

Juana Goulart Stollmaier

**BIORREDUÇÃO QUIMIOSSELETIVA DE CHALCONAS
BIFENÍLICAS COM LEVEDURAS EM SISTEMA BIFÁSICO**

Dissertação submetido(a) ao Programa
de Pós-Graduação em Química da
Universidade Federal de Santa
Catarina para a obtenção do Grau de
Mestra em Química
Orientadora: Profa. Dra. Maria da
Graça Nascimento
Coorientador: Prof. Dr. Boris Juan
Carlos Ugarte Stambuk

Florianópolis
Fevereiro, 2018

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária
da UFSC.

Stollmaier, Juana Goulart
Biorredução Quimiosseletiva de Chalconas
Bifenílicas com Leveduras em Sistema Bifásico /
Juana Goulart Stollmaier ; orientadora, Maria da
Graça Nascimento, coorientador, Boris Juan Carlos
Ugarte Stambuk, 2018.
155 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de
Santa Catarina, Centro de Ciências Físicas e
Matemáticas, Programa de Pós-Graduação em Química,
Florianópolis, 2018.

Inclui referências.

1. Química. 2. Biocatálise. 3. Leveduras. 4.
Chalconas. I. Nascimento, Maria da Graça. II.
Stambuk, Boris Juan Carlos Ugarte. III.
Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de
Pós-Graduação em Química. IV. Título.

Juana Goulart Stollmaier

**BIORREDUÇÃO QUIMIOSSELETIVA DE CHALCONAS
BIFENÍLICAS COM LEVEDURAS EM SISTEMA BIFÁSICO**

Esta Dissertação foi julgada adequada para obtenção do Título de
“Mestra” e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-
Graduação em Química

Florianópolis, 5 de março de 2018.

Prof. Dr. Vanderlei Gageiro Machado
Coordenador do Curso

Banca Examinadora:

Profa. Dra. Maria da Graça
Nascimento
Orientadora
QMC - UFSC

Prof. Dr. Boris Juan Carlos
Ugarte Stambuk
Coorientador
BQA - UFSC

Profa. Dra. Patrícia Bulegon
Brondani
QMC- BNU – UFSC

Prof. Dr. Ricardo Ferreira
Affeldt
QMC - UFSC

Prof. Dr. Miguel Soriano Balparda Caro
QMC - UFSC

AGRADECIMENTOS

Esta dissertação de mestrado só chegou a sua forma final graças à ajuda de vários indivíduos, os quais possuo eterna gratidão.

À minha família, pelo amor, apoio e incentivo que nunca faltou.

À Profa. Maria da Graça Nascimento, pela excepcional orientação, amizade e paciência com as minhas teimosias.

Ao Prof. Boris U. Stambuk, pela orientação e confiança depositada.

Aos colegas do Laboratório de Biocatálise, por sempre me fazerem companhia na bancada de trabalho e no café da salinha.

Aos meus amigos do corredor e da “pontezinha”, por terem sempre me apoiado nos momentos mais difíceis e estarem sempre disponíveis para tomar uma cerveja no fim do dia.

Ao grupo Gaming Nights™, por ser o grupo mais diverso e unido de amigos que já tive.

Ao Octávio, meu parceiro em tempo integral.

Aos professores do Depto. de Química, que contribuíram na minha formação como química e pesquisadora.

Ao M. Eduardo Zanella, por acordar cedo para me ajudar no cultivo das leveduras.

Ao Prof. Giovanni F. Caramori, pelos MEPs.

À equipe da Central de Análises, em especial aos funcionários dos equipamentos de RMN, Eliane e Glauber.

À UFSC, pela infraestrutura.

À CAPES, CNPq e INCT-Catálise, pelo apoio financeiro

“I have a friend who's an artist and he's sometimes taken a view which I don't agree with very well. He'll hold up a flower and say, "look how beautiful it is," and I'll agree, I think. And he says, "you see, I as an artist can see how beautiful this is, but you as a scientist, oh, take this all apart and it becomes a dull thing." And I think he's kind of nutty.

First of all, the beauty that he sees is available to other people and to me, too, I believe, although I might not be quite as refined aesthetically as he is. But I can appreciate the beauty of a flower.

At the same time, I see much more about the flower that he sees. I could imagine the cells in there, the complicated actions inside which also have a beauty. I mean, it's not just beauty at this dimension of one centimeter: there is also beauty at a smaller dimension, the inner structure... also the processes.

The fact that the colors in the flower are evolved in order to attract insects to pollinate it is interesting - it means that insects can see the color.

It adds a question - does this aesthetic sense also exist in the lower forms that are... why is it aesthetic, all kinds of interesting questions which a science knowledge only adds to the excitement and mystery and the awe of a flower.

It only adds. I don't understand how it subtracts.”

(Dr. Richard Feynman, 1981)

RESUMO

Este trabalho apresenta a síntese de uma série de chalconas bifênlicas (**26-38**) através de reações de condensação aldólica catalisada por base, bem como a utilização destes compostos carbonílicos α,β -insaturados como substratos nas reações de biorredução quimiosseletiva mediadas pelas leveduras *Saccharomyces cerevisiae* (fermento de pão comercial, FP, e linhagens industriais CAT-1 e PE-2) e sete cepas de leveduras selvagens, em sistema bifásico. As chalconas bifênlicas foram obtidas com bons rendimentos (40-98%), e foram caracterizadas por técnicas espectroscópicas de RMN de ^1H , de ^{13}C , IV e ponto de fusão. Estes, foram reduzidos com NaBH_4 para a obtenção dos álcoois racêmicos, que foram utilizados como padrões espectroscópicos para avaliar a quimiosseletividade da biorredução. A biotransformação destes compostos catalisada pela FP foi quimiosseletiva, formando apenas a correspondente cetona saturada. Utilizando o FP na reação de biorredução da chalcona **26** (reação modelo), foram avaliados diversos parâmetros reacionais tais como o sistema biocatalítico, solvente orgânico, pH, influência de aditivos, imobilização em alginato de cálcio, massa de substrato, massa de levedura, volumes das fases aquosa e orgânica e tempo reacional. Avaliou-se também o efeito de grupos substituintes do anel C das chalconas **26-38**. As maiores conversões em produto **26r**, foram obtidas nas reações mediadas por FP em sistema bifásico, com agitação magnética, na faixa de 30-35 °C e na faixa de pH de 5,5-6,5 (94%). Para a CAT-1 e PE-2, os valores de conversão em **26r** foram de 61-79%. O *n*-hexano ($\log P = 3,2$) foi o solvente mais adequado e a razão entre o volume de fase orgânica e fase aquosa foi importante para manter as atividades catalíticas das enzimas. Os efeitos dos substituintes do anel C das chalconas bifênlicas **28-38** foram, em geral, grandes e foi observada a correlação entre a posição do substituinte e a natureza dos grupos doadores e retiradores de elétrons. Usando o sistema bifásico otimizado, a chalcona bifênlica **26** foi submetida a reação com as demais leveduras selvagens, onde houve uma pequena formação do produto **26r** em 8 h de reação (máx. 8%). Portanto, nestas condições, as leveduras selvagens não apresentaram um potencial para serem utilizadas como biocatalisadores da reação de interesse. Ressalta-se que todas as reações foram realizadas em condições brandas, e em geral foram obtidos bons resultados de conversão e seletividade.

Palavras-chave: Biocatálise. Leveduras. Chalconas.

ABSTRACT

This work presents the synthesis of a series of biphenyl chalcones (**26-38**) through base-catalyzed aldol condensation reactions, as well as the use of α , β -unsaturated carbonyl compounds as substrates in the chemoselective bioreduction reactions mediated by yeast *Saccharomyces cerevisiae* (Baker's yeast, BY, and industrial strains CAT-1 and PE-2) and seven wild-type yeast strains, in a biphasic system. The biphenyl chalcones were obtained in good yields (40-98%), and were characterized by ^1H -, ^{13}C -NMR, IR spectroscopy and melting point. The compounds were reduced with NaBH_4 to obtain the racemic alcohols, which were used as spectroscopic standards to evaluate the chemoselectivity of the bioreduction. The biotransformation of these compounds catalyzed by BY was chemoselective, forming only the corresponding saturated ketone. Using BY in the bioreduction reaction of chalcone **26** (model reaction), several reaction parameters were evaluated, such as the biocatalytic system, organic solvent, pH, influence of additives, immobilization in calcium alginate, substrate mass, yeast mass, aqueous and organic ration and reaction time. The effect of substituent groups in the C-ring of chalcones **26-38** was also evaluated. The highest conversions values for product **26r** were obtained in reactions mediated by BY in a biphasic system with magnetic stirring, in the temperature range of 30-35 °C and in the pH range of 5.5-6.5 (94%). For CAT-1 and PE-2, the conversion values for **26r** were 61-79%. *n*-hexane (log P = 3.2) was the most suitable solvent and the ratio of organic phase volume to aqueous phase was important to maintain the catalytic activities of the enzymes. The effects of the substituents in the C-ring of the biphenyl chalcones **28-38** were generally large and a correlation was observed between the position of the substituent and the nature of the donor and withdrawing electron groups. Using the optimized biphasic system, the biphenyl chalcone **26** were reacted with the wild yeasts strains, where there was a small formation of product **26r** in 8 h of reaction (max 8%). Therefore, under these conditions, wild-type yeast strains did not have potential to be used as biocatalysts in the reaction of interest. It is noteworthy that all reactions were carried out under mild conditions, and in general good conversion and selectivity results were obtained.

Keywords: Biocatalysis. Yeast. Chalcones.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Variação da energia livre de Gibbs vs. coordenada da reação para uma reação catalisada e não catalisada (adaptada da referência 6).	27
Figura 2. Estrutura das proteínas (adaptado da referência 11).	28
Figura 3. Representação esquemática dos modelos de mecanismo enzimáticos. Adaptado da referência 12.....	29
Figura 4. Resolução cinética de um álcool racêmico mediado por lipase <i>Candida antarctica</i> (Novozyme 435) (adaptado da referência 14).	30
Figura 5. Complexo holoenzima (adaptado da referência 18).	32
Figura 6. Biorredução assimétrica de 3-piridil enona (2) utilizando FP (adaptado da referência 20).	34
Figura 7. Processo simplificado da fermentação da glicose em etanol.	35
Figura 8. Estruturas químicas do L-sorbitol e L-sorbose.	35
Figura 9. Parte das etapas de glicólise da levedura <i>S. cerevisiae</i> . ²⁷	37
Figura 10. Redução de dicetonas utilizando fermento de pão (adaptado da referência 26).....	37
Figura 11. Redução de α -halocetonas utilizando fermento de pão (adaptado da referência 27).	38
Figura 12. Reação de biorredução de <i>p</i> -acetiltolueno (10) na presença de FP imobilizado em alginato de cálcio (adaptado da referência 29).....	38
Figura 13. Equação da reação e exemplo ilustrativo do uso do sistema bifásico em uma reação de resolução cinética do 1-feniletanol (12) (adaptado da referência 1).	41
Figura 14. Diagrama de Venn para utilização de solventes em sistemas bifásicos (adaptado da referência 1).	42
Figura 15. Estrutura química do [BMIm]BF ₄ , um líquido iônico.	43
Figura 16. Estruturas químicas da progesterona (16) e testosterona (17), hormônios sexuais com grupos cetonae C=C.....	46
Figura 17. Possíveis produtos de redução de compostos carbonílicos α,β -insaturados (adaptado da referência 40).	47
Figura 18. Estruturas químicas da chalcona (22) e diversos derivados (adaptado da referência 41). * = carbono pró-quiral.	48
Figura 19. Equação da reação de biorredução da chalcona bifenólica com FP.	49
Figura 20. Rota sintética para a preparação das chalconas 26-38 através da condensação aldólica com 39 e 40a-m . $i = T_{amb}$, $t = 24$ h, KOH/EtOH/Agitação magnética.	56
Figura 21. Equação da reação de redução das chalconas 26-38 com NaBH ₄ . $i = T_{amb}$, $t = 6$ h, EtOH/Agitação magnética.	66

Figura 22. <i>Slant</i> usado para o cultivo de microorganismos	76
Figura 23. Tubo Falcon com a biomassa de levedura. Esquerda: levedura centrifugada ainda no meio de YPD. Direita: levedura lavada com água destilada e centrifugada.....	77
Figura 24. Espectro de RMN de ^1H do composto 26r . (CDCl_3 , 400 MHz)	78
Figura 25. Comparação entre os espectros de RMN de ^1H dos compostos 35 , 35a e 35r . (400 MHz, CDCl_3).....	80
Figura 26. Espectro de IV do composto 26a . (pastilha de KBr)	81
Figura 27. Equação da reação de biorredução da chalcona 39 para a dihidrochalcona 40 (adaptado da referência 21).	82
Figura 28. Valores de conversão para 26r usando o sistema monofásico, na presença de diferentes cossolventes, açúcares e temperaturas. Condições: 26 (50 mg), FP (2 g), H_2O destilada (30 mL), co-solvente (3 mL), açúcar (3 g), $t = 30\text{-}35^\circ\text{C}$, $t = 96\text{ h}$, 300 rpm.	83
Figura 29. Variação nos valores de conversão para 26r , usando o sistema bifásico, em função da fase aquosa, pH, tempo e temperatura. Condições: 26 (50 mg), FP (2 g), água destilada ou tampão (30 mL), <i>n</i> -hexano (30 mL), CH_2Cl_2 (3 mL), glicose (3 g), $t = 30\text{-}35^\circ\text{C}$, $t = 24\text{-}48\text{ h}$, 300 rpm.	85
Figura 30. Variação nos valores de conversão para 26r , usando sistema bifásico com DMSO como cossolvente, em função do pH, tempo e temperatura. Condições: 26 (50 mg), FP (2 g), tampão $\text{K}_2\text{HPO}_4/\text{ácido cítrico}$ (30 mL), <i>n</i> -hexano (30 mL), DMSO (3 mL), glicose (3 g), $t = 30\text{-}35^\circ\text{C}$, $t = 8/24/48\text{h}$, 300 rpm.	87
Figura 31. Variação nos valores de conversão para 26r , usando o sistema bifásico, em função dos açúcares. Condições: 26 (50 mg), FP (2 g), tampão $\text{K}_2\text{HPO}_4/\text{ácido cítrico}$ (30 mL, pH = 6,5), <i>n</i> -hexano (30 mL), DMSO (3 mL), açúcares (3 g), $t = 35^\circ\text{C}$, $t = 48\text{ h}$, 300 rpm.	88
Figura 32. Variação nos valores de conversão para 26r , usando o sistema bifásico, em função dos cossolventes e dos volumes. Condições: 26 (50 mg), FP (2 g), tampão $\text{K}_2\text{HPO}_4/\text{ácido cítrico}$ (30 mL, pH = 6,5), <i>n</i> -hexano (30 mL), cossolvente (1,5 – 4,5 mL), glicose (3 g), $t = 35^\circ\text{C}$, $t = 8\text{ h}$, 300 rpm.	89
Figura 33. Variação nos valores de conversão para 26r , usando o sistema bifásico, em função da massa do substrato 26 . Condições: 26 (50 – 150 mg), FP (2 g), tampão $\text{K}_2\text{HPO}_4/\text{ácido cítrico}$ (30 mL, pH = 6,5), <i>n</i> -hexano (30 mL), DMSO (4,5 mL), glicose (3 g), $t = 35^\circ\text{C}$, $t = 8\text{ h}$, 300 rpm...	93
Figura 34. Variação nos valores de conversão para 26r , usando o sistema bifásico, em função do volume de <i>n</i> -hexano. Condições: 26 (50 mg), FP	

(2 g), tampão K ₂ HPO ₄ /ácido cítrico (30 mL, pH = 6,5), <i>n</i> -hexano (10 – 25 mL), DMSO (4,5 mL), glicose (3 g), t = 35 °C, t = 8 h, 300 rpm. ...	94
Figura 35. Variação nos valores de conversão para 26r , usando o sistema bifásico, em função do volume da fase aquosa. Condições: 26 (50 mg), FP (2 g), tampão K ₂ HPO ₄ /ácido cítrico (10 – 25 mL, pH = 6,5), <i>n</i> -hexano (15 mL), DMSO (4,5 mL), glicose (3 g), t = 35 °C, t = 8 h, 300 rpm. ...	95
Figura 36. Variação nos valores de conversão para 26r , usando o sistema bifásico, em função tempo. Condições: 26 (50 mg), FP (1 g), tampão K ₂ HPO ₄ /ácido cítrico (15 mL, pH = 6,5), <i>n</i> -hexano (15 mL), DMSO (2,25 mL), glicose (1,5 g), t = 35 °C, t = 2 – 24 h, 300 rpm.	97
Figura 37. MEP da chalcona 26 e sua correspondente biorreduzida 26r	100
Figura 38. MEP da chalcona 29 e sua correspondente biorreduzida 29r	100
Figura 39. MEP da chalcona 35 e sua correspondente biorreduzida 35r	100
Figura 40. MEP da chalcona 38 e sua correspondente biorreduzida 38r	101
Figura 41. Leveduras secas	102
Figura 42. Espectro de IV do composto 26 (KBr)	116
Figura 43. Espectro de IV do composto 28 (KBr)	116
Figura 44. Espectro de IV do composto 29 (KBr)	117
Figura 45. Espectro de IV do composto 31 (KBr)	117
Figura 46. Espectro de IV do composto 32 (KBr)	118
Figura 47. Espectro de IV do composto 33 (KBr)	118
Figura 48. Espectro de IV do composto 34 (KBr)	119
Figura 49. Espectro de IV do composto 35 (KBr)	119
Figura 50. Espectro de IV do composto 36 (KBr)	120
Figura 51. Espectro de IV do composto 37 (KBr)	120
Figura 52. Espectro de IV do composto 38 (KBr)	121
Figura 53. Espectro de IV do composto 26a (KBr)	121
Figura 54. Espectro de RMN de ¹ H do composto 26 (400 MHz, CDCl ₃)	123
Figura 55. Espectro de RMN bidimensional (¹ H- ¹ H COSY) do composto 26 (400 MHz, CDCl ₃)	123
Figura 56. Espectro de RMN de ¹³ C do composto 26 (101 MHz, CDCl ₃)	124
Figura 57. Espectro de RMN de ¹³ C/DEPT 135 do composto 26 (101 MHz, CDCl ₃).....	124
Figura 58. Espectro de RMN de ¹ H do composto 28 (400 MHz, CDCl ₃)	125

Figura 59. Espectro de RMN de ^{13}C do composto 28 (101 MHz, CDCl_3)	125
Figura 60. Espectro de RMN de ^1H do composto 29 (400 MHz, CDCl_3)	126
Figura 61. Espectro de RMN de ^{13}C do composto 29 (101 MHz, CDCl_3)	126
Figura 62. Espectro de RMN de ^1H do composto 30 (400 MHz, CDCl_3)	127
Figura 63. Espectro de RMN de ^1H do composto 31 (400 MHz, CDCl_3)	128
Figura 64. Espectro de RMN de ^{13}C do composto 31 (101 MHz, CDCl_3)	128
Figura 65. Espectro de RMN de ^1H do composto 32 (400 MHz, CDCl_3)	129
Figura 66. Espectro de RMN de ^{13}C do composto 32 (101 MHz, CDCl_3)	129
Figura 67. Espectro de RMN de ^1H do composto 33 (400 MHz, CDCl_3)	130
Figura 68. Espectro de RMN de ^{13}C do composto 33 (101 MHz, CDCl_3)	130
Figura 69. Espectro de RMN de ^1H do composto 34 (400 MHz, CDCl_3)	131
Figura 70. Espectro de RMN de ^{13}C do composto 34 (101 MHz, CDCl_3)	131
Figura 71. Espectro de RMN de ^1H do composto 35 (400 MHz, CDCl_3)	132
Figura 72. Espectro de RMN de ^{13}C do composto 35 (101 MHz, CDCl_3)	132
Figura 73. Espectro de RMN de ^1H do composto 36 (400 MHz, CDCl_3)	133
Figura 74. Espectro de RMN de ^{13}C do composto 36 (50 MHz, CDCl_3)	133
Figura 75. Espectro de RMN de ^1H do composto 37 (400 MHz, CDCl_3)	134
Figura 76. Espectro de RMN de ^{13}C do composto 37 (101 MHz, CDCl_3)	134
Figura 77. Espectro de RMN de ^1H do composto 38 (400 MHz, CDCl_3)	135
Figura 78. Espectro de RMN de ^{13}C do composto 38 (101 MHz, CDCl_3)	135

Figura 79. Espectro de RMN de ^1H do composto 26a (400 MHz, CDCl_3)	136
Figura 80. Espectro de RMN de ^1H do composto 28a (400 MHz, CDCl_3)	136
Figura 81. Espectro de RMN de ^1H do composto 32a (400 MHz, CDCl_3)	137
Figura 82. Espectro de RMN de ^1H do composto 33a (400 MHz, CDCl_3)	137
Figura 83. Espectro de RMN de ^1H do composto 34a (400 MHz, CDCl_3)	138
Figura 84. Espectro de RMN de ^1H do composto 35a (400 MHz, CDCl_3)	138
Figura 85. Espectro de RMN de ^1H do composto 36a (400 MHz, CDCl_3)	139
Figura 86. Espectro de RMN de ^1H do composto 37a (400 MHz, CDCl_3)	139
Figura 87. Espectro de RMN de ^1H do composto 38a (400 MHz, CDCl_3)	140
Figura 88. Espectro de RMN de ^1H do composto 26r (400 MHz, CDCl_3)	141
Figura 89. Espectro de RMN bidimensional (^1H - ^1H COSY) do composto 26r (400 MHz, CDCl_3)	141
Figura 90. Comparação entre os espectros de RMN de ^1H de 26 e 26r (400 MHz, CDCl_3)	142
Figura 91. Espectro de RMN de ^{13}C do composto 26r (101 MHz, CDCl_3)	142
Figura 92. Espectro de RMN de ^{13}C /DEPT 135 do composto 26r (101 MHz, CDCl_3)	143
Figura 93. Comparação entre os espectros de RMN de ^1H de 28 e 28r (400 MHz, CDCl_3)	144
Figura 94. Espectro de RMN de ^1H do composto 29r (400 MHz, CDCl_3)	145
Figura 95. Comparação entre os espectros de RMN de ^1H de 29 e 29r (400 MHz, CDCl_3)	145
Figura 96. Espectro de RMN de ^1H do composto 30r (400 MHz, CDCl_3)	146
Figura 97. Comparação entre os espectros de RMN de ^1H de 30 e 30r (400 MHz, CDCl_3)	146
Figura 98. Comparação entre os espectros de RMN de ^1H de 31 e 31r (400 MHz, CDCl_3)	147

Figura 99. Comparação entre os espectros de RMN de ^1H de 32 e 32r (400 MHz, CDCl_3).....	147
Figura 100. Espectro de RMN de ^1H do composto 33r (400 MHz, CDCl_3)	148
Figura 101. Comparação entre os espectros de RMN de ^1H de 33 e 33r (400 MHz, CDCl_3).....	148
Figura 102. Espectro de RMN de ^1H do composto 34r (400 MHz, CDCl_3)	149
Figura 103. Comparação entre os espectros de RMN de ^1H de 34 e 34r (400 MHz, CDCl_3).....	149
Figura 104. Espectro de RMN de ^1H do composto 35r (400 MHz, CDCl_3)	150
Figura 105. Comparação entre os espectros de RMN de ^1H de 35 e 35r (400 MHz, CDCl_3).....	150
Figura 106. Espectro de RMN de ^1H do composto 36r (400 MHz, CDCl_3)	151
Figura 107. Comparação entre os espectros de RMN de ^1H de 36 e 36r (400 MHz, CDCl_3).....	151
Figura 108. Espectro de RMN de ^1H do composto 37r (400 MHz, CDCl_3)	152
Figura 109. Comparação entre os espectros de RMN de ^1H de 37 e 37r (400 MHz, CDCl_3).....	152
Figura 110. Espectro de RMN de ^1H do composto 38r (400 MHz, CDCl_3)	153
Figura 111. Comparação entre os espectros de RMN de ^1H de 38 e 38r (400 MHz, CDCl_3).....	153

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Classes de enzimas (adaptado da referência 18) ^{12,17}	31
Tabela 2. Coenzimas comuns requeridas em reações de biotransformação. ¹²	33
Tabela 3. Comparação entre etapas dos métodos enzima isolada x célula íntegra.....	39
Tabela 4. Valores de log <i>P</i> para solventes orgânicos comuns. ³⁹	44
Tabela 5. Ranking geral de recomendação do uso de solventes orgânicos. Adaptado da referência 41.....	45
Tabela 6. Variação nos valores de conversão para 26r , em função do FP imobilizado em microesferas de alginato de cálcio. Condições: 26 (50 mg), FP (2 – 8 g), <i>n</i> -hexano (30 mL), cossolvente (3 mL), glicose (3 g), <i>t</i> = 35 °C,	91
Tabela 7. Valores de conversão das reações de biorredução de chalconas bifenílicas substituídas medias por FP. Condições: 26, 28-38 (50 mg), FP (2 g), tampão K ₂ HPO ₄ /ácido cítrico (30 mL, pH = 6,5), <i>n</i> -hexano (30 mL), DMSO (4,5 mL), glicose (3 g), <i>t</i> = 35 °C, <i>t</i> = 8 h, 300 rpm.	98
Tabela 8. Conversão em 26r realizadas com leveduras selvagens. Condições: 26 (50 mg), levedura seca (1 g), tampão K ₂ HPO ₄ /ácido cítrico (15 mL, pH = 6,5), <i>n</i> -hexano (15 mL), DMSO (2,25 mL), glicose (1,5 g), <i>t</i> = 35 °C, <i>t</i> = 8 h, 300 rpm.	103
Tabela 9. Conversão em 26r realizadas com leveduras selvagens. Condições: 26 (50 mg), levedura fresca (1 g), tampão K ₂ HPO ₄ /ácido cítrico (15 mL, pH = 6,5), <i>n</i> -hexano (15 mL), DMSO (2,25 mL), glicose (1,5 g), <i>t</i> = 35 °C, <i>t</i> = 8 h, 300 rpm.	104
Tabela 10. Valores de conversão em 26r realizadas com <i>S. cerevisiae</i> em diferentes estados de conservação. Condições: 26 (50 mg), levedura (1 g), tampão K ₂ HPO ₄ /ácido cítrico (15 mL, pH = 6,5), <i>n</i> -hexano (15 mL), DMSO (2,25 mL), glicose (1,5 g), <i>t</i> = 35 °C, <i>t</i> = 8 h, 300 rpm.	105
Tabela 11. Tabela de correlação de espectroscopia de IV produzida com as frequências dos grupos em destaque deste trabalho. ⁵⁹	115

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- α – Alfa
 β – Beta
[BMIm][BF₄] – Tetrafluorborato de 1-butil-3-metil imidazólio
[BMIm][PF₆] – Hexafluorofosfato de 1-butil-3-metil imidazólio
[BMIm][I⁻] – Iodeto de 1-butil-3-metil imidazólio
CCD – Cromatografia de Camada Delgada
Conf. – Configuração
Conv. – Conversão
¹H-¹H COSY – Espectroscopia Correlacional de Hidrogênio
DMSO – Dimetilsulfóxido
d – Duplete
dd – Duplo duplete
 δ – Deslocamento químico
ee – Excesso Enantiomérico
Eq. – Equação
FP – Fermento de Pão comercial
IV – Infravermelho
LI – Líquido iônico
m – Multiplete
NADH – Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo
NADPH – Fosfato de Dinucleotídeo de Adenina e Nicotinamida
RMN de ¹H – Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio
RMN de ¹³C – Ressonância Magnética Nuclear de Carbono
ref. – Referência
Rend. – Rendimento
rpm – Rotações Por Minuto
s – Simpleto
S. cerevisiae – *Saccharomyces cerevisiae*
SB – Sistema Bifásico
t – Tripleto
UIBMB – União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular
YPD – *Yeast extract Peptone Dextrose*

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	25
1.1	ENZIMAS	26
1.1.1	Classes de enzimas e oxidorredutases	31
1.2	CÉLULAS ÍNTEGRAS E LEVEDURAS	34
1.2.1	Sistema Bifásico	39
1.3	CHALCONAS	46
2	OBJETIVOS	51
2.1	OBJETIVOS GERAIS	51
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	51
3	MATERIAIS E MÉTODOS	53
3.1	EQUIPAMENTOS.....	53
3.1.1	Laboratório de Biotálise	53
3.1.2	Laboratório de Estudos em Materiais Poliméricos – POLIMAT	53
3.1.3	Central de Análises no Departamento de Química – UFSC 53	
3.1.4	Laboratório de Biologia Molecular e Biotecnologia de Leveduras – LBMBL	53
3.2	REAGENTES, SOLVENTES E LEVEDURAS.....	54
3.2.1	Reagentes e solventes	54
3.2.2	Leveduras	54
3.3	PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS.....	55
3.3.1	Síntese das chalconas bifenílicas 26-38	55
3.3.2	Redução <i>via</i> NaBH₄	66
3.3.3	Biorredução utilizando fermento de pão comercial (FP) em sistema bifásico	72
3.3.3.1	Imobilização de FP em microesferas de alginato de cálcio em sistema monofásico	74
3.3.4	Biorredução utilizando leveduras selvagens	75
3.3.4.1	Condições de cultivo das leveduras	75

3.3.5	Cálculo dos valores de conversão e caracterização dos produtos por RMN de ^1H	77
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	79
4.1	SÍNTESE DAS CHALCONAS BIFENÍLICAS E REDUÇÃO COM NaBH_4	79
4.2	BIORREDUÇÃO UTILIZANDO FERMENTO DE PÃO COMERCIAL	81
4.2.1	Sistema monofásico vs. sistema bifásico.....	82
4.2.2	Efeito do pH.....	84
4.2.3	Influência de aditivos: cossolventes e açúcares	86
4.2.4	Imobilização do FP em microesferas de alginato de cálcio 90	
4.2.5	Avaliação da quantidade de substrato na biorredução de 26 92	
4.2.6	Diminuição da escala do sistema reacional.....	93
4.2.7	Estudo do tempo reacional.....	96
4.3	INFLUÊNCIA DOS GRUPOS SUBSTITUINTES	97
4.4	BIORREDUÇÃO UTILIZANDO LEVEDURAS SELVAGENS	102
4.4.1	Influência do estado de conservação das leveduras	103
5	CONCLUSÕES.....	107
6	PERSPECTIVAS	109
7	REFERÊNCIAS.....	110
	APÊNDICE I – Espectros de IV dos compostos sintetizados.....	115
	APÊNDICE II – Espectros de RMN de ^1H e RMN de ^{13}C dos compostos sintetizados.....	123

1 INTRODUÇÃO

Enzimas catalisam naturalmente a transformação de metabólitos que ocorrem dentro e/ou fora de células vivas, e mesmo que algumas enzimas aceitem apenas uma pequena variedade de substratos, uma grande parte delas são mais tolerantes e permitem a conversão de materiais de partida não naturais. A área da biocatálise trabalha com esta versatilidade com o objetivo de utilizar, identificar ou modificar enzimas que aceitem uma grande variedade de substratos, mas que continuam sendo seletivas o suficiente para gerar apenas um produto ou um estereoisômero. O termo “biocatálise” é usado para descrever o uso de enzimas (naturais, modificadas geneticamente, isoladas e/ou encontradas em microrganismos) para transformações sintéticas com reagentes de partida não naturais e as enzimas utilizadas nessas reações são denominadas “biocatalisadores”.¹

Biocatalisadores não atuam com princípios científicos diferentes da catálise orgânica, e a existência de múltiplos modelos enzimáticos incluindo catalisadores oligopeptídicos ou polipeptídicos prova que todas as ações enzimáticas podem ser explicadas racionalmente com princípios químicos e físicos.²

O uso de enzimas apresenta diversas vantagens, e algumas delas são a alta seletividade pelos substratos e estereosseletividade nas reações. A atividade catalítica pode ser regulada com variações de temperatura, concentração de substratos e pH, e podem ser quirais e enantiosseletivas. O custo de obtenção de enzimas tem diminuído devido a sua exploração e aplicação em diversos setores das indústrias, como por exemplo a utilização de laccases (EC 1.10.3.2) nas indústrias de sabores e fragrâncias.³

As enzimas estão presentes no nosso cotidiano de diversos modos, inclusive nos fermentos biológicos comerciais. Os fermentos biológicos, por sua vez, são bastante conhecidos pela sua ampla utilização na produção de pães, cervejas, vinhos e em escala industrial para a produção de bioetanol. Os processos realizados pelos fermentos acontecem devido às enzimas presentes nas leveduras.⁴

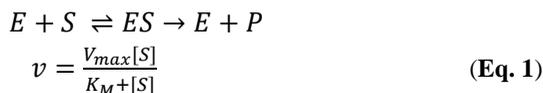
Dentro deste contexto, este trabalho visa o desenvolvimento de metodologias que utilizam leveduras, em especial *Saccharomyces cerevisiae*, em reações de biorredução de compostos carbonílicos α,β -insaturados, mais especificamente chalconas bifenílicas previamente sintetizadas, onde foram avaliadas algumas estratégias experimentais para o aumento dos valores de conversão aos produtos.

1.1 ENZIMAS

Enzimas são proteínas (com algumas exceções de RNA catalítico) que usam os seus resíduos de aminoácidos para catalisar quase todas as reações bioquímicas que ocorrem nas células vivas. Estas realizam importantes reações do metabolismo, como por exemplo o ciclo do ácido cítrico e a aceleração das taxas de velocidade de sínteses proteicas. Por serem bastante sensíveis ao ambiente, as atividades catalíticas são maiores na presença de água e em condições fisiológicas de temperatura, pH e pressão atmosférica.⁵

A utilização de enzimas como catalisadores, iniciou-se no final dos anos 1700, e o processo de fermentação foi postulado por Louis Pasteur na década de 1850,⁶ mas a aplicação direta de enzimas em reações químicas começou por volta de 1837 quando os primeiros pioneiros da química orgânica, Wöhler e Liebig, descreveram uma reação catalisada por enzimas usando um extrato de amêndoas para liberar HCN de uma cianoidrina.⁷

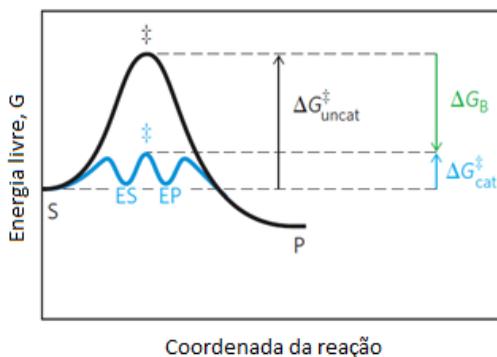
Leis de velocidade e uma equação específica para a cinética das enzimas foi proposta em 1913⁸ por Leonor Michaelis e Maud Menten, auxiliando na compreensão dos mecanismos envolvidos na formação do complexo enzima-substrato (ES) e do efeito da variação da concentração de substrato (S). **(Equação 1)**



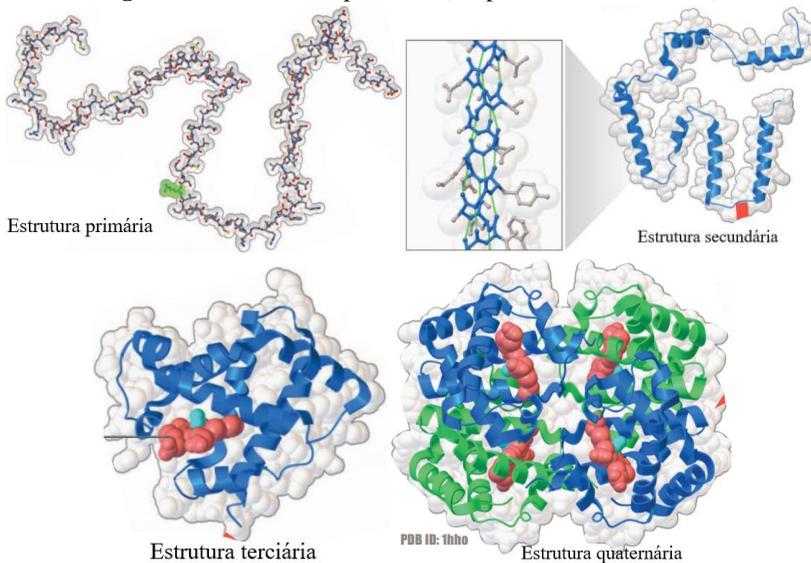
Em 1926, James Sumner foi o primeiro a purificar e cristalizar uma proteína, a urease, que foi um grande avanço para os estudos enzimáticos e lhe rendeu o Prêmio Nobel em 1946.⁵

Como catalisadores, as enzimas podem ser usadas para gerar um novo caminho reacional com menor energia de ativação (ΔG^\ddagger), levando a um processo mais rápido (**Figura 1**).⁶ Elas não são consumidas na reação e cumprem todos os requisitos para serem classificadas como um catalisador.⁹ Ao contrário de muitos catalisadores metálicos heterogêneos, as enzimas são ambientalmente benignas e totalmente biodegradáveis.¹⁰

Figura 1. Variação da energia livre de Gibbs vs. coordenada da reação para uma reação catalisada e não catalisada (adaptada da referência 6).



Como as enzimas são em sua maioria proteínas, a sequência de aminoácidos determina a estrutura tridimensional e por consequência o formato do sítio ativo e a função da proteína. As proteínas possuem quatro níveis de organização, sendo separadas em estrutura primária, secundária, terciária e quaternária.¹¹ (**Figura 2**)

Figura 2. Estrutura das proteínas (adaptado da referência 11).

A estrutura primária representa a sequência exata dos aminoácidos da cadeia polipeptídica, sendo específica para cada proteína. A estrutura secundária é definida pela conformação local de seu esqueleto principal sendo mantida principalmente por ligações de hidrogênio, forças de van der Waals, pontes dissulfetos e outras interações intramoleculares, gerando diversos padrões de enovelamento como a α -hélice, folha β -pregueada e voltas. A estrutura terciária constitui o arranjo tridimensional da estrutura secundária, junto da disposição espacial das cadeias laterais, e a quaternária representa a associação de duas ou mais subunidades polipeptídicas por ligações não covalentes para compor uma unidade funcional. As cavidades formadas pelo enovelamento das estruturas formam os sítios ativos, onde ocorre a catálise das reações bioquímicas.

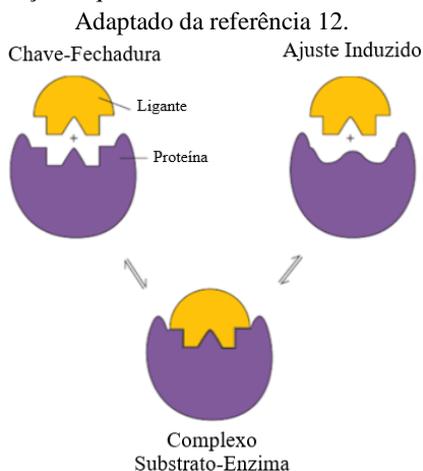
12

Para que uma reação seja catalisada por uma enzima, o substrato deve primeiro atingir o sítio ativo da enzima e se ligar com ela, formando o complexo “enzima-substrato”. As interações que ocorrem dentro do sítio ativo são interações do tipo van der Waals, eletrostáticas e ligações de hidrogênio⁶ entre o substrato e as terminações de aminoácidos

encontrados na superfície da enzima, fixando o substrato nas posições corretas. O papel de um sítio ativo é a formação de um estado de transição de menor energia levando a um processo mais rápido.⁵ Uma vez que a reação ocorre no sítio ativo, o mesmo pode ser geneticamente modificado para alterar os seus resíduos e consequentemente o número de substratos aceitos, aumento ou diminuição da atividade catalítica, estabilidade da enzima e modificação dos tipos de reações catalisadas, aumentando o escopo de aplicação das enzimas para quase todas as reações da química orgânica.^{2,13,14}

O modelo de mecanismo reacional enzimático que primeiro propôs uma explicação para o encaixe do substrato no sítio ativo foi o modelo “chave-fechadura” proposto por Emil Fischer, o qual assume uma simetria entre os sítios ativos e os substratos de forma com que as proteínas sejam rígidas e complementares aos substratos. Esse mecanismo possui limitações que foram observadas por Daniel E. Koshland Jr. e uma extensão sofisticada do mecanismo clássico foi proposto e denominado de “ajuste induzido”.¹² (**Figura 3**)

Figura 3. Representação esquemática dos modelos de mecanismo enzimáticos.



Em sua revisão,¹⁵ Koshland comparou o ajuste induzido com o ajuste de uma mão a uma luva, pois o mesmo assume que a enzima pode

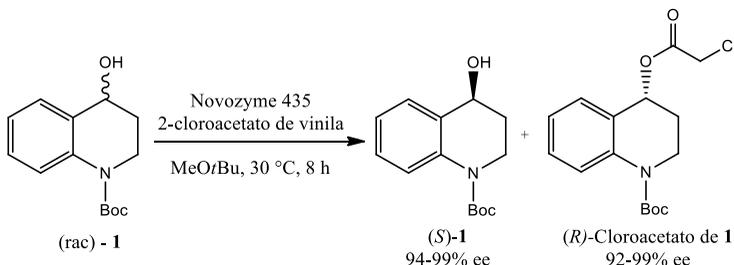
moldar a sua conformação dependendo da influência que a estrutura do substrato pode exercer sobre a enzima. Essa observação foi validada através de análises cristalográficas de raios-X e com esse novo modelo, é possível explicar o motivo de diversas estruturas presentes no substrato serem importantes além dos grupos mais reativos na biotransformação.¹²

Um exemplo da influência da estrutura do substrato é observado em uma característica importante das enzimas, a enantiosseletividade, sendo a maioria das classes de enzimas muito rigorosas quanto à quiralidade do substrato (alta enantiosseletividade), devido ao ambiente quiral do sítio ativo das enzimas. Em uma resolução enzimática de enantiômeros A e B, os complexos “enzima-substratos” diastereoméricos [EnzA] e [EnzB] são formados com diferentes valores de ΔG , o que consequentemente leva a uma diferença de valores de energia de ativação (ΔG^\ddagger). O complexo com a orientação com o menor valor de energia de ativação será transformado mais rapidamente que o outro, levando a um processo de reconhecimento quiral.¹⁰

Algumas não são tão rigorosas, como o caso das lipases e esterases, onde ambos os enantiômeros são incorporados no sítio ativo, mas depois no ciclo catalítico um dos enantiômeros é eliminado por sua falta de interações do tipo ligações de hidrogênio.⁵

Esta característica das enzimas pode ser utilizada na resolução de racematos, como por exemplo a resolução cinética de álcoois racêmicos mediados por lipases. A **Figura 4** apresenta a resolução do tetrahydroquinolin-4-ol (**1**) com 2-cloroacetato de vinila, catalisada pela lipase de *Candida antarctica* (CALB, comercialmente vendida como Novozyme 435).¹⁶

Figura 4. Resolução cinética de um álcool racêmico mediado por lipase *Candida antarctica* (Novozyme 435) (adaptado da referência 14).



O correspondente (*R*)-cloroacetato de **1** foi obtido com excesso enantiomérico (ee) de 92-99%, e o álcool (*S*)-**1**, não reativo, com ee de 94-99%.

1.1.1 Classes de enzimas e oxidorredutases

Segundo o *BRENDA*, *database* de enzimas organizado e avaliado pela comunidade científica, há cerca de 31.680 enzimas classificadas, todas elas divididas em 6 classes previamente definidas pela União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular (IUBMB) de acordo com o tipo de reação que elas são capazes de catalisar^{17,18} (**Tabela 1**).

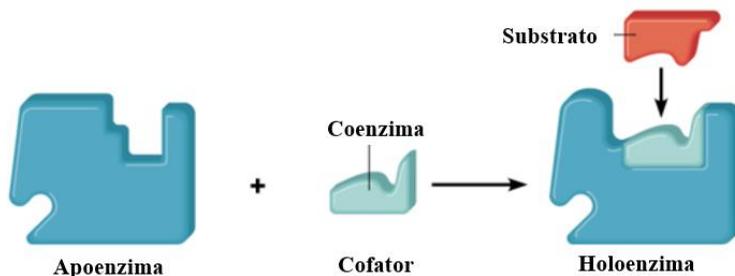
Tabela 1. Classes de enzimas (adaptado da referência 18)^{12,17}

Classe	Tipos de reações
1. Oxidorredutases	<p>○ = Reduction equivalent</p> <p>$A_{red} + B_{ox} \rightleftharpoons A_{ox} + B_{red}$</p>
2. Transferases	<p>$A-B + C \rightleftharpoons A + B-C$</p>
3. Hidrolases	<p>$A-B + H_2O \rightleftharpoons A-H + B-OH$</p>
4. Liases	<p>$A + B \rightleftharpoons A-B$</p>
5. Isomerases	<p>$A \rightleftharpoons Iso-A$</p>
6. Ligases	<p>$X = A, G, U, C$</p> <p>$A + B + XTP \rightleftharpoons A-B + XDP$</p>

Dentre todas as classes, pode-se citar as oxidorredutases como sendo interessantes para a indústria devido a sua aplicação em reações de biorredução de cetonas e aldeídos, pois podem gerar diversos produtos quirais, como álcoois e aminas, os quais são utilizados posteriormente como reagentes na síntese orgânica.¹⁹

Em seu funcionamento, as oxidorredutases necessitam de pequenas moléculas auxiliares chamados de cofatores (ou coenzimas em alguns casos específicos) que atuam como “dentes químicos”¹² que facilitam as interações de carga e ligações covalentes. No caso de uma enzima ser apenas ativada na presença de um cofator, ela é denominada “apoenzima” e seu complexo ativado de “holoenzima”.²⁰ (**Figura 5**)

Figura 5. Complexo holoenzima (adaptado da referência 20).



Os cofatores podem ser íons metálicos (ex. Fe^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+}) ou moléculas orgânicas (coenzimas) como NAD^+ e NADP^+ . Na **Tabela 2** são apresentadas as coenzimas mais comuns utilizadas em reações de biotransformação.¹²

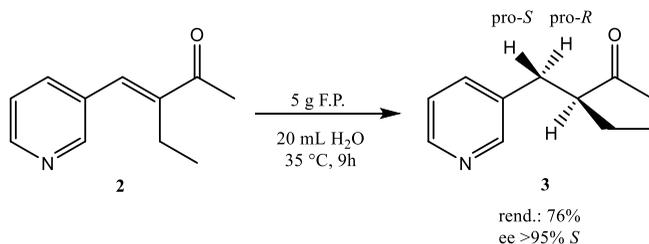
Tabela 2. Coenzimas comuns requeridas em reações de biotransformação.¹²

Coenzima	Tipo de reação
Cobalamina (B ₁₂)	Alquilação
Coenzima A	Transferência de grupos acila
Ácido Lipóico	Transferência de grupos acila
Nicotinamida	REDOX
Flavinas	Redução C=C, Oxidação de S e Ox.
	Bayer-Villiger
Piridoxal-fosfato	Transaminação
Biotina	Carboxilação
Ácido tetrahidrofólico	Transferência de carbonos
Tiamina (Vitamina B ₁)	Transferência de aldeídos

Ao utilizar uma oxidoredutase, o pesquisador deve decidir entre utilizar a enzima na forma purificada ou em um microrganismo, na forma de célula íntegra. Ao usar a enzima em sua forma pura, o cofator deve ser decidido de acordo com a reação estudada para ser adicionado em concentrações subestequiométricas, em alguns casos chegando a concentrações estequiométricas, no meio reacional. Como pode ser observado no exemplo da reação de redução de compostos carbonílicos α,β -insaturados com fermento de pão comercial (FP). Neste exemplo o mecanismo catalítico demonstra que o hidrogênio incorporado no carbono β à carbonila é derivado do cofator NAD(P)H e o hidrogênio incorporado no carbono α à carbonila é derivado do meio aquoso.²¹

A **Figura 6** mostra uma das reações utilizadas para o estudo do mecanismo catalítico da redução de alcenos ativados.²²

Figura 6. Biorredução assimétrica de 3-piridil enona (**2**) utilizando FP (adaptado da referência 22).



A ligação α,β -insaturada de **2** foi reduzida em um sistema aquoso simples com **FP** gerando o produto **3** com um bom valor de rendimento de 76% e com ee >95% para o isômero S.

Caso seja optado pela utilização de uma enzima pura com adição de cofator, o custo da reação poderá ser alto. Ao fazer um rápido orçamento (09/01/2018) no *site* da Sigma Aldrich®, 10 mg de catalase (uma oxidorreductase) derivada de *Aspergillus niger* custa R\$630,00 e 25 mg de NADPH custa R\$924,00.

Por outro lado, na utilização de microrganismos em reações de oxidorredução, as enzimas estão altamente estáveis em seu ambiente natural e os cofatores já se encontram presentes em algum ciclo biológico junto com as enzimas, evitando a necessidade de etapas de regeneração do cofator a cada ciclo catalítico pois o próprio metabolismo do organismo promove a regeneração.^{10,23}

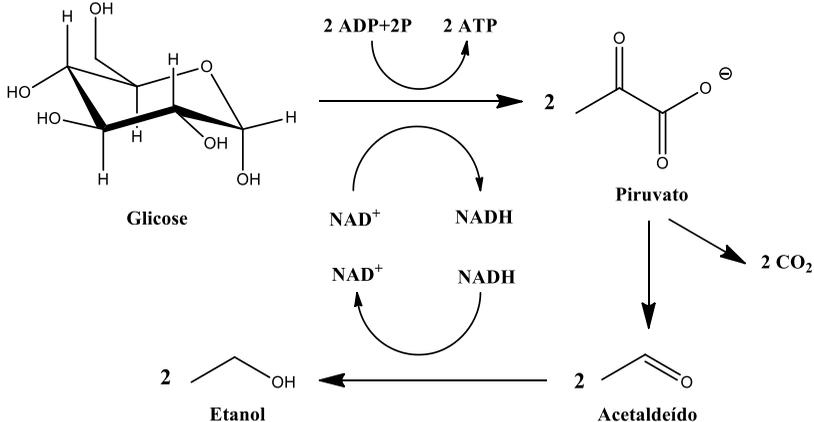
Algumas leveduras, como a *S. cerevisiae* (FP) são capazes de produzir pão, vinhos, cervejas, bioetanol,²⁴ fármacos e outros produtos industriais devido a presença de oxidorreductases no interior celular. A utilização de um microrganismo em reações biocatalisadas é comum e denominada “*whole-cell*” (célula íntegra).

1.2 CÉLULAS ÍNTEGRAS E LEVEDURAS

A aplicação de leveduras é uma técnica conhecida desde a antiguidade, como por exemplo o uso de leveduras para obtenção de vinho e cerveja devido à biotransformação (fermentação) de açúcares naturais (glicose, frutose, sacarose) encontrados nas uvas e no mosto,

respectivamente, gerando energia celular, CO_2 e etanol como produtos secundários, ilustrado na **Figura 7**.²⁵

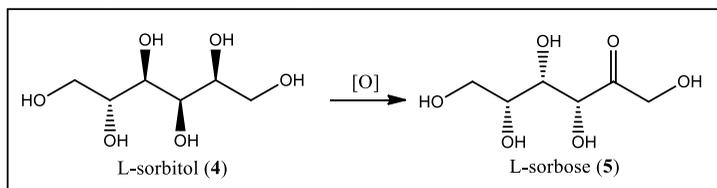
Figura 7. Processo simplificado da fermentação da glicose em etanol.



As leveduras contêm diversas enzimas da classe das oxidoreduktases em seu interior e continuam sendo utilizadas até hoje para diversas aplicações.²⁴

Uma das primeiras aplicações industriais em larga escala de um biocatalisador foi desenvolvida por Reichstein em 1934 com a sua rota sintética para obtenção de vitamina C²⁶ que logo foi patenteada e comprada pela Hoffman-La Roche. A etapa principal desse processo utiliza células de *Gluconobacter suboxydans* para a oxidação regioselectiva de L-sorbitol (4) para L-sorbose (5). (**Figura 8**)

Figura 8. Estruturas químicas do L-sorbitol e L-sorbose.

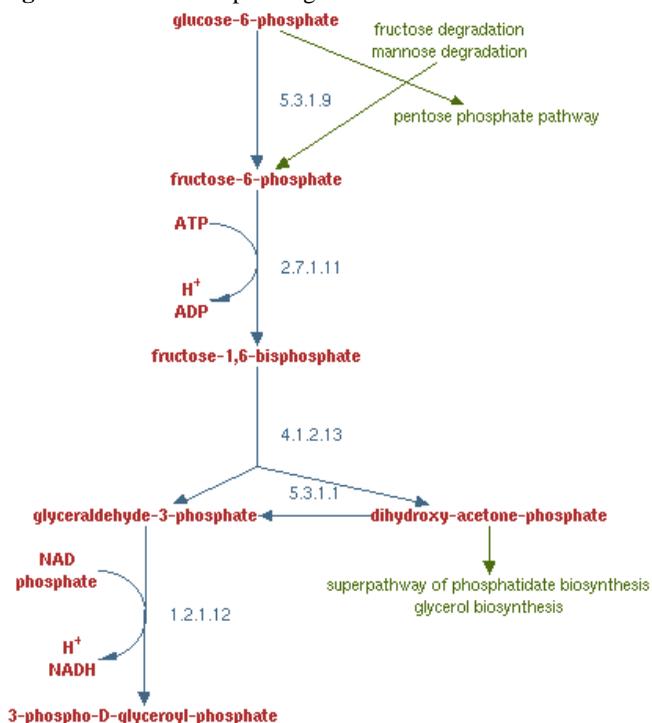


Neste caso, quando outros agentes oxidantes são utilizados, ocorre a formação de diversos produtos secundários derivados da oxidação dos outros grupos hidroxilas do L-sorbitol, o que demonstra a importância da utilização de um biocatalisador nesse processo industrial.¹

A utilização de microrganismos e células íntegras é muito vantajoso principalmente no caso de reações que precisam de oxidoredutases para diminuição de custos. Isto ocorre, pois, as leveduras vivas são capazes de regenerar continuamente seus cofatores (nicotinamida) ao metabolizar açúcares simples (ex: sacarose e glicose). Tendo isto em vista, a *Novozymes* começou a produção de células íntegras de microrganismos em 1960, sendo imitada em seguida por outras produtoras comerciais de enzimas. Salienta-se que tanto a levedura quanto os açúcares podem ser adquiridos em fontes comerciais populares e aplicados diretamente no laboratório, procedimento similar usado em parte deste projeto.

A **Figura 9** demonstra parte das etapas de glicólise realizadas pelo metabolismo de um microrganismo muito utilizado, a *S. cerevisiae*, e a recuperação de NAD(P).²⁷

Figura 9. Parte das etapas de glicólise da levedura *S. cerevisiae*.²⁷



Um dos primeiros estudos de biocatálise desenvolvidos no Brasil utilizou a *S. cerevisiae* para a redução de cetonas, e seus resultados foram publicados em 1990 pelos grupos de biocatálise da UNICAMP coordenados pelos professores Rodrigues e Moran.^{28,29} (**Figuras 10 e 11**)

Figura 10. Redução de dicetonas utilizando fermento de pão (adaptado da referência 28).

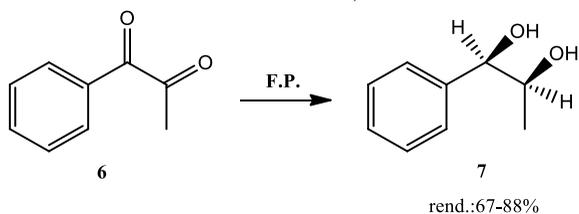
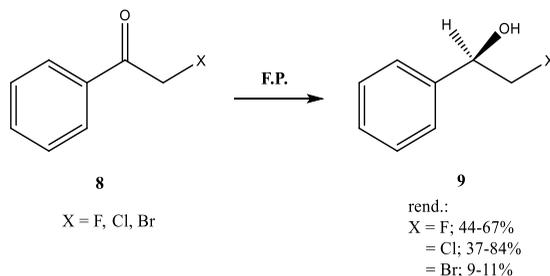


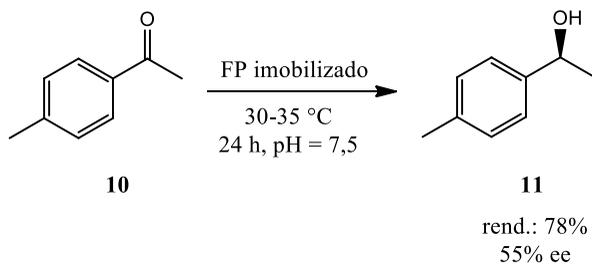
Figura 11. Redução de α -halocetonas utilizando fermento de pão (adaptado da referência 29).



Estes estudos iniciais apresentaram bons valores de rendimento dos álcoois obtidos.

A partir destes estudos, outros surgiram focando em diferentes aspectos da reação, como o desenvolvimento de métodos de imobilização, o uso de sistemas bifásicos e processos contínuos.³⁰ Um exemplo de método de imobilização em reações de redução de carbonila via FP para a síntese de álcoois quirais com a utilização de alginato de cálcio, derivado de um biopolímero biodegradável, apresentada na **Figura 12**.³¹

Figura 12. Reação de biorredução de *p*-acetiltolueno (**10**) na presença de FP imobilizado em alginato de cálcio (adaptado da referência 31)



Os bons resultados de rendimento e do valor de *ee* demonstram que a imobilização do FP em alginato de cálcio foi efetiva. As principais vantagens na utilização de métodos de imobilização são o reuso do biocatalisador em diversos ciclos e o aumento da estabilidade do biocatalisador, frente a solventes orgânicos.¹⁰

Na **Tabela 3**, estão apresentadas algumas diferenças na utilização de enzimas isolada ou células íntegras. Como comentado previamente, o método que utiliza células íntegras e/ou microrganismos possui diversas vantagens, mas uma de suas maiores desvantagens é a necessidade da utilização de uma grande quantidade de biomassa que está acompanhada com a enzima de interesse.¹

Tabela 3. Comparação entre etapas dos métodos enzima isolada x célula íntegra

<i>Etapa/Método</i>	Enzima Isolada	Célula Íntegra
<i>Fermentação</i>	✓	✓
<i>Ruptura da célula</i>	✓	
<i>Purificação</i>	✓	
<i>Concentração</i>	✓	✓
<i>Utilização em biotransformações</i>	✓	✓

Outras dificuldades que podem ser encontradas por um químico é a falta de conhecimento técnico, equipamentos e estruturas no laboratório para o crescimento das leveduras e coleta de biomassa suficiente para utilizar o método de células íntegras.

Tanto as leveduras quanto as enzimas são sensíveis ao meio, portanto tem sido utilizadas estratégias de proteção e imobilização das leveduras, baseadas em sistemas já otimizados previamente pelo grupo,³²⁻³⁵ para que não ocorra perda da atividade catalítica e deslocamento do sentido da reação para os reagentes como consequência.

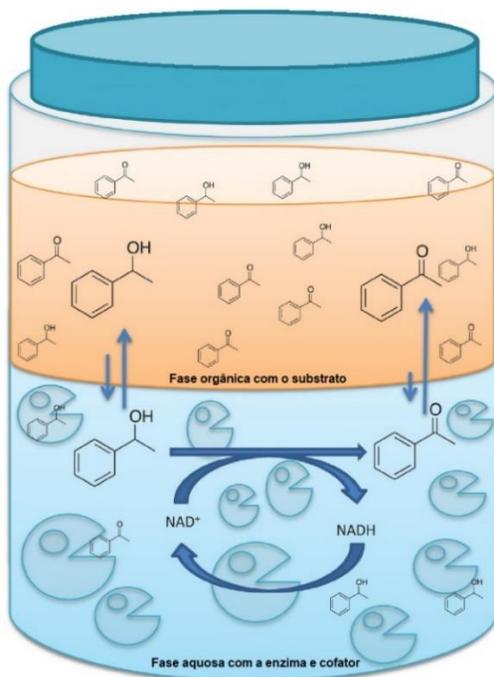
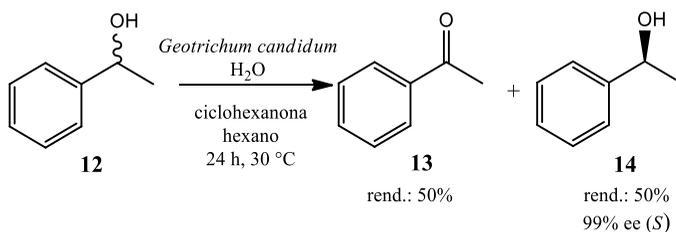
Um dos sistemas mais utilizados é o sistema bifásico, no qual a enzima/levedura permanece no meio aquoso e o substrato solubilizado no meio orgânico, sendo que ao utilizar técnicas de agitação a reação ocorre na interface dos dois meios.¹⁰

1.2.1 Sistema Bifásico

Quando o equilíbrio de uma reação química precisa ser deslocado no sentido da formação dos produtos, alguns parâmetros (ex. pH, temperatura, solvente, etc) podem ser alterados empregando técnicas

tradicionais da química orgânica. Porém, a atividade catalítica dos biocatalisadores fica dentro de um limite muito estreito desses parâmetros, o que significa que o equilíbrio em reações biocatalisadas precisa ser alterado com técnicas diferenciadas. A denaturação de enzimas pode ser evitada ao não expô-la diretamente a um solvente orgânico se a reação ocorrer em um sistema bifásico formado por “água/solvente orgânico imiscível”.^{10,35,36} A **Figura 13** ilustra um exemplo simplificado de um sistema bifásico e a interação entre as interfaces na resolução cinética com oxidação de 1-feniletanol (**12**) em 1-acetofenona (**13**) e (*S*)-1-feniletanol (**14**).¹

Figura 13. Equação da reação e exemplo ilustrativo do uso do sistema bifásico em uma reação de resolução cinética do 1-feniletanol (**12**) (adaptado da referência 1).

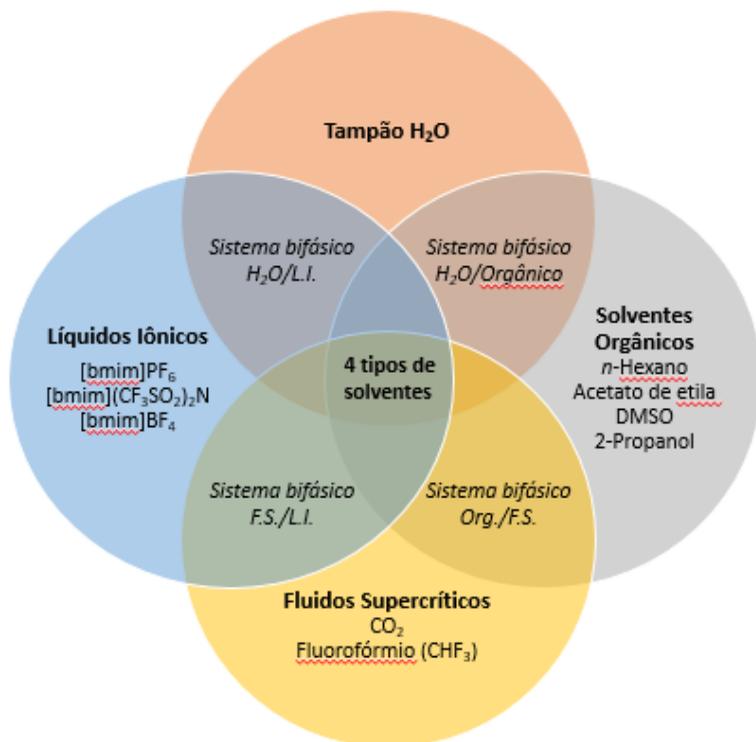


Os resultados da resolução cinética apresentada foram ótimos, o (S)-1-feniletanol (**14**) foi obtido com alto *ee* e rendimento máximo de 50%.

Atualmente, os sistemas bifásicos não estão mais limitados ao modelo “água/solvente orgânico imiscível”, sendo explorados outros solventes orgânicos miscíveis em água. As primeiras publicações utilizando fluidos supercríticos ocorreram em 1985³⁷, e posteriormente

com os líquidos iônicos em 2000.^{1,38} A **Figura 14** apresenta o diagrama de Venn para os usos de solventes e fluidos em diversos sistemas bifásicos.

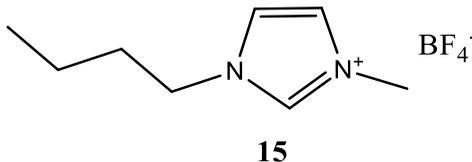
Figura 14. Diagrama de Venn para utilização de solventes em sistemas bifásicos (adaptado da referência 1).



Os líquidos iônicos (LIs), são líquidos formados completamente por pares iônicos e têm recebido uma atenção especial na área de química verde devido à suas características excepcionais, tais como ser um solvente não-volátil, não-inflamável, de baixa toxicidade e alta solubilidade em materiais orgânicos e inorgânicos, o que os tornam interessantes para a substituição de solventes orgânicos voláteis e inflamáveis. Uma das classes mais comuns de LIs são os derivados do 1-butil-3-metilimidazólio (BMIm), sendo um dos exemplos o

tetrafluorborato de 1-butil-3-metilimidazólio (**15**) apresentado na **Figura 15**.

Figura 15. Estrutura química do [BMIm]BF₄, um líquido iônico.



A escolha de qual solvente orgânico deve ser utilizado no sistema bifásico deve ser feita considerando a “biocompatibilidade” entre o solvente e a atividade catalítica da enzima. Para isso, parâmetros de hidrofobicidade foram tabelados, como o parâmetro de solubilidade de Hildebrandt, constante dielétrica e o momento de dipolo.

Porém, o mais utilizado é o logaritmo do coeficiente de partição ($\log P$) de um solvente entre 1-octanol e água. O $\log P$ consegue prever os efeitos do solvente orgânico na estabilidade da enzima, mas não os efeitos na estereoseletividade da mesma. Os valores teóricos de $\log P$ para biocompatibilidade variam entre $-2,5$ e $>2,0$ e estão relacionados com completamente miscíveis em água e imiscíveis.

Na **Tabela 4**, estão apresentados alguns solventes orgânicos comuns utilizados no sistema bifásico e seus valores de $\log P$.³⁹

Tabela 4. Valores de $\log P$ para solventes orgânicos comuns.³⁹

Solvente	$\log P$	Solvente	$\log P$
DMSO	-1,3	Éter dipropílico	1,9
Dioxano	-1,1	Clorofórmio	2,0
<i>N,N</i> -Dimetilformamida	-1,0	Benzeno	2,0
Metanol	-0,76	Acetato de pentila	2,2
Acetonitrila	-0,33	Tolueno	2,5
Etanol	-0,24	Octanol	2,9
Acetona	-0,23	Éter dibutílico	2,9
THF	0,49	Pentano	3,0
Acetato de etila	0,68	CCl ₄	3,0
Piridina	0,71	Ciclohexano	3,2
Butanol	0,80	Hexano	3,5
Éter dietílico	0,85	Octano	4,5
Acetato de propila	1,2	Decano	5,6
Acetato de butila	1,7	Dodecano	6,6

Os solventes hidrofílicos miscíveis em água, por exemplo dimetilformamida (DMF), dimetilsulfóxido (DMSO), acetona e álcoois de cadeias curtas, não podem ser utilizados como solventes orgânicos nas reações biocatalisadas, mas solventes lipofílicos imiscíveis em água como os haloalcanos, éteres e aromáticos conseguem manter uma alta atividade catalítica das enzimas. Em casos em que o substrato é polar, solventes miscíveis em água como dioxano, tetrahidrofurano (THF) e outros devem ser considerados, mas utilizando como biocatalisador uma enzima excepcionalmente estável.¹⁰

Um segundo parâmetro que deve ser observado em relação à escolha do solvente é a toxicidade. Diversos esforços têm sido feitos dentro da química verde/sustentável⁴⁰ para limitar o impacto ambiental e para proteger os trabalhadores dentro de seus espaços de trabalho de riscos relacionados ao uso de solventes tóxicos. Um estudo feito em 2014 organizou os dados de guias e rankings confeccionados pelas indústrias farmacêuticas e uniu-os em uma tabela simplificada.⁴¹ (**Tabela 5**)

Tabela 5. Ranking geral de recomendação do uso de solventes orgânicos.
Adaptado da referência 41.

Recomendado	Água, etanol, isopropanol, <i>n</i> -butanol, acetato de etila, acetato de propila, <i>n</i> -acetato de butila, anisol, sulfolano
Recomendado ou problemático	Metanol, <i>t</i> -butanol, álcool benzílico, etileno glicol, acetona, butanona, 4-metilpentan-2-ona, ciclohexanona, acetato de metila, ácido acético, anidrido acético
Problemático	2-Metiltetrahidrofurano, heptano, metilciclohexano, tolueno, xileno, clorobenzeno, acetonitrila, DMPU, DMSO
Problemático ou perigoso	Éter metil <i>tert</i> -butil, tetrahidrofurano, ciclohexano, diclorometano, ácido fórmico, piridina
Perigoso	Éter diisopropílico, 1,4-dioxano, diclorometano, pentano, hexano, DMF, dimetilacetamida, <i>n</i> -metil-2-pirrolidona, metóxi-etanol, trietilamina
Altamente perigoso	Éter dietílico, benzeno, clorofórmio, CCl ₄ , dicloroetano, nitrometano

Após levar em consideração o sistema bifásico e escolher o solvente orgânico ideal para a reação de interesse, há formas de estabilizar ainda mais as enzimas e obter maiores rendimentos. A estabilização das enzimas pode ser alcançada também com “aditivos” ou “ativadores”, que em baixas concentrações podem ser benéficos. Por ser um efeito que não é completamente compreendido em nível molecular, a adição de aditivos é empírica, mas alguns tipos já foram identificados e recomendados para reações biocatalisadas, tais como: ¹⁰

- Poli álcoois: carboidratos, açúcares, glicerol;
- Moléculas orgânicas polares pequenas: *N,N*-dimetil formamida, formamida e DMSO;
- Sais e bases orgânicas fracas: LiCl, NaCl, KCl, trietilamina, piridina.

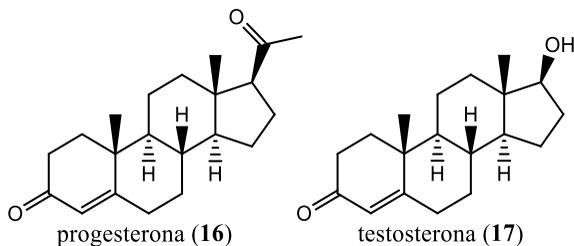
1.3 CHALCONAS

Um dos grupos funcionais orgânicos mais importantes é o grupo carbonila, no qual um átomo de carbono está ligado por uma ligação dupla a um átomo de oxigênio (C=O). O grupo carbonila é abundante na natureza e participa em diversos processos biológicos. Compostos orgânicos que apresentam esse grupo são denominados compostos carbonílicos ou carbonilados.⁶ Dentro desse grupo, há duas classes:

1. Substituinte acila pode ser substituído por outro grupo, no caso nucleófilos. Ex: ácido carboxílico, éster, cloreto de acila, amida;
2. Substituinte acila não substituído por nucleófilos. Ex: Aldeído e cetona

Aldeídos e cetonas são encontrados na natureza, sendo grupos funcionais responsáveis pelos odores de plantas, que variam de odores pungentes (aldeídos) a doces (cetonas) e biologicamente estão presentes em hormônios sexuais, tais como a progesterona (**16**) e a testosterona (**17**) (**Figura 16**).

Figura 16. Estruturas químicas da progesterona (**16**) e testosterona (**17**), hormônios sexuais com grupos cetona e C=C.

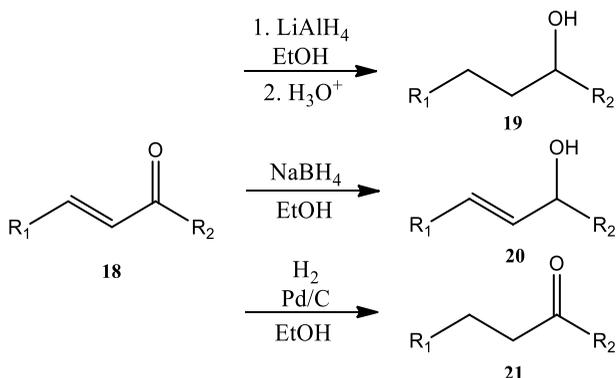


Dentre os compostos carbonílicos, uma classe interessante e bastante utilizada em biorreduções com microrganismos, compreende os compostos carbonílicos α,β -insaturados, os quais apresentam uma ligação C=C (insaturação) nas posições vizinhas α e β da carbonila.⁴² A redução desta classe de compostos pode gerar diversos produtos,

inclusive produtos quirais, sendo dependentes do agente redutor e/ou catalisador.

Por exemplo, a redução completa do sistema α,β -insaturado de um composto carbonílico **18** pode formar um álcool saturado **19**, a redução exclusiva da carbonila origina o álcool alílico correspondente **20** e a redução da ligação dupla $C=C$ leva a formação da cetona ou aldeído saturado **21**.⁴³ (**Figura 17**)

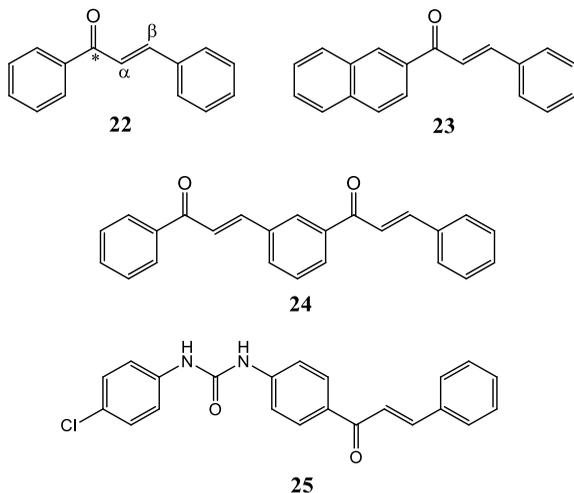
Figura 17. Possíveis produtos de redução de compostos carbonílicos α,β -insaturados (adaptado da referência 43)



As chalconas, ou (*E*)-1,3-difenilpropeno-1-onas, são compostos carbonílicos α,β -insaturados (**Figura 18**) naturais que possuem grande potencial farmacológico devido às suas diversas atividades biológicas apresentadas nos tratamentos de infecções virais e microbiais, doenças cardiovasculares, tumores malignos e controle de atividades antioxidantes.⁴²

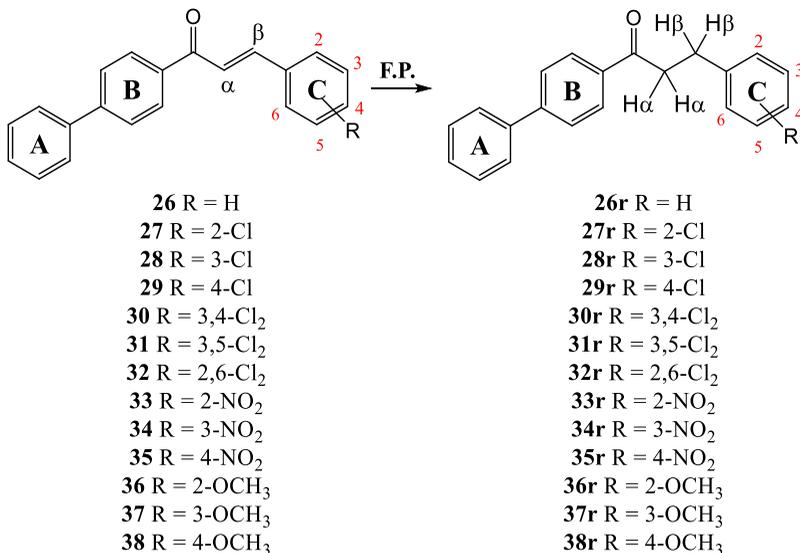
Para a indústria, suas aplicações se devem ao fato que chalconas pertencem a família dos flavonoides e, portanto, são precursores importantes na biossíntese de outros flavonoides e compostos heterocíclicos de alto valor biológico. A região da insaturação α,β com a ligação carbonílica está associada com as atividades biológicas das chalconas, pois é a porção mais reativa da molécula.^{42,44,45}

Figura 18. Estruturas químicas da chalcona (**22**) e diversos derivados (adaptado da referência 44). * = carbono pró-quiral.



Seguindo a linha de pesquisa de biorredução de compostos carbonílicos mediada por microrganismos que começou em 2000 no Laboratório de Biocatálise,⁴⁶ as chalconas escolhidas para serem os substratos da biorredução quimiosseletiva da ligação C=C deste projeto são as bifenílicas **26-38** apresentadas na **Figura 19**.

Figura 19. Equação da reação de biorredução da chalcona bifênlica com FP.



Para acompanhar o progresso da reação de biorredução, foi utilizada uma técnica de espectroscopia robusta para compostos orgânicos chamada espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN). Como o foco da reação é na hidrogenação da insaturação α,β , é previsto teoricamente em um espectro de RMN de ^1H , após a reação, a ausência de dois dubletos com valor de acoplamento $J = 16 \text{ Hz}$ na região de campo baixo e a presença de dois tripletos na região de campo alto (3,0-3,3 ppm).

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVOS GERAIS

Estudar reações de biorredução quimiosseletiva de chalconas bifenílicas substituídas em sistema bifásico utilizando como biocatalisadores a levedura *Saccharomyces cerevisiae* adquirida comercialmente e/ou leveduras selvagens crescidas em meio de cultura.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Otimizar as sínteses das chalconas bifenílicas **26-38** para serem utilizadas como substratos na reação de biorredução mediada por leveduras;
- Purificar e caracterizar as chalconas bifenílicas pelas técnicas de RMN de ^1H , RMN de ^{13}C e espectrofotometria de infravermelho (IV); e determinar a pureza por cromatografia de camada delgada (CCD);
- Obter os álcoois racêmicos, que serão usados como padrões de comparação através da redução das carbonilas das chalconas bifenílicas com borohidreto de sódio (NaBH_4) (**Figura 17**) e caracterizar por RMN de ^1H e determinar a pureza por CCD;
- Utilizar o fermento de pão comercial **FP** como biocatalisador nas reações de biorredução da chalcona bifenílica **26**, visando avaliar e otimizar as melhores condições reacionais da biotransformação (tempo, temperatura reacional, concentração do substrato, pH da solução tampão, solvente orgânico e variação dos volumes das fases aquosa e orgânica);
- Verificar o efeito dos grupos substituintes do anel aromático C das chalconas **26-38**, após otimização das condições experimentais da reação de biorredução da chalcona **26** mediada por FP;
- Preparar os meios de cultivo das leveduras selvagens e monitorar o crescimento, seguido de separação das células íntegras;

- Utilizar as leveduras selvagens para as reações de biorredução da chalcona **26** com os mesmos parâmetros otimizados da biorredução mediada por FP e comparar os resultados obtidos;
- Comparar os resultados obtidos com outros citados na literatura;
- Organizar e apresentar os resultados.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Biocatálise, do Departamento de Química da UFSC orientado pela Prof^a. Dr^a. Maria da Graça Nascimento, e no Laboratório de Biologia Molecular e Biotecnologia de Leveduras no Departamento de Bioquímica, orientado pelo Prof. Boris Ugarte Stambuk.

As análises de RMN de ^1H , ^{13}C foram realizadas na Central de Análises e as análises de IV foram realizadas no laboratório POLIMAT, ambos localizados no Departamento de Química da UFSC.

3.1 EQUIPAMENTOS

3.1.1 Laboratório de Biocatálise

- Agitadores magnéticos: Dist e/ou Micro Química;
- Rotavapor: R II Buchi;
- Balanças analíticas: Adventurer Ohaus-AR2140 e AND-EK200i;
- Aparelho de ponto de fusão: Micro Química - APF301;
- Banho termostatizado: Micro Química – MQBTZ99-20.

3.1.2 Laboratório de Estudos em Materiais Poliméricos – POLIMAT

- Espectrômetro de infravermelho com modo FTIR/ATR: Shimadzu IR Prestige-21.

3.1.3 Central de Análises no Departamento de Química – UFSC

- Espectrômetro RMN de ^1H , ^{13}C : Varian AC 400F, 400 MHz/100 MHz.

3.1.4 Laboratório de Biologia Molecular e Biotecnologia de Leveduras – LBMBL

- Incubadora e *shaker*: New Brunswick Innova 44;
- Centrífuga: Eppendorf Centrifuge 5804 R.

3.2 REAGENTES, SOLVENTES E LEVEDURAS

3.2.1 Reagentes e solventes

- **Sigma-Aldrich:** Borohidreto de sódio (98%), alginato de sódio (P.A.), D(+)-trealose (P.A.), peptona bacteriológica (P.A.), 4-acetilbifenil (98%), 2-clorobenzaldeído (99%), 3-clorobenzaldeído (97%), 4-clorobenzaldeído (97%), 2-nitrobenzaldeído (98%), 3-nitrobenzaldeído (99%), 4-nitrobenzaldeído (98%), 2-metoxibenzaldeído (98%), 3-metoxibenzaldeído (97%), 4-metoxibenzaldeído (98%).
- **Synth:** *n*-hexano (98,5%), diclorometano (99,5%), metanol (99,5%); etanol (P.A.), clorofórmio (P.A.).
- **Fluka:** Tetrafluoroborato de 1-butil-3-metil-imidazólio ([BMIm]BF₄, 97%), hexafluorofosfato de 1-butil-3-metil-imidazólio ([BMIm]PF₆, 96%). Iodeto de 1-butil-3-metil-imidazólio ([BMIm]I, 98%)
- **Vetec:** Hidróxido de potássio (P.A.), diclorometano (P.A.), cloreto de cálcio anidro (P.A.), Sílica gel 60 G para cromatografia em camada delgada (P.A.), extrato de levedura (P.A.), fosfato de sódio dibásico anidro (P.A.).
- **Reagen:** acetato de etila (P.A.).
- **Grupo Química:** DMSO (P.A.).
- **LAFAN:** Glicose (P.A.).
- **Cromoline:** Metanol (P.A.).
- **CRQ:** Ácido cítrico anidro (P.A.)
- **Cambridge Isotopes Laboratories:** CDCl₃ 99,8% com fita de prata
- **Amresco:** Sacarose (99,9%)

3.2.2 Leveduras

- *Saccharomyces cerevisiae* (FP) marca comercial Fleischmann
- CAT-1 *Saccharomyces cerevisiae* industrial⁴⁷
- PE-2 *Saccharomyces cerevisiae* industrial⁴⁷

- Hmd 19.3 *Spathaspora brasiliensis*
- Hmd 23.3 *Spathaspora xylofermentans*
- Hmd 2.1 *Spathaspora passalidarum*
- Hm 19.1a *Spathaspora arborariae*
- Xmd 16.2 *Spathaspora suhii*
- Xmd 23.2 *Spathaspora roraimanensis*
- Hm 45.1 *Schefferomyces stipis*

3.3 PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

3.3.1 Síntese das chalconas bifenílicas 26-38

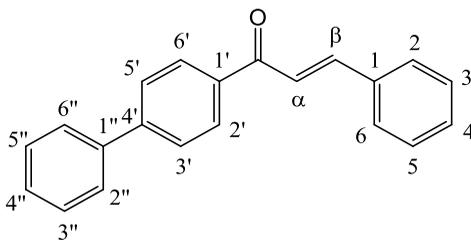
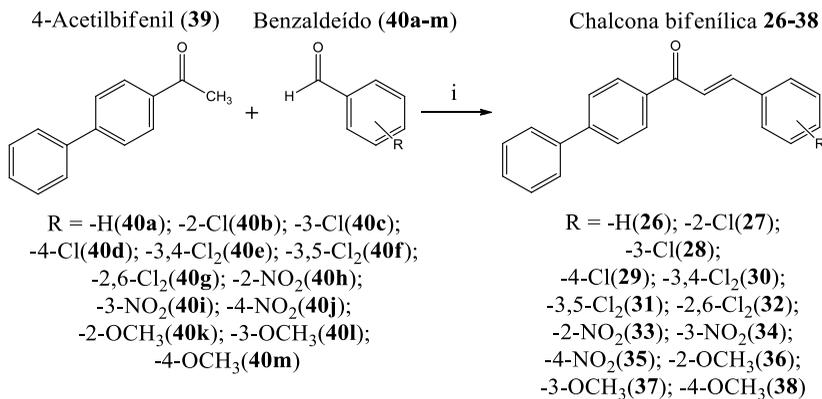
As rotas sintéticas das chalconas bifenílicas **26-38** foram previamente desenvolvidas pela Ma. Jéssica Berens do Laboratório Estrutura e Atividade, coordenado pelo Prof. Dr. Ricardo José Nunes e posteriormente adaptadas para este projeto.

Em um Erlenmeyer de 125 mL foi adicionado a acetofenona 4-acetilbifenil (5 mmol), o respectivo benzaldeído substituído (5 mmol) e 50 mL de etanol. Sob agitação, foi acrescentado hidróxido de potássio 50% m/v (1 mL). A reação foi deixada sob agitação magnética, a temperatura ambiente por 24 h. Em seguida, a reação foi vertida em um béquer contendo água gelada e neutralizada com ácido clorídrico 10% v/v. O precipitado formado foi filtrado a vácuo. Todas as chalconas foram obtidas de forma semelhante, e quando necessário, o produto foi recristalizado utilizando como solvente acetato de etila a quente.

Após a formação do produto, o solvente foi rotaevaporado e o produto foi analisado por RMN de ^1H , RMN de ^{13}C e IV. Os espectros de IV encontram-se no **Apêndice I**, juntamente da tabela de correlação e, os de RMN encontram-se no **Apêndice II**.

Todos os resíduos das sínteses das chalconas bifenílicas **26-38** foram neutralizados e despejados em galões de coleta de resíduos orgânicos.

Figura 20. Rota sintética para a preparação das chalconas **26-38** através da condensação aldólica com **39** e **40a-m**. $i = T_{amb}$, $t = 24$ h, KOH/EtOH/Agitação magnética.



Nomenclatura: (*E*)-1-([1,1'-bifenil]-4-il)-3-fenilprop-2-en-1-ona (**26**)

Fórmula molecular: C₂₁H₁₆O

Aspecto físico: sólido amarelo claro

Peso molecular: 284,35 g.mol⁻¹

Rendimento: 87%

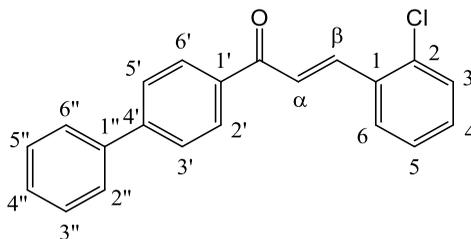
Ponto de fusão: 174 °C

RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ/ppm: 8,12 (d, $J = 8,4$ Hz, H2' e H6'), 7,86 (d, $J = 15,7$ Hz, Hβ), 7,74 (d, $J = 8,4$ Hz, H3' e H5'), 7,70 – 7,64 (m, H2'', H6'', H2, H6), 7,60 (d, $J = 15,7$ Hz, Hα), 7,49 (t, $J = 7,5$ Hz, H3'' e H5''), 7,46 – 7,40 (m, H4'', H3, H4, H5).

RMN de ¹³C (101 MHz, CDCl₃) δ/ppm: 189,91 (C=O), 145,55 (C4'), 144,78 (Cβ), 139,95 (C1''), 136,94 (C1'), 134,98 (C1), 130,61 (C2' e C6'), 129,20 (C2 e C6), 129,03 (C3'' e C5''), 128,55 (C3 e C5), 128,28 (C3' e C5'), 127,33 (C2'', C4'', C6'', C4), 122,03 (Cα).

IV (KBr) cm^{-1} : 3493 (w)*, 3049 (w), 3026 (w), 1950-1737 (w), 1654 (s), 1591 (s), 983 (s), 837 (s), 750 (vs), 686 (s).

* umidade

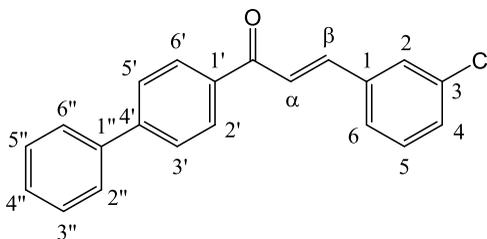


Nomenclatura: (*E*)-1-([1,1'-bifenil]-4-il)-3-(2-clorofenil)prop-2-en-1-ona (**27**)

Fórmula molecular: $\text{C}_{21}\text{H}_{15}\text{ClO}$

Peso molecular: $318,80 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

Rendimento: O composto não foi obtido com sucesso.



Nomenclatura: (*E*)-1-([1,1'-bifenil]-4-il)-3-(3-clorofenil)prop-2-en-1-ona (**28**)[‡]

Fórmula molecular: $\text{C}_{21}\text{H}_{15}\text{ClO}$

Aspecto físico: sólido amarelo

Peso molecular: $318,80 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

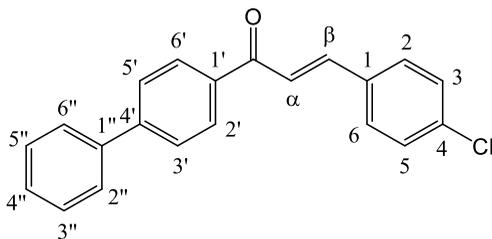
Rendimento: 79%

Ponto de fusão: $155 \text{ }^\circ\text{C}$

RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ/ppm : 8,12 (d, $J = 8,3 \text{ Hz}$, $\text{H}_{2'}$ e $\text{H}_{6'}$), 7,78 (d, $J = 16,8 \text{ Hz}$, H_β), 7,75 (d, $J = 8,4 \text{ Hz}$, $\text{H}_{3'}$ e $\text{H}_{5'}$), 7,68-7,64 (m, $\text{H}_{3''}$, $\text{H}_{4''}$, $\text{H}_{5''}$), 7,59 (d, $J = 15,7 \text{ Hz}$, H_α), 7,55-7,50 (m, 1H), 7,48 (d, $J = 7,8 \text{ Hz}$, 1H), 7,43 (d, $J = 7,2 \text{ Hz}$, H_6), 7,39 (s, H_2), 7,38 (d, $J = 9,6 \text{ Hz}$, H_4).

RMN de ^{13}C (101 MHz, CDCl_3) δ/ppm : 145,94 ($\text{C}4'$), 143,11 ($\text{C}\beta$), 136,95 ($\text{C}1''$), 135,16 ($\text{C}1'$), 130,49 ($\text{C}1$), 130,37 ($\text{C}3$), 129,31 ($\text{C}2'$ e $\text{C}6'$), 129,13 ($\text{C}3''$ e $\text{C}5''$), 128,43 ($\text{C}5$), 128,06 ($\text{C}4''$), 127,51 ($\text{C}3'$ e $\text{C}5'$), 127,45 ($\text{C}4$, $\text{C}2''$, $\text{C}6''$), 126,98 ($\text{C}2$ e $\text{C}6$), 123,36 ($\text{C}\alpha$).

IV (KBr) cm^{-1} : 3485 (w)*, 3089 (w), 3059 (w), 3035 (w), 1955-1778(w), 1656 (s), 1593 (s), 981 (s), 835 (s), 794 (s), 767 (s), 731 (s), 686 (s), 520 (m), 443 (m)



Nomenclatura: (*E*)-1-([1,1'-bifenil]-4-il)-3-(4-clorofenil)prop-2-en-1-ona (**29**)[≠]

Fórmula molecular: $\text{C}_{21}\text{H}_{15}\text{ClO}$

Aspecto físico: sólido amarelo

Peso molecular: 318,80 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$

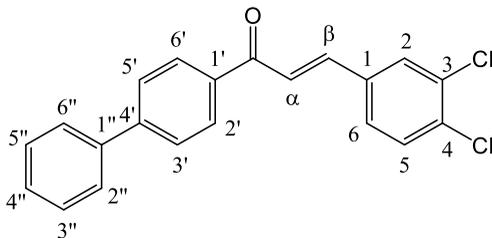
Rendimento: 86%

Ponto de fusão: 187 °C

RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ/ppm : 8,11 (d, $J = 8,2$ Hz, $\text{H}2'$ e $\text{H}6'$), 7,80 (d, $J = 15,7$ Hz, $\text{H}\beta$), 7,74 (d, $J = 8,1$ Hz, $\text{H}3'$ e $\text{H}5'$), 7,66 (d, $J = 7,1$ Hz, $\text{H}3$ e $\text{H}5$), 7,60 (d, $J = 8,6$ Hz, $\text{H}2$ e $\text{H}6$), 7,56 (d, $J = 15,7$ Hz, $\text{H}\alpha$), 7,49 (t, $J = 7,4$ Hz, $\text{H}3''$, $\text{H}4''$, $\text{H}5''$), 7,41 (d, $J = 8,1$ Hz, $\text{H}2''$ e $\text{H}6''$).

RMN de ^{13}C (101 MHz, CDCl_3) δ/ppm : 189,77 ($\text{C}=\text{O}$), 145,84 ($\text{C}4'$), 143,36 ($\text{C}\beta$), 140,03 ($\text{C}1''$), 136,87 ($\text{C}4$), 136,59 ($\text{C}1$), 133,58 ($\text{C}1'$), 129,75 ($\text{C}2'$ e $\text{C}6'$), 129,41 ($\text{C}2$ e $\text{C}6$), 129,27 ($\text{C}3$ e $\text{C}5$), 129,12 ($\text{C}3''$ e $\text{C}5''$), 128,41 ($\text{C}4''$), 127,48 ($\text{C}2''$ e $\text{C}6''$), 127,44 ($\text{C}3'$ e $\text{C}5'$), 122,56 ($\text{C}\alpha$).

IV (KBr) cm^{-1} : 3452 (w)*, 3059 (w), 3035 (w), 1917 (w), 1654 (s), 1608 (s), 979 (s), 819 (s), 767 (s), 686 (s), 628 (w), 495 (s).



Nomenclatura: (*E*)-1-([1,1'-bifenil]-4-il)-3-(3,4-diclorofenil)prop-2-en-1-ona (**30**)

Fórmula molecular: C₂₁H₁₄Cl₂O

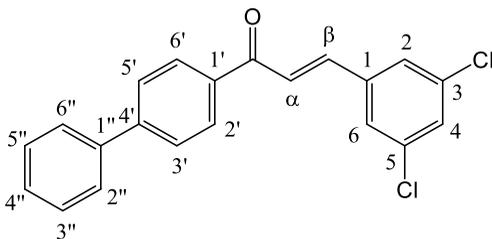
Aspecto físico: sólido amarelo

Peso molecular: 353,24 g.mol⁻¹

Rendimento: 45%

Ponto de fusão: 169 °C

RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ/ppm: 8,11 (d, *J* = 8,5 Hz, H2' e H6'), 7,74 (d, *J* = 8,2 Hz, H3' e H5'), 7,73 (d, *J* = 16,2 Hz, Hβ), 7,66 (d, *J* = 7,5 Hz, H6), 7,57 (d, *J* = 15,7 Hz, Hα), 7,53 – 7,45 (m, H2'', H3'', H4'', H5'', H6''), 7,43 (d, *J* = 7,4 Hz, H5).



Nomenclatura: (*E*)-1-([1,1'-bifenil]-4-il)-3-(3,5-diclorofenil)prop-2-en-1-ona (**31**)[≠]

Fórmula molecular: C₂₁H₁₄Cl₂O

Aspecto físico: sólido branco

Peso molecular: 353,24 g.mol⁻¹

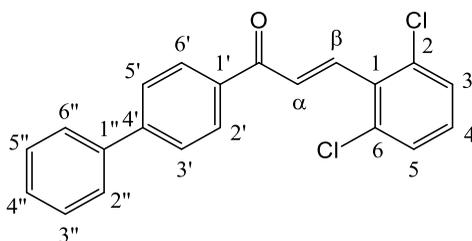
Rendimento: 98%

Ponto de fusão: 168 °C

RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ/ppm: 8,11 (d, *J* = 8,1 Hz, H2' e H6'), 7,75 (d, *J* = 8,1 Hz, H3' e H5'), 7,70 (d, *J* = 16,0 Hz, Hβ), 7,66 (d, *J* = 7,5

Hz, H2'' e H6''), 7,58 (d, $J = 15,6$ Hz, H α), 7,53 (d, $J = 1,9$ Hz, H2 e H6), 7,49 (t, $J = 7,6$ Hz, H3'' e H5''), 7,42 (s, H4), 7,41 (t, $J = 1,6$ Hz, H4'').

RMN de ^{13}C (101 MHz, CDCl_3) δ/ppm : 189,21 (C=O), 146,17 (C4'), 141,56 (C β), 139,95 (C1''), 138,11 (C1), 136,48 (C1'), 135,81 (C3 e C5), 130,15 (C4), 129,35 (C2' e C6'), 129,15 (C3'' e C5''), 128,50 (C4''), 127,57 (C3' e C5'), 127,46 (C2'' e C6''), 126,66 (C2 e C6), 124,49 (C α)
IV (KBr) cm^{-1} : 3452 (w)*, 3070 (s), 3030 (m), 1948-1737 (w), 1662 (vs), 1610 (vs), 991 (vs), 833 (vs), 796 (vs), 736 (vs), 692 (vs), 534 (s), 491 (m)



Nomenclatura: (E)-1-([1,1'-bifenil]-4-il)-3-(2,6-diclorofenil)prop-2-en-1-ona (**32**)[‡]

Fórmula molecular: $\text{C}_{21}\text{H}_{14}\text{Cl}_2\text{O}$

Aspecto físico: sólido amarelo

Peso molecular: 353,24 g.mol⁻¹

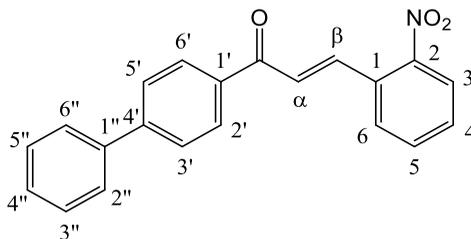
Rendimento: 93% sem recristalização

Ponto de fusão: 112 °C

RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ/ppm : 8,12 (d, $J = 8,4$ Hz, H2' e H6'), 7,90 (d, $J = 16,1$ Hz, H β), 7,74 (d, $J = 8,4$ Hz, H3' e H5'), 7,68 (d, $J = 15,9$ Hz, H α), 7,66 (d, $J = 8,6$ Hz, H2'' e H6''), 7,49 (t, $J = 7,4$ Hz, H3'' e H5''), 7,43 (t, $J = 1,3$ Hz, H4''), 7,40 (d, $J = 8,0$ Hz, H3, H5), 7,22 (t, $J = 8,0$ Hz, H4).

RMN de ^{13}C (101 MHz, CDCl_3) δ/ppm : 189,61 (C=O), 145,88 (C4'), 139,86 (C β), 137,76 (C1''), 136,39 (C1), 135,27 (C2 e C6), 132,70 (C α), 130,47 (C4), 129,92 (C1'), 129,41 (C3 e C5), 129,04 (C3' e C5'), 128,94 (C3'' e C5''), 128,35 (C4''), 127,40 (C2'' e C6''), 127,34 (C2' e C6').

IV (KBr) cm^{-1} : 3072 (s), 3055 (s), 3026 (s), 1934-1859 (w), 1670 (vs), 1610 (vs), 970 (vs), 839 (s), 769 (vs), 732 (vs), 694 (vs), 605 (s), 543 (m), 513 (s), 466 (s).



Nomenclatura: (*E*)-1-([1,1'-bifenil]-4-yl)-3-(2-nitrofenil)prop-2-en-1-ona (**33**)[‡]

Fórmula molecular: $\text{C}_{21}\text{H}_{15}\text{NO}_3$

Aspecto físico: sólido branco perolado

Peso molecular: $329,35 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

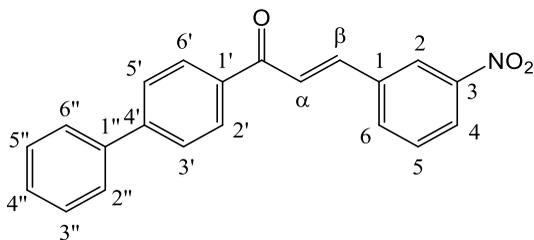
Rendimento: 40% sem recristalização

Ponto de fusão: $120 \text{ }^\circ\text{C}$

RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ/ppm : 8,20 (d, $J = 3,5 \text{ Hz}$, H3), 8,16 (d, $J = 3,5 \text{ Hz}$, H6), 8,14 (d, $J = 16,6 \text{ Hz}$, H β), 7,75 (d, $J = 6,7 \text{ Hz}$, H2' e H6'), 7,73 (d, $J = 6,5 \text{ Hz}$, H3' e H5'), 7,65 (t, $J = 7,3 \text{ Hz}$, H4 e H5), 7,54 – 7,45 (m, H3'', H4'', H5''), 7,42 (dd, $J = 7,4, 1,5 \text{ Hz}$, H2'' e H6''), 7,37 (d, $J = 15,7 \text{ Hz}$, H α).

RMN de ^{13}C (101 MHz, CDCl_3) δ/ppm : 190,08 (C=O), 146,03 (C2), 140,20 (C1''), 139,95 (C4'), 136,25 (C β), 133,69 (C5), 131,54 (C α), 130,47 (C1), 129,57 (C3' e C5'), 129,42 (C4 e C6), 129,12 (C3'' e C5''), 128,44 (C4''), 127,52 (C2'' e C6''), 127,44 (C2' e C6'), 125,16 (C3).

IV (KBr) cm^{-1} : 3074 (w), 3030 (w), 1897 (w), 1670 (s), 1598 (s), 1572 (s), 1348 (s), 837 (s), 769 (s), 752 (s), 688 (s), 576 (m), 551 (w).



Nomenclatura: (*E*)-1-([1,1'-bifenil]-4-il)-3-(3-nitrofenil)prop-2-en-1-ona (**34**)

Fórmula molecular: C₂₁H₁₅NO₃

Aspecto físico: sólido amarelo

Peso molecular: 329,35 g.mol⁻¹

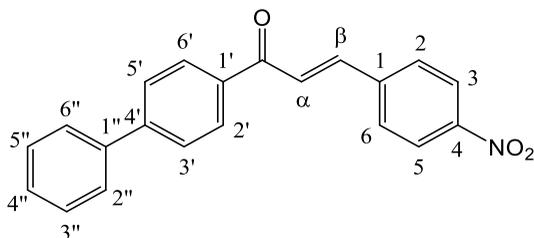
Rendimento: 98% sem recristalização

Ponto de fusão: 170 °C

RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ/ppm: 8,54 (t, *J* = 1,9 Hz, H₂), 8,27 (ddd, *J* = 8,3; 2,2; 0,9 Hz, H₄), 8,14 (d, *J* = 8,3 Hz, H₂' e H₆'), 7,94 (d, *J* = 7,7 Hz, H₆), 7,87 (d, *J* = 15,7 Hz, H_β), 7,77 (d, *J* = 8,3 Hz, H₃' e H₅'), 7,71 (d, *J* = 15,7 Hz, H_α), 7,67 (dd, *J* = 8,4; 1,2 Hz, H₂'' e H₆''), 7,63 (t, *J* = 7,9 Hz, H₅), 7,50 (t, *J* = 7,6 Hz, H₃'' e H₅''), 7,42 (t, *J* = 7,3 Hz, H₄'').

RMN de ¹³C (101 MHz, CDCl₃) δ/ppm: 189,18 (C=O), 146,21 (C₃), 141,67 (C_β), 139,89 (C₁''), 136,86 (C₁'), 136,41 (C₁), 134,49 (C₆), 130,19 (C₅), 129,37 (C₃' e C₅'), 129,15 (C₃'' e C₅''), 128,51 (C₄''), 127,58 (C₂'' e C₆''), 127,45 (C₂' e C₆'), 124,79 (C₄), 124,72 (C₂), 122,48 (C_α).

IV (KBr) cm⁻¹: 3074 (m), 3032 (m), 1909-1749 (w), 1670 (vs), 1600 (vs), 1525 (vs), 1346 (vs), 989 (vs), 837 (vs), 769 (vs), 750 (vs), 692 (vs), 574 (m), 547(m), 484 (m).



Nomenclatura: (*E*)-1-([1,1'-bifenil]-4-il)-3-(4-nitrofenil)prop-2-en-1-ona (**35**)

Fórmula molecular: C₂₁H₁₅NO₃

Aspecto físico: sólido amarelo

Peso molecular: 329,35 g.mol⁻¹

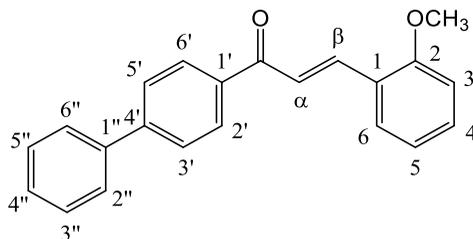
Rendimento: 92% sem recristalização

Ponto de fusão: 185 - 190 °C

RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ/ppm: 8,30 (d, *J* = 8,7 Hz, H3 e H5), 8,13 (d, *J* = 8,6 Hz, H2 e H6), 7,86 (d, *J* = 15,7 Hz, Hβ), 7,81 (d, *J* = 8,5 Hz, H2' e H6'), 7,76 (d, *J* = 8,6 Hz, H3' e H5'), 7,70 (d, *J* = 15,8 Hz, Hα), 7,66 (dd, *J* = 7,0, 1,4 Hz, H2'' e H6''), 7,50 (t, *J* = 7,4 Hz, H3'' e H5''), 7,43 (t, *J* = 4,7 Hz, H4'').

RMN de ¹³C (101 MHz, CDCl₃) δ/ppm: 189,19 (C=O), 141,57 (C1''), 141,24 (C4'), 129,37 (C2 e C6), 129,16 (C3' e C5'), 129,09 (C3'' e C5''), 128,55 (C4''), 127,60 (C2'' e C6''), 127,44 (C2' e C6'), 125,82, 124,38 (C3 e C5), 123,68 (Cα).

IV (KBr) cm⁻¹: 3078 (w), 3061 (w), 1932-1755 (w), 1658 (s), 1606 (s), 1517 (s), 1344 (s), 983 (s), 831 (s), 750 (s), 692 (s), 583 (m), 480 (s)



Nomenclatura: (*E*)-1-([1,1'-bifenil]-4-il)-3-(2-metoxifenil)prop-2-en-1-ona (**36**)[≠]

Fórmula molecular: C₂₂H₁₈O₂

Aspecto físico: sólido amarelo

Peso molecular: 314,38 g.mol⁻¹

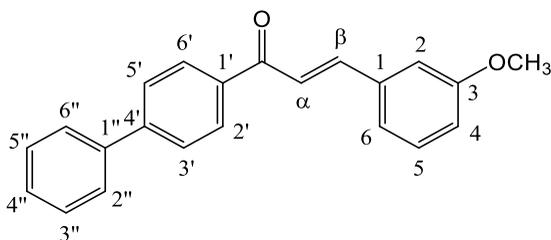
Rendimento: 77% sem recristalização

Ponto de fusão: 115 – 118 °C

RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ/ppm: 8,16 (d, *J* = 15,9 Hz, Hβ), 8,11 (d, *J* = 8,5 Hz, H2' e H6'), 7,73 (d, *J* = 8,5 Hz, H3' e H5'), 7,68 (d, *J* = 15,9 Hz, Hα), 7,66 (dd, *J* = 6,6, 1,8 Hz, H6, H2'', H6''), 7,49 (t, *J* = 7,4 Hz, H3'' e H5''), 7,44 – 7,37 (m, H4, H4''), 7,01 (t, *J* = 7,2 Hz, H5), 6,96 (d, *J* = 8,5 Hz, H3), 3,94 (s, -OCH₃).

RMN de ¹³C (50 MHz, CDCl₃) δ/ppm: 190,75 (C=O), 159,00 (C2), 145,43 (C4'), 140,0 (C1''), 140,22 (Cβ), 137,40 (C1'), 131,91 (C4), 129,43 (C6), 129,31 (C3' e C5'), 129,10 (C3'' e C5''), 128,28 (C4''), 127,38 (C2'' e C6), 123,02 (Cα), 120,92 (C5), 111,41 (C3), 55,72 (-OCH₃).

IV (KBr) cm⁻¹: 3068 (w), 3003 (w), 2843 (w), 1938-1905 (w), 1654 (vs), 1583 (vs), 1033 (vs), 989 (s) 835 (s), 744 (vs), 692 (vs), 586 (m), 470 (m).



Nomenclatura: (E)-1-([1,1'-bifenil]-4-il)-3-(3-metoxifenil)prop-2-en-1-ona (37) ≠

Fórmula molecular: C₂₂H₁₈O₂

Aspecto físico: sólido amarelo

Peso molecular: 314,38 g.mol⁻¹

Rendimento: 84% sem recristalização

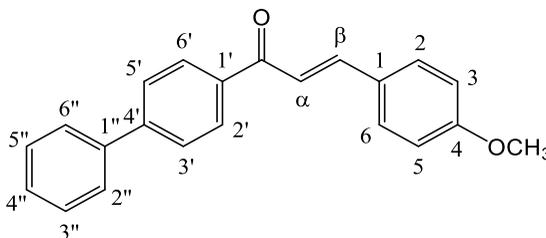
Ponto de fusão: 126 °C

RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ/ppm: 8,11 (d, *J* = 8,6 Hz, H2' e H6'), 7,81 (d, *J* = 15,7 Hz, Hβ), 7,74 (d, *J* = 8,6 Hz, H3' e H5'), 7,66 (dd, *J* = 8,3; 1,3 Hz, H2'' e H6''), 7,57 (d, *J* = 15,7 Hz, Hα), 7,49 (t, *J* = 7,4 Hz, H3'' e H5''), 7,42 (dt, *J* = 9,5, 4,3 Hz, H4''), 7,35 (t, *J* = 7,9 Hz, H5), 7,28

(s, H6), 7,18 (t, $J = 1$ Hz, H2), 6,98 (ddd, $J = 8,2, 2,5, 0,9$ Hz, H4), 3,87 (s, $-\text{OCH}_3$).

RMN de ^{13}C (101 MHz, CDCl_3) δ/ppm : 190,11 (C=O), 160,12 (C3), 145,71 (C4'), 144,83 (C β), 140,09 (C1''), 137,03 (C1'), 136,47 (C1), 130,11 (C5), 129,28 (C3' e C5'), 129,11 (C3'' e C5''), 128,36 (C4''), 127,45 (C2'' e C6''), 122,51 (C α), 121,27 (C6), 116,45 (C4), 113,63 (C2), 55,53 ($-\text{OCH}_3$).

IV (KBr) cm^{-1} : 3057 (m), 2995 (m), 2835 (m), 1959-1759 (w), 1680 (vs0), 1656 (vs), 1600 (vs), 1508 (vs), 977 (vs), 821 (vs), 771 (vs), 738 (vs), 692 (vs), 592 (s), 532 (s), 455 (m).



Nomenclatura: (*E*)-1-([1,1'-bifenil]-4-il)-3-(4-metoxifenil)prop-2-en-1-ona (**38**)

Fórmula molecular: $\text{C}_{22}\text{H}_{18}\text{O}_2$

Aspecto físico: sólido amarelo

Peso molecular: 314,38 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$

Rendimento: 44% sem recristalização

Ponto de fusão: 115 $^{\circ}\text{C}$

RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ/ppm : 8,10 (d, $J = 8,6$ Hz, H2' e H6'), 8,04 (d, $J = 8,6$ Hz, H3' e H5'), 7,83 (d, $J = 15,6$ Hz, H β), 7,73 (d, $J = 8,6$ Hz, H2'' e H6''), 7,69 (d, $J = 8,6$ Hz, H2 e H6), 7,65 (d, $J = 16,0$ Hz, H α), 7,51 – 7,45 (m, H3'', H5''), 7,41 (td, $J = 7,3, 1,2$ Hz, H4''), 6,95 (d, $J = 8,8$ Hz, H3 e H5), 3,87 (s, $-\text{OCH}_3$).

RMN de ^{13}C (101 MHz, CDCl_3) δ/ppm : 190,14 (C=O), 161,85 (C4), 145,46 (C4'), 144,77 (C β), 140,18 (C1''), 137,37 (C1'), 130,40 (C2 e C6), 129,18 (C3' e C5'), 129,09 (C3'' e C5''), 129,06, 128,37 (C1), 128,29 (C4''), 127,43 (C2'' e C6''), 127,39 (C2' e C6'), 119,89 (C α), 114,59 (C3 e C5), 55,58 ($-\text{OCH}_3$).

IV (KBr) cm^{-1} : 3057 (m), 2995 (m), 2835 (m), 1959-1759 (w), 1680 (vs), 1656 (vs), 1600 (vs), 1508 (vs), 977 (s), 821 (vs), 771 (vs), 783 (vs), 692 (vs), 592 (s), 532 (s), 491 (m), 455 (m).

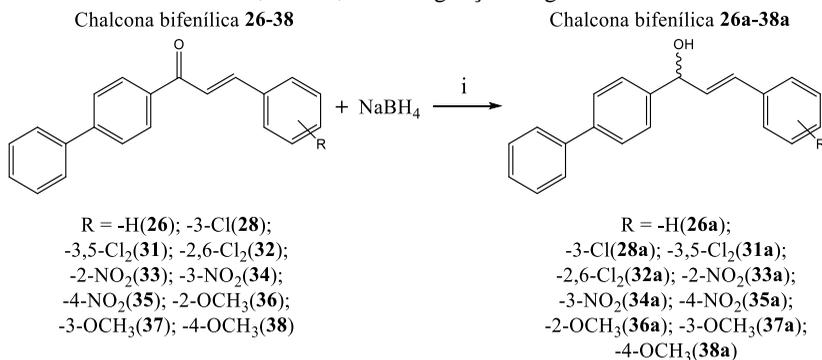
\neq = compostos inéditos.

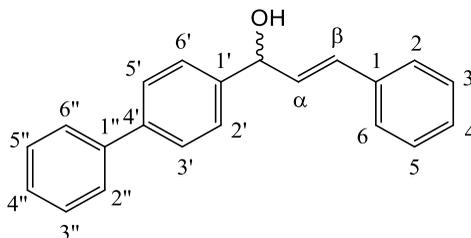
3.3.2 Redução *via* NaBH_4

Em um Erlenmeyer foi adicionado 0,5 mmol das chalconas **26-38** em 20 mL de EtOH absoluto e, em alguns casos, aproximadamente 5 mL de clorofórmio para auxiliar na solubilização dos compostos no meio reacional. Lentamente, foram adicionados 4 mmols de NaBH_4 , e a reação foi deixada sob agitação magnética na capela por cerca de 6h e monitorada por CCD (eluente n-hexano/acetato de etila 7:3) (**Figura 21**). Após a formação do produto, o solvente foi evaporado e o produto foi analisado por RMN de ^1H . Os espectros de RMN de ^1H dos álcoois encontram-se no **Apêndice II**.

Nesta reação, não foi necessário um tratamento de resíduos, pois o solvente foi evaporado.

Figura 21. Equação da reação de redução das chalconas 26-38 com NaBH_4 . $i = \text{Tamb}$, $t = 6 \text{ h}$, EtOH/Agitação magnética.





Nomenclatura: (*E*)-1-([1,1'-bifenil]-4-il)-3-fenilprop-2-en-1-ol (**26a**)

Fórmula molecular: C₂₁H₁₈O

Aspecto físico: sólido branco

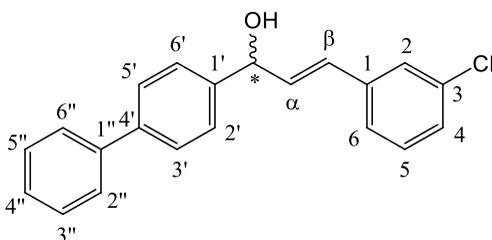
Peso molecular: 286,37 g.mol⁻¹

Rendimento: 71% sem recristalização

Ponto de fusão: >200 °C

RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ/ppm: 7,61 (d, *J* = 8,3 Hz, H3' e H5'), 7,59 (dd, *J* = 6,9, 1,2 Hz, H2'' e H6''), 7,52 (d, *J* = 8,3 Hz, H2' e H6'), 7,48 – 7,39 (m, H3, H5, H3'' e H5''), 7,36 (ddd, *J* = 7,2, 3,8, 1,5 Hz, H4''), 7,31 (d, *J* = 7,8 Hz, H2 e H6), 7,25 (t, *J* = 7,3 Hz, H4), 6,74 (d, *J* = 15,8 Hz, Hβ), 6,43 (dd, *J* = 15,8, 6,6 Hz, Hα).

IV (KBr) cm⁻¹: 3352 (vs), 3080 (s), 3055 (s), 3026 (s), 1950 (w), 1654 (m), 1597 (m), 1004 (vs), 964 (vs), 752 (vs), 692 (vs), 605 (m), 567 (m), 514 (m)



Nomenclatura: (*E*)-1-([1,1'-bifenil]-4-il)-3-(3-clorofenil)prop-2-en-1-ol (**28a**)

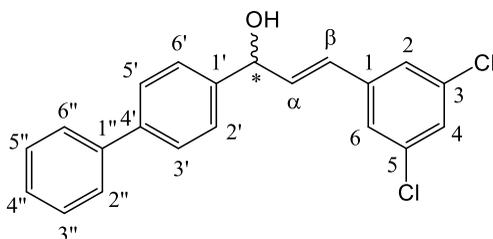
Fórmula molecular: C₂₁H₁₇ClO

Aspecto físico: sólido branco

Peso molecular: 320,81 g.mol⁻¹

Ponto de fusão: >200 °C

RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ/ppm : 7,64 (dd, $J = 4,9, 1,6$ Hz, $\text{H}2''$ e $\text{H}6''$), 7,62 (d, $J = 5,3$ Hz, $\text{H}3'$ e $\text{H}5'$), 7,51 (d, $J = 8,2$ Hz, $\text{H}2'$ e $\text{H}6'$), 7,48 (t, $J = 7,5$ Hz, $\text{H}3''$ e $\text{H}5''$), 7,47 (s, $\text{H}2$), 7,45 (d, $J = 6,8$ Hz, $\text{H}6$) 7,43 – 7,35 (m, $\text{H}4''$), 7,31 – 7,20 (m, $\text{H}4$ e $\text{H}5$), 6,69 (d, $J = 16,9$ Hz, $\text{H}\beta$), 6,45 (dd, $J = 15,8, 6,3$ Hz, $\text{H}\alpha$), 5,44 (d, $J = 6,1$ Hz, H^*).



Nomenclatura: (*E*)-1-([1,1'-bifenil]-4-il)-3-(3,5-diclorofenil)prop-2-en-1-ol (**31a**)

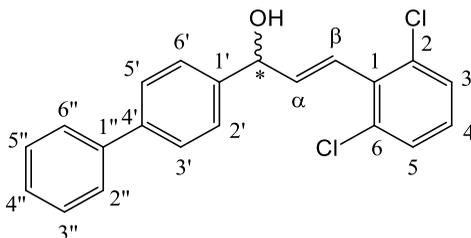
Fórmula molecular: $\text{C}_{21}\text{H}_{16}\text{Cl}_2\text{O}$

Aspecto físico: sólido branco

Peso molecular: 355,26 g.mol $^{-1}$

Ponto de fusão: >200 °C

RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ/ppm : 7,62 (d, $J = 8,3$ Hz, $\text{H}2''$ e $\text{H}5''$), 7,60 (d, $J = 8,2$ Hz, $\text{H}3'$ e $\text{H}5'$), 7,47 (d, $J = 8,1$ Hz, $\text{H}2'$ e $\text{H}6'$), 7,42 (t, $J = 5,9$ Hz, $\text{H}3''$ e $\text{H}5''$), 7,39 – 7,34 (m, $\text{H}4''$), 7,26 (d, $J = 1,6$ Hz, $\text{H}2$ e $\text{H}6$) 7,23 (t, $J = 1,8$ Hz, $\text{H}4$), 6,62 (d, $J = 16,6$ Hz, $\text{H}\beta$), 6,43 (dd, $J = 15,8, 6,0$ Hz, $\text{H}\alpha$), 4,71 (s, -OH).



Nomenclatura: (*E*)-1-([1,1'-bifenil]-4-il)-3-(2,6-diclorofenil)prop-2-en-1-ol (**32a**)

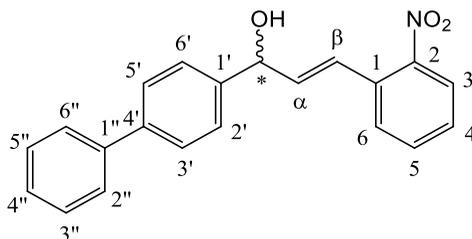
Fórmula molecular: $\text{C}_{21}\text{H}_{16}\text{Cl}_2\text{O}$

Aspecto físico: sólido branco

Peso molecular: 355,26 g.mol⁻¹

Ponto de fusão: >200 °C

RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ/ppm: 7,63 (d, *J* = 7,9 Hz, H3' e H5'), 7,62 (d, *J* = 7,0 Hz, H2'' e H6''), 7,57 (d, *J* = 8,2 Hz, H2' e H6'), 7,46 (t, *J* = 7,5 Hz, H3'' e H5''), 7,39 – 7,34 (m, H4''), 7,32 (d, *J* = 8,0 Hz, H3 e H5), 7,10 (t, *J* = 7,9 Hz, H4), 6,80 (dd, *J* = 16,2, 1,2 Hz, Hβ), 6,47 (dd, *J* = 16,2, 5,9 Hz, Hα), 5,50 (d, *J* = 5,7 Hz, H*).



Nomenclatura: (*E*)-1-([1,1'-bifenil]-4-il)-3-(2-nitrofenil)prop-2-en-1-ol
(33a)

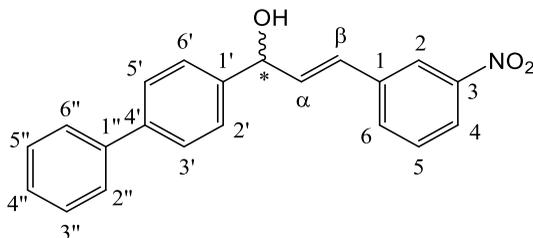
Fórmula molecular: C₂₁H₁₇NO₃

Aspecto físico: sólido branco

Peso molecular: 331,36 g.mol⁻¹

Ponto de fusão: >200 °C

RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ/ppm: 7,95 (dd, *J* = 8,2, 1,1 Hz, H3), 7,63 (d, *J* = 8,3 Hz, H3' e H5'), 7,62 – 7,55 (m, H2', H6', H2'', H6''), 7,56 - 7,50 (m, H4, H5, H6), 7,44 (t, *J* = 7,5 Hz, H3'' e H5''), 7,41 – 7,32 (m, H4''), 7,24 (d, *J* = 15 Hz, Hβ), 6,38 (dd, *J* = 15,6, 6,3 Hz, Hα), 5,49 (d, *J* = 6,3 Hz, H*), 4,54 (s, -OH).



Nomenclatura: (*E*)-1-([1,1'-bifenil]-4-il)-3-(3-nitrofenil)prop-2-en-1-ol
(34a)

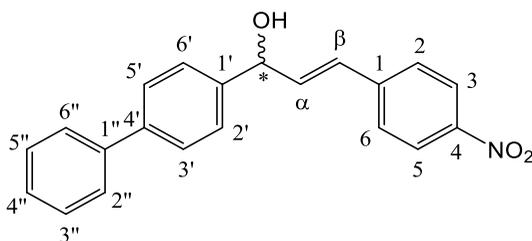
Fórmula molecular: C₂₁H₁₇NO₃

Aspecto físico: sólido branco

Peso molecular: 331,36 g.mol⁻¹

Ponto de fusão: >200 °C

RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ/ppm: 8,25 (t, *J* = 1,9 Hz, H₂), 8,08 (d, *J* = 7,9 Hz, H₄), 7,69 (d, *J* = 7,7 Hz, H₆), 7,62 (d, *J* = 8,2 Hz, H_{3'} e H_{5'}), 7,59 (d, *J* = 8,3 Hz, H_{2''} e H_{6''}), 7,53 – 7,42 (m, H₅, H_{2'} e H_{6'}), (7,40 – 7,31 (m, H_{3''}, H_{4''}, H_{5''}), 6,80 (d, *J* = 15,8 Hz, H_β), 6,56 (dd, *J* = 15,8, 5,9 Hz, H_α), 5,48 (d, *J* = 5,9 Hz, H^{*}).



Nomenclatura: (E)-1-([1,1'-bifenil]-4-il)-3-(4-nitrofenil)prop-2-en-1-ol
(35a)

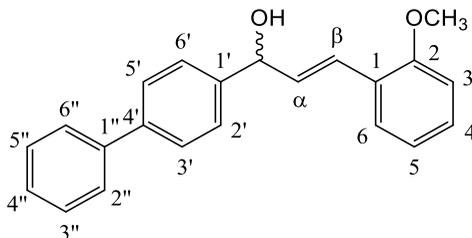
Fórmula molecular: C₂₁H₁₇NO₃

Aspecto físico: sólido branco

Peso molecular: 331,36 g.mol⁻¹

Ponto de fusão: >200 °C

RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ/ppm: 8,17 (d, *J* = 8,8 Hz, H₃ e H₅), 8,14 (d, *J* = 8,8 Hz, H₂ e H₆), 7,63 (d, *J* = 8,3 Hz, H_{3'} e H_{5'}), 7,61 – 7,57 (m, H_{2''} e H_{6''}), 7,51 (dd, *J* = 11,5, 8,5 Hz, H_{2'} e H_{6'}), 7,44 (dd, *J* = 15,9, 7,8 Hz, H_{3''} e H_{5''}), 7,39 – 7,33 (m, H_{4''}), 6,82 (d, *J* = 15,9 Hz, H_β), 6,60 (dd, *J* = 15,9, 5,8 Hz, H_α), 5,49 (d, *J* = 5,3 Hz, H^{*}).



Nomenclatura: (*E*)-1-([1,1'-bifenil]-4-il)-3-(2-metoxifenil)prop-2-en-1-ol (**36a**)

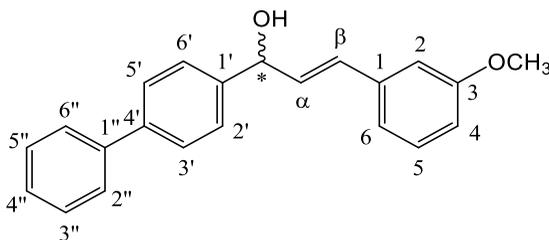
Fórmula molecular: C₂₂H₂₀O₂

Aspecto físico: sólido branco

Peso molecular: 316,39 g.mol⁻¹

Ponto de fusão: >200 °C

RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ/ppm: 7,61 (d, *J* = 7,8 Hz, H2'', H6'', H3' e H5'), 7,54 (d, *J* = 8,1 Hz, H2' e H6'), 7,46 (t, *J* = 7,5 Hz, H3'' e H5''), 7,36 (t, *J* = 7,3 Hz, H4''), 7,29 – 7,21 (m, H4), 7,10 (d, *J* = 15,9 Hz, Hβ), 6,93 (t, *J* = 7,5 Hz, H5), 6,89 (d, *J* = 8,3 Hz, H6), 6,46 (dd, *J* = 16,0, 7.0 Hz, Hα), 5,46 (d, *J* = 6,8 Hz, H*), 3,87 (s, -OCH₃).



Nomenclatura: (*E*)-1-([1,1'-bifenil]-4-il)-3-(3-metoxifenil)prop-2-en-1-ol (**37a**)

Fórmula molecular: C₂₂H₂₀O₂

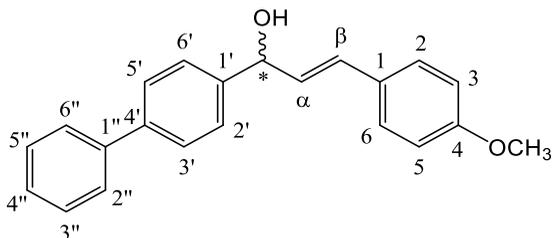
Aspecto físico: sólido branco

Peso molecular: 316,39 g.mol⁻¹

Ponto de fusão: >200 °C

RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ/ppm: 7,68 – 7,58 (m, H3', H5', H2'', H6''), 7,53 (d, *J* = 8,1 Hz, H2' e H6'), 7,47 (t, *J* = 7,5 Hz, H3'' e H5''), 7,38 (t, *J* = 7,3 Hz, H4''), 7,03 (d, *J* = 7,7 Hz, H4), 6,97 (s, H2), 6,84 (dd,

$J = 8,2, 2,5$ Hz, H β), 6,72 (d, $J = 15,8$ Hz, H β), 6,44 (dd, $J = 15,8, 6,5$ Hz, H α), 5,44 (d, $J = 6,4$ Hz, H*), 3,82 (s, -OCH $_3$).



Nomenclatura: (*E*)-1-([1,1'-bifenil]-4-il)-3-(4-metoxifenil)prop-2-en-1-ol (**38a**)

Fórmula molecular: C $_{22}$ H $_{20}$ O $_2$

Aspecto físico: sólido branco

Peso molecular: 316,39 g.mol $^{-1}$

Ponto de fusão: >200 °C

RMN de ^1H (400 MHz, CDCl $_3$) δ /ppm: 7,61 (dd, $J = 7,7, 2,4$ Hz, H3', H5', H2'', H6''), 7,52 (d, $J = 8,3$ Hz, H2' e H6'), 7,46 (t, $J = 7,6$, H3'', H4'', H5''), 7,39 – 7,33 (m, H2 e H6), 6,86 (d, $J = 8,8$ Hz, H3 e H5), 6,67 (d, $J = 15,8$ Hz, H β), 6,29 (dd, $J = 15,8, 6,8$ Hz, H α), 5,41 (d, $J = 6,7$ Hz, H*), 3,81 (s, -OCH $_3$).

3.3.3 Biorredução utilizando fermento de pão comercial (FP) em sistema bifásico

A reação de biorredução da chalcona bifenílica **26** foi realizada sob diferentes condições experimentais e as biorreduções das chalconas **27-38** foram realizadas sob a condição otimizada.

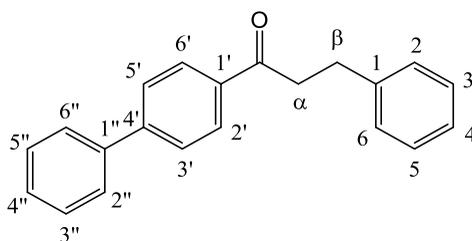
O biocatalisador principal utilizado foi a levedura *S. cerevisiae* (FP). Em uma reação típica, em um erlenmeyer de 125 mL solubilizou-se 50 mg do substrato **26** (aprox. $1,8 \times 10^{-4}$ mol) na fase orgânica composta de 4,5 mL de DMSO, 30 mL de *n*-hexano, e a seguir adicionou-se a fase aquosa, composta de 30 mL de solução tampão K $_2$ HPO $_4$ /ácido cítrico, 2 g de FP e 3 g de glicose.

Os frascos foram submetidos à agitação magnética com temperatura controlada de 35 °C. Após o tempo pré-determinado, a fase

aquosa foi retirada com auxílio de uma pipeta, para evitar a formação de emulsão quando o sistema bifásico era transferido para um funil de extração. A fase orgânica, ainda com um pouco de fase aquosa presente, foi transferida para o funil de extração e o produto extraído com alíquotas de *n*-hexano (2x15 mL), e transferida para um balão de fundo redondo. O produto foi rotaevaporado e a formação do produto foi quantificada por RMN de ^1H . Os espectros de RMN de ^1H das chalconas biorreduzidas encontram-se no **Apêndice II**.

O tratamento dos resíduos das biorreduções foram efetuados separadamente para fase orgânica e fase aquosa. A fase orgânica, composta majoritariamente por *n*-hexano, foi rotaevaporada, coletada e devolvida para um galão de *n*-hexano destinado a destilação do solvente. A fase aquosa foi coletada em um galão específico e após alcançar um nível mínimo, o resíduo sólido proveniente do FP e da glicose foi filtrado por filtração simples e despejado na coleta de resíduos sólidos. A solução tampão filtrada foi despejada no galão de coleta de resíduos aquosos, e descartada de acordo com normas vigentes da UFSC.

As quantidades utilizadas de biocatalisador, substrato, temperatura, pH da solução tampão, volume da fase orgânica e da fase aquosa variaram conforme os estudos, e serão detalhadas no decorrer da apresentação dos resultados e discussão.



Nomenclatura: 1-([1,1'-bifenil]-4-il)-3-fenilpropan-1-ona (**26r**)

Fórmula molecular: $\text{C}_{21}\text{H}_{18}\text{O}$

Aspecto físico: sólido amarelo claro

Peso molecular: $286,37 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

Conversão: 94%

RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ/ppm : 8,04 (d, $J = 8,5 \text{ Hz}$, $\text{H}_{2'}$ e $\text{H}_{6'}$), 7,74 (d, $J = 8,5 \text{ Hz}$, $\text{H}_{3'}$ e $\text{H}_{5'}$), 7,68 (d, $J = 8,5 \text{ Hz}$, $\text{H}_{2''}$, $\text{H}_{6''}$), 7,52 –

7,37 (m, H2, H6, H3'' e H5''), 7,35 – 7,26 (m, H3, H4, H5), 7,22 (t, $J = 6,9$ Hz, H4''), 3,34 (t, $J = 7,8$ Hz, H α), 3,10 (t, $J = 7,8$ Hz, H β).

RMN de ^{13}C (101 MHz, CDCl_3) δ/ppm : 198,85 (C=O), 141,29 (C1), 139,83 (C1''), 136,88 (C4'), 135,53 (C1'), 129,16 (C3' e C5'), 128,97 (C3'' e C5''), 128,94 (C3 e C5), 128,65 (C2 e C6), 128,23 (C4''), 127,28 (C2'' e C6''), 127,24 (C2' e C6'), 126,14 (C4), 40,49 (C α), 31,95 (C β)

Os produtos das reações de biorredução das demais chalconas bifênicas substituídas não foram purificados, e os resultados das reações serão apresentados na **Tabela 7**. Os valores de conversão foram obtidos pela quantificação dos sinais por RMN de ^1H , conforme descrito no item 3.3.5, página 79-80.

3.3.3.1 Imobilização de FP em microesferas de alginato de cálcio em sistema monofásico

Para a preparação das microesferas, foram preparadas duas soluções separadas, sendo uma delas a solução 2% de alginato de sódio com volume total de 50 mL e a outra, uma solução de cloreto de cálcio 2% com volume total de 100 mL. Na primeira solução, foram adicionados 2 g de FP e 3 g de glicose, e a mistura foi solubilizada após 1h com agitação intensa. Essa solução foi então gotejada na de cloreto de cálcio usando uma bureta. As microesferas foram separadas da solução com o auxílio de uma peneira e enxugadas com papel toalha. Em um erlenmeyer de 125 mL foi adicionado 50 mg da chalcona **26**, 30 mL de *n*-hexano e 3 mL de DMSO e todas as microesferas de alginato de cálcio provenientes da solução inicial de alginato de sódio. O sistema foi deixado sob agitação magnética por 48 h a 35 °C. As microesferas foram retiradas com a ajuda de uma peneira e lavadas com água destilada. A fase do *n*-hexano foi transferida para o funil de separação e o produto foi obtido após a rotaevaporação da fase orgânica. A formação dos produtos foi acompanhada por análises de RMN de ^1H .

O tratamento dos resíduos desse método para a fase orgânica é igual ao método da subseção 3.3.3., com a diferença de que não existe

uma fase aquosa e as microesferas são despejadas na coleta de resíduos sólidos.

3.3.4 Biorredução utilizando leveduras selvagens

Para o desenvolvimento deste projeto, foi realizada uma parceria com o aluno Eduardo Zanella, orientado pelo Prof. Boris Stambuk, para auxiliar a aluna no crescimento das diversas leveduras testadas nas reações de biorredução, utilizando a infraestrutura do Laboratório de Biologia Molecular e Biotecnologia de Leveduras.

3.3.4.1 Condições de cultivo das leveduras

Para o cultivo das leveduras selvagens *S. brasiliensis*, *S. xylofermentans*, *S. passalidarum*, *S. arborariae*, *S. suhii*, *S. roraimanensis*, *S. stipis*, e das *S. cerevisiae* industriais (CAT-1 e PE-2), foram utilizados meios líquidos ricos denominados YPD (*Yeast extract Peptone Dextrose*) contendo 10 g.L⁻¹ de extrato de leveduras, 20 g.L⁻¹ de peptona e 20 g.L⁻¹ de glicose em um tubo de ensaio. Foram adicionados nos YPD 2 g de ágar para gerar um meio de cultivo chamado *slant*.⁴⁸ O tubo de ensaio foi levado para uma autoclave para ser esterilizado, e em seguida o ágar solidifica a partir de 42°C, com o *slant* apoiado de forma inclinada para que o meio solidifique com uma maior área superficial (**Figura 22**). Após a solidificação do novo *slant*, foi introduzido um fio metálico com uma pequena volta em sua ponta em um *slant* previamente elaborado com uma pré-cultura armazenada e parte dessa pré-cultura foi transferida para o novo *slant*, onde foi novamente cultivada.

Figura 22. *Slant* usado para o cultivo de microorganismos



Após a transferência, o tubo ficou incubado por 30 °C por 48 h. Novamente com o fio metálico, foram retiradas células do novo *slant* e adicionadas em um meio rico em YPD. As células cresceram sob agitação constante de 160 rpm com temperatura constante de 28 °C por 24-48h. A biomassa proveniente do crescimento celular foi centrifugada a 4 °C e 6000 rpm para retirada do meio rico em YPD, e lavada com água destilada e novamente centrifugada, repetindo o ciclo por 3 vezes. O sobrenadante é descartado e as células foram armazenadas em tubos Falcon para serem transportadas ao Laboratório de Biocatálise. (**Figura 23**)

Figura 23. Tubo Falcon com a biomassa de levedura. Esquerda: levedura centrifugada ainda no meio de YPD. Direita: levedura lavada com água destilada e centrifugada.



Todas essas etapas foram feitas com materiais esterilizados, passando por autoclaves, lâmpadas de UV e/ou chama de bico de Bunsen. Os resíduos gerados nas etapas de cultivo e centrifugação das leveduras foram autoclavados e descartados na pia. A metodologia de cultivo da levedura foi adaptada do trabalho de Cadete *et al* (2013).⁴⁹

3.3.5 Cálculo dos valores de conversão e caracterização dos produtos por RMN de ^1H

Para a determinação da porcentagem de conversão da biotransformação dos substratos, amostras foram preparadas e encaminhadas para a Central de Análises, no Depto. de Química, para análises de RMN de ^1H . Como exemplo, a **Figura 24** mostra um espectro de uma amostra da reação de biorredução da chalcona **26** catalisada por FP.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste trabalho foi realizado um estudo de biotransformação de chalconas bifenílicas, mediadas pelas leveduras *S. cerevisiae* (FP, CAT-1 e PE-2), *S. xylofermentans*, *S. passalidarum*, *S. arborariae*, *S. suhii*, *S. roraimanensis* e *S. stipis*.

Primeiramente, serão abordados os resultados relacionados à síntese das chalconas bifenílicas **26-38** e dos correspondentes álcoois, para a obtenção dos álcoois racêmicos que serão utilizados como padrões espectroscópicos de RMN de ^1H . Em seguida, serão abordadas as reações de biorredução das chalconas bifenílicas utilizando os biocatalisadores em sistema bifásico.

4.1 SÍNTESE DAS CHALCONAS BIFENÍLICAS E REDUÇÃO COM NaBH_4

As chalconas são compostos sólidos em temperatura ambiente, e apresentam na maioria uma coloração amarela (com exceção das chalcona **31** e **33**) variando de tonalidade de acordo com os substituintes. As chalconas bifenílicas, em geral, apresentaram baixa solubilidade em *n*-hexano, porém boa solubilidade em outros solventes orgânicos, como por exemplo DMSO, acetato de etila, clorofórmio e diclorometano. As sínteses iniciais foram simples e apresentaram valores de rendimento que variam de 40 – 98%, com exceção da chalcona **27** que não foi obtida com sucesso, e sem etapa de recristalização do produto.

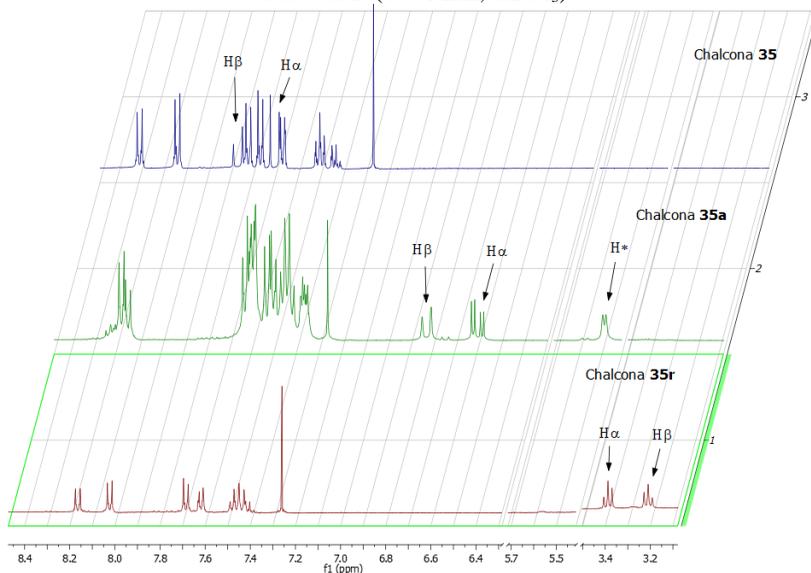
Foram preparados os álcoois das chalconas para serem utilizados como padrões espectroscópicos de comparação nos espectros de RMN de ^1H , ao invés de preparar o composto padrão através da hidrogenação por Pd/C da insaturação, o qual envolve uma metodologia mais complexa.

Para a redução *via* NaBH_4 , foi utilizado um método simples e bem estabelecido em meio etanólico. Os álcoois foram obtidos na forma de um sólido branco e foram caracterizados por RMN de ^1H . O rendimento do álcool da chalcona bifenílica principal **26** foi de 71%.

Na **Figura 25**, está demonstrado o espectro de RMN de ^1H com ênfase nos deslocamentos dos sinais dos hidrogênios da insaturação α,β

da chalcona **26**, do álcool correspondente **26a** e da chalcona biorreduzida **26r**. Todos os dados espectroscópicos estão apresentados nas páginas 68-74 e os espectros estão no Apêndice I (IV) e Apêndice II (RMN de ^1H)

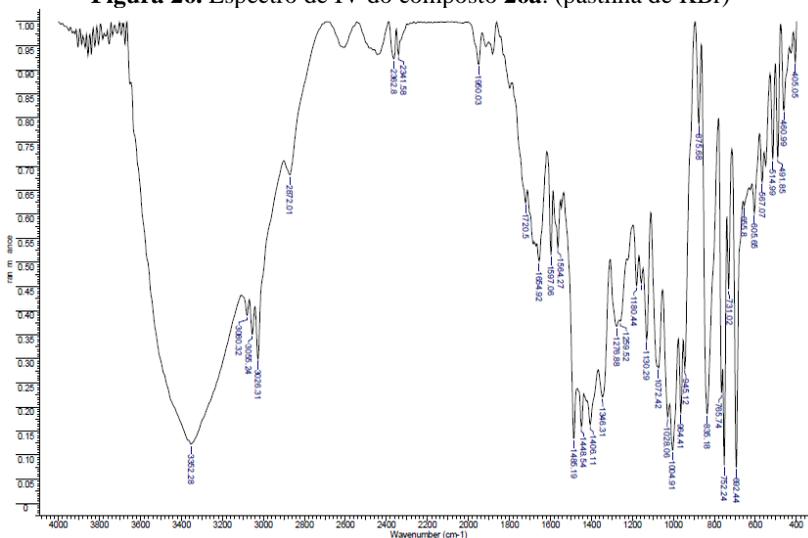
Figura 25. Comparação entre os espectros de RMN de ^1H dos compostos **35**, **35a** e **35r**. (400 MHz, CDCl_3)



Em todos os álcoois (**26a-38a**), observa-se o desdobramento e o deslocamento do sinal do $\text{H}\alpha$ devido a adição de um hidrogênio no carbono proveniente da carbonila vizinha, transformando o sinal de duplete ($^3J_{\text{H}\alpha\text{-H}\beta} \approx 16 \text{ Hz}$) em um duplo duplete ($^3J_{\text{H}\alpha\text{-H}\beta} \approx 16 \text{ Hz}$, $^3J_{\text{H}\alpha\text{-H}} \approx 6 \text{ Hz}$) e deslocando ambos os sinais do $\text{H}\alpha$ e $\text{H}\beta$ para campo alto (núcleos mais blindados), na região de 7,0 – 6,0 ppm. (**Figuras 80-88**, no Apêndice II)

No espectro de IV, apresentado na **Figura 26**, também é confirmada a formação do álcool correspondente **26a**, com a presença de uma larga banda em 3350 cm^{-1} característica de $-\text{OH}$ de álcoois e a diminuição da banda forte da carbonila em 1650 cm^{-1} .

Figura 26. Espectro de IV do composto **26a**. (pastilha de KBr)



Os dados espectroscópicos de IV para o composto **26r** estão apresentados no item 3.3.2, página 69.

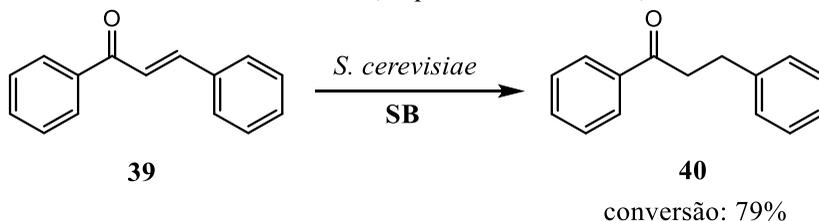
Após a preparação e caracterização dos reagentes e produtos, iniciaram-se os estudos de biorredução.

4.2 BIORREDUÇÃO UTILIZANDO FERMENTO DE PÃO COMERCIAL

Baseado nos trabalhos anteriores desenvolvidos pelo Lab. de Biocatálise^{23,32,50}, na linha de pesquisa sobre biotransformações mediadas por leveduras, foram selecionados diversos parâmetros experimentais a serem estudados e otimizados para a reação de biorredução da principal chalcona bifênlica **26**, com o objetivo de aumentar a conversão do substrato e a seletividade dos produtos obtidos para as demais chalconas bifênlicas substituídas (**28-38**).

Um dos trabalhos publicados pelo grupo sobre o tópico de biotransformação de chalconas mediada por FP é a de SILVA, sendo uma das reações estudadas apresentada na **Figura 27**.²³

Figura 27. Equação da reação de biorredução da chalcona **39** para a dihidrochalcona **40** (adaptado da referência 23).



Neste trabalho, foram estudadas mais 7 chalconas substituídas, e os valores de conversão variaram de 5 – 99% utilizando FP comercial. As reações foram realizadas em sistema bifásico de *n*-hexano/solução tampão 50:50 v/v.

Assim, dando continuidade a estes estudos, avaliou-se também a eficiência, ou não, do uso de sistema monofásico nas reações de biorredução da chalcona bifenílicas **26**. Este sistema foi comparado com o bifásico.

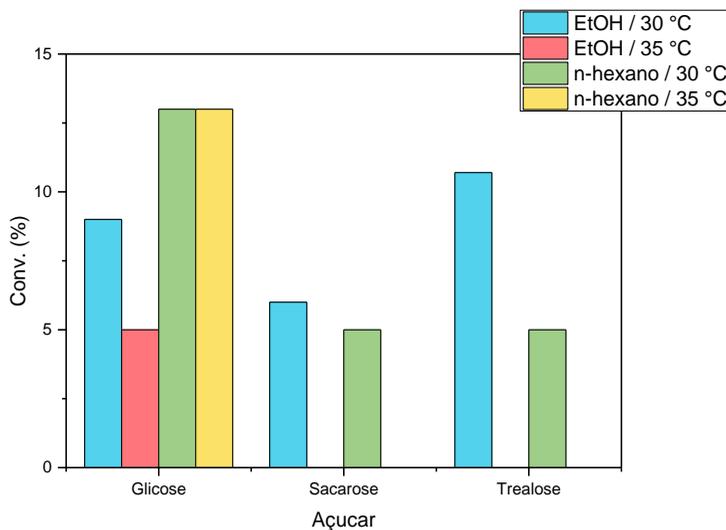
4.2.1 Sistema monofásico vs. sistema bifásico

O ambiente natural das enzimas, como descrito anteriormente, é em meio aquoso, porém ao trabalhar com compostos orgânicos, normalmente é necessária a utilização de solventes orgânicos para solubilizar o substrato. Portanto, um dos primeiros parâmetros experimentais otimizado para este trabalho foi a influência do meio reacional, pois deve ser analisada a resistência da levedura *S. cerevisiae* em meio monofásico aquoso ou em bifásico *n*-hexano/tampão, na qual a levedura estará presente no meio aquoso.

Para o sistema “monofásico”, foi utilizado como referência os estudos de MO, *et al* (2016)⁵¹, o qual utilizou 2,0 g de FP, 0,4 mmol de substrato, 3,0 g de sacarose, 30 mL de água e 1,5 mL de EtOH (co-solvente), a 30 °C, em uma biorredução de um éster β-ceto-α-oximina. Neste projeto, quase todos os parâmetros foram mantidos iguais, com exceção da massa do substrato e volume de cossolvente. Foi testado a influência do EtOH e do *n*-hexano como cossolventes do sistema monofásico e foram testados três açúcares disponíveis no laboratório,

sendo a sacarose, glicose e trealose. Os resultados das conversões em **26r** encontram na **Figura 28**.

Figura 28. Valores de conversão para **26r** usando o sistema monofásico, na presença de diferentes cossolventes, açúcares e temperaturas. Condições: **26** (50 mg), FP (2 g), H₂O destilada (30 mL), co-solvente (3 mL), açúcar (3 g), t = 30-35 °C, t = 96 h, 300 rpm.



Observa-se na **Figura 28** que os valores iniciais de conversão do composto **26** para **26r** ao usar o sistema monofásico foram baixos, sendo o valor máximo de 13% em 96 h de reação e com as seguintes condições reacionais: 50 mg de substrato **26**, 30 mL de água, 3 mL de *n*-hexano, 3 g de glicose a 30/35 °C. Segundo os parâmetros de saúde,⁴¹ o uso de *n*-hexano deve ser evitado e substituído por um solvente mais benigno, porém as enzimas apresentam uma afinidade por este solvente, devido a sua baixa polaridade.³⁹

No caso do estudo da variação da temperatura, sabe-se que o aumento da temperatura leva a um aumento de colisões entre substrato e sítio ativo da enzima, levando com que o complexo enzima-substrato seja alcançado mais rapidamente. Porém, temperaturas acima das fisiológicas podem causar inativação das enzimas, afetando o desempenho da reação biocatalisada.¹⁰ Portanto, a influência da temperatura foi avaliada entre

30 e 35 °C, em intervalos de 5 °C. Para os experimentos feitos com EtOH como solvente, a temperatura teve influência significativa nos valores de conversão para o composto **26r**, mas para o sistema com *n*-hexano, houve pouca diferença entre os valores.

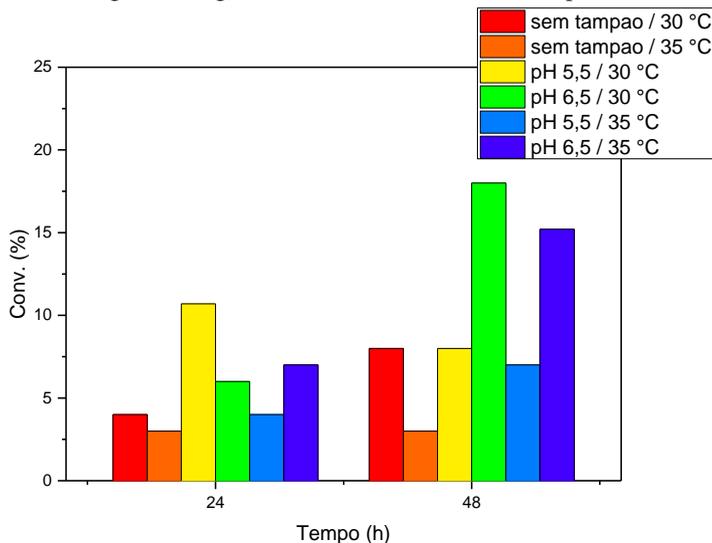
Baseado nestes resultados, foi decidido que os estudos continuariam com o sistema bifásico, fixando os melhores parâmetros anteriores. O sistema bifásico também foi previamente estudado e otimizado em outros trabalhos desenvolvidos pelos membros do Lab. de Biocatálise. Nestes estudos, foram avaliados o efeito do pH e a influência da adição de aditivos.

Salienta-se que não foi observada a formação do produto quando a reação foi realizada na ausência do FP (branco da reação).

4.2.2 Efeito do pH

A segunda característica das enzimas a ser considerada é que elas atuam melhor como biocatalisadores em uma determinada faixa de pH, sendo essa faixa de pH característica da atividade de cada enzima. O pH afeta no estado de ionização de uma enzima, o qual determina a conformação da estrutura e por consequência, propriedades importantes como atividade e seletividade.¹⁰ Portanto, neste trabalho variou-se a faixa de pH com dois valores de 5,5 e 6,5, usando o tampão K₂HPO₄/ácido cítrico, tempo e a temperatura da reação. Os resultados das conversões se encontram na **Figura 29**.

Figura 29. Variação nos valores de conversão para **26r**, usando o sistema bifásico, em função da fase aquosa, pH, tempo e temperatura. Condições: **26** (50 mg), FP (2 g), água destilada ou tampão (30 mL), *n*-hexano (30 mL), CH₂Cl₂ (3 mL), glicose (3 g), t = 30-35 °C, t = 24-48 h, 300 rpm.



Algumas informações podem ser retiradas da **Figura 29**, sendo que a principal é a dependência que o FP tem da presença da solução tampão. A troca da solução tampão na fase aquosa por apenas água destilada gerou valores de conversão menores que 5%, e a melhor condição observada foi do uso da solução tampão com pH = 6,5 a 30 °C, em 48 h (18%). Este valor de pH está de acordo com a otimização realizada nos estudos de SILVA, (2010)³³ e SCHAEFER, (2015),³² onde ambos estudaram uma faixa extensa de pH na biotransformação de compostos carbonílicos α,β insaturados, onde os maiores valores de conversão foram observados entre pH 5,5 – 9,0. No caso da biorredução do chalcona **39** da **Figura 29**, o pH escolhido foi de 5,5.²³

Um dos experimentos (pH = 5,5, 30 °C) demonstrou um comportamento inesperado, onde o valor da conversão para o produto **26r** caiu (11% para 8%) com o aumento do tempo reacional, mas o mesmo pode ser considerado um erro experimental devido à algum problema na etapa de extração do produto.

Como determinado na subseção anterior, o *n*-hexano foi selecionado como fase orgânica do sistema bifásico, mas a chalcona **26** possui baixa solubilidade nesse solvente. Portanto, foi incorporado o CH₂Cl₂ como cossolvente para auxiliar na solubilização do substrato e por consequência, na biorredução. Porém, os valores de conversão da biorredução a **26r** continuaram sendo baixos, sendo o máximo de apenas 14%, que pode ser justificado pela toxicidade dos solventes clorados em microrganismos.¹⁰ A partir desses resultados, foi decidido investigar o efeito da adição de cossolventes e açúcares, e os resultados serão discutidos na próxima subseção.

4.2.3 Influência de aditivos: cossolventes e açúcares

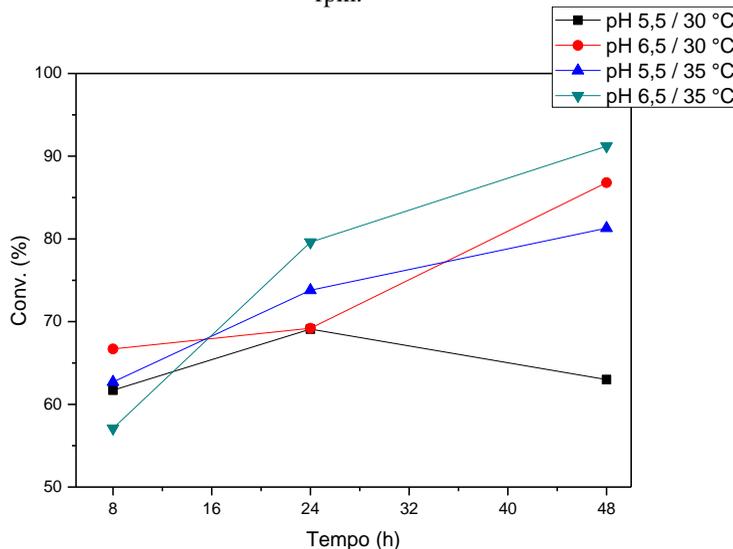
Uma das grandes dificuldades em qualquer reação química é a solubilidade do substrato no meio reacional, e na área de biocatálise este problema é ainda mais destacado, devido à necessidade de equilibrar a atividade enzimática com um solvente que seja capaz de solubilizar o substrato.¹⁰ Para isso, foi estudada a influência de diversos cossolventes, que são solventes presentes em baixa quantidade (10% v/v) na fase orgânica e que possuem como função principal auxiliar na solubilização do substrato e se manter miscível no solvente da fase orgânica. A influência de cossolventes na conversão e seletividade dos produtos obtidos em reações mediadas por FP está bem estabelecida na literatura.⁵²

O primeiro cossolvente testado foi o DMSO, devido as suas propriedades de estabilizar a matriz líquida das membranas plasmáticas das células íntegras dos micro-organismos, auxiliando na difusão e permeabilidade.⁵³

Os resultados das conversões se encontram na **Figura 30**.

Figura 30. Variação nos valores de conversão para **26r**, usando sistema bifásico com DMSO como cossolvente, em função do pH, tempo e temperatura.

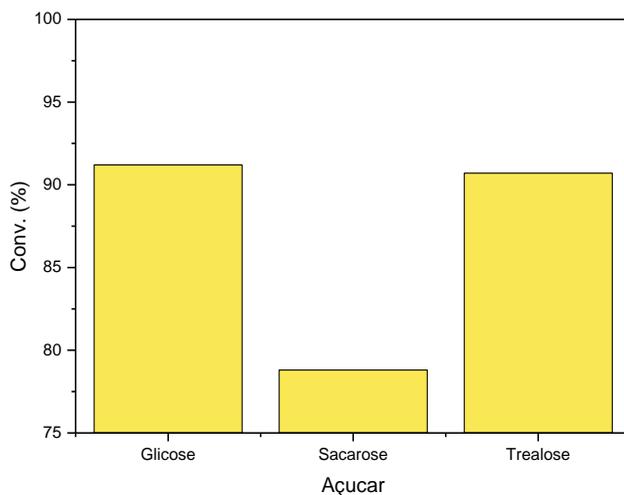
Condições: **26** (50 mg), FP (2 g), tampão K_2HPO_4 /ácido cítrico (30 mL), *n*-hexano (30 mL), DMSO (3 mL), glicose (3 g), $t = 30\text{-}35\text{ }^\circ\text{C}$, $t = 8/24/48\text{h}$, 300 rpm.



Como pode ser observado na **Figura 30**, os valores de conversão da biorredução quimiosseletiva da chalcona **26** aumentaram drasticamente e se mantiveram estáveis com o aumento do tempo reacional, obtendo-se o um valor máximo de 91% em pH = 6,5, $t = 35\text{ }^\circ\text{C}$, em 48 h. Com esses parâmetros fixos, foi decidido testar novamente a influência de um segundo aditivo, os açúcares, devido à importância dos açúcares na regeneração do cofator NADH, responsável pela catálise das reações de biorredução mediadas pela levedura *S. cerevisiae*.²¹

Os açúcares testados foram os mesmos usados no sistema monofásico, ou seja, glicose, sacarose e trealose. Os resultados das conversões em **26r** encontram-se na **Figura 31**.

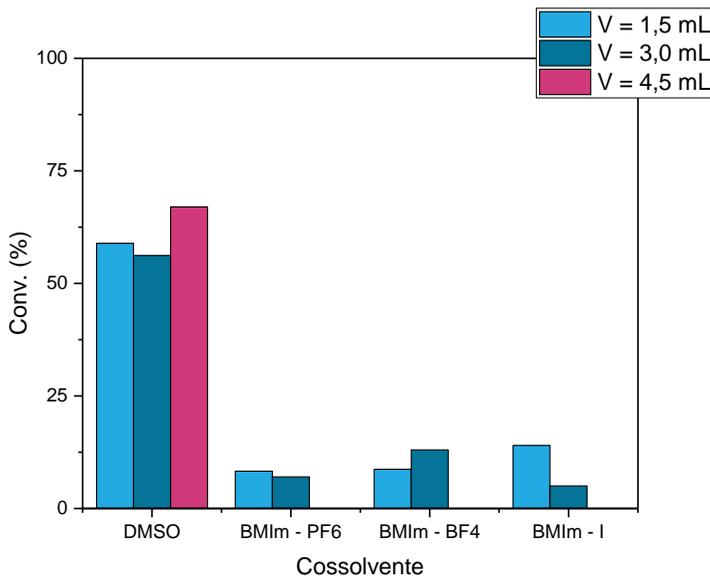
Figura 31. Variação nos valores de conversão para **26r**, usando o sistema bifásico, em função dos açúcares. Condições: **26** (50 mg), FP (2 g), tampão K_2HPO_4 /ácido cítrico (30 mL, pH = 6,5), *n*-hexano (30 mL), DMSO (3 mL), açúcares (3 g), $t = 35\text{ }^\circ\text{C}$, $t = 48\text{ h}$, 300 rpm.



No estudo da influência dos açúcares, não foi observado uma grande variação nos valores de conversão, sendo o mesmo valor de 91% ao usar a glicose e a trealose. Como a glicose já estava sendo utilizada nos demais experimentos e também possui um menor custo de obtenção do que a trealose, optou-se pela continuidade do uso da glicose como aditivo na reação de biorredução.

Seguindo a linha de investigação do uso dos cossolventes, variou-se o volume de cossolvente adicionado na fase orgânica com incrementos de 1,5 mL e foram testados três LIs, devido as suas propriedades específicas e diversos usos recentes em reações biocatalisadas, incluindo a resolução de racematos.⁵⁴ Por questões de agilidade no projeto, foi decidido que os estudos seguintes seriam realizados com tempo reacional de 8 h. Os dados de conversão em **26r** estão apresentados na **Figura 31**. Os resultados das conversões se encontram na **Figura 32**.

Figura 32. Variação nos valores de conversão para **26r**, usando o sistema bifásico, em função dos cossolventes e dos volumes. Condições: **26** (50 mg), FP (2 g), tampão K_2HPO_4 /ácido cítrico (30 mL, pH = 6,5), *n*-hexano (30 mL), cossolvente (1,5 – 4,5 mL), glicose (3 g), $t = 35\text{ }^\circ\text{C}$, $t = 8\text{ h}$, 300 rpm.



Após esse estudo, observa-se que as conversões em produtos foram fortemente influenciadas pela presença de DMSO. Como previsto, o CH_2Cl_2 exerce um efeito negativo no metabolismo das leveduras, sendo que a troca do cossolvente aumentou muito os valores de conversão (91%) em 48h. A variação dos volumes de cossolvente adicionados ao sistema bifásico também influenciaram nos valores de conversão em **26r**, onde observa-se uma pequena variação para os volumes de 1,5, 3,0 e 4,5 mL, mas um aumento de 11% na conversão quando 4,5 mL foi utilizado em estudos realizados em 8h.

No que se diz respeito aos LIs, decidiu-se por utilizar os volumes de 1,5 e 3,0 mL. Quando os líquidos iônicos [BMIm][PF₆], [BMIm][BF₄] e [BMIm][I] foram utilizados como cossolventes, ambas as conversões em **26r** foram menores quando comparadas com os dados obtidos com o DMSO (<5 – 14%). Não era esperado um valor tão baixo de conversão ao usar os LIs, tendo em vista que estão sendo bastante utilizados em

reações “verdes”, como observado no aumento no número de publicações com a tag “*ionic liquids*” nos últimos anos.⁵⁵ Em trabalhos relacionados a reações de biorredução quimiosseletiva de (Z)-3-halo-4-fenil-3-buten-2-ona mediadas por leveduras, os valores de conversão foram baixos (10 – 15%) e não foram melhores que os valores de conversão quando comparados com o sistema reacional sem LIs.⁵⁶

Um fator negativo no uso dos LIs foi o seu difícil manuseio. Os LIs são bastante viscosos em temperatura ambiente, portanto foi bastante difícil pipetar o volume correto em cada erlenmeyer. A sua extração também foi complexa, não sendo possível recuperar o LI utilizado, o que seria um ponto atrativo para o seu uso e reuso, salienta-se também que não foi possível recuperar o DMSO da reação.

A partir destes resultados, o DMSO foi escolhido como o melhor cossolvente para a redução da chalcona bifenólica **26** mediada por FP, com volume alterado de 3,0 mL para 4,5 mL, e este foi utilizado para verificar a influência dos próximos parâmetros experimentais, sendo estes a imobilização do FP em alginato de cálcio, quantidade de substrato, tempo e dos grupos substituintes.

4.2.4 Imobilização do FP em microesferas de alginato de cálcio

Antes de continuar com os estudos dos demais parâmetros experimentais do sistema bifásico, foi testado a metodologia de imobilização do FP em microesferas de alginato de cálcio, baseada em trabalhos anteriores.^{57,58}

Diversos sistemas foram testados com as microesferas de alginato de cálcio, onde foram variados parâmetros experimentais como a massa de FP adicionada na solução inicial de alginato de sódio, o modo de adição do açúcar (adicionado somente na reação ou encapsulado juntamente do FP), porcentagem em massa adicionada no sistema da quantidade de microesferas de alginato de cálcio provenientes da solução inicial de alginato de sódio, e o tipo de agitação. Os resultados das conversões em **26r** encontram-se na **Tabela 6**.

Tabela 6. Variação nos valores de conversão para **26r**, em função do FP imobilizado em microesferas de alginato de cálcio. Condições: **26** (50 mg), FP (2 – 8 g), *n*-hexano (30 mL), cossolvente (3 mL), glicose (3 g), $t = 35\text{ }^{\circ}\text{C}$, $t = 48\text{ h}$.

#	Massa de microesferas (%)	Massa de FP (g)	Glicose	Agitação	Conversão (%)
1	100	2	Adicionada	Orbital	<5
2			Encapsulada		<5
3	Adicionada		Magnética	<5	
4				<5	
5				<5	
6				<5	
7				<5	
8				<5	
9	Encapsulada			<5	
10				<5	
11		Adicionada		<5	
12				<5	
13	Encapsulada	<5			
14		<5			

Os dados apresentados na **Tabela 6** mostraram que mesmo usando diferentes condições reacionais, com o FP imobilizado, a conversão em **26r** foi muito baixa. Nas entradas 1 e 2 da **Tabela 6**, foram utilizadas todas as microesferas produzidas a partir dos 50 mL iniciais de solução de alginato de sódio com 2 g de FP, variando o modo de adição da glicose. Nestes testes, o sistema aparentava estar com um volume desproporcional de microesferas para a quantidade de solvente orgânico, sendo que as microesferas estavam em excesso e a agitação orbital não parecia ser efetiva.

Nas condições das entradas de 3 a 10, decidiu-se então colocar quantidades menores de microesferas nos Erlenmeyers e mudar a agitação orbital para magnética, pois tinha mais espaço para a inserção de uma barra magnética no sistema. Porém, mesmo com estas alterações, os valores de conversão em **26r** foram <5%.

A última variação do estudo, apresentada nas entradas 11 – 14, focou na adição de uma massa maior de FP na solução inicial de alginato de sódio, o que acarretou numa solução supersaturada de FP, impedindo o escoamento da solução pela bureta, gerando microesferas disformes e grandes. Como esperado, não houve melhoria nos valores de conversão (<5%), pois espera-se que quanto menor a microesfera, maior sua área superficial e melhor o contato entre substrato e FP.

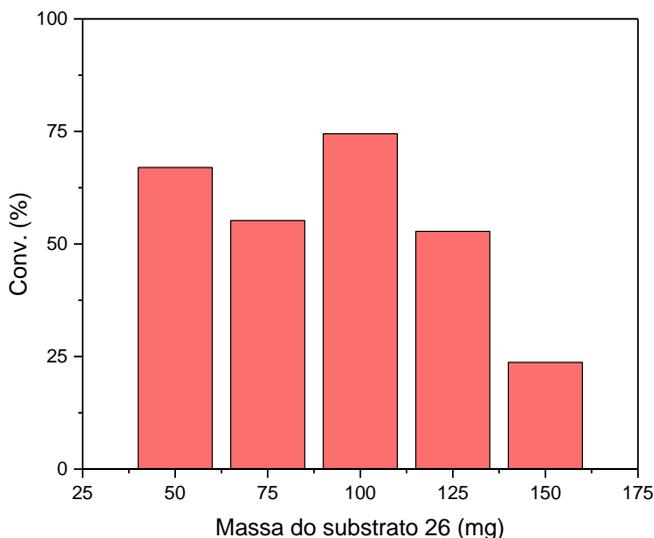
Devido a estes resultados preliminares não terem sido satisfatórios, foi decidido que a reação de biorredução seria conduzida apenas no sistema bifásico e retomou-se os estudos dos outros parâmetros experimentais.

4.2.5 Avaliação da quantidade de substrato na biorredução de **26**

Como representado na **Eq. 1**, a catálise enzimática segue uma lei de velocidade que é dependente da concentração inicial de substrato no meio reacional, podendo ocorrer variações nos valores de conversão e mudança na afinidade da enzima pelo substrato.

Portanto, para avaliar o efeito da concentração de substrato nas reações de biorredução, variou-se a massa da chalcona **26** de 50 mg ($1,75 \times 10^{-4}$ mol) até 150 mg ($5,27 \times 10^{-4}$ mol), em intervalos de 25 mg. As conversões em **26r** em função da concentração do substrato estão apresentadas na **Figura 33**.

Figura 33. Variação nos valores de conversão para **26r**, usando o sistema bifásico, em função da massa do substrato **26**. Condições: **26** (50 – 150 mg), FP (2 g), tampão K_2HPO_4 /ácido cítrico (30 mL, pH = 6,5), *n*-hexano (30 mL), DMSO (4,5 mL), glicose (3 g), $t = 35\text{ }^\circ\text{C}$, $t = 8\text{ h}$, 300 rpm.



Comparando os dados de conversão, percebe-se que ao usar o sistema bifásico com 2 g de FP é possível biotransformar até 100 mg do substrato **26** em **26r** (74%) em 8 h, sendo que o sistema sofreu inativação com 150 mg do substrato **26** (24%). Observa-se também uma pequena diferença ao usar 50 mg e 100 mg do substrato, sendo a conversão de 67 e 74% respectivamente.

Baseado nesse estudo, foi definido que as otimizações seguintes iriam continuar usando 50 mg de substrato para cada experimento, pois acarreta também em uma economia de material. No entanto, do ponto de vista de aplicabilidade, seria mais rentável biotransformar 100 mg com a mesma quantidade de FP.

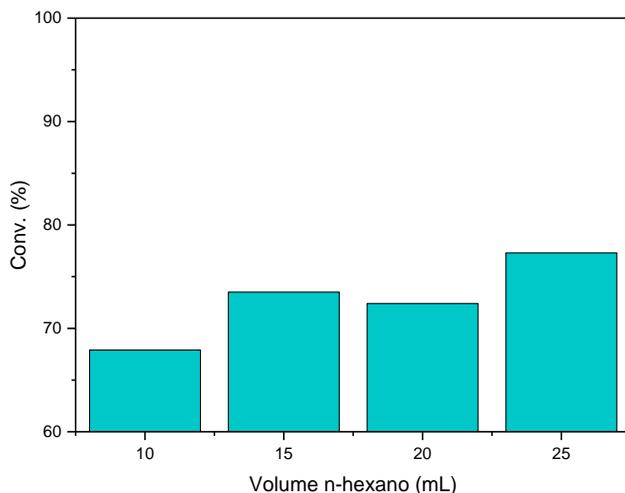
4.2.6 Diminuição da escala do sistema reacional

Para finalizar os estudos de otimização da biorredução da chalcona **26** utilizando o FP e prosseguir com as demais leveduras, foi necessário avaliar a diminuição da escala do sistema reacional, pois seria muito trabalhoso a obtenção de 2 g de biomassa para cada levedura selvagem, sendo o ideal trabalhar com apenas 1 g. Portanto, foi avaliado em qual escala reacional mínima a biorredução continuaria efetiva, além de auxiliar em outros parâmetros como, por exemplo, quantidade de resíduos gerados e eficiência de aproveitamento de reagentes.

A primeira etapa para a minimização da escala do sistema foi o estudo da variação do volume da fase aquosa e da orgânica (V_{aq}/V_{org}). Esse parâmetro é importante nos casos em que o sistema bifásico é utilizado, pois a variação das fases influencia na área interfacial, que por sua vez afeta a biorredução.

Para variar o volume da fase orgânica, fixou-se o da fase aquosa em 30 mL. Os valores de conversão em **26r** em função do volume de *n*-hexano estão apresentadas na **Figura 34**.

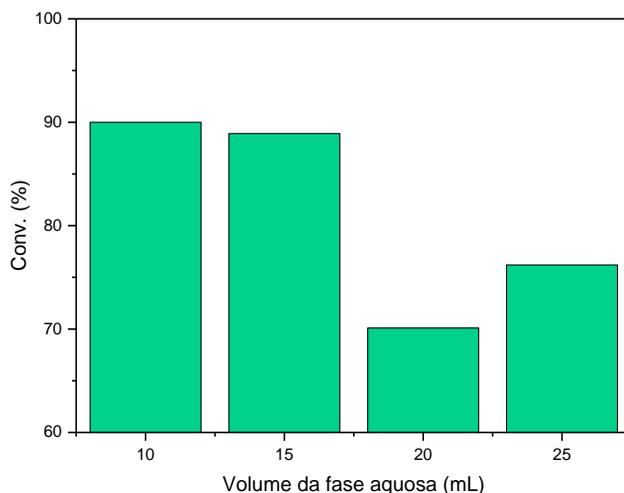
Figura 34. Variação nos valores de conversão para **26r**, usando o sistema bifásico, em função do volume de *n*-hexano. Condições: **26** (50 mg), FP (2 g), tampão K_2HPO_4 /ácido cítrico (30 mL, pH = 6,5), *n*-hexano (10 – 25 mL), DMSO (4,5 mL), glicose (3 g), $t = 35\text{ }^\circ\text{C}$, $t = 8\text{ h}$, 300 rpm.



Foi observada uma variação de 11% entre os valores de conversão com a variação do volume de *n*-hexano na fase orgânica, sendo o melhor resultado decorrente da reação com 25 mL de *n*-hexano (77%) e o pior, com 10 mL de solvente (68%). Como o melhor resultado foi alcançado com apenas 5 mL a menos do que nas condições iniciais, optou-se por realizar os testes de volume de solução tampão com a quantia fixa de 15 mL de *n*-hexano.

Em um outro estudo, manteve-se o volume da fase orgânica fixa (15 mL), e variou o volume da fase aquosa. Os resultados encontram-se na **Figura 35**.

Figura 35. Variação nos valores de conversão para **26r**, usando o sistema bifásico, em função do volume da fase aquosa. Condições: **26** (50 mg), FP (2 g), tampão K_2HPO_4 /ácido cítrico (10 – 25 mL, pH = 6,5), *n*-hexano (15 mL), DMSO (4,5 mL), glicose (3 g), $t = 35\text{ }^\circ\text{C}$, $t = 8\text{ h}$, 300 rpm.



Os resultados obtidos mostraram que com um volume menor de *n*-hexano e com volumes de 10 – 15 mL de solução tampão, foram alcançados valores de conversão (90 e 89%, respectivamente) ainda melhores do que do estudo anterior, o qual demonstra que o sistema pode ser adaptado e minimizado para o uso das leveduras selvagens. Por

questões práticas, foi decidido utilizar 15 mL de solução tampão, usando a metade das quantidades iniciais.

Por consequência, o volume do cossolvente DMSO também foi reduzido pela metade, sendo utilizado apenas 2,25 mL em cada reação de biorredução.

Em todos os testes anteriores de redução usando o sistema bifásico, utilizou-se 2 g de FP, mas ainda faltava testar, como objetivo final, apenas 1 g de FP. Nestas condições, a nova fase aquosa foi composta de 1 g de FP e 1,5 g de glicose dissolvidos em 15 mL de solução tampão K_2HPO_4 /ácido cítrico (pH = 6,5). A temperatura, tempo e agitação não foram variadas, e o valor de conversão alcançado após a biorredução foi de 70%. Portanto as novas condições de reação foram adequadas e implementadas para os próximos estudos.

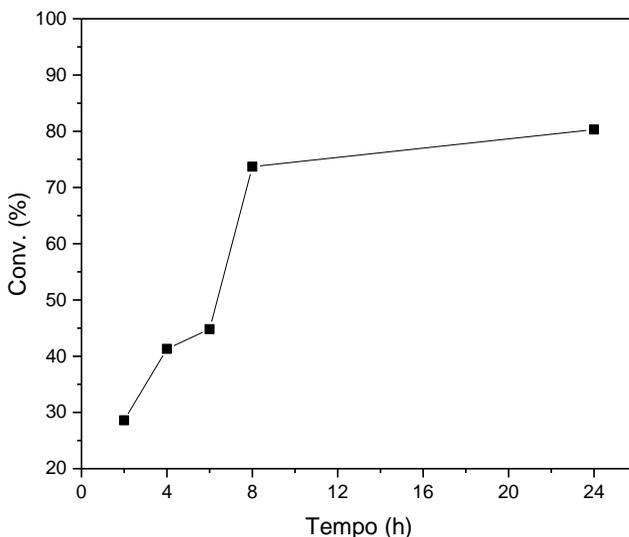
Os resultados alcançados eram esperados, pois se o sistema com 30/30 mL (V_{org}/V_{aq}) suportou até 100 mg do substrato **26**, o sistema possivelmente iria ser também eficiente quando reduzido pela metade.

4.2.7 Estudo do tempo reacional

O último parâmetro que foi testado com o sistema bifásico reduzido foi o tempo reacional, para avaliar se a biorredução poderia ser feita em um intervalo de tempo mais curto, mantendo um bom valor de conversão para o produto **26r**.

A reação foi monitorada entre 2 e 24h, e os resultados obtidos estão apresentados na **Figura 36**.

Figura 36. Variação nos valores de conversão para **26r**, usando o sistema bifásico, em função tempo. Condições: **26** (50 mg), FP (1 g), tampão K_2HPO_4 /ácido cítrico (15 mL, pH = 6,5), *n*-hexano (15 mL), DMSO (2,25 mL), glicose (1,5 g), $t = 35\text{ }^\circ\text{C}$, $t = 2 - 24\text{ h}$, 300 rpm.



Observa-se que de 2 h até 8 h foi o período em que houve a maior variação dos valores de conversão da biorredução. De 8 h até 24 h, os valores de conversão foram de 70% a 80% sendo a diferença de apenas 10%. Por questões de praticidade e de economia de tempo, foi definido que o tempo reacional seria mantido em 8 h nos estudos posteriores.

Com todos os parâmetros experimentais observados e discutidos, para a obtenção das melhores condições do sistema bifásico adaptado para o uso de uma quantidade baixa de biocatalisador, este estudo foi concluído.

4.3 INFLUÊNCIA DOS GRUPOS SUBSTITUINTES

Após a otimização do sistema bifásico utilizando a chalcona **26** como padrão para os valores de conversão, as demais chalconas com substituintes (**28-38**) foram submetidas a reação de biorredução para que

fosse avaliado o efeito eletrônico e estereo dos grupos substituintes. Os valores de conversão serão demonstrados na **Tabela 7**.

Tabela 7. Valores de conversão das reações de biorredução de chalconas bifenílicas substituídas medias por FP. Condições: **26, 28-38** (50 mg), FP (2 g), tampão K₂HPO₄/ácido cítrico (30 mL, pH = 6,5), *n*-hexano (30 mL), DMSO (4,5 mL), glicose (3 g), t = 35 °C, t = 8 h, 300 rpm.

Chalcona biorreduzida	Substituinte (R)	Conversão (%)
26r	- H	70
28r	- 3-Cl	<5
29r	- 4-Cl	69
30r	- 3,4-Cl ₂	23
31r	- 3,5-Cl ₂	<5
32r	- 2,6-Cl ₂	<5
33r	- 2-NO ₂	67
34r	- 3-NO ₂	79
35r	- 4-NO ₂	>95
36r	- 2-OCH ₃	13
37r	- 3-OCH ₃	13
38r	- 4-OCH ₃	25

A chalcona biorreduzida **26r** foi adicionada na **Tabela 7** para fins comparativos. Ao analisar a família de chalconas **28-32**, todas com substituintes cloro, observou-se que a biorredução ocorre apenas quando o substituinte está na posição *para*, sendo a conversão de 69% para a chalcona **29** (-4-Cl) e 23% para a chalcona **30** (3,4-Cl₂). Para as demais chalconas **28,31** e **32**, não ocorreu a reação após o tempo reacional de 8 h.

Baseado nas reações de substituição eletrofílica de anéis aromáticos, os halogênios são substituintes fracamente retiradores, portanto o cloro é um substituinte que retira elétrons do anel aromático por efeito indutivo mais fortemente do que doa elétrons por ressonância, pois o mesmo utiliza um orbital 3p para formar uma ligação π com o orbital 2p do carbono, e uma sobreposição de orbitais 3p-2p é fraca.⁶

Por possuir esse caráter fracamente retirador, pode ser feita a suposição de que a insaturação α,β , vizinha ao anel aromático substituído e parte de um sistema conjugado, sofre uma diminuição da ligação π e, por consequência, ficaria mais ativada para a reação de hidrogenação e os valores de conversão para as chalconas biorreduzidas **28r-32r** seriam iguais ou maiores que o da chalcona **26**. Esta suposição parece ser válida para a biorredução da chalcona **29**, que possui um valor de conversão para o produto **29r** similar a chalcona **26**, o que pode ser explicado devido a seu caráter retirador/doador. Esse efeito eletrônico é verificado em parte para a chalcona **30**, porém é influenciado negativamente com a presença de um segundo substituinte cloro na posição -3.

Ao usar enzimas, deve-se sempre levar em consideração as interações que ocorrem no sítio ativo e, portanto, o efeito estereo possui uma forte contribuição nas reações biocatalisadas. Para analisar o possível efeito estereo dos substituintes, foram sintetizadas e testadas as chalconas **30**, **31** e **32**, as quais sugerem que ocorre uma grande desvantagem estérica na enzima quando o anel está substituído nas posições -2,-3,-5 e -6.

Para a família de chalconas com grupo $-\text{NO}_2$ (**33-35**), todas as reações de biorredução apresentaram bons valores de conversão, sendo acima de 67%. O $-\text{NO}_2$ é um bom grupo retirador de elétrons por efeito indutivo e de ressonância.⁶ A presença deste grupo como substituinte no anel aromático deixa-o com um potencial eletroestático mais positivo e, seguindo a linha de raciocínio aplicada as chalconas cloradas (**28-32**), eram esperados valores de conversão maiores, os quais foram observados, com exceção do produto **33r**, que foi formado com um valor de conversão similar ao produto **26r**. Novamente, verificou-se que o efeito estereo favoreceu o substituinte na posição -4 do anel aromático.

O último grupo de substituintes, $-\text{OCH}_3$ (**36-38**), foi selecionado devido a sua característica de ser um grupo doador de elétrons. Foram observados valores de conversão de 13 (**36**, **37**) – 25% (**38**), resultados menores que os observados para a chalcona **26** e de acordo com a aplicação da hipótese contrária à que foi aplicada para os grupos substituintes retiradores anteriores, pois nesse caso a insaturação α,β estaria desativada e menos propensa a sofrer a redução. Foi observado

também, para esta família de chalconas, a influência e o favorecimento do substituinte na posição *para* (-4).

Na tentativa de compreender melhor sobre o efeito eletrônico dos grupos substituintes na insaturação α,β , foram calculados os mapas de potencial eletroestáticos (MEP) com o auxílio do Prof. Dr. Giovanni F. Caramori, do Grupo de Estrutura Eletrônica Molecular (GEEM). As geometrias das chalconas foram otimizadas utilizando-se o modelo B3LYP/6-31+G (d,p) do pacote Gaussian09. Os MEP's foram avaliados usando as densidades eletrônicas calculadas. Os mapas estão apresentados nas **Figuras 37-40**, com um valor de *cutoff* de 0,05. A cor vermelha na estrutura dos MEP's significa potencial eletrônico negativo, e azul significa potencial eletrônico positivo.

Figura 37. MEP da chalcona **26** e sua correspondente biorreduzida **26r**.

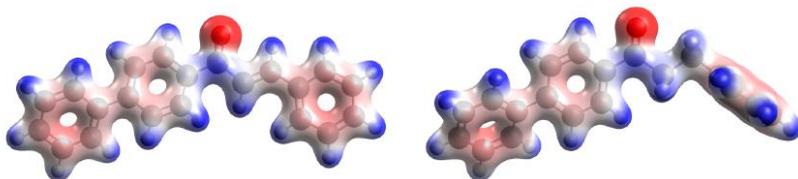


Figura 38. MEP da chalcona **29** e sua correspondente biorreduzida **29r**.

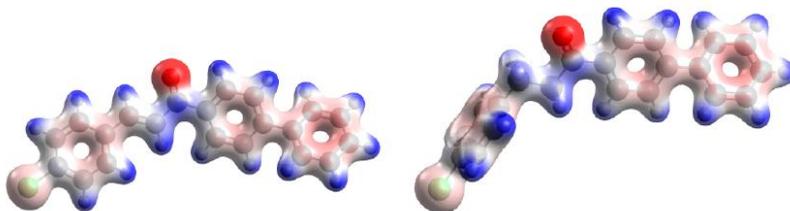


Figura 39. MEP da chalcona **35** e sua correspondente biorreduzida **35r**.

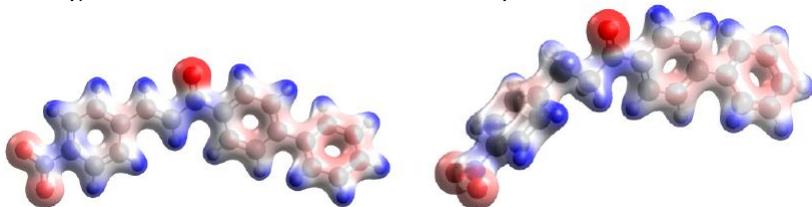
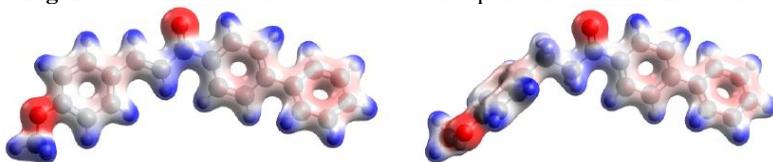


Figura 40. MEP da chalcona **38** e sua correspondente biorreduzida **38r**.



Como pode ser observado, a ligação dupla α,β apresentou um potencial mais negativo no composto **26**, e depois com a inserção de substituintes **29**, **35**, **38**, a ligação apresentou um potencial mais positivo, o qual demonstra um enfraquecimento da ligação dupla e uma maior facilidade para a inserção de H_2 pelo biocatalisador. Como não há uma diferença visível na ligação dupla das chalconas substituídas, pode-se analisar o potencial eletroestático do anel aromático substituído.

No caso da chalcona **29**, o anel aromático tem um potencial eletroestático levemente negativo, com exceção do carbono 4 diretamente ligado ao cloro. Para a chalcona substituída com o grupo nitro **35**, o anel aromático tem um potencial eletroestático mais positivo, resultado esperado pela característica forte do grupo nitro em retirar elétrons. O anel aromático substituído da chalcona **38** demonstrou-se o mais neutro de todos, com um fraco potencial negativo na metade do anel e uma tonalidade incolor em outra metade, nos carbonos próximos ao grupo substituinte $-OCH_3$.

A densidade eletrônica ao redor do anel aromático não pareceu afetar a ligação dupla de forma diferenciada cada ligação dupla em cada estrutura, e ao analisar os valores de deslocamento dos espectros de RMN de ^{13}C , também não houve uma grande diferença entre os valores (145 e 122 ppm), o que sugere que não ocorreram mudanças nas nuvens eletrônicas dos carbonos α e β .

Com base nas reações de biorredução e nos mapas de potencial eletroestáticos calculados, não foi possível obter uma hipótese geral sobre o efeito estérico e eletrônico dos substituintes, em especial para a família de chalconas bifênlicas cloradas, as quais foram especialmente beneficiadas pela posição -4 do anel aromático. Para compreender melhor o mecanismo da reação seria necessário uma melhor visualização do sítio ativo das oxidorreduzases presentes na levedura *S. cerevisiae*.

4.4 BIORREDUÇÃO UTILIZANDO LEVEDURAS SELVAGENS

Para a etapa final deste projeto, o sistema bifásico reduzido foi utilizado com sete leveduras selvagens para avaliar se a biorredução das chalconas bifenílicas ocorre em outras espécies. Para simular o sistema bifásico com FP comercial, o qual utiliza uma massa seca de 1 g, as leveduras selvagens passaram por um processo de secagem antes de serem hidratadas na solução tampão, para que pudessem ser pesadas. A biomassa das leveduras foi transferida do tubo Falcon para uma placa de Petri, e esta foi deixada por cerca de 5 h sob uma pedra aquecida a 40 °C até secarem, como apresentado na **Figura 41**.

Figura 41. Leveduras secas



Com as leveduras devidamente secas e pesadas, a reação de biorredução foi efetuada com a chalcona bifenílica **26** e os resultados estão apresentados na **Tabela 8**.

Tabela 8. Conversão em **26r** realizadas com leveduras selvagens. Condições: **26** (50 mg), levedura seca (1 g), tampão K_2HPO_4 /ácido cítrico (15 mL, pH = 6,5), *n*-hexano (15 mL), DMSO (2,25 mL), glicose (1,5 g), $t = 35\text{ }^\circ\text{C}$, $t = 8\text{ h}$, 300 rpm.

#	Levedura	Conversão (%)
1	Hmd 19.3	<5
2	Hmd 23.3	<5
3	Hmd 2.1	<5
4	Hm 19.1a	<5
5	Hm 45.1	<5
6	Xmd 16.2	<5
7	Xmd 23.2	<5

Observa-se que o produto não foi obtido utilizando as leveduras testadas. A utilização principal dessas leveduras é na síntese de etanol de segunda-geração, mas, assim como a *S. cerevisiae*, leveduras possuem diversas enzimas em seu interior celular, portanto, eram esperados resultados mais promissores.

Baseado nos resultados citados, foi decidido estudar a utilização das leveduras de forma fresca, pois foi levantada a hipótese de que a secagem e o aquecimento a $40\text{ }^\circ\text{C}$ poderia, de alguma forma, inativar as enzimas presentes nos microrganismos.

4.4.1 Influência do estado de conservação das leveduras

Para utilizar as leveduras frescas, as mesmas tiveram que ser coletadas pela manhã e transportadas até o Depto. de Química para serem adicionadas nos sistemas bifásicos em tempo hábil para uma reação de 8 h. As condições da reação biocatalisadas foram as mesmas do estudo das leveduras secas, com apenas a alteração do seu estado de conservação. Os resultados dos novos testes estão apresentados na **Tabela 9**.

Tabela 9. Conversão em **26r** realizadas com leveduras selvagens. Condições: **26** (50 mg), levedura fresca (1 g), tampão K_2HPO_4 /ácido cítrico (15 mL, pH = 6,5), *n*-hexano (15 mL), DMSO (2,25 mL), glicose (1,5 g), t = 35 °C, t = 8 h, 300 rpm.

#	Levedura	Conversão (%)
1	Hmd 19.3	6
2	Hmd 23.3	<5
3	Hmd 2.1	8
4	Hm 19.1a	<5
5	Hm 45.1	<5
6	Xmd 16.2	<5
7	Xmd 23.2	<5

Como pode ser observado, os resultados não foram satisfatórios, sendo a conversão em **26r** <5% ou 8%. Ou seja, houve apenas uma pequena melhora nos valores de conversão ao usar as leveduras frescas.

Com o intuito de estudar e definir melhor a influência do estado de conservação das leveduras, foram selecionadas duas leveduras *S. cerevisiae* industriais (CAT-1 e PE-2) que estavam liofilizadas e disponíveis no Lab. de Biocatálise. No LBMBL, as mesmas cepas de *S. cerevisiae* foram cultivadas em meio de cultura para que a biomassa fosse adquirida fresca e depois seca. Os valores de conversão da biorredução da chalcona bifenílica **26**, usando as diferentes fontes de *S. cerevisiae*, estão apresentadas na **Tabela 10**.

Tabela 10. Valores de conversão em **26r** realizadas com *S. cerevisiae* em diferentes estados de conservação. Condições: **26** (50 mg), levedura (1 g), tampão K_2HPO_4 /ácido cítrico (15 mL, pH = 6,5), *n*-hexano (15 mL), DMSO (2,25 mL), glicose (1,5 g), t = 35 °C, t = 8 h, 300 rpm.

#	Levedura	Estado de conservação	Conversão (%)
1	FP	Liofilizado	70
2		Liofilizado	62
3	CAT-1	Seco	66
4		Fresco	69
5		Liofilizado	50
6	PE-2	Seco	49
7		Fresco	59

A partir destes resultados, observa-se uma melhoria nos valores de conversão em função do estado de conservação da levedura, em especial ao utilizar a levedura úmida e fresca (62 – 69% para a CAT-1 e 50 – 59% para a PE-2). Ao usar as leveduras industriais, foram obtidos resultados satisfatórios de conversão para o produto **26r**, sendo a CAT-1 com os melhores resultados entre as duas leveduras industriais.

Foi definido então que o estado de conservação das leveduras é fundamental para essa reação de biorredução, e ao usar leveduras selvagens os resultados não foram satisfatórios quando comparadas com a utilização de FP comercial e industrial.

5 CONCLUSÕES

A partir de todos os resultados obtidos no presente trabalho, foram obtidas as seguintes conclusões:

- Das 12 chalconas bifenílicas (**26-38**) propostas de serem sintetizadas, apenas uma (**27**) não foi obtida com sucesso, as demais foram obtidas com bons rendimentos, variando de 40 – 98%;
- Os álcoois racêmicos (**26a – 38a**) foram obtidos e caracterizados apropriadamente, podendo ser utilizados como padrões espectroscópicos de RMN de ^1H para confirmação da quimiosseletividade da biorredução;
- O único produto formado na biorredução das chalconas **26-38** mediadas por *S. cerevisiae*, foram os da redução da insaturação α,β , gerando as respectivas chalconas saturadas;
- Ao considerar o sistema bifásico como um método de imobilização do FP, este foi o mais eficiente para a biorredução das chalconas bifenílicas, quando comparado com a imobilização por microesferas de alginato de cálcio;
- Os maiores valores de conversão para o composto **26r** foram obtidos em sistema bifásico com 2 g (31 g.L^{-1}) do biocatalisador *S. cerevisiae* (FP comercial);
- Ao usar o *n*-hexano ($\log P = 3,5$) obteve-se as maiores conversões (>90%) e este foi utilizado na maioria dos experimentos, mesmo sendo um solvente tóxico;
- As reações que utilizaram a solução tampão K_2HPO_4 /ácido cítrico apresentaram os maiores valores de conversão da chalcona **26** ao comparar com a utilização de água destilada;
- A massa máxima de substrato **26** tolerada pelo sistema é de 100 mg ($1,55 \text{ g.L}^{-1}$), sendo que a partir de 150 mg ($2,33 \text{ g.L}^{-1}$) ocorreu a inibição da atividade da oxidorredutase;
- A temperatura e o pH ótimos da reação de biorredução da chalcona **26** medida por FP foram de $35 \text{ }^\circ\text{C}$ e $\text{pH} = 6,5$;

- Foi necessário o uso de aditivos, sendo o DMSO utilizado como cossolvente e a glicose como açúcar para auxiliar na recuperação de cofatores;
- A utilização de LIs como cossolventes não resultou em uma melhoria dos valores de conversão para o produto **26r**;
- A variação do volume da fase orgânica e da fase aquosa foi importante para minimizar o sistema reacional;
- No sistema bifásico otimizado, o produto 1-([1,1'-bifenil]-4-il)-3-fenilpropan-1-ona **26r** foi obtido com 91% de conversão;
- Os efeitos eletrônicos dos grupos substituintes no anel C das chalconas **33-38** foram dependentes da natureza e posição dos grupos, sendo a *para* mais favorecida;
- Não foi observado dependência do efeito eletrônico para as chalconas bifenílicas **28-32** como esperado, mas verificou-se um forte efeito estéreo em todas as posições do anel C;
- As sete leveduras selvagens *S. brasiliensis*, *S. xylofermentans*, *S. passalidarum*, *S. arborariae*, *S. suhii*, *S. roraimanensis* e *S. stipis* não foram eficientes na biorredução da chalcona bifenílica **26** com o sistema bifásico reduzido;
- Ao usar as cepas de *S. cerevisiae* industriais CAT-1 e PE-2, obteve-se bons valores de conversão (50-69%) com o sistema bifásico reduzido;
- O estado de conservação da levedura (fresco, seco ou liofilizado) influenciou nos resultados;

De maneira geral, verifica-se a importância da otimização das condições reacionais nas reações biocatalisadas por leveduras para a obtenção dos melhores valores de conversão. O uso do sistema bifásico com aditivos foi fundamental para o aumento das conversões das reações de biorredução dos compostos carbonílicos α,β -insaturados, apresentando um excelente potencial para ser empregado como um método mais verde na obtenção de compostos de interesse sintético. É importante ressaltar que em todas as reações estudadas, foi verificado apenas a biorredução da ligação C=C das chalconas, evidenciando a quimiosseletividade do sistema biocatalítico.

6 PERSPECTIVAS

A partir dos resultados obtidos, têm-se com perspectivas:

- Avaliar a atividade biológica das chalconas saturadas **26r-38r**;
- Síntese de chalconas bifênlicas com outros substituintes, com variações em todas as posições disponíveis no anel C, visando um estudo mais aprofundado do efeito eletrônico e estéreo;
- Investigar uma nova forma de encapsulação efetiva com o alginato de cálcio, para possibilitar a reutilização do catalisador;
- Buscar e testar outras leveduras do gênero *Saccharomyces*.

7 REFERÊNCIAS

1. Au, S. K., Groover, J., Feske, B. D. & Bommarius, A. S. *Organic Synthesis Using Biocatalysis. Organic Synthesis Using Biocatalysis* (2016). doi:10.1016/B978-0-12-411518-7.00007-X
2. Bommarius, A. S. & Riebel, B. R. Introduction to biocatalysis. *Biocatal. Fundam. Appl.* 1–18 (2004). doi:10.1016/S0167-7799(00)89010-1
3. Meyer, H.-P. *et al.* The use of enzymes in organic synthesis and the life sciences: perspectives from the Swiss Industrial Biocatalysis Consortium (SIBC). *Catal. Sci. Technol.* **3**, 29–40 (2013).
4. Buehler, E. Enzymes: The Little Molecules That Bake Bread. *Scientific American* (2012). Available at: <https://blogs.scientificamerican.com/guest-blog/enzymes-the-little-molecules-that-bake-bread/>. (Acessado: 16° janeiro 2018)
5. Nelson, D. L. & Cox, M. M. Enzymes. in *Lehninger Principles of Biochemistry* 189–242 (W. H. Freeman and Company, 2013).
6. Bruice, P. Y. *Organic Chemistry*. (Pearson, 2013).
7. Itoh, T. & Hanefeld, U. Enzyme catalysis in organic synthesis. *Green Chem.* 331–332 (2017). doi:10.1039/C6GC90124G
8. Johnson, K. A. & Goody, R. S. The Original Michaelis Constant: Translation of the 1913 Michaelis–Menten Paper. *Biochemistry* **50**, 8264–8269 (2011).
9. IUPAC. Catalyst. *IUPAC Compendium of Chemical Technology* (1996). Available at: <https://goldbook.iupac.org/html/C/C00876.html>. (Acessado: 2° agosto 2017)
10. Faber, K. *Biotransformations in Organic Chemistry*. (Springer Berlin Heidelberg, 2011). doi:10.1007/978-3-642-17393-6
11. May, J. & S. Goodsell, D. What is a Protein? *RCSB PDB-101* Available at: <https://cdn.rcsb.org/pdb101/learn/resources/what-is-a-protein/what-is-a-protein.pdf>. (Acessado: 16° janeiro 2018)
12. Voet, D. & Voet, J. G. *Biochemistry*. (Wiley, 2010).
13. Pazmiño, D. E. T., Snajdrova, R., Rial, D. V., Mihovilovic, M. D. & Fraaije, M. W. Altering the Substrate Specificity and Enantioselectivity of Phenylacetone Monooxygenase by Structure-Inspired Enzyme Redesign. *Adv. Synth. Catal.* **349**, 1361–1368 (2007).
14. Brondani, P. B., Dudek, H. M., Martinoli, C., Mattevi, A. & Fraaije, M. W. Finding the Switch: Turning a Baeyer–Villiger Monooxygenase into a NADPH Oxidase. *J. Am. Chem. Soc.* **136**, 16966–16969 (2014).
15. Koshland, D. E. The Key–Lock Theory and the Induced Fit Theory.

- Angew. Chemie Int. Ed. English* **33**, 2375–2378 (1995).
16. Seddigi, Z. S., Malik, M. S., Ahmed, S. A., Babalghith, A. O. & Kamal, A. Lipases in asymmetric transformations: Recent advances in classical kinetic resolution and lipase–metal combinations for dynamic processes. *Coord. Chem. Rev.* **348**, 54–70 (2017).
 17. Schomburg, D. BRENDA The comprehensive enzyme information system. *Institut fuer Biochemie und Bioinformatik, Technische Universität Braunschweig* (2014). Available at: <http://www.brenda-enzymes.info/>.
 18. Koolman, J. & Roehm, K.-H. *Color Atlas of Biochemistry*. (Thieme, 2012).
 19. Drauz, K., Gröeger, H. & May, O. *Enzyme Catalysis in Organic Synthesis*. **1**, (2012).
 20. Learning Pathwayz. Enzyme Cofactors. (2018). Available at: <https://www.pathwayz.org/Tree/Plain/ENZYME+COFACTORS>. (Acessado: 9º janeiro 2018)
 21. Chu, Y., Zhang, B. L., Silvestre, V. & Cheng, J. P. Hydrogen transfer pathways of the asymmetric reduction of α,β -unsaturated ketone mediated by baker's yeast. *Bioorg. Chem.* **34**, 158–166 (2006).
 22. Kawai, Y., Hayashi, M. & Tokitoh, N. Asymmetric synthesis of a-chiral ketones by the reduction of enones with baker's yeast. *Tetrahedron* **12**, 3007–3013 (2002).
 23. Silva, V. D., Stambuk, B. U. & Nascimento, M. da G. Efficient chemoselective biohydrogenation of 1,3-diaryl-2-propen-1-ones catalyzed by *Saccharomyces cerevisiae* yeasts in biphasic system. *J. Mol. Catal. B Enzym.* **63**, 157–163 (2010).
 24. Sigrist, R., Costa, B. Z., Marsaioli, A. J. & Oliveira, L. G. Nature-inspired enzymatic cascades to build valuable compounds. *Biotechnol. Adv.* **33**, 394–411 (2015).
 25. Wikipedia. Ethanol fermentation. (2017). Available at: https://en.wikipedia.org/wiki/Ethanol_fermentation. (Acessado: 17º janeiro 2018)
 26. ETH Zurich. Vitamin C - Der Schweizerische Weg zur Vitamin-C Synthese. Available at: <https://www.tg.ethz.ch/projekte/details/vitamin-c/>. (Acessado: 10º janeiro 2018)
 27. SGD. *Saccharomyces cerevisiae* Pathway: glycolysis. Available at: <https://pathway.yeastgenome.org/YEAST/new-image?type=PATHWAY&object=GLYCOLYSIS&detail-level=2&EXP-ONLY=T>. (Acessado: 10º janeiro 2018)
 28. Souza Brenelli, E. C., Samenho Moran, P. J. & Rodrigues, J. A. R. Preparation of (-)-(1R, 2S)-1-Phenylpropane-1,2-Diol by Fermenting Baker's Yeast Reduction of 1-Phenyl-1,2-propanedione. *Synth.*

- Commun.* **20**, 261–266 (1990).
29. de Carvalho, M., Okamoto, M. T., Moran, P. J. S. & Rodrigues, J. A. R. Baker's yeast reduction of α -haloacetophenones. *Tetrahedron* **47**, 2073–2080 (1991).
 30. Birolli, W. G. *et al.* Biocatalysis and biotransformation in Brazil: An overview. *Biotechnol. Adv.* **33**, 481–510 (2015).
 31. Muthineni, N. *et al.* A Green approach towards the synthesis of chiral alcohols using functionalized alginate immobilized *Saccharomyces cerevisiae* cells. *J. Mol. Catal. B Enzym.* **134**, 233–237 (2016).
 32. Schaefer, C. A. BIOTRANSFORMAÇÃO DE COMPOSTOS CARBONÍLICOS COM MICRORGANISMOS EM SISTEMA AQUOSO E/OU BIFÁSICO. (Universidade Federal de Santa Catarina, 2015).
 33. Dutra Silva, V. BIOTRANSFORMAÇÃO DE COMPOSTOS CARBONÍLICOS α,β - INSATURADOS MEDIADA POR MICROORGANISMOS. (Universidade Federal de Santa Catarina, 2009).
 34. Dutra Silva, V. BIORREDUÇÃO DE OLEFINAS ATIVADAS CATALISADA POR LEVEDURAS E FUNGOS EM MEIO AQUOSO OU SISTEMA BIFÁSICO. (Universidade Federal de Santa Catarina, 2012).
 35. Silva, V. D., Stambuk, B. U. & Nascimento, M. D. G. Asymmetric reduction of (4R)-(-)-carvone catalyzed by Baker's yeast in aqueous mono- and biphasic systems. *J. Mol. Catal. B Enzym.* **77**, 98–104 (2012).
 36. Martinek, K., Semenov, A. N. & Berezin, I. V. Enzymatic synthesis in biphasic aqueous-organic systems. I. Chemical equilibrium shift. *BBA - Enzymol.* **658**, 76–89 (1981).
 37. Randolph, T. W., Blanch, H. W., Prausnitz, J. M. & Wilke, C. R. Enzymatic catalysis in a supercritical fluid. *Biotechnol. Lett.* **7**, 325–328 (1985).
 38. Madeira Lau, R., Van Rantwijk, F., Seddon, K. R. & Sheldon, R. A. Lipase-Catalyzed Reactions in Ionic Liquids. *Org. Lett.* **2**, 4189–4191 (2000).
 39. Laane, C., Boeren, S., Vos, K. & Veeger, C. Rules for optimization of biocatalysis in organic solvents. *Biotechnol. Bioeng.* **30**, 81–87 (1987).
 40. Anastas, P. & Eghbali, N. Green Chemistry: Principles and Practice. *Chem. Soc. Rev.* **39**, 301–312 (2010).
 41. Prat, D., Hayler, J. & Wells, A. A survey of solvent selection guides. *Green Chem.* **16**, 4546–4551 (2014).
 42. Rosa, G. P., Seca, A. M. L., Barreto, M. do C. & Pinto, D. C. G. A. Chalcone: A Valuable Scaffold Upgrading by Green Methods. *ACS*

- Sustain. Chem. Eng.* accsuschemeng.7b01687 (2017). doi:10.1021/accsuschemeng.7b01687
43. Costa, Paulo Pilli, Ronaldo Pinheiro, S. & Vasconcellos, M. *Substâncias Carboniladas e Derivados*. (Bookman, 2003).
 44. Chiaradia, L. D. *et al.* Synthesis, Biological Evaluation, And Molecular Modeling of Chalcone Derivatives As Potent Inhibitors of Mycobacterium tuberculosis Protein Tyrosine Phosphatases (PtpA and PtpB). *J. Med. Chem.* **55**, 390–402 (2012).
 45. Winter, E. *et al.* Naphthylchalcones induce apoptosis and caspase activation in a leukemia cell line: The relationship between mitochondrial damage, oxidative stress, and cell death. *Bioorg. Med. Chem.* **18**, 8026–8034 (2010).
 46. Zanotto, S. P. Utilização de enzimas e microorganismos para a obtenção de compostos oticamente ativos. (Universidade Federal de Santa Catarina, 2003).
 47. Basso, L. C., De Amorim, H. V., De Oliveira, A. J. & Lopes, M. L. Yeast selection for fuel ethanol production in Brazil. *FEMS Yeast Res.* **8**, 1155–1163 (2008).
 48. Koneman, E. W., D., A. S., Janda, M. W., Schreckenberger, P. C. & Winn W. C. Introduction to Microbiology. *Color Atlas Textb. Diagnostic Microbiol.* 67–110 (2006). doi:doi:10.1201/9781420021622.ch1
 49. Cadete, R. M. *et al.* *Spathaspora brasiliensis* sp. nov., *Spathaspora suhii* sp. nov., *Spathaspora roraimanensis* sp. nov. and *Spathaspora xylofermentans* sp. nov., four novel d-xylose-fermenting yeast species from Brazilian Amazonian forest. *Antonie Van Leeuwenhoek* **103**, 421–431 (2013).
 50. Albuquerque, P. M., Witt, M. A., Stambuk, B. U. & Nascimento, M. da G. Influence of sugars on enantioselective reduction using *Saccharomyces cerevisiae* in organic solvent. *Process Biochem.* **42**, 141–147 (2007).
 51. Mo, K. *et al.* Synthesis of pyrazine via chemoselective reduction of β -keto- α -oximino ester using baker's yeast. *J. Mol. Catal. B Enzym.* **123**, 29–34 (2016).
 52. Bencze, L. C., Paizs, C., Toşa, M. I. & Irimie, F. D. Substituent effects on the stereochemical outcome of the baker's yeast-mediated biotransformation of α -hydroxy- and α -acetoxymethyl-5-phenylfuran-2-yl-ethanones. *Tetrahedron: Asymmetry* **21**, 356–364 (2010).
 53. Yu, Z.-W. & Quinn, P. J. Dimethyl sulphoxide: A review of its applications in cell biology. *Biosci. Rep.* **14**, 259–281 (1994).
 54. Habulin, M. & Knez, Ž. Optimization of (R,S)-1-phenylethanol kinetic resolution over *Candida antarctica* lipase B in ionic liquids. *J.*

- Mol. Catal. B Enzym.* **58**, 24–28 (2009).
55. Royal Society of Chemistry. Keywords: ionic liquids. Available at: <http://pubs.rsc.org/en/results/journals?Category=journal&AllText=ionic liquid&IncludeReference=false&SelectJournal=True&ArtRefJournalName=Green Chemistry%3B&DateRange=false&SelectDate=false&PriceCode=False&OpenAccess=false&JournalName=Green Chemistry>. (Accessado: 17º fevereiro 2018)
56. Zampieri, D. S. *et al.* Enhancements of enantio and diastereoselectivities in reduction of (Z)-3-halo-4-phenyl-3-buten-2-one mediated by microorganisms in ionic liquid/water biphasic system. *J. Mol. Catal. B Enzym.* **85–86**, 61–64 (2013).
57. Duarte, J. C., Rodrigues, J. A. R., Moran, P. J. S., Valença, G. P. & Nunhez, J. R. Effect of immobilized cells in calcium alginate beads in alcoholic fermentation. *AMB Express* **3**, 31 (2013).
58. Milagre, H. M. S., Milagre, C. D. F., Moran, P. J. S., Santana, M. H. A. & Rodrigues, J. A. R. Asymmetric Bioreduction of Ethyl 3-Halo-2-oxo-4-phenylbutanoate by *Saccharomyces cerevisiae* Immobilized in Ca-Alginate Beads with Double Gel Layer. *Org. Process Res. Dev.* **10**, 611–617 (2006).
59. Socrates, G. *Infrared and Raman characteristic group frequencies. Infrared and Raman characteristic group frequencies* (2004). doi:10.1002/jrs.1238

APÊNDICE I – Espectros de IV dos compostos sintetizados

Tabela 11. Tabela de correlação de espectroscopia de IV produzida com as frequências dos grupos em destaque deste trabalho.⁵⁹

Grupo	Banda* (cm⁻¹)
O-H	3600 – 3200 (s)
H-arílico	3040 – 3010 (w)
-CH₂, -CH₃	2960 – 2850 (s)
CO₂ atmosférico	~ 2350 ~ 665
Overtone do benzeno	2000 – 1600
C=O (cetona) αβ-insaturada	1685 – 1665 (s)
C=C de compostos carbonílicos αβ-insaturados	1640 – 1590 (s)
C-NO₂	1570 – 1540 (s) 1390 – 1340 (s)
C-O de todas as classes	1300 – 1050 (s)
R' – C=C – R'' (trans)	990 – 960 (s)
C-Cl	800 – 600 (s)
Benzeno monosubstituído (5 H adjacentes)	820 – 720 (s) 710 – 670 (s) 630 – 605 (m-w) 560-415 (m-s)
Benzeno orto-dissubstituído (4 H adjacentes)	790 – 720 (s) 555 – 495 (w-m) 470 – 415 (m-s)
Benzeno meta-dissubstituído (3 H adjacentes)	960 – 900 (m) 880 – 830 (m) 820 – 765 (w) 710 – 680 (m-s) 560 – 505 (m) 490 – 415 (m-s)
Benzeno para-dissubstituído (2 H adjacentes)	860 – 780 (s) 650 – 615 (w-m) 520 – 445 (m-s)
Benzeno meta-, tetra-, pentassubstituído (H isolado)	935 – 810 (m-s)

* Intensidade da banda: (vs) = *very strong*, (s) = *strong*, (m) = *medium*, (vw) = *very weak*, (w) = *weak*.

Figura 44. Espectro de IV do composto **29** (KBr)

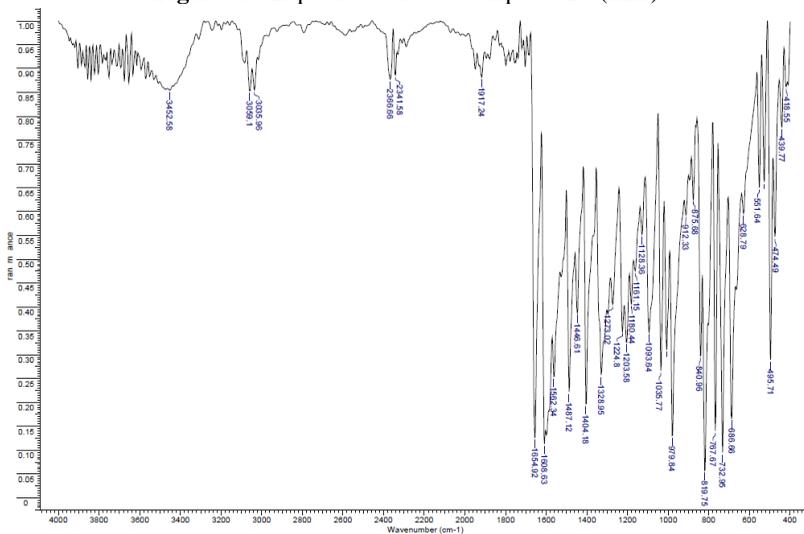


Figura 45. Espectro de IV do composto **31** (KBr)

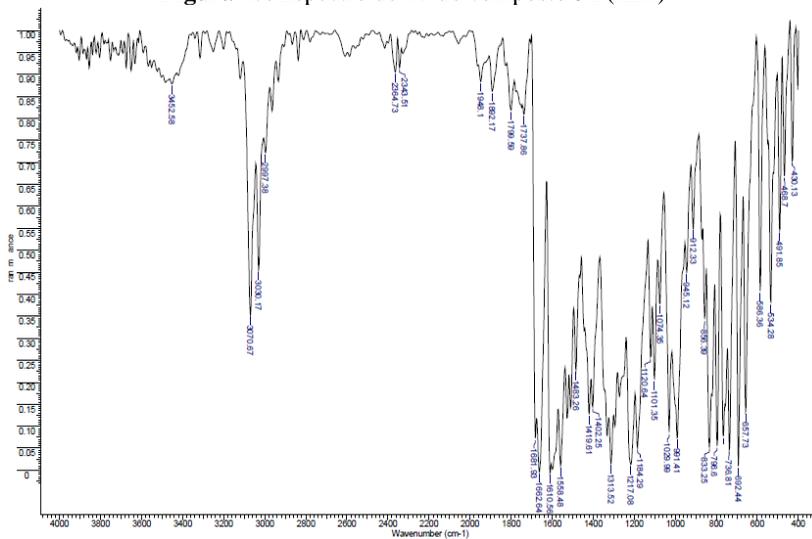


Figura 46. Espectro de IV do composto 32 (KBr)

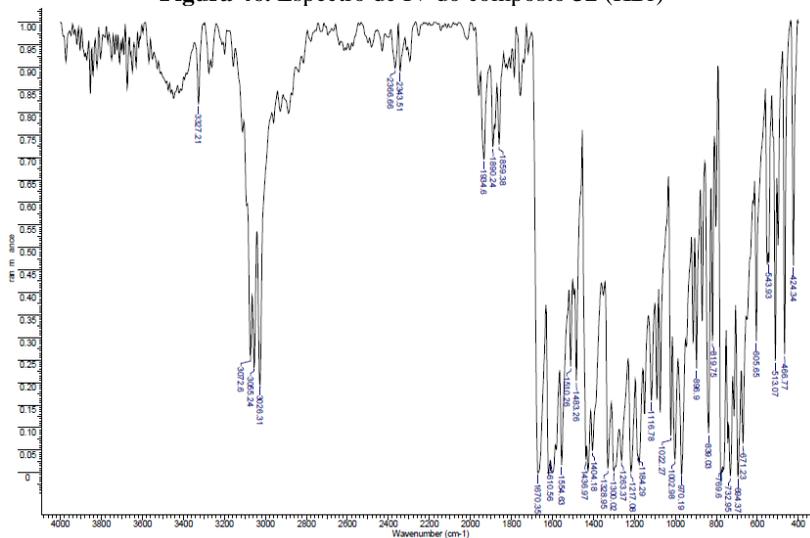


Figura 47. Espectro de IV do composto 33 (KBr)

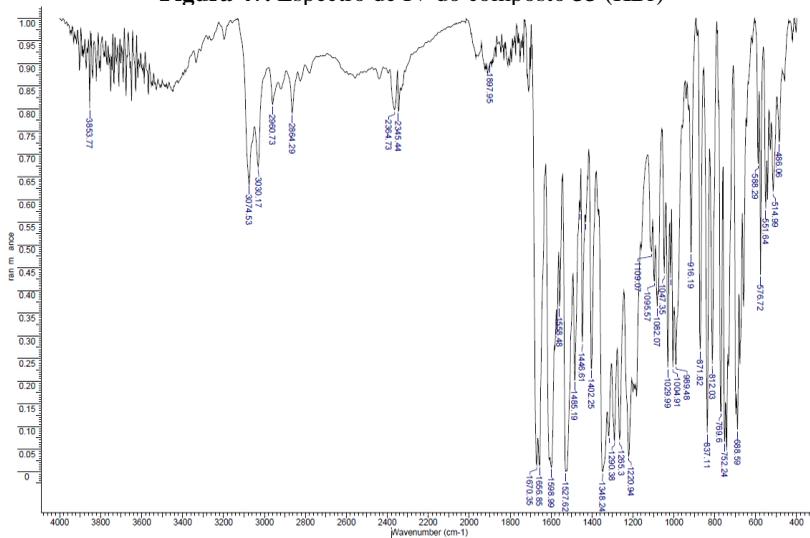


Figura 48. Espectro de IV do composto 34 (KBr)

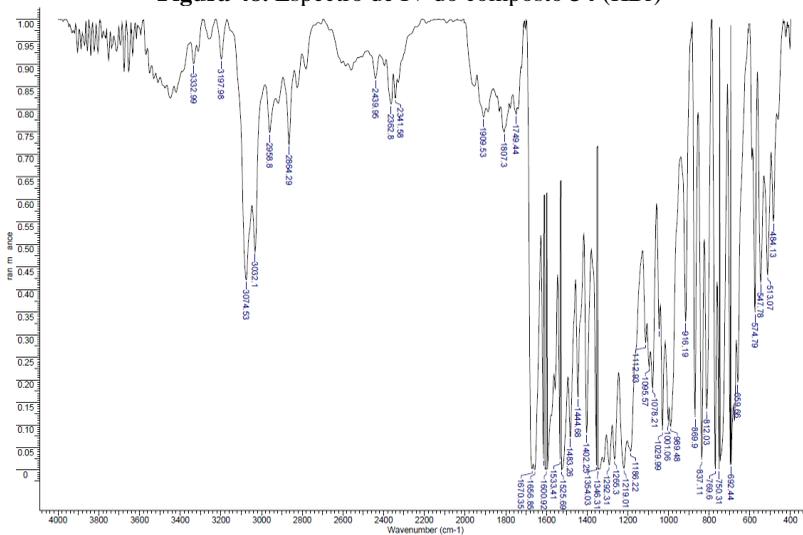


Figura 49. Espectro de IV do composto 35 (KBr)

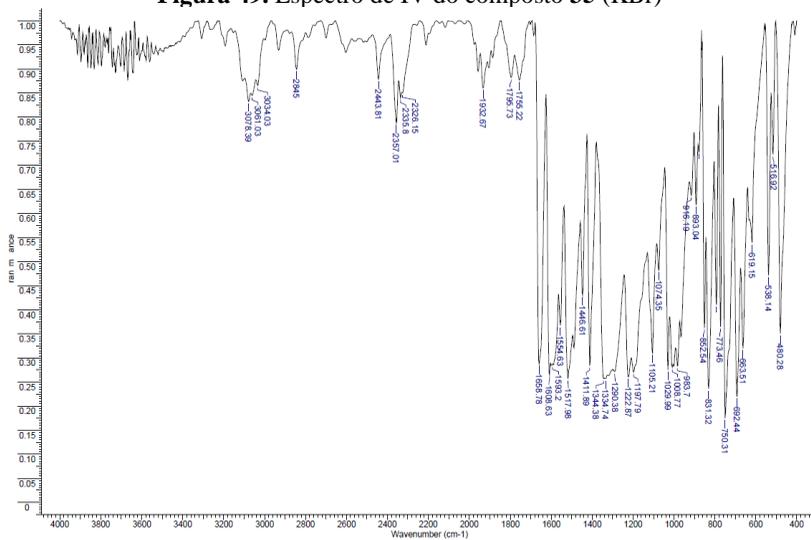


Figura 50. Espectro de IV do composto **36** (KBr)

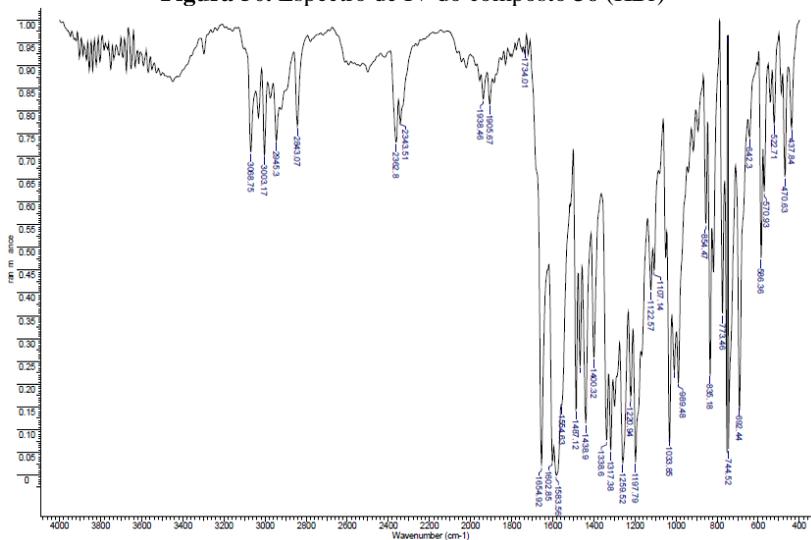
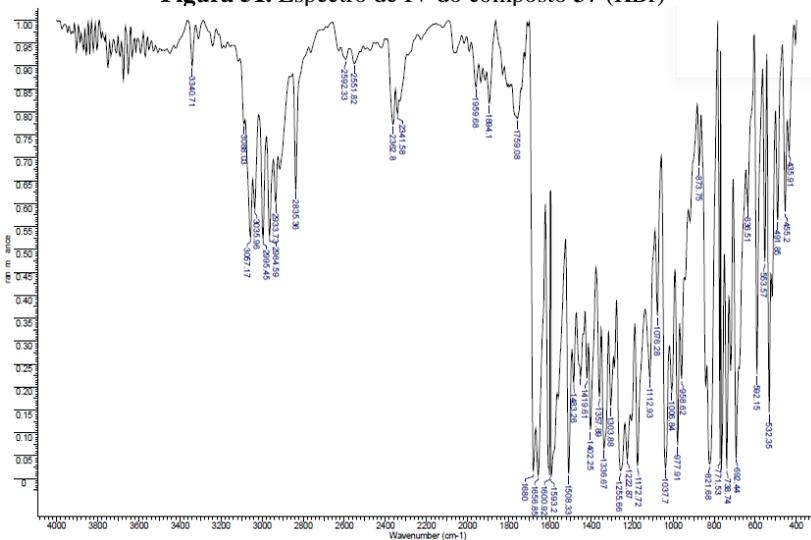


Figura 51. Espectro de IV do composto **37** (KBr)



APÊNDICE II – Espectros de RMN de ^1H e RMN de ^{13}C dos compostos sintetizados

Figura 54. Espectro de RMN de ^1H do composto **26** (400 MHz, CDCl_3)

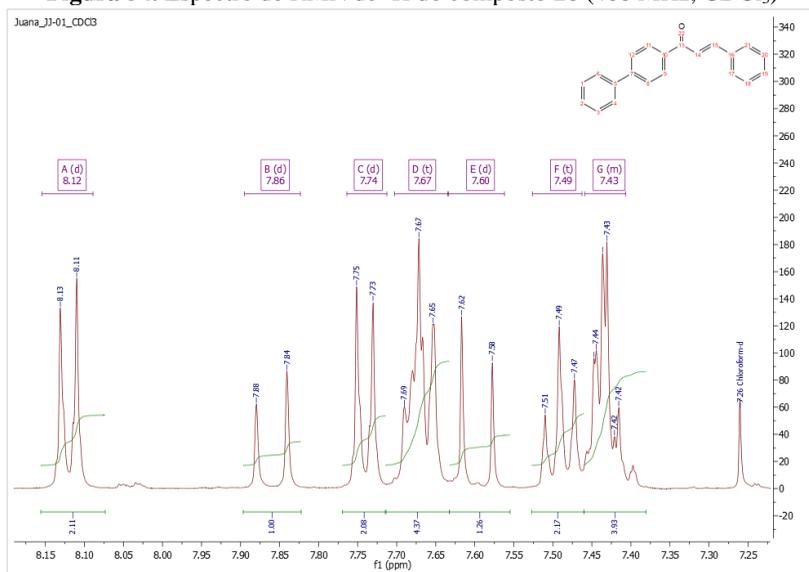


Figura 55. Espectro de RMN bidimensional (^1H - ^1H COSY) do composto **26** (400 MHz, CDCl_3)

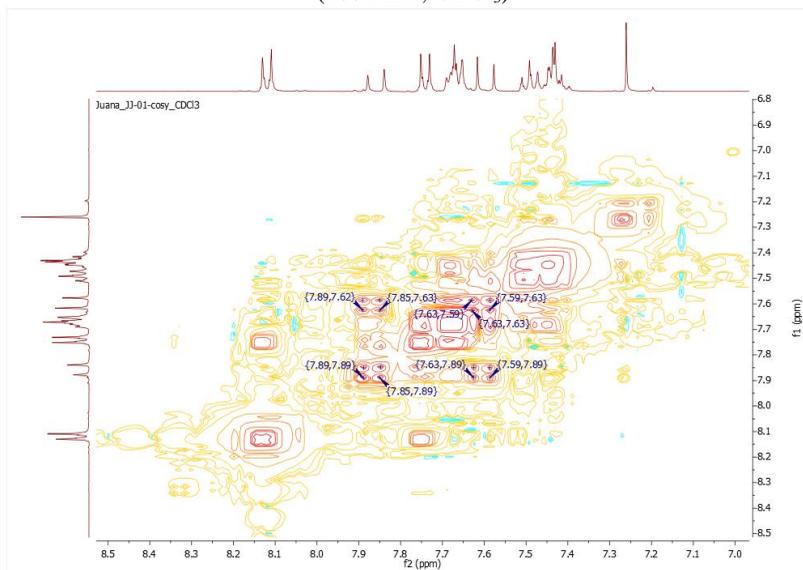


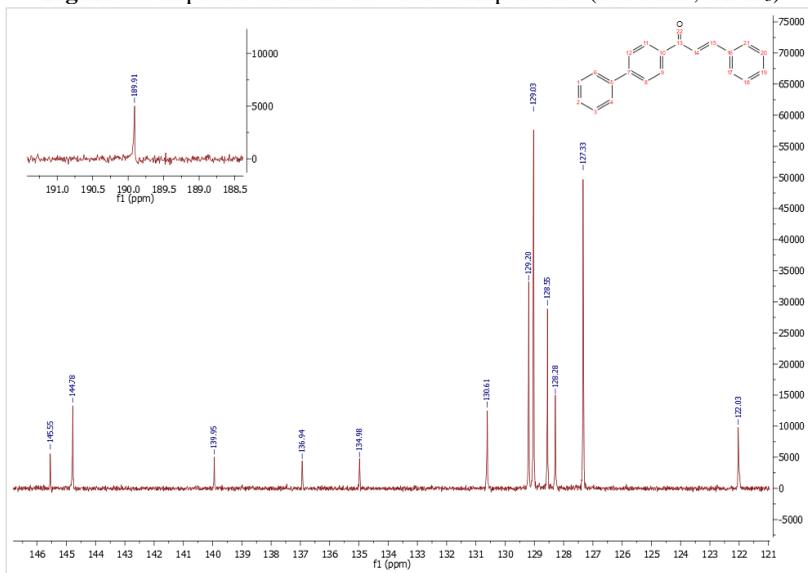
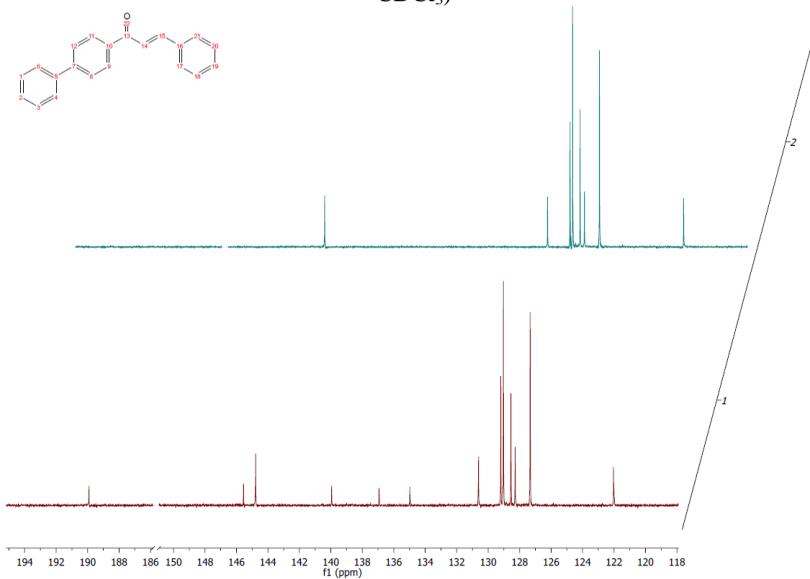
Figura 56. Espectro de RMN de ^{13}C do composto **26** (101 MHz, CDCl_3)**Figura 57.** Espectro de RMN de $^{13}\text{C}/\text{DEPT}$ 135 do composto **26** (101 MHz, CDCl_3)

Figura 58. Espectro de RMN de ^1H do composto **28** (400 MHz, CDCl_3)

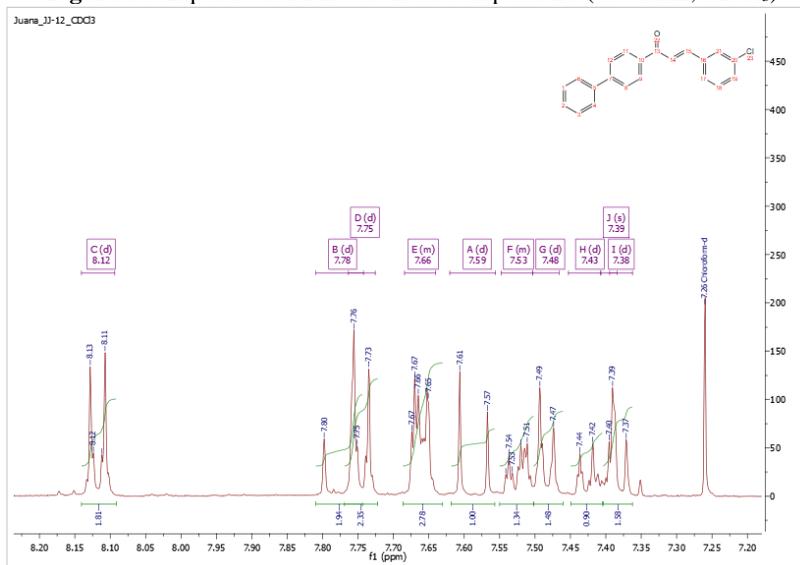


Figura 59. Espectro de RMN de ^{13}C do composto **28** (101 MHz, CDCl_3)

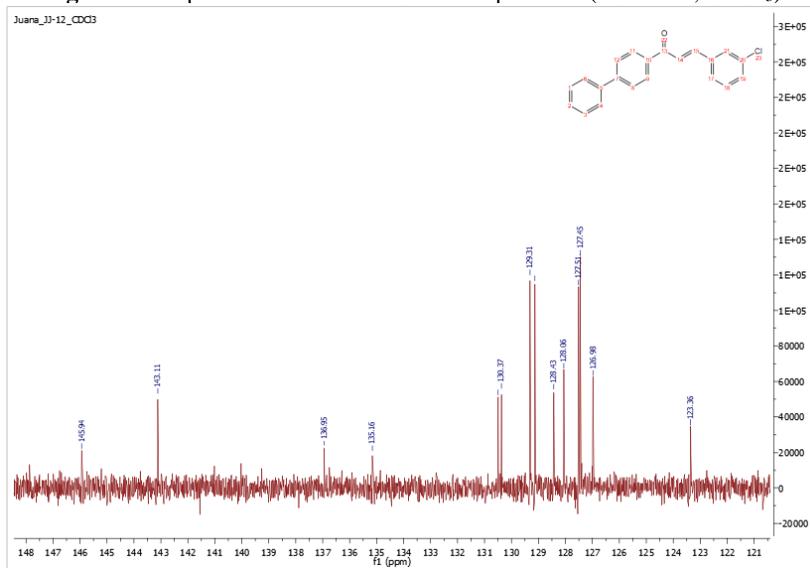


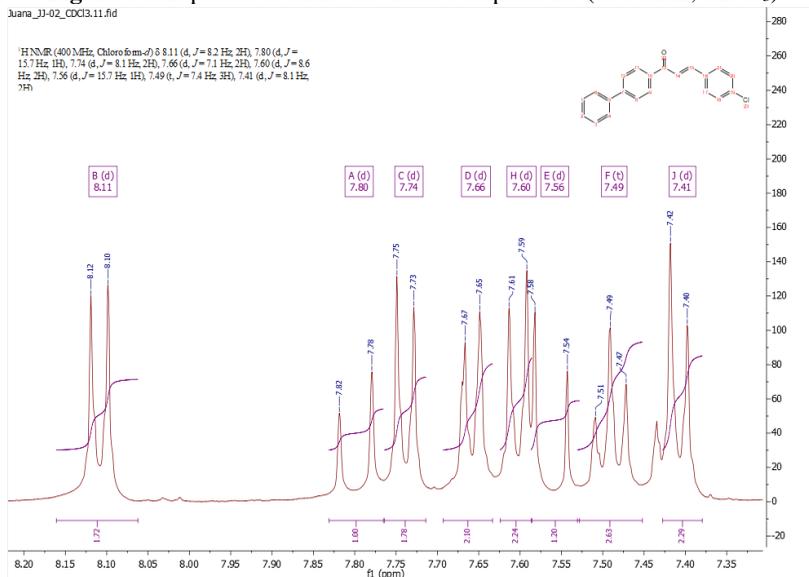
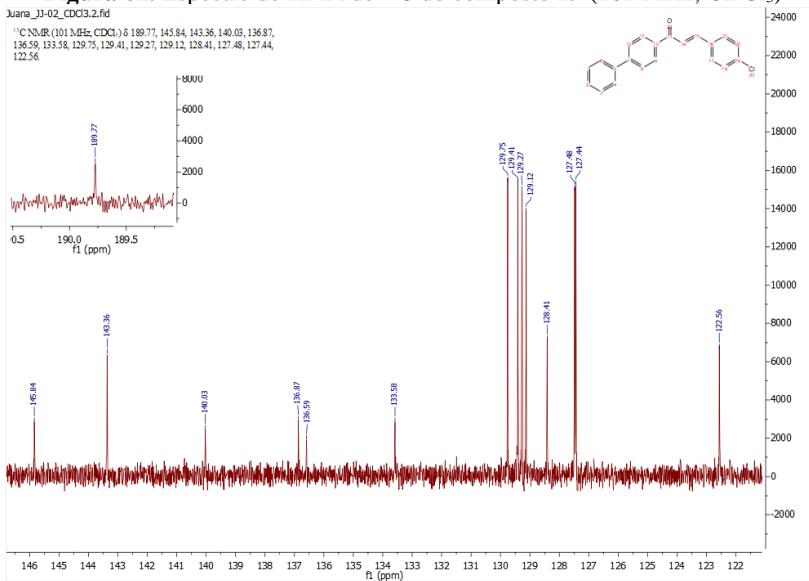
Figura 60. Espectro de RMN de ^1H do composto **29** (400 MHz, CDCl_3)**Figura 61.** Espectro de RMN de ^{13}C do composto **29** (101 MHz, CDCl_3)

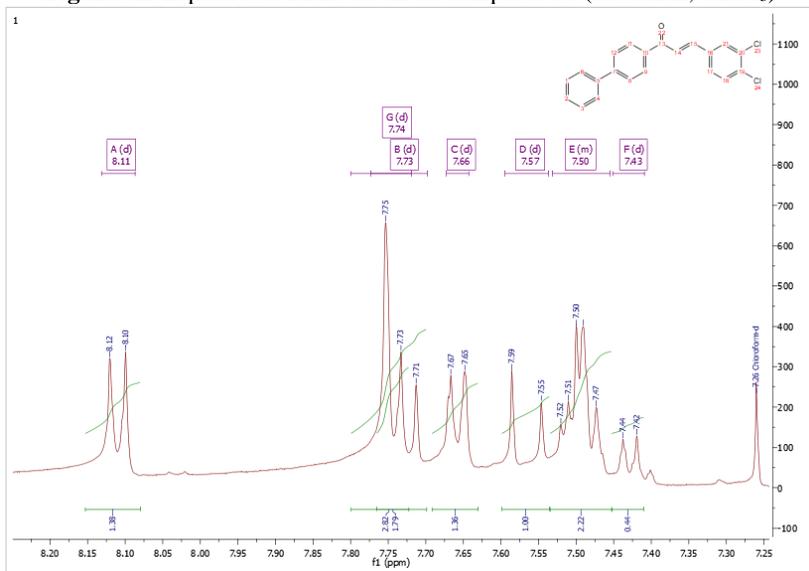
Figura 62. Espectro de RMN de ^1H do composto **30** (400 MHz, CDCl_3)

Figura 63. Espectro de RMN de ^1H do composto **31** (400 MHz, CDCl_3)

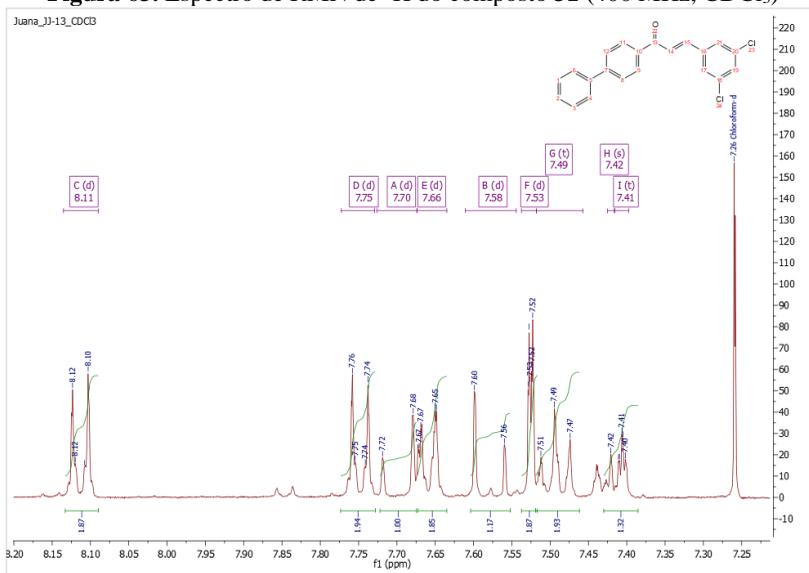


Figura 64. Espectro de RMN de ^{13}C do composto **31** (101 MHz, CDCl_3)

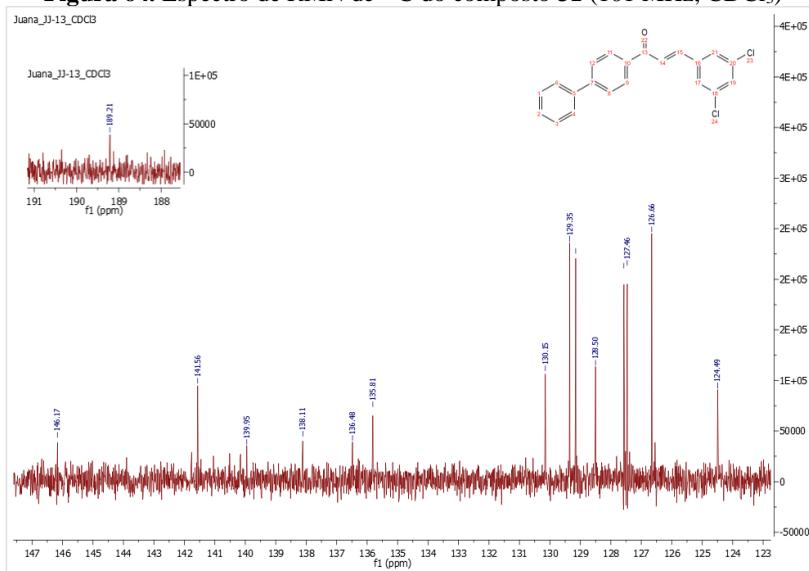


Figura 65. Espectro de RMN de ^1H do composto **32** (400 MHz, CDCl_3)

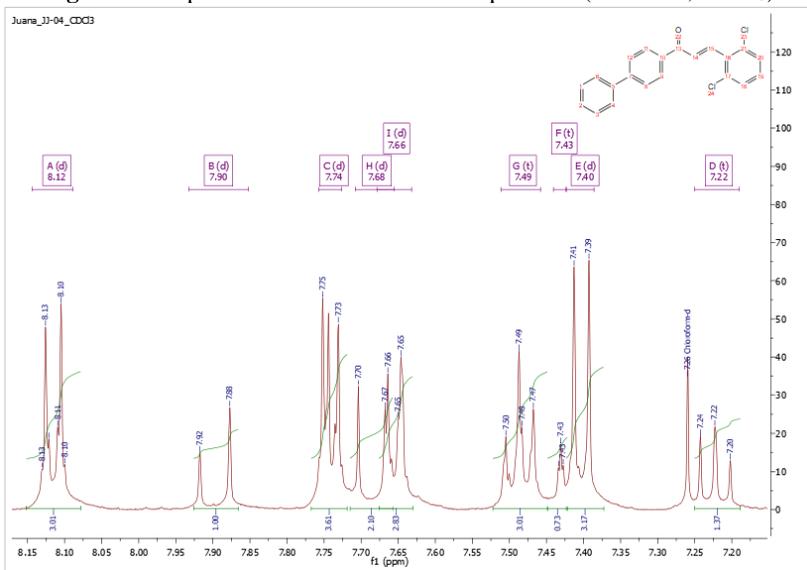


Figura 66. Espectro de RMN de ^{13}C do composto **32** (101 MHz, CDCl_3)

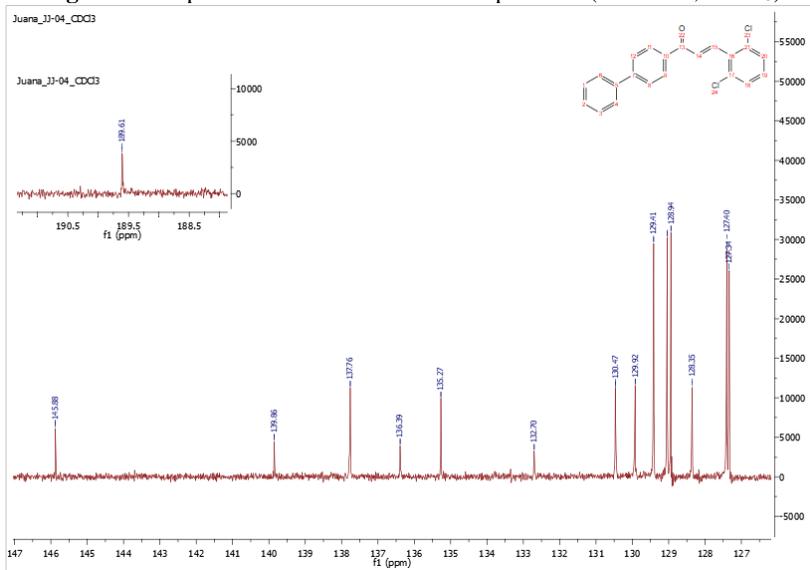


Figura 67. Espectro de RMN de ^1H do composto **33** (400 MHz, CDCl_3)

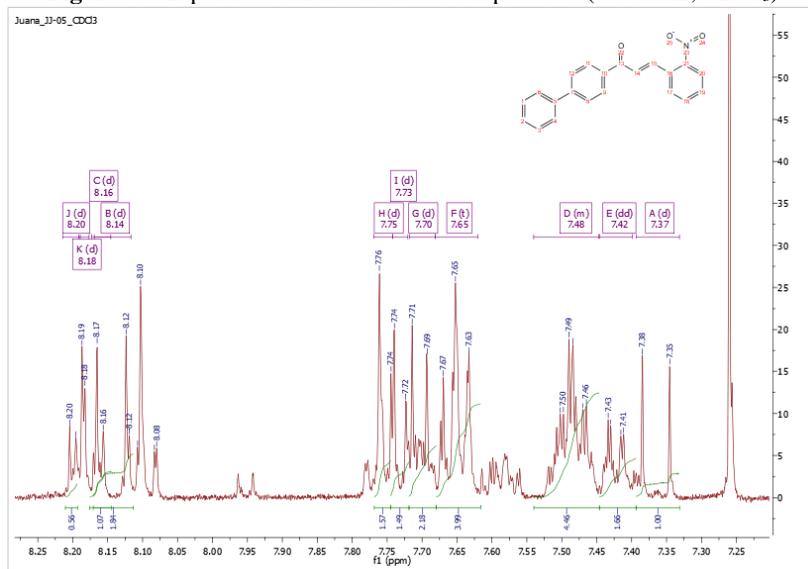


Figura 68. Espectro de RMN de ^{13}C do composto **33** (101 MHz, CDCl_3)

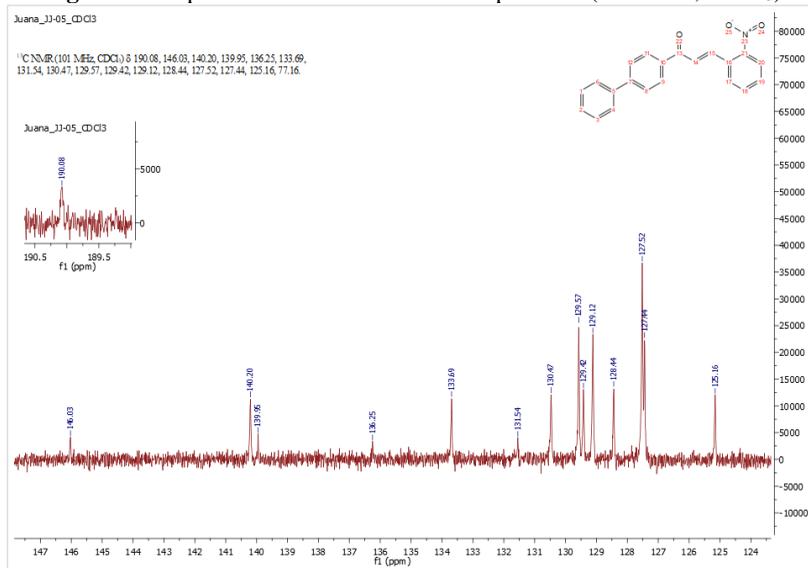


Figura 69. Espectro de RMN de ^1H do composto **34** (400 MHz, CDCl_3)

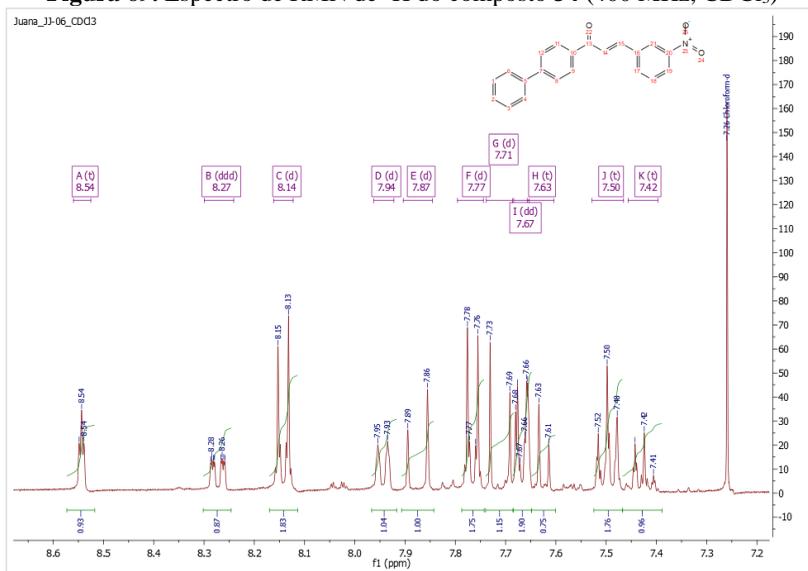


Figura 70. Espectro de RMN de ^{13}C do composto **34** (101 MHz, CDCl_3)

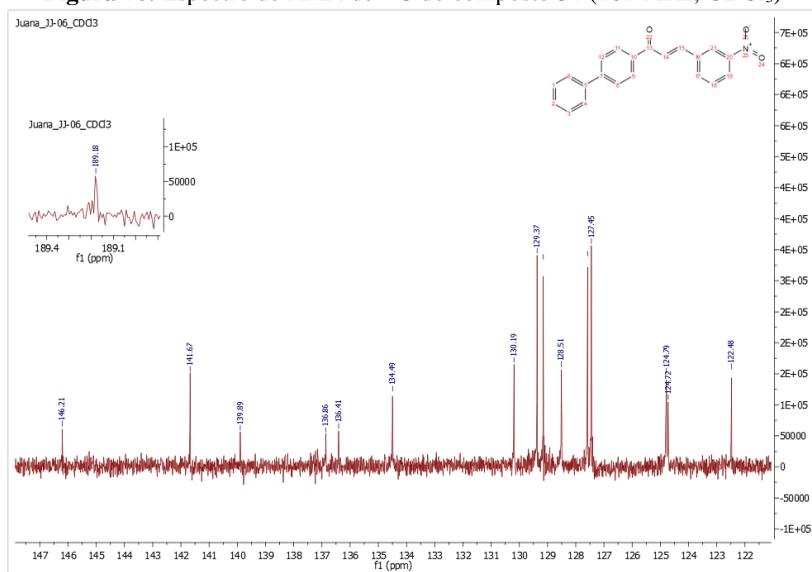


Figura 71. Espectro de RMN de ^1H do composto **35** (400 MHz, CDCl_3)

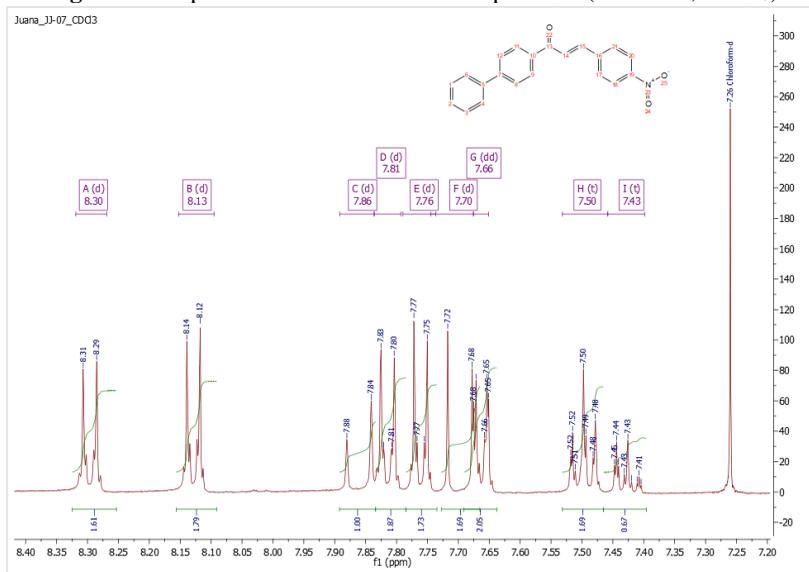


Figura 72. Espectro de RMN de ^{13}C do composto **35** (101 MHz, CDCl_3)

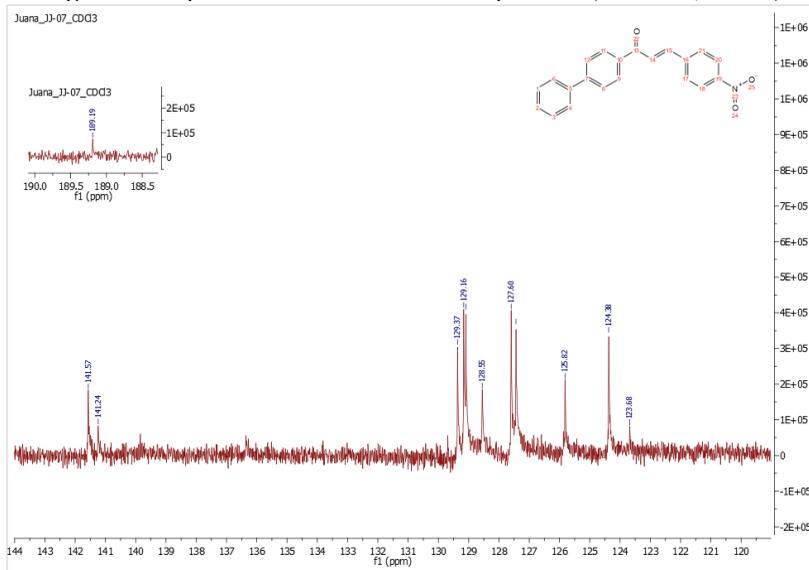


Figura 73. Espectro de RMN de ^1H do composto **36** (400 MHz, CDCl_3)

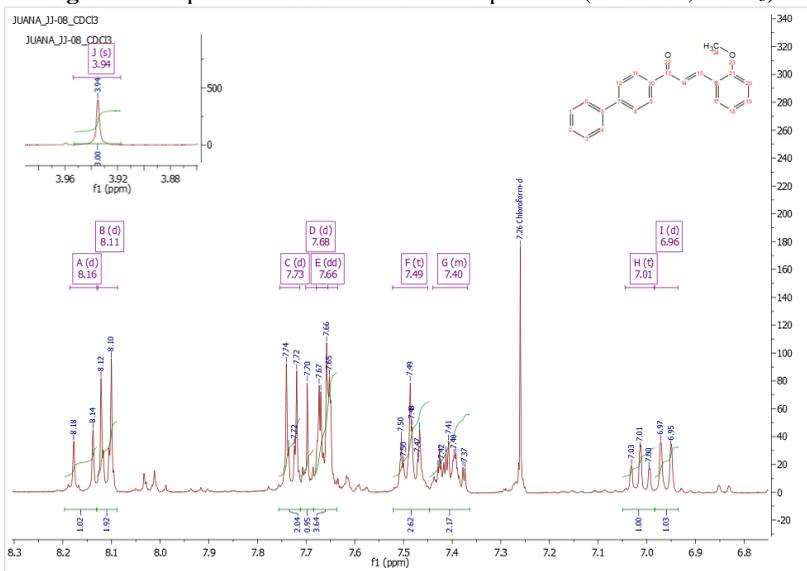


Figura 74. Espectro de RMN de ^{13}C do composto **36** (50 MHz, CDCl_3)

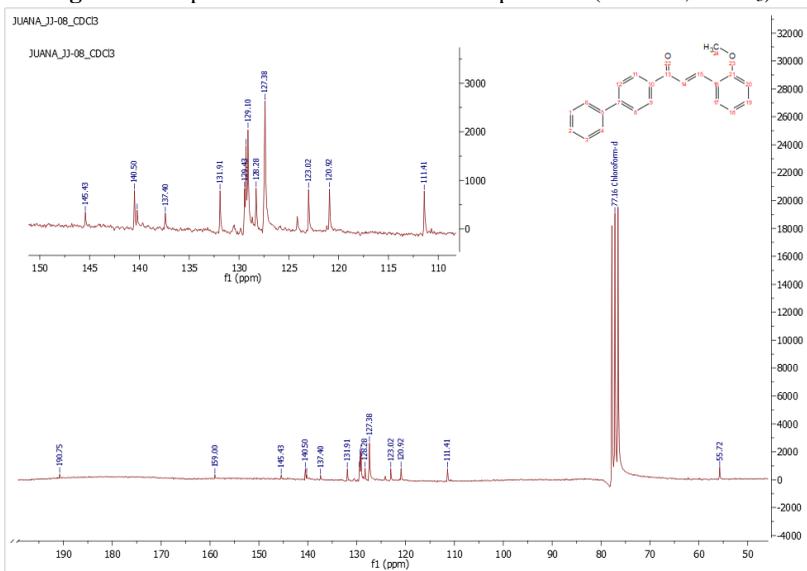


Figura 75. Espectro de RMN de ^1H do composto **37** (400 MHz, CDCl_3)

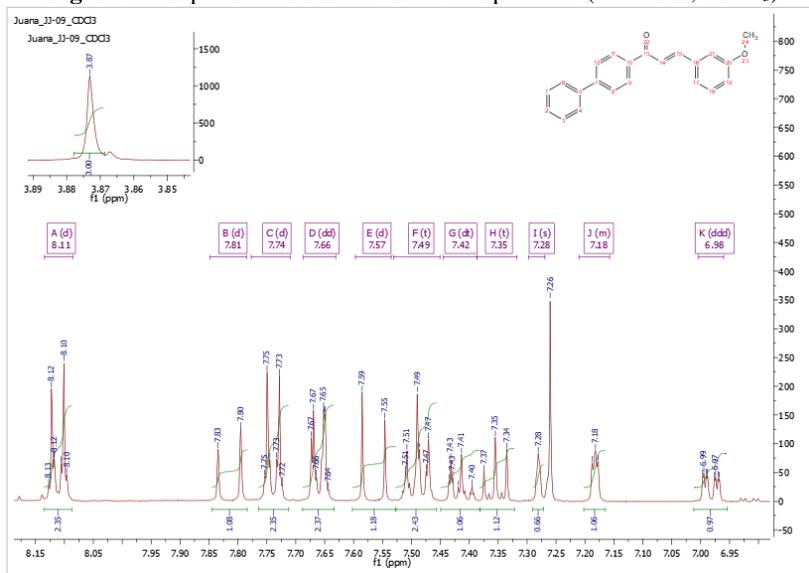


Figura 76. Espectro de RMN de ^{13}C do composto **37** (101 MHz, CDCl_3)

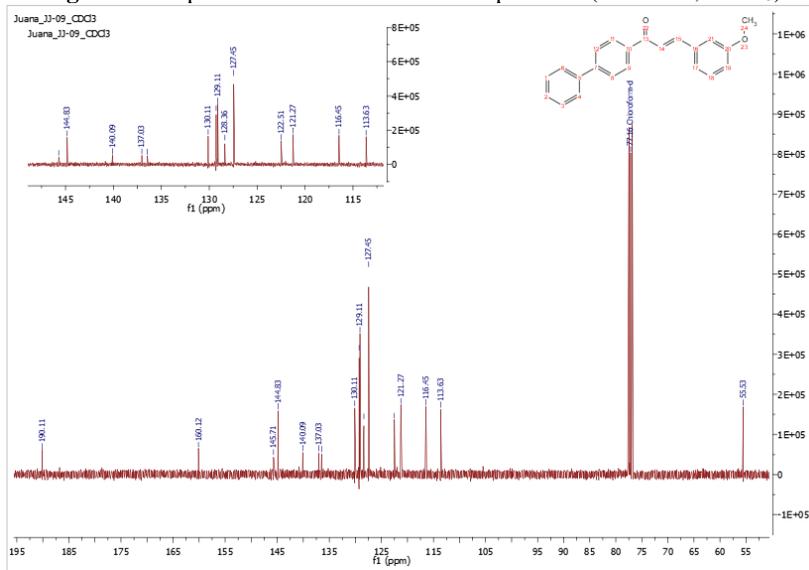


Figura 79. Espectro de RMN de ^1H do composto **26a** (400 MHz, CDCl_3)

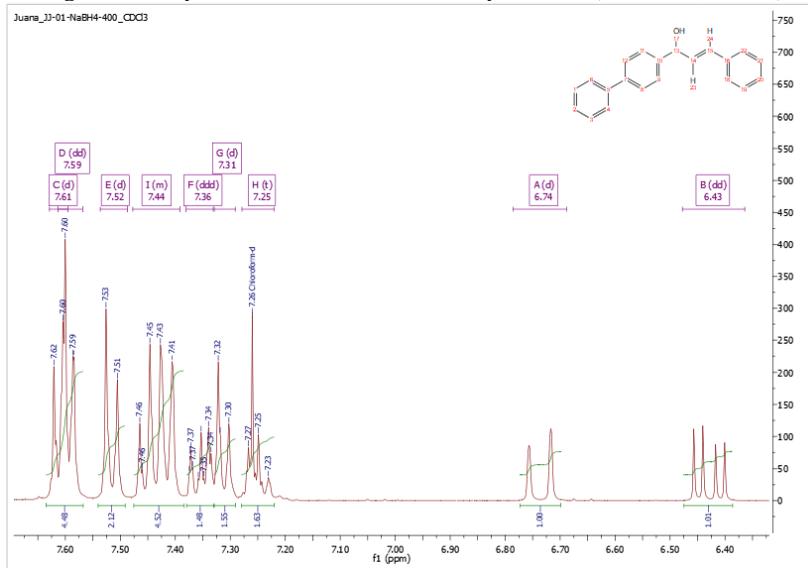


Figura 80. Espectro de RMN de ^1H do composto **28a** (400 MHz, CDCl_3)

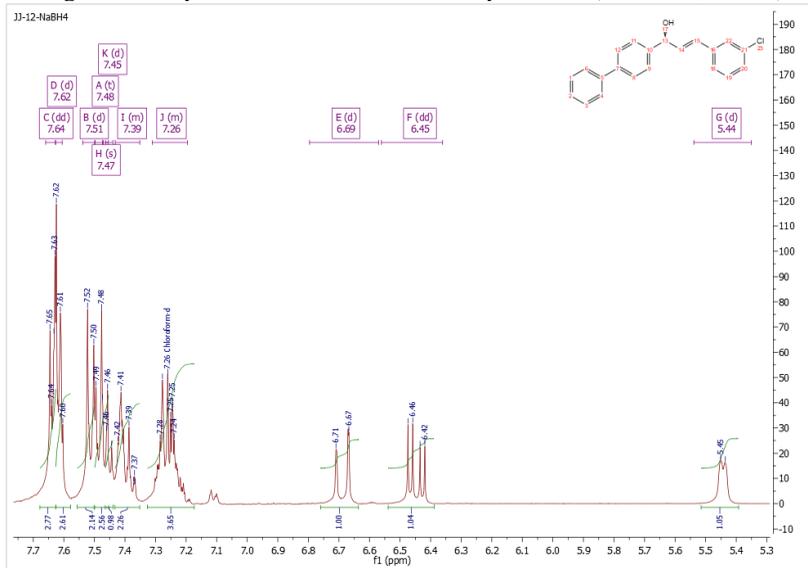


Figura 81. Espectro de RMN de ^1H do composto **32a** (400 MHz, CDCl_3)

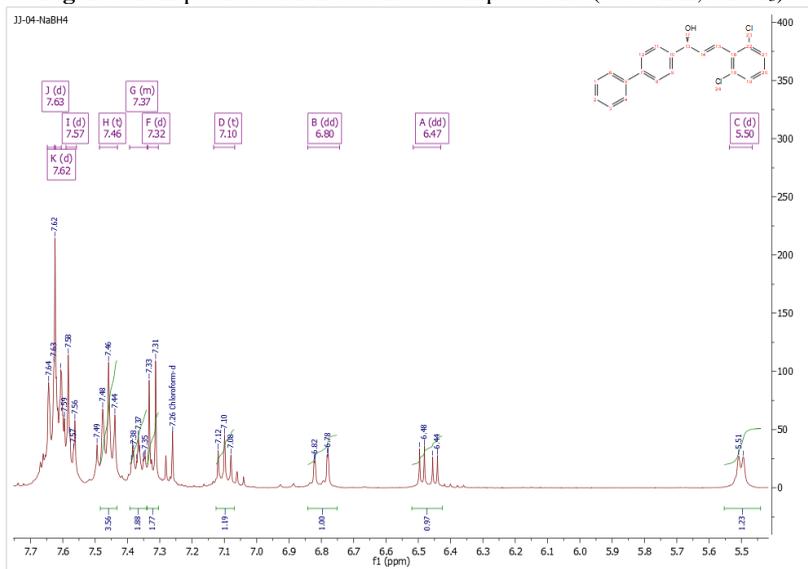


Figura 82. Espectro de RMN de ^1H do composto **33a** (400 MHz, CDCl_3)

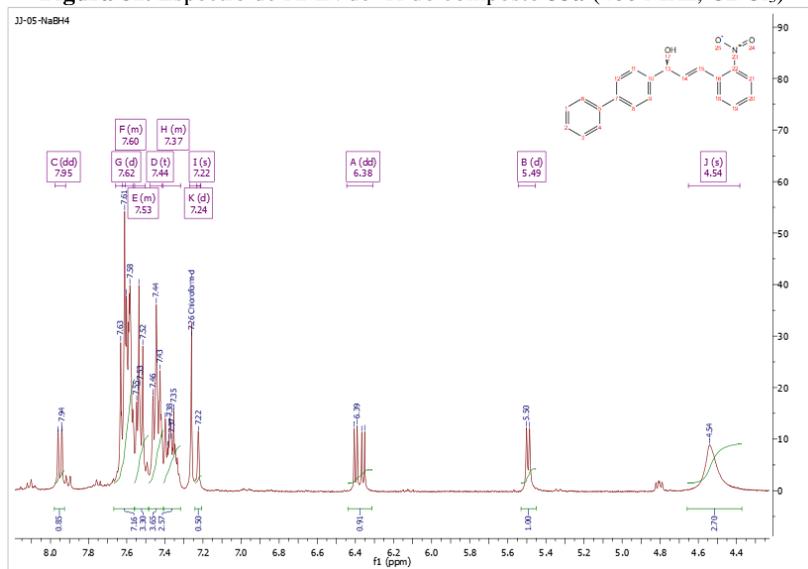


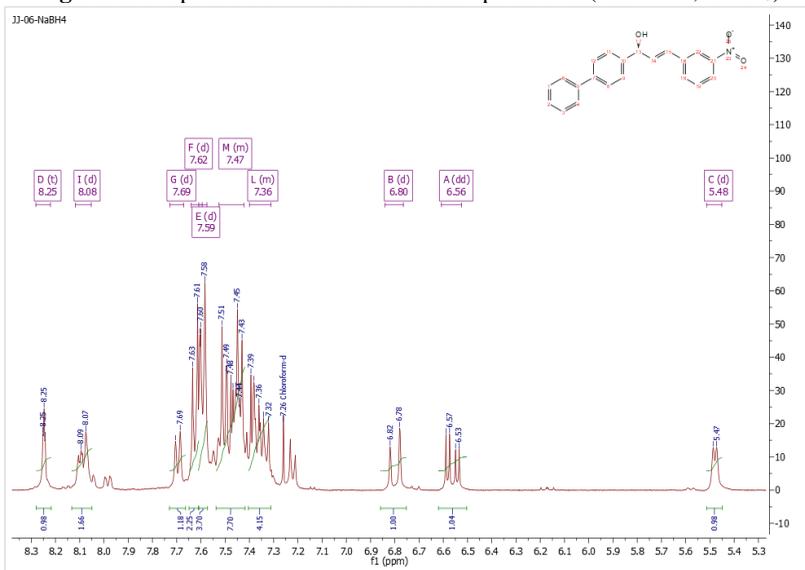
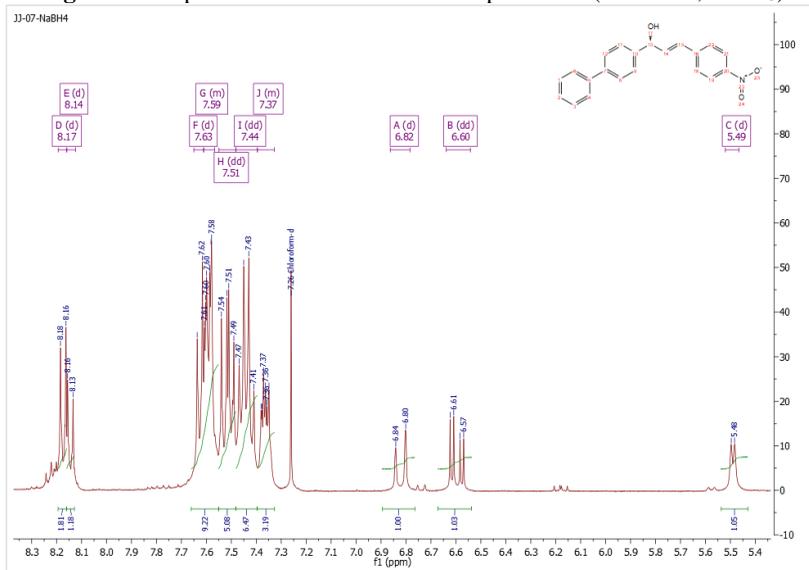
Figura 83. Espectro de RMN de ^1H do composto **34a** (400 MHz, CDCl_3)**Figura 84.** Espectro de RMN de ^1H do composto **35a** (400 MHz, CDCl_3)

Figura 85. Espectro de RMN de ^1H do composto **36a** (400 MHz, CDCl_3)

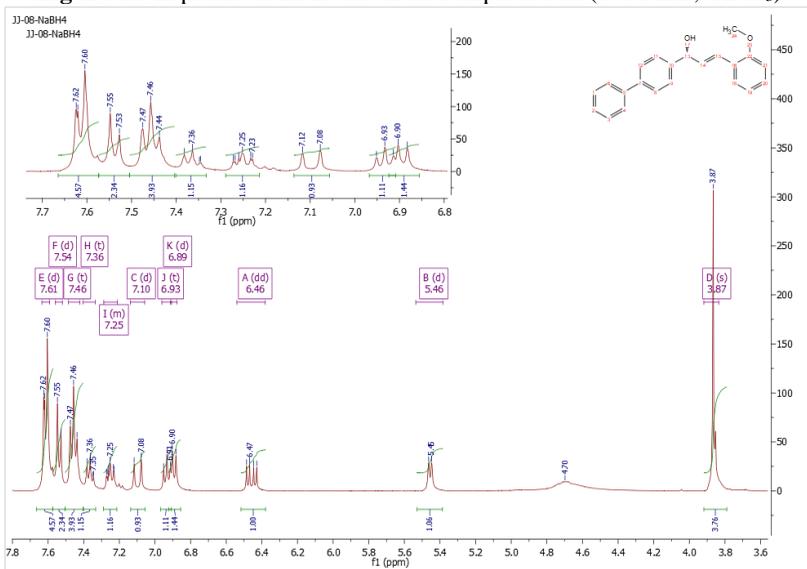


Figura 86. Espectro de RMN de ^1H do composto **37a** (400 MHz, CDCl_3)

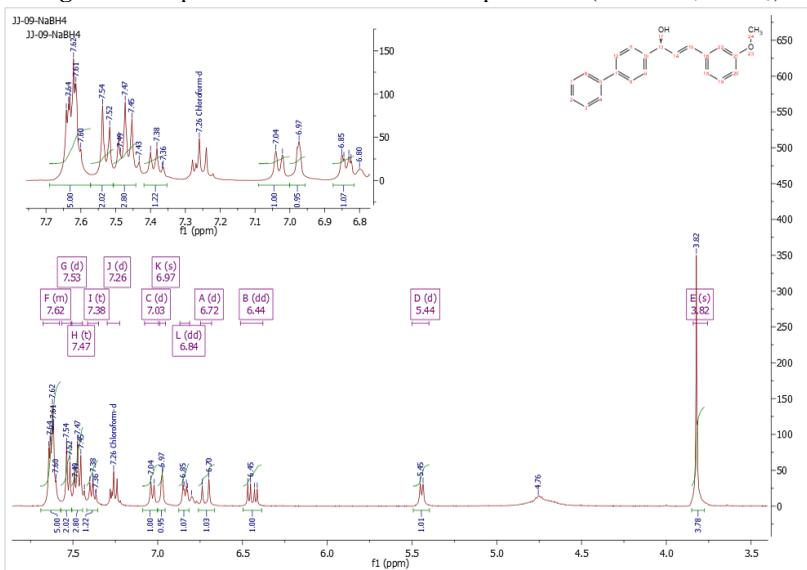


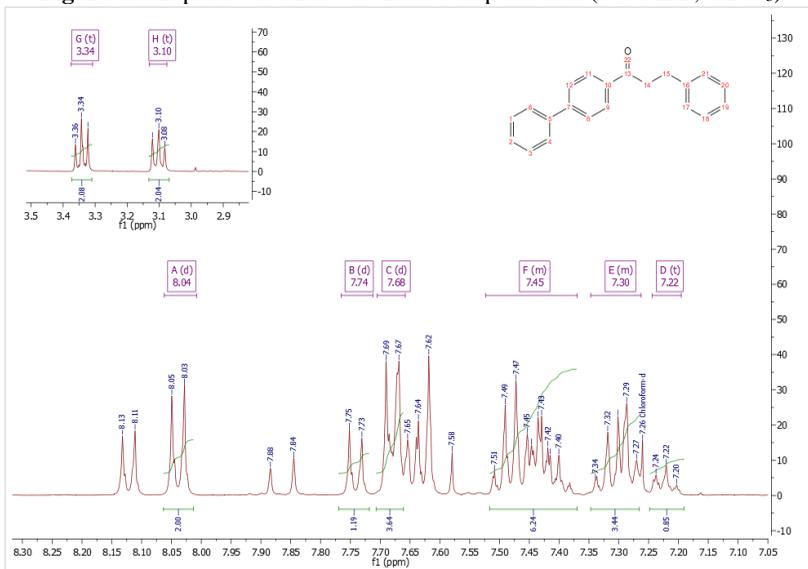
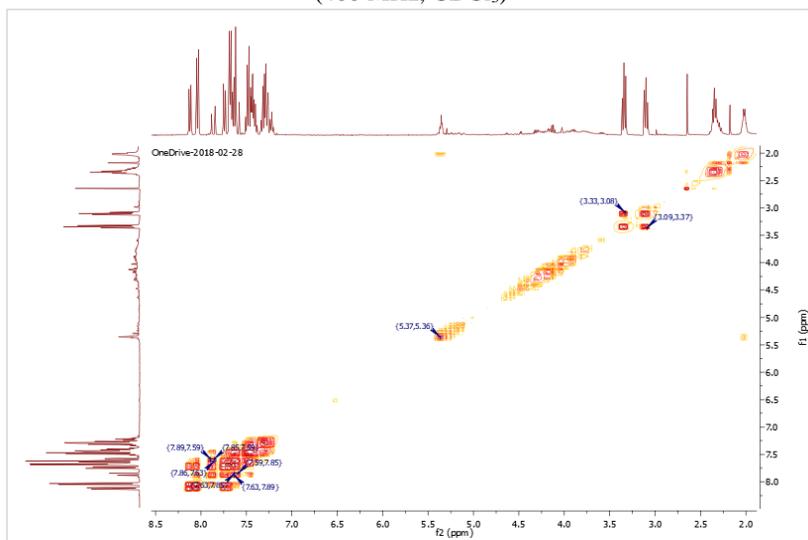
Figura 88. Espectro de RMN de ^1H do composto **26r** (400 MHz, CDCl_3)**Figura 89.** Espectro de RMN bidimensional (^1H - ^1H COSY) do composto **26r** (400 MHz, CDCl_3)

Figura 92. Espectro de RMN de $^{13}\text{C}/\text{DEPT}$ 135 do composto **26r** (101 MHz, CDCl_3)

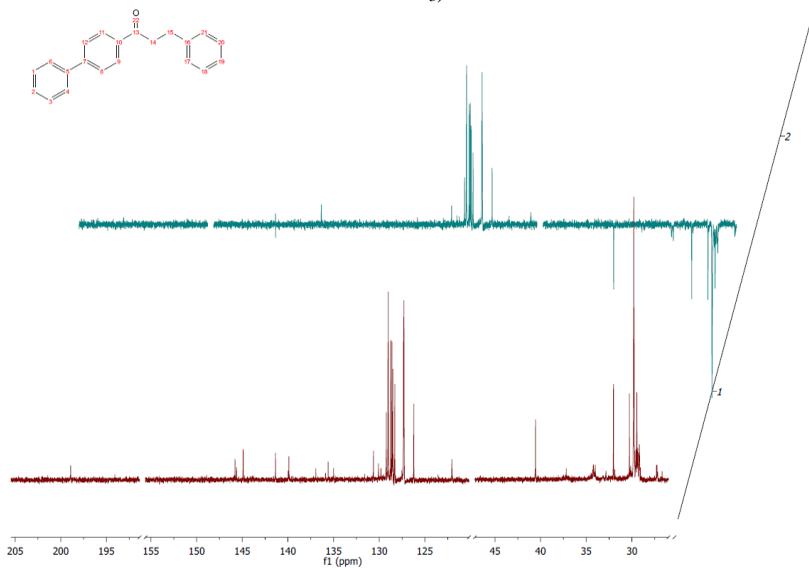


Figura 93. Comparação entre os espectros de RMN de ^1H de **28** e **28r** (400 MHz, CDCl_3)

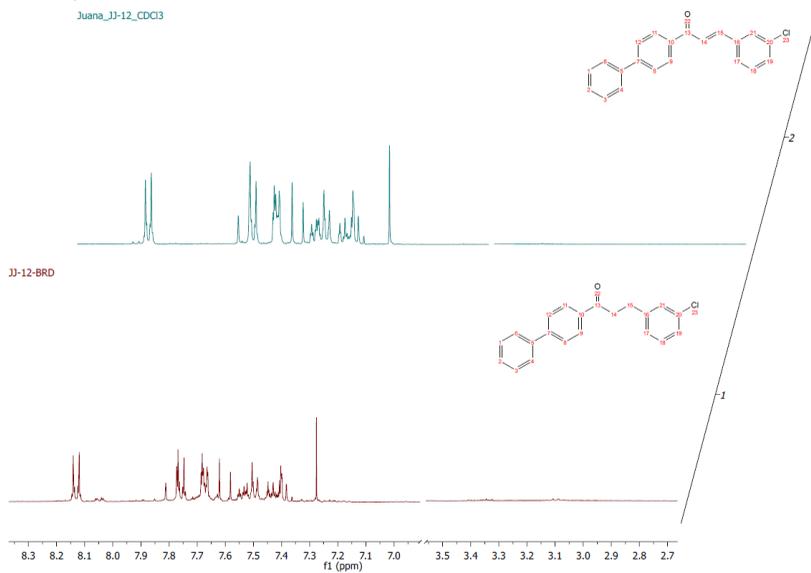


Figura 94. Espectro de RMN de ^1H do composto **29r** (400 MHz, CDCl_3)

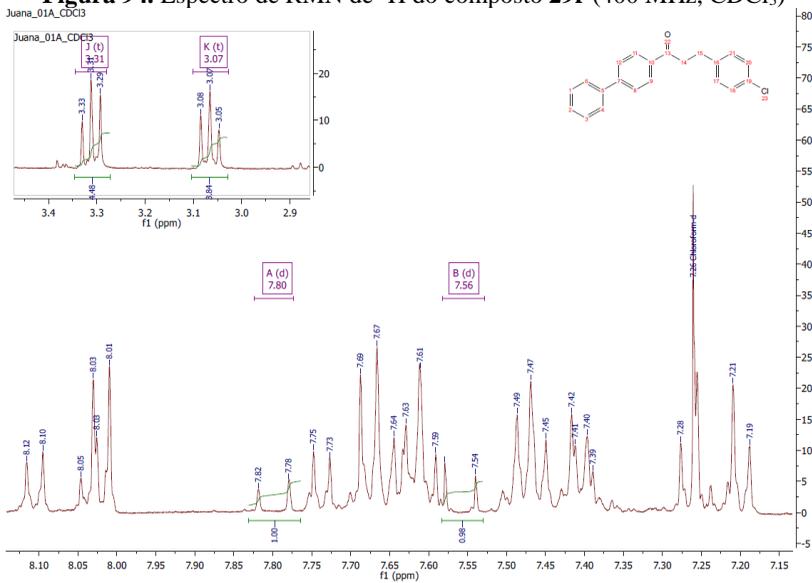


Figura 95. Comparação entre os espectros de RMN de ^1H de **29** e **29r** (400 MHz, CDCl_3)

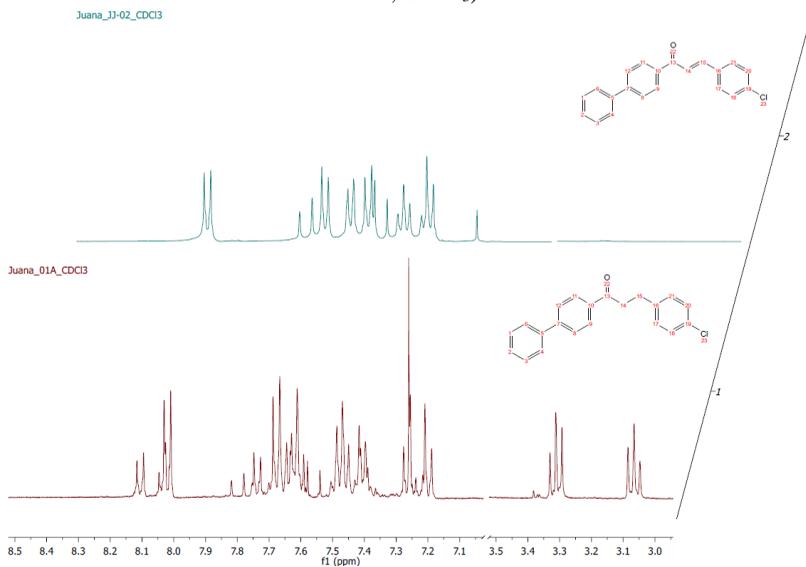


Figura 98. Comparação entre os espectros de RMN de ^1H de **31** e **31r** (400 MHz, CDCl_3)

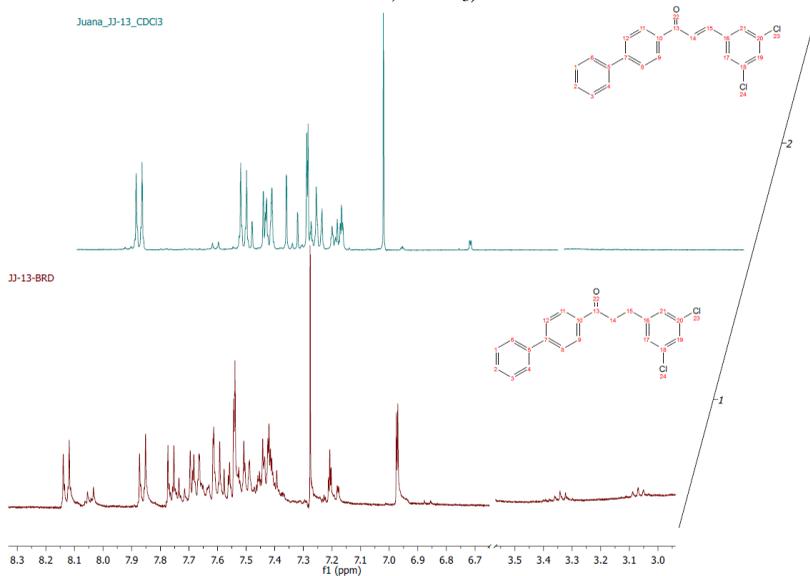


Figura 99. Comparação entre os espectros de RMN de ^1H de **32** e **32r** (400 MHz, CDCl_3)

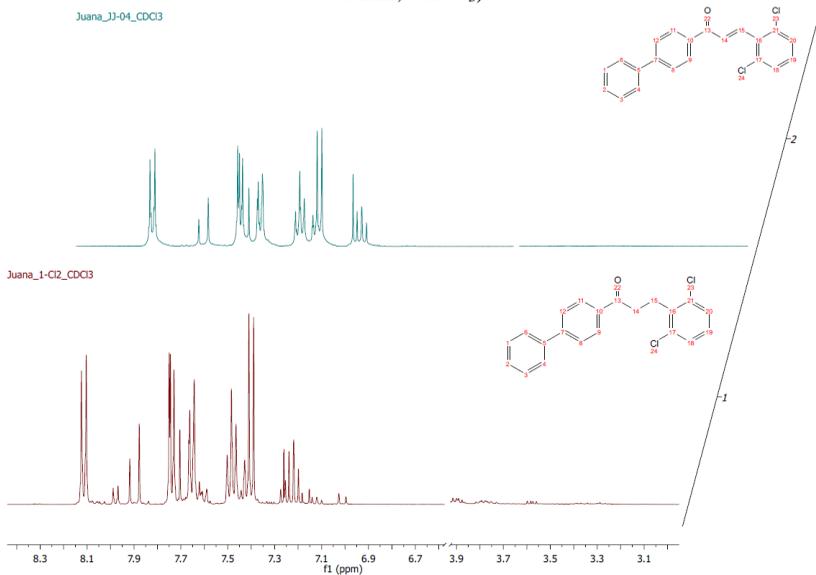


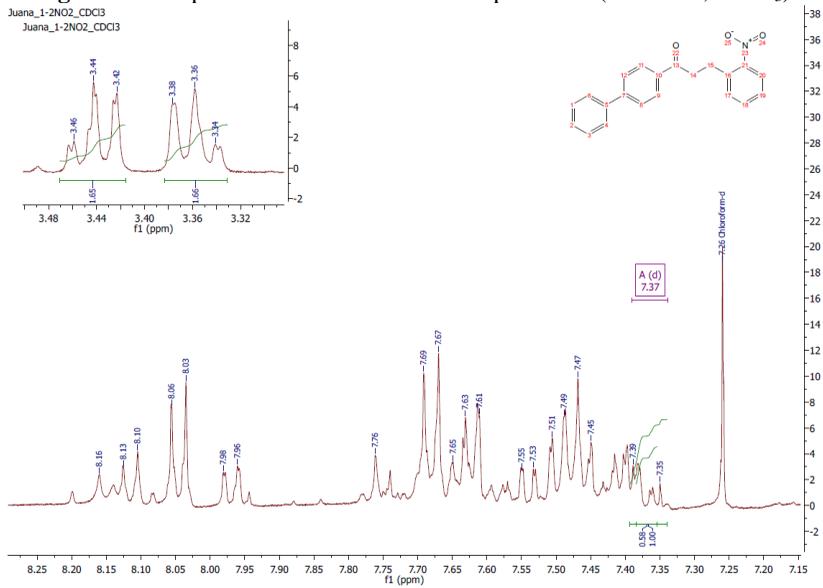
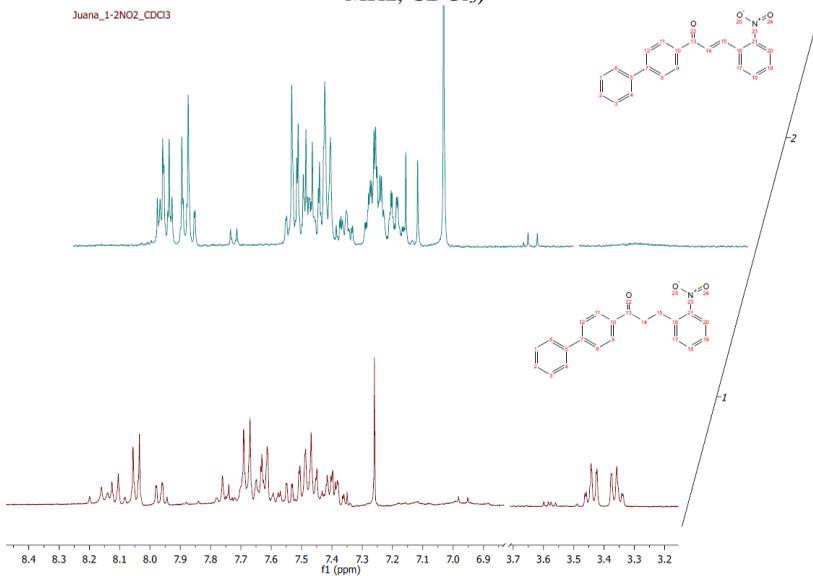
Figura 100. Espectro de RMN de ^1H do composto **33r** (400 MHz, CDCl_3)**Figura 101.** Comparação entre os espectros de RMN de ^1H de **33** e **33r** (400 MHz, CDCl_3)

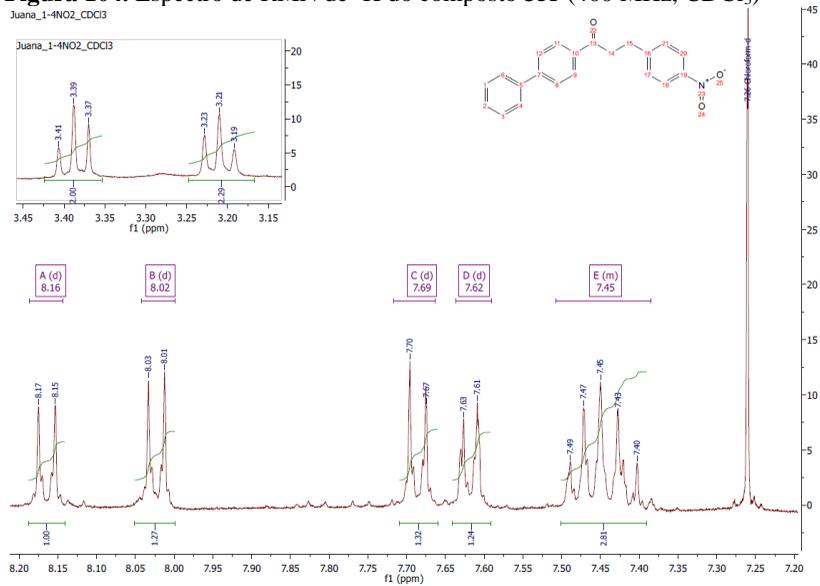
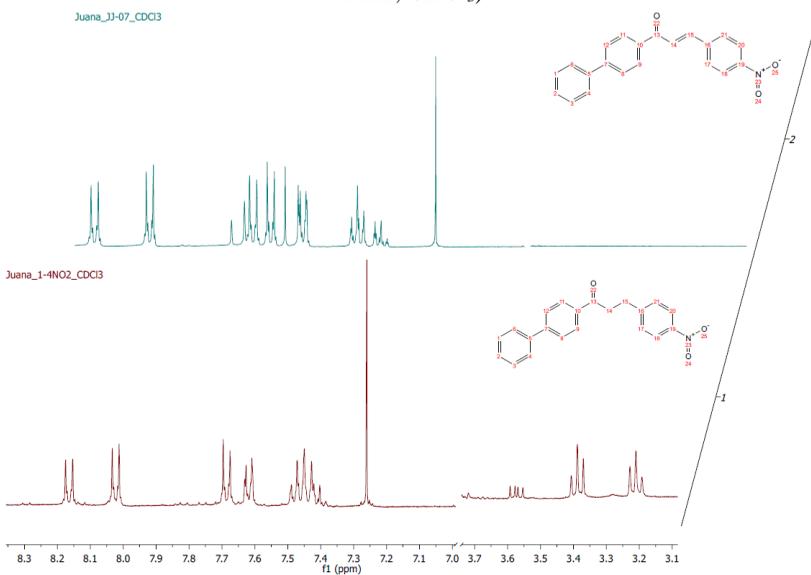
Figura 104. Espectro de RMN de ^1H do composto **35r** (400 MHz, CDCl_3)**Figura 105.** Comparação entre os espectros de RMN de ^1H de **35** e **35r** (400 MHz, CDCl_3)

Figura 106. Espectro de RMN de ^1H do composto **36r** (400 MHz, CDCl_3)

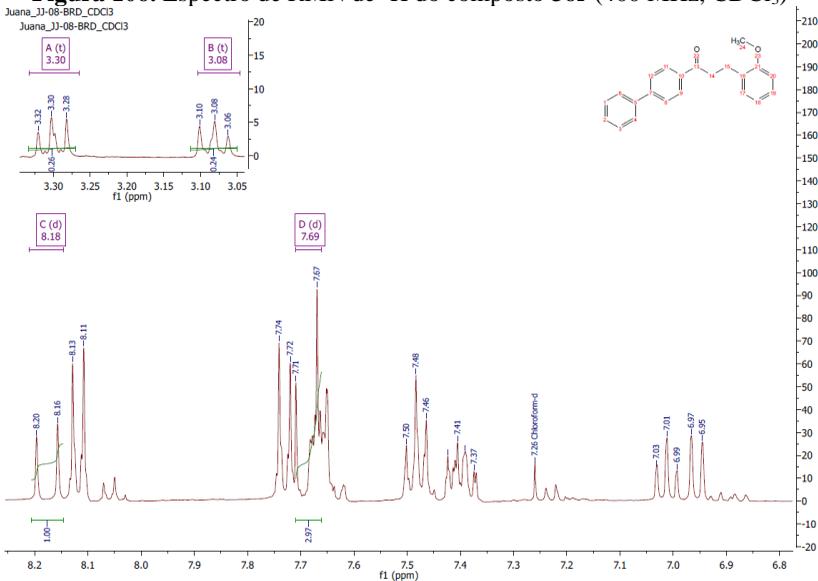


Figura 107. Comparação entre os espectros de RMN de ^1H de **36** e **36r** (400 MHz, CDCl_3)

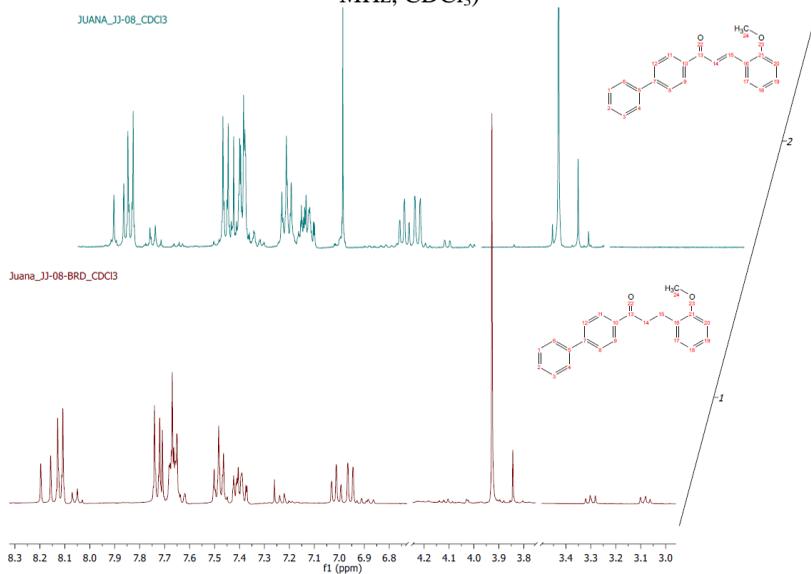


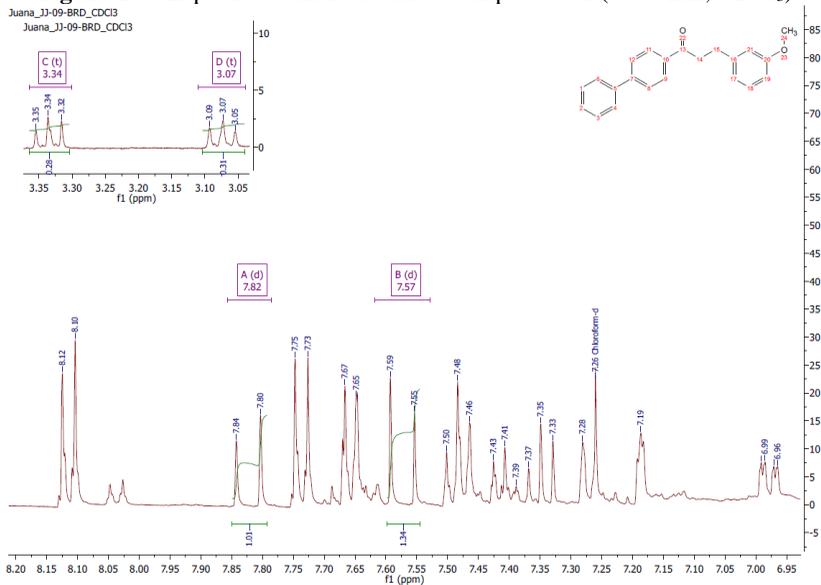
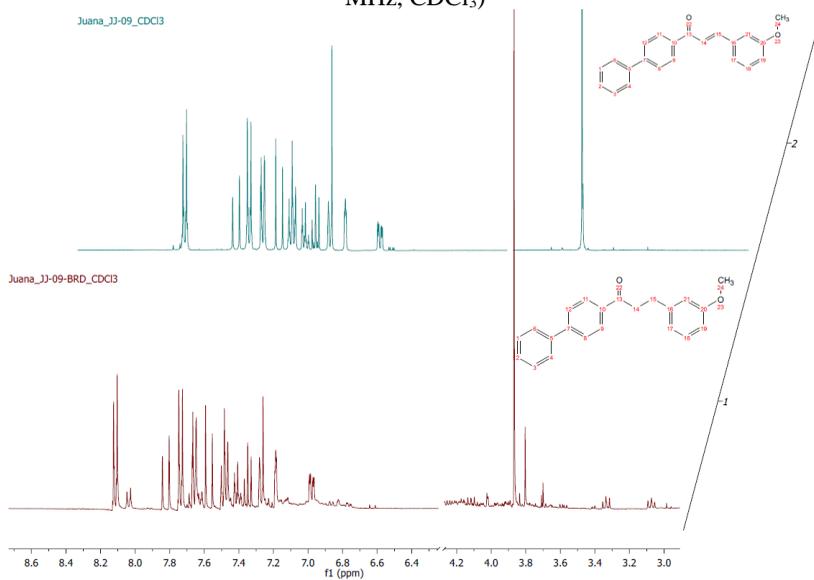
Figura 108. Espectro de RMN de ^1H do composto **37r** (400 MHz, CDCl_3)**Figura 109.** Comparação entre os espectros de RMN de ^1H de **37** e **37r** (400 MHz, CDCl_3)

Figura 110. Espectro de RMN de ^1H do composto **38r** (400 MHz, CDCl_3)

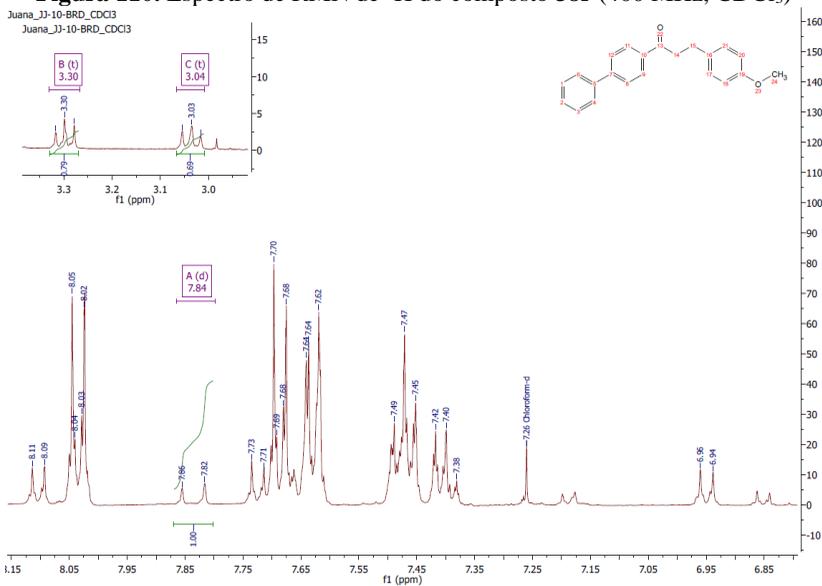


Figura 111. Comparação entre os espectros de RMN de ^1H de **38** e **38r** (400 MHz, CDCl_3)

