

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

INSTITUTO DE QUÍMICA DE SÃO CARLOS

Bacharelado em Química com Ênfase Tecnológica em Alimentos

**BIORREDUÇÃO DE DERIVADOS DE α -CLOROCETONAS POR FUNGOS DE
AMBIENTE MARINHO**

Aline Teixeira do Brasil Moraes

São Carlos

2015

ALINE TEIXEIRA DO BRASIL MORAIS

Biorredução de derivados de α -clorocetona por fungos de ambiente marinho

Trabalho de Conclusão de Curso para obtenção do diploma de graduação em **Bacharelado em Química com Ênfase Tecnológica em Alimentos** pelo Instituto de Química de São Carlos da Universidade de São Paulo.

O presente trabalho teve como intuito a biorredução enantiosseletiva de α -clorocetonas por fungos de ambiente marinho sob orientação do Prof. Dr. André Luiz Meleiro Porto.

São Carlos

Novembro de 2015

Dedico este trabalho aos meus pais, Mara e Jefferson, que com todo amor se dedicaram à minha formação pessoal e profissional.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por sempre estar presente em minha vida.

Ao meu orientador, Prof. Dr. André Luiz Meleiro Porto pela oportunidade, orientação, aprendizado e também rapidez nas correções dos trabalhos.

A técnica, Marília pela manutenção e organização do laboratório tornando a rotina de trabalho mais fácil.

Aos amigos que fiz no grupo de Biocatálise: Iara, Natália, Willian, Darlison, David e Irlon que sempre se dispuseram a me ajudar com algumas técnicas e no manuseio dos equipamentos, e também pelos momentos de descontração tornando a rotina do laboratório mais prazerosa, muito obrigada. Em especial, agradeço ao Doutorando Irlon Maciel pela orientação e incentivo na realização deste trabalho nestes dois anos em que participei no grupo.

Agradeço aos meus amigos de classe, a Natália, Marylyn, Lucas, Amanda Hikari, Victória e tantos outros que sempre estiveram me apoiando nestes anos de graduação tornando os momentos de estudos mais agradáveis. Vocês são demais!

Aos meus amigos e familiares que me acompanharam por todo apoio e carinho.

Aos meus pais, Mara e Jefferson (*in memoriam*), pelo sustento e pela total dedicação à minha formação pessoal e profissional com amor incondicional; aos meus irmãos, Sinara e Jefferson, pelo carinho, suporte, incentivo e pelo exemplo que também são em minha vida. Vocês são minha essência!

Ao meu noivo Henrique que perdeu algumas tardes de sábado me acompanhando no laboratório para execução deste trabalho e por compartilhar comigo todos os momentos. Amo muito você!

Ao Instituto de Química de São Carlos e à Universidade de São Paulo pela oportunidade. A Comissão de Pesquisa do IQSC pelo gerenciamento do projeto.

Ao CNPq pela concessão da bolsa de Iniciação Científica (PIBIC-163288/2014-3).

RESUMO

A biocatálise é uma ferramenta útil na síntese orgânica devido às reações enzimáticas serem estereosseletivas aos produtos e também por atender aos princípios da Química Verde. Dentre as aplicações está a síntese de cloridrinas quirais que são utilizadas na formação de epóxidos e amino-álcoois. Estes são intermediários para a síntese de compostos com atividades farmacológicas. Com o objetivo de estudar a redução enantiosseletiva de α -clorocetonas **2a-d** utilizou-se fungos de ambiente marinho. Inicialmente sintetizou a α -clorocetona **2a** por radiação micro-ondas (70%) e agitação convencional (97%). A reação por aquecimento convencional foi utilizada na síntese das cetonas **3a-d**. Em seguida, utilizou-se o fungo *Penicillium citrinum* CBMAI 1186 na biorredução da α -clorocetona **2a**. A reação foi realizada através da síntese química e seguida da reação biocatalítica sem prévia purificação da cetona **2a**, a qual foi monitorada por 6 d e obteve-se 32% de conversão e 15% e.e. da cloridrina **3a**. Para obter melhores resultados fez-se a adição de co-solventes (glicerol, hexano, isopropanol e metanol). Contudo, não houve alteração significativa no excesso enantiomérico, mas a reação em metanol apresentou melhor resultado. Também utilizou-se outros fungos de ambiente marinho (*Mucor racemosus* CBMAI 847, *Aspergillus sydowii* CBMAI 935, *Penicillium raistrickii* CBMAI 931 e *Penicillium oxalicum* CBMAI 1185) e os derivados **2b-2d** [(2-cloro-1-(4-flúor-fenil)etanona **2b**, 2-cloro-2-(furanil)etanona **2c** e 2-cloro-1-(*p*-toluil)etanona **2d**] os quais forneceram excessos enantioméricos de 3-94% e conversões de 15-97% para as respectivas cloridrinas **3a-d**. Este foi o primeiro estudo envolvendo a síntese de α -clorocetonas seguida de reação biocatalítica para a obtenção de cloridrinas enantioenriquecidas **3a-d**.

ABSTRACT

Biocatalysis is a useful tool in organic synthesis because the enzymatic reactions are stereoselective to products and also are in accordance to the principles of Green Chemistry. Among the applications are the synthesis of chiral chlorohydrins that are used in the formation of epoxides and amino-alcohols. These are intermediates for the synthesis of compounds with pharmacological activities. With the aim of studying the enantioselective reduction of α -chloroketones **2a-d** was used marine-derived fungus. Initially was synthesized α -chloroketone **2a** under microwave radiation (70%) and conventional stirring (97%). The reaction by conventional heating has been used in the synthesis of ketones **3a-d**. Then, we used the fungus *Penicillium citrinum* CBMAI 1186 for bioreduction of the α -chloroketone **2a**. The reaction was performed through chemical synthesis and then by biocatalytic reaction without further purification of the ketone **2a**, which was monitored for 6 d and gave 32% conversion and 15% e.e. of chlorohydrin **3a**. For best results made the addition of solvents (glycerol, hexane, isopropanol and methanol). However, there was no significant change in the enantiomeric excess, but the reaction in methanol showed better results. It is also used other marine-derived (*Mucor racemosus* CBMAI 847, *Aspergillus sydowii* CBMAI 935, *Penicillium raistrickii* CBMAI 931 and *Penicillium oxalicum* CBMAI 1185) and α -chloroketones **2b-2d** [(2-chloro-1-(4-fluoro-phenyl) ethanone **2b**, 2-chloro-2-(furanylethanone **2c** and 2-chloro-1-(*p*-tolyl)ethanone **2d**] which gave enantiomeric excesses of 3-94% and conversions of 15-97% for chloridrins **3a-d**, respectively. This was the first study involving the synthesis of α -chloroketones **2a-d** followed by biocatalytic reaction to obtain enantioenriched chloridrins **3a-d**.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	8
1.1. Microrganismos em biocatálise.....	8
1.2. Enzimas como catalisadores biológicos.....	10
1.3. Síntese orgânica em reator de micro-ondas.....	12
2. OBJETIVOS.....	14
3. METODOLOGIA.....	15
3.1. Reagentes e solventes.....	15
3.2. Métodos cromatográficos.....	15
3.2.1. Cromatografia em coluna e em camada delgada.....	15
3.2.2. Cromatografia a gás por ionização de chama (CG-FID).....	15
3.2.3. Cromatografia a gás por espectrometria de massas (CG-MS).....	15
3.3. Métodos espectroscópicos.....	16
3.3.1. Ressonância magnética nuclear (RMN).....	16
3.3.2. Espectroscopia no infravermelho (IV).....	16
3.4. Otimização para a síntese da 2-cloro-1-feniletanona 2a por radiação micro-ondas (MW) e aquecimento convencional (AC).....	16
3.5. Isolamento e identificação dos fungos filamentosos de ambiente marinho....	17
3.6. Cultivo dos micélios dos fungos marinhos em meio sólido.....	18
3.7. Cultivo dos micélios dos fungos marinhos em meio líquido.....	19
3.8. Síntese de α -clorocetonas 2a-d seguida pela reação de redução pelo fungo <i>P. citrinum</i> CBMAI 1186.....	20
3.9. Síntese das cloridrinas racêmicas 3a-d	22
3.10. Medida da rotação óptica das cloridrinas 3a-d obtidas por biorredução.....	22
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	23
4.1. ANÁLISES ESPECTROSCÓPICAS E CROMATOGRÁFICAS.....	33
4.1.1. Ressonância magnética nuclear (RMN).....	33
4.1.2. Espectroscopia no infravermelho (IV).....	37
4.1.3. Cromatografia à gás por ionização de chama (CG-FID).....	39
4.1.4. Cromatografia a gás por espectrometria de massas (CG-EM).....	41
5. CONCLUSÃO.....	43
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	44
ANEXOS.....	48

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Otimização da síntese da α -cloro-feniletanona 2a por radiação micro-ondas.....	24
Tabela 2 - Síntese de derivados da 2-cloro-1-feniletanona 2a por aquecimento convencional.....	25
Tabela 3 - Reação em cascata na síntese de 2-cloro-1-feniletanona 2a seguida pela biorredução por células do fungo <i>P. citrinum</i> CBMAI 1186.....	28
Tabela 4 - Redução enantiosseletiva da 2-cloro-1-feniletanona 2a pelo fungo <i>P. citrinum</i> CBMAI 1186 na presença de co-solventes.....	29
Tabela 5 - Síntese química das α -clorocetonas 2a-d e seguida da biorredução por fungos de ambiente marinho.....	30
Tabela 6 - Valores de rotação óptica para os produtos enantiopuros obtidos pela biotransformação com os fungos marinhos comparados com os dados da literatura.....	31

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Substâncias químicas com atividade farmacológica.....	10
Figura 2 - Formação de uma ligação peptídica entre dois aminoácidos.....	11
Figura 3 - α -clorocetonas empregadas nas reações de biorredução enantiosseletiva	14
Figura 4 - Placas de Petri contendo os fungos de ambiente marinho (6 d, 32 °C).....	18
Figura 5 - Frascos Erlenmeyer contendo colônias do fungo <i>M. racemosus</i> CBMAI 847 em meio líquido (6 d, 32 °C, 130 rpm).....	19
Figura 6 - Fluxograma da síntese de α -clorocetona 2a seguida pela reação de redução pelo fungo <i>P. citrinum</i> CBMAI 1186 em diferentes experimentos.....	21
Figura 7 - Proposta de mecanismo para oxidação do NH_4Cl pelo Oxone® seguida da mono-cloração de cetonas.....	25
Figura 8 - Cromatograma representando a formação do produto 2a e os subprodutos gerados na reação.....	26
Figura 9 - Espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) da α -cloro-feniletanona 2a	34
Figura 10 - Espectro de RMN ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) da α -cloro-feniletanona 2a	34
Figura 11 – Espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) do 2-cloro-1-feniletanol 3a .	36
Figura 12 – Espectro de RMN ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) do 2-cloro-1-feniletanol 3a	36
Figura 13 - Espectro no infravermelho da α -cloro-feniletanona 2a	37
Figura 14 - Espectro no infravermelho do 2-cloro-1-feniletanol 3a	38
Figura 15 -Cromatogramas obtidos por CG-FID em coluna quiral de β -ciclo dextrina: A) 2-cloro-feniletanona 2a . B) (<i>R</i>)-2-cloro-1-feniletanol 3a . Etapas da reação em cascata: C) 48 h de reação; D) 96 h de reação e E) 144 h de reação.....	40
Figura 16 – Espectro de massas da reação de formação da 2-cloro-1-feniletanona 2a por radiação micro-ondas.....	42

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1 - Bio-hidrogenação da (<i>E</i>)-3-(4-fluorofenil)-1-fenilprop-2-en-1-ona pelo fungo <i>P. citrinum</i> CBMAI 1186.....	9
Esquema 2 - Bio-oxidação regiosseletiva do (-)-Ambrox pelo fungo <i>A. sydowii</i> CBMAI 934.....	9
Esquema 1 - Biorredução de α -clorocetona pelo fungo <i>Trichoderma</i> sp. e aplicação da cloridrina em diferentes transformações orgânicas.....	10
Esquema 4 - Exemplos de regiosseletividade (A-grupos funcionais em diferentes regiões da molécula) e quimiosseletividade (B-molécula com diferentes grupos funcionais).....	12
Esquema 5 - Resolução enzimática do (\pm)-2-octanol por radiação micro-ondas.....	13
Esquema 6 - Biotransformação da 2,2,2-trifluór-acetofenona com o fungo marinho <i>M. Racemosus</i> CBMAI 847 por radiação micro-ondas e aquecimento convencional.....	13
Esquema 7 - Síntese de α -clorocetona 2a em reator de micro-ondas e por aquecimento convencional.....	17
Esquema 8 - Transferência de um íon hidreto do cofator NADH ao grupo carbonílico.....	32

1. INTRODUÇÃO

1.1 Microrganismos em biocatálise

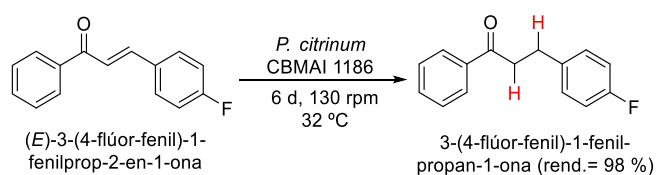
Os microrganismos, tais como, fungos e bactérias apresentam propriedades interessantes para aplicação em reações enzimáticas em relação aos processos químicos convencionais, já que são biodegradáveis, realizam reações quimio, estereo e regiosseletivas, e são de fácil cultivo em laboratório. Estas reações podem ser realizadas em condições brandas de temperatura e pressão, reduzindo possíveis reações laterais e a consequente formação de subprodutos indesejáveis, requisitos fundamentais do ponto de vista econômico/ambiental, quando empregados pela indústria na produção de moléculas bioativas. Também possibilitam promover reações em múltiplas etapas uma vez que possuem vasta diversidade de processos metabólicos e enzimas envolvidas evitando exaustivas reações de proteção e desproteção de grupos funcionais (Rocha *et al.*, 2010; Trincone, 2011; Tortora *et al.*, 2012).

Fungos derivados de ambiente marinho têm interesse biotecnológico devido a sua capacidade de produzir metabólitos secundários e enzimas intra e/ou extracelulares diferentes daquelas produzidas por seus homólogos terrestres. Estes fungos, com milhões de anos de evolução no ambiente marinho foram adaptados às condições diferenciadas nos seus ecossistemas, como por exemplo, alta concentração de sais, diferentes faixas de pH, baixa temperatura e alta pressão. Tais condições permitem que os fungos sejam capazes de produzir enzimas mais robustas, as quais podem gerar propriedades químicas diferenciadas ao serem empregadas em reações de biotransformação.

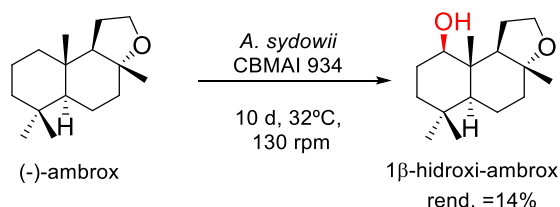
Em geral, o ambiente marinho possui baixo potencial hídrico, logo esses organismos, que neles vivem, necessitam manter o potencial hídrico de suas células menor que o potencial externo (água do mar) para que possam absorver a água (Raghukumar, 2008; Raghukumar *et al.*, 2008). Para manter o potencial hídrico menor dentro das células, os fungos derivados de ambientes marinhos acumulam osmólitos, tais como, glicerol, manitol e trealose para manutenção das células viáveis nesses ambientes extremos (Blomberg *et al.*, 1992). Portanto, é possível que as enzimas de fungos de ambiente marinho possam apresentar funções específicas às condições em que são cultivados apresentando atividades específicas.

A partir de 2009 o Grupo de Química Orgânica e Biocatálise (IQSC-USP) têm utilizado fungos derivados de ambiente marinho em reações biocatalíticas, os quais são cultivados no laboratório na presença de água do mar artificial. Como exemplo, o uso de células do fungo filamentoso *Penicillium citrinum* CBMAI 1186 em água do mar artificial bio-hidrogenou quimiosseletivamente a ligação dupla C=C da (*E*)-3-(4-flúor-fenil)-1-fenilprop-2-en-1-ona ao respectivo 3-(4-fluor-fenil)-1-fenilpropan-1-ol (Esquema 1) (Ferreira *et al.*, 2015). Células do fungo *Aspergillus sydowii* CBMAI 934 também catalisaram a reação de hidroxilação regioseletiva do (-)-Ambrox em 10 dias de fermentação ao correspondente derivado hidroxilado (Esquema 2) (Martins *et al.*, 2015). Desta maneira, tem-se verificado que fungos de ambiente marinho apresentam potencial para diferentes tipos de biotransformações.

Esquema 2 - Bio-hidrogenação da (*E*)-3-(4-flúor-fenil)-1-fenilprop-2-en-1-ona pelo fungo *P. citrinum* CBMAI 1186.

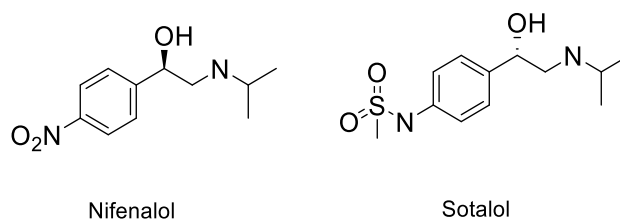


Esquema 3 - Bio-oxidação regioseletiva do (-)-Ambrox pelo fungo *A. sydowii* CBMAI 934.



A redução assimétrica de cetonas é uma reação eficiente no processo de obtenção de haloidrinas quirais, as quais são utilizadas como intermediários na preparação de um grande grupo de compostos com atividade farmacológica (Barbieri *et al.*, 2001; Nakamura *et al.*, 2003). Compostos farmacêuticos que possuem a unidade 2-amino-1-ariletanol, tais como Nifenalol e Sotalol são importantes agentes bloqueadores β-adrenérgicos. São utilizados no tratamento de asma, bronquite e insuficiência cardíaca. A aplicação dos enantiômeros (*R*)-Nifenalol e (*S*)-Sotalol são mais eficientes no tratamento de doenças cardiovasculares em relação à mistura racêmica dos seus respectivos enantiômeros (Figura 1) (Kapoor *et al.*, 2005).

Figura 1 – Exemplo de substâncias químicas com atividade farmacológica.

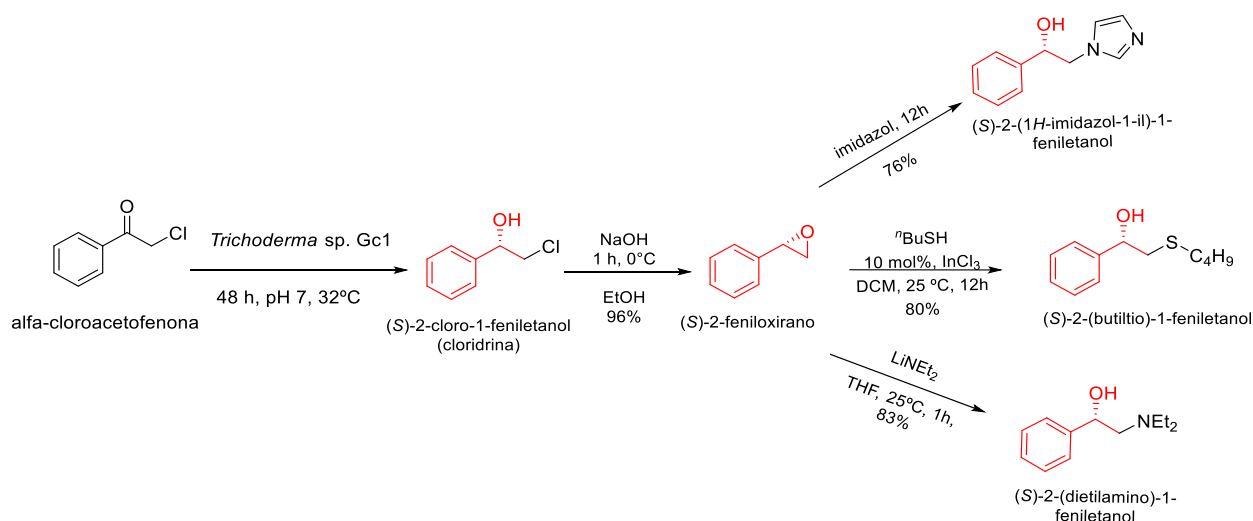


Fonte: Barbieri *et al.*, 2001, p. 416.

A biocatálise representa uma metodologia útil também para a síntese de cloridrinas quirais, as quais são utilizadas como intermediários na produção de diversos compostos de interesse biológico (Esquema 3) (Rocha *et al.*, 2009). As cloridrinas quirais são importantes na formação de epóxidos e amino álcoois quirais, os quais são utilizados em diversas transformações orgânicas.

O Esquema 3 ilustra uma sequência de reações a partir da redução de α -cloroacetofenona visando a obtenção de intermediários enantioenriquecidos de interesse sintético e biológico (Pamies *et al.*, 2002; Mei *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 2011; Ferreira *et al.*, 2014).

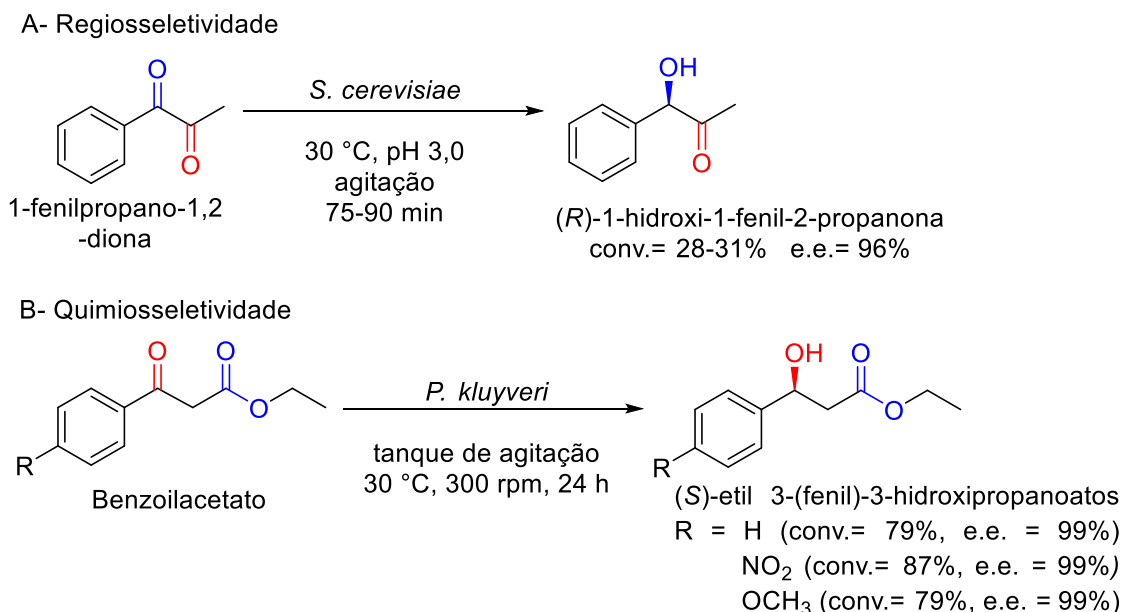
Esquema 4 - Biorredução de α -cloroacetona pelo fungo *Trichoderma* sp. e aplicação da cloridrina em diferentes transformações orgânicas.



1.2 Enzimas como catalisadores biológicos

Enzimas são macromoléculas protéicas e fundamentais para qualquer processo bioquímico. Elas são formadas por uma sequência de L-aminoácidos através de ligações peptídicas, as quais adotam uma complexa estrutura tridimensional responsável por sua

Esquema 4 – Exemplos de regioseletividade (A-grupos funcionais em diferentes regiões da molécula) e quimiosseletividade (B-molécula com diferentes grupos funcionais).

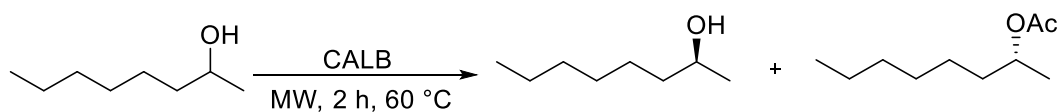


1.3 Síntese orgânica em reator de micro-ondas

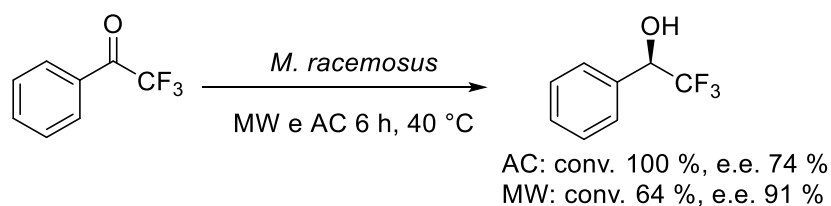
Embora os fornos de micro-ondas domésticos tenham sido utilizados desde os anos 1970, o primeiro relato de que estas fontes de energia também eram adequadas para acelerar reações orgânicas surgiu em 1986 (Larhed *et al.*, 2001). A partir dos trabalhos pioneiros de Gedye e Guiguere os químicos orgânicos passaram a utilizar o forno micro-ondas doméstico como uma ferramenta para realização de reações orgânicas. Nesses estudos os autores descreveram os resultados obtidos em reações de esterificação e ciclo-adição (de Souza *et al.*, 2011).

O uso da radiação por micro-ondas têm sido empregado em diversas aplicações na síntese de compostos orgânicos a fim de reduzir o tempo reacional de reações biocatalíticas podendo fornecer altos rendimentos e seletividades. Essa importante ferramenta tecnológica está concordante com os princípios da Química Verde e por isso tem sido utilizada em reações orgânicas e mais recentemente, em reações catalisadas por enzimas isoladas e micro-organismos (Ribeiro *et al.*, 2012; Ribeiro *et al.*, 2013).

Como exemplo, pode ser citada a reação de acetilação enantiosseletiva do (\pm)-2-octanol catalisada pela lipase de *Candida antarctica* B (CALB-hidrolase) com acetato de vinila por radiação micro-ondas à temperatura de 60 °C em 2 h de reação, obtendo o (*S*)-2-octanol com 50% de conversão e excesso enantiomérico >99% (Esquema 5) (Yu *et al.*, 2007).

Esquema 5 - Resolução enzimática do (\pm)-2-octanol por radiação micro-ondas.

O Grupo de Química Orgânica e Biocatálise começou a realizar trabalhos de biotransformação utilizando radiação micro-ondas a partir de 2012. O primeiro estudo envolveu a biorredução da 2,2,2-triflúor-acetofenona na obtenção do respectivo (*S*)-álcool com células do fungo de origem marinha *Mucor racemosus* CBMAI 847. A mesma reação também foi realizada por aquecimento convencional (Esquema 6) (Ribeiro *et al.*, 2013).

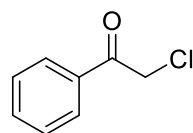
Esquema 6 – Redução da 2,2,2-triflúor-acetofenona com o fungo *M. racemosus* CBMAI 847 por radiação micro-ondas e aquecimento convencional.

Assim, neste trabalho realizou-se um estudo com fungos de ambiente marinho frente a redução de α -clorocetonas por uma metodologia de síntese química acoplada com uma reação biocatalítica.

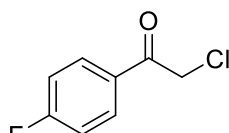
2. OBJETIVOS

Este trabalho teve como objetivo o emprego de fungos de ambiente marinho na redução enantiosseletiva de α -clorocetonas: 2-cloro-1-feniletanona **2a**, 2-cloro-1-(4-flúor-fenil)etanona **2b**, 2-cloro-2-(furanil)etanona **2c** e 2-cloro-1-(*p*-toluil)etanona **2d** (Figura 3).

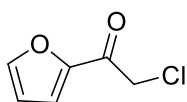
Figura 3 – α -clorocetonas empregadas nas reações de biorredução enantiosseletiva.



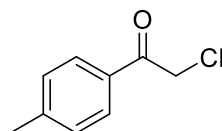
2-cloro-1-feniletanona **2a**



2-cloro-1-(4-flúor-fenil)etanona **2b**



2-cloro-2-(furanil)etanona **2c**



2-cloro-1-(*p*-toluil)etanona **2d**

Para atingir os objetivos realizaram-se as seguintes etapas:

a) As sínteses de α -clorocetonas **2a-d** por radiação de micro-ondas e aquecimento convencional;

b) As biorreduções de α -clorocetonas **2a-d** pelos fungos *Penicillium citrinum* CBMAI 1186, *Mucor racemosus* CBMAI 847, *Aspergillus sydowii* CBMAI 935, *Penicillium raistrickii* CBMAI 931 e *Penicillium oxalicum* CBMAI 1185.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Reagentes e solventes

Os reagentes acetofenona **1a** (99%), 4-flúor-acetofenona **1b** (99%), 2-furil-metil-cetona **1c**, 4-metil-acetofenona **1d** (95%) foram obtidos da Sigma-Aldrich. O NH_4Cl (99,99%) e o peroximonossulfato de potássio-Oxone[®] ($\text{KHSO}_5 \cdot 0,5\text{KHSO}_4 \cdot 0,5\text{K}_2\text{SO}_4$) também foram adquiridos da Sigma-Aldrich. Os solventes isopropanol, metanol e hexano foram adquiridos da Panreac. Todos os sais utilizados na composição da água do mar foram adquiridos da Merck e Vertec.

3.2 Métodos cromatográficos

3.2.1 Cromatografia em coluna e em camada delgada

Para as purificações por cromatografia em coluna (CC) foi utilizada sílica gel *flash* 60 230-400 da Across. Para a cromatografia em camada delgada (CCD) foi utilizada cromatofolha de sílica gel 60 F₂₅₄ da Sorbent Technologies. A revelação dos compostos impregnados nas cromatofolhas foi realizada com soluções de ácido fosfomolibdico ($\text{H}_3\text{PMo}_{12}\text{O}_{40}$) (6,5 g de ácido fosfomolibdico em 100 mL de álcool etílico). Para as fases móveis foram determinadas as misturas de solventes mais adequadas em cada separação.

3.2.2 Cromatografia a gás por ionização de chama (CG-FID)

As análises por CG-FID foram realizadas no equipamento Shimadzu[®], modelo GC-2010 plus equipado com autoinjeter modelo AOC-29i com detector de ionização de chamas (FID) e uma coluna quiral Varian CP-Chiralsil-DEX (β -ciclodextrina) (25 m x 0,25 mm x 0,39 mm). As condições utilizadas nas análises por cromatografia a gás foram: relação de split 1:10, gás de arraste nitrogênio (69 kPa), volume de injeção (1,0 μL), temperatura do injetor (250 °C), temperatura do detector (250 °C), temperatura inicial da coluna (120 °C), mantendo-se durante 2 min, velocidade de aquecimento (2 °C/min) até 165 °C com programação total de 32 min.

3.2.3 Cromatografia a gás por espectrometria de massas (CG-EM)

As análises por CG-EM foram realizadas no equipamento Shimadzu[®], modelo GC-EM-QP 2010 plus equipado com autoinjeter modelo AOC-20i com detector de massas (MS) e uma coluna Agilent Technologies DB-5MS contendo 5% fenil e 95% dimetilpolisiloxano (30 m x 0,25 mm x 0,25 mm). As condições utilizadas nas análises foram: relação de split 5, gás

de arraste hélio (62,8 kPa), volume de injeção (1,0 μ L), temperatura do injetor (250 °C), temperatura da coluna (80 °C), temperatura inicial da coluna (80 °C), mantendo-se durante 2 min, velocidade de aquecimento (5 °C/min) até 200 °C mantendo-se por 4 min com programação total de 30 min.

3.3 Métodos espectroscópicos

3.3.1 Ressonância magnética nuclear (RMN)

Espectros de RMN de ^1H e ^{13}C foram obtidos em espectrômetro Agilent Technologies, 500/54 Premium Shielded (Central de Análises Químicas Instrumentais - IQSC) operando nas frequências de 500 MHz (RMN ^1H) e 125 MHz (RMN ^{13}C). Os deslocamentos químicos (δ) foram expressos em partes por milhão (ppm) e referenciados pelo sinal de clorofórmio deuterado (CDCl_3 , 7,26 ppm).

3.3.2 Espectroscopia no infravermelho

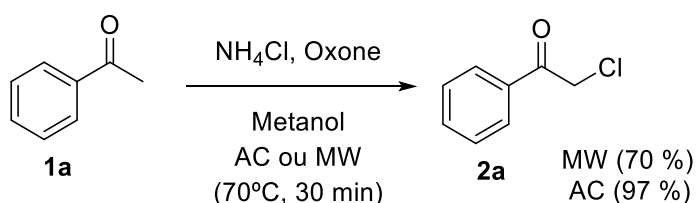
Os espectros no infravermelho foram obtidos por análise em um equipamento Shimadzu[®], modelo IRAffinity-1 com Transformada de Fourier. As análises foram realizadas em pastilhas de KBr quando sólidas e em cristal de silício quando líquidas na faixa de 400 cm^{-1} à 4000 cm^{-1} com 32 scans de resolução.

3.4 Otimização para a síntese da 2-cloro-1-feniletanona **2a** por radiação micro-ondas (MW) e aquecimento convencional (AC)

Em um balão de 25 mL adicionou-se a acetofenona **1a** (1,0 mmol, 120 mg), NH_4Cl (2,2 eq., 58,84 mg) e Oxone[®] (2,2 eq., 338,12 mg) em metanol (5 mL). A mistura reacional foi mantida em refluxo em um reator de micro-ondas por 15 min à temperatura de 70 °C na potência de 150-200 W. Percorrido o tempo de reação, realizou-se uma filtração simples e o solvente foi removido por pressão reduzida em rotaevaporador. A 2-cloro-1-feniletanona **2a** foi purificada por cromatografia em coluna (sílica gel 60) utilizando como eluente hexano e acetato de etila (9:1). A síntese da 2-cloro-1-feniletanona **2a** foi realizada também com outros solventes (água, acetonitrila, etanol e dimetilsulfóxido - DMSO). Em diferentes tempos reacionais (15, 30 e 60 min) foram utilizados diferentes equivalentes de cloreto de amônia e de Oxone[®], ao determinar o melhor rendimento para a formação da 2-cloro-1-feniletanona **2a** nas diferentes condições utilizadas em reator de micro-ondas.

O mesmo procedimento foi realizado utilizando 1,0 mmol da acetofenona **1a** 2,2 eq. de NH_4Cl e Oxone[®] em 5 mL de metanol em refluxo por aquecimento convencional à temperatura de 70 °C por 30 min. A mistura reacional foi realizada por aquecimento convencional em refluxo (70 °C). Percorrido o tempo de reação (30 min) realizou-se uma filtração e rotaevaporou o solvente (Esquema 7). O produto **2a** foi purificado por coluna (sílica gel 60) em uma mistura de hexano e acetato de etila (9:1) e caracterizado por RMN ^1H e ^{13}C , IV e EM. Em aquecimento convencional também foi realizada a síntese das α -clorocetonas **2b-d** a partir da 4-flúor-acetofenona **1b**, 2-furanilmetil cetona **1c** e 4-metil-acetofenona **1d**.

Esquema 7 - Síntese de α -clorocetona **2a** em reator de micro-ondas e por aquecimento convencional.



3.5 Isolamento e identificação dos fungos filamentosos de ambiente marinho

Os fungos *Penicillium raistrickii* CBMAI 931 e *Aspergillus sydowii* CBMAI 935 foram isolados da esponja *Chelonaplysilla erecta*. O fungo *Penicillium citrinum* CBMAI 1186 foi isolado da alga marinha *Caulerpa* sp. O fungo *Mucor racemosus* CBMAI 847 foi isolado da alga *Mussismilia hispida*. As algas e a esponja marinha foram coletadas pelo Grupo de Química Orgânica de Sistemas Biológicos (IQSC/USP) coordenado pelo Prof. Dr. Roberto G. S. Berlinck, na cidade de São Sebastião, Litoral Norte do Estado de São Paulo, Brasil. O isolamento dos fungos foi realizado em colaboração com o Grupo de Pesquisa em Ecologia de Microrganismos Aquáticos sob coordenação da Profa Dra. Mirna H. R. Selegim (UFSCar).

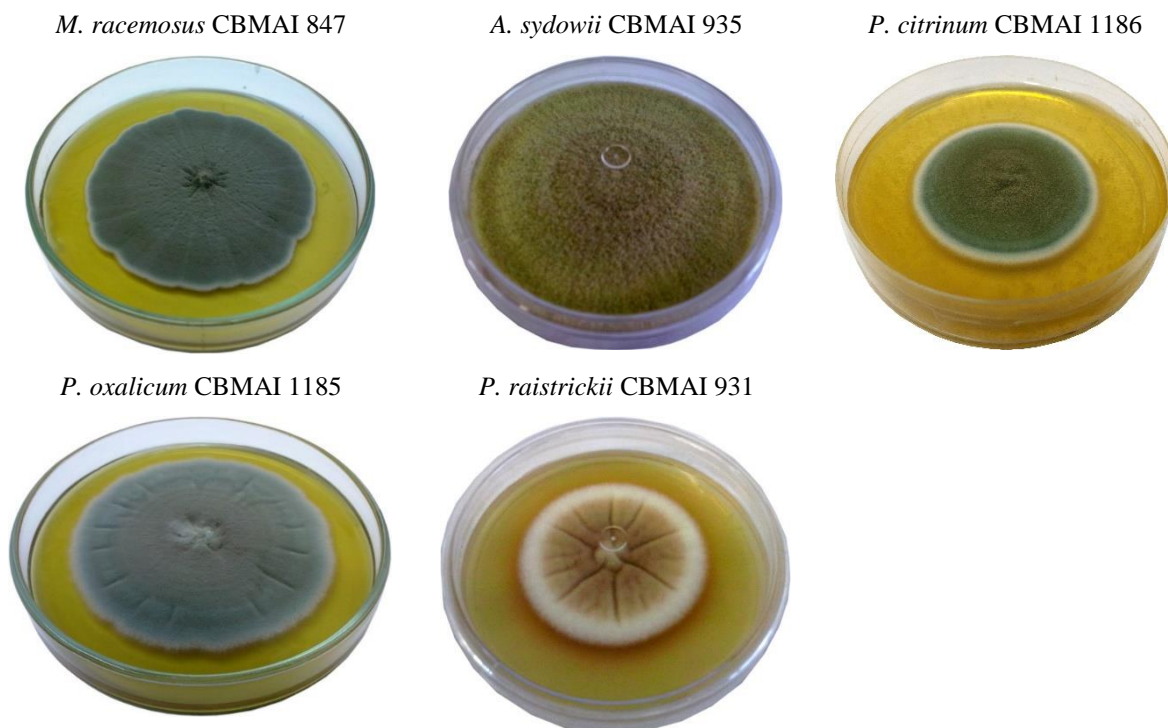
Os fungos utilizados neste trabalho foram depositados na Coleção Brasileira de Microrganismos de Ambiente e Indústria – CBMAI (<http://webdrm.cpqba.unicamp.br/cbmai/>).

3.6 Cultivo dos fungos de ambiente marinho em meio sólido

As células totais do fungo *P. citrinum* CBMAI 1186 foram cultivados em placa de Petri contendo 0,5 g de malte (Acumedia) e 0,5 g de Ágar (Acumedia) em 25 mL de água do mar artificial. A solução contendo o meio sólido foi esterilizada em autoclave vertical para posteriormente realizar a inoculação dos fungos.

As células do fungo marinho *P. citrinum* CBMAI 1186 de uma cultura estoque foi inoculada na placa de Petri, previamente preparada em um fluxo laminar para evitar contaminação. A placa contendo o fungo foi mantida em estufa à temperatura de 32 °C para o crescimento dos micélios por 6 d. Este procedimento foi realizado para os demais fungos utilizados: *M. racemosus* CBMAI 847, *A. sydowii* CBMAI 935, *P. raistrickii* CBMAI 931 e *P. oxalicum* CBMAI 1185. A composição da água do mar artificial utilizada foi constituída por uma mistura de sais: $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (1,36 g.L⁻¹), $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (9,68 g.L⁻¹), KCl (0,6g.L⁻¹), NaCl (30,0 g.L⁻¹), Na_2HPO_4 (0,014 mg.L⁻¹), Na_2SO_4 (3,47 g.L⁻¹), NaHCO_3 (0,17 g.L⁻¹), KBr (0,1 g.L⁻¹), $\text{SrCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (0,040 g.L⁻¹), H_3BO_3 (0,030 g.L⁻¹) em pH 7. A Figura 4 ilustra o crescimento das colônias dos fungos utilizados.

Figura 4 – Placas de Petri contendo os fungos de ambiente marinho (6 d, 32 °C).



Fonte: Birololi, W. G. 2014.

3.7 Cultivo dos fungos de ambiente marinho em meio líquido

A cultura do fungo de ambiente marinho *P. citrinum* CBMAI 1186 em meio líquido foi realizada pela transferência de fragmentos do meio sólido ($0,5 \times 0,5 \text{ cm}^2$), contendo micélios da cultura estoque para inocular 100 mL de meio de cultura em extrato de malte 2% (Acumedia) em água do mar artificial contidos em um frasco Erlenmeyer (250 mL), em pH 8. O meio líquido foi esterilizado em autoclave vertical para posteriormente realizar inoculação dos fungos no meio sólido.

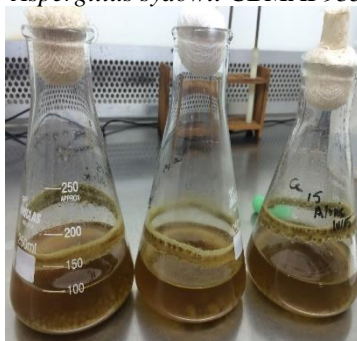
Os micélios do fungo *P. citrinum* CBMAI 1186 foram inoculados no meio líquido em uma câmara de fluxo laminar para evitar contaminação. Os micélios foram incubados por 6 d à temperatura de 32 °C em agitador orbital (130 rpm). Este procedimento foi realizado para os demais fungos: *M. racemosus* CBMAI 847, *A. sydowii* CBMAI 935, *P. raistrickii* CBMAI 931 e *P. oxalicum* CBMAI 1185. A Figura 5 ilustra o crescimento dos fungos *P. raistrickii* CBMAI 931, *A. sydowii* CBMAI 935 e *M. racemosus* CBMAI 847 em meio líquido.

Figura 5 - Frascos Erlenmeyer contendo micélios dos fungos *P. raistrickii* CBMAI 931, *A. sydowii* CBMAI 935 e *M. racemosus* CBMAI 847 em meio líquido.

Penicillium raistrickii CBMAI 931



Aspergillus sydowii CBMAI 935



Mucor racemosus CBMAI 847



3.8 Síntese de α -clorocetonas 2a-d seguida pela reação de redução pelo fungo *P. citrinum* CBMAI 1186

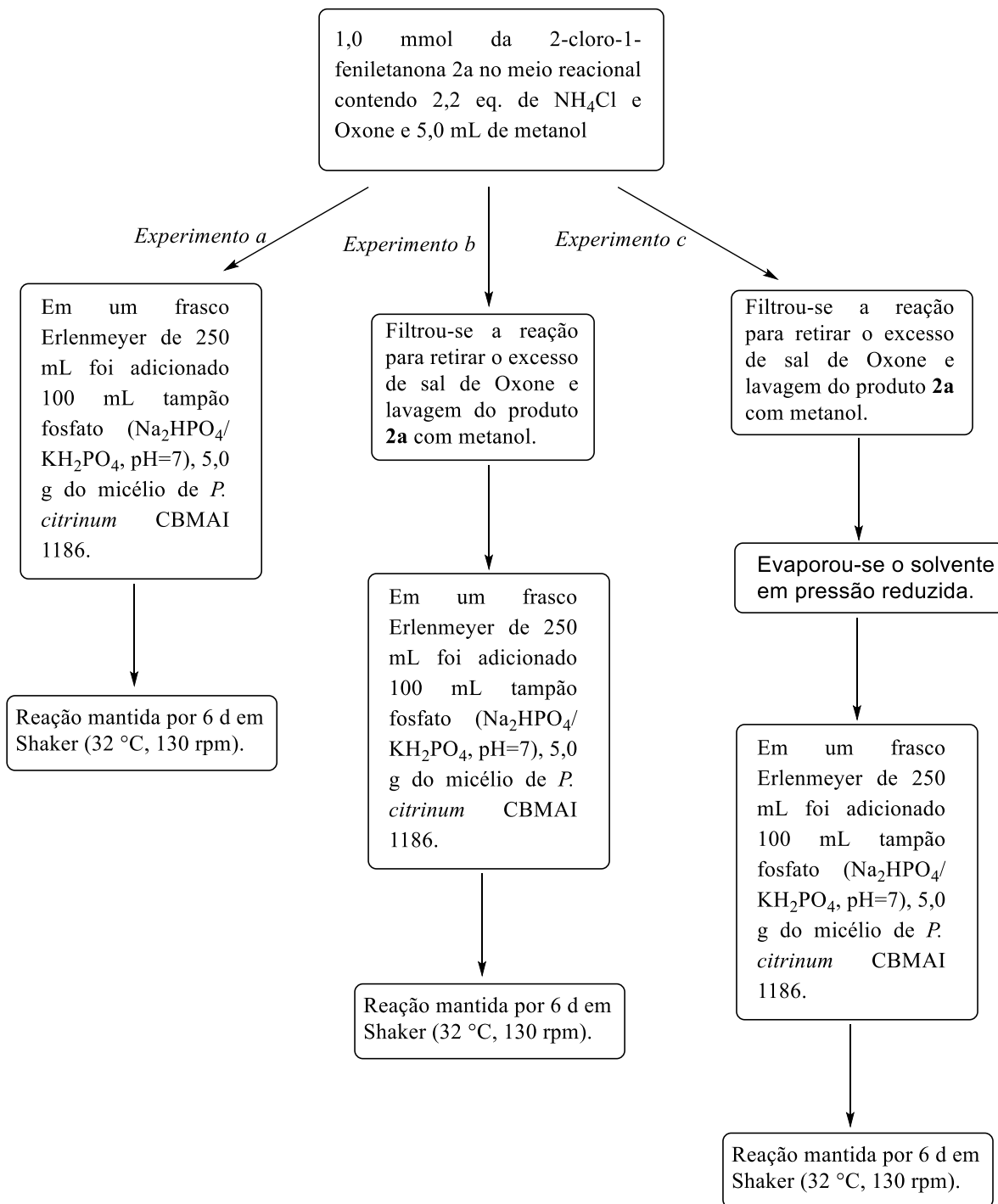
Experimento a: Após realizar a síntese da 2-cloro-1-feniletanona **2a** em refluxo por aquecimento convencional, a mistura reacional foi integralmente transferida para um frasco Erlenmeyer de 250 mL contendo 100 mL de uma solução tampão fostato ($\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$, $\text{pH} = 7 / 0,1 \text{ mol.L}^{-1}$) e 5,0 g (massa úmida) de micélios úmidos do fungo *P. citrinum* CBMAI 1186 previamente filtrados em funil de Buchner.

Experimento b: Após realizar a síntese da 2-cloro-1-feniletanona **2a** em refluxo por aquecimento convencional, filtrou-se a mistura reacional por filtração simples retirando o excesso do sal de Oxone[®] e lavou-se com metanol (1 mL). O micélio obtido foi adicionado em um frasco Erlenmeyer de 250 mL contendo 100 mL de uma solução tampão fostato ($\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$, $\text{pH} = 7 / 0,1 \text{ mol.L}^{-1}$) e 5,0 g (massa úmida) de micélios do fungo *P. citrinum* CBMAI 1186 previamente filtrados em funil de Buchner.

Experimento c: Após realizar a síntese da 2-cloro-1-feniletanona **2a** em refluxo por aquecimento convencional, a mistura reacional foi filtrada por filtração simples e o excesso de metanol foi evaporado à pressão reduzida em rotaevaporador. Em seguida à mistura reacional adicionou-se 300 μL de DMSO e transferiu-se para um frasco Erlenmeyer de 250 mL contendo 100 mL de uma solução tampão fostato ($\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$, $\text{pH} = 7 / 0,1 \text{ mol.L}^{-1}$) e 5,0 g (massa úmida) de micélios do fungo *P. citrinum* CBMAI 1186 previamente filtrados em funil de Buchner.

A Figura 6 ilustra os protocolos utilizados nos *experimentos a, b e c*.

Figura 6 - Fluxograma da síntese de α -clorocetona **2a** seguida pela reação de redução pelo fungo *P. citrinum* CBMAI 1186 em diferentes experimentos.



Em todos os casos as misturas reacionais foram incubadas durante 6 d em agitador orbital (130 rpm) à temperatura de 32 °C. As reações foram monitoradas por CCD a cada 48 h. Após 6 d de incubação as células foram filtradas em funil de Bunchner. A massa micelial obtida foi transferida para um frasco Erlenmeyer e mantida em agitação magnética por 30 min com 50 mL da mistura de acetato de etila e água (1:1) para rompimento das células. Após este tempo foi novamente filtrada em funil de Bunchner e extraída com AcOEt (3 × 50 mL). A fase orgânica foi seca com Na₂SO₄ anidro, filtrada e evaporada no rotaevaporador. Os extratos obtidos foram purificados por CC com sílica gel e o excesso enantiomérico da (*R*)-2-cloro-1-feniletanol **3a** foi determinado por CG-FID/coluna quiral.

3.9 Síntese das cloridrinas racêmicas 3a-d

As cloridrinas racêmicas **3a-d** foram sintetizados a partir da redução das correspondentes cetonas comerciais com boroidreto de sódio em metanol. As reações de redução foram realizadas em um balão de 50 mL sob agitação magnética em banho de gelo à temperatura de 0 °C. Para cada 1 equivalente das correspondentes cetonas foram adicionadas 1,1 equivalente de boroidreto de sódio em metanol (10 mL) e manteve-se a reação em agitação magnética por 30 min. Em seguida, a reação foi monitorada por cromatografia em camada delgada (CCD) e reveladas em solução de anisaldeído. Após confirmação da redução da cetona, foi adicionada à reação água destilada (15 mL) e extraiu-se com acetato de etila (3 x 20 mL). A fase orgânica foi seca com Na₂SO₄ anidro, filtrada e concentrada sob vácuo no rotaevaporador obtendo-se bons rendimentos.

3.10 Medida da rotação óptica das cloridrinas 3a-d obtidas por biorredução

A leitura de rotação óptica das cloridrinas **3a-d** foi realizada no polarímetro Jasco modelo P2000 equipado com lâmpada de sódio ($\lambda = 589$ nm) e software Spectra manager, utilizando cela de 0,98 dm de diâmetro e concentrações expressas em g/100 mL, o solvente utilizado foi o acetato de etila e as análises foram realizadas em quintuplicatas. A configuração absoluta das cloridrinas **3a-d** foi determinada por comparação da rotação específica descrita na literatura .

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

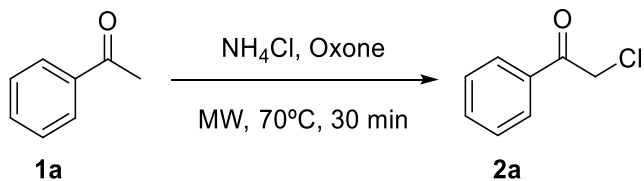
Em vista do protocolo relatado por Zhou *et al.* (2012) para monocloração de cetonas com NH_4Cl e Oxone[®] decidiu-se estudar tais condições de reação com o objetivo de preparar α -clorocetonas monocloradas **2a-d** empregando um reator de micro-ondas. Como pode ser observado na Tabela 1, inicialmente foi utilizada a acetofenona **1a** (1,0 mmol, 120 mg) para reagir com 1,1 eq. de NH_4Cl e 1,1 eq. de Oxone[®] em etanol (5,0 mL), como solvente limpo e renovável, à temperatura de 70 °C durante 15 min em radiação de micro-ondas, formando 16% de conversão da 2-cloro-1-feniletanona **2a** (entrada 1, Tabela 1).

Em tentativa de preparar a 2-cloro-1-feniletanona **2a** em maior rendimento focou-se o estudo na otimização destas condições reacionais (Tabela 1). Então, aumentou-se o tempo reacional para 30 min com a acetofenona **1a** (1,0 mmol, 120 mg) reagindo com 1,1 eq. de NH_4Cl e 1,1 eq. de Oxone[®] em etanol (5,0 mL) à temperatura de 70 °C em reator micro-ondas, formando 29% de conversão 2-cloro-1-feniletanona **2a** (entrada 2, Tabela 1). No entanto, o rendimento do produto **2a** não foi significativo e então se fez o uso de outros solventes orgânicos.

Quando a transformação foi realizada em metanol (5 mL) 1,1 equivalentes de NH_4Cl e 1,1 eq. de Oxone[®] foi convertido em 55% para a 2-cloro-1-feniletanona **2a** (entrada 3, Tabela 1). Os solventes acetonitrila (5,0 mL) e água (5,0 mL) foram utilizadas separadamente na reação à temperatura de 70 °C em radiação por micro-ondas por 30 min e foi observado por análise de CG/FID somente 2 e 3%, respectivamente para a formação da 2-cloro-1-feniletanona **2a** (entradas 4 e 5, Tabela 1). A reação na presença de DMSO (5,0 mL) não levou à formação de 2-cloro-1-feniletanona **2a** (entrada 6, Tabela 1). Neste caso, pode-se concluir que o solvente teve influência na formação da 2-cloro-1-feniletanona **2a** quando se utilizou NH_4Cl e Oxone[®] por radiação de micro-ondas. Neste estudo o metanol foi o solvente que melhor contribuiu na obtenção do produto **2a**.

Ao utilizar 2,2 eq. de NH_4Cl e 1,1 eq. de Oxone[®] em 5,0 mL de metanol à temperatura de 70 °C durante 30 min por radiação em micro-ondas, o produto **2a** foi obtido em 69% de conversão (entrada 7, Tabela 1). Em presença de 1,1 eq. de NH_4Cl e 2,2 eq. de Oxone[®] nas mesmas condições o produto **2a** foi obtido 59% de conversão (entrada 8, Tabela 1) e ao reagir 2,2 eq. de NH_4Cl e 2,2 eq. de Oxone[®] à temperatura de 70 °C durante 30 min porém na ausência de solvente, obteve-se 14% de conversão do produto **2a** (entrada 9, Tabela 1).

Tabela 1 - Otimização da síntese da α -cloro-feniletanona **2a** por radiação micro-ondas.

					
Entrada	Solvente	Tempo (min)	NH ₄ Cl (mmol)	Oxone [®] (mmol)	Conversão (%) ^a
1	Etanol	15	1,1	1,1	16
2	Etanol	30	1,1	1,1	29
3	Metanol	30	1,1	1,1	55
4	Acetonitrila	30	1,1	1,1	2
5	Água	30	1,1	1,1	3
6	DMSO	30	1,1	1,1	0
7	Metanol	30	2,2	1,1	69
8	Metanol	30	1,1	2,2	59
9	Sem solvente	30	2,2	2,2	14
10	Metanol	30	2,2	2,2	80 (70) ^b
11	Metanol	60	2,2	2,2	86 (74) ^b

^a Conversão obtida em análise por CG-FID.^b Rendimento isolado por CC.

Ainda visando obter melhores rendimentos realizaram-se novos experimentos em metanol. Ao utilizar 2,2 eq. de NH₄Cl e 2,2 eq. de Oxone[®] para 1,0 eq. de acetofenona **1a** à temperatura de 70 °C durante 30 min por radiação em micro-ondas, o produto **2a** foi obtido com 80% de conversão após extração. Por cromatografia em coluna foi obtido 70% de conversão para o produto **2a** (entrada 10, Tabela 1). O mesmo procedimento foi realizado em 60 min por radiação micro-ondas e a 2-cloro-1-feniletanona **2a** foi obtida com 86% de conversão e por cromatografia em coluna obteve-se 74% de conversão (entrada 11, Tabela 1). Este resultado mostrou que a melhor condição para formar 2-cloro-1-feniletanona **2a** foi na presença de NH₄Cl, Oxone[®] e metanol por radiação micro-ondas por 30 min.

A melhor condição na preparação da α -cloro-feniletanona **2a** por radiação de micro-ondas também foi realizada em aquecimento convencional em refluxo (70 °C). Seguindo as mesmas quantidades de 2,2 eq. de NH₄Cl, 2,2 eq. Oxone[®] e 5,0 mL de metanol, à temperatura de 70 °C por 30 min. A reação em aquecimento convencional formou 97% da α -cloro-feniletanona **2a** após purificação por CC (Esquema 7).

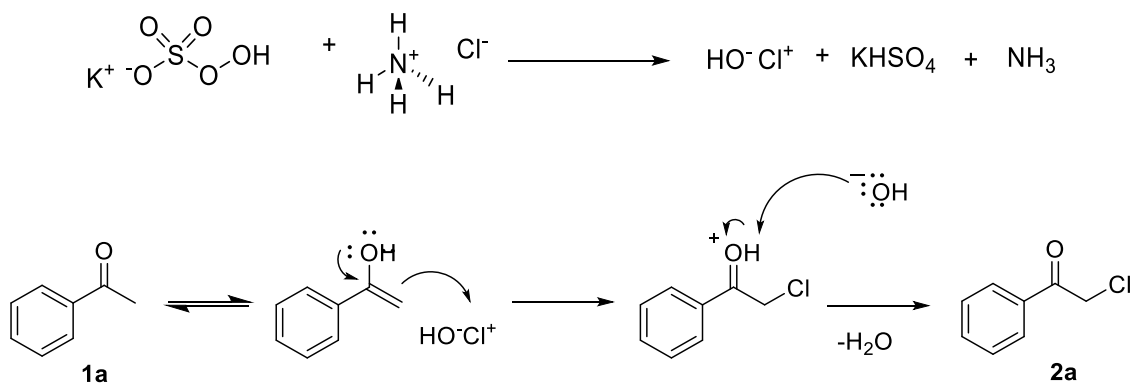
Em vista desses resultados também optou-se em realizar a síntese de **2a** por aquecimento convencional e aplicou-se a metodologia para as cetonas **1b-d** (Tabela 2).

Tabela 2 - Síntese de derivados da 2-cloro-1-feniletanona **2a** em aquecimento convencional.

$ \begin{array}{c} \text{R}-\text{C}(=\text{O})-\text{CH}_3 \xrightarrow[\text{AC, 70 } ^\circ\text{C, 30 min}]{2,2 \text{ eq NH}_4\text{Cl, 2,2 eq. Oxone}} \text{R}-\text{C}(=\text{O})-\text{CH}_2\text{Cl} \\ \text{2a-d} \end{array} $ <p> R = Ph (1a) R = 4-F-Ph (1b) R = Furanil (1c) R = 4-Me-Ph (1d) </p>	
Derivados da α -clorocetona	Conversão (%) ^a
2-cloro-1-feniletanona 2a	97
2-cloro-1-(4-flúor-fenil)-etanona 2b	93
2-cloro-2-(furan)etanona 2c	85
2-cloro-1-(<i>p</i> -toluil)etanona 2d	90

^a Rendimento isolado por CC.

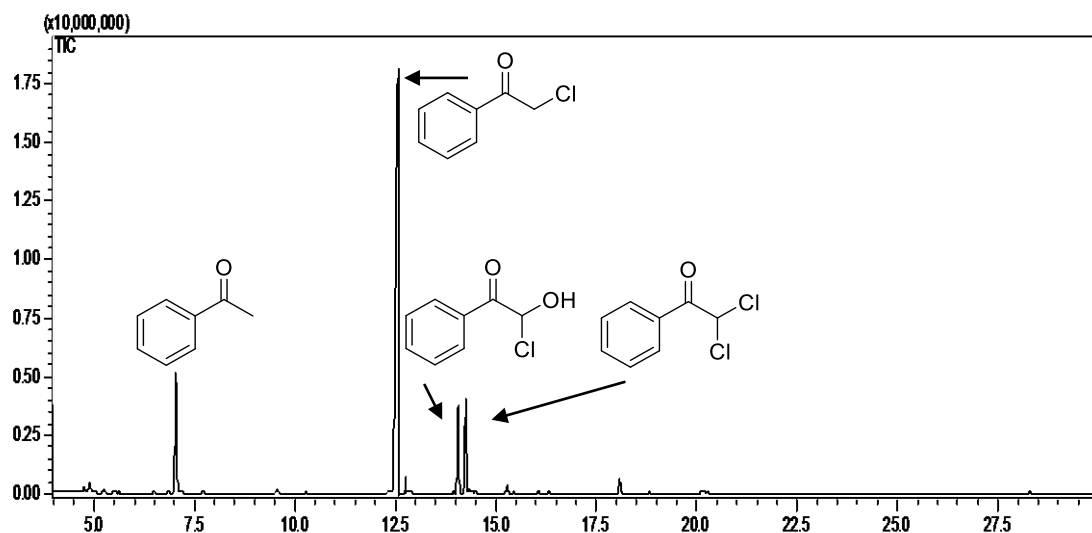
A proposta de mecanismo para a mono-cloração de cetonas utilizando Oxone[®] e NH₄Cl é apresentada na Figura 7. Primeiramente, os íons cloreto são oxidados pelo sal de Oxone[®] levando a formação de Cl⁺. Em seguida o enol obtido, pelo equilíbrio ceto-enólico com a cetona, reage *in situ* e promove o ataque nucleofílico ao íon Cl⁺ obtendo o correspondente produto mono-clorado (Zhou *et al.*, 2012).

Figura 7 - Proposta de mecanismo para oxidação do NH₄Cl pelo Oxone[®] seguida da mono-cloração de cetonas.

Segundo Zhou *et al.* (2012) os íons HO[·]Cl⁺ são instáveis e fáceis de se decomporem, esta observação pode contribuir para o menor rendimento do produto **2a** quando a reação foi realizada por radiação micro-ondas em comparação ao aquecimento convencional; por radiação micro-ondas houve a formação de subprodutos diclorados e também com adição de uma hidroxila junto ao cloro na posição 2 da cetona, devido também a reatividade da reação.

A [Figura 8](#) mostra o cromatograma obtido em um cromatógrafo a gás com detector de massas (CG-EM) com o pico do produto **2a** no tempo de 12,5 min e os subprodutos formados com tempos de retenção na região de 12 a 15 min.

Figura 8 – Cromatograma representando a formação do produto **2a** e os subprodutos gerados na reação.



Devido à importância de cloridrinas como intermediários reativos em química orgânica, destaca-se seu uso na formação de epóxidos na presença de uma solução de NaOH à temperatura de 25 °C por 3 h ([Barbieri *et al.*, 1999](#)) com 90% de conversão. O correspondente epóxido pode reagir com um vasto número de nucleófilos ([Barbieri *et al.*, 2001](#)) proporcionando uma variedade de produtos úteis com aplicação em sínteses totais de moléculas bioativas ([Esquema 3](#)).

O desenvolvimento por métodos conjugados em síntese orgânica vem ganhando espaço, uma vez que o custo do processo pode ser minimizado já que promove a redução de etapas de purificação e facilitação na obtenção do produto desejado.

Neste sentido, selecionou-se o fungo *Penicillium citrinum* CBMAI 1186 para iniciar os estudos de biotransformação, uma vez que trabalhos prévios realizados no laboratório indicaram resultados promissores com este microrganismo ([Rocha *et al.*, 2009](#); [Ferreira *et al.*, 2015](#)). Com base nestes estudos houve a necessidade de aprimorar o emprego deste fungo em novas reações de biotransformação.

A reação descrita como *experimento a* ([Seção de 3.8.](#)) mostrou que mesmo no tempo de 144 h de reação (130 rpm e 32 °C) nenhuma biotransformação ocorreu, possivelmente tanto o excesso do sal de Oxone[®] quanto os resíduos da própria reação podem ter sido

prejudiciais à manutenção do metabolismo do fungo impossibilitando a reação ocorrer nestas condições.

O *experimento b* (*Seção de 3.8.*) foi utilizado sem a presença do excesso do sal de Oxone[®] o qual foi retirado por filtração. E mesmo o meio reacional sem a presença do excesso do sal de Oxone[®] as células do fungo *P. citrinum* CBMAI 1186 não promoveram a biotransformação do composto **2a**.

Por fim, o *experimento c* (*Seção de 3.8.*) deu-se com a filtração e posterior retirada do excesso de metanol do meio. Após extração da reação a cloridrina **2a** foi obtida em 20% de conversão com excesso enantiomérico de 10% em 48 h de reação enquanto que no período de 144 h de reação ocorreu um acréscimo na conversão do produto **2a** bem como no excesso enantiomérico (conv. 32%; e.e. 15%). Esses resultados evidenciaram que o meio reacional influenciou a reação de redução ([Tabela 3](#)).

Com o objetivo de aumentar a conversão e o excesso enantiomérico da cloridrina **3a** a reação foi realizada na presença de 5% (5 mL) de diferentes co-solventes, tais como, glicerol, hexano e isopropanol. Estes co-solventes podem facilitar a solubilidade do substrato, e no caso da adição dos álcoois como co-solventes, estes também favorecerem a regeneração do cofator NAD⁺/NADH. Uma desvantagem da biotransformação como ferramenta para a síntese orgânica é a baixa solubilidade da maioria dos compostos orgânicos em água, uma vez que este processo geralmente é realizado em meio aquoso. Sistemas bifásicos podem ser usados em reações de biotransformação minimizando a solubilidade e toxicidade dos compostos no meio reacional ([Silva et al., 2010](#)). É importante destacar que em sistemas bifásicos tanto o substrato (cetona) quanto o produto (álcool) tendem a permanecer na fase orgânica evitando que causem danos as células do microrganismo.

Tabela 3 - Reação em cascata na síntese de 2-cloro-1-feniletanona **2a** seguida pela biorredução pelo fungo *P. citrinum* CBMAI 1186.

Entrada	Condição reacional	tempo (h)	conversão (%) 3a ^a	e.e. (%) 3a ^b
1	<i>Experimento a</i>	48	-	-
2		96	-	-
3		144	-	-
4	<i>Experimento b</i>	48	-	-
5		96	-	-
6		144	-	-
7	<i>Experimento c</i>	48	20	10
8		96	24	12
9		144	32	15


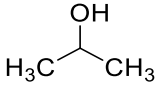
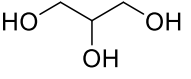
^a Conversão realizada por análise CG-FID.

^b e.e. = excesso enantiomérico.

A presença de solventes orgânicos pode influenciar a atividade bem como, a estabilidade das enzimas. Os solventes orgânicos também influenciam nas propriedades dielétricas do meio reacional este, por sua vez, influenciam nas forças de Van der Waals, que são responsáveis pela estrutura tridimensional de uma enzima (Gagnon *et al.*, 2011).

Nestes estudos, em todas as reações na presença dos diferentes co-solventes utilizados o excesso enantiomérico sofreu um leve decréscimo, porém ocorreu um aumento nos valores de conversão da cloridrina **3a** (Tabela 4) quando o fungo *P. citrinum* CBMAI 1186 foi utilizado na presença de 1% de glicerol. A conversão da cloridrina **3a** não foi significativa frente à reação contendo apenas tampão fosfato (pH 7, ausência de solvente orgânico). Os resultados da Tabela 4 indicam que não houve um aumento significativo na presença de co-solventes. Isso pode ocorrer devido a volatilidade do solvente, no caso do hexano, que pode ter evaporado durante os 6 d de reação. No caso do isopropanol e glicerol a baixa conversão pode ser devido ao pequeno volume (5 mL) empregado na reação de biorredução.

Tabela 4 - Reação enantiosseletiva da 2-cloro-1-feniletanona **2a** pelo fungo *P. citrinum* CBMAI 1186 na presença de co-solventes.

Entrada	Co-solvente	conversão (%) 3a ^a	e.e. (%) 3a ^b
1	 (hexano)	36	10
2	 (isopropanol)	5	9
3	 (glicerol)	38	10
4	Tampão fosfato (ausência de solvente orgânico)	32	15

^a Conversão foi obtida por análise em CG-FID.

^bExcesso enantiomérico.

A partir do estudo de biotransformação previamente realizado utilizando células do fungo *P. citrinum* CBMAI 1186 fez-se então o uso de outros fungos derivados de ambiente marinho, tais como, *Mucor racemosus* CBMAI 847, *Aspergillus sydowii* CBMAI 935, *Penicillium raistrickii* CBMAI 931 e *Penicillium oxalicum* CBMAI 1185 (*Seção 3.8-Experimento c*) com o objetivo de obter o produto (*S*)-2-cloro-1-feniletanol (**3a**) com melhor excesso enantiomérico e rendimento.

Diferentes rendimentos e excessos enantioméricos foram obtidos quando os fungos derivados de ambiente marinho foram utilizados. Quando o fungo *Mucor racemosus* CBMAI 847 foi utilizado obteve-se a (*S*)-cloridrina **3a** em baixo valor de conversão (conv.16%), no entanto com bom excesso enantiomérico (e.e. 60%). Já o fungo *Aspergillus sydowii* CBMAI 935 foi capaz de biotransformar em 21% de conversão na (*S*)-cloridrina **3a** e 50% de excesso enantiomérico. Enquanto que o fungo *Penicillium raistrickii* CBMAI 931 converteu a clorocetona **2a** na correspondente (*S*)-cloridrina **3a** em baixa conversão (15%) e baixo excesso enantiomérico (12%); e o fungo *Penicillium oxalicum* CBMAI 1185 converteu a clorocetona **2a** no correspondente (*S*)-cloridrina **3a** com baixa conversão (20%) e baixo excesso enantiomérico (21%) ([Tabela 5](#)).

Conclui-se também que estas reações foram realizadas consecutivamente à síntese química seguida da biotransformação (*Seção 3.8-Experimento c*) e para nosso conhecimento,

este foi o primeiro protocolo descrito na literatura utilizando síntese química seguida da reação biocatalítica com células microbianas.

Em adição a estes estudos prepararam-se as cloridrinas **3b-d** utilizando-se esta metodologia. Diferentes α -clorocetonas **2b-d** foram previamente sintetizadas por agitação convencional em refluxo (70 °C), utilizando cloreto de amônio (2,2 eq.) e Oxone® (2,2 eq.) em metanol (5,0 mL) por 30 min. Em seguida foram utilizadas na reação de biotransformação com micélios dos fungos: *P. citrinum* CBMAI 1186, *Mucor racemosus* CBMAI 847, *Aspergillus sydowii* CBMAI 935, *Penicillium raistrickii* CBMAI 931 e *Penicillium oxalicum* CBMAI 1185 os quais produziram diferentes valores de conversão e excesso enantiomérico (Tabela 5 e Figura 6).

Tabela 5 – Síntese química das α -clorocetonas **2a-d** e seguida da biorredução por fungos de ambiente marinho.

<p> $\text{R} = \text{Ph (1a)}$ $\text{R} = 4\text{-F-Ph (1b)}$ $\text{R} = \text{Furanil (1c)}$ $\text{R} = 4\text{-Me-Ph (1d)}$ </p>				
Fungo marinho	3a	3b	3c	3d
<i>P. citrinum</i> CBMAI 1186	c.a. (S) conv. 32 % e.e. 15 %	c.a. (S) conv. 45 % e.e. 48 %	c.a. (S) conv. 28 % e.e. 38 %	c.a. (S) conv. 40 % e.e. 60 %
<i>P. oxalicum</i> CBMAI 1185	c.a. (S) conv. 18 % e.e. 21 %	c.a. (S) conv. 94 % e.e. 25 %	c.a. (S) conv. 31 % e.e. 3 %	c.a. (S) conv. 97 % e.e. 94 %
<i>A. sydowii</i> CBMAI 935	c.a. (S) conv. 21 % e.e. 50 %	c.a. (S) conv. 68 % e.e. 9 %	c.a. (S) conv. 40 % e.e. 64 %	c.a. (S) conv. 90 % e.e. 89 %
<i>P. raistrickii</i> CBMAI 931	c.a. (S) conv. 15 % e.e. 12 %	c.a. (S) conv. 47 % e.e. 72 %	c.a. (S) conv. 27 % e.e. 15 %	c.a. (S) conv. 86 % e.e. 82 %
<i>Mucor racemosus</i> CBMAI 847	c.a. (S) conv. 16 % e.e. 60 %	c.a. (S) conv. 12 % e.e. 66 %	c.a. (S) conv. 12 % e.e. 4 %	c.a. (S) conv. 12 % e.e. 66 %

* conv.= conversão determinada por integração das áreas dos picos por CG-FID;

e.e. = excesso enantiomérico;

c.a. = configuração absoluta determinada pela medida da rotação óptica.

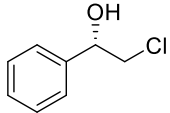
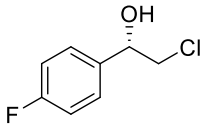
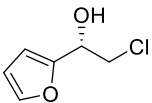
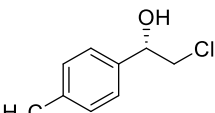
Células do fungo *P. oxalicum* CBMAI 1185 produziram boa conversão do 2-cloro-1-(4-flúor-fenil)etan-1-ol **3b** (conv. 94%), porém com baixo excesso enantiomérico (25%). O 2-cloro-1-(*p*-toluil)etan-1-ol **3d** foi obtido com 97% de conversão e 94% de excesso enantiomérico. O produto **3d** mostrou-se com altas conversões e excessos enantioméricos

para a maioria dos fungos utilizados neste estudo indicando que as enzimas foram estereosseletivas para a redução de **2d** (Tabela 5).

Em todos os casos o 2-cloro-1-feniletanol **3a** e 2-cloro-2-(furanil)etanol **3c** apresentaram baixas conversões (12-47%) e excessos enantioméricos (3-38%), quando os fungos derivados de ambiente marinho foram utilizados (Tabela 5). Enquanto que o produto **3b** apresentou valores moderados (conv. 47-94%, e.e. 48-72%) nas reações de biotransformação com os fungos marinhos. Tais resultados mostram a eficácia das reações de redução assimétrica empregando microrganismos de origem marinha, com uma metodologia que assegura os princípios da Química Verde na preparação de moléculas quirais enantioenriquecidas.

A configuração absoluta das cloridrinas **3a-d** foi determinada por comparação da rotação específica descrita na literatura (Tabela 6).

Tabela 6 - Valores de rotação óptica para os produtos enantiopuros obtidos pela biotransformação com os fungos marinhos comparados com os dados da literatura.

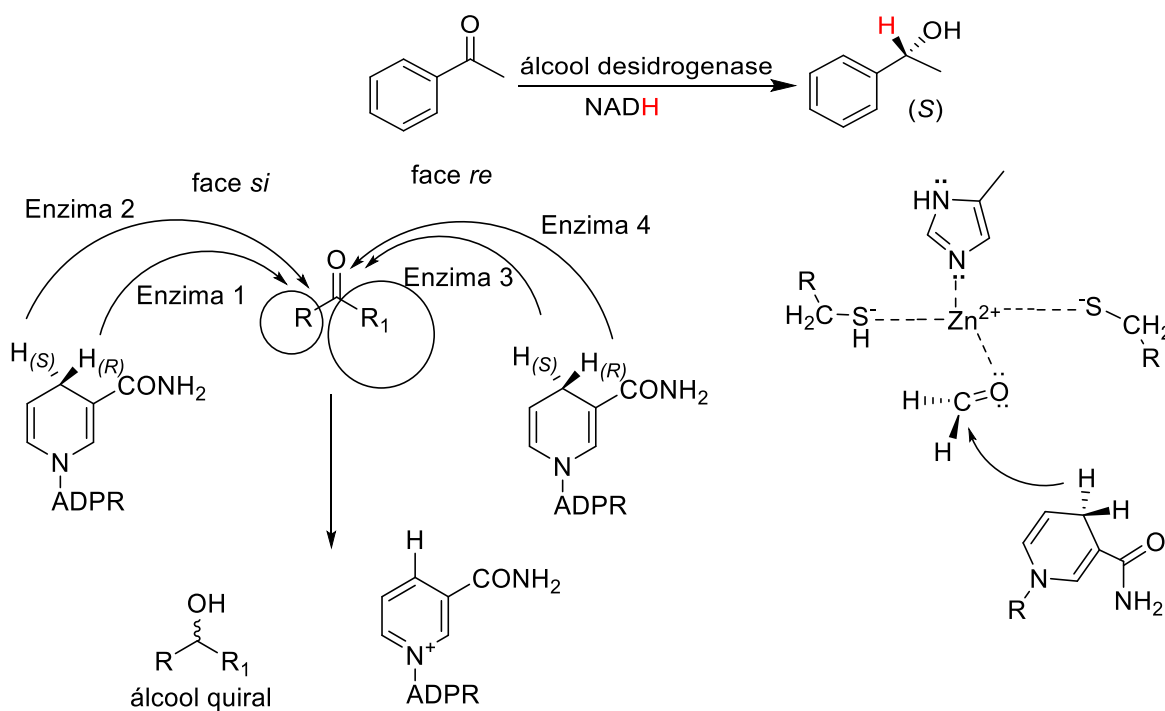
Compostos	$[\alpha]_D^{20} = \text{experimental}^a$	$[\alpha]_D^{20} = \text{literatura}$
 (S)-3a	$[\alpha]_D^{20} = +1,46$ (<i>c</i> 19,1 mg/1 mL, AcOEt)	$[\alpha]_D^{20} = +38,5$ (<i>c</i> 0,9 g/100 mL, CH ₂ Cl ₂) (Cheung et al., 2005)
 (S)-3b	$[\alpha]_D^{20} = +27,2$ (<i>c</i> 5 mg/2 mL, AcOEt)	$[\alpha]_D^{20} = +34$ (<i>c</i> 1,6 g/100 mL, CH ₂ Cl ₂) (Bandini et al., 2006)
 (S)-3c	$[\alpha]_D^{20} = +10,3$ (<i>c</i> 7,1 mg/2 mL, AcOEt)	$[\alpha]_D^{25} = +17,1$ (<i>c</i> 0,97 g/100 mL, MeOH) (Zuhal Gercek et al., 2005)
 (S)-3d	$[\alpha]_D^{20} = +32,1$ (<i>c</i> 2,8 mg/2 mL, AcOEt)	$[\alpha]_D^{25} = +43,1$ (<i>c</i> 0,8 g/100 mL, CHCl ₃) (Deevi Basavaiah et al., 2006)

^aA rotação óptica foi medida em acetato de etila como solvente em um polarímetro JASCO P2000 equipado com uma lâmpada de Na-589nm.

Além das reações realizadas com os micélios dos fungos derivados de ambiente marinho, empregou-se também os seus respectivos caldos enzimáticos utilizando a cetona **2a**. Porém, as reações com os caldos enzimáticos forneceram apenas traços da cloridrina **3a**, desta forma pode-se inferir que as enzimas responsáveis pela biorredução são intracelulares.

A redução de compostos carbonílicos como aldeídos e cetonas envolvem normalmente a ação de enzimas desidrogenases. Nas reações de redução de um grupo carbonílico pela álcool desidrogenase em que envolve a presença de uma coenzima, NAD(P)H ou NADH, ocorre a transferência de um íon hidreto ao grupo carbonílico da cetona, de tal forma que a enzima discrimina entre as faces do grupo carbonílico para formação preferencial de um estado estereoisomérico do álcool. O mecanismo de ação da coenzima no sítio catalítico envolve uma interação do oxigênio carbonílico do substrato ao íon inorgânico presente no sítio ativo da enzima (Zn^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+}) em que este atua como um ácido de Lewis ativando a carbonila e favorecendo a transferência do íon hidreto da coenzima NAD(P)H. A transferência do íon hidreto pelo cofator pode ser por um dos quatro diferentes tipos de estereoespecificidades, e isto depende da orientação da ligação do substrato à enzima que levará a formação do (*R*)- ou (*S*)-álcool (Esquema 8) (Marsaioli *et al.*, 2010).

Esquema 8 - Transferência de um íon hidreto do cofator NADH ao grupo carbonílico.



Fonte: Marsaioli *et al.*, 2010, p. 257.

4.1 ANÁLISES ESPECTROSCÓPICAS E CROMATOGRÁFICAS

Os produtos obtidos pela biorredução a partir de células totais dos fungos derivados de ambiente marinho (**3a-d**), bem como os sintetizados previamente **2a-d**, foram isolados e identificados por análises espectroscópicas de RMN ^1H e ^{13}C , Infravermelho (IV) e cromatografia à gás por espectrometria de massas (CG-EM). A título de identificação dos compostos obtidos neste trabalho foi descrito a caracterização da cetona **2a** e da cloridrina **3a** pelas técnicas de RMN ^1H , ^{13}C , IV, EM, CG-FID (coluna quiral). Os espectros de todos os compostos estão em anexo.

4.1.1 Ressonância magnética nuclear (RMN)

O produto clorado **2a** foi analisado por espectroscopia de RMN em CDCl_3 . Observou-se a presença de um multipeto em 7,97-7,92 ppm referente aos hidrogênios da posição *orto* do anel aromático, este sinal é observado em um campo menor uma vez que este está sobre maior influência da desblindagem provocada pelo grupo carbonílico e pelo efeito de anisotropia do sistema aromático. Outro multipeto aparece em 7,63-7,58 ppm referente aos hidrogênios na posição *para* do anel e em 7,51-7,46 ppm observou-se o sinal referente aos hidrogênios da posição *meta* em um campo de menor intensidade. Os hidrogênios do sistema aromático ficam desblindados pelo efeito do fenômeno da anisotropia diamagnética do anel aromático. O sinal em 4,72 ppm referente aos hidrogênios α $-\text{CH}_2$, aparecem em forma de singlete, este é afetado pela eletronegatividade do átomo de cloro desblindando os elétrons dos hidrogênios, o que faz que apareceram em um campo mais baixo do espectro de RMN ^1H (Figura 9).

O espectro de RMN ^{13}C em CDCl_3 também confirmou a estrutura do produto clorado **2a**. O sinal em 45,9 pmm é referente ao único carbono metilênico $-\text{CH}_2-$. Em 128,5 ppm e 128,9 ppm são referentes aos carbonos *orto* e *meta* do anel aromático, respectivamente. Os sinais 134,0 ppm e 134,2 ppm referem-se aos carbonos em *meta* e *epsilon* do anel aromático, respectivamente. Por fim, o sinal em 191,0 ppm é referente ao carbono da carbonila (Figura 10).

Figura 9 - Espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) da α -cloro-feniletanona **2a**.

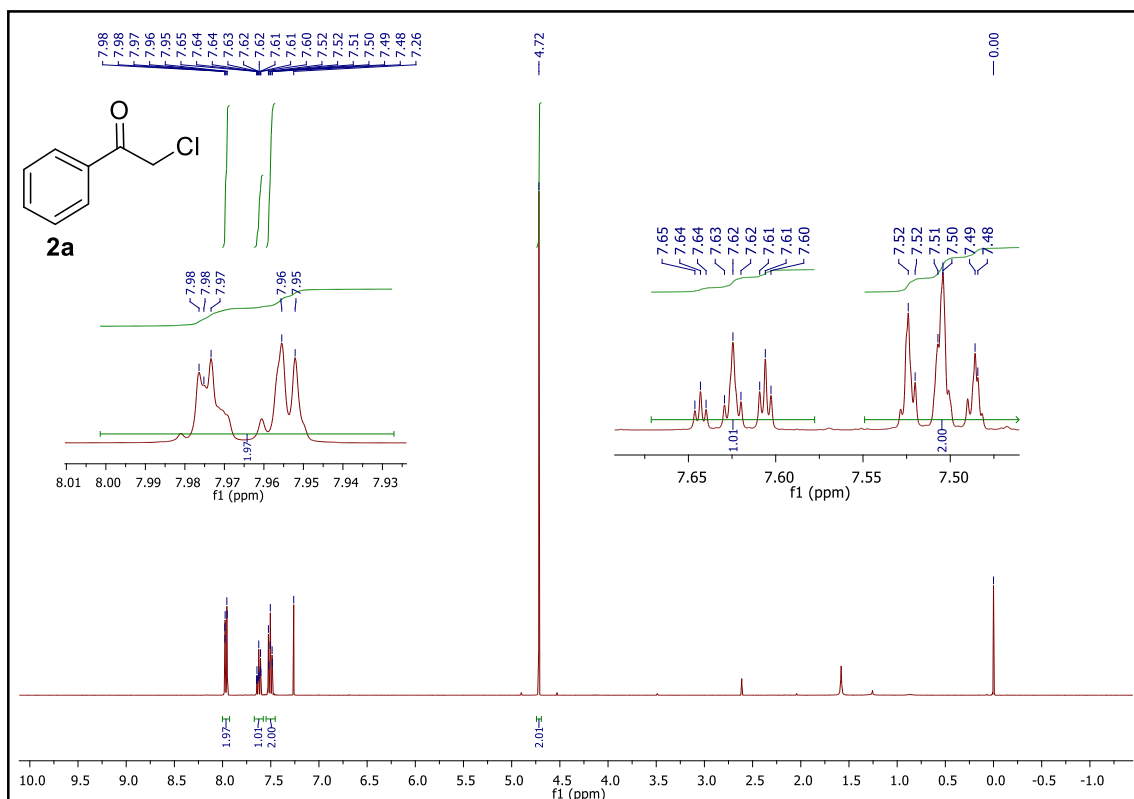
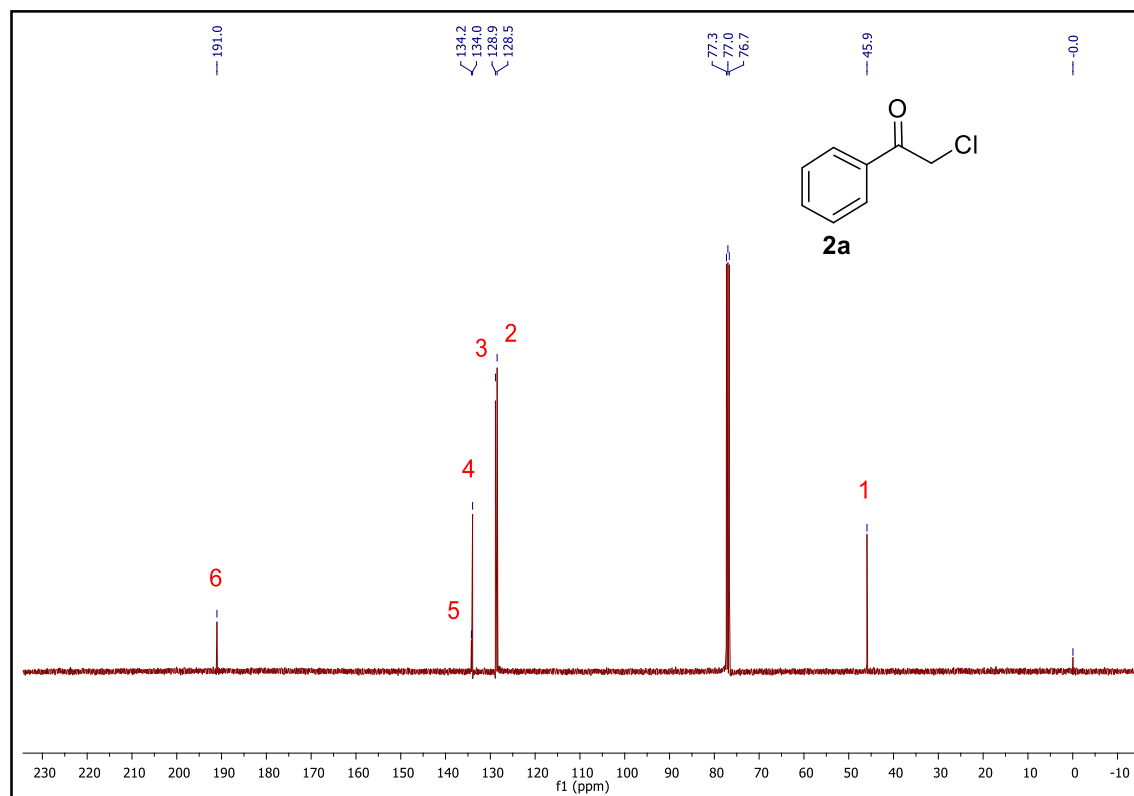


Figura 10 - Espectro de RMN ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) da α -cloro-feniletanona **2a**.



A cloridrina **3a** foi analisada por espectroscopia de RMN ^1H em CDCl_3 . Observou-se a presença de um singlete na região de 7,3 ppm referente aos hidrogênios do anel aromático, este sinal é observado em um campo mais baixo uma vez que este está sobre maior influência da desblindagem provocada pela hidroxila. Na região de 5,9 ppm tem-se um sinal referente ao hidrogênio do grupamento álcool. O hidrogênio carbinólico encontra-se desblindado pelo efeito da eletronegatividade do oxigênio, o qual faz uso de um campo mais baixo para excitar os núcleos. O sinal em 3,8 ppm é referente aos hidrogênios da ligação $-\text{CH}_2$ que estão próximos ao átomo de cloro. Este é afetado pela eletronegatividade do átomo de cloro desblindando os elétrons dos hidrogênios, o que faz com que aparecem em um campo mais alto do espectro de RMN ^1H (Figura 11).

O espectro de RMN ^{13}C em CDCl_3 também confirmou a estrutura da cloridrina **3a**. O sinal em 50,9 ppm é referente ao carbono $-\text{CH}_2$. O carbono ligado à hidroxila aparece na região espectral em 74,0 ppm; e em 128,6 ppm e 126 ppm são referentes aos carbonos do anel aromático. E o sinal em 139,9 ppm é referente ao carbono quaternário ligado ao grupo substituinte da cadeia lateral, o qual está mais desblindado pela influência do átomo de oxigênio (Figura 12).

Figura 11 – Espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) do 2-cloro-1-feniletanol **3a**.

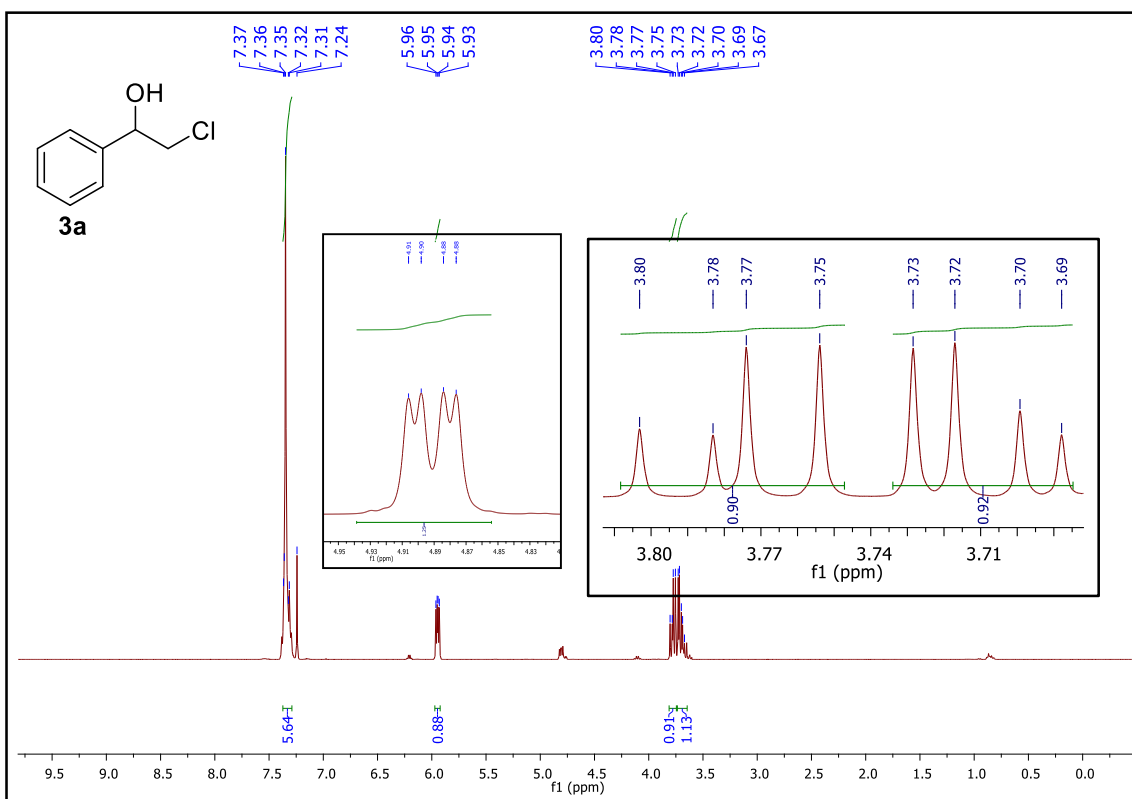
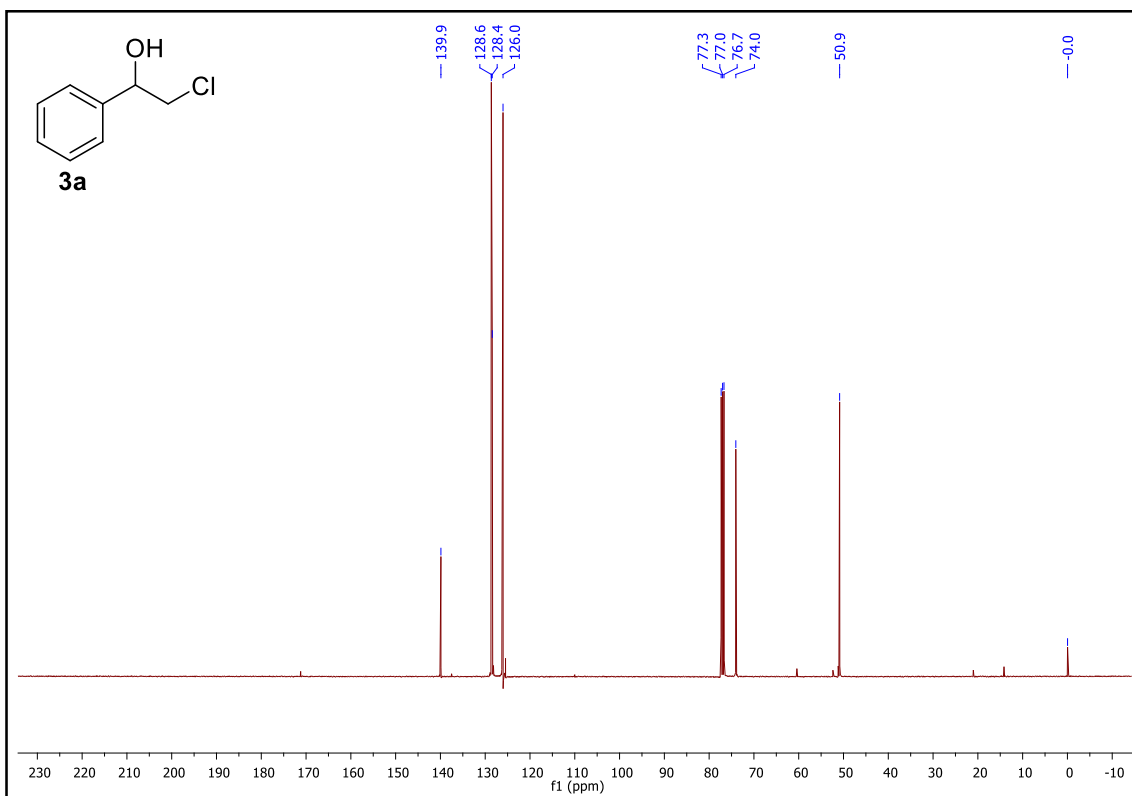


Figura 12 – Espectro de RMN ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) do 2-cloro-1-feniletanol **3a**.

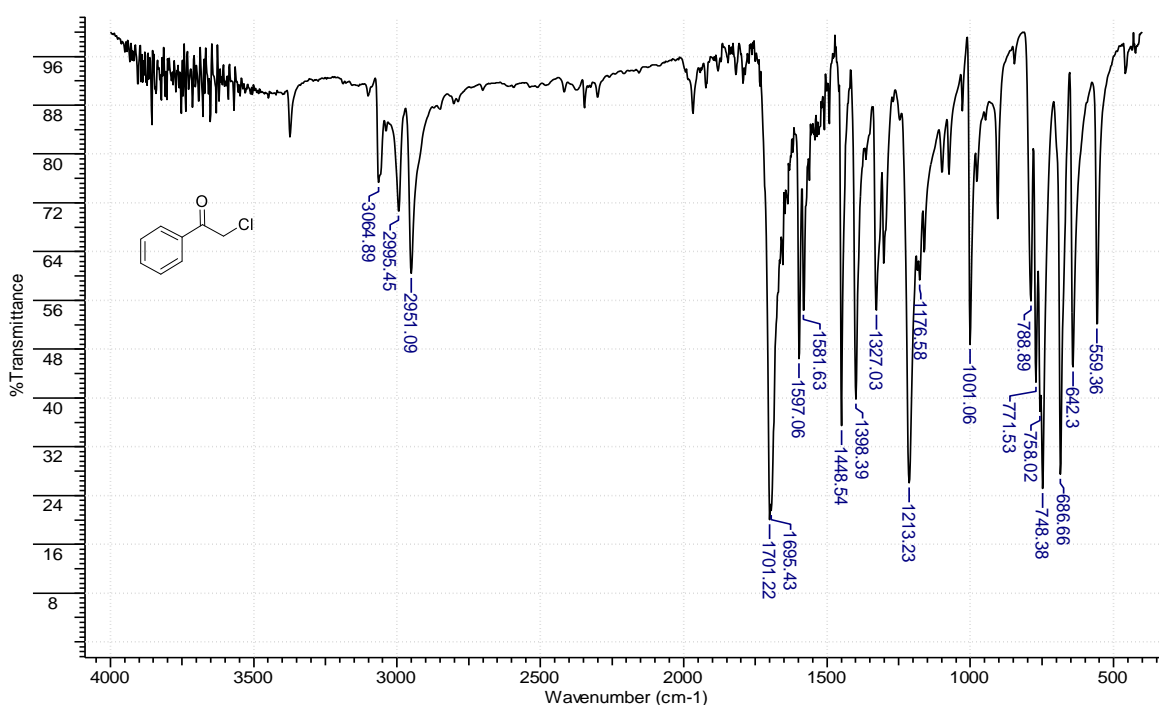


4.1.2 Espectroscopia no infravermelho (IV)

O espectro no infravermelho corrobora para a confirmação do produto 2-cloro-1-feniletanona **2a** pela análise das bandas características (Figura 13). A banda na região de 3065 cm^{-1} refere-se à vibração da ligação =C-H (sp^2) do anel aromático. Na região de $2955\text{--}2951\text{ cm}^{-1}$ correspondem as bandas de vibração --C-H (sp^3). O sinal em 1701 cm^{-1} com forte intensidade representa o estiramento do grupo carbonílico --C=O .

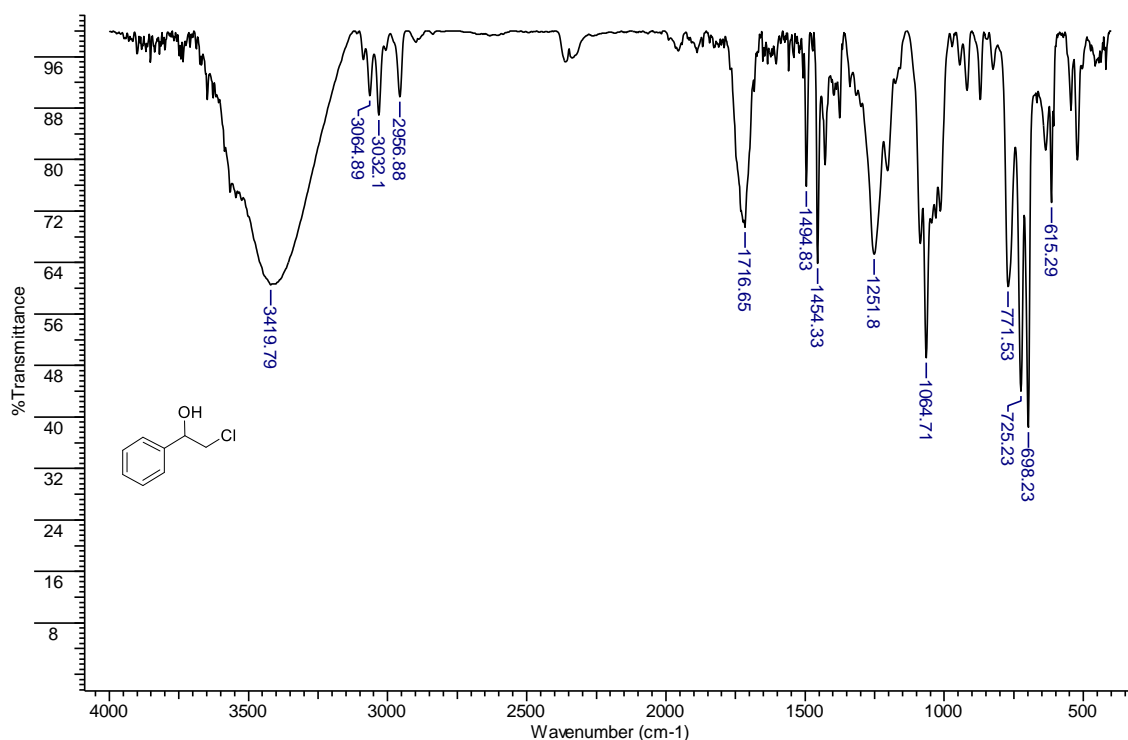
As bandas de média intensidade que aparecem no intervalo de $1597\text{--}1398\text{ cm}^{-1}$ são as vibrações das ligações --C=C-- do anel aromático. No intervalo de $1213\text{--}1001\text{ cm}^{-1}$ são bandas características de estiramentos do anel aromático. E entre $789\text{--}559\text{ cm}^{-1}$ apresentam bandas de média e forte intensidade referente ao estiramento da ligação --C-Cl . Na região de $748\text{--}687\text{ cm}^{-1}$ observa-se a deformação da ligação C-H do anel aromático, fora do plano com forte intensidade.

Figura 13 - Espectro no infravermelho da 2-cloro-1-feniletanona **2a**.



Na Figura 14 tem-se o espectro no infravermelho para o 2-cloro-1-feniletanol **3a**. Em 3420 cm^{-1} tem-se uma banda de intensidade intermediária e larga, resultante da associação polimérica dos grupamentos O-H via fortes ligações hidrogênio. Este é um forte indício da formação da cloridrina **3a**, devido também a ausência do sinal em 1701 cm^{-1} referente ao estiramento do grupo carbonílico C=O . As bandas que aparecem no intervalo de $3065\text{--}3032\text{ cm}^{-1}$ referem-se à vibração da ligação =C-H (sp^2) do anel aromático. Em 2957 cm^{-1} corresponde à vibração da ligação --C-H (sp^3). As bandas de média intensidade que aparecem no intervalo de $1495\text{--}1454\text{ cm}^{-1}$ são as vibrações das ligações --C=C-- do anel aromático. No intervalo de $1252\text{--}1065\text{ cm}^{-1}$ são bandas características de estiramentos do anel aromático e vibrações --C-O-H . Em aproximadamente 772 cm^{-1} apresenta-se uma banda de forte intensidade referente ao estiramento da ligação --C-Cl . Na região de $725\text{--}615\text{ cm}^{-1}$ observa-se a deformação da ligação C-H do anel aromático fora do plano e com fraca intensidade.

Figura 14 - Espectro no infravermelho do 2-cloro-1-feniletanol **3a**.

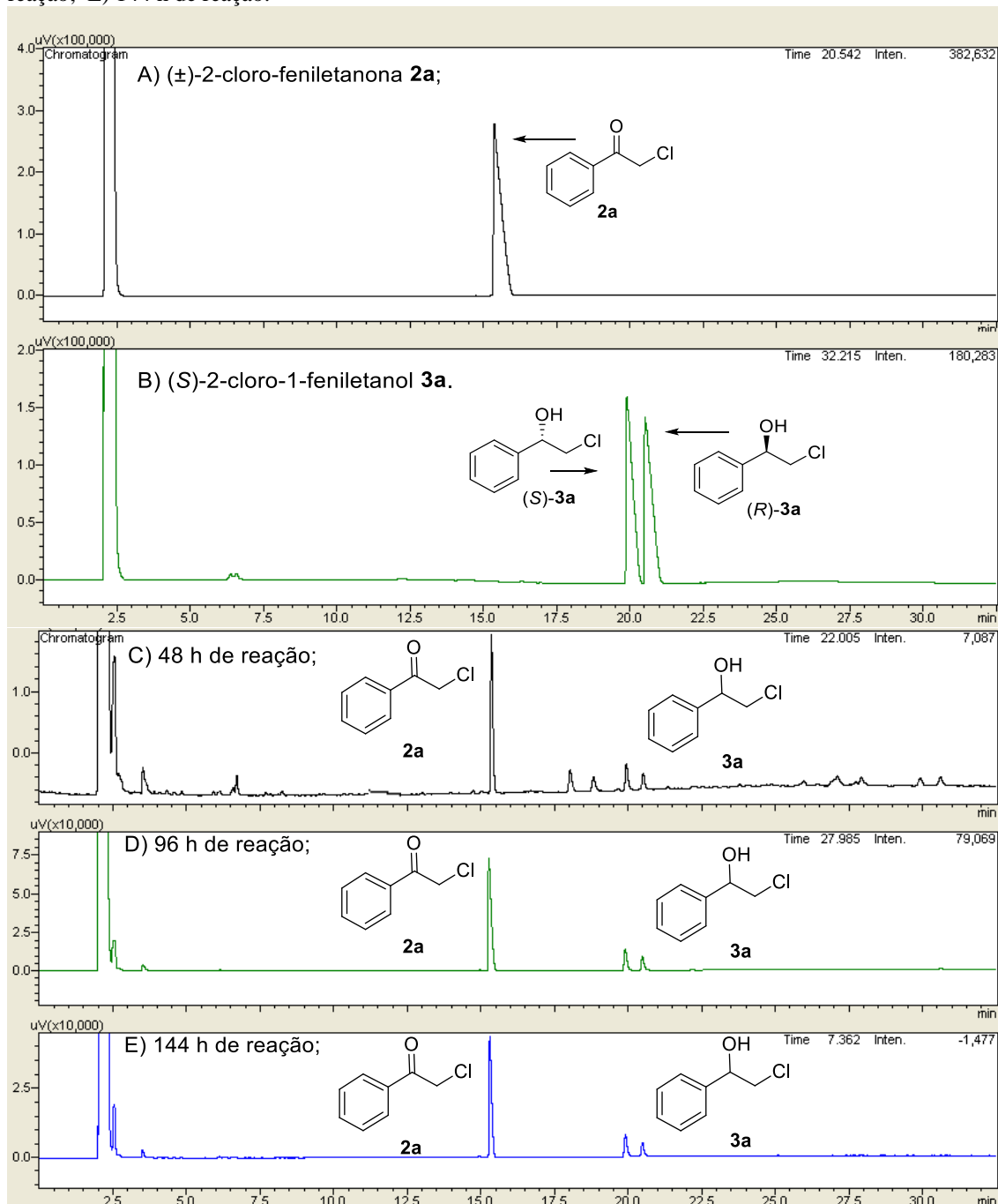


4.1.3 Cromatografia a gás por ionização de chama (CG-FID)

O pico em 15,45 min no cromatograma A (Figura 15) corresponde a α -clorofeniletanona **2a**. Os picos em 20,1 e 20,9 minutos correspondem aos enantiômeros da cloridrina racêmica **3a** no cromatograma B (Figura 15).

A reação no tempo de 24 h produziu 20% do composto **3a** com e.e. 10% cromatograma C. Já no tempo de 48 h o produto **3a** foi convertido em 24% com e.e 12%, segundo o cromatograma D. Por fim, em 96 h células do fungo *P. citrinum* CBMAI 1186 promoveram 32% do composto reduzido **3a** em moderado excesso enantiomérico (15%) como mostrado no cromatograma E (Figura 15 e Tabela 3). As análises cromatográficas foram realizadas em coluna quiral de β -ciclodextrina.

Figura 15 - Cromatogramas obtidos por CG-FID em coluna quiral de β -ciclodextrina da: A) (\pm)-2-cloro-feniletanona **2a**; B) (*R*)-2-cloro-1-feniletanol **3a**. Etapas da reação em cascata: C) 48 h de reação; D) 96 h de reação; E) 144 h de reação.



4.1.4 Cromatografia a gás por espectrometria de massas

A reação de síntese de **2a** na presença da radiação micro-ondas formou vários produtos, os quais não foram isolados. Entretanto, foram obtidos os espectros de massas (Figura 16) a partir do cromatograma da Figura 8 e sugerida as possíveis estruturas dos subprodutos obtidos.

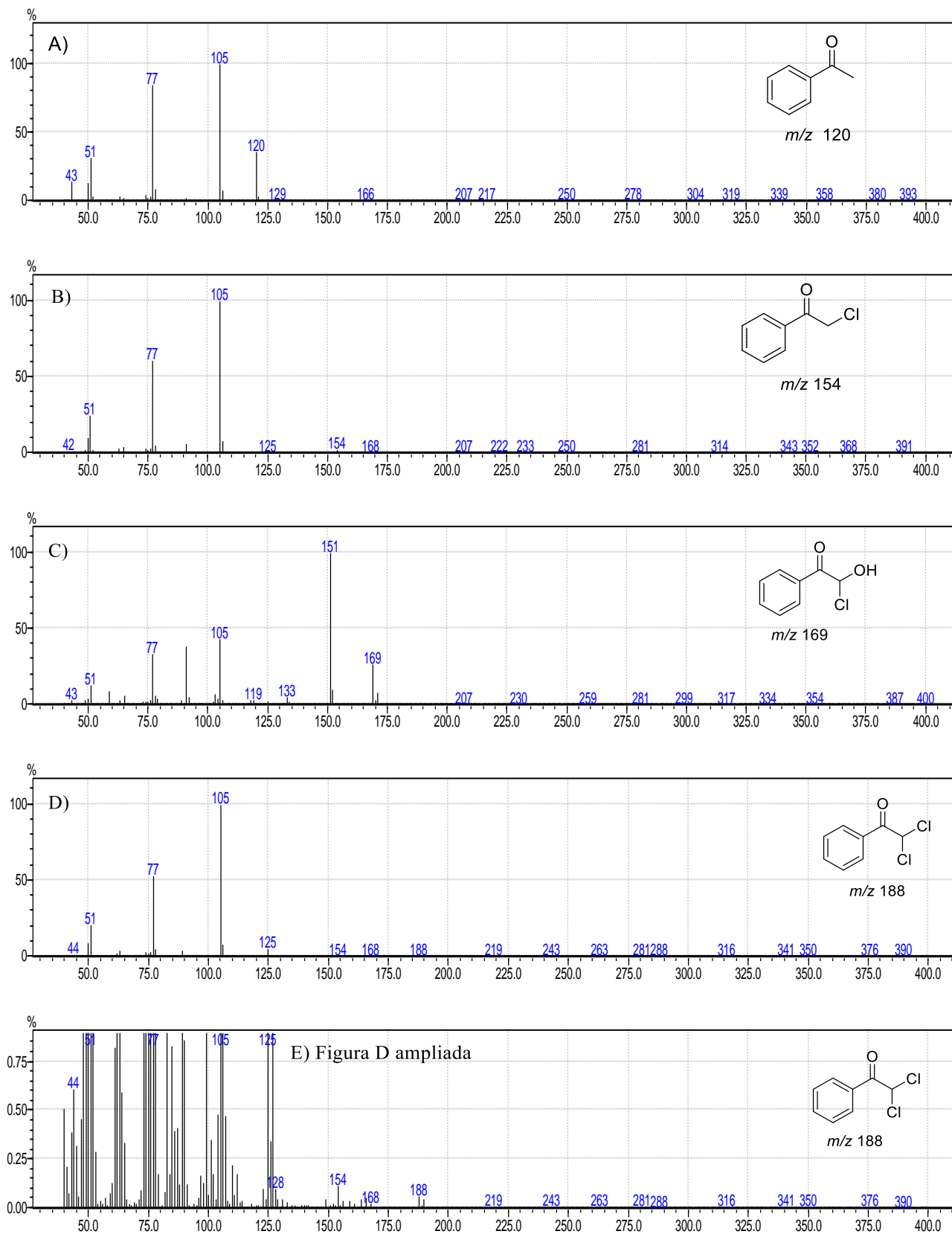
A Figura 16 apresenta os espectros da acetofenona **1a** como reagente de partida e a formação da 2-cloro-1-feniletanona **2a**, bem como, outros subprodutos formados na reação. Ao observar o espectro de massas (Figura 16A) pode-se detectar a presença do íon molecular (M^+ 120) e os fragmentos com razão m/z 77 e íon mais estável m/z 105 (100%) referente a quebra heterolítica da acetofenona, liberando um radical metila ($\cdot\text{CH}_3$) e o íon acílio (m/z 105). Desta forma sugere-se que o composto obtido corresponde à acetofenona (material de partida).

Na Figura 16B observa-se uma fragmentação liberando um radical ($\cdot\text{CH}_2\text{Cl}$) e formando o íon acílio m/z 105 (100%). O pico do íon molecular apresentou m/z 154 e de baixa intensidade (<1%). Este correspondeu ao produto **2a** via monocloração da acetofenona e que após ser purificado por cromatografia em coluna foi caracterizado por RMN ^1H e ^{13}C . Portanto trata-se da α -cloroacetofenona **2a**.

O espectro da Figura 16C sugere a formação do subproduto 2-cloro-2-hidroxi-1-feniletan-1-ona (MM 170 g/mol) formado pela adição de um grupo hidroxila na posição 2 α -cloroacetofenona **2a**. O pico do íon molecular apresentou m/z 169 (30%) com perda do próton da hidroxila. O pico base m/z 151 corresponde à perda de uma molécula de água, o que está de acordo com a estrutura sugerida. Outros fragmentos característicos de grupos aromáticos também foram detectados (m/z 105 e 77).

No espectro da Figura 16D observou-se a formação do subproduto 2,2-dicloro-1-feniletan-1-ona, que corresponde à adição de dois átomos de cloro na posição α à carbonila, cujo íon molecular é de m/z 188 (<1 %). O pico base m/z 105 e o pico m/z 77 (50%) sugerem a formação do composto diclorado. Ainda, a expansão do espectro da Figura 16D para a Figura 16E sugere a adição de átomos de cloro devido à relação isotópica dos picos. Assim, a Figura 16 possibilita sugerir a formação dos compostos obtidos.

Figura 16 – Espectro de massas da reação de formação da 2-cloro-1-feniletanona **2a** por radiação micro-ondas.



5. CONCLUSÃO

A síntese da 2-cloro-1-feniletanona **2a** com NH_4Cl e Oxone[®] foi eficaz quando realizada em agitação convencional formando 97% do produto **2a**. Enquanto que por radiação micro-ondas obteve-se 70% de conversão. Provavelmente se deve ao maior número de misturas formadas na reação por radiação micro-ondas como foi constatado pelos espectros de massas, bem como a instabilidade dos íons $\text{HO}\cdot\text{Cl}^+$.

Para as reações de biotransformação utilizando células úmidas de fungos de ambiente marinho (*P. citrinum* CBMAI 1186, *Mucor racemosus* CBMAI 847, *Aspergillus sydowii* CBMAI 935, *Penicillium raistrickii* CBMAI 931 e *Penicillium oxalicum* CBMAI 1185) a utilizou-se os derivados de α -clorocetonas **2a-d** [(2-cloro-1-feniletanona **2a**, 2-cloro-1-(4-flúor-fenil)-etanona **2b**, 2-cloro-2-(furanil)etanona **2c** e 2-cloro-1-(*p*-toluil)etanona **2d**)] as quais foram monitoradas por 6 d e produziram diferentes conversões e excessos enantioméricos. Destaca-se que as reações de síntese foram realizadas sem prévia purificação seguida da biorredução com as células microbianas.

O melhor resultado foi na obtenção do 2-cloro-1-(*p*-toluil)etan-1-ol **3d** o qual apresentou altas conversões e excessos enantioméricos para a maioria dos fungos utilizados neste trabalho, com destaque para o fungo *P. oxalicum* CBMAI 1185 (conv. 97%, e.e. 94%). Enquanto que o 2-cloro-1-(4-flúor-fenil)etan-1-ol **3b** apresentou valores moderados (conv. 47-94%, e.e. 48-72%), o 2-cloro-1-feniletanol (**3a**) e 2-cloro-2-(furan)etan-1-ol (**3c**) apresentaram baixas conversões (12-47%) e excessos enantioméricos (3-38%) para os fungos marinhos utilizados.

Finalmente, este trabalho foi importante, pois desenvolveu-se um protocolo de síntese química acoplada à metodologia biocatalítica sem prévia purificação.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BARBIERI, C.; CARUSO, E.; D'ARRIGO, P.; FANTONI, G. P.; SERVI, S. Chemo-enzymatic synthesis of (*R*)- and (*S*)-3,4-dichloro-phenylbutanolide intermediate in the synthesis of sertraline. **Tetrahedron: Asymmetry**, v. 10, p. 3931-3937, 1999.
- BARBIERI, C.; BOSSI, L.; D'ARRIGO, P.; FANTONI, G. P.; SERVI, S. Bioreduction of aromatic ketones: Preparation of chiral benzyl alcohols in both enantiomeric forms. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 11, p. 415-421, 2001.
- BIROLI, W. G. **Biodegradação do pesticida esfenvalerato por fungos de ambiente marinho**. 2013. Tese (Mestrado em Química Orgânica e Biológica) – Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2013.
- BIROLI, W. G.; FERREIRA, I. M. ALVARENGA, N.; SANTOS, D. de A.; MATOS, I. L. de; COMASSETO, J. V.; PORTO, A. L. M. **Biocatalysis and biotransformation in Brazil: An overview. Biotechnology Advances**, v. 33, p. 481-510, 2015.
- BLOMBERG, A. and ADLER, L. Physiology of osmotolerance in fungi. **Advances in Microbial Physiology** v. 33, p. 145-212, 1992.
- DE SOUZA, R. and MIRANDA, L. Microwave assisted organic synthesis: A history of success in Brazil. **Química Nova** v. 34, p. 497-506, 2011.
- FABER, K. **Biotransformations in organic chemistry**. 5.ed. Berlin: Spring-Verlag, 2004. 454 p.
- FERREIRA, I., MEIRA, E., ROSSET, I. and PORTO, A. Chemoselective biohydrogenation of alpha,beta- and alpha,beta,gamma,delta-unsaturated ketones by the marine-derived fungus *Penicillium citrinum* CBMAI 1186 in a biphasic system. **Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic** v. 115, p. 59-65, 2015.
- FERREIRA, I., NISHIMURA, R., SOUZA, A., CLOSOSKI, G., YOSHIOKA, S. and PORTO, A. Highly enantioselective acylation of chlorohydrins using Amano AK lipase from *P. fluorescens* immobilized on silk fibroin-alginate spheres. **Tetrahedron Letters** v. 55, p. 5062-5065, 2014.
- GAGNON, M. and VASUDEVAN, P. Effects of solvent and enzyme source on transesterification activity. **Energy & Fuels** v. 25, p. 4669-4674, 2011.

KAPOOR, M.; ANAND, N.; AHMAD, K.; KOUL, S.; CHIMNI, S. S.; TANEJA, S. C. and QAZI, G. N. Synthesis of β -adrenergic blockers (*R*)-(-)-nifenalol and (*S*)-(+)-sotalol via a highly efficient resolution of a bromohydrin precursor. **Tetrahedron Letters** v. 16, p. 717-725, 2005.

LARHED, M. and HALLBERG, A. Microwave-assisted high-speed chemistry: A new technique in drug discovery. **Drug Discovery Today** v. 6, p. 406-416, 2001.

LENARDAO, E., FREITAG, R., DABDOUB, M., BATISTA, A. and SILVEIRA, C. Green chemistry - The 12 principles of green chemistry and its insertion in the teach and research activities. **Química Nova** v. 26, p. 123-129, 2003

LEHNINGER, P.; DAVID, L. N.; MICHAEL, M. C. **Principles of biochemistry**. 4. ed. New York, Worth Publishers, 2000. 1202 p.

MARSAIOLI, A.; PORTO, A. L. M. **Biocatálise e biotransformação: Fundamentos e aplicações**. Vol 1. Editora Schoba, 2010. 337 p.

MARTINS, M., OUZZANI, J., ARCILE, G., JELLER, A., DE LIMA, J., SELEGHIM, M., H. R., OLIVEIRA, A. L. L., DEBONSI, H. M., VENANCIO, T., YOKOYA, N. S., FUJII, M. T., PORTO, A. L. M. Biohydroxylation of (-)-Ambrox, (-)-Sclareol, and (+)-Sclareolide by whole cells of Brazilian marine-derived fungi. **Marine Biotechnology** v. 17, p. 211-218, 2015.

MEI Y., BENTLEY, P. and Du, J. Thiourea catalysis of NCS in the synthesis of α -chloroketones. **Tetrahedron Letters** v. 49, p. 3802-3804, 2008.

NAKAMURA, K.; YAMANAKA, R.; MATSUDA, T.; HARADA, T. Recent developments in asymmetric reduction of ketones with biocatalysts. **Tetrahedron: Asymmetry**, v. 14, p. 2659-2681, 2003.

PAMIES, O. and BACKVALL, J. Chemoenzymatic dynamic kinetic resolution of beta-halo alcohols. An efficient route to chiral epoxides. **Journal of Organic Chemistry** v. 67, p. 9006-9010, 2002.

RAGHUKUMAR, C. Marine fungal biotechnology: An ecological perspective. **Fungal Diversity** v. 31, p. 19-35, 2008.

RAGHUKUMAR, C., D'SOUZA-TICLO, D. and VERMA, A. Treatment of colored effluents with lignin-degrading enzymes: An emerging role of marine-derived fungi. **Critical Reviews in Microbiology** v. 34, p. 189-206, 2008.

RIBEIRO, S. S.; FERREIRA, I. M.; PORTO, A. L. M. Aplicação da irradiação micro-ondas em biocatálise. Dentro de: Biocatálise e biotransformação: Fundamentos e aplicações. v. 3. p. 161-210. Editora Schoba, 2014.

RIBEIRO, S., DE OLIVEIRA, J. and PORTO, A. Lipase-catalyzed kinetic resolution of (+/-)-mandelonitrile under conventional condition and microwave irradiation. **Journal of the Brazilian Chemical Society** v. 23, p. 1395-1399, 2012.

RIBEIRO, S., RAMINELLI, C. and PORTO, A. Enzymatic resolution by CALB of organofluorine compounds under conventional condition and microwave irradiation. **Journal of Fluorine Chemistry** v. 154, p. 53-59, 2013.

ROCHA, L. C., FERREIRA, H. V., PIMENTA, E. F., BERLINCK, R. G. S., REZENDE, M. O. O., LANDGRAF, M. D., SELEGHIM, M. H. R., SETTE, L. D., PORTO, A. L. M. Biotransformation of alpha-bromoacetophenones by the marine fungus *Aspergillus sydowii*. **Marine Biotechnology** v. 12, p. 552-557, 2010.

ROCHA, L. C., FERREIRA, H. V., PIMENTA, E. F., BERLINCK, R. G. S., SELEGHIM, M. H. R., JAVAROTI, D. C. D., SETTE, L. D., BONUGLI, R. C., PORTO, A. L. M. Bioreduction of alpha-chloroacetophenone by whole cells of marine fungi. **Biotechnology Letters** v. 31, p. 1559-1563, 2009.

SCHMID, A., DORDICK, J., HAUER, B., KIENER, A., WUBBOLTS, M. and WIHTOLT, B. Industrial biocatalysis today and tomorrow. **Nature** v. 409, p. 258-268, 2001.

SILVA, V., STAMBUK, B. and NASCIMENTO, M. Efficient chemoselective biohydrogenation of 1,3-diaryl-2-propen-1-ones catalyzed by *Saccharomyces cerevisiae* yeasts in biphasic system. **Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic** v. 63, p. 157-163, 2010.

TORTORA, G.J., FUNKE, B.R., CASE, C.L. **Microbiologia**. 10^a ed. Ed. Artmed, 2012. 934 p.

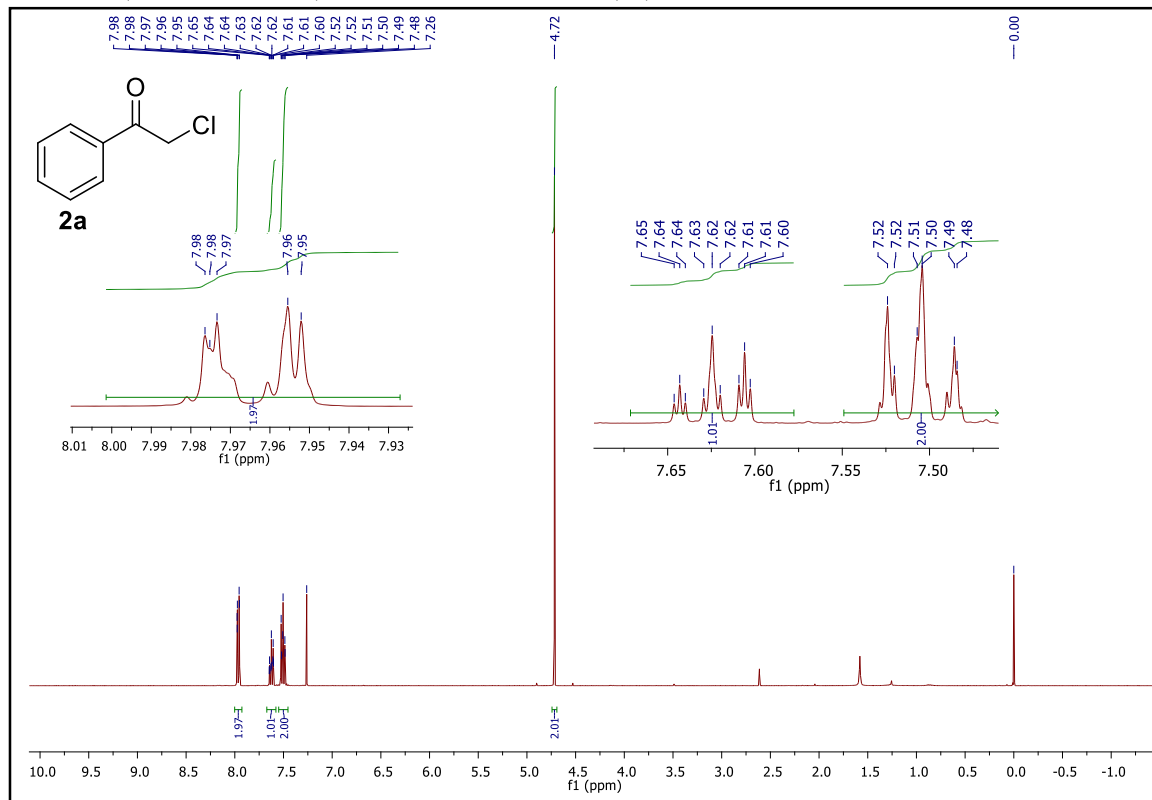
TRINCONI, A. Marine biocatalysts: Enzymatic features and applications. **Marine Drugs** v. 9, p. 478-499, 2011.

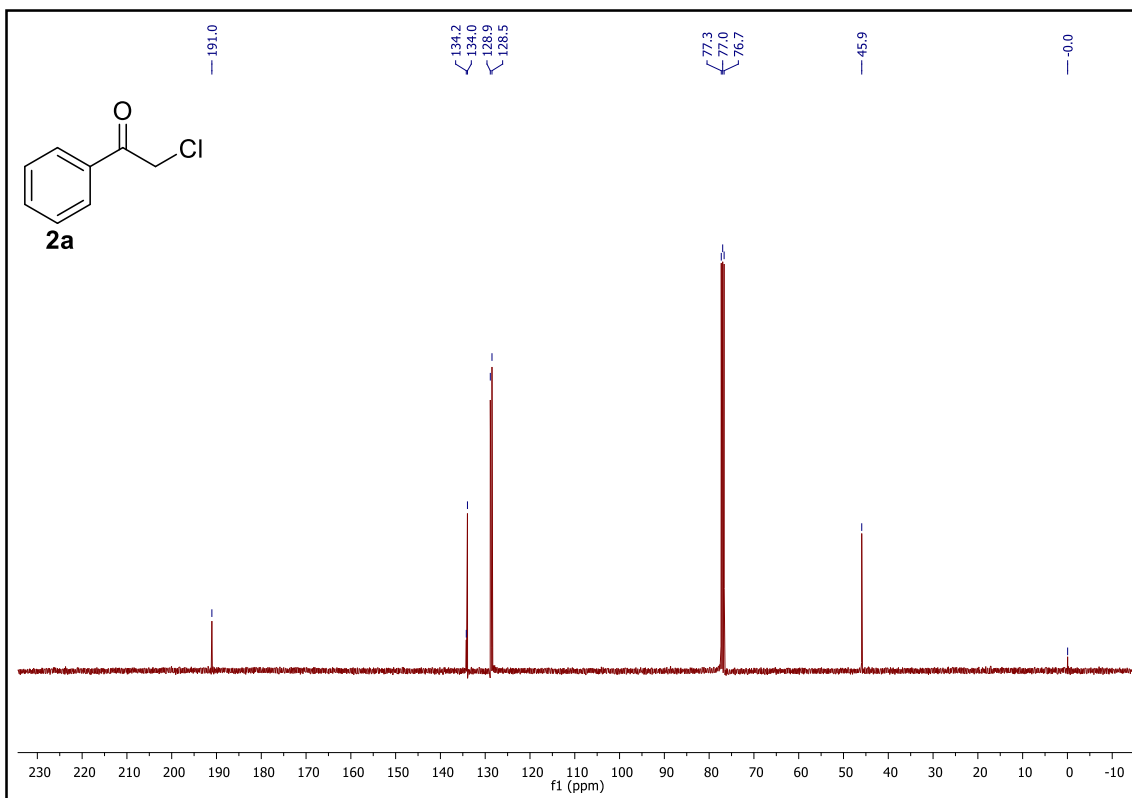
YU, D.; WANG, Z.; CHEN, P.; JIN, L.; VHENG, Y.; ZHOU, J.; CHAO, S. Microwave-assisted resolution of (*R, S*)-2-octanol by enzymatic transesterification. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 48, p. 51-57, 2007.

ZHANG, J., WANG, J., QIU, Z. and WANG, Y. Highly regio- and dtereoselective halohydroxylation of olefins: A facile synthesis of vicinal halohydrins. **Tetrahedron** v. 67, p. 6859-6867, 2011.

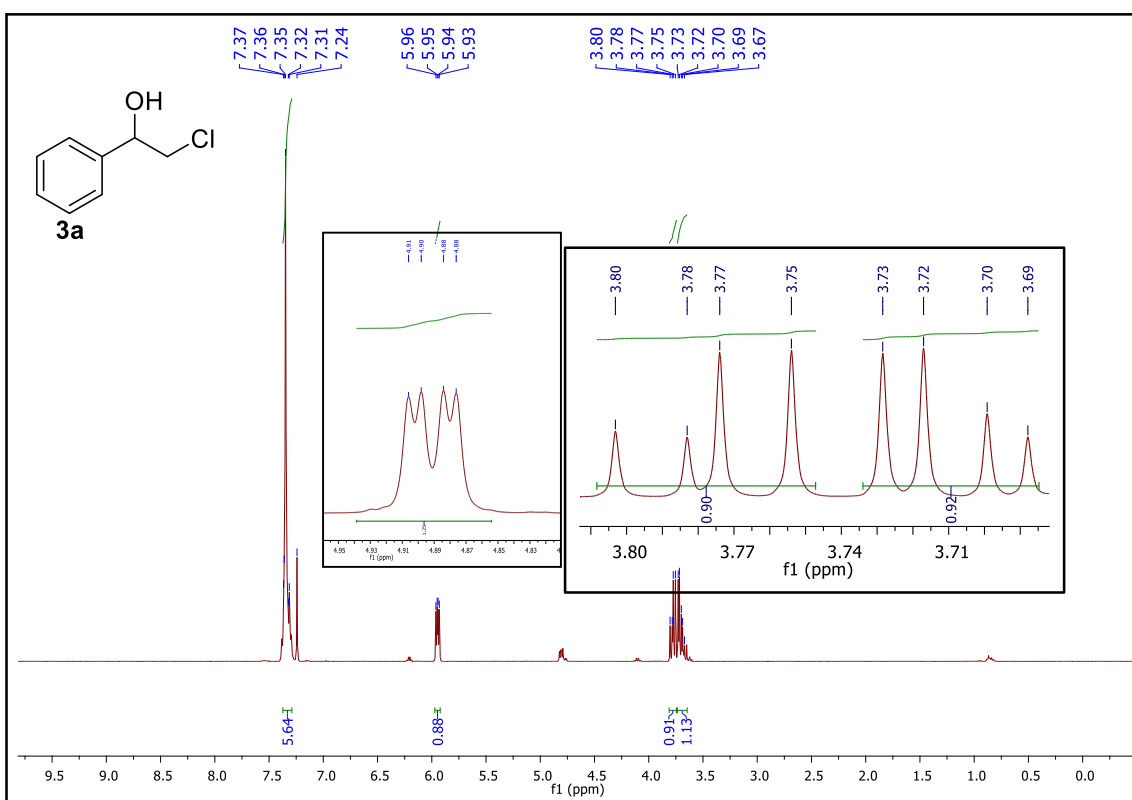
ZHOU, Z., LI, L. and HE, X. A simple and convenient method for direct alpha-chlorination of ketones with ammonium chloride and Oxone® . **Chinese Chemical Letters** v. 23, p. 1213-1216, 2012.

ANEXOS

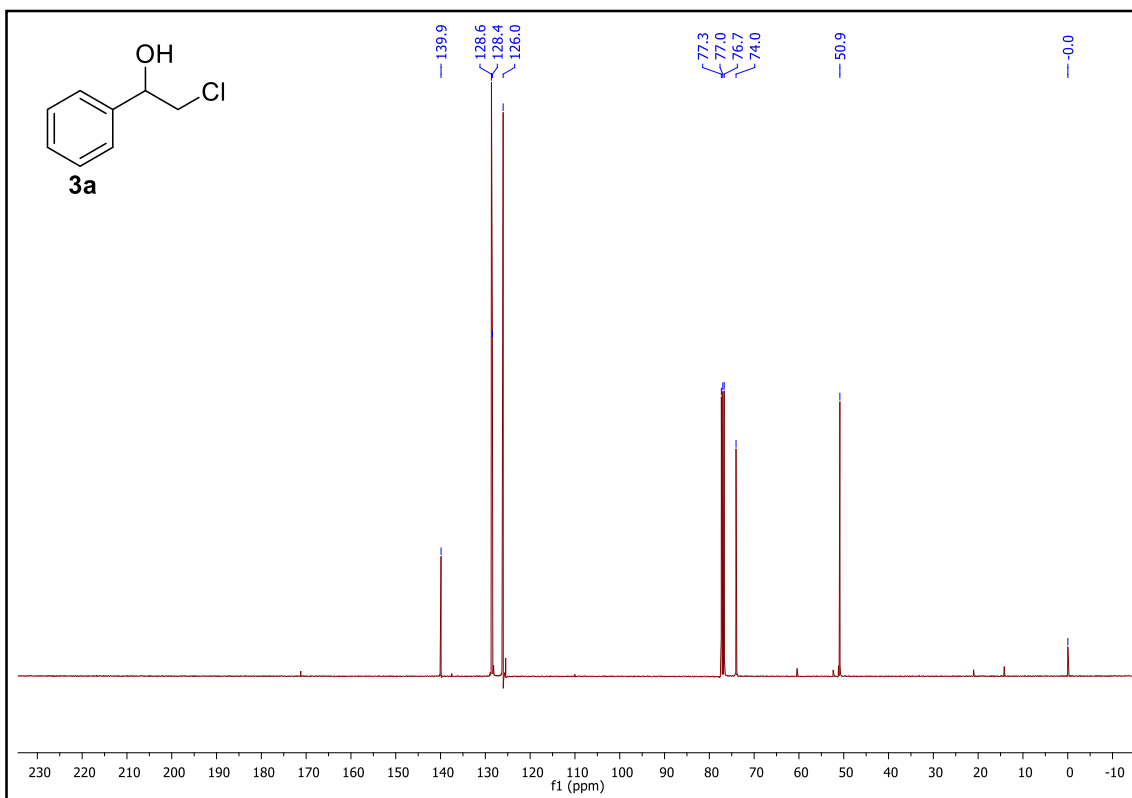
I – Espectros de RMN ^1H e ^{13}C RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) da 2-cloro-1-feniletanona (**2a**)RMN ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) da 2-cloro-1-feniletanona (**2a**)



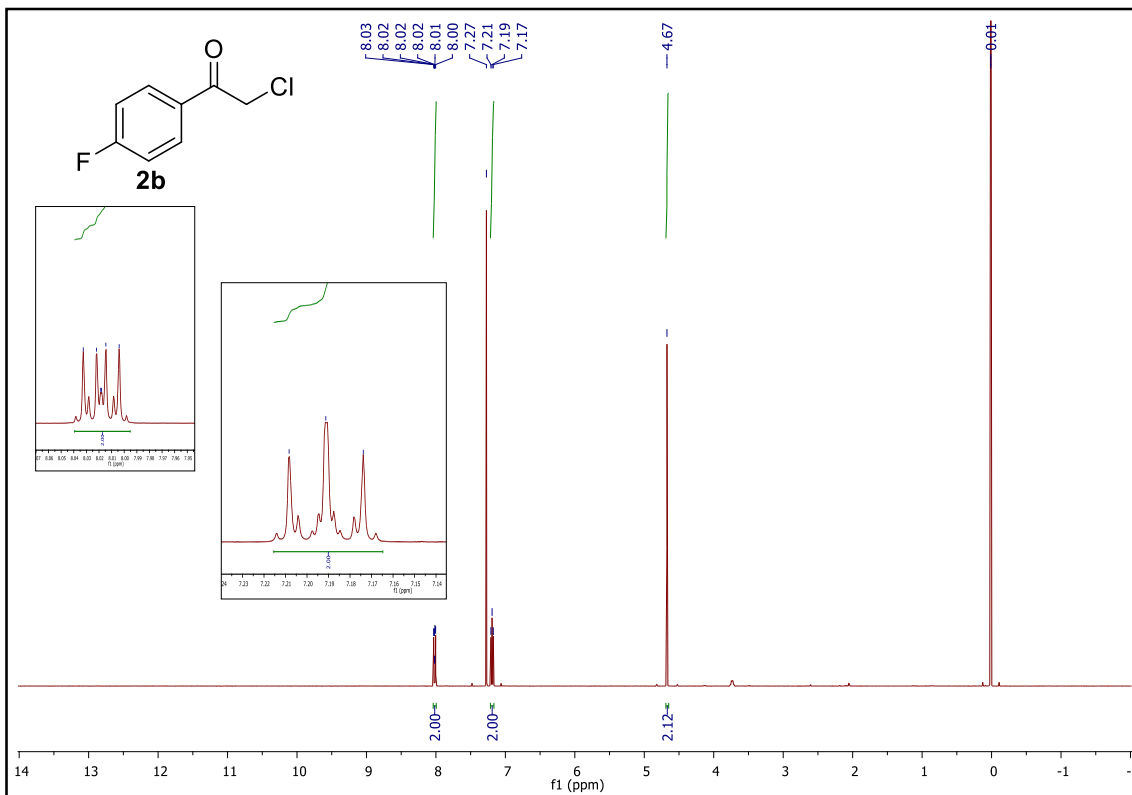
RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃) do 2-cloro-1-feniletanol (**3a**)



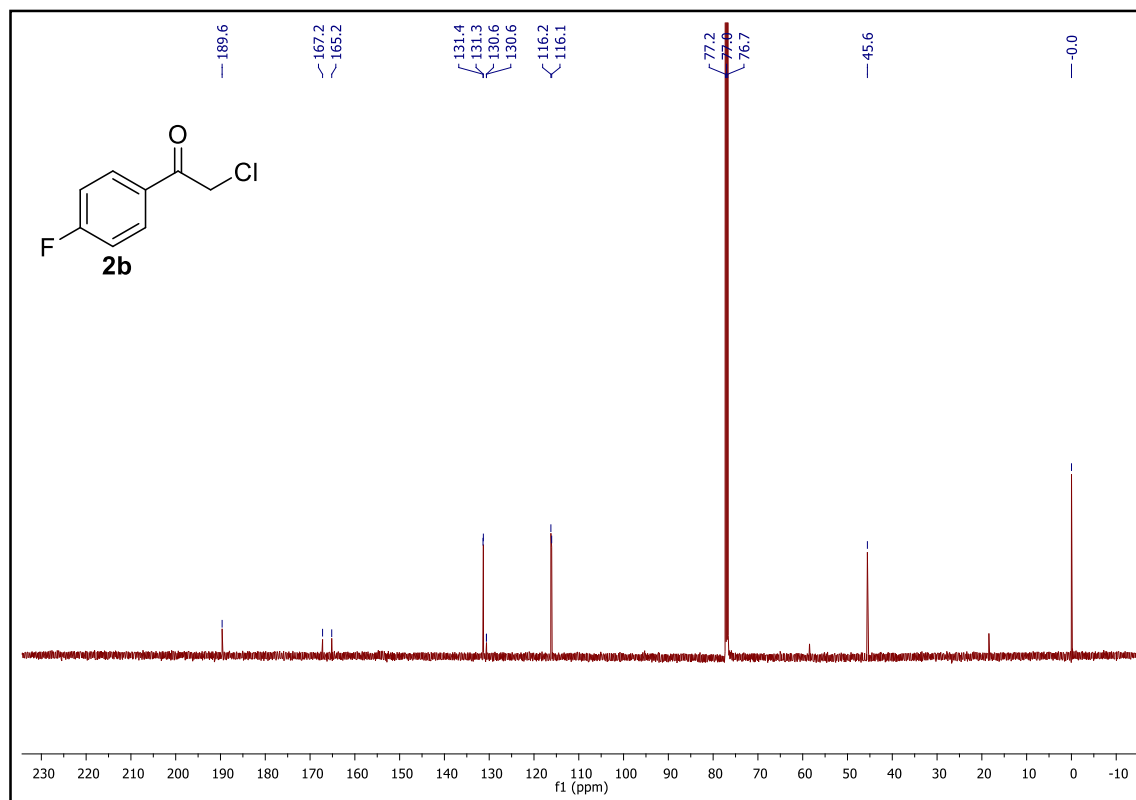
RMN ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) do 2-cloro-1-feniletanol (**3a**)



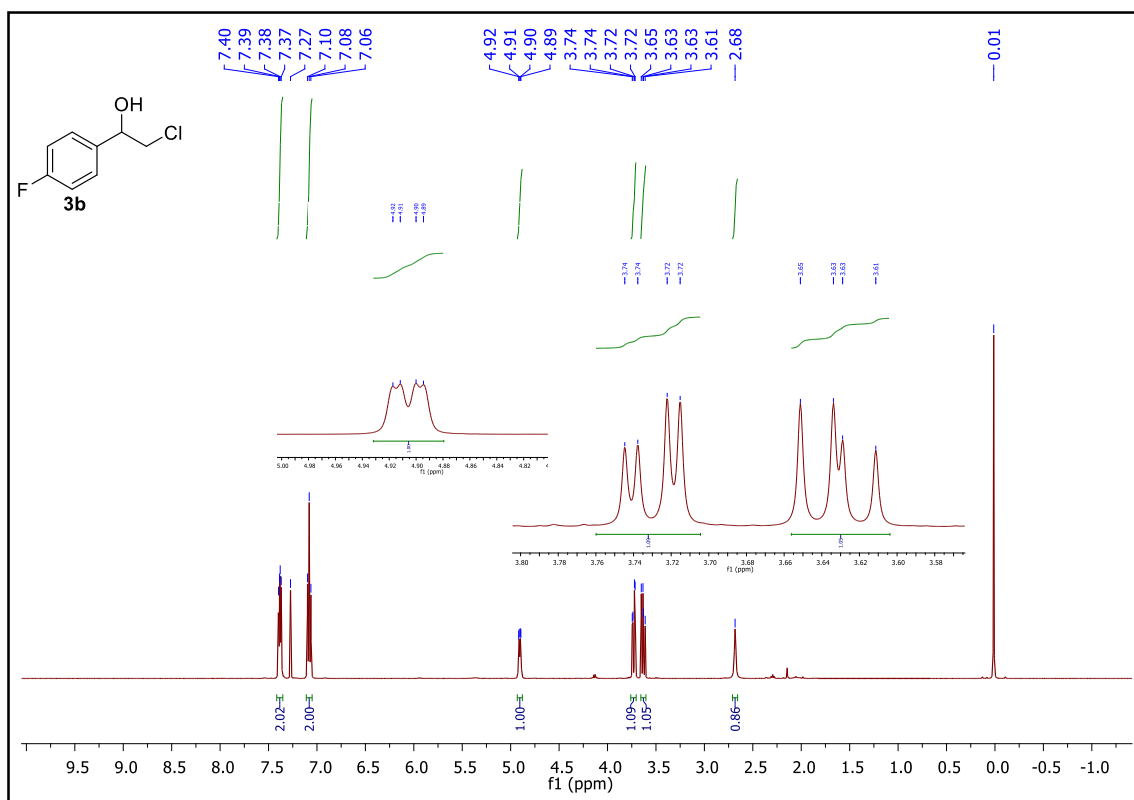
RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) da 2-cloro-1-(4-flúor-fenil)-etanona (**2b**)



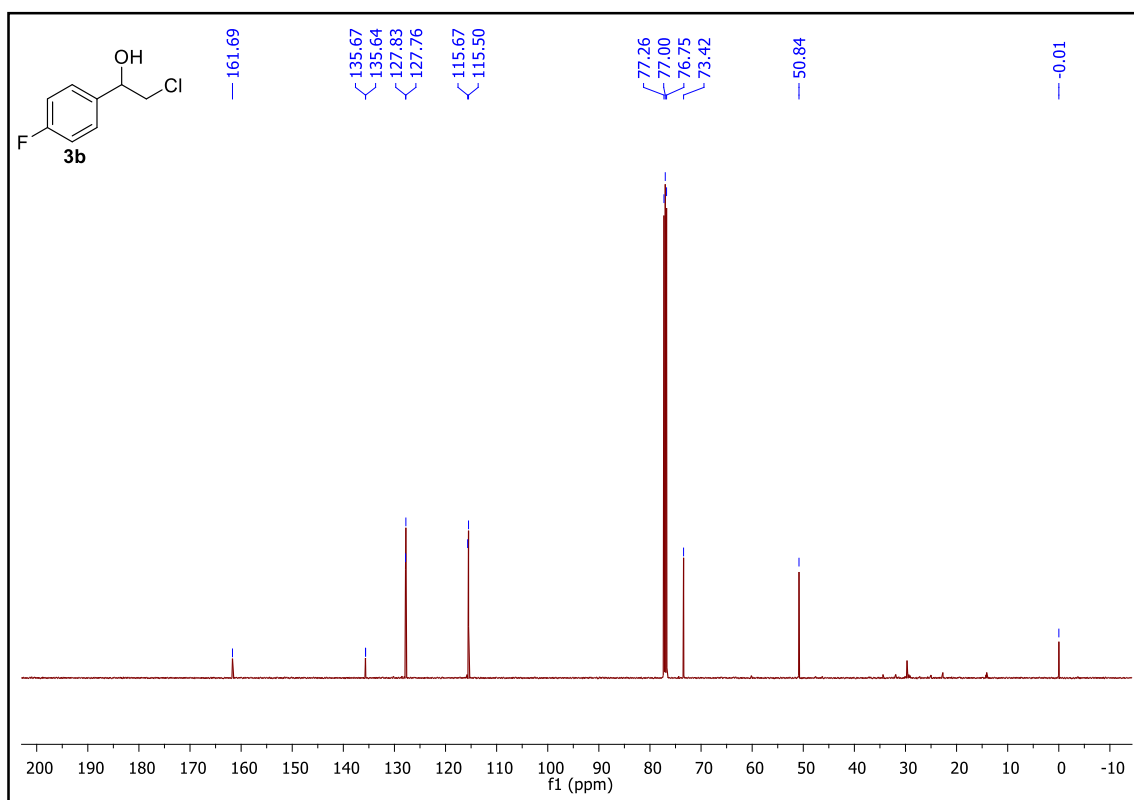
RMN ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) da 2-cloro-1-(4-flúor-fenil)-etanona (**2b**)



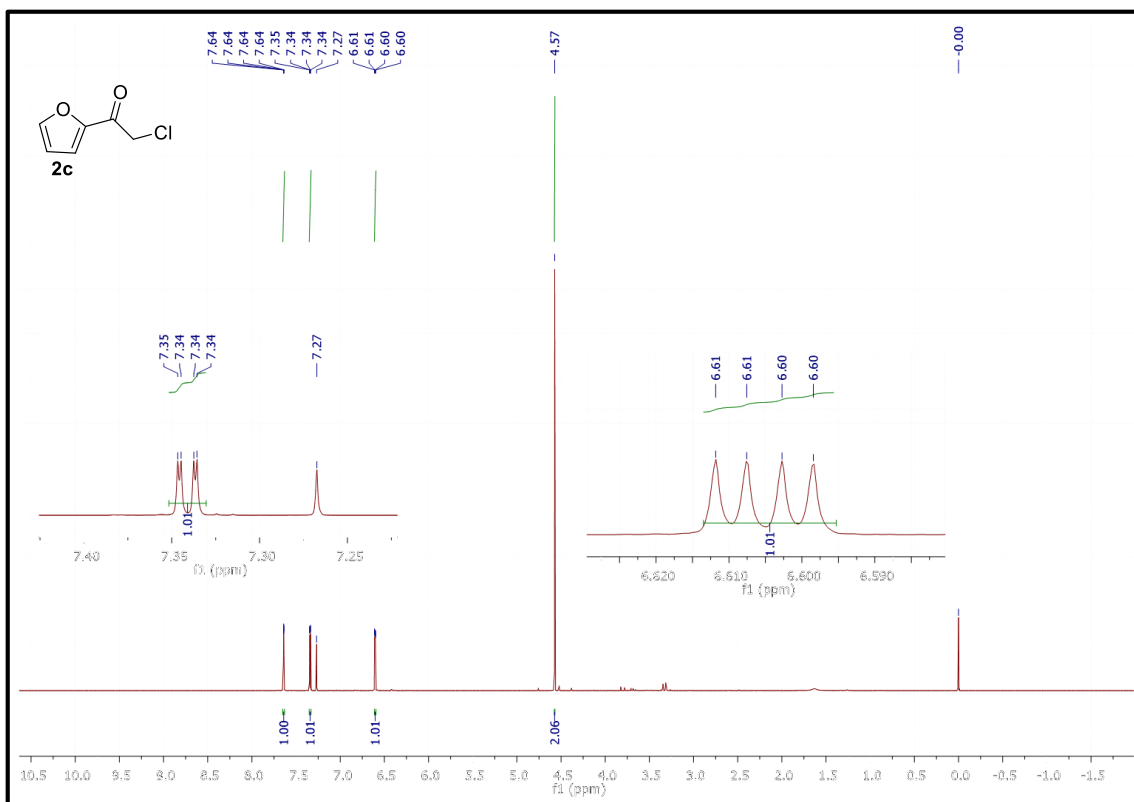
RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) do 2-cloro-1-(4-flúor-fenil)etan-1-ol (**3b**)



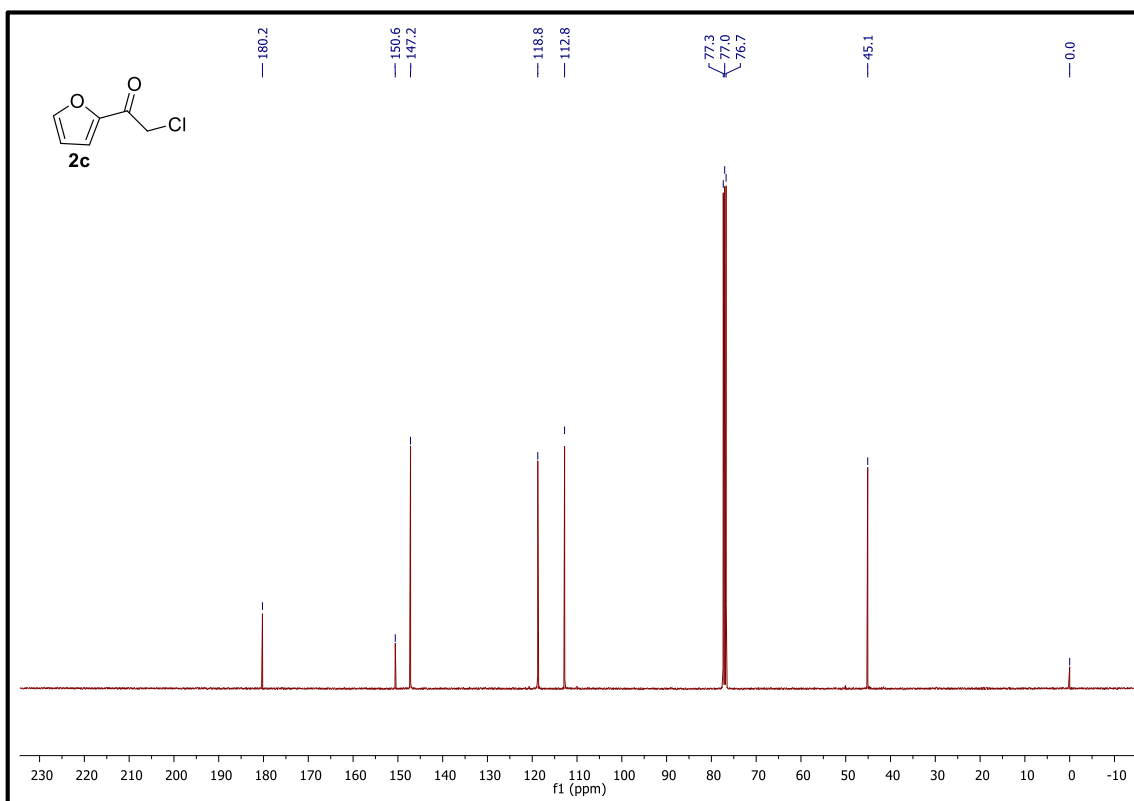
RMN ¹³C (125 MHz, CDCl₃) do 2-cloro-1-(4-fluór fenil)etan-1-ol (**3b**)



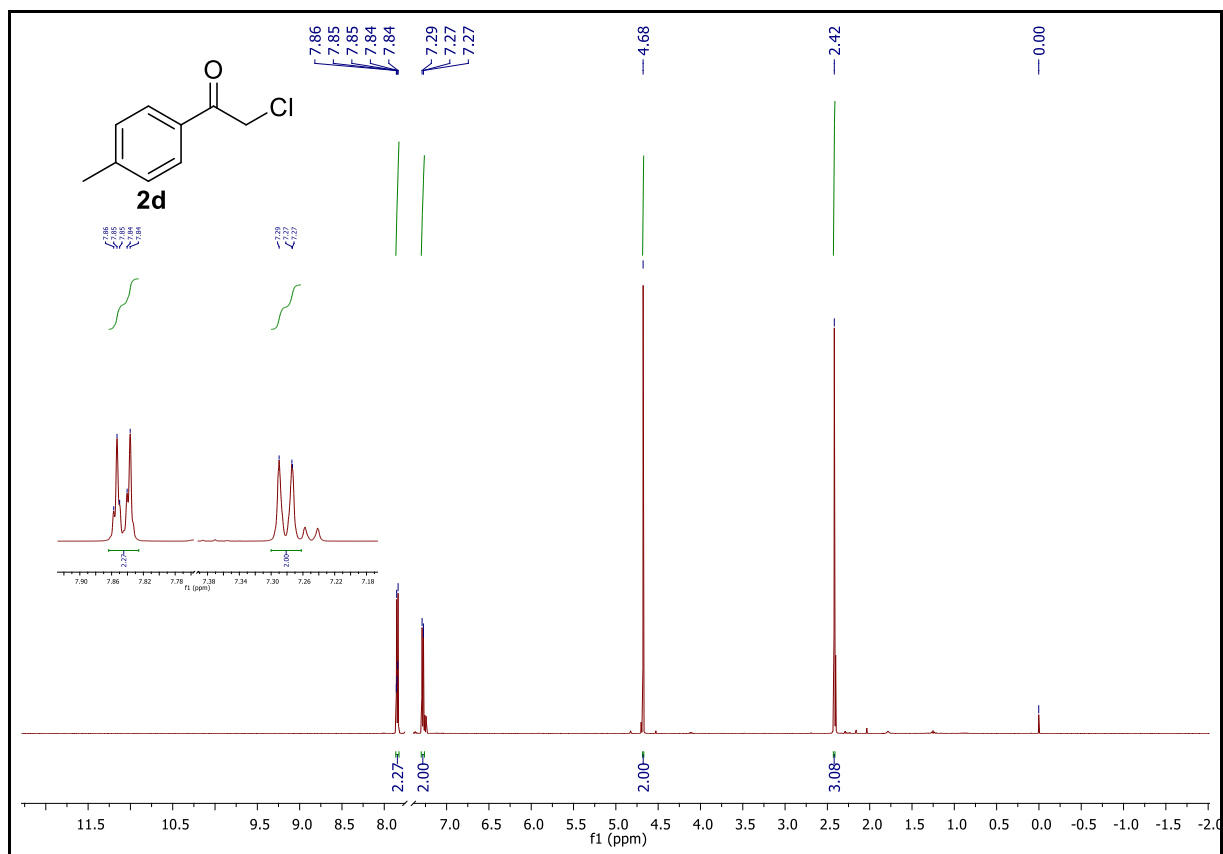
RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃) da 2-cloro-2-(furanil)etanona (**2c**)



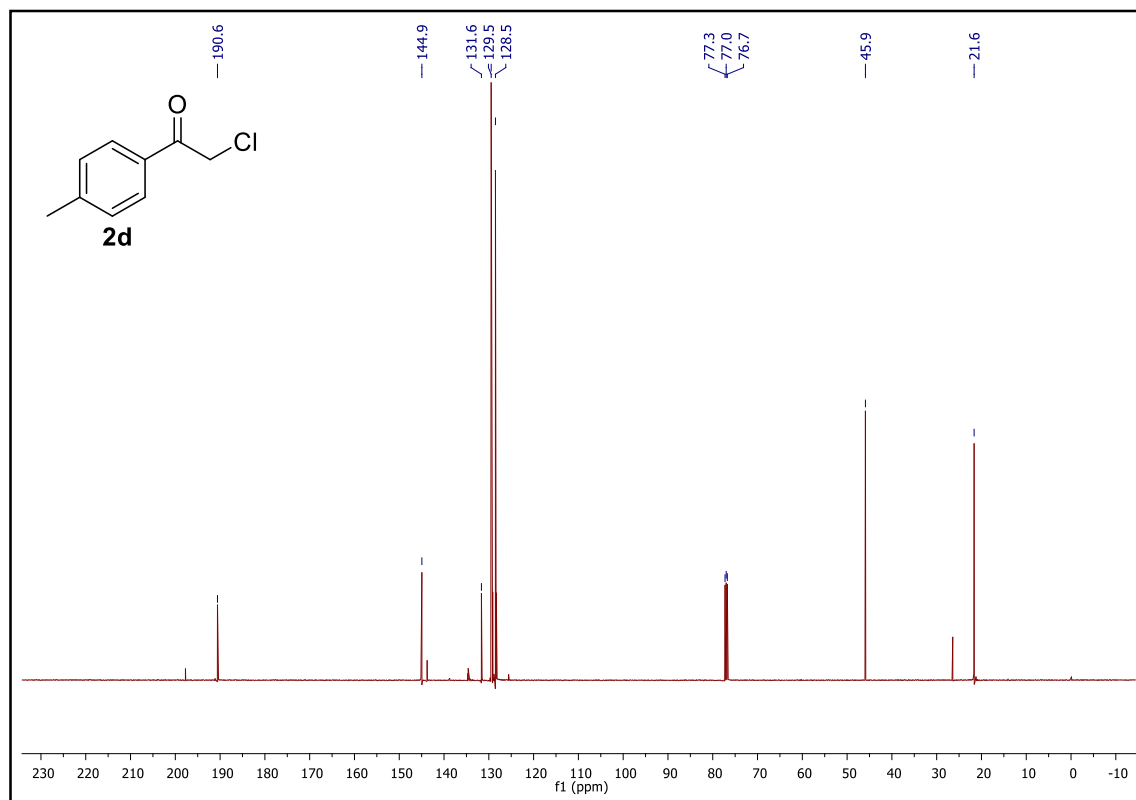
RMN ¹³C (500 MHz, CDCl₃) da da 2-cloro-2-(furanil)etanona (**2c**)



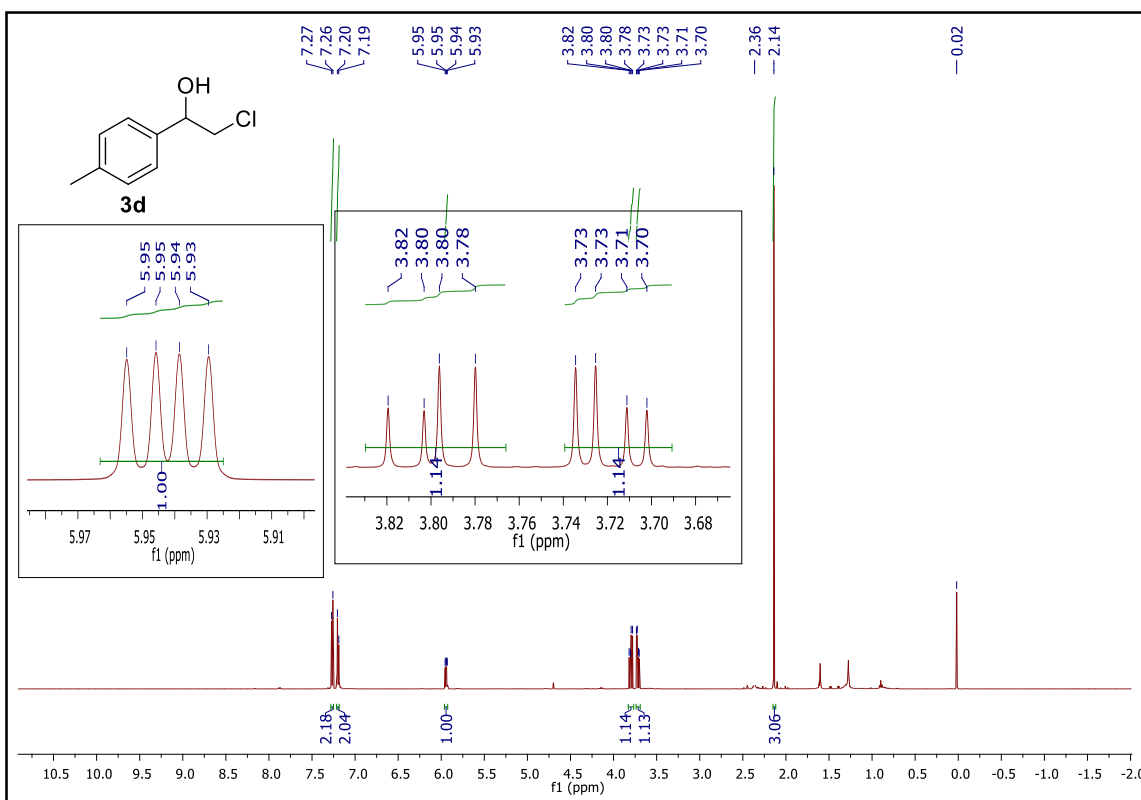
RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃) da 2-cloro-1-(*p*-toluil)etanona (**2d**)



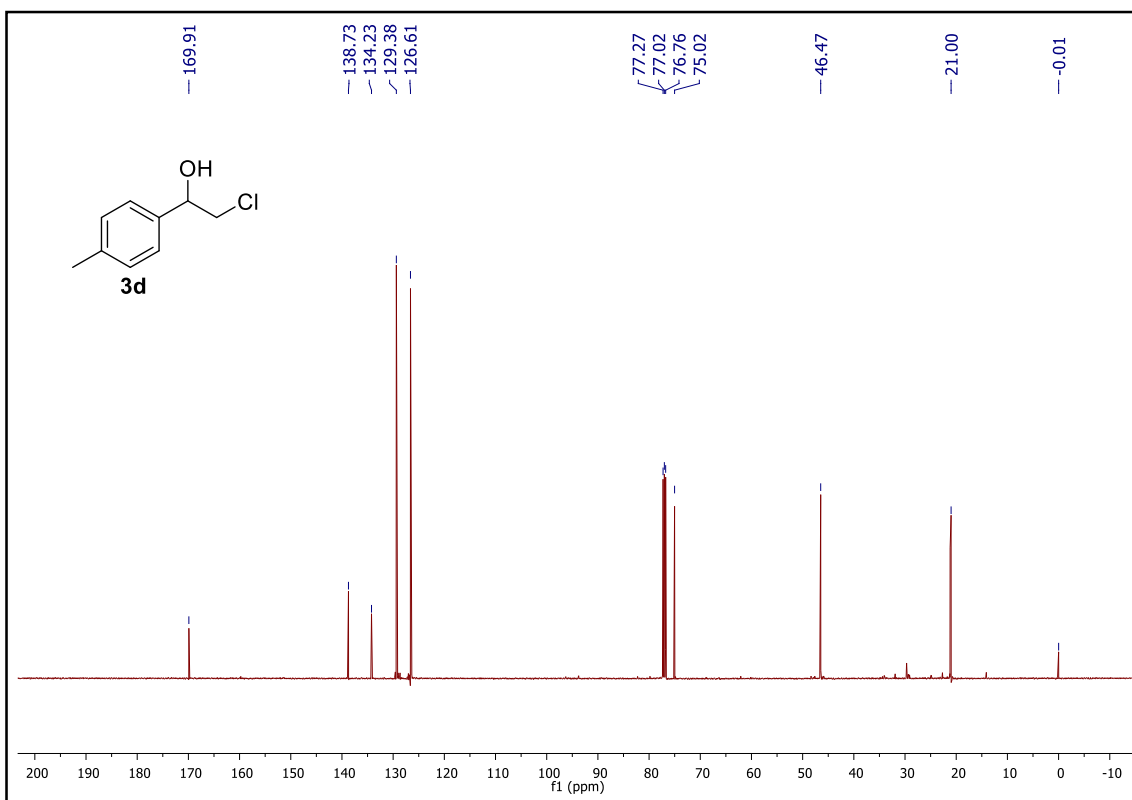
RMN ¹³C (125 MHz, CDCl₃) da 2-cloro-1-(*p*-toluil)etanona (**2d**)



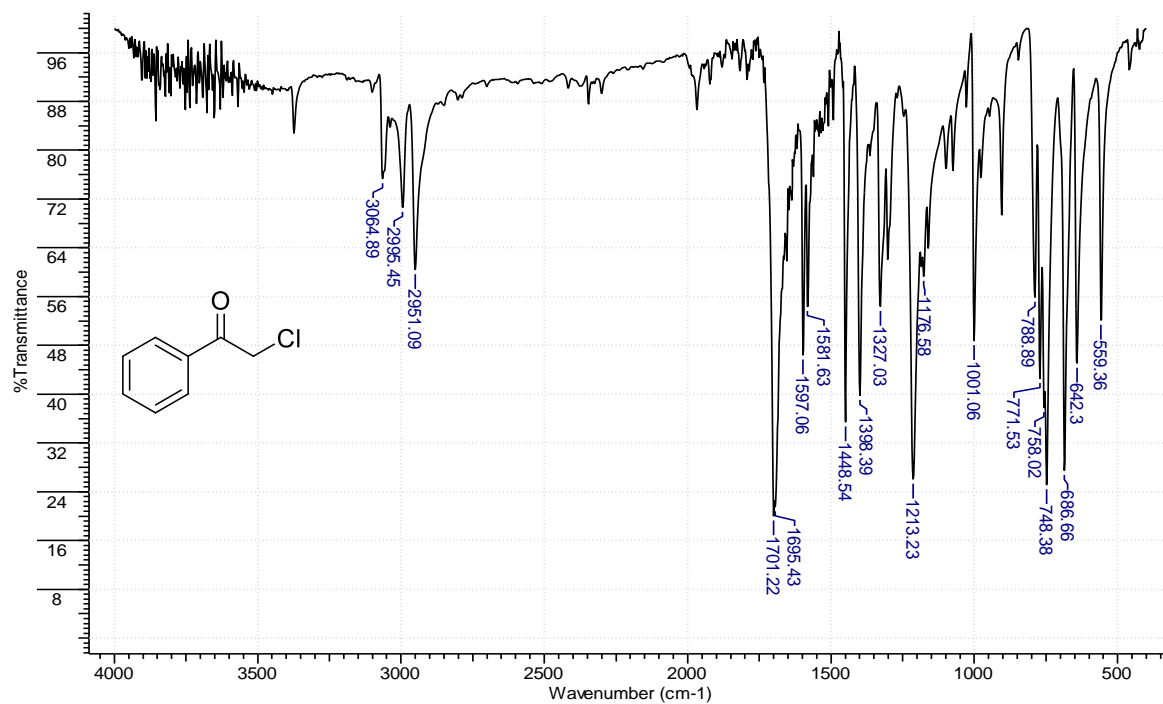
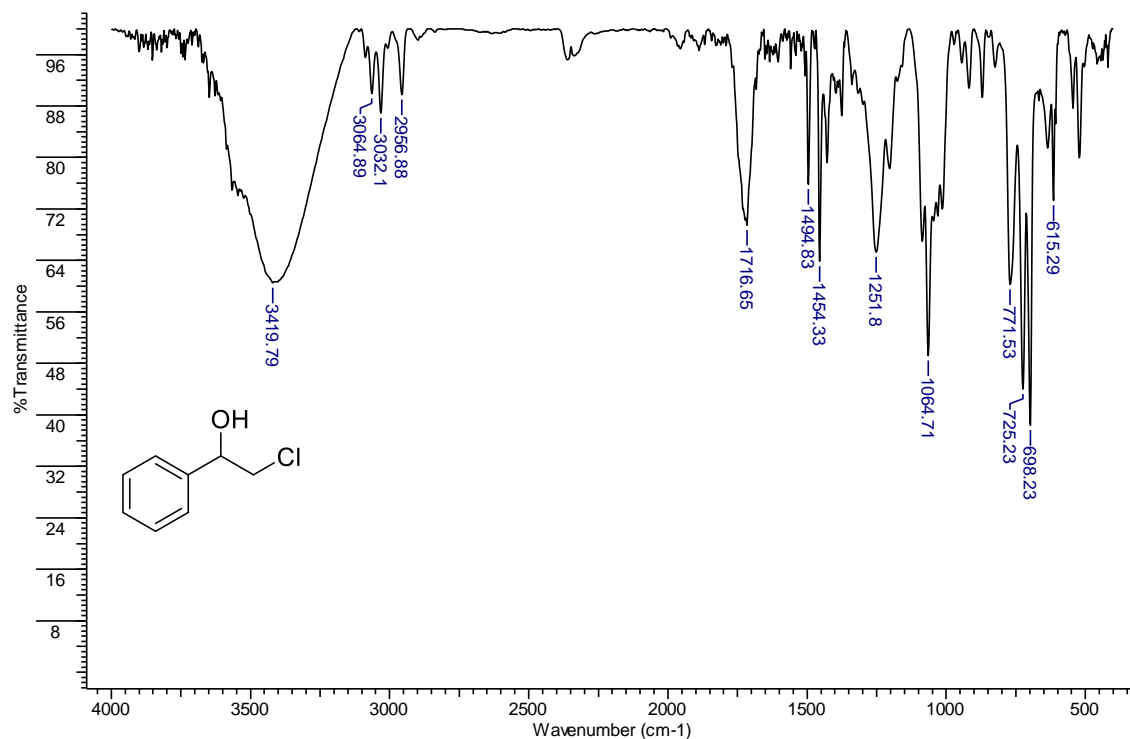
RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃) do 2-cloro-1-(*p*-toluil)etan-1-ol (**3d**)



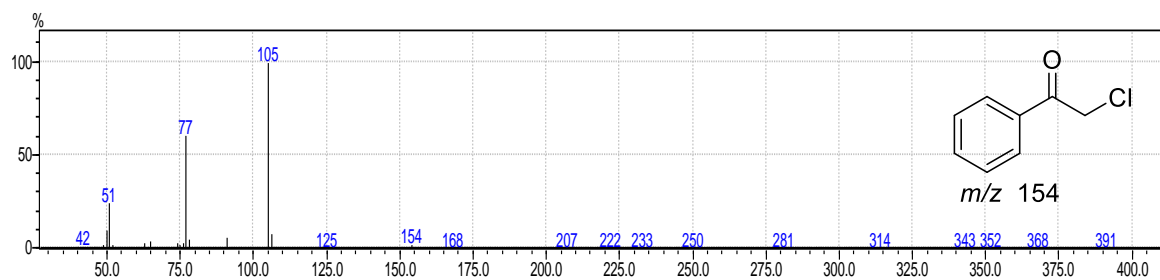
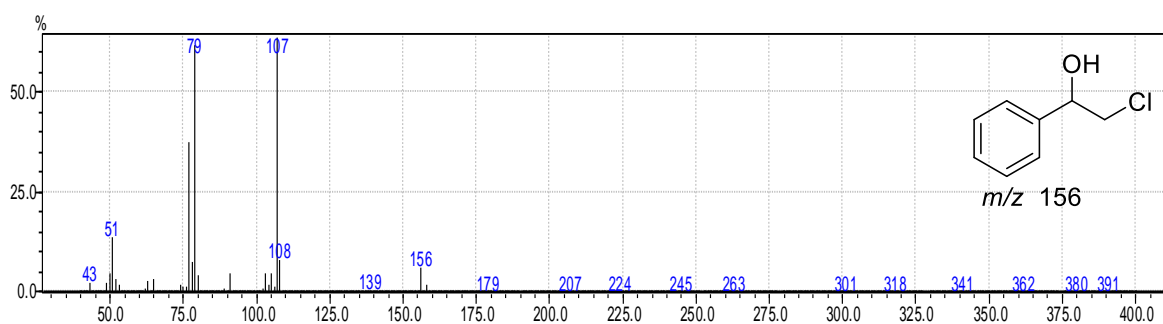
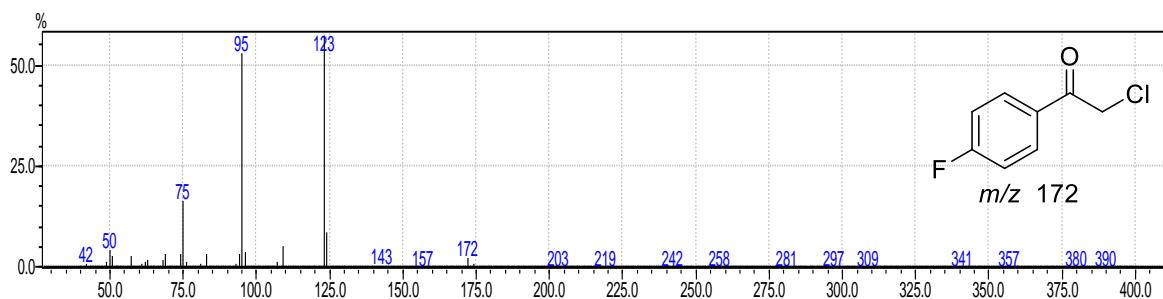
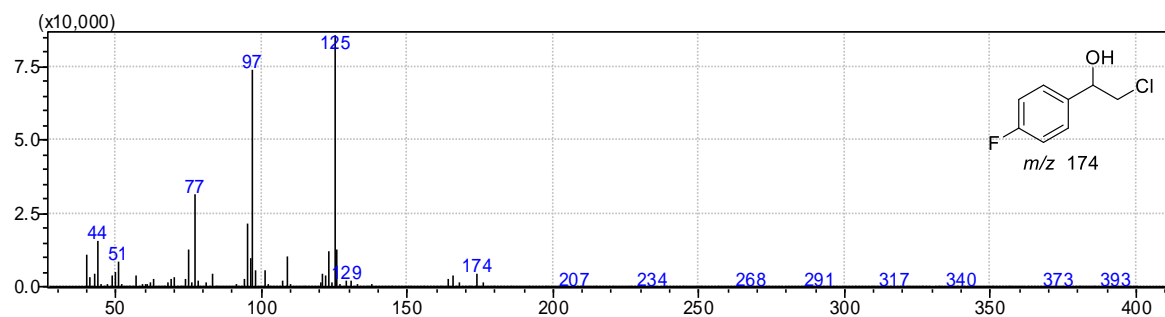
RMN ¹³C (125 MHz, CDCl₃) do 2-cloro-1-(*p*-toluyl)etan-1-ol (**3d**)

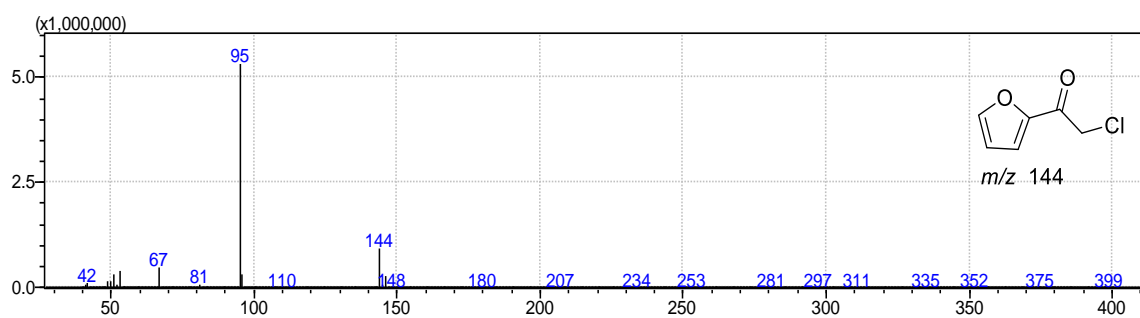


II – Espectros de Infravermelho

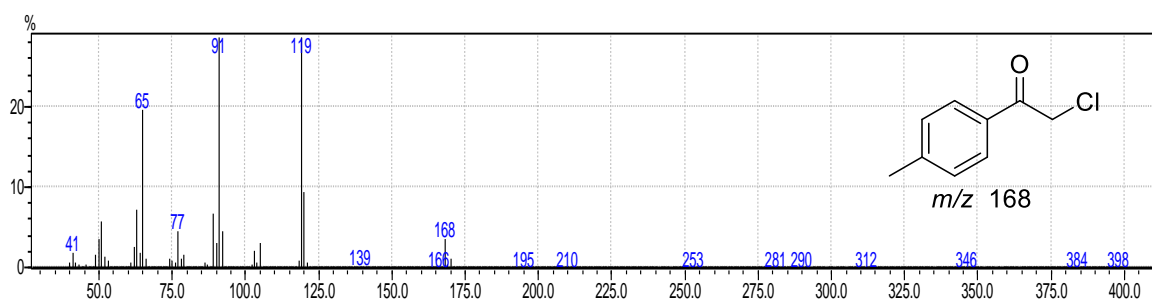
2-cloro-1-feniletanona (**2a**)2-cloro-1-feniletanol (**3a**)

III – Espectros de Massas

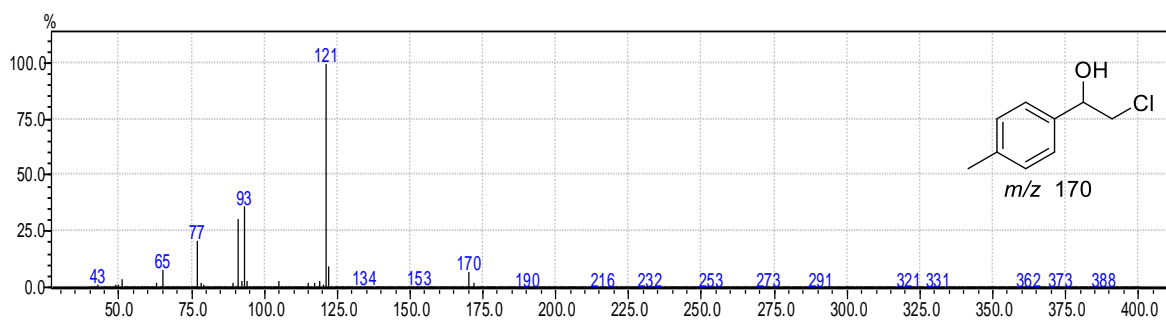
2-cloro-1-feniletanona (**2a**)2-cloro-1-feniletanol (**3a**)2-cloro-1-(4-flúor fenil)-etanona (**2b**)2-cloro-1-(4-flúor fenil)etan-1-ol (**3b**)2-cloro-2-(furanil)etanona (**2c**)



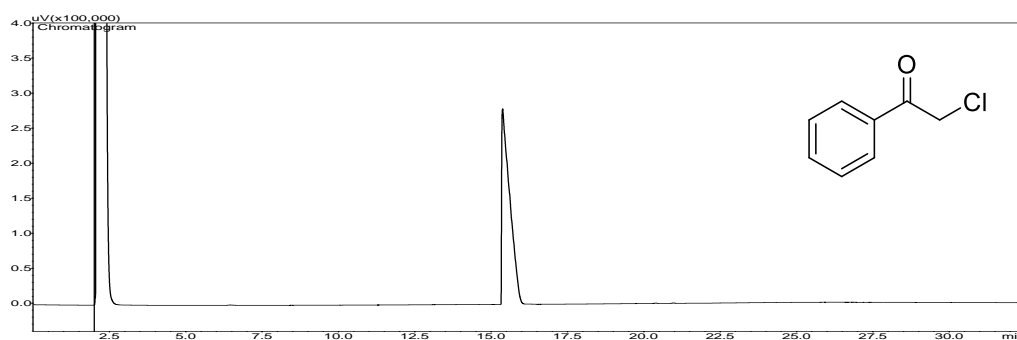
2-cloro-1-(*p*-toluil)etanona (**2d**)



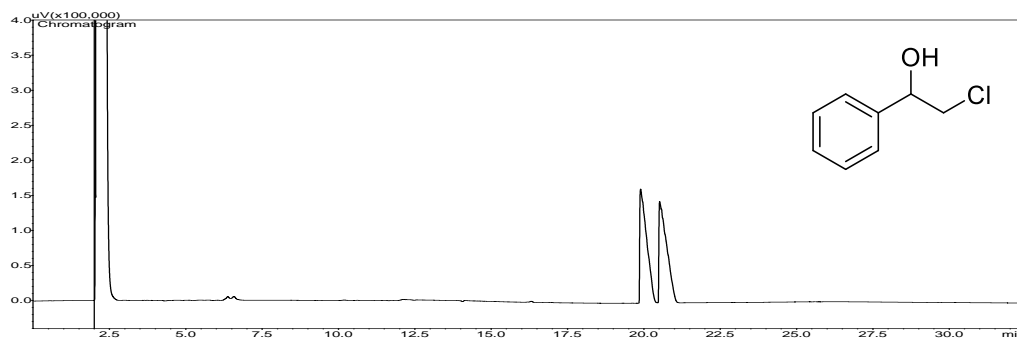
2-cloro-1-(*p*-toluil)etan-1-ol (**3d**)



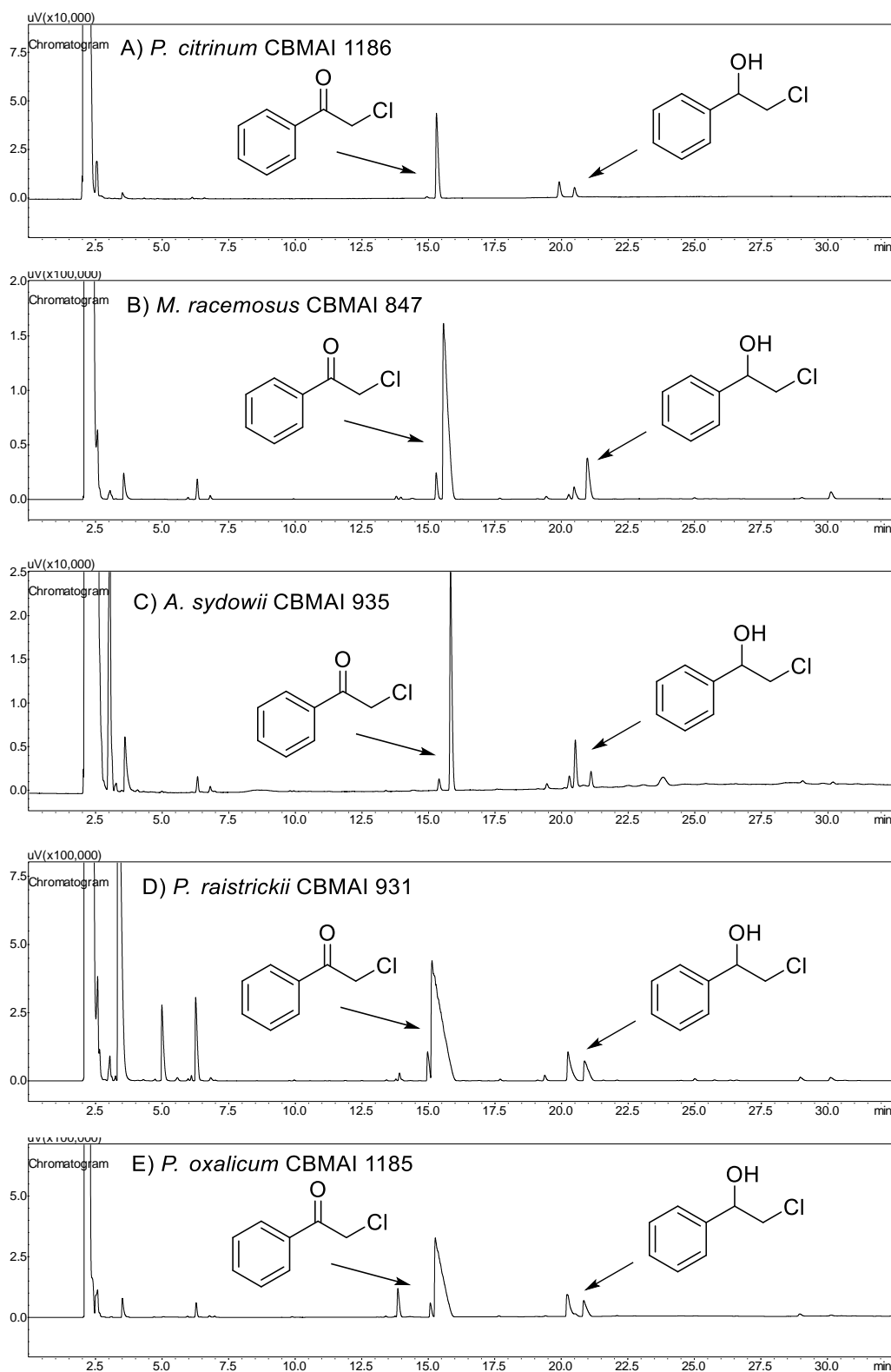
2-cloro-1-feniletanona (2a). Condições de análises em CG-FID: $T_i=120\text{ }^{\circ}\text{C}$, $T_f=165\text{ }^{\circ}\text{C}$ (8 min), $r=2\text{ }^{\circ}\text{C/min}$, $t_f=32,5\text{ min}$. Tempo de retenção **2a**= 15,8 min.



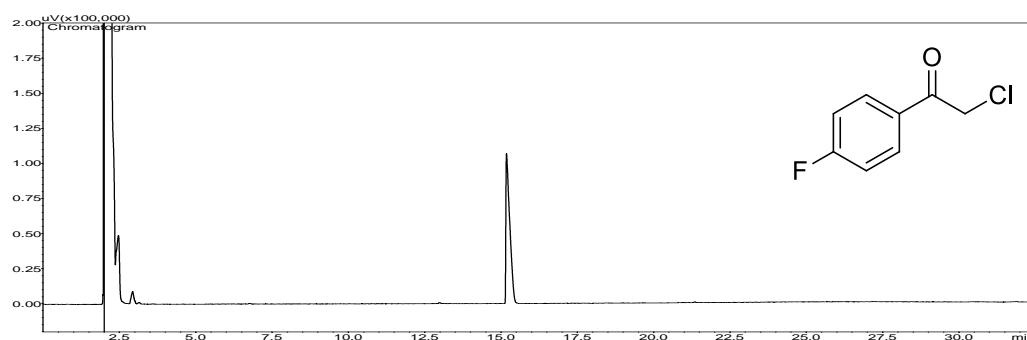
2-cloro-1-feniletanol (3a). Condições de análises em CG-FID: $T_i=120\text{ }^{\circ}\text{C}$, $T_f=165\text{ }^{\circ}\text{C}$ (8 min), $r=2\text{ }^{\circ}\text{C/min}$, $t_f=32,5\text{ min}$. Tempo de retenção (*S*)-**3a**= 20 min; (*R*)-**3a** = 20,5 min.



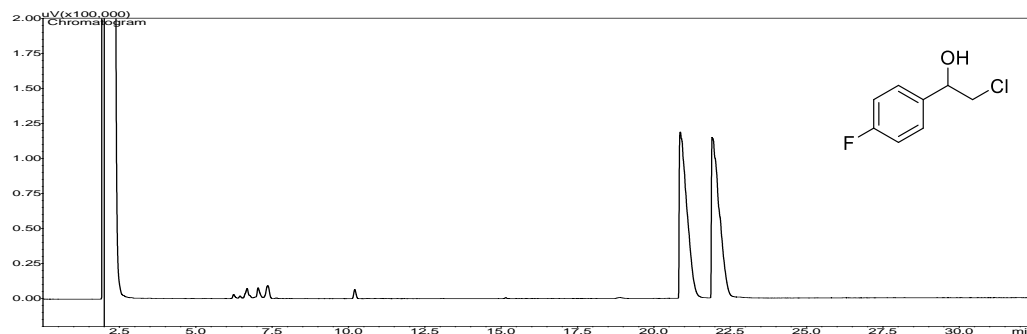
2-cloro-1-feniletanol (**3a**) – Reação com fungos marinhos A) *P. citrinum* CBMAI 1186, B) *Mucor racemosus* CBMAI 847, C) *Aspergillus sydowii* CBMAI 935, D) *Penicillium raistrickii* CBMAI 931; E) *Penicillium oxalicum* CBMAI 1185.



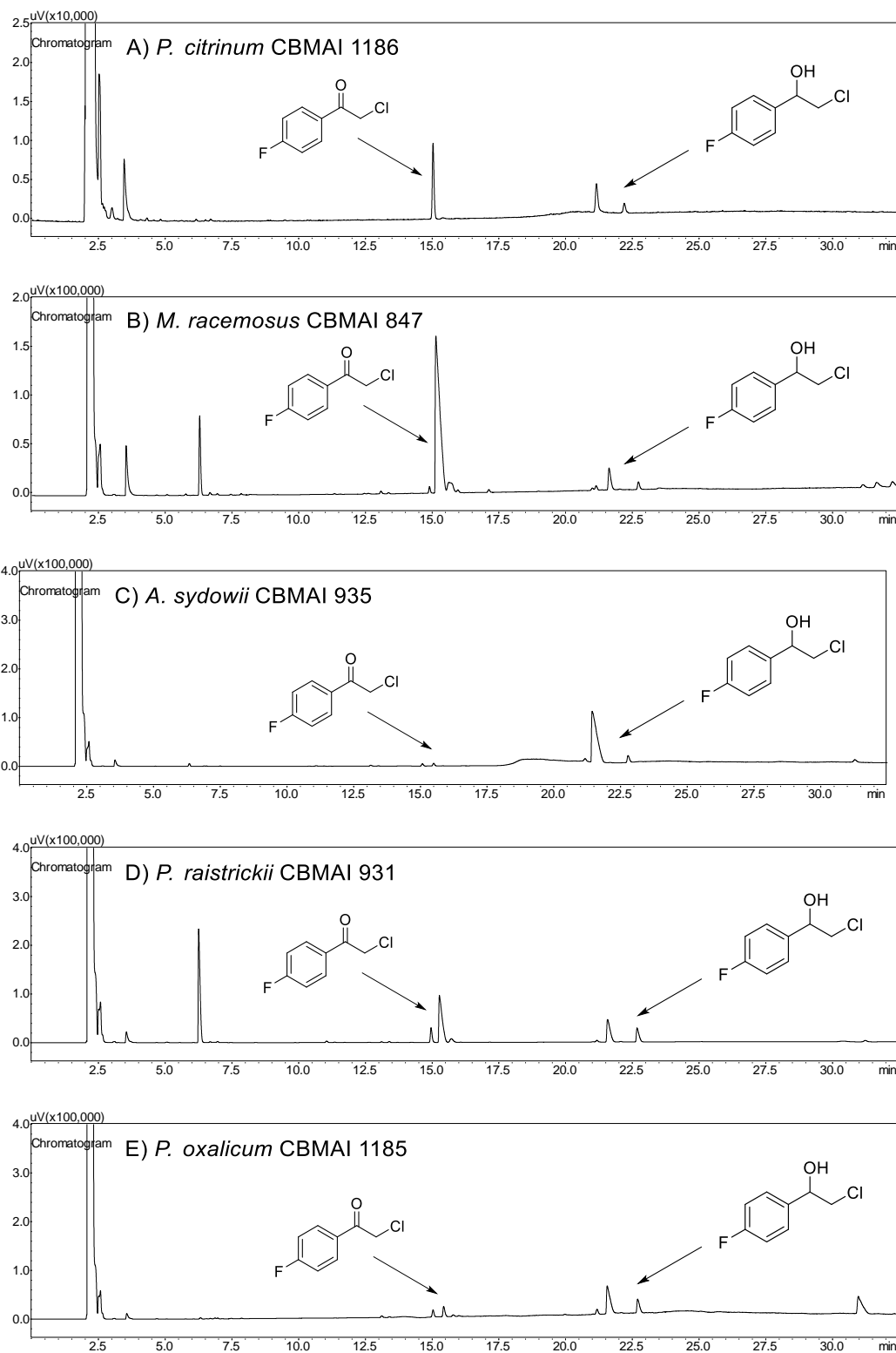
2-cloro-1-(4-flúor-fenil)-etanona (**2b**). Condições de análises em CG-FID: $T_i=120\text{ }^{\circ}\text{C}$, $T_f=165\text{ }^{\circ}\text{C}$ (8 min), $r=2\text{ }^{\circ}\text{C/min}$, $t_f=32,5\text{ min.}$ Tempo de retenção **2b**= 15,3 min.



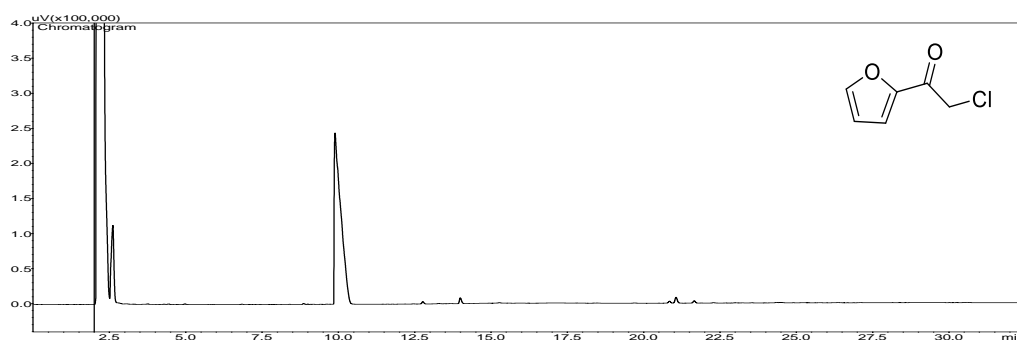
2-cloro-1-(4-flúor-fenil)etan-1-ol (**3b**). Condições de análises em CG-FID: $T_i=120\text{ }^{\circ}\text{C}$, $T_f=165\text{ }^{\circ}\text{C}$ (8 min), $r=2\text{ }^{\circ}\text{C/min}$, $t_f=32,5\text{ min.}$ Tempo de retenção (*S*)-**3b**= 21,7 min; (*R*)-**3b** = 22,4 min.



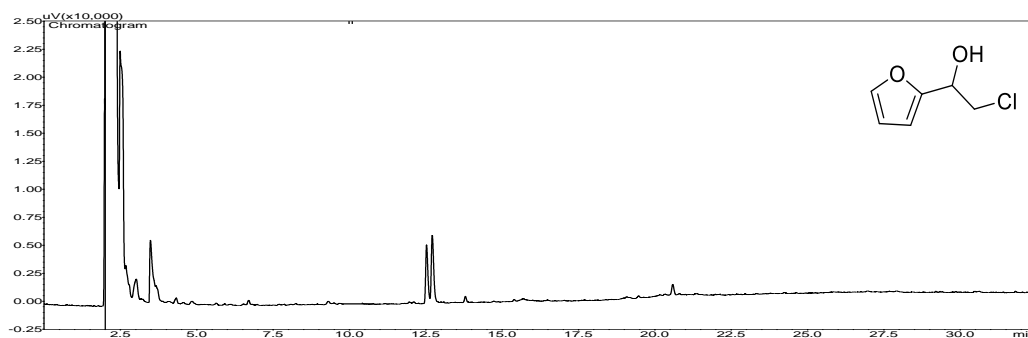
2-cloro-1-(4-flúor-fenil)etan-1-ol (**3b**) – Reação com fungos marinhos: A) *P. citrinum* CBMAI 1186, B) *Mucor racemosus* CBMAI 847, C) *Aspergillus sydowii* CBMAI 935, D) *Penicillium raistrickii* CBMAI 931; E) *Penicillium oxalicum* CBMAI 1185.



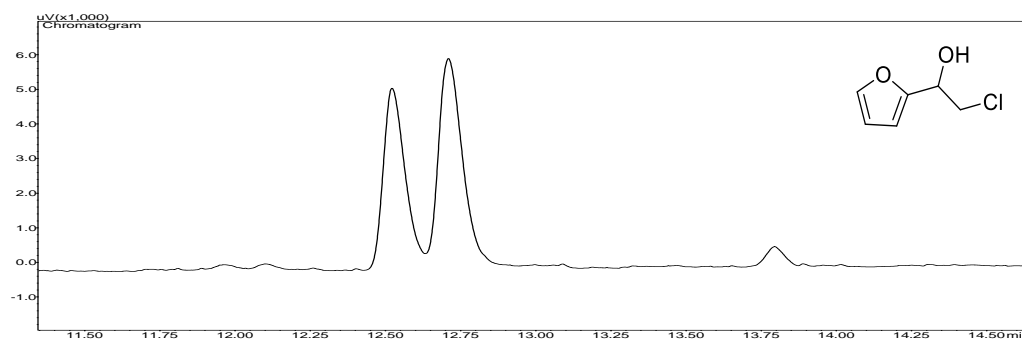
2-cloro-2-(furanil)etanona (**2c**). Condições de análises em CG-FID: $T_i=120\text{ }^{\circ}\text{C}$, $T_f=165\text{ }^{\circ}\text{C}$ (8 min), $r=2\text{ }^{\circ}\text{C/min}$, $t_f=32,5\text{ min}$. Tempo de retenção **2c**= 10 min.



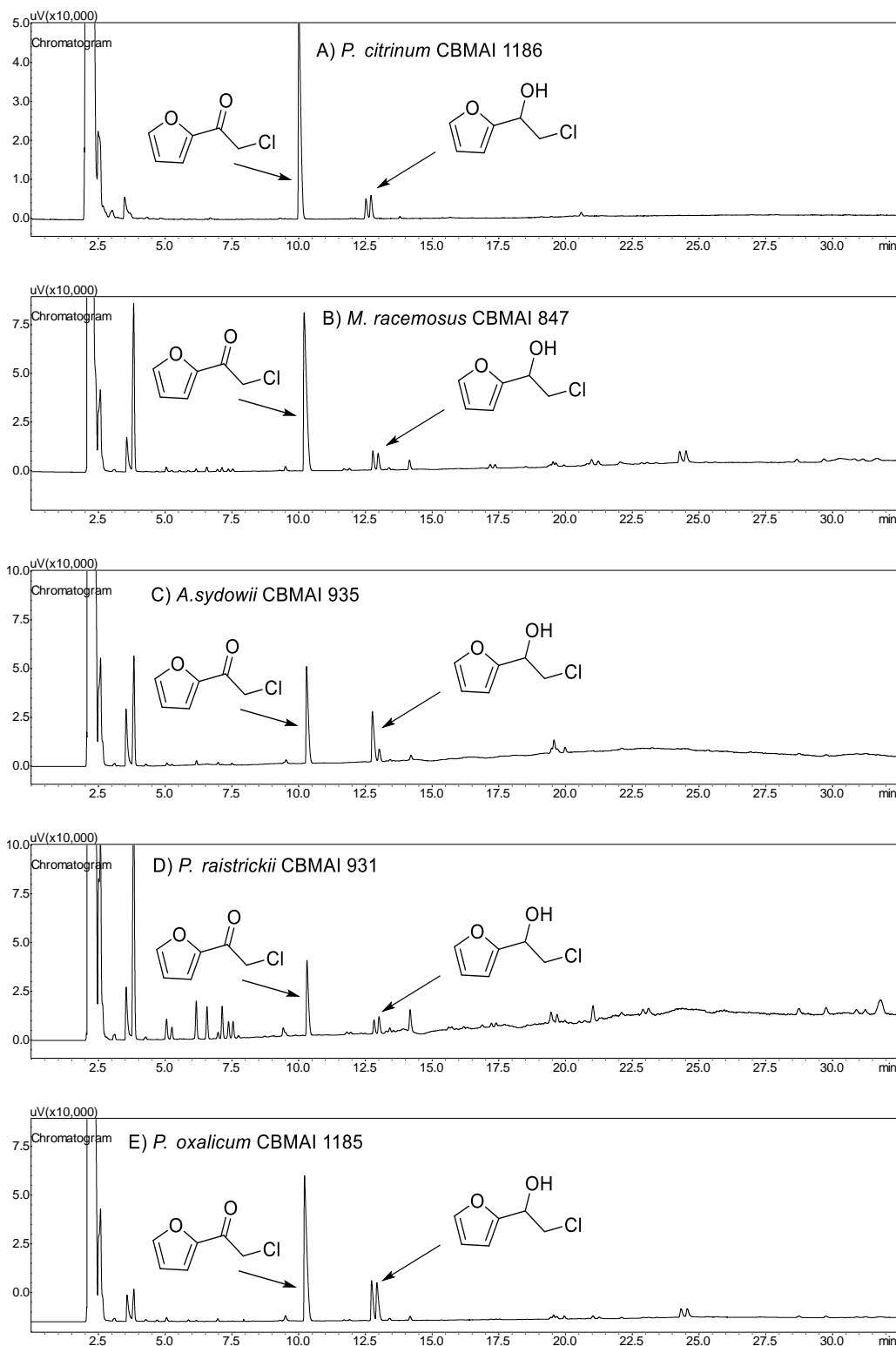
2-cloro-1-(furan-2-il)etan-1-ol (**3c**). Condições de análises em CG-FID: $T_i=120\text{ }^{\circ}\text{C}$, $T_f=165\text{ }^{\circ}\text{C}$ (8 min), $r=2\text{ }^{\circ}\text{C/min}$, $t_f=32,5\text{ min}$. Tempo de retenção (*S*)-**3c**= 12,5 min; (*R*)-**3c** = 12,7 min.



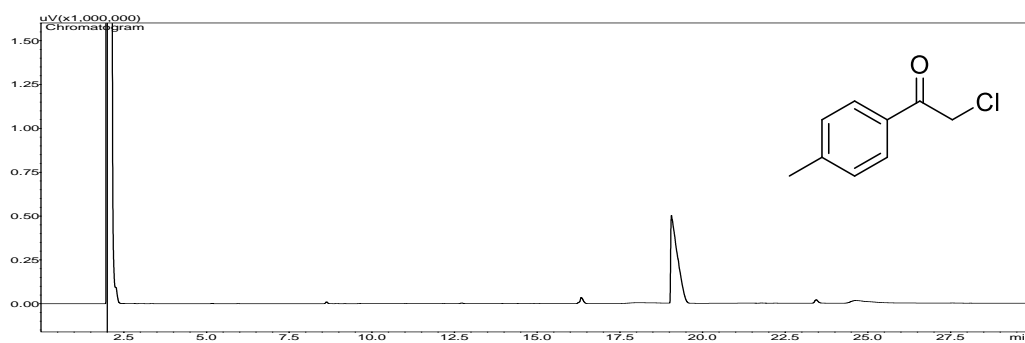
2-cloro-1-(furan-2-il)etan-1-ol (**3c**) ampliado:



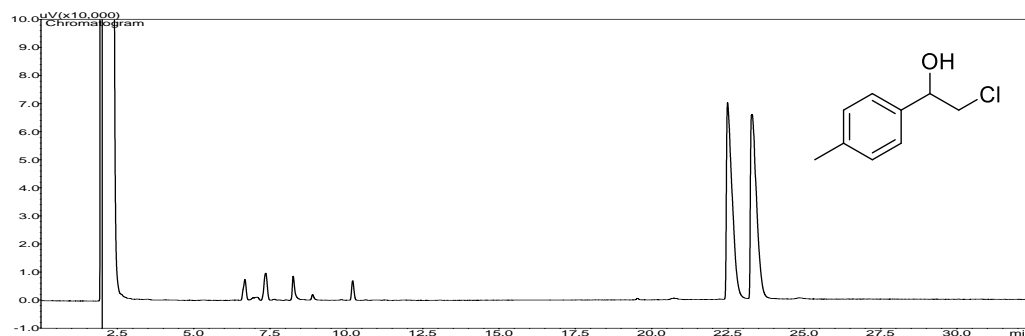
2-cloro-1-(furan-2-il)etan-1-ol (**3c**) – Reação com fungos marinhos: A) *P. citrinum* CBMAI 1186, B) *Mucor racemosus* CBMAI 847, C) *Aspergillus sydowii* CBMAI 935, D) *Penicillium raistrickii* CBMAI 931; E) *Penicillium oxalicum* CBMAI 1185.



2-cloro-1-(*p*-toluil)etanona (**2d**). Condições de análises em CG-FID: $T_i=120\text{ }^{\circ}\text{C}$, $T_f=165\text{ }^{\circ}\text{C}$ (8 min), $r=2\text{ }^{\circ}\text{C/min}$, $t_f=32,5\text{ min}$. Tempo de retenção (*R*)-**3a**= 19,3 min.



2-cloro-1-(*p*-toluil)etan-1-ol (**3d**). Condições de análises em CG-FID: $T_i=120\text{ }^{\circ}\text{C}$, $T_f=165\text{ }^{\circ}\text{C}$ (8 min), $r=2\text{ }^{\circ}\text{C/min}$, $t_f=32,5\text{ min}$. Tempo de retenção (*S*)-**3d**= 22,5 min; (*R*)-**3d** = 23,4 min.



2-cloro-1-(*p*-toluyl)etan-1-ol (**3d**) Reação com fungos marinhos: A) *P. citrinum* CBMAI 1186, B) *Mucor racemosus* CBMAI 847, C) *Aspergillus sydowii* CBMAI 935, D) *Penicillium raistrickii* CBMAI 931; E) *Penicillium oxalicum* CBMAI 1185.

