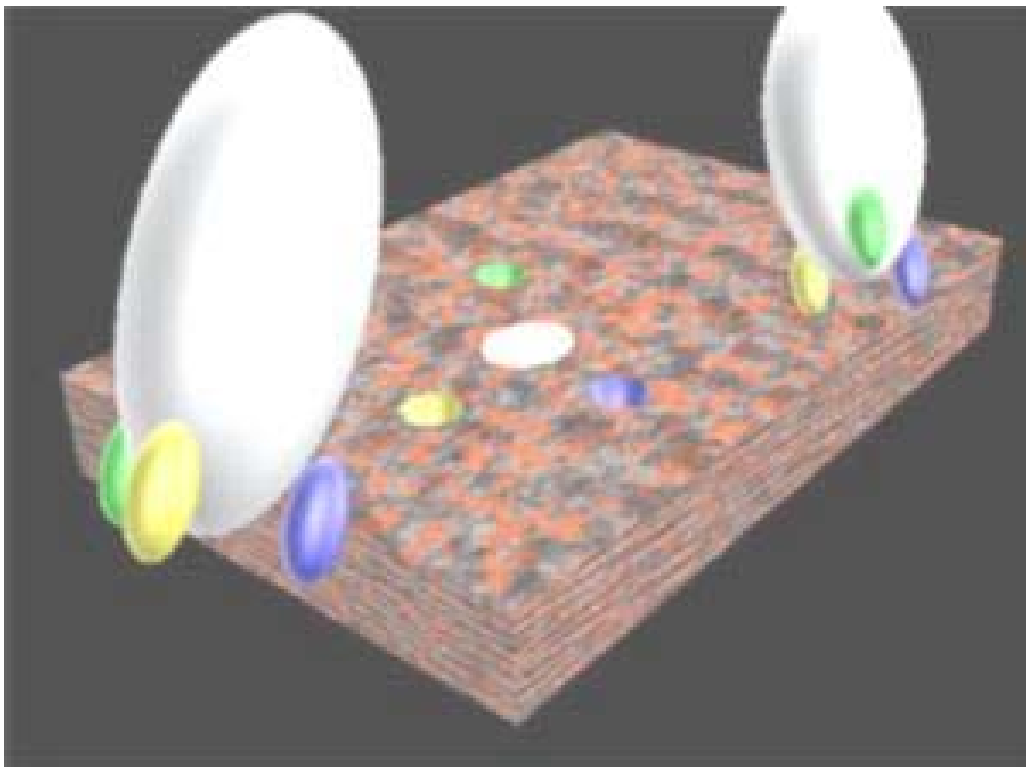


Síntese Enantiosseletiva de Amidas e Ésteres Catalisada por Lipases



Neide Queiroz

**Universidade Federal de Santa Catarina
Centro de Ciências Físicas e Matemáticas
Programa de Pós-Graduação em Química**

**Síntese Enantiosseletiva de
Amidas e Ésteres Catalisada por Lipases**

Neide Queiroz

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação
em Química da Universidade Federal de
Santa Catarina, como requisito parcial para a
obtenção do título de Doutor em Química.

Florianópolis, 20 dezembro de 2002.

Neide Queiroz

Síntese Enantiosseletiva de Amidas e Ésteres Catalisada por Lipases

Esta tese foi julgada e aprovada para a obtenção do título de Doutor em Química Orgânica no Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal de Santa Catarina.

Prof. Faruk José Nome Aguilera
Coordenador do Curso

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dra. Maria da Graça Nascimento
Orientadora

Prof. Dr. Valentim E. U. Costa

Prof. Dr. Miguel Soriano B. Caro

Prof. Dra. Maria Helena Sarragiotto

Prof. Dr. Ricardo José Nunes

Prof. Dra. Marina Uieara

Florianópolis, 20 de dezembro de 2002.

A minha família, pelo apoio constante: pai e mãe pelo
eterno amor, carinho, atenção e força.

Agradecimentos

O meu obrigada a **Deus**, que me concede todos os dias o dom da vida.

Obrigadão a todas as pessoas da minha família que me apoiaram: pai, mãe, Neusa, Nata, Lu e Luquinha pelo amor, carinho, atenção e força.

A minha orientadora, Profa Maria da Graça Nascimento que na orientação deste trabalho conseguiu colocar mais do que o seu saber, mas também o seu carinho. Minha sincera gratidão, respeito e carinho!!

Aos amigos do grupo de Biocatálise, foram anos de trabalho, conversas, brincadeiras e amizade, proporcionando muito mais que um simples ambiente de trabalho. Que o companheirismo e o respeito mútuo que demonstraram nunca seja esquecido. Em especial a Juliana pela contribuição neste trabalho.

Agradeço ao Departamento de Química e a Pós Graduação em Química da UFSC pela oportunidade de realização deste trabalho.

Aos funcionários Graça e Jadir da secretaria da pós que foram sempre tão prestativos e atenciosos, o que tornou possível o desenvolvimento de uma amizade.

Aos professores que além de transmitir seus conhecimentos, transmitiram a sua experiência, em especial a Profa Sonia Probst, Profa Marina Uieara, Prof. Miguel Caro, Profa Maria da Graça Nascimento, Profa Nazaré Sanches, Prof. Nito Debacher e Prof. Valdir Soldi. Meu carinho e gratidão!

Aos funcionários da UFSC que estiveram comigo nos dias anônimos, nas horas simples. A todos os pequenos gestos, às pequenas atenções. A todos aqueles que contribuíram para a construção desta tese. Meu carinho, reconhecimento e gratidão.

Ao Prof. Valentim E. U. da Costa do Instituto de Química da UFRGS pelo acolhimento em seu laboratório e aos seus orientandos Fernando Morisco pela execução de algumas

análises cromatográficas e Mariane pela acolhida em sua casa. Meus sinceros agradecimentos!

A Profa. Anita J. Marsaioli, Antonio Laverde e Sergio Antonio Fernandes do Instituto de Química da UNICAMP pelas análises de RMN ¹H.

A Profa Márcia Maria de Souza e aos seus alunos, do Departamento de Farmácia da Univali pela realização dos testes farmacológicos de alguns compostos.

Ao meu chefe Henrique Melo Lisboa do Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental da UFSC pelo incentivo. VALEU!!

Ao CNPq pelo suporte financeiro e a todos os brasileiros que com seu trabalho foram os financiadores indiretos dessa tese.

Quero também agradecer a amizade de Fábio, Sandra, Pedrão, Roberto, Flávia, Paulão, Lílian, Josiel, Alessandra, Lúcia, Silvia, Marli, Lourdes, Vanessa, Rosi, Elisa, Gil, José, Ângelo e a todos aqueles que não estão aqui mencionados. Vocês com certeza estarão sempre no meu coração.

Amigo é o irmão que o coração escolhe! Agradeço as amigas Elisane e Angela que tiveram presença marcada nos bons momentos e também nos mais difíceis durante o meu doutorado. Obrigada pela força e por acreditarem neste trabalho, o meu respeito, amizade e carinho!

Agradeço aos professores por terem gentilmente aceitado fazerem parte da banca examinadora deste trabalho. Exprimo aqui o meu reconhecimento!

A Vanessa pela carinhosa leitura crítica do manuscrito desta tese.

“A ciência é uma coisa maravilhosa quando não precisa ganhar o próprio sustento com ela. Deveríamos ganhar a vida trabalhando com coisas que temos certeza que sabemos fazer. Somente quando não temos de dar satisfações a ninguém é que obtemos prazer no empenho científico”.

Albert Einstein

ÍNDICE

LISTA DE FIGURAS	IX
LISTA DE TABELAS	XIII
LISTA DE ABREVIATURAS	XV
RESUMO.....	XVI
ABSTRACT	XVII
1 INTRODUÇÃO	1
1.1 RELEVÂNCIA DA QUIRALIDADE EM QUÍMICA ORGÂNICA.....	2
1.2 RESOLUÇÃO CINÉTICA ENZIMÁTICA.....	5
1.3 MÉTODOS ANALÍTICOS PARA A DETERMINAÇÃO DO EXCESSO ENANTIOMÉRICO	9
1.3.1 Método polarimétrico.....	10
1.3.2 Cromatografia gasosa e líquida.....	11
1.3.2.1 Cromatografia gasosa.....	11
1.3.2.2 Cromatografia líquida de alta eficiência.....	12
1.3.3 Espectroscopia de ressonância magnética nuclear de hidrogênio	13
1.3.3.1 Reagente de deslocamento químico quiral	13
1.4 ENZIMAS.....	14
1.5 LIPASES EM QUÍMICA ORGÂNICA	18
1.6 RESOLUÇÃO DE ÁCIDOS RACÊMICOS CATALISADA POR LIPASES	22
1.7 PREPARAÇÃO DE AMIDAS VIA ENZIMÁTICA.....	24
1.8 IMOBILIZAÇÃO DE ENZIMAS	29
1.8.1 Imobilização de lipases	32
1.8.1.1 Imobilização de lipases em polímeros.....	33
2 OBJETIVOS	35
3 JUSTIFICATIVA	36
4 EXPERIMENTAL	37
4.1 MATERIAL	37
4.2 CARACTERIZAÇÃO DOS COMPOSTOS	39
4.2.1 Espectrofotometria no infravermelho.....	39
4.2.2 Ressonância magnética nuclear de hidrogênio.....	39
4.2.3 Cromatografia gasosa com fase quiral - CGQ	40
4.3 DETERMINAÇÃO DO EXCESSO ENANTIOMÉRICO	40
4.3.1 Determinação do ee por CGQ.....	41
4.3.1.1 Derivatização dos ácidos remanescentes das sínteses enantiosseletivas	42
4.3.2 Determinação do ee por RMN ¹ H	43
4.4 ATRIBUIÇÃO DA CONFIGURAÇÃO ABSOLUTA DOS COMPOSTOS QUIRAIS	44
4.5 PREPARAÇÃO DAS LIPASES IMOBILIZADAS	46
4.5.1 Imobilização de lipases em filme de PEO	46
4.5.2 Imobilização de lipases em gel de ágar	46
4.6 SÍNTESES NÃO ENZIMÁTICAS DE REAGENTES E DE PADRÕES RACÊMICOS.....	47
4.6.1 Preparação do (R,S)-hidroxi(fenil)acetato de metila.....	47
4.6.2 Preparação do (R,S)-acetiloxi(fenil)acetato de metila.....	47
4.6.3 Preparação do (R,S)-2-(4-clorofenoxi)propanoato de metila.....	48
4.6.4 Preparação de amidas racêmicas	48

4.7 PREPARAÇÃO DO MEIO REACIONAL PARA AS SÍNTESES ENZIMÁTICAS – PROCEDIMENTO GERAL	50
4.7.1 <i>Preparação de amidas derivadas do (R,S)-hidroxi(fenil)acetato de metila (16)</i>	50
4.7.2 <i>Aminólise de (R,S)-acetiloxi(fenil)acetato de metila (17)</i>	51
4.7.3 <i>Acetilação enantiosseletiva de (R,S)-hidroxi(fenil)acetato de metila (16)</i>	51
4.7.3.1 <i>Reação utilizando a lipase da Candida antarctica</i>	51
4.7.3.2 <i>Reação utilizando a lipase de Pseudomonas sp.</i>	52
4.7.4 <i>Resolução de ácidos racêmicos via esterificação biocatalítica</i>	52
4.7.4.1 <i>Ácidos 2-alquil e 2- bromo substituído</i>	52
4.7.4.2 <i>Ácido (R,S)-3-metil pentanóico (9)</i>	53
4.7.5 <i>Resolução de aminas racêmicas via acilação catalisada por CAL</i>	53
4.8 ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA.....	54
4.8.1 <i>Modelo das contorções abdominais induzidas pelo ácido acético 0,6 % em camundongos.</i>	54
4.8.2 <i>Síntese dos compostos utilizados nos testes farmacológicos</i>	55
4.8.3 <i>Análise Estatística</i>	57
4.9 NÚMERO DE IDENTIFICAÇÃO DOS COMPOSTOS UTILIZADOS NA TESE	58
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	60
5.1 RESOLUÇÃO DO ÁCIDO 2-(4-CLOROFENOXI) PROPIONICO	60
5.1.1 <i>Aminólise enantiosseletiva do 2-(4-clorofenoxi) propanoato de metila</i>	61
5.1.2 <i>Esterificação enantiosseletiva do ácido 2-(p-clorofenoxi) propiônico</i>	62
5.2 RESOLUÇÃO DO (R,S)-2-HIDROXI(FENIL)ACETATO DE METILA.....	67
5.2.1 <i>Aminólise enantiosseletiva de 2-hidroxi ésteres catalisados por CAL</i>	68
Enzima	72
5.2.2 <i>Resolução do (R,S)-ácido hidroxi(fenil)acético por PSL e CAL</i>	75
5.3 RESOLUÇÃO DOS ÁCIDOS RACÊMICOS 2-BROMOALCANÓICOS POR LIPASES	85
5.3.1 <i>Ácido 2-bromopentanóico (3)</i>	85
5.3.2 <i>Ácido 2-bromoexanóico (4)</i>	87
5.3.3 <i>Ácido 2-bromoocetanóico (5)</i>	89
5.3.4 <i>Ácido 2-bromoexadecanóico (6)</i>	90
5.4 RESOLUÇÃO DE ÁCIDOS RACÊMICOS 2 E 3-ALQUILALCANÓICOS.....	97
5.4.1 <i>Ácido 2-etilhexanóico (7)</i>	97
5.4.2 <i>Ácido 2-metilpentanóico (8)</i>	98
5.4.3 <i>Ácido 3-metilpentanóico (9)</i>	100
5.5 RESOLUÇÃO DAS AMINAS RACÊMICAS	101
5.6 TESTES FARMACOLÓGICOS DE COMPOSTOS RACÊMICOS E ENANTIOMERICAMENTE PUROS	108
5.6.1 <i>Avaliação da resposta antinociceptiva dos compostos de 3 a 6 e 27 a 29</i>	109
5.6.2 <i>Amidas derivadas do (R,S)-2-hidroxi(fenil)acetato de metila</i>	111
6 CONCLUSÕES.....	115
7 PERSPECTIVAS.....	117
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	118
9 ANEXO - PRODUÇÃO ACADÊMICA NOS ANOS DE 1997-2002.....	133

Lista de Figuras

Figura 1- Enantiômeros de substâncias cujas características biológicas são função direta de sua configuração [2].....	3
Figura 2- Rotas para obter compostos enantiomericamente puros [5].....	4
Figura 3- Curvas da pureza enantiomérica do substrato e produto ao longo de uma resolução cinética enzimática. a) reação reversível e b) reação irreversível.....	8
Figura 4- Exemplo de reação com excesso enantiomérico de 100%. L = ligante.....	9
Figura 6- Frequência do uso de enzimas em biotransformações [12].....	18
Figura 7- Representação esquemática da estrutura tridimensional da lipase de <i>Mucor miehei</i> na forma aberta (ativa). Quando a tampa está aberta, a tríade catalítica no sítio ativo (vermelho) torna-se acessível para o substrato (normalmente triglicerídeos) [43].	19
Figura 8- Mecanismo catalítico de lipases baseado na “tríade catalítica” de serina (nucleófilo), histidina, e ácido aspártico ou glutâmico, na resolução cinética de ésteres racêmicos (a) e álcoois racêmicos (b). Os números dos resíduos de aminoácidos se referem a lipase de <i>Rhizopus oryzae</i> [43].	20
Figura 9- Transesterificação enantiosseletiva utilizando ésteres enólicos.	21
Figura 10- Síntese enzimática de amidas opticamente puras.	25
Figura 11- Síntese de análogos da capsaicina catalisada por lipases [98].....	26
Figura 12- Aminas enantiomericamente puras obtidas através da biotransformação de ésteres oxalâmicos usando a lipase de <i>Candida antarctica</i>	27
Figura 13- Principais técnicas de imobilização [12].....	31
Figura 14- Unidades monoméricas da agarose e do PEO.	34
Figura 15- Cromatograma do composto hidroxi(fenil)acetato de metila (16) no CGQ. (a) racemato; (b) enantiomericamente puro e (c) após reação biocatalítica. Condições experimentais: $P_{H_2} = 85$ kPa, $T_i = 80$ °C, Inj. = 250 °C, Det. = 275 °C, $\Delta_{aq} = 2$ °C/min, $T_f = 180$ °C.....	41
Figura 16- Fluxograma utilizado para de obtenção do ácido remanescente em reações de esterificação.	43
Figura 17- Estruturas do substrato e dos seletores quirais.	44
(R,S)-2-(4-clorofenoxi)propanoato de metila.....	58
Figura 18 – Reações de aminólise de (R,S)-2-(4-clorofenoxi)propanoato de metila (A) e esterificação do ácido (R,S)-2-(4-clorofenoxi)propiónico (B) catalisadas por lipases.	60

- Figura 19-** Cromatograma do 2-(4-clorofenoxi)propanoato de ciclohexila (**37**) obtido por síntese enzimática (A) e do padrão racêmico (B). Condições experimentais: Inj. = 250 °C, Det. = 275 °C, $T_i = 90$ °C, $T_f = 180$ °C, $\Delta_{aq} = 3$ °C/min, Pressão do $H_2 = 85$ kPa. 65
- Figura 20** – Cromatograma do 2-(4-clorofenoxi)propanoato de hexila (**38**) obtido por síntese enzimática (A) e do padrão racêmico (B). Condições experimentais: Inj. = 250 °C, Det. = 275 °C, $T_i = 90$ °C, $T_f = 180$ °C, $\Delta_{aq} = 3$ °C/min, Pressão do $H_2 = 85$ kPa. 65
- Figura 21** – Cromatograma do 2-(4-clorofenoxi)propanoato de metila (**39**) obtido a partir do ácido remanescente da síntese enzimática (A) e do padrão racêmico (B). Condições experimentais: Inj. = 250 °C, Det. = 275 °C, $T_i = 90$ °C, $T_f = 180$ °C, $\Delta_{aq} = 3$ °C/min, Pressão do $H_2 = 85$ kPa. 66
- Figura 22** – Curvas geradas por computador que descrevem a seletividade de CRL na resolução cinética de 1.[161] (1a) Formação de **37** com CRL livre; (1b) formação de **37** com CRL/PEO; (2a) formação de **38** com CRL/livre; (2b) formação de **38** com CRL/PEO. 66
- Figura 23-** Aminólise enantiosseletiva de (R,S)- hidroxifenilacetato de metila com 1-butilamina e 1-octilamina catalisada por CAL. 68
- Figura 24** – Cromatograma mostrando a separação dos enantiômeros de **16** e **40** por CGQ após 48h de reação. Condições experimentais: Inj. = 250 °C, Det. = 275 °C, programação: 80°C 5 °C/min 140 °C 3°C/min 220 °C, split 200:1, Pressão do $H_2 = 75$ kPa. 69
- Figura 25**– Curvas geradas por computador que descrevem a seletividade de CAL na resolução cinética de **16** com 1-butilamina em hexano[161]. 71
- Figura 26-** Reação de aminólise catalisada por CAL de (R,S)-acetiloxifenilacetato de metila com aminas primárias. 74
- Figura 27** – Espectro de RMN 1H da mistura reacional da reação de aminólise entre **17** e 1-octilamina com CAL após 12 horas, ($CDCl_3$, 200 MHz). 74
- Figura 28** – Resolução do (R,S)-ácido hidroxifenilacético usando PSL livre ou imobilizada. a) através de reação de esterificação de **2** e b) reação de acilação enantiosseletiva de **16**. Condições experimentais: a) 5 mmol de **2** e 15 mmol de 1-pentanol, 500 mg (PSL ou CAL), 30 mL de solvente, $T = 25$ °C e b) 1,5 mmol de **16** e 15 mmol de acetato de vinila, 100 mg de PSL, 30 mL de solvente, $T = 25$ °C. 76
- Figura 29** – Influência dos solventes e do tempo na acilação enantiosseletiva de (R,S)-hidroxifenilacetato de metila catalisada por PSL livre e imobilizada em filme de PEO. . 80

Figura 30 – Esterificação enantiosseletiva do ácido 2-bromopentanóico catalisada por lipases.	85
Figura 31 – Cromatograma do 2-bromopentanoato de butila obtido com a CRL imobilizada em gel de ágar com ee de 22%. Condições experimentais: Inj. = 250 °C, Det. = 275 °C, $T_i = 90$ °C, $T_f = 180$ °C, $\Delta_{aq} = 3$ °C/min, Pressão do $H_2 = 85$ kPa.	86
Figura 32 - Esterificação enantiosseletiva do ácido 2-bromoexanóico catalisada por lipases.	87
Figura 33 - Esterificação enantiosseletiva do ácido 2-bromooctanóico catalisada por lipases.	89
Figura 34 – Esterificação enantiosseletiva do ácido 2-bromoexadecanóico catalisada por lipases.	91
Figura 35 – Espectro parcial de uma mistura reacional (6 , 49 e 1-pentanol), mostrando como obter a conversão de uma reação.	91
Figura 36 - Espectros parciais de RMN ¹ H de (\pm)- 6 na presença do complexo calix[6]/S-PEA a várias temperaturas (CDCl ₃ , 500 MHz).	96
Figura 37 - Espectros parciais de RMN de ¹ H (500 MHz, CDCl ₃ , 45 °C) de 6 na presença do complexo calix[6]/S-PEA. a) racemato; b) racemato após irradiação do H _{β} ; c) e d) quirais – produtos de biotransformação com lipases após irradiação do H _{β} (Entradas 10 e 7 da Tabela 18, respectivamente).	96
Figura 38 - Resolução do ácido 2-metilpentanóico através de reação de esterificação catalisada por lipases.	99
Figura 39 - Aminólise enantiosseletiva de aminas racêmicas utilizando CAL como catalisador e acetato de etila como agente acilante.	102
Figura 40 - Espectro de RMN ¹ H do meio reacional de 12 e acetato de etila (CDCl ₃ 200 MHz).	103
Figura 41 - Cromatograma parcial de (1-feniletil)acetamida (23) obtido em CGQ. a) racemato; b) S- 23 e c) R- 23 (obtida via enzimática). P $H_2 = 75$ KPa, $T_i = 250$ °C, Det. = 280°C, 90 °C 5°C/min 150°C (5 min) 3 °C/min 200°C. (R,S)-	105
Figura 42 – Regra empírica que prediz a enantiopreferência de lipases entre álcoois secundários e aminas do tipo NH ₂ CHRR1. A lipase favorece o enantiômero com a forma mostrada onde L é o substituinte grande tal como o grupo fenila e M um substituinte médio tal como o grupo metila [181].	106

Figura 43 – Atividade antinociceptiva dos ácidos 2-bromoalcanóicos sobre o modelo de contorções abdominais em camundongos induzidas pelo ácido acético por via intraperitoneal.....	109
Figura 44 – Atividade antinociceptiva do ácido hexadecanóico sobre o modelo de contorções abdominais em camundongos induzidas pelo ácido acético por via intraperitoneal.....	110
Figura 45 - Visualização da atividade antinociceptiva dos compostos de 3, 4, 5, 6 e 29 no modelo de dor induzido pelo ácido acético em camundongos comparados como a aspirina e acetaminofeno.....	110
Figura 46 – Atividade antinociceptiva de 16 e derivados amidas enantiomericamente puras (33 e 34) e racêmicas (30 a 32) sobre a dor induzida pelo ácido acético por via intraperitoneal.....	112
Figura 47 - Visualização da atividade antinociceptiva dos compostos 30 a 34 no modelo de contorções abdominais em camundongos induzidas pelo ácido acético comparados com a aspirina e o acetaminofeno.	113

Lista de Tabelas

Tabela 1- Classificação das enzimas segundo a IUBMB.	15
Tabela 2 - Resolução de ácidos e derivados racêmicos através de reações de esterificação, transesterificação e hidrólise catalisada por lipases.	23
Tabela 3- Amidas e aminas enantiomericamente puras obtidas através de reações catalisadas por lipases.....	28
Tabela 4 – Compostos racêmicos submetidos à resolução cinética enzimática.	38
Tabela 5 – Compostos testados no modelo das contorções abdominais em camundongos induzidas pelo ácido acético (0,6 %).	55
Tabela 6 - Número de identificação dos compostos usados na tese.	58
Tabela 7- Resolução cinética do 2-(4-clorofenoxi)propanoato de metila por aminólise enantiosseletiva catalisada por CAL.....	61
Tabela 8- Efeitos da cadeia alquílica do álcool na resolução de 1 através de reação de esterificação catalisada por CRL livre (CRL/livre) e imobilizada em PEO (CRL/PEO)....	63
Tabela 9- Efeito do solvente na resolução de (R,S)-2-hidroxi(fenil)acetato de metila com 1-butilamina catalisada pela CAL.	70
Tabela 10- Dados obtidos da reação de aminólise do (R,S)-hidroxi(fenil)acetato de metila com 1-octilamina.	72
Tabela 11- Influência de solventes na atividade catalítica de PSL imobilizada e livre na acilação catalítica de (R,S)-hidroxi(fenil)acetato de metila com acetado de vinila.	79
Tabela 12 – Efeito da temperatura na reação de acilação de 16 catalisada por PSL imobilizada em filme de PEO.....	81
Tabela 13 – Aplicação da metodologia de acetilação usando PSL livre e imobilizada em escala de 1g.....	82
Tabela 14 – Resultados das reutilizações da PSL imobilizada em filme de PEO na reação de acilação de (R,S)-hidroxi(fenil)acetato de metila.	83
Tabela 15 - Dados obtidos para a reação de esterificação de 3 com 1-butanol catalisada por lipases.	86
Tabela 16- Dados obtidos da reação de esterificação de 4 com 1-butanol e 1-hexanol catalisada por lipases.	88
Tabela 17- Dados obtidos para a reação de esterificação de 5 com 1-butanol catalisada por PSL.	90

Tabela 18- Dados obtidos para a reação de esterificação de 6 com 1-butanol catalisada por lipases na forma livre e imobilizada.....	91
Tabela 19- Discriminação quiral do H ₂ de (±)- 6 na presença de seletores quirais.....	95
Tabela 20 - Dados obtidos da reação de esterificação de 8 com 1-butanol catalisada por lipases.....	99
Tabela 21- Valores de porcentagem de conversão, eep e ees para as reações de aminólise catalisada pela lipase de <i>Candida antarctica</i>	104
Tabela 22 – Valores de DI ₅₀ e inibição máxima dos compostos estudados.....	108

Lista de Abreviaturas

Δ_{aq} = taxa de aquecimento

$[\alpha]$ = rotação ótica específica

Asp = ácido aspártico ou aspartato

CAL = lipase de *Candida antarctica*

CDAs = agentes derivatizantes quirais

CDPM = ciclodextrinas permetiladas

CG = cromatografia gasosa

CGQ = cromatografia gasosa com fase quiral

CLAE = cromatografia líquida de alta eficiência

CLSRs = reagentes de deslocamento lantanídicos quirais

CRL = lipase de *Candida rugosa*

CSAs = agentes de solvatação quiral

Glu = ácido glutâmico ou glutamato

Det. = detector

E = razão enantiomérica

c = conversão

eep = excesso enantiomérico do produto

eep = excesso enantiomérico do substrato

EC = Enzyme Commission

Enz = enzima

Eudragit S100 = copolímero de metacrilato e ácido metacrílico

FID = detector por ionização de chama

His = histidina

Inj. = injetor

IUBMB = União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular

PEO = poli-óxido de etileno

PSL = lipase de *Pseudomonas sp.*

RMN¹H = ressonância magnética nuclear de hidrogênio

Ser = serina

S-PEA = (S)-(-)-1-feniletilamina

SQ = seletores quirais

t.a. = temperatura ambiente

tr = tempo de retenção

T_f = temperatura final

T_i = temperatura inicial

m = multiplete

t = tripleto

s = singleto

sl = singleto largo

q = quarteto

dt = duplo tripleto

J = constante de acoplamento

IV = Espectrofotometria no infravermelho

PH₂ = pressão do gás hidrogênio usando na CGQ

i.p. = intraperitoneal

n.d = não determinado

RESUMO

QUEIROZ, Neide. Síntese Enantiosseletiva de Amidas e Ésteres Catalisada por Lipases. Florianópolis, 2002. 152f. Tese (Doutorado em Química Orgânica) – Programa de Pós-graduação em Química, UFSC.

Orientadora: Maria da Graça Nascimento

Defesa: 20/12/2002

Os químicos, procurando sintetizar substâncias enantiopuras, dependem da disponibilidade de materiais de partida quirais. Neste trabalho foi pesquisada a obtenção de ácidos, ésteres, aminas e amidas enantiomericamente puros, através da resolução de ácidos e aminas racêmicos. Dentre as resoluções de ácidos racêmicos, o mais explorado foi o ácido hidróxi(fenil)acético por possuir um grupo hidroxila e um grupo carboxílico. Para obter seus enantiômeros opticamente puros, foram realizadas reações de esterificação do grupo carboxílico e acilação da hidroxila. As reações de esterificação com 1-pentanol forneceram uma conversão em éster de 10 % usando lipase de *Pseudomonas sp.* imobilizada em gel de ágar (PSL/ágar) após 336h e de 26 % utilizando lipase de *Candida antarctica* (CAL) após 840h a 25 °C. As reações de acilação foram realizadas após derivatização prévia do ácido em seu éster metílico. O éster foi acilado usando acetato de vinila, PSL livre ou imobilizada em filme de poli(óxido)etileno (PSL/PEO) ou em gel de ágar, em vários solventes orgânicos. Excelentes resultados foram obtidos usando PSL/PEO e éter isopropílico como solvente. Para este sistema, os excessos enantioméricos (ee) para o substrato e produto foram > 99% com conversão de 50%. A enantiosseletividade (E) alcançada foi excelente (E = 1057) contra um E de 230 usando PSL livre, com enantiopreferência para o isômero S. Os demais ácidos submetidos à resolução enzimática através de reação de esterificação com álcoois aquirais foram 2 e 3-alquilalcanóicos e 2-bromoalcanóicos. Neste processo empregaram-se lipases livres e imobilizadas. Os resultados alcançados para a resolução destes ácidos foram modestos, com E variando 1,2 a 10. Também foi avaliada a aminólise biocatalítica de (R,S)-hidróxi(fenil)acetato de metila e (R,S)-2-(4-clorofenoxi)propanoato de metila com 1-butilamina e 1-octilamina catalisada pela CAL. As correspondentes amidas foram obtidas com E variando de 1,2 a 2,7, sendo o enantiômero R, o mais reativo. Na resolução das aminas racêmicas (1-etilpentilamina, 1-metilheptilamina, 1-metilhexilamina, 1-feniletilamina, 1,2-dimetilpropilamina, 2-etilhexilamina) através da aminólise catalisada por CAL, observou-se que o grau de enantiosseletividade foi dependente da amina de partida e que R foi o enantiômero mais reativo. As aminas discriminadas enantiomericamente foram a 1-metilheptilamina, 1-metilhexilamina, 1-feniletilamina e 1,2-dimetilpropilamina, com valores de E variando 24 a 79. Além disso, alguns compostos racêmicos (ácidos, ésteres e amidas) e enantiomericamente puros (amidas) foram avaliados em teste farmacológico. Os ácidos 2-bromoalcanóicos, hidróxi(fenil)acetato de metila e seus derivados amidas, administrados por via intraperitoneal foram capazes de reduzir significativamente a nocicepção causada pelo ácido acético em camundongos.

Palavras-chave: lipases, imobilização de enzimas, enantiosseletividade enzimática, ésteres e amidas quirais, atividade antinociceptiva.

ABSTRACT

QUEIROZ, Neide. Síntese Enantiosseletiva de Amidas e Ésteres Catalisada por Lipases. Florianópolis, 2002. 152f. Tese (Doutorado em Química Orgânica) – Programa de Pós-graduação em Química, UFSC.

Orientadora: Maria da Graça Nascimento

Defesa: 20/12/2002

In order to synthesize enantiopure compounds, the chemists depend on the disponibility of chiral materials. In this work, it was investigated the production of acids, amines and amides optically pure, via enzymatic resolution of racemic acids and amines. Hydroxy(phenyl) acetic acid was the compound investigated more extensively due to the presence of hydroxy and carboxyl group. To obtain optically pure enantiomers, esterification of carboxylic acid and acylation of hydroxyl group catalyzed by lipases was accomplished. The esterification reactions with n-pentanol yielded the ester in 10% conversion using *Pseudomonas sp* lipase immobilized in agar gel (PSL/agar) after 336 h, and 26% using *Candida antarctica* lipase (CAL) after 840 h reaction at 25 °C. The acylation reactions were realized after acid derivatization to the corresponding methyl ester. The methyl esters were acylated with vinyl acetate, catalyzed by free PSL or immobilized in poly (ethylene oxide) (PEO) and in agar gel, in various organic solvents. Excellent results were obtained using PSL immobilized in PEO and isopropyl ether as solvent. For this system, the enantiomeric excess (ee) for substrate and product were >99% with conversion near 50%. The enantiomeric ratio was also excellent, being of 1057. For the system PSL/free an E value of 230 was obtained. In both cases, the enantioselectivity was for the S isomer. 2- and 3-Alkylalkanoic and 2-bromoalkanoic acids were also submitted to enzymatic resolution using free or immobilized lipase. No enzymatic recognition was observed for 2-alkylalkanoic acids. However, 2-bromoalkanoic acids were discriminated using PSL and CAL, but still showed a low enantioselectivity with E values of 1.2-10. The biocatalytic aminolysis of methyl (R,S)-hydroxy(phenyl)-acetate and methyl (R,S)-2-chlorophenoxy propanoate with 1-butylamine and 1-octylamine, in hexane at 25 °C, was studied using CAL. The corresponding amides were obtained with low enantioselectivity (E= 1.2-2.7) and showed enantioselectivity for R-isomer. In the enzymatic resolution of racemic amines 1-ethylpentylamine, 1-methylhexylamine, 1-phenylethylamine, 1,2-dimethylpropylamine and 2-ethylhexylamine catalyzed by CAL and PSL, the enantioselectivity was highly dependent on the amine structure. E values of 24-79 were obtained using CAL as biocatalyst, forming only R-isomer. Biological activity of some racemic compounds (acids, esters and amides) and optically pure (amides) were evaluated in pharmacological tests. The results suggested that 2-bromoalkylalkanoic acids, methyl hydroxy(phenyl)acetate and some of its derivatives had antinociceptive activity and that these compounds might be used to obtain new substances with analgesic potential.

Key words: lipases, enzyme immobilization, enzymatic enantioselective, chiral esters and amides, antinociceptive.

1 INTRODUÇÃO

Nós vivemos em um mundo quiral e nossos corpos também estão em um ambiente quiral. O processo biológico fundamental pelo qual nossos corpos são mantidos e crescem são controlados pela quiralidade. As enzimas envolvidas na digestão e metabolismo, por exemplo, são catalisadores quirais que interagem de forma diferenciada com os diferentes enantiômeros. Considere por exemplo, os enantiômeros da carvona, onde a forma **R** é o componente principal do óleo de hortelã, enquanto que a **S** é o componente principal das sementes do cominho. Os dois enantiômeros cheiram diferentemente para os humanos em qualquer proporção.

O desenvolvimento de métodos eficazes para obter separadamente os enantiômeros de um composto racêmico é fundamental, principalmente para os fármacos quirais. Um enantiômero pode ser obtido de maneira usual através da resolução de misturas racêmicas e de sínteses assimétricas. Em ambos os métodos, o uso de enzimas tem crescido significativamente. Certamente, os métodos bioquímicos possuem suas limitações perante aos clássicos da química orgânica, mas representam uma ferramenta sintética poderosa para complementar outras metodologias na química orgânica sintética moderna.

A separação de enantiômeros usando enzima é chamada de “**resolução enzimática**”. As enzimas podem ser utilizadas na sua forma bruta, purificadas ou imobilizadas.

Nesta tese será abordado o emprego das lipases livres e/ou imobilizadas em filme de poli-óxido etileno (PEO) e em gel de ágar na resolução de amins e ácidos racêmicos. Também foi avaliado o potencial antinociceptivo de ácidos 2-bromoalcanóicos e de amidas derivadas do ácido hidroxifenilacético.

1.1 Relevância da quiralidade em química orgânica

A história da quiralidade na química orgânica começou em 1815 quando o físico francês Jean Baptiste Biot descobriu que certas substâncias foram hábeis para desviar o plano da luz polarizada passada através delas, um fenômeno chamado de atividade ótica. Parte do enigma foi resolvido quando Louis Pasteur separou os cristais de uma mistura racêmica de um sal de ácido tartárico e reconheceu que a solução das imagens não sobreponíveis desviavam a luz plano polarizada em direções opostas [1].

Denomina-se quiral, qualquer molécula ou objeto que não seja sobreponível à sua imagem especular. Muitos dos compostos associados com os organismos vivos são quirais, como por exemplo DNA, enzimas, anticorpos e hormônios. Por esta razão os enantiômeros de um composto podem apresentar atividade biológica distinta. Por exemplo, os enantiômeros do limoneno apresentam odores diferentes, mesmo sendo formados naturalmente. O enantiômero *S* tem aroma de limão, enquanto que o *R* tem aroma de laranja. A distinção no odor ocorre porque os receptores também são constituídos de moléculas quirais e reconhecem a diferença entre os enantiômeros.

Nos fármacos quirais, somente um dos enantiômeros é o responsável pela atividade de interesse e em certos casos o outro enantiômero pode ser prejudicial ou inativo. O exemplo mais expressivo que marcou a história da química biológica foi a tragédia da talidomida, a qual era prescrita na forma racêmica. O enantiômero *R* era efetivo contra náusea matutina de mulheres grávidas, enquanto que o *S* teve efeitos devastadores que causaram a má formação em muitos fetos. Esta teoria está sendo questionada, particularmente, porque os dois enantiômeros da talidomida facilmente podem ser interconvertidos no organismo.

As estruturas dos enantiômeros do limoneno, talidomida e de outras substâncias cujas características são função direta de sua configuração são mostrados na Figura 1.

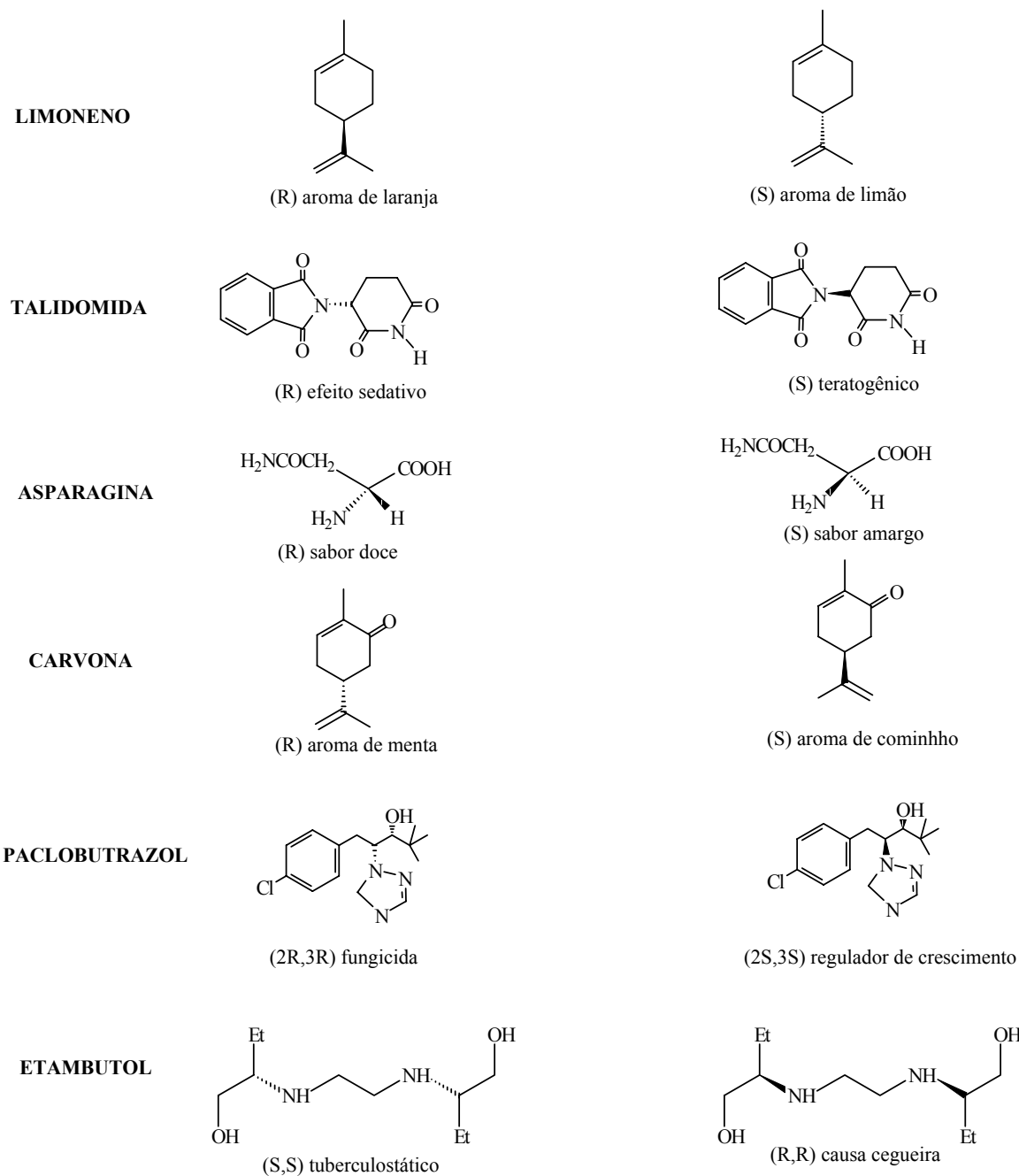


Figura 1- Enantiômeros de substâncias cujas características biológicas são função direta de sua configuração [2].

Obviamente há uma forte demanda para obter enantiômeros puros devido ao fato que para muitas aplicações a forma racêmica já não é aceita. A busca por métodos eficazes para produzir compostos enantiomericamente puros indiscutivelmente aumentará [3]. Em 2001 o prêmio Nobel em química foi para as descobertas feitas pelos químicos, **William S.**

Kowles, Ryoji Noyori e K. Barry Sharpless pelos seus desenvolvimentos na síntese catalítica assimétrica. Os trabalhos destes cientistas tiveram um grande impacto, tanto na pesquisa acadêmica como nas indústrias farmacêuticas, pois possibilitaram o desenvolvimento de fármacos e outras substâncias biologicamente ativas com pureza enantiomérica [4].

Um enantiômero de um produto quiral pode ser preparado por três caminhos principais, sendo através do uso de um composto quiral, da separação de materiais racêmicos e de sínteses assimétricas, Figura 2 [5].

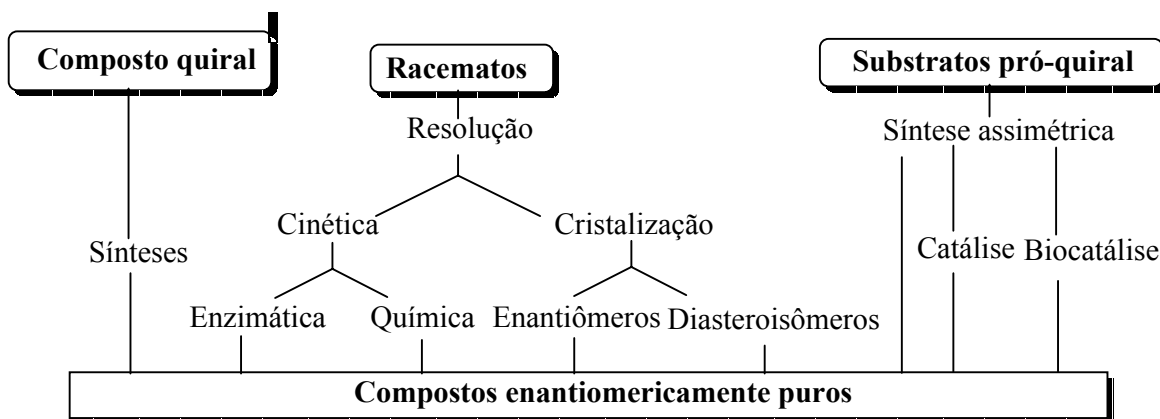


Figura 2- Rotas para obter compostos enantiomericamente puros [5].

O composto quiral se refere a produtos naturais prontamente disponíveis ou seja, isolados de fontes naturais ou produzidas através de fermentação. Estes compostos podem ser convertidos em sintéticos através de manipulações químicas [6]. Quando um material de partida é um produto natural, na maioria dos casos somente um dos enantiômeros está disponível. Conseqüentemente, muitos enantiômeros desejados devem ser preparados por caminhos alternativos. Além disso, para aplicações em grande escala nem sempre é possível encontrar o material de partida desejado de uma fonte natural.

Apesar de desenvolvimentos revolucionários terem sido feitos em sínteses assimétricas catalíticas, a resolução de racematos ainda é a metodologia mais importante para a síntese industrial de produtos enantiopuros [7]. Os métodos para resolução incluem

resolução cinética química ou enzimática, ou a clássica via cristalização preferencial ou separação de diastereoisômeros.

Vários fatores influenciam na escolha do método tais como o preço do material de partida, número de etapas sintéticas, disponibilidade de produção tecnológica, etc.. As enzimas como catalisadores quirais possuem um papel importante nos métodos citados para obter um composto enantiomericamente puro e também estão envolvidas na produção de compostos quirais na natureza, nas sínteses assimétricas e na resolução de racematos.

1.2 Resolução cinética enzimática

Um substrato racêmico quando é submetido a uma reação enzimática sofre discriminação quiral entre os enantiômeros. Devido a quiralidade da enzima, o enantiômero que melhor se ajusta no seu sítio ativo é convertido em uma velocidade mais alta. Para assegurar uma alta seletividade para ambos os enantiômeros, a diferença na velocidade de reação dos enantiômeros individuais deve ser a maior possível. Em alguns casos ideais a velocidade é tão extrema, que o “bom” enantiômero é transformado rapidamente e o outro não é convertido. Então a reação enzimática cessa automaticamente em 50% de conversão, quando já não existe mais o enantiômero reativo. Como consequência, cada enantiômero pode ser obtido somente com 50% de rendimento em uma resolução enzimática [8].

Na prática a maior parte das resoluções enzimáticas de substratos racêmicos não mostra uma situação ideal e a diferença na razão das velocidades de conversão dos enantiômeros não é infinita, mas mensurável. O que se observa nestes casos, não é uma parada total da reação em 50% de conversão, mas uma acentuada diminuição na

velocidade próxima a este valor. Em tais casos um enantiômero depara com algumas dependências cruciais:

- A velocidade de transformação de cada enantiômero varia com o grau de conversão (c), logo a razão dos dois enantiômeros não permanece constante durante a reação.
- Os excessos enantioméricos dos substratos (ees) e produtos (eep) tornam-se uma função da conversão (c).

Um tratamento muito útil das resoluções cinéticas enzimáticas, descrevendo a dependência da c, ees e eep foi desenvolvido por Sih em 1982 sob a base teórica de Sharpless e K. Fajans. O parâmetro que indica a discriminação de uma enzima entre dois enantiômeros foi introduzido como **Razão Enantiomérica (E)**, sendo somente determinado pelo ambiente do sistema [8].

Para reações irreversíveis, tais como hidrólise de éster em meio aquoso ou reações de transferência acila usando ésteres enólicos ou anidridos ácidos, a conversão e a razão enantiomérica podem ser calculadas a partir dos valores de ees e de eep, com o uso das Equações 1, 2 e 3 [8-10].

$$c = \frac{ees}{ees + eep} \quad \text{Equação 1}$$

$$E = \frac{\ln[(1-c)(1-ees)]}{\ln[(1-c)(1+ees)]} \quad \text{Equação 2}$$

$$E = \frac{\ln[1-c(1+eep)]}{\ln[1-c(1-eep)]} \quad \text{Equação 3}$$

Onde:

c = conversão
 ee = excesso enantiomérico
 s = substrato
 p = produto
 E = razão enantiomérica

As Equações 1, 2 e 3 fornecem resultados confiáveis com exceção para extensões de conversões muito baixas e muito altas, onde uma medida precisa é restringida por erros derivados de manipulação de amostra. Em tais casos, é recomendado usar a Equação 4, porque somente valores de ees e eep necessitam ser medidos. Os últimos termos são quantidades relativas em contraste com a conversão, que é uma quantidade absoluta [11].

$$E = \ln\left[\frac{(1 - ees)}{(1 + ees/eep)}\right] / \ln\left[\frac{(1 + ees)}{(1 + ees/eep)}\right] \quad \text{Equação 4}$$

A situação torna mais complicada quando a reação é reversível. Este é o caso se a concentração do nucleófilo que ataca o intermediário acil-enzima está limitado e não em excesso (por exemplo, água em uma reação hidrolítica). Nesta situação, a constante de equilíbrio da reação, negligenciada na reação irreversível, tem um papel importante e, portanto tem que ser determinada.

As equações 5, 6 e 7 relacionam a seletividade da reação (E), a conversão (c), as purezas óticas do substrato (ees) e produto (eep) e também a constante de equilíbrio K.

$$K = \frac{1 - c_e}{c_e} \quad \text{Equação 5}$$

$$E = \frac{\ln[1 - (1 + K) c (1 + eep)]}{\ln[1 - (1 + K) c (1 - eep)]} \quad \text{Equação 6}$$

$$E = \frac{\ln[1 - (1 + K)(c + ees \{1 - c\})]}{\ln[1 - (1 + K)(c - ees \{1 - c\})]} \quad \text{Equação 7}$$

Onde:

c_e = conversão no equilíbrio

ee = excesso enantiomérico

s = substrato

p = produto

E = razão enantiomérica

K = constante de equilíbrio

A Figura 3 mostra o comportamento das curvas de pureza enantiomérica para o produto e substrato em uma resolução enzimática, seguindo uma reação do tipo reversível. A curva do produto assemelha-se de uma reação irreversível. Porém, uma significativa diferença é encontrada na curva do substrato, quando comparada a de uma reação irreversível, particularmente em taxas de conversão maiores. Quando a reação reversa começa a acontecer em uma extensão significativa (a qual depende da posição do equilíbrio), as purezas enantioméricas do substrato e produto são diminuídas [9, 10].

Para melhorar a pureza ótica do substrato e produto em resoluções enzimáticas reversíveis desloca-se o equilíbrio para obter uma reação irreversível.

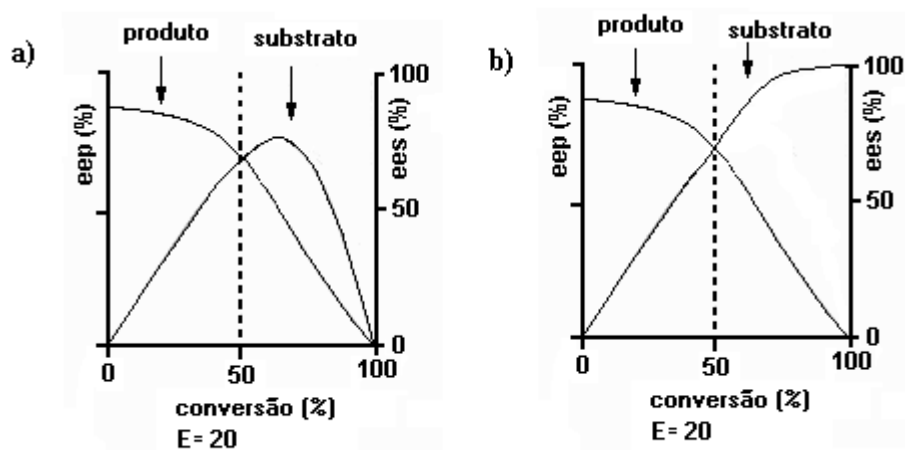


Figura 3- Curvas da pureza enantiomérica do substrato e produto ao longo de uma resolução cinética enzimática. a) reação reversível e b) reação irreversível.

Os valores de razões enantioméricas menores do que 15 são inaceitáveis para propósitos práticos. Podem ser consideradas moderadas a bom de 15-30 e acima destes valores são excelentes. Deve ser enfatizado que $E > 200$ não podem ser determinados com precisão devido a imprecisões emergidas dos métodos das determinações do excesso enantioméricos (ex. RMN, CLAE ou CG), onde uma pequena variação do ees ou eep causa uma mudança significativa no valor numérico de E [12].

1.3 Métodos analíticos para a determinação do excesso enantiomérico

A similaridade estrutural entre os pares de enantiômeros reflete-se igualmente nas suas propriedades físicas e químicas na ausência de influência quiral externa.

O desenvolvimento de métodos de análise estereoquímica sensível, especialmente os cromatográficos de alta resolução para a determinação da pureza enantiomérica, foi fundamental para o desenvolvimento da síntese assimétrica, pois permite a avaliação precisa do grau de seletividade obtido em uma determinada reação [13].

Um excesso enantiomérico de 100% corresponde a um composto enantiomericamente puro. A reação que fornece esta pureza é chamada de enantioespecífica representado uma situação ideal que raramente é atingida na prática. Jan Backvall e colaboradores, combinaram a ação de uma enzima e um catalisador de metal de transição (Ru_2L), para a produção de um éster com pureza enantiomérica de 100%, Figura 4 [14]. Neste processo, a lipase catalisa a acilação de um dos enantiômeros com maior rapidez do que do outro. O catalisador metálico continuamente racemiza o enantiômero não desejado do álcool, o qual novamente é acilado por via enzimática. No final do processo obtém-se apenas o enantiômero desejado.

Um excesso enantiomérico de 0% corresponde a uma mistura de 1:1 de enantiômeros, conhecida como mistura racêmica ou racemato, denotada pelo prefixo (\pm).

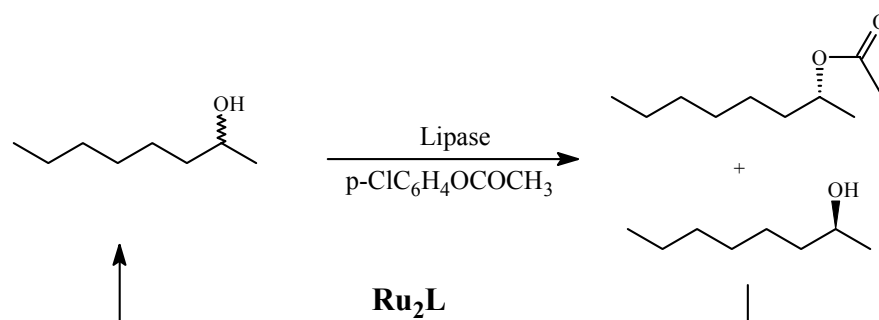


Figura 4- Exemplo de reação com excesso enantiomérico de 100%. L = ligante.

1.3.1 Método polarimétrico

O método clássico para determinar o excesso enantiomérico de uma amostra é medir sua pureza ótica através de um polarímetro. A rotação ótica específica, $[\alpha]$, é uma grandeza característica de cada composto oticamente ativo, Equação 8.

$$[\alpha]_t^D = \frac{100 \cdot \alpha_o}{c \cdot l} \quad \text{Equação 8}$$

Onde:

α_o = rotação ótica observada

l = comprimento da cela em dm

c = concentração em g por 100 cm³ de solvente

t = temperatura (Celsius)

D = comprimento da linha de emissão de sódio (589 nm)

A rotação da luz plana polarizada é igual para ambos enantiômeros, mas com sinal contrário. Na literatura encontram-se valores de $[\alpha]$ para vários compostos oticamente ativos. Esse dado não só é utilizado como critério de identificação de uma substância, mas também para avaliar o excesso enantiomérico ou a sua porcentagem em uma mistura, Equação 9.

$$ee = \frac{\text{rotação específica observada}}{\text{rotação específica do enantiômero puro}} \times 100 \quad \text{Equação 9}$$

Embora este método seja uma técnica geralmente usada para determinar o excesso enantiomérico de um composto, este possui algumas desvantagens:

- A amostra sob a análise deve ser homogênea e destituída de traços de impurezas quirais.
- Para amostras com baixo poder de rotação ótica, grande quantidade de amostras pode ser requerida para produzir medidas de rotação ótica mensurável.
- Há muitos casos na literatura científica onde a rotação ótica absoluta foi reportada incorretamente ou interpretada errada [13].

- As medidas de rotação ótica são particularmente sensíveis a temperatura e a concentração. Os erros nas medidas de rotações destes efeitos combinados são estimados pelo menos de $\pm 4\%$.

A variação de temperatura é causada pela mudança no volume da amostra líquida ou das soluções resultando em uma mudança direta no número de moléculas quirais no caminho ótico. A rotação ótica específica não é sempre linearmente proporcional a concentração. As interações entre as moléculas de solutos podem conduzir a rotações óticas não lineares em solução concentrada, portanto é essencial que ao comparar valores de rotação ótica, os mesmos tenham sido obtidos na mesma concentração da solução e no mesmo solvente. A concentração da solução deve ser relatada ao registrar valores de pureza ótica para novos compostos.

1.3.2 Cromatografia gasosa e líquida

A introdução e desenvolvimento de fases estacionárias quirais para cromatografia tornou-se um instrumento analítico para detecção, separação e quantificação de estereoisômeros óticos.

1.3.2.1 Cromatografia gasosa

Um método atrativo para a análise de misturas enantioméricas é o uso da cromatografia gasosa (CG) com fase estacionária quiral (CGQ). Este método não é afetado por traços de impurezas, é rápido e simples para ser realizado. A premissa sobre a qual o método está baseado é que a associação molecular pode levar reconhecimento quiral suficiente que resulte na resolução enantiomérica. O método usa uma fase estacionária quiral que contém um agente de resolução auxiliar de alta pureza enantiomérica. Os

enantiômeros sofrem interações diastereoméricas rápidas e reversíveis com a fase estacionária, sendo eluído em velocidades diferentes.

A amostra deve ser suficientemente volátil e estável termicamente, e, é claro, deve ser resolvida quantitativamente sobre a fase quiral. Ocasionalmente, isto significa que as misturas enantioméricas precisam ser derivatizadas (com um reagente aquiral) antes da análise por CG. Neste caso deve ser verificado se não houve racemização durante a derivatização.

Após resolução quantitativa dos enantiômeros sob a fase estacionária quiral ser alcançada, a inspeção do cromatograma fornece diretamente a composição enantiomérica da amostra. Tais medidas podem ser efetuadas com um alto grau de precisão ($\pm 0,05\%$), de forma que dados precisos são obtidos, sendo particularmente útil para analisar misturas que são altamente enriquecidas, $95\% < ee < 100\%$, ou próximo do limite de racêmico. A resolução dos enantiômeros pela cromatografia confia na diferença entre as energias livres de formação dos intermédios diastereoisoméricos transitórios formados durante a eluição. A designação da configuração absoluta, portanto envolverá a correlação da configuração molecular com a ordem da eluição do enantiômero. O outro fator importante no parâmetro da CG é o da separação do pico, chamado α .

A maioria das aplicações reportadas desta técnica envolve a resolução direta de enantiômeros derivatizados sob fases estacionárias quirais [13].

1.3.2.2 Cromatografia líquida de alta eficiência

A utilização da cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) para determinar a pureza enantiomérica tem sido talvez o método mais importante para a análise de compostos quirais. A separação de enantiômeros, como na CG, requer um agente quiral. O método mais direto e preferido é induzir as interações diastereoméricas dos dois

enantiômeros com a fase quiral estacionária. Os complexos diastereoméricos formados terão estabilidades diferentes, eluindo com tempos diferentes. Uma outra alternativa é usar suporte aquiral e eluir com solvente quiral [13].

1.3.3 Espectroscopia de ressonância magnética nuclear de hidrogênio

1.3.3.1 Reagente de deslocamento químico quiral

Os enantiômeros não podem ser identificados em um meio aquiral por seu espectro de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN¹H) por terem deslocamentos químicos idênticos. Já os diastereoisômeros possuem deslocamentos químicos não equivalentes, o que permite a sua diferenciação no espectro de RMN.

A determinação da pureza enantiomérica requer a intervenção de um auxiliar quiral para converter os enantiômeros em diastereoisômeros. A integração apropriada dos sinais dos diastereoisômeros fornece uma medida da composição diastereoisomérica, podendo ser diretamente relacionado à composição enantiomérica da mistura original.

Alguns auxiliares quirais amplamente usados formam diastereoisômeros (agentes derivatizantes quirais- CDAs) enquanto outros formam complexos diastereoméricos *in situ* com os enantiômeros dos substratos (agentes de solvatação quiral - CSAs e reagentes de deslocamento lantanídeos quirais - CLSRs)[13, 15, 16].

A magnitude do deslocamento químico não equivalente é proporcional ao tamanho do campo magnético aplicado. Com a diminuição da temperatura, na qual o espectro é registrado, pode-se acentuar a anisotropia entre os diastereoisômeros. O uso de solventes apolares tais como benzeno-d₆ ou tolueno-d₈ oferece consideráveis vantagens. Isto efetivamente exclui a aplicação de métodos de RMN para análise da pureza enantiomérica dos substratos que são somente solúveis em solventes polares como DMSO-d₆.

Infelizmente, numerosos compostos farmacologicamente importantes se encaixam nesta categoria. Em tais casos o método de CG quiral ou CLAE pode proporcionar uma alternativa viável[13].

1.4 Enzimas

Uma célula deve realizar milhares de transformações químicas para viver, crescer e reagir no seu meio ambiente. Estas reações raramente acontecem espontaneamente, mas geralmente são catalisadas por enzimas* [17]. Como catalisadores, aumentam a velocidade de uma reação química e não são consumidas durante a reação [18].

O alcance das reações catalisadas por enzimas é muito grande, devido à imensa versatilidade e variedade de enzimas encontradas nos sistemas vivos, tornando necessário introduzir um sistema de classificação. Uma classificação sistemática introduzida pela União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular (IUBMB) dividiu as enzimas em 6 grupos gerais de acordo com a natureza e reação química que catalisam. Cada grupo foi posteriormente dividido em subclasses e sub-subclasses com base na natureza da reação catalisada, Tabela 1 [12, 19].

Para sua identificação individual todas enzimas possuem um código **EC A.B.C.D** onde EC é a abreviatura de “Enzyme Commission”; **A** representa a classe; **B** indica a subclasse; **C** indica a sub-subclasse; **D** é o número individual da enzima em sua sub-subclasse. Os nomes das enzimas e o número de classificação da EC podem ser obtidos pela internet [20]. Por exemplo, o código **EC 3.1.1.3** corresponde a lipase de *Chromobacterium viscosum* onde:

* Enzimas são proteínas com atividade catalítica. No entanto, experiências feitas na década de 1980 revelaram que moléculas de RNA podem também ser enzimas muito ativas. Ainda é polêmico se tais RNAs devam ser chamados de enzimas, ou mereceriam um outro nome, como ribozimas, que os diferenciariam das enzimas de natureza protéica.

3. indica a classe: hidrolase;
 3.1 indica a subclasse: atua sobre as ligações de éster;
 3.1.1 indica a sub-subclasse: hidrolases de ésteres carboxílicos e
 3.1.1.3 indica que é a terceira enzima na sub-subclasse 1.

Tabela 1- Classificação das enzimas segundo a IUBMB.

Classe de enzimas	Algumas subclasses	Reações catalisadas pelas enzimas
1. Oxidoreduases	hidrogenases, oxidases, peroxidases	oxidação e redução: oxigenação de ligações C-H, C-C, C=C, C=O
2. Transferases	transaldolases, transcetolases	transferência de grupos: aldeídico, cetônico, acila, açúcar, fosforila ou metila
3. Hidrolases	esterases, lipases, peptidases	formação e hidrólise de ésteres, amidas, epóxidos, nitrilas e anidridos
4. Liases	descarboxilases, cetoácidiolases	adição e eliminação de pequenas moléculas sobre ligações C=C, C=N, C=O
5. Isomerasas	racemases, epimerases, mutases	isomerizações tais como racemização, epimerização
6. Ligases	sintetases	formação e clivagem de ligações C-O, C-S, C-N, C-C

Na natureza há cerca de 25.000 enzimas, sendo que a IUBMB já reconheceu 3.000. Cerca de 90% deste vasto reservatório de biocatalisadores permanece para ser descoberto e usado. No entanto, somente uma fração destas enzimas já investigada (aproximadamente 300, ou seja 10%) está disponível comercialmente [12]. A grande maioria das enzimas utilizada nas biotransformações em química orgânica é utilizada em sua forma bruta devido a sua disponibilidade, baixo custo e maior estabilidade operacional [21, 22]. As enzimas puras são vendidas por unidade padrão* por terem preços elevados, enquanto que preparações brutas por Kg [12].

* As atividades catalíticas das enzimas são medidas pelo sistema de **unidade padrão**, o "International Unit" (1 I.U. = 1 mmol de substrato transformado por minuto), mas outras unidades tais como nmol/min ou nmol/h também são comuns. Outro sistema de unidade é o Katal (1 Katal = 1 mol s⁻¹ de substrato transformado).

Uma das propriedades das enzimas que as fazem tão importante como ferramenta de pesquisa é a especificidade que exibem em relação às reações que catalisam. Algumas enzimas exibem especificidade absoluta; quer dizer, catalisam somente uma reação em particular. Outras enzimas serão específicas para um tipo particular de ligação química ou grupo funcional. Em geral há quatro tipos distintos de especificidade [23].

- Especificidade absoluta: a enzima catalisará somente uma reação.
- Especificidade de grupo: é a habilidade da enzima dirigir a ação catalítica para um grupo funcional específico na molécula tal como distinguir entre OH ou NH.

- Especificidade de ligação: a enzima atuará sobre um tipo particular de ligação química restante da estrutura molecular.
- Especificidade estereoquímica: a enzima atuará sobre um tipo particular de isômero ótico ou estéreo.

A especificidade é uma característica inerente da catálise enzimática porque a reação acontece em uma pequena área da enzima, denominada de sítio ativo, que contém aminoácidos cujas cadeias laterais formam uma superfície tridimensional complementar ao substrato, na qual o substrato inteiro ou parte pode se fixar [24].

Teoricamente, o sítio ativo pode ser subdividido em sítios de ligações, que incluem os resíduos de aminoácidos que interagem com o substrato e um sítio catalítico, que inclui os resíduos diretamente responsáveis pela catálise. Alguns modelos procuram explicar a especificidade substrato/enzima. O modelo **Chave/Fechadura** prevê um encaixe perfeito do substrato no sítio de ligação, que seria rígido como uma fechadura. O modelo do **Ajuste Induzido** prevê um sítio de ligação não totalmente pré-formado, mas sim moldável à molécula de substrato; a enzima se ajustaria ao substrato na sua presença. Algumas evidências experimentais sugerem um terceiro modelo que combina o ajuste induzido a

uma “torção” da molécula do substrato, que o “ativaria” e o prepararia para a sua transformação em produto [24].

Para explicar a especificidade estereoquímica das enzimas, Ogston em 1948, sugeriu que a formação do complexo enzima/substrato só é possível para um dos enantiômeros, sendo que a configuração correta é definida no sítio ativo por três pontos de interação diferentes,

esta teoria foi chamada “regra dos três pontos”

representada na Figura

5. Os sítios A' e A''

podem representar os

sítios de ligação para R''

e R''', respectivamente e

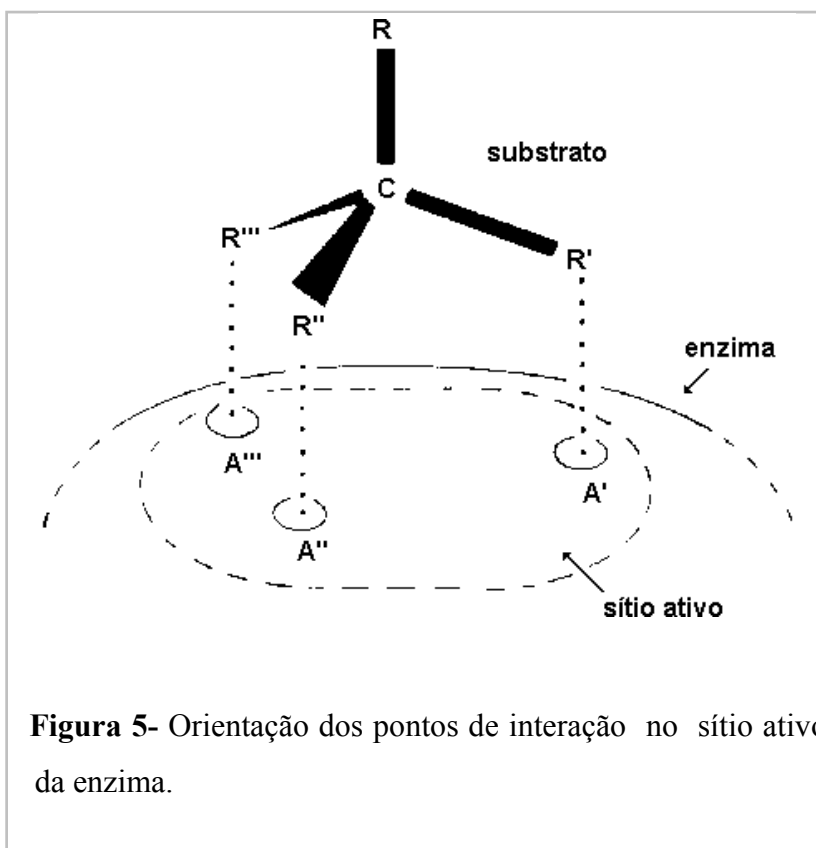
A' um sítio catalítico

para uma reação

envolvendo R'. Assim,

mesmo que R' e R''

sejam quimicamente



idênticos, a assimetria do complexo enzima-substrato mostra que somente R' pode reagir, contanto que o sítio de ligação A''' seja específico para R''' [24].

As enzimas hidrolíticas (proteases, celulasas, amilases e lipases) são as mais freqüentemente usadas na química orgânica, Figura 6. Entre as várias razões que as tornam uma opção particularmente atrativa, pode se citar a ampla disponibilidade, baixo custo, condições suaves de síntese, facilidade de uso porque não necessitam de cofatores e ampla especificidade para substratos [12].

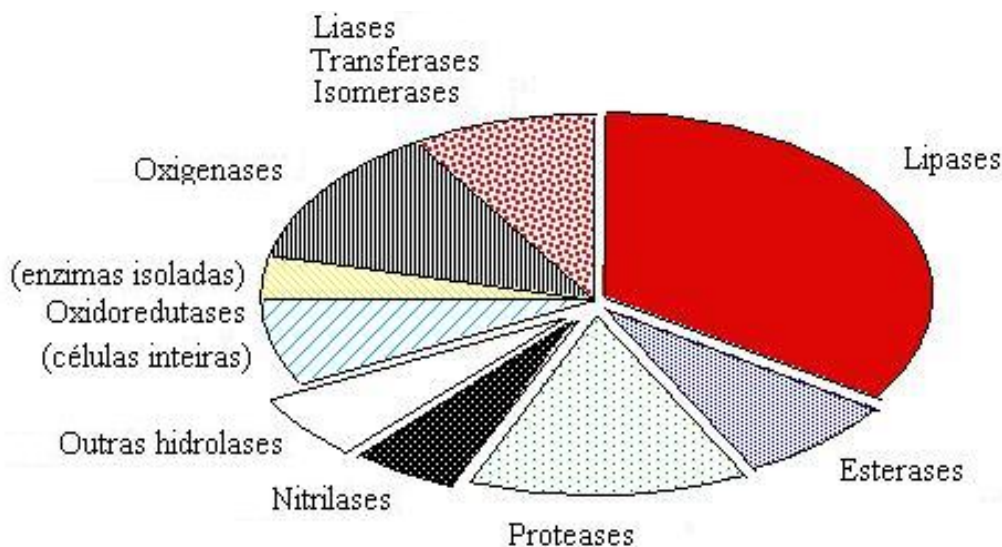


Figura 6- Frequência do uso de enzimas em biotransformações [12].

Uma abordagem mais detalhada será feita para as lipases por se tratar das enzimas utilizadas neste trabalho.

1.5 Lipases em química orgânica

As lipases são enzimas hidrolíticas presentes em diversos organismos, incluindo animais, plantas, fungos e bactérias. Em seu ambiente natural possui a função de catalisar a hidrólise de triacilgliceróis aos correspondentes ácidos graxos e glicerol. Além das funções metabólicas possuem um papel importante na biotecnologia, onde catalisam a hidrólise de óleos e gorduras, síntese de ésteres de ácidos graxos como ingredientes de cosméticos ou surfactantes [25-31] e também na síntese orgânica de compostos enantiomericamente enriquecidos [32-40], tais como intermediários chaves (polióis, álcoois quirais, ácidos carboxílicos quirais e aminas quirais) [22, 33, 34, 41].

Os aspectos básicos sobre mecanismos de catálise das lipases foram elucidados a partir de suas estruturas tridimensionais, na forma nativa e/ou na de complexo enzima/inibidor. Os estudos realizados demonstraram a existência de duas conformações

principais, forma fechada (inativa) e forma aberta (ativa). Na conformação fechada o sítio ativo está totalmente oculto sob um curto segmento helicoidal, formado por uma ou mais pregas denominado tampa “do inglês lid”. Na conformação aberta a tampa é deslocada para fora do sítio ativo, deixando-o totalmente acessível ao solvente e substrato, Figura 7 [42, 43].

Todas as lipases cujas estruturas foram elucidadas são membros da família α , β -hidrolase e possuem uma tríade catalítica constituída dos resíduos de aminoácidos serina, histidina e ácido aspártico ou glutâmico (Ser-His-Asp/Glu).

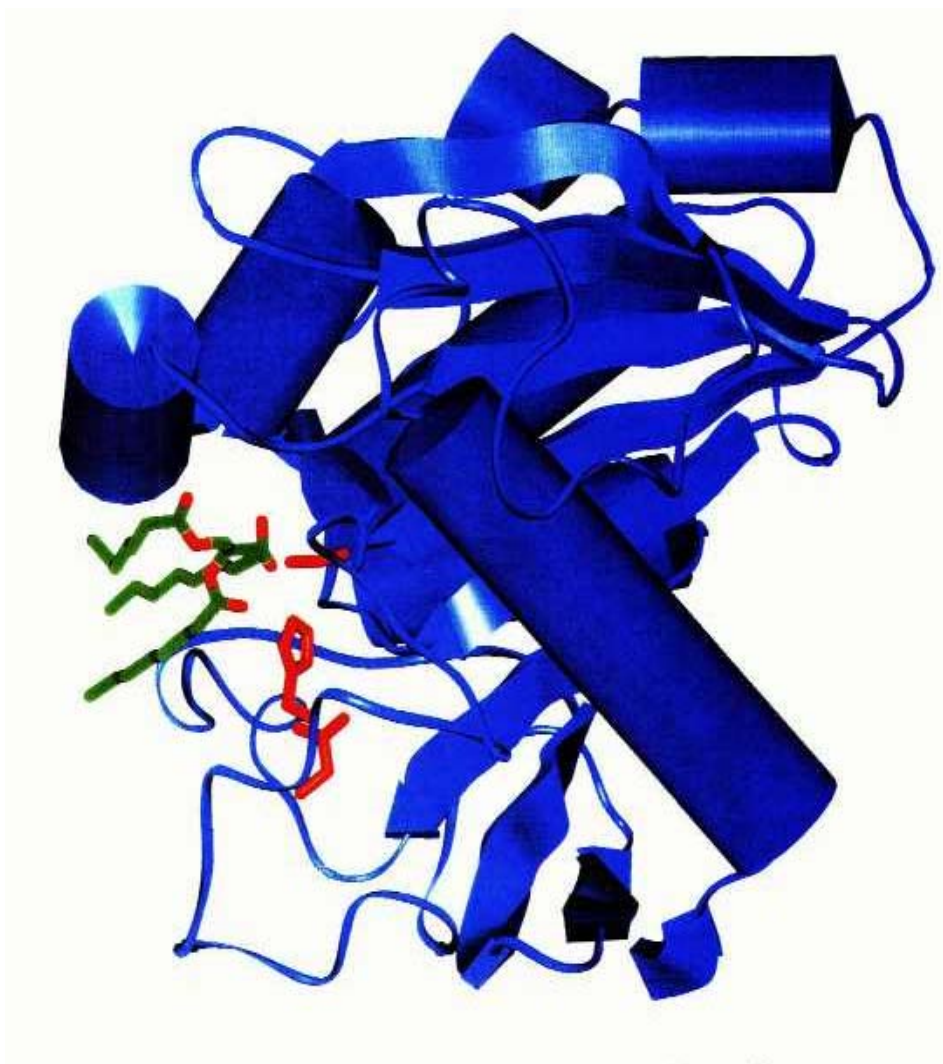


Figura 7- Representação esquemática da estrutura tridimensional da lipase de *Mucor miehei* na forma aberta (ativa). Quando a tampa está aberta, a tríade catalítica no sítio ativo (vermelho) torna-se acessível para o substrato (normalmente triglicerídeos) [43].

Os compostos enantiomericamente puros obtidos através de reações catalisadas por lipases geralmente envolvem reações de transferência do grupo acila com vários nucleófilos. Uma aplicação desta metodologia está na resolução cinética de ésteres, álcoois e amins racêmicas. O mecanismo catalítico envolvido na resolução de álcoois e ésteres racêmicos está representado na Figura 8 [44].

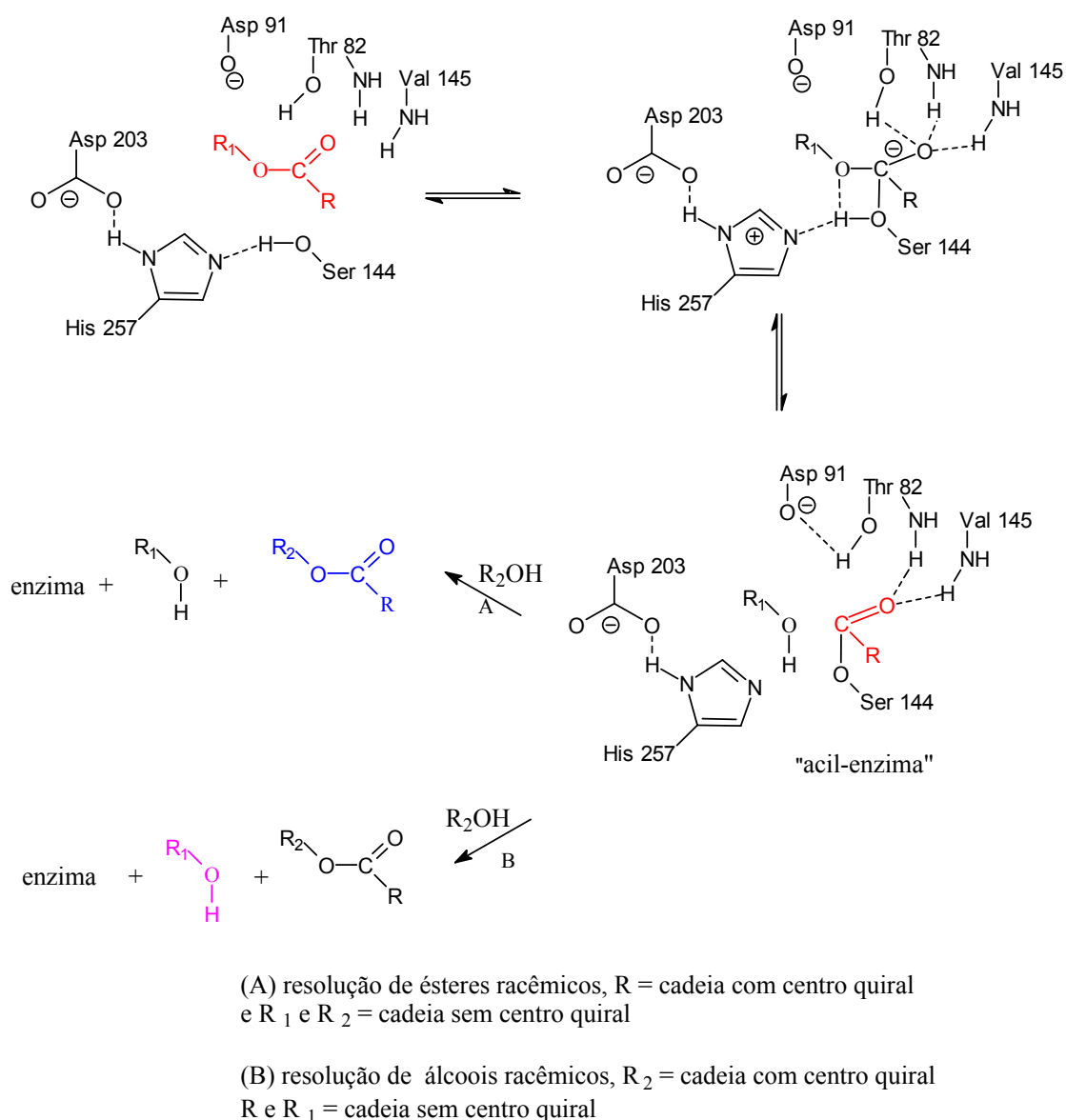
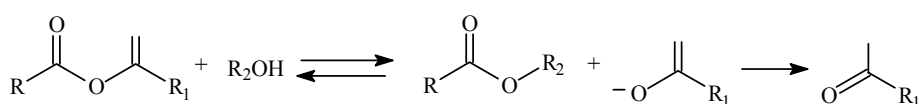


Figura 8- Mecanismo catalítico de lipases baseado na “tríade catalítica” de serina (nucleófilo), histidina, e ácido aspártico ou glutâmico, na resolução cinética de ésteres racêmicos (a) e álcoois racêmicos (b). Os números dos resíduos de aminoácidos se referem a lipase de *Rhizopus oryzae* [43].

No mecanismo mostrado na Figura 8, o resíduo de aminoácido da Ser atua como um nucleófilo e reage com uma molécula de substrato, aqui representado por um éster. Durante a ligação com o substrato, um hidrogênio é transferido da Ser para His, tornando-a mais nucleofílica. A carga positiva do anel imidazólico protonado é estabilizado pela interação com o grupo carboxílico do Asp. Um intermediário tetraédrico é formado, no qual a enzima e substrato estão covalentemente ligados (estado de transição enzima-substrato). O hidrogênio sob a His liga-se ao oxigênio, o qual é então eliminado como uma molécula de álcool. Um complexo acil-enzima é formado como um intermediário covalente altamente reativo que pode reagir com uma segunda molécula de álcool (transesterificação) para formar o produto resolvido e com regeneração da enzima livre.

Na resolução cinética de ésteres racêmicos (doadores acilas), a etapa determinante da quiralidade reside na etapa de acilação, enquanto que na resolução cinética de álcoois e aminas racêmicas, é a desacilação do intermediário acil-enzima.

As reações de transesterificação geralmente são reversíveis e a reversibilidade é determinada pela nucleofilicidade relativa do nucleófilo e do grupo de saída, onde ambos competem para formar o intermediário acil-enzima, no sentido do produto ou reagente. A nucleofilicidade do grupo de saída pode ser diminuída pela introdução de substituintes aceptores de elétrons [45]. Os acetatos de vinila e isopropenila são doadores acila muito utilizados em reação de transesterificação enantiosseletiva, Figura 9 [46-49].



R = cadeia alquílica aquiral e R₁ = H ou CH₃, R₂ = cadeia alquílica quiral

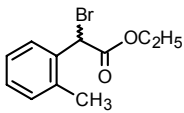
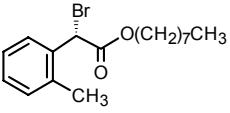
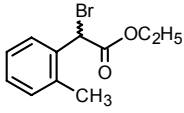
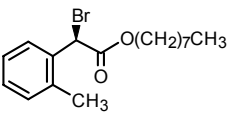
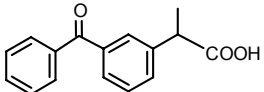
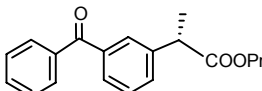
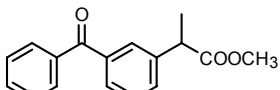
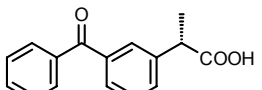
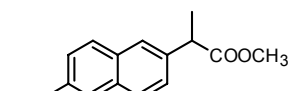
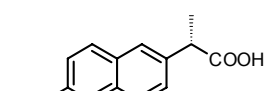
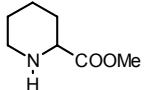
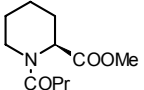
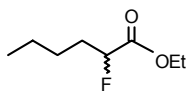
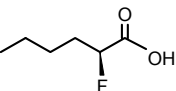
Figura 9- Transesterificação enantiosseletiva utilizando ésteres enólicos.

1.6 Resolução de ácidos racêmicos catalisada por lipases

Os ácidos carboxílicos enantiopuros são blocos de construção para a síntese de muitos fármacos, pesticidas e compostos naturais tais como feromônios. As lipases foram usadas com sucesso na resolução de vários álcoois racêmicos através de reações de hidrólise, esterificação ou transesterificação, mas somente uma quantidade limitada de informações existe sobre a resolução de ácidos substituídos na posição 2 [50-55], especialmente quando o substituinte é um halogênio [56-59]. A maioria dos trabalhos estuda a resolução de ácidos 2-arylpropionico, um importante grupo de fármacos antiinflamatório não esteroidais [60-65], ou a resolução de ácidos 2-hidroxi carboxílicos, os quais são também importantes blocos de construção [66]. As lipases de *Candida antarctica* B [53], *Candida rugosa* [67] e *Rhizomucor miehei* [60] tem sido empregadas com sucesso para a resolução de ácidos 2-arylpropionico e a lipase de *Pseudomonas cepacia* [66] foi usada para a resolução de ácidos 2-hidroxi. Estes estudos relatam que muitos fatores modificam a estereosseletividade das lipases para uma determinada reação. Porém, nenhuma regra tem sido estabelecida para predizer da enantiosseletividade de uma enzima particular para um substrato específico [68].

As possíveis aproximações para a resolução enzimática de ácidos racêmicos incluem a hidrólise enantiosseletiva e ou alcoólise de um éster correspondente [69-71], ou esterificação direta em meio não aquoso [72-74]. A última metodologia não requer qualquer pré-tratamento químico do substrato e torna vantajoso quando permite a separação do produto ácido desejado através de extração seletiva simples. Alguns exemplos de obtenção de ácidos e seus derivados enantiomericamente puros resolvidos através de reações de esterificação, transesterificação e hidrólise catalisadas por lipases estão representados na Tabela 2.

Tabela 2 - Resolução de ácidos e derivados racêmicos através de reações de esterificação, transesterificação e hidrólise catalisada por lipases.

Substrato racêmico	Produto enantiopuro	c (%)	eep (%)	E	Enzima	Ref.
		22	41	2,80	RML	[68]
		15	57	4,30	PCL	[68]
		18,2	81,5	11,4	CAL	[75]
		20	>99	>100	PFL	[76]
		38,4	98	>100	CRL	[77]
		39	99	>100	CAL-A	[78]
		60	69	27,0	LP30	[79]

RML = Lipase de *Rhizomucor miehei*; PCL = Lipase de *Pseudomonas cepacia*; CAL = Lipase de *Candida antarctica* (Novozym[®] 435); LP30 = Lipase P30 Amano; PFL = Lipase de *Pseudomonas fluorescens*; BCL = Lipase de *Burkholderia cepacia*

Continuação da Tabela 2.

		49	80	19,0	PCL	[56]
		49	77	14,4	PCL	[56]
		22	>99	>100	PFL	[76]
		---	99	---	BCL	[80]
		31	98	>100	CRL	[81]
		39,4	13,9	1,4	CRL	[82]
		40,3	46.1	3,6	CRL	[82]

RML = Lipase de *Rhizomucor miehei*; PCL = Lipase de *Pseudomonas cepacia*; CAL = Lipase de *Candida antarctica* (Novozym[®] 435); LP30 = Lipase P30 Amano; PFL = Lipase de *Pseudomonas fluorescens*; BCL = Lipase de *Burkholderia cepacia*.

1.7 Preparação de amidas via enzimática

Ainda que em uma reação de transesterificação enzimática o solvente tem papel importante [83], a escolha do doador acila é também essencial e é necessário conhecer a reatividade do material de partida para escolher o agente acilante. Para evitar a reversibilidade deste processo, vários agentes acilantes têm sido usados, como ésteres ativados [84], ésteres enólicos [85], anidridos [86], tioésteres [87], entre outros [88, 89]. Porém, os agentes mencionados acima não podem ser empregados na acilação enzimática

de amins, devido a maior nucleofilicidade com relação aos seus correspondentes álcoois e freqüentemente estes reagentes reagem com as amins na ausência da enzima.

O uso de lipases para gerar ligações amídicas em solventes orgânicos foi prenunciado vários anos atrás [90] e a reação de aminólise enzimática era aplicada à síntese preparativa de peptídeos por Klibanov [91] e Wong [92]. A utilidade de lipases para a preparação de amidas quirais foi inicialmente demonstrado na reação de resolução do cloropropionato de etila racêmico com várias amins aromáticas e alifáticas, Figura 10 [93].

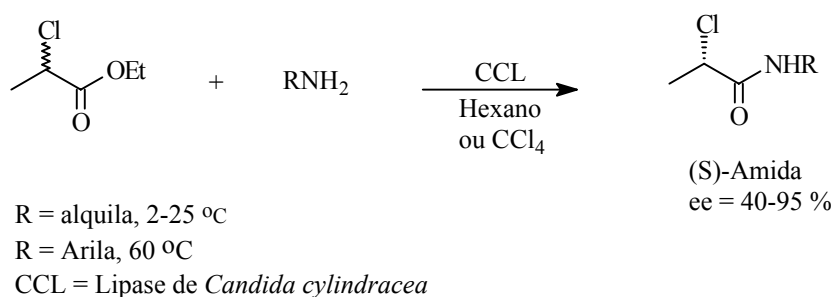


Figura 10- Síntese enzimática de amidas oticamente puras.

As lipases também catalisam a formação de amidas a partir de ésteres não ativados. A preparação de N-octilalquil amidas por exemplo, tem sido realizada em hexano anidro [94] e a lipase de *Candida antarctica* apresentou uma alta atividade e especificidade na acilação de amins primárias com butirato de etila [95]. As amidas de ésteres graxos tem sido preparadas com rendimentos moderados usando a lipase *Rhizomucor miehei* [96]. Kobata e col. tem investigado a síntese de análogos da capsaicina. Vários derivados de ácido graxo reagem com vanilamina na presença de diversas lipases, alcançando rendimentos moderados de análogos da capsaicina, Figura 11. Entre as lipases usadas, a *Pseudomonas cepacia* foi a que produziu os melhores rendimentos [97, 98].

Chapman e col. encontraram um caminho indireto para resolver aminas usando ésteres oxalâmicos de 1-feniletilamina. A lipase de *Candida antarctica* (CAL-B) catalisou a hidrólise do grupo éster e mostrou alta enantiosseletividade para o estereocentro distante. As bioconversões procederam com razões enantioméricas maiores que 30 e em alguns casos maior que 100. Os altos valores de E tornaram possível a obtenção do produto da biotransformação ou do substrato não hidrolisado com alta pureza stereoquímica, Figura 12 [110].

Outras aminas racêmicas resolvidas por lipase reportadas na literatura estão apresentadas na Tabela 3.

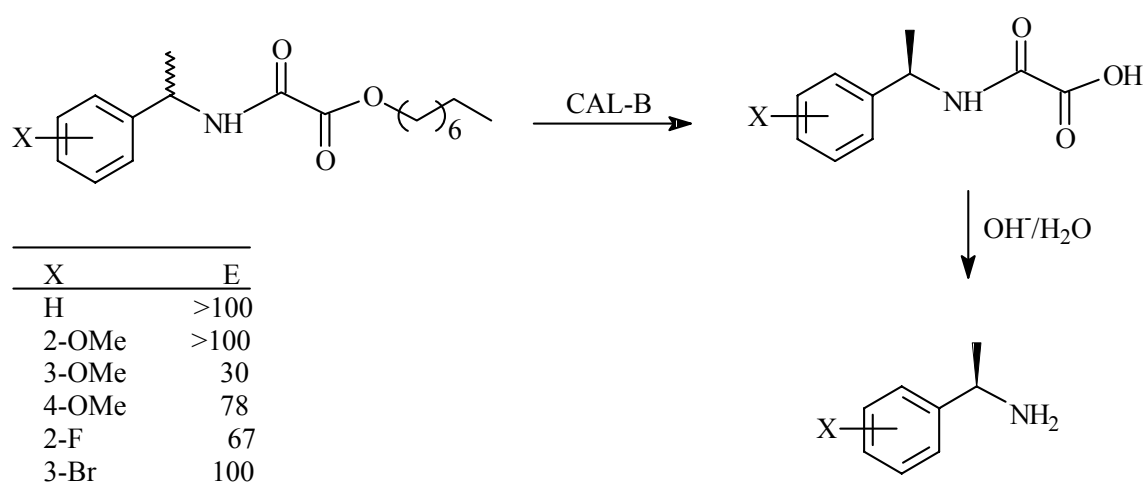


Figura 12– Aminas enantiomericamente puras obtidas através da biotransformação de ésteres oxalâmicos usando a lipase de *Candida antarctica*.

Na maioria dos exemplos estudados nas reações de aminólise com aminas racêmicas, as lipases e especialmente CAL, sempre exibiram preferência para o isômero R. Kazlauskas [101] descreveu uma estrutura baseada na racionalização da enantiopreferência de subtilisina e lipases com aminas primárias. Enquanto as lipases favorecem o enantiômero R, a subtilisina tem preferência para o enantiômero oposto. Sinisterra [111]

estudou a influência de diversas variáveis para a aminólise de ésteres catalisada por várias lipases de diferentes procedências.


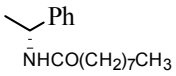
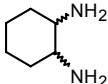
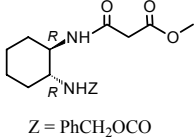

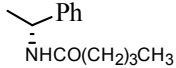
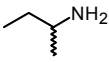
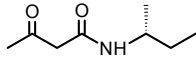
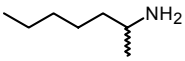
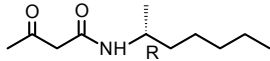
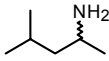
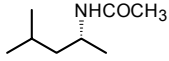
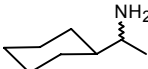
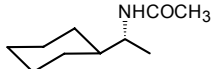
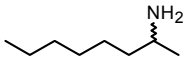
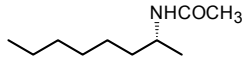

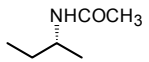
Tabela 3- Amidas e aminas enantiomericamente puras obtidas através de reações catalisadas por lipases.

Aminas racêmicas	Produto oticamente puro	c (%)	eep (%)	E	Enzima	Ref.
		21	55	4	CAL	[105]
		22	60	5	CAL	[105]
		27	95	50	CAL	[105]
 R = fenil, 1-naftil, propil	 R = fenil, 1-naftil, propil	20-44	90-98	---	CAL	[103]
		64*	99	---	CAL	[112]
		46,6	96	---	PAL	[102]
		34	80	---	Amano PS	[113]
		52	92	>100	CAL	[114]
 R = 2-furil, 2-tienil, 2-piridil	 R = 2-furil, 2-tienil, 2-piridil	36-50	89-99	32-100	CAL	[104]

PAL = Lipase de *Pseudomonas aeruginosa*; CAL = Lipases de *Candida antarctica*; Amano PS = Lipase de *Pseudomonas cepacia*.

* Resolução cinética dinâmica de feniletilamina racêmica. Nesta técnica ocorre a racemização do enantiômero não reativo e assim é possível obter bons rendimentos de um enantiômero.

Continuação da Tabela 3.

		51	95	>200	CAL	[114]
	 Z = PhCH ₂ OCO	26	94	45	CAL	[115]
		20	99	---	CRL	[116]
		46	56	---	CAL	[117]
		38	98	---	CAL	[117]
		28	>98	---	PAL	[118]
		38	>99	---	PAL	[118]
		43	81	---	PAL	[118]
		55	32	---	PAL	[118]

PAL = Lipase *Peudomonas aeruginosa*; CAL = Lipase de *Candida antarctica*; Amano PS = Lipase de *Pseudomonas cepacia*.

1.8 Imobilização de Enzimas

A imobilização é o meio pelo qual as enzimas e células são transformadas em catalisadores heterogêneos, fornecendo uma maneira fácil de recuperá-las e reciclá-las [119]. Os biocatalisadores imobilizados geralmente são mais estáveis e fáceis de manipular, sendo portanto, mais ajustáveis a um processo contínuo. Dependendo da técnica

de imobilização, as propriedades dos biocatalisadores tais como estabilidade, seletividade, valor de K_M (Constante de Michaelis-Menten), dependências do pH e temperatura, podem ser significativamente alteradas, às vezes para melhor ou para pior [120]. Vários métodos diferentes têm sido usados para imobilização de enzimas, os quais incluem a adsorção em materiais insolúveis, confinamento dentro de géis poliméricos, encapsulamento em membranas, ligação cruzada com reagente bifuncional ou multifuncional e ligação a um suporte insolúvel. Alguns métodos de imobilização estão exemplificados na Figura 13 [119-124].

A **ligação em suporte** consiste na fixação do biocatalisador (enzimas isoladas ou células inteiras) a um suporte insolúvel em água, por adsorção física ou por ligação iônica ou covalente. Os materiais utilizados como suportes podem ser orgânicos ou inorgânicos, e os mais comuns são a sílica, celite, alumina, carvão ativado e vários polissacarídeos, além de polímeros em geral [125-130].

Na **adsorção física** as ligações estabelecidas entre a enzima e o suporte (principalmente forças de Van der Waals e ligações de hidrogênio) tem pequeno efeito sobre a atividade catalítica. Porém, devido às ligações serem fracas, a enzima pode facilmente ser desorvida do suporte e isto pode ser ocasionado por mudanças de pH, força iônica ou concentração de substrato. O processo de adsorção também não é específico, assim outras substâncias poderão ligar ao suporte quando a enzima imobilizada é usada.

A **ligação iônica** fornece um caminho um pouco mais específico de ligação de uma enzima a um suporte, portanto muitas resinas de troca iônica têm sido usadas como meio de suporte, um exemplo é a resina DEAE-sephadex que foi utilizada para imobilizar a enzima Chiralzyme[®] L-6 [131]. A enzima permanecerá ligada ao suporte contanto que o pH e força iônica sejam mantidos em valores apropriados.

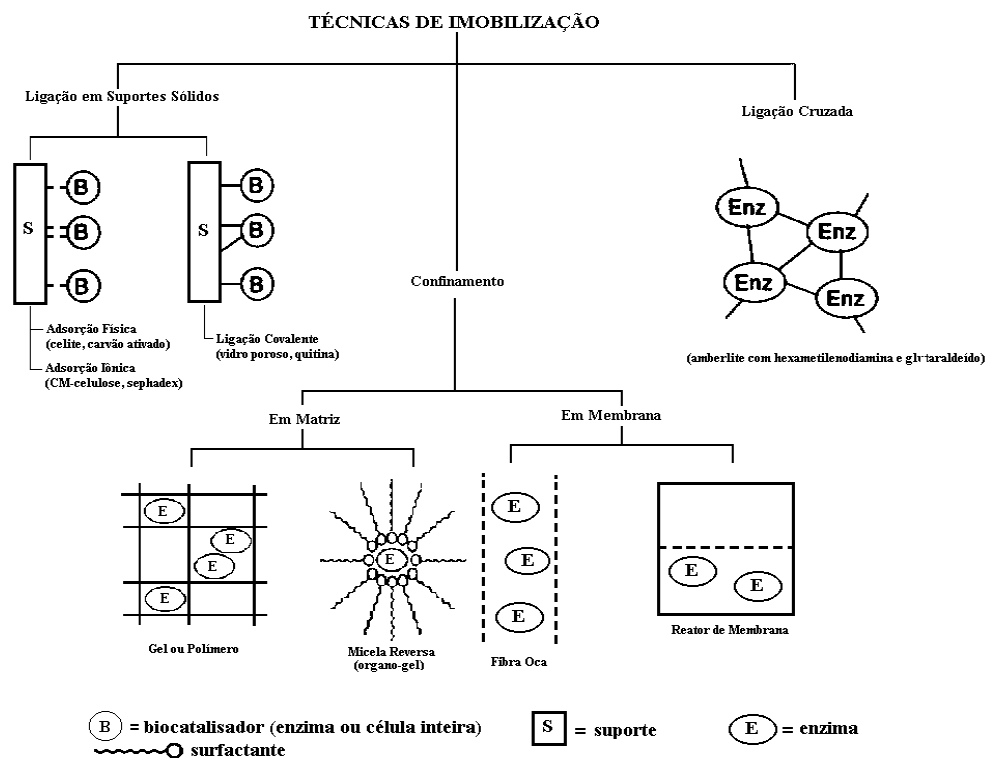


Figura 13- Principais técnicas de imobilização [12]

A **ligação covalente** pode fornecer ligações mais permanentes entre a enzima e o suporte. Porém, é essencial que as condições usadas para a formação das ligações covalentes sejam brandas para evitar perda da atividade catalítica e o sítio ativo também deve permanecer livre de ligações covalentes e assim, é às vezes protegido por um substrato ou composto análogo durante o processo de imobilização. A enzima geralmente se liga covalentemente ao suporte através de seus grupos aminos (α ou β) livres, mas outros grupos como as sulfidrilas, hidroxilas, imidazóis ou carboxílicos também podem estar envolvidos [123].

O vidro poroso é um exemplo comum de suporte inorgânico para a imobilização covalente [120, 132]. Os polímeros de polissacarídeos naturais (celulose, amido, quitina ou agarose)[120], polímeros semi-sintéticos (ex. carboximetil celulose) [125] e co-polímeros (ex. Eudragit S100) [125, 126] podem ser alternativas de suportes.

A imobilização por **ligação cruzada** é a fixação de moléculas de enzima umas as outras através de ligações covalentes. A imobilização é mais usualmente ocasionada pela ação do glutaraldeído, cujos grupos aldeídicos formam bases de Schiff com os grupos aminoácidos livres da enzima formando uma rede de ligação cruzada. Este processo é também conhecido como reticulação. As enzimas com ligações cruzadas são macromoléculas insolúveis em água. Este procedimento tem a vantagem de que o biocatalisador não é submetido a uma modificação estrutural e fica protegido por substâncias de alto peso molecular [123].

O **confinamento** envolve a criação de uma barreira através da qual as moléculas de substrato e produto passarão livremente, mas será impenetrável para o biocatalisador. As técnicas de imobilização por confinamento envolvem duas categorias. Em uma delas, uma simples membrana ou barreira cerca uma área definida que contém o catalisador. Na outra, o catalisador é disperso dentro de um gel tridimensional [119]. O aprisionamento de uma enzima, pela formação de gel ou microencapsulação é de aplicação geral e não deve afetar a atividade da enzima [123].

Os hidrogéis preparados a partir dos polissacarídeos naturais como gelatina, alginato, ágar, k-carragena e poli(acrilamida) são excelentes materiais para o confinamento de catalisadores [133-139]. As enzimas também podem ser confinadas em micelas reversas, membranas sintéticas [140] e fibras ocas [120, 141].

1.8.1 Imobilização de lipases

A utilização de lipases como biocatalisadores para química orgânica pode ser realizada, em escala laboratorial, usando-se enzimas solubilizadas em meio aquoso ou as liofilizadas [33-37].

O uso de lipase imobilizada é geralmente preferido devido a sua reutilização, flexibilidade operacional e fácil recuperação do meio reacional. Por outro lado, a imobilização de lipases possui suas limitações de transferência de massa e portanto é requerida a perspicácia durante a preparação do sistema suporte/enzima e no seu comportamento após este processo [142].

Um exemplo de um método bem sucedido de imobilização de lipases foi desenvolvido pela Novozymes para o uso em sistemas orgânicos. Isto possibilitou o uso da Lipozyme[®]TL IM para a modificação de grandes quantidades de gordura a preços razoáveis [143].

1.8.1.1 Imobilização de lipases em polímeros

Os polímeros podem ser naturais, como o ágar e sintéticos, como o poli-óxido de etileno (PEO). O gel de ágar e o filme de poli-óxido de etileno (PEO) estão entre os vários suportes citados para imobilizar enzimas [134, 144-146]. A Figura 13 apresenta as unidades monoméricas da agarose (principal componente do ágar) [147] e do PEO [146].

O ágar é uma mistura complexa de compostos polissacarídeos derivados de certas algas vermelhas. O principal componente gelificante do ágar é a agarose, um polímero neutro, basicamente um dissacarídeo que apresenta repetições da molécula de galactose, Figura 14.

A gelatinização da agarose é um processo bem estudado e ocorre quando soluções quentes de agarose são resfriadas abaixo de 40 °C. Na solução quente, o estado das moléculas de agarose parece se comportar como rolos endurecidos, mas quando tais soluções são esfriadas, géis duros, turvos e frágeis são formados em concentrações de polissacarídeo em excesso de 0,1% p/p [147].

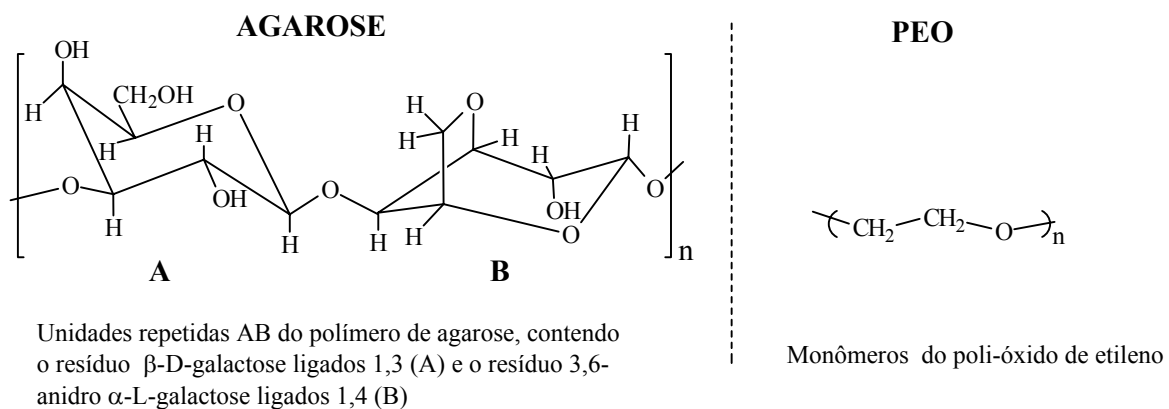


Figura 14- Unidades monoméricas da agarose e do PEO.

Em comparação como outros suportes, tais como sílica, alumina e celite, os polímeros hidrofóbicos como o poli-óxido de etileno e poli-propileno, levam a um aumento da atividade de enzimas da classe das lipases [148]. Nestes suportes, as enzimas são facilmente adsorvidas. Estudos de microscopia eletrônica de varredura realizada por Crespo mostraram que não há diferença na morfologia de fratura do filme de PEO puro e com lipases. A morfologia da superfície do filme de PEO com lipases revelou que as enzimas estão localizadas preferencialmente na superfície do material polimérico [146].

2 OBJETIVOS

Objetivo geral

Tendo em vista a relevância de compostos enantiomericamente puros e o uso de enzimas como catalisadores para obtenção destes, este trabalho teve como finalidade avaliar a eficiência das lipases livres e/ou imobilizadas em reações de esterificação, aminólise e transesterificação enantiosseletivas.

Objetivos específicos

- Avaliar a eficiência das lipases de *Pseudomonas sp.*, de *Candida rugosa* e de *Candida antarctica*, livres e imobilizadas em gel de ágar ou em filme de poli(óxido)etileno na resolução dos ácidos (R,S)- hidroxi(fenil)acético, (R,S)- 2-bromopentanóico, (R,S)-2-bromoexanóico, (R,S)- 2-bromooctanóico, (R,S)-2-bromoexadecanóico, (R,S)- 2-etilexanóico, (R,S)- 2-metilpentanóico, (R,S)- 3-metilpentanóico e das amins (R,S)-1-etilpentilamina, (R,S)-1-metilheptilamina, (R,S)-1-metilhexilamina, (R,S)-1-feniletilamina, (R,S)-1,2-dimetilpropilamina
- Investigar a possível atividade antinociceptiva dos ácidos 2-bromoalcanóicos, ácido hexadecanóico, 2-bromoexadecanoato de metila, 2-bromoexadecanoato de propila, (R,S)-*N*-alquil-2-hidroxi-2-fenil acetamida, R-*N*-octil-2-hidroxi-2-fenil acetamida e S-*N*-octil-2-hidroxi-2-fenil acetamida, no modelo de contorções abdominais em camundongos induzidas pelo ácido acético.

3 JUSTIFICATIVA

Muitos produtos biologicamente ativos tais como, alguns antibióticos, feromônios, agentes β -bloqueadores adrenérgicos, etc., apresentam centros quirais. A atividade biológica destes produtos está associada a uma determinada configuração no centro quiral. Às vezes, a presença do produto com a configuração contrária do centro quiral bioativo produz efeitos prejudiciais, outras vezes é inibidor da ação do enantiômero ativo, ou é inativo. A avaliação do comportamento de compostos racêmicos e enantiomericamente puros, em testes farmacológicos é importante devido à tendência atual na indústria farmacêutica em produzir fármacos enantiomericamente puros. Neste sentido, devido a sua enantioespecificidade, as enzimas são os catalisadores ideais para a obtenção de produtos enantiomericamente puros. A busca de uma metodologia mais eficiente para a utilização de enzimas em síntese orgânica levou-nos a procurar um sistema que melhor se adapte as condições sintéticas desejadas para a resolução de amins e ácidos racêmicos. Muitas técnicas vêm sendo empregadas, apresentando vantagens e desvantagens em suas aplicações sintéticas na Química Orgânica. A técnica de imobilização de enzimas foi escolhida e a utilização de dois suportes são avaliados a fim de otimizar as condições para o emprego dos mesmos em meio orgânico, nas reações de esterificação, aminólise e transesterificação enantiosseletivas.

O trabalho do Grupo de Biocatálise da UFSC vem contribuindo para a implantação no Brasil do uso de enzimas como catalisadores em processos de síntese assimétrica.

4 EXPERIMENTAL

4.1 Material

Na preparação dos suportes, filme de poli-óxido de etileno (PEO) e gel de ágar, utilizou-se PEO e ágar da Aldrich. Algumas informações adicionais são fornecidas abaixo:

- PEO com massa molar de 300.000 daltons (lote 01729JZ).
- Ágar (C₁₂H₁₈O₉)_x com massa molar de 3000 a 9000 daltons.

Para a realização deste trabalho foram utilizadas três enzimas: Lipase de *Candida antarctica* (CAL) da Novozymes, Lipase de *Pseudomonas sp.* (PSL) e Lipase de *Candida rugosa* (CRL) fornecidas pela Amano.

A enzima CAL também conhecida como Nozozyme 435, é termoestável, imobilizada em macroporos de resina acrílica, com os diâmetros das partículas de 0,3-0,9 mm e uma densidade de 430Kg/m³. Possui atividade específica de 7000 PLU/g (Propyl Laurate Units). As enzimas PSL e CRL possuem uma atividade de 30 000u/g e foram fornecidas na forma liofilizadas.

Os solventes e reagentes são das seguintes procedências:

- **Aldrich:** α-metilbenzilamina, (R,S)-1,2-dimetilhexilamina, (R,S)-1-metil hexilamina, (R,S)-1-etilpentilamina, (R,S)-1-metilheptilamina, hexanol
- **Merck:** metanol
- **Reagen:** hexano, heptano, acetato de etila.
- **Fluka:** cloreto de tionila e acetato de vinila, trifluoretanol, ácido hexadecanóico
- **Sigma:** ácido (R,S)-2-bromopentanóico, ácido (R,S)-2-bromoexanóico, ácido (R,S)-2-bromooctanóico, ácido (R,S)-2-bromoexadecanóico, ácido (R,S)-2-metil pentanóico, ácido (R,S)-3-metilpentanóico, ácido (R,S)-2-etilexanóico e ácido (R,S)-2-(4-clorofenoxi) propiônico, ácido (R,S)-mandélico, ácido R-(-)-mandélico e ácido S-(+)-mandélico
- **Vetec:** pentanol, 1-butanol, ciclohexanol

No decorrer desta tese os compostos serão referidos por numeração. Na Tabela 4 encontram-se os compostos que foram estudados na resolução cinética enzimática.

Tabela 4 – Compostos racêmicos submetidos à resolução cinética enzimática.

	Compostos	NIC
Ácidos racêmicos	(R,S)-Ácido 2-(4-clorofenoxi) propiônico	1
	(R,S)-Ácido hidroxifenilacético	2
	(R,S)-Acido 2-bromopentanóico	3
	(R,S)-Acido 2-bromoexanóico	4
	(R,S)-Acido 2-bromoocetanóico	5
	(R,S)-Acido 2-bromoexadecanóico	6
	(R,S)-Acido 2-etilexanóico	7
	(R,S)-Acido 2-metilpentanóico	8
	(R,S)-Acido 3-metilpentanóico	9
Aminas racêmicas	(R,S)-1-etilpentilamina	10
	(R,S)-1-metileptilamina	11
	(R,S)-1-metilexilamina	12
	(R,S)-1-feniletilamina	13
	(R,S)-1,2-dimetilpropilamina	14
	(R,S)-2-etilexilamina	15

NIC = número de identificação do composto na tese.

4.2 Caracterização dos compostos

Os compostos foram caracterizados por análises espectroscópicas (IV, RMN ^1H) e por cromatografia gasosa com fase quiral (CGQ).

4.2.1 Espectrofotometria no infravermelho

Os espectros de absorção na região do infravermelho foram registrados em um espectrofotômetro da Perkin Elmer FT-16-PC, em pastilha de KBr. O padrão de referência usado foi um filme de poliestireno com absorção em 1028 cm^{-1} .

4.2.2 Ressonância magnética nuclear de hidrogênio

Os espectros de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN ^1H) foram obtidos no espectrômetro Bruker AC 200MHz, utilizando como referência interna tetrametilsilano (TMS, $\delta = 0,00$). Os solventes utilizados nas análises foram clorofórmio e acetona deuterados.

Os espectros de RMN ^1H para quantificação do excesso enantiomérico do ácido (R,S)-2-bromoexadecanóico (**6**) foram obtidos no espectrômetro Varian Inova – 500 MHz instalado no Instituto de Química da UNICAMP.

As constantes de acoplamento (J), foram medidas em Hertz (Hz) e os sinais foram caracterizados como: dubleto (d), duplo dubleto (dd), multiplete (m), quarteto (q), singleto (s), singleto largo (sl) e tripleto (t).

4.2.3 Cromatografia gasosa com fase quirál - CGQ

O excesso enantiomérico dos produtos e substratos remanescente das reações de biocatálise foi monitorado no cromatógrafo gasoso da marca Shimadzu-14B. A coluna capilar utilizada foi da Chrompack, constituída da fase CP-chirasil Dex CB (25m x 0,25mm ID x 0,25 μ m). Nesta fase a molécula de β -ciclodextrina está quimicamente ligada ao filme de dimetilpolisiloxano. Esta ligação impede a ciclodextrina de migrar para diferentes localidades na superfície do filme. Desta forma a enantiosseletividade é homogênea através da fase, resultando em um maior fator de resolução entre os isômeros. Isto também garante a estabilidade da enantiosseletividade [149].

4.3 Determinação do excesso enantiomérico

O excesso enantiomérico (ee), isto é, a porcentagem do enantiômero em maior quantidade menos a do menor é o termo usado para relatar a composição enantiomérica. A metodologia descrita por David Kelly fornece uma maneira fácil de conhecer a relação dos enantiômeros em uma mistura [150]. Por exemplo, aplicando a Equação 12 para uma mistura com ee de 66%, obtem-se que a porcentagem do enantiômero em maior quantidade é 83 % e do outro enantiômero é 17 %.

Alguns cálculos simples provem a solução.

$$ee = \% \text{ maior} - \% \text{ menor} \quad \text{Equação 10}$$

e

$$\% \text{ maior} + \% \text{ menor} = 100 \quad \text{Equação 11}$$

Substituindo 10 em 11 tem-se

$$\% \text{ maior} = (ee + 100)/2 \quad \text{Equação 12}$$

Como visto no **item 1.3** é necessário utilizar alguns métodos para determinar o ee de um composto. Os métodos utilizados neste trabalho foram CGQ, RMN ^1H e polarimetria.

4.3.1 Determinação do ee por CGQ

As condições analíticas usadas na separação dos enantiômeros na CGQ foram determinadas para cada composto. Primeiramente, os padrões racêmicos previamente sintetizados foram submetidos a CGQ para obter as melhores condições de separação dos enantiômeros. Um exemplo de boa separação dos picos de um racemato é mostrado para o (R,S)-hidroxi(fenil)acetato de metila (**16**), Figura 15a.

O ee dos produtos e substratos remanescentes de uma síntese enzimática pode ser calculado usando a CGQ utilizando o procedimento descrito na Figura 15.

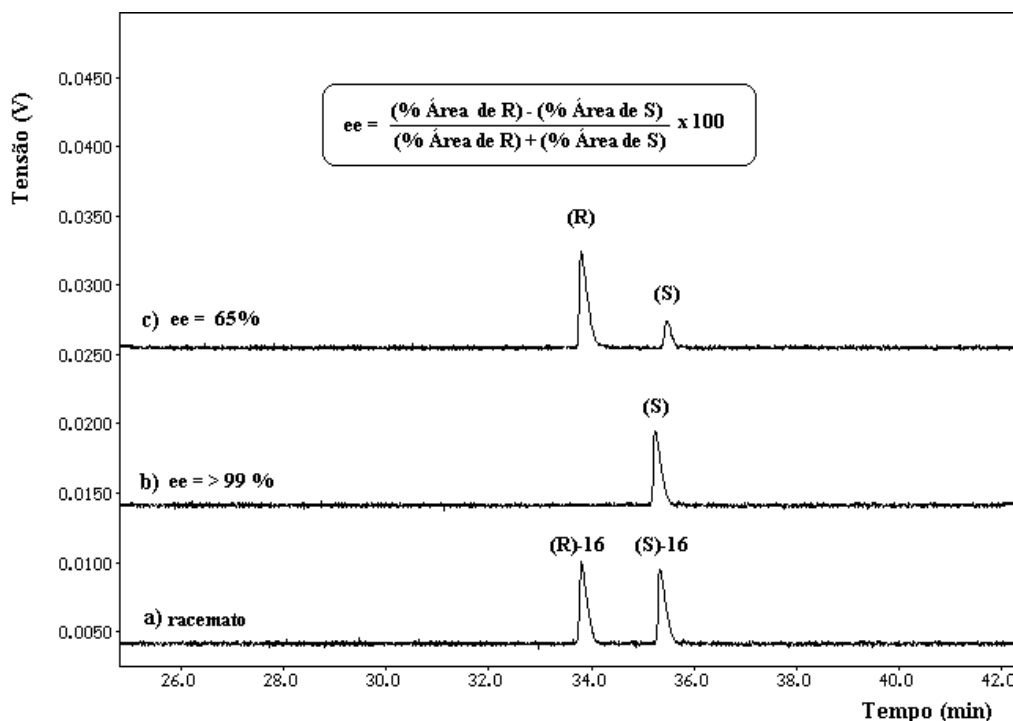


Figura 15- Cromatograma do hidroxi(fenil)acetato de metila (**16**) no CGQ. (a) racemato; (b) enantiomericamente puro e (c) após reação biocatalítica. Condições experimentais: $\text{PH}_2 = 85 \text{ kPa}$, $T_i = 80 \text{ }^\circ\text{C}$, $\text{Inj.} = 250 \text{ }^\circ\text{C}$, $\text{Det.} = 275 \text{ }^\circ\text{C}$, $\Delta_{\text{aq}} = 2 \text{ }^\circ\text{C}/\text{min}$, $T_f = 180 \text{ }^\circ\text{C}$.

A programação utilizada na CGQ para separar os enantiômeros dos substratos e produtos obtidos nas sínteses enzimáticas será mostrada posteriormente, quando os mesmos estiverem sendo citados.

Alguns substratos necessitam serem derivatizados para posterior análise na CGQ e determinação do ee.

4.3.1.1 Derivatização dos ácidos remanescentes das sínteses enantiosseletivas

Na resolução cinética de ácidos racêmicos é necessário medir o excesso enantiomérico do ácido remanescente para determinar a enantiosseletividade da enzima em uma reação específica. Os ácidos remanescentes das sínteses enzimáticas podem ser obtidos conforme procedimento descrito na Figura 16.

Os ácidos remanescentes foram derivatizados aos seus ésteres metílicos conforme o procedimento descrito na seqüência: em um frasco de 2 mL adicionou-se aproximadamente 1 mg do ácido, 250 μ L de MeOH e 50 μ L de H₂SO₄. Fechou-se o frasco, agitou e aqueceu a solução resultante por 45 minutos a temperatura de 60 °C. Após este período resfriou-se a solução e adicionou-se 250 μ L de H₂O e 500 μ L de CHCl₂ com agitação por alguns minutos. A fase de diclorometano foi analisada no CGQ para obter o excesso enantiomérico do ácido remanescente.

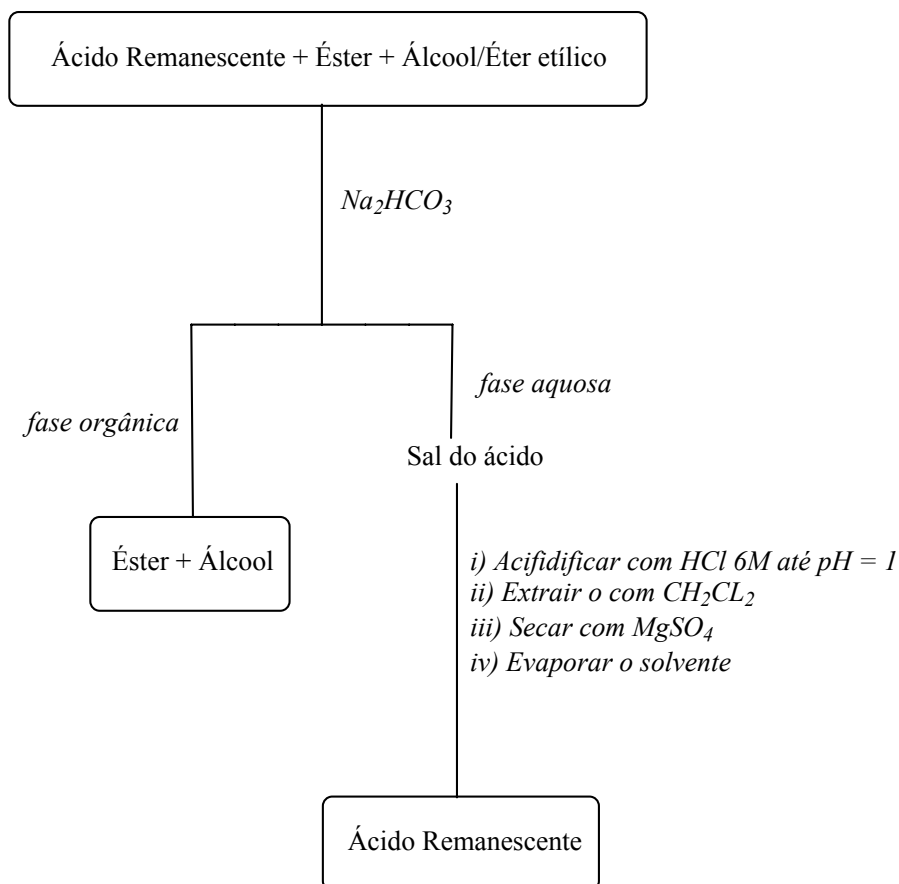


Figura 16- Fluxograma utilizado para de obtenção do ácido remanescente em reações de esterificação.

4.3.2 Determinação do ee por RMN ^1H

A técnica de ressonância magnética nuclear de hidrogênio para a determinação do ee somente foi utilizada para o composto **6**. Os experimentos foram realizados no Instituto de Química da UNICAMP, em colaboração com a Dra. Anita Marsaioli, Dr. Antonio Laverde e Sérgio A. Fernandes.

A determinação de ee do ácido **6** por RMN ^1H foi avaliada pela discriminação quiral do mesmo perante quatro seletores quirais (SQ): α - e β -ciclodextrinas permetiladas (CDPM) e um complexo calix[n] ($n=4$ e 6) e S-(-)-1-feniletamina (S-PEA), Figura 17.

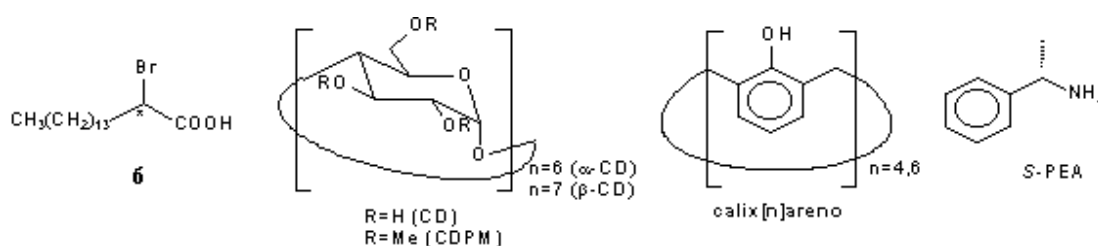


Figura 17- Estruturas do substrato e seletores quirais.

Os complexos CDPM/**6** foram preparados através de mistura equimolar (15 mmol) das espécies e solubilizados em CD_3OD e $\text{CD}_3\text{OD}/\text{D}_2\text{O}$. Os complexos calix[n]/S-PEA/**6** também foram preparados através de mistura equimolar (1:1:1 – 15 mmol), porém foram solubilizados em CDCl_3 . Cabe ressaltar que o complexo calix[n]/S-PEA, usado como SQ, é mais eficiente quando preparado com 24 horas de antecedência [151].

Os espectros de RMN ^1H (11,74 T) foram adquiridos em sonda de configuração inversa: pulsos de 45° (largura: 3,2 ms), largura de varredura de 8KHz (número de dados de 32K pontos), tempos de aquisição (at) e espera de reciclagem (d1) de 3,2 s e 1,0 s, respectivamente. Foram acumuladas cerca de 32-64 transientes, com resolução digital média de 0,25 Hz/ponto. A quantificação dos ee foi efetivada após desconvolução dos espectros. A desconvolução trata-se de um recurso computacional confiável para calcular a área de picos parcialmente sobrepostos.

4.4 Atribuição da configuração absoluta dos compostos quirais

As atribuições da configuração absoluta dos compostos quirais foram efetuadas por comparação direta com padrões enantiomericamente puros por CGQ e também usando a polarimetria, utilizando-se de dados de rotação óptica específicos disponíveis na literatura.

Os padrões quirais disponíveis foram analisados sob as mesmas condições analíticas que os racematos por meio da CGQ. Comparando o tempo de retenção (t_r) do pico correspondente ao composto enantiomericamente puro com os dos picos do racemato é possível diferenciar um enantiômero do outro. Por exemplo, o racemato **16**, isômero S-**16**, quando analisados por CGQ apresentaram os cromatogramas mostrados na Figura 15a e 15b. Através do tempo de retenção do S-**16** atribui-se o pico correspondente a este isômero, e assim o outro corresponde ao isômero R.

Uma outra maneira de atribuição da configuração absoluta utilizada para os compostos sem padrão enantiomericamente puro foi através dos valores de rotação ótica específica $[\alpha]$ disponíveis na literatura. Como o desvio da luz plano polarizada obtido para cada enantiômero é diferente, esse dado pode ser usado como critério de identificação.

Os dados da rotação ótica dos produtos e substratos remanescentes das sínteses enzimáticas foram utilizados para atribuir a configuração absoluta destes compostos. A atribuição é feita comparando o sentido do desvio provocado pelo composto, o qual se deseja atribuir da configuração absoluta, com o informado na literatura.

Por exemplo, sabe-se da literatura que o enantiômero R-**16** desvia o plano da luz polarizada para a esquerda (-) e o produto obtido em uma síntese enzimática desvia para a direita (+). Com estas informações é possível afirmar que o composto obtido da síntese enzimática é o S-**16**.

Para atribuir a configuração absoluta de compostos que não possuem os dados de rotação ótica específicos para o enantiômero R e S descritos na literatura, é necessário transformá-los em compostos com configuração absoluta conhecida [152].

4.5 Preparação das lipases imobilizadas

4.5.1 Imobilização de lipases em filme de PEO

Em um béquer contendo 25 mL de água adicionou-se 500 mg de PEO e agitou-se a solução por 12 horas. Após este período, colocou-se a massa de lipase desejada*. O sistema foi agitado por mais 4 horas para completa solubilização da enzima. A solução resultante foi depositada em um recipiente de teflon e colocada sobre um banho de areia a 40 °C. Desta forma obteve-se o filme de PEO após a evaporação da água. O filme de PEO contendo a enzima é retirado do recipiente, cortado em pequenas secções e guardado em solvente orgânico para uso posterior nas sínteses assimétricas.

4.5.2 Imobilização de lipases em gel de ágar

Em um tubo de ensaio de 15 cm colocou-se 0,4 g de ágar e adicionou-se 9,0 mL de água. Em seguida este tubo foi colocado em um banho termostático a 100 °C até dissolução do ágar. Após a dissolução, esperou-se a temperatura diminuir até aproximadamente 50 °C e depois adicionou 1 mL de solução de enzima*, homogeneizando a mistura com uma espátula. Após o resfriamento a temperatura ambiente, o gel resultante foi passado através de uma peneira com diâmetro aproximado de 0,1 cm, obtendo-se assim secções regulares de gel de ágar contendo a enzima. O suporte foi estocado em solvente orgânico para uso posterior.

* As concentrações serão especificadas no decorrer dos resultados e discussões para cada reação.

4.6 Sínteses não enzimáticas de reagentes e de padrões racêmicos

4.6.1 Preparação do (R,S)-hidroxi(fenil)acetato de metila

Em um balão de 500 mL colocou-se 15,2 g (100 mmol) de (R,S)-ácido hidroxi(fenil) acético (**2**) em 100 mL de metanol e 5 gotas de H₂SO₄ concentrado. Refluxou-se a solução por 5 horas. O excesso de metanol foi evaporado e o produto dissolvido em éter etílico. Lavou-se com H₂O, seguido por solução de bicarbonato de cálcio saturado até o ácido remanescente ser removido. Secou-se com sulfato de magnésio anidro (MgSO₄) e evaporou-se o solvente. O composto (R,S)-hidroxi(fenil)acetato de metila (**16**) foi obtido com 75 % de rendimento como um sólido branco (pf = 53-54°C).

IV (KBr) ν (cm⁻¹): 3444 (OH), 1740 (C=O)

RMN ¹H (200, MHz, CDCl₃) δ : 3,75 (s, 1H); 5,17 (s, 1H); 7,25-7,39 (m, 5H)

4.6.2 Preparação do (R,S)-acetiloxi(fenil)acetato de metila

A uma solução do composto **16** (2,0g – 9,6 mmol) em piridina (10 mL) foi adicionado anidrido acético (5 mL), e a mistura reacional foi mantida no escuro por 24 h a temperatura ambiente e concentrada sob vácuo. O óleo residual foi dissolvido em éter etílico (75 mL) e a fase orgânica lavada com água, solução de bicarbonato de cálcio e seca com MgSO₄. Evaporou-se o solvente e o óleo resultante foi purificado em coluna cromatográfica utilizando como eluente hexano/acetato de etila (10:1, v/v). O (R,S)-acetiloxi(fenil)acetato de metila (**17**) foi obtido com 85 % de rendimento como um óleo viscoso.

IV (KBr) ν (cm⁻¹): 1740 (C=O) e 1725 (C=O)

RMN ^1H (200, MHz, CDCl_3) δ : 2,15 (s, 3H); 3,67 (s, 3H); 5,98 (s, 1H); 7,34-7,47 (m, 5H).

4.6.3 Preparação do (R,S)-2-(4-clorofenoxi)propanoato de metila

Em um balão de 250 mL contendo 50 mL de metanol e 5 gotas de H_2SO_4 concentrado foi adicionado 4,80 g (150 mmol) de **1**. Refluxou-se a solução por 5 horas. O excesso de metanol foi evaporado e o produto dissolvido em éter etílico. Lavou-se com H_2O , seguido por solução de bicarbonato de cálcio saturado até o ácido remanescente ser removido. Secou-se com MgSO_4 e evaporou-se o solvente. O composto (R,S)-2-(4-clorofenoxi)propanoato de metila (**18**) foi obtido com 85 % de rendimento como um óleo viscoso.

IV (KBr) ν (cm^{-1}): 1756 (C=O)

RMN ^1H (200, MHz, CDCl_3) δ : 1,70 (d, 3H); 3,85 (s, 3H); 5,03 (q, 1H); 7,06 (dd, 2H); 7,42 (dd, 2H)

4.6.4 Preparação de amidas racêmicas

Em um béquer contendo 25 mmol de amina, 50 mmol de piridina e 15 mL de clorofórmio foi adicionado, gota a gota, 50 mmol de cloreto de acetila com o auxílio de um funil de separação. O sistema foi mantido sob agitação mecânica e resfriado em um banho de gelo. A solução resultante foi dissolvida em éter etílico e extraída com soluções de HCl 5% e NaH_2CO_3 5%. A fase orgânica foi separada e seca com MgSO_4 , e em seqüência evaporou-se o solvente para obter a amida.

As amidas preparadas por este método foram (R,S)-*N*-(1-etilpentil)acetamida (**19**), (R,S)-*N*-(1-metilhexil)acetamida (**20**), (R,S)-*N*-(2-etilhexil)acetamida (**21**), (R,S)-*N*-(1-metilheptil)acetamida (**22**), (R,S)-*N*-(1-feniletil)acetamida (**23**), (R,S)-*N*-(1,2-dimetilpropil)acetamida (**24**), *N*-butilacetamida (**25**) e *N*-octilacetamida (**26**). As amidas **19**, **20**, **21** e **24** foram obtidas na forma de óleo viscoso. Sendo **22** (pf 51-53 °C), **23** (pf 75-77 °C), **25** e **26** obtidas na forma de sólido branco.

Os espectros de IV (KBr) dos compostos **19** a **26** apresentaram bandas principais em: 3282 (NH), 1646 (C=O, Banda de amida I) e 1554 (NH, Banda de amida II)

Os sinais observados para os compostos **19** a **26** nos espectros de RMN¹H (200 MHz, CDCl₃) foram:

- Composto **19**, δ (ppm): 0,90 (t, 6H); 1,40 (m, 8H); 2,00 (s, 3H); 3,80 (m, 1H); 5,10 (sl, 1H).
- Composto **20**, δ (ppm): 0,80 (t, 3H); 1,10 (d, 3H); 1,50 (m, 8 H); 2,00 (s, 3H); 3,90 (m, 1H), 6,70 (sl, 1H).
- Composto **21**, δ (ppm): 0,85 (t, 6H); 1,35 (m, 9H); 1,96 (s, 3H); 3,15 (t, 21H), 6,50 (sl, 1H).
- Composto **22**, δ (ppm): 0,85 (t, 3H); 1,10 (d, 3 H); 1,35 (m, 10H); 1,96 (s, 3H); 3,90 (m, 1H), 6,10 (sl, 1H).
- Composto **23**, δ (ppm): 1,47-1,51 (d, 3H); 1,96 (s, 3H); 5,13 (q, 3H); 7,26-7,34 (m, 5H).
- Composto **24**, δ (ppm): 0,71 (d, 6H); 1,14 (d, 3H); 1,80 (m, 1 H); 1,96 (s, 3H); 3,78 (m, 1H); 5,59 (sl, 1H).

- Compostos **25**, δ (ppm): 0,92 (d, 3H); 1,29-1,42 (m, 4H); 1,89 (s, 3H); 3,27 (t, 2H); 8,03 (sl, 1H).
- Compostos **26**, δ (ppm): 0,87 (d, 3H); 1,29-1,43 (m, 12H); 1,90 (s, 3H); 3,17 (t, 2H); 7,57 (sl, 1H).

4.7 Preparação do meio reacional para as sínteses enzimáticas – Procedimento Geral

Os reagentes em quantidade apropriadas foram adicionados em um erlenmeyer contendo a enzima imobilizada ou livre. O sistema foi deixado sobre agitação branda (agitador com banho termostatizado), de acordo com tempo necessário para ocorrer a reação. A formação do produto foi acompanhada por cromatografia de camada delgada (c.c.d.) e as porcentagens dos excessos enantioméricos foram determinadas por CGQ. Em alguns casos utilizou-se do RMN ^1H para determinar a porcentagem de conversão de substratos a produtos. Os produtos e substratos remanescentes foram separados dos suportes através de filtração simples, sendo este lavado várias vezes com o solvente utilizado nas sínteses.

Reações controle foram executadas paralelamente, utilizando o suporte com as mesmas características em termos de sua composição, apenas sem a enzima. As outras condições experimentais (solvente, temperatura, etc.) também foram análogas.

4.7.1 Preparação de amidas derivadas do (R,S)-hidroxi(fenil)acetato de metila (**16**)

A uma solução contendo 250 mg de **16** (1,5 mmol), 25 mL de solvente orgânico e 200 mg de lipase *Candida antarctica* foi adicionado 3 mmol de 1-butilamina ou

1-octilamina. A solução resultante foi agitada por 48 h em banho termostático a 35 °C. A porcentagem de conversão foi calculada através da Equação 1 citada na revisão de literatura e por RMN¹H para *N*-butil-2-hidroxi-2-fenilacetamida e para *N*-octil-2-hidroxi-2-fenilacetamida, respectivamente.

Neste experimento foi avaliado o efeito do solvente, logo os mesmos serão especificados nos resultados.

4.7.2 Aminólise de (R,S)-acetiloxi(fenil)acetato de metila (17)

Uma mistura equimolar (3 mmol) de **17** (620 mg) e 1-butilamina (220 mg) ou octilamina (390 mg) foi dissolvida em 25 mL de t-butanol contendo 300 mg de CAL e agitada por 12 h em banho termostático a 35 °C. A mistura reacional foi analisada por CGQ e RMN¹H.

4.7.3 Acetilação enantiosseletiva de (R,S)-hidroxi(fenil)acetato de metila (16)

4.7.3.1 Reação utilizando a lipase da *Candida antarctica*

No primeiro teste de acetilação enantiosseletiva do grupo OH de **16** utilizou-se 500 mg de CAL. Os reagentes **16** (3 g – 18 mmol) e acetato de vinila (4,7 g – 55 mmol) foram dissolvidos em 30 mL de éter isopropílico e agitados por 40 dias a 35 °C. A formação de produto foi acompanhada por CGQ em intervalos de 48h.

4.7.3.2 Reação utilizando a lipase de *Pseudomonas sp.*

Os reagentes **16** (0,25 g – 1,5 mmol) e acetato de vinila (1,94 g – 15 mmol) foram colocados em um erlenmeyer contendo 30 mL de solvente e 100 mg de PSL (imobilizada em PEO ou em gel de ágar ou na forma livre). A solução heterogênea foi agitada em banho termostático a 25 °C por 96 h. O progresso da reação foi acompanhado através dos valores de excessos enantioméricos obtidos por CGQ em intervalos de 24h. Esta reação foi também estudada a 35 °C usando éter isopropílico como solvente.

Neste experimento foi avaliado o efeito do solvente, logo os mesmos serão especificados nos resultados.

Os valores de E foram calculados a partir do grau de conversão e os excessos enantioméricos de acordo com as Equações 2 e 3, citadas na revisão de literatura.

4.7.4 Resolução de ácidos racêmicos via esterificação biocatalítica

4.7.4.1 Ácidos 2-alkil e 2- bromo substituído

Uma mistura de ácido racêmico 2-substituído (5 a 30 mmol) e um excesso de 3 vezes do álcool primário (15 a 90 mmol) foi colocada em 25 mL de hexano contendo a enzima imobilizada ou livre. A solução heterogênea foi agitada em banho termostático a 35 °C. Os tempos de reação, quantidades exatas dos reagentes e de enzima, serão especificados para cada reação em particular, na apresentação dos resultados. As enzimas utilizadas nestes experimentos foram as lipases de *Pseudomonas sp.* e de *Candida rugosa*.

A porcentagem de conversão foi calculada utilizando a Equação 1, citada na revisão de literatura, após obtenção dos valores de excessos enantioméricos do substrato e produto por análises de CGQ.

4.7.4.2 Ácido (R,S)-3-metil pentanóico (9)

Primeiramente 10 mmol **9** e 15 mmol de 1-pentanol foram colocados em 25 mL de hexano contendo 300 mg de CAL. A solução heterogênea foi agitada em banho termostaticado a 35 °C, por 5h.

Em outro experimento 30 mmol de **9** e 30 mmol de 1-pentanol foram colocados em 25 mL de hexano contendo 300 mg de CAL. A solução heterogênea foi agitada por 6 horas. Alíquotas em intervalos de 1 h foram analisadas em RMN ¹H para determinação da porcentagem de conversão em éster. Os ácidos remanescentes destas reações foram separados da mistura reacional conforme Figura 17, e submetido à análise polarimétrica.

4.7.5 Resolução de aminas racêmicas via acilação catalisada por CAL

2 mmol de amina e 8 mmol de acetato de etila foram adicionados a um erlenmeyer contendo 5 mL de éter etílico previamente seco sobre peneira molecular, e 100 mg de CAL. O sistema foi deixado sob agitação suave em um banho termostaticado à temperatura de 35°C por 48hs. O produto e substratos remanescentes foram separados da enzima através de decantação, sendo esta lavada várias vezes com éter etílico para remoção de todos os reagentes e os produtos. Os mesmos foram concentrados em um rotaevaporador e analisados em CGQ.

4.8 Atividade antinociceptiva

Os testes farmacológicos foram realizados no Núcleo de Investigações Químico-farmacêuticas (NIQFAR), Curso de Farmácia da Universidade do Vale do Itajaí (UNIVALI) sob a orientação da Profa. Dra. Márcia Maria de Souza.

4.8.1 Modelo das contorções abdominais induzidas pelo ácido acético 0,6 % em camundongos.

Camundongos “Suíços” machos (25-35 g) foram mantidos sob temperatura controlada (22 ± 2 °C) e iluminação em ciclo de 12 horas com ração e água “*ad libitum*”. Os animais foram aclimatizados no laboratório por 1 hora antes do início dos testes. A resposta antinociceptiva foi obtida utilizando-se o “Teste de contorções abdominais” induzidas pelo ácido acético (0,6 %). Esse teste embora seja um modelo de nocicepção simples e pouco específico, permite avaliar a atividade antinociceptiva de várias substâncias que atuam tanto a nível central como a morfina, como a nível periférico como os antiinflamatórios não esteroidais, como a aspirina. A resposta antinociceptiva foi induzida pela injeção intraperitoneal (i.p.) de ácido acético (0,6 %) diluído em solução salina (0,9 %). Basicamente as contorções abdominais consistem na contorção da musculatura abdominal juntamente com a extensão de uma das patas posteriores de acordo com o método descrito anteriormente por Coller e col. [153] e adaptado por Bentley [154].

Os animais foram pré-tratados com os compostos listados na Tabela 5 via i.p., 30 minutos antes da injeção do ácido acético. O grupo controle recebeu volume semelhante de uma solução veículo (solução de NaCl 0,9 % e DMSO₄). Após a injeção do ácido acético, os animais foram colocados individualmente sob funis de vidro, e o número de contorções abdominais foi quantificado cumulativamente durante o período de 20 minutos. A

atividade antinociceptiva foi determinada tomando-se como base a inibição do número de contorções abdominais dos animais pré-tratados com os compostos, em relação ao número de contorções abdominais dos animais controle (veículo).

Tabela 5 – Compostos testados no modelo das contorções abdominais em camundongos induzidas pelo ácido acético (0,6 %).

NIC	Compostos
3	Ácido (R,S)-2-bromopentanóico
4	Ácido (R,S)-2-bromoexanóico
5	Ácido (R,S)-2-bromooctanóico
6	Ácido (R,S)-2-bromoexadecanóico
16	(R,S)-hidroxi(fenil)acetato de metila
27	2-bromoexadecanoato de metila
28	2-bromoexadecanoato de propila
29	Ácido hexadecanóico
30	(R,S)- <i>N</i> -butil-2-hidroxi-2-fenil acetamida
31	(R,S)- <i>N</i> -octil-2-hidroxi-2-fenil acetamida
32	(R,S)- <i>N</i> -dodecil-2-hidroxi-2-fenil acetamida
33	(R)- <i>N</i> -octil-2-hidroxi-2-fenil-acetamida
34	(S)- <i>N</i> -octil-2-hidroxi-2-fenil-acetamida

NIC = Número de identificação do composto na tese.

4.8.2 Síntese dos compostos utilizados nos testes farmacológicos

Os compostos **3**, **4**, **5**, **6** e **29** foram utilizados diretamente do frasco e sem purificação prévia. A preparação do composto **16** já foi previamente descrita no item 4.6.1 e para preparar os compostos **27** e **28** utilizou-se do procedimento descrito na literatura [155].

A partir da reação de aminólise do composto **16** com a amina (1-butilamina, octilamina e dodecilamina) catalisada por CAL foram preparados os compostos de **30**, **31** e

32. A uma solução de **16** (250 mg – 1,5 mmol) em 25 mL de éter isopropílico adicionou 3 mmol da amina e 200 mg de lipase *Candida antarctica*. A mistura reacional foi agitada por 120 h em banho termostaticado a 35 °C. A reação foi acompanhada por c.c.d. e após 120 h não observou mais a mancha correspondente ao composto **16**. Já as amidas **33** e **34** enantiomericamente puras foram preparadas conforme o procedimento descrito acima, mas partiu-se das formas R e S do composto **16**.

Na seqüência, a enzima foi separada do meio reacional por filtração e a solução resultante foi dissolvida em éter etílico e extraída com solução de HCl (0,1 M) para eliminar a amina remanescente. Após a secagem com MgSO₄ da fase orgânica, seguida da evaporação do solvente, obteve-se um sólido que foi lavado sucessivamente com hexano para garantir a ausência do composto **16** (solúvel em hexano) e obter as amidas (parcialmente solúvel).

A obtenção das amidas racêmicas e enantiomericamente puras foi confirmada por medidas de rotação óticas, RMN¹H e CGQ.

Os espectros de IV (KBr) do compostos **30** a **34** apresentaram bandas principais em ν (cm⁻¹): 3306 (OH), 3226 (NH), 1620 (C=O , Banda de amida I), 1534 (NH, Banda de amida II).

Os sinais observados para os compostos **30** a **34** nos espectros de RMN¹H (200, MHz, CDCl₃) foram:

- Composto **30**, δ (ppm): 0,86 (t, 3H); 1,19-1,44 (m, 4H); 3,18 (t, 2H); 4,30 (sl, 1H); 4,90 (s, 1H); 6,50 (sl, H); 7,31 (sl, 5H).
- Composto **31**, **33** e **34**, δ (ppm): 0,87 (t, 3H); 1,22-1,42 (m, 8H); 3,25 (dt, 2H); 5,00 (s, 1H); 6,20 (sl, 1H); 7,38 (sl, 5H).
- Composto **32**, δ (ppm): 0,86 (t, 3H); 1,24-1,42 (m, 20H); 3,25 (dt, 2H); 3,65 (s, 1H); 5,00 (s, 1H); 6,0 (sl, 1H); 7,38 (sl, 5H).

Os valores de rotações óticas específicas para as amidas enantiomericamente puras são apresentados na seqüência:

- Composto **33**: $[\alpha]_D^{20}$ de 34 = -0,10 (c.1,5, CHCl₃) – Enantiômero R
- Composto **34**: $[\alpha]_D^{20}$ de 35 = + 0,10 (c. 1,5, CHCl₃) – Enantiômero S

4.8.3 Análise Estatística

Os resultados para os testes de atividade antinociceptiva são apresentados como médias \pm erro padrão da medida, exceto para os valores de DI₅₀ (a dose de drogas que reduzem a resposta antinociceptiva em 50 % em relação ao valor do grupo controle), as quais são reportadas como médias aritméticas acompanhadas por seus respectivos limites de confiança de 95 %. Os valores de DI₅₀ foram determinados por regressão linear dos experimentos individuais usando o software GraphPad (GraphPad Software, CA). A significância estatística entre os grupos foi feita pela análise de variância ANOVA, seguida pelo Teste de Comparação Múltipla Dunnett's. Valores de p menores que 0,05 ($p < 0,05$) foram considerados como indicativo de significância.

4.9 Número de identificação dos compostos utilizados na tese

A Tabela 6 foi confeccionada para facilitar o acompanhamento desta tese.

Tabela 6 - Número de identificação dos compostos usados na tese.

NIC	Compostos	Obtidos		
		1	2	3
1	(R,S)-Ácido 2-(4-clorofenoxi)propiónico	X		
2	(R,S)-Ácido hidroxifenilacético	X		
3	(R,S)-Ácido 2-bromopentanóico	X		
4	(R,S)-Ácido 2-bromoexanóico	X		
5	(R,S)-Ácido 2-bromoocetanóico	X		
6	(R,S)-Ácido 2-bromoexadecanóico	X		
7	(R,S)-Ácido 2-etilexanóico	X		
8	(R,S)-Ácido 2-metilpentanóico	X		
9	(R,S)-Ácido 3-metilpentanóico	X		
10	(R,S)-1-etilpentilamina	X		
11	(R,S)-1-metileptilamina	X		
12	(R,S)-1-metilexilamina	X		
13	(R,S)-1-feniletilamina	X		
14	(R,S)-1,2-dimetilpropilamina	X		
15	(R,S)-2-etilexilamina	X		
16	(R,S)-hidroxifenilacetato de metila		X	
17	(R,S)-acetiloxifenilacetato de metila		X	
18	(R,S)-2-(4-clorofenoxi)propanoato de metila		X	
19	(R,S)-N-(1-etilpentil)acetamida		X	
20	(R,S)-N-(1-metilexil)acetamida		X	
21	(R,S)-N-(2-etilexil)acetamida		X	
22	(R,S)-N-(1-metilheptil)acetamida		X	
23	(R,S)-N-(1-feniletil)acetamida		X	

1. Compostos adquiridos direto de fornecedores conforme descrito na seção materiais;
2. Obtidos por métodos químicos;
3. Obtidos das reações catalisadas por enzimas.

Continuação da Tabela 8.

24	(R,S)-N-(1,2-dimetilpropil)acetamida	X	
25	N-butilacetamida	X	
26	N-octilacetamida	X	
27	2-bromoexadecanoato de metila	X	
28	2-bromoexadecanoato de propila	X	
29	Ácido hexadecanóico	X	
30	(R,S)-N-butil-2-hidroxi-2-fenilacetamida		X
31	(R,S)-N-octil-2-hidroxi-2-fenilacetamida		X
32	(R,S)-N-dodecil-2-hidroxi-2-fenilacetamida		X
33	(R)-N-octil-2-hidroxi-2-fenilacetamida		X
34	(S)-N-octil-2-hidroxi-2-fenilacetamida		X
35	N-butill-2-(4-clorofenoxi)propanamida		X
36	N-octil-2-(4-clorofenoxi)propanamida		X
37	2-(4-clorofenoxi) propanoato de hexila		X
38	2-(4-clorofenoxi) propanoato de ciclohexila		X
39	2-(4-clorofenoxi) propanoato de metila		X
40	N-butil-2-hidroxi-2-fenilacetamida		X
41	N-octil-2-hidroxi-2-fenilacetamida		X
42	N-butil-acetiloxi(fenil)acetamida		X
43	hidroxi(fenil)acetato de pentila		
44	N-octil-acetiloxi(fenil)acetamida		X
45	2-bromopentanoato de butila		X
46	2-bromoexanoato de butila		X
47	2-bromoexanoato de hexila		X
48	2-bromooctanoato de butila		X
49	2-bromoexadecanoato de butila		X
50	2-etilexanoato de pentila		X
51	2-metilpentanoato de butila		X
52	3-metilpentanoato de butila		X

1. Compostos adquiridos direto de fornecedores conforme descrito na seção materiais;
2. Obtidos por métodos químicos;
3. Obtidos das reações catalisadas por enzimas.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nesta seção, serão apresentados os resultados obtidos para a resolução dos compostos ácidos (**1 a 9**) e de seus derivados (**16 a 18**), seguido pelos resultados das aminas racêmicas (**10 a 15**). Posteriormente serão apresentados os resultados obtidos nos testes farmacológicos dos compostos **3 a 6**, **16** e **27 a 34**.

5.1 Resolução do ácido 2-(4-clorofenoxi) propiônico

O composto **1** foi submetido ao processo de discriminação quiral utilizando a lipase de *Candida antarctica* (CAL) em reações de aminólise, e em reações de esterificação utilizando CAL e a lipase de *Candida rugosa* (CRL) imobilizada em PEO e na forma livre, Figura 18.

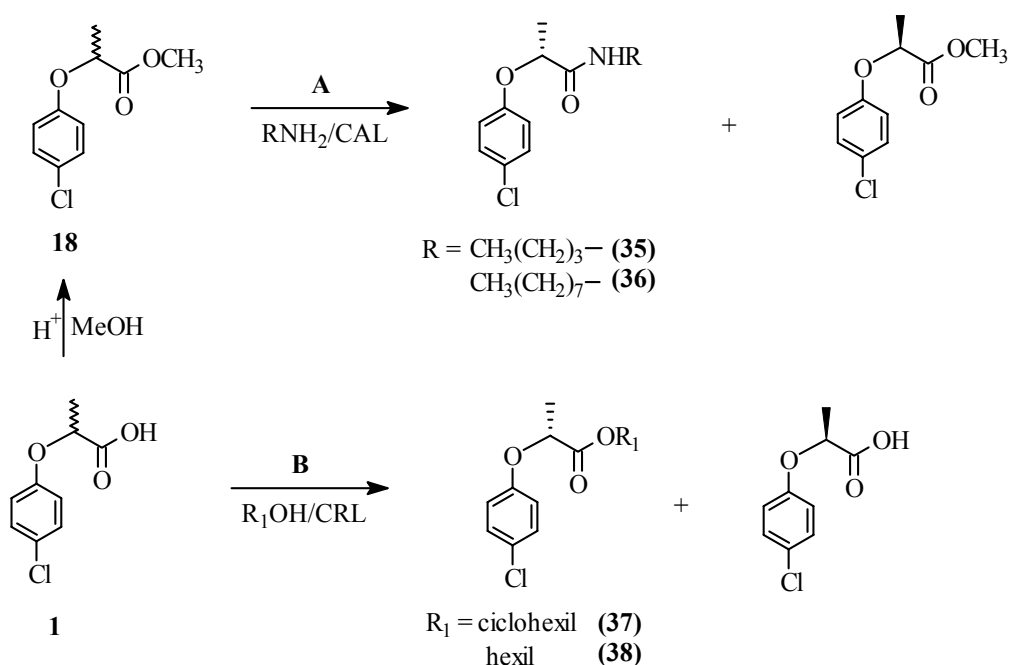


Figura 18 – Reações de aminólise de (R,S)-2-(4-clorofenoxi)propanoato de metila (A) e esterificação do ácido (R,S)-2-(4-clorofenoxi)propiônico (B) catalisadas por lipases.

5.1.1 Aminólise enantiosseletiva do 2-(4-clorofenoxi) propanoato de metila

A lipase de *Candida antarctica* tem uma alta eficiência catalítica na resolução de ésteres, aminas e diaminas através de aminólise e amoniólise, incluindo régio- e quimio seletividade [156]. A reação de aminólise é irreversível devido a estabilidade da ligação amida [105].

O (R,S)-2-(4-clorofenoxi)propanoato de metila (**18**) foi obtido a partir do composto **1** por síntese não enzimática e reagido com 1-butilamina e 1-octilamina na presença de CAL em hexano. Os resultados obtidos estão mostrados na Tabela 7.

Tabela 7- Resolução cinética do 2-(4-clorofenoxi)propanoato de metila por aminólise enantiosseletiva catalisada por CAL.

Amina	NIC da amida ^a	t (h)	c (%) ^b	eep (%) ^c	ees (%) ^c	E ^d
1-butilamina	35	66	27	11	4	1,3
1-octilamina	36	66	35	8	4	1,2

- a. Número de identificação do composto;
 b. Calculado pela Equação 1 [pág. 6];
 c. Determinada por CGQ (100 °C 5°C/min 220 °C);
 d. Calculada pelas Equações 2 e 3 [pág. 6].

A aminólise biocatalítica de **18** com 1-butilamina e 1-octilamina formou *N*-butil-2-(4-clorofenoxi)propanamida (**35**) e *N*-octil-2-(4-clorofenoxi)propanamida (**36**), respectivamente. Os cromatogramas do meio reacional, comparados com padrões, indicaram que o enantiômero R foi o mais reativo, mas a diferença na velocidade de reação dos enantiômeros individuais não foi suficiente para assegurar uma alta seletividade. Os valores de razões enantioméricas (E) menores do que 15 não são aceitáveis para propósitos sintéticos assimétricos, mas devido a sua simplicidade é um método alternativo para a síntese de amidas funcionalizadas.

5.1.2 Esterificação enantiosseletiva do ácido 2-(p-clorofenoxi) propiônico

O ácido 2-(4-clorofenoxi) propiônico (**1**) foi esterificado com 1-pentanol na presença de CAL e uma mistura de solventes 1:1 (hexano:éter etílico). A reação ocorreu com 50 % de conversão após 26 h. Esta reação também foi realizada usando CCl₄ como solvente, a conversão em éster foi de 50 % após 96 h. Em ambos os sistemas o ácido e o éster foram separados e submetidos a medidas de rotação ótica. Não foi observado desvio no plano da luz polarizada, sendo então as rotações óticas iguais a zero. Para confirmação deste resultado o ácido remanescente foi derivatizado ao seu éster metílico e submetido à análise de CGQ. Novamente os resultados mostraram que a enzima CAL não foi estereosseletiva, mas foi hábil para catalisar esta reação, podendo ser empregada na preparação de ésteres aquirais.

Considerando os resultados obtidos com CAL, o composto **1** foi esterificado utilizando outros sistemas, enfatizando também a cadeia alquílica do álcool. As reações de esterificações de **1** foram realizadas utilizando CRL na forma livre ou imobilizada em PEO, como catalisador, e ciclohexanol ou 1-hexanol, como aceptores acila. Os resultados obtidos para estes sistemas estão apresentados na Tabela 8. Os excessos enantioméricos do éster obtido e do ácido remanescente foram determinados por CGQ. Na Figura 19 encontra-se o cromatograma do (R)-2-(4-clorofenoxi)propanoato de ciclohexila (**37**) com ee de 92 % e o padrão racêmico. A Figura 20 mostra o cromatograma do (R)-2-(4-clorofenoxi) propanoato de hexila (**38**) com ee de 79 % e o padrão racêmico.

O excesso enantiomérico do ácido remanescente nas reações de esterificação enantiosseletiva foi determinado por CGQ após sua esterificação com metanol, fornecendo o (S)- 2-(4-clorofenoxi)propanoato de metila (**39**) com ee variando de 47 a 76 %. Na

Figura 21 tem-se um exemplo de cromatograma para **39** com ee de 68 % e o padrão racêmico.

A configuração absoluta do isômero mais reativo foi atribuída baseando-se em dados da literatura, onde a CRL catalisa preferencialmente a formação do R-éster. Os resultados de polarimetria obtidos para este éster mostraram que o luz plano polarizada é desviada para a direita (+), os quais foram concordantes com os obtidos neste trabalho [54, 157, 158]. No ácido remanescente (**1**) o enantiômero predominante foi o S(-), por comparação com dados de polarimetria [159].

A partir da configuração do enantiômero majoritário do produto ou do substrato remanescente é possível identificá-lo em um cromatograma obtido por CGQ. A área maior representa o enantiômero em excesso, por exemplo, o pico de área maior nos cromatogramas apresentados nas Figuras 19 a 20 corresponde ao majoritário de **37** e **38**, respectivamente. Nestes casos o enantiômero em excesso é o R.

Tabela 8- Efeitos da cadeia alquílica do álcool na resolução de **1** através de reação de esterificação catalisada por CRL livre (CRL/livre) e imobilizada em PEO (CRL/PEO).

Sistema ^a	Álcool	t (h)	c (%) ^b	ee p (%) ^c	ee s (%) ^d	E ^e
CRL/livre	ciclohexanol	72	37	97	58	118
CRL/PEO	ciclohexanol	72	39	96	62	92
CRL/ livre	1-hexanol	72	47	87	76	32
CRL/ PEO	1-hexanol	72	46	79	68	17
CRL/ PEO	1-hexanol	48	33	94	47	51

a. enzima = 500 mg; T = 35 °C;

b. Calculada de acordo com a Equação 1 [pág. 6];

c. Determinado por CGQ;

d. Determinado por CGQ após derivatização com MeOH;

e. Calculada de acordo com as Equações 2 e 3 [pág. 6].

A Tabela 8 compara a enantiosseletividade da CRL livre versus CRL imobilizada em PEO em reações de esterificação de **1** usando 1-hexanol ou ciclohexanol como aceptores acila. Em ambos os experimentos, a enantiosseletividade observada (valores de E) usando CRL livre foi sempre maior. Na reação de esterificação com ciclohexanol obteve-se um valor de E de 118 usando a CRL livre contra um valor de E de 92 utilizando CRL imobilizada em PEO. Uma diferença nos valores de E também foi observada empregando 1-hexanol como acceptor acila, E iguais a 32 e 17 foram obtidos ao usar CRL/livre e CRL/PEO, respectivamente. Os valores de E entre 15 a 30 podem ser considerados de moderados a bom, e acima destes são excelentes para propósitos sintéticos assimétricos [12]. Portanto, nos experimentos citados acima uma enantiosseletividade moderada foi alcançada usando 1-hexanol e excelente utilizando o ciclohexanol. Em sistemas que não apresentam uma excelente enantiosseletividade, a reação pode ser interrompida em porcentagens de conversão menores para obter um valor de E maior. Por exemplo, pode ser verificado que para a reação entre **1** e 1-hexanol, o valor de E foi de 17 (c = 46 %) e 51 (c = 33 %), Tabela 8.

A Figura 22 ilustra as curvas que descrevem a relação entre os excessos enantioméricos e conversões a partir das Equações 2 e 3 para os sistemas estudados. Pode ser visualizado que em porcentagens de conversões menores que 50 %, o composto **37** (curvas 1a e 1b) apresenta um eep maior do que **38** (curvas 2a e 2b). Os valores de eep vão diminuindo com o aumento da porcentagem de conversão. O contrário ocorre para o ees que aumenta, conforme curvas do composto **39**, que mostram que acima de 70 % é possível obter o substrato remanescente com alta pureza enantiomérica. Com os resultados expostos acima, fica evidente a vantagem de usar o ciclohexanol como acceptor acila baseando-se no valor do ee do éster. Uma explicação provável é que os ésteres de álcoois secundários são mais resistentes a reação reversa do que os álcoois primários. A pequena

quantidade de água residual normalmente presente na enzima e a água gerada como produto de esterificação são suficientes para atuar como substrato na hidrólise reversa [160].

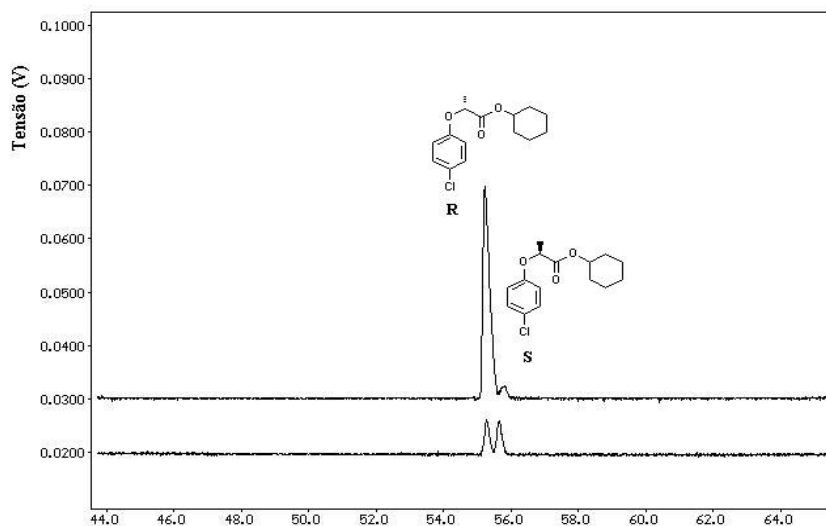


Figura 19- Cromatograma do 2-(4-clorofenoxi)propanoato de ciclohexila (**37**) obtido por síntese enzimática (A) e do padrão racêmico (B). Condições experimentais: Inj. = 250 °C, Det. = 275 °C, $T_i = 90$ °C, $T_f = 180$ °C, $\Delta_{aq} = 3$ °C/min, Pressão do $H_2 = 85$ kPa.

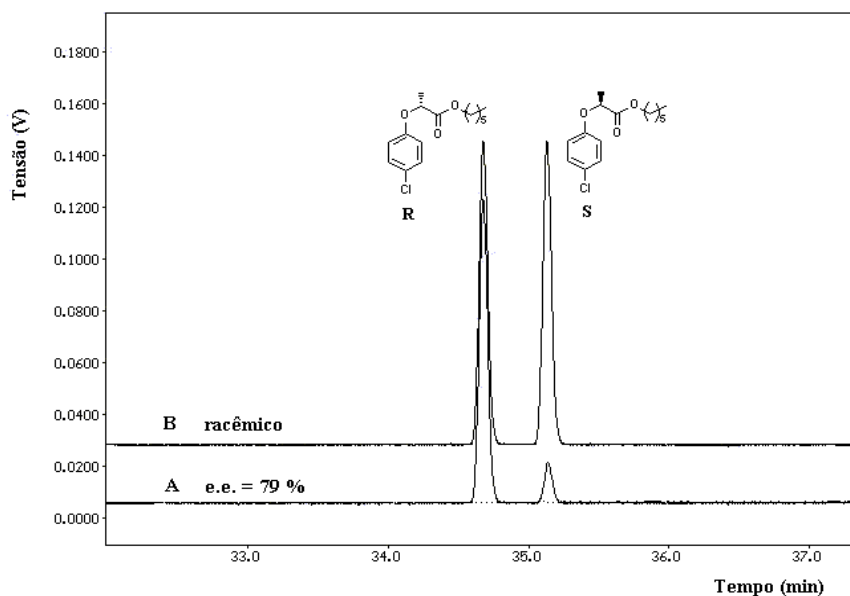


Figura 20 – Cromatograma do 2-(4-clorofenoxi)propanoato de hexila (**38**) obtido por síntese enzimática (A) e do padrão racêmico (B). Condições experimentais: Inj. = 250 °C, Det. = 275 °C, $T_i = 90$ °C, $T_f = 180$ °C, $\Delta_{aq} = 3$ °C/min, Pressão do $H_2 = 85$ kPa.

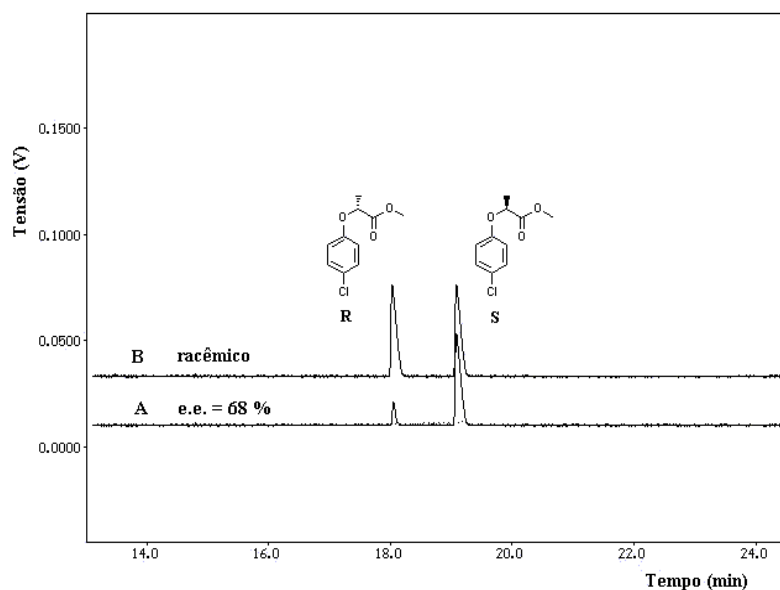


Figura 21 – Cromatograma do 2-(4-clorofenoxi)propanoato de metila (**39**) obtido a partir do ácido remanescente da síntese enzimática (A) e do padrão racêmico (B). Condições experimentais: Inj. = 250 °C, Det. = 275 °C, T_i = 90 °C, T_f = 180 °C, Δ_{aq} = 3 °C/min, Pressão do H_2 = 85 kPa.

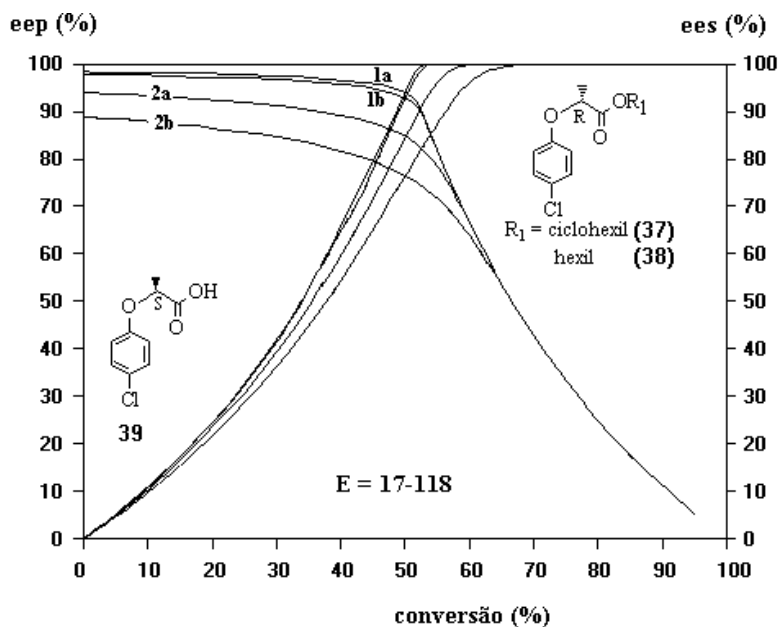


Figura 22 – Curvas geradas por computador* que descrevem a seletividade de CRL na resolução cinética de **1**. [161] (1a) Formação de **37** com CRL livre; (1b) formação de **37** com CRL/PEO; (2a) formação de **38** com CRL/livre; (2b) formação de **38** com CRL/PEO.

* O programa para o cálculo da seletividade de uma resolução cinética expressada como a Razão Enantiomérica (E) está disponível gratuitamente na internet (www.cis.TUGraz.at/orgc).

A formação de (R)-2-(4-clorofenoxi)propanoato de ciclohexila com $E = 84$ e (R)-2-(4-clorofenoxi)propanoato de butila com $E = 12$ catalisada por lipase de *Candida cylindracea* foi reportada por Chen e colaboradores. A lipase de *Candida cylindracea* (também chamada de *Candida rugosa*) preferencialmente reagiu com o enantiômero R na presença dos aceptores acila [162].

Apesar do sistema estudado por Chen e colaboradores ter sido diferente do que foi estudado neste trabalho, constatou-se que CRL foi um bom catalisador.

A imobilização de CRL em PEO não alterou a enantiopreferência da enzima, sendo que o enantiômero reativo também foi o R, entretanto foi observada uma diminuição na sua enantiosseletividade. Nenhuma predição segura pode ser feita quanto à influência da imobilização na enantiosseletividade da enzima. Acredita-se que possam ter ocorrido pequenas mudanças conformacionais devido a interação da enzima com o suporte e que afetaram o encaixe adequado do substrato no seu sítio ativo.

5.2 Resolução do (R,S)-2-hidroxi(fenil)acetato de metila

Os ácidos 2-hidroxi e seus ésteres óticamente ativos, e derivados amidas são intermediários versáteis e importantes, utilizados como auxiliares quirais, compostos bioativos, e podem facilmente ser convertidos em ésteres halo quiral, glicóis, epóxidos e aminoácidos [163]. Com o intuito de resolver o composto **16**, um composto α -hidroxi éster, realizaram-se dois tipos de sínteses. Uma tentativa de resolução de **16** foi pela obtenção de amidas enantiomericamente puras, ou seja, por meio de reação de aminólise. A outra foi através da acilação enantiosseletiva do grupo hidroxi deste composto.

5.2.1 Aminólise enantiosseletiva de 2-hidroxi ésteres catalisados por CAL

Apesar da enzima CAL ter mostrado uma baixa enantiosseletividade na reação de aminólise (R,S)-2-(4-clorofenoxi)propanoato de metila, fez-se uso desta novamente na aminólise de **16**. Tem sido reportado que a enantiosseletividade da enzima é influenciada pela estrutura dos substratos, e/ou a natureza do solvente como hidrofobicidade, momento dipolo e constante dielétrica [164].

Na reação de aminólise do composto **16** utilizou-se 1-butilamina e 1-octilamina, como aceptores acila, para formar *N*-butil-2-hidroxi-2-fenilacetamida (**40**) e *N*-octil-2-hidroxi-2-fenilacetamida (**41**), respectivamente, Figura 23.

Primeiramente avaliou a influência do solvente orgânico para a obtenção **40** com uma maior pureza enantiomérica e em seguida o tamanho da cadeia alquílica do aceptor na reação de aminólise de **16**.

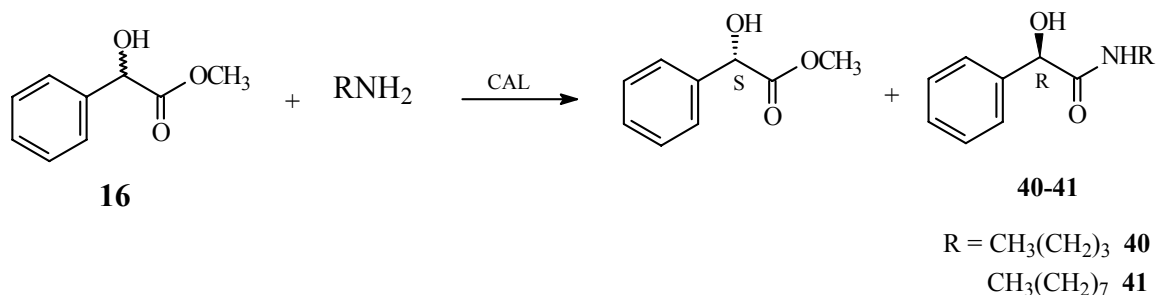


Figura 23- Aminólise enantiosseletiva de (R,S)- hidroxi(fenil)acetato de metila com 1-butilamina e 1-octilamina catalisada por CAL.

O progresso da reação e os excessos enantioméricos do substrato e produto, para a reação de aminólise de **16** com 1-butilamina foi acompanhado por CGQ, Figura 24.

As reações de aminólises de **16** com 1-butilamina utilizando a CAL em vários solventes procederam com porcentagens de conversão entre 50 a 95 %, valores de ees de 5 a 92 % e de eep de 5 a 22 %, Tabela 9. Para obter um melhor excesso enantiomérico do

produto é aconselhável interromper a reação antes de alcançar os 50% de conversão. No caso dos experimentos relatados na Tabela 9 foi estipulado um período de reação de 48h, o que levou a formação de amidas com porcentagens de conversão superiores a 50%. Isto também não seria ruim se a enzima tivesse uma boa enantiosseletividade, pois o substrato poderia ser obtido com boa pureza enantiomérica.

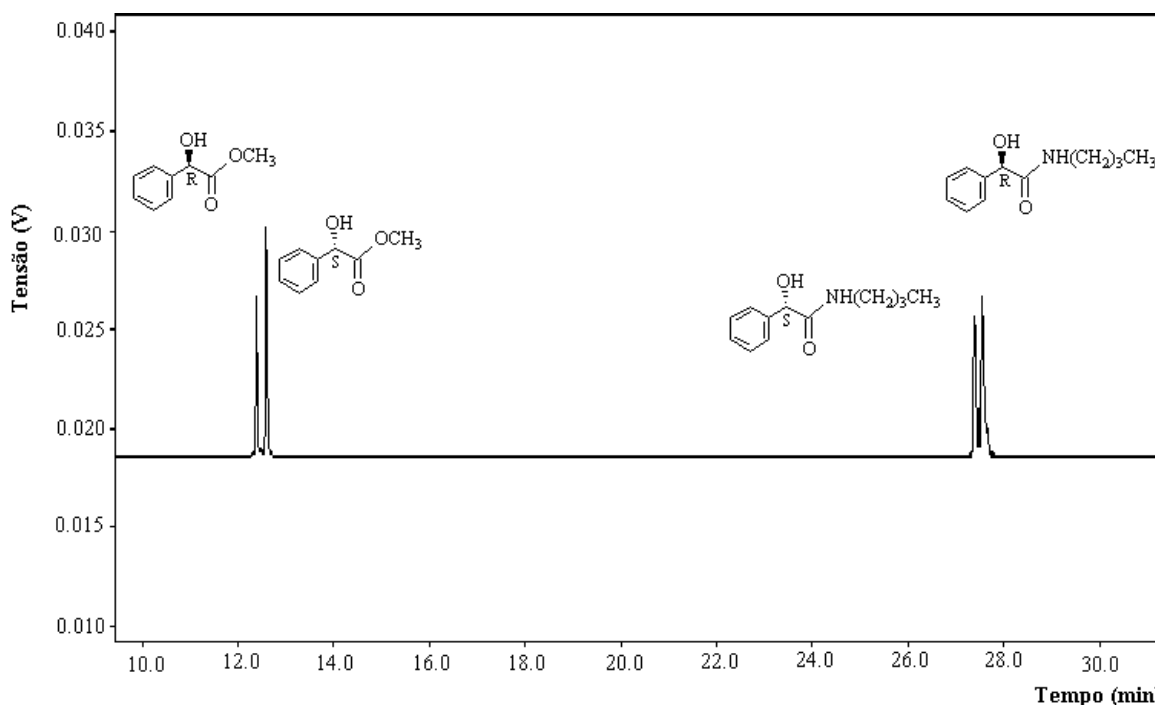


Figura 24 – Cromatograma mostrando a separação dos enantiômeros de **16** e **40** por CGQ após 48h de reação. Condições experimentais: Inj. = 250 °C, Det. = 275 °C, programação: 80°C 5 °C/min 140 °C 3°C/min 220 °C, split 200:1, Pressão do H₂ = 75 kPa.

A polaridade do solvente orgânico empregado para a esterificação pode afetar a atividade enzimática. O valor de log P dos solventes é o parâmetro largamente utilizado para descrever a polaridade do solvente e seu possível efeito na atividade enzimática, onde P é coeficiente de partição de um dado solvente entre a água e octanol em um sistema bifásico [165].

Neste trabalho foi verificado que a reação de aminólise ocorre nos solventes estudados, mas não foi possível obter uma boa enantiosseletiva. A atividade catalítica de CAL variou com o log P, entretanto, não foi observada uma relação com os valores de porcentagem de conversão.

Tabela 9- Efeito do solvente na resolução de (R,S)-2-hidroxi(fenil)acetato de metila com 1-butilamina catalisada pela CAL.

solvente	log P ^a	c (%) ^b	eep (%) ^c	ees (%) ^c	E ^d
Acetona	-0,23	76	16	52	2,1
Tetrahidrofurano	0,49	50	22	22	1,9
Éter etílico	0,85	58	20	28	1,9
t-Butanol	1,45	81	15	63	2,3
Éter isopropílico	1,90	95	5	91	2,3
Clorofórmio	2,00	73	15	40	1,9
Tolueno	2,50	93	4	57	1,6
Hexano	3,50	92	8	92	2,7
Octano	4,50	93	14	39	1,8
Hexadecano	8,80	n.d ^e	n.d ^e	5	n.d ^e

Condições experimentais: Reagentes (0,15 mmol de **16** e 0,30 mmol de 1-butilamina), T = 35 °C, CAL (100 mg), 30 mL solvente, t = 48 h.

- a. Referência [165];
- b. Calculada pela Equação 1 [pág. 6];
- c. Determinado por CGQ (80 °C 5°C/min 140 °C 3°C/min 220 °C);
- d. Calculada pelas Equações 2 e 3 [pág. 6];
- e. n.d = Não determinado.

Os valores de E obtidos na reação de aminólise de **16** variaram de 1,6 a 2,7, Tabela 9. O perfil das curvas que descrevem a seletividade de CAL para a reação de **16** com 1-butilamina com E = 2,7 está representado na Figura 25. A projeção das curvas mostrou que mesmo em baixa porcentagem de conversão, a amida é formada com excesso

enantiomérico menor do que 50 %, e somente acima de 90% de conversão é que se pode obter o éster remanescente com ee acima de 90 %. Como mencionado anteriormente, valores de $E < 15$ são inaceitáveis para propósitos práticos envolvendo a síntese assimétrica. Por outro lado, esta metodologia pode ser aplicada para preparar α -hidroxiamidas em escala laboratorial usando um método brando.

Embora CAL tenha apresentado baixa enantiosetividade, pode ser constatado que o enantiômero R foi o mais reativo, verificado através do cromatograma do meio reacional, Figura 24.

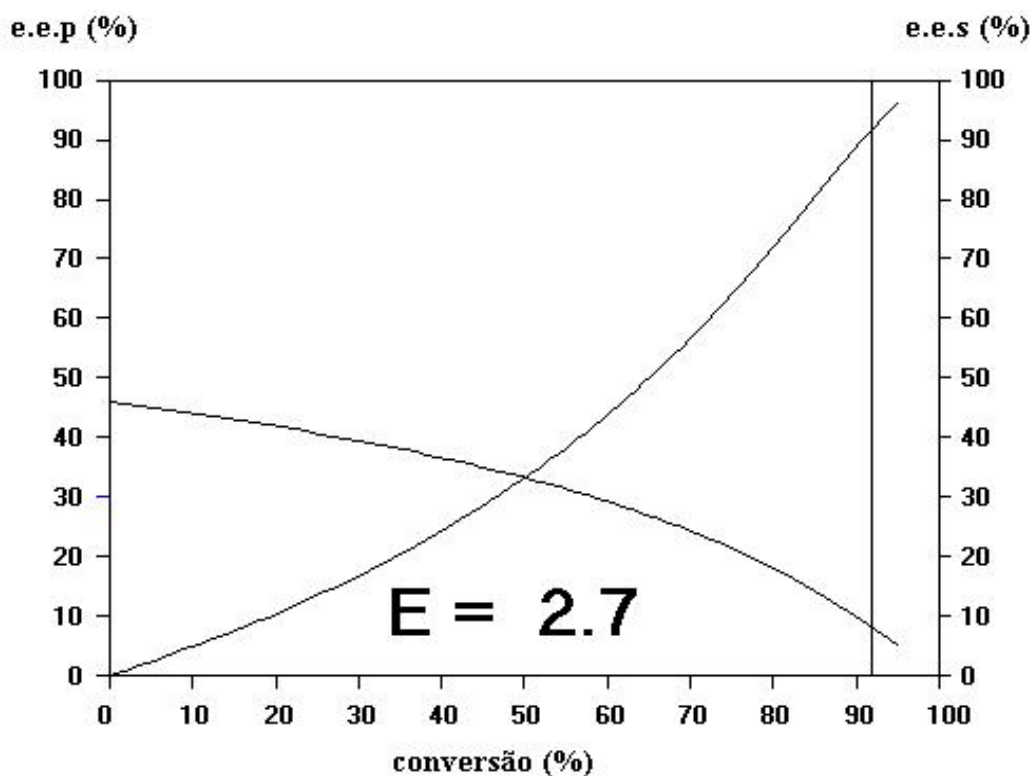


Figura 25– Curvas geradas por computador* que descrevem a seletividade de CAL na resolução cinética de **16** com 1-butilamina em hexano [161].

* O programa para o cálculo da seletividade de uma resolução cinética expressada como a Razão Enantiomérica (E) está disponível gratuitamente na internet (www.cis.TUGraz.at/orgc).

A formação de **41** foi verificada através da reação de aminólise de **16** com 1-octilamina catalisada por CAL. Outra enzima utilizada para esta reação foi a PSL imobilizada em PEO (PSL/PEO). Os resultados obtidos estão mostrados na Tabela 10.

Tabela 10- Dados obtidos da reação de aminólise do (R,S)-hidroxi(fenil)acetato de metila com 1-octilamina.

Entrada	Enzima	Solvente	t (h)	c (%) ^a	ees (%) ^b	eep (%) ^c	E ^d
1	CAL	hexano	30	80	46	11	1,8
2	CAL	t-BuOH	30	78	40	13	1,9
3	CAL	1,4-dioxano	360	95	30	3	1,3
3	PSL/PEO	1,4-dioxano	360	39	0	0	---
4	PSL/PEO	Hexano	144	30	0	0	---
5	PSL/PEO	CCl ₄ ^e	144	15	---	---	---

Condições experimentais: reagentes (10 mmol de **16** e 20 mmol de 1-octilamina), CAL (500 mg), PSL (150 mg), 30 mL de solvente e T = 35 °C.

- Determinada por RMN ¹H (s, 1H, δ = 5,16 de **16** e s, 1 H, δ = 4,97 da amida);
- Calculado por CGQ (80 °C 2°C/min 120 °C 5°C/min 220 °C);
- Determinado pela Equação 1 a partir do valor de ees e conversão [pág. 6];
- Determinada pelas Equações 2 e 3 [pág. 6];
- Solvente destruiu o filme de PEO durante a reação.

Não foi possível a determinação do excesso enantiomérico da amida formada por CGQ devido a falta de discriminação quiral de **41** na fase estacionária CP-chirasil-Dex CB. Os enantiômeros de **16** foram discriminados, sendo o pico de menor área correspondente ao enantiômero mais reativo, R(-), logo a R(-)-N-octil-2-hidroxi-2-fenilacetamida foi obtida. A amida formada foi submetida a medida de rotação ótica, a qual forneceu um desvio o plano luz polarizada para a esquerda, o que caracteriza um composto levógiro. A

configuração absoluta foi confirmada por meio de amostra padrão do R-**16** analisada por CGQ.

A lipase de *Pseudomonas sp.* também formou a correspondente α -hidroxiamida de **16** com baixa porcentagem de conversão (15 a 39%) e nenhuma seletividade, ao contrário de CAL que mostrou altas porcentagens de conversão (78 a 95%) e alguma seletividade ($E = 1,3$ a $1,9$).

Nos experimentos relatados na Tabela 10 também foi estipulado um período de reação, o que levou a formação de amidas com diferentes porcentagens de conversão. Como mencionado anteriormente para obter um maior excesso enantiomérico do produto é aconselhável interromper a reação antes de alcançar os 50% de conversão. Isto também não garante que o produto será obtido com boa pureza enantiomérica. Como pode ser observado nos experimentos utilizando a PSL a porcentagem inferior a 50 % não formou a amida quiral.

Comparando os resultados obtidos com a CAL na reação de aminólise de **16** com 1-butilamina e 1-octilamina, pode-se constatar que a variação do solvente e o tamanho da cadeia alquílica do acceptor acila não foi suficiente para obter uma boa seletividade.

Outra reação de aminólise estudada foi a do composto **17** com 1-octilamina e 1-butilamina, catalisada por CAL em t-butanol. Com esta reação visou-se avaliar a regioseletividade da CAL neste sistema.

Os resultados de RMN ^1H e CGQ mostraram que a enzima não foi regioseletiva, formando vários produtos independentemente da amina utilizada na reação de aminólise. Os compostos identificados no meio reacional são indicados na Figura 26.

O espectro de RMN ^1H do meio reacional da reação de **17** com 1-octilamina mostrando os sinais de alguns compostos identificados são apresentado na Figura 27.

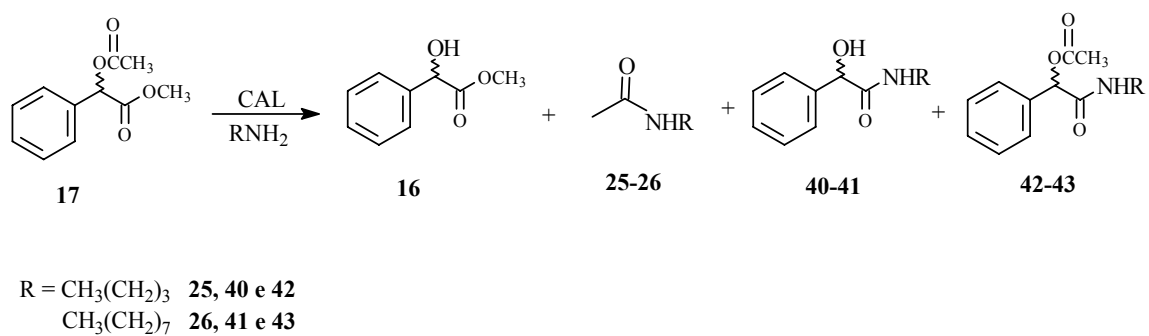


Figura 26- Reação de aminólise catalisada por CAL de (R,S)-acetiloxi(fenil)acetato de metila com aminas primárias.

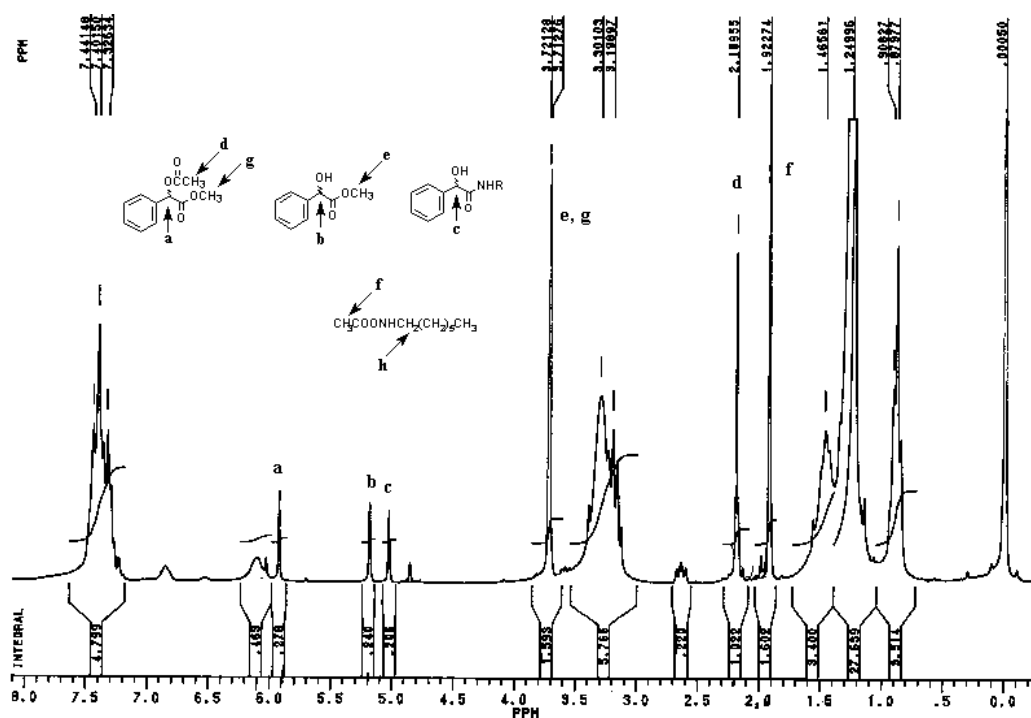


Figura 27 – Espectro de RMN ^1H da mistura reacional da reação de aminólise entre **17** e 1-octilamina com CAL após 12 horas, (CDCl_3 , 200 MHz).

Os resultados até aqui apresentados mostraram uma baixa enantioseletividade nas reações de aminólise de **18** e **16** e nenhuma regioseletividade de **17**, utilizando 1-butilamina e 1-octilamina, como aceptores acila e CAL como catalisador.

5.2.2 Resolução do (R,S)-ácido hidroxi(fenil)acético por PSL e CAL

O ácido hidroxi(fenil)acético (**2**) e seus derivados são reagentes quirais úteis largamente aplicados para propósitos sintéticos e investigações estereoquímicas. Os enantiômeros de **2** podem ser usados para a resolução de álcoois, aminas, etc. e também como reagentes derivatizantes para determinação da pureza ótica por RMN e CLAE [166].

Existem alguns estudos com relação a resolução de **2**, entre os quais está a resolução por desracemização, processo no qual fornece um único enantiômero em excesso enantiomérico e rendimento químico de 100%, a partir do racemato. Este processo envolve o uso de duas enzimas: (i) lipase de *Pseudomonas sp.* que catalisa a acilação de **2** em éter isopropílico; seguida pela (ii) mandelato racemase que catalisa a racemização do isômero R remanescente na solução tampão. Quando esta seqüência foi repetida por 4 vezes, o ácido S-O-acetiloxi(fenil)acético foi obtido com 80 % de rendimento e um ee > 99% como único produto. A primeira etapa que consistiu da resolução cinética de **2** apresentou uma excelente enantiosseletividade, $E > 200$ [167]. Outra metodologia interessante foi a utilização da lipase de *Pseudomonas sp.* MA02 isolada da terra. Usando esta enzima sob condições ótimas, R-(–) de **2** foi acumulado ao rendimento máximo teórico de 50 % (30 g L⁻¹) e excesso enantiomérico de 99,4%. A enzima usou o isômero S de **2** como fonte de carbono e energia [168].

Como o ácido hidroxi(fenil)acético possui um grupo hidroxila e um carboxílico, neste trabalho foram realizados estudos para obter seus enantiômeros separadamente, através da reação de esterificação do ácido carboxílico e também pela acilação da hidroxila.

Inicialmente **2** foi submetido à reação de esterificação com 1-pentanol catalisada por PSL imobilizada em gel de ágar, em mistura de solvente 1:1 (CH₃CN:CCl₄). Outra

enzima testada para esta reação foi a CAL. Após 72 h, não foi constatada a formação do éster, usando PSL/ágar ou CAL. A conversão de 10 e 26 % do ácido hidroxi(fenil)acético ao hidroxi(fenil)acetato de pentila (**43**) foi obtida usando PSL após 336 h e CAL após 840 h, respectivamente, Figura 28a. Os excessos enantioméricos não foram determinados, já que os processos mostraram-se inviáveis para estudos posteriores.

Muitos processos são geralmente sugeridos para melhorar a atuação do sistema catalítico, sendo estes a imobilização da enzima em diferentes suportes e/ou mudanças estruturais no reagente de partida. Assim, a PSL foi imobilizada em gel de ágar e em filme de PEO e devido à baixa solubilidade de **2** em solventes orgânicos mais apolares, o mesmo foi modificado ao **16** por métodos não enzimáticos. Após estas alterações, o composto **16** foi submetido ao processo de acilação enantiosseletiva, usando acetato de vinila como agente acilante e PSL na forma livre e também imobilizada em gel de ágar e em filme de PEO para a obtenção de **17**, Figura 28b.

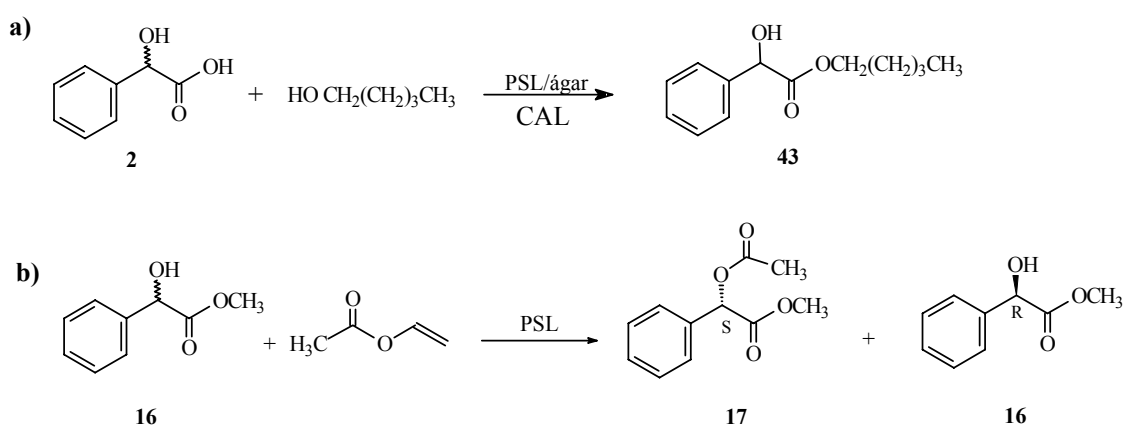


Figura 28 – Resolução do (R,S)-ácido hidroxi(fenil)acético usando PSL livre ou imobilizada. a) através de reação de esterificação de **2** e b) reação de acilação enantiosseletiva de **16**. Condições experimentais: a) 5 mmol de **2** e 15 mmol de 1-pentanol, 500 mg (PSL ou CAL), 30 mL de solvente, T = 25 °C e b) 1,5 mmol de **16** e 15 mmol de acetato de vinila, 100 mg de PSL, 30 mL de solvente, T = 25 °C.

Quando se comparou sob a mesma condição de reação, a lipase de *Pseudomonas sp.* imobilizada em dois suportes diferentes; aprisionamento em gel de ágar e adsorção em filme de PEO, observou-se uma dependência da atividade enzimática em função do suporte. Com imobilização de PSL em gel de ágar verificou-se que a reação de acetilação não ocorreu após 96 h usando éter isopropílico como solvente, entretanto utilizando a enzima livre verificou que a conversão em 17 ocorre com 13%. Porém, a atividade catalítica de PSL imobilizada em filme de PEO aumentou quando comparada com a forma livre, a conversão foi de 50 e 13 %, respectivamente. Como reportado por Wang e col., a enzima imobilizada pode aumentar a velocidade de reação [46].

Uma explicação para os resultados diferenciados quando se usou PSL imobilizada em PEO e em gel de ágar foi relacionada ao processo de difusão dos reagentes e produtos para o meio reacional, e da quantidade de água presente no suporte. Quando enzimas aprisionadas em gel de ágar são usadas, as velocidades da reação total são frequentemente afetadas pelas limitações de transferência de massas dentro de matrizes de aprisionamento e restrições da superfície disponível para a transferência de substratos e produtos [139]. Usando PEO, a difusão foi mais rápida já que a enzima se encontra na superfície do filme, conforme estudos realizados por Crespo [146]. Além disso, existe uma grande diferença no conteúdo de água nos dois suportes, enquanto que água utilizada na preparação do filme de PEO é evaporada, o mesmo não acontece com o gel de ágar, onde toda água está envolvida no processo de gelatinização.

Em uma mistura reacional existem partições de água entre a enzima, o suporte e o solvente do meio. A quantidade de água presente na enzima tem um papel importante em determinar sua atividade catalítica. Quando uma quantidade de água é fixa em um sistema, a solubilidade da água no meio reacional é de grande importância. De modo análogo, a

capacidade do suporte em atrair água, influencia a quantidade de água na enzima e portanto sua atividade catalítica [169].

Um teste simples de capacidade de absorção de água por suportes foi desenvolvido por Reslow e col.[170]. Suportes secos foram misturados em éter isopropílico saturado com água. A quantidade de água absorvida pelo suporte pode então ser calculada. A “aquafilicidade” (Aq) foi definida como sendo a razão entre a quantidade de água no suporte e no solvente, em um sistema padrão. Quando enzimas foram imobilizadas sob diferentes suportes e a atividade catalítica foi medida em uma concentração fixa de água, a atividade diminuiu com o aumento da Aq [169].

Baseando-se nas informações citadas acima, postula-se que PSL também tem a sua atividade diminuída com a imobilização em gel de ágar, devido um valor de Aq maior do que no filme PEO.

Além de investigar a atividade catalítica de PSL livre e imobilizada na reação de acetilação entre **16** e acetato de vinila, também foi avaliada a influência do solvente.

Ainda que seja conhecido que o solvente afeta a especificidade das lipases em biotransformações enantiosseletivas, a racionalização dos mecanismos destes efeitos e o estabelecimento de modelos que permitam antecipar o comportamento de um determinado sistema ainda é incipiente. Os métodos de otimização que empregam a técnica de variação de solvente ainda são empíricos, em geral baseados no conhecimento de sistemas semelhantes ou na escolha arbitrária de um determinado solvente [42].

A Tabela 11 mostra o efeito do solvente orgânico na enantiosseletividade de PSL na forma livre e também imobilizada em filme de PEO na reação de acilação entre **16** e acetato de vinila. Este estudo não foi realizado com a PSL imobilizada em gel de ágar por este sistema ter sido ineficiente nesta reação.

Tabela 11- Influência de solventes na atividade catalítica de PSL imobilizada e livre na acilação catalítica de (R,S)-hidroxi(fenil)acetato de metila com acetato de vinila.

solventes	t (h)	ees ^a (%)		eep ^a (%)		c (%) ^b		E ^c	
		livre	PEO	livre	PEO	livre	PEO	livre	PEO
i-Pr₂O	24	2	33	>99	>99	1	25	200	274
	48	3	47	>99	>99	3	32	205	315
	72	9	69	>99	>99	8	41	216	413
	96	15	99	>99	>99	3	50	230	1057
hexano	24	0	17	0	>99	0	17	0	242
	48	1	39	0	>99	1	2	200	290
	72	6	56	>99	>99	6	36	211	349
	96	7	72	>99	>99	7	42	214	429
t-BuOH	24	0	20	0	>99	0	15	0	242
	48	1	33	>99	>99	1	25	200	274
	72	3	47	>99	>99	3	32	205	315
	96	3	61	>99	>99	3	38	205	370
acetona	24	0	5	0	>99	0	5	0	209
	48	0	7	0	>99	0	7	0	214
	72	2	13	>99	>99	2	12	203	227
	96	2	14	>99	>99	2	15	203	236

Condições experimentais: reagentes (1,5 mmol de **16** e 15 mmol de acetato de vinila), 100 mg de PSL, 30 mL de solvente e T = 25 °C.

- Determinados por CGQ (80 °C 2°/min 180 °C); >99 indica que o outro enantiômero não foi detectado;
- Determinada pela Equação 1 [pág. 6];
- Calculada pelas Equações 2 e 3 [pág. 6].

Os resultados mostraram que tanto a PSL livre e a imobilizada, tiveram a mesma preferência estereoquímica para o enantiômero S de **16**, independente do solvente

utilizado. A configuração absoluta do enantiômero mais reativo foi determinada por CGQ através da comparação direta dos tempos de retenção de padrão enantiomericamente puro com o substrato remanescente, como mostrado na Figura 15.

Os valores de E variaram de 209 a 1057 de acordo com o solvente usado na reação, conforme mostra a Tabela 11. Embora elevados valores de E possam estar dentro de uma faixa de erros, emergidos dos métodos de determinação do ee, onde uma pequena variação pode causar uma mudança significativa no valor de E, ficou evidente que a maior enantiosseletividade de PSL é utilizando o éter isopropílico, seguido por hexano, t-butanol e acetona. Logo, a PSL mostrou boa reatividade e excelente seletividade neste sistema.

Considerando a natureza do solvente orgânico e suporte, o éter isopropílico e filme de PEO foram os mais apropriados para a conversão biocatalítica de **16** com eep > 99%. Todos estes resultados podem ser melhores visualizados na Figura 29.

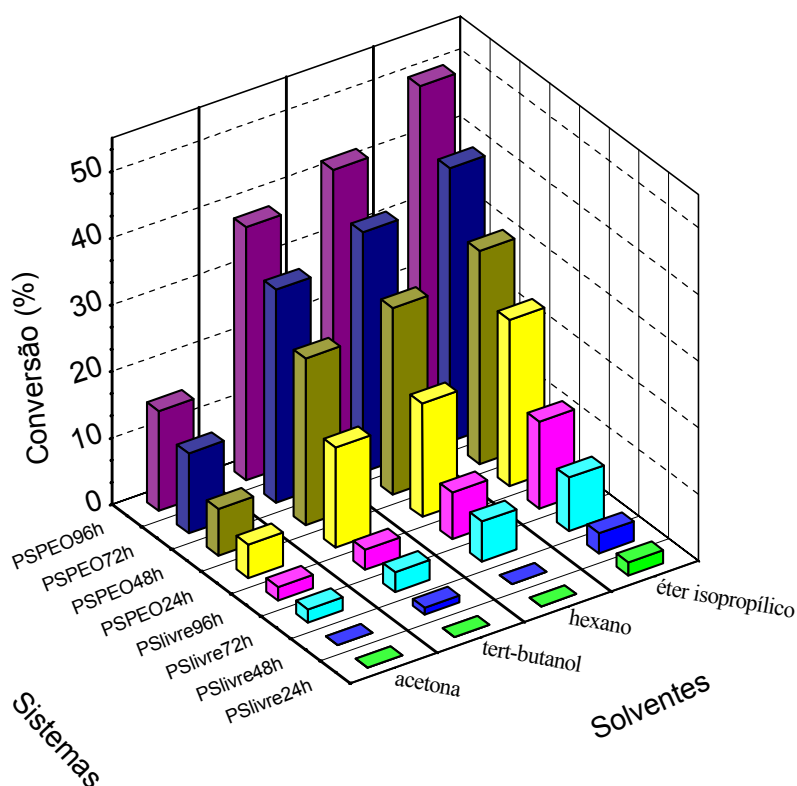


Figura 29 – Influência dos solventes e do tempo na acilação enantiosseletiva de (R,S)-hidroxi(fenil)acetato de metila catalisada por PSL livre e imobilizada em filme de PEO.

A acilação de **16** também foi estudada por Miyazawa e col. [171] utilizando várias lipases. Os valores de E variaram de 6 a 24, sendo que lipase *Pseudomonas sp.* foi a que apresentou melhor enantiosseletividade, E de 24.

As reações de acetilação citadas anteriormente, onde se verificou o efeito dos solventes na atividade catalítica de PSL livre e imobilizada em PEO, foram feitas a 25 °C. Porém, foi observada alguma diferença no tempo de reação para obter uma conversão de 50 % de **17** quando a reação foi realizada a 35 °C e com PSL imobilizada em PEO, Tabela 12.

Tabela 12 – Efeito da temperatura na reação de acilação de **16** catalisada por PSL imobilizada em filme de PEO.

tempo (h)	c (%) ^a		ees (%) ^b		eep		E ^c	
	25 °C	35 °C	25 °C	35 °C	25°C	35 °C	25°C	35 °C
24	25	28	33	38	>99	>99	274	289
48	32	49	47	97	>99	>99	315	844
72	41	50	69	>99	>99	>99	413	1057
96	50	---	>99	---	>99	>99	---	1057

Condições experimentais: reagentes (1,5 mmol de **16** e 15 mmol de acetato de vinila), 100 mg de PSL, 30 mL de éter isopropílico.

- Determinada pela Equação 1 ($c = ees / (ees + eep)$) [pág. 6];
- Determinados por CGQ (80 °C 2°/min 180 °C);
- Calculada pelas Equações 2 e 3 [pág. 6].

Quando a temperatura de 35 °C foi utilizada verificou-se um considerável aumento na velocidade para formar **17** com 49 % de conversão após 48h com eep de 99 % e ees de 97 %. Observando os resultados após 72 h verificou-se um pequeno aumento na porcentagem de conversão, passando de 49 para 50 %. Isto significa que houve uma acentuada diminuição na velocidade próxima a estes valores, e nestas condições ambos enantiômeros foram obtidos com ee > 99%. Porém, foram necessárias 96 h a 25 °C para

obter 50 % de conversão e um ee >99%. Estes resultados indicam que PSL tem maior atividade catalítica a 35 °C e que a temperatura realmente acelerou a formação de **17**. Nenhuma mudança na integridade física do sistema PSL/PEO foi observada após 96 h a 35 °C, e a enzima manteve a enantiopreferência para o enantiômero S.

A reação de acetilação entre **16** e acetato de vinila também foi realizada em escala de 1g. Os resultados novamente comprovaram a eficiência de PSL imobilizada em PEO em comparação com a livre, Tabela 13. Deve ser enfatizado que o procedimento experimental foi extremamente versátil, mostrando que **17** pode ser obtido em um tempo reacional bem menor do que quando a enzima livre é utilizada. Ambos os sistemas mostraram uma excelente enantiosseletividade indicada pelos valores de E entre 179 e 600.

Tabela 13 – Aplicação da metodologia de acetilação usando PSL livre e imobilizada em escala de 1g.

Sistema	t (h)	c (%) ^a	eep (%) ^b	ees (%) ^b	E ^c
PSL/livre	456	52	92	>99	179
PSL/PEO	72	47	>99	89	600

Condições experimentais: reagentes (6 mmol de **16** e 60 mmol de acetato de vinila), 100 mg de PSL, 30 mL de éter isopropílico, T = 35 °C.

- Determinada pela Equação 1 [pág. 6];
- Determinados por CGQ (80 °C 2°/min 180 °C);
- Determinada pelas Equações 2 e 3 [pág. 6].

Além de aumentar a velocidade de formação de **17** quando comparada com a enzima livre, outra vantagem adicional do sistema PSL/PEO foi a sua reutilização. A enzima imobilizada em PEO foi reutilizada por quatro vezes em um período de quatro meses, na reação de acetilação entre **16** e acetato de vinila. Após cada uso, o filme de PEO contendo a PSL foi lavado com éter isopropílico e estocado para o próximo reuso. Os

resultados mostraram que a reatividade e enantiosseletividade de PSL mantiveram-se constantes por três reutilizações e na quarta, houve uma acentuada diminuição na reatividade, mas a enantiosseletividade foi preservada. Os valores de eep obtidos foram > 99% em todas as reutilizações independentes do tempo de reação, Tabela 14.

Tabela 14 – Resultados das reutilizações da PSL imobilizada em filme de PEO na reação de acilação de (R,S)-hidroxi(fenil)acetato de metila.

		c (%) ^a			eep (%) ^b			ees (%) ^b			E ^c		
		24h	48h	72h	24h	48h	72h	24h	48h	72h	24h	48h	72h
Número de reutilizações	1	25	32	41	>99	>99	>99	33	47	70	274	317	418
	2	25	32	41	>99	>99	>99	33	47	70	274	317	418
	3	18	29	40	>99	>99	>99	22	41	67	246	298	401
	4	4	10	40	>99	>99	>99	4	7	11	207	214	221

Condições experimentais: reagentes (1,5 mmol de **16** e **15** mmol de acetato de vinila), 100 mg de PSL, 30 mL de solvente, T = 25 °C.

- a. Determinada pela Equação 1 [pág. 6];
- b. Determinados por CGQ (80 °C 2°/min 180 °C);
- c. Calculada pelas Equações 2 e 3 [pág. 6].

Alguns dados sobre estabilidade operacional de enzimas imobilizadas já foram reportados na literatura. Os quatro exemplos citados abaixo são para a imobilização de lipases.

a) A lipase de *Candida cylindracea*, imobilizada em nylon ativado com glutaraldeído, reteve 25 % da atividade após 5 ciclos na síntese de propionato de etila [127].

b) A lipase de *Mucor miehei*, imobilizada nos macroporos de resinas aniônicas, reteve de 40 a 70 % de sua atividade catalítica após 10 ciclos na síntese do oleato de isopropilideno glicerol, dependendo da razão ácido oléico/glicerol isopropilideno [127].

c) A lipase de *Chromobacterium viscosum* imobilizada em organogéis de gelatina, permaneceu com a atividade catalítica após 15 sucessivas corridas em um período de 30 dias em heptano [172].

d) A lipase de *Candida rugosa* imobilizada por adsorção física em copolímero de estireno-divinilbenzeno levou a uma pequena desativação da enzima, após 12 ciclos consecutivos de 24 h cada. Tais resultados revelaram bom potencial para reciclagem sob sistemas não aquosos [130].

A estabilidade operacional de sistemas de imobilização de enzimas é economicamente muito importante e poderá ser mais vantajosa do que na forma livre.

Ficou evidente que o poli(óxido de etileno), como suporte polimérico para imobilizar a PSL, aumentou a atividade enzimática e é muito mais eficiente do que a correspondente enzima na forma livre e imobilizada em gel de ágar sob as mesmas condições. Além disso, pode ser reutilizado por 3 vezes sem perda significativa da reatividade e seletividade.

A acilação enantiosseletiva entre **16** e o acetato de vinila também foi avaliada usando lipase de *Candida antarctica* (CAL) em éter isopropílico (t = 48 h). Após este período houve a formação do produto com apenas 3 % de conversão, eep 76 %, ees 2 % e E = 7,5. A CAL mostrou enantiopreferência oposta a PSL, o enantiômero mais reativo foi o R, sendo que para todos os sistemas estudados utilizando PSL o enantiômero mais reativo sempre foi o S.

Como visto anteriormente, a CAL mostrou uma enantiosseletividade baixa para este sistema, mas se o aperfeiçoamento das condições experimentais levar a formação de **17** com ee melhores, será possível obter tanto o enantiômero R e quanto o S de **16** apenas usando lipases de procedências diferentes. Estes resultados evidenciam mais uma grande

vantagem da biocatálise na obtenção de compostos enantiomericamente puros, sob condições brandas de reação.

5.3 Resolução dos ácidos racêmicos 2-bromoalcanóicos por lipases

5.3.1 Ácido 2-bromopentanóico (**3**)

O ácido **3** foi submetido à discriminação quiral através da reação de esterificação com 1-butanol catalisada por PSL e CRL immobilizadas em gel de ágar e na forma livre, Figura 30.

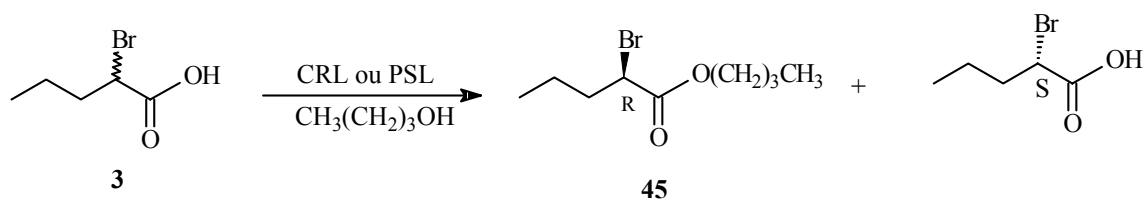


Figura 30 – Esterificação enantiosseletiva do ácido 2-bromopentanóico catalisada por lipases.

A discriminação quiral de **3** não ocorreu usando a lipase de *Pseudomonas sp.* na forma livre formando o 2-bromopentanoato de butila racêmico. Uma nova investigação foi realizada, só que utilizando a lipase de *Candida rugosa* immobilizada em gel de ágar e na forma livre. A análise dos resultados mostrou que esta enzima foi mais eficiente do que a PSL, mas que ainda não apresentou uma boa discriminação quiral, Tabela 15.

A Figura 31 mostra o cromatograma para **45** com ee de 22%, formado quando a CRL immobilizada em ágar foi usada na reação de esterificação de **3**. A atribuição da configuração absoluta foi baseada na literatura [84], onde o desvio no plano da luz polarizada para a esquerda é característico do enantiômero S. O ácido remanescente **3**

após medida de rotação ótica, o qual também desviou o plano da luz polarizada para a esquerda, foi atribuído como sendo o enantiômero S, logo R foi o isômero mais reativo.

Tabela 15 - Dados obtidos para a reação de esterificação de **3** com 1-butanol catalisada por lipases.

Enzima/Sistema	t (h)	c (%) ^a	eep (%) ^b	ees ^b	E ^c
PSL/ágar	840	40	0	0	---
PSL/livre	840	80	0	0	---
CRL/ágar	120	22	22	7	1,7
CRL/livre	120	56	12	15	1,5

Condições experimentais: reagentes (5 mmol de **3** e 15mmol de álcool), enzimas (250 mg de PSL e 500 mg CRL), 25 mL de hexano e T = 35 °C.

a. Determinada pela Equação 1 [pág. 6].

b. Determinados por CGQ (80 °C 2°/min 180 °C)

c. Calculada pelas Equações 2 e 3 [pág. 6].

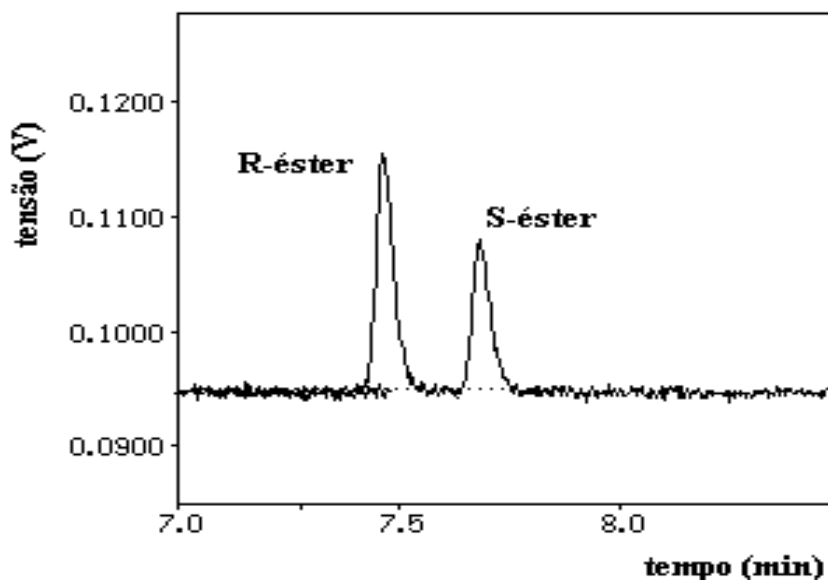


Figura 31 – Cromatograma do 2-bromopentanoato de butila obtido com a CRL imobilizada em gel de ágar com ee de 22%. Condições experimentais: Inj. = 250 °C, Det. = 275 °C, T_i = 90 °C, T_f = 180 °C, Δ_{aq} = 3 °C/min, Pressão do H₂ = 85 kPa.

A reação de esterificação de **3** também foi testada utilizando CAL, os resultados mostraram uma baixa atividade catalítica e nenhuma enantiosseletividade, sendo uma conversão de 43 % foi conseguida somente após 32 dias.

A avaliação dos resultados mostra que das três lipases usadas, apenas a CRL apresentou alguma enantiosseletividade, E de 1,7. Aconselha-se o uso de CRL para estudos futuros, onde mudanças de outros parâmetros possam melhorar a sua estereosseletividade.

5.3.2 Ácido 2-bromoexanóico (**4**)

O ácido **4** foi submetido à discriminação quiral através da reação de esterificação catalisada pelas enzimas PSL e CRL imobilizadas em gel de ágar, e também com CRL imobilizada em PEO e na forma livre, Figura 32.

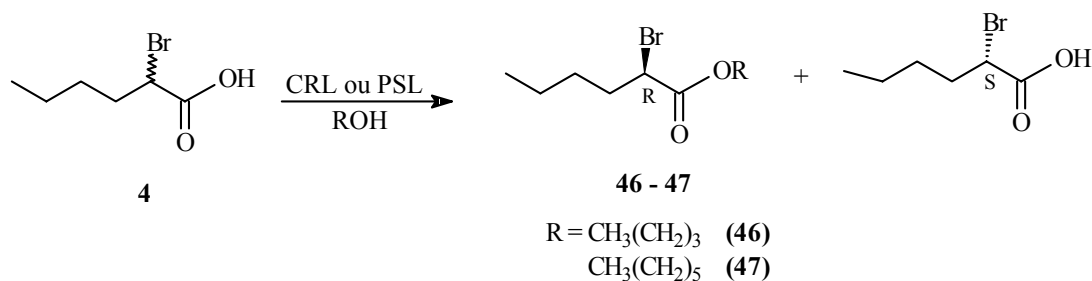


Figura 32- Esterificação enantiosseletiva do ácido 2-bromoexanóico catalisada por lipases.

Os resultados apresentados na Tabela 16 mostraram que a PSL imobilizada em gel de ágar foi hábil para catalisar a formação do éster com conversão de 56%, mas não mostrou enantiosseletividade. Nenhuma comparação pode ser feita a respeito da enantiosseletividade da enzima livre, mas estudos realizados com os demais ácidos bromados revelaram que há uma diminuição quando a forma livre é usada. A CRL mostrou uma certa discriminação para os enantiômeros com os valores de E variando de

1,2 a 4,0. O melhor resultado foi obtido com a enzima imobilizada em PEO e com 1-hexanol como acceptor acila.

Independente do suporte utilizado, a enantiopreferência das enzimas foi para isômero R de **4**. Novamente a configuração absoluta do enantiômero mais reativo foi determinada por comparação do desvio no plano da luz polarizada causado pelo ácido remanescente com o valor fornecido na literatura [84]. O sinal negativo é atribuído ao enantiômero S, logo R foi o isômero mais reativo.

Tabela 16- Dados obtidos da reação de esterificação de **4** com 1-butanol e 1-hexanol catalisada por lipases.

Sistema	Álcool	t (h)	c (%) ^a	eep (%) ^b	ees (%) ^c	E ^d
PSL/ágar	CH ₃ (CH ₂) ₃ OH	816	56	0	0	---
CRL/livre	CH ₃ (CH ₂) ₃ OH	118	38	8	5	1,2
CRL/livre	CH ₃ (CH ₂) ₃ OH	72	10	12	1	1,3
CRL/PEO	CH ₃ (CH ₂) ₃ OH	72	32	50	24	3,8
CRL/ágar	CH ₃ (CH ₂) ₃ OH	72	20	22	6	1,6
CRL/livre	1-hexanol	72	11	41	5	2,5
CRL/PEO	1-hexanol	72	43	48	36	4,0

Condições experimentais: reagentes (5 mmol de **4** e 15mmol de álcool), enzimas (250 mg de PSL e 500 mg CRL), 25 mL de hexano e T = 35 °C.

a. Determinada pela Equação 1 [pág. 6];

b. Determinado por CGQ (90 °C 3°C/min 200 °C); Inj. = 250 e Det. 280 °C

c. Determinado após derivatização com MeOH via química por CGQ (90 °C 3°C/min 170 °C)

d. Determinada pelas Equações 2 e 3 [pág. 6].

Nas condições experimentais utilizadas para a resolução de **4** não se obteve bons resultados, com relação a enantiosseletividade, utilizando PSL e CRL. A imobilização da CRL, variação do suporte e do acceptor acila não foram suficientes para garantir uma boa enantiosseletividade. A PSL não mostrou discriminação dos enantiômeros de **4**.

Tabela 17- Dados obtidos para a reação de esterificação de **5** com 1-butanol catalisada por PSL.

Entradas	Enzima	t (h)	c (%) ^a	eep (%) ^b	ees (%) ^c	E ^d
1	PSL/ágar	432	46	70	60	10
2	PSL/ágar	192	57	54	73	7
3	PSL/PEO	192	19	8	35	2,2
4	PSL/livre	98	2	8	0	1,2
5	PSL/PEO	98	25	38	13	2,5
6	PSL/ágar	98	58	50	68	5,9

Condições experimentais: reagentes (5 mmol de **5** e 15mmol de álcool), 250 mg de PSL (entradas 2 a 3) e 500 mg de PSL (entradas 4 a 6), T = 25 °C (entrada 1) e 35 °C (entradas 2 a 6) e 25 mL de hexano.

- a. Determinada pela Equação 1 [pág. 6];
- b. Determinado por CGQ (90 °C 3°C/min 200 °C); Inj. = 250 e Det. 280 °C;
- c. Determinado após derivatização com MeOH via química por CGQ (90 °C 3°C/min 170 °C);
- d. Determinada pelas Equações 2 e 3 [pág. 6].

5.3.4 Ácido 2-bromoexadecanóico (**6**)

A esterificação enantiosseletiva de **6** catalisada pela lipase de *Candida cylindracea*, hoje chamada de lipase de *Candida rugosa*, já foi descrita na literatura. A reação de esterificação do ácido com 1-butanol forneceu o éster com 47 % de conversão após 22 h e um $[\alpha] = -9,7$ (c 1,0, CHCl₃), mas nem a configuração absoluta e o excesso enantiomérico foram definitivamente confirmados [173].

Em busca de outra metodologia, a resolução de **6** foi averiguada através da reação de esterificação com 1-butanol catalisada por PSL imobilizada em PEO ou na forma livre,

e também por CAL, Figura 34. Em ambos os sistemas foram usados hexano como solvente orgânico.

A determinação da porcentagem de conversão em éster de **6** por RMN ^1H foi feita através da integração dos sinais dos hidrogênios **a**, **b** e **b'** exemplificados na Figura 35. Para evitar a sobreposição dos sinais utilizou-se acetona deuterada como solvente na aquisição do espectro de RMN ^1H para esta mistura reacional.

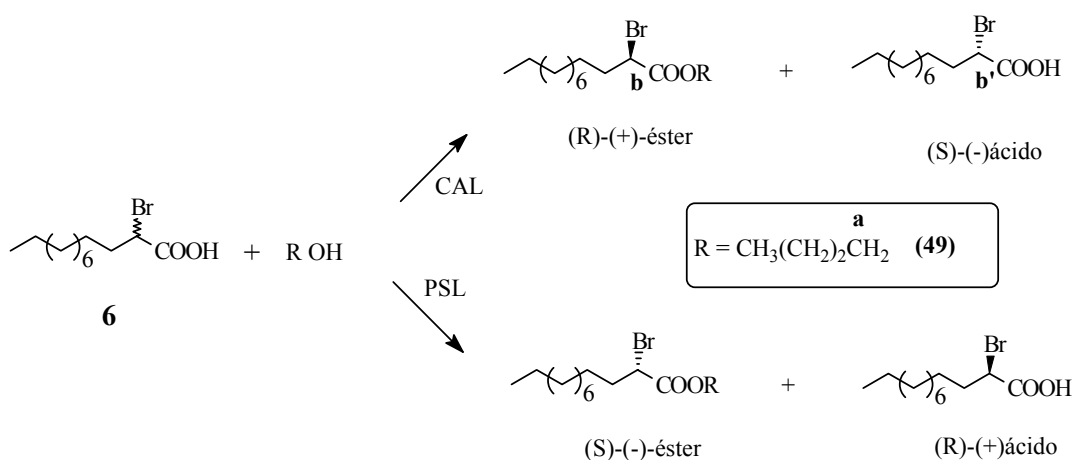


Figura 34 – Esterificação enantiosseletiva do ácido 2-bromoexadecanóico catalisada por lipases.

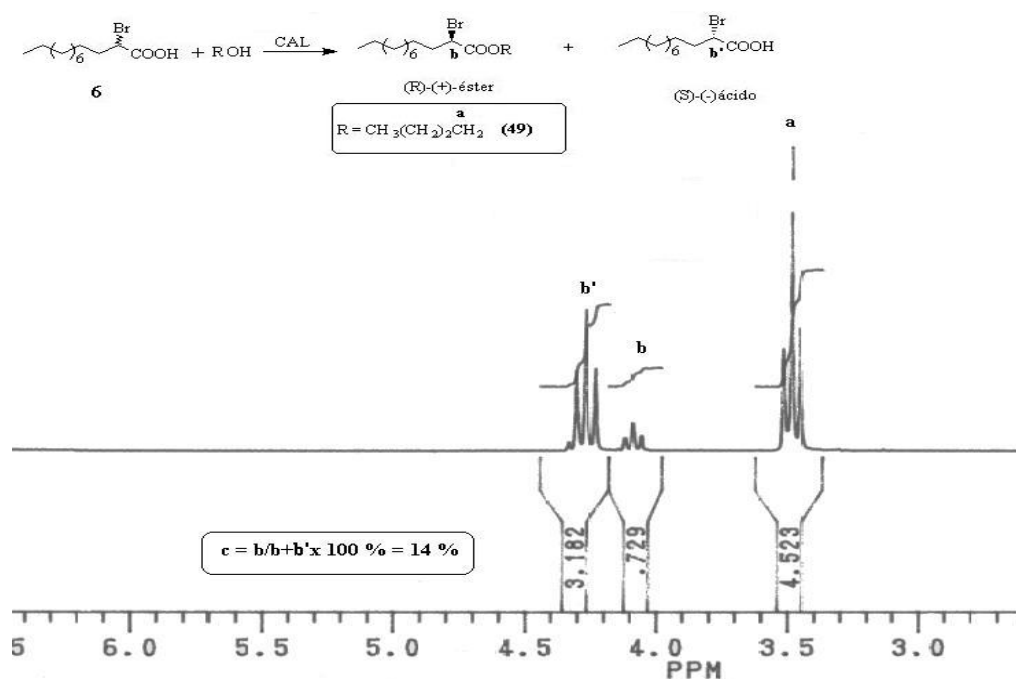


Figura 35 – Espectro parcial de uma mistura reacional (**6**, **49** e 1-pentanol), mostrando como obter a conversão de uma reação.

Os resultados obtidos para estas reações estão sumarizados na Tabela 18.

Tabela 18- Dados obtidos para a reação de esterificação de **6** com 1-butanol catalisada por lipases na forma livre e imobilizada.

Entradas	Enzima	t (h)	c (%) ^a	ees (%)	α ° (ac.) ^b	Isômero remanescente
1	PSL/PEO	104	39	75 ^c	+	R
2	PSL/ágar	432	98	---	---	---
3	PSL/PEO	96	39	34 ^c	+	R
4	PSL/ágar	240	80	89 ^d	+	R
5	CAL	96	52	18 ^c	-	S
6	PSL/ livre	172	66	97 ^e	+	R
7	PSL/PEO	172	78	90 ^e	+	R
8	PSL/ágar	172	67	64 ^e	+	R
9	CAL	172	100	---	---	---
10	CAL	80	85	37 ^e	-	S

Condições experimentais: Entradas 1 a 2 utilizou-se 5 mmol de reagentes e 10 mmol para as entradas de 3 a 10, sendo a quantidade de enzima de 150, 250 e 300 mg de enzima para as entradas 1 a 3 respectivamente e 500 mg de 4 a 10; 25 mL de hexano e T = 35 °C.

- a. Determinada por RMN ¹H (relação dos hidrogênios b e b' das estruturas mostradas na Figura 35).
- b. Sinal da rotação óptica absoluta do ácido remanescente.
- c. Determinado por CGQ após derivatização com MeOH
- d. Determinado por medidas polarimétricas.
- e. Determinado por RMN ¹H.

Em uma resolução cinética enzimática é ideal cessar a reação quando esta atinge uma conversão em torno de 50 %. Na presença de uma enzima enantiosseletiva, o enantiômero mais reativo pode ser obtido com alto valor de ee antes da reação completar 50 %. Após esta porcentagem, o enantiômero menos reativo começa a reagir também, diminuindo assim o ee do produto.

A dificuldade de quantificação do excesso enantiomérico de **49** por CGQ impediu a obtenção dos valores de E. Como o acompanhamento da reação por CGQ não foi possível, optou-se em estipular um tempo de reação para os sistemas apresentados na Tabela 18 e as

porcentagens de conversão foram determinadas após este período por RMN ^1H , explicando assim os diferentes valores de conversão obtidos. O ácido remanescente foi isolado e submetido a três métodos analíticos para determinação do seu excesso enantiomérico. Os métodos analíticos, polarimetria, cromatografia e RMN ^1H empregando seletores quirais, foram utilizados para determinar o ee de **6** remanescente.

A quantificação dos excessos enantiomérico de **6** por CG com uma coluna quiral apropriada e atribuição precisa da configuração absoluta pela síntese química a partir de precursores quirais foram reportados por Hernanz e col.[174, 175]. Baseando-se neste estudo, o composto **6** foi derivatizado para o seu correspondente éster metílico e analisado por CGQ com a fase estacionária CP-Chirasil–Dex CB. Os resultados do ee estão mostrados nas entradas 1, 3 e 5 da Tabela 18. Infelizmente o éster obtido enzimaticamente não foi resolvido por esta fase, em decorrência do tamanho da cadeia. Desta forma o enantiômero oposto ao do ácido remanescente poderia ser obtido através da hidrólise do éster, mas para isto seria necessário desenvolver um sistema hidrolítico que evitasse a epimerização no carbono estereogênico. Estudos realizados por Evans e col. mostraram que a epimerização pode ocorrer até mesmo sobre condições brandas [175].

Baseando-se nestas informações, o valor dos ee atribuído aos ácidos remanescentes pela metodologia citada acima pode ter sido alterado significativamente pela reação de esterificação com metanol por método não enzimático, usando ácido como catalisador.

O outro método empregado para determinar o ee do ácido foi através de medidas de rotação ótica. Para isto, preparou-se uma solução 0,01 g/mL do ácido remanescente (entrada 4 da Tabela 18) e a medida de rotação ótica observada forneceu $[\alpha]_{22} = + 20$ (c 1,00, CHCl_3). Atribuiu-se ao ácido remanescente a configuração absoluta R e um valor de ee de 89 %, por analogia com os valores de rotação específica para este ácido preparado

por Guo e col., os quais obtiveram um ee > 95% para ambos enantiômeros. O isômero R apresentou $[\alpha]_{22} = +21,2$ (c 1,00, CHCl₃) e para o S $[\alpha]_{22} = -21,2$ (c 1,00; CHCl₃) [176].

Os demais ácidos remanescentes de outras sínteses não foram submetidos a este método analítico pela necessidade de maior quantidade de amostra. O método polarimétrico somente foi utilizado para os demais casos para confirmar o sinal da rotação ótica, os quais estão expressos na Tabela 18.

O terceiro método analítico fundamentou-se na discriminação dos sinais de RMN de ¹H dos enantiômeros devido a formação de espécies diastereoisoméricas entre substratos quirais e SQs (agentes quirais de deslocamento, solvatação ou de derivação). Esta técnica foi desenvolvida no laboratório SPINLAB da Unicamp pelo grupo da Profa. Anita Marsaioli.

Conforme apresentado na parte experimental, a determinação de ee por RMN ¹H de **6** e do ácido remanescente das reações de esterificação foi avaliada pela discriminação quiral dos mesmos perante quatro seletores quirais, Figura 17.

Inicialmente avaliou-se o potencial de discriminação enantiomérica dos seletores quirais com relação ao ácido racêmico **6**. Observou que apenas o H_α do racemato sofreu discriminação, o qual ocorreu na presença dos complexos calix[4]/S-PEA e calix[6]/S-PEA, e também na presença de β-CDPM em CD₃OD/D₂O, Tabela 19.

Verificou ainda que, no experimento com o complexo calix[6]/S-PEA a temperatura ambiente (25 °C), há uma sobreposição entre o sinal discriminado de (±)-**6** e o sinal do grupo metilênico do calix[6], δ de 3,8 a 4,0 ppm. Porém, aumentando a temperatura de realização dos espectros foi possível separar satisfatoriamente o sinal discriminado (H_α), do sinal do seletor (CH_{2-calix}), Figura 36. Contudo, havia um agravante para uma boa análise quantitativa; a multiplicidade do sinal discriminado (dd, *J* 8,6 e 5,8 Hz) levou a sobreposição dos sinais diastereoisoméricos, dificultando a integração dos

mesmos para a obtenção do ee, além de diminuir o limite de detecção da análise. Esta limitação foi engenhosamente contornada com a saturação dos hidrogênios vizinhos (H_{β}) ao sinal discriminado. Desta forma o duplo dubleto do H_{α} foi reduzido a um simples singlete e o sinal discriminado dos enantiômeros foi facilmente analisado após desconvolução, Figura 37. Tal procedimento simplificou a determinação de ee aumentou o limite de detecção da análise.

Tabela 19- Discriminação quiral do H_{α} de (\pm)-**6** na presença de seletores quirais.

Seletor quiral (SQ)	solvente	$\Delta\delta_H = \delta_{(+)} - \delta_{(-)} $ (em Hz)
α -CDPM	CD_3OD	-
β -CDPM	CD_3OD	-
α -CDPM	CD_3OD/D_2O (1:1)	-
β -CDPM	CD_3OD/D_2O (1:1)	8,1
calix[4]/ \mathcal{S} -PEA	$CDCl_3$	8,2
calix[6]/ \mathcal{S} -PEA	$CDCl_3$	8,3

Os excessos enantioméricos expressos na Tabela 18 para o ácido remanescente **6**, (Entradas 4, 6, 7, 8 e 10) foram determinados usando a metodologia descrita acima. Novamente pode ser observada a enantiopreferência oposta de CAL e PSL, conforme mostra a Figura 36c e 36d, respectivamente. Além disso, a CAL foi mais reativa que a PSL em termos de conversão de **6** em **49**. A Tabela 18 mostra que após 172h, 100% de produto é obtido usando CAL e dependendo de estar livre ou imobilizada, a conversão usando PSL variou de 66 a 78 %.

Com base nestes resultados, pode-se afirmar que o emprego destes sistemas de seletores quirais poderá ser uma alternativa para a determinação do ee do ácido 2-bromoexadecanóico, seus derivados e compostos análogos. A metodologia empregando complexos calix[n]/indutor quiral é muito interessante devido a sua versatilidade, isto é, os indutores quirais podem ser variados e aplicados a uma série de substratos, de acordo com as necessidades experimentais.

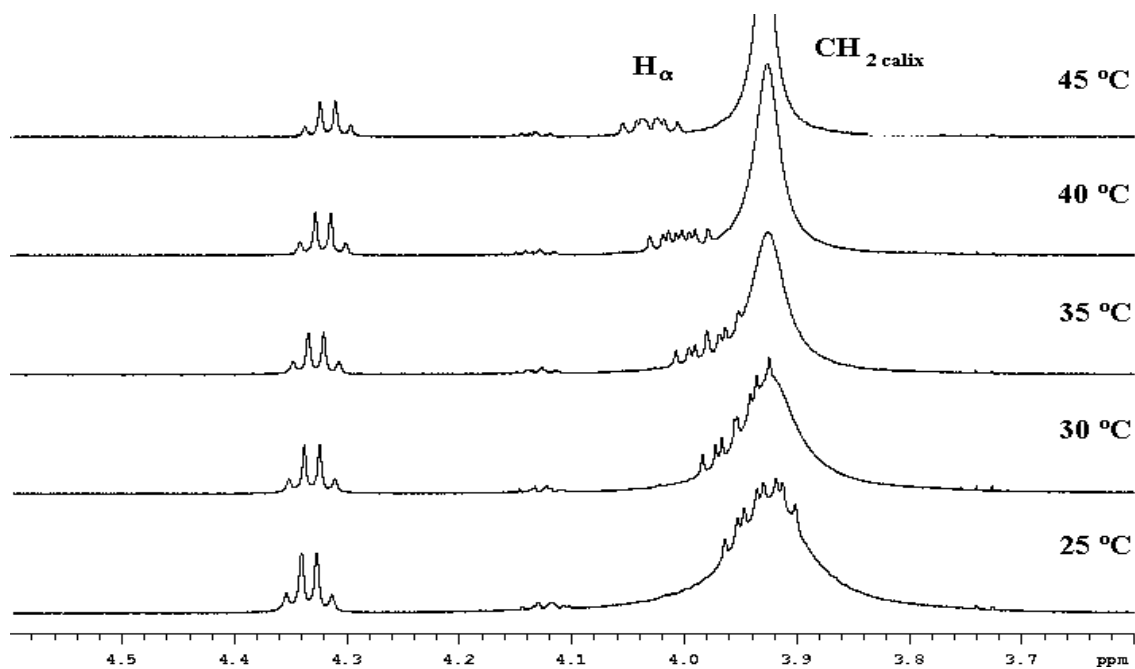


Figura 36- Espectros parciais de RMN¹H de (±)-**6** na presença do complexo calix[6]/S-PEA a várias temperaturas (CDCl₃, 500 MHz).

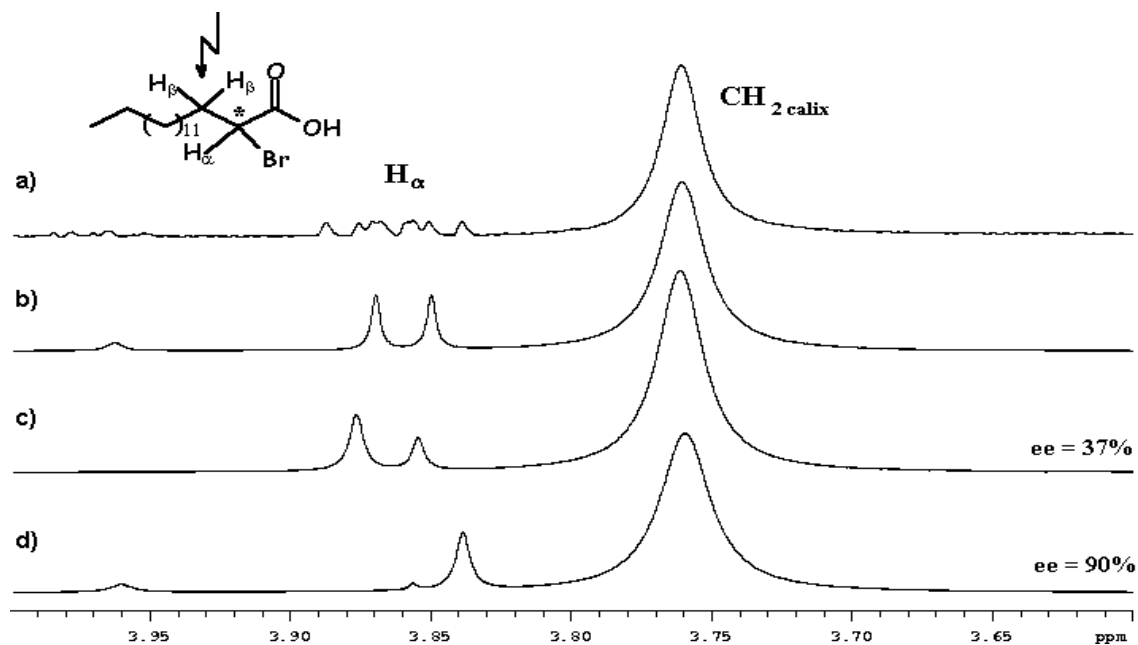


Figura 37- Espectros parciais de RMN de ¹H (500 MHz, CDCl₃, 45 °C) de **6** na presença do complexo calix[6]/S-PEA. a) racemato; b) racemato após irradiação do H_β; c) e d) quirais – produtos de biotransformação com lipases após irradiação do H_β (Entradas 10 e 7 da Tabela 18, respectivamente).

A PSL não teve sua enantiopreferência alterada após o processo de imobilização, o isômero S sempre foi o mais reativo. Foi observado um acréscimo na porcentagem de conversão usando a PSL imobilizada em PEO, em relação a enzima livre ou imobilizada em gel de ágar. Os valores de *e.e.s* variaram de 64 a 97% e indicaram que PSL possui uma boa seletividade em relação aos enantiômeros de **6** e que futuras variações nas condições experimentais poderão prover uma melhora na discriminação quiral.

As enzimas utilizadas neste trabalho apresentaram enantiopreferência oposta para o enantiômero mais reativo, sendo S (PSL) e R (CAL), conforme dados da Tabela 18 e espectro de RMN ^1H , Figura 37.

5.4 Resolução de ácidos racêmicos 2 e 3-alkilalcanóicos

Um processo de esterificação entre um álcool quiral e um ácido racêmico pode levar a formação de compostos opticamente ativos com o emprego de lipases em meio orgânico. Esta metodologia foi aplicada para a síntese direta dos ácidos 2 e 3-alkilalcanóicos com álcoois primários e lipases livres ou imobilizadas, em solvente orgânico.

5.4.1 Ácido 2-etilhexanóico (7)

A esterificação de **7** com 1-pentanol na presença de CAL ou PSL formou o 2-etilhexanoato de pentila (**50**) após 53 dias com de conversão de 8,7 e 6,5 %, respectivamente. A baixa reatividade destas enzimas pode estar relacionada a impedimentos estéreos na estrutura de **7**, onde provavelmente o radical etila ligado diretamente ao carbono quiral está dificultando a formação do éster. A baixa reatividade

obtida com a CAL foi observada com relação ao tempo de reação, que foi muito longo. Para os ésteres derivados do ácido 2-metil substituído a reação ocorreu com conversão de 85 % após 72h. Este tema será apresentado na próxima seção.

Outro problema ocorrido na resolução deste ácido foi a falta de discriminação pela fase estacionária quiral CP-chirasil-DEX de seus ésteres. Assim, foi inviável o prosseguimento da resolução deste substrato.

Outros estudos envolvendo novas metodologias de resolução e de quantificação do ee, em conjunto aos desenvolvidos aqui poderão contribuir para obter os enantiômeros de **7** enantiomericamente puros.

5.4.2 Ácido 2-metilpentanóico (**8**)

A obtenção de ácidos 2-metilalcanóicos enantiomericamente puros foi alcançada com uma enantiosseletividade modesta por Engel. Utilizando a lipase de *Candida rugosa* foi possível obter preferencialmente o enantiômero S dos ácidos 2-metilalcanóicos. A enantiosseletividade (E) alcançada variou de 3 a 70 dependendo do acceptor e doador acila. O melhor resultado foi obtido com o ácido 2-metilpentanóico e 1-octanol (E = 70)[177].

A resolução de **8** estudada neste trabalho foi avaliada através da reação de esterificação com 1-butanol catalisada por CAL ou PSL, Figura 38. Álcoois de cadeias maiores não foram estudados pela dificuldade de separação dos enantiômeros de **51** na fase estacionária CP-chirasil-DEX.

Os resultados obtidos nestas reações estão sumarizados na Tabela 8. A preferência estereoquímica na reação de esterificação de **8** foi oposta para as enzimas CAL e PSL. Uma enantiosseletividade baixa foi observada com E variando de 1,2 a 7,3. A atribuição da configuração absoluta do isômero mais reativo foi baseada nos sinais da rotação ótica

específicas obtidos por Engel para **8**, onde o sinal negativo foi relacionado ao isômero R [177]. O mesmo sinal (-) foi obtido para o ácido remanescente da reação de esterificação catalisada por PSL, logo o isômero S foi o mais reativo. Na reação catalisada por CAL obteve-se o ácido remanescente com sinal positivo, portanto o isômero mais reativo foi o R. O tempo de retenção dos enantiômeros de **51**, onde o pico de maior área indica o enantiômero mais reativo de **8**, mostrou que CAL e PSL possuem estereopreferência distinta.

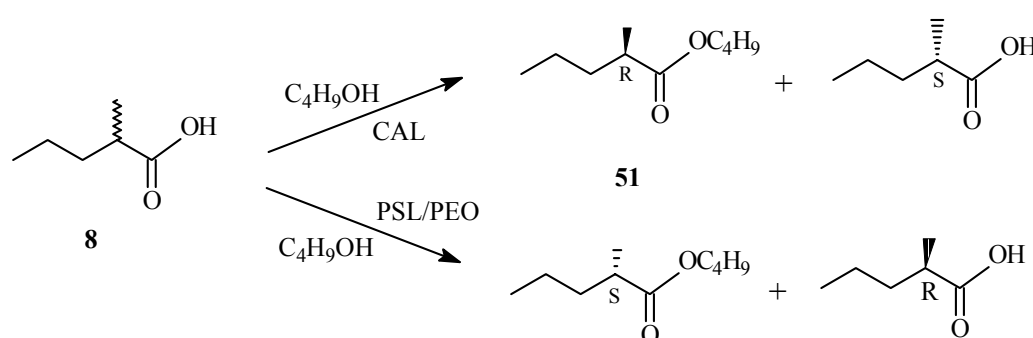


Figura 38- Resolução do ácido 2-metilpentanóico através de reação de esterificação catalisada por lipases.

Tabela 20 - Dados obtidos da reação de esterificação de **8** com 1-butanol catalisada por lipases.

Enzima	t (h)	c (%) ^a	eep (%) ^b	ees (%) ^c	E ^d	Isômero mais reativo
PSL/PEO	840	22	71	20	7,2	S
CAL	24	32	11	5	1,3	R
CAL	48	60	7	10	1,2	R
CAL	72	85	3	15	1,2	R

Condições experimentais: reagentes (30 mmol de **8** e 90 mmol de 1-butanol), T = 35 °C, CAL (500 mg), PSL (250 mg), 25 mL de hexano

- Calculada pela Equação 1 [pág. 6];
- Determinado por CGQ (60 °C $\underline{2^\circ C/min}$ 140 °C);
- Determinado por CGQ após derivatização com MeOH (60 °C $\underline{2^\circ C/min}$ 140 °C);
- Determinada pelas Equações 2 e 3 [pág. 6].

5.4.3 Ácido 3-metilpentanóico (9)

Na tentativa de resolução de **9**, inicialmente foi realizada uma reação de esterificação com 1-pentanol, em quantidades equimolares de 10 mmol catalisada por CAL. A percentagem de conversão ao 3-metilpentanoato de pentila (**52**) foi de 68% em 5 horas de reação. Devido a falta de discriminação quiral pela fase estacionária CP-chirasil Dex CB, o ácido remanescente foi isolado e submetido a medidas polarimétricas. O desvio no plano da luz polarizada para direita indicou que CAL foi estereosseletiva.

Como já foi mencionado, para determinar a enantiosseletividade em uma reação é necessário conhecer o excesso enantiomérico do produto e/ou do substrato remanescente. Baseado na premissa de que os ésteres não puderam ser discriminados na fase quiral usada, uma quantidade maior de reagentes (30 mmol) foi utilizada para obter uma boa recuperação do ácido remanescente para avaliação do valor de rotação ótica.

A reação foi acompanhada retirando-se alíquotas em intervalos de 1 hora e a percentagem de conversão do éster determinada por RMN ¹H. A reação foi interrompida quando a conversão alcançou 43%, visando obter um excesso enantiomérico do éster com maior valor e, portanto com maior grau de pureza.

O ácido remanescente foi isolado conforme o procedimento descrito na parte experimental. Uma solução etanólica do ácido 3-metil pentanóico (0,04 g/mL) foi submetida a medida de rotação ótica. A rotação ótica observada (α_o) foi de 0,06°. A rotação ótica específica $[\alpha]$ foi calculada de conforme a Equação 8.

$$[\alpha]_t^p = \frac{100 \cdot 0,06}{4 \text{ g/mL} \cdot 0,5 \text{ dm}} = +3,0 \text{ (c = 4, EtOH - isômero mais reativo)}$$

O excesso enantiomérico do ácido foi calculado usando a Equação 9 e valor da rotação específica para ácido-(+)-3-metil pentanóico foi abstraído do Handbook of Chemistry and Physics [178].

$$ees = \frac{3,0}{8,5} \times 100 = 35 \%$$

Como os dados de literatura não apresentam valores para $[\alpha]$ de **52**, não foi possível determinar o seu excesso enantiomérico.

Por analogia com os dados obtidos para o a reação esterificação entre **7** e 1-butanol, onde o desvio no plano da luz polarizado para direita foi atribuído para o enantiômero S do ácido remanescente, acredita-se que o enantiômero mais reativo de **8** também foi o R. A enantiosseletividade (E) da CAL para esta reação não foi calculada por falta de dados experimentais.

5.5 Resolução das aminas racêmicas

As amidas *N*-(1-etilpentil)acetamida (**19**), *N*-(1-metilhexil)acetamida (**20**), *N*-(2-etilhexil)acetamida (**21**), *N*-(1-metilheptil)acetamida (**22**), *N*-(1-feniletíl)acetamida (**23**) e *N*-(1,2-dimetilpropil)acetamida (**24**) preparadas por métodos não enzimáticos tiveram uma boa discriminação quiral na fase estacionária CP-chirasil Dex CB, obtendo-se assim as condições cromatográficas ideais para a separação de seus enantiômeros.

Primeiramente avaliou-se a eficiência de CAL nas reações de aminólise de (R,S)- α -metilbenzilamina (**13**) e 1-metileptilamina (**11**) empregando o acetato de vinila como agente acilante. Diferente das reações de transesterificação onde o emprego deste éster melhora a enantiosseletividade da enzima, as reações de aminólise não formaram as correspondentes amidas enantiomericamente puras (evidenciado por CGQ) e a mistura

tornou-se marrom após 12 horas. Formaram-se vários produtos inesperados que não puderam ser identificados (cromatografia de camada delgada e CG). Os compostos formados provavelmente são originados da reação do acetaldeído com aminas primárias, formando iminas *N*-substituídas ($\text{CH}_3\text{CH}=\text{NR}$). Baseando-se que os resultados apresentados para estas duas aminas foram semelhantes, não foram realizadas as reações das outras com este agente acilante.

Fundamentado em dados de literatura com relação ao uso de CAL como catalisador em aminólise enantiosseletiva de aminas racêmicas utilizou-se o acetato de etila como agente acilante para as aminas **10** a **15**, Figura 39.

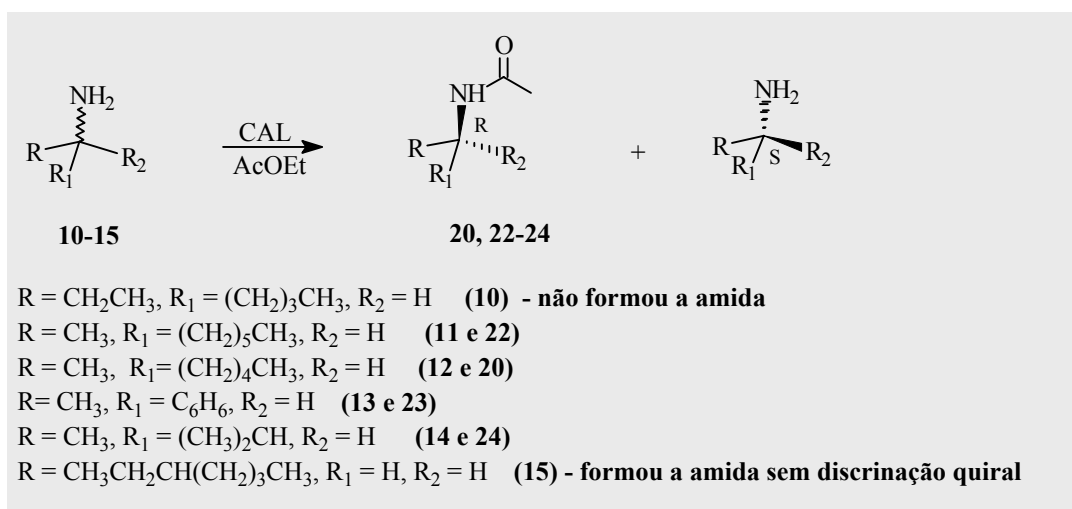


Figura 39- Aminólise enantiosseletiva de aminas racêmicas utilizando CAL como catalisador e acetato de etila como agente acilante.

A porcentagem de conversão a produto foi determinada por RMN^1H conforme exemplificado para 1-metilexilamina (**12**) pela integração da área dos sinais em 3,0 ppm (a) e 3,9 ppm (b) correspondente ao hidrogênio metínico da amina e da amida, respectivamente, Figura 40.

Os dados experimentais obtidos para a resolução biocatalítica das aminas (**10** a **15**) estão reportados na Tabela 21. Foi verificado que o grau de enantiosseletividade depende

da estrutura da amina, e dentre as discriminadas enantiomericamente a seletividade da CAL sempre foi para o enantiômero R da amina.

A configuração absoluta das aminas remanescentes e amidas foi determinada por comparação com dados da literatura e por analogia com os resultados obtidos para **23**. A partir de um padrão enantiomericamente puro da amina **13** foi possível sintetizar a amida S-**23** com o mesmo padrão de pureza. Desta forma, através do tempo de retenção de S-**23** e do produto obtido da reação de aminólise biocatalítica foi possível determinada a configuração absoluta do enantiômero mais reativo.

Através da inspeção dos cromatogramas obtidos para o racemato, forma S e para mistura da reação, fica evidente que o enantiômero R reagiu preferencialmente na presença de CAL, Figura 41.

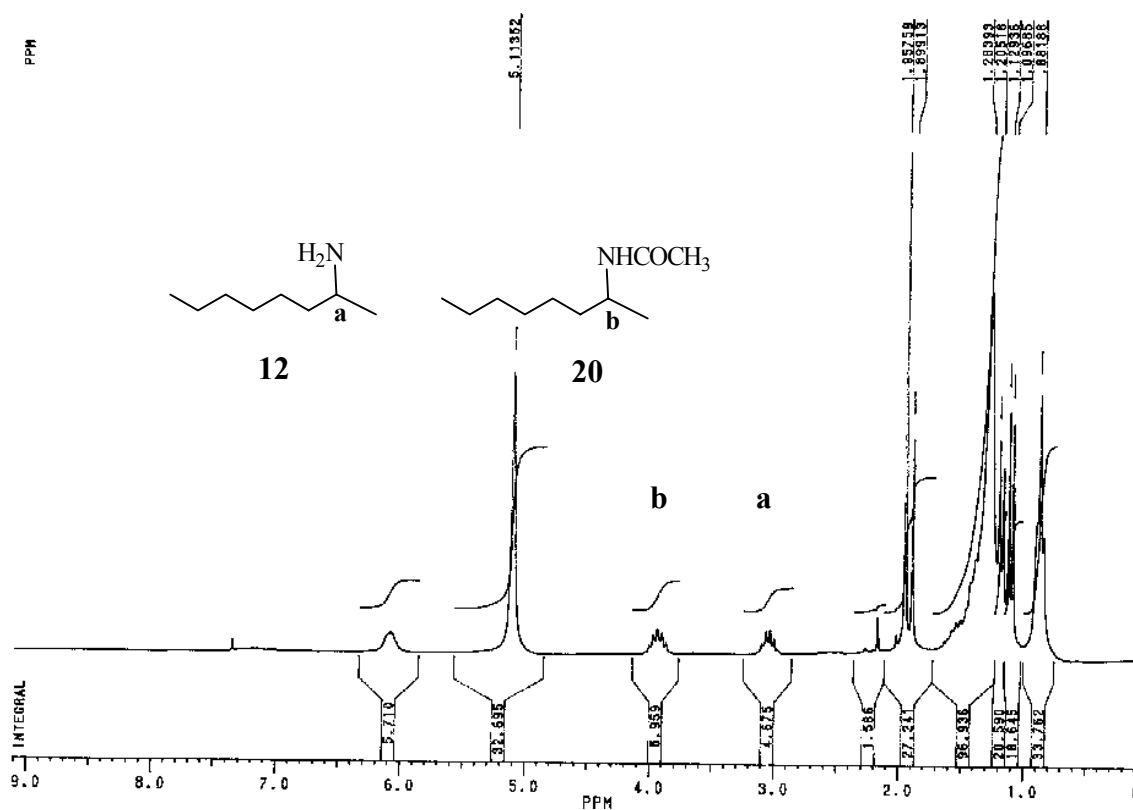


Figura 40- Espectro de RMN¹H do meio reacional de **12** e acetato de etila (CDCl₃ 200 MHz)

Com base nos dados reportados anteriormente atribuiu-se a configuração R para todas as demais amidas. Esta atribuição também está de acordo com os dados relatados por Baldessari e col. que relataram que a CAL reage preferencialmente com enantiômero R da amina, e assim obteve-se aminas S e amidas R [179].

Neste trabalho, o desvio no plano da luz polarizada provocado pelas amidas **20**, **22**, **23** e **24** foi para a direita (+), enquanto que as aminas desviram para a esquerda (-), estes resultados estão de acordo com os resultados obtidos por Kazlauskas e col.[101].

Tabela 21- Valores de porcentagem de conversão, eep e ees para as reações de aminólise catalisada pela lipase de *Candida antarctica*.

Amidas	Aminas	c (%) ^a	eep ^b (%)	Ees ^b (%)	E ^c
n.d. ^d	10	---	---	---	---
22	11	41	91	62	40
20	12	42	95	68	79
23	13	20	94	40	24
24	14	51	88	93	53
21	15	45	---	---	---

Condições experimentais: 2mmol de amina e 8 mmol de acetato de etila, 5 mL de éter etílico desidratado, 100 mg de CAL, 35°C e t = 48h.

a. Determinada por RMN¹H;

b. Determinado por CGQ;

c. Calculado conforme Equações descritas na 2 e 3 [pág. 6];

d. não detectada.

As sínteses químicas freqüentemente usam proteases e lipases como catalisadores enantio- e regioseletivos. Para simplificar o uso destes catalisadores, os químicos desenvolveram regras, ou generalizações, sobre sua seletividade. Por exemplo, muitos pesquisadores propuseram regras para predizer qual enantiômero de um álcool secundário reage mais rapidamente em reações catalisadas por lipases [180].

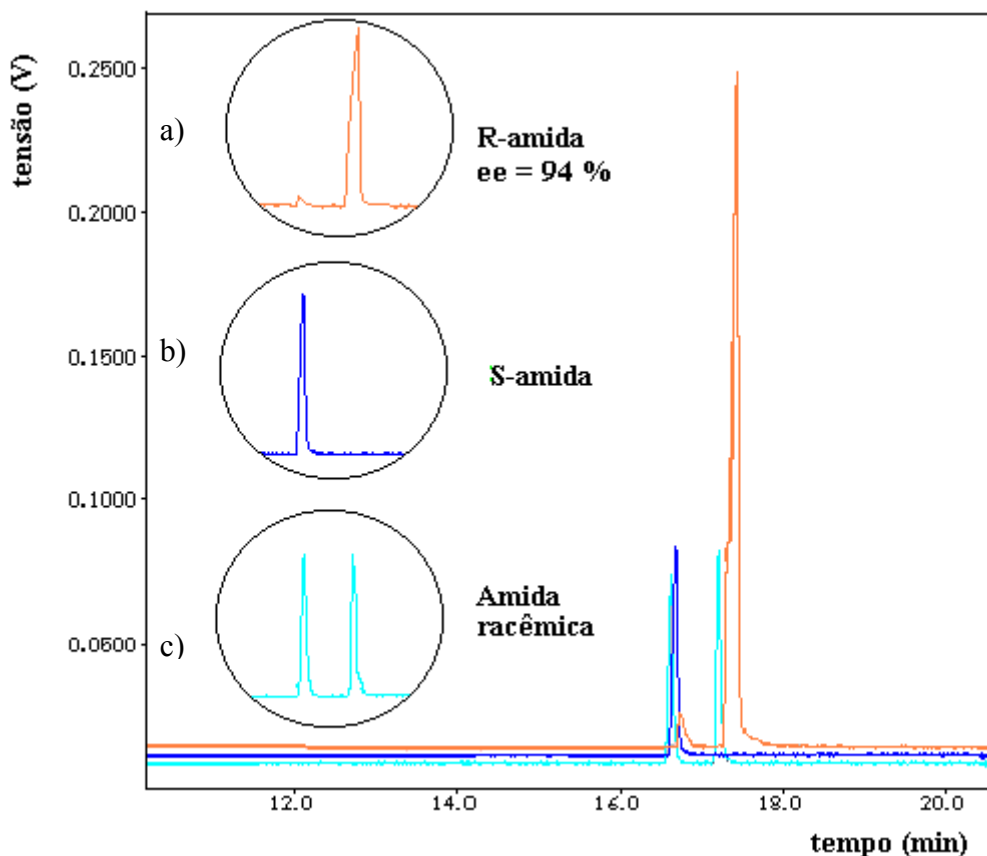


Figura 41- Cromatograma parcial de (1-feniletil)acetamida (**23**) obtido em CGQ. a) racemato; b) S-**23** e c) R-**23** (obtida via enzimática). $P_{H_2} = 75 \text{ KPa}$, $T_i = 250^\circ\text{C}$, Det. = 280°C , 90°C $5^\circ\text{C}/\text{min}$ 150°C (5 min) $3^\circ\text{C}/\text{min}$ 200°C .

Uma regra simples é mostrada na Figura 42, observando somente os tamanhos relativos dos substituintes, mas algumas também incluem polaridade ou restrições para os tamanhos específicos dos substituintes. Estas regras têm ajudado os químicos a usarem as lipases como catalisadores, já que sugerem que estas enzimas discriminam entre enantiômeros principalmente pelos tamanhos dos substituintes. Por exemplo, as resoluções de álcoois secundários onde ambos L e M tem tamanhos similares são pouco eficientes, e modificações químicas que aumentem a diferença no tamanho freqüentemente resultam em enantiosseletividade aumentada. Smidt e col. sugeriram que uma regra similar pode

também explicar a enantiopreferência de uma lipase entre os enantiômeros de aminas primárias do tipo NH_2CHRR_1 [180].

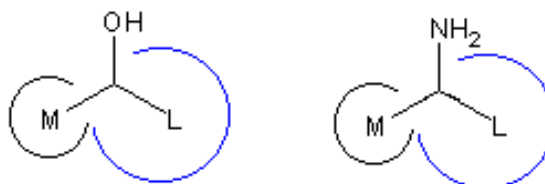


Figura 42 – Regra empírica que prediz a enantiopreferência de lipases entre álcoois secundários e aminas do tipo NH_2CHRR_1 . A lipase favorece o enantiômero com a forma mostrada onde L é o substituinte grande tal como o grupo fenila e M um substituinte médio tal como o grupo metila [180].

A regra empírica que prediz a enantiopreferência de lipases entre álcoois secundários também pode ser aplicada para as aminas (R,S)-1-metiletilamina (**11**), (R,S)-1-metilexilamina (**12**), (R,S)-1-feniletilamina (**13**) e (R,S)-1,2-dimetilpropilamina (**14**) [180].

As amidas **20**, **22**, **23** e **24** foram obtidas com bons excessos enantioméricos, variando de 88 a 95 % e valores de E de 24 a 79. O comportamento mostrado pela CAL na reação de aminólise para as aminas do tipo $\text{NH}_2\text{CHCH}_3\text{R}_1$, **11** a **14**, pode ser devido às mudanças conformacionais na região de ligação do grupo acila pela sua interação com a enzima. Embora as amidas tenham sido obtidas com diferentes excessos enantioméricos, a seletividade da enzima não foi alterada com o tamanho da cadeia alquílica da amina.

O substrato (R,S)-1-etilpentilamina (**10**) não foi reativo nas condições experimentais utilizadas para os demais. Em um outro experimento o tempo reacional foi aumentado de 48 para 144 h e também não foi observada a formação do produto nestas condições. Provavelmente a reação é dificultada pela presença do grupo etila ligado ao

centro estereogênico, sendo uma evidência da interferência do tamanho do substituinte na reatividade. Para as aminas que possuem um grupo metila ao invés do grupo etila, os produtos foram obtidos em excessos enantioméricos, os dados são mostrados na Tabela 21.

Para a (R,S)-2-etilexilamina (**15**) verificou-se que mesma não foi discriminada enantiomericamente pela enzima obtendo-se assim a amida *N*-(2-etilexil)acetamida na forma racêmica. Acredita-se que o grupo metileno entre o centro quiral e o nucleofílico esteja atuando como um espaçador entre os mesmos, diferenciando das demais aminas onde o centro nucleofílico está ligado diretamente ao carbono quiral.

Nas aminas estudadas verificou-se que tanto o tamanho do substituinte M e a posição onde o nitrogênio está ligado foram fatores importantes para alterar a reatividade e enantiosseletividade da CAL.

A enantiosseletividade de CAL na reação de aminólise de aminas racêmicas tendo o acetato de etila como doador acila foi mais significativa para as aminas (**11** a **14**) fornecendo $E = 24$ a 79 com enantiopreferência para o enantiômero R. O doador acila empregado deve ser estável o suficiente para prevenir uma reação espontânea com as aminas a serem resolvidas via enzimática.

A partir dos resultados obtidos nas reações de aminólise biocatalítica, postula-se que os efeitos estéreos e a distância do nitrogênio do centro quiral são importantes na discriminação quiral de aminas racêmicas pela CAL.

5.6 Testes farmacológicos de compostos racêmicos e enantiomericamente puros

A Tabela 22 reporta os valores de DI_{50} e inibição máxima obtidos para todos compostos avaliados no modelo de contorções abdominais em camundongos induzido pelo ácido acético.

Tabela 22 – Valores de DI_{50} e inibição máxima dos compostos estudados.

Compostos	IM ^a	DI_{50} ^b ($\mu\text{mol/Kg}$)
3	78,9	56,6 (81,7-125,9)
4	85,6	<51,27
5	80,7	101,1 (55,7-142,2)
6	88,5	< 8,95
16	93,3	50,2 (33,9-146,3)
27	inativo	---
28	inativo	---
29	84,4	<23,4
30	91,4	35,7 (39,4-116,7)
31	71,4	32,1 (30,3-93,4)
32	85,2	<18,8
33	71,9	29,0 (50,9-123,8)
34	83,3	104,11 (86,7-137,0)
Aspirina	---	133,1 (73,0-243,3) ^c
Acetaminofeno	---	125,0 (104,0-250,0) ^c

a. IM = inibição máxima;

b. DI_{50} = dose de fármaco que reduzem a resposta antinociceptiva em 50 % em relação ao valor do controle;

c. Dados de Malheiros e colaboradores [181].

Para melhor compreensão dos resultados, dividiu-se a discussão dos mesmos avaliando primeiramente os compostos (3 a 6 e 27 a 29) e posteriormente os compostos (16 e 30 a 34).

5.6.1 Avaliação da resposta antinociceptiva dos compostos de 3 a 6 e 27 a 29

Os compostos de 3, 4, 5, 6 e 29 foram efetivos em inibir o processo doloroso induzido por ácido acético. O composto 6 inibiu a dor em 88 % na concentração de 89,57 $\mu\text{mol/Kg}$, os demais compostos (3, 4 e 5) tiveram IM de 78,9, 85,6 % e 80,7 %.

A inibição do processo doloroso ocorreu de forma dose-dependente para os compostos 4, 5, 6 e 29, Figura 43 e 44.

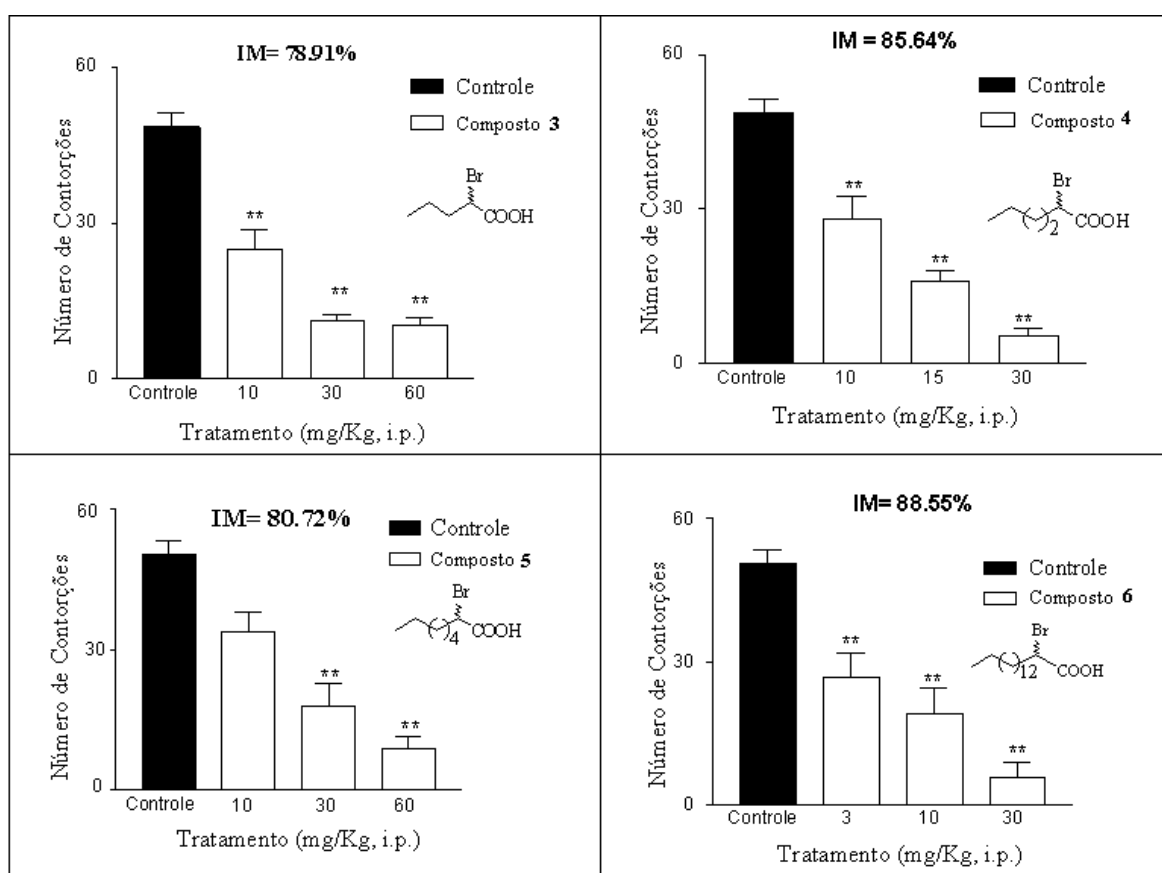


Figura 43 – Atividade antinociceptiva dos ácidos 2-bromoalcanóicos sobre o modelo de contorções abdominais em camundongos induzidas pelo ácido acético por via intraperitoneal.

A DI_{50} exibida pelo composto 6 foi aproximadamente 6 vezes menor que os compostos 3 e 4, 11 vezes para o 5 e 2,7 vezes para o 29, demonstrando claramente a sua potência. A atividade antinociceptiva do composto 6 também foi comparado a fármacos

conhecidos, sendo 15 vezes mais potente do que a aspirina e 14 vezes mais potente do que o acetaminofeno, como mostra a Figura 45.

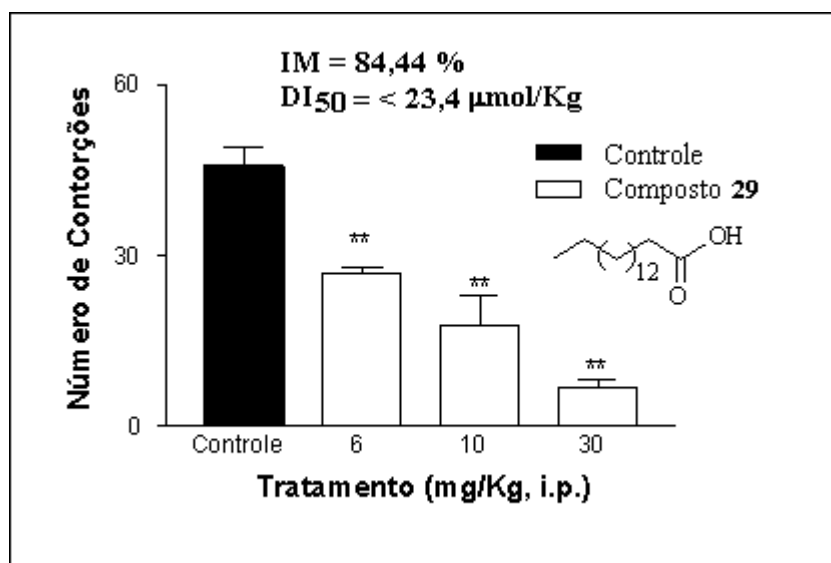


Figura 44 – Atividade antinociceptiva do ácido hexadecanóico sobre o modelo de contorções abdominais em camundongos induzidas pelo ácido acético por via intraperitoneal.

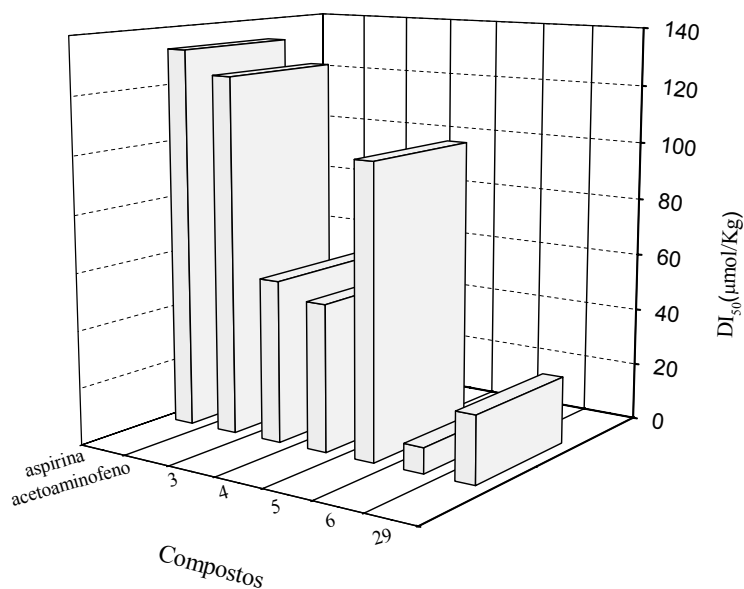


Figura 45- Visualização da atividade antinociceptiva dos compostos de 3, 4, 5, 6 e 29 no modelo de dor induzido pelo ácido acético em camundongos comparados como a aspirina e acetaminofeno.

Os compostos **6** e **29** diferem em suas estruturas apenas no substituinte na posição 2, Br e H, respectivamente. A contribuição do bromo foi bem evidente já que foi observado um aumento na DI_{50} de $< 8,95 \mu\text{mol/Kg}$ para $<23,4 \mu\text{mol/Kg}$. Já a derivatização do composto **6** em ésteres metílico (**27**) e propílico (**28**) resultou na inativação do efeito antinociceptivo. Provavelmente estes compostos são desfavoráveis à interação com o receptor ou outros alvos de ação dos fármacos, tais como: enzima, molécula transportadora e canal iônico.

5.6.2 Amidas derivadas do (R,S)-2-hidroxi(fenil)acetato de metila

Para entender o potencial das contribuições de um substituinte alquila ou grupo funcional de vários perfis de atividades biológicas de um fármaco, é necessário entender os perfis de reatividade e físico-químico dos alcanos.

O tamanho do substituinte alquila nos compostos de **30** a **32** influenciou no resultado da atividade antinociceptiva. Existe uma tendência da DI_{50} diminuir com o aumento da cadeia, Figura 46. Mudando a cadeia alquílica de 4 átomos de carbono ($DI_{50} = 35,7 \mu\text{mol/Kg}$) para 8 ($DI_{50} = 32,1 \mu\text{mol/Kg}$) observou apenas uma pequena variação na DI_{50} . Um efeito mais pronunciado foi observado mudando a cadeia alquílica para 12 átomos de carbono ($DI_{50} = <18,8 \mu\text{mol/Kg}$). Acredita-se que a maior lipofilicidade do composto **32** facilita sua passagem pelas membranas biológicas, as quais são compostas de uma bicamada de fosfolípídeo (com proteínas intercaladas, etc.).

Para avaliar a importância da função amida testou-se o composto de partida das amidas (composto **16**). Os valores de DI_{50} mostraram que todas as amidas derivadas deste éster foram mais potentes. Este experimento mostrou que o grupo amida melhora a resposta da atividade antinociceptiva.

A DI_{50} exibida pelo composto **32** corresponde aproximadamente 2 vezes mais potente do que os compostos **30** e **31**. O composto **32** foi cerca de 7 vezes mais potente do que a aspirina e o acetaminofeno. As demais amidas foram 3,5 vezes mais potentes que aspirina. Como observado, as amidas testadas apresentaram grande potencial analgésico, Figura 47.

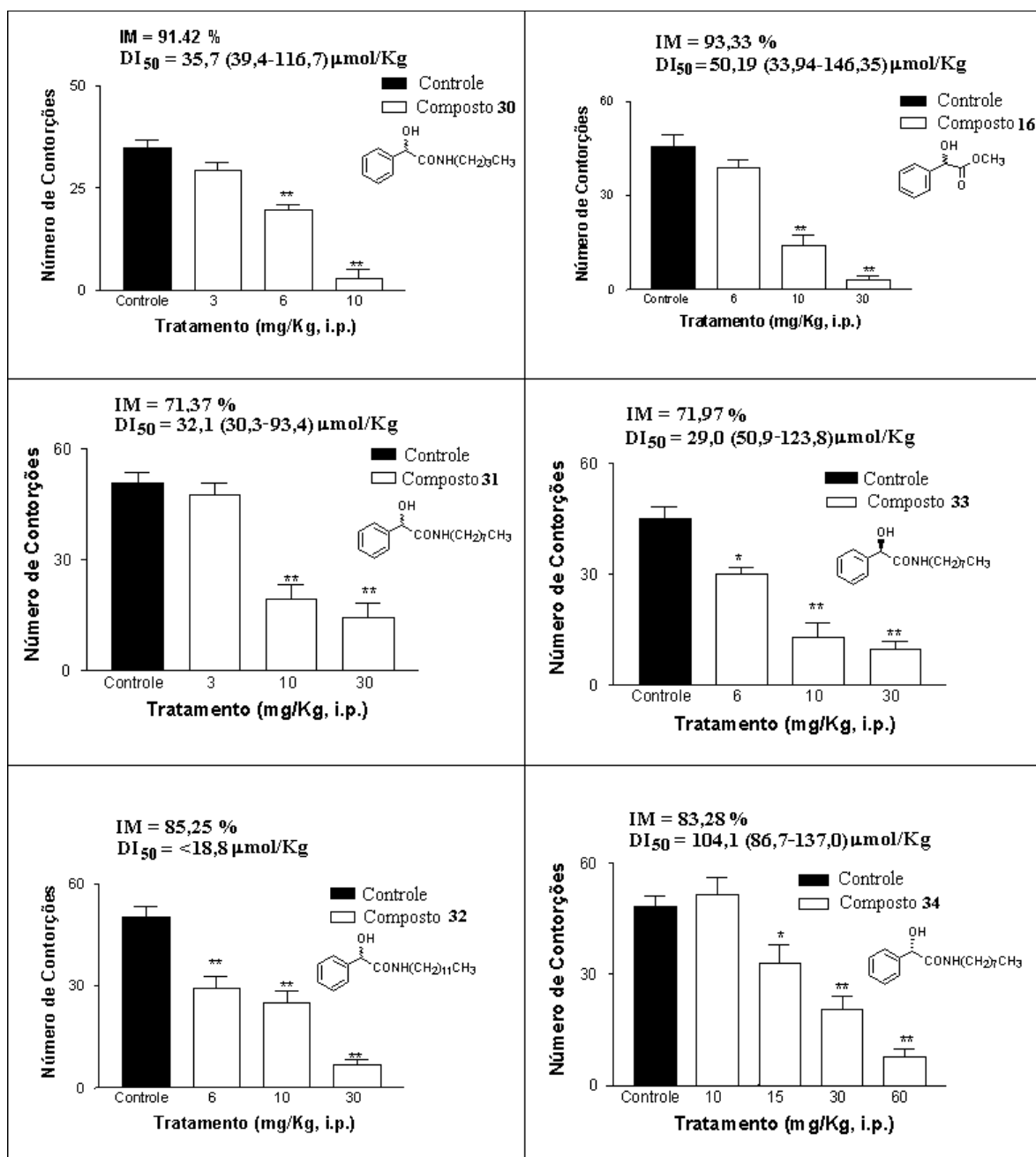


Figura 46 – Atividade antinociceptiva de **16** e derivados amidas enantiomericamente puras (**33** e **34**) e racêmicas (**30** a **32**) sobre a dor induzida pelo ácido acético por via intraperitoneal.

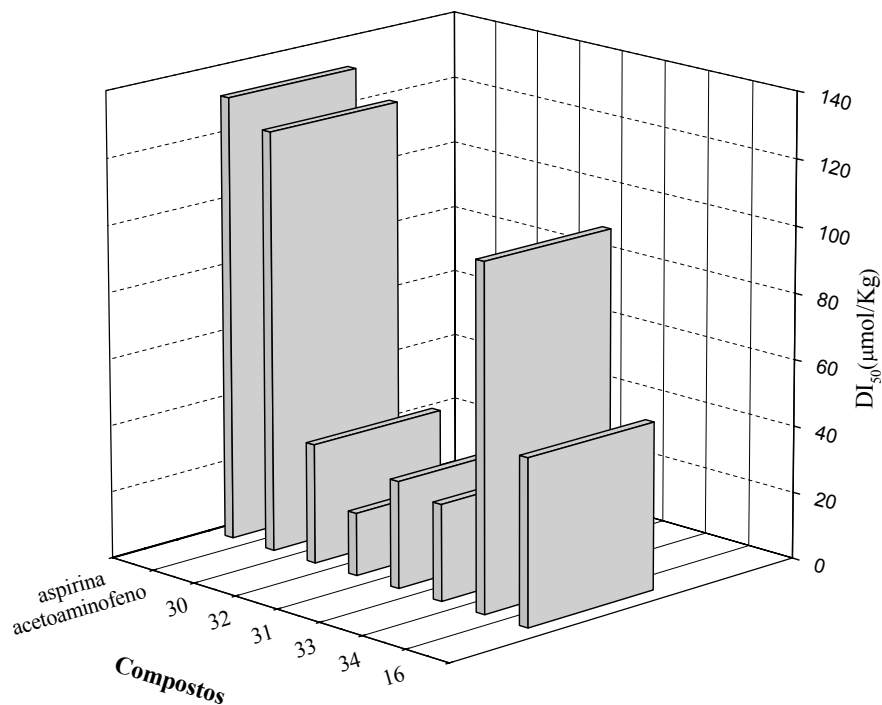


Figura 47- Visualização da atividade antinociceptiva dos compostos **30** a **34** no modelo de contorções abdominais em camundongos induzidas pelo ácido acético comparados com a aspirina e o acetaminofeno.

O conhecimento da configuração absoluta da unidade estereogênica de uma molécula bioativa, particularmente de um fármaco, é indispensável à completa compreensão dos fatores estruturais envolvidos e relacionados com a sua atividade [182].

O teste realizado com as amidas racêmicas produziu um significativo efeito antinociceptivo no modelo de contorções abdominais em camundongos, induzidas pelo ácido acético. Como é de conhecimento que devido à natureza protéica, os biorreceptores são enantioespecíficos, discriminando os enantiômeros, logo em misturas racêmicas podem compreender apenas um enantiômero bioativo [182]. Para verificar a eficácia e potência de

cada enantiômero do composto **16** no modelo de dor induzida pelo ácido acético, testou-se os compostos **33** e **34**, os quais correspondem aos isômeros R e S, respectivamente.

Para analisar-se a potência de um fármaco é necessário comparar a sua eficiência na mesma concentração. Observou que o composto **33** (enantiômero R) produz inibição das contorções na concentração de 10 mg/Kg, sendo que o composto **34** (enantiômero S) apresentou inibição igual ao controle nesta mesma concentração, Figura 44. A DI_{50} exibida pelo composto **33** corresponde praticamente à potência apresentada pelo **31**, mas aproximadamente 3,5 vezes maior que o **34**. O composto **33** também foi mais potente do que a aspirina (4,5 vezes) e acetaminofeno (4,3 vezes). Estes resultados sugerem que ambos enantiômeros do composto **30** são responsáveis pela atividade antinociceptiva, sendo o enantiômero R mais eficaz, Figura 47.

A importância deste teste foi avaliar o potencial de cada enantiômero separadamente, visto que um pode não apresentar nenhuma atividade relacionada ao enantiômero bioativo, ou apresentar um perfil farmacológico distinto e/ou propriedades tóxicas.

6 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos no presente trabalho permitiram as seguintes conclusões:

A PSL imobilizada em filme de PEO forneceu uma excelente metodologia para a produção de (S)-(+)-acetiloxi(fenil)acetato de metila em escala laboratorial através da reação de acetilação de hidroxifenilacetato de metila. Além disso, o suporte aumentou a reatividade de PSL, quando comparada com a forma livre e imobilizada em gel de ágar. O sistema também pode ser reutilizado por três vezes sem perda significativa na reatividade e enantiosseletividade da enzima.

A CRL imobilizada em PEO não mostrou melhora na reatividade e enantiosseletividade na resolução do ácido 2-(4-clorofenoxi)propiónico quando comparada com a enzima livre. Entretanto, em ambos os sistemas foi possível alcançar uma boa enantiosseletividade.

O suporte pode influenciar na reatividade e enantiosseletividade da enzima e dependendo da origem desta pode ser para melhor, inalterado ou para pior, conforme relatado anteriormente.

As reações de aminólise de hidroxifenilacetato de metila e 2-(4-clorofenoxi)propionato de metila utilizando CAL ocorreram com baixa enantiosseletividade e com a PSL não foi verificada a formação de produtos. Logo, a CAL pode ser usada como alternativa para preparação de amidas funcionalizadas, em condições brandas.

A obtenção dos ácidos 2 e 3-alkilalcanóicos opticamente puros não foi alcançada com sucesso usando CAL e PSL. O excesso enantiomérico máximo de 71 % foi obtido para o ácido 2-metilpentanóico através da reação de esterificação catalisada por PSL

imobilizada em PEO. Os ácidos 2-bromoalcanóicos também não foram obtidos com alta pureza ótica usando as enzimas CRL, PSL e CAL. Os melhores resultados foram obtidos com os ácidos 2-bromooctanóico e 2-bromoexadecanóico usando PSL imobilizada em gel de ágar, evidenciando que os ácidos de cadeia maiores são os melhores substratos para esta enzima.

A enantiopreferência oposta mostrada por CAL e PSL nas resoluções dos ácidos racêmicos pode ser utilizada para obter ambos enantiômeros de um substrato, se condições ótimas de síntese forem obtidas em trabalhos futuros.

A resolução das aminas racêmicas através da reação de aminólise catalisada por CAL sucedeu com bons resultados para 1-metilheptilamina, 1-metiexilamina, 1-feniletilamina, 1,2-dimetilpropilamina. Os valores de E variaram de 24 a 79, utilizando o acetato de etila como doador acila. O efeito estereo e o tamanho dos substituintes foram fatores importantes na reatividade e enantiosseletividade de CAL, conforme evidenciado para 1-etilpentilamina e 2-etilexilamina.

Dentre os compostos testados no modelo das contorções abdominais em camundongos induzidas pelo ácido acético, somente 2-bromoexadecanoato de metila e propila não foram eficientes, isto é, não inibiram os processos dolorosos causados pelo ácido acético. Os ácidos (R,S)- 2-bromopentanóico, (R,S)- 2-bromoexanóico, (R,S)- 2-bromopentanóico, (R,S)- 2-bromooctanóico, (R,S)- 2-bromoexadecanóico e hexadecanóico; (R,S)- hidroxifenilacetato de metila, (R,S)- N-butil-2-hidroxi-2-fenilacetamida, (R,S)- N-octil-2-hidroxi-2-fenilacetamida, (R,S)- N-dodecil-2-hidroxi-2-fenilacetamida, (R)- N-octil-2-hidroxi-2-fenilacetamida e (S)- N-octil-2-hidroxi-2-fenilacetamida foram todos mais potentes que a aspirina e o acetaminofeno, sendo que o (R,S)- 2-bromoexadecanóico foi o mais potente de todos.

7 PERSPECTIVAS

Os resultados obtidos no modelo de contorções abdominais em camundongos induzidas pelo ácido acético por via i.p., com os ácidos 2-bromoalcanóicos e com as amidas são promissores do ponto de vista farmacológico, sendo a continuação deste trabalho importante para determinar o mecanismo de ação destes compostos.

Novos estudos para a resolução do ácido 2-bromoexadecanóico empregando as enzimas PSL e CAL e utilizando RMN ^1H com seletores quirais como método analítico para determinar o excesso enantiomérico do ácido possibilitará obter tanto o enantiômero R e S do ácido 2-bromoexadecanóico já que CAL e PSL apresentaram enantiopreferência oposta. De posse dos enantiômeros R e S do ácido 2-bromoexadecanóico, os mesmos poderão ser utilizados em testes farmacológicos e comparados com os resultados já obtidos para a forma racêmica do ácido. Vale salientar que este ácido apresentou excelente efeito antinociceptivo no modelo de contorções abdominais em camundongos induzidas pelo ácido acético por via intraperitoneal.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. <http://www.pasteur.fr>, acessado em 02/09/2002.
2. Bon, E.P.S., Pereira, N. J., *Aplicações Industriais de Biocatalisadores*, in *Tecnologia Enzimática*. 1999: Rio de Janeiro. p. 52-82.
3. www.ub.rug.nl/eldoc/dis/science/e.keller/c1.pdf, Acessado em 15/10/2002.
4. QMCWEB, *Prêmio Nobel de Química 2001*. Disponível em: www.qmcweb.ufsc.br, Acessado em: 15 de abril de 2002.
5. Sheldon, R.A., in *Chirotechnology - industrial synthesis of optically active compounds*. 1993, Marcel Dekker Inc.: New York. p. 39.
6. Blaser, H.-U., *The chiral pool as a source of enantioselective catalysts and auxiliaries*. Chem. Rev., 1992. **92**: p. 935-952.
7. Collis, A.N., Sherdrake, G. N., Crosby, J. Eds., in *Chirality in Industry II*. 1997: Chichester.
8. Faber, K., *Biocatalytic applications*, in *Biotransformations in organic chemistry*. 1997, Springer. p. 27-116.
9. Chen, C.-S., Fujimoto, Y., et al., *Quantitative analyses of biochemical kinetic resolution of enantiomers*. J. Am. Chem. Soc., 1982. **104**: p. 7294-7299.
10. Chen, C.-S.W., S-H.; et al., *Quantitative analyses of biochemical kinetic resolution of enantiomers. 2. Enzyme-catalyzed esterifications in water-organic solvent biphasic systems*. J. Am. Chem. Soc., 1987. **109**: p. 2812-2817.
11. Rakels, J.J., Straathof, A. J. J., Heijnen, J. J., *A simple method to determine the enantiomeric ratio in enantioselective biocatalysis*. Enz. Microb. Technol., 1993. **15**: p. 1051-1056.
12. Faber, K., *Biotransformations in organic chemistry*. 1997, Sringer-Verlag New York INC.: New York.
13. Aitken, R.A., Kilényi, S. N., *Asymmetric synthesis*. 1 ed, ed. L.C. Hall. 1992. 233.
14. Persson, B.A., Larsson, A. E. L. , Ray, M. L., Bäckvall, J-E., *Ruthenium and enzyme catalyzed dynamic kinetic resolution of secondary alcohols*. J. Am. Chem. Soc., 1999. **121**: p. 1645-1650.

15. Costa, V.E.U., Axt, M., *Mixtures of chiral and achiral chemical shift reagents of europium and their benefits for the determination of enantiomeric purity*. Magn. Reson. Chem., 1996. **34**: p. 929-931.
16. Axt, M., Alifantes, J., Costa, V. E. U., *Use of chiral lanthanide shift reagents in the elucidation of NMR signals from enantiomeric mixtures of polycyclic compounds*. J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2, 1999. **12**: p. 2783-2788.
17. Stryer, L., *Bioquímica*. 4 ed, editora E.G.K. S.A. 1996, Rio de Janeiro, 215.
18. Campbell, M.K., *Biochemistry*. 2 ed., Orlando - USA: Harcourt Brace College. 137.
19. Champe, P.C., Harvey, R. A., *Bioquímica Ilustrada*. 2 ed., editora Artes Médicas, 1997, Porto Alegre.
20. <http://www.expasy.ch/sprot/enzyme.html>. 2002.
21. Hernaiz, M.J.S.-M., J. M., Sinisterra, J. V., *Comparasion of the enzymatic activity of commercial and semipurified lipase of Candida cylindracea in the hydrolysis of the esters of (R,S)-2-aryl propionic acids*. Tetrahedron, 1994. **50**: p. 10749-10760.
22. Wu, S.-H., Guo, Z. -W, Sih, C. J., *Enhancing the enantioselectivity of Candida lipase catalyzed esters hydrolysis via noncovalent enzyme modifications*. J. Am. Chem. Soc., 1990. **112**: p. 1990-1995.
23. Wong, C.-H., Whitesides, M., *Enzymes in synthetic organic chemistry*. Vol. 12. 1994: Pergamon.
24. Palmer, T., *Specificity of enzyme action*, in *Understanding enzymes*. 1995, Prentice Hall - Ellis Horwood. p. 67-75.
25. Yamaguchi, S., Mase, T., *High yield synthesis of monoglyceride by mono and diacyl glycerol lipase from Penicillium camembertii U-150*. J. Ferment. Bioeng., 1991. **72**: p. 162-167.
26. Linko, Y.-., Y.-., Lamsa, M., Linko, P., *Lipase catalysed transesterification of rapeseed oil and 2-ethyl-1-ethanol*. J. Am. Oil Chem. Soc., 1994. **71**: p. 1411-1414.
27. Talon, R., Montel, M. -C., Berdague, J. -L., *Production of flavour ester by lipase of Staphilococcus varneri ans S. Xylosus*. Enzyme Microbiol. Technol., 1196. **19**: p. 620-622.
28. Wang, Y.J., Shu, J. Y., Wang, F. F., Shaw, J. F., *Lipase catalysed oil hydrolysis in the absence of added emulsifier*. Biotechnol. Bioeng., 1988. **31**: p. 628-633.

29. Yang, D., Rhee, S. S., *Continuous hydrolysis of olive oil by immobilized lipase in organic solvent*. Biotechnol. Bioeng., 1992. **40**: p. 748-752.
30. Talon, R., Montel, M. C., Gandermer, G., Viau, M., Cantonnet, M., *Lypolysis of pork fat by Staphylococcus warneri, Staphylococcus saprophyticus and Micrococcus varians*. Appl. Microbiol. Biotechnol., 1993. **38**: p. 606-609.
31. Plou, J.F., Barandiaran, M., Calvo, M. V., Ballesteros, A., Pastor, E., *High yield production of mono and dioleyglycerol by lipase catalyzed hydrolysis of triolein*. Enzyme Microb. Technol., 1996. **18**: p. 66-71.
32. Kim, K.K., Song, H. K., Shin, D. H., Hwang, K. Y., Suh, S. W., *The crystal structure of a triacylglycerol lipase from Pseudomonas cepacia reveals a highly open conformation in the absence of a bound inhibitor*. Structure, 1997. **5**: p. 173-185.
33. Sonnet, P.E., *Kinetic resolutions of aliphatic alcohols with a fungal lipase from Mucor miehei*. J. Org. Chem., 1987. **52**: p. 3477-3479.
34. Stokes, T.M., Oehlschlager, C., *Enzymes reactions in apolar solvents: the resolution of (±)-sucatol with porcine pancreatic lipase*. Tetrahedron Lett., 1987. **28**: p. 2091-2094.
35. Sugai, T., Ohta, H., et al., *A single preparation of R-2-hydroxy-4-phenyl butanoic acid*. Agric. Biol. Chem., 1991. **55**: p. 293-294.
36. García, M.J., Rebolledo, F., Gotor, V., *Practical enzymatic route to optically active 3-hydroxiamides. Synthesis of 1,3-aminoalcohols*. Tetrahedron Assym., 1993. **4**: p. 2199-2210.
37. Quiros, M., Sanchez, V. M., Bieva, R., Rebolledo, F., Gotor, V., *Lipase catalyzed synthesis of optically active amides in organic media*. Tetrahedron Assymetr., 1993. **4**: p. 1105-1112.
38. Santaniello, E., Ferrabochi, P., Grisenti, P., *Lipase catalysed transesterifications in organic solvents: application to the preparation of enantiomerically pure compounds*. Enzyme Microb. Technol., 1993. **15**: p. 367-382.
39. Forutani, T., Masakatsu, F., Ooshima, H., Kato, J., *N-acylation of amino alcohol by acyl migrations following enzyme catalyzed esterification*. Enz. Microb. Technol., 1996. **19**: p. 578-584.
40. Wu, Y.X., Jaaskelainen, S., Linko, Y. -Y., *An investigation of crude lipases for hydrolysis, esterification and transesterification*. Enz. Microb. Technol., 1996. **19**: p. 223-226.

41. Sugai, T., Kakeya, H. Ohta, H., et al., *A synthesis of (-)-deoxypodocarpic acid methyl ester via an enzymatic enantioselective hydrolysis of the key intermediate enol ester*. Tetrahedron Lett., 1989. **45**: p. 6135.
42. Costa, V.E.U., Amorim, H. L. N., *O emprego de lipases como agentes de resolução cinética de enantiômeros em síntese orgânica: aspectos gerais sobre a influência do solvente*. Quim. Nova, 1999. **22**: p. 863-873.
43. Schmid, R.D., Verger, R., *Lipases: interfacial enzymes with attractive applications*. Angew. Chem. Int. Ed., 1998. **37**: p. 1608-1633.
44. Zoete, M.C., Kock-Van Dalen, A. C., VAN RANTWIJK, et al., *A new enzymatic reaction: enzyme catalyzed ammonolysis of carboxylic esters*. Biocatalysis, 1994. **10**: p. 307-316.
45. Kirchner, G.S., M. P.; Klivanov, A. M. *Resolution of racemic mixtures via lipase catalysis in organic solvent*. J. Am. Chem. Soc., 107, **1985**, 7072-7076.
46. Wang, Y.F., Lalonde, J.J., Momongan, M., et al., *Lipase catalyzed irreversible transesterifications using enol esters as acylating reagents: preparative enantio and regioselective synthesis of alcohols, glycerol derivatives, sugar and organometallics*. J. Am. Chem. Soc., 1988. **110**: p. 7200-7205.
47. Faber, K., Riva, S., *Enzyme catalyzed irreversible acyl transfer*. Synthesis, 1992: p. 895-910.
48. Fang, J.M., Wong, C. H., *Enzymes in organic syntheses: alteration of reversible reactions to irreversible process*. Syn Letters, 1994. **6**: p. 393-402.
49. Queiroz, N., Nascimento, M. G., *Pseudomonas sp. lipase immobilized in polymers versus the use of free enzyme in the resolution of (R,S)-methyl mandelate*. Tetrahedron Lett., 2002. **43**: p. 5225-5227.
50. Miyazawa, T., Kutita, S., Shimaoka, M., Ueji, S., Yamada, T., *Resolution of racemic carboxylic acids via the lipase-catalyzed irreversible transesterification of vinyl esters*. Chirality, 1999. **11**: p. 554-560.
51. Berlund, P., Holmquist, M., Hult, K, *Reversed enantiopreference of Candida rugosa lipase supports different modes of binding enantiomers of a chiral acyl donor*. J. Mol. Catalysis B: Enzymatic, 1998. **5**: p. 283-287.
52. Colton, I., Ahmed, S. N., Kazlauskas, R. J., *2-propanol treatment increases the enantioselectivity of Candida rugosa lipase toward esters of chiral carboxylic acids*. J. Org. Chem., 1995. **60**: p. 212-217.

53. Yang, H., Henke, E., Bornscheuer, U. Y., *The use of vinyl esters significantly enhanced enantioselectivities and reaction rates in lipase catalyzed resolutions of arylaliphatic carboxylic acids*. J. Org. Chem., 1999: p. 1709-1712.
54. Yasufuku, Y., Ueji, S. -I., *Effect of temperature on lipase-catalyzed esterification in organic solvent*. Biotechn. Lett., 1995: p. 1311-1316.
55. Yasufuku, Y., Ueji, S. -I., *Improvement (5-fold) of enantioselectivity for lipase-catalyzed esterification of a bulky substrate at 57 degrees °C in organic solvent*. Biotechn. Techn., 1996. **10**: p. 625-628.
56. Tranel, F., Haufe, G., *Lipase catalyzed resolution of 2-fluorodecanoic acid*. Tetrahedron Assymetr., 2000. **11**: p. 889-896.
57. Jones, M.M., Williams, J. M., *Dynamic kinetic resolution in the hydrolysis of an alpha-bromo ester*. J. Chem. Commun., 1998. **22**: p. 2519-2520.
58. O'Hagan, D., Rzepa, H. S., *The stereoelectronic influence of fluorine in enzyme resolutions of α -fluoroesters*. J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2, 1994: p. 3-4.
59. Dasaradhi, L., O' Hagan, D., *The effect of aryl fluorines in a lipase resolution*. Bioorg. Med. Chem. Lett., 1993. **3**: p. 1655-1658.
60. Lopez-Belmonte, M.T., Alcantara, A. R., Sinisterra, J., *Enantioselective esterification of 2-arylpropionic acids catalyzed by immobilized Rhizomucor miehei lipase*. J. Org. Chem., 1997. **62**: p. 1831-1840.
61. Palomer, A., Cabré, M., Ginesta, J., Mauleon, D., Carganico, G., *Resolution of rac-ketoprofen esters by enzymatic reactions in organic media*. Chirality, 1993. **5**: p. 320-328.
62. Lalonde, J.J., Govardhan, C., Khalaf, N., Martinez, A. G., Visuri, K., Margolin, A. L., *Cross-linked crystals of Candida rugosa lipase: highly efficient catalysts for the resolution of chiral esters*. J. Am. Chem. Soc., 1995. **117**: p. 6845-6852.
63. Pepin, P., Lortie, R., *Influence of water activity on the enantioselective esterification of (R,S)-ibuprofen by Candida antarctica B in solventless media*. Biotechnol. Bioeng., 1999. **63**: p. 502-505.
64. De Crescenzo, G., Ducret, A., Trani, M., Lortie, R., *Enantioselective esterification of racemic ketoprofen in non-aqueous solvent under reduced pressure*. J. Mol. Catal. B Enzym., 2000. **9**: p. 49-56.
65. Sakaki, K., Giorno, L., Drioli, E., *Lipase catalyzed optical resolution of racemic naproxen in biphasic enzyme membrane reactor*. J. Membr. Sci., 2001. **184**: p. 27-38.

66. Sundholm, O., Kanerva, T., *Enantioselectivity of Pseudomonas cepacia lipase for the acetylation of 2-hydroxy carboxylic acid esters*. *Models Chem.*, 1998. **135**: p. 625-640.
67. Berglund, P., Vörde, C., Högberg, H. -E., *Esterification of 2-methylalkanoic acids catalysed by lipase from Candida rugosa: enantioselectivity as a function of water activity and alcohol chain length*. *Biocatalysis*, 1994. **9**: p. 123-130.
68. Guieysse, D., Salagnad, C., Monsan, P., Remaud-Simeon, M., *Resolution of 2-bromo-*o*-tolyl-carboxylic acid by transesterification using lipases from Rhizomucor miehei and Pseudomonas cepacia*. *Tetrahedron Asymmetr.*, 2001. **12**: p. 2473-2480.
69. Tsai, S.W., Wei, H. J., *Enantioselective esterification of racemic naproxen by lipases in organic solvent*. *Enzyme Microb. Technol.*, 1994. **16**: p. 328-333.
70. Benjamin, S., Pandey, A., *Candida rugosa lipase: molecular biology and versatility in biotechnology*. *Yeast*, 1998. **14**: p. 1069-1087.
71. Verger, R., *Interfacial activation of lipases: facts and artefacts*. TIBTECH, 1997. **15**: p. 32-38.
72. John, V.T., Abraham, G., in *Lipase catalysis and its application: Biocatalysts for industry*. 1991, Plenum Press: New York.
73. Battistel, E., Bianchi D., Cesti, P., Pina, C., *Enzymatic resolution of (S)-(+)-naproxen in a continuous reactor*. *Biotechn. Bioeng.*, 1991. **38**: p. 659-664.
74. Lee, E.G., Chung, B. H., *Chiral resolution using enzymes*. *J. Biotechnol Bioeng*, 2000. **15**: p. 415-422.
75. D'Antona, N., Lombardi, P., Nicolosi, G., Salvo, G., *Large scale preparation of enantiopure S-ketoprofen by biocatalysed kinetic resolution*. *Process Biochemistry*, 2002. **38**: p. 373-377.
76. Kumar, I., Manju, K., Jolly, R. S., *A new biocatalyst for the preparation of enantiomerically pure 2-arylpropanoic acids*. *Tetrahedron Asymmetr.*, 2001. **12**: p. 1431-1434.
77. Lee, E.G., Won, H. S., Chung, B. H., *Enantioselective hydrolysis of racemic naproxen methyl ester by two-step acetone-treated Candida rugosa lipase*. *Process Biochemistry*, 2001. **37**: p. 293-298.
78. Liljeblad, A., Lindborg, J., Kanerva, A., Katajisto, J., Janerva, L. T., *Enantioselective lipase-catalyzed reactions of methyl pipercolinate: transesterification and N-acylation*. *Tetrahedron Lett.*, 2002. **43**: p. 2471-2474.

79. Kalaritis, P., Regenye, R., Partridge, J. J., Coffen, D. L., *Kinetic resolution of 2-substituted esters catalyzed by a lipase Ex. Pseudomonas fluorescens*. J. Org. Chem., 1990. **55**: p. 812-815.
80. Kimura, M., Kuboki, A., Sugai, T., *Chemo-enzymatic synthesis of enantiomerically pure (R)-2-naphthymethoxyacetic acid*. Tetrahedron Asymmetr., 2002. **13**: p. 1059-1068.
81. Sharma, A., Chattopadhyay, S., *Enantio reversal in Candida rugosa lipase catalyzed esterification of 3-hydroxybutyric acid*. J. Mol. Catalysis B: Enzymatic, 2000. **10**: p. 531-534.
82. Berglund, P., Holmquist, M., Hult, K., *Reversed enantioselectivity of Candida rugosa lipase supports different binding of enantiomers of a chiral acyl donor*. J. Mol. Catalysis B: Enzymatic, 1998. **5**: p. 283-287.
83. Nakamura, K., Kinoshita, M., Ohno, A., *Effect of solvent on lipase catalyzed transesterification in organic media*. Tetrahedron, 1994. **50**: p. 4681-4690.
84. Kirchen, G., Scollar, M. D., Klivanov, A. M., *Resolution of racemic mixtures via lipase catalysis in organic solvents*. J. Am. Chem. Soc., 1985. **107**: p. 7072-7076.
85. Degueil-Castaing, M., de Jeso, B., Cronillard, S., Maillard, B., *Enzymatic reactions in organic synthesis: 2- ester interchange of vinyl esters*. Tetrahedron Lett., 1987. **28**: p. 953-954.
86. Bianchi, D., Cesti, P., Battistel, E., *Anhydrides as acylating agents in lipase catalyzed stereoselective esterification of racemic alcohols*. J. Org. Chem., 1988. **53**: p. 5531-5534.
87. Frykman, H., Öhner, N., Norin, T., Hult, K., *S-ethyl thiooctanoate as acyl donor in lipase catalyzed resolution of secondary alcohols*. Tetrahedron Lett., 1993. **34**: p. 1367-1370.
88. Ghogare, A., Kumar, G. S., *Oxime esters as novel irreversible acyl transfer agents for lipase catalysis in organic media*. J. Chem. Soc., Chem. Commun., 1989: p. 1533-1535.
89. Kita, Y., Takabe, Y., Murata, K., Naka, T., Akai, S., *1-Ethoxyvinyl acetate as a novel, highly reactive, and reliable acyl donor for enzymatic resolution of alcohols*. Tetrahedron Lett., 1996. **37**: p. 7369-7372.
90. Zaks, A., Klivanov, A. M., *Enzyme catalyzed processes in organic solvents*. Proc. Natl. Acad. Sci., 1985. **82**: p. 3192-3196.

91. Margolin, A.L., Klibanov, A. M., *Peptide synthesis catalyzed by lipases in anhydrous organic solvents*. J. Am. Chem. Soc., 1987. **109**: p. 3802-3804.
92. West, J.B., Wong, C. -H., *Use of nonproteases in peptide synthesis*. Tetrahedron Letters, 1987. **28**: p. 1629-1632.
93. Gotor, V., Brieva, R., Revollo, F., *A simple procedure for the preparation of chiral amides*. Tetrahedron Letters, 1988. **29**: p. 6973-6974.
94. Tuccio, B., Ferré, F., Comeu, L., *Lipase catalyzed synthesis of N-octyl-alkylamides in organic media*. Tetrahedron Lett., 1991. **32**: p. 2763-2764.
95. Djeghara, Z., Deleuze, H., Jeso, B., *Enzymes in organic synthesis VII: Enzymatic acylation of amines*. Tetrahedron Lett., 1991. **32**: p. 761-762.
96. Bistline, R.G., Bilyk, A., Fearheller, S. H., *Lipase catalyzed formation of fatty amides*. J. Am. Oil Chem. Soc., 1991. **68**: p. 95-98.
97. Kobata, K., Yoshikawa, Y., Kohashi, K., Watanabe, T., *Enzymatic synthesis of capsaicin analogs with liver acetone power*. Tetrahedron Lett., 1996. **37**: p. 2789-2790.
98. Kobata, K., Kawamura, M., Toyoshima, M., Tamura, Y., Ogawa, S., Watanabe, T., *Lipase catalyzed synthesis of capsaicin analogs by amidation of vanillyamine with fatty acid derivatives*. Biotechn. Lett., 1998. **20**: p. 451-454.
99. Kitaguchi, H.F., P. A., *Enzymatic resolution of racemic amines. Crucial role of the solvent*. J. Am. Chem. Soc., 1989. **111**: p. 3094-3095.
100. Gutman, A.L., Meyer, E., Kalerin, E., Polyak, F., Sterling, J., *Resolution of racemic amines in a continuous reactor in organic solvents*. Biotech. Bioeng., 1992. **40**: p. 760-767.
101. Kazlauskas, R.J., Weissfloch, A. N. E., *A structure-based rationalization of the enantioselectivity of subtilisin toward secondary alcohols and isoteric primary amines*. J. Mol. Catalysis B: Enzymatic, 1997. **3**: p. 65-72.
102. Jaeger, K.E., Liebeton, K., Zonta, A., Schimossek, K., Reetz, M. T., *Biotechnological application of Pseudomonas aeruginosa lipase: efficient kinetic resolution of amines and alcohols*. Appl. Microbiol. Biotechnol., 1996. **46**: p. 99-105.
103. Reetz, M.T., Dreisbach, C., *Highly efficient lipase-catalyzed kinetic resolution of chiral amines*. Chimia, 1994. **48**: p. 570.

104. Iglesias, L.E., Sánchez, V. M., Rebolledo, F., Gotor, V., *Candida antarctica B lipase catalysed resolution of (\pm)-1-(heteroaryl)ethylamines*. Tetrahedron Asymmetr., 1997. **8**: p. 2675-2677.
105. Hacking, M.A.P.J., van Rantwijk, F., Sheldon, R. A., *Lipase catalyzed reactions of aliphatic and arylaliphatic carbonic acid esters*. J. Mol. Catal. B Enzym., 2000: p. 201-208.
106. Urdiales, E.G., Rebolledo, F., Gotor, V., *Enzymatic one-pot resolution of two nucleophiles: alcohol and amine*. Tetrahedron: Assymetry, 2000. **11**: p. 1459-1463.
107. Kagan, H.B., in *Asymmetry Synthesis; Morrison, J. D.* 1985, Academic: Orlando. p. 1-39.
108. Coppola G. M., S., H. F., in *Asymmetric Synthesis;*, Wiley, Editor. 1987: New York.
109. Kazlauskas, R.J., Weber, H., *Improving hydrolases for organic synthesis*. Curr. opin. chem. biol., 1998. **2**: p. 121-126.
110. Chapman, D.T., Crout, D. H. G., Mahmoudian, M., Scopes, D. I. C., Smith, P. W., *Enantiomerically pure amine by a new method: biotransformation of oxalamic esters using the lipase from Candida antarctica*. Chem. Commun., 1996: p. 2415-2416.
111. De Castro, M.S., Sinisterra Gago, J. V., *Lipase catalyzed synthesis of chiral amides. A systematic study of the variable that control the synthesis*. Tetrahedron, 1998. **54**: p. 2877-2892.
112. Reetz, M.T., Schimossek, K., *Lipase catalyzed dynamic kinetic resolution of chiral amines: use of palladium as the racemization catalyst*. Chimia, 1996. **50**: p. 668-669.
113. Takaoka, Y., Kajimoto, T., Wong, C. -H., *Inhibition of N-acetylglucosaminyltransfer enzyme: chemical enzymatic synthesis of new five membered acetamido azasugar*. J. Org. Chem., 1993. **58**: p. 4809-4812.
114. Öhrner, N., Orrenius, C., Mattson, A., Norin, T., Hult, K., *Kinetic resolutions of amine and thiol analogues of secondary alcohols catalyzed by the Candida antarctica lipase B*. Enz. Microb. Technol., 1996. **19**: p. 328-331.
115. Alfonso, I., Astorga, C., Rebolledo, F., Gotor, V., *Sequential biocatalytic resolution of (\pm)-trans-cyclohexane-1,2-diamine. Chemoenzymatic synthesis of an optically active polyamine*. Chem. Soc., Chem. Commun., 1996: p. 2471-2472.

116. Castro, M.S., Domínguez, P., Sinisterra, J. V., *Enzymatic amidation and alkoxyacylation of amines using native and immobilised lipases with different origins: a comparative study*. Tetrahedron, 2000. **56**: p. 1387-1391.
117. García, M.J., Rebolledo, F., Gotor, V., *Lipase catalyzed aminolysis and ammonolysis of β -cetoesters. Synthesis of optically active β -cetoamides*. Tetrahedron, 1994. **50**: p. 6935-6940.
118. Jaeger, L.E., Schneidinger, B., Rosenau, F., Werner, M., Lang, D., et. al., *Bacterial lipases for biotechnological applications*. J. Molecular Catalysis B: Enzymatic, 1997. **3**: p. 3-12.
119. Walker, J.M., Gingold, E. B., *Immobilized Biocatalysts*, in *Molecular Biology and Biotechnology*. 1993, Royal Society of Chemistry, UK.
120. Faber, K., *Special techniques*, in *Biotransformations in organic chemistry*. 1997, Springer: Berlin. p. 345-356.
121. Katchalski-Katzir, E., *Immobilized enzymes*. 1973: Cleveland: CRC Press.
122. Pereira, M.E.G.G., Shimabukuro, O. H., Mariano, E. T., Robin, A. R. M. M., Torres, B. P. C., *Biotecnologia*. 1985, São Paulo: Editora Manole Ltda. 220-236.
123. Palmer, T., *Biotechnological applications of enzymes*, in *Understanding Enzymes*. 1995: New York. p. 356-366.
124. Klibanov, A.M., *Immobilized enzymes and cells as practical catalysts*. Science, 1983. **219**: p. 727.
125. Charusheela, A., Arvind, L., *Enzyme catalyzed hydrolysis of esters using reversibly soluble polymer conjugated lipase*. Enzyme Microbiol. Technol., 2002. **30**: p. 19-25.
126. Bryjak, J., Bachmann, K., Pawlow, B., Maliszewska, I., Trochimczuk, A., Kolarz, B. N., *Immobilization of lipase on various acrylic copolymers*. Chem. Eng. J., 1997. **65**: p. 249-256.
127. Inanov, A.E., Schneider, M., *Methods for immobilization of lipases and their use for ester synthesis*. J. Mol. Catal. B Enzym., 1997. **3**: p. 303-309.
128. Plou, J.F., Cruces, M. A., Ferrer, M., Fuentes, G., Pastor, E., Bernabé, M., Christensen, M., Comelles, F., Parra, J. L., Ballesteros, A., *Enzymatic acylation of di- and trisaccharides with fatty acids: choosing the appropriate enzyme, support and solvent*. J. Biotechnol., 2002. **96**: p. 55-66.

129. Gorokhova, I.V., Ivanov, A. E., Zubov, V. P., *Coprecipitation of the Pseudomonas fluorescens lipase with hydrophobic compounds as an approach to its immobilization for catalysis in nonaqueous media*. Russ. J. Bioorg. Chem., 2002. **28**: p. 38-43.
130. Oliveira, P.C., Alve, G., M., Castro, H., F., *Immobilisation studies and catalytic properties of microbial lipase onto styrene-divinylbenzene copolymer*. Biochem.Eng. J., 2000. **5**: p. 63-71.
131. Fishman, A., Zviely, M., *Chemo-enzymatic of (S)- α -cyano-3-phenoy benzyl alcohol*. Tetrahedron Asymmetr., 1998. **9**: p. 107-118.
132. Shriver-Lake, L., Gammeter, W. B., Bang, S. S., Pazirandeh, M., *Covalent binding of genetically engineered microorganisms to porous glass beads*. Analytica Chimica Acta, 2002. **220307**: p. 1-8.
133. Munjal, N., Sawhney, *Stability and properties of mushroom tyrosinase entrapped in alginate, polyacrylamide and gelatin gels*. Enz. Microb. Technol., 2002, **30**: p. 613-619.
134. Queiroz, N., *Aplicações sintéticas de enzimas imobilizadas em organo-gel e gel de ágar*. 1997. 75f., Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Federal de Santa Catarina: Florianópolis.
135. Stamatis, H., Xenakis, A., *Biocatalysis using microemulsion-based polymer gels containing lipase*. J. Mol. Catal. B Enzym., 1999. **6**: p. 399-406.
136. Betigeri, S.S., Neau, S. H., *Immobilization of lipase using hydrophilic polymers in the form of hydrogel beads*. Biomaterials, 2002. **23**: p. 3627-3636.
137. Dashevsky, A., *Protein loss by the microencapsulation of an enzyme (lactase) in alginate beads*. Int. J. Pharm., 1998. **161**: p. 1-5.
138. Knezevic, Z., Bobic, S., Milutinovic, A., Obradovic, B., Mojovic, L., Bugarski, B., *Alginate-immobilized lipase by electrostatic extrusion for the purpose of palm oil hydrolysis in lecithin/isooctane system*. Process Biochem., 2002. **38**: p. 313-318.
139. Doumèche, B., Heinemann, M., Büchs, J., Hartmeier, W., Ansorge-Schumacher, M. B., *Enzymatic catalysis in gel-stabilized two-phase systems: improvement of the solvent phase*. J. Mol. Catal. B Enzym., 2002. **709**: p. 1-9.
140. Bayramoglu, G., Kaçar, Y., Denizli, A., Arica, M. Y., *Covalent immobilization of lipase onto hydrophobic group incorporated poly(2-hydroxymethyl methacrylate) based hydrophilic membrane matrix*. J. Food Eng., 2002. **52**: p. 367-374.

141. Lozano, P., Pérez-Marín, A. B., De Diego, T., Gómez, D., Paolucci-Jeanjean, D., Belleville, M. P., Rios, G. M., Iborra, J. L., *Active membranes coated with immobilized Candida antarctica lipase B: preparation and application for continuous butyl butyrate synthesis in organic media*. J. Membr.Sci., 2002. **201**: p. 55-64.
142. Al-Duri, B., Yong, Y. P., *Lipase immobilisation: an equilibrium study of lipases immobilised on hydrophobic and hydrophilic/hydrophobic supports*. Biochem. Eng. J., 2000. **4**: p. 207-215.
143. Novozymes, *Nova técnica de imobilização: um impulso para as lipases*, in *Biotimes*. 2002. p. 3.
144. Mrani, I., Fras, G., Bénét, J. C., *Microstructure et propriétés hygro-mécaniques du gel d'agar*. J. Phys. III, 1985. **5**: p. 985-998.
145. Neto, P.R.C., Mazzuco, L. M., Nascimento, M. G., *Biotransformação de óleo e gorduras*. Biotecnologia & Ciência e Desenvolvimento, 2001. **19**: p. 28-31.
146. Crespo, J.S., *Imobilização de lipases em materiais poliméricos*. 1999, 79f., Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Federal de Santa Catarina: Florianópolis.
147. Clark, A.H., Ross-Murphy, S. B., *Structural and mechanical properties of biopolymer gels*, in *Advances in Polymer Science*. 1987, Springer Verlag Berlin Heidelberg. p. 107-125.
148. Brady, K., Simom, L. M., Szajáni, B., *Lipase immobilized on a hydrophobic, microporous support for the hydrolysis of fats*. J. Am. Chem. Soc., 1988. **65**: p. 917-921.
149. Chrompack, *CP-chirasil-Dex CB.*, www.chrompack.com, 1999.
150. Kelly, D.R., *The conversion of enantiomeric excesses to percentage enantiomeric ratios*. <http://preprint.chemweb.com/orgchem/0011002>, 2002.
151. Fernandes, S.A., Natchigall, F. F., Lazzarotto, M, Borges, R. B., Porto, A. L. M., Marsaioli, A. J., *Livro de resumos do VII Encontro de Usuários de RMN / I Encontro Luso-Brasileiro*. 2001: p. 59-60.
152. Kawasaki, M., Nakamura, K., Kawabata, S., *Lipase-catalyzed enantioselective deacetylation of ortho-substituted phenyl acetates with 1-butanol in organic solvents*. J. Mol. Catal. B Enzym., 1999. **6**: p. 447-451.

153. Coller, H.O.J., Dinneen, L. C., Johnson, C. A., Schneider, C., *The abdominal constriction response and its suppression by analgesic drugs in the mouse*. Br. J. Pharmacol. Chemother., 1968. **32**: p. 295-310.
154. Bentley, G.A., Newton, S. H., Starr, J., *Evidence for an action of morphine and enkephalin on sensory nerve endings in the mouse peritoneum*. Br. J. Pharmacol., 1981. **73**: p. 325-333.
155. Vogel, A.I., *Textbook of practical organic chemistry*. 5 th ed. 1989: Longman Scientific & Technical. 695-697.
156. Quiros, M., Rebolledo, F., Gotor, V., *Enzymatic selective transformations of diethyl fumarate*. Tetrahedron, 1995. **51**: p. 7715-7720.
157. Yasufuku, Y., Ueji, S.-I., *High temperature-intuced high enantioselectivity of lipase for esterifications of 2-phenoxypropionic acids in organic solvent*. Bioorganic Chemistry, 1997. **25**: p. 88-99.
158. Chen, C.-S., Sih C. J., *General aspects and optimization of enantioselective biocatalysis in organic solvents: the use of lipases*. Angew. Chem. Int. Ed. Engl., 1989. **28**: p. 695-707.
159. Jourdain, F., Hirokawa, T., Kogane, T., *Resolution of (±)-mandelic- and (±)-2-(chlorophenoxy)propionic- acid derivatives by crystallization of their diastereomeric amides with (R)- or (S)-α-arylethylamines*. Tetrahedron Lett., 1999. **40**: p. 2509-2512.
160. Langrand, G., Secchi, M., Buono, G., Baratti, J., Triantaphylides, C.. *Lipase-catalyzed ester formation in organic solvents an easy preparative resolution α-substituted cyclohexanols*. Tetrahedron Lett., 1985. **26**: p. 1857-1860.
161. Faber, K., H. Hoeng, *Programa "Selectivity"*. <http://www.cis.TUGraz.at/orgc>, 2002,
162. Chen, C.-S., Wu, S.-H, Girdaukas, G., Sih C. J., *Quantitative analyses of biochemical kinetic resolution of enantiomers. 2. Enzyme-catalyzed esterifications in water-organic solvent biphasic systems*. J. Am. Chem. Soc., 1987. **109**: p. 2812-2817.
163. Coppola G. M, *α-hidroxy acids in enantioselective syntheses*. 1997, Weinheim, Germany: Wiley-VCH.
164. Ueji, S., Watanabe, Keiichi, Koshiba, T., Nakamura, M., Oh-ishi, K., Yasufuku, Y., Miyazawa, T., *Lipase catalyzed esterification of 2-(4-substituted phenoxy)propionic acids in organic solvents: substituent effect controlling enantioselectivity toward racemic acids*. Biotechn. Lett., 1999. **21**: p. 865-868.

165. Laane, C., Boeren, S., Vos, K., Veeger, C., *Rules for optimization of biocatalysis in organic solvents*. Biotechn. Bioeng., 1987. **30**: p. 81-87.
166. Miyazawa, T., Kutita, S., Shimaoka, M., Ueji, S., Yamada, T., *Resolution of racemic carboxylic acids via the lipase-catalyzed irreversible transesterification of vinyl esters*. Chirality, 2000. **11**: p. 554-560.
167. Strauss, U.T., Faber, K., *Deracemization of (\pm)-mandelic acid using a lipase-mandelate racemase two-enzyme system*. Tetrahedron Asymmetr., 1999. **10**: p. 4079-4081.
168. Kim, B.-Y., Hwang, K.-C., Song, H.-S., Chung, N., Bang, W.-G., *Optical resolution of RS-(\pm)-mandelic acid by Pseudomonas sp.* Biotechn. Lett., 2000. **22**: p. 1871-1875.
169. Koskinen, A.M.P., Klivanov, A. M., *Enzymatic reactions in organic media*. First edition ed. 1996: Blackie Academic & Professional. 9-37.
170. Reslowm, M., Adlercreutz, P., Mattiasson, B., *Modification of the microenvironment of enzymes in organic solvents*. Biocatalysis, 1992. **6**: p. 307-308.
171. Miyazawa, T., Kutita, S., Ueji, S., Yamada, T., *Resolution of mandelic acids by lipase-catalyzed transesterifications in organic media*. Biocatal. Biotransfor., 2000. **17**: p. 459-473.
172. Ress, G.D., Nascimento, M. G., Jenta, T. R. J., Robinson, B. H., *Reverse enzyme synthesis in microemulsion based organo-gels*. Biochim. Biophys. Acta, 1991. **1073**: p. 493-501.
173. Klivanov, A.M., Scollar, M. P., Kirchner, G., *Resolution of racemic mixtures via lipase catalysis in organic solvents*. J. Am. Chem. Soc., 1985. **107**: p. 7072-7076.
174. Hernanz, D., Camps, F., Guerrero, A., Delgado, A., *Synthesis and configurational assignment of (R) and (S)-2-bromohexadecanoic acids*. Tetrahedron Asymmetr., 1995. **6**: p. 2291-2298.
175. Evans, D.A., Britton, T. C., Ellman, J.A., *Contrasteric carboximide hydrolysis with lithium hydroperoxide*. Tetrahedron Lett., 1987. **28**: p. 6141-6144.
176. Guo, J., Knapp, D. W., Boegeman, S., *A practical preparation of enantiomerically pure (R)- and (S)-2-bromohexadecanoic acids*. Tetrahedron Asymmetr., 2000. **11**: p. 4105-4111.
177. Engel, K.H., *Lipase-catalyzed enantioselective esterification of 2-methylalkanoic acids*. Tetrahedron: Asymmetr., 1991. **2**: p. 165-168.

178. Lide, D.R., *CRC Handbook of chemistry and physics*. 76 ed. 1995, New York: CRC Press.
179. Baldessari, A., Mangone, A. P., *One-pot biocatalyzed preparation of substituted amides as intermediates of pharmaceuticals*. *J. Mol. Catal. B Enzym.*, 2001. **11**: p. 335-341.
180. Smidt, H., Fischer, A., Fischer, P., Schmid, R. D., *Preparation of optically pure chiral amines by lipase catalyzed enantioselective hydrolysis of N-acyl amines*. *Biotechnol. Techn.*, 1996. **10**: p. 335-338.
181. Malheiros, A., Chechin Filho, V., Schmitt, C. B., Santos, A. R.S., Scheidt, C., Calixto, J. B., Delle Monaque, F.,unes, R. A., *A sesquiterpene drimane with antinociceptive activity from *Drimys winteri* bark*. *Phytochemistry*, 2001. **57**: p. 103-107.
182. Barreiro, E.J., Fraga, C. A. M., *Química medicinal - As bases moleculares da ação dos fármacos*. 2001, Porto Alegre: Artmed Editora. 133-160.

9 ANEXO - Produção Acadêmica nos Anos de 1997-2002

Artigos

Queiroz, N., Nascimento, M. G., **Organo-gel de heptano: Diagrama de fases e Aplicações Sintéticas.** QN, 1999. 22: p. 335-338.

Queiroz, N., Nascimento, M. G., ***Pseudomonas sp.* lipase immobilized in polymers versus the use of free enzyme in the resolution of (R,S)-methyl mandelate.** Tetrahedron lett., 2002. 43: p. 5225-5227.

Crespo, J. S., Queiroz, N., Nascimento, M. G., Soldi, V., **Synthetic applications of lipases immobilized on poly(ethylene oxide),** Submetido ao J. Mol. Catal.B Enzymatic em 09/2002.

Trabalhos em Congressos

Queiroz, N., Burlin, G. G., Nascimento, M. G., **Gel de ágar e de ágar-galactomanana como suportes para a imobilização de enzimas.** In: Livro de Resumos da 20^a Reunião Anual da SBQ. Poços de Caldas-MG, 1997.

Queiroz, N., Nascimento, M. G., **Atuação de palatase M imobilizada em organo-gel (MBG) e sua eficiência em reações de esterificação.** In: Livro de Resumos da 20^a Reunião Anual da SBQ. Poços de Caldas-MG, 1997.

Queiroz, N., Nascimento, M. G., **Síntese de ésteres catalisada por palatase M imobilizada em gel de ágar e organo-gel (MBG).** In Livro de Resumos da 21^a Reunião Anual da SBQ. Poços de Caldas-MG, 1998.

Queiroz, N., Nascimento, M. G., **Efeito do pH na atividade catalítica de palatase M imobilizada em gel de ágar em sínteses de ésteres alifáticos.** In Livro de Resumos da 21^a Reunião Anual da SBQ. Poços de Caldas-MG, 1998.

Queiroz, N., Nascimento, M. G., **Aplicação sintética de lipases imobilizadas em polímeros e blendas poliméricas.** In: Livro de Resumos da 21^a Reunião Anual da SBQ. Poços de Caldas-MG, 1998.

Queiroz, N., Vieira M. A., Nascimento, M. G., **Palatase M immobilizada em gel de ágar e organo-gel**. In: Livro de Resumos do VI Encontro de Química da Região Sul. Maringá-PR, 1998.

Jesus, P. C., João, J. J., Queiroz, N., Nascimento, M. G., **Estudo cinético da adsorção da lipase *Candida Cilindracea* em crisotila**. In: Livro de Resumos da 22^a Reunião Anual da SBQ. Poços de Caldas-MG, 1999.

Vieira, M. A., Queiroz, N., Nascimento, M. G., **Imobilização de papaína em crisotila**. In: Livro de Resumos do VII Encontro de Química da Região Sul. Tubarão-SC, 1999.

Vieira, M. A., Queiroz, N., Nascimento, M. G., **Estudo de adsorção de papaína em crisotila e aplicações sintéticas**. In: Livro de Resumos da 23^a Reunião Anual da SBQ. Poços de Caldas-MG, 2000.

Vieira, M. A., Queiroz, N., Nascimento, M. G., **Reações de transesterificação com o 3-aminopropanol-1 via enzimática**. In: Livro de Resumos do VIII Encontro de Química da Região Sul. Santa Cruz do Sul-SC, 2000.

Vieira, M. A., Queiroz, N., Nascimento, M. G., **Reações de transesterificação de ésteres alquílicos com o 3-aminopropanol-1 catalisada por lipases**. In: Livro de Resumos da 24^a Reunião Anual da SBQ. Poços de Caldas-MG, 2001.

Queiroz, N., Nascimento, M. G., **Resolution of (R,S)-methyl mandelate by *Pseudomonas sp.*** In: 9th Brazilian meeting on organic synthesis. Curitiba-PR, 2001.

Queiroz, N., Nascimento, M. G., **Resolução do R,S-mandelato de metila através de de aminólise biocatalítica**. In: Livro de Resumos do IX Encontro de Química da Região Sul. Londrina - PR, 2001.

Coelho, J. C., Queiroz, N., Nascimento, M. G., **Síntese de amidas oticamente ativas catalisadas por lipase de *Candida antarctica***. In: Livro de Resumos da 25^a Reunião Anual da SBQ. Poços de Caldas-MG, 2002.

Fernandes, S. A., Laverde, A., Queiroz, N., Coelho, J. C., Nascimento, M. G., Fujiwara, F. Y., Marsaioli, A. J., **Discriminação enantiomérica do ácido α -bromopalmítico na presença de seletores quirais empregando RMN ¹H**. In: Livro de Resumos da VII Jornada Brasileira de Ressonância Magnética, Maringá, 2002.