



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA

Instituto de Química

Química Tecnológica

Trabalho de Conclusão de Curso

RESOLUÇÃO CINÉTICA ENZIMÁTICA DE MISTURAS
RACÊMICAS DE ADUTOS DE MORITA-BAYLIS-HILLMAN
ORIUNDOS DE ENONAS CÍCLICAS.

Cristiane de Araujo da Fonseca

Orientador: Prof. Dr. Angelo Henrique de Lira Machado

Coorientadora: Diana de Meneses Souza

Brasília – DF

2018



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA

Instituto de Química

Química Tecnológica

Trabalho de Conclusão de Curso

RESOLUÇÃO CINÉTICA ENZIMÁTICA DE MISTURAS
RACÊMICAS DE ADUTOS DE MORITA-BAYLIS-HILLMAN
ORIUNDOS DE ENONAS CÍCLICAS.

Cristiane de Araujo da Fonseca

Trabalho de conclusão de curso
em Química Tecnológica apresentado ao
Instituto de Química da Universidade de
Brasília, como requisito parcial para
obtenção do título de Bacharel em
Química Tecnológica.

Orientador: Prof. Dr. Angelo
Henrique de Lira Machado

Coorientadora: Diana de
Meneses Souza

Brasília – DF

2018

Agradecimentos

Antes de tudo, devo o que sou ao Senhor dos senhores, e O agradeço fielmente pela vida, pelas preces ouvidas, por ser meu amparo em uma cidade estranha em que estive muitas vezes sozinha e com medo. Se à Ti me dirijo, Tu me diriges! E Te louvo, Senhor!

Agradeço aos meus pais Maria Aparecida e Geraldo, que sempre me apoiaram! Apoiaram na decisão de me mudar para uma cidade sozinha, em fazer um curso de “loucos”, em passar noites em claro estudando, a ser tudo o que sempre quis ser. Nunca questionaram o quão difícil estava, nem a necessidade que passamos, mas sempre se orgulharam. Não há como expressar a gratidão que tenho por vocês.

Ao Daniel, meu irmão, agradeço pelas conversas, pela ajuda que sempre tive, pelo seu carinho discreto e único, que me reconfortam tão bem, obrigada pelas palavras de orgulho quando se referem a mim. Agradeço ao meu pequeno irmãozinho Emanuel, que sabe prender minha atenção como ninguém, que me motiva com tanta alegria e carinho.

Agradeço de forma especial aos meus padrinhos Ana Maria e Sebastião, e seus filhos, Regina, Alexandre e Gabriel, assim como meus tios Denise e Edivan, e suas filhas, Camilla e Maria Luiza, por sempre estarem presentes nas minhas visitas à Patos, deixando suas bênçãos e sempre torcendo por mim. Aos meus avós, Ana e Antônio, agradeço a cada dia pelas orações, pela preocupação, pelos sorrisos quando chego para fazer uma visita.

Com grande carinho agradeço ao Jeferson, que me apoiou fielmente todos esses quatro anos de relacionamento à distância. Por entender que existem dias que eu não consigo lhe dar atenção, mesmo assim está presente, e não me julga por isso. Sempre me reconforta nas horas difíceis e me aconselha nas minhas dúvidas. Sou grata pela sua paciência.

Aos meus amigos, que hoje são grandes em números e valores, agradeço por sempre estarem presentes, aqueles de Minas que estão sempre à minha espera e são motivos de grandes memórias. Agradeço aos amigos que a UnB me trouxe como o “Troxas” que se mantém vivo, e sei que levarei para a vida.

Agradeço às minhas colegas e amigas que dividiram morada comigo ao longo dessa caminhada, à Fernanda que se fez uma grande amiga e me apoia cada passo, que é uma grande conselheira e uma guerreira. E Carol, que por fim, a vida nos aproximou, e hoje é uma grande pessoa ao meu lado, agradeço por ajudar a amenizar o peso da graduação.

Agradeço à Mary, a minha amiga mineira, uma amizade que se iniciou nos primeiros semestres, obrigada pelas tantas vezes que me ajudou a ter forças para estudar de madrugada, a levantar de manhã para continuar essa batalha. Por ter coragem em embarcar comigo em

grandes jornadas, viagens e congressos e que me entende na beleza que vejo na Química. Obrigada pelas inúmeras vezes que cuidou de mim em meus momentos de dores, obrigada pelos conselhos, pelos almoços, e por essa amizade linda que criamos.

Ao Professor Dr. Angelo Machado, por aceitar me orientar de tão bom grado e estar sempre presente e disposto a sanar minhas dúvidas. Você é um professor excepcional.

À minha coorientadora, Diana de Meneses Souza, por me receber em seu meio de trabalho e me ensinar com tanta estima, atenção e suporte. Obrigada por estar sempre tão disposta a sorrir e nos alegrar.

Ao Laboratório de Isolamento e Transformação de Moléculas Orgânicas (LITMO) e seus membros que me acolheram e me auxiliaram, se mostraram unidos e prestativos, agradeço pela ajuda, dica e conselhos.

Resumo

Este trabalho buscou a síntese de adutos de Morita-Baylis-Hillman, provenientes de aldeídos aromáticos e enonas cíclicas, para os estudos de resolução cinética enzimática utilizando a lipase CAL B, como parte da pesquisa da rota sintética do *Floribundano B*. A síntese dos adutos foi realizada utilizando o catalisador 6,7-diidro-5*H*-pirrolo[1,2-*a*]imidazol-7-ol e os rendimentos variaram de 30 a 93%. Foi realizada a tentativa de acetilação e hidrólise enzimática que não apresentaram resultados satisfatórios.

Palavras-chave: Adutos de Morita-Baylis-Hillman, Resolução cinética enzimática.

Abstract

This work aimed the synthesis of Morita-Baylis-Hillman adducts, from aromatic aldehydes and cyclic enones, to be used as substrate for the enzymatic kinetic resolution studies using CAL B lipase, as part of the proposed synthetic route for *Floribundane B*. The synthesis of the adducts was performed using 6,7-dihydro-5H-pyrrolo[1,2- α]imidazol-7-ol as catalyst and the yields ranged from 30 to 93%. The attempt for enzymatic acetylation and hydrolysis was carried out without satisfactory results.

Keywords: Morita-Baylis-Hillman adducts, Enzymatic kinetic resolution.

Abreviações

AMBH: aduto de Morita-Baylis-Hillman

CAL B: lipase de *Candida antarctica* B

CCD: cromatografia em camada delgada

CG-FID: cromatografia gasosa com detector de Ionização em chamas

d: duplete

DABCO: 1,4-diazobicyclo[2.2.2]octano

dd: duplo duplete

DMSO: dimetilsulfóxido

dt: duplete de tripleto

ee: excesso enantiomérico

GRE: grupo retirador de elétrons

J: constante de acoplamento

m: multiplete

MBH: Morita-Baylis-Hillman

PLS lipase da *Pseudomona sp.*

ppm: partes por milhão

q: quarteto

qt: quarteto de tripleto

RMN ¹³C: ressonância magnética nuclear de carbono 13

RMN ¹H: ressonância magnética nuclear de hidrogênio

s: simpleto

SDS: dodecil sulfato de sódio

t: tripleto

tt: tripleto de tripleto

δ: deslocamento químico

QS: *Quorum sensing*

AI: Autoindutores

Lista de esquemas

Esquema 1: Rota proposta para a obtenção do Floribundano B.	13
Esquema 2: Reação geral de Morita-Baylis-Hillman.	14
Esquema 3: Mecanismo geral da reação de Morita-Baylis-Hillman.	15
Esquema 4: Mecanismo proposto por McQuade. ²⁰	16
Esquema 5: Resolução biocatalítica realizada por Burgess e Jennings (1989)	17
Esquema 6: Hidrólise enzimática dos AMBH utilizando esterase de fígado de porco segundo Bhuniya <i>et al</i> (2002).	18
Esquema 7: Transesterificação de AMBH utilizando <i>Pseudomonas</i> sp. lipase segundo Nascimento <i>et al.</i> (2003).	18
Esquema 8: Hidrólise dos adutos acetilados utilizando CAL B segundo Vasconcelos <i>et al</i> (2014).	19
Esquema 9: Síntese e acetilação dos adutos de MBH e hidrólise segundo Bode <i>et al</i> (2017).....	19
Esquema 10: Resolução cinética enzimática dinâmica cocatalisada TEA/CAL B segundo Xia <i>et al.</i> (2017).	21
Esquema 11: Síntese do composto 1a.	22
Esquema 12: Esquema geral dos adutos sintetizados.	22
Esquema 13: Acetilação via química dos adutos MBH.	23
Esquema 14: Acetilação via enzimática dos AMBH.	23
Esquema 15: Hidrólise enzimática dos adutos acetilados.	23
Esquema 16: Reação de obtenção do composto 7a.	26
Esquema 17: Reação de obtenção do composto 7b.	26
Esquema 18: Reação de formação do composto acetilado 9a.	28
Esquema 19: Reação de formação do composto acetilado 9b.	29
Esquema 20: Reação de hidrólise enzimática do composto 9a.	33
Esquema 21: Modelos de adutos da literatura.	34
Esquema 22: Rotação da parte lateral da cadeia do AMBH	34

Lista de Figuras

Figura 1: RMN ¹ H (600 MHz, CDCl ₃) 1a.....	24
Figura 2: RMN ¹³ C (151 MHz, CDCl ₃) 1a.....	25
Figura 3: RMN ¹ H (600 MHz, CDCl ₃) 7a.....	27
Figura 4: RMN ¹ H (600 MHz, CDCl ₃) 7b.....	27
Figura 5: RMN ¹³ C (151 MHz, CDCl ₃) 7b.....	28
Figura 6: RMN ¹ H (600 MHz, CDCl ₃) 9a.....	29
Figura 7: RMN ¹ H (600 MHz, CDCl ₃) 9b.....	30
Figura 8: Cromatograma da acetilação enzimática 7e com isopropanol à 25 °C.....	31
Figura 9: Cromatograma da acetilação enzimática 7a com hexano a 40 °C.....	31
Figura 10: Cromatograma da acetilação enzimática 7b com hexano a 40 °C.....	31
Figura 11: Cromatograma da acetilação enzimática 7e com hexano a 40 °C.....	32
Figura 12: Cromatograma da acetilação enzimática 7c com acetonitrila a 40 °C.....	32
Figura 13: Cromatograma da acetilação enzimática 7d com hexano a 40 °C.....	32
Figura 14: Cromatograma da hidrólise do composto 9a utilizando tampão fosfato pH 7 e CAL B.....	33
Figura 15: Cromatograma da acetilação enzimática do composto 7g com acetonitrila utilizando a enzima PS.....	33

Lista de Tabelas:

Tabela 1: Aldeídos e cetonas utilizados na síntese dos adutos e seus respectivos rendimentos..... 26

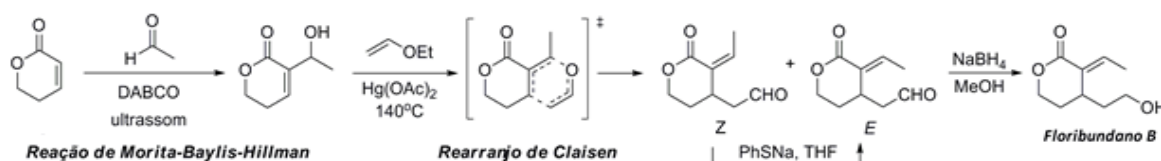
Sumário

1.	Introdução	13
2.	Objetivos	14
3.	Revisão Bibliográfica	14
3.1	REAÇÃO DE MORITA-BAYLIS-HILLMAN	14
3.2	Mecanismo	15
3.3	Resolução cinética em Adutos de Morita-Baylis-Hillman	16
4.	Metodologia	21
4.1	Síntese do catalisador	21
4.2	Síntese dos Adutos de Morita-Baylis-Hillman	22
4.3	Resolução cinética	22
5.	Resultados e Discussões	24
5.1	Catalisador 6,7-diidro-5 <i>H</i> -pirrolo[1,2- α]imidazol-7-ol	24
5.2	Adutos de Morita-Baylis-Hillman provenientes de enonas cíclicas	25
5.3	Resolução cinética	28
6.	Conclusão	33
7.	Procedimentos experimentais	35
7.1	Síntese do catalisador 6,7-diidro-5 <i>H</i> -pirrolo[1,2- α]imidazol-7-ol	35
7.2	Síntese dos adutos de Morita-Baylis-Hillman	35
7.2.1	Dados dos adutos de Morita-Baylis-Hilman obtidos:	36
7.3	Reações de acetilações:	38
7.3.1	Dados dos compostos obtidos pela reação de acetilação:	38
7.4	Resolução cinética com CAL B	41
7.5	Hidrólise do composto 9a:	41
7.6	Acetilação com a Enzima PS do composto 7g:	41
8.	Referências	42
9.	ANEXO	44

1. Introdução

O *Quorum Sensing* (QS) é um sistema baseado no reconhecimento de sinais químicos genericamente denominados de autoindutores (AI) que é utilizado por bactérias para modular a alteração coordenada da expressão genética em resposta a mudanças na densidade populacional, sendo este sistema utilizado por diversos patógenos humanos de relevante importância médica (Camilli e Bassler, 2006). Portanto, impedir a virulência bacteriana é uma alternativa de inibir a patogênese bacteriana sem impor imediata pressão seletiva ao patógeno bacteriano. Deste modo uma variedade de análogos de AIs, sintéticos e naturais, tem sido estudada levando à descoberta de alguns inibidores de QS. (Henke e Bassler, 2004)

O Floribundano B é uma lactona da classe química dos iridóides recentemente isolada das folhas e das cascas do tronco *Hymenodictyon floribundum* B. Esta molécula apresenta alguns elementos estruturais presentes em drogas anti-patogênicas baseadas no QS de bactérias que o colocam como potencial inibidor de QS. Fato este que nos estimulou a buscar uma rota sintética que permita a obtenção do Floribundano B e outros análogos estruturais para posteriores testes de sua atuação no QS bacteriano.



Esquema 1: Rota proposta para a obtenção do Floribundano B.

Em meio às reações propostas para nossa rota de sintética, encontra-se o rearranjo de Claisen de adutos de Morita-Baylis-Hillman (MBH). Por se tratar de uma reação pericíclica, com mecanismo concertado, a utilização do aduto na sua forma enantiomericamente enriquecida no rearranjo de Claisen levará à formação enantiospecífica dos produtos *Z* e *E*, permitindo a síntese de apenas um dos enantiômeros do Floribundano B.

Desta forma, a obtenção de adutos de MBH na sua forma enatioenriquecida se tornou um desafio nesta nossa intenção.

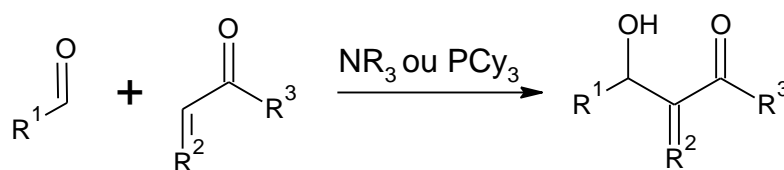
2. Objetivos

- Preparar misturas racêmicas de adutos de MBH oriundos de enonas cíclicas;
- Determinar experimentalmente as condições de reação que permitem a resolução cinética enzimática de misturas racêmicas de adutos de MBH oriundos de enonas cíclicas.
- Estudar a reação de resolução cinética enzimática de misturas racêmicas de adutos de MBH oriundos de enonas cíclicas na obtenção de adutos de MBH em sua forma enantioenriquecida.

3. Revisão Bibliográfica

3.1 REAÇÃO DE MORITA-BAYLIS-HILLMAN

Em 1972, Baylis e Hillman, publicaram uma patente alemã, na qual relataram reações de alcenos ativados para adição de nucleófilos com uma variedade de aldeídos catalisadas por aminas terciárias, momento em que houve grande conhecimento desta reação, que passou a ser conhecida como Reação de Baylis-Hillman. Porém, cinco anos antes, Morita (1968) reportou um artigo com reação semelhante, utilizando como catalisador uma fosfina terciária. Assim, é comum ter seu nome inserido no título da reação.

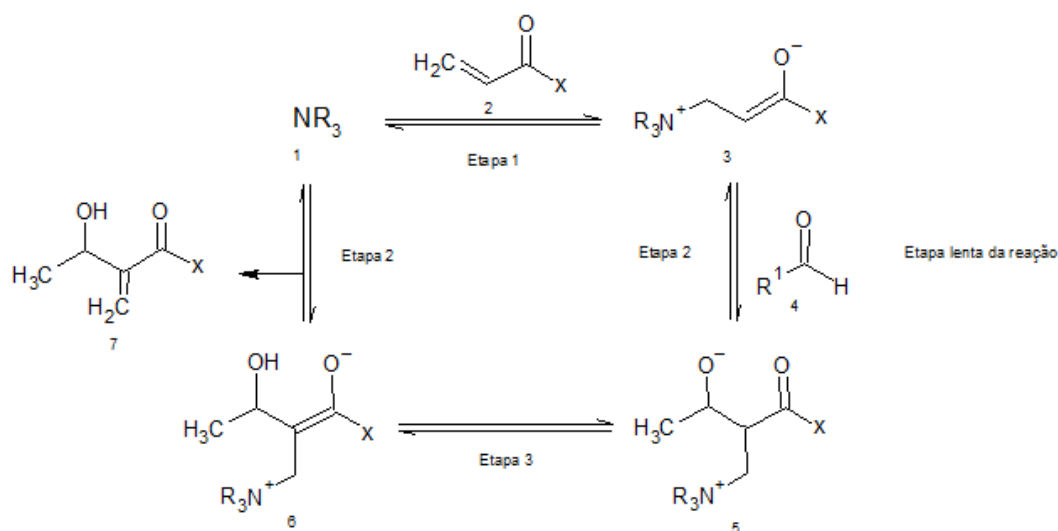


Esquema 2: Reação geral de Morita-Baylis-Hillman.

A reação de Morita-Baylis-Hillman apresenta muitas vantagens, entre elas, uma grande economia atômica, podendo ser realizada na maioria das vezes sem o uso de solventes orgânicos e com atmosfera inerte. Outra vantagem é a formação de pelo menos um centro estereogênico, configurando-se uma eficiente metodologia para a formação de uma ligação carbono-carbono. (BASAVIAH; RAO; REDDY, 2006)

3.2 MECANISMO

O mecanismo da reação de MBH que Hoffmann e Rabe (1983) propuseram, envolve, em uma primeira etapa, a adição de Michael do catalisador **1** (amina terciária ou fosfina) ao carbono β da carbonila α,β -insaturada **2**, gerando um *zwitterion*. Em seguida, devido a um ataque nucleófilo no aldeído **4**, há a formação de um intermediário zwitteriônico **5** que, após uma transferência de prótons e eliminação da amina, gera o produto β -hidroxi- α -metileno carbonilado **7**.

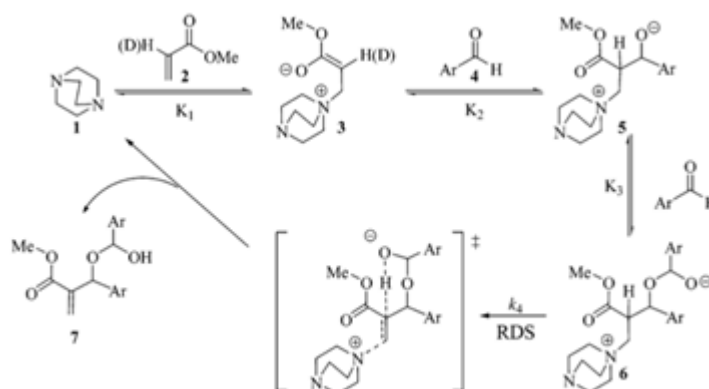


Esquema 3: Mecanismo geral da reação de Morita-Baylis-Hillman.

Hill e Isaacs (1990) também defenderam essa proposta mecanística com um estudo sobre o efeito isotópico cinético ($\text{KIE} = 1,03 \pm 0,1$), em que foi usado acrilonitrila como eletrófilo, confirmando que a fissão do α -próton não ocorre em uma etapa determinante. Além disso, Hill e Isaacs também constataram um aumento de dipolo na segunda etapa da reação, provocando uma separação de cargas, sendo considerada a etapa lenta da reação.

Dentre esses estudos, um mais recente, avaliou novamente a cinética realizada por Hill e Isaacs. McQuade *et al.* (2005) observaram uma não linearidade entre o consumo do aldeído e do acrilato e que o mecanismo da reação é de segunda ordem com relação ao aldeído, propondo um novo mecanismo (Esquema **4**), onde uma segunda molécula de aldeído é apresentada na etapa K_3 (Esquema **4**). A etapa lenta é representada por um estado de transição que envolve o

anel de seis membros, favorecendo a etapa de transferência de prótons para o ciclo catalítico da reação, devido ao efeito isotópico cinético primário ($KIE = 5,2 \pm 0,6$ em DMSO)



Esquema 4: Mecanismo proposto por McQuade.²⁰

Segundo Aggarwal, Fulford e Lloyd-Jones (2005), o mecanismo da reação possui o aldeído de segunda ordem, como McQuade et al. (2005) mostraram, porém apenas no início da reação (até 20% de conversão), onde há uma limitante taxa de transferência de prótons. A pesquisa anterior monitorou o experimento somente no início (primeiros 10% de conversão). Aggarwal, Fulford e Lloyd-Jones (2005) verificaram uma perda no efeito cinético isotópico primário, propondo que a reação se torna autocatalítica.

3.3 RESOLUÇÃO CINÉTICA EM ADUTOS DE MORITA-BAYLIS-HILLMAN

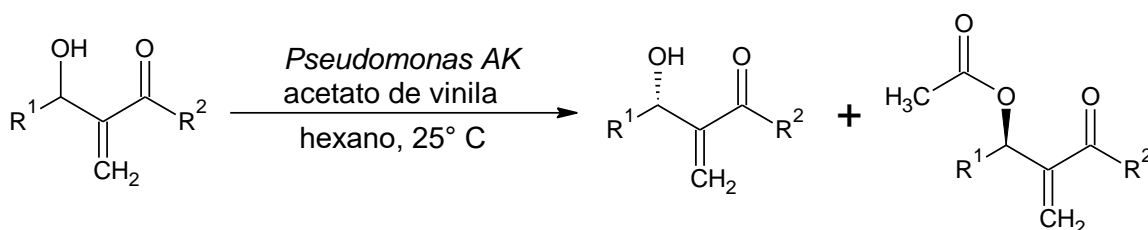
Há grande interesse em alcançar a assimetria dos adutos de MBH e em obtê-los com elevado grau de pureza. A princípio, pode ser realizado com uma fonte de quiralidade em qualquer um dos três componentes (eletrófilo, alceno ativado e catalisador) e muitos esforços têm sido feitos nessa direção. Vários pesquisadores como Drewes (1988,1993), Basavaiah (1990), Gilbert (1991) Kundig (1994) Lager (2000) e Sibi (2000), entre outros, utilizaram alcenos ativados, como acrilatos e acrilamida, eletrófilos (aldeídos enantioméricos) e catalisadores, todos quirais. Porém, somente em alguns casos houve alto rendimento químico e exeso enantiomérico satisfatório, como Yang (2000). Esse método gera experimentos com muitas etapas reacionais, além de serem reações bastante custosas e difíceis.

Também têm sido investigados métodos como a hidrogenação enantioselectiva, epoxidação, peroxidação, acilação enzimática, hidrólise enzimática do aduto acilado e

resolução cinética dinâmica nucleofílica de adutos acilados. Mesmo apresentando bons resultados na epoxidação de Sharpless com elevado grau de pureza ótica, há restrições a esse método por apresentar múltiplas etapas na síntese e indisponibilidade dos reagentes de resolução (NASCIMENTO *et al.*, 2003).

Basicamente, existem duas abordagens para as reações de resolução cinética de álcoois quirais. A primeira consiste em realizar a transesterificação de álcoois por via enzimática, obtendo tanto o álcool quanto o éster na forma enantiopura. A segunda consiste em realizar a esterificação por via química com subsequente hidrólise enzimática.

Um dos primeiros trabalhos referentes à transesterificação de adutos foi feito por Burgess e Jennings (1989) utilizando a lipase *Pseudomonas KA* (Amano). Verificaram que a enzima é bastante enantiosseletiva quando o R² (Esquema 5) é uma cadeia grande, mas o mesmo não ocorreu com R² sendo uma cadeia pequena. Notaram também uma semelhante eficácia para alcooxi ou alquil em R². Além disso a lipase tolerou substituintes como arilas, alcinos, alcenos e sulfetos, indicando que pode se adequar com funções que são passíveis de redução em certas condições, e que poderiam envenenar os catalisadores baseados de metais de transição capazes de resolver esses compostos. Uma observação deixada por Burgess e Jennings é que a taxa de reação pode ser governada pelo substituinte R¹ (Esquema 5), pois utilizando o substituindo propil a taxa de reação se mostrou maior que a utilização do grupo metil.



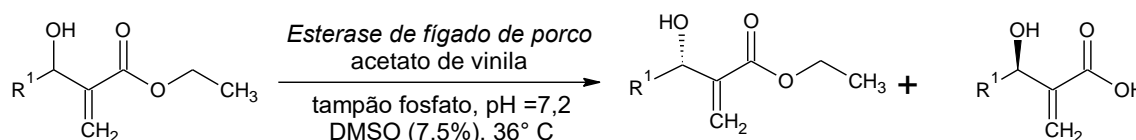
Esquema 5: Resolução biocatalítica realizada por Burgess e Jennings (1989)

Tsuboi *et al.* (1998) mantiveram R² fixo como etila e variaram o agente de acilação, utilizando a lipase PS. Com acetato de isopropenila houve um alto reconhecimento molecular, e o acetato de vinila aumentou ainda mais a pureza dos acetados. Em uma tentativa de aumentar a taxa de reação, o trifluoroacetato de vinila também foi usado, porém gerou a formação de uma mistura complexa, e o agente de acilação não pode ser isolado. Assemelhando com as

observações de Burgess e Jennings, substituintes com cadeias longas assim como retiradores de elétrons não prosseguem com satisfatória reação de transesterificação.

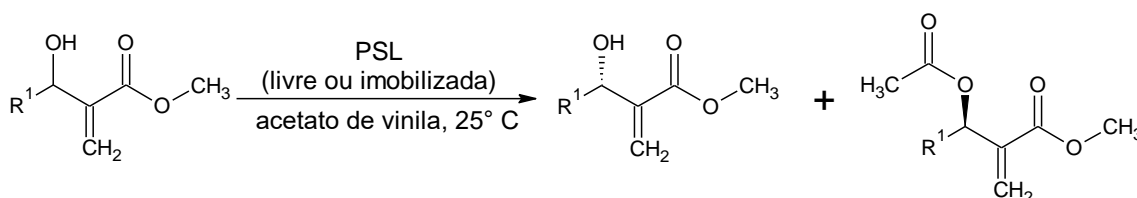
No mesmo trabalho, Tsuboi *et al.* fizeram um estudo sobre a hidrólise dos acetatos de AMBH. A lipase PS apresentou maior taxa de reação, porém a lipase AK resultou em melhores excessos enantioméricos.

Bhuniya *et al.* (2002) exerceram a hidrólise enzimática utilizando esterase de fígado de porco resolvendo adutos sintetizados a partir de aldeídos diversos e com acrilato de etila. A resolução do éster foi feita com cossolvente DMSO, temperatura 36 °C e tampão fosfato pH 7. Os rendimentos das resoluções variaram de 25 a 40% obtendo um *ee* entre 92 a > 99% (Esquema 6)



Esquema 6: Hidrólise enzimática dos AMBH utilizando esterase de fígado de porco segundo Bhuniya *et al.* (2002).

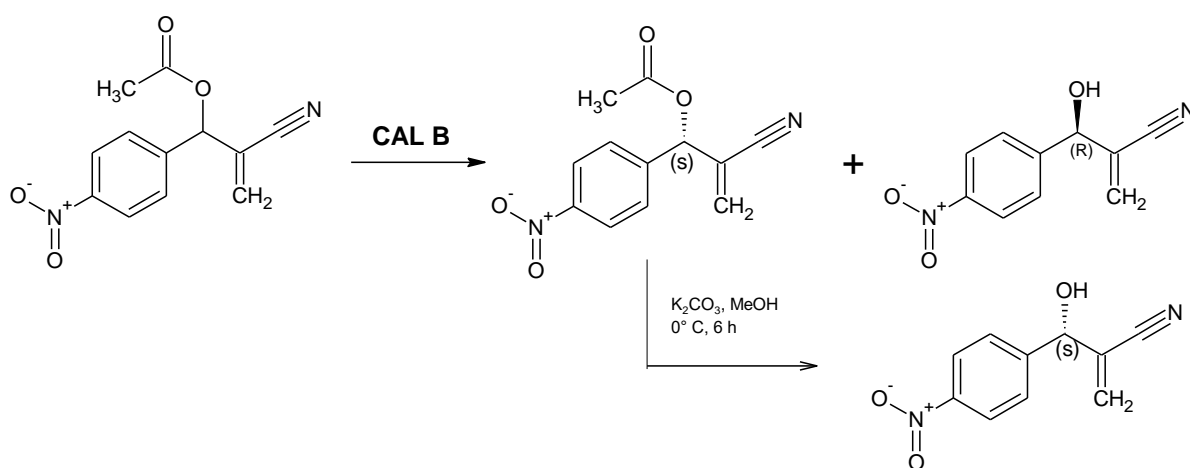
Nascimento *et al.* (2003) realizaram resoluções cinéticas via transesterificação enzimática com a lipase da *Pseudomonas sp.*, tanto na forma livre (PSL), quanto na forma imobilizada em poli(óxido de etileno) (PEO), em sílica na forma de gel e montmorillonite K10. A resolução do aduto (Esquema 7), se mostrou melhor com PEO com uma conversão de 50% e um *ee* de 99%. Os substratos contendo R¹ substituídos por metila e propila apresentaram fraca conversão, mas mantiveram *ee* 99%. O substrato com substituinte naft-2-il foi inerte às condições de reação. Já as resoluções dos adutos com imobilização da lipase em gel ou em montmorillonite não apresentaram resultados.



Esquema 7: Transesterificação de AMBH utilizando *Pseudomonas sp.* lipase segundo Nascimento *et al.* (2003).

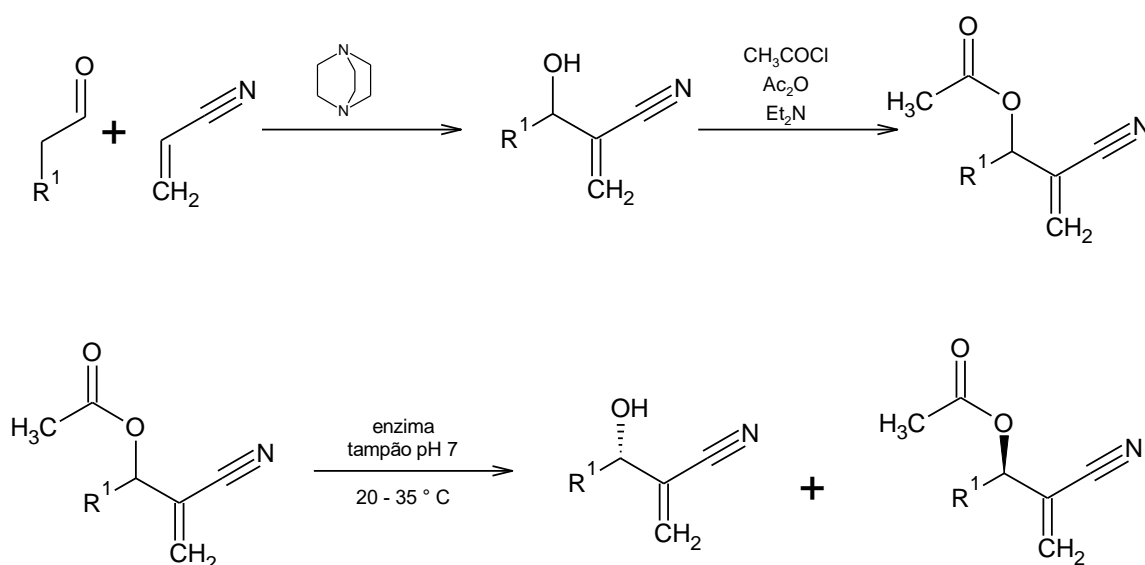
Com o intuito de avaliar a atividade biológica dos enantiômeros puros, após a acetilação, Vasconcellos *et al.* (2014) realizaram a resolução cinética via hidrólise enzimática

dos adutos *meta* e *para* (+/-)-2-[hidroxi(nitrofenil)metil]acrilonitrila. Tais adutos possuem grandes atividades biológicas, como eficientes antiparasitas e anticâncer, porém uma limitação na produção de novas drogas são os racematos. A lipase *Candida antarctica B* obteve um alto reconhecimento molecular das configurações R com *ee* > 99%, o éster não reagido foi separado e hidrolisado com carbonato de potássio obtendo os álcoois S com *ee* de 86,8% e 97,5%.



Esquema 8: Hidrólise dos adutos acetilados utilizando CAL B segundo Vasconcelos *et al* (2014).

Bode *et al.* (2017) perceberam o sucesso das resoluções em adutos alifáticos, e propuseram estudar substratos aromáticos juntamente com homólogos rígidos e flexíveis para identificar um perfil de substrato favorecido pelas lipases escolhidas. Os adutos foram sintetizados com acrilonitrila na presença do catalisador DABCO, e em seguida foram acetilados sob condições padrões (Esquema 9).



Esquema 9: Síntese e acetilação dos adutos de MBH e hidrólise segundo Bode *et al* (2017).

Cerca de 100 tipos de preparações diferentes de lipases foram aplicados em cada um dos três substratos. O substrato acetilado com substituinte R sendo fenila, mostrou sucesso com a lipase *Pseudomonas fluorescens* (22 % de conversão e *ee* 94 % do álcool *S*), lipase Amano AK ((48 % de conv. e *ee* 88 %) além das Lipo Max CXT da *P. alcaligenes*, lipase *P. cepacia*, lipase Amano *P. fluorescens* e Lipozyme CAL B que obtiveram conversão de 29 a 51 % e *ee* entre 90 e 94 %.

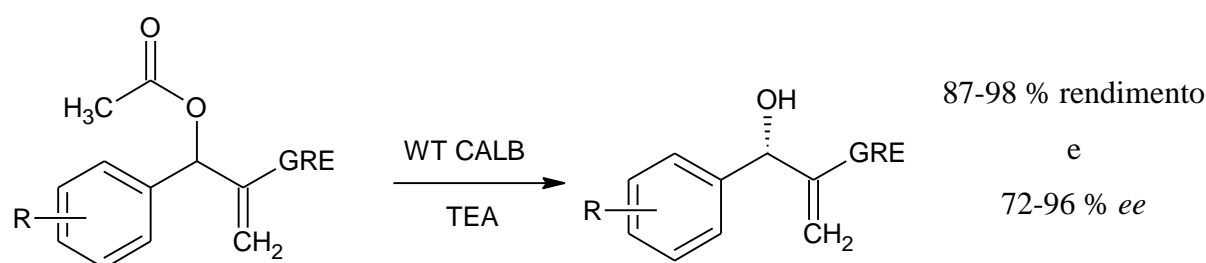
A amostra com o substituinte feniletênil apresentou o melhor resultado geral na resolução com as lipases *Pseudomonas fluorescens* (51% de conversão e 93 % de *ee*) e lipase Amano AK (40 % de conv e *ee* 96 %). Por fim o substrato que se apresentou mais difícil de ser resolvido foi com substituinte feniletíl, pois apenas duas lipases alcançaram resultados, a primeira foi a Novozyme 435 (conversão 17% e *ee* 96 %) e a última Lipozyme CAL B (29% de conversão e *ee* 94%). No trabalho, Bode *et al.* observaram que o substrato que possui homólogo rígido foi o mais enantiosseletivo, e, o mais flexível foi o mais difícil de se resolver. Outra observação deixada em seu trabalho foi que a Lipozyme CAL B mesmo não apresentando o melhor desempenho, demonstrou ser capaz de resolver todos os três substratos.

Strub, Garbós e Lochynski (2017) tinham o objetivo de otimização da síntese e resolução biocatalítica do AMBH alifático racêmico para gerar β -hidroxi-nitrilas, e seus acetatos, opticamente puros e determinar a configuração absoluta do 3-hidroxi-2-metilenobutanonitrila. Sua pesquisa era focada na síntese de novas δ -lactonas com potencial em propriedades olfativas. Utilizaram como modelo de substrato o aduto 3-hidroxi-2-metilenobutanonitrila. A resolução feita por transesterificação com 10 diferentes enzimas, obteve bons resultados. A Novozyme 435 e lipase A da *Candida Antartica*, apresentaram maiores taxas de reação (25 % e 39% de conversão em 1 h) com *ee* 97 % e 95%, respectivamente. Outras lipases também apresentaram resultados na transesterificação, porém necessitam de um maior tempo de reação, como PS Amano da *Pseudomonas cepacia* e lipozyme imobilizada da *Mucor miehei*, havendo pouco excesso enantiomérico.

A hidrólise enzimática foi realizada com as mesmas 10 lipases, e mostraram resultados aceitáveis apenas três enzimas: a Novozyme 435 (40 % conv. e *ee* 100 %), PS Amano da *Pseudomonas cepacia* (19 % conv. e *ee* 100 %) e Lipase A da *Candida antarctica* (47 % conv. e *ee* 100 %). Foi observado no trabalho de Strub, Garbós e Lochynski (2017) que, embora a hidrólise em um sistema bifásico tenha apresentado maiores conversões do que a

transesterificação, se configurou em um processo mais lento, e nesse caso, requer 24 h para obter excelente *ee* de um acetato.

Xia *et al.* (2017), a fim de superar limitações das resoluções cinética como baixa enantiosseletividade e conversão máxima de 50%, decidiram se dedicar à resolução cinética dinâmica de adutos MBH livre de metais que oferecem opcionalmente álcoois resolvidos *R* ou *S*. Foi escolhido o trietilamina (TEA) como base orgânica catalisadora de racemização e testado com sete lipases utilizadas na resolução cinética comum. Apenas as lipases CAL B e subtilisina de *Bacillus subtilis* apresentaram estereosseletividade. O teste realizado com cocatálise TEA/CAL B para os substratos de estudo (Esquema 10) forneceram rendimento de 87 a 98% e *ee* 72 a 96 %.



Esquema 10: Resolução cinética enzimática dinâmica cocatalisada TEA/CAL B segundo Xia *et al.* (2017).

Após obter sucesso na construção seletiva do álcool (*S*), o desvio enfrentado por Xia *et al.* foi reverter a enantiosseletividade, invertendo a bolsa de ligação de ácido da CAL B para criar mutantes enantiocomplementares para a resolução cinética de ácidos racêmicos. Hult *et al.* relataram um importante mutante de CAL B, W104A, que foi testado no trabalho de Xia e seu grupo, obtendo enantiosseletividade *R* moderadamente reversa (51% *ee* a 40% de conversão). Melhorando ainda mais a seletividade *R*, uma biblioteca de mutantes da CAL B foi construída sob orientação do software YASARA. A melhor variante em toda biblioteca foi WB13 (de sequência W104V / A281L / A282K) com 42% de conversão e 80% *ee*.

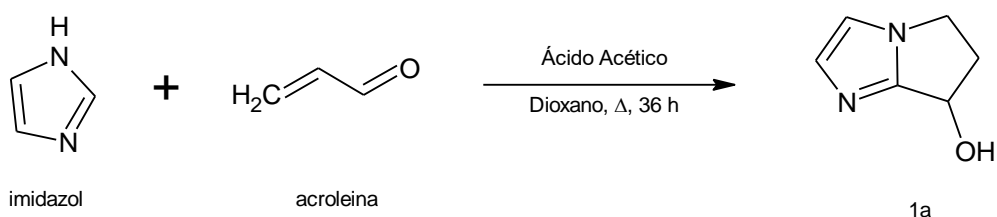
4. Metodologia

4.1 SÍNTESE DO CATALISADOR

O catalisador utilizado na síntese dos AMBH oriundos de enonas cíclicas é 6,7-dihidro-5*H*-pyrrolo[1,2-*a*]imidazol-7-ol (**1a**), fornecendo bons rendimentos médios em tempos

razoáveis. É de preparo relativamente simples e uso de reagentes economicamente viáveis (imidazol e acroleína). (COELHO et al, 2012, p. 7)

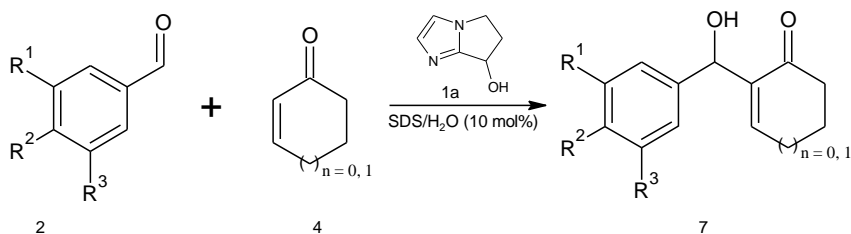
O catalisador foi preparado adicionando o imidazol, em 1,4-dioxano, ácido acético e a acroleína em refluxo por 36 h, acompanhado por CCD. A purificação foi realizada em coluna cromatográfica de gel sílica com metanol e acetato de etila como fase móvel e por fim foi recristalizado. Foram obtidos os espectros RMN ^1H (600 MHz, CDCl_3) e RMN ^{13}C (151 MHz, CDCl_3) para caracterização da estrutura.



Esquema 11: Síntese do composto 1a.

4.2 SÍNTESE DOS ADUTOS DE MORITA-BAYLIS-HILLMAN

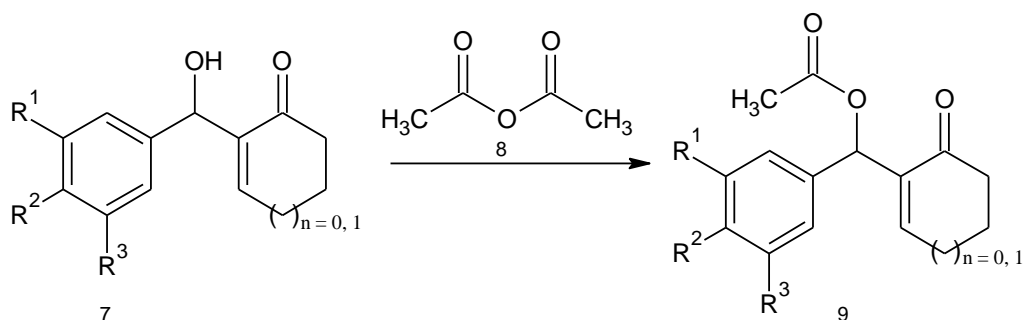
As sínteses dos adutos seguiram a mesma metodologia aplicada por Coelho *et al* (2012) de forma ambientalmente favorável, sem o uso de cossolventes orgânicos na presença de dodecil sulfato de sódio (SDS).



Esquema 12: Esquema geral dos adutos sintetizados.

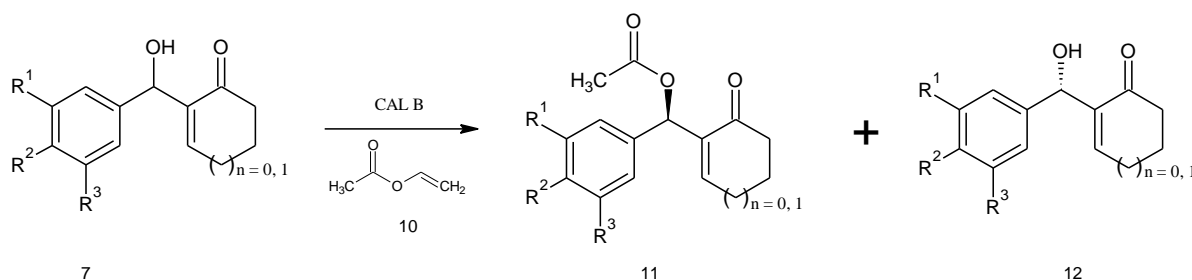
4.3 RESOLUÇÃO CINÉTICA

Para início dos testes de resolução cinética os adutos foram acetilados por via química, com anidrido acético, sob agitação magnética por 2 h, essas acetilações foram utilizadas como padrão no CG-FID e RMN ^1H .



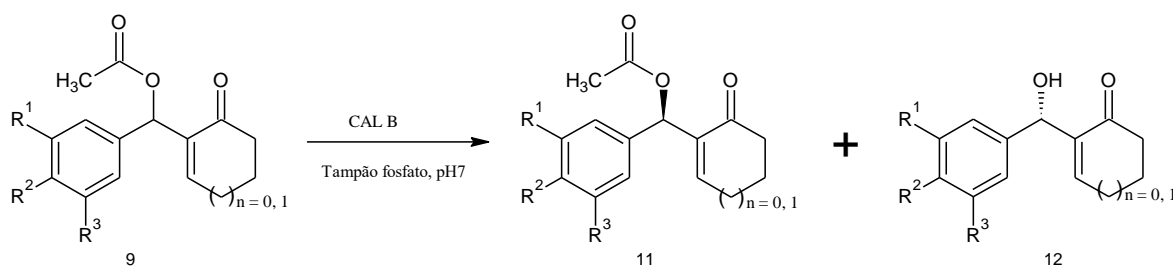
Esquema 13: Acetilação via química dos adutos MBH.

Após obtido os padrões acetilados foi iniciado o estudo de resolução cinética, onde foram realizadas acilações enzimáticas com acetato de vinila na presença da lipase CAL B como biocatalisador. Variando os solventes, tempo de reação e temperatura.



Esquema 14: Acetilação via enzimática dos AMBH.

Foi realizado a hidrólise enzimática na presença de CAL B, do aduto acetilado usando tampão fosfato (pH = 7).



Esquema 15: Hidrólise enzimática dos adutos acetilados.

Uma segunda lipase (PS) foi utilizada com a intenção de verificar se era possível resolver os adutos por meio de acetilação enzimática.

5. Resultados e Discussões

5.1 CATALISADOR 6,7-DIIDRO-5H-PIRROLO[1,2-A]IMIDAZOL-7-OL

O catalisador, sintetizado segundo a metodologia de Coelho et al (2012), forneceu o produto representado nos espectros a baixos, apresentando o pico relativo ao hidrogênio carbinólico em 5,16 ppm, no espectro de RMN ^1H , e não houve presença de pico característico do aldeído na região de 10 ppm (Figura 1). Já o espectro RMN ^{13}C , indica os sinais com a quantidade de carbonos da estrutura. O rendimento do catalisador foi de 73%.

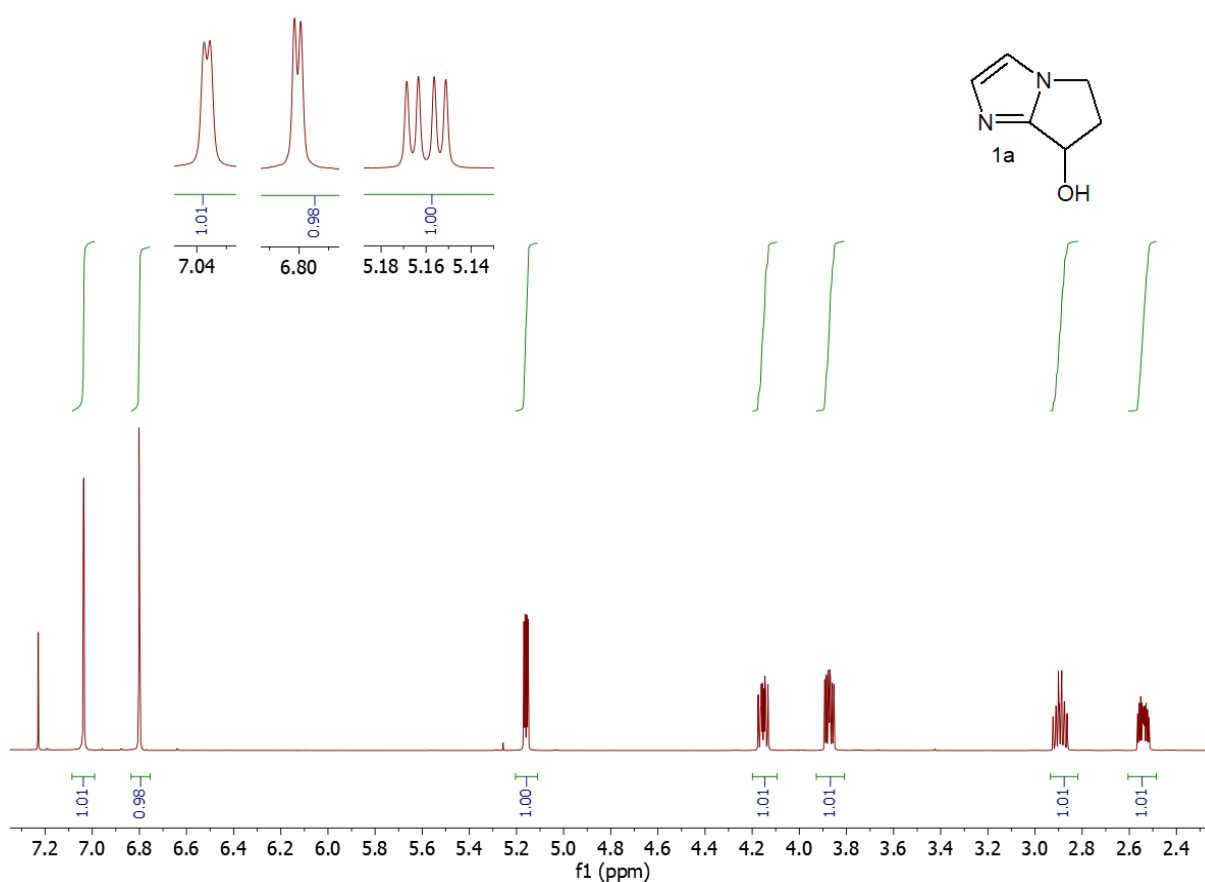


Figura 1: RMN ^1H (600 MHz, CDCl_3) 1a.

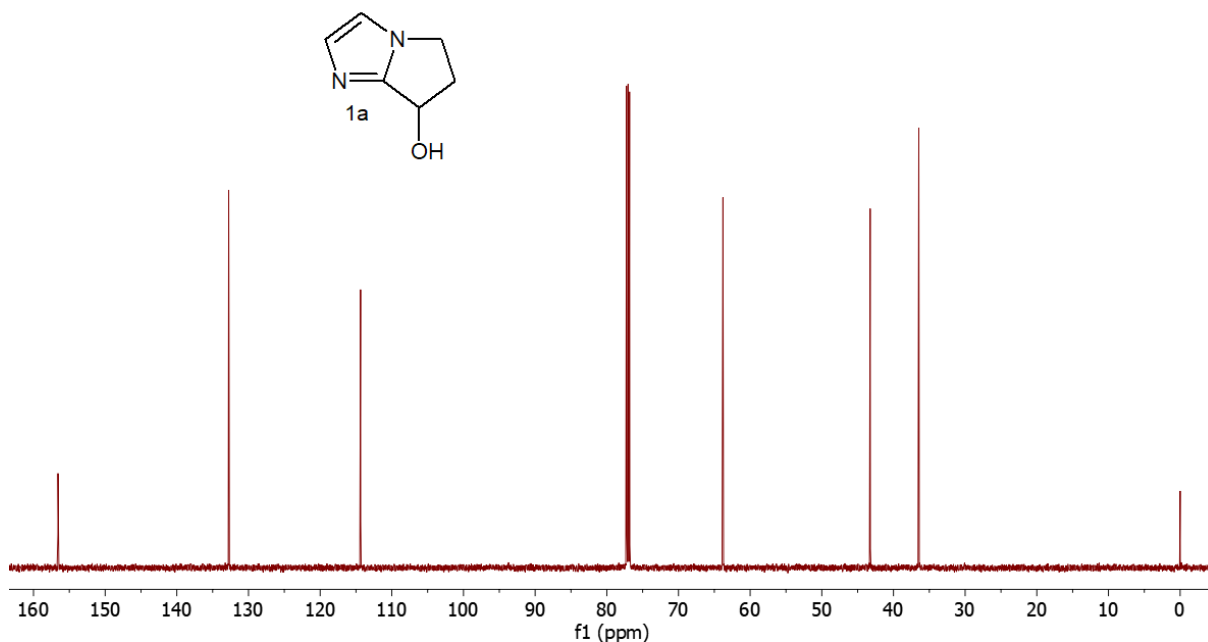
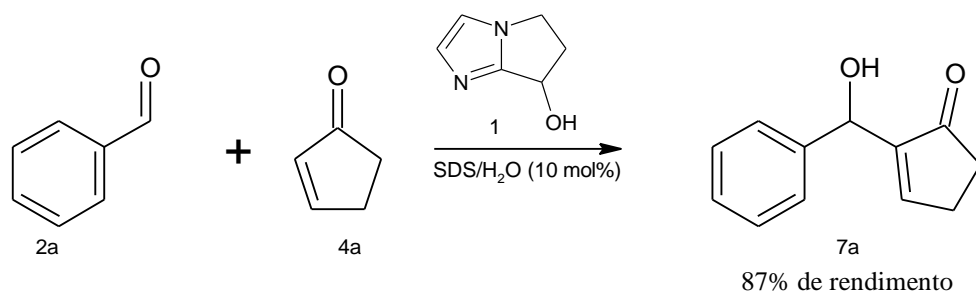


Figura 2: RMN ^{13}C (151 MHz, CDCl_3) 1a.

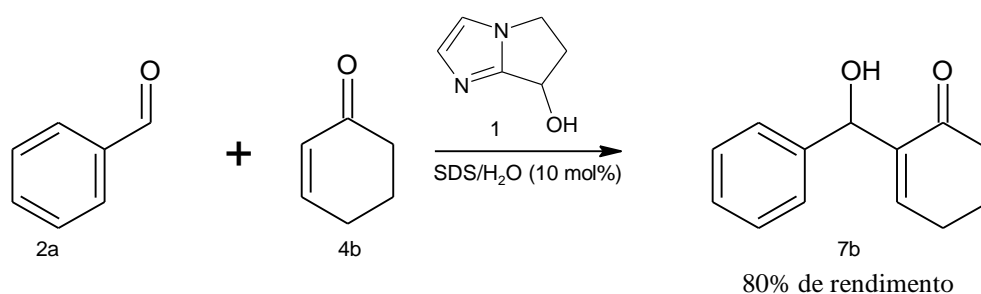
5.2 ADUTOS DE MORITA-BAYLIS-HILLMAN PROVENIENTES DE ENONAS CÍCLICAS

Diante do resultado satisfatório obtido na síntese do catalisador o mesmo foi utilizado para a síntese de diversos adutos MBH nas condições aplicadas por Coelho *et al.* (2012). Os rendimentos foram variados de 30 a 93%, obtendo em maioria um bom rendimento para essa reação, variando a enona cíclica (ciclopentenona e ciclohexenona) e o substituinte do aldeído aromático, que foram utilizados (**Tabela 1**).

A formação do aduto é evidenciada pelo espectro RMN ^1H , os picos característicos dos adutos são o hidrogênio carbinólico na região de 5,6 ppm e o hidrogênio da hidroxila em 3,5 ppm na forma de um simpleto largo. No espectro RMN ^{13}C há ausência de sinais em 190 ppm que representam a carbonila do aldeído e apresenta um sinal na região de 210 que se refere à carbonila da cetona, há os carbonos aromáticos entre 127 e 129 ppm e um sinal em aproximadamente 65 ppm, do carbono carbinólico.



Esquema 16: Reação de obtenção do composto 7a.



Esquema 17: Reação de obtenção do composto 7b.

Tabela 2: Aldeídos e cetonas utilizados na síntese dos adutos e seus respectivos rendimentos.

	Aldeído	Cetona	Rendimento (%)
7a	benzaldeído (2a)	ciclopentenona (4a)	87
7b	benzaldeído (2a)	ciclohexenona (4b)	80
7c	4-nitrobenzaldeído (2b)	ciclopentenona (4a)	68
7d	4-nitrobenzaldeído (2b)	ciclohexenona (4b)	79
7e	3- nitrobenzaldeído (2c)	ciclopentenona (4a)	63
7f	3- nitrobenzaldeído (2c)	ciclohexenona (4b)	76
7g	piperinal (2d)	ciclopentenona (4a)	30
7h	piperinal (2d)	ciclohexenona (4b)	32
7i	3,4-dimetoxibenzaldeído (2e)	ciclopentenona (4a)	50
7j	3,4-dimetoxibenzaldeído (2e)	ciclohexenona (4b)	50
7k	4-clorobenzaldeído (2f)	ciclopentenona (4a)	85
7l	4-clorobenzaldeído (2f)	ciclohexenona (4b)	85
7m	4-bromobenzaldeído (2g)	ciclopentenona (4a)	93
7n	4-bromobenzaldeído (2g)	ciclohexenona (4b)	74

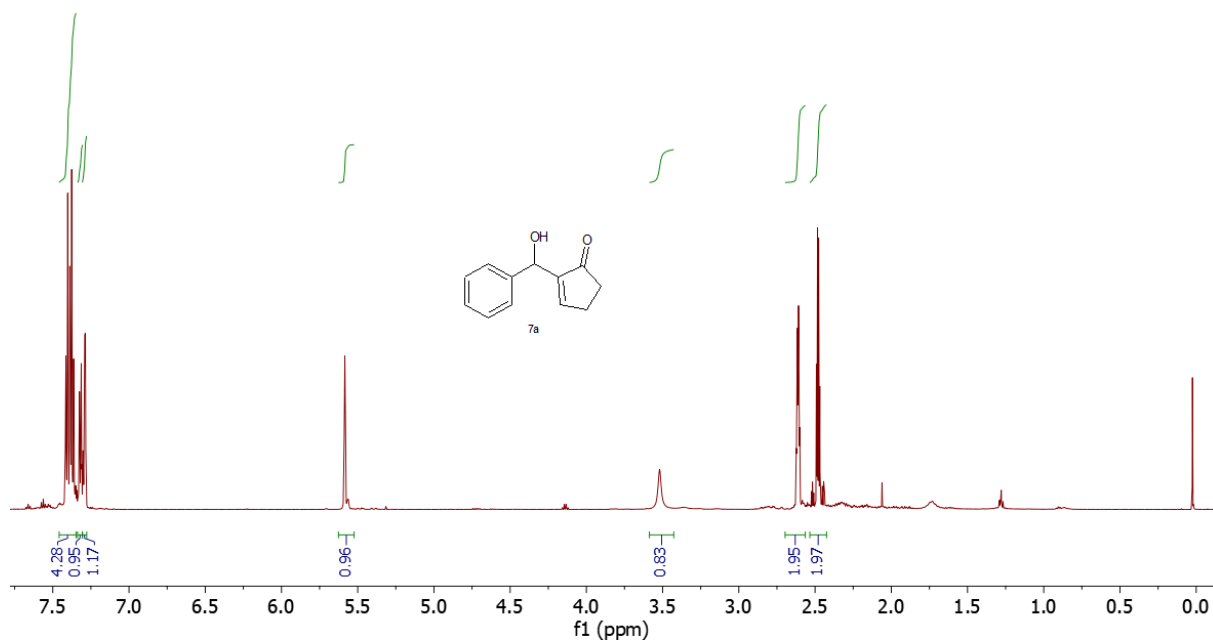


Figura 3: RMN 1H (600 MHz, CDCl₃) 7a.

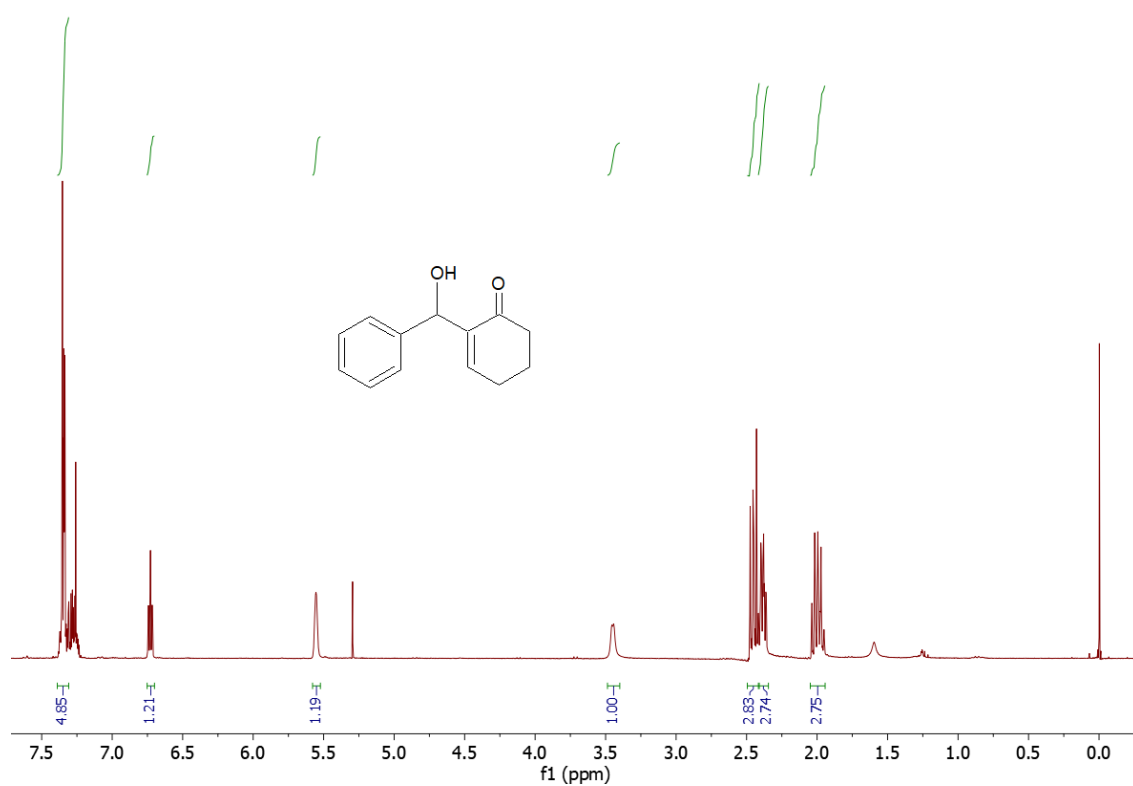


Figura 4: RMN 1H (600 MHz, CDCl₃) 7b.

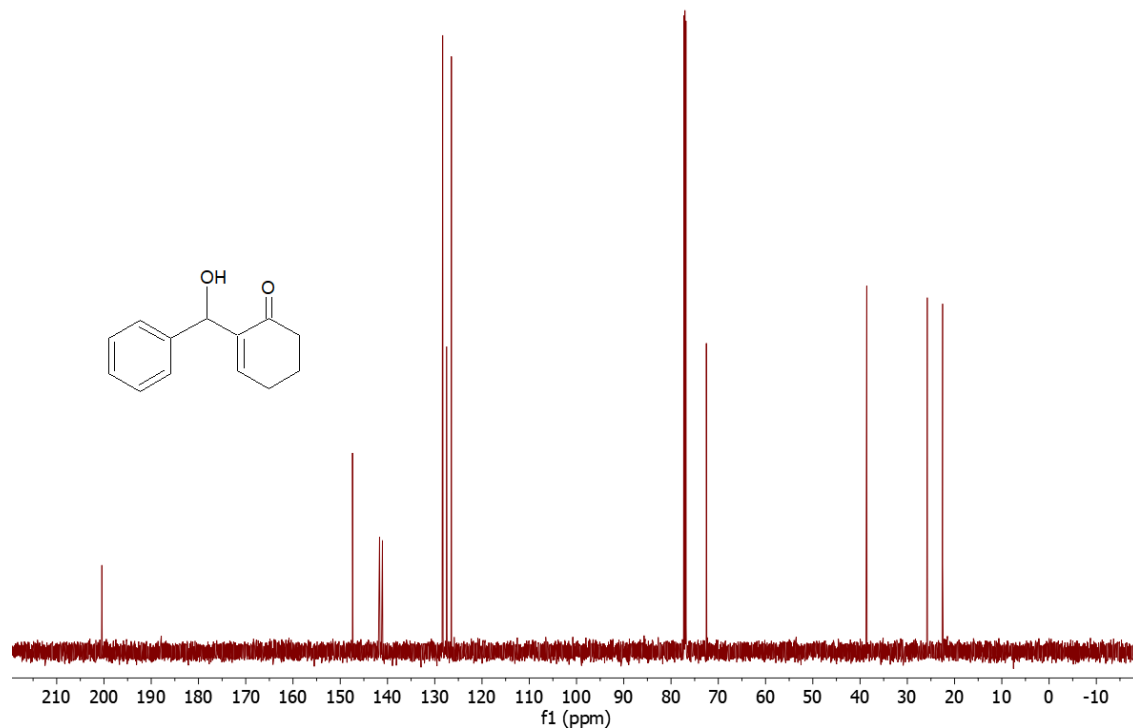
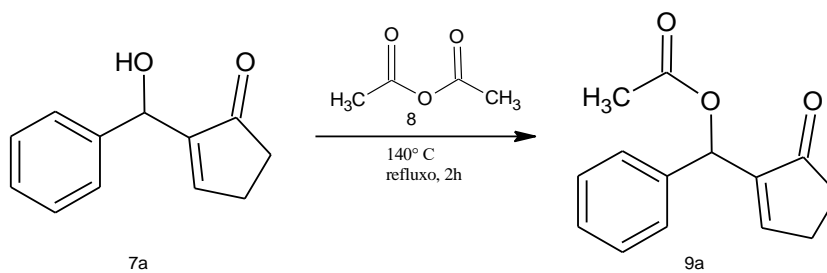


Figura 5: RMN 13C (151 MHz, CDCl₃) 7b.

5.3 RESOLUÇÃO CINÉTICA

5.3.1 Acetilações dos AMBH

As reações de acetilação foram realizadas tratando-se o aduto com anidrido acético sob refluxo por 2 horas, apresentaram 99% de rendimento. Evidenciando a formação do produto acetilado, o espectro RMN H¹ apresenta um simpleto com integração para três hidrogênios na região de 2 ppm correspondente à metila do grupo acetil. O hidrogênio carbinólico se encontra mais deslocado para valores um pouco maiores, além do desaparecimento do sinal referente à hidroxila.



Esquema 18: Reação de formação do composto acetilado 9a.

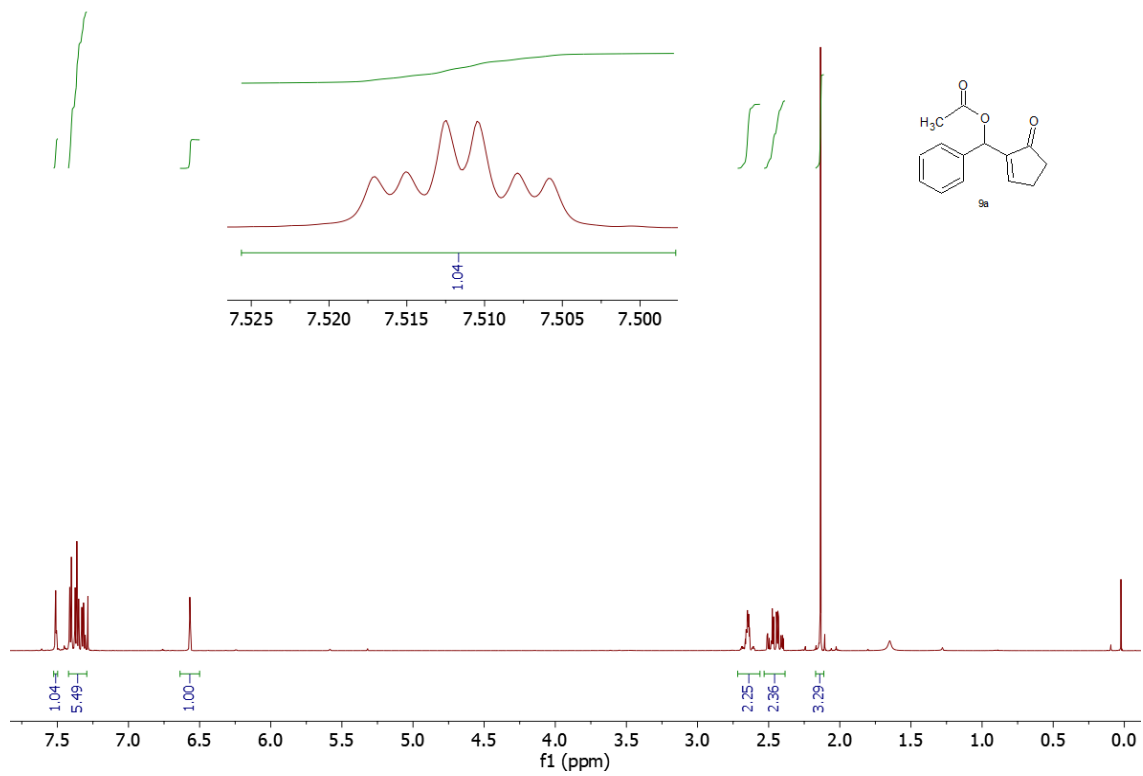
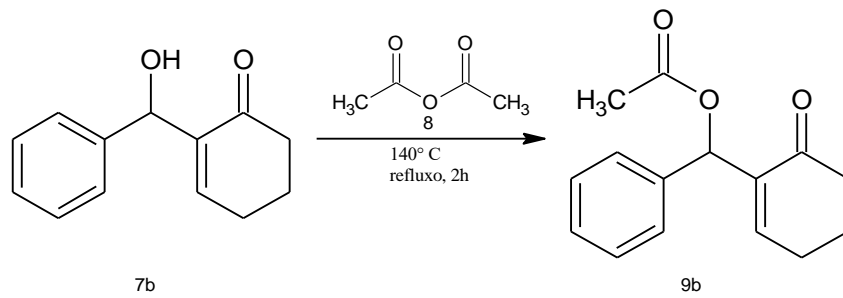


Figura 6: RMN 1H (600 MHz, CDCl₃) 9a.



Esquema 19: Reação de formação do composto acetilado 9b.

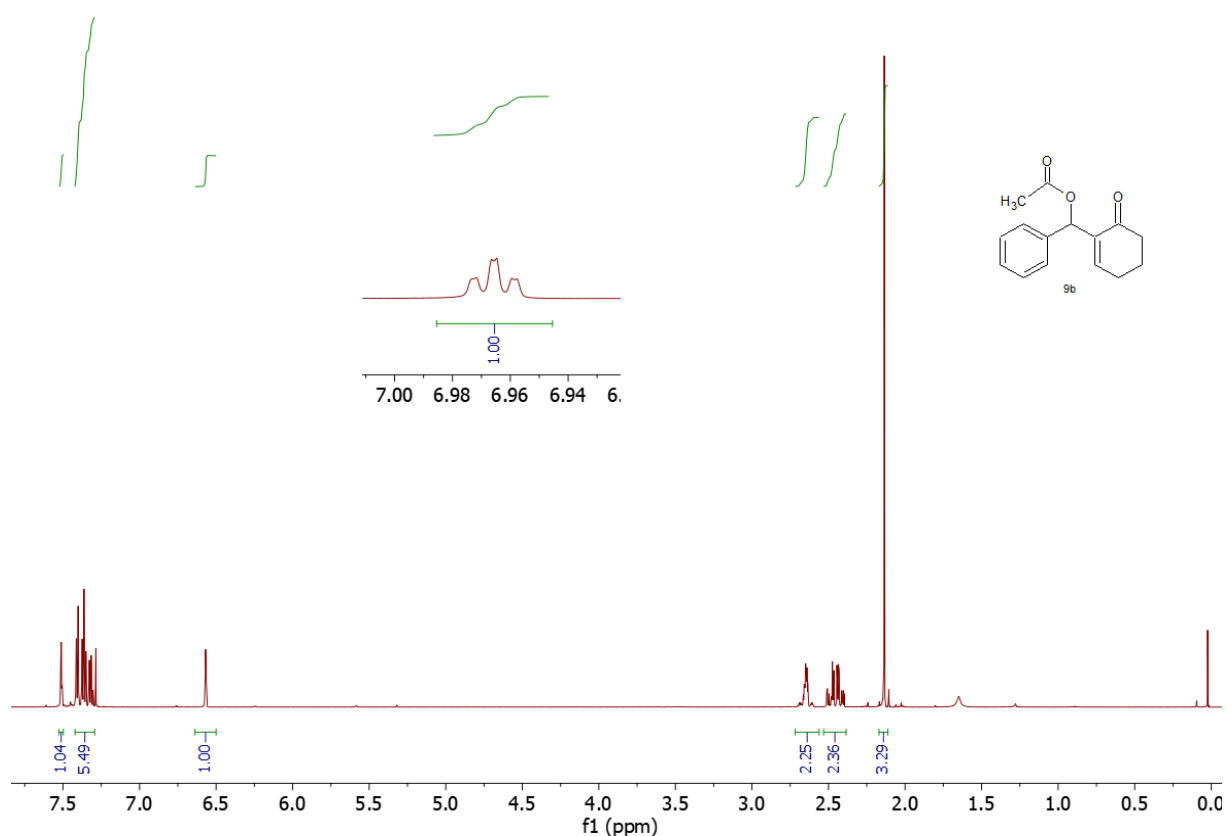


Figura 7: RMN 1H (600 MHz, CDCl₃) 9b.

5.3.2 Resolução cinética dos AMBH com CAL B

Após obter os padrões dos compostos acetilados, determinou um método cromatográfico para a separação dos enantiômeros *R* e *S*, tanto dos adutos quando dos adutos acetilados.

O estudo da resolução cinética consistiu em realizar acilação enzimática dos compostos 7a-n usando Lipase CAL B como biocatalisador, alterando os solventes para estudo, as reações seguem o Esquema 14. Os solventes utilizados foram hexano, acetonitrila e isopropanol, para os quais houve um controle das reações de 2 em 2 h, onde alíquotas foram colhidas e analisadas, até 48 h. Em seguida outro teste com hexano e acetato de etila foram feitos aumentando a temperatura a 40 °C, em que o controle foi o mesmo utilizado no teste o anterior.

O aduto **7e** foi resolvido utilizando o solvente isopropanol à 25 °C, o cromatograma abaixo mostra o resultado da resolução, onde não houve acetilação enzimática e o tempo de retenção refere-se ao aduto.

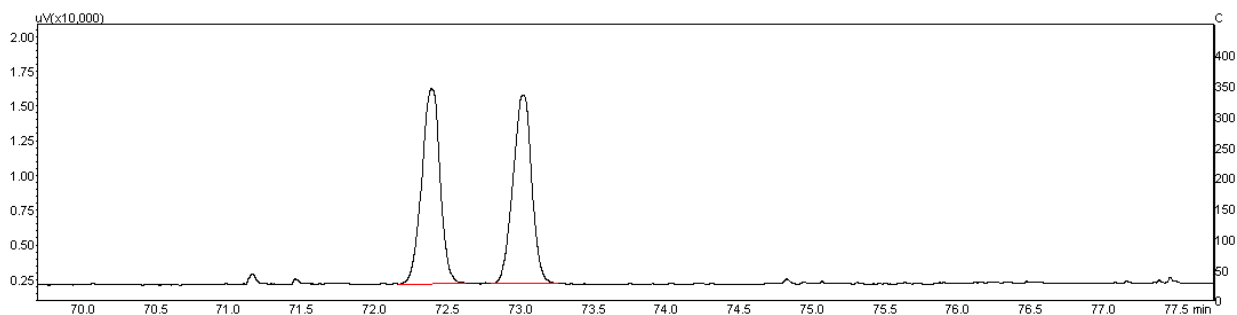


Figura 8: Cromatograma da acetilação enzimática 7e com isopropanol à 25 °C.

O solvente hexano foi utilizado no aduto **7e**, a 25 °C os adutos **7a** e **7b** a 40 °C. Porém nenhum apresentou reação, abaixo apresenta os cromatogramas finais apresentado o tempo de retenção referente aos adutos de partida.

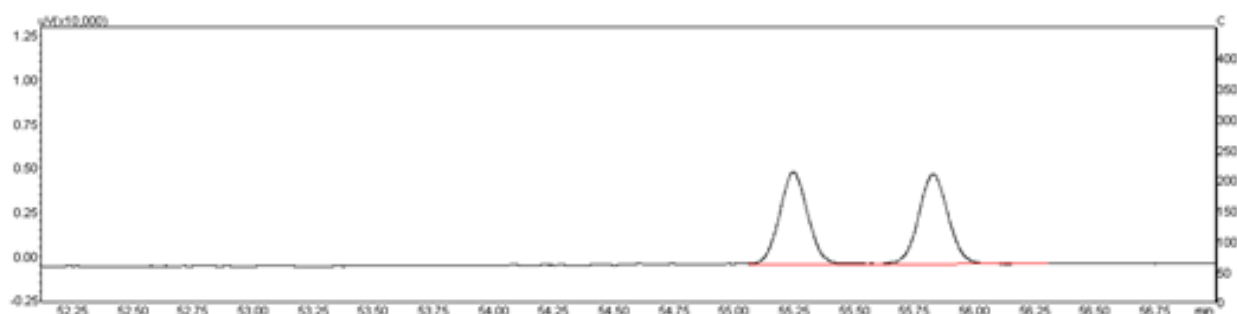


Figura 9: Cromatograma da acetilação enzimática 7a com hexano a 40 °C.

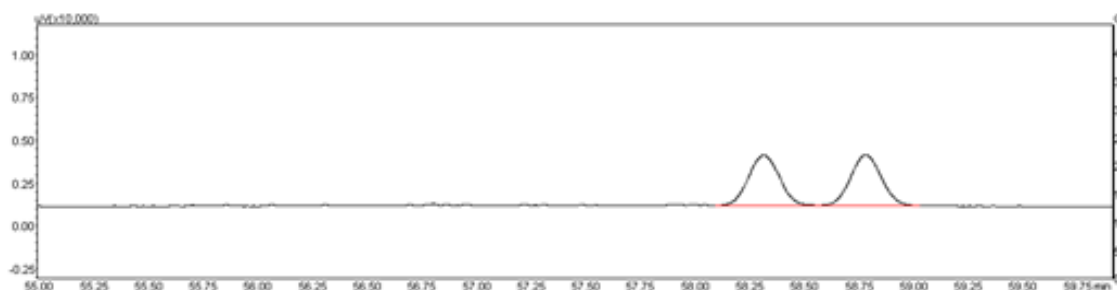


Figura 10: Cromatograma da acetilação enzimática 7b com hexano a 40 °C.

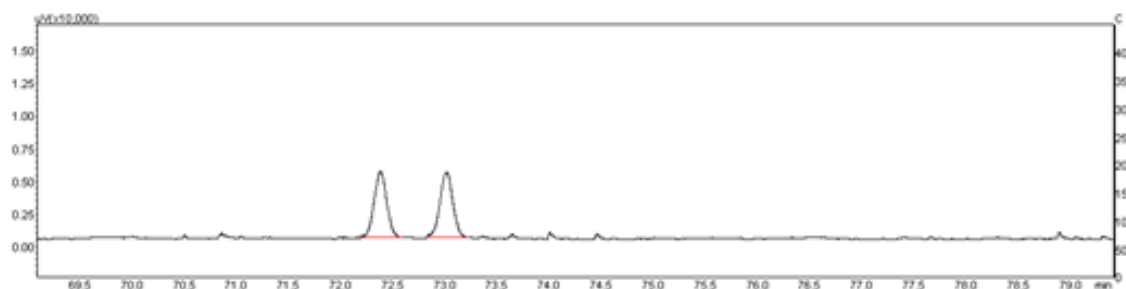


Figura 11: Cromatograma da acetilação enzimática 7e com hexano a 40 °C.

Foi utilizado acetonitrila para a resolução dos adutos **7c-n** à 40 °C. Os cromatogramas referentes a cada reação estão a seguir com os tempos referentes aos adutos, isso mostra que não houve reações de acetilação enzimática para nenhum aduto.

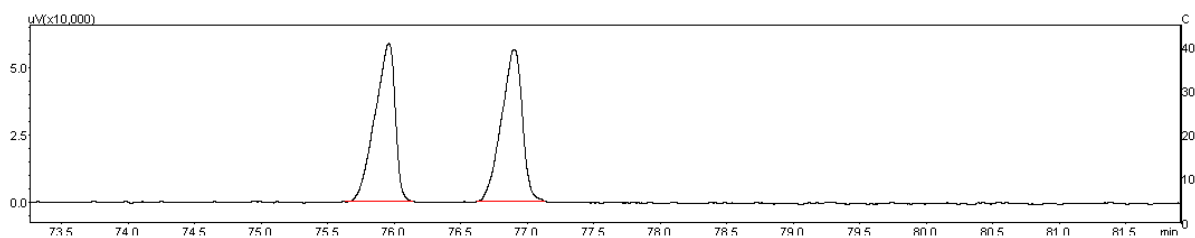


Figura 12: Cromatograma da acetilação enzimática 7c com acetonitrila a 40 °C.

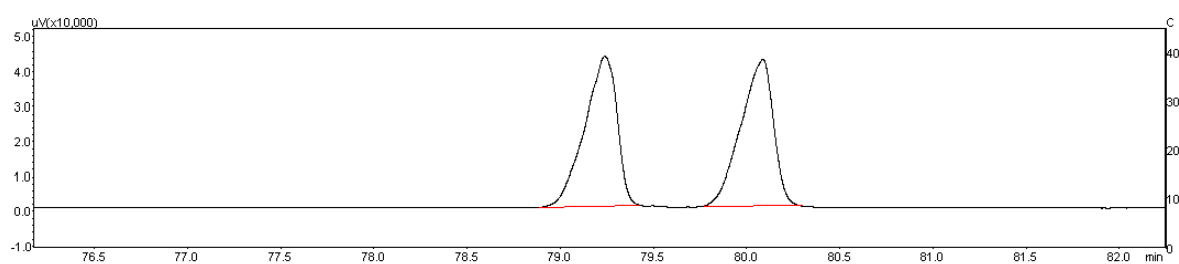
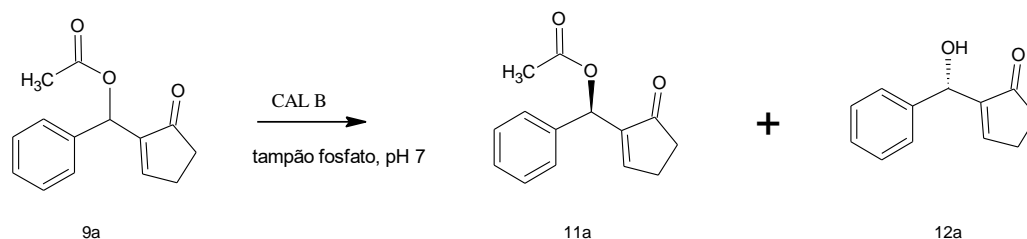


Figura 13: Cromatograma da acetilação enzimática 7d com hexano a 40 °C.

Não havendo sucesso nas acetilações enzimáticas foi feita uma tentativa de hidrólise do acetilado **9a** com a enzima CAL B e tampão fosfato de sódio, pH 7, durante sete dias, porém a reação também não ocorreu e o tempo de retenção do cromatograma se refere ao aduto acetilado **9a**.



Esquema 20: Reao de hidr3lise enzim3tica do composto 9a.

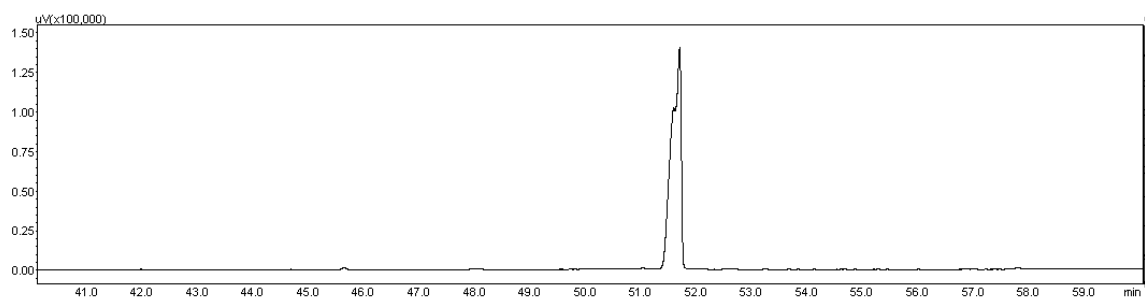


Figura 14: Cromatograma da hidr3lise do composto 9a utilizando tamp3o fosfato pH 7 e CAL B.

Por fim, para verificar se o reconhecimento enzim3tico se dificultou por parte do aduto ou da lipase CAL B, foi realizado um 3ltimo teste de acetilao do aduto **7g** com uma diferente enzima, a lipase PS, com acetato de vinila e solvente acetonitrila, grau HPLC. (HAYASHI; YANAGIHARA; TSUBOI, 1998). Como mostra o cromatograma abaixo, n3o houve acetilao enzim3tica, sugerindo que as estruturas dos adutos n3o s3o reconhecidas por essas lipases.

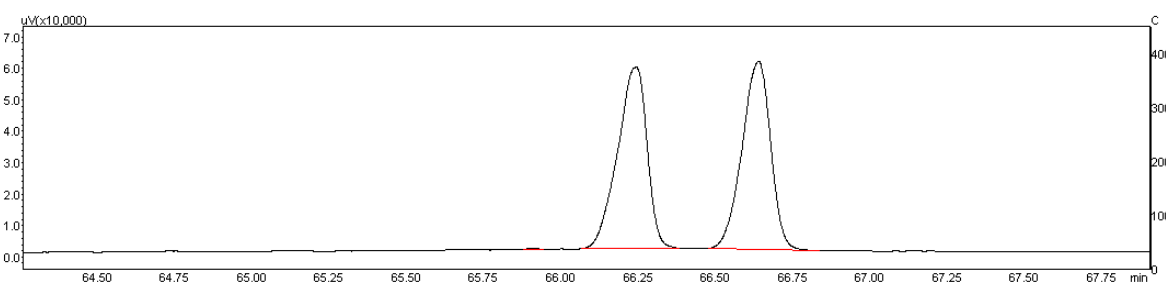


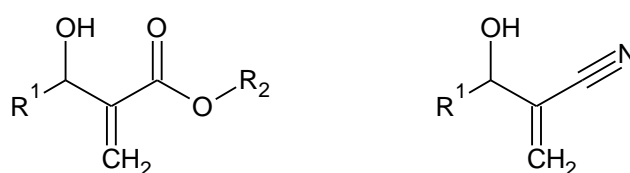
Figura 15: Cromatograma da acetilao enzim3tica do composto 7g com acetonitrila utilizando a enzima PS.

6. Conclus3o

Neste trabalho, foi realizada a s3ntese do catalisador 6,7-diidro-5H-pirrolol[1,2- α]imidazol-7-ol e este foi utilizado na s3ntese de 14 adutos de Morita-Baylis-Hillman e seus respectivos acetatos, todos em rendimentos equivalentes aos relatados na literatura.

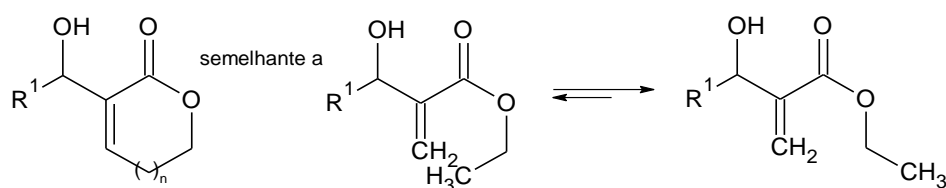
Prosseguindo do estudo de suas resoluções cinéticas via acetilação e hidrólise enzimática, que visou a obtenção dos adutos com elevada pureza enantiomérica, como desafio para a síntese do *Floribundano B*. A síntese e acetilações dos adutos foram realizadas com sucesso, porém a resolução cinética não obteve resultados satisfatórios, mesmo variando as condições de reação.

Ao se comparar a estrutura dos adutos sintetizados neste trabalho com os já estudados na literatura, pode-se perceber que as cadeias se diferem na parte proveniente do alceno ativado. Os dados de literatura trazem adutos constituídos de nitrilas ou éster com uma cadeia lateral R_2 relativamente pequena, de um ou dois carbonos.



Esquema 21: Modelos de adutos da literatura.

Mesmo os AMBH derivados de ésteres, que apresentam uma estrutura semelhante com relação à dos adutos em questão, possuem, em sua cadeia lateral, uma liberdade de rotação, já os adutos oriundos de enonas cíclicas reportam uma rigidez da estrutura devido aos anéis de cinco ou seis membros.

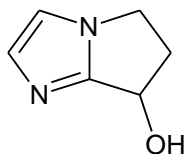


Esquema 22: Rotação da parte lateral da cadeia do AMBH

Essa limitação que os adutos provenientes das enonas cíclicas traz pode dificultar no reconhecimento do sítio ativo enzimático, o que dificultou as resoluções cinéticas neste trabalho.

7. Procedimentos experimentais

7.1 SÍNTESE DO CATALISADOR 6,7-DIIDRO-5H-PIRROLO[1,2-*A*]IMIDAZOL-7-OL



Em um balão de 50 mL 1,63 g (24 mmol) de imidazol comercial foi dissolvido em 1,4-dioxano (25 mL) foram adicionados 0,10 mL de ácido acético ((1,7 mmol, 7 mol%) e 2,5 mL de acroleína recém destilada (1,5 equiv., 3,7 mmol). A reação foi mantida sob agitação magnética e refluxo por 36 h e monitorada por CCD até que não houvesse mais evolução. Após o fim da reação o solvente foi evaporado a pressão reduzida, e o bruto da reação foi dissolvido em cerca de 50 mL de metanol quente e sílica gel (1g) e o metanol foi evaporado a pressão reduzida. O resíduo de sílica foi aplicado em coluna cromatográfica e purificado com sistema eluente metanol/acetato de etila (1:3). O produto foi concentrado e uma recristalização foi realizada com acetona.

¹H NMR (600 MHz, CDCl₃) δ 7,04 (d, *J* = 1,0 Hz, 1H); 6,80 (d, *J* = 0,83 Hz, 1H); 5,16 (dd, *J* = 7,3; 3,1 Hz, 1H); 4,17 – 4,13 (m, 1H); 3,89 – 3,85 (m, 1H); 2,92 – 2,86 (m, 1H); 2,56 – 2,52 (m, 1H).

¹³C NMR (151 MHz, CDCl₃) δ 156,6; 132,8; 114,3; 63,8; 43,3; 36,5.

7.2 SÍNTESE DOS ADUTOS DE MORITA-BAYLIS-HILLMAN

Em um balão foram colocados 1,42 mmol aldeído, 2 equivalentes da enona cíclica correspondente, 0,65 equivalente do catalisador 6,7-diidro-5H-pirrolo[1,2-*a*]imidazol-7-ol já sintetizado, e 2 mL de uma solução de dodecil sulfato de sódio (SDS/H₂O 10 mol%), as reações duraram 7 dias e foram acompanhadas com placas CCD. Ao final, foram adicionados 30 mL de água destilada e realizadas três extrações com 30 mL de acetato de etila. A fase orgânica foi seca com sulfato de sódio. A purificação foi realizada em cromatografia em coluna usando como eluente uma mistura 20% de acetato de etila em hexano.

7.2.1 Dados dos adutos de Morita-Baylis-Hilman obtidos:

2-(hidroxi(fenil)metil)ciclopent-2-en-1-ona – composto 7a

^1H NMR (600 MHz, CDCl_3) δ 7,43 - 7,36 (m, 5H); 5,58 (s, 1H); 3,52 (s, 1H); 2,63 - 2,60 (m, 2H); 2,52 – 2,44 (m, 2H).

2-(hidroxi(fenil)metil)ciclohex-2-en-1-ona - composto 7b

^1H NMR (600 MHz, CDCl_3) δ 7,36 – 7,33 (m, 5H); 6,75 – 7,71 (td, $J = 4,2; 1,0$ Hz, 1H); 5,55 (s, 1H); 3,48 – 3,42 (d, $J = 4,7$ 1H); 2,48– 2,36 (m, 4H).

^{13}C NMR (151 MHz, CDCl_3) δ 200,4; 147,4; 141,7; 141,1; 128,3; 127,5; 126,5; 77,3; 77,1; 76,8; 72,5; 38,6; 25,8; 22,5.

2-(hidroxi(4-nitrofenil)metil)ciclopent-2-en-1-ona - composto 7c

^1H NMR (600 MHz, CDCl_3) δ 8,24 – 8,22 (dt, $J = 9,2; 2,4$ Hz, 2H); 7,62 – 7,59 (m, 2H); 7,33 – 7,32 (dt, $J = 2,7; 1,2$ Hz, 2H); 5,70 (s, 1H); 5,32 (s, 1H); 2,67 – 2,65 (m, 2H); 2,55 – 2,46 (m, 2H).

2-(hidroxi(4-nitrofenil)metil)ciclohex-2-en-1-ona - composto 7d

^1H NMR (600 MHz, CDCl_3) δ 8,21 – 8,19 (m, 2H); 7,57 – 7,55 (d, $J = 8,2$ Hz, 2H); 6,86 – 6,84 (t, $J = 4,2$ Hz, 1H); 5,63 (s, 1H); 3,63 (s, 1H); 2,49 – 2,44 (m, 4H); 2,06 -2,01 (m, 4H).

^{13}C NMR (151 MHz, CDCl_3) δ 200,1; 149,4; 148,2; 147,2; 140,2; 127,1; 123,5; 72,0; 60,4; 38,4; 25,8; 22,4.

2-(hidroxi(3-nitrofenil)metil)ciclopent-2-en-1-ona - composto 7e

^1H NMR (600 MHz, CDCl_3) δ 8.31 -8.28, (m, 1H); 8,18 – 8,17 (dq, $J = 8,2; 1,1$ Hz, 1H); 7,79 – 7,77 (m, $J = 0,8; 19,3$ Hz, 1H); 7,57 – 7,55 (t, $J = 7,9$ Hz, 1H); 7,36 – 7,35 (td, $J = 2,7; 1,2$ Hz, 1H); 5,69 (s, 1H); 3,62 (s, 1H); 2,68 – 2,66 (m, 1H); 2,56 – 2,47 (m, 1H).

^{13}C NMR (151 MHz, CDCl_3) δ 209,4; 159,9; 148,4; 146,7; 143,5; 132,5; 129,5; 122,8; 121,3; 69,0; 35,2; 26,8.

2-(hidroxi(3-nitrofenil)metil)ciclohex-2-en-1-ona - composto 7f

^1H NMR (600 MHz, CDCl_3) δ 8,24 – 8,23 (t, $J = 2,1$ Hz, 1H); 8,15 – 8,13 (dq, $J = 8,1; 1,1$ Hz, 1H); 7,77 – 7,76 (d, $J = 5,9$ Hz, 1H), 7,75 – 7,52 (t, $J = 7,9$ Hz, 1H); 6,88 - 6,86

(dt, $J = 4,1$; 1,0 Hz, 1H); 5,62 – 5,61 (d, $J = 5,7$ Hz, 1H); 3,61 – 3,60 (d, $J = 6,0$ Hz, 1H); 2,51 – 2,44 (m, 4H); 2,07 – 2,02 (m, 2H).

2-(1,3-benzodioxol-5-il(hidroxi)metil)ciclopent-2-en-1-ona - composto 7g

$^1\text{H NMR}$ (600 MHz, CDCl_3) δ 7,33 – 7,32 (td, $J = 2,7$; 1,3 Hz, 1H); 6,90 – 6,89 (d, $J = 1,7$ Hz, 1H); 6,87- 6,85 (dq, $J = 1,1$; 0,61 Hz, 1H); 6,79 (s, 1H); 5,97 (m, 1H); 5,48 (m, 1H); 3,44 (m, 1H); 2,64 – 2,61 (m, 2H); 2,52 – 2,44 (m, 2H).

$^{13}\text{C NMR}$ (151 MHz, CDCl_3) δ 209,6; 159,2; 147,2; 135,4; 108,1; 107,0; 69,8; 35,3; 26,6.

2-(1,3-benzodioxol-5-il(hidroxi)metil)ciclohex-2-en-1-ona - composto 7h

$^1\text{H NMR}$ (600 MHz, CDCl_3) δ 6,87 (d, $J = 2,3$ Hz, 1H); 6,84 – 6,83 (dq, $J = 92,0$; 1,3 Hz, 1H); 6,80 – 6,78 (m, 2H); 5,96 (s, 2H); 5,49 (s, 1H); 3,40 (s, 1H); 2,48 – 2,45 (td, $J = 9,4$; 3,4 Hz, 2H); 2,44 – 2,41 (m, 2H); 2,04 – 1,99 (q, $J = 7,8$ Hz, 2H).

2-((3,4-dimetoxifenil)(hidroxi)metil)ciclopent-2-en-1-ona - composto 7i

$^1\text{H NMR}$ (600 MHz, CDCl_3) δ 7,29 – 7,28 (td, $J = 2,7$; 1,3 Hz, 1H); 6,97 (d, $J = 3,8$ Hz, 1H); 6,91 – 6,89 (dq, $J = 8,2$; 1,2 Hz, 1H); 6,85 – 6,84 (d, $J = 7,2$ Hz, 2H); 5,52 (s, 1H); 3,89 – 3,88 (d, $J = 3,6$ Hz, 6H); 3,52 (s, 1H) 2,62 – 2,59 (m, 2H); 2,52 – 2,43 (m, 2H).

2-((3,4-dimetoxifenil)(hidroxi)metil)ciclohex-2-en-1-ona - composto 7j

$^1\text{H NMR}$ (600 MHz, CDCl_3) δ 6,96 (td, $J = 1,8$ Hz, 1H); 6,87 – 6,84 (m, 2H); 6,75 – 6,73 (td, $J = 4,2$; 0,6 Hz, 1H); 5,54 (s, 1H); 5,52 (s, 1H); 3,90 – 3,89 (d, $J = 1,0$ Hz, 6H); 3,48 (s, 1H); 2,50 – 2,46 (m, 2H); 2,43 – 2,40 (m, 2H); 2,06 – 1,99 (m, 2H).

$^{13}\text{C NMR}$ (151 MHz, CDCl_3) δ 200,6; 148,9; 148,4; 147,3; 141,2; 134,2; 118,7; 110,9; 109,8; 72,2; 55,9; 55,9; 38,6; 25,8; 22,6.

2-((4-clorofenil)(hidroxi)metil)ciclopent-2-en-1-ona - composto 7k

$^1\text{H NMR}$ (600 MHz, CDCl_3) δ 7,35 – 7,34 (m, 4H); 7,28 – 7,27 (td, $J = 2,7$; 1,3 Hz, 1H); 5,56 (s, 1H); 3,54 (s, 1H); 2,64 – 2,61 (m, 2H); 2,53 – 2,44 (m, 2H).

2-((4-clorofenil)(hidroxi)metil)ciclohex-2-en-1-ona - composto 7l

¹H NMR (600 MHz, CDCl₃) δ 7,35 – 7,30 (m, 4H); 6,77 – 6,75 (td, *J* = 4,2; 1,0 Hz, 1H); 5,54 – 5,53 (d, *J* = 4,7 Hz, 1H); 3,49 – 3,48 (d, *J* = 5,4 Hz, 1H); 4,48 – 4,46 (m, 2H); 2,44 – 2,40 (m, 2H); 2,04 – 2,00 (m, 2H)

2-((4-bromofenil)(hidroxi)metil)ciclopent-2-en-1-ona - composto 7m

¹H NMR (600 MHz, CDCl₃) δ 7,52 – 7,46 (m, 2H); 7,3 – 7,27 (m, 3H); 5,54 (s, 1H); 3,53 (s, 1H); 2,64 – 2,61 (m, 2H); 2,53 – 2,45 (m, 2H).

¹³C NMR (151 MHz, CDCl₃) δ 209,5; 159,5; 147,3; 147,3; 140,3; 131,6; 128,1; 121,7; 69,3; 35,2; 26,7.

2-((4-bromofenil)(hidroxi)metil)ciclohex-2-en-1-ona - composto 7n

¹H NMR (600 MHz, CDCl₃) δ 7,50 – 7,44 (m, 2H); 7,73 – 7,25 (d, *J* = 7,7 Hz, 2H); 6,77 – 6,76 (td, *J* = 14,2; 1,0 Hz, 1H); 5,52 (s, 1H); 3,48 (s, 1H); 2,48 – 2,46 (m, 2H); 2,44 – 2,41 (m, 2H); 2,04 – 2,00 (q, *J* = 6,8 Hz, 2H).

7.3 REAÇÕES DE ACETILAÇÕES:

Em um tubo de schlenk, foram adicionados barra magnética, 3,5 mmol do aduto e 3,5 mL de anidrido acético. A reação ficou em agitação sob refluxo a 120 °C por duas horas. Em seguida, foram adicionados 10 mL de acetato de etila e 10 mL de água destilada e realizadas 3 extrações líquido-líquido. A fase orgânica foi lavada de 3 a 5 vezes com 10 mL de solução saturada de bicarbonato de sódio, até que se observasse a saída de ácido acético da porção. A fase orgânica foi seca com sulfato de sódio anidro e levado ao rotaevaporador para a retirada do solvente.

7.3.1 Dados dos compostos obtidos pela reação de acetilação:

(5-oxociclopent-1-en-1-il)(fenil)metil acetato – composto 9a.

¹H NMR (600 MHz, CDCl₃) δ 7,52 – 7,51 (td, *J* = 2,8; 1,2 Hz, 1H); 7,42 – 7,40 (m, 2H); 7,38 – 7,35 (m, 2H); 7,33 – 7,3 (tt, *J* = 6,3; 1,5 Hz, 1H); 6,57 (s, 1H); 2,66 – 2,63 (m, 2H), 2,51 – 2,40 (m, 2H), 2,14 (s, 3H).

(6-oxociclohex-1-en-1-il)(fenil)metil acetato - composto 9b.

¹H NMR (600 MHz, CDCl₃) δ 7,39 – 7,37 (m, 1H); 7,36 – 7,32 (m, 3H); 6,97 – 6,96 (td, *J* = 4,2; 1,3 Hz, 1H); 7,76 (q, *J* = 1,4 Hz, 1H); 6,57 (s, 1H); 2,51 – 2,64 (m, 4H); 2,12 (s, 3H); 2,09 – 1,90 (m, 2H).

(4-nitrofenil)(5-oxociclopent-1-en-1-il)metil acetato - composto 9c.

¹H NMR (600 MHz, CDCl₃) δ 8,23 – 8,20 (m, 2H); 7,65 – 7,59 (m, 3H); 6,61 (s, 1H); 2,73 – 2,64 (m, 2H); 2,53 – 2,41 (m, 2H); 2,17 (s, 1H).

(4-nitrofenil)(2-oxociclohexil)metil acetato - composto 9d.

¹H NMR (600 MHz, CDCl₃) δ 8,24 – 8,23 (m, 2H); 7,58 – 7,55 (m, 2H); 7,08 – 7,06, (td, *J* = 4,2; 1,2 Hz, 1H); 6,69 (s, 1H); 2,53 – 2,40 (m, 4H); 2,15 (s, 3H); 2,09 – 1,96 (m, 2H).

(3-nitrofenil)(5-oxociclopent-1-en-1-il)metil acetato - composto 9e.

¹H NMR (600 MHz, CDCl₃) δ 8,21 – 8,18 (tt, *J* = 2,3; 0,5 Hz, 1H); 8,19 – 8,18 (dq, *J* = 8,3; 1,1 Hz, 1H); 7,81 – 7,80 (m, *J* = 7,7; 0,5 Hz, 1H); 7,64 – 7,63 (td, *J* = 2,7; 1,3 Hz, 1H); 7,56 – 7,53 (t, *J* = 7,7 Hz; 1H); 6,62 – 6,61 (q, *J* = 1,7 Hz, 1H), 2,72 – 2,69 (m, 2H); 2,53 – 2,41 (m, *J* = 19,3; 3,8 Hz, 2H); 2,18 (s, 3H).

(3-nitrofenil)(6-oxociclohex-1-en-1-il)metil acetato - composto 9f.

¹H NMR (600 MHz, CDCl₃) δ 8,21 (t, *J* = 2,3 Hz, 1H); 8,17 – 8,13, (dq, *J* = 8,2, 1,1 Hz, 1H); 7,79 – 7,77 (dp, *J* = 7,7; 0,6 Hz, 1H); 7,53 – 7,50 (t, *J* = 7,9 Hz, 1H); 7,12 – 7,10 (td, *J* = 4,2 Hz, 1H); 6,77 – 6,76 (q, *J* = 1,5 Hz, 1H); 2,51 – 2,39 (m, 4H); 2,16 (s, 3H), 2,09 – 1,97 (s, 2H).

1,3-benzodioxol-5-il(5-oxociclopent-1-en-1-il)metil acetato - composto 9g.

¹H NMR (600 MHz, CDCl₃) δ 7,53 – 7,52 (td, *J* = 2,8; 1,3 Hz, 1H); 6,90 – 6,88 (ddt, *J* = 7,9; 1,74; 0,5 Hz, 1H); 6,87 (dd, *J* = 1,7; 0,4 Hz, 1H); 7,78 – 7,77 (t, *J* = 7,9 Hz, 1H); 6,47 – 6,46 (q, *J* = 1,7 Hz, 1H); 2,67 – 2,63 (m, 2H); 2,50 – 2,39 (m, 2H), 2,12 (s, 2H); 2,09 – 1,97 (s, 3H).

¹³C NMR (151 MHz, CDCl₃) δ 206,5; 169,6; 158,7; 147,8; 147,6; 145,4; 131,7; 121,2; 108,2; 107,7; 101,2; 70,5; 35,0; 34,9; 26,6; 21,1.

1,3-benzodioxol-5-il(6-oxociclohex-1-en-1-il)metil acetato - composto 9h.

¹H NMR (600 MHz, CDCl₃) δ 7,00 – 6,97 (td, *J* = 4,2; 1,1 Hz, 1H); 6,88 – 6,86 (m, *J* = 8,0; 1,8; 0,6 Hz, 1H); 6,84 (dt, *J* = 1,7; 0,5 Hz, 1H); 6,78 – 6,76, (d, *J* = 7,9 Hz, 1H); 6,65 (q, *J* = 1,4 Hz, 1H); 5,95 (s, 2H); 2,50 – 2,39 (m, 4H); 2,10 (s, 3H); 2,08 – 1,96 (m, 2H).

(3,4-dimetoxifenil)(5-oxociclopent-1-en-1-il)metil acetato - composto 9i

¹³C NMR (151 MHz, CDCl₃) δ 206,6; 169,7; 166,4; 158,8; 149,1; 148,9; 145,5; 139,0; 130,5; 126,5; 119,6; 112,4; 111,2; 111,0, 110,6, 77,3; 77,1, 76,8; 72,7; 70,5; 56,0; 55,9; 55,9; 55,9; 35,1; 34,8; 28,4, 26,63; 22,18; 21,26; 21,13.

(3,4-dimetoxifenil)(6-oxociclohex-1-en-1-il)metil acetato - composto 9j.

¹H NMR (600 MHz, CDCl₃) δ 6,98 - 6,97 (td, *J* = 4,2; 1,2 Hz, 1H); 6,94 – 6,90 (m, 2H), 6,84 – 6,83 (d, *J* = 8,2 Hz, 1H); 6,71 – 6,69 (q, *J* = 1,5 Hz, 1H); 3,90 (s, 3H); 3,87 (s, 3H); 2,50 – 2,3 (m, 4H); 2,11 (s, 3H); 2,07 – 1,96 (m, 2H).

(4-clorofenil)(5-oxociclopent-1-en-1-il)metil acetato - composto 9k.

¹H NMR (600 MHz, CDCl₃) δ 7,54-7,52 (td, *J* = 2,8; 1,2 Hz, 1H); 7,36 – 7,31 (m, 4H), 6,52 – 6,51 (q, *J* = 1,6 Hz, 1H), 2,67 – 2,64 (m, 2H); 2,51 – 2,39 (m, *J* = 2,9; 19,2 Hz, 2H); 2,13 (s, 3H).

(4-clorofenil)(6-oxociclohex-1-en-1-il)metil acetato - composto 9l.

¹H NMR (600 MHz, CDCl₃) δ 7,33 -7,29 (m, *J* = 5,1, 1,0, 4H); 7,00 – 6,98 (td, *J* = 1,4, 1H); 2,49 – 2,39, (m, 4H); 2,12 (s, 3H); 2,08 – 1,95 (m, 2H).

(4-bromofenil)(5-oxociclopent-1-en-1-il)metil acetato - composto 9m.

¹H NMR (600 MHz, CDCl₃) δ 7,54 – 7,52 (td, *J* = 2,8; 1,2 Hz, 1H); 7,36 – 7,31 (m, 4H); 6,52 – 6,51 (q, *J* = 1,6 Hz, 1H); 2,67 – 2,64 (m, 2H); 2,51 – 2,39 (m, 2H); 2,13 (s, 3H).

(4-bromofenil)(6-oxociclohex-1-en-1-il)metil acetato - composto 9n.

¹H NMR (600 MHz, CDCl₃) δ 7,53 – 7,52 (td, *J* = 2,7; 1,2 Hz, 1H); 7,50 – 7,48 (dt, *J* = 9,6; 2,5 Hz, 2H); 7,30 – 7,28 (dt, *J* = 8,8; 2,6 Hz, 2H); 6,51 – 6,50 (q, *J* = 1,6; 1H); 2,70 – 2,61 (m, 2H); 2,51 – 2,40 (m, 2H); 2,13 (s, 3H).

7.4 RESOLUÇÃO CINÉTICA COM CAL B

Em um erlenmeyer de 10 mL foram pesados 20 mg do aduto (**7e**), 20 mg da CAL B, 46,5 mg de acetato de vinila, e adicionados 2 mL de hexano em à 25° C por 48 h, os adutos **7a** e **7b** foram utilizados para o teste em hexano à 40° C por 48 h. O aduto 7e foi colocado em reação utilizando o solvente isopropanol à 25° por 48 h. Todos os adutos foram testados com acetonitrila à 40° C durante 40 h.

7.5 HIDRÓLISE DO COMPOSTO 9A:

Em um tubo de schlenk foram adicionados 20 mg (0,086 mmol) do aduto acetilado 9a, 20 mg de CAL B e 2 mL de tampão fosfato de sódio pH 7, foi agitada por 7 dias, a reação foi filtrada, solução de NaHCO₃ foi adicionada ao filtrado e a mistura extraída com acetato de etila. A fase orgânica foi seca com sulfato de sódio anidro e levado ao rotaevaporador para a retirada do solvente.

7.6 ACETILAÇÃO COM A ENZIMA PS DO COMPOSTO 7G:

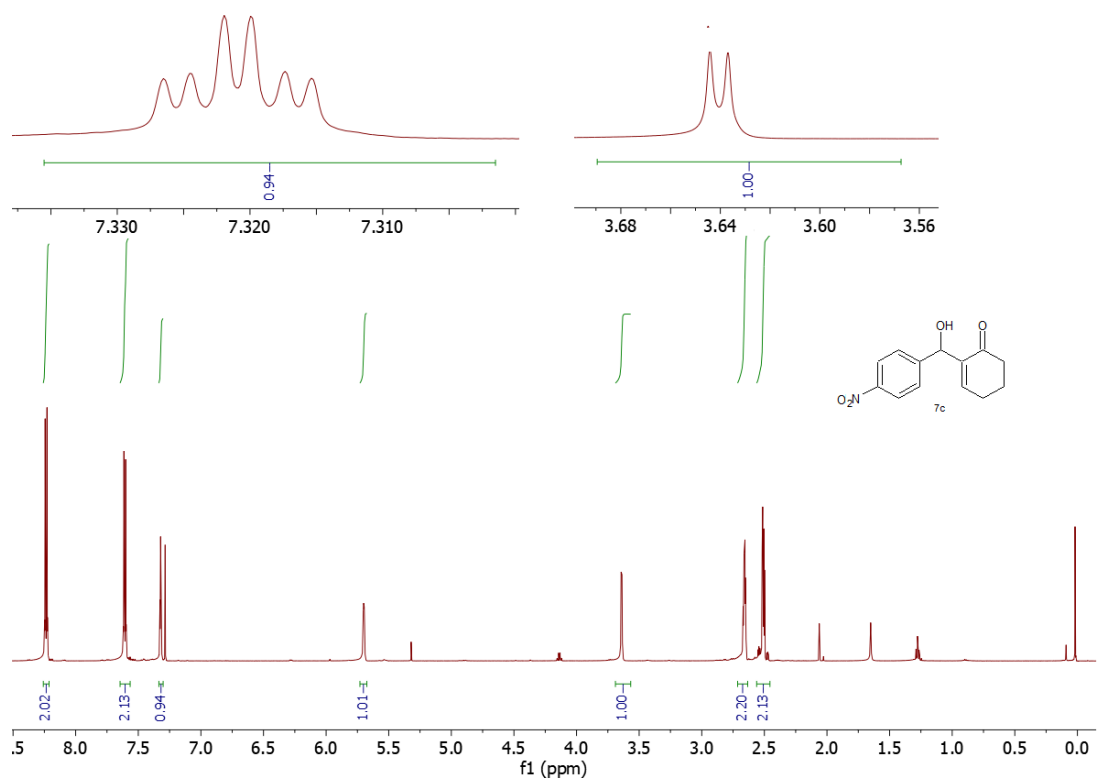
Em uma solução do aduto **7g** (20mg, 0,086 mmol) em acetonitrila (2 mL), foi adicionada acetato de vinila (0,037 g, 0,44 mmol) e 0,101 g de lipase OS. Após isso foi agitada a temperatura ambiente por 7 dias e Celite foi adicionada. A mistura reacional foi filtrada e lavada com solução saturada da NaHCO₃, seca com NaSO₄ e concentrada à vácuo.

8. Referências

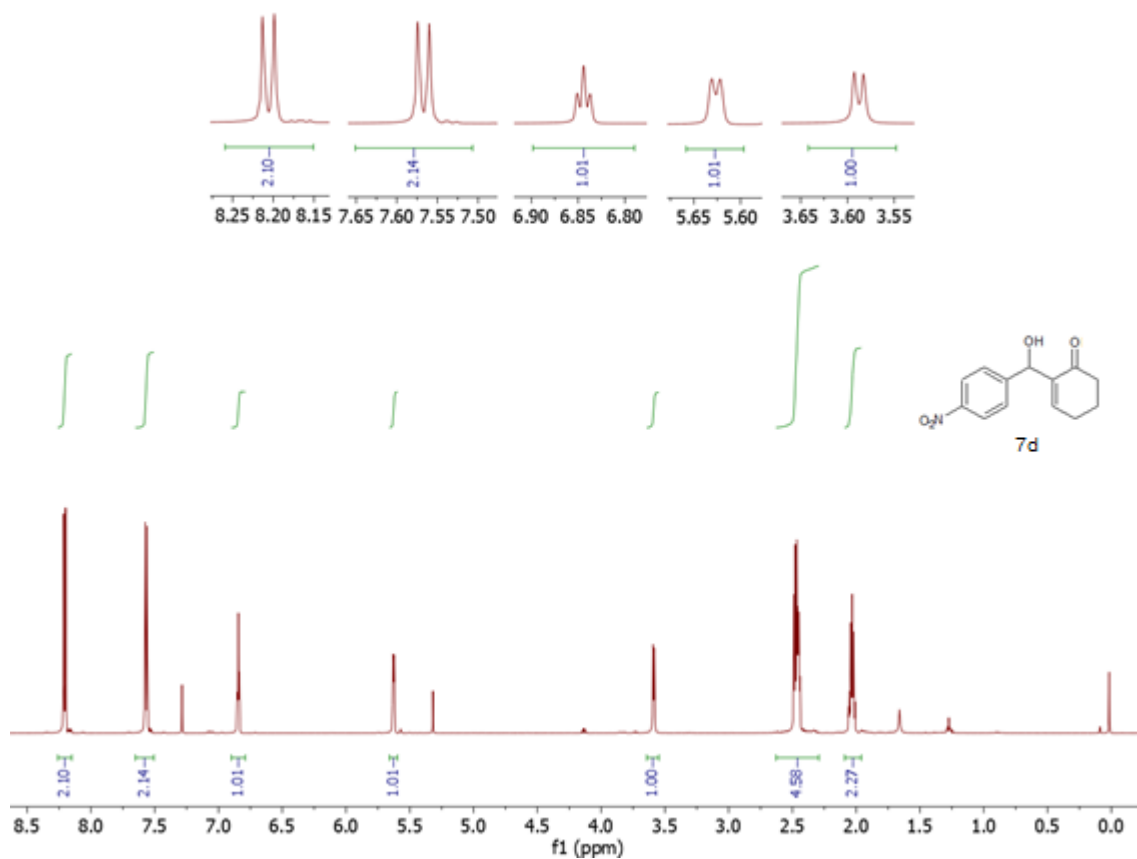
1. Aggarwal, V. K; Fulford, S.Y; Lloyd-Jones, G.C. Reevaluation of the mechanism of the Baylis-Hillman Reaction: Implications for asymmetric catalysis. **Angewandte Chemie**, v. 44, p. 1706-1708, 2005.
2. Basavaiah, D; Rao, K. V; Reddy, R. J; The Baylis-Hillman reaction: a novel source of attraction, opportunities, and challenges in synthetic chemistry. **Chemical Society Reviews**, v. 36, n. 10, p. 1581-1588, 2007
3. Basavaiah, d. Et al. Chiral acrylates as substrates in baylis-hillman reaction. **Tetrahedron letters**, v. 31, n. 11, p. 1621-1624, 1990.
4. Baylis, A. B.; Hillman, M. E. D.; Patente Alemã 2155113, 1972 (Chem. Abst. 1972, 77, 34174q).
5. Bhuniya, D; Narayanan S; Lamba, T. S; Reddy K. V. S. R. K. Porcine Liver Esterase Catalyzed Kinetic Resolution of Baylis-Hillman (B-H) Adducts. **Synthetic communications**, v. 33, n. 21, p. 3717-2726, 2003.
6. Juma, W.P.; Chhiba, V; Brady, D; Bode, M. L. Enzymatic kinetic resolution of Morita-Baylis-Hillman acetates. **Tetrahedron: Asymmetry**, p. 1169-1174, 2017.
7. Burgess, K; Jennings, L. D. Biocatalytic resolutions of α -methylene- β -hydroxy esters and ketones. **The Journal of organic chemistry**, v.55, n. 4, p. 1138-1139, 1990.
8. Camilli, A; Bassler, B. L. Bacterial small-molecule signaling pathways. **Science**, v. 311, n. 5764, p.1113-1116, 2006.
9. Cantillo, D; Kappe, C. O. A Unified Mechanistic View on the Morita-Baylis-Hillman Reaction: Computational and Experimental Investigations. **The Journal of organic chemistry**, v. 75, n. 24, p. 8615-8626, 2010.
10. Coelho, F; Almeida, W. P. The baylis-hillman reaction: a strategy for the preparation of multifunctionalised intermediates for organic synthesis. **Química nova**, Campinas (SP), v. 23, p 98-101, 2000.
11. Drewes, S. E; Emslie, N. D; Field, J. S; Khan, A. A; Ramesar, N. S. A novel tetrahydrofuran derivative via a tertiary ketol-type rearrangement. **Tetrahedron letters**, v. 34, n. 7, p. 1205-1208, 1993.
12. Drewes, S. E; Manickum, T; Roos, G. H. P. Stereoselective Synthesis of α -Methylene- β -Hydroxy- γ -Alkoxy Esters and Ketones. **Synthetic Communications**, v. 18, n. 10, p. 1065-1070, 1988.
13. Morita, K; Suzuki, Z; Hirose, H. **Bull. Chem. Soc. Jpn.** 1968, 41, 2815.
14. Künding, P. E; Xu, L. H; Schnell, B. Planar Chiral Arylaldehydeimine Tricarbonylchromium Complexes in the Asymmetric Baylis-Hillman Coupling Reaction. **Synlett**, v. 1994, n06, p. 413-414, 1994.
15. Gilbert, A; Heritage, T. W; Isaacs, N. S. Assymmetric induction in the Baylis-Hillman reaction. **Tetrahedron Asymmetry**, v. 2, n. 10, p. 969-972, 1991.

16. Gomes, J. C; Rodrigues Jr, M. T; Moyano, A; Coelho F. Efficient catalysis of aqueous Morita-Baylis-Hillman reactions of cyclic enones by a bicyclic imidazolyl alcohol. **European Journal of Organic Chemistry**, v. 35, p. 6861-6866, 2012.
17. Hayashi, N; Yanagihara, K; Tsuboi, S. Lipase-catalyzed kinetic resolution of Baylis-Hillman products. **Tetrahedron: Asymmetry**, v. 9, n. 21, p. 3825-3830, 1998.
18. Henke, J. M; Bassler, B. L. Bacterial social engagements. **Trends in cell biology**, v. 14, n. 11, p. 648-656, 2004
19. Hoffmann, H. M. R; Rabe, J. Preparation of 2-(1-Hydroxyalkyl)acrylic Esters; Simple Three-Step Synthesis of Mikanecic Acid. **Angew. Chem. Int. Ed. Engl.**, v. 22, n. 10, p. 795-6, 1983
20. Langer, P. New strategies for the development of an asymmetric version of the Baylis-Hillman reaction. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 39, n. 17, p. 3049-3052, 2000.
21. Nascimento, M.G; Zanotto, S. P; Melegari, S. P; Fernandes, L; Sá M. M. Resolution of α -methylene- β -hydroxy esters catalyzed by free and immobilized *Pseudomonas* sp. Lipase. **Tetrahedron: Asymmetry**, v. 14, p. 3111-3115, 2003.
22. Price, K. E; Broadwater, S. J; Walker, B. J; McQuade, D. T. A new interpretation of the Baylis-Hillman mechanism. **The Journal of organic chemistry**, v. 70, n. 10, p. 3980-3987, 2005.
23. Sibi, M. P; Manyem, S. Enantioselective conjugate additions. **Tetrahedron**, v. 56, n. 41, p. 8033-8061, 2000.
24. Strub, D. J; Garbós; Lochynski, S. Synthesis lipase catalyzed kinetic resolution, and determination of the absolute configuration of enantiomers of the Morita-Baylis-Hillman adduct 3-hydroxy-2-methylenebutanenitrile. *The Free Internet Journal for Organic Chemistry*, p. 313-323, 2012.
25. Xavier, F. J., Neto, J. S., Nérís, P. L., Oliveira, M. R., Vale, J. A., & Vasconcellos, M. L. Kinetic resolution of leishmanicidal meta and para (\pm)-2-[Hydroxy (nitrophenyl) methyl] acrylonitrile catalyzed by CALB: In vitro evaluations of separated meta (R),(S) and (R/S) adducts. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 108, p. 7-12, 2014.
26. Xia, B., Xu, J., Xiang, Z., Cen, Y., Hu, Y., Lin, X., & Wu, Q. Stereoselectivity-Tailored, Metal-Free Hydrolytic Dynamic Kinetic Resolution of Morita-Baylis-Hillman Acetates Using an Engineered Lipase-Organic Base Cocatalyst. **ACS Catalysis**, v. 7, n. 7, p. 4542-4549, 2017.
27. Yang, K. S., & Chen, K. Diastereoselective Baylis-Hillman Reactions: The Design and Synthesis of a Novel Camphor-Based Chiral Auxiliary. **Organic letters**, v. 2, n. 6, p. 729-731, 2000.

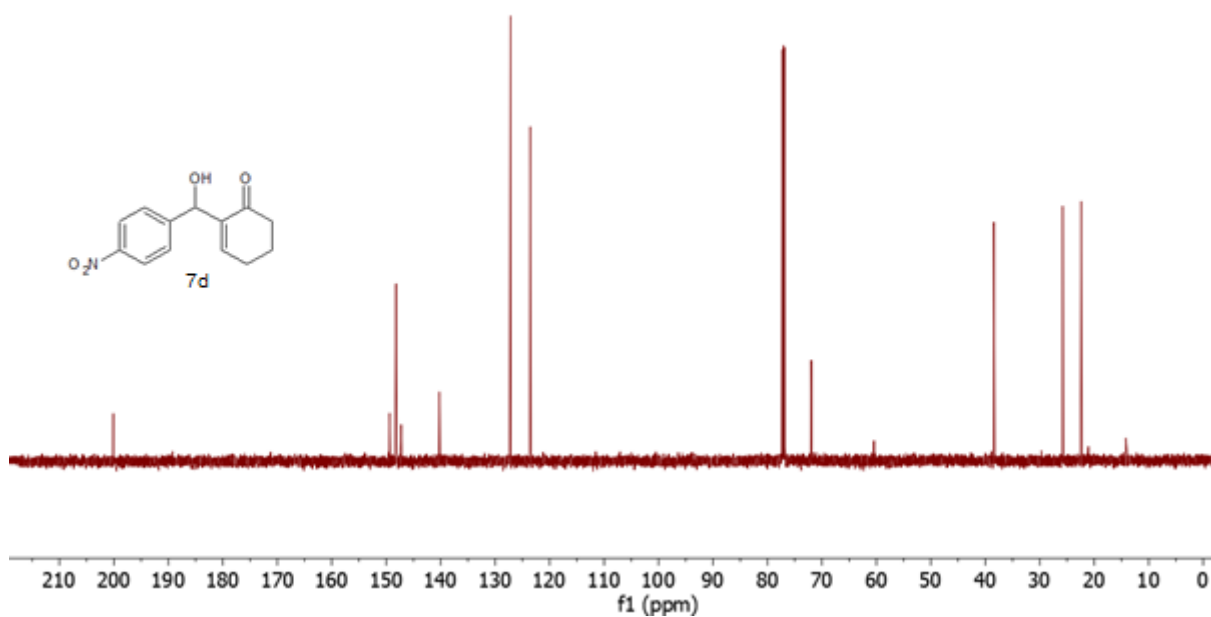
9. ANEXO



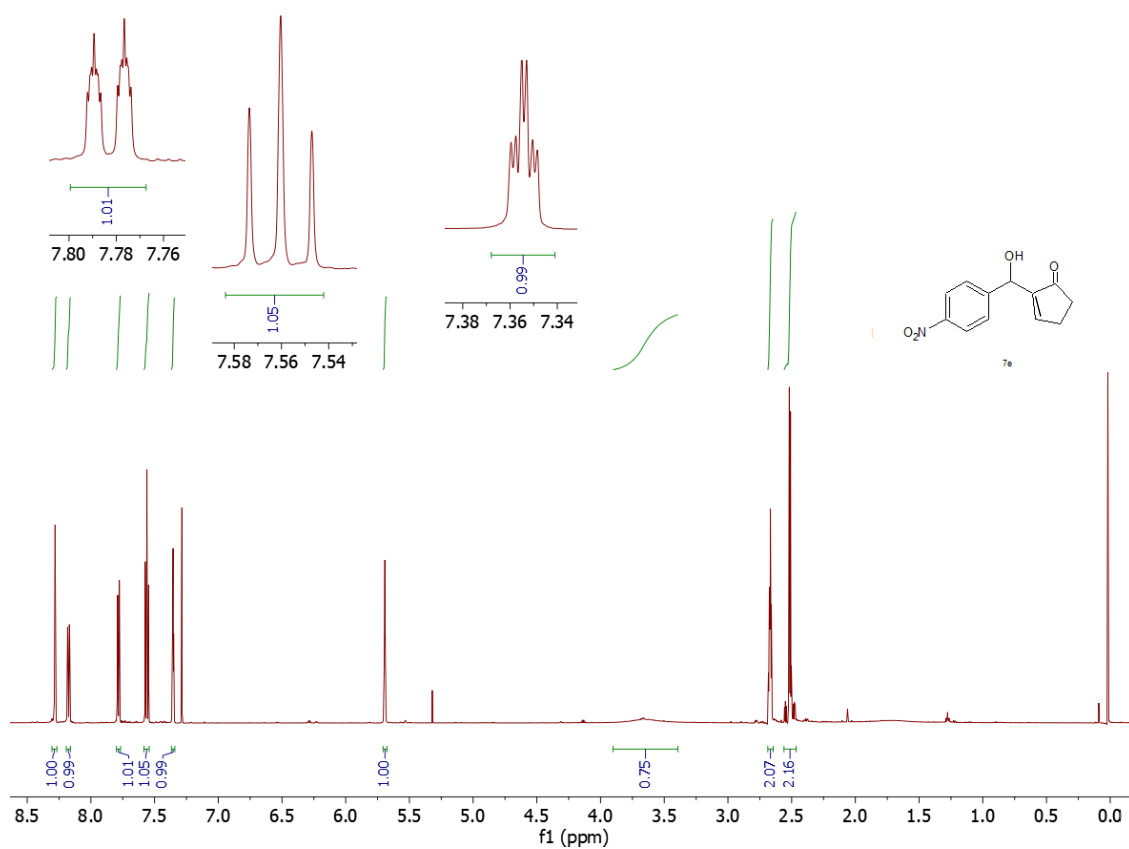
RMN ¹H (600 MHz, CDCl₃) do 7c.



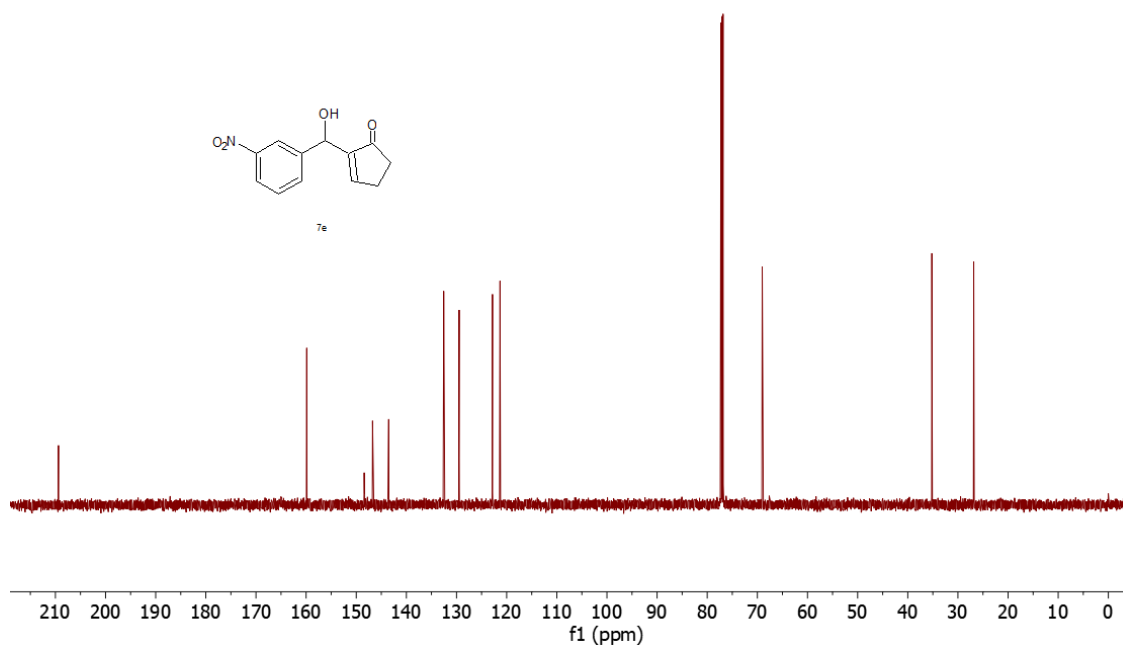
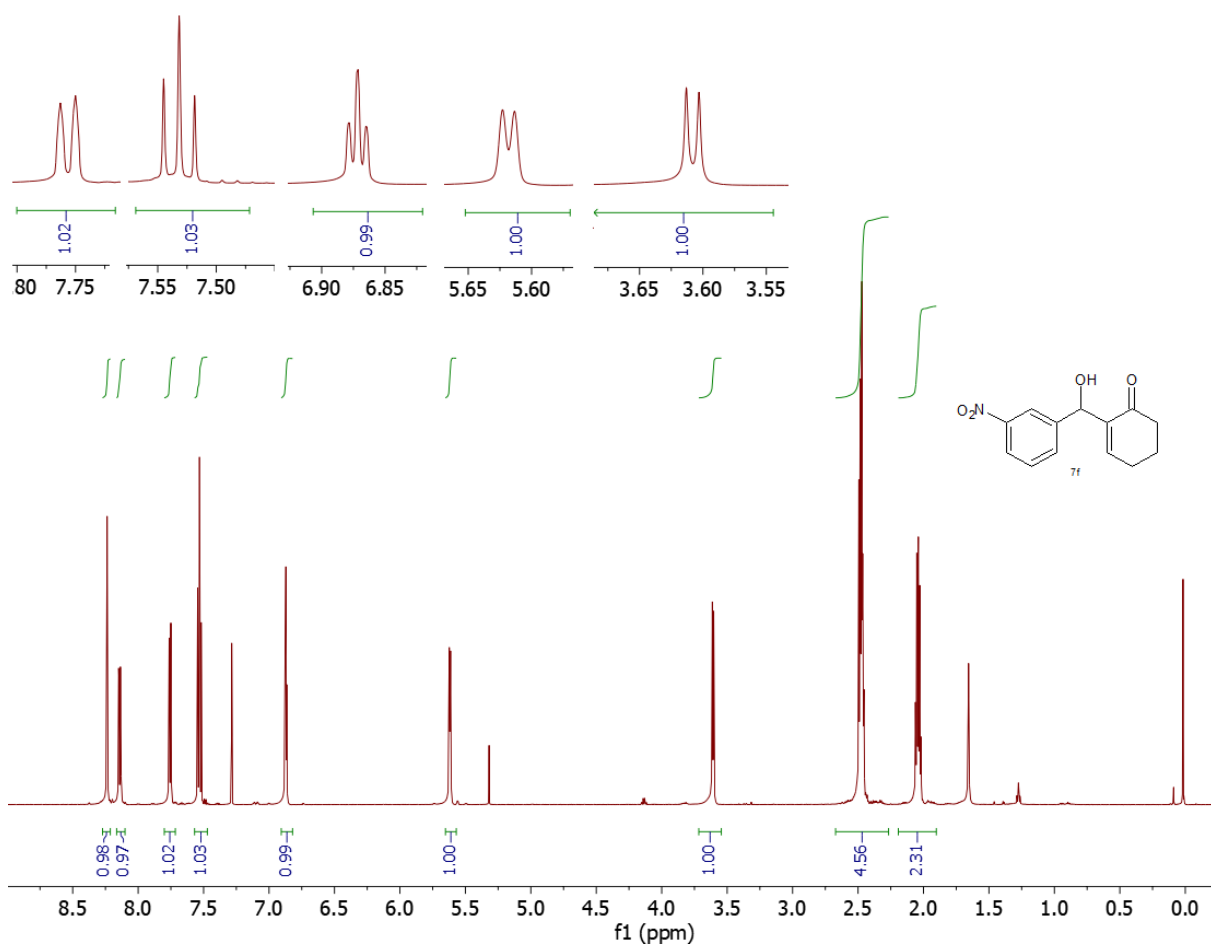
RMN ¹H (600 MHz, CDCl₃) do 7d

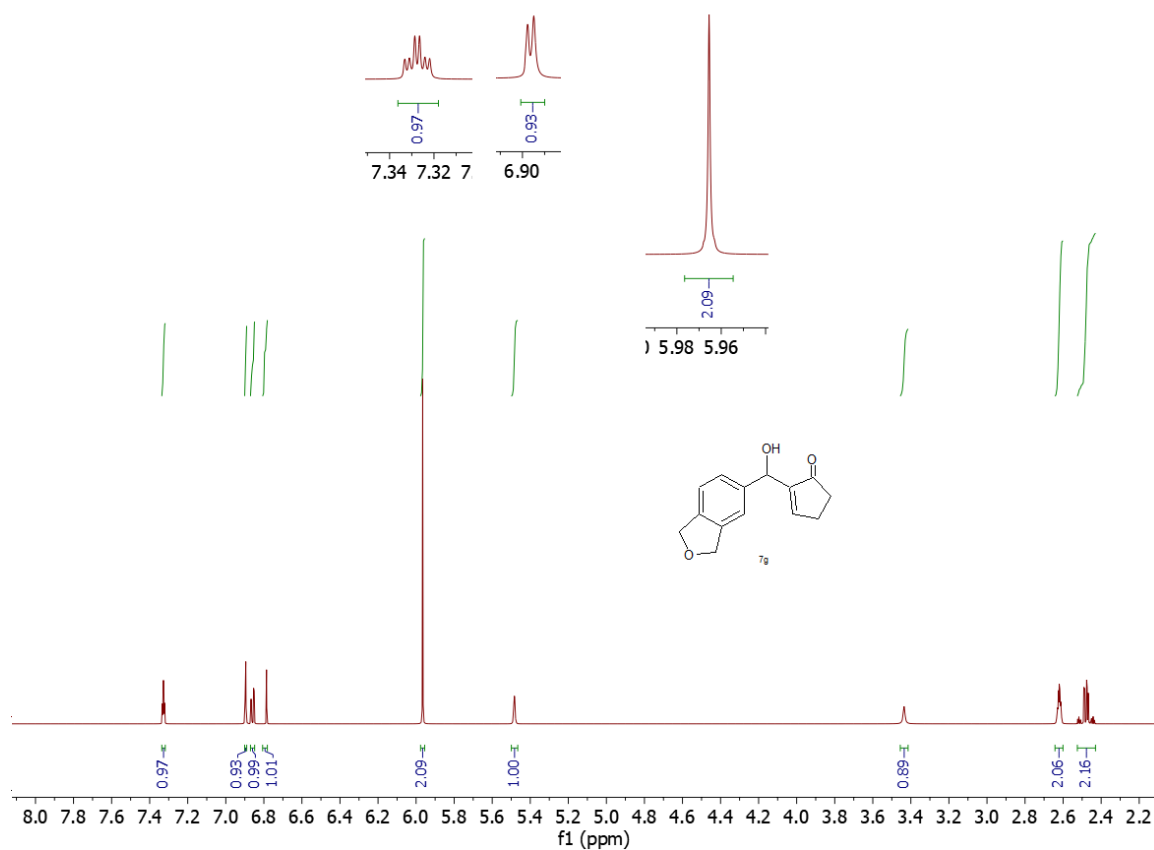
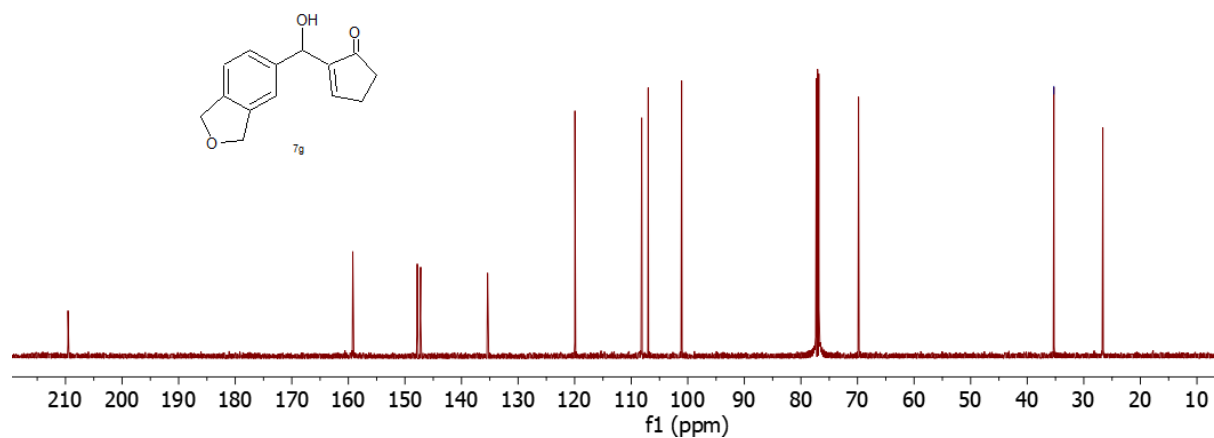


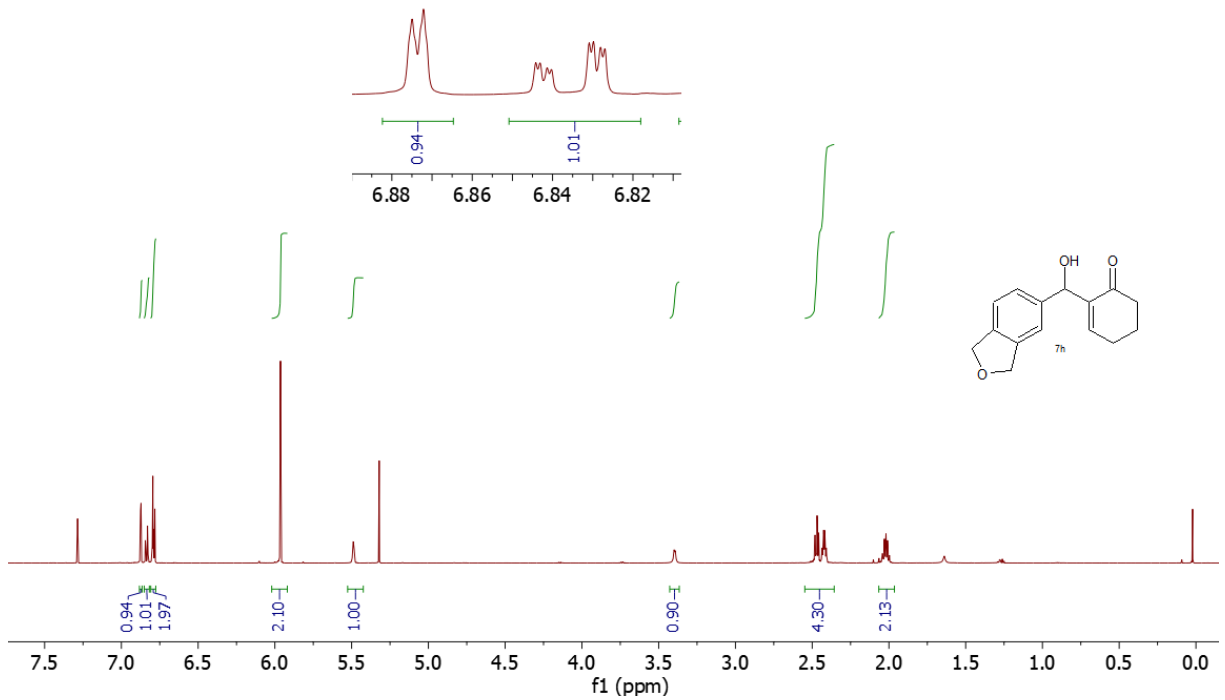
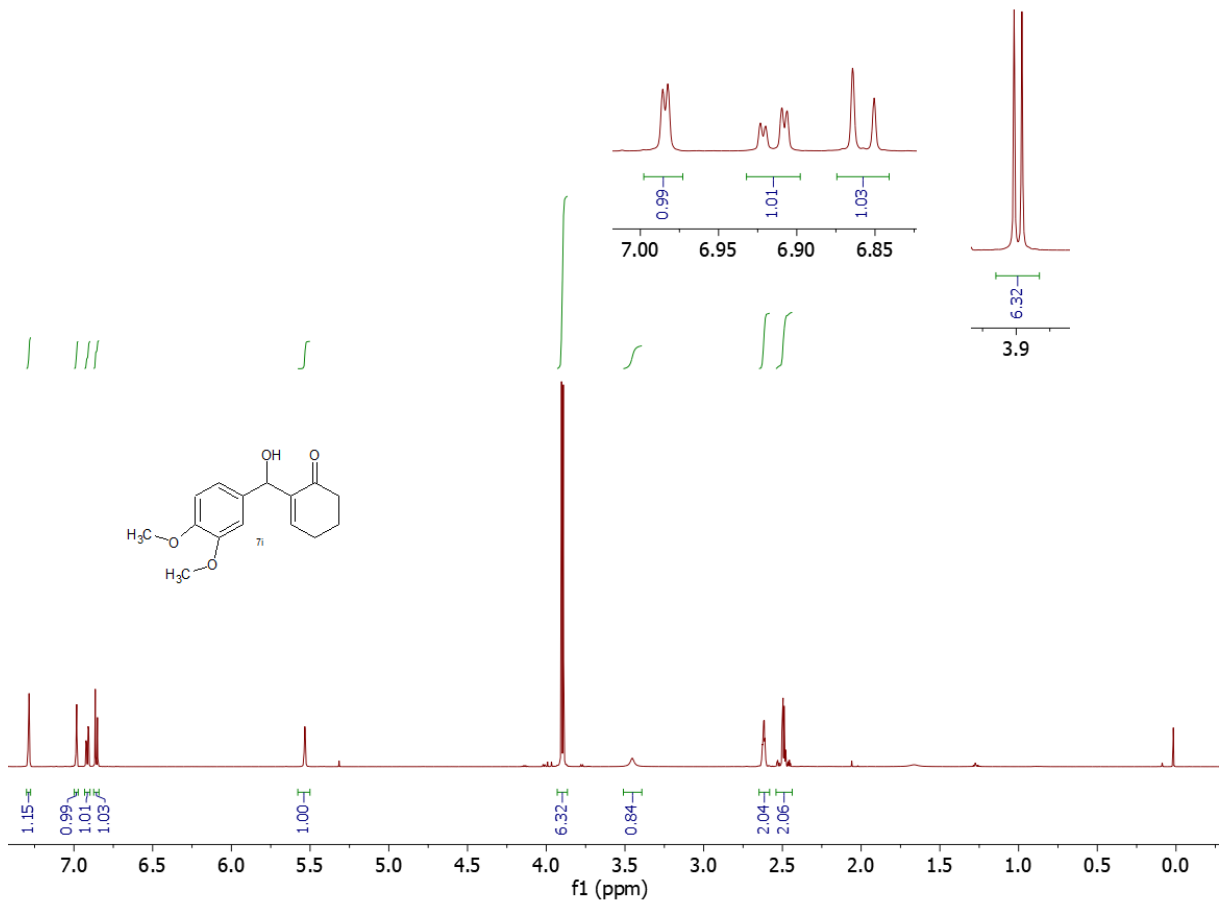
RMN ¹³C (151 MHz, CDCl₃) de 7d.

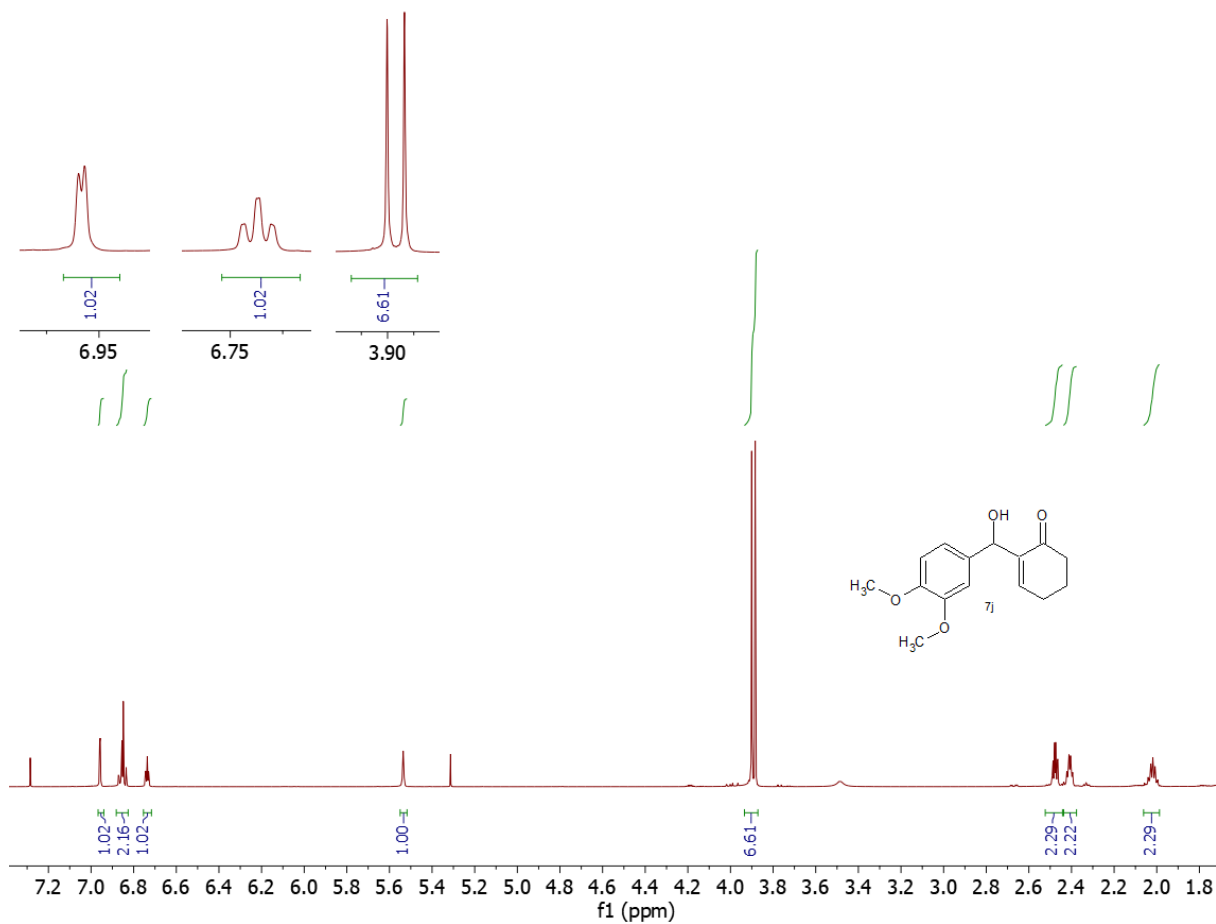
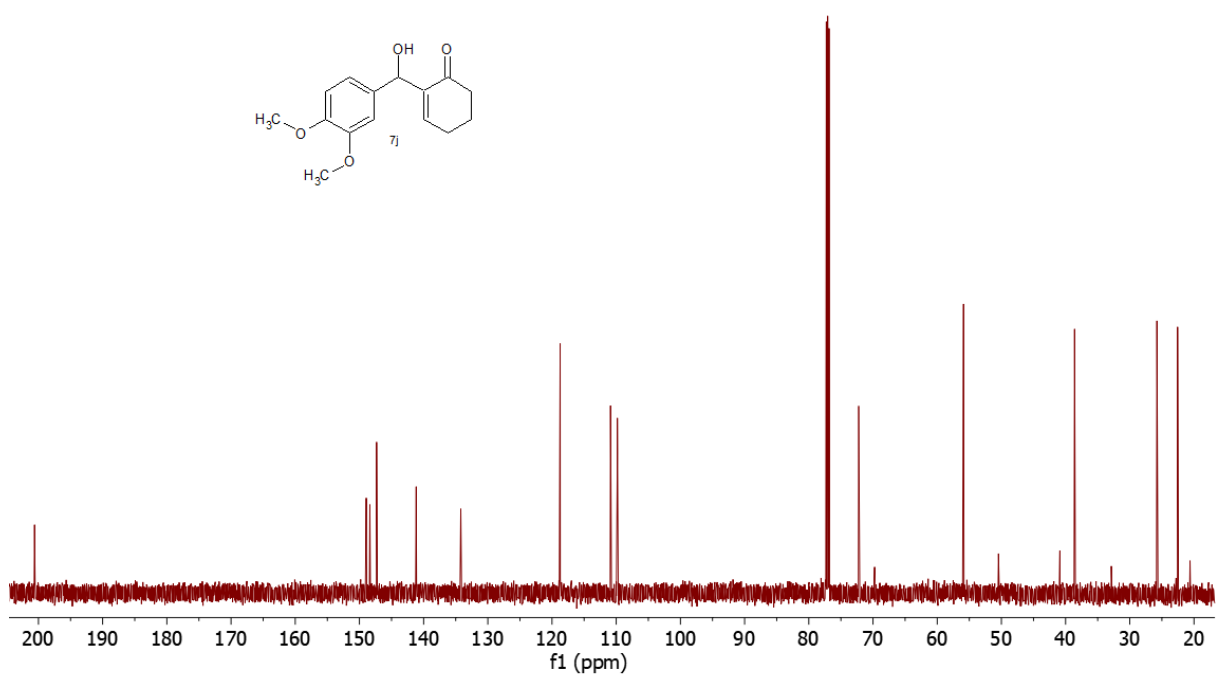


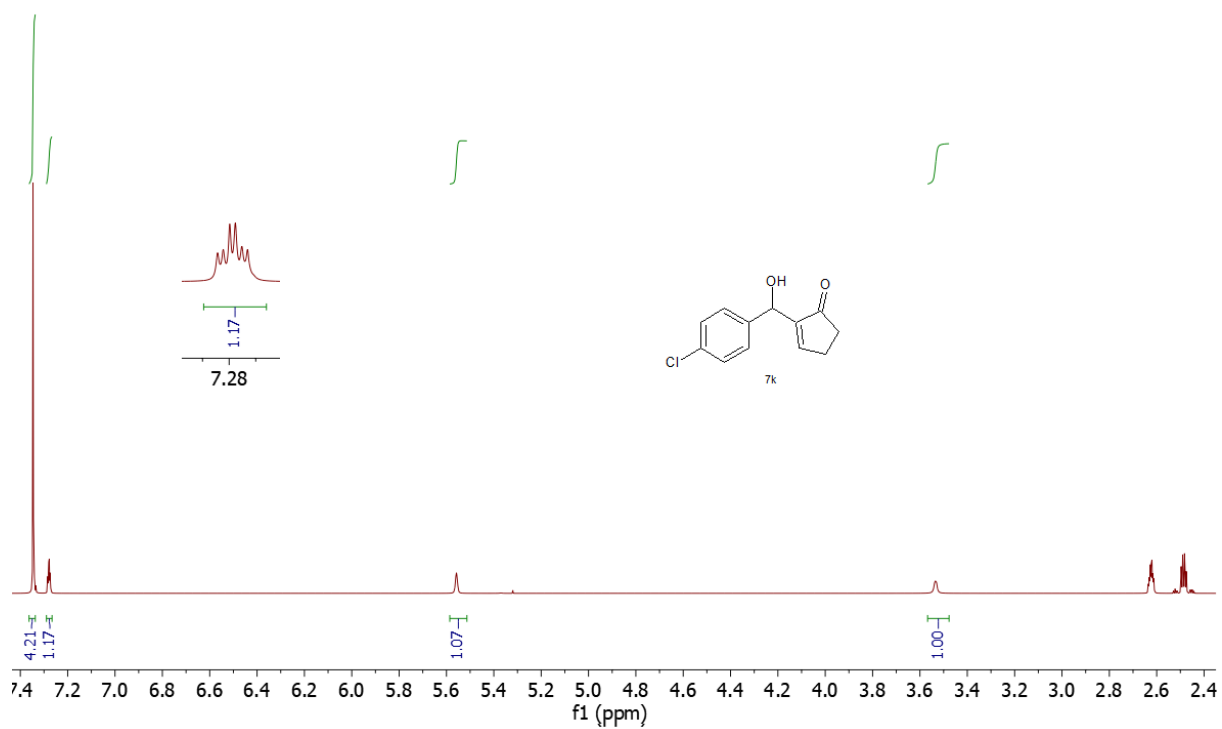
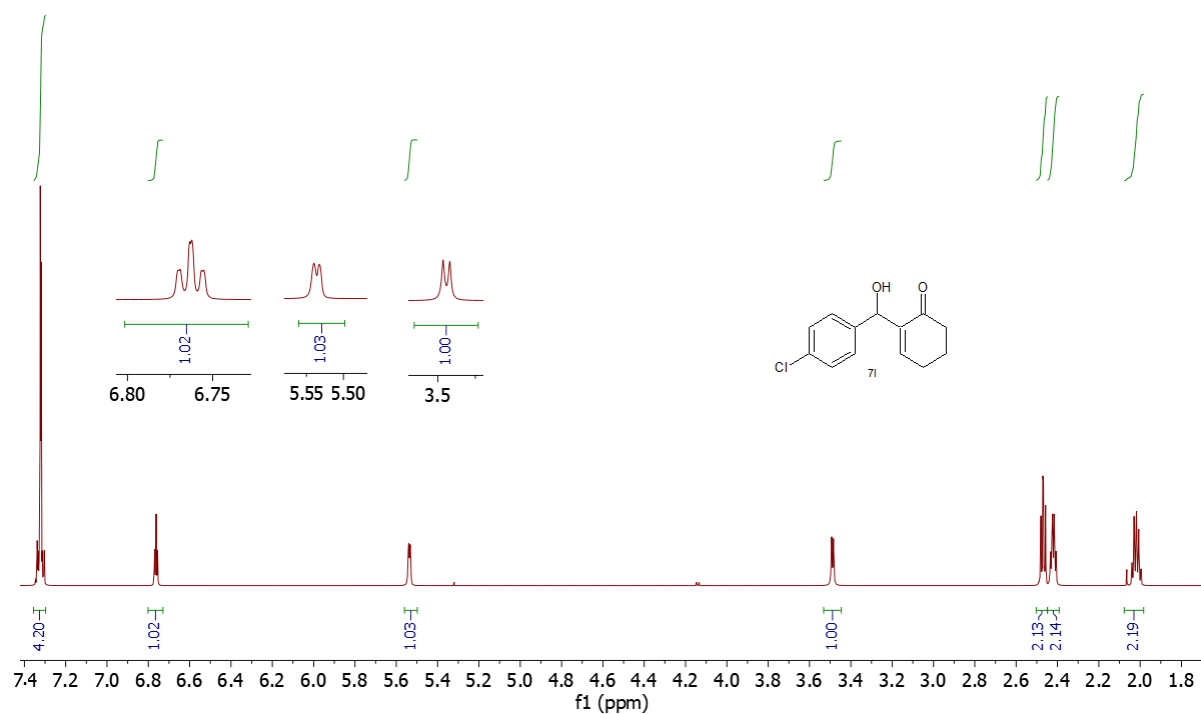
RMN H¹ (600 MHz, CDCl₃) de 7e.

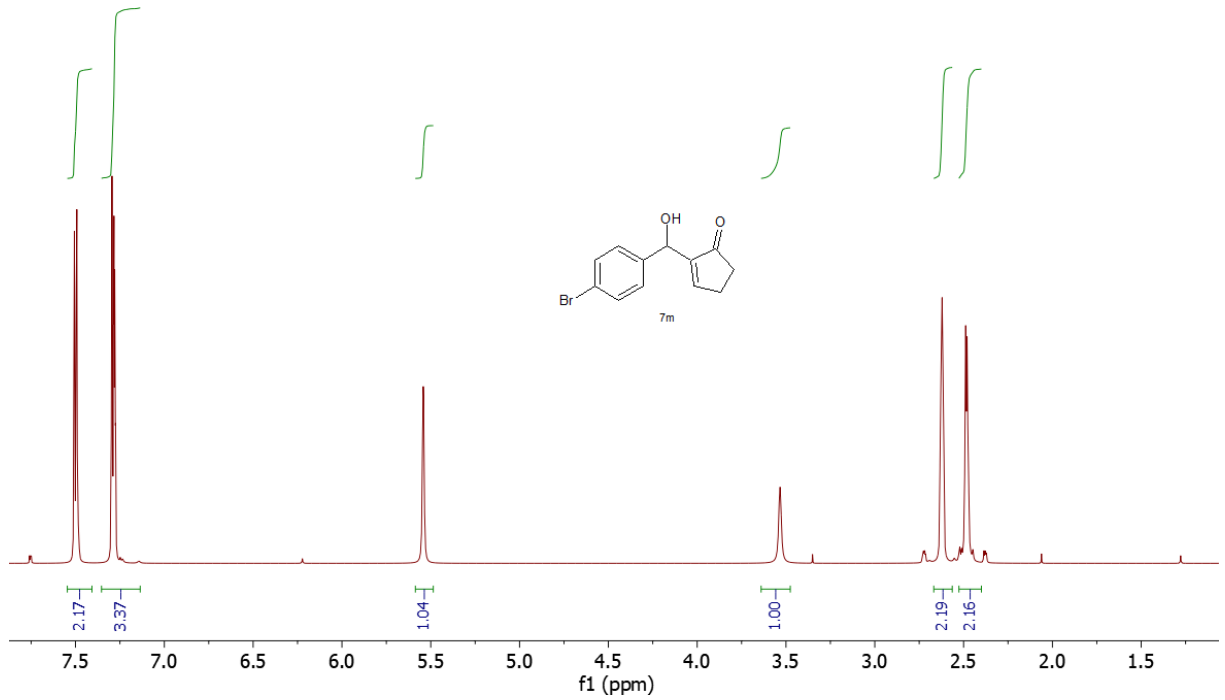
RMN C^{13} (151 MHz, $CDCl_3$) do 7e.RMN H^1 (600 MHz, $CDCl_3$) de 7f.

RMN H^1 (600 MHz, CDCl_3) de 7g.RMN C^{13} (600 MHz, CDCl_3) de 7g.

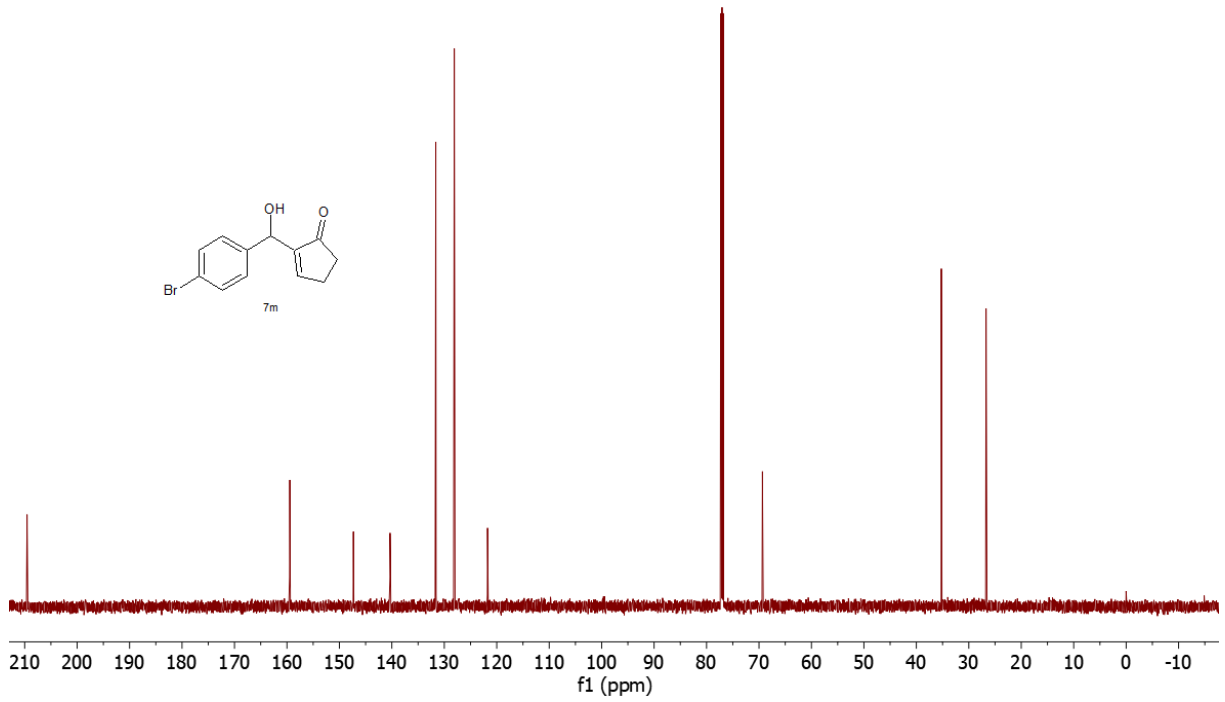
RMN H¹ (600 MHz, CDCl₃) de 7h.RMN H¹ (600 MHz, CDCl₃) de 7i.

RMN H¹ (600 MHz, CDCl₃) de 7j.RMN C¹³ (151 MHz, CDCl₃) de 7j.

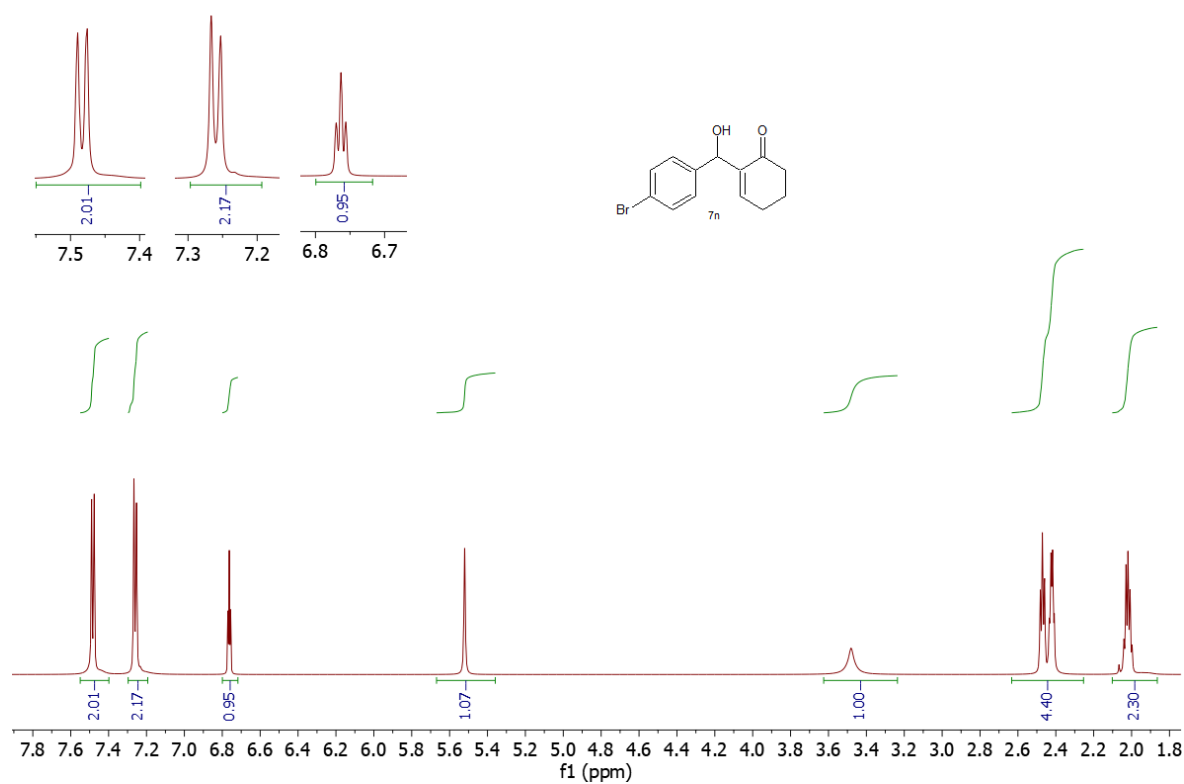
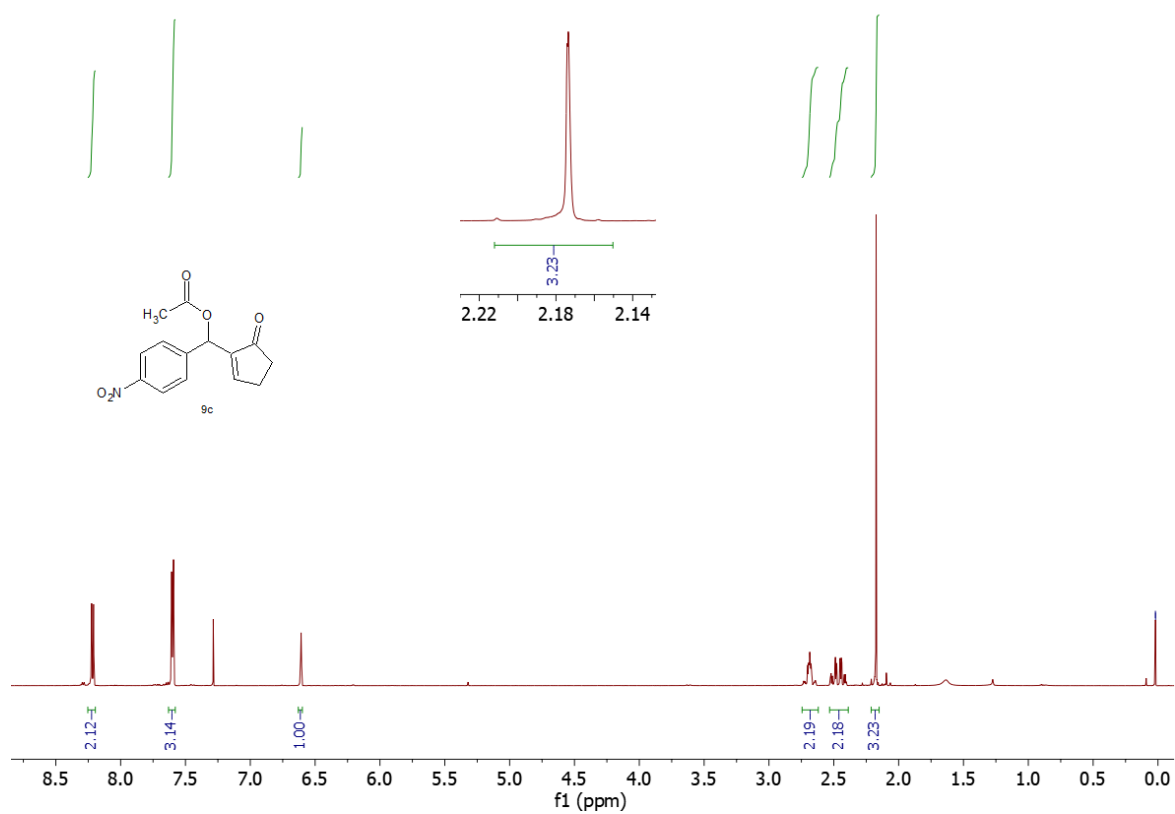
RMN H^1 (600 MHz, CDCl_3) de 7k.RMN H^1 (600 MHz, CDCl_3) de 7l.

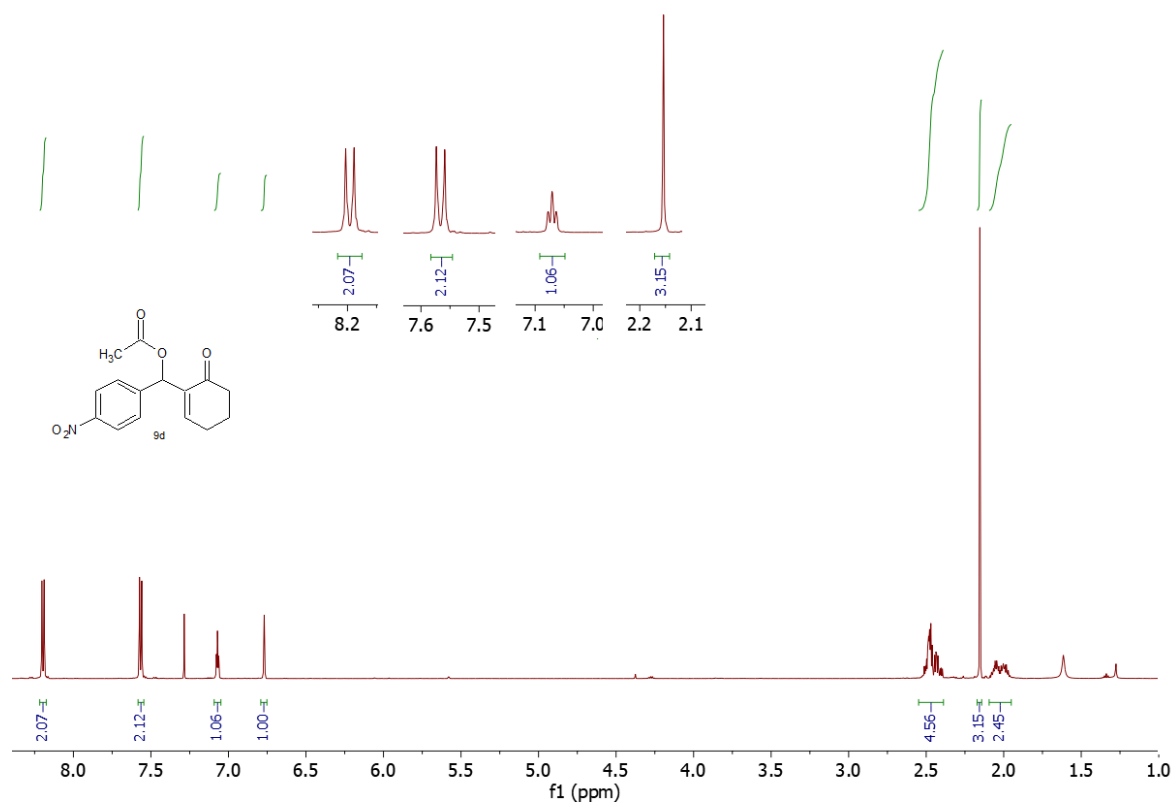
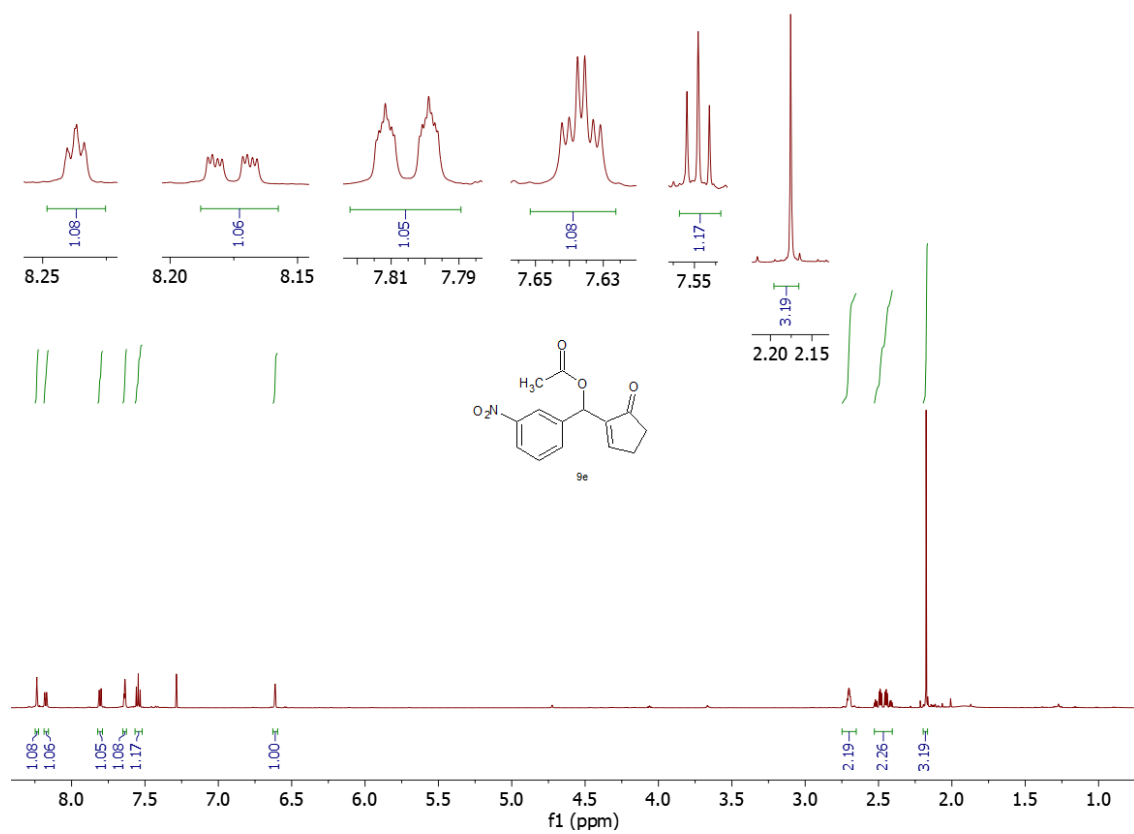


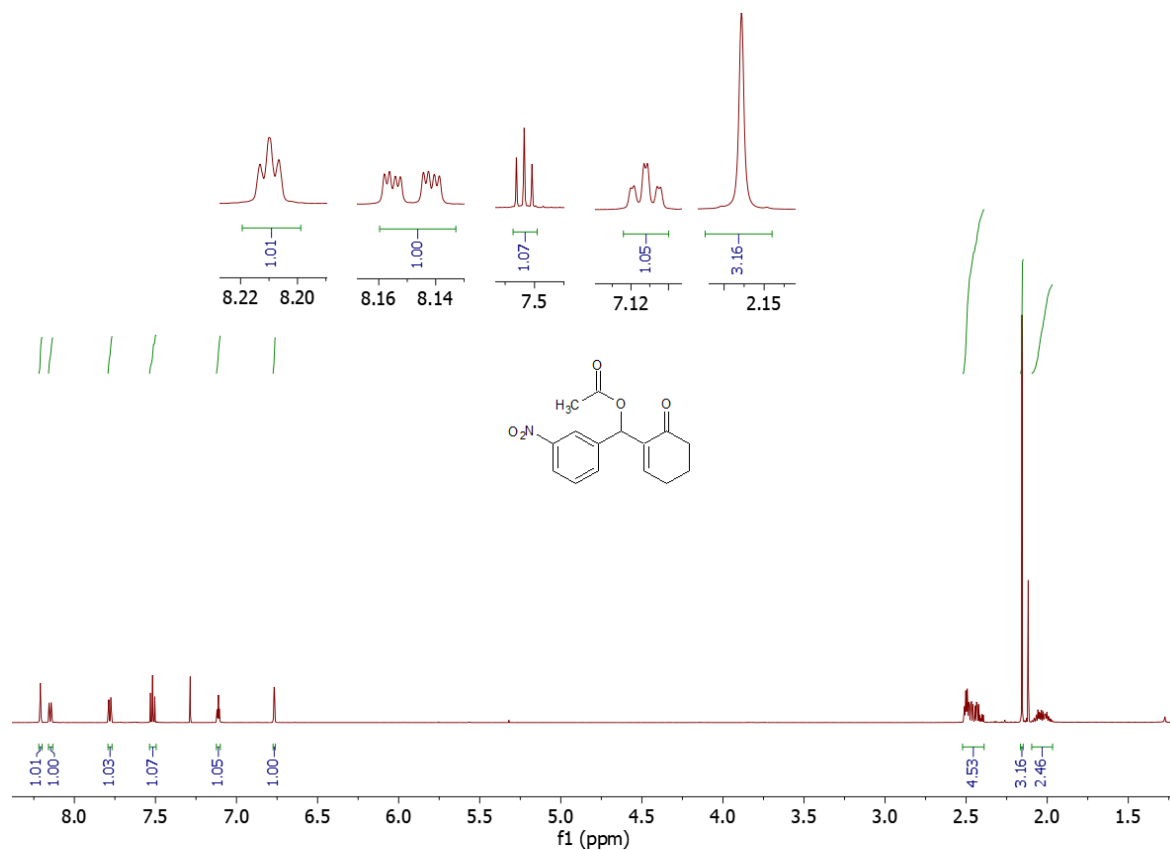
RMN H^1 (600 MHz, CDCl_3) de 7m.



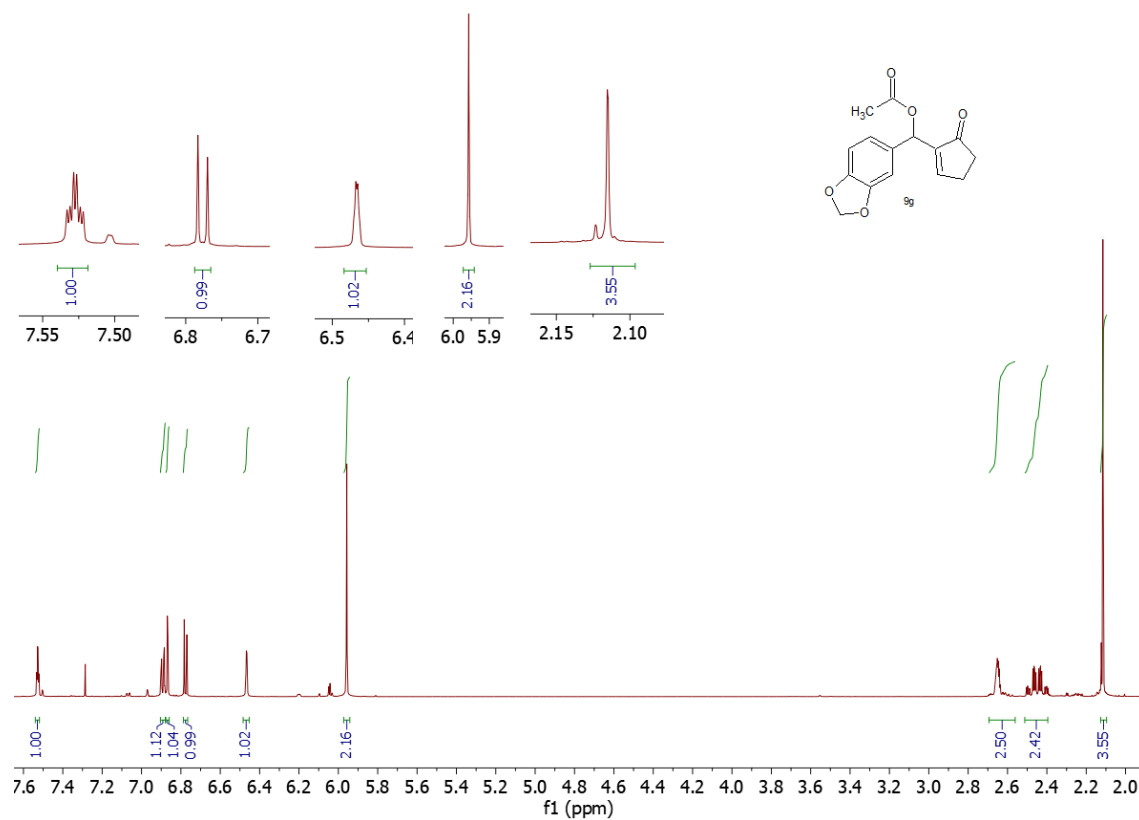
RMN C^{13} (600 MHz, CDCl_3) de 7m.

RMN H¹ (600 MHz, CDCl₃) de 7n.RMN H¹ (600 MHz, CDCl₃) de 9c.

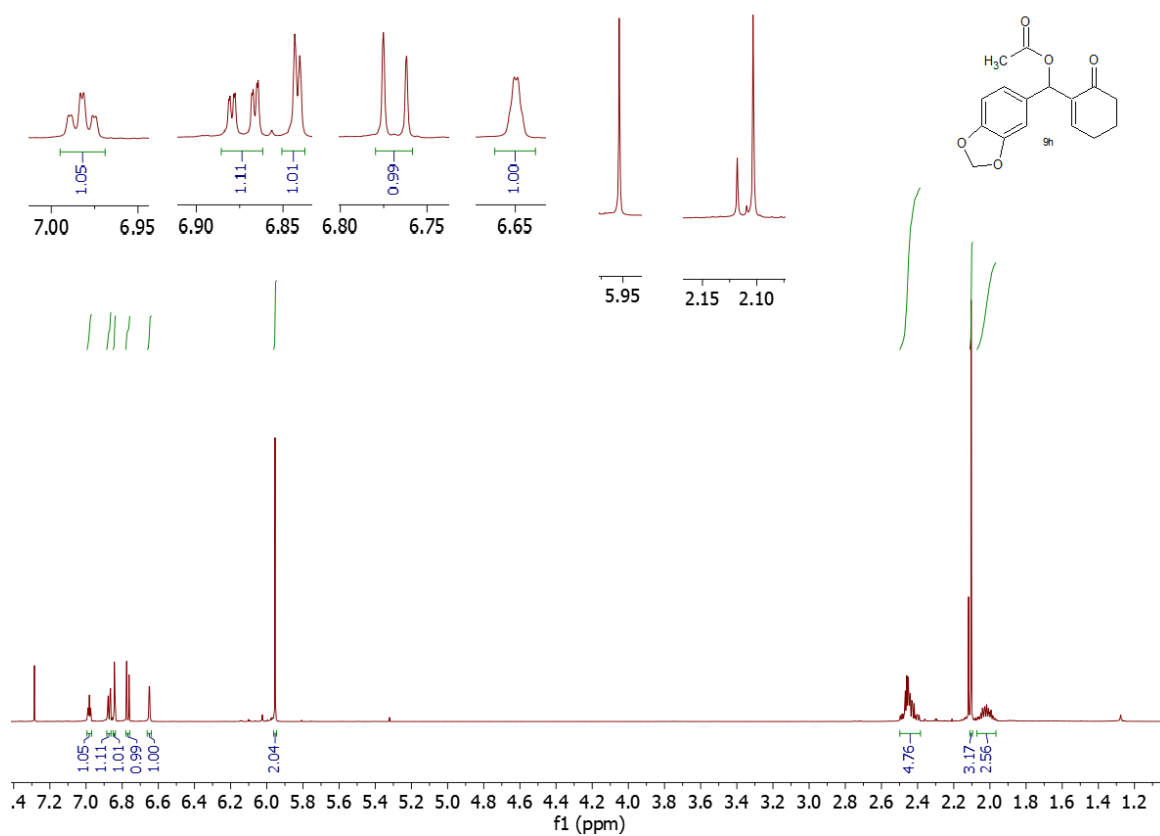
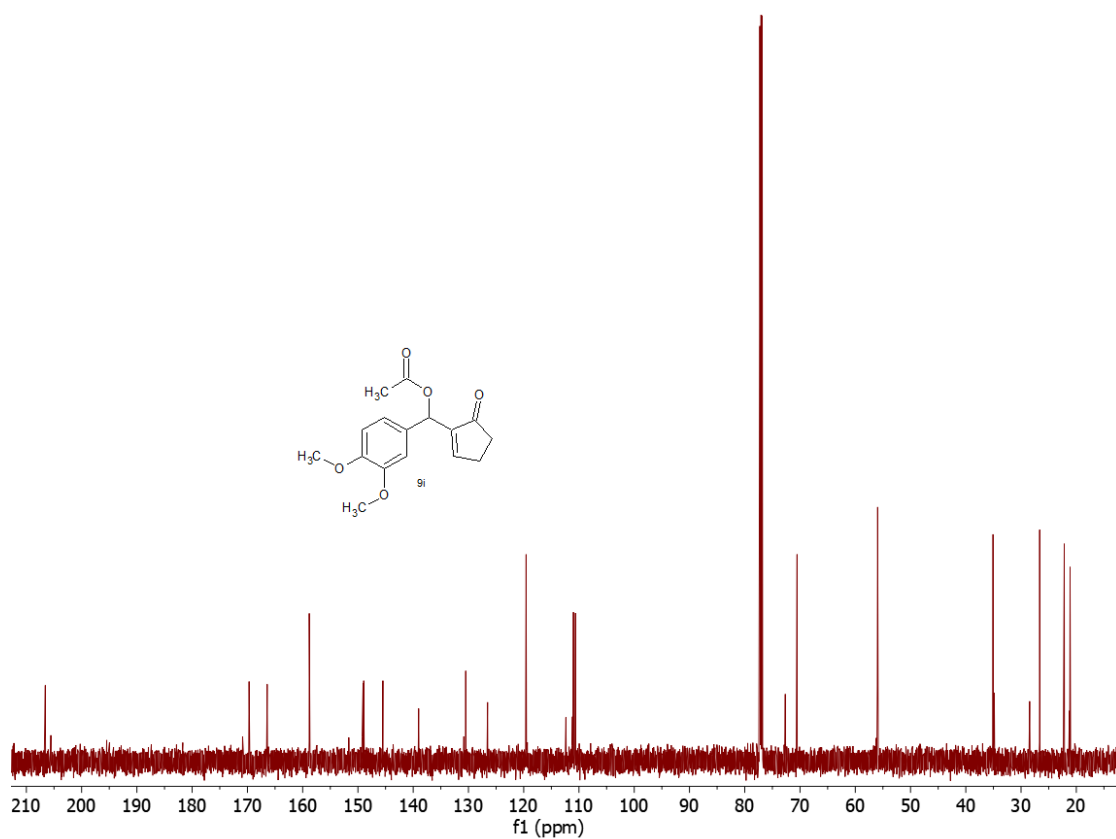
RMN H¹ (600 MHz, CDCl₃) de 9d.RMN H¹ (600 MHz, CDCl₃) de 9e.

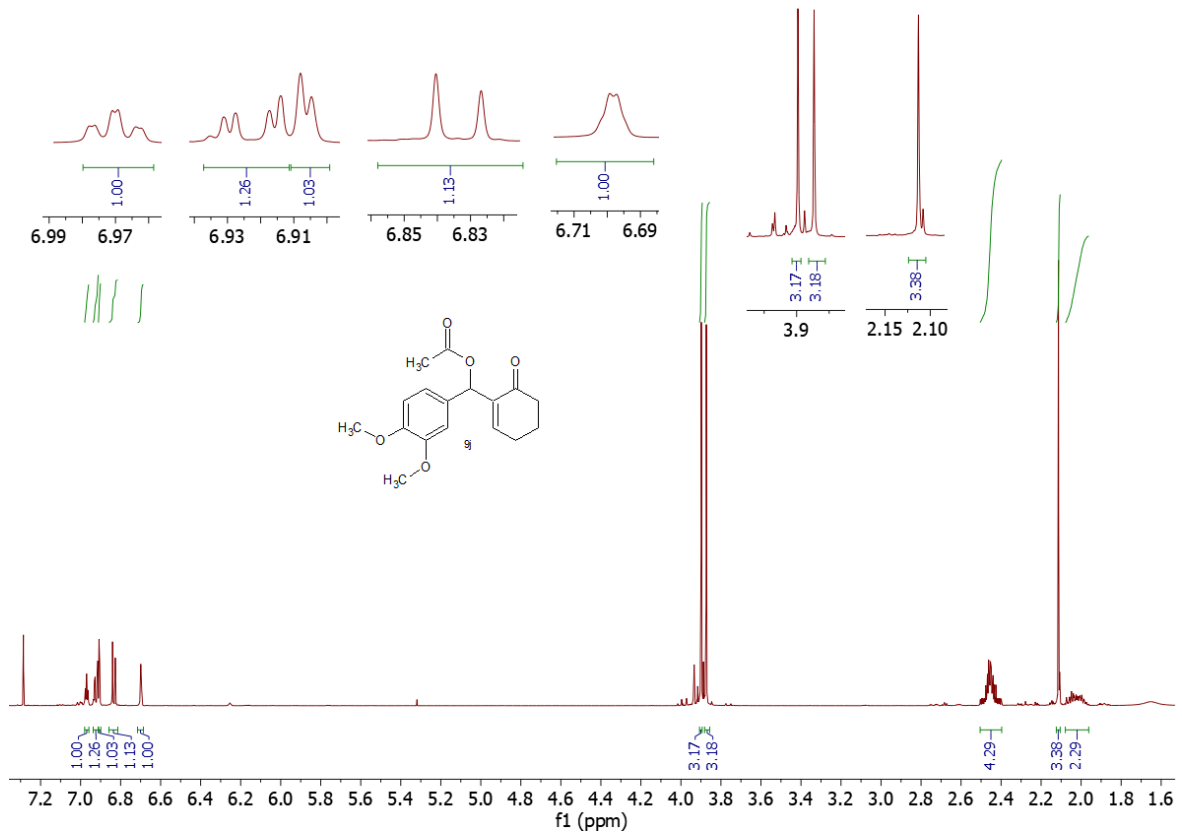
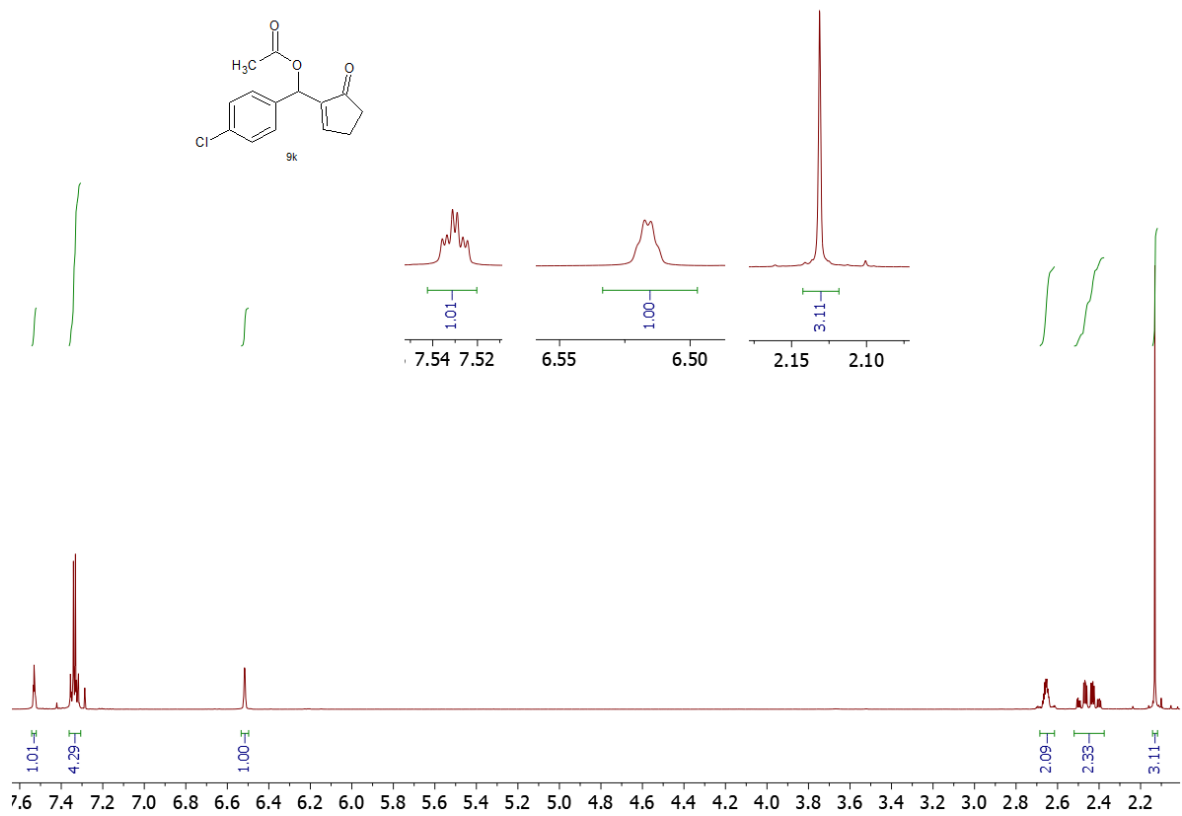


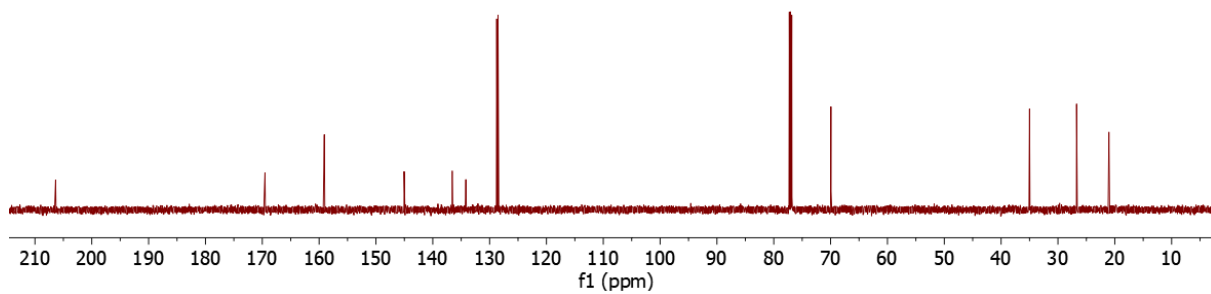
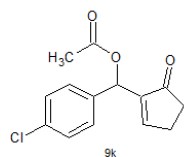
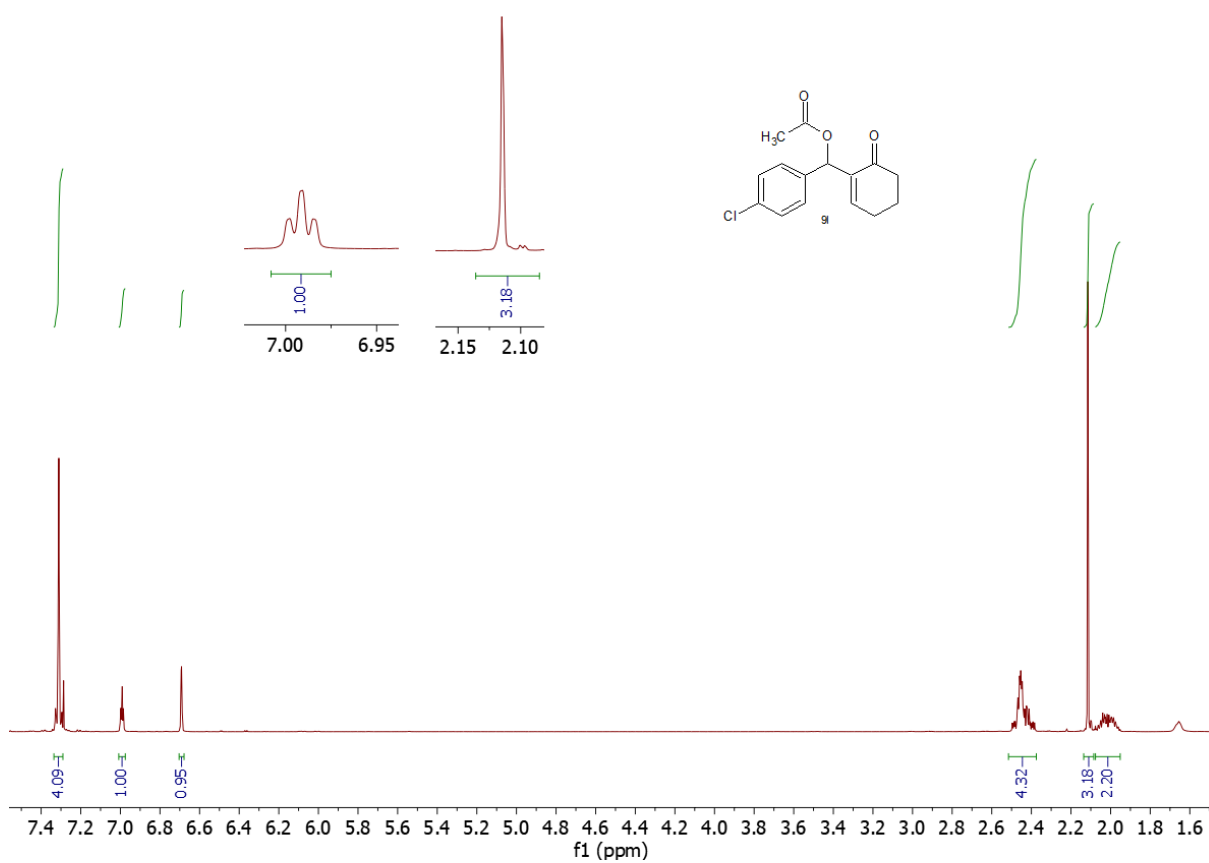
RMN H¹ (600 MHz, CDCl₃) de 9f.

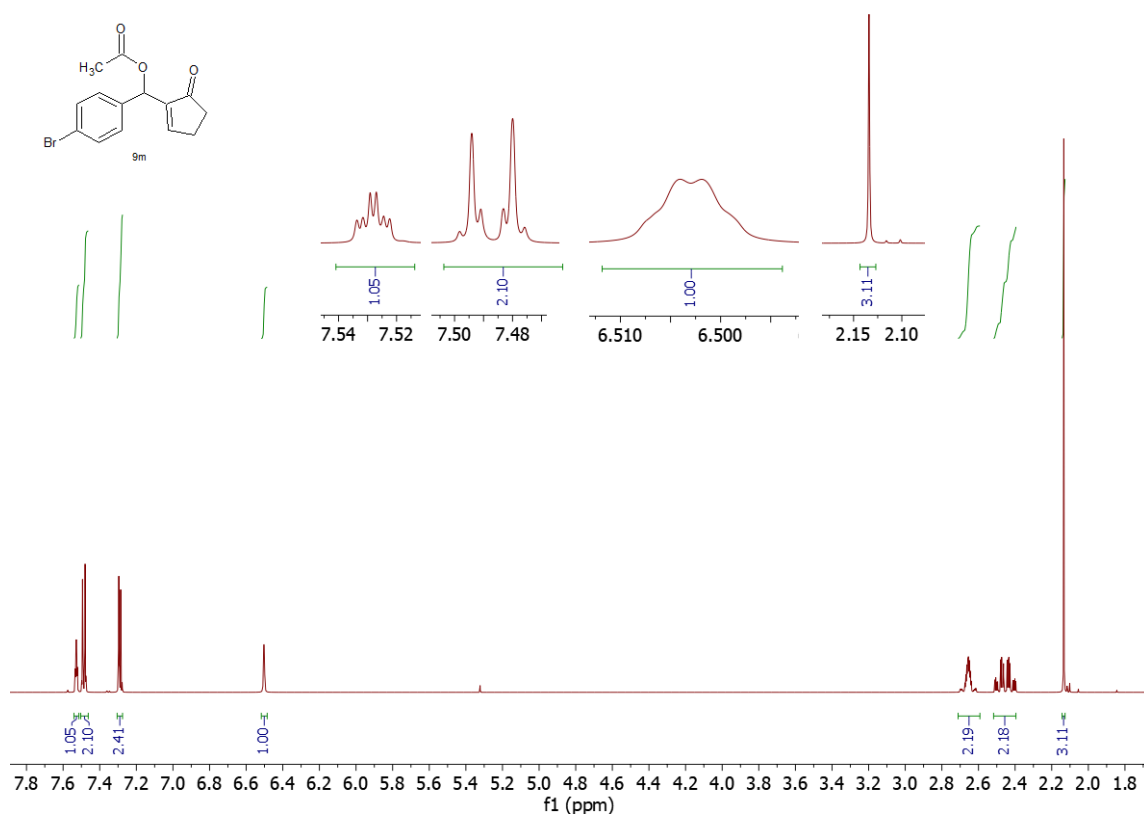


RMN H¹ (600 MHz, CDCl₃) de 9g.

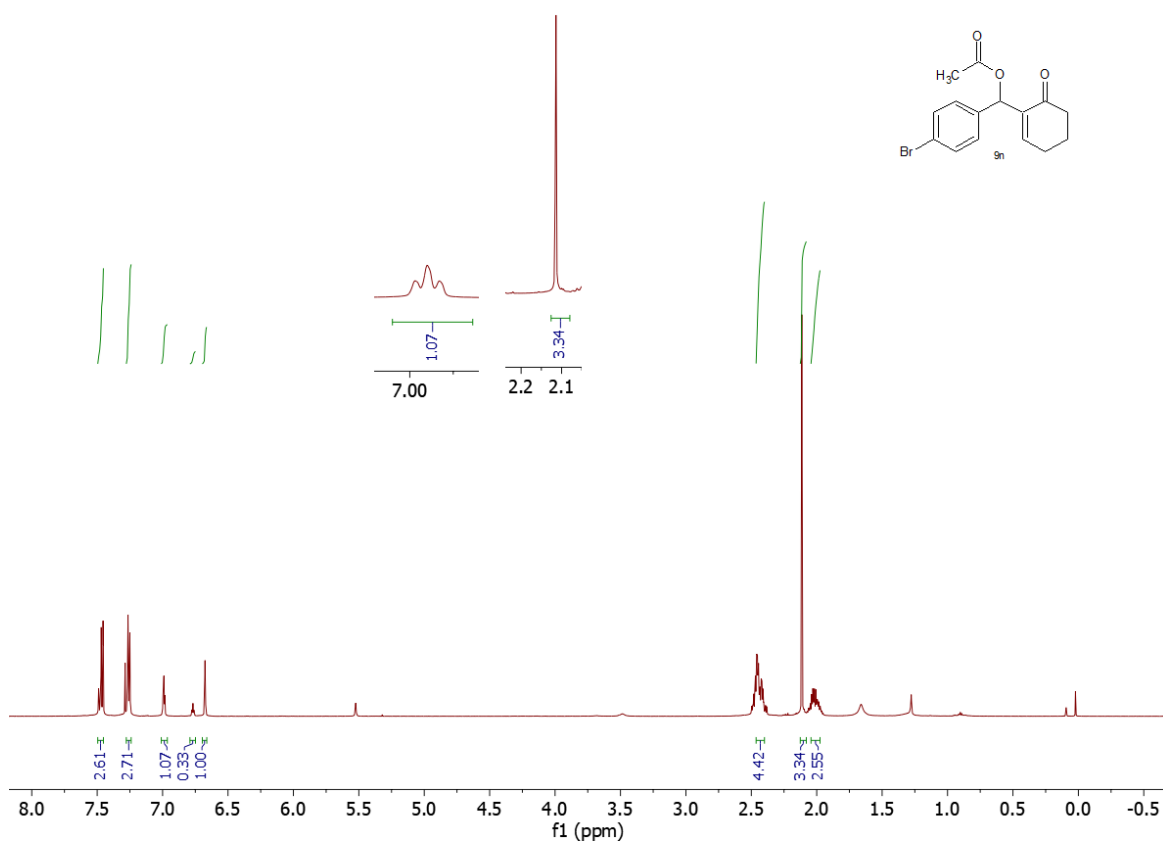
RMN H¹ (600 MHz, CDCl₃) de 9h.RMN H¹ (151 MHz, CDCl₃) de 9i.

RMN H¹ (600 MHz, CDCl₃) de 9j.RMN H¹ (600 MHz, CDCl₃) de 9k.

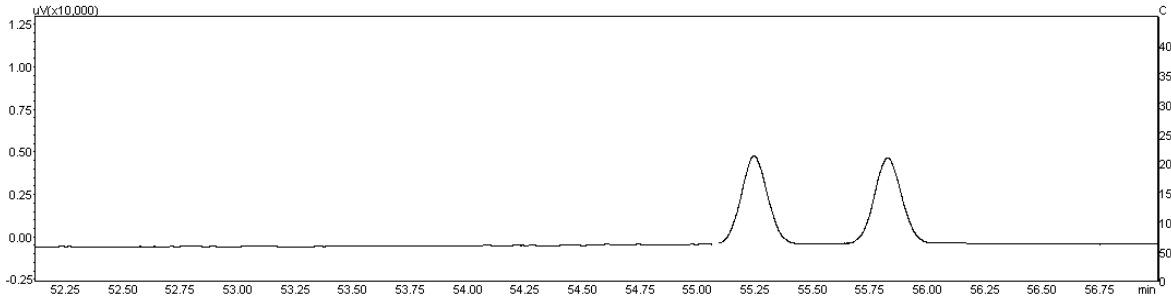
RMN C^{13} (151 MHz, CDCl_3) de 9k.RMN H^1 (600 MHz, CDCl_3) de 9l.



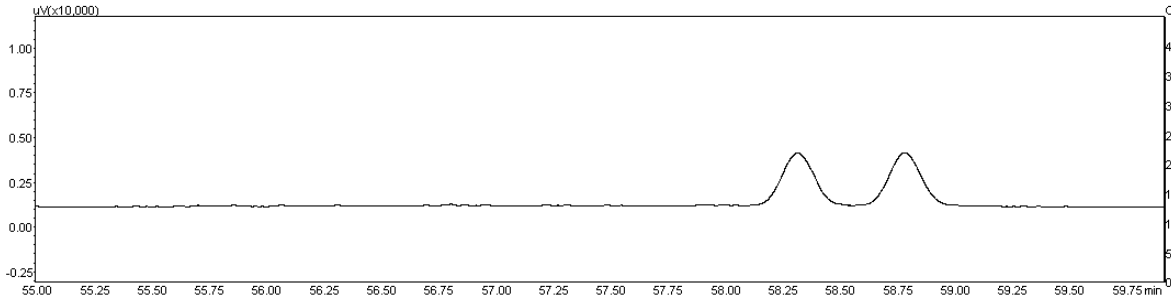
RMN ¹H (600 MHz, CDCl₃) de 9m.



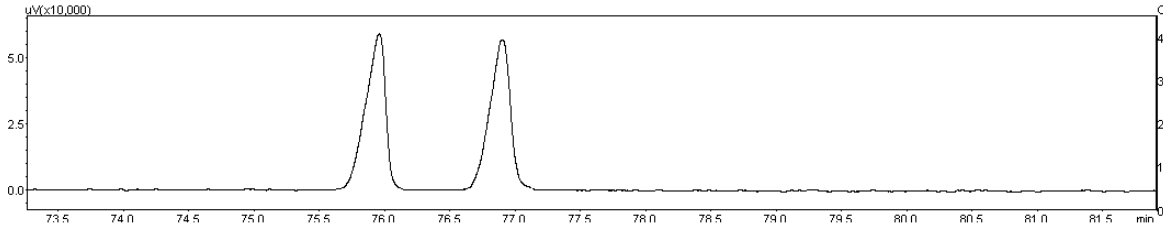
RMN ¹H (600 MHz, CDCl₃) de 9n.



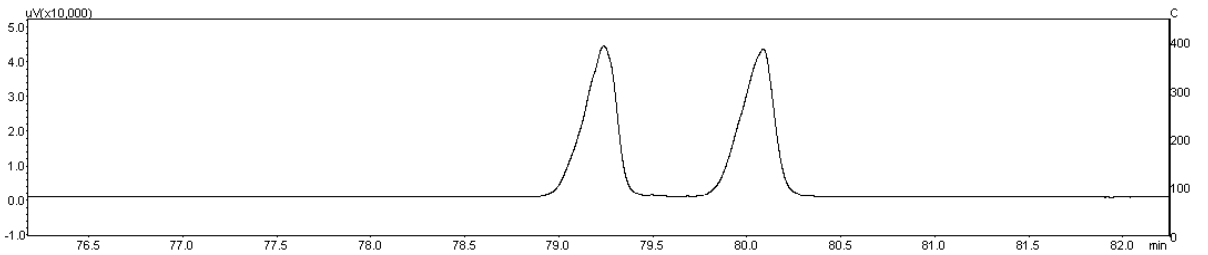
Cromatograma do padrão 7a.



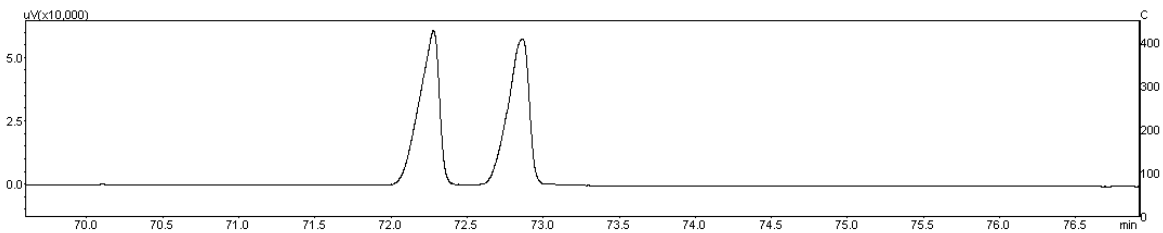
Cromatograma do padrão 7b.



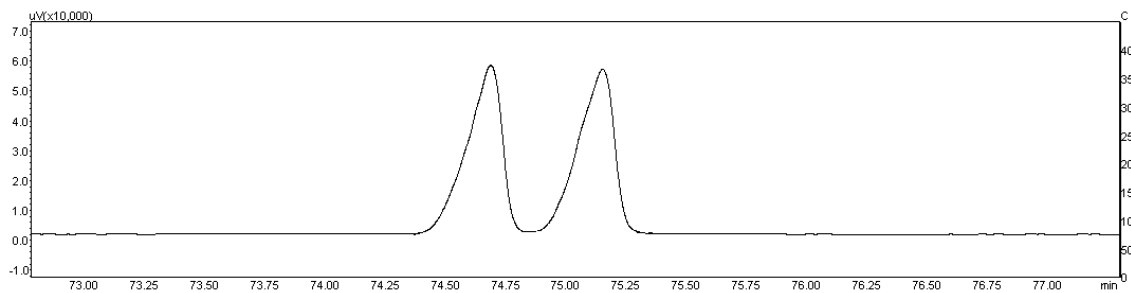
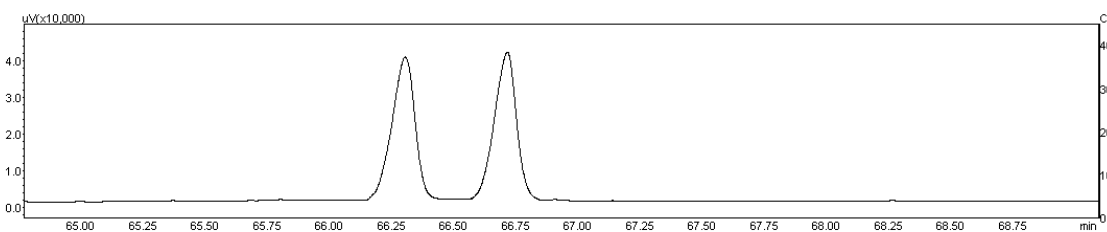
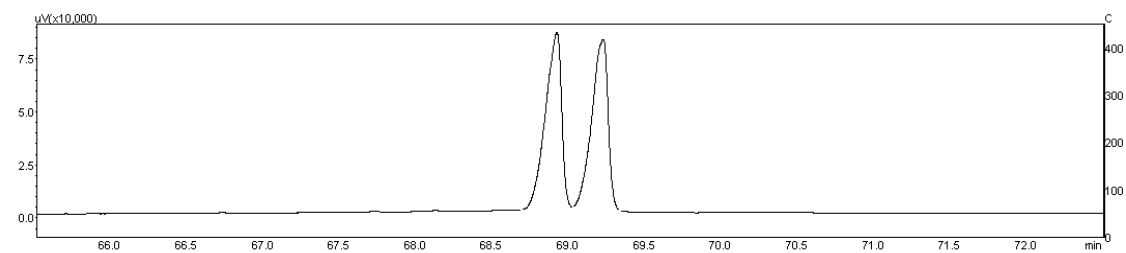
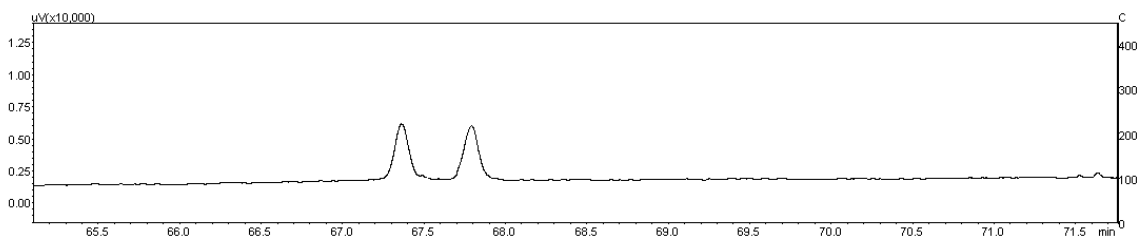
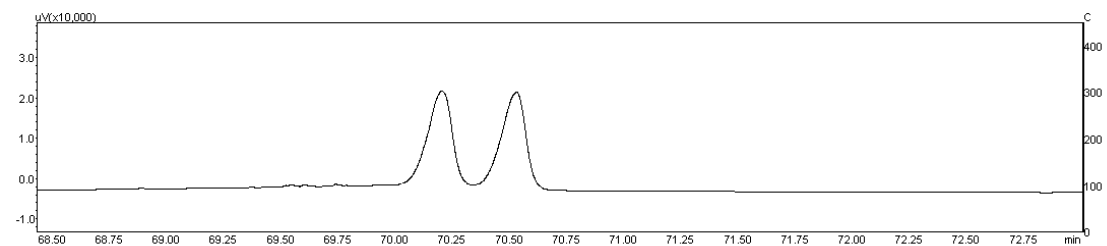
Cromatograma padrão 7c.

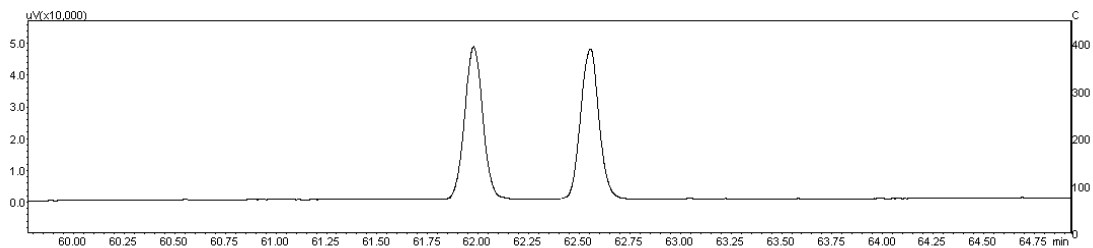
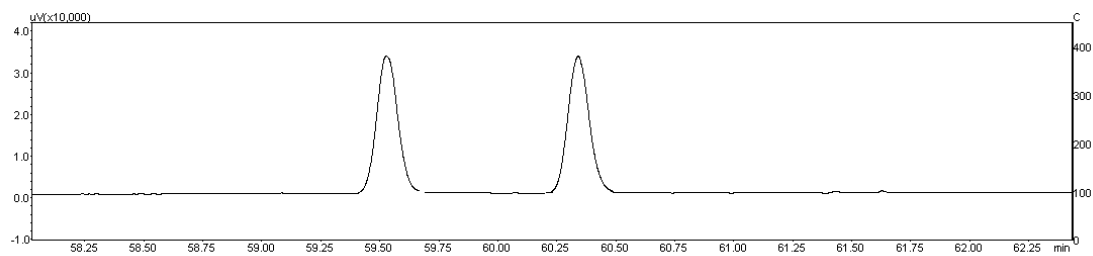
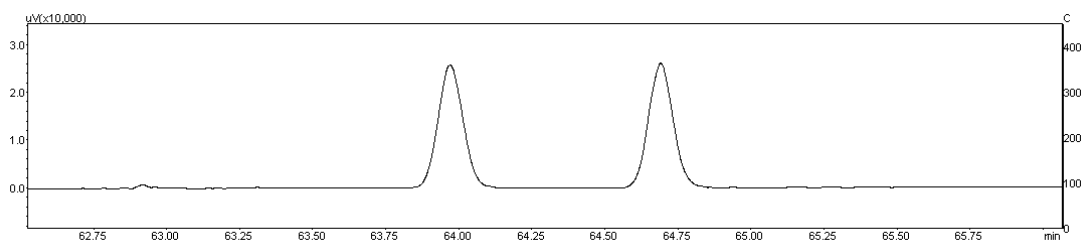
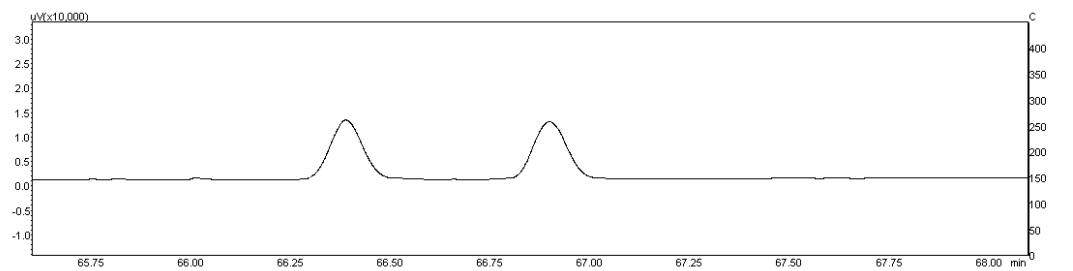
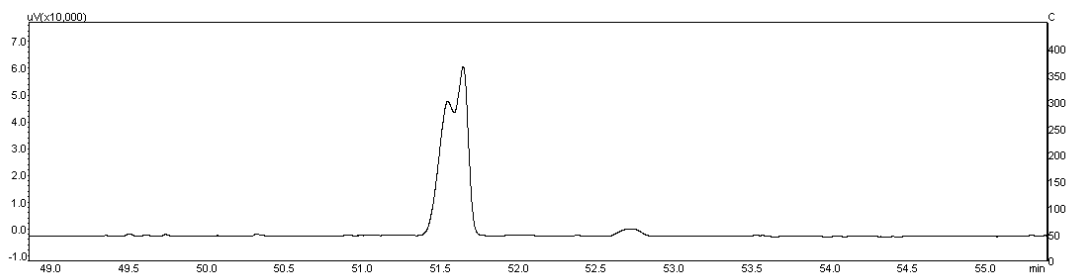


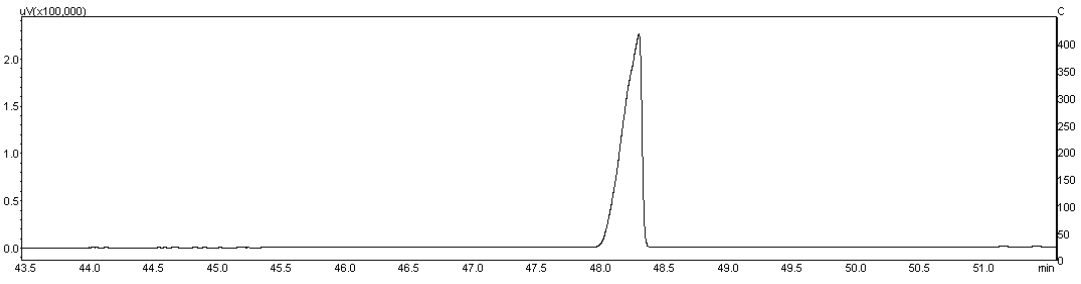
Cromatograma padrão 7d.



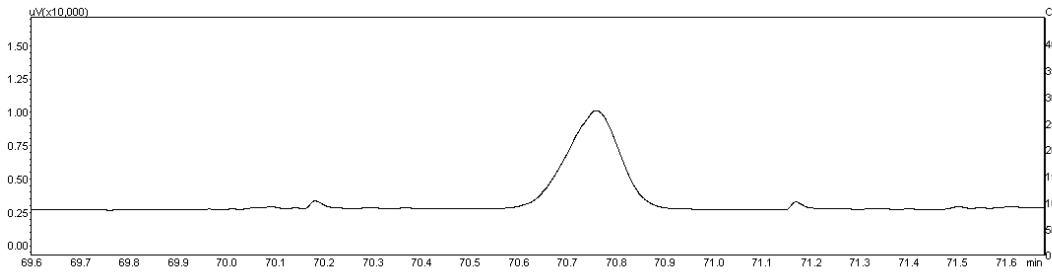
Cromatograma padrão 7e.

**Cromatograma padrão 7f.****Cromatograma padrão 7g.****Cromatograma padrão 7h.****Cromatograma padrão 7i.****Cromatograma padrão 7j.**

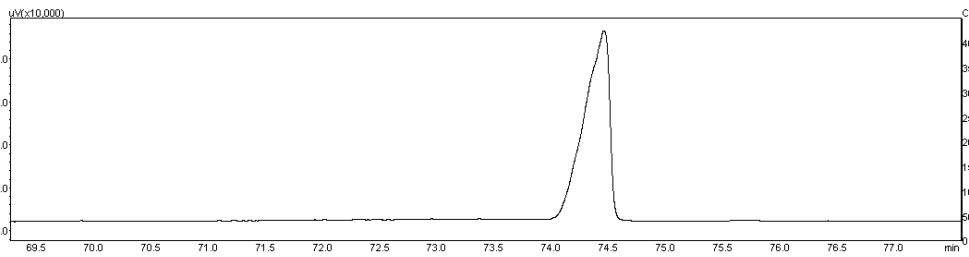
**Cromatograma padrão 7k.****Cromatograma padrão 7l.****Cromatograma padrão 7m.****Cromatograma padrão 7n.****Cromatograma padrão 9a.**



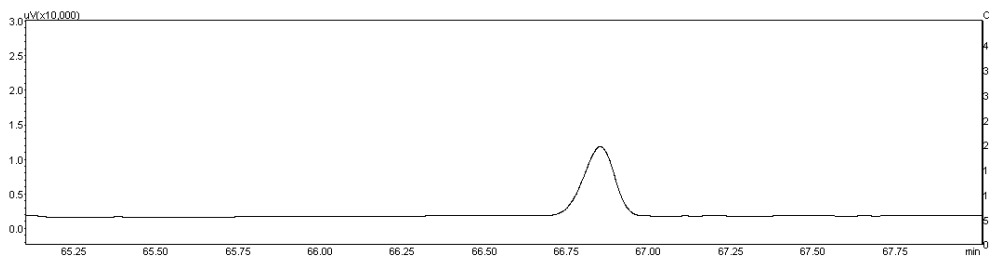
Cromatograma padrão 9b.



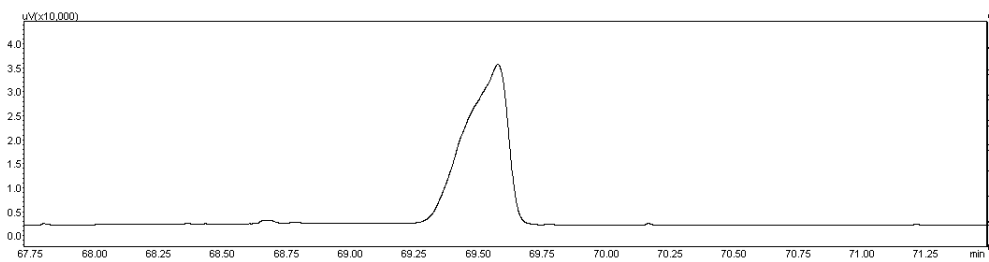
Cromatograma padrão 9c.



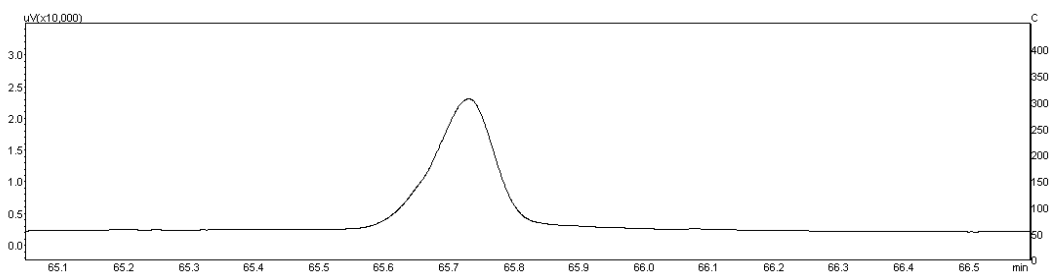
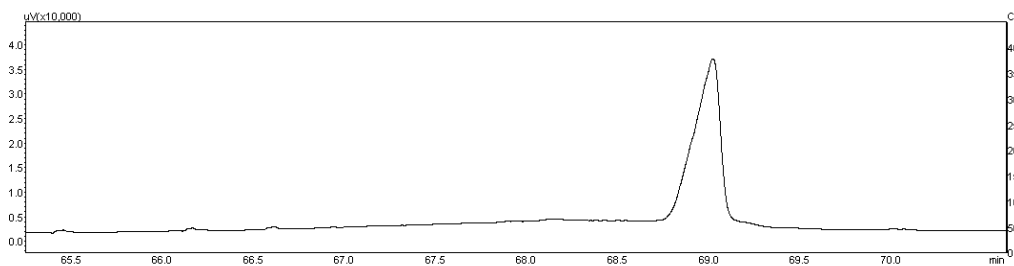
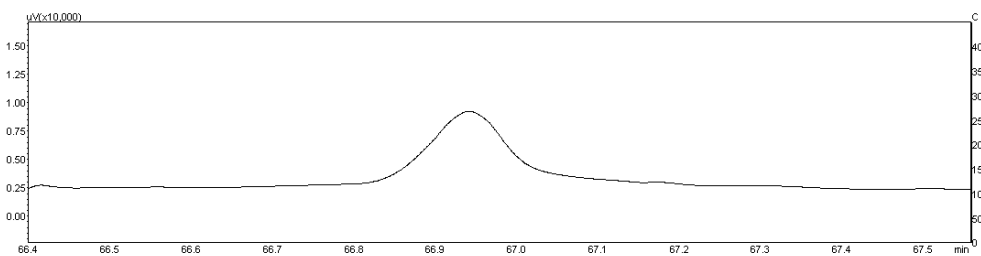
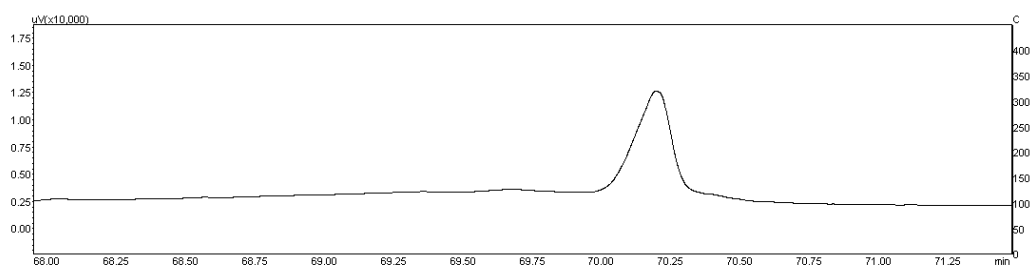
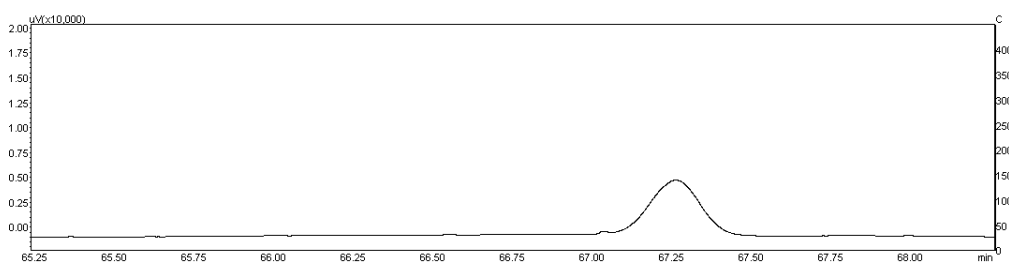
Cromatograma padrão 9d.

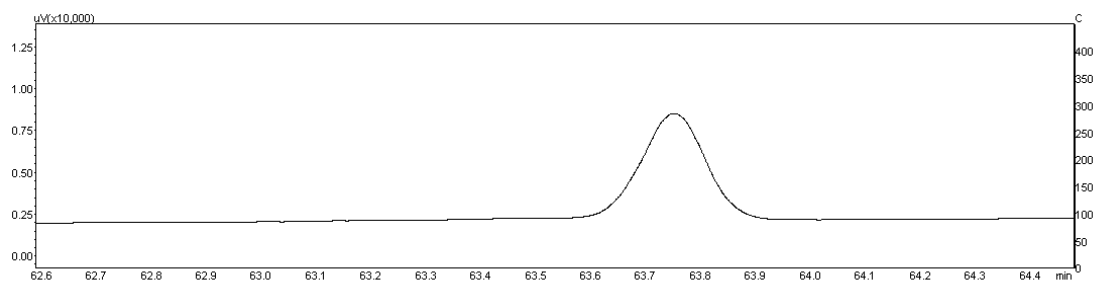
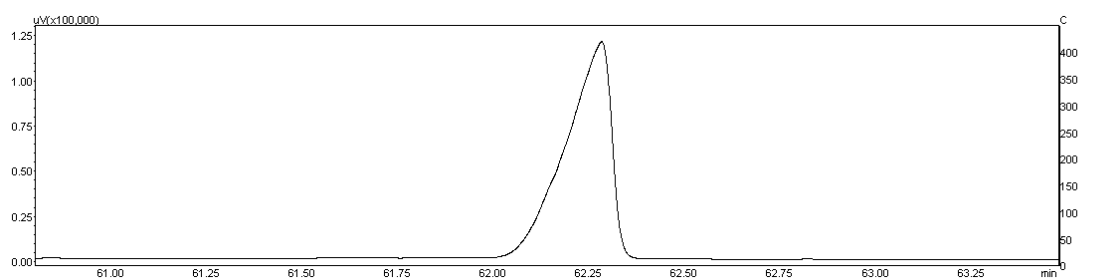
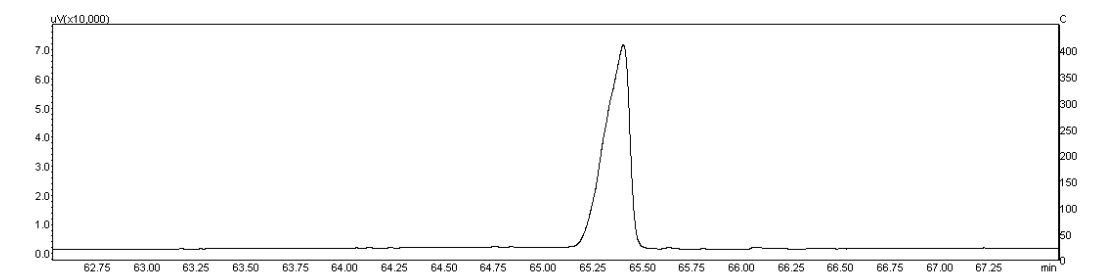
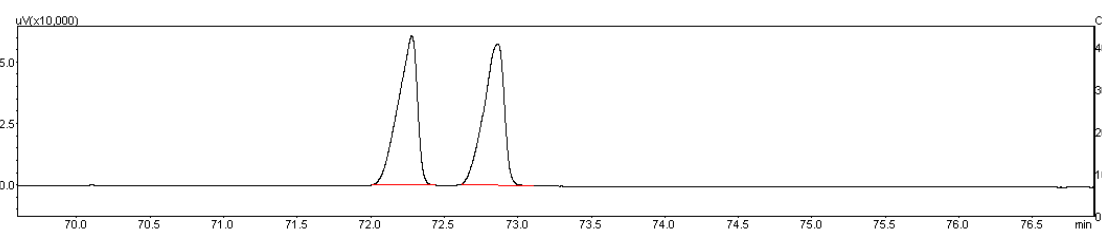
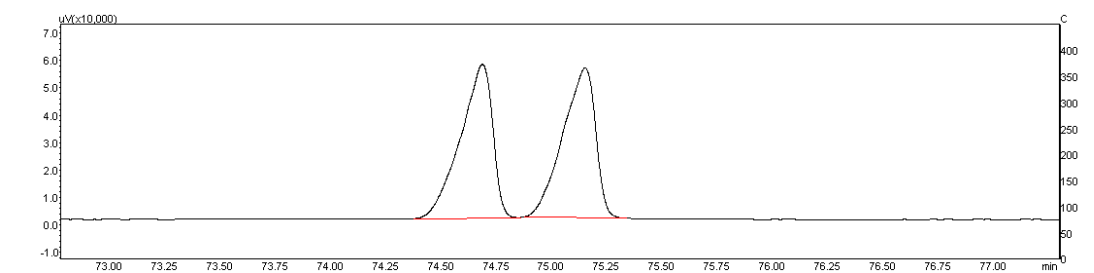


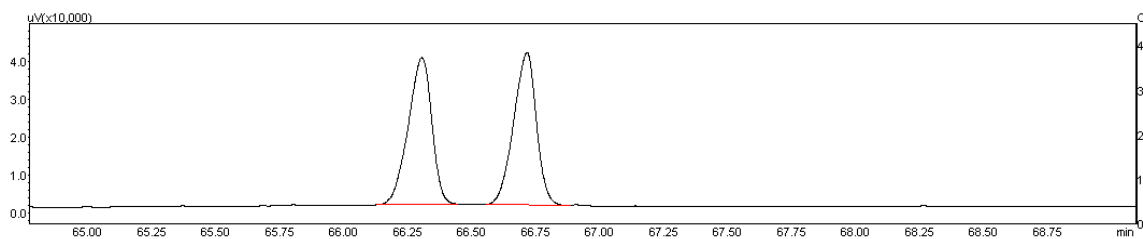
Cromatograma padrão 9e.



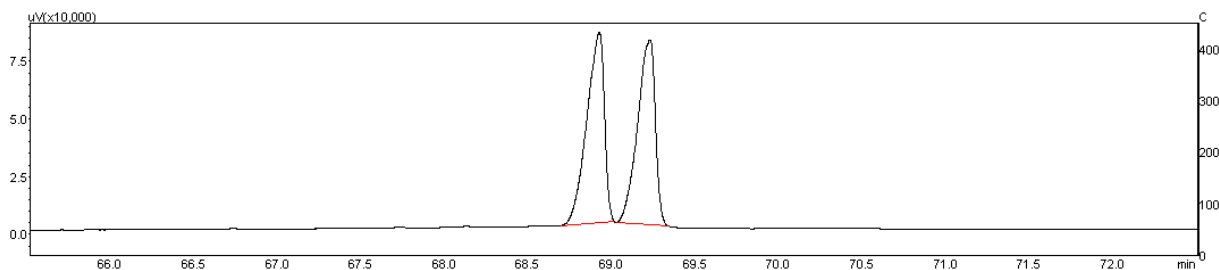
Cromatograma padrão 9f.

**Cromatograma padrão 9g.****Cromatograma padrão 9h.****Cromatograma padrão 9i.****Cromatograma padrão 9j.****Cromatograma padrão 9k.**

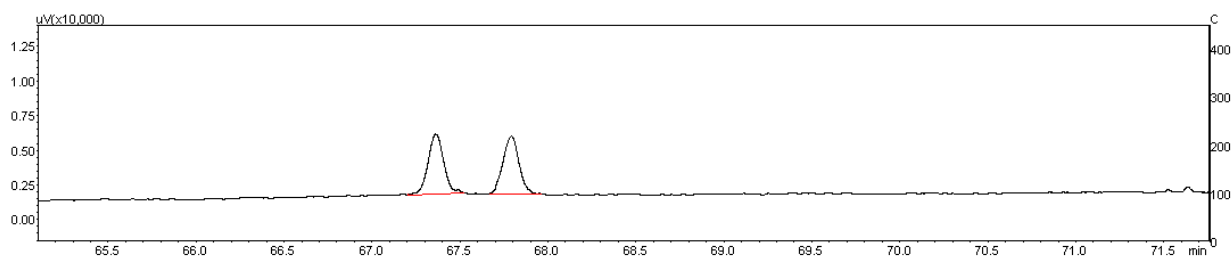
**Cromatograma padrão 9l.****Cromatograma padrão 9m.****Cromatograma padrão 9n.****Cromatograma acetilação enzimática 7e.****Cromatograma acetilação enzimática 7f.**



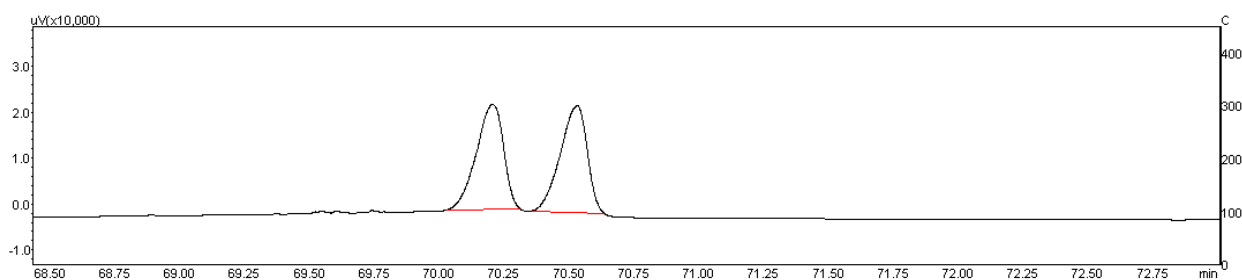
Cromatograma acetilação enzimática 7g.



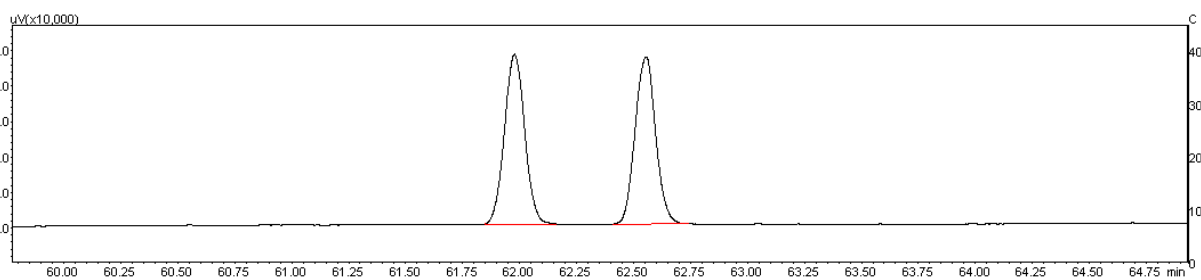
Cromatograma acetilação enzimática 7h.



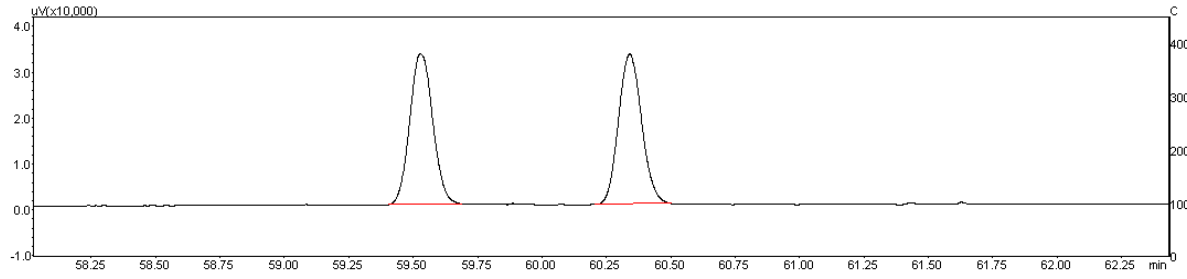
Cromatograma acetilação enzimática 7i.



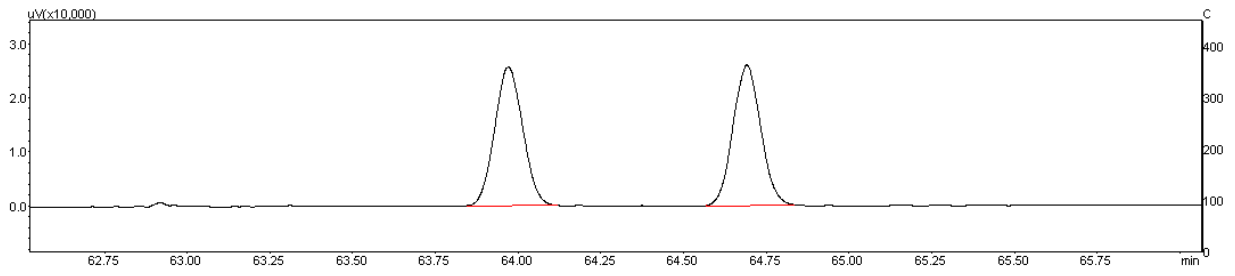
Cromatograma acetilação enzimática 7j.



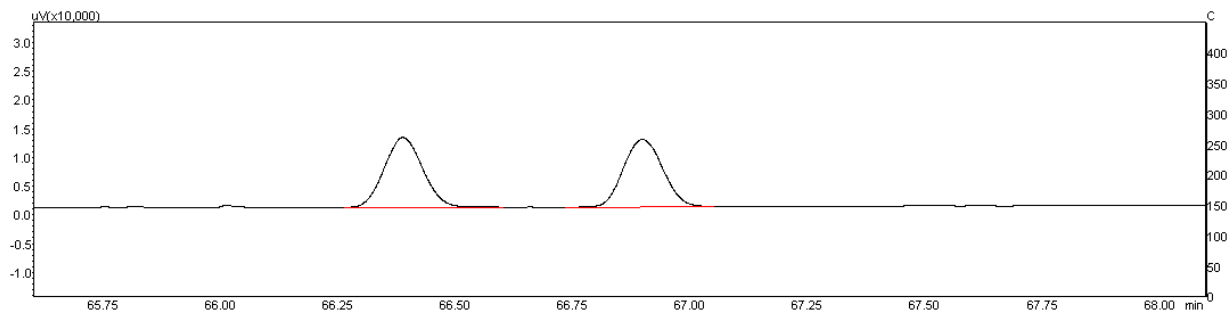
Cromatograma acetilação enzimática 7k.



Cromatograma acetilação enzimática 7l.



Cromatograma acetilação enzimática 7m.



Cromatograma acetilação enzimática 7n.