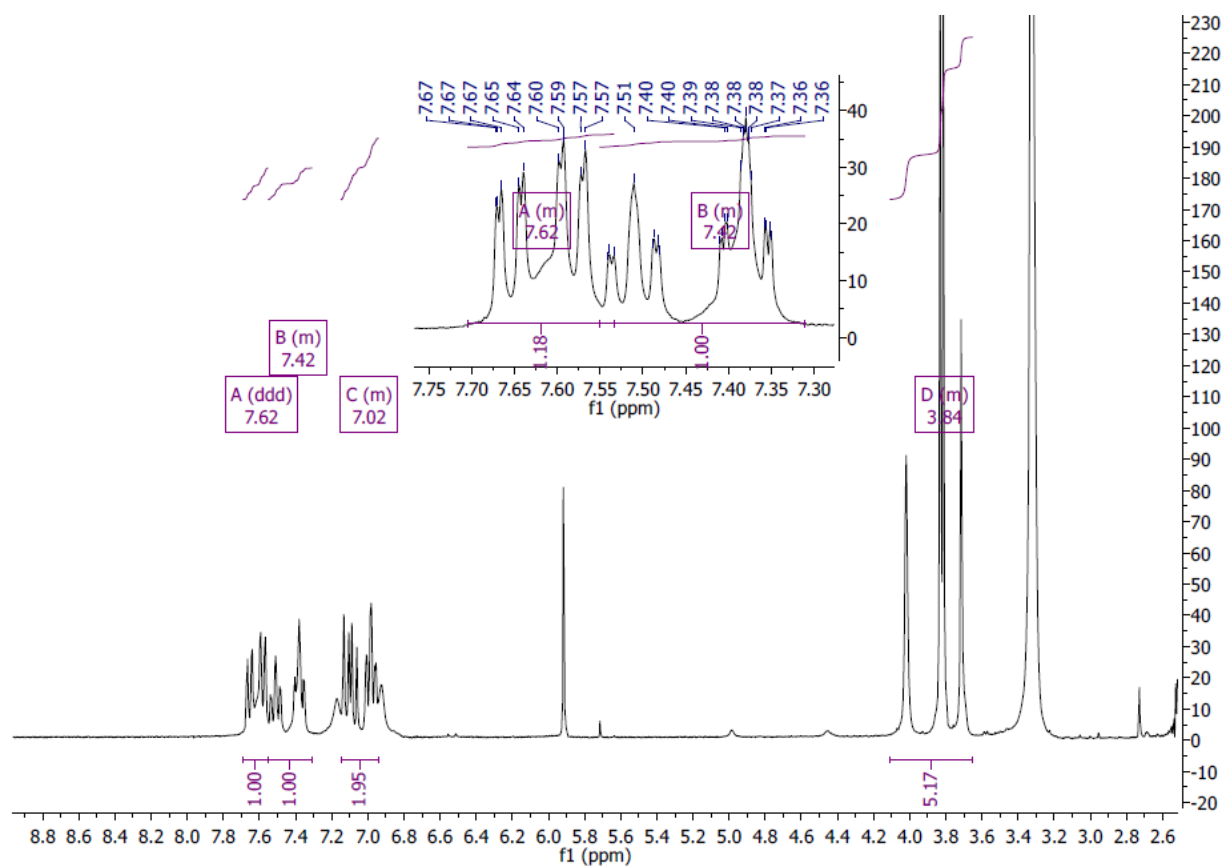
Apêndice 20 – Espectro de massas (HRMS) obtido para o produto 4h

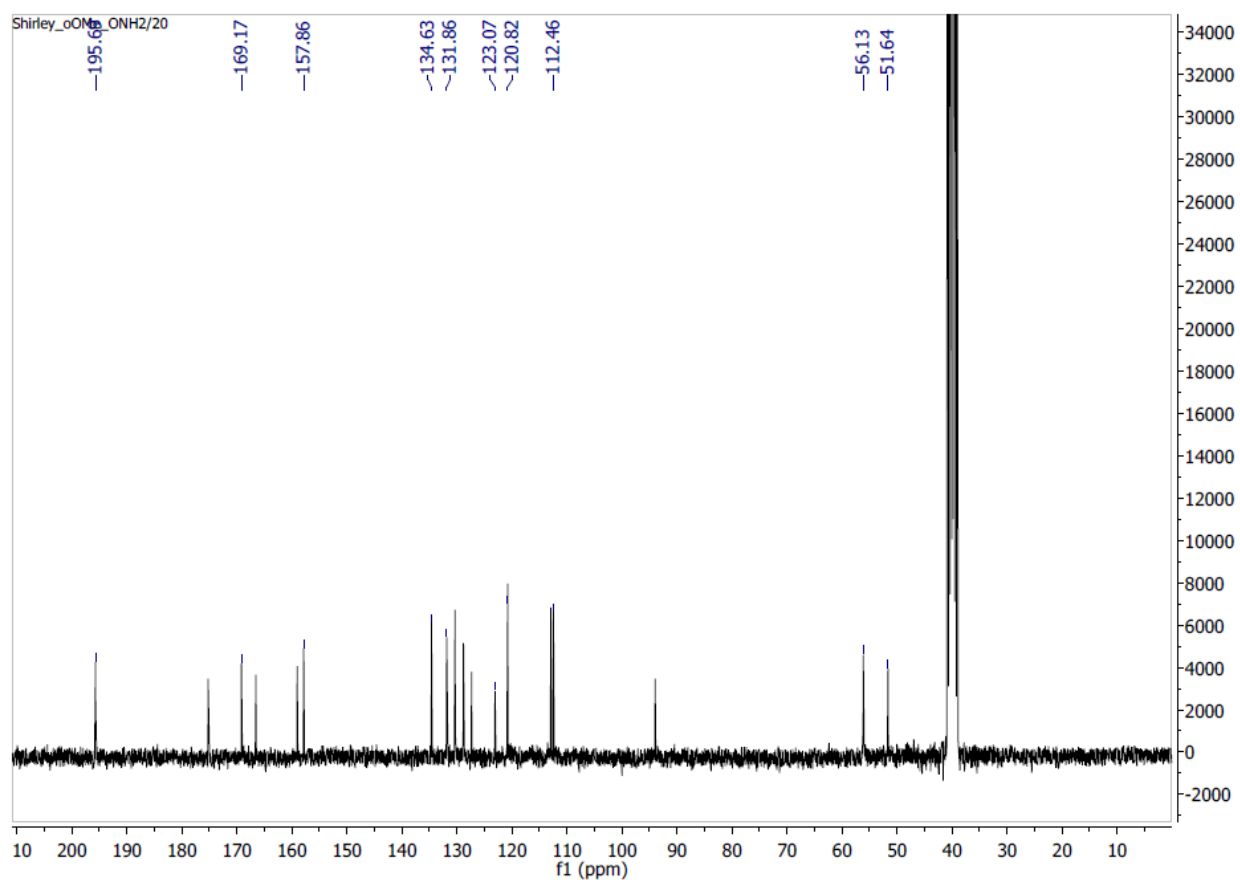
6.3 Espectros de RMN

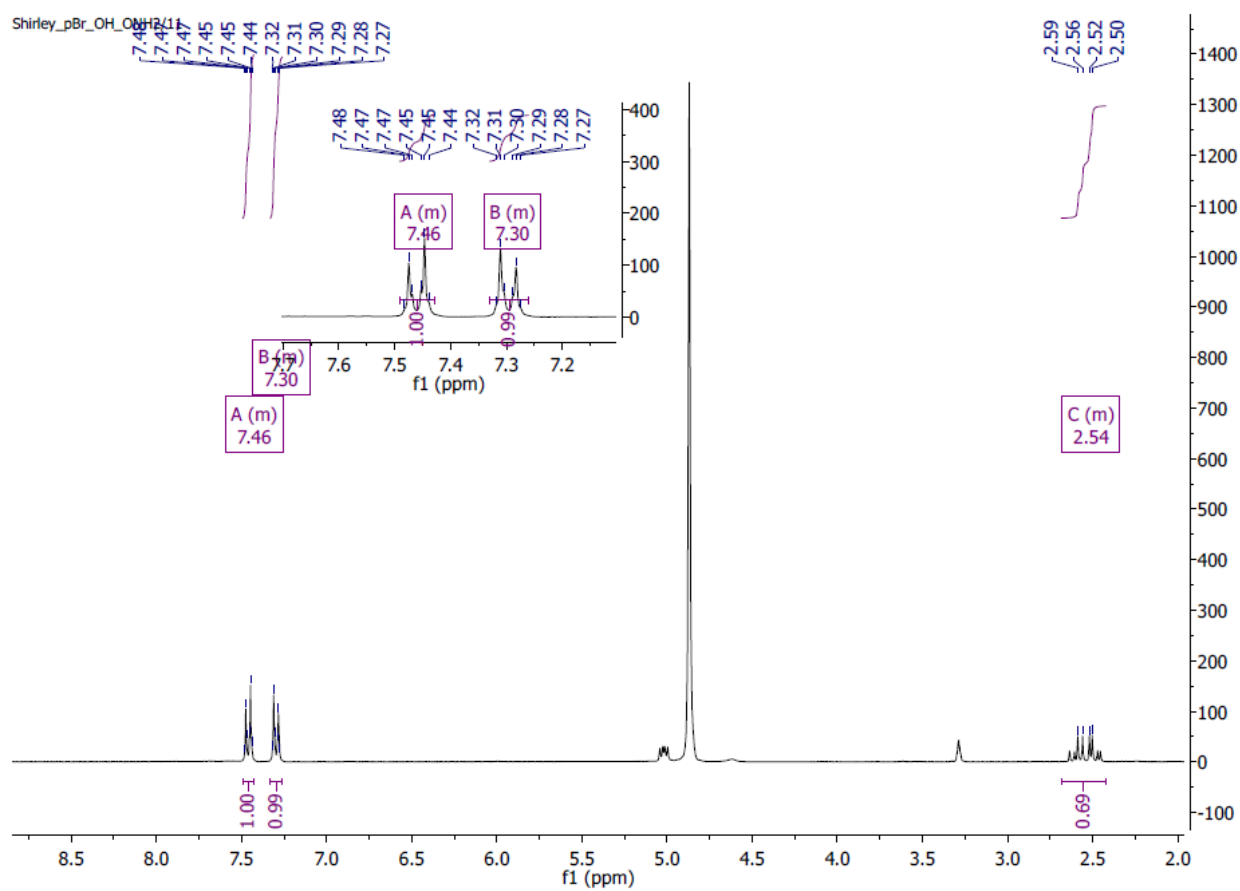
Apêndice 21 – Espectro de ^1H RMN para o composto 2b



Apêndice 22 – Espectro de ^{13}C RMN para o composto **2b**

Apêndice 23 – Espectro de ^1H RMN para o composto 2c

Apêndice 24 – Espectro de ^{13}C RMN para o composto 2c

Apêndice 25 – Espectro de ^1H RMN para o composto 2g

Apêndice 26 – Espectro de ^{13}C RMN para o composto 2g